พฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.)

วิทยานิพนธ์

ของ

พรทิพย์ ปัดตาเคนัง

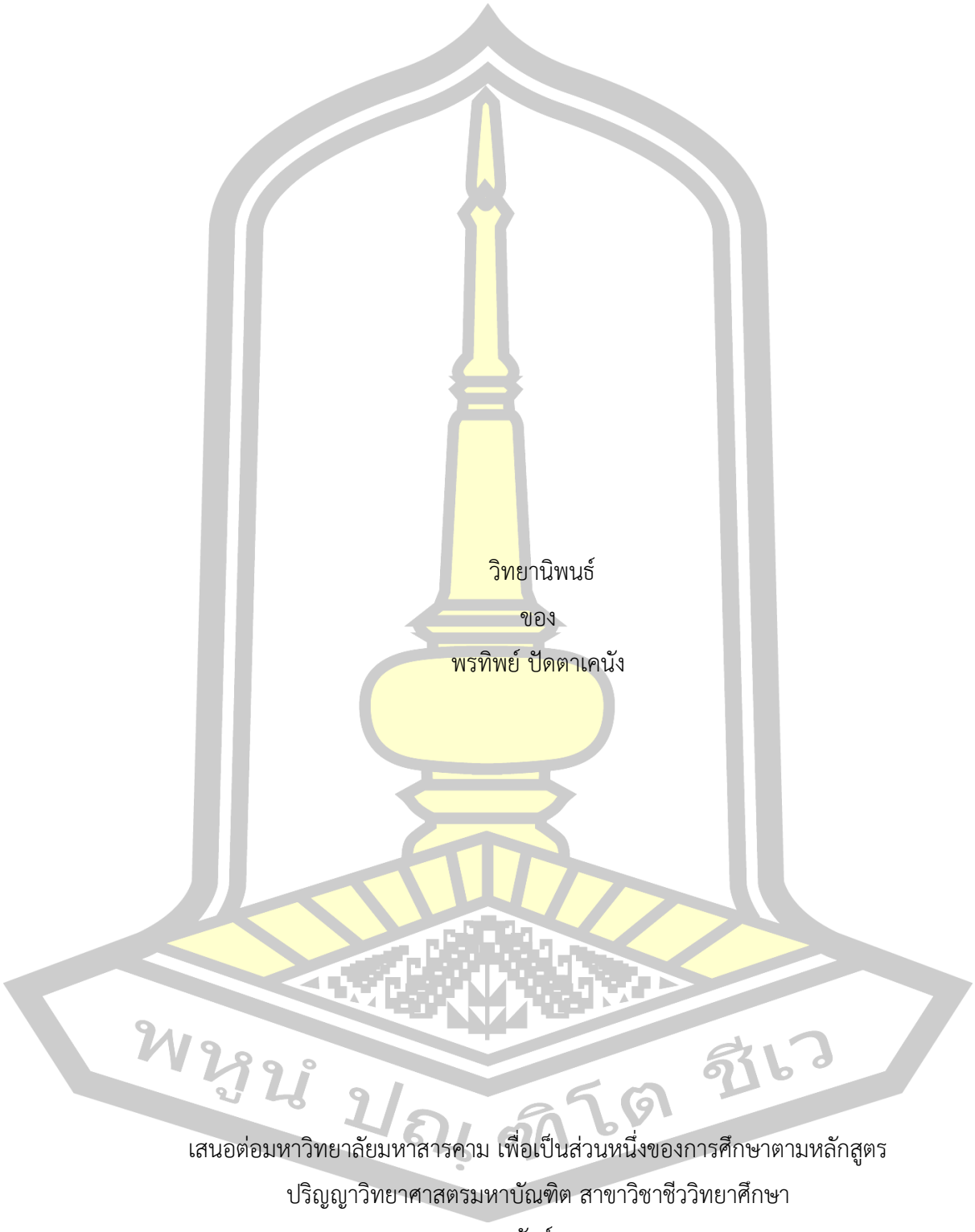
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

กุมภาพันธ์ 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.)



วิทยานิพนธ์

ของ

พรทิพย์ ปัดตาเคนัง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

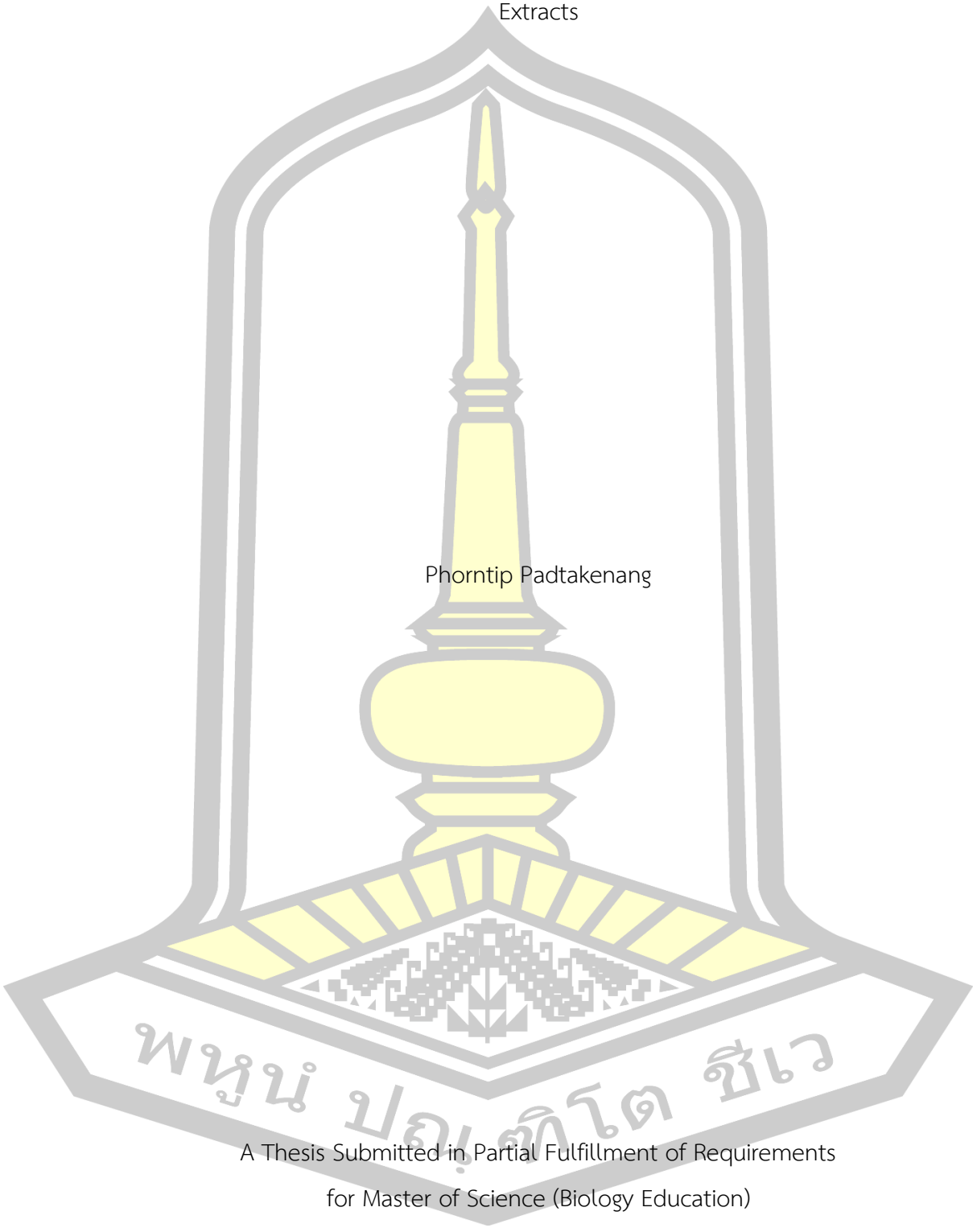
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

กุมภาพันธ์ 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Phytochemical Screening and Biological Activity of *Paederia linearis* Hook. f. Extracts

Phorntip Padtakenang



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Biology Education)

February 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวพรทิพย์ ปัดตาเคนัง แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. พักพล มุ่งลือ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. วิลาวัณย์ พร้อมพรม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. วรรณชัย ชาแท่น)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. ธีรพร กทิศาสตร์)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. มัณฑนา นครเรียบ)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง พฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook. f.)

ผู้วิจัย พรทิพย์ ปัดตาเคนัง

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิลาวัณย์ พร้อมพรม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณชัย ชาแท่น

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยาศึกษา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา จากการศึกษาพฤกษเคมีด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล พบว่า ตัวทำละลายที่สามารถพบสารพฤกษเคมี คือ เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม อะซิโตน และเฮกเซน ตามลำดับ ทุกตัวทำละลายจะตรวจพบพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์พีนอยด์ สารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวม (174.42±15.43 mgGAE.g^{-1}, $p<0.05$) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (41.32±1.94 mgQE.g^{-1} , $p<0.05$) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากลำต้นและราก สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (40.73 ± 6.68% , $p<0.05$) และวิธี FRAP assay (68.22 ± 12.1%, $p<0.05$) เมื่อเทียบกับลำต้นและราก สารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลของตดหมูตดหมาสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอะคาร์โบส (Acabose) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จากการทดสอบเบื้องต้นนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่บ่งชี้ว่าต้นตดหมูตดหมามีความเหมาะสมในการเป็นอาหารเสริมสุขภาพและด้านเภสัชวิทยาต่อไป

คำสำคัญ : ตดหมูตดหมา, สารพฤกษเคมี, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

TITLE Phytochemical Screening and Biological Activity of *Paederia l inearis* Hook. f. Extracts

AUTHOR Phorntip Padtakenang

ADVISORS Assistant Professor Wilawan Promprom , Ph.D.

Assistant Professor Wannachai Chatan , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology Education

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

The present study was performed to investigate the phytochemical screening and biological activities of *Paederia linearis* extracts from root, stem and leaf. Phytochemical studiesof the five organic sovents : hexane,acetone,chloroform,methanol and ethanol. The result showed that secondary metabolite could be found from the extracts from all solvent. Flavonoid and terpenoid were found in extracts from all solvent.The ethanolic leaf extracts had the highest total phenolic content (174.42±15.43 mgGAE.g^{-1},$p<0.05$) and flavonoids content (41.32±1.94 mgQE.g^{-1},$p<0.05$) when compared with the extracts from stem and root. Antioxidant activity in leaf extracts were highest in testing methods, i.e. DPPH free radical scavenging method (40.73 ± 6.68%,$p<0.05$) and FRAP assay (68.22 ± 12.1%,$p<0.05$), when compared with stem and root extracts. The ethanolic leaf extracts of *P. linearis* showed that it had a good α-glucosidase inhibitors when compared to the authentic drug acabose. This preliminary study results were a basic information for future examination to provide the suitable supplementary food and to use in pharmacological.

Keyword : Paederia linearis Hook. f., Phytochemical, α-glucosidase activity

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.วิลาวัณย์ พร้อมพรม และ ผศ.ดร.วรรณชัย ชาแท่น อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยตรวจสอบข้อบกพร่องต่างๆด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา พร้อมทั้งให้กำลังใจตลอดระยะเวลาทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ช่วยแนะนำแนวทาง ตรวจสอบข้อบกพร่องต่างๆด้วยความละเอียดถี่ถ้วนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ช่วยสั่งสอนให้ความรู้ และปลูกฝังให้ผู้วิจัยเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่ดีและมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาชีวิทยาศึกษาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุญสิทธิ์ ปัดตาเคนัง คุณแม่อวยชัย ปัดตาเคนัง และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณครูกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ โรงเรียนสารคามพิทยาคมทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

พรทิพย์ ปัดตาเคนัง

พหูน ปณฺ ฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ภูมิหลัง 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 สมมติฐานของการวิจัย 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 3

1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย 4

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

1.8 นิยามศัพท์เฉพาะ 5

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 6

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตดหมูตดหมา 6

2.2 วิธีการสกัดสารจากพืช 7

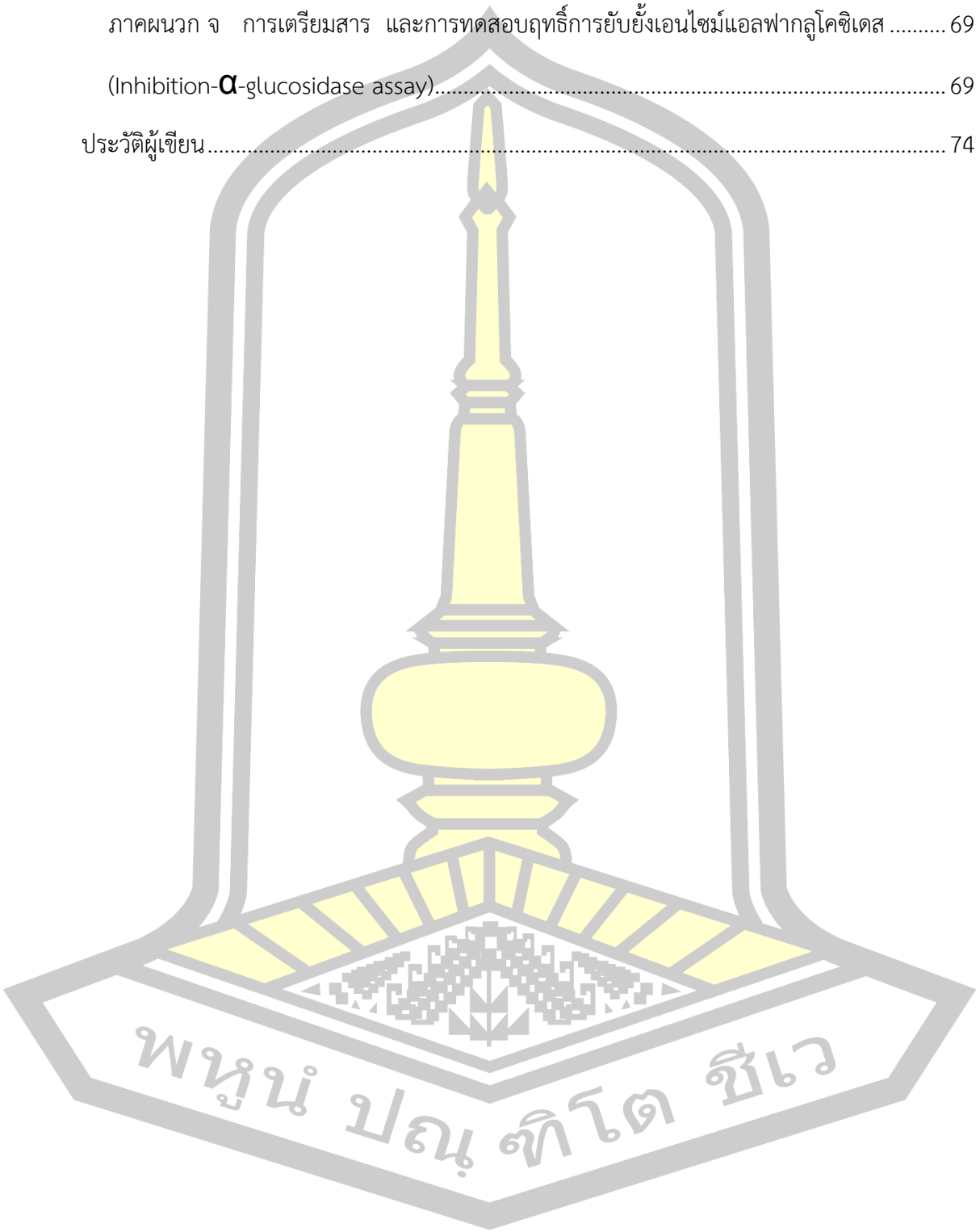
2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น 8

2.4 สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่พบในพืช 9

2.5 สารประกอบฟีนอลิก 12

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระ 13
2.8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน 15
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 22
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 22
3.2 แผนการดำเนินการวิจัย 24
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย 25
บทที่ 4 ผลการวิจัย 30
4.1 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) 30
4.2 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) 33
4.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) 34
4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH 35
4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP 36
4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-α-glucosidase assay). 37
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล 40
ข้อเสนอแนะ 41
บรรณานุกรม 42
ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) 48
ภาคผนวก ข การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) 54
ภาคผนวก ค 60
การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH 60

ภาคผนวก ง การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP 65
ภาคผนวก จ การเตรียมสาร และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 69
(Inhibition-α-glucosidase assay)..... 69
ประวัติผู้เขียน..... 74



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย 4

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบตดหมูตดหมา 32

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา 35

ตารางที่ 4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ(% DPPH free radical inhibition) ของสารมาตรฐานวิตามินซี 35

ตารางที่ 5 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% FRAP free radical inhibition) ของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 36

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาด้วยวิธี DPPH assay และวิธี FRAP 37

ตารางที่ 7 ร้อยละฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (% **α**-glucosidase inhibition) ของสารมาตรฐานอะคาร์โบส 38

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธี *p*-nitrophenol colorimetric 39

ตารางที่ 9 ปริมาณการเตรียมความเข้มข้นของกรดแกลลิก (Gallic acid) 49

ตารางที่ 10 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 50

ตารางที่ 11 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา 51

ตารางที่ 12 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา 51

ตารางที่ 13 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดใบของตดหมูตดหมา 51

ตารางที่ 14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา 53

ตารางที่ 15 ปริมาณสานประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา 53

ตารางที่ 16 ปริมาณสานประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา 53

ตารางที่ 17 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) 56

ตารางที่ 18 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา 57
ตารางที่ 19 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา 57
ตารางที่ 20 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา 57
ตารางที่ 21 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา 59
ตารางที่ 22 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา 59
ตารางที่ 23 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา 59
ตารางที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน วิตามินซี (Ascorbic acid) 62
ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ตดหมูตดหมา 63
ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้น ตดหมูตดหมา 63
ตารางที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ ตดหมูตดหมา 64
ตารางที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 67
ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ตดหมูตดหมา 67
ตารางที่ 30 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้น ตดหมูตดหมา 68
ตารางที่ 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ ตดหมูตดหมา 68
ตารางที่ 32 การเตรียมสารละลาย และสารมาตรฐาน 70
ตารางที่ 33 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารอะคาร์โบส 72

ตารางที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา 72

ตารางที่ 35 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา 73

ตารางที่ 36 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา 73

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) 7
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มแอลคาลอยด์ 9
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ 10
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มแทนนิน 10
ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มสเตียรอยด์ 11
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ 11
ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH 14
ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 16
ภาพที่ 9 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย 24
ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 33
ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) 34
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานเกรดแกลลิก (Gallic acid) 50
ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) 56

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

พืชสกุล *Paederia* เป็นไม้พุ่มหรือไม้เลื้อย พบในเอเชียเขตร้อน มีประมาณ 16 ชนิด ในประเทศไทยพบ 10 ชนิด เป็นวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าตดหมา (*P. pilifera)* ตดหมูตดหมา *(P. linearis)* พบได้ในภาคเหนือ ส่วนพังโหม (*P. foetida*) พบได้ในภาคใต้ และพาโหมสองสี (*P. lanuginosa)* เป็นพืชหายาก พบที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก และกาญจนบุรี พืชสกุลนี้ส่วนของใบและลำต้นจะมีกลิ่นฉุนมาก เนื่องจากมีการปลดปล่อยสารประกอบกำมะถัน กลิ่นฉุนมากหรือน้อยจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ลักษณะทั่วไปของพืชสกุลนี้ คือ ใบออกตรงข้าม บริเวณก้านใบมีหูใบไม่ชัดเจน ก้านช่อดอกสั้น ดอกมีกลีบดอก 4-5 กลีบกลีบดอกสั้น มักมีสีขาว สีชมพู สีม่วงเข้ม หรือสีน้ำตาลอ่อน กลางบริเวณหลอดฐานของดอกมีขนเล็กนุ่มสีขาว มีเกสรตัวเมียที่มีแทรกแทรกอยู่ในหลอด มีรังไข่ 2 เซลล์ ในช่องรังไข่มีเส้นใยสีขาว 2 เส้น ผลแห้งกลมหรือรูปไข่ มีปีกบีบอัดด้านข้าง ภายในมีเมล็ด 2 เมล็ด (Puff, 2007)

Paederia linearis Hook. f. มีชื่อท้องถิ่น ว่า ตดหมูตดหมา จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้เถาขนาดเล็กขึ้นตามธรรมชาติ เลื้อยตามพื้นดิน หรือเกี่ยวพันต้นไม้อื่น ลำต้นมีความยาว 9 เมตร ใบรูปแถบ ยาว 35-170 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร โคนใบโค้งมนเล็กน้อย บางครั้งเป็นรูปหัวใจ ใบที่มีอายุมากค่อนข้างกว้าง ส่วนใบอ่อนจะเป็นรูปแถบหรือหอก ขอบใบเรียบ ใบมีขนเล็กน้อย ก้านใบ ยาว 4-15 มิลลิเมตร มีหูใบลักษณะสามเหลี่ยม ยาว 1-3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงรูปไข่ยาวประมาณ 0.8-1.4 มิลลิเมตร มีขนดกสั้นปกคลุม ก้านช่อดอกยาว 7-25 มิลลิเมตร ดอกเป็นหลอดยาว ยาว 7-14 มิลลิเมตร แฉกกลีบดอกยาว 1-2.5 มิลลิเมตร ดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ ก้านเกสรเพศเมียยาว 7-14 มิลลิเมตร มีผลค่อนข้างกลมหรือไข่ มีปีกบีบอัดออกด้านข้างปีก ยาว 0.6-1.6 มิลลิเมตร มีเมล็ดสีดำ (Puff, 2007) สรรพคุณของตดหมูตดหมาตามตำราสมุนไพรพื้นบ้าน คือ ใบ ใช้แก้ท้องเสีย แก้ตัวร้อน แก้ปวดฟัน ถอนพิษงู แก้ไข้ตัวร้อน แก้ปวดศีรษะ เป็นยาระบายอ่อนๆ ขับพยาธิไส้เดือน และเป็นยาอายุวัฒนะ ส่วนเถา แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ไข้ ดอก ใช้ขับน้ำนม ผล ใช้แก้ไข้จับสั่น แก้ริดสีดวงทวาร ส่วนรากใช้ต้มกับน้ำดื่มแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2543) นอกจากสรรพคุณตามตำราหมอพื้นบ้านที่กล่าวข้างต้นแล้วก่อนหน้านี้มีรายงานถึงพฤกษเคมีของพืชสกุล *Paederia* เช่น *P. foetida* เมื่อนำสารสกัดจากใบไปตรวจสอบสารพฤกษเคมี พบสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ไตรเทอร์ปีนอยด์ (*triterpenoids*) สเตอรอล (sterols) อัลคาลอยด์ (alkaloid) และไกลโคไซด์ (Glycoside) (Silpi et

al., 2014) *P. linearis* Hook. f. เมื่อนำส่วนของรากที่สกัดด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล ไปตรวจสอบสารพฤกษเคมี พบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟีนอลิก (phenolic) และแทนนิน (tannin) (Sudta et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและสมบัติทางเคมีของพืชสกุล *Paederia* เช่น สารสกัดจากใบ *P. foetida* ที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน (Salehin et al., 2011) เมื่อนำไปทดสอบกับหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร alloxan ความเครียดจากการออกซิเดชั่นของไตและการเกิดปฏิกิริยา renoinflammatory NF-kB พบว่า สารสกัดจากใบ *P. foetida* ช่วยลดความเครียดจากการออกซิเดชั่นและยับยั้งการอักเสบของไตในผู้ป่วยโรคเบาหวานในช่วงต้น (Borgohain et al., 2017) และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (Kanokporn et al., 2014) สารสกัดจากราก *P. pilifera* มีผลกระทบต่อการลดลงของเยื่อเมือกในกระเพาะอาหารที่เกิดแผลในหนูทดลอง เช่นเดียวกับยา omeprazole ทำให้ไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และยังทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ catalase (CAT) superoxide dismutase (SOD) และกลูตาไธโอน (GSH) ซึ่งคุณสมบัติของ cytoprotective และ antioxidant อาจเกิดจากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดจากรากของ *P. linearis* Hook. f. แบบสดและรากที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนเมื่อทดสอบคุณสมบัติทางเคมีร่วมกับผลต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะให้ความร้อนของแป้งข้าวเหนียว กข6 และลักษณะเนื้อสัมผัสของแป้งข้าวเหนียว กข6 พบว่า มีผลต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวเหนียว กข6 โดยน้ำจากรากของ *P. linearis* แบบสดและที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนที่ความเข้มข้น 10% (w/v) ทำให้แป้งข้าวเหนียว กข6 ขณะให้ความร้อนมีความยืดหยุ่นสูง (ภริตา สำเภาทอง และอังคณา จันทรพลพันธ์, 2561) และเมื่อนำสารสกัดจากรากของ *P. linearis* ไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ในหลอดทดลอง พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ Vero (% cell growth> 50%) โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง cytotoxic กับเซลล์ NCI-H187 ที่มีค่าการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ 60.20% ดังนั้น จึงคาดว่า *P. linearis* Hook. f. สามารถใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระที่ปลอดภัยได้ (Sudta et al., 2013)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านภาวะการเป็นเบาหวาน ด้วยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส แต่ยังไม่พบข้อมูลรายงานการวิจัย ดังนั้น ผู้วิจัยจึง สนใจศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟาวโวนอยด์รวม และฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส จากสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ที่ได้จากบ้านท่าขอนยาง บริเวณหนองตีนบ้าน หมู่ที่ 3 ตำบลท่านขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านสารออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพ และเป็นแนวทางนำส่วนต่างๆของตดหมูตดหมามาใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชวิทยาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา จากตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล

1.2.2 เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยเอทานอล

1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยเอทานอล

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 พบสารในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

1.3.2 สารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมามีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 พืชที่ใช้สำหรับการวิจัยครั้งนี้ คือ ราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่ได้จาก บ้านท่าขอนยาง บริเวณหนองตีนบ้าน หมู่ที่ 3 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

1.4.2 ตัวทำละลายที่ใช้สกัด คือ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ เอทานอล

1.4.3 ตัวแปรต้น ได้แก่ ราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

1.4.4 ตัวแปรต้นตาม ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

1.4.5 ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาในเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2560

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึง เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2561

ตารางที่ 1 ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

กิจกรรม	ระยะเวลา ตุลาคม 2560 ถึง ธันวาคม 2561				
	ต.ค.-ธ.ค 2560	ม.ค.-เม.ย. 2561	พ.ค.-ส.ค 2561	ก.ย.-พ.ย. 2561	ธ.ค. 2561
1. ศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเตรียมสารสกัดจากราก ลำต้นและใบของตดหมูตดหมา	⟷				
2. ดำเนินการตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดราก ลำต้นและใบของตดหมูตดหมา		⟷			
3. วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง			⟷		
4. สรุปผล เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์และส่งผลงานตีพิมพ์				⟷	
5. เสนอผลงานวิทยานิพนธ์					⟷

1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1.6.1 ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา SC1-309 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ได้ทราบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดของสารสกัดจากราก ลำต้นและใบของตดหมูตดหมา

1.7.2 ได้ทราบปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

1.7.3 ได้ทราบฤทธิ์ทางชีภาพ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

1.7.4 สามารถนำสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมามาใช้ประโยชน์ทางเภสัชเวทเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด

1.8 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.8.1 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น คือ การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอลโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (color reaction) หรือการเกิดตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญ เช่น แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

1.8.2 ปริมาณฟีนอลิกรวม คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดของตัวอย่างที่สนใจโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetry

1.8.3 ปริมาณฟาวโวนอยด์รวม คือ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่สนใจโดยใช้วิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetry

1.8.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ คือ ความสามารถในการต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

1.8.4.1 วิธี DPPH assay free radical scavenging activity คือ วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้อนุมูลอิสระที่เรียกว่า DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

1.8.4.2 วิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay คือ การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method

1.8.5 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส คือ ความสามารถในการยับยั้งการการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคสิเดส โดยใช้วิธี *p* -nitrophenol colorimetry

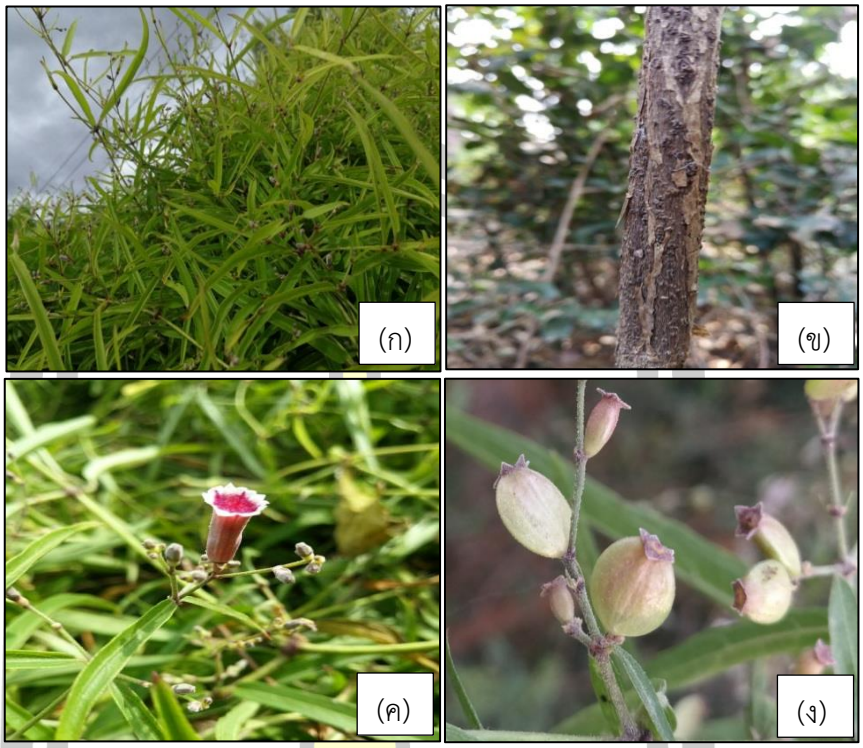
พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตดหมูตดหมา

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Paederia linearis* Hook. f.
ชื่อวงศ์	Rubiaceae
ชื่อพื้นเมือง	ตำยานตัวผู้, เครือตดหมา (นครราชสีมา); ตดหมูตดหมา (ภาคกลาง, ตาก); พังโหม (ภาคกลาง); ย่านพาโหม (ภาคใต้); หญ้าตดหมา (ภาคเหนือ)
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
ลักษณะวิสัย	ไม้พุ่ม หรือไม้เลื้อย ลำต้นยาวประมาณ 9 เมตร
ใบ	ใบเป็นใบเดี่ยว รูปหอกหรือแถบ ยาว 35-170 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร ใบออกตรงข้าม ก้านใบยาว 4-15 มิลลิเมตร บริเวณก้านใบมีหูใบรูปสามเหลี่ยมยาว1-3 มิลลิเมตร โคนใบโค้งมนเล็กน้อย บางครั้งเป็นรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ใบมีขนเล็กน้อย
ช่อดอก	มีดอกย่อยจำนวนน้อย กลีบดอกเป็นหลอดยาว 7-14 มิลลิเมตร ออกตามง่ามใบ ก้านช่อดอกยาว 7-25 มิลลิเมตร แฉกกลีบดอกยาว 1-2.5 มิลลิเมตร กลีบดอกสีชมพูจำนวน 5 กลีบ ก้านเกสรเพศเมีย ยาว 7-14 มิลลิเมตร
ผล	ผลค่อนข้างกลมหรือไข่ มีปีกบีบอัดออกด้านข้าง
เมล็ด	เมล็ดสีดำ 2 เมล็ด
แหล่งที่พบ	พบในเอเชียเขตร้อน
สภาพแวดล้อม	ชอบแสงแดดจัด ดินร่วนซุย พบขึ้นตามที่โล่งแจ้ง
ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร	ยอดอ่อน และใบอ่อนรับประทานเป็นผักสด ต้มหรือลวกรับประทานเป็นผักกับน้ำพริก น้ำจากรากนำไปตำกับข้าวเหนียวนึ่งเพื่อทำข้าวพอง (ข้าวโป่ง)
การขยายพันธุ์	ใช้เมล็ด

(Puff, 2007 และ นันทวัน บุณยะประภัศร, 2543)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) ประกอบด้วย (ก) กิ่งและใบ (ข) ลำต้น (ค) ดอกและช่อดอก (ง) ผล (ที่มา : พรทิพย์ ปัดตาเคนัง, วันที่ 7 ตุลาคม 2560)

2.2 วิธีการสกัดสารจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนความร้อนและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้แต่ละวิธีจะมีข้อจำกัดแตกต่างกัน (วรพร ศีลศร, 2554) ได้แก่

2.2.1 การหมัก (maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดรูปชมพู่ ขวดปากกว้าง หรือโถที่ปิดสนิท ทิ้งไว้ 5-7 วัน หมั่นเขย่าและคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรอง อาจสกัดซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ได้สารสกัดทั้งหมด ข้อดีของวิธีนี้สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่เปลืองสารละลายมาก

2.2.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extractor) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป กลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุตัวอย่างพืชไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน Flask ด้วยวิธีกาลักน้ำ Flask ได้รับความร้อน ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ใน Flask ตัวทำละลาย

เมื่อกระทบ Condenser จะวนเวียนมาสกัดใหม่จบเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ วิธีการสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนอาจทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไป

2.2.3 การแช่สกัดต่อเนื่อง (percolation) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือ Percolation นำตัวอย่างพืชมาหมักกับสารละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆบรรจุตัวอย่างพืชทีละน้อยเป็นชั้นลงใน Percolation เติมตัวทำละลายลงไปให้ตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยการเติมตัวทำละลายเหนือตัวอย่างพืชอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรอง

2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้จะมีปริมาตรมาก และเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมาทำให้เข้มข้นก่อน (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544) ซึ่งอาจทำได้หลายวิธีดังนี้

2.3.1 การแช่แข็ง (freezing) ถ้าเป็นการสกัดด้วยน้ำ วิธีเหมาะสมคือ วิธีแช่แข็งโดยใช้ lyophilizer หรือ Freeze Dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งแยกได้จาก concentrated extract โดย centrifuge วิธีนี้เหมาะสมกับสารที่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน

2.3.2 การระเหย (free evaporation) คือ การระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ หรือ hot plate บางครั้งอาจเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ละเหยได้เร็วขึ้น

2.3.3 อัลตราฟิลเทรชัน (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้น โดยใช้แผ่นเมมเบรน ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 เป็นต้น

2.3.4 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) เป็นวิธีระเหยแห้งโดยกลั้นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporation ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ Distillation flask, condenser และ receiving flask โดย distillation flask จะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ

2.4 สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่พบในพืช

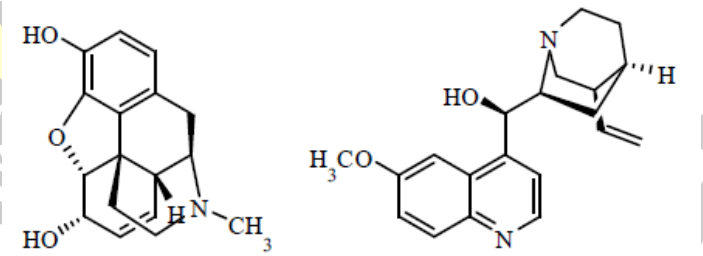
สารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (biosynthesis origin) ของสารเคมีเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

2.4.1 สารปฐมภูมิ (primary metabolites) เป็นสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยทั่วไปพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมที่จำเป็น (essential metabolism) ของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด สารปฐมภูมิ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ไขมัน (lipid) โปรตีน กรดอะมิโน และเอนไซม์ (enzymes)

2.4.2 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เชื่อว่าสารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช สารเหล่านี้มักแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสารทุติยภูมิยังเกี่ยวข้องในวงจรเมตาลิซึมพื้นฐานของเซลล์สิ่งมีชีวิต (นงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง, 2559) สารทุติยภูมิที่พบพืชแต่ละชนิด ตัวอย่าง เช่น

2.4.2.1 แอลคาลอยด์ (alkaloid)

แอลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นด่าง และมีไนโตรเจน (nitrogen) เป็นส่วนประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล สารประเภทนี้จะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ ตัวอย่างเช่น reserpine ในรากระย่อม สรรพคุณลดความดันเลือด สาร Quinine ในเปลือกต้นซิงโคนา (cinchona) มีสรรพคุณรักษาโรคมาเลเรีย และสาร morphine ในยางของผลฝิ่น มีสรรพคุณระงับอาการปวด เป็นต้น



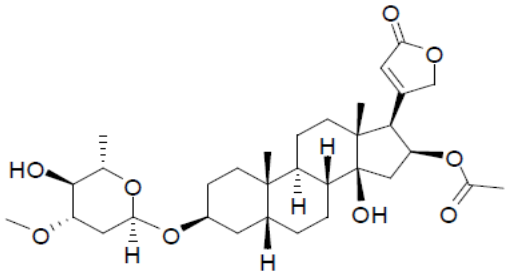
Morphine Quinine

ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มแอลคาลอยด์

พหุน ปณฺ ฑิโต

2.4.2.2 คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)

คาร์ดิแอคไกลโคไซด์เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย (Congestive heart failure)ผลในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ Aglycone และชนิด (และจำนวน) ของน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะช่วยให้ไกลโคไซด์ละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น มีการนำ มาใช้ในการรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติ ตัวอย่างเช่น Oleandrin

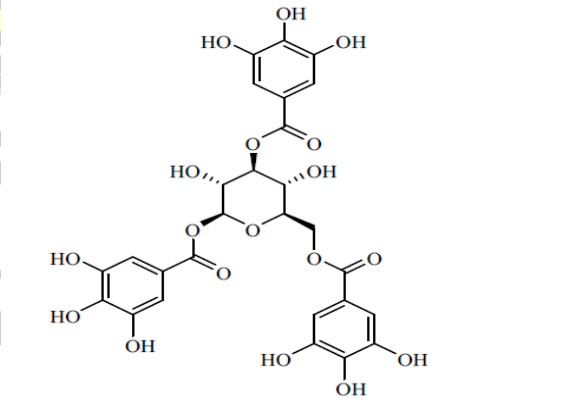


Oleandrin

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

2.4.2.3 แทนนิน (tannin)

แทนนินพบในพืช มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด เมื่อรวมกับโปรตีนจะให้สารที่ไม่ละลายน้ำใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ถ้ารับประทานเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง เมื่อทาผิวหรือเยื่อบุอ่อนที่เป็นโรค หรือได้รับอันตราย แทนนินจะสร้างฟิล์มปกคลุม ทำให้ผิวไม่ไวต่อความรู้สึกเจ็บปวด จะหยุดการหลั่งสารและทำให้หายคัน (อุดมเดชา พลเยี่ยม, 2556)

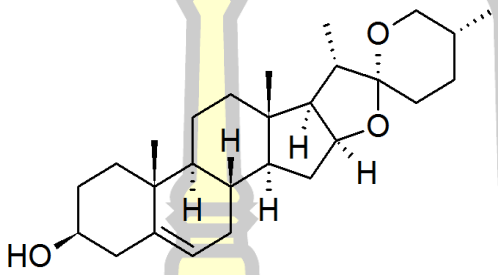


Tannin

ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มแทนนิน

2.4.2.4 สเตียรอยด์ (steroids)

สเตียรอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentano perhydro Phenanthrene nucleus นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ รักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิดหลายชนิด เช่น diosgenin เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิด (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544b)

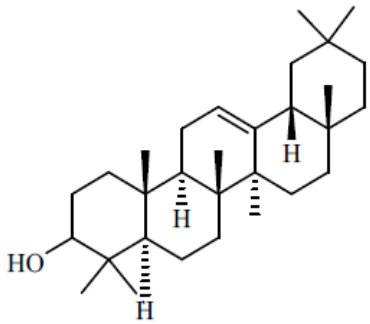


Diosgenin

ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มสเตียรอยด์

2.4.2.5 เทอร์พีนอยด์ (terpenoid)

เทอร์พีนอยด์หรือเทอร์พีน (Terpene) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดที่ในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง diterpenes พบในสัตว์ทะเลจำพวกฟองน้ำ triterpenes มักพบในรูปของ cardiac glycosides, saponin และ phytosterol ตัวอย่างเช่น β -amyrin พบในพืชแทบทุกชนิดเป็นต้น



β-amyrin

ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีนอยด์

2.5 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืช มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง จำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) คือ สารที่มีสูตรโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป

ปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกได้รับความสนใจในฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagenic activity) ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่างๆโดยเฉพาะ โรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็งโดยสารประกอบฟีนอลิก จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้วจะกลายเป็นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลซึ่งค่อนข้างเสถียร ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วยจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ผล และใบ (รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์, 2555)

2.6 สารประกอบฟลาโวนอยด์

เป็นสารประกอบฟินอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบ flavonoids ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ช่วยให้เม็ดเลือดไม่จับตัวเป็นก้อนจนอุดตัน ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นสารต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอาการแพ้ ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ แต่สิ่งที่น่าสนใจมากที่สุดคือคุณสมบัติในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์

โดยสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มีความสามารถในการลดการเกิดอนุมูลอิสระ หรือหากเกิด มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นแล้วฟลาโวนอยด์ก็สามารถกำจัดได้ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระ

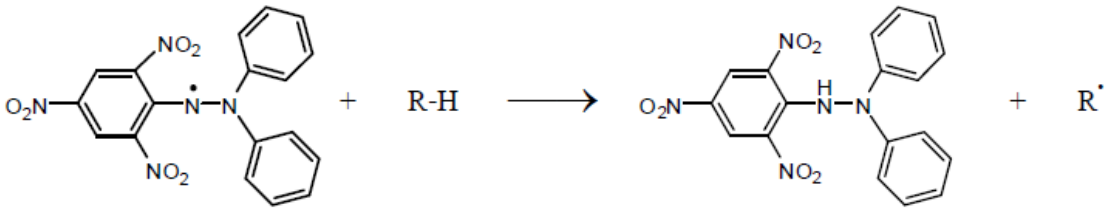
สารอนุมูลอิสระ (Free radicals) หรือ Reactive Oxygen Species (ROS) เป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆภายในร่างกายเพื่อให้สารอนุมูลอิสระนั้นมีความเสถียรมากขึ้น แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในตัวคน มี 2 แหล่ง คือ จากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหารการหายใจ การออกกาลังกาย และจากแหล่งภายนอกร่างกายที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ความเครียด การติดเชื้อ เป็นต้น อนุมูลอิสระมีหลายชนิด โดยชนิดที่สำคัญได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ไฮดรอกซิลแรดดิเคิล (Hydroxyl radical) เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจึงเกิดการทำลายโมเลกุลอื่นๆต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตาและผิวพรรณ รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกายมีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระโดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Catalase และ Glutathione peroxidase เป็นต้น แต่การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้นร่างกายจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกด้วยเช่นกัน สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidants) ที่รู้จักกันดี ได้แก่วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน วิตามินเอ และพฤกษแคมีต่างๆ เช่น โพลีฟีนอล และ ไอโซฟลาโวน นอกจากนี้ยังมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในเภสัชภัณฑ์ และส่วนประกอบอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สารกันบูดในอาหาร และเครื่องสำอางอีกด้วย (วรพร ศีลศร, 2554)

วิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay) มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายวิธี แต่ในที่นี้ขอกล่าวถึง 3 วิธี ได้แก่

วิธี DPPH assay free radical scavenging activity

เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้อนุมูลอิสระที่เรียกว่า DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ สารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงและจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้เปลี่ยนจากสารละลาย

สีม่วงเป็นสารละลายสีเหลืองและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังสมการ (จินดาพร คงเดช, 2551)



DPPH (สีม่วง) สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH-H (สีเหลือง)

ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ สารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (DPPH) ในระยะเวลาที่กำหนด ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทเมตรี ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูล อิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มข้นของสารละลาย สีม่วงก็จะลดลง ซึ่งอาจจะรายงานผลทดลองเป็นค่า Fifty percent inhibition concentration (IC50) ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ ในการรายงานค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างเป็น IC50 ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง โดยคำนวณ % Radical scavenging

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยากับ Free radical DPPH (% scavenging effect) ดังสมการ

$$\% \text{ Radical Scavenging} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

เมื่อ Acontrol = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

Asample = ค่าดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

DPPH assay เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ให้ความถูกต้องและมี Reproductivity สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ Antioxidant activity ของเลือดได้ เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

วิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay

FRAP assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked Colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe^{2+}-TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จึงสามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+}ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือเฟอรัสซัลเฟต

วิธี ABTS radical cation decolorization assay

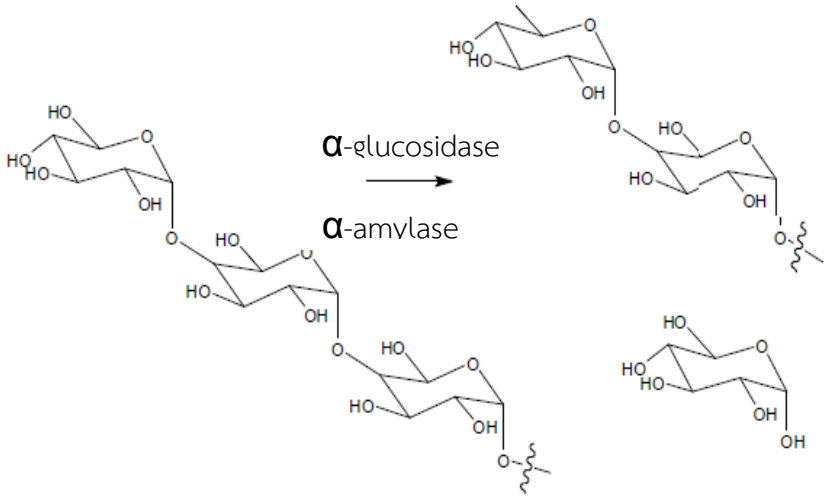
เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะหที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรเนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไวเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างซึ่งได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยวิธีการ คำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox เช่นเดียวกับวิธี $DPPH^{\bullet}$ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิด เป็นอนุมูลอิสระ

$$ABTS^{\bullet+} + AH\ (antioxidant) \longrightarrow ABTS\ (สีจางลง) + A^{\bullet}$$

2.8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน

กระบวนการเกิดโรคเบาหวานนั้นเกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการย่อยแป้ง ให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ กระบวนการเปลี่ยนแปลงข้างต้นจะเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้สามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์

ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นถ้ามีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ก็จะช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ (วิมลพรรณ รุ่งพรหม และคณะ, 2552)



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน ของสารที่สกัดได้จากสมุนไพรนั้น จะใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อติดตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ดังปฏิกิริยา *p*-nitrophenyl-α-*D*-glucopyranoside (PNP-G) เป็นสารละลายไม่มีสี ทำหน้าที่เป็นซับสเตรตในปฏิกิริยา เมื่อมีเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายใสสีเหลือง และน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที่ 8 ซึ่งสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงมากแสดงว่าไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน, 2554) ยาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสในปัจจุบัน ได้แก่ acarbose, miglitol และ vogilbose เป็นต้น แต่พบว่ายาเหล่านี้อาจมีผลต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานทำให้มีอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วง จึงได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคเบาหวานมากขึ้นในปัจจุบัน

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 งานวิจัยในประเทศ

สุนันท์ และอรุณรัตน์ (2553) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและรากกระพังโหม (*P. foetida*) โดยศึกษาผลของวิธีทำแห้งและชนิดของตัวทำละลายที่มีต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและรากกระพังโหม ตัวอย่างใบและรากกระพังโหมที่ผ่านการทำแห้งต่างกัน คือ ผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และทำแห้งแบบเยือกแข็ง ตัวอย่างแห้งถูกสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน คือ น้ำ และสารละลาย 70% เอทานอล ผลการวิจัย พบว่า สารสกัดจากใบกระพังโหมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากรากกระพังโหม สารสกัดด้วย 70 % เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และกระพังโหมที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างที่ทำแห้งด้วยวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดของใบกระพังโหมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.877 และ 0.962 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดรากกระพังโหมมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมากกับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน โดยมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.988 จากผลการวิจัยจึงสรุปได้ว่า วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างใบและรากกระพังโหม และการสกัดด้วยสารละลาย 70 % เอทานอล ทำให้ได้สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

พงษ์ฤทธิ์ และคณะ (2560) ศึกษาพืชผักพื้นบ้านของไทยมีความหลากหลายแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ แต่การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการและสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักพื้นบ้านยังมีน้อยมาก การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของพืชกินได้ในพื้นที่ชีวมณฑลสะแกราชและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จะช่วยเพิ่มองค์ความรู้ของพืชเหล่านี้ให้มีมากยิ่งขึ้น งานวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบพืชกินได้จำนวน 5 ชนิด คือ เครืองูเห่า ใบลิ้นกวาง ตดหมูตดหมา ผักสาบ และใบส้มลม ซึ่งส่วนใหญ่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการรับประทานเป็นผักสด ผลการศึกษาพบว่า เครืองูเห่า มีคุณค่าทางโภชนาการสูงในด้านของพลังงาน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และใยอาหาร ใบตดหมูตดหมา มีปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสสูง ส่วนใบลิ้นกวาง และผักอีนูน มีปริมาณวิตามินเอ และบี 2 สูงกว่าพืชกินได้ชนิดอื่นๆ ที่ศึกษาแต่ยังมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชผักต่างๆ ส้มลมมีปริมาณไขมันสูงใกล้เคียงกับเครืองูเห่า แต่มีธาตุเหล็ก และวิตามินบี 1 สูงกว่าพืชกินได้อื่นๆ ที่ศึกษา นอกจากนี้ วิตามินบี 1 ที่พบในส้มลม รวมไปถึงในเครืองูเห่า และใบลิ้นกวางนั้นมีปริมาณต่อสัดส่วนที่กินได้ สูงเกินกว่าปริมาณที่แนะนาให้บริโภคต่อวัน จาก Thai RDI ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพืชกินได้ พบว่า ใบลิ้นกวาง

มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และพบว่าลิ้นกวางยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าพืชกินได้ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้

ภริตา และอังคณา (2561) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรากกระพังโหม (*P. linearis* Hook. f.) แบบสดและรากกระพังโหมที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนร่วมกับผลของรากกระพังโหมต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะให้ความร้อนของแป้งข้าวเหนียว กข6 และลักษณะเนื้อสัมผัสของแป้งข้าวเหนียว กข6 ผลการทดลองพบว่า ปริมาณความชื้น ไขมัน เถ้า น้ำตาลรีดิวซ์ สารประกอบฟีนอลลิก และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS ของรากกระพังโหมสดมีค่าเป็น 70.05%, 0.07%, 3.22%, 34.81 mg/g, 0.58 mg GAE/g, 18.09%, 13.57% ตามลำดับ ขณะที่ของรากกระพังโหมที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนมีค่าเป็น 6.48%, 0.48%, 8.08%, 58.45 mg/g, 0.59 mg GAE/g, 22.729%, 17.30% ตามลำดับ น้ำรากกระพังโหมสดและรากกระพังโหม ที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนที่ความเข้มข้น 10% (w/v) มีผลต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวเหนียว กข6 โดยทำให้แป้งข้าวเหนียว กข6 ขณะให้ความร้อนมีความยืดหยุ่นสูง

2.9.2 งานวิจัยต่างประเทศ

Salehin et al. (2011) ศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูด้วยสารสกัดจากใบ *Madhuca indica* และลำต้นของ *P. foetida* พบว่า เมื่อนำสารสกัดจากใบ *Madhuca indica* และลำต้นของ *P. foetida* ที่สกัดด้วยเมทานอล และเมื่อให้หนูที่ระดับปริมาณ 50, 100, 250 และ 500 mg / kg ผลปรากฏว่าระดับกลูโคสในเลือดลดลง 22.2, 25.8 และ 36.3% ตามลำดับที่ระดับ 100, 250 และสารสกัด 500 mg / kg น้ำหนักตัว ในทางตรงกันข้ามยาลดความอ้วนแบบมาตรฐาน glibenclamide ลดลงระดับกลูโคสในเลือดลดลง 35.9% ซึ่งใกล้เคียงกับที่ได้รับมากที่สุดสารสกัดใบ *Madhuca indica* สารสกัดจากลำต้นของ *P. foetida* ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ใช้ คือ 50, 100, 250 และ 500 mg / kg น้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ใส่กลูโคสลดลง 7.7, 25.3, 31.0 และ 31.2 ตามลำดับ

Rajesh et al. (2013) ศึกษาองค์ประกอบพฤกษเคมี การออกฤทธิ์และการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาจาก *P. foetida* (Skunk vine) เป็นพืชพื้นเมืองที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีความหลากหลายของการใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการรักษาอาการเจ็บป่วยโรคตับ โรคไขข้ออักเสบ ท้องผูก เบาหวาน ไอ หอบหืดแผล ปวดท้อง ท้องร่วง ปวดฟัน มะเร็ง ท้องอืดท้องเฟ้อ และอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย จากการศึกษาพฤกษเคมีพบว่ามี สารแอสปรูโลไซด์ สารประกอบฟีนอลิก แอลคาลอยด์ น้ำมันระเหย สเตียรอยด์ แทนนิน ไตรเทอร์พีนอยด์ และพบว่ามี anti-ulcer, anti-diarrheal, antihyperglycemic, antioxidant, antitussive, anthelmintic ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

P. foetida มีสารประกอบทุติยภูมิชนิดต่างๆที่มีลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยมีผลทางเภสัชวิทยาแตกต่างกัน

Sristisri (2013) การวิเคราะห์พฤกษเคมี สารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมต้านจุลชีพของใบ *P. foetida* ที่เก็บจากพื้นที่ต่างกันในประเทศอินเดียพบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ซาโปนินแทนนิน ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ แอลคาลอยด์ แต่ไม่พบ สเตียลอยด์ และแอนทราควิโนน สารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ที่มีโซนการยับยั้งตั้งแต่ 4 ถึง12 มิลลิเมตร ทำการทดสอบ MIC ของสารสกัดเอทานอลเป็น 1.25 mg / mL ต่อ *B. subtilis* และ *S. aureus* สารสกัดจากพืชฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* มากกว่า *S. aureus* แต่ยังน้อยกว่าต่อ *S. aureus* ที่ใช้ยา streptomycin และสารสกัดไม่มีผลต่อการยับยั้ง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Proteus vulgaris* เป็นที่สังเกตว่า metabolite ของพืชแตกต่างกันไปตามการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ที่เจริญเติบโต

Sudta et al. (2013) ศึกษาองค์ประกอบพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากรากแห้งของ *P. P. linearis* Hook f. ที่สกัดด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล พบว่า สารสกัดจากรากแห้งของ *P. linearis* Hook f. มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannin) พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางถึงดีเมื่อเทียบกับมาตรฐาน ค่าปริมาณรวมฟีนอลฟลาโวนอยด์และแทนนินของสารสกัดเมทานอล คือ 51.27 ±0.13 mg GAE / g, 36.41± 1.28 mg QE / g และ 9.81 ±1.85% ตามลำดับ พบสารสกัดทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ Vero (% cell growth> 50%) สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้ง cytotoxic กิจกรรมเซลล์ NCI-H187 มีค่าการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ 60.20% ด้วยผลลัพธ์ทั้งหมดนี้เราสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจาก *P. linearis* Hook f. สามารถใช้เป็นแหล่งใหม่ของสารต้านอนุมูลอิสระที่ปลอดภัยได้

Joshi & Ferrao (2014) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและพฤกษเคมีของรากจาก *P. foetida* อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นพืชที่รู้จักกันทั่วไปว่าเป็นไม้เลื้อย พบว่าสารสกัดจากราก *P. foetida* มีปริมาณความชื้น เป็น 6% w / W ปริมาณเถ้ารวมเป็น 8.75% w / W ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายกรดเป็น 1.1% w / W น้ำเถ้าที่ละลายน้ำได้เป็น 1.8% w / W แอลกอฮอล์ 9.8 % w / W, สารที่ละลายน้ำได้เป็น 9.2% w / W อีเทอร์ 2.4% w / W การตรวจสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลของราก พบพฤกษเคมีแอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์คาร์ ไตรเทอร์พีนอยด์ เตียรอยด์ แทนนินและเรซิน ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถยืนยันมาตรฐาน pharmacopoeial ในการกำหนดคุณภาพและความบริสุทธิ์ของราก *P. foetida* ได้

Kanokporn et al. (2014) การศึกษาผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *P. pilifera* สารสกัดรากจาก *P. pilifera* มีปริมาณฟีนอลและแอสคอร์บิกสูงและแสดงให้เห็นถึงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ การปรับปริมาณสารสกัดจาก *P. pilifera* ทุกขนาด (250,

500, 750 mg. / kg. BW) และ omeprazole แสดงให้เห็นถึงการลดลงของเยื่อเมือกในกระเพาะอาหารที่เกิดแผล เปอร์เซ็นต์การยับยั้งในหนูที่ได้รับสารสกัดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของยา การรักษาด้วยสารสกัดจาก *P. pilifera* และ omeprazole พบว่าทำให้ไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ peroxidation และการเพิ่มขึ้นของ catalase (CAT) และ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์และระดับกลูตาไธโอน (GSH) คุณสมบัติของ cyto-protective และ antioxidant ผลของสารสกัดที่พบในการศึกษานี้อาจเกิดจากการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Silpi et al. (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ทางเคมีพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบ *P. foetida* จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง การทดสอบทางเคมีพฤกษเคมีของสารสกัดเมทานอล พบว่า มีสารไตรเทอร์พีนอยด์ น้ำมันระเหย สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ และไกลโคไซด์

Manasi & Sunita (2015) การศึกษาพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของ *Paederia foetida* L. ซึ่งเก็บมาจากป่าทั่วไปกับพันธุ์ที่ปลูก พบว่า *P. foetida* L. ที่ได้จากทั้งสองแหล่งพบพฤกษเคมี ได้แก่ ซาโปนิน แทนนิน และ แทนนิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ ตรวจสอบโดยใช้การตรวจวัด DPPH และ FRAP พบว่าสารต้านอนุมูลมีค่าเท่ากับ 84-85% ในตัวอย่างทั้งสองกลุ่มการทดสอบ DPPH การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลของป่าและพันธุ์ที่เพาะปลูกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญนั้น คือ พันธุ์ที่ปลูกมีปริมาณฟีนอลิก 3.044 mg GAE.g-¹ และ พันธุ์ที่เก็บมาจากป่า 3.016 mg GAE.g-¹ ความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ ใน พันธุ์ที่เก็บมาจากป่า เท่ากับ 0.647 mgQE.g^{-1}ซึ่งใกล้เคียงกับที่ปลูกความหลากหลายคือ 0.627 mgQE.g^{-1} ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งสองกลุ่มทดสอบมีคุณสมบัติของทางเภสัชเวท

Devi & Singh (2016) ศึกษาการวิเคราะห์ทางเคมีและปริมาณฟีนอลทั้งหมดใบ *Paederia foetida*, *Clerodendrum siphonanthes* และ *Blumeopsis flava* สารสกัดถูกเตรียมด้วยเมทานอล โดยอุปกรณ์ของ Soxhlet การหาปริมาณฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteus พบว่าสารสกัดใบของ *Paederia foetida* พบสารทางเคมี ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ไกลโคไซด์ ซาโปนิน และ สเตียรอยด์ แต่สารที่มีความเข้มข้นสูง คือ เทอร์พีนอยด์ และสเตียรอยด์ สารสกัดใบ *B. flava* ไม่พบ ซาโปนิน และสารสกัดใบ *B. flava* และ *C. siphonanthes* ไม่พบสเตียรอยด์ ปริมาณฟีนอลิกรวมของเมทิลแอลกอฮอล์ของ *P. foetida, C. siphonanthes* และ *B. flava* มีค่าเท่ากับ 138.33 ± 6.41, 131.67 ± 5.77 และ 71.25 ± 7.60 mg / g ตามลำดับ *P. foetida* มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด เห็นได้ชัดว่า *P. foetida* มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงสุด Borgohain et al. (2017) การศึกษาผลของสารสกัดจากใบของ *P. foetida* ในผู้ป่วยเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร alloxan ความเครียดจากการออกซิเดชั่นของไตและการเกิดปฏิกิริยา renoinflammatory NF-KB ในหนูเบาหวาน ที่ปริมาณ 250 และ 500 มก. / กก.

น้ำหนักตัว (ชั่งน้ำหนัก) พบว่าสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดสูง ระดับ creatinine ในเลือด ยูเรียในเลือด ไนเตรต (BUN) บิลิรูบิน aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), ไตรกลีเซอไรด์ (TRIGs) และระดับคอเลสเตอรอลรวม (TCHOL) ในหนูที่เป็นเบาหวาน นอกจากนี้ MEPF ยังช่วยลดการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการลดความเข้มข้นของสารที่ทำปฏิกิริยาไคโอไบรท์เรเดียม (malondialdehyde, MDA) ในเนื้อเยื่อไตของ กลุ่มที่เป็นเบาหวาน นอกจากนี้สัตว์ที่ได้รับ MEPF มีความเข้มข้นของ IL-6, IL-1**β**ต่ำ และ TNF-**α** เมื่อเทียบกับหนูที่ควบคุมโรคเบาหวาน แสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ขึ้นอยู่กับปริมาณไตในผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่ผลที่ได้ก็ยิ่งโดดเด่นขึ้นในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางจุลพยาธิวิทยา การตรวจสอบยังยืนยันการกระทำของโรคไตในระหว่างโรคเบาหวาน สรุป: การรักษาด้วย MEPF ช่วยลดความเครียดจากการออกซิเดชั่นและยับยั้งการอักเสบของไตโดยการยับยั้ง NF-kB ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

Mazumder et al. (2018) ศึกษาประเมินการตรวจคัดกรองพฤกษเคมีเบื้องต้นและป้องกันการเกิดอาการท้องร่วงสารสกัดจากใบ *P. foetida* ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท จากการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น พบสารพฤกษเคมีสเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลและแทนนินในสารสกัดจากใบ *P. foetida* นอกจากนี้พบว่า สารสกัดจากใบ *P. foetida* สามารถยับยั้งอาการท้องร่วงในหนูขาวที่เกิดจากการได้รับสารกระตุ้น ricinoleic acid ที่พบในน้ำมันละหุ่งเมื่อเทียบกับมาตรฐาน loperamide ซึ่งการศึกษานี้พิสูจน์ให้เห็นว่าแทนนิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ และ ไตรเทอร์พีนอยด์ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบ *P. foetida* สามารถใช้เป็นสมุนไพรบำบัดโรคได้

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหยสารแบบหมุนได้ภายใต้สูญญากาศ (Rotary evaporator)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
4. เครื่องอังน้ำ (Water bath)
5. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer)
6. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette)
7. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)
8. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
9. บีกเกอร์ (Beaker)
10. กระบอกตวง (Cylinder)
11. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
12. กรวยแก้ว (Glass funnel)
13. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
14. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
15. ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (vial)
16. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
17. หลอดทดลอง (Test tube)
18. หลอดหยด (Dropper)
19. กระดาษฟอยด์ (Foil)
20. ช้อนตักสาร (Spatula)
21. ที่ตั้งหลอดทดลองสแตนเลส (Stainless Test Tube Stand)
22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Reader)
23. ผ้าขาวบาง (Straining cloth)
24. กระดาษกรอง (Filter paper)

3.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distilled water)
2. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH)
3. เมทานอล (Methanol, CH_3OH)
4. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$)
5. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4)
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
7. แกลเซียลแอซีติก (Glacial acetic, CH_3COOH)
8. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3)
9. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3)
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)
11. โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate tribasic dodecahydrate,$Na_3PO_4.12H_2O$)
12. เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$)
13. อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (Aluminium trichloride,$AlCl_3$)
14. ลวดแมกนีเซียม (Mg ribbon)
15. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
16. กรดแกลลิก (Gallic acid)
17. วิตามินซี (Ascorbic acid)
18. เคอร์ซิติน (Quercetin)
19. อคาร์โบส (Acarbose)
20. น้ำยาทดสอบดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff's reagent)
21. น้ำยาทดสอบฟอลินซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent)
22. เอ็นไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (**α**-glucosidase)
23. *p* -nitrophenyl-**α**-D-glucopyranoside (PNP-G)

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย

ภาพที่ 9 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างพืช

1. ตดหมูตดหมา เก็บจากบ้านท่าขอนยาง บริเวณหนองตีนบ้าน หมู่ที่ 3 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ในช่วงเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2560 โดยมีตัวอย่างพรรณไม้ที่ใช้อ้างอิงงานวิจัย คือ P. Padtakenang 1 และเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. ระบุชนิดพืชจากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย โดยเอกสารทางอนุกรมวิธานคือ Puff (2007)

3.3.2 วิธีการสกัดสารตัวอย่าง

1. นำราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมามาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่บดละเอียดจาก ข้อ 1. สกัดด้วยเฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

3. นำสารละลายของส่วนสกัดจากราก ลำต้นและใบของตดหมูตดหมา มากรองผ่านกระดาษกรอง

4. สารละลายของส่วนสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ได้สารสกัดเข้มข้น

5. นำสารสกัดเข้มข้นที่สกัดได้ของราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาไปตรวจสอบสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้น หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคสิเดส

3.3.3 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา แบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์เทอร์ปีนอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008) ดังนี้

1. การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าพบ แอลคาลอยด์

2. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

3. การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบ เทอร์ปีนอยด์

4. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำ ไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10%NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้น แสดงว่าพบ แอนทราควิโนน

5. การตรวจสอบแทนนิน (tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบ แทนนิน

6. การตรวจสอบซาโปนิน (saponins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลอง แสดงว่าพบ ซาโปนิน

7. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมแกลเซียลแอซีติก (Glacial acetic) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบ สเตียรอยด์

8. การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์

3.3.4 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากวิธีของ Basma et al. (2011) (Basma et al. 2011) นำสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% 500 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% (w/v) 800 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.3.5 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ พัชรีและรุ่งเพ็ชร (2559) (พัชรี บุญศิริ และรุ่งเพ็ชร ตั้งรัศมีประเสริฐ, 2559) นำสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที หลังจากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE.g^{-1} dried extract)

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Ayoola et al., 2008) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ความเข้มข้น 60 ppm ในเมทานอล เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ppm นำสารสกัดจากที่เตรียมข้างต้น จำนวน 750 ไมโครลิตร และ DPPH 0.1 ไมโครลิตร ในอัตราส่วน 1:1 ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยามคลื่น 517 นาโนเมตร วัดค่า Absorbance ทุกหลอดรวมทั้งหลอด

ควบคุม (DPPH) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่า % Radical scavenging activity และค่า IC50 ใช้สูตรคำนวณ % Radical scavenging ดังนี้

$$\% \text{ Radical Scavenging} = \frac{(\text{Acontrol} - \text{Asample})}{\text{Acontrol}} \times 100$$

เมื่อ Acontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงจาก Benzie et al., 1996 โดยปิเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สารมาตรฐานทำเช่นเดียวกันกับสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และค่า IC50

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-**α**-glucosidase assay)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสด้วยวิธี p-nitrophenol colorimetric โดยใช้อะคาร์โบส (Acarbose) เป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 เติมสารละลายไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดีกลูโคไพราโนไซด์ (p -nitrophenyl-**α**-D-glucopyranoside) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มีความ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายแอลฟากลูโคซิเดส ปริมาตร 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Wongsa et al. 2012)

ในการหาค่า IC50 ของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสนั้น ทำได้โดย การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการคำนวณเป็นร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ [(ABSblank – ABSsample)/ABSblank] x 100

เมื่อ ABSblank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

ABSsample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

3.3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

3.3.9.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน Standard Error Means (SEM)

3.3.9.2 สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐานได้แก่ One –Way ANOVA (One-way analysis of variance)

3.3.9.3 เมื่อพบว่าผลการตรวจสอบสมมติฐานมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan’s New Multiple Range Test

3.3.9.4 คำนวณค่าสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane) อะซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) ซึ่งแบ่งการตรวจสอบ ออกเป็น 8 กลุ่มได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์(Flavonoids) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) แอนทราควิโนน (anthraquinones) แทนนิน (tannins) ซาโปนิน (saponins) สเตียรอยด์ (steroids) และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008) จากการตรวจสอบดังกล่าว พบสารพฤกษเคมีในส่วนต่างๆ ของตดหมูตดหมาแตกต่างกัน ดังนี้

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยเฮกเซน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ ส่วนแอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอลคาลอด์ ซาโปนิน ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แอนทราควิโนน แทนนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ซาโปนิน สเตียรอยด์ แอลคาลอด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แทนนิน และสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล ตรวจพบพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ แอลคาลอด์ แอนทราควิโนน ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แทนนิน ดังแสดงในตารางที่ 2

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยเฮกเซน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ ส่วนแอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน สารที่ตรวจไม่พบคือ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนแอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน ตรวจไม่พบ ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน

คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบ คือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แทนนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบ คือ แอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล ตรวจบสารพฤกษเคมี คือ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แทนนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยเฮกเซน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน และคาร์ดิแอคไกโคไซด์ ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตน ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบคือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบ คือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน และแทนนิน ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล ตรวจพบสารพฤกษเคมี คือ ซาโปนิน สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แทนนิน คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบ คือ แอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล ตรวจพบพบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ส่วนสารที่ตรวจไม่พบ คือ แอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบตดหมูตดหมา โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล

ส่วนสกัดของตดหมูตดหมา	สารพฤษเคมี	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด				
		เฮกเซน	อะซิโตน	คลอโรฟอร์ม	เมทานอล	เอทานอล
ราก	แอลคาลอยด์	-	-	+	+	+
	ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+
	เทอร์พีนอยด์	+	+	+	+	+
	แอนทราควิโนน	-	-	-	+	+
	แทนนิน	-	-	-	-	-
	ซาโปนิน	-	+	+	+	+
	สเตียรอยด์	+	+	-	+	+
	คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-	+	-	+	+
ลำต้น	แอลคาลอยด์	-	-	-	-	-
	ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+
	เทอร์พีนอยด์	+	+	+	+	+
	แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-
	แทนนิน	-	+	-	+	+
	ซาโปนิน	-	+	+	+	+
	สเตียรอยด์	+	+	+	+	+
	คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-	+	+	+	+
ใบ	แอลคาลอยด์	-	-	-	-	-
	ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+
	เทอร์พีนอยด์	+	+	+	+	+
	แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-
	แทนนิน	-	-	-	+	+
	ซาโปนิน	-	+	+	+	+
	สเตียรอยด์	+	+	+	+	+
	คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-	+	+	+	+

หมายเหตุ

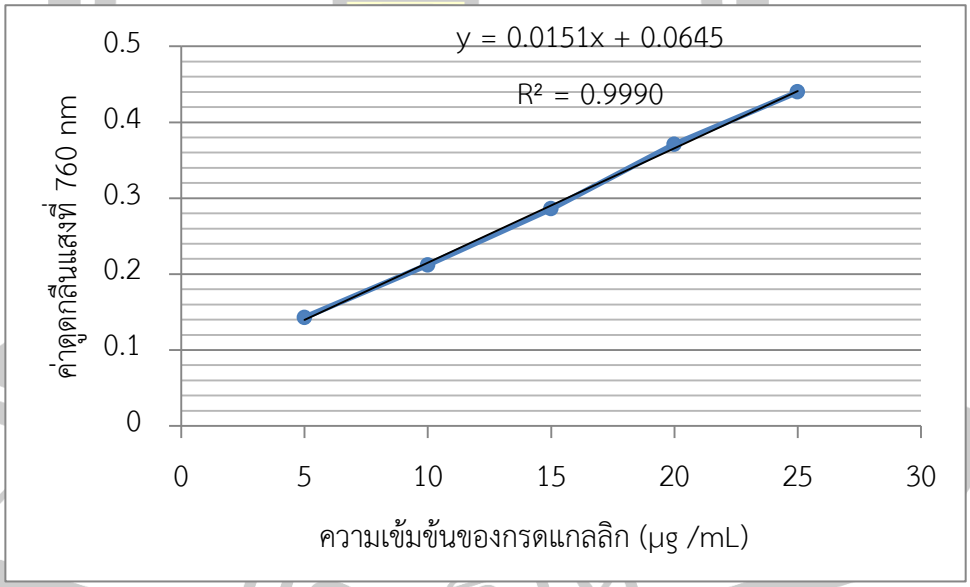
- หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ

\+ หมายถึง ตรวจสอบพบ

จากตารางที่ 2 สารสกัดจากราก ลำต้น และใบตดหมูตดหมา ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด พบว่า ทุกตัวทำละลายตรวจพบสารพฤกษเคมีเหมือนกัน คือ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์พีนอยด์ แต่ตัวทำละลายที่สามารถตรวจพบสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด คือ เอทานอล เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ซึ่งในการสกัดสมุนไพรมาใช้เป็นยา มักใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเพราะมีความปลอดภัย สามารถละลายสารได้หลายชนิด และจากการรายงานการวิจัยของ ปานทิพย์ และวัลลภา (2557) กล่าวว่า สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลตรวจพบสารพฤกษเคมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และให้ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ไปหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสในขั้นตอนต่อไป

4.2 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Basma et al. (2011) ซึ่งใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก $y = 0.0151x + 0.0629$ ($R^2 = 0.9990$) ดังแสดงในภาพที่ 10

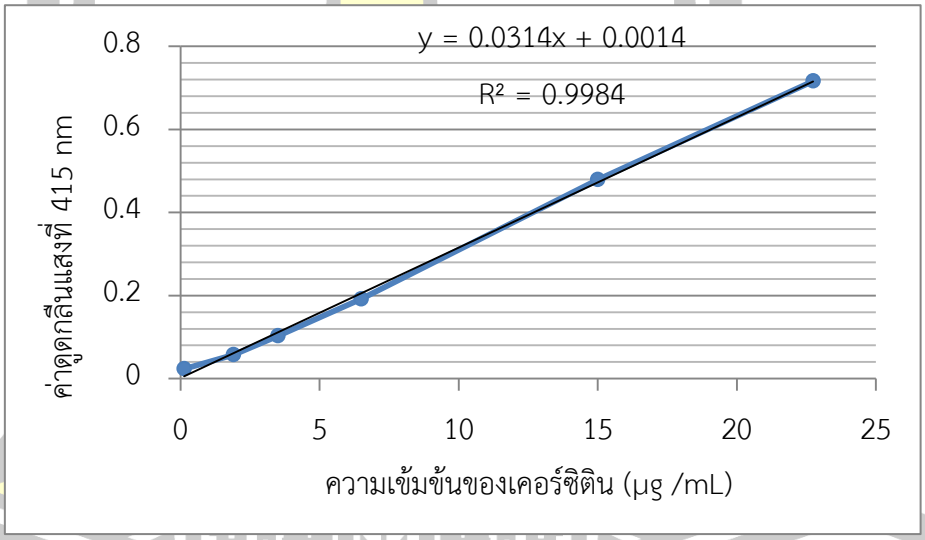


ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยเอทานอล โดยรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE.g^{-1}) พบว่า ส่วนสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 174.42±15.43 mg GAE.g-1, 87.86±11.19mg GAE.g-1 และ 85.21±4.68 mg GAE.g-1 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูดหมามีปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากทุกกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3

4.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric ดัดแปลงมาจากวิธีการของ ดัดแปลงจากวิธีของ พัชรีและรุ่งเพ็ชร (2559) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน y = 0.0314x + 0.0014 (R^2 = 0.9984) ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

จากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิตินสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยเอทานอล โดยรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE.g^{-1}) พบว่าส่วนสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด รองลงมาคือราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 41.32±1.94 mgQE.g^{-1}, 33.38±3.31 mgQE.g^{-1}และ 29.99±1.55 mgQE.g^{-1} ตามลำดับ

โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูดหมามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากราก และลำต้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

ส่วนสกัดจากตดหมูตดหมา	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE.g-1)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg QE.g-1)
ราก	87.86±11.19[b]	33.38±3.31[ab]
ลำต้น	85.21±4.68[b]	29.99±1.55[a]
ใบ	174.42±15.43[a]	41.32±1.94[bc]

หมายเหตุ

- ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ±SEM จากการทดลอง 3 ซ้ำ
- ค่าที่มีอักษร a,b และ c ตามแนวตั้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

จากทดสอบฤทธิ์ต้านนอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีการของ Braca et al. (2002) โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 1.0 - 0.06 µg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ(% DPPH free radical inhibition) ของสารมาตรฐานวิตามินซี

ความเข้มข้นของวิตามินซี (µg/mL)	% DPPH free radical inhibition
0.06	9.69 ±0.64
0.13	10.78±0.32
0.25	16.24±0.31
0.5	35.11±0.08
1	63.08±0.52

หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500.00-15.625 µg/mL ผลการทดลองแสดงเป็นร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) และค่า IC50 พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระและ IC50 สูงที่สุด รองลงมาคือราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.73 ± 6.68, 17.92 ± 1.70 และ 17.49 ± 2.46 ตามลำดับ สำหรับค่า IC50 เท่ากับ 0.44 ± 0.67, 1.41 ±0.63 และ 1.84 ± 0.48 µg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 27.09± 5.48 และ IC50 เท่ากับ 0.77±0.15 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของราก ลำต้น และสารมาตรฐานวิตามินซี ดังแสดงในตารางที่ 6

4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP

จากทดสอบฤทธิ์ต้านนอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ดัดแปลจากวิธีการของ (Benzie & Anek, 1996) โดยใช้เฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 1000 - 62.50 µg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% FRAP free radical inhibition) ของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต (µg/mL)	% FRAP free radical inhibition
62.5	0.42±0.03
125	1.18±0.02
250	2.71±0.02
500	4.99±0.02
1000	9.77±0.02

หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 - 62.50 µg/mL ผลการทดลองแสดงเป็นร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%FRAP free radical inhibition)

และค่า IC50 พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ และ IC50 สูงที่สุด รองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่า เท่ากับ 68.22 ± 12.18, 24.97 ± 2.24 และ 21.04 ± 2.55 ตามลำดับ สำหรับค่า IC50 เท่ากับ 0.04 ± 0.97, 0.47 ± 0.59 และ 0.52 ± 0.63 µg/mL ตามลำดับตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ซึ่งมีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 1.43±0.33 และ IC50 เท่ากับ 0.18±0.17 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของราก ลำต้น และสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธี DPPH assay และวิธี FRAP

ส่วนสกัดจากตดหมูตดหมา	DPPH		FRAP	
	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ	IC50	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ	IC50
ราก	17.92 ± 1.70^{b}	1.41±0.63	24.97 ± 2.24^{b}	0.47±0.59
ลำต้น	17.49 ± 2.46^{b}	1.84±0.48	21.04 ± 2.55^{b}	0.52±0.63
ใบ	40.73 ± 6.68^{a}	0.44±0.67	68.22 ± 12.18^{a}	0.04±0.97
วิตามินซี	27.09± 5.48^{b}	0.77±0.15	-	-
เฟอรัสซัลเฟต	-	-	1.43 ± 0.33^{c}	0.18±0.17

หมายเหตุ

- ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ±SEM จากการทดลอง 3 ซ้ำ
- ค่าที่มีอักษร a, b และ c ตามแนวตั้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.6 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-α-glucosidase assay)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสด้วยวิธี *p*-nitrophenol colorimetric ตามวิธีการของ Wongsa et al, 2012 โดยใช้อะคาร์โบสเป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 2000 - 100 µg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ร้อยละฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (% **α**-glucosidase inhibition) ของสารมาตรฐานอะคาร์โบส

ความเข้มข้นของอะคาร์โบส (µg/mL)	% **α**-glucosidase inhibition
100	87.60±0.00
250	88.84±0.00
500	89.88±0.00
1000	93.20±0.00
2000	94.40±0.00

หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 - 62.50 µg/mL ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และ ค่า IC50 พบว่า ส่วนสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ และ IC50 สูงที่สุด รองลงมาคือราก และลำต้น ซึ่งมีค่า เท่ากับ 93.04 ± 1.63, 86.62 ± 1.56 และ 48.78 ± 2.75 ตามลำดับ สำหรับค่า IC50 เท่ากับ 0.81 ± 0.10, 2.20± 0.09 และ 3.65 ± 0.07 µg/mL ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ซึ่งมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเท่ากับ 90.78 ± 0.01 และ IC50 เท่ากับ 0.98±0.02 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับราก และลำต้น ดังแสดงในตารางที่ 8

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ด้วยวิธี *p*-nitrophenol colorimetric

ส่วนสกัดจากตดหมูตดหมา	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (% α-glucosidase inhibition)	IC50
ราก	86.62 ± 1.56[b]	2.20±0.09
ลำต้น	48.78 ± 2.75[a]	3.65±0.07
ใบ	93.04 ± 1.63[c]	0.81±0.10
อะคาร์โบส	90.78 ± 0.69[bc]	0.98±0.02

หมายเหตุ

- ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ±SEM จากการทดลอง 3 ซ้ำ
- ค่าที่มีอักษร a, b และ c ตามแนวตั้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ซึ่งแบ่งการตรวจสอบสารพฤกษเคมีออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ พบว่า ทุกตัวทำละลายตรวจพบสารพฤกษเคมีเหมือนกัน คือ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์พีนอยด์ แต่ตัวทำละลายที่สามารถตรวจพบสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด คือ เอทานอล เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ซึ่งในการสกัดสมุนไพรมาใช้เป็นยา มักใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเพราะมีความปลอดภัย สามารถละลายสารได้หลายชนิด และจากการรายงานการวิจัยของ ปานทิพย์ และวัลลภา (2557) กล่าวว่า สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลตรวจพบสารพฤกษเคมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และให้ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ไปหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (174 mgGAE g^{-1} , 41.32 mg QE g^{-1}) เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูดหมามีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากราก และลำต้น และเมื่อเปรียบเทียบพืชในสกุลเดียวกัน พบว่า ในรายงานการวิจัยของ Manasi and Sunita (2015) ได้รายงานปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากใบ *P. foetida* พบมีปริมาณฟีนอลิกรวม 3.044 mg GAE.g^{-1} และปริมาณฟลาโวนอยด์ 0.627 mgQE.g^{-1} แสดงว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาที่วิจัยในครั้งนี้มีปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าพืช *P. foetida* อาจจะส่งผลให้สารสกัดจากใบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pourmorad et al. 2006 ที่พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณที่สูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (40.73 ± 6.68, 68.22 ± 12.1) เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สาร

สกัดจากใบตดหมูดหมามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แตกต่างจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี และเฟอรัสซัลเฟต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการรายงานของพืชในสกุลเดียวกัน พบว่า ในรายงานการวิจัยของ Silpi et al. (2014) รายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ *P. foetida* ด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง เช่นเดียวกับ สุนันท์ และอรุณรัตน์ (2553) อาจเป็นเพราะงานวิจัยครั้งนี้ในสารสกัดใบตดหมูตดหมาให้ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณสูงจึงส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และจากการที่พืชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะสามารถนำไปรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคต่างๆ ได้ ตามการรายงานของ Rajesh et al. (2013) ได้นำสารสกัดจากใบ *P. foetida* ไปใช้ในการรักษาโรคไขข้ออักเสบ เบาหวาน ปวดท้อง ท้องร่วง มะเร็ง และอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูงที่สุด โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ซึ่งมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส เท่ากับ 90.78 ± 0.01 และ IC50 เท่ากับ 0.98±0.02 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับราก และลำต้น และจากการที่ใบมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูงอาจจะมีแนวโน้มในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านทางการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งจากรายงานการวิจัยของพืชในสกุลเดียวกัน พบว่า การรายงานการวิจัยของ Borgohain et al. (2017) ได้รายงานว่าสารสกัดจากใบของ *P. foetida* สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนู เบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร alloxan นอกจากนี้ยังช่วยลดการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับรายงานของ Rajesh et al. (2013) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์และการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาจากใบ *P. foetida* พบว่าสารสกัดจากใบสามารถใช้ในการรักษาโรคเบาหวานได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาทั้งแบบสดและแบบแห้งเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2. ควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาเพื่อลดความเสี่ยงต่อการนำไปใช้ด้านเภสัชวิทยาต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จินดาพร คงเดช. (2551). การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง. (2559). การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยบูรพา.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. เล่ม 1(3) กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

นันทวัน บุณยะประภัศร. (2543). *สมุนไพรไม้พื้นบ้าน 1*. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด,หน้า 895

ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน. (2554). ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากพืชตระกูลเฟินเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน. *การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมี และเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21* มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1–5.

พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา, พงศ์เทพ สุวรรณวารี, หนูเดือน เมืองแสน, ดวงกมลม แม้นศิริ, ทักษิณ อาชวาคม และวารินทร์ บุญเรียม. (2560). *คุณค่าทางโภชนาการของพืชกินได้ในพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราชและพื้นที่ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี.* สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พัชรี บุญศิริ และรุ่งเพ็ชร ตั้งรัศมีประเสริฐ. (2559). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายและในผลิตภัณฑ์อาหาร. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 1.

ภริตา สำเภาทอง และอังคณา จันทรพลพันธ์. (2561). รากกระพังโหม: องค์ประกอบทางเคมี กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเหนียว กข6. *แก่นเกษตร*, *46*(1), 438–444.

รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์. (2555). ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคซิเดส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วรพร ศีลศร. (2554). การเตรียมสารสกัดมาตรฐานกล้วยไม้หวายม่วงแดงเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

วิมลพรรณ รุ่งพรหม ,ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล และสมฤดี เลี่ยมทอง. (2552). สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจากมะรุม. วิทยาศาสตร์เกษตร, *40*(3), 49–52.

สุนันท์ บุตรศาสตร์ และ อรุณรัตน์ อุทัยคู (2553) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากและใบกระพังโหม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

อุดมเดชา พลเยี่ยม. (2556). การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

Ayoola, G. A., Coker, H., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & To, A. (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3).

Basma, A. A., Zakaria, Z., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *4*(5), 386–390.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power : The FRAP Assay*. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 70-76 .

Borgohain, M. P., Chowdhury, L., Ahmed, S., Bolshette, N., Devasani, K., Das, T. J., Lahkar, M. (2017). Renoprotective and antioxidative effects of methanolic *Paederia foetida* leaf extract on experimental diabetic nephropathy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *198*, 451–459.

Devi, U., ThInaocha, D., Singh, T. C. (2017). Phytochemical screening on three traditional medicinal plant against piles. *International Journal of Research*, 4 (5), 99-105.

Joshi, A., & Ferrao, G. (2014). Physicochemical and Phytochemical Investigation of the Roots of *Paederia Foetida* Linn. *Journal PharmTech Research*, *4*(2), 268–280.

Kanokporn, S., Supap, S., & Kantarat, J. (2014). Gastroprotective Effects and Antioxidant Activities of *Paederia pilifera* Hook.f. Root Extract. *Chiang Mai Journal of Science*, *41*(5.1), 1121–1131.

Manasi, S., & Sunita, B. (2015). A comparative analysis of phytochemical and antioxidant profile of *Paedaria fotida* L. wild and cultivated varieties. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *5*(1), 1329–1337.

Mazumder, K., Dey, Z. K., Dey, S., Hossain, S., Rahman Sajon, S., & Delowar Hossain, K. (2018). Phytochemical screening and evaluation of ant diarrheal mode of action of leaves extracts of *Paederia foetida* linn. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, *11*(5), 304–309.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, *5*(11), 1142–1145.

Puff, C. (2007). Flora of Thailand: RUBIACEAE. [Online]. 1991 [cited 23 September 2011]; Available from: https://homepage.univie.ac.at/christian.puff/_FTH-RUB/FTH-RUB_HOME.htm

Rajesh, K. S., Raghuveer, I., Vihangesh, D., & Shashi, A. (2013). *Paederia foetida* Linn: Phytochemistry, Pharmacological and Traditional uses. IJPSR,4(12), 4525-4530., *4*(12), 4525–4530.

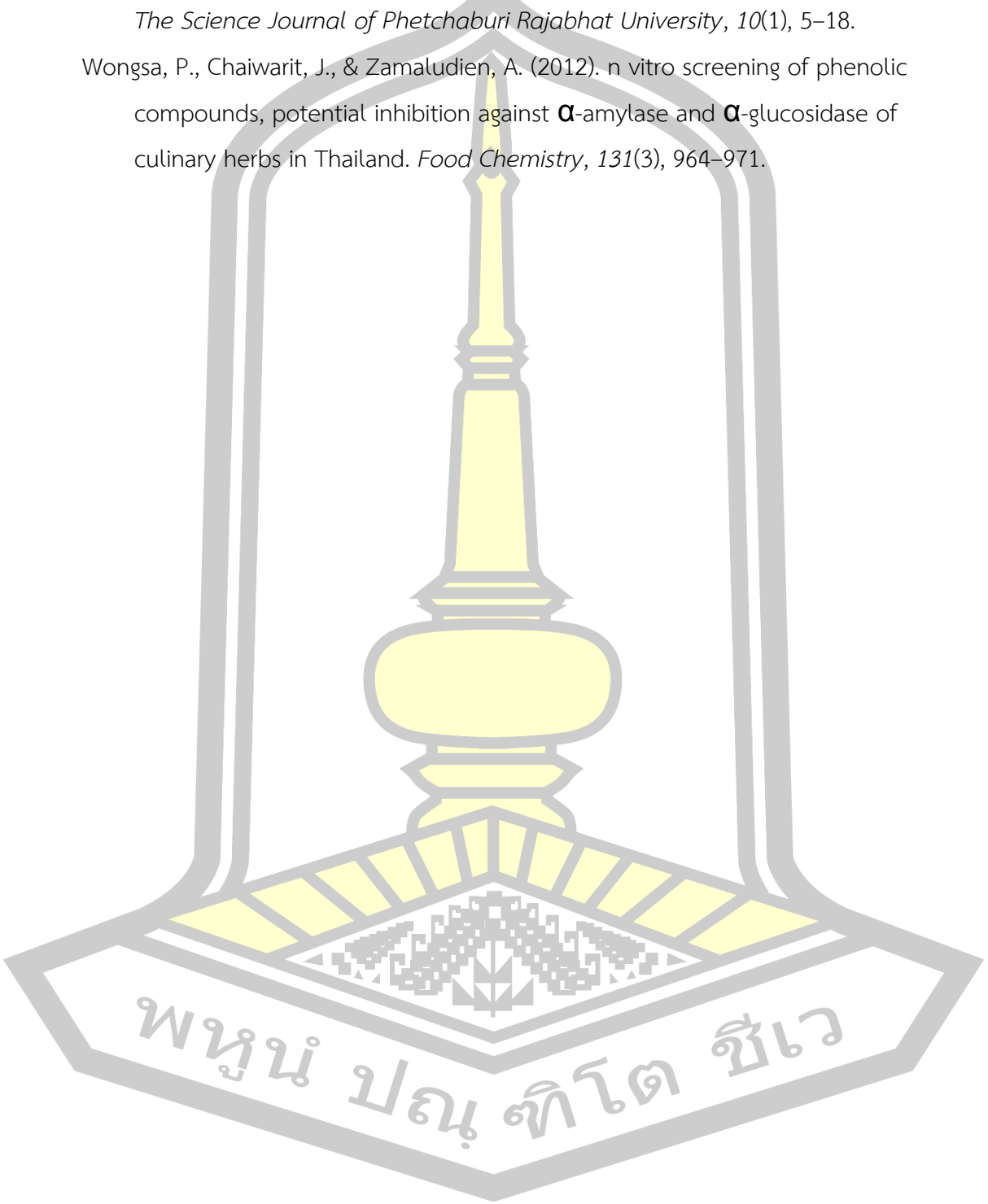
Salehin, K., Dilara, Z., Rajib, D., Dilruba, N., Shamima, A., Ahmed, R., Mohammed, R. (2011). Antihyperglycemic Activity Studies with Methanol Extract of Madhuca Indica J.F. Gmel.Leaves and *Paederia Foetida* L. Stems in Mice. *Advances in Natural and Applied Sciences*, *5*(2), 122–126.

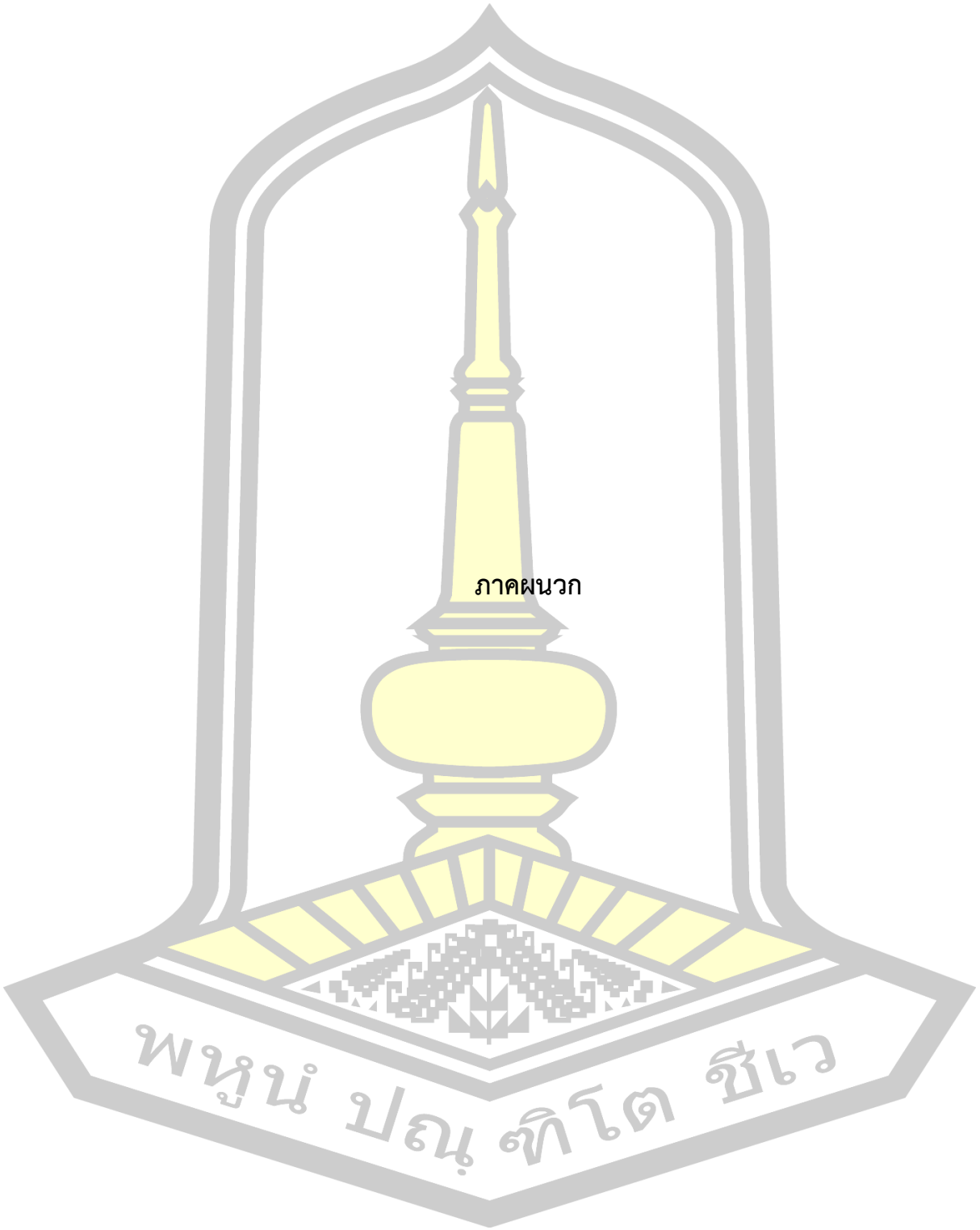
Silpi, C., Ahmade, S., & Singh, K. (2014). Comparison of in vitro antioxidant potential of fractioned *Paederia foetida* leaf extract. *International Journal of Drug Development & Research*, *6*(2), 105–109.

Sristisri, U. (2013). Screening of phytochemicals, nutritional status, antioxidant and antimicrobial activity of *Paederia foetida* Linn. from different localities of Assam, India. *Journal of Pharmacy Research*, *7*(1), 139–141.

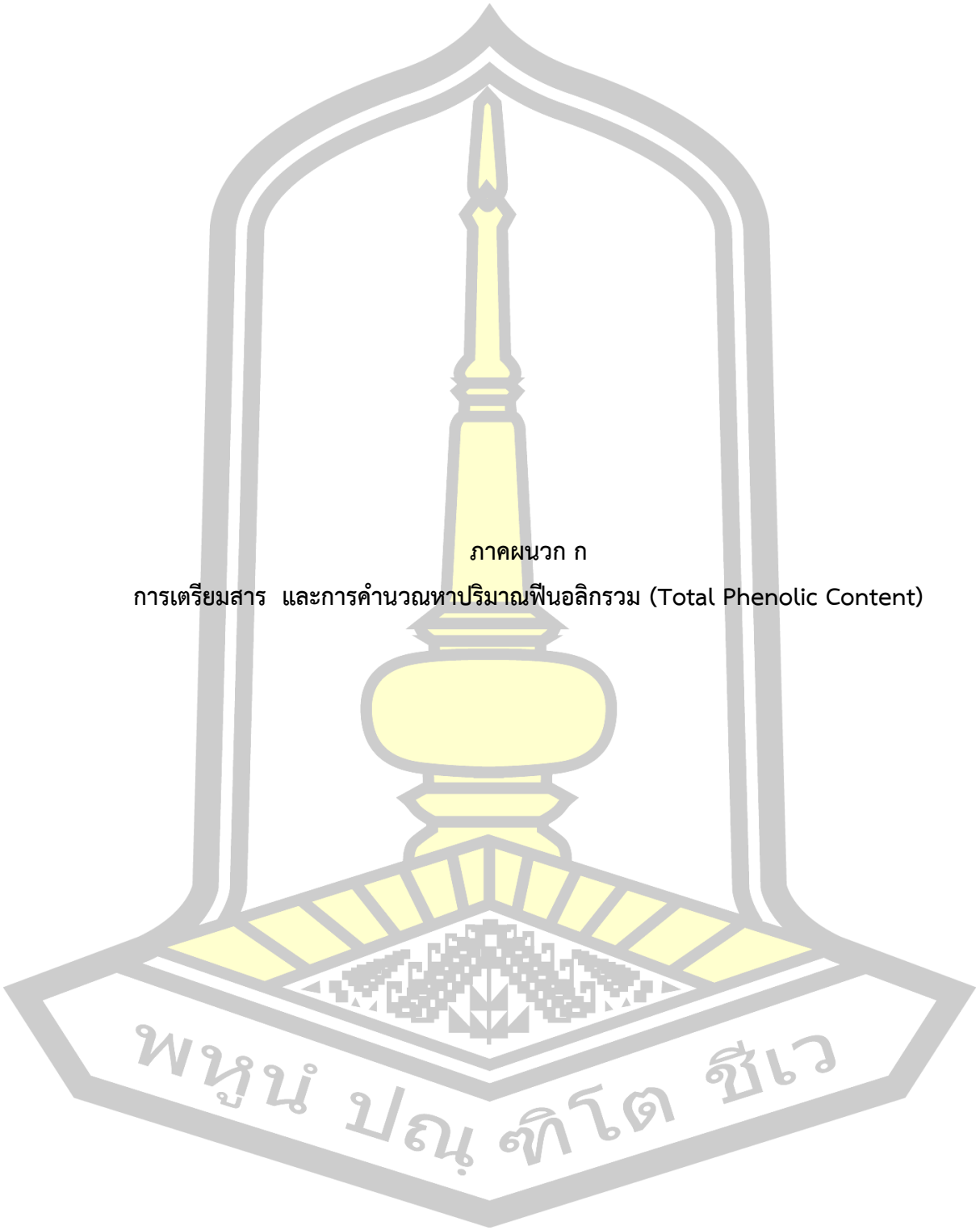
Sudta, P., Chanatip, S., & Wanirat, K. (2013). Phytochemical Analysis, In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity of Extracts of *Paederia linearis* Hook. f. Root. *The Science Journal of Phetchaburi Rajabhat University*, *10*(1), 5–18.

Wongsa, P., Chaiwarit, J., & Zamaludien, A. (2012). n vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against **α**-amylase and **α**-glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, *131*(3), 964–971.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

1.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

1.1.1 เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu โดยเจือจางเป็น 10 % โดยนำ Folin-Ciocalteu มา 10 mL ผสมด้วยน้ำกลั่น 90 mL

1.1.2 เตรียมสารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.01g ในน้ำกลั่น โดยชั่ง Gallic acid 0.01 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาณให้ได้100 mLจากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL (ตารางที่ 9) เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 9 ปริมาณการเตรียมความเข้มข้นของกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้น (µg/mL)	ปริมาณสารละลายมาตรฐาน (mL)	ปริมาณเมทานอล (mL)
5	0.5	9.5
10	1.0	9.0
15	1.5	8.5
20	2.0	8.0
25	2.5	7.5

1.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent แล้วนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm

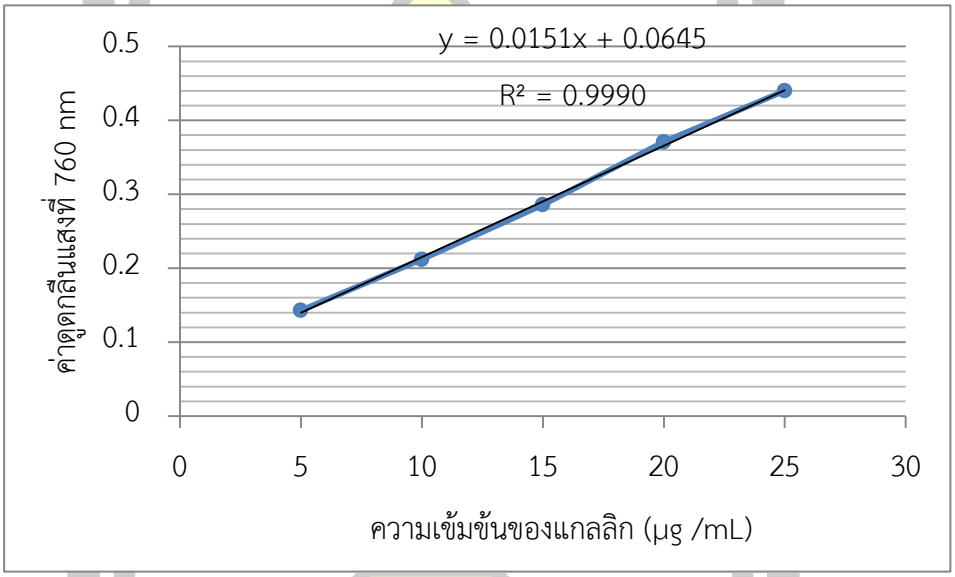
1.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% 500 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% (w/v) 800 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 10 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
5	0.141	0.145	0.143	0.143
10	0.212	0.214	0.21	0.212
15	0.286	0.288	0.284	0.286
20	0.371	0.369	0.373	0.371
25	0.44	0.438	0.442	0.440



กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการ y = 0.0151x + 0.0629,R² = 0.9990

ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานเกรดแกลลิก (Gallic acid)

1.4 จะได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของส่วนสกัดจากส่วนต่างๆ ของตดหมูตดหมา

ตารางที่ 11 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดรากตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.189	0.189	0.189	0.189
100	0.229	0.229	0.231	0.229
250	0.318	0.322	0.321	0.320
500	0.463	0.468	0.466	0.465
1000	0.728	0.733	0.732	0.731

ตารางที่ 12 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดลำต้นตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.14	0.139	0.141	0.140
100	0.23	0.229	0.232	0.230
250	0.377	0.375	0.375	0.375
500	0.601	0.601	0.601	0.601
1000	1.013	1.011	1.014	1.012

ตารางที่ 13 ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของสารสกัดใบของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดใบตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.229	0.227	0.228	0.228
100	0.457	0.457	0.463	0.459
250	0.684	0.68	0.682	0.682
500	1.019	1.025	1.021	1.021
1000	1.633	1.635	1.637	1.635

1.5 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาในหน่วย mgGAE.g^{-1}

ตัวอย่าง การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คือ y = 0.0151x + 0.0629

ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.10 mg /mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.229 จะได้ว่า

จากสมการ y = 0.0151x + 0.0629

แทนค่า y = 0.229

0.229 = 0.0151x + 0.0629

X = 10.894

ในส่วนสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.10 mg /mL มีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 10.894 mgGAE.g^{-1}

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วย mgGAE.g^{-1}

ส่วนสกัดตัวอย่าง 0.10 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 10.894 mgGAE

ถ้าส่วนสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก

$$\frac{10.894 \text{ mgGAE.x1,000 mg}}{0.10 \text{ mg}}$$

$$= 108.94 \text{ mgGAE.g}^{-1}$$

ดังนั้น สารสกัดจากรากตดหมูตดหมามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 108.94 mgGAE.g^{-1}

นำค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา

1.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาในหน่วย mgGAE.g^{-1}

ตารางที่ 14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา

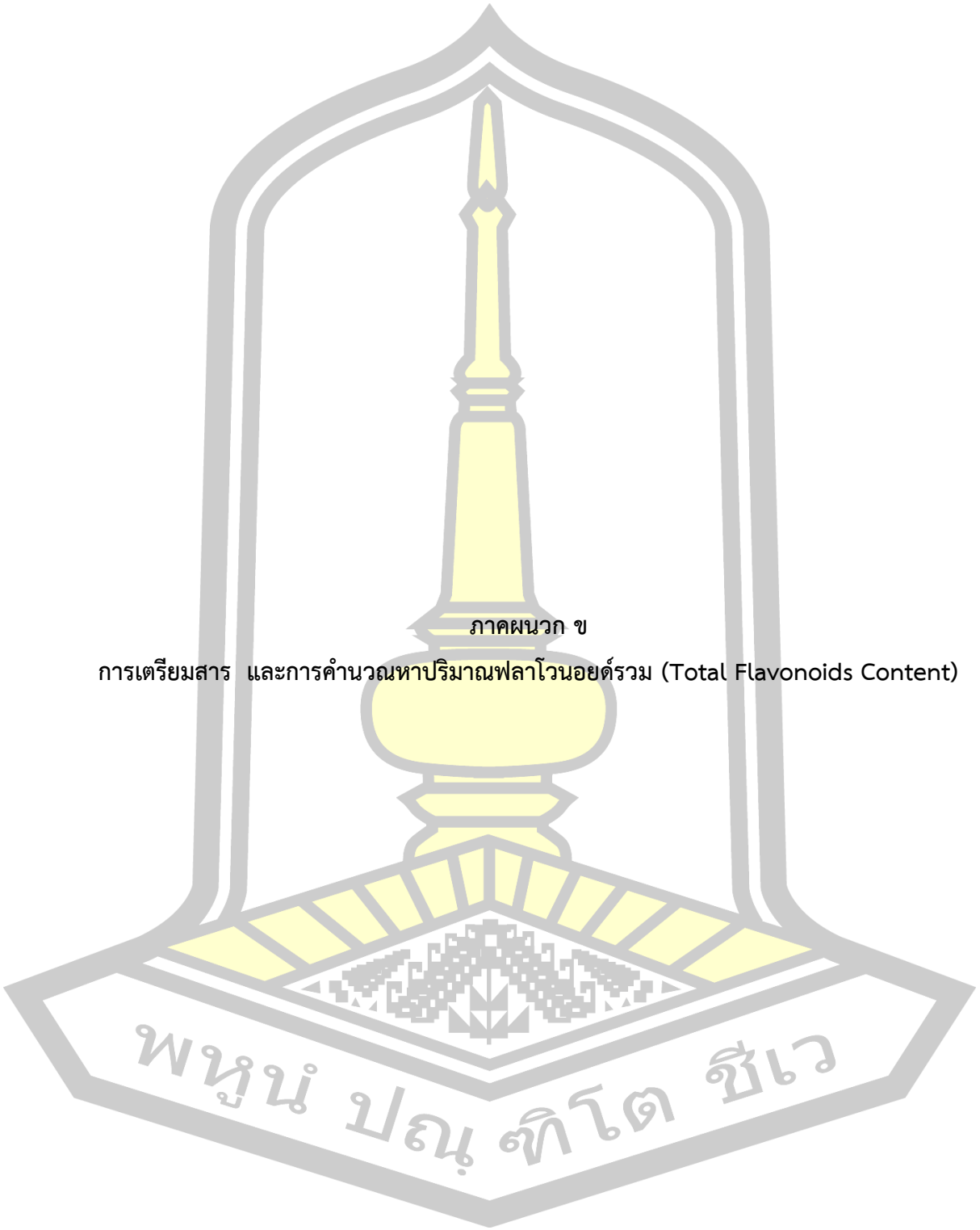
ความเข้มข้นของสารสกัดรากตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม mgGAE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	164.90	164.90	164.90	164.90	0.00
100	108.94	108.94	110.26	109.38	0.76
250	67.15	68.21	67.94	67.77	0.55
500	52.78	53.44	53.17	53.13	0.33
1000	43.94	44.27	44.20	44.14	0.17

ตารางที่ 15 ปริมาณสานประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดลำต้นตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม mgGAE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	100.00	98.67	101.32	100.00	0.32
100	109.60	108.94	110.92	109.82	0.35
250	82.78	82.25	82.25	82.42	0.30
500	71.05	71.05	71.05	71.05	0.00
1000	62.81	62.68	62.88	62.79	0.10

ตารางที่ 16 ปริมาณสานประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดใบตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม mgGAE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	217.88	215.23	216.55	216.55	0.40
100	259.93	259.93	263.90	261.25	0.29
250	164.10	163.04	163.57	163.57	0.05
500	126.42	127.21	126.68	126.77	0.40
1000	103.87	104.00	104.13	104.00	0.13



ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

2. ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$)colorimetric

2.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

2.1.1 สารละลาย Aluminum trichoride ($AlCl_3$) ความเข้มข้น 10% โดยชั่ง $AlCl_3$ 10 กรัม ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL

2.1.2 สารละลายชั่งโซเดียมไนเตรท์ ($NaNO_3$) 5 % (w/v) โดยชั่ง $NaNO_3$ 5 กรัม ละลายในน้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL

2.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง NaOH 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับให้ได้ 50 mL

2.1.4 สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายเอทานอล

2.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

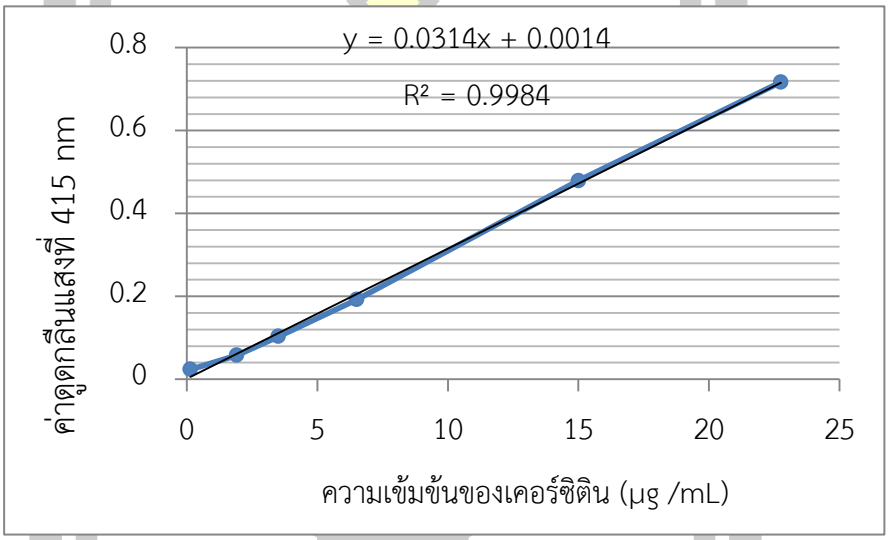
นำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO3) ความเข้มข้น 5 % ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งไว้อีก 6 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 ml ด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำสารผสมที่ได้ไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE.g-1dried extract)

2.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

ตารางที่ 17 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.94	0.025	0.024	0.021	0.023
1.88	0.057	0.057	0.058	0.057
3.75	0.103	0.102	0.104	0.103
7.50	0.193	0.191	0.192	0.192
15.00	0.48	0.479	0.478	0.479



กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิตินได้สมการ $y = 0.0314x + 0.0014$, $R^2 = 0.9984$

ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

2.4 จะได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

ตารางที่ 18 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.072	0.083	0.089	0.081
100	0.143	0.141	0.135	0.139
250	0.244	0.234	0.238	0.238
500	0.357	0.343	0.346	0.348
1000	0.618	0.62	0.619	0.619

ตารางที่ 19 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.055	0.056	0.056	0.055
100	0.106	0.116	0.126	0.116
250	0.248	0.263	0.256	0.255
500	0.385	0.384	0.385	0.384
1000	0.694	0.689	0.705	0.696

ตารางที่ 20 ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา (µg /mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
50	0.091	0.101	0.192	0.128
100	0.189	0.202	0.186	0.192
250	0.265	0.265	0.259	0.263
500	0.427	0.426	0.427	0.426
1000	0.816	0.822	0.817	0.818

2.5 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมาในหน่วย mgQE.g^{-1}

ตัวอย่าง การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิตินคือ y = 0.0314x + 0.0014

ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.10 mg /mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.143 จะได้ว่า

จากสมการ y = 0.0314x + 0.0014

แทนค่า y = 0.143

0.143 = 0.0314x + 0.0014

X = 4.509

ในส่วนสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.10 mg /mL มีปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 4.509 mgQE.g^{-1}

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย mgQE.g^{-1}

ส่วนสกัดตัวอย่าง 0.10 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิติน 4.509 mgQE.g^{-1}

ถ้าส่วนสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิติน

$$\frac{4.509 \text{ mg mgQE.x1,000 mg}}{0.10 \text{ mg}}$$

= 45.09 mgQE.g^{-1}

ดังนั้น สารสกัดจากรากของตดหมูตดหมามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 45.09 mgQE.g^{-1}

นำค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา

2.6 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบส่วน ของตดหมูตดหมาในหน่วย mgQE.g^{-1}

ตารางที่ 21 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา

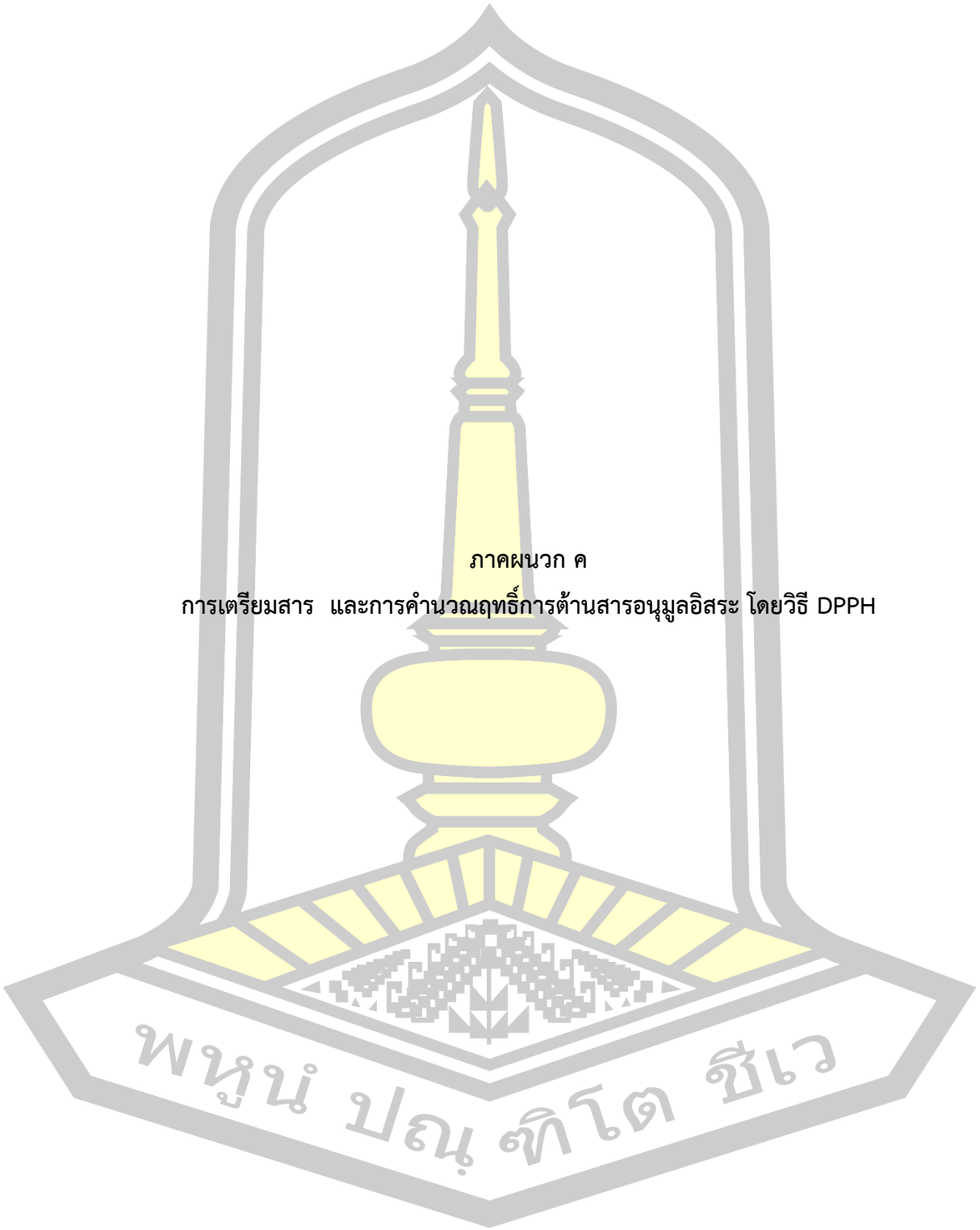
ความเข้มข้นของสาสกัดจากรากตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม mgQE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	44.96	51.97	55.79	50.91	1.49
100	45.09	44.45	42.54	44.03	1.32
250	30.90	29.63	30.14	30.22	0.64
500	22.65	21.75	21.94	22.11	0.46
1000	19.63	19.70	19.66	19.66	0.03

ตารางที่ 22 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากลำต้นของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม mgQE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	34.14	34.77	34.77	34.56	1.36
100	33.31	36.49	39.68	36.49	1.18
250	31.41	33.32	32.43	32.39	0.95
500	24.43	24.36	24.43	24.41	0.03
1000	22.05	21.89	22.40	22.12	0.26

ตารางที่ 23 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา (µg /mL)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม mgQE.g^{-1}				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SEM
50	57.07	63.43	57.70	59.40	1.50
100	59.74	63.88	58.79	60.80	1.30
250	33.58	33.58	32.81	33.32	0.44
500	27.10	27.04	27.10	27.08	0.03
1000	25.94	26.13	25.97	26.01	0.10



ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

3. การคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging

3.1 การเตรียมสารละลายในการทดสอบ

3.1.1 สารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 mM (20 µg/mL) โดยชั่ง DPPH 10.0 mg ละลายในเอทานอล 500 mL

3.1.2 สารมาตรฐานวิตามินซี ที่มีความเข้มข้น 1.0 mg/mLในเอทานอล โดยชั่งสารมาตรฐาน 0.1 mg ละลายในเอทานอล 1.0 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้น 1.0 - 0.06 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 mg/mL ในเอทานอล ปริมาตร 0.2 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 1000-36.5 µg/mL

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

โดยผสมสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis pectrophotometer โดยใช้ Vitamin C เป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่า % Radical scavenging activity และค่า IC50 ใช้สูตรคำนวณ % Radical scavenging ดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

เมื่อ Acontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

ตัวอย่าง การคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา ที่ความเข้มข้น 0.500 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.367 (B) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบเท่ากับ 0.454 (A)

จากสมการ % Radical scavenging = [(Acontrol – Asample)/Acontrol] x 100

แทนค่า % Radical scavenging = [(0.454-0.367)/0.454] x 100

= 0.367

สารสกัดจากรากตดหมูตดหมา ที่ความเข้มข้น1.00 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 30.39

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

ตัวอย่าง การหาค่า IC_{50} สารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

จากสมการ $y = 30.007x + 7.6526$; $R^2 = 0.9993$

แทนค่า $y = 50$; $x = (50-7.6526)/30.007$

$= 1.41$

ดังนั้นความเข้มข้นสารที่ IC_{50} ของสารสกัดรากตดหมูตดหมา = 1.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

ตารางที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

ความเข้มข้นของวิตามินซี (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย±SEM
0.06	0.414	0.410	0.416	9.17	10.28	9.17	9.69 ±0.64
0.13	0.407	0.409	0.409	11.14	10.50	10.70	10.78±0.32
0.25	0.384	0.384	0.382	16.16	15.97	16.59	16.24±0.31
0.5	0.297	0.297	0.297	35.15	35.01	35.15	35.11±0.08
1	0.163	0.167	0.167	64.41	63.46	63.54	63.08±0.52
Control	0.458	0.457	0.458				

3.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากส่วนต่างๆของตดหมูตดหมา

ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก ตดหมูตดหมา

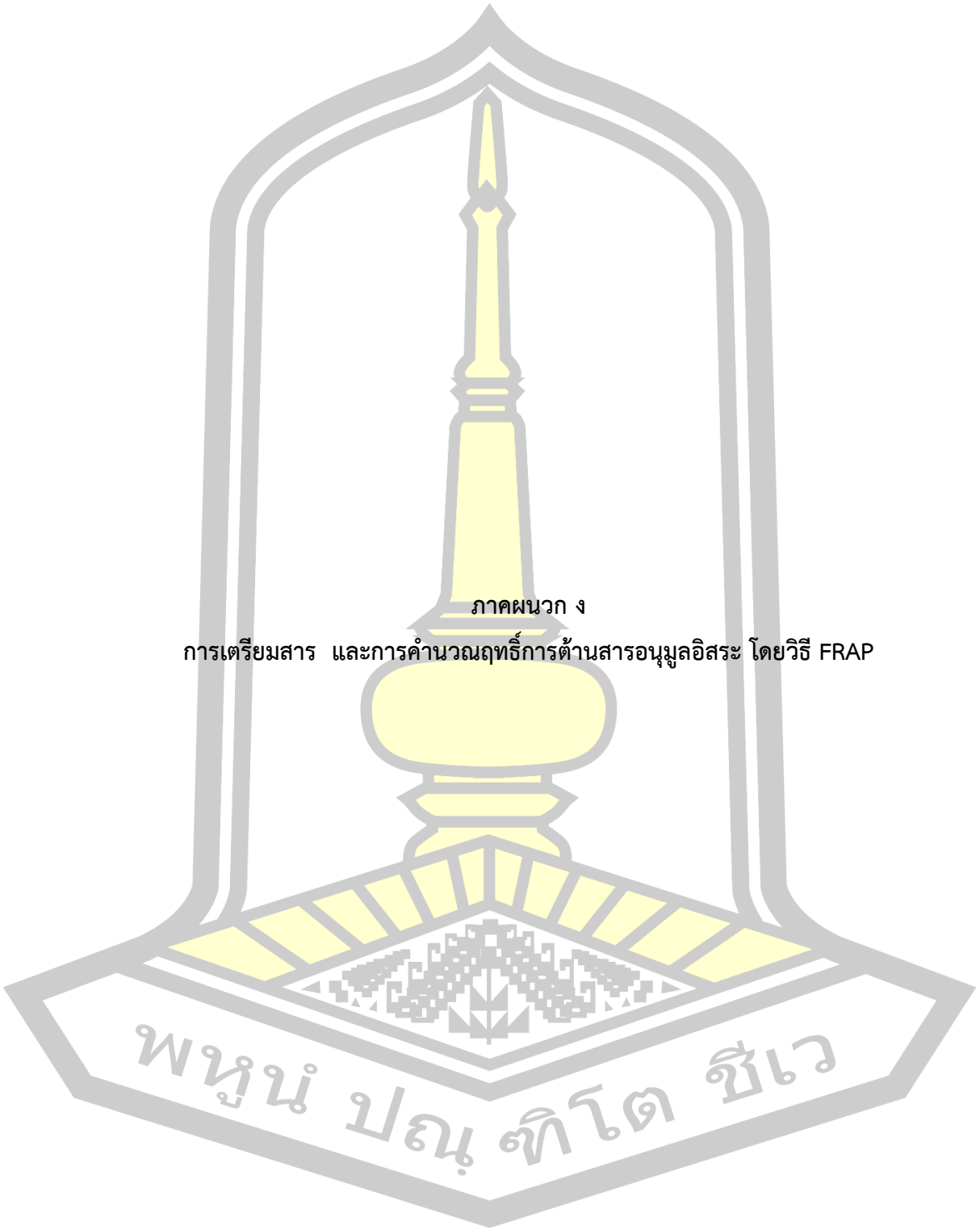
ความเข้มข้นของรากตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
36.5	0.413	0.413	0.414	9.03	9.03	8.81	8.95±0.12
62.5	0.392	0.395	0.392	13.65	12.99	13.65	13.43±0.38
125	0.391	0.391	0.390	13.87	13.87	14.09	13.95±0.12
250	0.367	0.366	0.367	19.16	19.38	19.16	19.23±0.12
500	0.357	0.345	0.369	21.36	24.00	18.72	21.36±2.64
1000	0.316	0.315	0.314	30.39	30.61	30.83	30.61±0.22
Control	0.454	0.455	0.453				

ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้น ตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของลำต้นตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
36.5	0.416	0.418	0.416	8.37	7.92	8.37	8.22±0.12
62.5	0.411	0.411	0.410	9.47	9.47	9.69	9.54±0.22
125	0.406	0.404	0.405	10.57	11.01	10.79	10.79±0.55
250	0.383	0.381	0.386	15.63	16.07	14.97	15.56±0.25
500	0.345	0.347	0.346	24.00	23.56	23.78	23.78±0.25
1000	0.285	0.286	0.286	37.22	37.00	37.00	37.07±0.25
Control	0.456	0.454	0.453				

ตารางที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของใบตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
36.5	0.381	0.383	0.381	16.07	15.63	16.07	15.93±0.25
62.5	0.377	0.378	0.378	16.96	16.74	16.74	16.81±0.12
125	0.350	0.355	0.350	22.90	21.80	22.90	22.54±0.63
250	0.283	0.280	0.289	37.66	38.32	36.34	37.44±0.00
500	0.187	0.184	0.187	58.81	59.47	58.81	59.03±0.38
1000	0.032	0.033	0.035	92.95	92.73	92.29	92.65±0.33
Control	0.456	0.454	0.452				



ภาคผนวก ง
การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP

4. การคำนวณฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

4.1 การเตรียมสารละลายในการทดสอบ

4.1.1 เตรียมบัฟเฟอร์ โดยชั่ง Sodium acetate 2.634 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Acetic acid 1.62 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4.1.2 เตรียม $FeCl_3$ โดยชั่ง 0.0324 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร

4.1.3 เตรียม TPTZ โดยชั่ง 0.0315 g ละลายใน 40 mM HCl 10 มิลลิลิตร

4.1.4 นำสารละลายในข้อ 1 2 และ 3 มารวมกันจะได้ FRAP reagent

4.1.5 ชั่งสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน 0.2 g ละลายใน เอทานอล 10 ml แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง ให้มีความเข้มข้น 2000-50 ppm

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP

โดยปิเปตสารละลาย FRAP ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารสกัดราก ลำต้น และใบที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สารมาตรฐานทำเช่นเดียวกันกับสารสกัดตัวอย่าง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและค่า IC50

ตัวอย่าง การคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมา ที่ความเข้มข้น 0.500 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.831 (A) และ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัส เท่ากับ 0.123 (B)

จากสมการ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ $= [(A595 - B) / M] \times 100$

แทนค่า $= [(0.0831-0.123)/0.0012] \times 100$

$= 59.00$

สารสกัดจากรากตดหมูตดหมา ที่ความเข้มข้น 0.500 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 59.00

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

ตารางที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm			% FRAP free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
62.5	0.178	0.1740	0.170	0.45	0.42	0.39	0.42±0.03
125	0.263	0.269	0.263	1.16	1.21	1.16	1.18±0.02
250	0.450	0.450	0.445	2.72	2.72	2.68	2.71±0.02
500	0.721	0.726	0.721	4.98	5.02	4.98	4.99±0.02
1000	1.294	1.294	1.299	9.75	9.75	9.80	9.77±0.02
Control	0.454	0.454	0.454				

4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของตดหมูตดหมา

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของรากตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm			% FRAP free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
62.5	0.358	0.361	0.360	19.58	19.83	19.75	19.72±0.12
125	0.388	0.391	0.387	22.08	22.33	22.00	22.13±0.17
250	0.528	0.53	0.526	33.75	33.91	33.58	33.75±0.16
500	0.831	0.827	0.831	59.00	58.66	59.00	58.88±0.19
1000	1.126	1.124	1.122	83.58	83.41	83.25	83.41±0.16
Control	0.454	0.456	0.454				

ตารางที่ 30 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของลำต้นตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm			% FRAP free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
62.5	0.316	0.315	0.313	16.08	16.00	15.83	15.97±0.16
125	0.312	0.316	0.314	15.75	16.08	15.91	15.91±0.25
250	0.498	0.499	0.497	31.25	31.33	31.16	31.25±0.08
500	0.755	0.761	0.757	52.66	53.16	52.83	52.88±0.25
1000	1.109	1.111	1.107	82.16	82.33	82.00	82.16±0.16
Control	0.453	0.454	0.455				

ตารางที่ 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของใบตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm			% FRAP free radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
62.5	0.578	0.581	0.579	37.91	38.16	38.00	38.02±0.12
125	0.725	0.725	0.727	50.16	50.16	50.33	50.22±0.09
250	1.519	1.523	1.519	116.33	116.66	116.33	116.44±0.19
500	2.675	2.679	2.673	212.66	213.00	212.50	212.72±0.25
1000	3.297	3.299	3.295	264.50	264.66	264.33	264.50±0.16
Control	0.456	0.452	0.454				

ภาคผนวก จ
การเตรียมสาร และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-α-glucosidase assay)

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

5. การคำนวณฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-α-glucosidase assay)

5.1 การเตรียมสารละลายในการทดสอบ

5.1.1 การเตรียม Stock phosphate buffer pH 6.9

A : ชั่ง NaH2PO4 0.69314 g ละลายใน DI ปริมาตร 50 mL

B : ชั่ง Na2HPO4 1.6128 g ละลายใน DI ปริมาตร 50 mL

C: ผสมสารละลาย Aและ B เขย่าให้เข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml และปรับ pH ให้ได้ 6.9

5.1.2 การเตรียม Stock α–glucosidase

A : ใส่ buffer pH 6.9 ลงในขวด 1 ml

B : ปิเปต α-Glucosidases ปริมาณ 500 µl ละลายใน Buffer pH 6.9 50 ml

5.1.3 เตรียม stock PNP-G

A : ชั่ง PNP-G 30.125 mg ละลายใน buffer 6.9 50 ml

B : ปรับปริมาตรได้ 100 ml

5.1.4 เตรียม stock Na_2CO_3

A : ชั่งสาร Na_2CO_3 21.2 g ละลายในน้ำ DI 100 ml

B : ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml

5.1.5 เตรียม Stock สารละลาย และสารมาตรฐาน

ชั่งสารตัวอย่าง 0.2 g ละลายใน DMSO 10 ml ให้มีความเข้มข้น 2000-50 ppm

ตารางที่ 32 การเตรียมสารละลาย และสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาณสารละลาย (µl)	ปริมาณ DMSO (µl)
2000	1000	0
1000	500	500
500	250	750
250	125	875
125	62.5	937.5
100	50	950
50	25	975

5.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Inhibition-**α**-glucosidase assay)

โดยชั่งสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา 0.1 กรัมละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัด 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดีกลูโคไพราโนไซด์ (p -nitrophenyl-**α**-D-glucopyranoside) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มีความ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายแอลฟากลูโคซิเดส ปริมาตร 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1M Na_2CO_3 1000 ไมโครลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ในการหาค่า IC50 ของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำได้โดยการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการคำนวณเป็นร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ [(ABSblank – ABSsample)/ABSblank] x 100 โดยใช้อะคาร์โบส (acarbose) เป็นตัวควบคุมบวก

5.3 การคำนวณ% **α**-glucosidase inhibition

ตัวอย่าง การคำนวณ % **α**-glucosidase inhibition

การคำนวณ % **α**-glucosidase inhibition ของสารสกัดจากรากของตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.500 (mg/mL)

จากสมการ % **α**-glucosidase inhibition = [(ABSblank – ABSsample)/ABSblank] x 100

แทนค่า เมื่อ ABSblank = 3.701

ABSsample = 3.695

% **α**-glucosidase inhibition = [(3.701 – 3.695)/ 3.701] x 100

% **α**-glucosidase inhibition = 43.98

สารสกัดจากรากตดหมูตดหมาที่ความเข้มข้น 0.500 (mg/mL) ครั้งที่ 1 มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส เท่ากับ 43.98

5.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานอะคาร์โบส

ตารางที่ 33 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารอะคาร์โบส

ความเข้มข้นของอะคาร์โบส (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm			% α-glucosidase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
100	0.531	0.46	0.458	87.57	87.62	87.62	87.60±0.01
250	0.486	0.413	0.413	88.84	88.84	88.84	88.84±0.00
500	0.448	0.375	0.373	89.86	89.92	89.86	89.88±0.01
1000	0.324	0.253	0.251	93.16	93.21	93.21	93.20±0.01
2000	0.278	0.209	0.207	94.35	94.40	94.46	94.40±0.03
Control	3.702	3.700	3.701				

5.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากส่วนต่างๆของตดหมูตดหมา

ตารางที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากรากตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของรากตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm			% α-glucosidase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
100	3.759	3.749	3.769	42.25	42.52	41.98	42.25±0.02
250	3.742	3.744	3.722	42.71	42.66	43.25	42.88±0.01
500	3.695	3.696	3.695	43.98	43.96	43.98	43.97±0.00
1000	3.638	3.632	3.642	45.52	45.69	45.42	45.54±0.00
2000	2.744	2.79	2.744	69.68	68.44	69.68	69.26±0.02
Control	3.702	3.701	3.701				

ตารางที่ 35 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากลำต้นตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของลำต้นตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm			% α-glucosidase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย± SEM
100	3.795	3.839	3.839	82.05	80.87	80.87	81.26±0.02
250	3.75	3.768	3.75	83.27	82.78	83.27	83.11±0.01
500	3.683	3.682	3.682	85.08	85.11	85.11	85.10±0.00
1000	3.662	3.652	3.662	85.65	85.92	85.65	85.74±0.00
2000	3.207	3.209	3.207	97.94	97.89	97.94	97.92±0.00
Control	3.702	3.700	3.703				

ตารางที่ 36 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และค่าร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบตดหมูตดหมา

ความเข้มข้นของใบตดหมูตดหมา (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm			% α-glucosidase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย±SEM
100	4.422	4.303	4.422	82.46	85.67	82.46	83.53±0.06
250	4.208	4.200	4.208	88.24	88.46	88.24	88.31±0.00
500	3.847	3.850	3.850	98.00	97.91	97.91	97.94±0.02
1000	3.733	3.741	3.743	98.91	99.13	99.18	99.08±0.00
2000	3.643	3.633	3.641	96.48	96.21	96.43	96.37±0.00
Control	3.701	3.700	3.702				

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพรทิพย์ ปัดตาเคนัง
วันเกิด	วันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 70 หมู่ 6 ตำบลหัวดง อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44180
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	ครู คศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนสารคามพิทยาคม ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2547 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนาดูนประชาสรรพ์ อำเภอนาดูน จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2551 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2554 ประกาศนียบัตรบัณฑิตวิชาชีพครู มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชา ชีววิทยาศึกษา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว