ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

วิทยานิพนธ์

ของ

สายทอง สมบัติภูธร

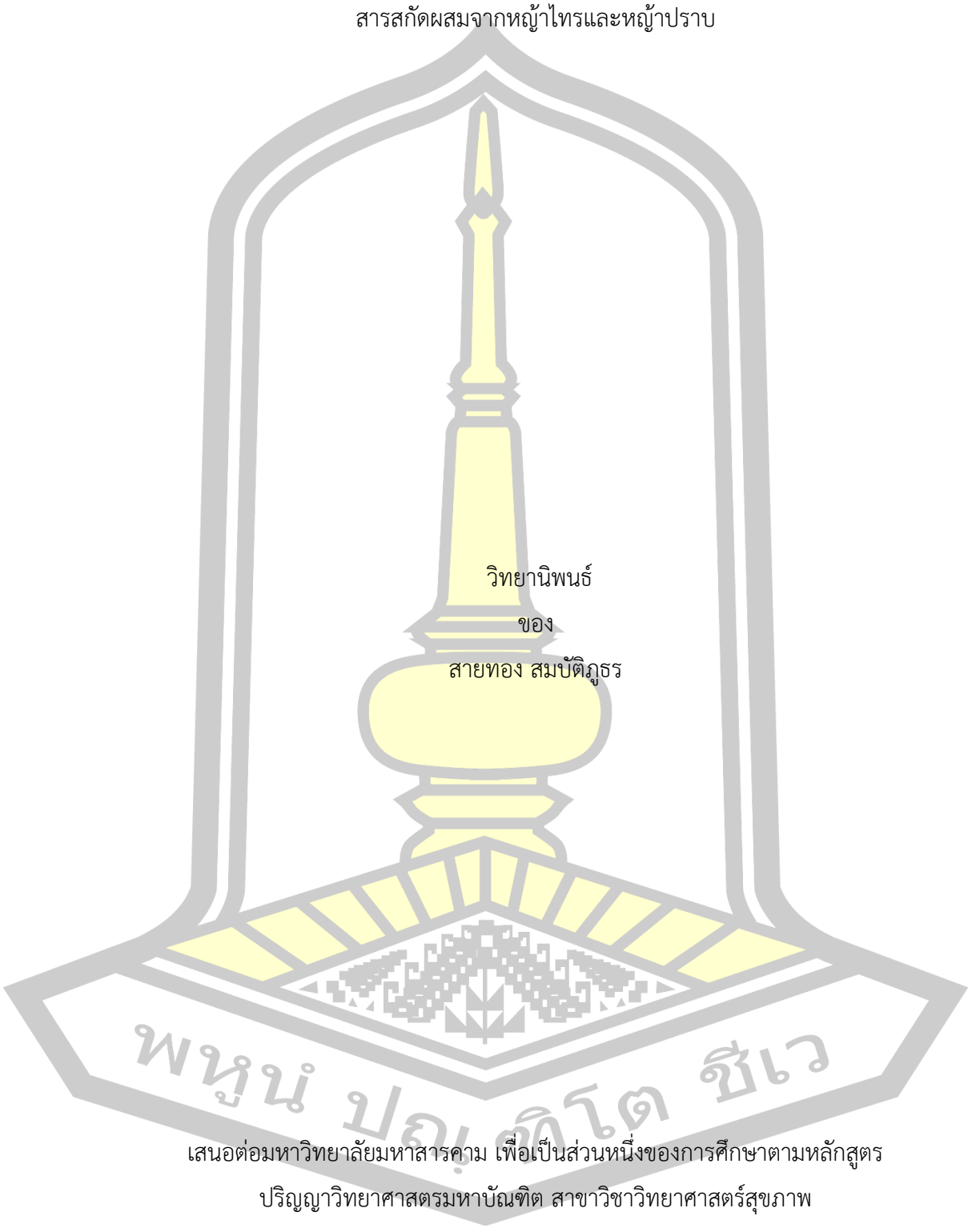
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ



วิทยานิพนธ์

ของ

สายทอง สมบัติภูธร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Antioxidant, Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase Inhibitory Activities of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* Mixed Extracts

Saithong Sombutphoothorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Health Science)

May 2020

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวสายทอง สมบัติภูธร แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. ชูศรี ตลับมุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. อำภา คนซื่อ)

.....กรรมการ
(รศ. ดร. ปราโมทย์ ทองกระจาย)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผศ. ดร. ธีรพร กทิศาสตร์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ผศ. นพ. เทพลักษ์ ศิริธนะวุฒิชัย)
คณบดีคณะแพทยศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

ผู้วิจัย สายทอง สมบัติภูธร

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำภา คนซื่อ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์การทำวิจัยในครั้งนี้เพื่อตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น หาปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) radical scavenging และ 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ($ABTS^+$) ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ (1:1) ในตัวทำละลายที่แตกต่าง ได้แก่ น้ำด้วยการต้ม (ALE) และเอทานอล 80% (ELE) แล้วนำสารสกัด ELE ที่ได้ไปสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย n-hexanes (FHLE), dichloromethane (FCLE), ethyl acetate (FELE) และน้ำ (FALE) แล้วนำไปทดสอบ พบว่าสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบมีสารแอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และสเตียรอยด์ สารสกัด ELE มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด (40.024±0.952 mgGE/gExt และ 0.072±0.001 mgQE/gExt) ในการสกัดแยกสารพบว่า สารสกัด FELE มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด (33.900±0.575 mgGE/gExt และ 0.034±0.0033 mgQE/gExt) และเมื่อทดสอบวิธี FRAP พบว่าสารสกัด ELE และ FELE มีความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (291.461±3.403 และ 222.360±3.021 mgTE/gExt ตามลำดับ) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด ELE (IC_{50} = 0.082±0.0025 mg/mL) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัด ALE (IC_{50} = 0.122±0.0033 mg/mL) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และสารสกัด ELE (IC_{50} = 0.0048±0.00018 mg/mL) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า Trolox (IC_{50} = 0.0086±0.00063 mg/mL) ซึ่งใช้สารมาตรฐานเมื่อทดสอบด้วยวิธี $ABTS^+$ ในการสกัดแยกสารพบว่าสารสกัด FELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดในชั้นอื่นเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ $ABTS^+$ (IC_{50} = 0.143±0.009 และ 0.044±0.001 mg/mL ตามลำดับ) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส พบว่าสารสกัด ALE (IC_{50} = 0.022±0.001 และ 0.114±0.006 mg/mL

ตามลำดับ) ELE (IC_{50} = 0.098±0.002 และ 1.005±0.316 mg/mL ตามลำดับ) และ FALE (IC_{50} = 0.025±0.002 และ 0.692±0.012 mg/mL ตามลำดับ) มีความสามารถในการยับยั้งทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า acarbose (IC_{50} = 1.054±0.113 และ 0.173±0.026 mg/mL ตามลำดับ) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่รู้จักกันดีในการใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน ยาสมุนไพรตำรับนี้มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีคุณสมบัติต้านโรคเบาหวาน ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในสัตว์ทดลองต่อไป

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดส, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, หญ้าไทร, หญ้าปราบ

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

TITLE Antioxidant, Alpha-Glucosidase and Alpha-Amylase Inhibitory Activities of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* Mixed Extracts

AUTHOR Saithong Sombutphoothorn

ADVISORS Assistant Professor Ampa Konsue , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Health Science

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2020

ABSTRACT

The aim of this research was to determine on phytochemical screening, antioxidant activity, alpha-glucosidase and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* by using different solvent extractions. Both plants (1:1;w:w) of recipe were extracted using by different solvents including aqueous (ALE) and 80% ethanol (ELE). The extract uesing liquid-liquid extraction was suspended in 80% methanol and partitioned with n-hexanes (FHLE), dichloromethane (FCLE), ethyl acetate (FELE) and aqueous (FALE) respectively. Phytochemical screening was determined on total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) contents in plants. The antioxidant activities were determined by Ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) radical scavenging and 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ($ABTS^{+}$) assay. The alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory assay was evaluated on glucose transferase mechanism. This experimental study found that the recipe showed high among of total phenolic and flavonoid contents especially ELE (40.024±0.952 mgGE/gExt and 0.072±0.001 mgQE/gExt). The extract was fractionated with FELE showed high among of total phenolic and flavonoid contents, (33.900±0.575 mgGE/gExt and 0.034±0.0033 mgQE/gExt). The antioxidant activity by FRAP assay found that the ELE and FELE (291.461±3.403 and 222.360±3.021 mgTE/gExt, respectively) showed high among of ferric reducing antioxidant power. The ELE (IC_{50} = 0.082±0.0025 mg/mL) was significantly exerted on free radical scavenging activity higher than ALE (IC_{50} =

0.122±0.0033 mg/mL) and FELE showed higher than all fractions by DPPH assay. $ABTS^{+}$ radical scavenging activity, the ELE (IC_{50} = 0.0048±0.00018 mg/mL) was significantly stronger than Trolox (IC_{50} = 0.0086±0.00063 mg/mL), known as standard substances. alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities, ALE (IC_{50} = 0.022±0.001 and 0.114±0.006 mg/mL), ELE (IC_{50} = 0.098±0.002 and 1.005±0.316 mg/mL) and FALE (IC_{50} = 0.025±0.002 and 0.692±0.012 mg/mL) respectively, were significantly more effect in inhibited alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme than acarbose (IC_{50} = 1.054±0.113 and 0.173±0.026 mg/mL, respectively) known anti-diabetic drug. The recipe has been having the phenolic and flavonoid contents which chemical substances were known as anti-oxidation and anti-diabetic property, Pharmaceutical activities were showed on antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. Further, also chemical compositions, major active compound(s) and *in vivo* were clarified in next study.

Keyword : Antioxidant, Alpha-glucosidase, Alpha-amylase, Leersia hexandra, Elephantopus scaber

พหุน ปณฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำภา คนซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำข้อเสนอแนะและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของรายงานการวิจัยให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ร่วมหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต และเจ้าหน้าที่คณะแพทยศาสตร์ทุกท่านที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้การอบรมเลี้ยงดูให้โอกาสทางการศึกษาและให้กำลังใจมาโดยตลอด ทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจในการทำวิจัยและดำเนินชีวิต คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องคุณพระบิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน ตลอดจนบูรพาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สายทอง สมบัติภูธร

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 14

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 14

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 16

1.3 สมมุติฐาน 16

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 16

1.5 สถานที่ทำวิจัย 17

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 17

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 18

2.1 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น 18

2.2 อนุมูลอิสระ 21

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ 25

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 31

2.5 โรคเบาหวาน 33

2.6 อนุมูลอิสระกับโรคเบาหวาน 35

2.7 เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 36

2.8 เอนไซม์อะไมเลสและการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส 38
2.9 การรักษาโรคเบาหวานในทฤษฎีการแพทย์แผนไทย 39
2.10 พืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย 39
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 46
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 50
3.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร 50
3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร 50
3.3 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น 52
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 54
3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 56
3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส 57
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 59
บทที่ 4 ผลการวิจัย 60
4.1 ปริมาณสารสกัดจากหญ้าปราบและหญ้าไทร 60
4.2 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 62
4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 63
4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 66
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 67
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 69
5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 69
5.2 ข้อเสนอแนะ 73
บรรณานุกรม 74

ภาคผนวก 82
ภาคผนวก ก รูปภาพส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ใช้ในงานวิจัย 83
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 89
ภาคผนวก ค ขั้นตอนการทดสอบและกราฟแสดงผลการทดสอบ 95
ภาคผนวก ง หนังสือการตรวจรับรองเอกลักษณ์พันธุ์พืช 107
ภาคผนวก จ ผลงานการตีพิมพ์เผยแพร่วิทยานิพนธ์ 110
ประวัติผู้เขียน 130

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา oxidation 23

ตาราง 2 ปริมาณสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 62

ตาราง 3 ผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ 63

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและหมักด้วยเอทานอล 80% 65

ตาราง 5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดโดยการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction 66

ตาราง 6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและหมักด้วยเอทานอล 80% 67

ตาราง 7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี liquid-liquid extraction 68

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาเอนไซม์กำจัด H_2O_2 และ lipid hydroperoxide ด้วย Glutathione peroxidase 28

ภาพประกอบ 2 กลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase inhibitor) 37

ภาพประกอบ 3 หญ้าไทร 40

ภาพประกอบ 4 หญ้าปราบ 43

ภาพประกอบ 5 การแยกสารตามความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยวิธี liquid-liquid extraction 52

ภาพประกอบ 6 ปริมาณสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction 61

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สถานการณ์โรคเบาหวานในปัจจุบันมีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลสมาพันธ์เบาหวานโลก (international diabetes federation; IDF) ได้รายงานสถานการณ์ ผู้เป็นโรคเบาหวานทั่วโลกแล้ว 285 ล้านคนและได้ประมาณการณ์ว่าจะมีจำนวนผู้เป็นเบาหวานทั่วโลกเพิ่มมากกว่า 439 ล้านคน ในปีพ.ศ. 2573 หากไม่มีการดำเนินการในการป้องกันและควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้องค์การอนามัยโลก (WHO) ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว เนื่องจากผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มปัจจัยเสี่ยงนำไปสู่ภาวะโรคแทรกซ้อนที่รุนแรงขึ้น เช่น โรคหัวใจ ภาวะไตวาย และเบาหวานขึ้นจอตา[1] ส่งผลให้ประเทศไทยมีนโยบายให้ความสำคัญกับการแก้ปัญหาโรคเบาหวาน ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขมีแนวคิดในการที่จะนำการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกมามีส่วนร่วมในการรักษา โดยกรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก ได้กำหนดยุทธศาสตร์พัฒนาระบบบริการ พัฒนาศาสตร์การรักษาให้มีคุณภาพมาตรฐานได้รับการยอมรับในระดับสากล พัฒนาวิชาการ พัฒนาระบบการจัดระบบความรู้ด้านการแพทย์แผนไทย อนุรักษ์และส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย โดยครอบคลุมด้านการส่งเสริม การรักษา การฟื้นฟู และการป้องกัน จนปัจจุบันพบว่าได้รับการยอมรับจากประชาชนมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเรื้อรัง เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง มะเร็ง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา ลดการใช้ยาเกินความจำเป็น เกิดเป็นแนวทางในการเยียวยารักษาโดยใช้ยาสมุนไพรควบคู่กับการรักษาร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบัน[2]

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ส่งผลให้ไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งพลังงานรวมไปถึงการสังเคราะห์ไขมันและโปรตีนในร่างกายได้ ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งมีเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแป้งได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดสูง ได้แก่ เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) หรือมอลเทส (maltase) จากลำไส้เล็ก และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) จากตับอ่อน โดยทั่วไปแพทย์จะให้การรักษาโดยการให้รับประทานยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในการลดหรือป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลกลูโคส เช่น อะคาร์โบส ไมกลิทอล และโวกลิโบส เป็นต้น โดยจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส จะช่วยลดการย่อยคาร์โบไฮเดรตและลดการดูดซึมน้ำตาล ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง แต่ในการรักษาโดยใช้ยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดผลข้างเคียง

ต่อผู้ป่วย เช่น ภาวะตับเป็นพิษ และเกิดอาการไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องเสียและคลื่นไส้ อีกทั้งต้องใช้ระยะเวลารักษานานและจำเป็นต้องใช้ตัวยาร่วมกันหลายชนิด[3-4] นอกจากนี้โรคเบาหวานยังส่งผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายมากกว่าปกติเนื่องจากภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น (oxidative stress) ในผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง จะมีกระบวนการ glucose autoxidation และ glycosylated กับ protein ทำให้เกิดการสะสมของ advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งเป็นแหล่งการเกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย จึงจำเป็นต้องมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในร่างกาย เพื่อป้องกันความเสื่อมโทรมของร่างกายและโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ[5] ดังนั้นการดูแลรักษาและป้องกันภาวะดังกล่าวการใช้ยาสมุนไพรเป็นทางเลือกทางหนึ่งในการรักษาโรคเบาหวาน โดยสมุนไพรที่นำมาศึกษานี้เป็นตำรับยาแก้โรคเบาหวานที่ปรากฏในคัมภีร์ยาสมุนไพรไทย "ตำรับหมอพร"[6] และตำรายากลางบ้าน[7] ซึ่งมีการใช้ยาสมุนไพรนี้มาจากประสบการณ์ของบรรพบุรุษไทยที่สั่งสม ถ่ายทอด และใช้กันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

หญ้าไทร (หญ้าไซ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Leersia hexandra* Sw. อยู่ในวงศ์ Poaceae ชื่อสามัญ Swamp rice grass[8,9] เป็นพืชจำพวกหญ้า มักขึ้นอยู่ที่ริมน้ำ ที่ชุ่มชื้น เหง้าใต้ดิน ลำต้นทอดเลื้อย ใบแถบเรียวยาว ช่อดอกแยกแขนง (คล้ายข้าว)[10,11] สรรพคุณ รสจืดขื่น ต้มดื่มเป็นยาขับปัสสาวะ ขับฟอกโลหิตประจำเดือนของสตรี[11] รักษาโรคเบาหวาน[6,7] ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[12,13] ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งปอด[12] ฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูทดลอง[14]

หญ้าปราบ หรือ โด่ไม่รู้ล้ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elephantopus scaber* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae ชื่อสามัญ Prickly leaved elephant’s foot[15,16] เป็นพืชล้มลุกหรือพืชจำพวกหญ้า ลำต้นสั้น ใบเดี่ยวรูปหอกกลับติดเหง้าเรียงเป็นวงกลมชิดกัน ช่อดอกกระจุกกลม[17,18] สรรพคุณ รสกร่อยขื่น แก้โรคผิวหนัง ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ แก้โรคเบาหวาน[6,7] บำรุงกำหนัด แก้ไอ[19] แก้ไข้ แก้อักเสบ ขับน้ำเหลืองเสีย บำรุงหัวใจ แก้กามโรคในสตรี[18,20] ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและเนื้องอก[21] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[22] ฤทธิ์ปกป้องตับ[23] ฤทธิ์ต้านจุลชีพ[24–27] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[22,26,28] ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด[29–31] ฤทธิ์ลดปวด[29] ไม่พบรายงานความเป็นพิษในหนูทดลอง[22,29]

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่พบข้อมูลทางวิชาการมายืนยันถึงประสิทธิภาพในการรักษาโรคเบาหวานของยาตำรับนี้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส ด้วยการสกัดสารจากยาตำรับนี้ซึ่งประกอบด้วยหญ้าไทรและหญ้าปราบในอัตราส่วนที่เท่ากัน รวมถึงการทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ซึ่งกลุ่มสาร

ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และแทนนิน มีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และเพื่อเป็นข้อมูลทางวิชาการทางการแพทย์ในการยืนยันผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดของตำรับยาสมุนไพรนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีในพืชเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

1.3 สมมุติฐาน

เนื่องจากสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าสารสกัดจากหญ้าปราบมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ดังนั้นตำรับยาแผนไทยที่ใช้รักษาโรคเบาหวานที่ประกอบด้วยพืชทั้งสองชนิดนี้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP, DPPH และ ABTS และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดส รวมถึงมีกลุ่มสารพฤกษเคมี เช่น สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์ ในพืชเป็นกลุ่มสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ ซึ่งจะช่วยลดการย่อยคาร์โบไฮเดรตและลดการดูดซึมน้ำตาล ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 พืชสมุนไพรที่ใช้สำหรับการวิจัยครั้งนี้ คือ หญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยหญ้าไทรเก็บจาก อ. เมืองอำนาจเจริญ จ. อำนาจเจริญ และหญ้าปราบเก็บจาก อ. เมือง จ. มหาสารคาม ช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2562

1.4.2 เตรียมพืชสมุนไพรและสกัดสารด้วยการต้มและเอทานอล 80% โดยนำสารสกัดจากเอทานอล 80% ไปสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ด้วยวิธี liquid-liquid extraction

1.4.3 ศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีในพืชเบื้องต้น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด สารประกอบฟีนอลิก ซาโปนิน คูมาริน สเตียรอยด์ และแอนทราควิโนน โดยสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

1.4.4 ศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

1.4.5 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และวิธี 2,2’-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay

1.4.6 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

1.4.7 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

1.5 สถานที่ทำวิจัย

1.5.1 อาคารผลิตยาและยาสมุนไพร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.2 ห้องปฏิบัติการเภสัชกรรม ME-407 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.3 ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ตึก 2 ชั้น 6 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นข้อมูลเชิงวิชาการทางการแพทย์ที่สำคัญสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน และบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข

1.6.2 เป็นทางเลือกในการใช้ตำรับยาสมุนไพรที่มีหญ้าไทรและหญ้าปราบเป็นส่วนประกอบในการรักษาโรคเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.6.3 เป็นข้อมูลในการยืนยันการใช้ตำรับยาสมุนไพรที่มีหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่ได้บันทึกไว้ในคัมภีร์ยาสมุนไพรไทย "ตำรับหมอพร" และตำรายากลางบ้าน หรือตำรายาอื่น ๆ ที่มีพืชสมุนไพรนี้เป็นส่วนประกอบที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน

1.6.4 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปพัฒนาตำรับยาหรือตัวยาเดี่ยวในการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน

1.6.5 เพิ่มคุณค่าและมูลค่าของหญ้าไทรและหญ้าปราบซึ่งเป็นพืชจำพวกหญ้าที่พบได้ในชุมชน

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในหลอดทดลอง ผู้วิจัยได้แบ่งหัวข้อในการค้นคว้า รวบรวมเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามหัวข้อ ดังต่อไปนี้

2.1 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น
2.2 อนุมูลอิสระ
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ
2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2.5 โรคเบาหวาน
2.6 อนุมูลอิสระกับโรคเบาหวาน
2.7 เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส
2.8 เอนไซม์อะไมเลสและการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส
2.9 การรักษาโรคเบาหวานในทฤษฎีการแพทย์แผนไทย
2.10 พืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) คือ สารเคมีตามธรรมชาติที่พบในพืช เป็นสารอาหารที่ช่วยบำรุงสุขภาพ มีหน้าที่ให้มีสีสัน รสชาติ และการปกป้องคุ้มกันโรคแก่ผลไม้ พืชผัก เมล็ดธัญพืช และถั่วต่าง ๆ มันเป็นทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่คอยปกป้องพืช และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทรงประสิทธิภาพ ช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ ในคน เช่น โรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง กระดูกพรุน โรคปอด ไปจนถึงโรคมะเร็ง กลไกการทำงานของสารพฤกษเคมีเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจเป็นไปโดยการช่วยให้เอนไซม์บางกลุ่มทำงานได้ดีขึ้น เอนไซม์บางชนิดทำหน้าที่ทำลายสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย มีผลทำให้สารก่อมะเร็งหมดฤทธิ์ ซึ่งปัจจุบันพบสารพฤกษเคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิด นักวิทยาศาสตร์พบว่าสารพฤกษเคมีสร้างประโยชน์ด้วยกลไกการออกฤทธิ์ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ ด้านออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ (DNA) เป็นกลไกสำคัญ ที่ทำให้สารพฤกษเคมีลดการเกิดโรคมะเร็งได้ เพิ่มภูมิต้านทานโรค

เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ต่อต้านการอักเสบ ช่วยกำจัดสารพิษ ช่วยให้ร่างกายทำงานประสานกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่นิยมมานำทำการทดสอบในอาหารและสุมนไพร ได้แก แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางยา ในพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งอาจมีสาระสำคัญเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกัน การพบสารสำคัญเหลานี้มากบงบอกถึงพืชชนิดนั้นมีฤทธิ์ทางยาสูง เชน แอลคาลอยด์ เทอรพีนอยดและซาโปนิน มีคุณสมบัติในการนำไปประยุกตใช้เป็นยา[32]

การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดในพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และค่อนข้างจำเพาะกับกลุ่มสารเคมี โดยตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสี (color reaction) ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือเกิดตะกอน แบ่งเป็น 9 กลุ่ม[33] ดังนี้

2.1.1 แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ รสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์มีคุณสมบัติทางเคมีทางกายภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมากมาย เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ตัวอย่างเช่น morphine และ cocaine

2.1.2 แทนนิน (tannins) เป็นสารจำพวกพอลิฟีนอลที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และสลับซับซ้อน มีสมบัติเป็นกรดอ่อนและมีรสฝาด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปไกลโคไซด์คุณสมบัติและชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น proanthocyanidins

2.1.3 เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) หรือ เทอร์พีน (terpenes) ประกอบด้วยหน่วยเล็กที่สุดเรียกว่า isoprene unit ซึ่งเป็น branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง diterpenes พบในสัตว์ทะเลจำพวกฟองน้ำ triterpenoids มักพบในพืชในรูปของ cardiac glycosides, saponin และ phytosterol มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น สามารถต้านไวรัสได้ ตัวอย่างเช่น andrographolide ที่พบในต้นฟ้าทะลายโจร

2.1.4 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compound) พบมากในธรรมชาติโดยมักพบเป็นเม็ดสี (pigment) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ส่วนใหญ่

เป็นเม็ดสีที่ละลายได้ในน้ำทำให้ดอกไม้มีสีสวยงาม ในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์อาจเรียกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ตัวอย่างเช่น quercetin และ catechin

2.1.5 คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycoside) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์นิวเคลียส คือมีโครงสร้างเป็นวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีนอยู่ในโมเลกุล มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต เช่น สารในยี่โถ เมล็ดรำเพย เมล็ดตีนเป็ดน้ำ ซึ่งมีการใช้พืชในกลุ่มที่มีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในหลายรูปแบบ อาทิ การนำไปทำเป็นธนูอาบยาพิษ ยาช่วยอาเจียน ยาระบาย และโรคหัวใจ ปัจจุบันมีการนำมาใช้ในผู้ป่วยภาวะหัวใจวายโดยเพิ่มแรงบีบของหัวใจเพื่อให้มีระยะพักเพิ่มขึ้น

2.1.6 ซาโปนิน (saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่มีส่วน aglycone เป็นสาร steroids หรือ triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C3 ได้เป็น o-glycoside น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่เป็น oligosaccharide 1–5 หน่วย ซาโปนินไกลโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้เป็นยาฝาด ทำให้แผลหายเร็วรักษาแผลไหม้ น้ำร้อนลวก ตัวอย่างเช่น madecassoside

2.1.7 แอนทราควิโนน (anthraquinones) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด และมีความสำคัญที่สุด พบได้ทั้งในรูปอิสระและไกลโคไซด์แอนทราควิโนนมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3-ring system เป็นสารที่มีสีแดงส้ม มีการนำสารแอนทราควิโนนมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่ายอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น emodin และ diacerein

2.1.8 สเตียรอยด์ (steroids) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารในกลุ่ม tetracyclic triterpenes คือมีวงแหวนเชื่อมต่อกันที่เป็นโครงสร้างหลัก 4 วง โดยมีวงแหวนหกเหลี่ยม 3 วง และวงแหวนห้าเหลี่ยมอีก 1 วง โครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentano-perhydrophenanthrene nucleus เป็นสารที่มีความสำคัญเนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษาโรคหัวใจ (cardiac glycosides) ยาขับปัสสาวะ ยาคุมกำเนิดหลายชนิด และเป็นฮอร์โมนเพศ ตัวอย่างเช่น testosterone และ progesterone

2.1.9 คูมาริน (coumarins) สารจำพวกคูมาริน เป็นแลคโทนของ ortho-hydroxy cinnamic acid ในพืชจะพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์สารในกลุ่มนี้อาจเรียกว่าคูมารินไกล

โคไซด์ (coumarins glycosides) หรือแลคโทนไกลโคไซด์ (lactone glycosides) สารจำพวกคูมารินใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น เป็นยาบำรุงเลือด ตัวอย่างเช่น aesculetin และ umbelliferone

2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกายเป็นปกติ และร่างกายจะมีการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปผ่านทางเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ หากไม่สมดุลกันระหว่างการเกิดและการต้านอนุมูลอิสระนั้นจะส่งผลเสียต่อสุขภาพ[34] อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวภายในอะตอมหรือโมเลกุล มีความไม่คงตัวและทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับสารชีวโมเลกุล เชน ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อ โรคหลายชนิดเกิดจากสาเหตุของอนุมูลอิสระ เชน การชรา โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคภูมิแพ ความดันโลหิตสูง ความผิดปกติของสายตาและความผิดปกติของระบบประสาท[35]

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 electron เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่วองไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองคประกอบหลักของเซลล์ มีทั้งที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) อนุมูลอิสระและไม่ใชอนุมูลอิสระซึ่งจะไปกระตุนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ทำใหเกิดอนุมูลอิสระตลอดเวลาและเกิดเป็นลูกโซในสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใชออกซิเจน เมื่ออนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ซึ่งสิ่งที่จะนำมาใช้บอกระดับความเป็นพิษควรจะเป็นความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกาย สารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species และ reactive nitrogen species ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อาจจะพบได้ในรูปของ lipid radical หรือ genetic radical RS นั้นไม่จำเป็นว่าจะต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น H_2O_2 ก็จัดเป็น RS เช่นกัน[34] อย่างไรก็ตามการสรางอนุมูลอิสระหรือการกระตุนใหเกิดการสรางอนุมูลอิสระทั้งจากอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใชอนุมูลอิสระของ ROS และ RNS สงผลใหเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากซึ่งถ้าไม่สมดุลกับสารตานอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่ถูกสร้างขึ้นในการกำจัดทำใหเกิดภาวะที่เรียกวา oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค[35]

Reactive oxygen species (ROS) นั้นเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่าง ๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลชีพต่าง ๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ เพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไปทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบและนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่าง ๆ มะเร็ง รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง ซึ่งจากรายงายการวิจัยพบว่าภาวะ oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุของโรค และร่างกายจะมีภาวะนี้เมื่อเป็นโรคบางอย่างซึ่งภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหล่านี้อย่างเห็นได้ชัด[36] ดังนั้นเมื่อ ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์ภายในร่างกาย จะมีเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นเรียกรวมว่า antioxidant enzymes ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักที่สำคัญได้แก่ superoxide dismutases (SODs), catalases และ glutathione peroxidases ซึ่งแต่ละเอนไซม์มีโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกันไป

อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นหลายประเภท ได้แก่

2.2.1 รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species หรือ ROS) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์แรดิคอล(superoxide radical) ไฮดรอกซิลแรดิคอล (hydroxyl radical) ซิงเกลตออกซิเจน (singlet oxygen) บางครั้งอาจไม่จัดให้ซิงเกลตออกซิเจนเป็นอนุมูลอิสระ แต่โดยคุณสมบัติแล้วซิงเกลตออกซิเจนก็สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ ROS เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่งที่แตกต่างกันดังนี้

2.2.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย (endogenous sources) ROS จะเกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆของร่างกายผ่านกระบวนการสร้าง ATP โดย O_2 จะเปลี่ยนไปเป็น H_2O โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะต้องการ ATP วันละ 300 mol ซึ่งจะได้จากการใช้ O_2 จำนวน 100 mol ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์และบางขั้นตอนก็ผ่านปฏิกิริยาโดยไม่ใช้เอนไซม์นอกจากการสร้างพลังงานแล้ว ในกลไกป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อถูก pathogen เข้ารุกรานก็มีการสร้าง ROS ขึ้นมาได้เช่นกัน โดยเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า oxidative burst เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเช่น macrophage และ leukocyte ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่าง ๆ จะมีการสร้าง $O2^{\bullet-}$ ขึ้น

ผ่านทาง NADPH oxidase โมเลกุล $O_2^{\bullet-}$ ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น H_2O_2 และเกิดเป็น hypochlorite (HOCl) ในที่สุด

2.2.1.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย (exogenous sources) ปัจจัยแวดล้อมนั้นมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีต่าง ๆ เช่น UV, X-ray, Gamma ray โดยรังสีเหล่านี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนไปเป็น hydroxyl radical อย่างง่ายดาย หรือแม้แต่มลภาวะทางเคมีเช่น paraquat ที่กระตุ้นให้เกิด peroxide หรือ ozone สารจำพวก quinones และ nitroaromatics ก็สารที่ทำให้เกิด superoxide ได้ นอกจากนี้ยังมีโลหะหนักซึ่งเมื่อได้รับไปมาก ๆ ก็จะเสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ได้ สารต่าง ๆ เหล่านี้มักจะก่อให้เกิดมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ

2.2.2 ซัลเฟอร์เซนเตอร์แรดิคอล (sulfur-centered radical) เช่น ไทอิลแรดิคอล (thiyl radical หรือ$RS^{\bullet}$) ซึ่งสามารถรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้และสามารถออกซิไดซ์ NADPH ได้ รวมถึงสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ได้แก่ $HO^{\bullet}$ และ $O_2^{\bullet}$ เป็นต้น

2.2.3 คาร์บอนเซนเตอร์แรดิคอล (carbon-centered radical) เกิดจากโมเลกุลของพันธะ C-H เกิดการแตกหักได้คาร์บอนที่มีอิเลคตรอนอิสระ (carbon radical) ที่สามารถรวมตัวกับโมเลกุลของออกซิเจนได้ และสามารถออกซิไดซ์ NADPH ได้[36]

ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใชอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา oxidation

reactive oxygen species (ROS)			
อนุมูลอิสระ (free radicals)	สัญลักษณ์	สารที่ไม่ใชอนุมูลอิสระ (non-radicals)	สัญลักษณ์
oxygen radical	$O_2^{\bullet}$	singlet oxygen	$^1O_2$*
superoxide radical	$O_2^{\bullet-}$	hydrogen peroxide	H_2O_2
hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	ozone	O_3
hydroperoxyl radical	$HO_2^{\bullet}$	organic peroxide	ROOH
peroxyl radical	$RO_2^{\bullet}$		
alkoxyl radical	$RO^{\bullet}$		
carbonate radical	$CO_3^{\bullet-}$		
reactive chlorine species (RCS)			

chlorine radical	$Cl^{\bullet}$	hypochloric acid	HOCl
		nitryl chloride	NO_2Cl
		chlorine gas	Cl_2
reactive nitrogen species (RNS)			
nitric oxide radical	$NO^{\bullet}$	nitric oxide	HNO_2
nitrogen dioxide radical	$NO_2^{\bullet}$	peroxynitrite	$ONOO^-$
		peroxynitrous acid	ONOOH
		nitryl chloride	NOOCl
		alkyl peroxynitrites	RO_2NO
		nitrocarbonate	$O_2NOCO_2^-$
		nitrosoperoxycarbonate	$ONO_2CO_2^-$

ที่มา : อธิป สกุลเผือก[34]

การทำลายเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายจากอนุมูลอิสระส่งผลทำให้เซลล์เสียสภาพทั้งโครงสร้างและการทำงาน โดยอาจเสียสภาพแค่เพียงบางส่วนไปจนกระทั่งสูญเสียสภาพโดยถาวร โดยอนุมูลอิสระมักจะทำลายที่เซลล์ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ ผ่านกระบวนการสำคัญ ดังนี้ 1) ลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น เป็นการทำลายไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated lipid) ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและเกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดไขมันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (fatty acid hydroperoxides) และสารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehydes)[37] 2) การทำลายดีเอ็นเอ อนุมูลอิสระสร้างความเสียหายแก่ดีเอ็นเอและนิวคลีโอโปรตีน(nucleoproteins) ด้วยกลไกต่าง ๆ ทั้งโดยทางตรงจากการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ หรือโดยทางอ้อมจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น แคลเซียมไอออนดีเพนเดนท์เอนโดนิวคลีเอส (Ca^{2+}-dependent endonuclease) ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ต่าง ๆ เช่น การทำลายลำดับเบส (base lesion) การทำลายโครงสร้างของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ (sugar lesion) การแตกหักของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded breaks) และการจับตำแหน่งผิดพลาดของดีเอ็นเอและโปรตีน (DNA-protein cross links)[37] 3) การทำลายโปรตีน โปรตีนเป็นเป้าหมายสำคัญหนึ่งที่มักจะถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ แม้ว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นอาจไม่รุนแรงถึงขั้นทำให้เซลล์เสียสภาพเช่นเดียวกับการทำลายไขมันและดีเอ็นเอ แต่หากโปรตีนที่ถูกทำลายนั้นมีคุณสมบัติที่จำเพาะต่อการทำงานของเซลล์ เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากตำแหน่ง

ของกรดอะมิโนที่ถูกทำลายเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ (active site) ของเอนไซม์เหล่านั้น จะทำให้เอนไซม์สูญเสียคุณสมบัติและส่งผลให้เซลล์เสื่อมสภาพได้[38]

จากกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ส่งผลทำให้ร่างกายของคนเราเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์อยู่ตลอดเวลา เนื่องมาจากการเกิดกระบวนการเผาผลาญสารอาหารของร่างกาย เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานที่เพียงพอต่อการทำกิจกรรมในแต่ละวัน แต่ในขณะเดียวกัน ร่างกายก็มีการสร้าง และซ่อมแซมเซลล์ขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดความสมดุลขึ้น ทั้งนี้ชีวิตประจำวันของผู้คนในปัจจุบันต้องพบเจอกับมลภาวะ ความเร่งรีบในการใช้ชีวิต และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลทำให้สุขภาพเสื่อมถอย กระบวนการเผาผลาญต่าง ๆ ของร่างกายลดลง หรือเกิดของเสียต่าง ๆ ขึ้นในร่างกายมากกว่าปกติ โดยที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดของเสียได้ทัน ทำให้ความสมดุลในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป หนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ คือ อนุมูลอิสระ (free radical)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidationด้วยเหตุที่ ROS เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่าง ๆ ในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนดึกติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น เป็นต้นเหตุของภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson รวมถึงอาการอักเสบต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก

2.3.1 เราสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

2.3.1.1 intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase

1) superoxide dismutases (SODs) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ superoxide ให้เปลี่ยนเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเซลล์ทุกเซลล์และพบในextracellular fluid SODs นั้นจะมี cofactor เป็นโลหะหนักซึ่งได้แก่ Cu Zn และ Mn ในมนุษย์

Cu/Zn-SODs จะพบใน cytoplasm ส่วน MnSODs จะพบใน mitochondria จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ของ SODs ยังคงเป็น ROS ซึ่งในสภาวะปกติจะมีเอนไซม์ catalases และ peroxidases เข้ามาเปลี่ยนโมเลกุลของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 ต่อไป อย่างไรก็ตามหากร่างกายเกิดภาวะขาดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้นจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็น hydroxyl radical ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่รุนแรงได้

2) catalases เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 โดยใช้ substrate เป็น H_2O_2 จำนวน 2 โมเลกุล เอนไซม์ชนิดนี้มี Mn หรือ Fe เป็น cofactor ซึ่งจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน eukaryotic cell ทั่วไป

3) glutathione peroxidases ซึ่งจะช่วยเร่งปฏิกิริยา reduction ของ hydrogen peroxide ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ

2.3.1.2 extracellular antioxidants ได้แก่ vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups

2.3.1.3 membrane antioxidants ได้แก่ carotenoids ubiquinone vitamin E

2.3.1.4 สารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ copper, manganese, selenium และ zinc

2.3.2 การแบ่งประเภทความแรงของสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายและได้รับจากภายนอกร่างกาย

สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะมีความแรงที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.3.2.1 primary antioxidant สารในกลุ่ม endogenous antioxidant เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแรงสูงที่สุด ซึ่งนอกจากจะมี potency สูงแล้วยังสามารถนำไปใช้เพื่อการเปลี่ยนแปลงสารให้เป็นไปตามที่ร่างกายต้องการได้อีกด้วย เช่น catalases glutathione peroxidases หรือเรียกอีกอย่างว่า primary antioxidant

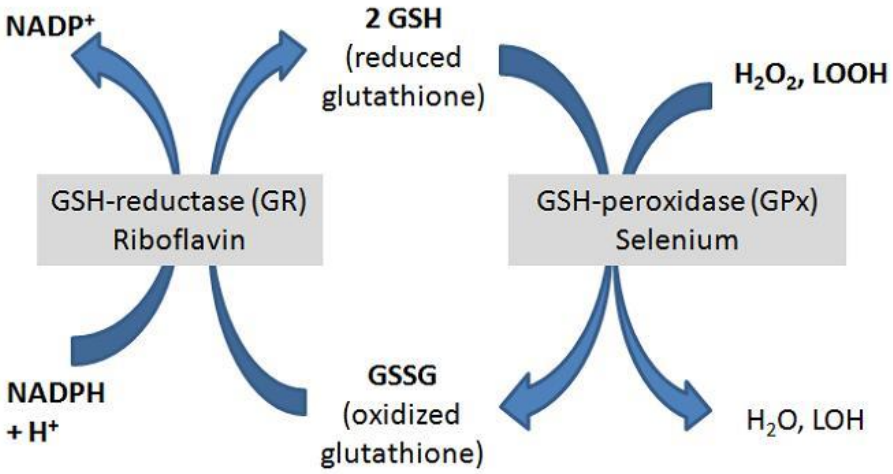
2.3.2.2 shock absorbers สารต้านอนุมูลอิสระอีกประเภทหนึ่งที่มีความแรงรองลงมาจาก endogenous antioxidants โดยสารเหล่านี้จะพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น albumin transferrin เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ไม่สามารถสร้างขึ้นได้หากในร่างกายเกิดภาวะ oxidative stress ไปแล้ว

2.3.2.3 secondary antioxidant จัดเป็นสารในกลุ่ม vitamin กรดอะมิโนบางชนิด และ co-enzyme Q10 ซึ่งมีมากที่สุดประกอบไปด้วยสารทุติยภูมิที่มีรายงานการต้านอนุมูลอิสระ เช่น flavonoids, polyphenols, vitamin E, vitamin C และ carotenoids เป็นต้น

2.3.3 antioxidant network

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในแต่ละส่วนของเซลล์จะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้ามาจัดการที่แตกต่างกันตามสภาวะที่อยู่ เช่น หากอนุมูลอิสระนั้นเกิดที่ชั้น lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ vitamin E จะเข้ามามีบทบาทในการรับ free radical เหล่านั้น แต่ถ้าหากเกิดขึ้นใน cytoplasm vitamin C ซึ่งละลายในน้ำได้ดีก็จะเข้ามามีบทบาทแทน หากคิดตามทฤษฎีการเกิด ROS ในร่างกายแล้ว ในทุก ๆ วันจะต้องมี ROS เกิดขึ้นประมาณ 1 mol หากสมมติว่า vitamin E เป็น antioxidant เพียงอย่างเดียวที่ใช้ในการกำจัด ROS เราจำเป็นต้องได้รับ vitamin E ถึง 431 กรัมต่อวัน ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่จะได้รับ vitamin E ที่สูงขนาดนั้นในการรับประทานอาหารตามปกติ แสดงให้เห็นว่าร่างกายมีกลไกจำนวนมากในการรับมือกับ ROS ที่เกิดขึ้น และส่งผ่าน free radical ต่อ ๆ กันไป โดยทำงานกันอย่างเป็นระบบ เรียกว่า antioxidant network เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้รับหรือให้ electron แก่อนุมูลอิสระไป ตัวสารนั้นก็จะกลายเป็น pro-oxidant โดยสามารถอธิบาย antioxidant network ภายในร่างกายได้ดังนี้ เมื่อเกิด lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์ อนุมูลอิสระเกิดขึ้นที่บริเวณlipid bilayer จะมี vitamin E (alpha-tocopherol) มารับไปเกิดเป็น vitamin E radical ซึ่ง vitamin C (ascorbic acid) จะมารับ free radical ต่อและเปลี่ยนให้กลับมาเป็น vitamin E ปกติจากนั้น reduced glutathione (GSH) จะมารับ free radical จาก vitamin C radical (dehydroascorbic acid) และ coupling กับ GSH อีกโมเลกุล เกิดเป็น oxidized glutathione (GSSG) ก็จะเป็นการกำจัด free radical ออกไปได้เพื่อที่จะนำเอา glutathione กลับมาใช้อีกครั้ง ในร่างกายจะมี GSH reductase ที่ทำงานควบคู่กับ riboflavin เพื่อจะเปลี่ยน GSSG ให้กลับมาอยู่ในรูป GSH และพร้อมที่จะจับกับอนุมูลอิสระต่อไป นอกจากนี้ vitamin C และ dihydrolipoic acid ก็ยังช่วยในกระบวนการเปลี่ยน GSSG ให้กลับมาอยู่ในรูป GSH เช่นกัน[39]

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาเอนไซม์กำจัด H_2O_2 และ lipid hydroperoxide ด้วย Glutathione peroxidase

ที่มาภาพ: http://www.smj.ejnal.com/ejournal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1841

ปฏิกิริยาเคมี วิตามิน ซี หรือ Ascorbic acid เป็นสารต้านออกซิเดชันที่รู้จักกันดี มีคุณสมบัติทางเคมีเป็น monosaccharide หรือน้ำตาลเชิงเดียว พบในพืชและสัตว์ แต่มนุษย์ขาดเอนไซม์ในการสังเคราะห์ ascorbic acid จึงต้องรับจากอาหารภายนอก จึงจัดเป็นวิตามินจำเป็นของมนุษย์ ascorbate พบความเข้มข้นสูงในพืชจำนวนมาก เช่น ผลไม้ตระกูลส้มและพืชอื่น ๆ พบในส่วนของ chloroplast ที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ในปริมาณสูงมาก ascorbate สามารถสังเคราะห์ในสัตว์ แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและหนูตะเภาสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ ทำให้ต้องรับ ascorbate จากภายนอก มีความสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในการเปลี่ยนแปลง procollagen เป็น collagen โดยการออกซิเดชัน proline เป็น hydroxyproline มีบทบาทในเมแทบอลิซึมของ tyrosine การเปลี่ยน folic acid เป็น folinic acid เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรท เหล็ก เป็นต้น ascorbate เป็นสาร redox active สามารถทำปฏิกิริยาสะเทินกับ H_2O_2 และ ROS อื่น ๆ ได้ ascorbyl radical ซึ่งเป็น radical ที่ว่องไวน้อยและอันตรายน้อยกว่า เนื่องจากโครงสร้างสามารถเกิด resonance hybrid ทำให้ electron มีเสถียรมากขึ้น ascorbate ทำงานในระบบต้านออกซิเดชันร่วมกับ α-tocopherol ในการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นในชั้นลิพิดเมมเบรน โดยการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนแก่ ROS ตัวเองกลายเป็น tocopheryl radical (oxidized form) Tocopheryl ที่เกิดในชั้นลิพิดสามารถถูกรีดิวซ์กลับเป็น α-tocopherol คืนได้โดยรับ electron จาก ascorbate ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์เป็น ascorbyl radical ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีกเป็น dehydroascorbate (DHA) เป็นรูป oxidized ของ ascorabte DHA สามารถถูกรีดิวซ์ก

ลับเป็น ascorbate อย่างมีประสิทธิภาพด้วย dehydrogenase ภายในเซลล์โดยอาศัย GSH หรือขับถ่ายออกจากร่างกาย ดังนั้นการยับยั้งออกซิเดชันในลิพิดเมมเบรนจะได้ผลดีจะอาศัยทั้ง ascorbate และ α-tocopherol สารเหล่านี้พบว่ามีระดับต่ำถึงต่ำมากในผู้ที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ เบาหวานและโรคเรื้อรังจากภาวะเครียดออกซิเดชันต่าง ๆ ทำให้มีคำแนะนำให้รับประทานเพื่อชดเชย[39]

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีขายในปัจจุบันนี้กว่าร้อยละ 90 จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนการนำไปใช้เพื่อหวังผลด้านสุขภาพนั้นขึ้นกับการศึกษาทั้งทางด้าน *in vitro, in vivo* และ clinical research โดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมักจะมีประโยชน์กับระบบต่าง ๆ เช่นระบบหัวใจและหลอดเลือด ช่วยในการมองเห็น เสริมสุขภาพความงามของผิวและผม เพื่อป้องกันโรคมะเร็ง และโรคจากความเสื่อมของระบบต่าง ๆ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่ เช่น vitamin E และ vitamin C สารในกลุ่ม flavonoids สารกลุ่ม carotenoids และสารกลุ่ม phenolics โดยลักษณะสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ที่มีร่วมกันก็คือ การมี conjugated double bond อยู่ในโครงสร้าง เพราะเมื่อสารเหล่านี้รับหรือสูญเสีย electron ไป free radical ที่เกิดขึ้นจะ delocalized ภายในโครงสร้างได้และทำให้โมเลกุลมีความเสถียรกว่าสารที่ไม่มี conjugated double bond ดังนั้นความรุนแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่ก็จะลดลง

2.3.4 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

2.3.4.1 free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนแก่ อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิมอาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเลคตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น butylated hydroxyl anisole (BHA), vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น[40]

2.3.4.2 singlet oxygen quenching ($^1O_2$) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ($^1O_2$) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล

2.3.4.3 Metal chelating โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท

เช่น peroxyl radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

2.3.4.4 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้[40]

2.3.5 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืช มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกนัการสร้างสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

สารประกอบฟีนอลิก คือ สารที่มีสูตรโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

2.3.5.1 simple phenols หรือ phenolic acid และอนุพันธุ์เช่น gallic acid, ellagic acid, tannic acid, vanillin, catechol, resorcinol และ salicylic acid เป็นต้น

2.3.5.2 phenylpropanoids ได้แก่ phenolic compound ที่ aromatic ring มี three-carbon side chain เกาะอยู่แยกย่อยได้หลายกลุ่ม ได้แก่ hydroxycinnamic acid (ferulic acid, caffeic acid หรือ coumaric acid), coumarins (umbelliferone, scopoletin, aesculetin หรือ psoralen), lignans (pinoresinol, eugenol หรือ myristicin)

2.3.5.3 flavonoids เป็นกลุ่มสำคัญ ของ phenolic compounds ได้แก่ สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ catechins, proanthocyanins, anthocyanidines, flavones, flavovols, flavonones และ isoflavones จากการที่พบ flavonoid อย่างกว้างขวางทั้งพืช ผักและผลไม้ รวมทั้งเครื่องดื่มที่เตรียมจากพืช เช่น ชา พบว่าในใบชาจะมี catechins อยู่ถึง 30% ของน้ำหนักแห้งและเชื่อว่าเป็นสารสำคัญในการออก

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ chemoprevention โดย anthocyanins เป็นสารที่มีสีในพืช ส่วนกลุ่ม flavones, flavonols และ isoflavones พบได้ทั่วไปและเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

ปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกได้รับความสนใจในฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidation) และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic activity) ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (free radicals) และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะ โรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ จึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป นอกจากนี้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้ด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระสามารถแบงออกเปน 2 ประเภท คือ การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแตละประเภทจะมีหลายวิธีดวยกัน ซึ่งแตละวิธีมีความจำเพาะแตกตางกัน โดยปกติมักใชหลายวิธีรวมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

2.4.1 วิธีการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เชน การทำใหเกิดสี การทำใหเกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระที่นิยม ไดแก การตรวจวัดสารโพลีฟนอลชนิดตาง ๆ โครมาโตกราฟแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารตานอนุมูลอิสระชนิดตาง ๆ โดยใชเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

2.4.2 วิธีการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเปนการวิเคราะหเพื่อหาปริมาณของสารตานอนุมูลอิสระในตัวอยางประเภทตาง ๆ วิธีที่นิยม ไดแก การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระดวยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) และการวิเคราะหความสามารถในการรีดิวซเฟอรริกของสารตานอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกลาว

ข้างตนจะมีการสรางอนุมูลอิสระที่ทราบความเขมขนที่แนนอนและวิเคราะหความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอยางที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากคาการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช เชน $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารตานอนุมูลอิสระหาไดจากอัตราสวนของการลดลงของคาการดูดกลืนแสงของสารตัวอยางกับสารมาตรฐาน (เชน trolox, vitamin C และ ferrous sulfate)[41]

หนวยของการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได 2 แบบ คือ

2.4.2.1 แบบปริมาณความเขมขนของสารตานอนุมูลอิสระที่มีในตัวอยาง ซึ่งคาตัวเลขสูงก็แสดงวามีฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระสูง

2.4.2.2 แบบปริมาณความเขมขนของสารตัวอยางที่ทำใหสารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC_{50}, 50 % of inhibitory concentration) โดยคาตัวเลขต่ำแสดงวามีฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหนวยไดหลากหลาย ไดแก µM/mg, mM/mg, µM/mL, mM/mL, mg/mL, µg/mL เปนตน[41]

1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นวิธีการทดสอบที่นิยมใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กลไกการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ของสารกลุ่มฟีนอลเกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารกลุ่มฟีนอล เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารกลุ่มฟีนอลแล้วจะได้เป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร โดยจะเห็นเป็นสีเหลือง (A) ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (B)[42] ดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเปนสารสังเคราะหที่อยูในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีมวงสามารถดูดกลืนแสงไดสูงสุดโดยใช้ เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารตานอนุมูลอิสระที่ละลายดวยเอทานอล (สารที่ใหอิเล็กตรอน) จะทำใหสีมวงจางลง ๆ จนเปนสีเหลือง ซึ่งกอนนำมาวัดคาการดูดกลืนแสงตองตั้งทิ้งไวที่มืดเปนเวลา 30 นาทีเพื่อใหเกิดปฏิกิริยา ทำใหสามารถหาการเปนสารตานอนุมูลอิสระของสารตัวอยางไดจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได จากการนำคาการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใสตัวอยางเทียบกับคาการดูดกลืนแสงตั้งต้น (กอนใสสารตัวอยาง)[41]

2) ABTS radical cation decolorization assay การวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระดวยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส เปนวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส($ABTS^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เปนสารสังเคราะหที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงไดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจาก

สีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีคาการดูดกลืนแสงสูง จึงตองทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ดวยฟอสเฟตบัฟเฟอร จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอยางที่ละลายดวยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำใหสีจางลง และตั้งทิ้งไวเพื่อใหเกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเปนสารตานอนุมูลอิสระของสารตัวอยางไดจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox จะทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ขอดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายไดดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรียจึงทำปฏิกิริยาไดอยางรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาไดดีในชวง pH กวาง

3) ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay การวิเคราะหความสามารถในการรีดิวซเฟอรริกของสารตานอนุมูลอิสระ วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารตานอนุมูลอิสระสามารถถายเทอิเล็กตรอนใหกับสารประกอบเชิงซอน $[Fe(III)(TPTZ)^{2}]^{3+}$ ทำใหเกิดการเปลี่ยนรูปเปน $[Fe(II)(TPTZ)^{2}]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)^{2}]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)^{2}]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารตานอนุมูลอิสระไดในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอรรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ไดแก การทำใหเกิดสารประกอบเชิงซอน $[Fe(III)(TPTZ)^{2}]^{3+}$ ประกอบด้วยนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายดวยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรดเฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซเฟอรริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอรรัสซัลเฟตหรือสารตัวอยาง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไวในที่มืด วิธีการนี้เปนวิธีที่งาย ใชเวลานอย ไมแพง และสามารถทำซ้ำแล้วใหผลเหมือนเดิม

2.5 โรคเบาหวาน

ปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนถึง 592 ล้านคนในปี ค.ศ. 2035 ทำให้องค์การอนามัยโลก (WHO) ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว[43] หากไม่มีการดำเนินการในการป้องกันและควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพ ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง (Hyperglycemia) คือสภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายที่ไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งพบได้ทั้งในผู้ป่วยภาวะทนต่อน้ำตาลบกพร่อง (Impaired glucose tolerance) และเบาหวาน (ทั้งชนิดที่ 1 และ 2) โดยเบาหวานจัดเป็นโรคไม่ติดต่อ (Non-communication disease) ที่มีปัญหาต่อวงการสาธารณสุขทั่วโลกและนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนตามมามากมาย[1]

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) และถูกขับออกทางปสสาวะเนื่องจาก

ร่างกายขาดฮอรโมนอินซูลินที่สรางจากตับออน ตับออนอาจสรางอินซูลินไมไดหรืออินซูลินมีประสิทธิภาพลดลง หรือจากการที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินลดลงหรือมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน โรคเบาหวานยังเพิ่มปัจจัยเสี่ยงนำไปสู่ภาวะโรคแทรกซ้อนที่รุนแรงขึ้น เช่น โรคหัวใจ (Heart disease) ภาวะไตวาย (Kidney failure) และเบาหวานขึ้นจอตา (Diabetic retinopathy) วิธีการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้น โดยทั่วไปใช้วิธีการควบคุมอาหารและออกกำลังกายร่วมกับการฉีดอินซูลินในรายที่เป็นมาก การรักษาโรคเบาหวานโดยการใช้ยาเป็นวิธีที่ใช้กันมากในปัจจุบัน ทั้งชนิดรับประทานและชนิดฉีด ตัวอย่างชนิดรับประทาน เช่น ยากลุ่มซัลโฟนิลยูเรีย (sulfonylureas) ได้แก่ ไกลเบนคลาไมด์ (glibenclamide) ไกลคลาไซด์ (gliclazide) ไกลพีไซด์ (glipezide) ซึ่งออกฤทธิ์ในการกระตุ้น เบต้าเซลล์ให้หลั่งอินซูลินมากขึ้น ช่วยให้เนื้อเยื่อตอบสนองต่ออินซูลินเพิ่มขึ้นแต่มักทำให้เกิดอาการข้างเคียง ได้แก่ มีผื่นตามผิวหนัง คลื่นไส้อาเจียน ตัวเหลืองซีดเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดต่ำ เป็นต้น การรักษาโดยการให้รับประทานยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในการลดหรือป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลกลูโคส เช่น อะคาร์โบส ไมกลิทอล และโวกลิโบส เป็นต้น โดยจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (**α**-amylase) และแอลฟากลูโคซิเดส (**α**-glucosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแป้งได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดลดลง ลดภาวะการมีน้ำตาลในเลือดสูง แต่ในการรักษาโดยใช้ยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น ภาวะตับเป็นพิษ (liver toxicity) และเกิดอาการไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหาร (adverse gastrointestinal symptoms) อีกทั้งผู้ป่วยเบาหวานโดยเฉพาะเบาหวานชนิดที่ 2 ต้องใช้ระยะเวลารักษานานและจำเป็นต้องใช้ตัวยาร่วมกันหลายชนิดในการรักษา ด้วยเหตุดังกล่าวจึงทำให้ต้องมีการค้นหาตัวยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (**α**-amylase) และแอลฟากลูโคซิเดส (**α**-glucosidase) จากธรรมชาติชนิดใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อร่างกาย[3,4]

2.5.1 โรคเบาหวานสามารถแบ่งได้หลายประเภท ได้แก่

2.5.1.1 เบาหวานชนิดที่ 1 (type I diabetes mellitus) เกิดจากการที่ตับอ่อนไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินซึ่งทำหน้าที่ดึงเอาน้ำตาลจากเลือดไปใช้ หรืออาจมีการสร้างได้น้อยกว่าปกติ ทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาโดยอาศัยอินซูลินจากภายนอก เบาหวานชนิดนี้มักเกิดตั้งแต่อายุยังไม่มาก เบาหวานชนิดนี้พบได้น้อย

2.5.1.2 เบาหวานชนิดที่ 2 (type II diabetes mellitus) ประเภทนี้พบได้บ่อยกว่าชนิดที่ 1 เกิดจากอินซูลินไม่สามารถออกฤทธิ์ที่ทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะในร่างกายนำน้ำตาลไปใช้ได้ แม้ว่าตับอ่อนจะสร้างอินซูลินได้ปกติ ทางการแพทย์เรียกว่าเกิดภาวะดื้ออินซูลิน ประเภทนี้อาจรักษา

โดยการใช้ยาโดยไม่จำเป็นต้องใช้อินซูลิน แต่เบาหวานชนิดที่ 2 นี้อาจเรื้อรังเป็นระยะเวลานานและตับอ่อนอาจสร้างอินซูลินได้ลดลงเรื่อย ๆ ในที่สุดก็อาจต้องใช้อินซูลินจากภายนอกในการรักษาด้วย

2.5.1.3 เบาหวานที่เกิดขึ้นระหว่างตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus) เป็นเบาหวานอีกชนิดหนึ่งซึ่งผู้ป่วยไม่มีประวัติการป่วยเป็นเบาหวานมาก่อน และมีการตรวจพบเมื่อตั้งครรภ์ เบาหวานชนิดนี้อาจกลายเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ต่อไปได้

นอกจากเบาหวานชนิดที่กล่าวถึงข้างต้นอาจมีเบาหวานชนิดอื่น ๆ ที่มีสาเหตุแตกต่างออกไป เช่น อาจเกิดจากการใช้ยาบางชนิด โรคตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง อุบัติเหตุ หรือความผิดปกติทางพันธุกรรม เป็นต้น[44]

2.6 อนุมูลอิสระกับโรคเบาหวาน

การเกิดโรคเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และ 2 จะมีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้น สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ (free radicals) และภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น (Oxidative stress)[45] ภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงนี้ มีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้นและมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ลดลง เมื่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย คือ เกิดขบวนการเมทาบอลิซึมของกลูโคส ส่งผลทำให้เกิดขบวนการกระตุ้นเอนไซม์ NADH reductase ส่งผลกระตุ้นให้มีการสร้างสารกลุ่ม Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนหรือได้รับอิเล็กตรอน ตัวอนุมูลอิสระจึงไม่เสถียรและพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ได้อย่างต่อเนื่องจนเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น โดยหากเกิดขึ้นในโรคเบาหวานก็จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อน ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าไปทำลายพวก macromolecule ในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน และ DNA โดยปกติ ร่างกายหรือเซลล์จะมีกลไกการป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress[46] โดยทั่วไปในการทำงานของร่างกายหรือเซลล์จะมีระบบต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) หรือ defense mechanisms เช่น Vitamin C และ Vitamin E, superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นตัวที่จะมาช่วยในการจัดการหรือลดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้โดยร่างกายจะพยายามรักษาความสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ แต่เมื่อใดก็ตามที่ความสมดุลนี้เสียไปจะทำให้เกิดภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น

กระบวนการเกิดภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น (oxidative stress) ในผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง เกิดจากการสะสมของ glucose จากภาวะ hyperglycemia และเกิด glycosylation จากกระบวนการ glucose autoxidation และ glycosylated กับ protein ทำให้เกิดการสะสมของ

advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งเป็นแหล่ง free radical ที่สำคัญ โดย AGEs สามารถปลดปล่อย superoxide anion และ hydrogen peroxide ออกมา มีผลให้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในร่างกาย เช่น glutathione ลดลงและมีไม่เพียงพอสำหรับทำลายอนุมูลอิสระ จึงเกิด oxidative stress ขึ้น[47]

ภาวะเครียดทางออกซิเดชั่นจะแสดงบทบาทสำคัญของการเกิดโรคที่เป็นภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และ 2 ซึ่งมีการศึกษาสาร 8-Hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG) ในปัสสาวะใช้เป็นสารบ่งชี้ภาวะการทำลายดีเอ็นเอจากภาวะเครียดทางอ็อกซิเดชั่น (oxidative stress) ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และความสัมพันธ์ของระดับ 8-OHdG กับสารบ่งชี้ทางชีวเคมีอื่น ๆ ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน พบว่า ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะเครียดทางออกซิเดชั่นเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการทำลายดีเอนเอจากภาวะเครียดทางออกซิเดชั่นที่เกิดมากขึ้น ซึ่งระดับของ 8-OHdG ในปัสสาวะและระดับของ malondialdehyde (MDA) ในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ใช้เป็นสารบ่งชี้ภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น ซึ่งจะเข้าไปมีส่วนร่วมในการเกิดโรคของภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวาน[48] นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมจากการเกิดมี 8-OHdG มากทั้งใน DNA ของนิวเคลียสและของไมโตคอนเดรีย ที่เป็นผลมาจากการทำลายของสารอนุมูลอิสระที่มีสร้างขึ้นมาเรื่อย ๆ ส่งผลให้มีการเกิดภาวะ chronic inflammation[49] โรคที่ร่วมกับการเกิดภาวะเครียดทางออกซิเดชั่น เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคเรื้อรังต่าง ๆ นี้ แสดงถึงการเกิดมี pro-oxidative shift ในระบบ redox แล้วทำให้เกิดความไม่สมดุลของการจัดการกลูโคส ทำให้ทราบว่า กล้ามเนื้อไมโตคอนเดรียนั้นเป็นบริเวณหลักของการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่งภาวะนี้คือ mitochondrial oxidative stress[50] ซึ่งสาเหตุสำคัญมาจากการที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงและในผู้ป่วยโรคเบาหวานก็จะมีกระบวนการจัดการกับระดับน้ำตาลที่เลวร้ายลง จึงเป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดอนุมูลอิสระมากเกินจนเกิดภาวะ oxidative stress และพบว่าการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคเบาหวานเกิดจากโรคแทรกซ้อนเป็นส่วนใหญ่[51] ที่สำคัญคือโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress เนื่องจากภาวะน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีการสร้าง superoxide anion มากขึ้นจนเกิดกระบวนการ lipid-peroxidation ได้[43] ดังนั้นการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการช่วยลดระดับภาวะ oxidative stress และการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี

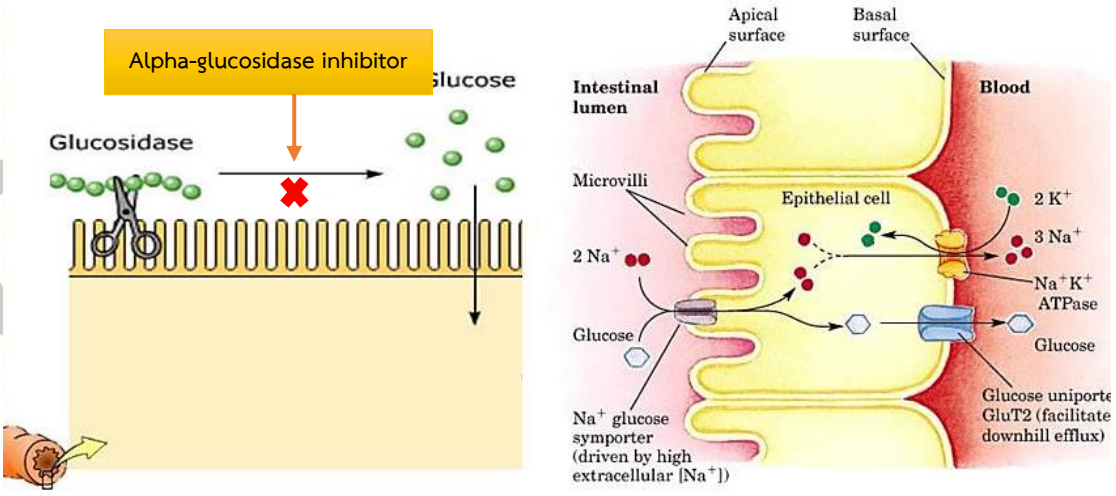
2.7 เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังลำไส้เล็กจะทำหน้าที่สลายออลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ เพื่อให้น้ำตาลถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดนำไปใช้เป็นกระบวนการเมตะบอลิซึมและ

สร้างพลังงานแก่ร่างกายต่อไป ทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่มีความบกพร่องของอินซูลินอาจทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ เนื่องจากอินซูลินไม่สามารถนำน้ำตาลที่อยู่ในกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานในร่างกายได้

สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase inhibitor) มักใช้เป็นแนวทางในการรักษาในลำดับแรกเพื่อจัดการภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส จะส่งผลให้การดูดซึมกลูโคสในลำไส้จากทางเดินอาหารเกิดขึ้นได้ช้าลง ออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตในลำไส้ ทำให้ร่างกายลดการดูดซึมกลูโคส จึงสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นหลังมื้ออาหาร ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงทำให้ oxidative stress ที่เกิดในผนังหลอดเลือดลดลงด้วย ทำให้ลดการเกิด vascular complication ในผู้ป่วยเบาหวานได้ และยังทำให้ตับอ่อนหลั่งอินซูลินเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังมื้ออาหารได้อีกด้วย

ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น อะคาโบส (acarbose) โวกิลโบส (voglibose) และมิกิทอล (miglitol) โดยจะมีผลในการลดระดับน้ำตาลหลังอาหาร (postprandial glucose) เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยตัวยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสก็มีอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายอย่าง เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว ปวดท้อง[52] ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสของพืชสมุนไพรหรือพืชที่รับประทานได้ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส และมีผลข้างเคียงน้อยหรือไม่มีเลย จึงนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการดูแลสุขภาพของผู้ป่วยโรคเบาหวาน



ภาพประกอบ 2 กลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase inhibitor)

ที่มาภาพ: https://www.slideshare.net/iyerbk/voglibose

2.8 เอนไซม์อะไมเลสและการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลส (amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) ไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (maltose) มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) เอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งน้ำตาลที่ถูกย่อยจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์[4]

สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (alpha amylase) มี 3 ชนิด ได้แก่

2.8.1 ชนิดที่เป็นโปรตีน พบได้ในพืชชั้นสูงจะยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง ตัวอย่างพืชที่พบสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ถั่วเมล็ดแห้ง และเผือก สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 9,000- 63,000 ดาลตัน ค่อนข้างทนต่อความร้อน อาจต้องใช้เวลาในการทำลายด้วยความร้อนนานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ข้อดีของสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส คือ ช่วยให้การย่อยคาร์โบไฮเดรต หรือสตาร์ช (starch) ในน้ำลายและลำไส้เล็กเป็นไปอย่างช้า ๆ ทำให้น้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ด้วย ซึ่งอาจเป็นผลดี เหมาะสำหรับเป็นอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และ อาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

2.8.2 ชนิดที่เป็นพอลิเพปไทด์ ผลิตโดยจุลินทรีย์ streptomyces พอลิเพปไทด์เหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,936-8,500 ดาลตัน สารยับยั้งชนิดนี้ยังไม่มีการศึกษากับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในพืช แมลง และสัตว์ มีเพียงงานวิจัยที่กำลังศึกษาในคนเท่านั้น

2.8.3 ชนิดที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีไนโตรเจน (N-containing carbohydrate) ผลิตโดยจุลินทรีย์ streptomyces เช่นเดียวกัน สามารถยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดส ตัวอย่างสารยับยั้งกลุ่มนี้ ได้แก่ โอลิโกสแตติน (oligostatin) อะไมโลสแตติน (amylostatin) และเทรสแตติน (trestatin) ซึ่งมีหน่วยย่อยของซูโดไดแซ็กคาไรด์ (pseudodisaccharide unit) อาจเป็นโอลิโกไบโอเอมีน (oligobioamine) หรือดีไฮโดรโอลิโกไบโอเอมีน (dehydrooligobioamine) ซึ่งจะมีแอลฟา-ดี-กลูโคสจำนวนหนึ่งต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4 และมีหนึ่งโมเลกุลเป็นพันธะแอลฟา-1,1

2.9 การรักษาโรคเบาหวานในทฤษฎีการแพทย์แผนไทย

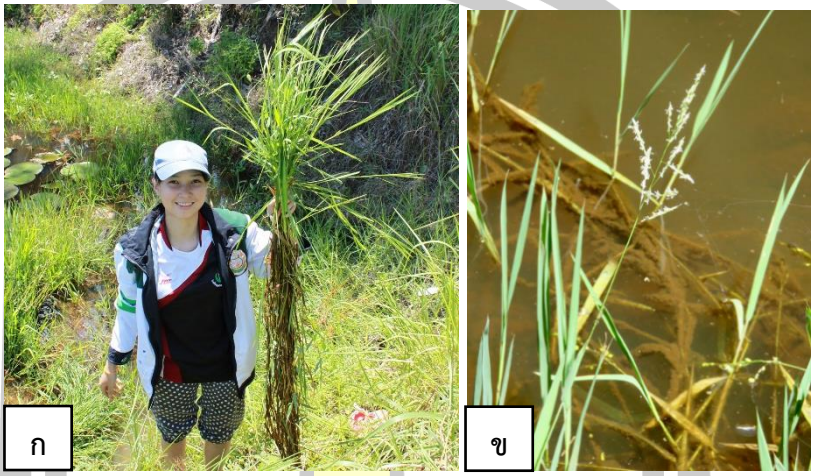
การแพทย์แผนไทยมีอิทธิพลมาจากการรับเอาวัฒนธรรมการรักษาจากอินเดียเข้ามาปรับใช้ จึงเกิดแนวคิดการอธิบายการเจ็บป่วยของมนุษย์โดยใช้ทฤษฎีธาตุ ซึ่งการแพทย์แผนไทยมีแนวคิดที่คล้ายคลึงกับทฤษฎีธาตุของอินเดีย คือร่างกายประกอบด้วยธาตุ 4 ประการ ได้แก่ ธาตุดิน ธาตุน้ำ ธาตุลม และธาตุไฟ การเจ็บป่วยมีสาเหตุจากความแปรปรวนของธาตุทั้ง 4 โดยเรียกสาเหตุการเกิดโรคว่า “สมุฏฐาน” นอกจากนี้ยังมีเหตุเนื่องจากการเกิดพฤติกรรมไม่เหมาะสมอื่น ๆ ด้วย ซึ่งสมุฏฐานและพฤติกรรมมีผลให้ธาตุทั้งสี่ในร่างกายไม่สมดุล จึงมีหลักการรักษาคือ การปรับสมดุลของธาตุโดยการใช้สมุนไพร การเลือกใช้สมุนไพรขึ้นอยู่กับทฤษฎีรสยาและสรรพคุณทางยาของสมุนไพรแต่ละชนิด[53] นอกจากนี้ยังมีการแพทย์พื้นบ้านที่มี “หมอพื้นบ้าน” เป็นผู้ปฏิบัติการโดยใช้ภูมิปัญญาพื้นบ้านด้านสุขภาพที่สืบทอดกันมาในชุมชนนั้น ๆ ดูแลสุขภาพผู้คนในชุมชนและตนเองเพื่อการดำรงชีวิตอย่างปกติและสมดุล เช่น การบริโภคอาหารและพืชผักพื้นบ้าน การใช้สมุนไพรที่มีในชุมชนและการเป่ามนต์คาถาประกอบกัน การใช้ยากลางบ้าน (มีร่วมยาหรือตำรายาประจำครอบครัว) ซึ่งในหลายชุมชนมีตำรับยาสมุนไพรที่มีชื่อเสียงและเป็นที่รู้จักของประชาชน[20]

2.10 พืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

ตำรับยาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคเบาหวานที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มาจากคัมภีร์ยาสมุนไพรไทย "ตำรับหมอพร" กรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ เป็นที่รำลือกันว่า ทุกวิชาการในพระองค์ ล้วนเป็นสุดยอดวิชา ยิ่งเฉพาะตำรับยาสมุนไพรตำรับนี้ ถือกันว่าดีเลิศไร้เทียมทาน มีสรรพคุณบำรุงชีวิตแก้โรคแก้พิษได้ชะงัด มากกว่า 900 ขนาน 9,000 ตัวยา ทรงจารึกพระคัมภีร์ ชื่อ "อติสาระวรรคฯ" เป็นคัมภีร์ยาสมุนไพรไทยอันบริบูรณ์ทั้งตัวยาและวิธีใช้ประทาน คัมภีร์ยาสมุนไพรไทยนี้เป็นตำรายาแผนโบราณเสด็จในกรม ฯ ทรงเขียนในสมุดข่อยด้วยลายพระหัตถ์ของพระองค์เอง ตำรานี้เขียนเสร็จในปี พ.ศ. 2458 ทรงตั้งชื่อตำรายาไทยสมุดข่อยเล่มนี้ว่า พระคัมภีร์อติสาระวรรค โบราณกรรมและปัจจุบันนะกรรม คัมภีร์ยาสมุนไพรไทยนี้ยังเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์ทหารเรือ จังหวัดสมุทรปราการจนบัดนี้ คัมภีร์ยาสมุนไพรไทย ฉบับนี้กลายเป็นทรัพย์คู่บ้านสืบทอดสู่รุ่นบุตรหลานอย่างคุ้มค่าที่สุด เนื้อหามีทั้งส่วนที่เป็นตำรายาแผนโบราณ และกล่าวถึงการผสมยา แก้โรคต่าง ๆ ซึ่งมีตำรับยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานหลายขนาน โดยขนานที่ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาคือ ขนานที่ 23 ได้กล่าวไว้ว่า “...ท่านให้เอา ต้นหญ้าไททั้งห้า กับต้นหญ้าปราบทั้งห้า (เอาทั้งต้นตลอดถึงราก) เอาอย่างละ 1 กำมือ ตัวยาทั้ง 2 อย่างนี้ นำมาล้างให้สะอาด มัดเป็น 3 เปลาะ ใส่หม้อดินต้มกับน้ำ ใช้น้ำยารับประทานต่างน้ำชา วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ถ้วยชา ประมาณ 15 วัน โรคเบาหวานจะหายไป มีสรรพคุณชะงัดนักแล เคยใช้รักษาได้ผลดีมามากแล้วๆ...”[6] นอกจากนี้ ตำรับยาดังกล่าวยังปรากฏในตำรายาอื่น ๆ

ที่กล่าวถึงการนำไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ตำรายากลางบ้าน[7] และงานวิจัยการรวบรวมตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานในเชิงทฤษฎีการแพทย์แผนไทย[53]

2.10.1 หญ้าไทร



ภาพประกอบ 3 หญ้าไทร

ก. ต้น ข. ดอก

หญ้าไทร หรือหญ้าไซ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Leersia hexandra* Sw. อยู่ในวงศ์ Poaceae[8,9] (ชื่อเดิมคือ Gramineae หรือวงศ์หญ้า) ชื่ออื่น ๆ หญ้าคมบาง (นครศรีธรรมราช) หญ้าทราย หญ้าไทร (กรุงเทพฯ)[10] ชื่อสามัญ Southern cutgrass หรือ Swamp ricegrass

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นหญ้าอายุหลายปี ชอบขึ้นอยู่ที่ริมน้ำ ที่ชุ่มชื้น มีรากยาวและมีเหง้าใต้ดินที่แข็งแรง ลำต้นทอดเลื้อย (trailing) ไปตามพื้นดินหรือในน้ำ แตกรากตามข้อ ต้นสูง 96.82-118.38 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 1.35-1.81 มิลลิเมตร ลำต้นสีเขียวอมน้ำตาล กลม เรียบ ข้อมีขนสีขาวคลุมรอบ ๆ ใบเป็นแบบรูปใบแถบ (linear) ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ใบยาว 13.5-17.04 เซนติเมตร กว้าง 0.59-0.97 เซนติเมตร ใบสีเขียว ผิวใบหยาบสากมือและไม่มีขน เส้นกลางใบด้านหลังเป็นสันเล็กยาวตลอด ขอบใบหยักแบบขนครุย (ciliate) กาบใบสีเขียว เรียบ กาบใบยาว 5.21-6.75 เซนติเมตร ลิ้นใบเป็นแผ่นเยื่อเรียบ (membranous entire) ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ยอดอ่อนโผล่แบบม้วน ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์-ธันวาคม ช่อดอกออกที่ปลายยอดแบบช่อแยกแขนง (panicle) ช่อดอกยาว 13-21 เซนติเมตร ส่วน Head ยาว 2.5-4 เซนติเมตร กลุ่มดอกย่อย (spikelet) รูปรี ยาว 3-4 มิลลิเมตร มีกาบหุ้ม (glume) ที่มีขนหยาบสั้น ๆ กลุ่มดอกย่อยขึ้นเรียงตามกันอยู่บนแกนช่อดอกย่อยด้านเดียว แต่ละกลุ่มประกอบด้วยดอก (floret) ที่มี lemma หุ้มและไม่มีหาง (awnless) ดอกย่อยมีดอกเดียว สมบูรณ์เพศ (fertile) อับเรณูสีเหลือง ดอกแก่ร่วงง่าย

พืชชนิดนี้มีใบม้วนกลมแข็งเป็นเส้นคมและคายมาก มีขนเล็ก ๆ สากมือ บาดผิวหนังให้เป็นริ้วรอยเจ็บๆ คันๆ ได้ มักพบขึ้นอยู่ตามคูคลองที่น้ำขึ้นถึงได้ หรือตามท้องไร่ท้องนา ชาวบ้านที่ชอบเลี้ยงปลากัดนิยมเอาหญ้าไทรใส่ไว้ในบ่อ หรืออ่างที่ใช้เลี้ยงปลากัด ว่ากันว่าจะทำให้ปากปลาคมดี พบในแถบเขตร้อน พบทั่วไปในแหล่งน้ำ ตามตลิ่ง คูน้ำและเป็นวัชพืชในนาข้าว[9,56] พบในแอฟริกา อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ เอเชีย และออสเตรเลีย ในไทยพบทุกภาคตามพื้นที่ชุ่มน้ำ[9]

สรรพคุณทางการแพทย์แผนไทย ทั้งต้น มีรสจืดขื่น ต้มน้ำ ดื่มเป็นยาขับปัสสาวะ ขับฟอกโลหิตประจำเดือนของสตรี แก้โลหิตประจำเดือนเป็นลิ่ม เป็นก้อนแข็ง ดำเน่าเหม็น ซึ่งทำให้เจ็บปวดตามท้องน้อยและบั้นเอวและขับฟอกพิษในตับ[54]

การรักษาโรคทางการแพทย์แผนโบราณ ตามตำรายาแผนไทย ในคัมภีร์ยาสมุนไพรไทยตำรับหมอพร และตำรายากลางบ้าน โดยพระครูสิริเลขการ วัดด่านสำโรง อ.เมือง จ. สมุทรปราการ บันทึกไว้ว่าใช้หญ้าไทรร่วมกับหญ้าปราบต้มดื่มรักษาโรคเบาหวานและเคยรักษาได้ผลดีมามากแล้ว[6,7] นอกจากนี้ บางหมู่บ้านในประเทศอินโดนีเซีย มีใช้หญ้าไทรรักษาอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ[55] และใช้ยาตำรับที่มีหญ้าไทร ต้นอ้อย หญ้าเจ้าชู้ และหญ้าคา เพื่อบรรเทาอาการไอ[56] ในประเทศแอฟริกา มีตำรับยาโบราณของเซเนกัล (senegal) ใช้หญ้าไทรรักษาไอเป็นเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการอ่อนแรงซึ่งมีอาการไอเป็นประจำ และสาธารณรัฐแคเมอรูน ในแอฟริกากลาง ใช้หญ้าไทรในการรักษาความดันโลหิตสูง[14]

สารพฤกษเคมีที่พบในหญ้าไทร

ราก พบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และเทอรพีนอยด (terpenoids) สกัดสารตัวตัวทำละลายน้ำกลั่น[13] กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) กรดมาลิค (malic acid) กรดแลคติก (lactic acid) และ กรดซิตริก (citric acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากการแยกสารจากรากหญ้าไทรและหาปริมาณของกรดอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำตรวจสอบด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography)[17]

ทั้งต้น พบ glucose ในตัวทำละลายด้วยน้ำ และองค์ประกอบทางเคมีอีก 3 ชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ในการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC-DAD-HRESI-MS[14] มีความสามารถในการดูดซึมและสะสมโลหะได้ดี โดยเฉพาะ chromium (Cr-hyperaccumulator) ในต่างประเทศ เช่น ประเทศจีนมักใช้ต้นหญ้าปราบในการปรับสภาพดินและน้ำที่ปนเปื้อนบริเวณโรงงาน[57]

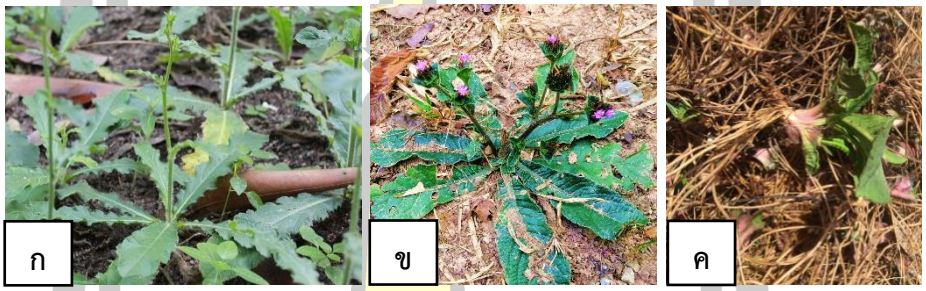
การศึกษาทางเภสัชวิทยา

การศึกษาพืชวงศ์หญ้า 3 ชนิด ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (antiproliferation) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากหญ้า 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าไทร หญ้าชันกาด หญ้าขน ใช้ทั้งต้น (ทำให้แห้ง) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซนและบิวทานอล ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) เปรียบเทียบกับเซลล์ปอดปกติ (MRC-5) พบว่า ปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซนและบิวทานอลที่ได้ (%yield) คือ หญ้าไทร (28.34, 13.11) หญ้าชันกาด (13.65, 20.24) และหญ้าขน (18.49, 19.33) ตามลำดับ สารสกัดหญ้าชันกาดด้วยบิวทานอลสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ A549 และ HeLa cells (IC_{50} 2, 1.1 mg/mL) ในขณะที่สารสกัดหญ้าไทรและหญ้าขน แสดงผลในระดับปานกลางถึงระดับต่ำ (IC_{50} 90-980 mg/mL) ซึ่งสารสกัดหญ้าทั้ง 3 ชนิดด้วยเฮกเซน ทำให้เซลล์ตายและแปรผันตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นในการทดสอบการตายของเซลล์ (apoptosis) ในเซลล์ A549 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งหมดเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกตัวของดีเอ็นเอ (ladder-like DNA fragmentation) ของเซลล์มะเร็งสัมพันธ์กับปริมาณและเวลา อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากหญ้าดังกล่าวนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptotic นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากหญ้าทั้งสามชนิดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านการบุกรุก (anti-Invasive effects) ของเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cells) สารสกัดจากหญ้าไทรด้วยเฮกเซน (50-100 µg/ml) และสารสกัดหญ้าชันกาดด้วยบิวทานอล (1 µg/ml) ลดความสามารถในการรุกรานของเซลล์ MDA-MB-231 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า หญ้าทั้ง 3 ชนิด มีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งที่มีศักยภาพ และอาจพัฒนาเป็นยาเคมีบำบัดที่มีศักยภาพในการรักษามะเร็งที่ลุกลามในอนาคต[12]

การศึกษาฤทธิ์ลดความดันโลหิตด้วยสารสกัดหญ้าไทรด้วยตัวทำละลายน้ำในหนูทดลอง (male wistar rat) ที่ถูกเหนี่ยวให้มีความดันเลือดสูงด้วยเอทานอล (ethanol-induced hypertension) โดยนำผงหญ้าไทรแห้ง 500 กรัม ต่อน้ำร้อน 5 ลิตร แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ตามกรรมวิธีดั้งเดิมกรองแล้วทำให้แห้ง ได้สารสกัดหญ้าไทรด้วยตัวทำละลายน้ำ 19 กรัม (3.8% yield) เพื่อนำไปป้อนทางปากในหนูทดลอง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น (10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน) และกลุ่มที่ 2 ได้รับเอทานอล 40° เป็นเวลา 5 สัปดาห์ หลังจากนั้น กลุ่มที่ 1 จะเป็นกลุ่มควบคุมปกติ และกลุ่มที่ 2 หนูทดลองที่เป็นความดันเลือดสูงถูกแบ่งย่อยออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ซึ่งจะได้รับการรักษาดังนี้ กลุ่มที่ 2.1 ได้รับเอทานอลและน้ำกลั่น (10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) กลุ่มที่ 2.2 ได้รับเอทานอลและสารสกัดหญ้าไทร (100 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) กลุ่มที่ 2.3 ได้รับเอทานอลและสารสกัดหญ้าไทร (200 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) และกลุ่มที่ 2.4 ได้รับเอทานอลและ nifedipine (10

มิลลิลิตร/กิโลกรัม/p.o.) ตามลำดับ พบว่า เอทานอลทำให้ความดันเลือดแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (MAP) อัตราการเต้นของหัวใจปกติ มีค่าไขมัน คีเอตินีน และเอนไซม์จากตับและไตในเลือดเพิ่มขึ้น การให้สารสกัดหญ้าไทร ในขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ทำให้ความดันเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบ nifedipine หนูทดลองที่เป็นความดันเลือดสูงที่ได้รับสารสกัดหญ้าไทร หรือ nifedipine มีไขมันในเลือดลดลง ฟื้นฟูการทำงานในตับและไตอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหญ้าไทร อาจมีกลไกเกี่ยวข้องกับกระบวนการลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี[14]

2.10.2 หญ้าปราบ



ภาพประกอบ 4 หญ้าปราบ
ก. ใบ ข. ดอก ค. ราก

หญ้าปราบ หรือรู้จักกันดีในชื่อ โด่ไม่รู้ล้ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elephantopus scaber* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae (ชื่อเดิมของวงศ์นี้คือ Compositae)[15,16] ชื่ออื่น ๆ ได้แก่ ขี้ไฟนกคุ่ม (เลย) คิงไฟนกคุ่ม (ชัยภูมิ) เคยโป้(ภาคเหนือ) โด่ไม่รู้ล้ม (ภาคกลาง) ตะซีโกวะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) หญ้าไก่นกคุ่ม หญ้าไฟนกคุ้ม หญ้าสามสิบสองหาบ หนาดผา (ภาคเหนือ) หญ้าปราบ (ภาคใต้) หนาดมีแคลน (สุราษฎร์ธานี)[17,18] ชื่อสามัญ Prickly leaved elephant's foot[16,18]

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พืชล้มลุกหรือพืชจำพวกหญ้า ลำต้นสั้น กลม ชี้ตรง สูง 10-30 เซนติเมตร ตามผิว ลำต้น และใบมีขนสีขาวตรงละเอียด ห่าง สาก ทอดขนานกับผิวใบ ใบเป็นชนิดใบเดี่ยว อยู่บริเวณเหนือเหง้า ติดเป็นวงกลมเรียงสลับชิดกัน คล้ายแบบกระจุกกุหลาบซ้อนที่โคนต้น ใบรูปหอกกลับ หรือรูปไข่แกมใบหอกกลับ แผ่นใบยาว 8-20 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร ส่วนที่ค่อนไปทางปลายใบ ผายกว้าง แล้วสอบแหลมทู่ ๆ ส่วนโคนใบสอบแคบจนถึงก้านใบ ผิวใบมีขนสากทั้งสองด้าน ท้องใบมีขนมากกว่าหลังใบ ขนตรงห่างสีขาว และขนต่อม ห่าง ขอบใบหยักมน หรือจักฟันเลื่อยห่าง ๆ เส้นแขนงใบมี 12-15 คู่ ใบมักแผ่ราบไปกับพื้นดิน เนื้อใบหนาสาก ก้านใบยาว 0.5-2 เซนติเมตร หรือไม่มีก้านใบ ดอกช่อแทงออกจากกลางต้น ช่อดอกรูปขอบขนาน มี 4 ดอกย่อย ยาว 8-10 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ดอกย่อยขนาดเล็ก ดอกรูปหลอดสีม่วง หลอด

กลีบดอกยาว 3-3.5 มิลลิเมตร เกลี้ยง ปลายกลีบดอกยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ไม่มีขน เกสรเพศผู้สีเหลือง มีอับเรณูยาว 2.2-2.3 มิลลิเมตร ปลายแหลม ฐานเป็นติ่งแหลม ก้านชูอับเรณูยาว 1.5-1.7 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมีก้านเกสรยาว 7-8 มิลลิเมตร ยอดเกสรยาว 0.5-0.6 มิลลิเมตร มีขนที่ปลายยอดและสิ้นสุดที่รอยแยก แต่ละช่อย่อยมาอยู่รวมกันเป็นช่อกระจุกกลมที่ปลายก้านดอก บริเวณโคนกระจุกดอกมีใบประดับแข็งรูปสามเหลี่ยม แนบอยู่ 3 ใบ ยาว 1-2 เซนติเมตร กว้าง 0.5-1.5 เซนติเมตร ขอบเรียบ ปลายเรียวแหลม ผิวใบทั้งสองด้านมีขนตรงสีขาว ออกที่ปลายยอดแบบช่อแยกแขนง ก้านช่อดอกยาวถึง 8 เซนติเมตรมีขนสาก ๆ ทั่วไป ฐานรองดอก แบน เกลี้ยง เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 มิลลิเมตร วงใบประดับรูปขอบขนาน มี 2 ชั้น สูง 7-10 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ใบประดับรูปใบหอก ผิวด้านนอกมีขนตรง และที่ขอบมีขนครุย ชั้นนอกรูปใบหอก ยาว 4-6 มิลลิเมตร กว้าง 0.5-1.5 มิลลิเมตร ปลายแหลม ชั้นที่ 2 รูปขอบขนานยาว 8-10 มิลลิเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร ปลายแหลม แพปพัส สีขาวเป็นเส้นตรงแข็งมี 5 เส้น เรียง 1 ชั้น ยาว 5-6 มิลลิเมตร ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก ผลเล็กเรียว รูปกรวยแคบ ผิวด้านนอกมีขนหนาแน่น ยาว 2.5-3 มิลลิเมตร กว้าง 0.4-0.5 มิลลิเมตร ไม่มีสัน ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ออกดอกช่วงเดือนสิงหาคม-มกราคม พบขึ้นตามป่าโปร่งที่ดินค่อนข้างเป็นทรายทั่ว ๆ ไปในป่าเต็งรัง ป่าดิบ และป่าสนเขาทุกภาคของประเทศไทย และประเทศเขตร้อนทั่วโลก[17,18]

สรรพคุณทางการแพทย์แผนไทย หญ้าปราบ หรือโด่ไม่รู้ล้ม มีรสกร่อยขื่น ใบ ใช้รักษาบาดแผล แก้โรคผิวหนัง รากและใบ ขับปัสสาวะ แก้ท้องร่วง แก้โรคแผลในกระเพาะอาหาร แก้บิด แก้กามโรคในสตรีต้มอาบหลังคลอด ราก แก้ปวดฟัน แก้อาเจียน ต้มเอาน้ำอม แก้ปวดฟัน ต้มดื่ม แก้อาเจียน ทั้งต้น แก้ปัสสาวะพิการ บำรุงกำหนัด แก้วัณโรค แก้ไอ แก้ไข้ แก้อักเสบ ขับน้ำเหลืองเสีย แก้ดีซ่าน ขับนิ่ว แก้บิด แก้เหน็บชา บำรุงหัวใจ แก้กามโรคในสตรี[18]

นอกจากการรักษาโรคตามแพทย์แผนไทยแล้ว[6,7] ยังมีรายงานการสำรวจการใช้พืชสมุนไพรตามภูมิปัญญาหมอพื้นบ้านอีสาน พบว่ามีการใช้หญ้าปราบ (โด่ไม่รู้ล้ม) รักษาอาการปวดเอวหลังคลอดบุตร[20] รากใช้ต้มรับประทานเป็นยาแก้ไอและยาชูกำลัง[19] และยังเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยาผสมโคคลาน ซึ่งเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติที่ใช้รักษาผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยใช้บรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย[58] ในประเทศบราซิลใช้ทั้งต้นต้มรับประทานเป็นยาขับปัสสาวะ ขับนิ่ว ลดไข้ แก้ไอหลอดลมอักเสบและหอบหืด[59] ประเทศจีน ฮ่องกง และไต้หวัน ใช้ต้นหญ้าปราบกันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคไตอักเสบ ตัวบวม เจ็บหน้าอก ไข้ โรคหิด แก้ไอจากโรคปอดบวม[19] จะเห็นได้ว่ามีการนำหญ้าปราบมาปรุงเป็นยาเดี่ยวและยาตำรับโดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืชต้มรับประทานเพื่อรักษาอาการต่าง ๆ และบำรุงร่างกายกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

สารพฤกษเคมีที่พบในหญ้าปราบ

ทั้งต้น พบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins)[29] เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สเตรียรอยด์ (steroids)[60] ไตรเทอร์ปีน (triterpenes) ฟลาโวน (flavones)[61] deoxyelephantopin (DET) เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกด้วยตัวทำละลายเอทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม[23,61,62] ethyl, methyl 3,4,3´,4´-tetrahydroxy-σ-truxinate, 5-*o*-coffeoylquinic acid, chlorogenic acid methyl ester, deoxyelephantopin และ isoscarbertopin สกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท[63] กลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ได้แก่ 3,4-dihydroxy benzaldehyde, p-coumaric acid, vanillic acid, syringic acid, isovanillic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, 3-methoxy-4-hydroxyl cinnamic aldehyde, tricin, syringic acid, E-3-(3-ethoxy-4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 2-hydroxybenzolate acid ซึ่งแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายเอทานอล[64,65]

ลำต้น (aerial part) พบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid aglycoside luteolin และ flavonoid glycosides) ได้แก่ luteolin-7-Oglucuronide 6"-methyl ester และ luteolin-4-O-β-D glucoside, polyphenols 3 ชนิด ได้แก่ trans-p-coumari acid, methyl trans-caffeate, trans-caffeic acid แยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยตัวทำละลายเอทานอล[65]

ราก พบ methyl 3, 4-dicaffeoylquinate เมื่อแยกสารด้วยตัวทำละลายเอทานอล[65] 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 3, 4-di-*O*-caffeoyl quinic acid methyl ester, 4, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid, 4, 5-di-*O*-caffeoyl quinic acid methyl ester, 1α, 2β-di-*O*-caffeoyl-cychopentan-3β-ol[24]

นอกจากนี้ยังพบ monoterpenes, sesquiterpenes, hexadecanoic acid, isopropyl dimethyl tetrahydronaphthalenol, β-sesqui-phellandrene, octadecadienoic acid, phytol[38] beta-phellandrene และ beta-pinene ในน้ำมันหอมระเหย[66]

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและเนื้องอก[20] ได้แก่ มะเร็งเต้านม ด้วยสาร deoxyelephantopin (DET) เป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกองค์ประกอบทางเคมีได้จากต้นหญ้าปราบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (human breast cancer cell lines) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (malignant tumors) เซลล์มะเร็งผิวหนัง

(melanoma derived cell line MEXF 394NL)[67] ใบหญ้าปราบมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องท้อง (Dalton's ascitic lymphoma) ในหนูทดลอง[68]

ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ปกป้องตับ[23] สาร deoxyelephantopin (DET) เป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกองค์ประกอบทางเคมีได้จากต้นหญ้าปราบ

ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ได้แก่ สารสกัดจากรากมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสในหลอดทดลอง (respiratory syncytial virus (RSV))[24] สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *P. vulgaris*[25] สารสกัดจากทั้งต้นด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 4 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumonia* ได้ถึง 75%[27] สารสกัดจากทั้งต้นด้วยตัวทำละลายน้ำสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Strptococcus mutans*[26]

ฤทธิ์ต้านการอักเสบในระบบประสาทของสารสกัดใบหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% แล้วนำมาสกัดแยกโดยใช้เอทิลอะซิเตท[22]

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รากหญ้าไทร

การศึกษาสารสำคัญและกิจกรรมการตานอนุมูลอิสระเบื้องตนของหญ้าไทร เพื่อหาสัดสวนที่เหมาะสมเพื่อเป็นสูตรมาตรฐานของชาสมุนไพร และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชงชาสมุนไพรเพื่อให้ได้ปริมาณโพลีฟีนอลสูงที่สุด โดยนำสวนของ หญ้าไทรหรือหญ้าไซ (ราก) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่นโดยอัตราสวนพืชตอน้ำกลั่น 1:10 เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารสำคัญในพืชเบื้องต้น พบว่า มีกลุ่มสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และเทอรพีนอยด์ และพบปริมาณโพลีฟีนอล 58.33±0.29 µgGAE/mL การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ TBARS assay พบว่าสารสกัดหญ้าไทร มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 16.14±2.80% ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งสารเกิดออกซิเดชัน โดยวิธี TBARS พบวา หญ้าไทร มีประสิทธิภาพเท่ากับ 8.93±2.40% แสดงให้เห็นว่าหญ้าไทรมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีสารกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และเทอรพีนอยด[13]

ใบหญ้าปราบ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต้นหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 70% แล้วนำมาแยกสารด้วย แอลกอฮอล์ 50% (hydro alcoholic) เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล พบว่า มีสารพฤษเคมีกลุ่ม แอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) ควิโนน (quinones) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) และ น้ำมัน (oils)[26]

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% แล้วนำมาสกัดแยกโดยใช้เอทิลอะซิเตท (ESEAF) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้าน

อนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ESEAF 1,000 µg/mL มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 85.73% มีค่า IC_{50} 69.70±0.01 µg/mL เมื่อเทียบกับ gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide anion radical scavenging activity (SOD) พบว่า ESEAF มีค่า IC_{50} 3.79±0.16 µg/mL จากผลการทดสอบ DPPH แสดงให้เห็นว่า ESEAF มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้น ESEAF ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)[22]

รากหญ้าปราบ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์การวิธี superoxide scavenging มีค่า IC_{50} = 48±5 µg/mL วิธี Hydroxyl radical scavenging มีค่า IC_{50} =72±12 µg/mL และวิธี lipid peroxidation inhibiting IC_{50} =103±18 µg/mL เทียบกับสาร Curcumin (IC_{50} = 9.8, 38.2 และ 16.5 µg/mL ตามลำดับ) เมื่อนำสารสกัดรากหญ้าปราบขนาด 75 มก./กก. และ 150 มก./กก. มาทดสอบในหนูทดลองที่มีพยาธิสภาพที่ตับ (CCl_4 เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับในหนูทดลอง) โดยตรวจวัดระดับซีรั่มในเลือด พบว่าระดับ AST ALT ALP และ GGT ลดลงและเพิ่มระดับของ TP และ Albumin อย่างมีนัยสำคัญ ระดับ TBARS และ CD ลดลงเมื่อกับหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา เนื้อเยื่อตับมีระดับ GSH เพิ่มขึ้น ระดับ SOD และ CAT ลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาในตับที่เกิดจาก CCl_4 นั้นลดลง จากการให้สารสกัดรากหญ้าปราบเปรียบเทียบกับสาร Curcumin แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและต้านความเป็นพิษต่อตับ อาจเป็นเพราะกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ[28]

ต้นหญ้าปราบ (ทั้งต้น)

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดต้นหญ้าปราบในหนูทดลอง (Swiss albino mice) โดยนำต้นหญ้าปราบแห้ง 99 กรัมในตัวทำละลายเมทานอล (1:5 w/v) ได้ปริมาณสารสกัด 4.33 กรัม นำมาทดลองฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล oral glucose tolerance tests (OGTT) โดยแบ่งหนูทดลองเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่ม 1 ควบคุม ได้รับสารละลาย 1% Tween 80 ปริมาตร 10 mL/kg กลุ่ม 2 ได้รับยามาตรฐาน (glibenclamide, 10 mg/kg) กลุ่ม 3-6 ได้รับสารสกัดหญ้าปราบด้วยการป้อนทางช่องปากในขนาด 50, 100, 200 และ 400 มก./กก. หลังจาก 1 ชั่วโมงจะได้รับกลูโคส ขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม และเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจหลังจากให้กลูโคสไป 120 นาที วัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) พบว่า สารสกัดหญ้าปราบขนาด 50, 100, 200 และ 400 มก./กก. มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลในเลือดลดลง 0, 13.0, 36.6 และ 48.1 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงเมื่อให้สารสกัดในปริมาณที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยา glibenclamide

ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้น้ำตาลในเลือดลดลง 47.3% สารสกัดหญ้าปราบในขนาด 400 มก./กก. แสดงฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่า glibenclamide[29,69]

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Streptozotocin จากสาร 28Nor-22 (R) Witha 2,6,23-trienolide ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่สกัดแยกได้จากต้นหญ้าปราบ ด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เมื่อนำมาทำการทดสอบในหนูทดลอง ด้วยวิธี glucose oxidase method โดยใช้สาร STZ-induced พบว่า สาร 28Nor-22 (R) Witha 2,6,23-trienolide จากต้นหญ้าปราบ สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและเพิ่มระดับอินซูลินในหนูเบาหวาน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นหญ้าปราบมีประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นการปล่อยอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนหรือการได้รับการฟื้นฟูของเซลล์เนื้อเยื่อตับอ่อน[30]

ใบและรากหญ้าปราบ

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดจากสารสกัดจากใบและรากหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายด้วยน้ำในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Alloxan ฉีดทางช่องท้องขนาด 150 mg/kg^{-1} โดยแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ได้แก่ กลุ่ม 1 หนูปกติ กลุ่ม 2 หนูกลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน กลุ่ม 3 หนูเบาหวานที่ป้อนสารสกัดรากหญ้าปราบ (ESR) ขนาด 0.3 g/kg^{-1} กลุ่ม 4 หนูเบาหวานที่ป้อนสารสกัดใบหญ้าปราบ (ESL) ขนาด 0.3 g/kg^{-1} และกลุ่ม 5 หนูเบาหวานที่ได้รับยา humalin ฉีดทางช่องท้องขนาด 0.6 g/kg^{-1} เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการตรวจค่าทางชีวิเคมี พบว่า ระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ได้รับ ESR และ ESL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (84.8±0.43 และ 88.3±0.19 mg/dL^{-1} ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Alloxan (360.8±0.49 mg/dL^{-1}) มีเปอร์เซ็นค่าน้ำตาลสะสมในเลือด (HbA1c) ในหนูกลุ่มที่ 1-5 คือ 2.40±0.06, 4.80±0.05, 2.5±0.02, 2.6±0.01 และ 2.4±0.03% ตามลำดับ มีระดับไกลโคเจนในตับคือ 48.80±0.52, 9.0±0.28, 42.3±0.18, 40.6±0.22 และ 46.3±0.06 mg/g^{-1} ตามลำดับ มีระดับอินซูลินในซีรั่ม คือ 38.60±0.44, 8.2±0.24, 34.8±0.09, 32.0±0.13 และ 33.0±0.43 mg/g^{-1} ตามลำดับ มีระดับคอเลสเตอรอล HDL ไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น มีค่ายูเรียและครีเอตินินในปัสสาวะลดลง และทำการตรวจสอบย้อมสีเบต้าเซลล์ในเซลล์ Islet ด้วยวิธี Immunohistochemistry (เบต้าเซลล์ย้อมติดสีแดง) พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ ESR และ ESL ย้อมติดสีแดงประมาณครึ่งหนึ่งในเซลล์ Islet เมื่อเทียบกับหนูปกติ ซึ่งหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับยา humalin ไม่พบการย้อมติดสีแดงที่เซลล์ Islet แสดงให้เห็นว่า ESR และ ESL สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและฟื้นฟูการทำงานของตับและไตเมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน โดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถรักษาโรคเบาหวานได้ใกล้เคียงกัน[31]

การศึกษาความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดหญ้าปราบที่สกัดด้วยเมทานอลในหนูทดลอง โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 9 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับสารละลาย 1% Tween 80 ในน้ำเกลือ (2 mL/kg) กลุ่ม 2-9 ได้รับสารสกัดหญ้าปราบ ในขนาด 100, 200, 300, 600, 800, 1,000, 2000 และ 3000 มก./กิโลกรัม ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรือการตายเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และสังเกตต่ออีก 2 สัปดาห์ สารสกัดหญ้าปราบไม่ได้แสดงความเป็นพิษในหนูทดลองแม้จะได้รับในขนาดที่สูงแล้วก็ตาม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบพฤติกรรมและการตาย[69]

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหญ้าปราบ (ESEAF) โดยแบ่งหนูทดลองเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมให้น้ำมันงา กลุ่ม 2 ให้ ESEAF ละลายในน้ำมันงา ขนาด 2,000 mg/kg สังเกตพฤติกรรมเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลและชั่งน้ำหนักหนูต่ออีก 14 วัน แล้วกับการการุณยฆาตด้วย Zoletil/Ketamine/Xylazine ในขนาด 13.5 mg/kg ป้อนทางช่องปาก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมอง ไต ปอด หัวใจ ม้าม และตับ เพื่อวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมี พบว่า ไม่พบเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและการตาย ไม่พบความผิดปกติทางคลินิกจากผลการวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมี[22]

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ทำการศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในหลอดทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

3.3 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

3.1.1 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา คือ พืชสมุนไพรที่ใช้สำหรับการวิจัยครั้งนี้ คือ หญ้าไทร เก็บจาก อ. เมืองอำนาจเจริญ จ. อำนาจเจริญ และหญ้าปราบ เก็บจาก อ. เมือง จ. มหาสารคาม ช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2562 ทำการตรวจเอกลักษณ์พืชโดย รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล แสนสุข จากสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม นำสมุนไพรตัวอย่างมาจัดทำพรรณไม้แห้งแล้วนำไปเก็บไว้ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยมีรหัสพรรณไม้แห้งของหญ้าไทร (Code: MSU.MED-LH-SS01) และหญ้าปราบ (Code: MSU.MED-ES-SS01) ตามลำดับ

3.1.2 นำส่วนของต้นหญ้าไทรสดและหญ้าปราบสดมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ชั่งบันทึกน้ำหนัก หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำมาบดละเอียดได้เป็นผง แล้วชั่งน้ำหนักผงยา เมื่อใช้จะผสมผงยาหญ้าไทรและหญ้าปราบในอัตราส่วน 1:1

3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

3.2.2 การสกัดสารจากพืชด้วยการต้ม (decoction)

นำผงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของหญ้าไทรและหญ้าปราบ ปริมาณ 100 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร ต้ม ด้วยเครื่องต้มไฟฟ้าสแตนเลส ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 เพื่อแยกเอากากออก แล้วนำกากผงยาทำการต้มซ้ำอีกสองครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมารวมกันแล้วนำไปทำแห้ง โดยใช้เครื่อง freeze dry ชั่งน้ำหนักแห้งของสารสกัด คำนวณหา % yield เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.2.2 การสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% (sonicator)

นำผงสมุนไพรผสมของหญ้าไทรและหญ้าปราบ ปริมาณ 100 กรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของน้ำหนักแห้ง นำไปสกัดด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) ที่ความถี่ 60 KHz. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเพื่อแยกสารสกัดด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง whatman No.1 แล้วนำกากผงยาสกัดสารซ้ำอีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมารวมกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย (evaporator) ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ชั่งน้ำหนักแห้งของสารสกัด คำนวณหา % Yield เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการสกัดแยกสารต่อไป

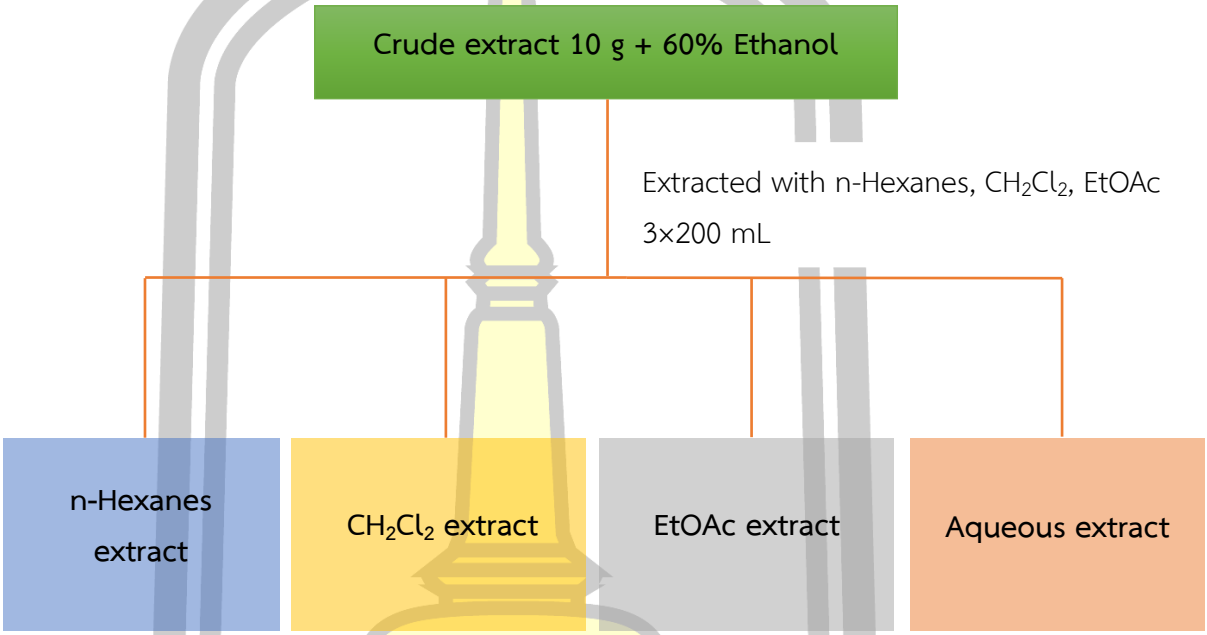
3.2.2.1 การสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

โดยนำสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอล 80% มาสกัดแยกชั้นด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยใช้หลักการความแรงขั้วของตัวทำละลาย เริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วมาก โดยดัดแปลงจากวิธีของพีรวิชญ์ พาดี, 2553[70] ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดแยกสารดังต่อไปนี้

1) ชั่งสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดตัวทำละลายเอทานอล 80% ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 60% (เพื่อให้ได้ปริมาตรในชั้นน้ำเพิ่มขึ้น) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุไว้ใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร สกัดด้วย n-hexanes จำนวน 3 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้มารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารและคำนวณหา %Yield เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 เพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2) เปลี่ยนตัวทำละลายในการสกัดเป็น dichloromethane และ ethyl acetate ตามลำดับ โดยการสกัดเช่นเดียวกับตัวทำละลาย n-hexanes ส่วนชั้นน้ำ (aqueous) ได้

จากส่วนที่เหลือจากการแยกชั้นของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด นำมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator และ freeze dryer ชั่งน้ำหนักสารที่แยกได้แต่ละชั้นและคำนวณหา %yield เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 เพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป[70]



ภาพประกอบ 5 การแยกสารตามความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยวิธี liquid-liquid extraction

3.3 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ศึกษาถึงสาร 9 กลุ่มได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

3.3.1 แอลคาลอยด์

ชั่งส่วนสกัด 0.5 กรัม ละลายด้วยสารละลาย 2% กรดไฮโรคลอริก (2% HCl) จำนวน 15 มิลลิลิตร อุ่นเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองส่วนสกัด แล้วหยดด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ผลบวกจะปรากฏสีส้มแดง[71]

3.3.2 แทนนิน

ชั่งสารสกัดพืช 0.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำเดือด 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ทำการกรอง นำสวนใสที่ไม่มีตะกอน มาทำการหยด 0.1% เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนสี ถ้าเกิดสีเขียวน้ำตาลหรือ น้ำตาลดำ แสดงว่ามีแทนนิน[71]

3.3.3 เทอร์ปีนอยด์

ชั่งสารสกัดพืช 0.5 กรัม ในหลอดทดลอง เติมคลอโรฟอรม 2 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริคเขมขน (conc. H_2SO_4) 3 มิลลิลิตร สังเกตสี ถ้าเกิดชั้นของสีน้ำตาลแดงแสดงว่ามีเทอรพีนอยด์[71]

3.3.4 ฟลาโวนอยด์

ชั่งสารสกัดพืช 0.5 กรัม ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนใหละลายละลาย จากนั้นเติมแอมโมเนีย 5 มิลลิลิตร ตามด้วย กรดซัลฟิวริคเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนสี ถ้าเกิดสีเหลือง แสดงว่า มีฟลาโวนอยด์[72]

3.3.5 ซาโปนิน

ชั่งส่วนสกัด 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำเดือด 5 มิลลิลิตร ตั้งให้เย็นทิ้งไว้ 5 นาที ผลบวกจะเกิดฟองคล้ายกับสบู่[71]

3.3.6 คูมาริน

ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรเขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน[33]

3.3.7 สเตียรอยด์

ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์[33]

3.3.8 แอนทราควิโนน

ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังไอน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออกแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่

อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน[33]

3.3.9 คาร์ดิแอคไกลโคไซด์

ชั่งสารสกัด 0.5 กรัม โดยเติมกรดแกลเซียลแอซีติก (glacial acetic acid) 3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนด้วย Kedde reagent จะให้สีม่วง และทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบ Keller-Kiliani ซึ่งประกอบด้วยกรดแกลเซียลแอซีติก-สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์-กรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก[33]

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ตัวทำละลายน้ำสกัดด้วยการต้มและเอทานอล 80% และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากการแยกสารตามความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยวิธี liquid-liquid extraction 4 ชนิด ได้แก่ n-hexanes, dichloromethane, ethyl acetate และน้ำ โดยการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระด้วยวิธี FRAP การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH และการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS ดังต่อไปนี้

3.4.1 การหาปริมาณฟีนอลลิกรวม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวม โดยการนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.12 mg/mL มา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% folin–ciocalteu reagent (v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (gallic acid equivalents, mg GAE/g dried extract)[73]

3.4.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยการนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.47 mg/mL มา 100 ไมโครลิตร และเติม 5% $NaNO_2$ (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ (w/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำกลั่น 2,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (quercetin equivalents, mg QE/g dried extract)[74]

3.4.3 การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

โดยการนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.12 mg/mL มา 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม สารละลาย FRAP ปริมาตร 900 ไมโครลิตร (เตรียมสารจาก 300 มิลลิโมลาร์ acetate buffer (pH 3.6): 10 มิลลิโมลาร์ tripyridyltriazine solution: 20 มิลลิโมลาร์ ferric chloride solution อัตราส่วน 10: 1: 1) เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ นำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอคต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (trolox equivalents, mg TE/g dried extract)[75]

3.4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

โดยการนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.05, 0.12, 0.23, 0.47 และ 0.94 mg/mL มา 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม สารละลาย DPPH ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% inhibition) รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% inhibitory concentration) และเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox[76]

บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) จากสูตร

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

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (สารทั้งหมดยกเว้นสารตัวอย่าง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) กับสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สมการเส้นตรง Y=aX+b

3.4.5 การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS ด้วยการเปลี่ยน ABST ให้เป็นอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยการเติมสารละลาย $K_2S_2O_8$ แล้วปล่อยทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:50 จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.05, 0.12, 0.23, 0.47 และ 0.94 mg/mL มา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เจือจางปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จางลงของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% inhibition) รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% inhibitory concentration) และเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox (การคำนวณเช่นเดียวกันกับวิธี DPPH)[77]

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ด้วยวิธี *p*-nitrophenol colorimetric โดยใช้อคาร์โบส (acarbose) เป็นสารมาตรฐาน ในการทดลองจะใช้ *p*-nitrophenyl-***α***-*D*-glucopyranoside (PNP-G) เป็นสารละลายใสไม่มีสีทำหน้าที่เป็นสับสเตรทในปฏิกิริยา โดยเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ PNP-G ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และ *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายใสสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร[78]

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียม 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.8

2. เตรียมเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 1 unit/mL ใน 0.1 M potassiumphosphate buffer pH 6.8

3. เตรียม p-nitrophenyl-**α**-D-glucopyranoside (PNP-G substate) ความเข้มข้น 2 mM ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.8

4. เตรียม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 mM ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.8

5. เตรียมสารมาตรฐาน Acarbose ปริมาตร 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.8 และปรับระดับความเข้มข้นเป็น 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001-5 mg/mL

วิธีทำการทดลอง

โดยนำสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.07, 0.04, 0.56, 0.14 และ 0.28 mg/mL ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl-**α**-*D*-glucopyranoside) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สุดท้ายเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 320 ไมโครลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (% **α**-glucosidase inhibition) รายงานเป็นค่า IC_{50} เทียบกับสารมาตรฐาน acarbose

3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อติดตามการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น คือ แป้งไปเป็นผลิตภัณฑ์ คือ reducing sugar เช่น มอลโตส จะทำปฏิกิริยากับ DNS reagent สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมากหมายถึงเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สามารถย่อยแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์จำนวนมากได้ แสดงว่าสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้น้อย แต่ถ้าค่าการดูดกลืนคลื่นแสงน้อย หมายถึงเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มีความสามารถในการย่อยแป้งได้น้อยลง แสดงว่าสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มาก[79]

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1% w/v โดยชั่งแป้ง 0.25 กรัม ละลายด้วยน้ำเดือดจนมีปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท

3. เตรียมสารละลาย sodium phosphate buffer pH 6.9 โดยชั่ง sodium Chloride 32.2 มิลลิกรัม และ sodium phosphate 0.24 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลล์

4. เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 3 unit/mL โดยชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาณ 9.49 มิลลิกรัม ละลายด้วย sodium phosphate buffer pH 6.9 จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้มาใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 4,000 รอบ เป็นเวลา 4 นาที ดูดเฉพาะส่วนใส ไม่มีตะกอนใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กแล้วแช่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียล

5. เตรียมสารละลาย 1% DNS โดยชั่ง 3,5-Dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม sodium sulfate 0.05 กรัม sodium hydroxide 1.0 กรัม phenol 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6. เตรียมสารละลาย 40% sodium potassium tartrate โดยชั่ง sodium potassium tartrate 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีทำการทดลอง

นำสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเติมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.03, 0.05, 0.10, 0.42 และ 0.21 mg/mL ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.9 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแป้ง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1% DNS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที และเพื่อยุติปฏิกิริยา เติมสารละลาย sodium potassium tartrate จำนวน 500 ไมโครลิตร นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงโดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% α- amylase inhibition) รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% inhibitory concentration) เทียบกับสารมาตรฐาน acarbose

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยของการทดลองละ 5 ซ้ำ (mean ± standard derivation) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance; One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี duncan multiple range test ที่ *p*-value <0.05 คำนวณค่าสถิติและหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS Version 23.0

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดจากหญ้าปราบและหญ้าไทร ดังนี้

4.1 ปริมาณสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.2 ผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.1 ปริมาณสารสกัดจากหญ้าปราบและหญ้าไทร

4.1.1 ผลการสกัดสารจากพืชด้วยการต้ม (decoction)

นำผงสมุนไพรที่มีส่วนผสมของหญ้าไทรและหญ้าปราบ (ALE) ปริมาณ 100 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร ต้ม ด้วยเครื่องต้มไฟฟ้าสแตนเลส ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 เพื่อแยกเอากากออก แล้วนำกากผงยาทำการต้มซ้ำอีกสองครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมารวมกันแล้วนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry ได้เป็นผงสารสกัดหยาบ (crude extracts) ที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 39.89 กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 39.89 ของน้ำหนักผงแห้ง เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 เพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป (ตาราง 2)

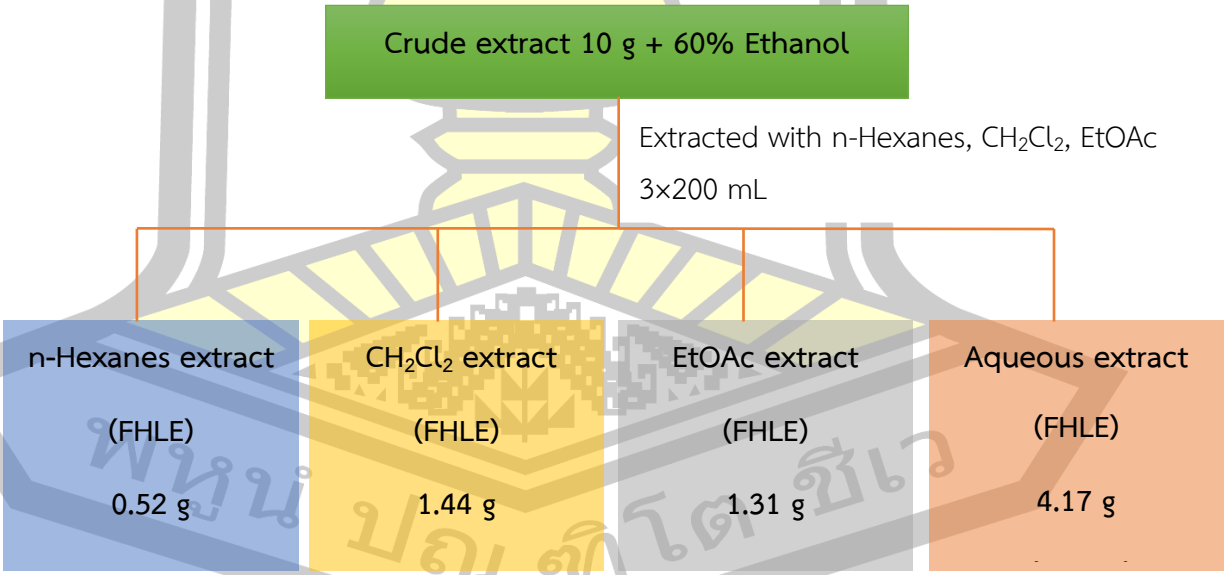
4.1.2 ผลการสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% (sonicator)

นำผงสมุนไพรผสมของหญ้าไทรและหญ้าปราบ (ELE) ปริมาณ 100 กรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของน้ำหนักแห้ง นำไปสกัดด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) ที่ความถี่ 60 KHz. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเพื่อแยกสารสกัดด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง whatman No.1 แล้วนำกากผงยาสกัดสารซ้ำอีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมารวมกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย (evaporator) แล้วทำให้แห้งเป็นผงโดยใช้เครื่อง freeze dry ได้เป็นผง

สารสกัดหยาบ (crude extracts) มีลักษณะเป็นผงสีเขียวดำ น้ำหนัก 30.53 กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 16.53 ของน้ำหนักผงแห้ง เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 เพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป (ตาราง 2)

4.1.3 ผลการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

นำสารสกัด ELE ที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอล 80% ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 60% (เพื่อให้ได้ปริมาตรในชั้นน้ำเพิ่มขึ้น) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุไว้ใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลาย n-hexanes, dichloromethane และ ethyl acetate ตามลำดับ แต่ละชั้นของตัวทำละลายทำการสกัดจำนวน 3 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำแต่ละชั้นไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย n-hexanes (FHLE), dichloromethane (FCLE) และ ethyl acetate (FELE) มีลักษณะเป็นสีเขียวดำ ส่วนชั้นน้ำ (FALE) ได้เป็นสารสกัดหยาบที่มีสีน้ำตาล เมื่อชั่งน้ำหนักของสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย ได้แก่ n-hexanes (FHLE), dichloromethane (FCLE), Ethyl acetate (FELE) และ น้ำ (FALE) ได้ปริมาณสารสกัด (%yield) เท่ากับ 5.2, 14.4, 13.1 และ 41.72 ตามลำดับ เก็บในภาชนะปิดสนิททึบแสงที่อุณหภูมิ -20 เพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป (ตาราง 2)



ภาพประกอบ 6 ปริมาณสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

ตาราง 2 ปริมาณสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

ตัวอย่าง	% yield	ลักษณะสีของสารที่สกัดได้
ALE	39.89	สีน้ำตาลเข้ม
ELE	30.53	สีเขียวดำ
FALE	41.7	สีน้ำตาล
FELE	13.1	สีเขียวดำ
FCLE	14.4	สีเขียวดำ
FHLE	5.2	สีเขียวดำ

หมายเหตุ: ALE คือ สารสกัดด้วยการต้ม, ELE คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 80%; FALE, FELE, FCLE และ FHLE คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ตามลำดับ ที่สกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

4.2 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ผลการตรวจสอบพบว่าสารสกัด ALE พบสารพฤกษเคมีคือ เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน และสารสกัด ELE พบสารพฤกษเคมีคือ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และสเตียรอยด์ ในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่า สารสกัด FALE พบสารพฤกษเคมีคือ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน สารสกัด FELE และ FHLE พบสารพฤกษเคมีคือ สเตียรอยด์ FCLE พบสารพฤกษเคมีคือ แทนนิน และสเตียรอยด์ ไม่พบแอนทราควิโนนและคาร์ดิแอกไกลโคไซในการตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากหญ้าปราบและหญ้าไทรในทุกตัวทำละลาย (ตาราง 3)

ตาราง 3 ผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

สารพฤกษเคมี	สารสกัด					
	ALE	ELE	FALE	FELE	FCLE	FHLE
แอลคาลอยด์	-	+	-	-	-	-
แทนนิน	-	+	+	-	+	-
เทอร์ปีนอยด์	+	+	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	-	-	-
ซาโปนิน	-	+	+	-	-	-
คูมาริน	+	+	+	-	-	-
สเตียรอยด์	-	+	-	+	+	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + หมายถึง ตรวจสอบพบ, - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ; ALE คือ สารสกัดด้วยการต้ม, ELE คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 80%; FALE, FELE, FCLE และ FHLE คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ตามลำดับ ที่สกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

4.3.1 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด ELE มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 40.024±0.952 mgGE/gExt รองลงมา คือ ALE มีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ 11.424±0.158 mgGE/gExt (ตาราง 4) ปริมาณฟีนอลิกรวมในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FELE มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 33.900±0.575 mgGE/gExt รองลงมา คือ FCLE, FALE และ FHLE มีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 28.944±0.143, 10.642±0.513 และ 0.660±0.263 mgGE/gExt ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด ELE มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.072±0.0007 mgQE/gExt รองลงมา คือ ALE มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.017±0.0002 mgQE/gExt (ตาราง 4) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FELE ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.034±0.0033 mgQE/gExt รองลงมา คือ FCLE, FALE และ FHLE มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.029±0.0030, 0.014±0.0008 และ 0.009±0.0004 mgQE/gExt ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.3.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยวิธี FRAP พบว่า สารสกัด ELE มีความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 291.461±3.403 mgTE/gExt รองลงมา คือ ALE ความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 175.670±3.132 mgTE/gExt (ตาราง 4) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการสกัดแยกสารด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FELE มีความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 222.360±3.021 mgTE/gExt รองลงมา คือ FCLE, FALE และ FHLE มีความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 215.123±3.654, 105.635±1.522 และ 61.747±0.977 mgTE/gExt ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.3.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัด ELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.082±0.0025 mg/mLรองลงมา คือ ALE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.122±0.0033 mg/mL (ตาราง 4) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.143±0.009 mg/mL รองลงมาคือ FALE, FCLE และ FHLE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.165±0.002, 0.166±0.011 และ 2.035±0.151 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทาสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.004±0.0002 mg/mL และ 0.016±0.0012 mg/mL ตามลำดับ (ตาราง 5)

4.3.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยวิธี ABTS พบว่า สารสกัด ELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.005±0.0002 mg/mL รองลงมา คือ ALE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.010±0.0005 mg/mL (ตาราง 4) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.044±0.001 mg/mL รองลงมาคือ FALE, FCLE และ FHLE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.061±0.003, 0.068±0.004 และ 0.158±0.015 mg/mL

ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.002±0.00004 mg/mL และ 0.009±0.0006 mg/mL ตามลำดับ (ตาราง 5)

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและหมักด้วยเอทานอล 80%

Samples	TPC	TFC	FRAP	DPPH	$ABTS^+$
	mgGE/gExt	mgQE/gExt	mgTE/gExt	IC_{50}(mg/mL)	IC_{50}(mg/mL)
ALE	11.424±0.158b	0.017±0.0002b	175.670±3.132b	0.122±0.0033d	0.010±0.0005d
ELE	40.024±0.952a	0.072±0.0007a	291.461±3.403a	0.082±0.0025c	0.005±0.0002b
ascorbic acid	-	-	-	0.004±0.0002a	0.002±0.00004a
trolox	-	-	-	0.016±0.0012b	0.009±0.0006c

หมายเหตุ: ALE คือ สารสกัดด้วยการต้ม, ELE คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 80%, การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TPC คือปริมาณฟีนอลิกรวม หน่วยเป็น mgGE/gExt วิธี TFC คือปริมาณฟลาโวนอยด์รวม หน่วยเป็น mgQE/gExt วิธี FRAP คือความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ หน่วยเป็น mgTE/gExt การวิเคราะห์วิธี DPPH และ $ABTS^+$ แสดงค่า IC_{50} มีหน่วยเป็น mg/mL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox โดย a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$)

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ตาราง 5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดโดยการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

Samples	TPC	TFC	FRAP	DPPH	$ABTS^+$
	mgGE/gExt	mgQE/gExt	mgTE/gExt	IC_{50}(mg/mL)	IC_{50}(mg/mL)
FALE	10.642±0.513c	0.014±0.0008c	105.635±1.522c	0.165±0.002b	0.061±0.003c
FELE	33.900±0.575a	0.034±0.0033a	222.360±3.021a	0.143±0.009b	0.044±0.001b
FCLE	28.944±0.143b	0.029±0.0030b	215.123±3.654b	0.166±0.011b	0.068±0.004c
FHLE	0.660±0.263d	0.009±0.0004d	61.747±0.977d	2.035±0.151c	0.158±0.015d
ascorbic acid	-	-	-	0.004±0.0002a	0.002±0.00004a
trolox	-	-	-	0.016±0.0012a	0.009±0.0006a

หมายเหตุ: สารสกัด FALE, FELE, FCLE และ FHLE คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ตามลำดับ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TPC คือปริมาณฟีนอลิกรวม หน่วยเป็น mgGE/gExt วิธี TFC คือปริมาณฟลาโวนอยด์รวม หน่วยเป็น mgQE/gExt วิธี FRAP คือความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ หน่วยเป็น mgTE/gExt การวิเคราะห์วิธี DPPH และ $ABTS^+$ แสดงค่า IC_{50} มีหน่วยเป็น mg/mL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ trolox โดย a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$)

4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน อะคาร์โบส (acarbose®) ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน พบว่า สารสกัด ALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.022±0.001 mg/mL รองลงมาคือ ELE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.098±0.002 mg/mL (ตาราง 6) ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสในการสกัดแยกสารด้วยวิธี

liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.025±0.002 mg/mL โดยสารสกัด ALE, ELE และ FALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่สูงกว่า acarbose® ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.054±0.113 mg/mL นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด FELE, FCLE และ FHLE ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (ตาราง 7)

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน อะคาร์โบส (acarbose®) ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน พบว่า สารสกัด ALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.114±0.006 mg/mL รองลงมาคือ ELE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.005±0.316 mg/mL (ตาราง 6) ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัด FALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.692±0.012 mg/mL นอกจากนี้สารสกัด ALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสใกล้เคียงกับ acarbose® ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.173±0.026 mg/mL และพบว่าสารสกัด FELE, FCLE และ FHLE ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ตาราง 7)

ตาราง 6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ที่สกัดด้วยการต้มด้วยน้ำและหมักด้วยเอทานอล 80%

Samples	Alpha-glucosidase	Alpha-amylase
	IC_{50}(mg/mL)	IC_{50}(mg/mL)
ALE	0.022±0.001a	0.114±0.006a
ELE	0.098±0.002b	1.005±0.316b
Acarbose®	1.054±0.113c	0.173±0.026a

หมายเหตุ: ALE คือ สารสกัดด้วยการต้ม, ELE คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 80%, โดยการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสแสดงค่า IC_{50} มีหน่วยเป็น mg/mL

เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose® โดย a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$)

ตาราง 7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี liquid-liquid extraction

สารสกัด	**Alpha-Glucosidase**	**Alpha-Amylase**
	IC_{50}(mg/mL)	**IC_{50}(mg/mL)**
FALE	0.025±0.002a	0.692±0.012b
FELE	N/A	N/A
FCLE	N/A	N/A
FHLE	N/A	N/A
Acarbose®	1.054±0.113b	0.173±0.026a

หมายเหตุ: สารสกัด FALE, FELE, FCLE และ FHLE คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ตามลำดับ N/A (not available) คือ ไม่พบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสหรือแอลฟาอะไมเลส โดยการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสแสดงค่า IC_{50} มีหน่วยเป็น mg/mL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose® โดย a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ได้สรุปและอภิปรายผลการวิจัยตามหัวข้อดังต่อไปนี้

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาการเตรียมสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ การต้มด้วยน้ำ (ALE) เอทานอล 80% (ELE) พบว่าการต้มด้วยน้ำมีปริมาณสารสกัดมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล 80% (ELE) และเมื่อนำสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (ELE) มาสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction ในตัวทำละลายที่มีความมีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ n-hexanes (FHLE), dichloromethane (FCLE), Ethyl acetate (FELE) และน้ำ (FALE) พบว่าการสกัดแยกในชั้นน้ำมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ พีรวิชญ์ พาดี (2553) ได้ทำการสกัดแยกสารใบพญาวานรโดยวิธีวิธี liquid-liquid extraction พบว่า การสกัดแยกในชั้นน้ำมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด มีปริมาณสารสกัด (%yield) เท่ากับ 46.3% รองลงมาคือ dichloromethane 24.8%, n-hexanes 16.1% และ ethyl acetate 8.5%[70]

การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผสมจากหญ้าปราบและหญ้าไทรในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า ELE พบสารพฤกษเคมีมากที่สุด 7 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และสเตียรอยด์ สารสกัด ALE พบสารพฤกษเคมี 3 กลุ่ม ได้แก่ เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน การสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดใน FALE พบสารพฤกษเคมีมากที่สุด 4 กลุ่ม ได้แก่ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน สารสกัด FCLE พบสารพฤกษเคมี 2 กลุ่ม ได้แก่ แทนนิน และสเตียรอยด์ ส่วนสารสกัด FELE และ FHLE พบสารพฤกษเคมีเพียง 1 กลุ่ม คือ สเตียรอยด์ และไม่พบแอนทราควิโนนและคาร์ดิแอกไกลโคไซในสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ดังนั้นในการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ พบว่ามีสารพฤกษเคมี ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และสเตียรอยด์ ซึ่งองค์ประกอบทางเคมี

เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ฤทธิ์การแก้ปวดแก้อักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ในยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ได้แก่ steroids, polyphenols และ flavonoid ซึ่งสารเหล่านี้มักอยู่ในกลุ่ม organic acid, ester หรือ alcohol[83] สอดคล้องกับการศึกษาของ Ganga RB, (2016) สารสกัดต้นหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 70% แล้วนำมาแยกสารด้วยแอลกอฮอล์ 50% (hydro alcoholic) เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล พบว่ามีสาร พฤกษเคมีกลุ่ม แอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) ควิโนน (quinones) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) และ น้ำมัน (oils)[26] สอดคล้องกับการศึกษาของ พรหทัย พุทธวัน และคณะ (2561) ได้ทำการศึกษาสารสกัดรากหญ้าไทรที่สกัดด้วยน้ำกลั่น พบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และเทอรพีนอยด (terpenoids)[13] สอดคล้องกับการศึกษาของ Rahmatullah M, (2014) ได้ทำการศึกษาสารสกัดหญ้าปราบหรือโด่ไม่รู้ล่มที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins)[29] และการศึกษาของ Wang JJ, *et al*. (2013) และ Kabeer FA & Prathapan R. (2014) ได้ทำการศึกษาสารสกัดหญ้าปราบหรือโด่ไม่รู้ล่ม พบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มเทอร์ปินอยด์ (terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สเตรียรอยด์ (steroids)[60] นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาต้นหญ้าปราบของ Huang CC, *et al*. (2014), Wang JJ, *et al*. (2013), Wang J, (2014) และ Su M, (2009) พบสารสำคัญ (major compound) ในต้นหญ้าปราบ คือ deoxyelephantopin (DET) เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกด้วยตัวทำละลายเอทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม[23,61-63] ออกฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี และรายงานการศึกษาของ Zhang HB, *et al*. (2011) และ Chang CL, *et al*. (2012) ได้ทำการศึกษากลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) โดยการแยกองค์ประกอบทางเคมีสารสกัดหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ 3,4-dihydroxy benzaldehyde, p-coumaric acid, vanillic acid, syringic acid, isovanillic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, 3-methoxy-4-hydroxyl cinnamic aldehyde, tricin, syringic acid, E-3-(3-ethoxy-4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 2-hydroxybenzolate acid[64,65]

การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด ELE มีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดรองลงมาคือ ALE การสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารกัด FELE มีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด รองลงมาคือ FCLE, FALE และ FHLE ตามลำดับ และมีความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งความสามารถในการถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ โดยสารประกอบฟีนอลิก มีวงแหวนอะโรมาติกและหมู่ไฮดรอกซิลอย่าน้อย 1 หมู่ ในโครงสร้าง สามารถพบได้ตามธรรมชาติในพืช จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง[84] การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง เช่น เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกแต่เป็นอันตรายต่อการบริโภค[85] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ พรหทัย พุทธวัน และคณะ (2561) ได้ศึกษารากหญ้าไทรที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่นโดยอัตราสวนพืชตอน้ำกลั่น พบปริมาณโพลีฟีนอล 58.33±0.29 μgGAE/mL[13] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Yuliani, (2019) ได้ทำการศึกษาหญ้าปราบโดยการแยกสารด้วยตัวทำละลาย methanol, ethyl acetate, butanol และน้ำ พบว่า มีปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดตัวทำละลายด้วย methanol มากที่สุดเท่ากับ 0.611±0.009 mg/mL รองลงมาคือ ethyl acetate, butanol และน้ำ มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 0.536±0.003, 0.495±0.032 และ 0.220±0.020 mg/mL ตามลำดับ ในการศึกษามีปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดตัวทำละลายด้วย ethyl acetate มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 0.92±0.000 mg/mL รองลงมาคือ butanol, methanol และน้ำ มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.90±0.000, 0.83±0.057 และ 0.80±0.000 mg/mL ตามลำดับ[81] และการศึกษาของ Ganga rao B, *et al*. (2012) ได้ทำการศึกษาหญ้าปราบโดยการสกัดด้วย alcohol 70% และแยกสารด้วยตัวทำละลาย hydro-alcoholic, hexane, ethyl acetate และ methanolic พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 4.49, 3.39, 8.76 และ 3.34 mgGAE/g ตามลำดับ[82]

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัด ELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัด ALE ในการทดสอบโดยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ascorbic acid และ trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงให้เห็นว่าสารสกัด ELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า ALE และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ trolox หรือวิตามินอี แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ascorbic acid หรือวิตามินซี ในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่า สารสกัด FELE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ FALE, FCLE และ FHLE ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในการทดลอง พบว่าการสกัดสารโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายส่งผลต่อการกำจัดอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทั้งวิธี DPPH และ $ABTS^{+}$ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมและ

ฟลาโวนอยด์รวม สารสกัดจากเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งจะมีค่า IC_{50} ต่ำ[86] สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pornhathai P, *et al*. (2018) พบว่าสารสกัดหญ้าไทรด้วยตัวทำละลายน้ำ มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 16.14±2.80%[13] สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wu C, *et al*. (2018) พบว่าสารสกัดใบหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% แล้วนำมาสกัดแยกโดยใช้เอทิลอะซิเตท (ESEAF) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ESEAF 1,000 µg/mL มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 85.73% มีค่า IC_{50} 69.70±0.01 µg/mL เมื่อเทียบกับ Gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่า ESEAF มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้น ESEAF ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)[22] สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ganga rao B, *et al*. (2012) พบว่าหญ้าปราบโดยการสกัดด้วย alcohol 70% และแยกสารด้วยตัวทำละลาย hydro-alcoholic, hexane, ethyl acetate และ methanol โดยสารสกัดที่แยกด้วย methanol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุด มีค่า IC_{50} 112 µg รองลงมาคือ hydro alcoholic, ethyl acetate และ hexane มีค่า IC_{50} 147, 313 และ 602 µg ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} 16 µg[82]

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ พบว่า สารสกัด ALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส สูงที่สุด โดยสารสกัด ALE และ ELE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีมากกว่า acarbose® และสารสกัด ALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ใกล้เคียงกับ acarbose® ในการสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารกัด FALE มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสสูงที่สุดและมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีมากกว่า acarbose® นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด FELE, FCLE และ FHLE ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลส เนื่องจากความสามารถในการดึงสารละลายของตัวทำละลายแตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษานี้แสดงเห็นได้ว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วมากหรือขั้วปานกลาง เช่น น้ำหรือเอทานอล จะสามารถดึงสารละลายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบออกมาได้ดีมากกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้ว เช่น n-hexanes, dichloromethane, ethyl acetate ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะช่วยลดการย่อยคาร์โบไฮเดรตและสามารถลดการดูดซึมน้ำตาล ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง[87] รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรวบรวม

ข้อมูลทบทวนวรรณกรรมที่ตีพิมพ์ทั่วโลก พบว่าสารที่แยกได้จากพืชสมุนไพร 411 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส ประกอบด้วย terpene, alkaloid, quinine, flavonoid, phenol, phenylpropanoid และ steroid[83] ซึ่งสอดคล้องผลการศึกษาของ Daisy P, *et al*. (2009) การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Streptozotocin จากสาร 28Nor-22 (R) Witha 2,6,23-trienolide ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่สกัดแยกได้จากต้นหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายอะซิโตน พบว่า สาร 28Nor-22 (R) Witha 2,6,23-trienolide จากต้นหญ้าปราบสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและเพิ่มระดับอินซูลินในหนูเบาหวาน[30] นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดจากสารสกัดจากใบและรากหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายด้วยน้ำในหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย alloxan พบว่า ระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ได้รับสารสกัดจากใบและรากหญ้าปราบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (84.8±0.43 และ 88.3±0.19 mg/dL^{-1} ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย alloxan (360.8±0.49 mg/dL^{-1})[31]

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบเพิ่มเติมด้วยวิธีที่หลากหลาย เช่น การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น

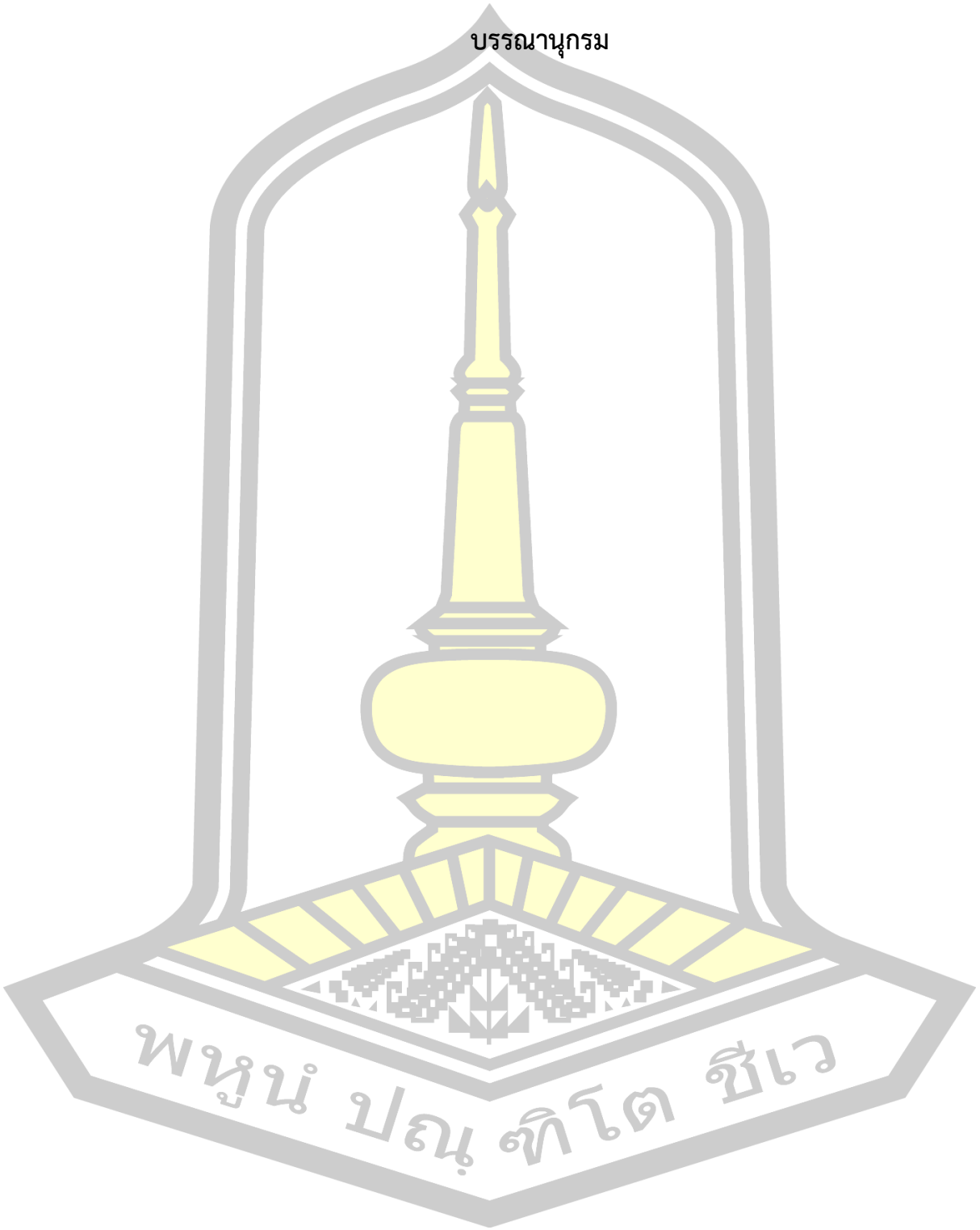
5.2.2 ควรมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยการแยกสารบริสุทธิ์ เพื่อระบุถึงสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

5.2.3 ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านลดระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลอง

5.2.4 ควรมีการศึกษาความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

1. Sheen, Y.J., and Sheu WH. Association between hypoglycemia and dementia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;116:279-287.

2. สถาบันการแพทย์แผนไทยกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. *คู่มือสำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ผสมผสานในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล*. ปทุมธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2560.

3. Klomsakul PC and P. α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of *Ceasalpinia sappan*, *Ficus foveolata* and *Eurycoma longifolia* extracts. *Phranakhon Rajabhat Res J (Science Technol*. 2017;12(1):63-73.

4. Ellappan, T., Balasubramaian, P., Chidambaram, K. & Subhash CM. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. *J Acupunct Meridian Stud*. 2013;6(1):24-30.

5. Dokpuang D, Khobjai W. Oxidative Stress of Diabetes Mellitus Patients and Diabetes Complications in Phayao Hospital. 2556(730):146-154.

6. ธรรมนิตย์ ชำนาญ. *คัมภีร์ยาสมุนไพรไทย ตำรับหมอพร กรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์*. กรุงเทพฯ: ไทยควอลิตี้บุ๊คส์; 2552.

7. พระธรรมวโรดม (บุญมา คุณสมฺปนฺโน ป.ธ.9). *ตำรายากลางบ้าน*. กรุงเทพฯ: สหธรรมิก; 2554.

8. The Plant List (2013). *Leersia hexandra* Sw. Plant List Version 1.1. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-422089. Accessed June 15, 2019.

9. Liu L and SMP. Poaceae (Leersia). *In Flora of China*. 2006;22:184-185.

10. องค์การสวนพฤกษศาสตร์. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. http://www.qsbg.org/Database/BOTANIC_Book full option/search_detail.asp?botanic_id=1601. Accessed May 15, 2019.

11. ชยันต์ พิเชียรสุนทร แม้นมาส ชวลิต และวิเชียร จีรวงส์. *คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษามหาราชา 5 ธันวาคม พุทธศักราช 2542*. พิมพ์ครั้ง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่งจำกัด (มหาชน); 2558.

12. Stapf F, Hansakul P, Ngamkitidechakul C, Ingkaninan K, Panunto W. Antiproliferative , apoptotic induction , and antiinvasive effects of. 2009;31(1):79-84.

13. พรหทัย พุทธวัน สรแอณห. การวิเคราะหสารสำคัญและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรทองถิ่นในภาคเหนือเพื่อพัฒนาเป็นชาสมุนไพรสำเร็จรูป. *วิทย์ มข*. 2561;46(2):238-24.

14. Bilanda DCAA of L hexandra S (Poaceae) AE on E, Tcheutchoua YC, Djomeni Dzeufiet PD, et al. ol-Induced Hypertension in Wistar Rat. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2019;2019:1-9. doi:10.1155/2019/2897867

15. The Plant List (2013). *Elephantopus scaber* L. Plant List Version 1.1. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-422089. Accessed June 15, 2019.

16. Chen Y and MGG. Asteraceae (Vernonieae). *In Flora of China*. 2011;20-21:368-369.

17. นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. *สมุนไพร...ไม้พื้นบ้าน (2)*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2541.

18. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. *ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร*. พิมพ์ครั้ง. กรุงเทพฯ: ศิลป์สยามบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์; 2548.

19. Inta A, Shengji P, Balslev H, Wangpakapattanawong P TC. A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence. *J Ethnopharmacol*. 2008;116:508-517.

20. Kamlangluea KC and K. Treatment with herbs and the ancient recipe of traditional medicine. *J Med Heal Sci*. 2017;24(2):48-57.

21. Wu C, Liu J, Zhang X. Determination of organic acids in the root exudates of Cr-hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz using high performance liquid chromatography. *Se pu. Chinese J Chromatogr*. 2018;36(2):167-172. doi:10.3724/SP.J.1123.2017.09009

22. Chan CK, Tan LTH, Andy SN, Kamarudin MNA, Goh BH, Kadir HA. Anti-neuroinflammatory activity of *Elephantopus scaber* L. via activation of Nrf2/HO-1 signaling and inhibition of p38 MAPK pathway in LPS-induced microglia BV-2 cells. *Front Pharmacol*. 2017;8(JUN):1-14. doi:10.3389/fphar.2017.00397

23. C. C. Huang, K. J. Lin, Y. W. Cheng, C. A. Hsu, S. S. Yang and LFS. Hepatoprotective effect and mechanistic insights of deoxyelephantopin, a phyto-sesquiterpene lactone, against fulminant hepatitis. *J Nutr Biochem*. 2013;24(3):516–530.

24. Geng, H.W., X.L. Zhang, G.G. Wang XXY and XW et al. Antiviral dicaffeoyl derivatives from *Elephantopus scaber*. *J Asian Nat Prod Res*. 2011;13:665-669.

25. Suresh KS, Perumal P SB. Antibacterial Studies on Leaf Extract of *Elephantopus Scaber* Linn. *Anc Sci Life*. 2004;23:6-8.

26. Ganga, R.B., R.Y. Venkateswara SP and VSPD. Qualitative and quantitative phytochemical screening and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Elephantopus scaber* Linn. *Recent Res Sci Technol*. 4:15-20.

27. Avani K, Neeta S. A study of the antimicrobial activity of *Elephantopus scaber*. *Indian J Pharmacol*. 2005;37(2):126-127. doi:10.4103/0253-7613.15115

28. Sheeba KO, Wills PJ, Latha BK, Rajalekshmy R, Latha MS. Antioxidant and antihepatotoxic efficacy of methanolic extract of *Elephantopus scaber* Linn in Wistar rats. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2012;2(SUPPL2). doi:10.1016/S2222-1808(12)60289-8

29. Rahmatullah M. Elephantopus spicatus : A plant with hitherto unreported antihyperglycemic and antinociceptive. 2014;3(9):71-80.

30. Daisy, P., R. Jasmine SI and EM. A novel steroid from *Elephantopus scaber* L. an ethnomedicinal plant with antidiabetic activity. *Phytomedicine*. 2009;16:252-257.

31. P. Daisy NAR and DR. Hypoglycemic effects of *Elephantopus scaber* in alloxan-induced diabetic rats. *Indian J Biol Sci*. 2007;7(2):433-437.

32. Faizal, A. and Geelen D. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev*. 2013;12(4):877-893.

33. จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ. การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคนา. 2559.

34. สกุลเผือก อ. *อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2559.

35. อนงนาฏ ไพนุพงศ. อนุมูลอิสระและสารต่านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. *PKRU SciTech J*. 2017;1(2):20-27.

36. LJ M. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 2002;7(181-182):219-222.

37. Salas VM CG. Calcium-dependent DNA damage and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-independent glycogen phosphorylase activation in an in vitro model of acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*. 1997;25(6):1432-1438.

38. Rice-Evans CA G V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochem*. 1995;29:39-63.

39. Kukongviriyapan V. Essential Role of Antioxidant Network of Vitamins and Enzymes. 2014;29(1):59-70.

40. Silvia V, Angela A SM. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr Pharm Des*. 2004;10(14):1677-1694.

41. บุหรัน พันธุสวรรค. อิสระ สารตานอนุมูลอิสระ และการวิเคราะหฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตรและอนุมูลเทคโนโลยี*. 2556;21(3):275-286.

42. ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. *วารสารวิชาการ มอบ*. 2549;8(2):1-13.

43. Ble-Castillo JL, Carmona-Diaz E MJ. Effect of a-tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetes. *Biomed & Pharmacother*. 2005;59:290-295.

44. สุนทร ตัณฑนันทน์. *เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับโรคเบาหวาน : คู่มือปรับวิถีชีวิตพิชิตเบาหวาน*. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง; 2556.

45. Wu L, Chiou CC, Chang PY WJ. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339:1–9.

46. Evans MD, Dizdaroglu M CM. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and signifcance. *Mutat Res*. 2004;567:1-61.

47. J.P. Kuylenholen, M.Brownlee WJM. Oxidative stress and diabetes mellitus Pathogenesis of long-term complications. *Intern Med*. 1999;10:9-19.

48. ดวงชีวัน เทศสมบูรณ์ อตแสต. ระดับ 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine ที่เพิ่มขึ้นเป็นสารบ่งชี้การเกิดการทำลาย ดีเอ็นเอจากภาวะ Oxidative stress ในผู้ป่วยเบาหวาน. *วารสารสาธารณสุขมหาวิทยาลัยบูรพา*. 2556;8(1):94-103.

49. Valavanidis A, Vlachogianni T FC. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidativestress and carcinogenesis. *J ofEnvironmental Sci Heal*. 2009;27:120-139.

50. W D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95.

51. อนุสรณ์ ลังการพินธ์. ผลกระทบของการเกิดอนุมูลอิสระจากโรคเบาหวานต่อการทำงานของไต. *ลำปางวารสาร*. 2552;2:80-81.

52. Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., and Carvalho I. α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. 2006;62(44):10277-10302.

53. ชาติชาย นัทนเสนีย์. โรคเบาหวานและการรักษาในเชิงทฤษฎีการแพทย์แผนไทย. 2556.

54. อุทัย สินธุสาร. *สมุนไพร ร้านเจ้ากรมเป๋อ*. พิมพ์ครั้ง. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ธรรมสาร; 2545.

55. Ticktin BH and T. Uras: Medicinal and ritual plants of Serampas, Jambi Indonesia. *Ethnobot Res Appl*. 2012;10:133–149.

56. Khairiah A, Nisyawati, Silalahi M. Biodiversity of medicinal plants by Minangkabau ethnic in Guguak Sarai, West Sumatera, Indonesia. *AIP Conf Proc*. 2017;1862(July):1-6. doi:10.1063/1.4991213

57. Xue-Hong Zhanga, Jie Liua, Hai-Tao Huanga, Jun Chena Y-NZ and D-QW. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant. *Chemosphere*. 2007;67(6):1138–1143.

58. บัญชียาหลักแห่งชาติ. บัญชียาจากสมุนไพร. http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/archives_file/20170207174301.pdf. Accessed May 15, 2019.

59. M.L.A. Hammer MLA JE. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajo Island, Para (Brazil). *J Ethnopharmacol*. 1993;40:53-75.

60. Kabeer FA, Prathapan R. Phytopharmacological Profile of *Elephantopus scaber*. *Pharmacologia*. 2014;5(8):272-285. doi:10.5567/pharmacologia.2014.272.285

61. J. J. Wang, Y. J. Liu, J. X. Xu, A. Wang, Y. L. Wang and CLL. Studies on medicinal plants of Elephantopus (Compositae). *Nat Prod Res Dev*. 2013;25:401–409.

62. Su M, Wu X, Chung HY LY and YW. Antiproliferative activities of five Chinese medicinal herbs and active compounds in *Elephantopus scaber*. *Nat Prod Commu*. 2009;4:1025-1030.

63. Wang J, Li P, Li B, Guo Z, Kennelly EJ, Long C. Bioactivities of compounds from *Elephantopus scaber*, an ethnomedicinal plant from Southwest China. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2014;2014(January 2015). doi:10.1155/2014/569594

64. Zhang, H.B., L.J. Kong, Q.L. Hang JHJ and ZDM. Studies on triterpenes from *Elephantopus scaber*. *Chinese J Exp Tradit Med Formulae*. 2011;3:101-103.

65. Chang, C.L., C.C. Shen CLN and CCC. A new sesquiterpene from *Elephantopus scaber*. *Hiromitsu J*. 2012;65:49-56.

66. Tabassum N VG. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5(2):19-28.

67. Thana NN, Fotso S, Sevvana M, Sheldrickc GM, Fiebigd HH, Kelterd G LH. Sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber*. *Naturforsch*. 2005;60:200-204.

68. Rajkapoor B, Jayakar B AR. Antitumor activity of *Elephantopus scaber* Linn against dalton's ascitis lymphoma. *Indian J Pharm Sci*. 2002;64:71-73.

69. Shahriar SMS, Rahmatullah M. Oral Glucose Tolerance Tests in Mice With a Polyherbal Formulation Diabeto-Mlf. 2016;5(01):199-206.

70. พีรวิชญ์ พาดี. องค์ประกอบทาเคมี ความเป็นพิษเฉียบพลันและฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดใบพญาวานร. 2553.

71. Rajabhat P, Damsud T, Kaewpiboon C. ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสของส่วนสกัดจากผักสลัดน้ำ *in Vitro*. 2016;11(2):65-74.

72. Wadood, A., Ghufran, M., Jamal, S.B., Naeem, M., Khan, A., Ghaffar R and A. Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. *Biochem Anal Biochem*. 2013;2(4):1-4.

73. Singleton VL, Orthofer R LR. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzym*. 1999;299:152-78.

74. Chang C, Yang M, Wen H CJ. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10:178-82.

75. Benzie, I.F.F. and Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.

76. Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A PG. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med*. 1994;16:547-53.

77. Hua Long L HB. Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286:991-4.

78. Dong HQ, Li M, Zhu F, Liu FL HJ. Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chem*. 2012;130:261-266.

79. ศริญญา อัครชยสิทธิ์. ฤ. ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟ่า-อะไมเลสและฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลามาของไซยนิดินและอนุพันธ์. 2551.

80. Shahriar SMS, Rahmatullah M. Oral Glucose Tolerance Tests in Mice With a Polyherbal Formulation Diabeto-Mlf. 2016;5(01):199-206.

81. Yuliani, Fida Rachmadiarti, Sari Kusuma Dewi, Mahanani Tri Asri and Agoes Soegianto. Total phenolic and flavonoid contents of *Elephantopus scaber* and *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) leaves extracts from various altitude habitats. *Eco. Env. & Cons.* 2019;25:106-S113.

82. Ganga Rao B, Y. Venkateswara Rao, S. Pavani and V.S. Praneeth Dasari. Qualitative and quantitative phytochemical screening and in vitro anti-oxidant and anti-microbial activities of *Elephantopus scaber* Linn. *Recent Research in Science and Technology*. 2012;4(4):15-20.

83. Zhenhua Y, Wei Z, Fajin F, Yong Z, Wenyi K. α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Human Wellness*. 2014;3:136-174.

84. Saranraj P, Sudhanshu SB, Ramesh CR. Traditional Foods From Tropical Root and Tuber Crops: Innovations and Challenges. *Inn Trad F*. 2019;7:159-191.

85. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15:7313-52.

86. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97:1111-6.

87. Trinh, B.T.D., D. Staerk and A.K. Jäger. Screening for potential alpha-glucosidase and alpha -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. *J. of Ethnopharmacology*. 2016;186:189-195.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

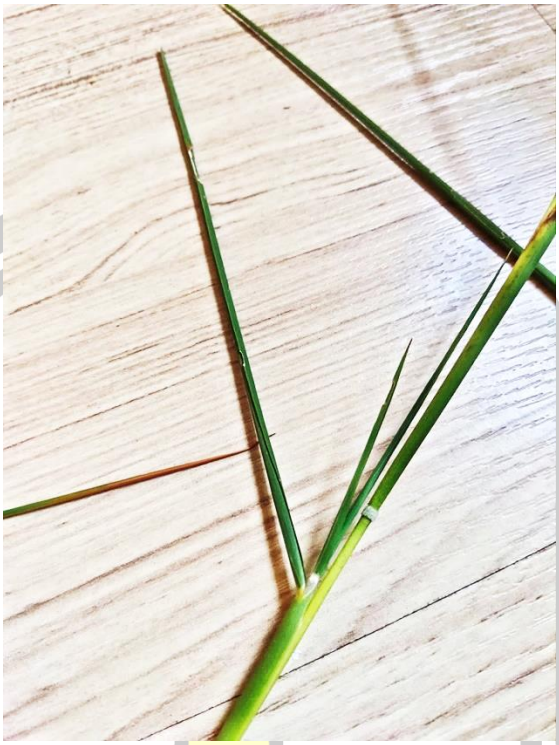
รูปภาพส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ใช้ในงานวิจัย

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

รูปภาพส่วนต่าง ๆ ของต้นหญ้าไทร

ต้นหญ้าไทร

ดอกหญ้าไทร



ใบและลำต้นหญ้าไทร

รากหญ้าไทร

รูปภาพส่วนต่าง ๆ ของต้นหญ้าปราบ (โด่ไม่รู้ล้ม)

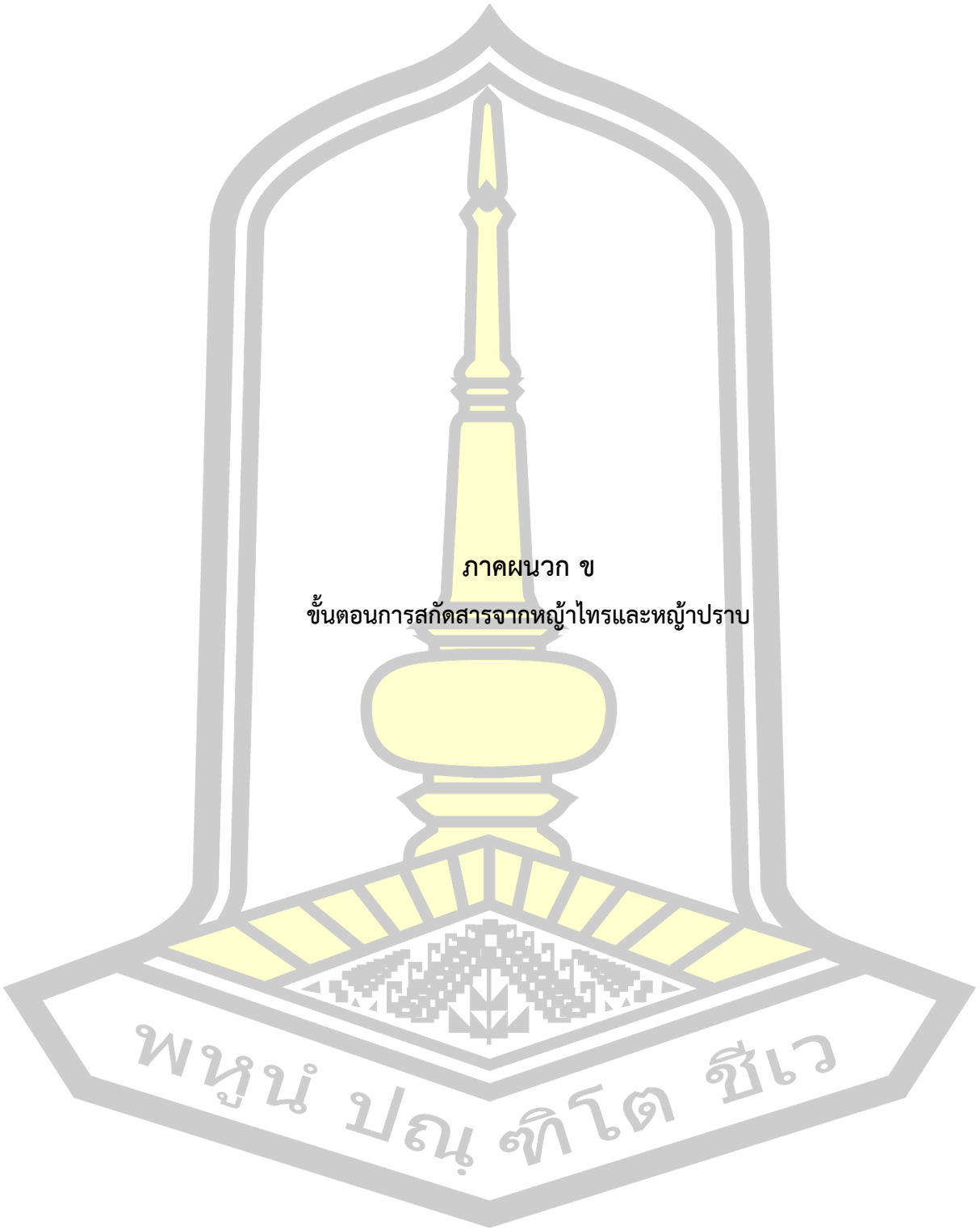
ต้นหญ้าปราบ

บหญ้าปราบ

รากและลำต้นหญ้าปราบ

ดอกหญ้าปราบ

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

ขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

การเตรียมสมุนไพรจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

อบสมุนไพรที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

ผสมผงสมุนไพรหญ้าไทรและหญ้าปราบ อัตราส่วน 1:1

การสกัดสารจากหญ้าไทรและหญ้าปราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% (sonicator)

และการต้มด้วยน้ำ (decoction)

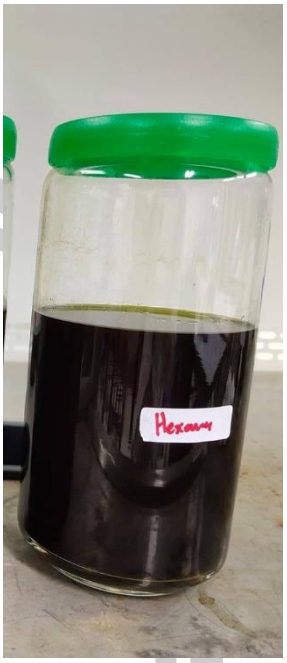
กรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศแล้วนำไประเหย โดยใช้เครื่อง evaporator

แล้วนำไปทำแห้ง โดยใช้เครื่อง freeze dry

การสกัดแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

ขั้นตอนการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย dichloromethane

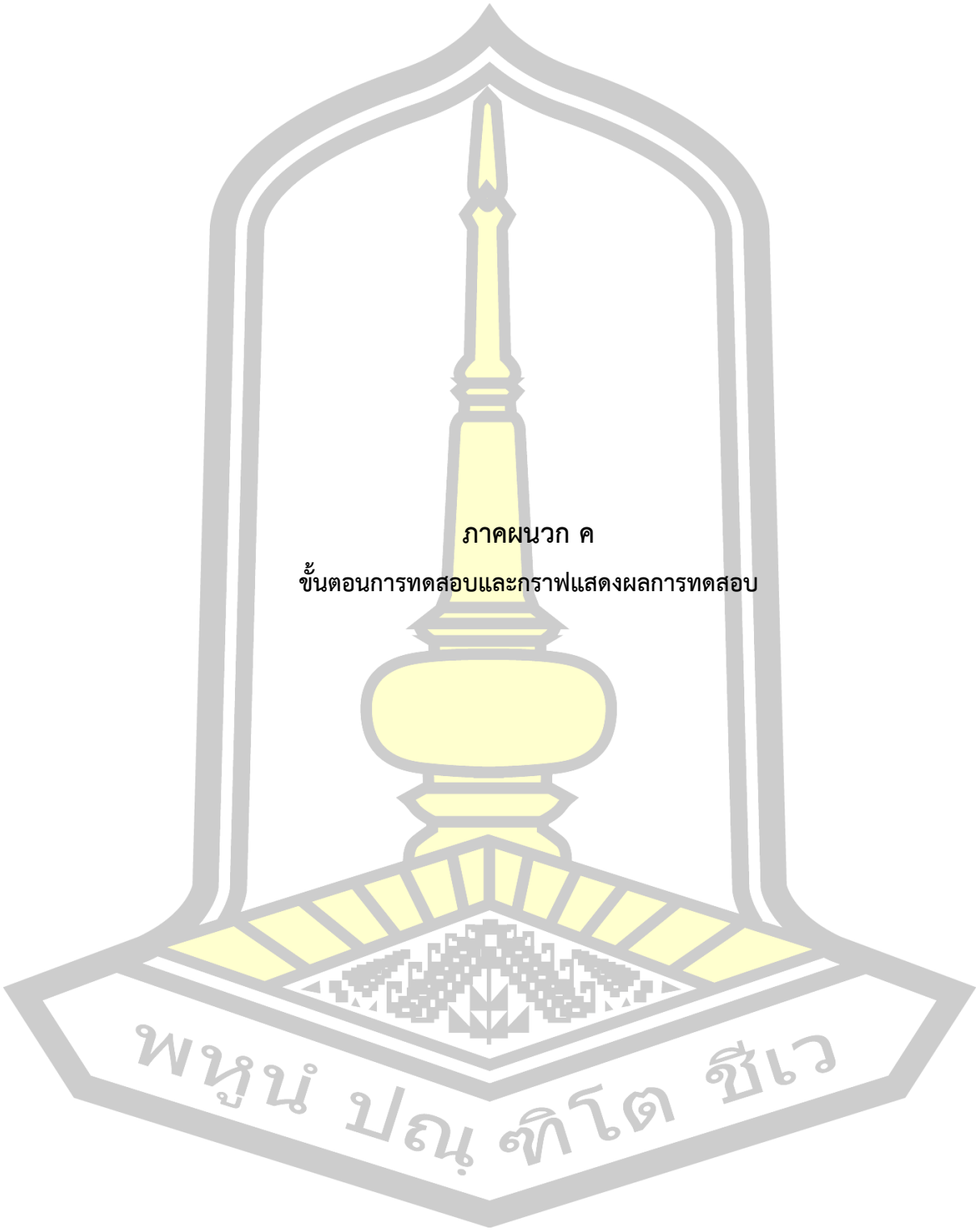
ขั้นตอนการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate



ขั้นตอนการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย n-hexanes

ขั้นตอนการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลายน้ำ

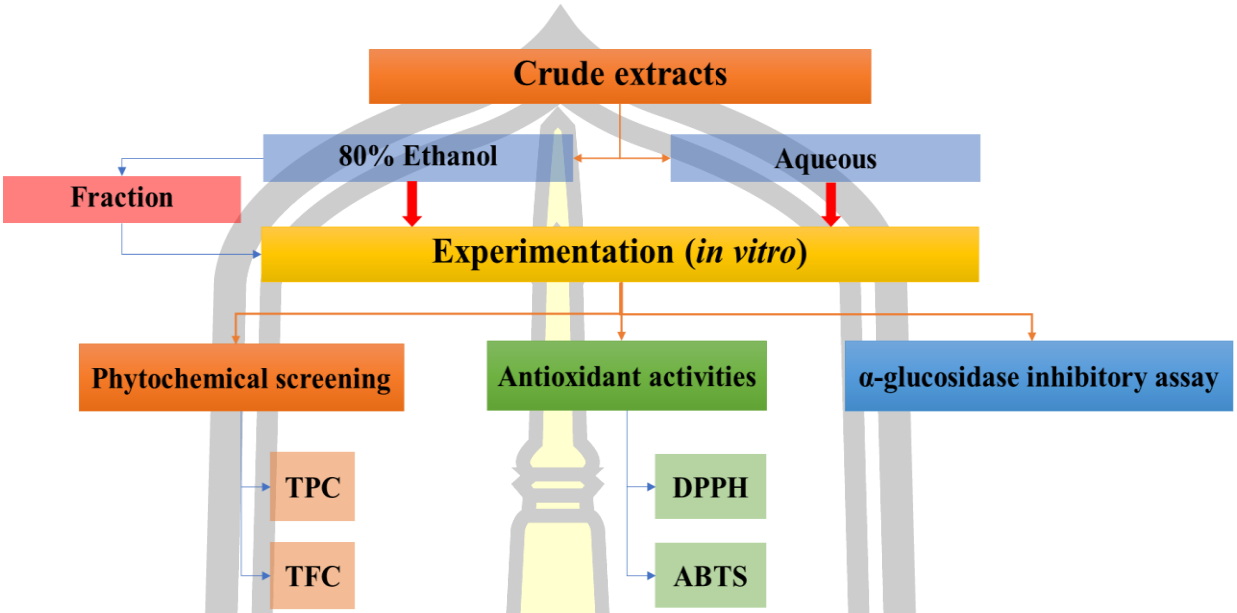
พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



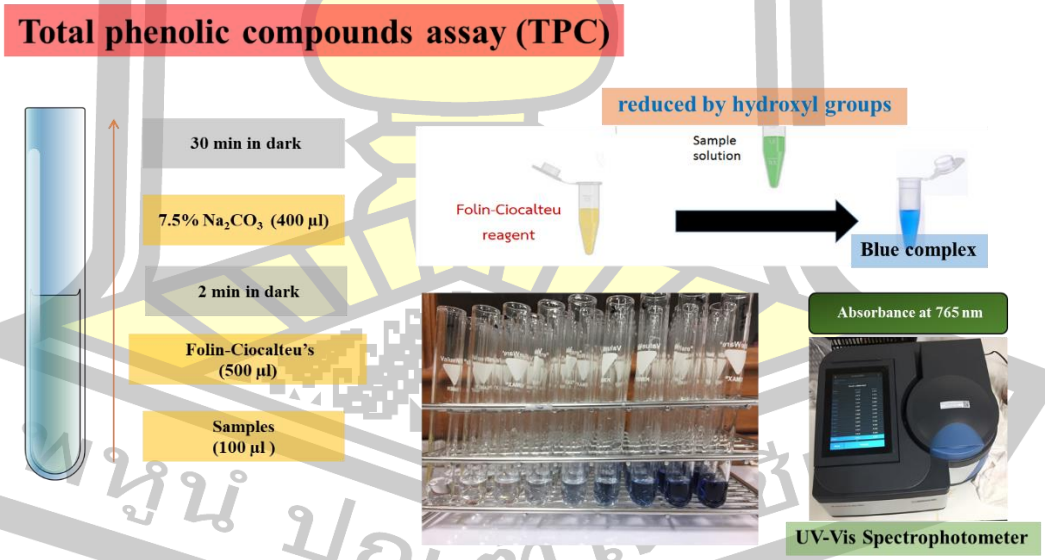
ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการทดสอบและกราฟแสดงผลการทดสอบ

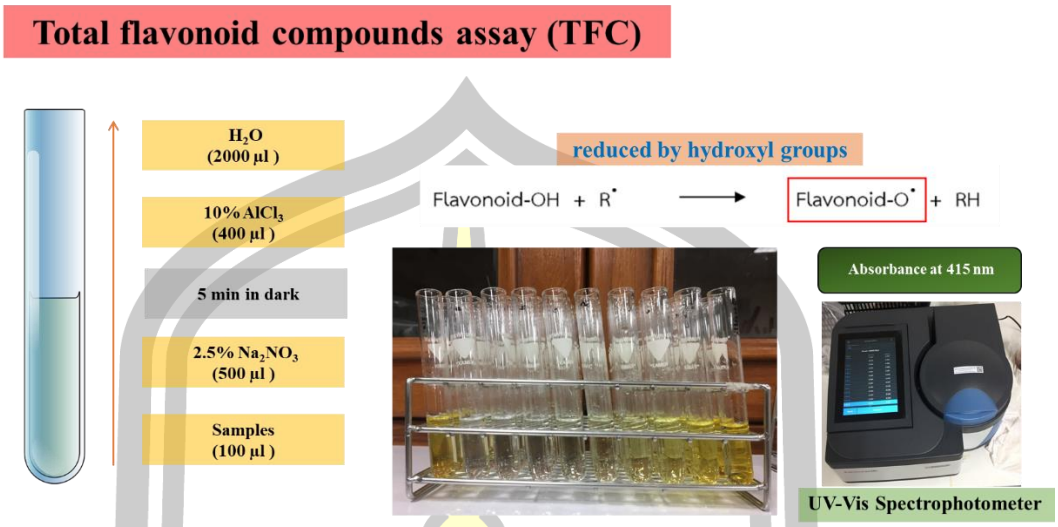
ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีต่างๆ



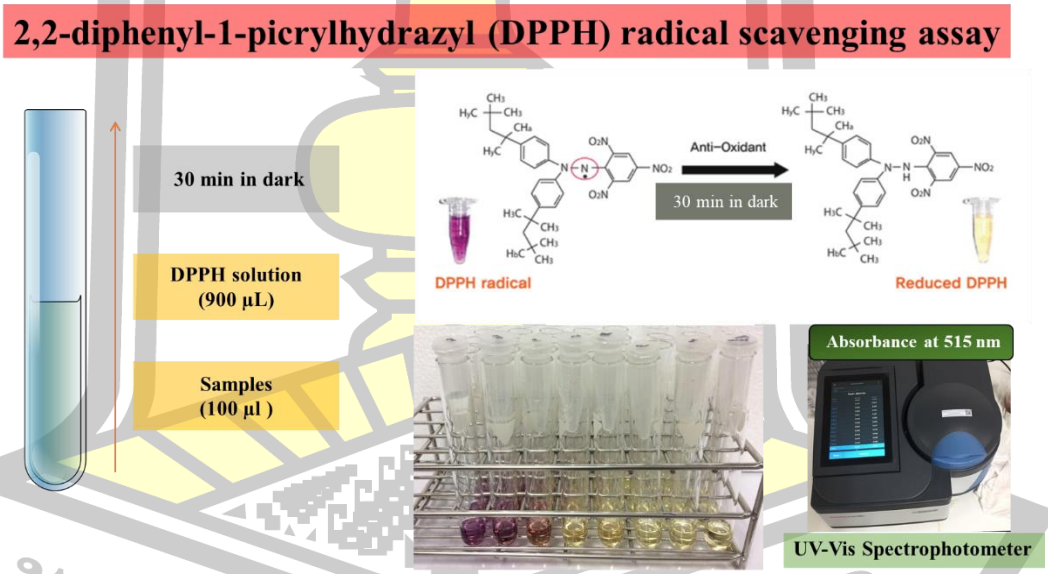
ขั้นตอนการทดสอบสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ



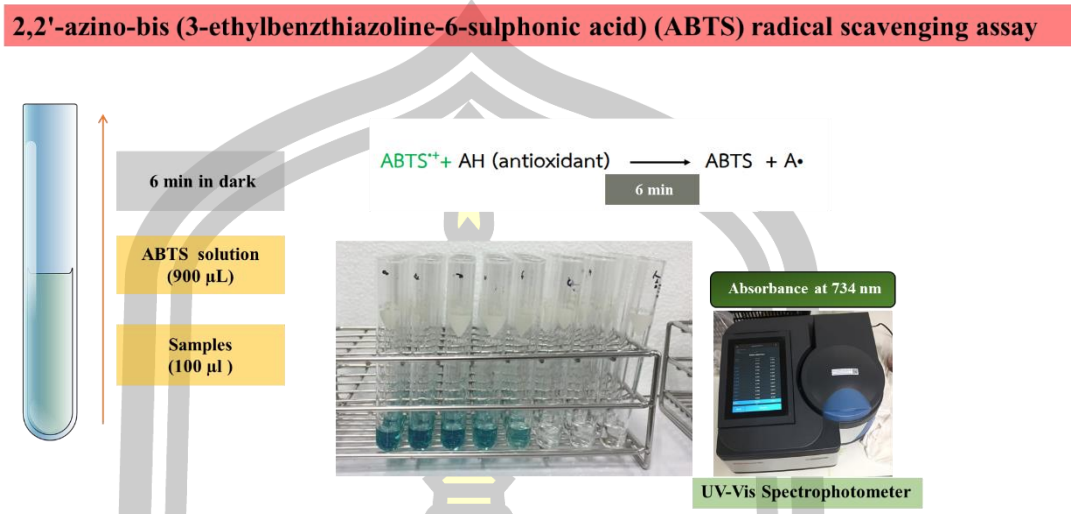
ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม



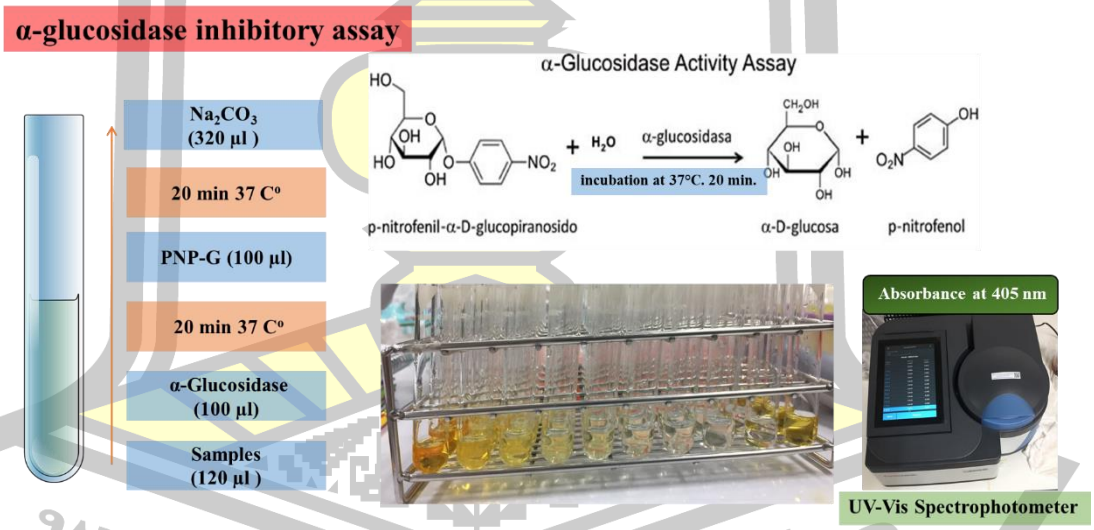
ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม



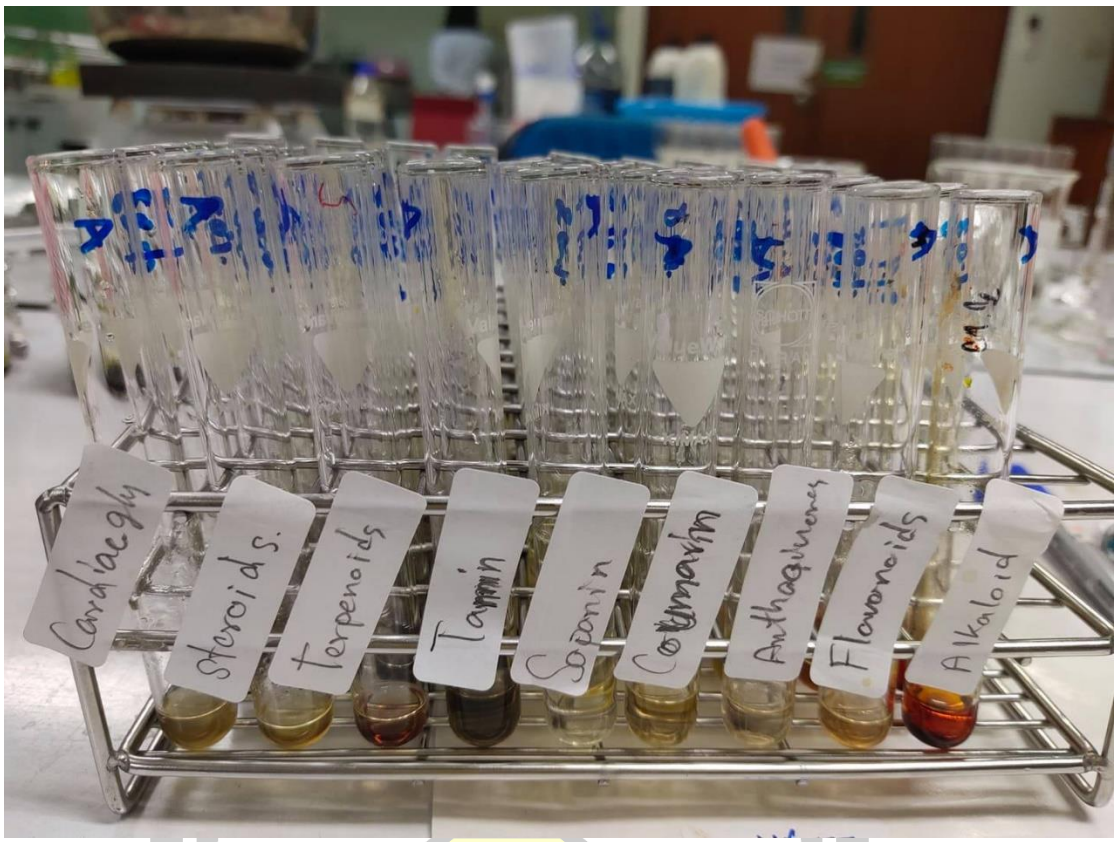
ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH



ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS



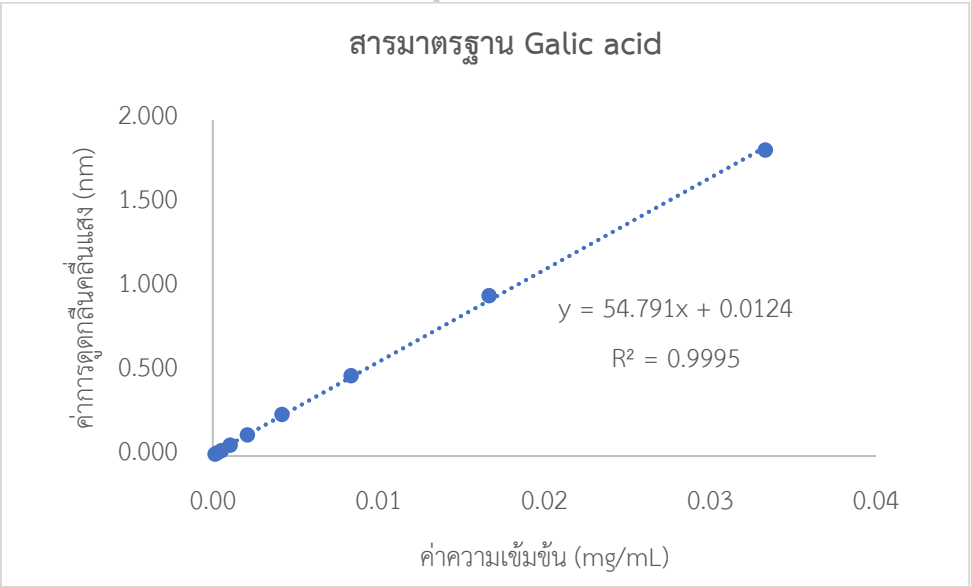
ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส



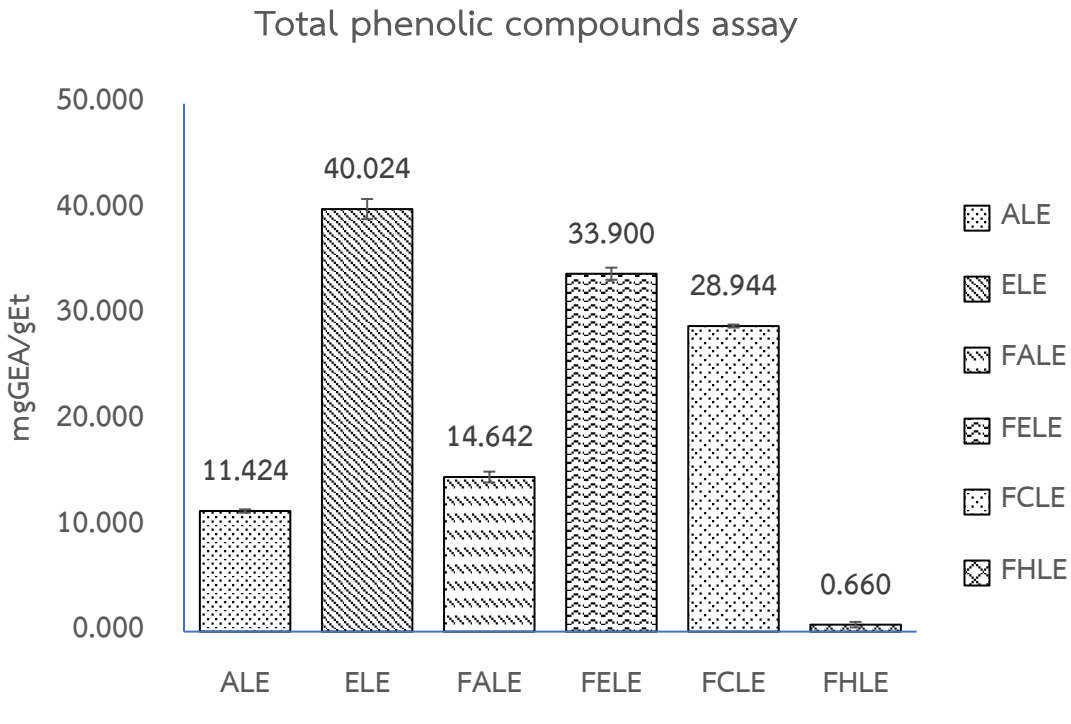
ขั้นตอนการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (n=5)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

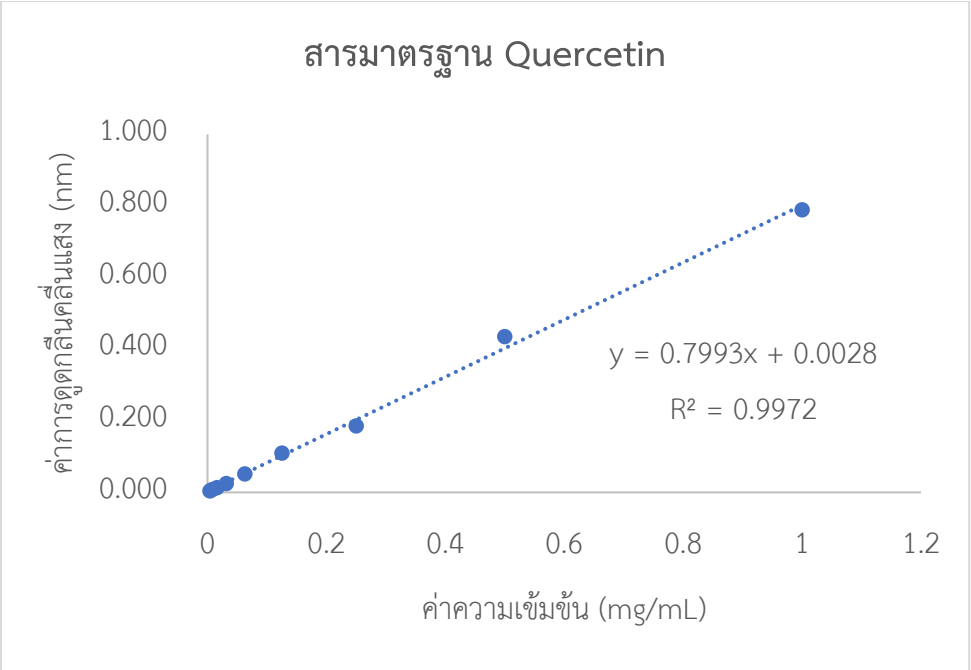
กราฟแสดงผลการทดสอบ



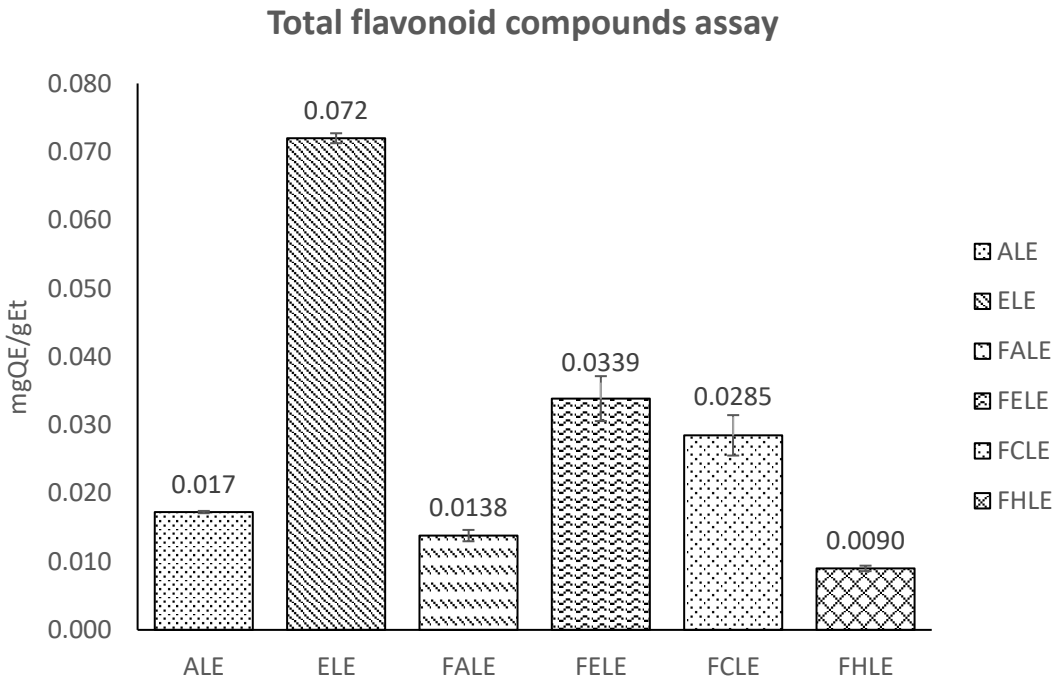
กราฟแสดงสารมาตรฐาน galic acid ที่ใช้ในการทดสอบวิธี TPC



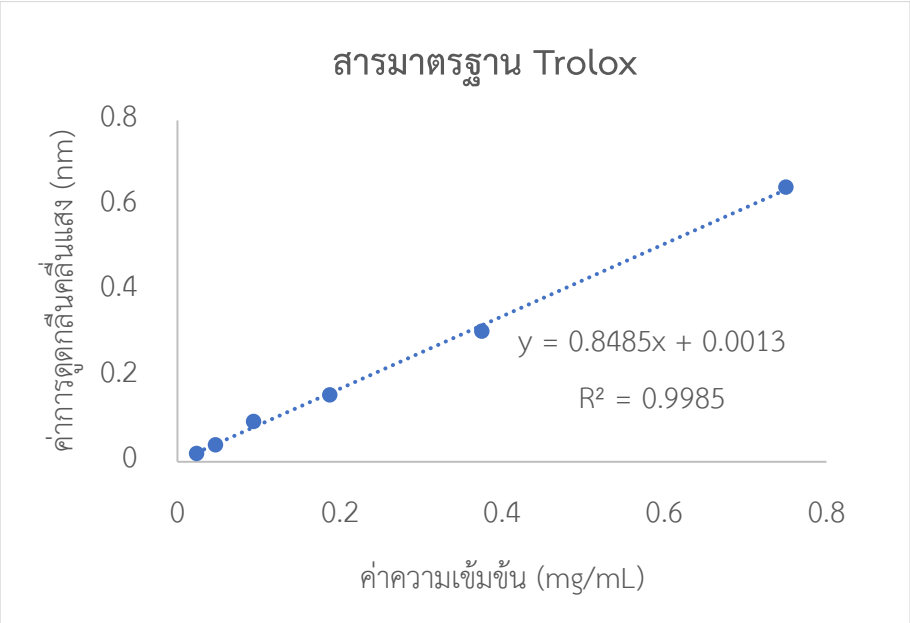
กราฟแสดงปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ในการทดสอบวิธี TPC



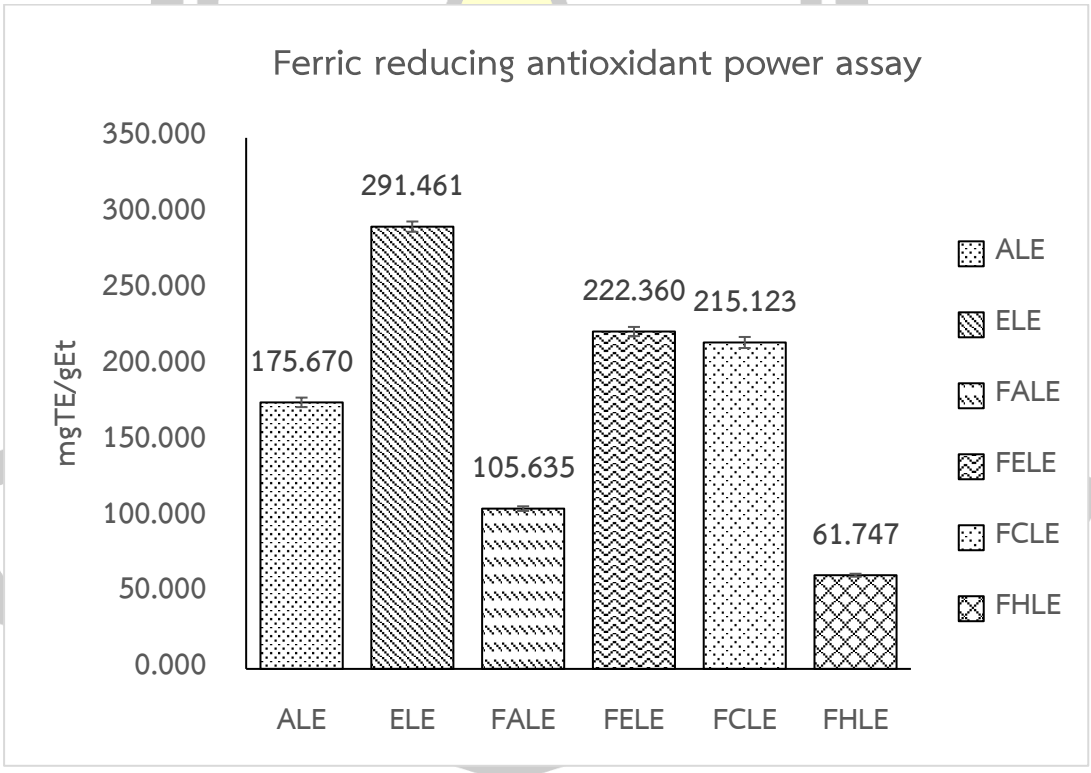
กราฟแสดงสารมาตรฐาน quercetin ที่ใช้ในการทดสอบวิธี TFC



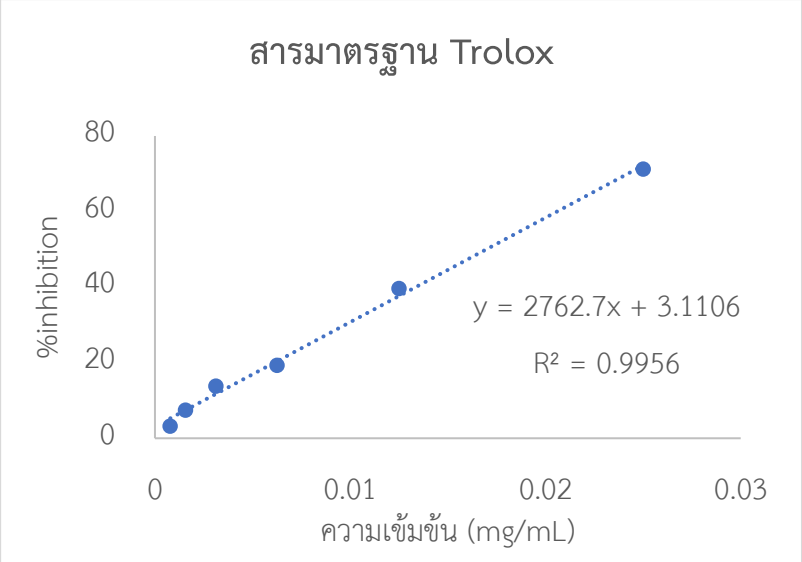
กราฟแสดงปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ในการทดสอบวิธี TFC



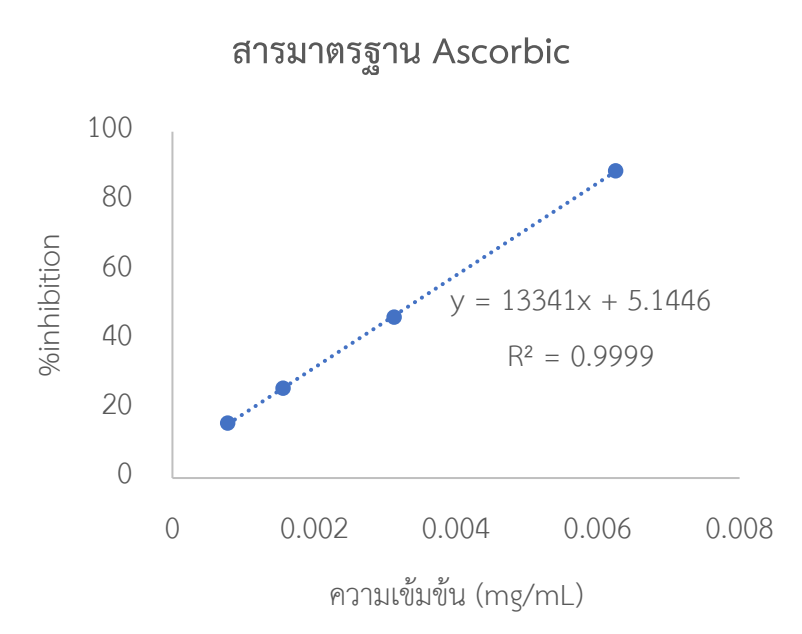
กราฟแสดงสารมาตรฐาน trolox ที่ใช้ในการทดสอบวิธี FRAP



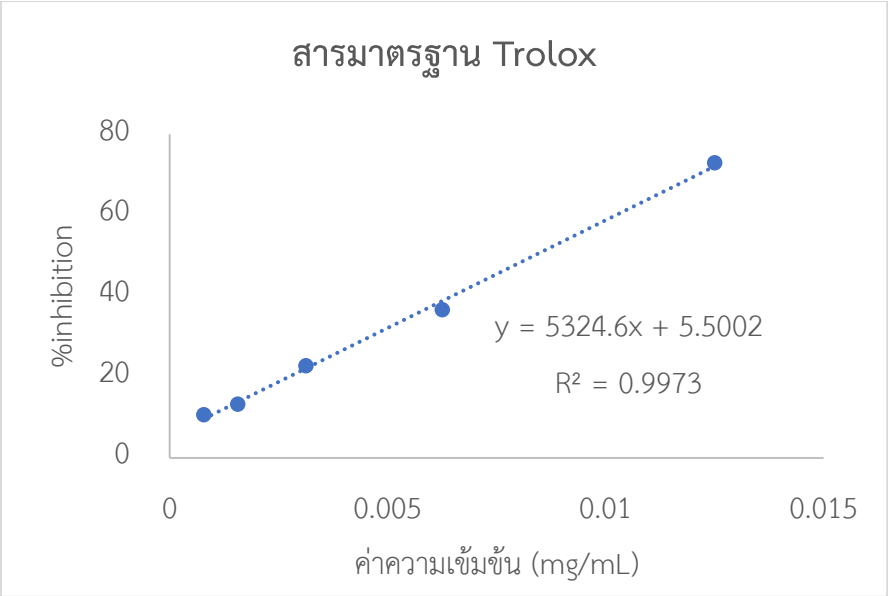
กราฟแสดงปริมาณการรีดิวซ์ของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ในการทดสอบวิธี FRAP



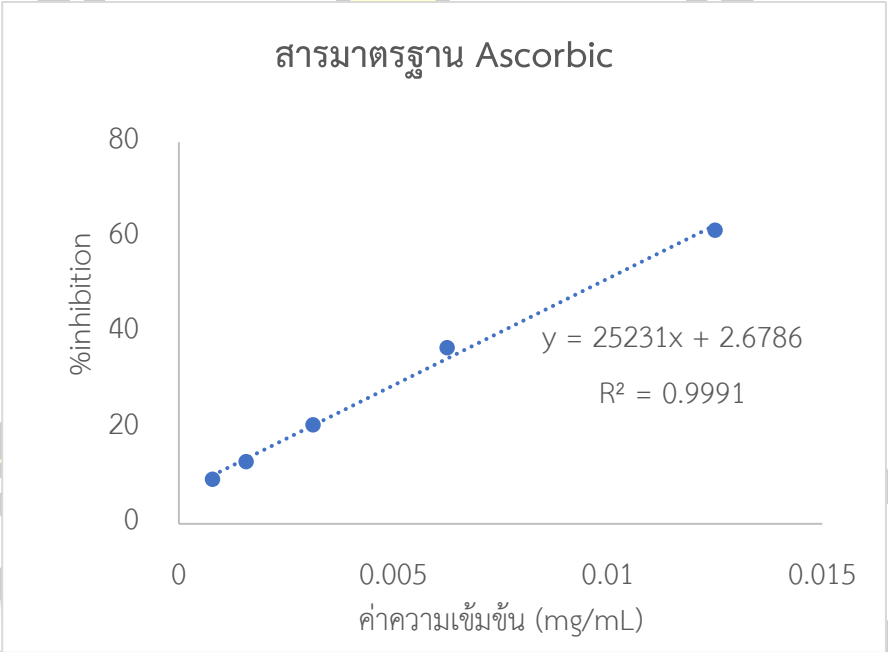
กราฟแสดงสารมาตรฐาน trolox ที่ใช้ในการทดสอบวิธี DPPH



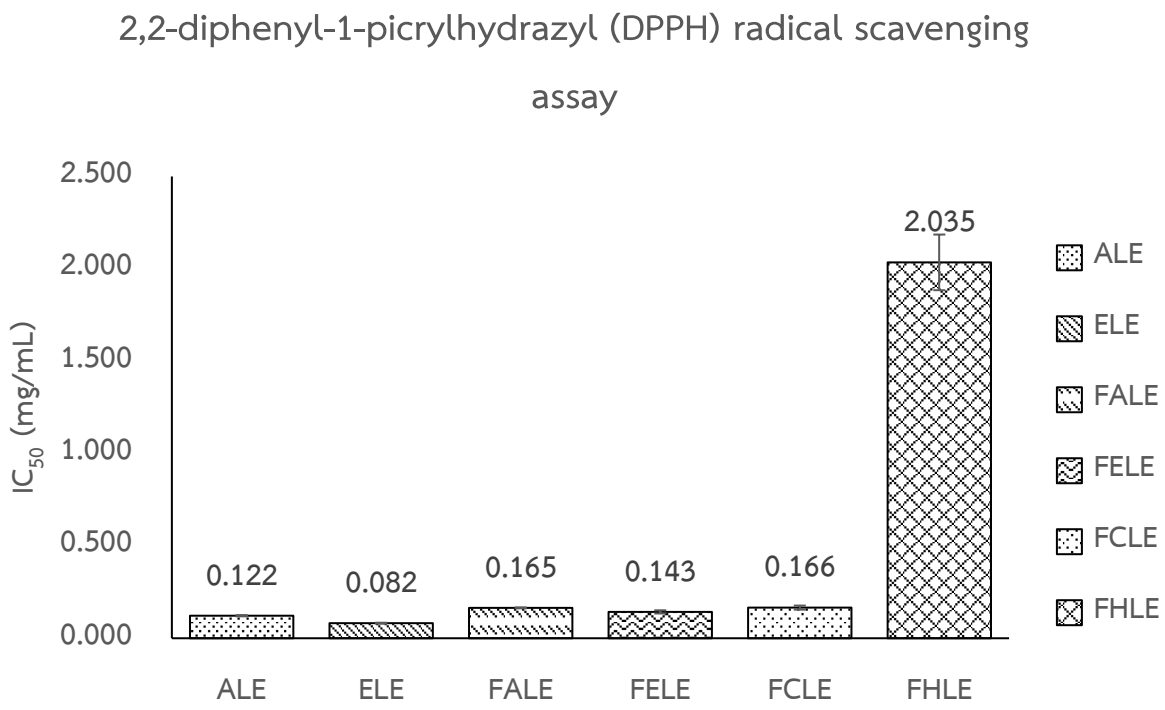
กราฟแสดงสารมาตรฐาน ascorbic ที่ใช้ในการทดสอบวิธี DPPH



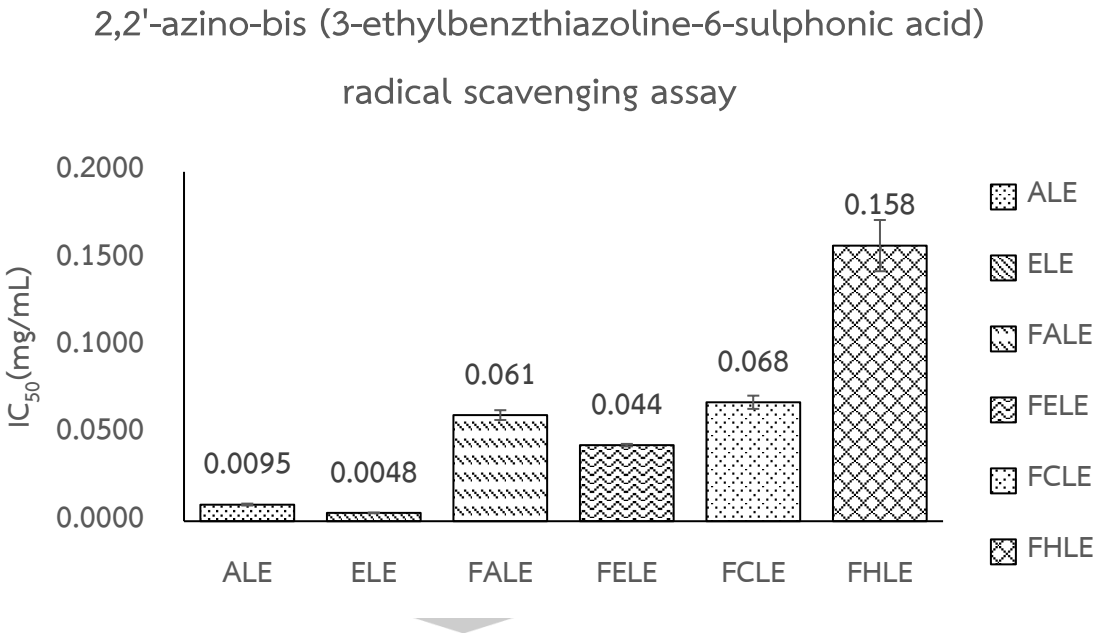
กราฟแสดงสารมาตรฐาน trolox ที่ใช้ในการทดสอบวิธี ABTS



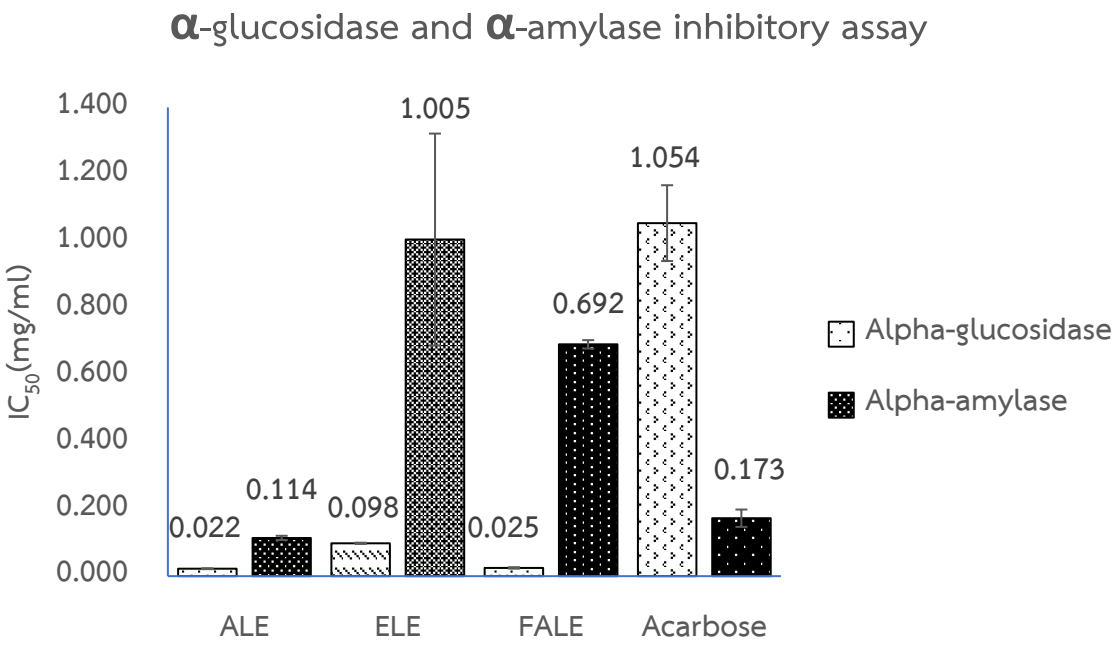
กราฟแสดงสารมาตรฐาน ascorbic ที่ใช้ในการทดสอบวิธี ABTS



กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ในการทดสอบวิธี DPPH



กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ในการทดสอบวิธี ABTS



กราฟแสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ภาคผนวก ง

หนังสือการตรวจรับรองเอกลักษณ์พันธุ์พืช

ได้รับเรื่องแล้ว
(สิริมา)
-3 ม.ค. 2563

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โทร 0-4372-2393 ภายใน 7749
ที่ อว 0605.20/ 1681 วันที่ 18 ธันวาคม 2562
เรื่อง ขอความอนุเคราะห์ตรวจเอกลักษณ์พืช

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช

ด้วยข้าพเจ้า นางสาวสายทอง สมบัติภูธร รหัสนิสิต 61011550001 นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำภา คนซื่อ และกำลังดำเนินการทำวิทยานิพนธ์เรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและแอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผสมจากหญ้าไทรและหญ้าปราบ ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรให้มีความถูกต้อง

ในการนี้ เพื่อให้การตรวจสอบเอกลักษณ์เป็นไปอย่างถูกต้องสมบูรณ์ จึงใคร่ขอความอนุเคราะห์ให้ท่าน **รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล แสนสุข** ซึ่งเป็นบุคลากรในสังกัดสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยเป็นผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกพืช ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรดังกล่าวข้างต้น

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาให้ความอนุเคราะห์ จักเป็นพระคุณยิ่ง

สายทอง สมบัติภูธร
(นางสาวสายทอง สมบัติภูธร)
นิสิตนิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)

อำภา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำภา คนซื่อ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ศาสตราจารย์สุรพล เวียงนนท์)
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีคณะแพทยศาสตร์

สำเนาเรียน รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล แสนสุข
ฝ่ายวิชาการ คณะแพทยศาสตร์
โทร. 0-4372-2393
โทรสาร 0-4372-2393

บันทึกข้อความ

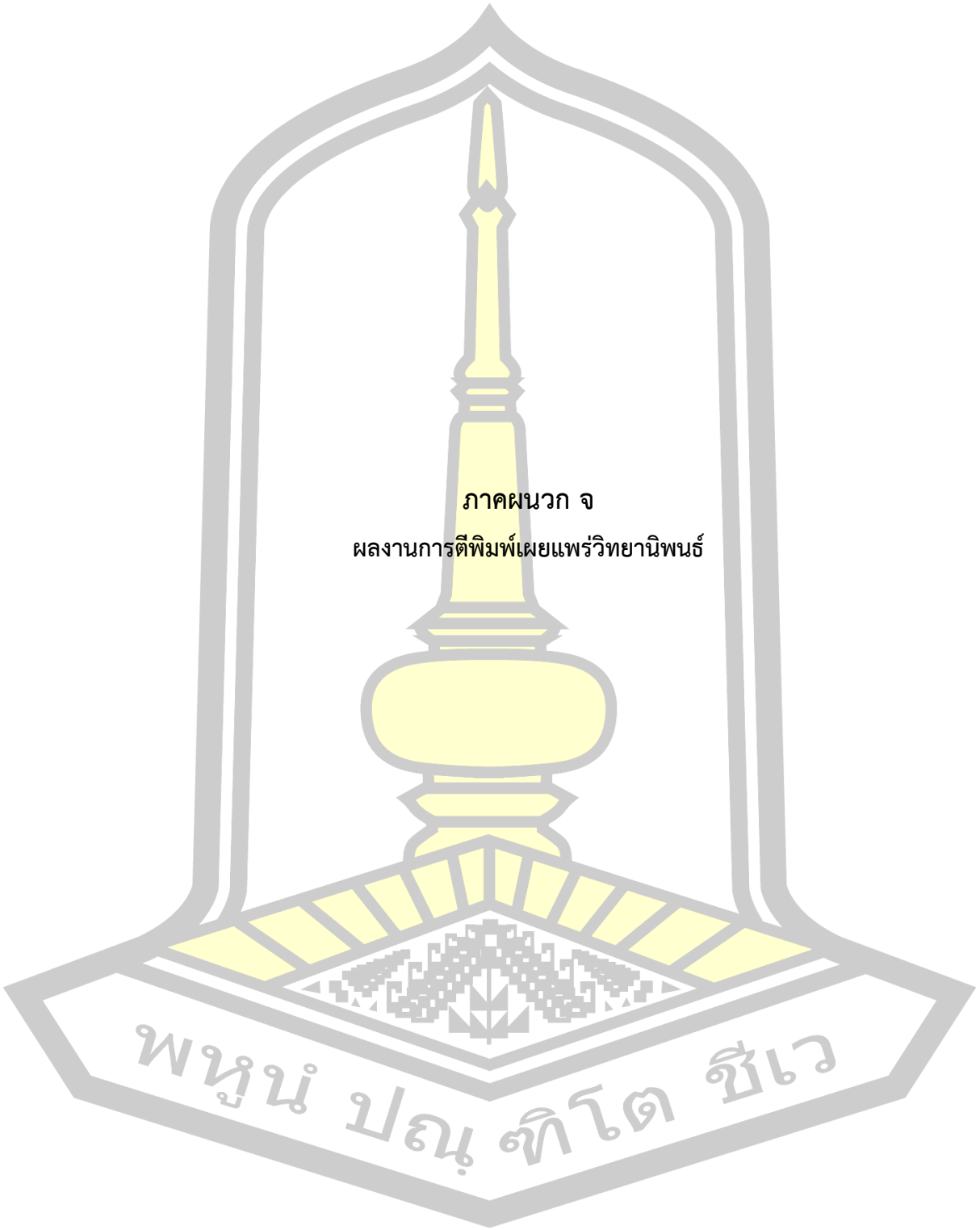
ส่วนราชการ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โทร. 1741
ที่ อว 0605.6/019 วันที่ 6 มกราคม 2563
เรื่อง ยินดีให้ความร่วมมือด้านการวิจัย

เรียน คณบดีคณะแพทยศาสตร์

ตามหนังสือคณะแพทยศาสตร์ ที่ อว 0605.20/1381 ลงวันที่ 18 ธันวาคม 2562 เรื่อง ขอความอนุเคราะห์ตรวจเอกลักษณ์พืช โดยคณะแพทยศาสตร์ ได้ขอความอนุเคราะห์ให้ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรพล แสนสุข ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกพืช เพื่อให้คำแนะนำด้านการจำแนกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพร สรรพคุณด้านสมุนไพร และเป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรให้มีความถูกต้อง ความละเอียดทราบแล้วนั้น บัดนี้สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มีความยินดีให้ความร่วมมือด้านการวิจัย ในครั้งนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(รองศาสตราจารย์วีระชัย สายจันทา)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช



ภาคผนวก จ

ผลงานการตีพิมพ์เผยแพร่วิทยานิพนธ์

Conference
Proceedings
The 6th International Conference on
Food, Agriculture and Biotechnology
August 26-27, 2019
Maha Sarakham, Thailand
ICoFAB 2019

Preface

The integrated ASEAN Economic Community (AEC) was launched in 2015. One of the main purposes of this integration is for the development of science and technology since it is a key factor in sustaining economic growth, enhancing community wellbeing and promoting integration in this region.

In order for ASEAN to become world class and be globally competitive, it requires the driving forces from the three main scientific areas of (1) Food science and technology (2) Agricultural technology and (3) Biotechnology. ASEAN is home to one of the world's most precious natural resources, and the most diverse microbial community. Scientific strength in this region would be significantly enhanced provided that appropriate collaborative networks amongst member countries are promoted. In addition, education sectors should focus more on internationalizing. Their curricula and universities across this region should find more opportunities to collaborate in research and academic activities.

The Faculty of Technology (MSU) initiated the 1st International Postgraduate Symposium on Food, Agriculture and Biotechnology in 2014 (IPSFAB 2014). Our symposiums in the past four years (2014 – 2017) had gone successfully. We are honored by distinguished scientific committees and audiences from around the world. Since 2018, the name of symposium has been changed to "The International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (ICoFAB 2018)". The revision has been made to broaden the conference scope, in which encourage more researchers, not limited to the postgraduates, in related research areas to take part and share their research experiences. Thus, the potential academic networks or collaboration amongst Thai and international researchers could be developed.

The 6th ICoFAB 2019 would be providing an atmosphere of collaborative networks amongst national and international researchers. All participants may find benefits from update research trends presented at the symposium.

A. Moongngarm

(Assoc. Prof. Dr. Anuchita Moongngarm)
Dean of the Faculty of Technology
Mahasarakham University

MSU Editorial Board

Assoc. Prof. Dr. Anuchita Moongngam
Assoc. Prof. Dr. Maratree Plainsirichai
Assoc. Prof. Dr. Thalisa Yuwa-amornpitak
Assoc. Prof. Prasit Chutichudech
Assoc. Prof. Dr. Anut Chantiratikul
Asst. Prof. Dr. Sirirat Deeseenthum
Asst. Prof. Dr. Wantana Sinsiri
Asst. Prof. Dr. Pheeraya Chottanom
Asst. Prof. Dr. Wasan Duangkhamchan
Asst. Prof. Dr. Vijitra Luang-In
Asst. Prof. Dr. Kedsirin Sakwiwatkul
Asst. Prof. Dr. Luchai Butkhup
Asst. Prof. Dr. Eakapol Wangkahart
Asst. Prof. Dr. Panarat Phadee

Organizing Committee

Assoc. Prof. Dr. Anuchita Moongngam
Asst. Prof. Dr. Sirirat Deeseenthum
Asst. Prof. Dr. Eakapol Wangkahart
Asst. Prof. Dr. Vijitra Luang-In
Asst. Prof. Dr. Wasan Duangkhamchan
Asst. Prof. Dr. Narendhirakannan RT
Asst. Prof. Dr. Abdulhadi Albaser

Scientific Committee

Prof. He Chaoxing,	*Institute of Vegetable and Flowers Chinese Academy of Agricultural Sciences, China*
Prof. Ping Zhang,	*Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, China*
Prof. Yongqi Shao,	*Zhejiang University, China*
Prof. C. Hanny Wijaya,	*Bogor Agricultural University, Indonesia*
Honorary Prof. Colin Wrigley,	*QAAFI, University of Queensland, Australia*
Prof. Emeritus Ian Warrington,	*Massey University, New Zealand*
Assoc. Prof. Dr. Ko-Tung Chang,	*National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan*
Asst. Prof. Dr. Abdulhadi Albaser,	*University of Sebha, Libya*
Assoc. Prof. Dr. Khamsah Suryati Mohd,	*Universiti Sultan Zainal Abidin, Terengganu, Malaysia*
Prof. Jun Zou,	*Shanghai Ocean University, China*
Dr. Steve Bird,	*University of Waikato, New Zealand*
Assoc. Prof. Dr. Bei Wang,	*Guangdong Ocean University, China*
Dr. Miguel Bao,	*Institute of Marine Research, Norway*
Asst. Prof. Dr. Narendhirakannan RT,	*Karunya Institute of Technology and Science, India*
Assoc. Prof. Dr. Maratree Plainsirichai,	*Mahasarakham University,Thailand*
Assoc. Prof. Dr. Thalisa Yuwa-amornpitak,	*Mahasarakham University, Thailand*

Assoc. Prof. Dr. Anut Chantiratikul, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Pheeraya Chottanom, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Karnnika Chokeatwatana, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Benjapon Kunlanit, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Srinual Jantathai, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Vijitra Luang-in, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Luchai Butkhup, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Kedsukon Maneewan, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Sirirat Deeseenthum, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Eakapol Wangkahart, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Kriengsak Bunleu, *Mahasarakham University, Thailand*
Asst. Prof. Dr. Tatdao Phasipol, *Mahasarakham University, Thailand*
Dr. Issaraporn Somboonwatthanakul, *Mahasarakham University, Thailand*
Dr. Sunisa Roidoung, *Mahasarakham University, Thailand*

Content

Full papers:	Page
Effect of Sugar Substitution by Stevia Extract on Sensory Acceptance, Color, and Texture Profiles of Brownie *Naruetit Sriharbutr*	1
Phytochemical Screening, Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of the Aqueous Extracts of *Dendrocalamus membranaceus* and *Thyrsostachys siamensis* *Agarat Kamcharoen*	6
Distribution of Melatonin and Serotonin in Germinated Rice *Jakkaphan Kaennok*	12
Sensory Characteristics of No-Sugar Black-Rice Tea Drinks *Jutawan nuanchankong*	18
Effect of Cinnamon Oil and Garlic Extract for Fresh Shrimp Preservation *Supraewpan Lohalaknadech*	22
Effects of Wood Vinegar and Cow Manure on Growth of Khao Dawk Pradoo Rice in Experimental Field *Wanida Sumranram*	28
Kinetics Study on Hot-Air Drying Carrot Cubes *Wanwisa Sukzamran*	32
Effect of Acid-Alkaline Pretreatment on Reducing Sugar Yield and Lignocellulosic Compositions of Rice (*Oryza sativa* L.) Residues *Kaewkanlaya Sotthisawad*	39
Mixture of Parawood Sawdust and Dried Napier Grass as a Substrate on *Lentinus squarrusulus* Mont. Cultivation *Niramai Fangkrathok*	44
Variation of Inulin Content in Banana Peels at Different Maturity Stages *Ratchanee Puttha*	50
Phenolic and Antioxidant Properties of Male Bud Flowers and Fruit of *Musa* Genotypes with Different Ploidy *Somkit Jaitrong*	56
Efficacy of *Stephania pierrei* Tuber Extract for Leaf Spot Disease Control in Greenhouse and Field Condition *Quanjai Rupitak*	61
Phytochemical Contents and Antioxidant Activity of Bagasse Sugarcane Extracts *Panadda Sanarat*	64
Locust Bean Gum Hydrolysis for Mannooligosaccharide (MOS) Production Using *Bacillus methylotrophicus* KS1 *Sunchai Phiuphech*	69

Content

Full papers: **Page**

Screening of Yeasts from Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang) for Alcoholic Fermentation Products in Community Enterprise *Pikulthong Paewlueng*	74
Isolation and Identification of Lipase-Producing Bacteria from Soil in Nasinuan Forest, Kantarawichai District, Mahasarakham Province *Manatchanok Yotchaisarn*	79
Screening and Identification of Bacteria that Produce Chitinase Enzymes from Soil in Na Si Nuan Forest, Maha Sarakham, Thailand *Ketsara Suwunnapukdee*	88
Random Mutagenesis of *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG 178 for Improvement a Lovastatin Production *Supawan Meena*	94
Genetic Variation among Thai Dugong (*Dugong dugon*) Populations from Cytochrome *C* Oxidase Subunit 1 DNA Sequence Data *Nattapong Srisamoot*	99
Comparative Study of Proteome Pattern of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa Leaf Proteins *Bung-on Prajanban*	106
Characterisation of Microwave-assisted Pretreatment for Spent Coffee Grounds *Wipada Jamzai*	112
Morphological Observation of Polylactide-b-Poly (Ethylene Glycol)-b-Polylactide Triblock Copolymers Stereocomplex Films *Pattarin Intaravichien*	118
Plasma Technology and Abiotic Elicitor Effectively Increased Isothiocyanates, Bioactive Compounds and Cytotoxicity against Caco2 Cells in Mustard Green Microgreen Extract *Worachot Saengha*	123
Phytochemical Screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent Extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* *Saithong Sombutphoothorn*	132
Evaluation on Phytochemical Constituents and Antioxidant Activities of Various Formula from Ko-Klan Remedies by Aqueous Infusion Preparation Method *Khwanchnok Maimork*	139
Plant Diversity in Burapha University, Sa Kaeo Campus *Chakkrapong Rattamanee*	144
Parasitic Infection in Common Lowland Frog (*Hoplobatrachus rugulosus* Wiegmann) and Disease Treatment *Panarat Phadee*	153

doi:10.14457/MSU.res.2019.24 ICoFAB2019 Proceedings | 132

Phytochemical Screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent Extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*

Saithong Sombutphoothorn[1] and Ampa Konsue[2]*

[1] Graduate student of Health Science program, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44000, THAILAND.
[2] Applied Thai Traditional Medicine, Thai Traditional Medicine Research Unit, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44000, THAILAND.

*Corresponding author's e-mail: e-mail: ampa_ice@hotmail.com

Abstract:

The aim of this research was to determine on phytochemical screening, antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* by using different solvent extractions. Both plants (1:1;w:w) of recipe were extracted using by different solvents including aqueous (ALE) and 80% ethanol (ELE). Phytochemical screening was determined on total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) contents in plants. The antioxidant activities were determined by, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) radical scavenging and 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ($ABTS^+$) assay. The α-glucosidase inhibitory assay was evaluated on glucose transferase mechanism. This experimental study found that the recipe showed high-among of total phenolic and flavonoid contents especially ELE (40.024±0.952 mgGE/gExt and 0.072±0.001 mgQE/gExt,). The ELE (IC_{50} = 0.082±0.0025 mg/mL) was significantly exerted on free radical scavenging activity higher than ALE (IC_{50} = 0.122±0.0033 mg/mL). $ABTS^+$ radical scavenging activity, the ELE (IC_{50} = 0.0048±0.00018 mg/mL) was significantly stronger than Trolox (IC_{50} = 0.0086±0.00063 mg/mL), known as standard substances. α-glucosidase inhibitory activity, ALE (IC_{50} = 0.022±0.001 mg/mL) and ELE (IC_{50} = 0.098±0.002 mg/mL) were significantly more effect in inhibited α-glucosidase enzyme than acarbose (IC_{50} =1.054±0.113 mg/mL), known anti-diabetic drug. The recipe has been having the phenolic and flavonoid contents which chemical substances were known as anti-oxidation and anti-diabetic property, Pharmaceutical activities were showed on antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities. Further, also chemical compositions, major active compound(s) and *in vivo* were clarified in next study.

Keywords: Phytochemical screening, Phenol, Flavonoids, Antioxidant, α-glucosidase

Introduction

Herbal medicines have been developed not only to improve ancient traditional therapeutics, but also as an alternative solution for health problems [1]. Thai traditional medicine is folklore medicine inherited from Thai ancestor [2]. The drugs have been used for healing since the past until now. In each recipe might be consist with also approximately of some plant, some dosage, some herbal part and some indication to disease treatment. This traditional medicine recipe is once recipe from Thai traditional medicine which composed with two kinds of medicinal plants. First plant, *Leersia hexandra*, Swamp Rice grass, name in Thai is Yaa-Sai [3] and second plant, *Elephantopus scaber*, Prickly-leaved elephant's foot, name in Thai is Do-Mai-Ru-Lom in weight ratio 1:1 (w:w) [4]. Thai ancestor still believed that this recipe has been claimed usage to treatment of diabetes.

The review literatures of each plant in the recipe was revealed in many scientific reports. *L. hexandra* (family: Poaceae) is grass species used in traditional medicine to treat many diseases including hypertension and diuretic. The phytochemical studies have demonstrated the presence of plants are polyphenol, flavonoids and terpenoids. The pharmacological activities were reported such as hypertension, antioxidant and anticancer [5-6].

E. scaber (family: Asteraceae) has been used as traditional medicine in many countries. It has been popular as a medicinal herb in many countries of Southeast Asia [7]. In Thailand, it has been used as traditional medicine including diuretic, tonic, antihelminthic and aphrodisiac [7]. The most important of these biologically active constituents of plants are elephantopin, triterpenes, stigmasterol, epifriedelinol and lupeol. Other compounds are copaene, isopropyl, dimethyl, hexahydronaphthalene, cyclosativene and

Zingiberene from the essential oils [8]. This plant has been extensively screened and proved for anticancer activity, which is mainly for its deoxyelephantopin containing. Many other biological activities such as antimicrobial [9-12], hepatoprotective [13], antioxidant [14-16], antidiabetic [17-19], anti-inflammatory [14], analgesic [17], anti-asthamatic[20] and anticancer [21] have been reported in various research articles[7-8].

Free radical stress is a common theme which underlines etiology of several degenerative disorders. The production of free radicals is linked to the inflammatory process. Free radicals prime the immune response, recruit inflammatory cells and are innately bactericidal [22-23]. The most common reactive oxygen species (ROS) in particular free radicals include superoxide ($O_2^{\bullet}$) anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), peroxyl ($ROO^{\bullet}$) radicals, and reactive hydroxyl ($OH^{\bullet}$) radicals. The nitrogen derived free radicals are nitric oxide ($NO^{\bullet}$) and peroxynitrite anion ($ONOO^{\bullet}$). In treatment of these diseases, antioxidant therapy has gained an immense importance. Synthetic antioxidants like butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) commonly used in processed foods have side effects and are carcinogenic [24-25].

Diabetes mellitusis a well-known metabolic disorder, which is characterized by an abnormal postprandial increase of blood glucose level. The control of postprandial hyperglycemia is believed to be important in the treatment of diabetes mellitus. α-Glucosidase secreted from intestinal chorionic epithelium is responsible for the degradation of carbohydrates. α-Glucosidase inhibitors slow down the process of digestion and absorption of carbohydrates by competitively blocking the activity of glucosidase. Consequently, the peak concentration of postprandial blood glucose is reduced and the blood sugar level comes under control. α-Glucosidase inhibitors can offer several advantages and has been recommend by the Third Asia-Pacific Region Diabetes Treatment Guidelines as the first-line of treatment for lowering postprandial hyperglycemia [26]. Several α-glucosidase inhibitors, acarbose was obtained from natural sources, can effectively control blood glucose levels after food intake and have been used clinically in the treatment of diabetes mellitus [27]. In clinically, they have been associated with serious gastrointestinal side effects. It is necessary to search for alternatives that can display α-glucosidase inhibitory activity but without side reactions [28].

However, this traditional medicine recipe was widely used to treat many diseases, but there is no any scientific report. Therefore, this study aimed to determine on phytochemical screening (TPC and TFC), anti-oxidant activity (DPPH and ABTS) and α-glucosidase inhibitory for confirmed pharmaceutical preliminary.

Materials and methods

Sample Collection

Leersia hexandra and *Elephantopus scaber* in recipe were collected from Maha Sarakham and Amnat Charoen province, northeastern of Thailand. The specimens were identified and deposited at the Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Thailand (code; *L. hexandra*: MSU.MED- LH0001/SS and *E. scaber*: MED- ES0001/SS). All of the fresh materials were cleaned and dried at 40°C for 18 hr in a hot air oven and then powdered.

Preparation of Extracts

The aqueous extract (ALE) was prepared by distilled water for 15 min at 100°C in Electric boiler (1:10 w/v). The boiling process was repeated twice. The ethanolic extract (ELE) was macerated with 80% ethanol for 3 hr at 60°C in sonication bath (1:10 w/v). The sonicating process was repeated three times. The residue powder was excluded by using filter papers. The filtrate was evaporated using by a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000, Germany) and freeze-dried to obtain brown extract. The extracts were kept in the fridge at -20°C until be used.

Total phenolic content assay

Total phenolic content was determined according to a modified procedure [29]. Sample (100 µL) will be oxidized with 500 µL of 0.2 N Folin-Ciocalteu's reagent and neutralized by adding 400 µL of 7.5% Na_2CO_3. The absorbance measured at 765 nm by UV-Vis Spectrophotometer after mixed and incubated in room temperature for 30 min. The results were expressed as gallic acid equivalents (mgGE/gExt).

Total Flavonoid Content Assay

Flavonoid content was estimated using the aluminum chloride colorimetric method [30]. The extracts from recipe will be mixed with 100 µL of 5% aluminum chloride (w/v), 400 µL of 2.5% $NaNO_2$ After 5 min, 500 µL of 5%$AlCl_3$. The mixture was allowed to stand at room temperature for 10 min. The solution was mixed 2,000 µL distilled water. The samples were measured at 415 nm. The TFC was calculated from a standard quercetin equivalent (mgQE/gExt).

DPPH radical scavenging assay

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) radical scavenging capacities of wheat extracts were estimated by the reduction of the reaction color between DPPH solution and sample extracts as previously described by prior method [31]. DPPH was dissolved in ethanol to a 0.039 mg/mL. The plant extract at various concentrations was diluted with distilled water to get sample solution. The sample solution with 100 µL following which 900 µL DPPH (0.1 mM) working solution. After a 30 min reaction kept in the dark at ambient temperature then absorbance of the solution was measured at 515 nm. In this study, Trolox and ascorbic acid were used as standard substances. Blank was run in each assay. DPPH radical ability was expressed as IC_{50} (mg/mL) and the inhibition percentage calculated using the following formula: DPPH scavenging activity (%) = $(A_0-A_1)/ A_0$ x 100 where A_0 is the absorbance of the control and A_1 is the absorbance of the sample.

$ABTS^+$ Radical Scavenging assay

In ABTS assay, the plants extract was allowed to react with $ABTS^+$, a model stable free radical derived from 2,2-azinobis (3-ethylvenzothiazolin-6-sulphonic acid) ($ABTS^+$) [32]. The $ABTS^+$ (900 µL) was added to the extracts (100 µL) and thoroughly mixed. The mixture was held at room temperature for 6 min and absorbance was immediately measured at 734 nm. Trolox and ascorbic acid solution in distilled water was prepared and assayed under the same conditions. ABTS scavenging ability was expressed as IC_{50} (mg/mL) and the inhibition percentage calculated using the following formula: ABTS scavenging activity (%) = $(A_0-A_1)/ A_0$ x 100 where A_0 is the absorbance of the control and A_1 is the absorbance of the sample.

α-Glucosidase inhibitory assay

All extracts were tested for their ability in inhibiting α- glucosidase using *in vitro* assay. The assay method was assessed using Taepongsorat, *et al*. (2019) with slight modifications [33]. Briefly, a volume of 120 µL of the sample solution and 100 µL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) containing α- glucosidase solution (0.2 U/mL) was incubated at 37°C for 20 min. After preincubation, 100 µL of 5 mM p- nitrophenyl- α- D- glucopyranoside solution in 0.1- M phosphate buffer (pH 6.8) was added to each well and incubated at 37°C for another 20 min. Then, the reaction was stopped by adding 320 µL of 0.2- M Na_2CO_3 into each well, and absorbance were read (A) and recorded at 405 nm by UV-Vis Spectrophotometer and compared to a control which had 120 µL of buffer solution. The system without α- glucosidase was used as blank, and acarbose was used as positive control. The α- glucosidase inhibitory activity was expressed as inhibition (%) and was calculated as follows: %inhibition = $(A_0–A_1)/A_0 \times 100$ where A_0 is the absorbance of the control and A1 is the absorbance of the sample. IC_{50} values were calculated by the graphic method.

Statistical analysis

All assays were expressed as means ± standard deviation (SD) from five separate experiments (n = 5). Statistical analysis was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests. Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results and discussion

The ELE and ALE from the recipe has been have both TPC and TFC which ELE (40.024±0.952 mgGE/gExt; 0.072±0.0007 mgQE/gExt) showed significantly higher contents than ALE (11.424±0.158 mgGE/gExt; (0.017±0.0002 mgQE/gExt). (Table 1). Phenolic compounds have an aromatic ring with one or more hydroxyl groups and act as antioxidants [47]. In the study, extraction methods, solvent polarity is frequently used for recovering phenolic compounds from plant. Ethanol is an organic solvent which has been known as a good solvent for phenolic substance extraction and lowly hazard to human consumption [34]. Some organic molecules are more polar and therefore more soluble in water. Thus, the chemical composition on aqueous extraction method were composed with polysaccharide, proteins and glycoside substances. The aqueous extraction may either contain non-phenolic or possess phenolic compounds that contain a smaller number of active groups than the other solvents [35]. Total phenolic compounds in methanol extract of *E. scaber* showed high TPC and significant antioxidant activity. The antioxidant activity increased with increasing concentration of extract [39]. *E. scaber* ingredients composed with phenolic, flavonoid, terpenoid and another compound might play a role in the antioxidant activity. These phytochemicals showed possess wound healing, anti-venom, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-diabetic, cytotoxic and anti-tumour activities.

In this study DPPH radical scavenging activity, standard substances, ascorbic acid (IC_{50} = 0.004±0.0002 mg/mL) and trolox (0.016±0.0012 mg/mL) were show significantly more potent than all of

the extracts from this recipe. While, The ELE (IC_{50} = 0.082±0.0025 mg/mL) was significantly exerted on free radical scavenging activity higher than ALE (IC_{50} = 0.122±0.0033 mg/mL). (Table 1). Surprisingly, $ABTS^+$ radical scavenging assay, the ELE (IC_{50} = 0.0048±0.00018 mg/mL) was significantly stronger on this method than trolox (IC_{50} = 0.0086±0.00063 mg/mL), known as standard substances but not ascorbic acid (IC_{50} = 0.0019±0.00004 mg/mL). (Table 1). The antioxidant activity in the experiment found that the extraction by using by ethanol provided high significantly free radical scavenging both DPPH and $ABTS^+$ methods which is related to the quantity of TPC and TFC. The ethanol extract gave the strong antioxidant capacity in the study which showed low values of IC_{50} [36]. The antioxidant activity of extracts varied depending on the polarity of solvent and the method used to extract bioactive compounds. Changing in solvent polarity alters its ability to dissolve a selected group of antioxidant compounds and influences the antioxidant activity estimation [37]. The antioxidant activity could be therapeutic importance in preventing oxidative stress involving in the development of several diseases [38]. There were some reports regarding the ethanol and aqueous extracts of *L. hexandra* showed that it has an antioxidant effect that protects the tissues from the deleterious effects of free radicals resulting in hypertension rat [5]. Methanol extract of *E. scaber* showed high TPC and the antioxidant activity increased with increasing concentration of extract [39].

In this experiment, α-glucosidase inhibitory activity, the result found that ALE (IC_{50} = 0.022±0.001 mg/mL) and ELE (IC_{50} = 0.098±0.002 mg/mL) which can inhibit activity of α-glucosidase enzyme more than acarbose (IC_{50} = 1.054±0.113 mg/mL). (Table 1). In this study, the α-glucosidase inhibitory activity was obtained stronger than the positive control, acarbose. Phytochemicals have also been isolated from plants includes elephantopin, triterpenes, stigmasterol epifriedelinol and lupeol [8]. They showed strong inhibitory activity against α-glucosidase. These studies showed α-glucosidase inhibitors slow down the process of digestion and absorption of carbohydrates by competitively blocking the activity of glucosidase [26]. On the basis of literatures published worldwide, summarized in a list of 411 natural products isolated from medicinal plants that showed α-glucosidase inhibitory activity [38]. Structurally these natural product inhibitors compose of terpene, alkaloid, quinine, flavonoid, phenol, phenylpropanoid, and steroid frameworks. These inhibitors are rich in organic acid, ester, alcohol, and allyl functional groups. A majority of the compounds reported contain flavonoid, terpene, and phenylpropanoid ring structures [38]. Recently, several studies have determined that flavonoid compounds can be very effective in inhibiting α-glucosidase activity [45]. A total of 103 flavonoids showed glycosidase inhibitory activity including xanthones, flavanones, flavans, anthocyamins, chalcones, and other structural motifs [38]. Thirty-seven polyphenols from plants have shown promising α-glucosidase inhibitory activity. Gallic acid, an important constituent of many plants species showed strong inhibitory activity against glucosidase both *in vitro* and *in vivo* [46]. The effect of phytomedicines can be evaluated by studying synergistic effects through multitarget effects or effects on pharmacokinetic or physicochemical properties. There has been some reports regarding 28Nor-22(R) with a 2, 6, 23-trienolide, a major steroid isolated from the acetone extract of the *E. scaber* decreased blood level glucose in STZ diabetic rats [41]. This may be due to a stimulating effect on insulin release from regenerated β-cells of the pancreas or increased cellularity of the islet tissues [41]. Bioactive compounds of *E. scaber* had also successfully identified in some compounds such as deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin, scabertopin, isoscabertopin, elescaberin, 17, 19-dihydrodeoxyelephantopin and a terpenoid which showed a broad range of biological functions [8]. The ethyl acetate root extract and methanol leaf extract of *E. scaber* showed antihyperglycemic effect by reducing the blood glucose level, glycosylated hemoglobin, a change in the lipid profile and kidney functions, liver and muscle glycogen, serum insulin levels and histopathological studies [42]. Aqueous extract of leaves and roots into alloxan induced diabetic rats significantly reduced serum glucose, glycosylated hemoglobin and the activity of gluconeogenic enzyme glucose-6-phosphatase [43]. However, could be linked to more than one mechanism including insulin sensitizing, insulin releasing, gluconeogenesis inhibition and α-glucosidase inhibition [44]. Thus, it is worthwhile to evaluate further the effective components of isolated compounds *in vivo* rather than make a conclusion based on enzyme inhibition assay only [45].

Conclusions

The recipe are combines from *L. hexandra* and *E. scaber* as a Thai traditional remedy, present experiments provides a preliminary data that the recipe ingredients with phenolic compounds and flavonoid contents. The pharmaceutical activities were show more potent on antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities. In this study, the pharmaceutical preliminary was confirmed to use of this recipe from Thai traditional medicine. However, chemical compositions, major active compound(s) and *in vivo* need to be clarified in next study.

Table 1 Total phenolic (TPC), and flavonoid contents (TFC), DPPH, and ABTS radical scavenging activities, and α-glucosidase inhibitory activities of different solvent extracts from combination of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*.

Samples	TPC mgGE/gExt	TFC mgQE/gExt	DPPH IC_{50}(mg/mL)	$ABTS^{+}$ IC_{50}(mg/mL)	α-Glucosidase IC_{50} (mg/mL)
ALE	11.424±0.158b	0.017±0.0002b	0.122±0.0033d	0.0095±0.00054d	0.022±0.001a
ELE	40.024±0.952a	0.072±0.0007a	0.082±0.0025c	0.0048±0.00018b	0.098±0.002a
ascorbic	-	-	0.004±0.0002a	0.0019±0.00004a	-
acid	-	-	0.016±0.0012b	0.0086±0.00063c	-
trolox	-	-	-	-	1.054±0.113b
acarbose					

ALE was extracted with aqueous. ELE was extracted with 80% ethanol. TPC was measured with gallic acid equivalents (mgGE/gExt). TFC was measured with quercetin equivalent (mgQE/gExt). Antioxidant activities and α-glucosidase inhibitory activities showed IC_{50} of different extracts from recipe. DPPH and $ABTS^{+}$ radical scavenging activity were used trolox and ascorbic acid as standard substances. α-glucosidase inhibitory activities was used Acarbose as a positive control. Different letters indicated significantly different at $p < 0.05$.

Acknowledgements

The study was supported by Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand.

References

[1] WHO. *WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2004, p. 1-7.
[2] Nichpanit S, Thai Traditional and Alternative Health Profile: Thai Traditional Medicine, Indigenous Medicine and Alternative Medicine 2011-2013. *Health Profi Edit.indd*. 2014, 289-304.
[3] Liu L, and Phillips SM. Poaceae (Leersia). In Flora of China. 2006; 22, 184-185.
[4] Chen Y, and MG Gilbert. Asteraceae (Vernonieae). In Flora of China. 2011; 20-21, 368-369.
[5] Danielle CB, Yannick CT, Paul DD, Daniel LD, Yannick BF, Théophile D, and Pierre K. Antihypertensive Activity of *Leersia hexandra* Sw. (Poaceae) Aqueous Extract on Ethanol-Induced Hypertension in Wistar Rat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019; 1-9.
[6] Pintusorn H, Chatri N, Kornkanok I, Watcharin P. Antiproliferative, apoptotic induction and antiinvasive effects of *Leersia hexandra* (L.) Sw., *Panicum repens* Linn., and *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf extracts on human cancer cells. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2009; 31(1), 79-84.
[7] Sudip K M, Haraprasad P, Ishan P, Sankhadip B. Biological potential of *Elephantopus scaber* Linn. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2018; 50(2), 130-134.
[8] Abubakar Kabiru. *Elephantopus Species*: Traditional Uses, Pharmacological Actions and Chemical Composition. *Adv. in Life Sci. Technol*. 2013; 15, 6-13.
[9] Geng HW, Zhang XL, Wang GG, Yang XX and Wu X *et al*. Antiviral dicaffeoyl derivatives from *Elephantopus scaber*. *J. Asian Nat. Prod. Res*. 2011; 13, 665-669.
[10] Suresh KS, Perumal P, Suresh B, Antibacterial Studies on Leaf Extract of *Elephantopus Scaber* Linn, *Ancient Sci Life*. 2004; 23, 6-8.
[11] Ganga RB, Venkateswara RY, Pavani S and Dasari VSP. Qualitative and quantitative phytochemical screening and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Elephantopus scaber* Linn. *Recent Res. Sci. Technol.* 2012a; 4, 15-20.
[12] Avani K, Neeta S. A study of the antimicrobial activity of *Elephantopus scaber*, *Ind J Pharm* 2005; 37, 126-127.
[13] Huang CC, Lin KJ, Cheng YW, Hsu CA, Yang SS and Shyur LF. "Hepatoprotective effect and mechanistic insights of deoxyelephantopin, a phyto-sesquiterpene lactone, against fulminant hepatitis," *J. Nutr. Biochem*. 2013; 24(3), 516–530.
[14] Chim-Kei C, Loh Teng-Hern T, Shathiswaran NA, Muhamad N, Alfarizal K, Bey-Hing G and Habsah AK. Anti-neuroinflammatory Activity of *Elephantopus scaber* L. via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of p38 MAPK Pathway in LPS-Induced Microglia BV-2 Cells. *Front. Pharmacol*. 2017; 8, 1-15.

[15] Kannakuzhiyil OS, Pallara JW, Bhaskara KL, Rajagopal R, Mukalel SL. Antioxidant and antihepatotoxic efficacy of methanolic extract of *Elephantopus scaber* Linn in Wistar rats. *APJTD* 2012; 2, S904-S908.

[16] Ganga R, Venkateswara RY, Pavani S, and Praneeth DVS. Qualitative and quantitative phytochemical screening and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Elephantopus scaber* Linn. *Recent res. sci. technol.* 2012; 4(4), 15-20.

[17] Rahmatullah M and Haque E. *Elephantopus spicatus*: a plant with hitherto unreported antihyperglycemic and antinociceptive potential. *WJPP*. 2014; 3(9), 71-80.

[18] Daisy P,Jasmine R, Ignacimuthu S and Murugan E. A novel steroid from *Elephantopus scaber* L. an ethnomedicinal plant with antidiabetic activity. *Phytomedicine*. 2009;16: 252-257.

[19] Daisy P, Nirmara AR and Rajathi D. Hypoglycemic effects of *Elephantopus scaber* in alloxan-induced diabetic rats. *Indian J. Biol. Sci.* 2007; 7(2), 433-437.

[20] Sagar R, Sahoo HB, Evaluation of Antiasthmatic activity of ethanolic extract of *Elephantopus scaber* L. leaves, *Indian J Pharmacol*. 2012; 44, 398-40.

[21] Wu C, Liu J, Zhang X. Determination of organic acids in the root exudates of Cr-hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz using high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*. 2018; 36(2), 167-172.

[22] Allen LH. Mechanisms of pathogenesis: Evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect*. 2003; 5, 1329-1335.

[23] Grimble RF. Nutritional anti-oxidants and the modulation of inflammation: Theory and practice. *New Horiz*. 1994; 2,175-185.

[24] Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyl anisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*. 1975; 52, 59–63.

[25] Fukushima S, Hassegawa A, Shibata M & Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1983; 70, 343–347.

[26] Li YP, Bai B, Ye J, *et al*. Reviews on preparation and determination of α-glucosidase inhibitor, *Food Sci.* 2008; 29, 617–619.

[27] Playford RJ, Pither C, Gao R, *et al*. Use of the α-glucosidase inhibitor acarbose in patients with 'Middleton syndrome': normal gastric anatomy but with accelerated gastric emptying causing postprandial reactive hypoglycemia and diarrhea. *Can. J. Gastroenterol.* 2013; 27, 403–404.

[28] Mata R, Cristians S, Escandón-Rivera S, *et al*. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α-glucosidases, *J. Nat. Prod.* 2013; 76, 468–483.

[29] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela- Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin- ciocalteu reagent. *Methodz Enzymol*. 1999; 299, 152-78.

[30] Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002; 10, 178- 82.

[31] Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med*. 1994; 16, 547- 53.

[32] Hua LL, Halliwell B. Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 286, 991- 4.

[33] Taepongsorat L, Konsue A. Biological screening of tri-jannarose as a recipe from Thai traditional *medicine. Phcog Res*. 2019; 11, 110-4.

[34] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15, 7313- 52.

[35] Do QD, Angkawijaya AE, Tran- Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, *et al*. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica. J Food Drug Anal*. 2014; 22, 296- 302.

[36] Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996; 97, 1111- 6.

[37] Zhou K and Yu L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebennsmitt Wiss Technol*. 2004; 37, 717- 21.

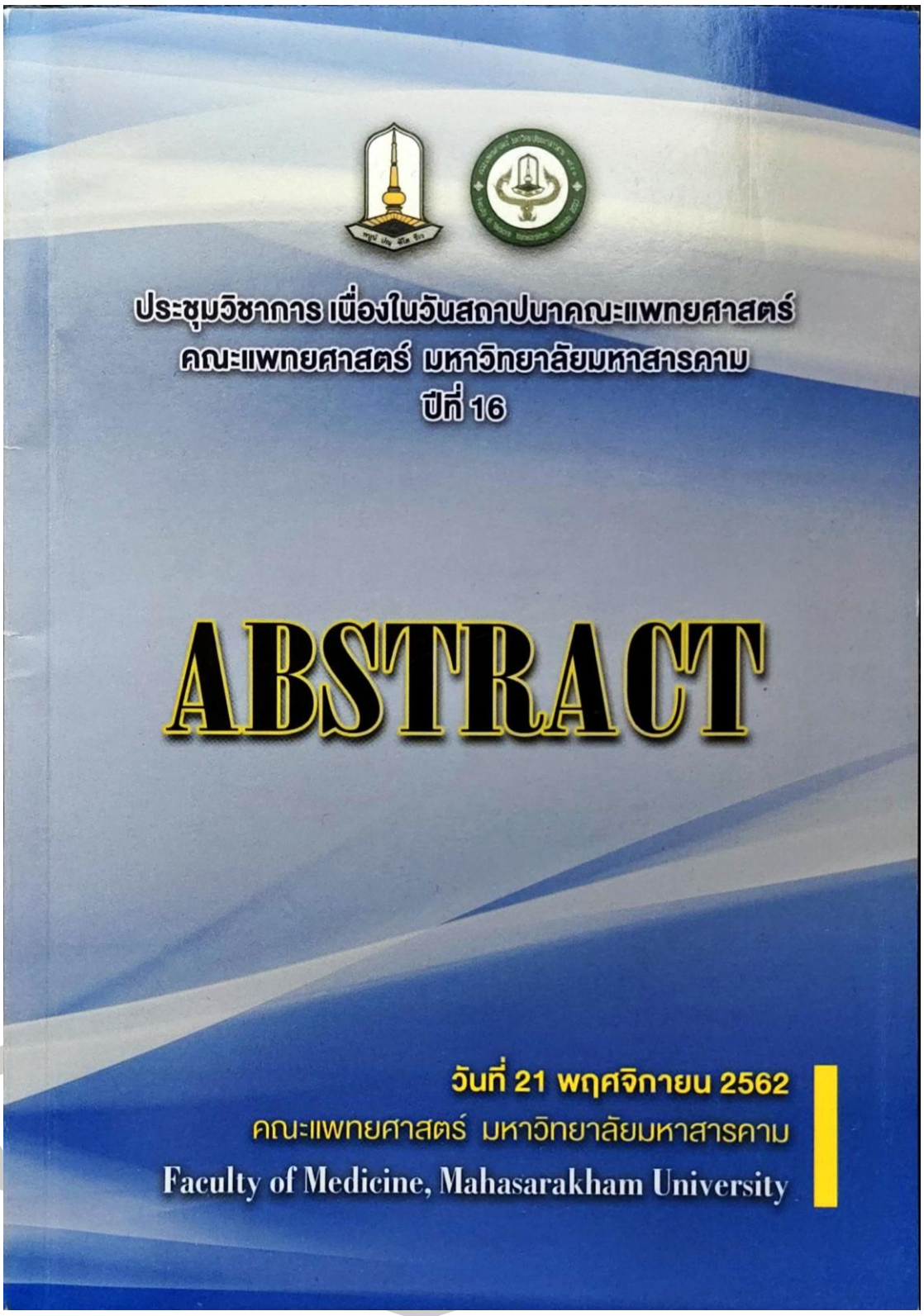
[38] Zhenhua Y, Wei Z, Fajin F, Yong Z, Wenyi K. α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Human Wellness*. 2014; 3, 136–174.

[39] Farha AK and Remani P. Phytopharmacological Profile of *Elephantopus scaber*. *Pharmacologia* 2014; 5, 272-285.

[40] Daisy P, Jasmine R, Ignacimuthu S and Murugan E. A novel steroid from *Elephantopus scaber* L. an ethnomedicinal plant with antidiabetic activity. *Phytomedicine*. 2009; 16, 252-257.

[41] Daisy P, Suveena S and Lilly VS. Molecular docking of medicinal compound Lupeol with autolysin and potential drug target of UTI. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011; 3, 557-562.

[42] Modilal MRD and Daisy P. Hypoglycemic effects of *Elephantopus scaber* in alloxan-induced diabetic rats. *Indian J. Novel Drug Delivery*. 2011; 3, 98-103.
[43] Davis SN, Granner DK. Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw Hill Professional; 2001. 1701- 7.
[44] Wagner H, Ulrich- Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009; 16, 97- 110.
[45] Zhang HY, Yan L, Research progress in anti-microbial of flavonoids, Anti Infect. *Pharm*. 2009; 6, 92–95.
[46] Zhao J, Zhou XW, Chen XB, *et al*., α-Glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*, Chem. Nat. Comp. 2009; 45, 244–246.
[47] Saranraj P, Sudhanshu SB, Ramesh CR. Traditional Foods From Tropical Root and Tuber Crops: Innovations and Challenges. *Inn Trad F*. 2019; 7, 159-191.


ประชุมวิชาการ เนื่องในวันสถาปนาคณะแพทยศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ปีที่ 16
ABSTRACT
วันที่ 21 พฤศจิกายน 2562
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Faculty of Medicine, Mahasarakham University

สารบัญ

สารจากคณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สารจากรองคณบดีฝ่ายวิจัยและประกันคุณภาพการศึกษา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สารบัญ

โครงการ "ประชุมวิชาการคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม"

กำหนดการ การนำเสนอผลงานวิชาการเนื่องในวันครบรอบวันสถาปนา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

บทคัดย่อภาคบรรยาย (Oral Presenttation)

- ผลของสารสกัดยาพิกัดตรีพิษจักรต่อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2
- **Bergenin improves antioxidative enzyme activities in sodium selenite-induced oxidative stress in mouse livers** 3
- **Fenofibrate attenuates palmitic acid (PA)-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in HepG2 cell.** 4
- **α-Mangostin ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in ICR mice** 5
- **Phytochemical screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*** 6
- ปัจจัยที่มีผลต่อการบริหารงบประมาณรายจ่ายเงินรายได้ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 7
- ปริวรรตตำรับยาสมุนไพรในคัมภีร์ยาใบลานอีสานผูกที่ 2 กรณีศึกษาคัมภีร์ยาใบลาน หมอพื้นบ้านพิมพ์ แก้ววิเศษ 8
- ภาวะสุขภาพ และคุณภาพชีวิต ของผู้ป่วยมะเร็งตับระยะสุดท้าย ที่มีภาวะท้องมานที่รับการรักษา แบบประคับประคองร่วมกับพอกเจลสมุนไพร โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสว่าง-แดนดิน จังหวัดสกลนคร 9
- การปรับปรุงคุณภาพการบริการเพื่อลดการตีตราและเลือกปฏิบัติต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวี โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 10

ตารางนำเสนอผลงานภาคบรรยาย (Oral Presentation)
วันพฤหัสบดี ที่ 21 พฤศจิกายน 2562
ณ ห้องประชุมเฉลิม วราวิทย์ ME2-0202 (ชั้น 2) อาคารศูนย์บริการทางการแพทย์และศูนย์วิจัยเฉลิมพระเกียรติ หลังที่ 2 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ลำดับที่	ชื่อ – สกุล	หัวข้อ
Oral-01	จงกลณี ธนาไสย์	ผลของสารสกัดยาพิกัดตรีพิษจักรต่อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
Oral-02	Yollada Sriset	Bergenin improves antioxidative enzyme activities in sodium selenite-induced oxidative stress in mouse livers
Oral-03	Nadta Sukkasem	Fenofibrate attenuates palmitic acid (PA)-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in HepG2 cell.
Oral-04	Nitima Tatiya-aphiradee[1]	**α-Mangostin ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in ICR mice**
Oral-05	Saithong Sombut-phoothorn	Phytochemical screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*
Oral-06	จิระกรณ์ พูนน้อย	ปัจจัยที่มีผลต่อการบริหารงบประมาณรายจ่ายเงินรายได้ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Oral-07	ปิยาภรณ์ แสนศิลา	ปริวรรตตำรับยาสมุนไพรในคัมภีร์ยาใบลานอีสานผูกที่ 2 กรณีศึกษาคัมภีร์ยาใบลาน หมอพื้นบ้านพิมพ์ แก้วิเศษ
Oral-08	พิชิต โนนตูม	ภาวะสุขภาพ และคุณภาพชีวิต ของผู้ป่วยมะเร็งตับระยะสุดท้ายที่มีภาวะท้องมานที่รับการรักษา แบบประคับประคองร่วมกับพอกเจลสมุนไพร โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสว่าง-แดนดิน จังหวัดสกลนคร
Oral-09	สายฝน ป้องชาลี	การปรับปรุงคุณภาพการบริการเพื่อลดการตีตราและเลือกปฏิบัติต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวี โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Phytochemical screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*

Saithong Sombutphoothorn[1], Ampa Konsu[1]*

[1]*Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44000, Thailand*

Introduction: Herbal medicines have been developed not only to improve ancient traditional therapeutics, but also as an alternative solution for health problems. **Objective:** The aim of this research was to determine on phytochemical screening, antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber* by using different solvent extractions. Both plants (1:1;w:w) of recipe were extracted using by different solvents including aqueous (ALE) and 80% ethanol (ELE). Phytochemical screening was determined on total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) contents in plants. The antioxidant activities were determined by, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) radical scavenging and 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ($ABTS^+$) assay. The α-glucosidase inhibitory assay was evaluated on glucose transferase mechanism. **Results:** This experimental study found that the recipe showed high-among of total phenolic and flavonoid contents especially ELE (40.024±0.952 mgGE/gExt and 0.072±0.001 mgQE/gExt,). The ELE (IC_{50}=0.082±0.0025 mg/mL) was significantly exerted on free radical scavenging activity higher than ALE (IC_{50}=0.122±0.0033 mg/mL). $ABTS^+$ radical scavenging activity, the ELE (IC_{50}=0.0048±0.00018 mg/mL) was significantly stronger than Trolox (IC_{50}=0.0086±0.00063 mg/mL), known as standard substances. α-glucosidase inhibitory activity, ALE (IC_{50}=0.022±0.001 mg/mL) and ELE (IC_{50}=0.098±0.002 mg/mL) were significantly more effect in inhibited α-glucosidase enzyme than acarbose (IC_{50}=1.054±0.113 mg/mL), known anti-diabetic drug. **Conclusion:** The recipe has been having the phenolic and flavonoid contents which chemical substances were known as anti-oxidation and anti-diabetic property, Pharmaceutical activities were showed on antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities. Further, also chemical compositions, major active compound(s) and *in vivo* were clarified in next study.

Keywords: Phytochemical screening, Phenol, Flavonoids, Antioxidant, Alpha-glucosidase.

****Corresponding author:*** Ampa Konsue/E-mail: ampa_ice@hotmail.com

INTERNATIONAL CONFERENCE ON FOOD, AGRICULTURE AND BIOTECHNOLOGY (ICoFAB) 2019

This is to certify that

Saithong Sombutphoothorn

has presented oral presentation entitled

"Phytochemical screening, Antioxidant and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from *Leersia hexandra* and *Elephantopus scaber*"

held on August 26-27, 2019, at the Faculty of Technology, Mahasarakham University, Thailand

A. Mooyngam

Assoc. Prof. Dr. Anuchita Moongngam
Dean, Faculty of Technology
Mahasarakham University

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

มอบเกียรติบัตรฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

Saithong Sombutphoothorn

ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัยโดยวาจา ชื่อเรื่อง

Phytochemical screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from Leersia hexandra and Elephantopus scaber

ในการประชุมวิชาการเนื่องในวันครบรอบวันสถาปนาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
วันที่ ๒๑ พฤศจิกายน ๒๕๖๒ ณ ห้องประชุมเฉลิม วราวิทย์
อาคารศูนย์บริการทางการแพทย์และศูนย์วิจัยเฉลิมพระเกียรติ หลังที่ ๒ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. เทพลักษ์ ศิริธนะวุฒิชัย
คณบดีคณะแพทยศาสตร์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสายทอง สมบัติภูธร
วันเกิด	28 ตุลาคม 2538
สถานที่เกิด	อำเภอเขาวง จังหวัดกาฬสินธุ์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	193 หมู่ 9 บ้านกุดบอด ตำบลสงเปลือย อำเภอเขาวง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46160
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิตปริญญาโท
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น ที่โรงเรียนพุทโธภาวนาประชาสรรค์ จังหวัดกาฬสินธุ์ พ.ศ. 2556 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ที่โรงเรียนบัวขาว จังหวัดกาฬสินธุ์ พ.ศ. 2560 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีการแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต(พท.ป.) สาขาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2563 กำลังศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพมหาบัณฑิต (วท.ม.) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) ประจำปีงบประมาณ 2563 แหล่งทุนจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ผลงานวิจัย	Phytochemical screening, Antioxidant, and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Different Solvent extracts from Leersia hexandra and Elephantopus scaber

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว