นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของตำรับยารักษาโรคเบาหวานกรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9

อุษา พิมพา[1*] ปรรณณวัชญ์ ไชยวัฒนนันทน์[1] ยุพา งานโคกสูง[1] และ วิชิดา หล้าสมศรี[2]

[1]สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

[2]สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail : usa.pim@dome.tu.ac.th

Received date: May 13, 2025; Revised date: June 27, 2025; Accepted date: June 27, 2025

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลกที่ร้ายแรงที่สุดโรคหนึ่ง และเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติในการเผาผลาญของร่างกาย ก่อให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตำรับยารักษาโรคเบาหวานกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 และสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ โดยการสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมักด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยวิธีการต้มแบบดั้งเดิมสมัยโบราณ ซึ่งได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FARP จากการทดสอบพบว่าสารสกัดของตำรับชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่มีค่า IC_{50} = 474.11 µg/mL ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเหงือกปลาหมอชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุด IC_{50} = 14.73 µg/mL, วิธี ABTS พบว่าทองพันชั่งชั้นน้ำมีฤทธิ์ดีที่สุด IC_{50} = 22.38 µg/mL และการทดสอบวิธี FARP พบว่าทองพันชั่งชั้นน้ำมีฤทธิ์ดีที่สุดเท่ากับ 157.95 mg Trolox/g extract และ 336.99 mg Fe^{2+}/g extract นอกจากนี้สารประกอบ ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุดที่ 239.96±3.06 mg GAE/g extract, 587.67 mg QE/g extract ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตำรับยารักษาโรคเบาหวานกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงและความปลอดภัยของตำรับยาสมุนไพรเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันในทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

คำสำคัญ: ฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

Original Article

Antioxidant activities and alpha-glucosidase inhibitory activity of 9th ordered Krom Luang Chumphon Khet Udom Sak remedy

Usa Pimpa[1*], Pannawat Chaiyawatthananthn[1], Yupa Ngankogsoong[1] and Wichida Larsomsri[2]

[1]Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

[2]Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Phayao University

*Corresponding author E-mail: usa.pim@dome.tu.ac.th

Abstract

Diabetes is one of the most serious global public health issues and is a chronic disease caused by metabolic disorders in the body, leading to high blood sugar levels. This study aims to test the inhibitory effects on the enzyme alpha-glucosidase, antioxidant activity, total phenolic and total flavonoids content of the extract from 9th Ordered Krom- Luang Chumphon Khet Udom Sak remedy, as well as individual herbs in the formulation. The herbs were extracted using the ethanol fermentation method and the traditional boiling method. The inhibitory effects on the alpha-glucosidase enzyme and antioxidant activity were tested using DPPH, ABTS, and FARP methods. The test results showed that the ethanolic extract of remedy exhibited an inhibitory effect on alpha-glucosidase enzyme with IC_{50} = 474.11 µg/mL. The antioxidant activity measured by the DPPH method showed that the ethanol extract of *Acanthus ebracteatus* Vahl. had the highest activity with an IC_{50} = 14.73 µg/mL. The ABTS method revealed that the water extract of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. had the highest activity with an IC_{50} = 22.38 µg/mL. The FARP method indicated that the water extract of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. had the highest activity 157.9 mg Trolox/g extract and 336.99 mg Fe2+/g extract. Additionally, the highest phenolic and flavonoid compounds were 239.96 mg GAE/g extract and 587.67 mg QE/g extract, respectively. This shows that remedy has alpha-glucosidase enzyme inhibitory and antioxidant activities. Therefore, there should be further studies on the side effects of herbal medicines for scientific confirmation.

Keywords: Flavonoid, Antioxidant activity, Alpha-glucosidase enzyme

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลกที่ร้ายแรงที่สุดโรคหนึ่ง และเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติในการเผาผลาญในร่างกายส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง อุบัติการณ์ของโรคในปัจจุบันมีความรุนแรงมากขึ้น[1] และส่งผลกระทบอย่างหนักต่อสุขภาพของประชาชนทั่วโลก รวมถึงการพัฒนาทางสังคมและเศรษฐกิจ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะพบได้บ่อยที่สุด ถือเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่ง ซึ่งสาเหตุหลักๆมาจากพฤติกรรมการใช้ชีวิต เช่น พฤกรรมการกินอาหารที่มีรสหวานมากเกินไป จากการสำรวจพบว่าประชากรทั่วโลกมีแนวโน้มของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 26.6 ล้านราย ซึ่งมีความชุก 570.9 ล้านรายและมีผู้เสียชีวิต 1.59 ล้านรายในปี 2025[2] จากการสำรวจในประเทศไทยพบว่า ระหว่างปี 2021 ถึง 2045 ประชากรไทยอายุ 20-79 ปี เป็นโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจาก 9.7 % ในปี 2021 เป็น 11.0% ในปี 2045[3]

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคที่เกิดจากการเผาผลาญในร่างกายที่ผิดปกติและพบได้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่ง และมีลักษณะเฉพาะคือภาวะน้ำตาลในเลือดสูง สาเหตุมาจากภาวะดื้ออินซูลิน ส่งผลทำให้ไม่สามารถนำน้ำตาลมาเป็นพลังงานได้ ซึ่งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบในลำไส้เล็กทำหน้าที่ในการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาล[4] ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์นี้จึงช่วยลดดัชนีน้ำตาลในเลือดหลังอาหารได้

ในยุคปัจจุบันการรักษาโรคเบาหวานคือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสโดยใช้ยาสังเคราะห์ อย่างไรก็ตามสารยับยั้งเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย ปวดท้อง และท้องอืด ดังนั้นการพัฒนาสารยับยั้งที่ได้ธรรมชาติหรือสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกในการรักษาภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โดยสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ได้จากพืชสมุนไพร เช่น อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและป้องกันโรคเบาหวานได้และมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่า[4,5]

ยารักษาโรคเบาหวานกรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 เป็นตำรับยาโบราณที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ผลพริกไทยล่อน (*Piper nigrum* L.) ซึ่งมีรสเผ็ดร้อน ใบและลำต้นของเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Vahl.) มีรสขมและเค็มเล็กน้อย ใบของชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.) มีรสขมเล็กน้อย และใบของทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz.) ซึ่งมีรสเย็น จากนั้นนำสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมาผสมกันตามสัดส่วนที่กำหนดในปริมาณที่เท่ากัน (1:1:1:1) โดยหลักทฤษฎีแพทย์แผนไทยโรคเบาหวาน หรือ มธุรเมห ตามภาษาสันกฤต เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของธาตุทั้ง 4 (ดิน น้ำ ลม ไฟ) โดยเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีรสมัน รสหวาน มากร่วมกับการทำงานของตับที่หย่อนลง ในพิกัดแห่งปิตตะสมุฏฐาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอพัทธะปิตตะ ที่แปลงรูปรสธาตุเป็นโอชะธาตุหย่อน มีผลให้รสธาตุเหลือค้างในสังสรณโลหิตมากขึ้นและมีความเข้มข้นสูงขึ้น ขณะที่วาโยธาตุกำเริบ โดยเฉพาะลมอังคมังคานุสารีวาตา มีผลกระทบให้เกิดธาตุแปรปรวน คือ นหารู กลุ่มที่เป็นเส้นเลือดต่างๆ มีความเปราะ กลุ่มที่เป็นเส้นประสาท ทำให้การรับความรู้สึกผิดปกติ ตะโจ หรือผิวหนังให้เกิดบาดแผลแล้วหายได้ยาก หากกระทบมายังจักษุประสาท มีผลให้เกิดความผิดปกติของการมองเห็น และหากกระทบต่อปิหกัง มีผลให้การขับมูตตังผิดปกติไป[6] ดังนั้นพริกไทยล่อน ซึ่งมีรสเผ็ดร้อนมีผลในการเพิ่มการทำงานของปิตตะและวาตะ แต่ลดการทำงานของเสมหะ เหงือกปลาหมอ มีรสขมและเค็ม โดยรสขมจะเพิ่มการทำงานของวาตะ ลดการทำงานปิตตะ (ในเชิงกำเดา) แต่บำรุงน้ำดี (พัทธะปิตตะ) และเสมหะ ขณะที่รสเค็มจะเพิ่มการทำงานของปิตตะ เสมหะ ชุมเห็ดเทศ รสขมเล็กน้อย รสขมจะเพิ่มการทำงานของวาตะ ลดการทำงานปิตตะและเสมหะ และทองพันชั่ง รสเย็น รสขมจะลดการทำงานของปิตตะ แต่บำรุงน้ำดี (พัทธะ-ปิตตะ) เมื่อพิจารณารสยาโดยรวมพบว่ายารสร้อนจากพริกไทยและรสเค็มจากเหงือกปลาหมอจะกระตุ้นการทำงาน

ของอพัทธะ ปิตตะและวาตะ มีผลให้เกิดการไหลเวียนที่มากขึ้น ยารสขมจากเหงือกปลาหมอและชุมเห็ดเทศ ซึ่งรสขมนั้นจะลดการทำงานของกำเดา แต่เพิ่มการทำงานของพัทธะปิตตะ และเมื่อพัทธะปิตตะออกจากถุงน้ำดีแล้ว จะแปลงเป็นอพัทธะปิตตะ เพื่อทำงานได้มากขึ้น ยารสขมเย็นจากเหงือกปลาหมอ ชุมเห็ดเทศและทองพันชั่งจะช่วยให้ร่างกายเย็นลงปรับสมดุลมิให้ร่างกายมีความร้อนสูงเกินไป ที่จะเป็นสาเหตุทำให้ธาตุแปรปรวน[6] จากกลไกเบื้องต้นควรศึกษาฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์กลูโคซิเดสเพื่อพิสูจน์ฤทธิ์ของตำรับยาในการรักษาโรคเบาหวานต่อไป

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP รวมถึงทดสอบสารประกอบธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยพบว่า พริกไทยล่อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 63 µg/mL[7] และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ค่า IC_{50} = 105 mg/mL[8], เหงือกปลาหมอมีฤทธิ์ต้านอนุมูอิสระที่ค่า IC_{50} 44.4 ± 1.00 mg/mL[9], ชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC_{50} 11.33 ± 2.29 mg/mL[9] และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ค่า IC_{50} = 47.054 µg/mL[10] และทองพันชั่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC50 52.95 ± 0.16 µg/mL[11] และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ค่า IC_{50} = 25.0 ± 0.8 µg/mL[12] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้ในการสนับสนุนและพัฒนาสู่การวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 และสารสกัดจากสมุนไพรตัวเดี่ยวในตำรับ

ระเบียบวิธีศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน Rotary evaporator, ตู้แช่แข็งสูญญากาศ (Freeze Dry), Evaporating dishes, Evaporating flask ขนาด 1000 ml, Micro pipette, Centrifuge tube, Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium nitrite ($NaNO_2$), Gallic acid, Aluminum chloride, Quercetin, Sodium hydroxide (NaOH), Absolute ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), Potassium persulfate ($K_2O_8S_2$), hydrochloric acid (HCl), Sodium acetate trihydrate ($C_2H_3NaO_2{\cdot}3H_2O$), Glacial acetic acid, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Iron(III) chloride hexahydrate ($FeCl_3{\cdot}6H_2O$), Ferrous Sulphate ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$),Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (USA), DI water, 4-Nitrophenyl **α**-D–glucopyranoside ($C_{12}H_{15}NO_8$), **α**-Glucosidase, Bovine serum albumin (BSA), Ultrapure water, dimethyl sulfoxide (DMSO), 95% Ethanol

2. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบเหงือกปลาหมอ ทองพันช่าง และชุมเห็ดเทศ จากสวนสมุนไพรที่ อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี และพริกไทยล่อน สั่งซื้อจากร้านขายสมุนไพรแห้ง (ภาพที่ 1) ล้างทำความสะอาดแล้วนำมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จนกว่าสมุนไพรจะแห้งดี จากนั้นนำตัวอย่างพืชแห้งมาปั่นบดด้วยเครื่องปั่นละเอียด สกัดโดยวิธี Maceration โดยแช่ด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 3 วัน ในอัตราส่วน 1:10 g/mL เมื่อครบกำหนดวัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporators) จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) และสกัดด้วยชั้นน้ำโดยการนำสมุนไพรมาต้มเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาต้มเคี่ยว 3 เอา 1 แบบดั้งเดิม และนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดชั้นน้ำที่กรองได้เข้าเครื่อง Freeze Dry จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งสมุนไพรในตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 และมีการกำหนดตัวอักษรย่อแทนสมุนไพรแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 1

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ของ Medjiofack และ Nutmakul[5,8] ทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย Absolute ethanol ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 500-1000 µg/mL จากนั้นดูดสารสารสกัดตัวอย่างมาจำนวน 20 µL ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% ปริมาตร 100 µL และเติม 10% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL บ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรด Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0-200 µg/mL จากสมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0041x + 0.0925$; $R^2 = 0.9994$ ปริมาณสารฟีนอลิกที่ได้แสดงผลในหน่วย mg GAE/g extract

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

วิเคราะห์โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยดัดแปลงการทดลองจาก Medjiofack และ Nutmakul[5,8] ทำการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย Absolute ethanol ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 500-1000 µg/mL นำสารสกัดตัวอย่างมาจำนวน 500 µL และเติม 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µL ลงไปผสมให้เข้ากัน ทำการเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µL ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1M NaOH ปริมาตร 500 µL ลงไปผสมให้เข้ากัน และจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 275 µL ผสมลงให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นระหว่างที่บ่มให้ทำการปิเปตสารละลายลงใส่ใน 96-well plate ปริมาตร 100 µL ต่อหลุมโดยทำซ้ำ 4 หลุม เมื่อครบ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์เทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin ที่ช่วงความเข้มข้น 0-200 µg/mL จากสมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0004x + 0.0026$; $R^2 = 0.9996$ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ได้แสดงผลในหน่วย mg QE/g extract

5. การวิเคราะห์หาสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging โดยดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Nutmaku[8] โดยทำการเตรียมสาร 10 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย Absolute ethanol ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 1-100 µg/mL จากนั้นนำสารสกัดมา 100 µL ใส่ลงใน 96-well plate แล้วทำการเติมสารละลาย DPPH 100 µL (2.4 mg ละลายด้วย Absolute ethanol 100 mL) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง

Spectrophotometer คำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1-100 µg/mL นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) คำนวณได้จากสมการ

% DPPH reduction = [(Abs control - Abs sample) / Abs control] x 100

6. การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging โดยดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Nutmaku[8] โดยทำการเตรียมสาร 10 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย Absolute ethanol ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ (ที่ความเข้มข้น 1-100 µg/mL) จากนั้นนำสารสกัดมาใส่ลงใน Microcentrifuge tube ปริมาตร 10 µL และทำการเติม $ABTS^{\bullet+}$ working solution (เตรียมจาก 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ ผสมกับ 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ในอัตราส่วน 1:0.5) ที่ 990 µL ผสมให้เข้ากัน บ่มภายใต้ความมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างมา 100 µL ใส่ลงใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1-100 µg/mL นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) คำนวณได้จากสมการ

% ABTS inhibition = [(Abs control – Abs sample)/Abs control] x 100

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power โดยดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Olatunji[13] โดยทำการเตรียมสาร 10 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย Absolute ethanol ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ (ที่ความเข้มข้น 1-100 µg/mL) จากนั้นนำสารสกัดมาใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 µL และทำการเติม FRAP working reagent ปริมาตร 180 µL (เตรียมจาก A : 300 mM acetate buffer (pH 3.6), B : 10 mM TPTZ solution, C : 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ผสม A B C ให้เข้ากันโดยอัตราส่วน 10:1:1) จากนั้นบ่มภายใต้ความมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นนำไปคำนวณ เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (ที่ช่วงความเข้มข้น 5-300 µg/mL) การคำนวณโดยใช้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 0.0091x + 0.137$; $R^2 = 0.9999$ แสดงผลในหน่วย mg Trolox/g extract และเทียบสารมาตราฐาน Fe^{2+} (ที่ช่วงความเข้มข้น 5-800 µg/mL) การคำนวณโดยใช้จากสมการ เส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 0.0044x + 0.1143$; $R^2 = 0.9998$ แสดงผลในหน่วย mg Fe^{2+}/g extract

8. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

วิเคราะห์ความสามารถฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส โดยดัดแปลงจากวิธีการก่อนหน้านี้ Nutmaku[8] ทำการเตรียมสาร 50 mg/mL ชั้นเอทานอลละลายด้วย DMSO ส่วนชั้นน้ำละลายด้วย MQ (ที่ความเข้มข้น 62.5-500 µg/mL) นำสารสกัดมาใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 µL ทำการเติม Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 80 µL และทำการเติม p-nitro-phenyl α-D-glucopyranoside (p-NPG) ปริมาตร 50 µL จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเติมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ปริมาตร 50 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย Na_2CO_3 ปริมาตร 50 µL แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโน-เมตร คำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้น 62.5-500 µg/mL นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูซิเดส (% inhibition) คำนวณได้จากสมการ

Inhibition (%) = [(Abs control - Abs sample) / Abs control] x 100

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (mean±SD) โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

ผลการศึกษา

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด (Extraction yield)

ผลการศึกษาพบว่าสมุนไพรที่สกัดด้วย 95% เอทานอล แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด (%Yield) สมุนไพรที่มีค่าสูงที่สุด คือ ชุมเห็ดเทศ รองลงมาคือตำรับ มีค่า %Yield อยู่ที่ 20.11%, 10.38% ตามลำดับ และสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด %Yield สมุนไพรที่มีค่าสูงที่สุด คือ ทองพันชั่ง รองลงมาคือ เหงือกปลาหมอ มีค่า %Yield อยู่ที่ 30.46%, 23.77% ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบพบว่า PNE (พริกไทยล่อนชั้นเอทานอล), RNW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ), RMDE (ตำรับชั้นเอทานอล) มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 239.96, 108.40 และ 80.30 mg GAE/g extract ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบจาก SAE (ชุมเห็ดเทศชั้นเอทานอล), AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล) และ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ) มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดเท่ากับ 53.07, 41.40 และ 1.34 mg GAE/g extract ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบพบว่า AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล), SAE (ชุมเห็ดเทศชั้นเอทานอล), RMDE (ตำรับชั้นเอทานอล) มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 587.67, 445.80 และ 430.20 mg QE/g extract ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสารสกัดหยาบจาก AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล) มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบจาก RAW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ), SAW (ชุมเห็ดเทศชั้นน้ำ) และ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ) มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุดเท่ากับ 178.30, 93.30 และ 21.42 mg QE/g extract ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

4. การวิเคราะห์หาสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging

ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH พบว่า AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล), AEW (เหงือกปลาหมอชั้นน้ำ), RNE (ทองพันชั่งชั้นเอทานอล) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.73, 23.21 และ 28.95 µg/mL ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงให้เห็นว่า AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล) มีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน BHT (Butylated hydroxytoluene) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.85 µg/mL ในขณะที่ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ), PNE (พริกไทยล่อนชั้นเอทานอล), SAW (ชุมเห็ดเทศชั้นน้ำ), และ RMDW (ตำรับชั้นน้ำ) ที่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แสดงในตารางที่ 3

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging

ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี ABTS พบว่า RNW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ), RMDW (ตำรับชั้นน้ำ) และ AEW (เหงือกปลาหมอชั้นน้ำ) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.38, 40.16

และ 42.87 µg/mL ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงให้เห็นว่า RNW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ) มีฤทธิ์ดีที่สุดแต่ยังต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน Trolox ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.46 µg/mL ในขณะที่ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ), PNE (พริกไทยชั้นเอทานอล), AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล), SAE (ชุมเห็ดเทศชั้นเอทานอล), และ RMDE (ตำรับชั้นเอทานอล) ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แสดงในตารางที่ 4

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power

ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี FRAP พบว่า RNW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ), AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล) และ AEW (เหงือกปลาหมอชั้นน้ำ) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน Trolox โดยมีค่าเท่ากับ 157.95, 140.22 และ 113.85 µg/mL ตามลำดับ ในขณะที่ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ), SAW (ชุมเห็ดเทศชั้นน้ำ) และ PNE (พริกไทยล่อนชั้นเอทานอล) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับ 2.13, 37.63 และ 53.21 mg Trolox/g Extract ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 5 และเมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน Fe^{2+} ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$) พบว่า RNW (ทองพันชั่งชั้นน้ำ), AEE (เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล) และ AEW (เหงือกปลาหมอชั้นน้ำ) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 336.99, 301.42 และ 245.77 mg Fe^{2+}/g Extract ตามลำดับ ในขณะที่ PNW (พริกไทยล่อนชั้นน้ำ), SAW (ชุมเห็ดเทศชั้นน้ำ) และ PNE (พริกไทยล่อนชั้นเอ-ทานอล) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 14.71, 88.15 และ 120.37 mg Fe^{2+}/g Extract ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 5

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสพบว่า สารสกัดสมุนไพรทุกตัวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ยกเว้น RMDE (ตำรับชั้นเอทานอล) ที่มีฤทธ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 474.11 µg/mL แต่ยังมีฤทธิ์ที่น้อยกว่าสารมาตราฐานอะคาร์โบสที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 237.02 µg/mL แสดงในตารางที่ 6

อภิปรายผล

ตำรับยารักษาโรคเบาหวานกรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 ซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ พริกไทยล่อน เหงือกปลาหมอ ชุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง (อัตราส่วน 1:1:1:1) จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับยาและสมุนไพรตัวเดี่ยว พบว่าพริกไทยล่อนที่สกัดด้วยชั้นเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 239.96 mg GAE/g extract รองลงมาคือทองพันชั่งชั้นน้ำ ที่มีค่าเท่ากับ 108.40 mg GAE/g extract ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนหน้านี้ได้มีการศึกษาและค้นพบว่า พริกไทยล่อนมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม[14,15] รวมถึงทองพันชั่งที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้าพบว่ามีปริมาณสารฟีนอลิก[18] ในขณะที่พริกไทยชั้นน้ำไม่พบปริมาณสารฟีนอลิก ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารสกัดชั้นน้ำไม่สามารถละลายสารที่อยู่ในสมุนไพรออกมาได้จึงทำให้ไม่พบปริมาณสารในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่าเหงือกปลาหมอที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 587.67 mg QE/g extract รองลงมาคือชุมเห็ดเทศ ที่มีค่าเท่ากับ 445.80 mg QE/g extract จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเหงือกปลาหมอและชุมเห็ดเทศมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์[13,16] ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีค่าที่แตกต่างกันอาจเป็นเพราะว่าถิ่นกำเนิดของพืช ช่วงการเก็บเกี่ยว รวมถึงสายพันธุ์ของพืช นอกจากนี้การผสมสมุนไพรหรือตำรับยังแสดงให้เห็นถึงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ลดลง ไม่ได้มีปริมาณมากกว่าสมุนไพรเดี่ยวเพียงอย่างเดียว อาจเป็นเพราะสารประกอบทุติยภูมิของพืชชนิดอื่น จากการศึกษา

แสดงให้เห็นว่าในพืชที่มีใบขนาดใหญ่จะมีค่าที่สูงที่สุด ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการมีสารฟลาโวนอยด์ที่ส่งเสริมคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการต้านอนุมูลอิสระ[17]

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ซึ่งข้อดีในการทดสอบวิธีนี้คือ ราคาไม่สูง เตรียมง่าย ขั้นตอนการทำง่าย และสามารถทำให้เห็นความแตกต่างในมุมของสารประกอบที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับวิธีการสกัดในการทดลองโดยใช้เอทานอลในการสกัดและการสกัดด้วยชั้นน้ำเพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.73 µg/mL รองลงมาคือ เหงือกปลาหมอชั้นน้ำ ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.21 µg/mL ในขณะที่สมุนไพรผสมหรือตำรับมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.36 µg/mL ถึงแม้ว่าผสมสมุนไพรหรือตำรับจะมีฤทธิ์ไม่ดีเท่าสมุนไพรตัวเดี่ยว โดยหลักการใช้ยาแบบผสมสมุนไพรหรือตำรับเป็นแนวคิดดั้งเดิมและภูมิปัญญาในสมัยโบราณโดยการใช้สมุนไพรผสมหรือตำรับตามตำราการแพทย์แผนไทยที่ได้มีการใช้และถ่ายทอดกันมายาวนาน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสมดุลของธาตุดิน น้ำ ลม ไฟ ในร่างกาย โดยการยึดตามหลักของรสยาสมุนไพร รวมถึงโครงสร้างโมเลกุลและหมู่ฟังก์ชั่นทางเคมีที่แตกต่างกัน ดังนั้นสรุปได้ว่าการใช้สมุนไพรตัวเดี่ยวอาจพบอาการข้างเคียงได้มากกว่าและอาจจะพบความเป็นพิษของสมุนไพรตัวนั้นๆได้อีกด้วย ซึ่งการใช้ยาผสมสมุนไพรหรือตำรับการออกฤทธิ์อาจจะน้อยกว่าสมุนไพรตัวเดี่ยว แต่ก็สามารถออกฤทธิ์ได้และพบความเป็นพิษน้อยกว่าอีกด้วย[18]

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging ซึ่งข้อดีในการทดสอบวิธีนี้คือ อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ มีเสถียรภาพนานกว่าสารอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเก็บไว้ในที่มืด นอกจากนี้ยังสามารถเก็บสารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นเวลาหลายเดือนเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรทุกตัวที่สกัดด้วยชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่าอนุมูลอิสระ ABTS สามารถละลายได้ทั้งสารอินทรีย์และในน้ำ ต่างจากอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งละลายได้เฉพาะสารอินทรีย์เท่านั้น ดังนั้นการทดสอบด้วยวิธี ABTS จึงใช้คัดกรองตัวอย่างที่ละลายด้วยน้ำและไม่ละลายน้ำได้[19] จากการทดสอบพบว่าทองพันชั่งชั้นน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.38 µg/mL รองลงมาคือ ตำรับชั้นน้ำและเหงือกปลาหมอชั้นน้ำ ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.16, 42.87 µg/mL ตามลำดับ จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าเหงือกปลาหมอที่สกัดด้วยชั้นน้ำมีฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.87 µg/mL[9] ดังนั้นสรุปได้ว่าการทดสอบด้วยวิธี ABTS จะมีฤทธิ์ดีในสารสกัดที่เป็นชั้นน้ำมากกว่าชั้นเอทานอล

จากการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ (Ferric reducing antioxidant power; FARP) ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับด้วยตัวทำละลายเอทานอลและการสกัดด้วยวิธีต้ม จากการทดสอบพบว่าทองพันชั่งชั้นน้ำมีความสามารถในการรีดิวซ์ได้สูงสุดเมื่อเทียบการสารมาตราฐานโทรลอกซ์ ได้ค่าเท่ากับ 157.95 mg Trolox/g extract และเมื่อเทียบกับเหล็ก ได้ค่าเท่ากับ 336.99 mg Fe^{2+}/g extract รองลงมาคือ เหงือกปลาหมอชั้นเอทานอล ที่มีค่าเท่ากับ 140.22 mg Trolox/g extract และ 301.42 mg Fe^{2+}/g extract การศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าทองพันชั่งและเหงือกปลาหมอมีความสามารถในการรีดิวซ์[11,13] ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้สารสกัดที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงๆ จะมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดี[20]

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกลไกในการป้องกันการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ผลการทดสอบพบว่า สมุนไพรทุกตัวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ยกเว้นตำรับชั้นเอทานอล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 474.11 µg/mL ซึ่งมีความ

สอดคล้องกับการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดชั้นน้ำเนื่องจากว่าตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าจะสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วมากกว่า อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์แบบผสมสมุนไพรหรือตำรับ จึงอาจเป็นการเพิ่มหรือเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพร จนทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเพิ่มขึ้นได้ (Synergistic effect) หรือสารที่อยู่ในส่วนสารสกัดเข้าไปแย่งจับ (Active site) หรือทำให้โครงสร้างเอนไซม์เปลี่ยนแปลง จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับซับสเตรตตามธรรมชาติได้[21] จากการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยต่อไป ซึ่งในอนาคตที่จะนำไปศึกษาต่อควรจะมีการแยกสาร เพื่อดูสารที่ออกฤทธิ์แบบโดยตรง รวมทั้งศึกษากลไกการยับยั้งของสารเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้ในการสนับสนุนและพัฒนาสู่การวิจัยต่อไป

ข้อสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและผสมสมุนไพรหรือตำรับรักษาโรคเบาหวาน ที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ พริกไทยล่อน เหงือกปลาหมอ ชุมเห็ดเทศ และทองพันชั่ง (อัตราส่วน 1:1:1:1) โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอลและสกัดด้วยการต้มด้วยน้ำตามกรรมวิธีแบบดั้งเดิมสมัยโบราณ จากการทดสอบพบว่า ส่วนใหญ่การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะแสดงการออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเหงือกปลาหมอที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุด, การทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าทองพันชั่งที่สกัดด้วยการต้มน้ำทีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดชั้นเอทานอล เนื่องจากว่าอนุมูลอิสระ ABTS สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าสารอินทรีย์, การทดสอบด้วยวิธี FARP พบว่าทองพันชั่งชั้นน้ำมีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดีที่สุด รวมถึงการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่ามีปริมาณสารที่สูงในตัวทำละลายเอทานอล โดยพริกไทยล่อนมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดและเหงือกปลาหมอมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และนอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวานด้วยการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส พบว่า สมุนไพรเดี่ยวทุกตัวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ยกเว้นตำรับชั้นเอทานอล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นตำรับยารักษาเบาหวาน ควรมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงและความปลอดภัยของสมุนไพรในตำรับ เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันในทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ควรเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9 และสารสกัดจากสมุนไพรตัวเดี่ยวในตำรับให้สูงขึ้น เพื่อศึกษาหลักฐานเชิงประจักษ์ทางเภสัชวิทยา
2. ควรศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยใช้เทคนิค HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆท่านที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมไปถึงการได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 สมุนไพรในตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ขนานที่ 9

ชื่อวิทยาศาสตร์ (คำย่อ)	ชื่อสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	การสกัด	คำย่อ
Piper nigrum L.	พริกไทยล่อน (PN)	เมล็ด	Ethanol Maceration	PNE
			Water Decoction	PNW
Acanthus ebracteatus Vahl.	เหงือกปลาหมอ (AE)	ใบและลำต้น	Ethanol Maceration	AEE
			Water Decoction	AEW
Senna alata (L.) Roxb.	ชุมเห็ดเทศ (SA)	ใบ	Ethanol Maceration	SAE
			Water Decoction	SAW
Rhinacanthus nasutus (Linn.) Kurz.	ทองพันชั่ง (RN)	ใบ	Ethanol Maceration	RNE
			Water Decoction	RNW
Remedy	ตำรับ (RMD)	-	Ethanol Maceration	RMDE
			Water Decoction	RMDW

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัด (Extraction yield), ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content) (n=3)

สารสกัดสมุนไพร	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total flavonoids content (mg QE/g extract)
PNW	12.96	1.34±0.14	21.42±1.81
PNE	4.94	239.96±3.06	183.08±3.30
AEW	23.77	77.01±2.80	240.00±3.07
AEE	6.91	41.40±1.45	587.67±3.01
SAW	22.99	58.54±0.63	93.30±1.10
SAE	20.11	53.07±4.30	445.80±2.18
RNW	30.46	108.40±2.11	178.30±2.21
RNE	9.63	59.35±0.52	290.80±4.70
RMDW	20.78	76.50±2.31	185.59±1.71
RMDE	10.58	80.30±1.87	430.20±4.28

ตารางที่ 3 ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging (n=3)

Extract	DPPH scavenging activity of the different concentrations; %				IC_{50} value (µg/mL)
	1	10	50	100	
PNW	0.75±0.25	1.33±0.30	7.07±0.91	10.16±1.24	>100
PNE	1.27±0.20	4.83±1.22	27.27±1.41	55.03±0.64	90.44±1.34
AEW	0.68±3.09	23.85±1.28	77.54±3.08	84.41±2.70	23.21 ± 1.37
AEE	2.96±0.52	36.11±2.26	93.09±0.08	93.93±0.07	14.73 ± 0.97
SAW	1.46±0.96	9.26±2.21	40.05±2.87	47.29±0.74	>100
SAE	1.78±0.29	6.52±2.04	48.76±0.48	84.58±0.55	47.92±1.24
RNW	3.91±0.47	21.15±0.25	46.89±0.64	56.72±0.75	67.23±3.12
RNE	2.77±0.59	20.02±0.22	72.41±0.97	91.09±1.49	28.95±0.67
RMDW	3.47±1.19	13.09±0.80	29.25±2.07	42.00±2.28	>100
RMDE	1.23±0.52	16.64±0.88	72.08±1.42	93.70±0.23	31.36±1.03
BHT	5.92±1.42	34.10±0.40	75.39±0.24	88.04±0.28	16.85± 0.05

ตารางที่ 4 ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging (n=3)

Extract	ABTS•+ scavenging activity of the different concentrations; %				IC_{50} value (µg/mL)
	1	10	50	100	
PNW	0.72±0.20	1.38±0.55	8.56±0.54	15.80±1.07	>100
PNE	0.84±0.17	3.02±0.36	18.19±1.31	31.97±1.61	>100
AEW	0.56±0.26	12.00±0.15	57.03±0.90	96.83±0.46	42.98±0.75
AEE	0.72±0.14	2.70±0.14	21.18±1.18	44.17±1.01	>100
SAW	0.59±0.51	8.65±0.63	38.34±0.93	66.64±0.87	69.43±1.58
SAE	1.02±0.10	1.98±0.83	15.16±1.33	31.30±1.28	>100
RNW	1.92±0.52	25.04±0.54	81.13±0.82	99.53±0.06	22.38±0.38
RNE	1.15±1.14	9.47±0.85	39.24±1.89	60.96±1.54	71.61±3.94
RMDW	0.44±0.32	14.43±0.33	58.56±0.21	91.20±0.20	40.16±0.09
RMDE	0.66±0.16	2.80±0.23	22.41±0.61	43.71±0.92	>100
Trolox	7.49±0.63	87.50±044	99.98±0.14	100.14±0.12	5.46±0.01

ตารางที่ 5 ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (n=3)

Sample	FRAP (mg Trolox/g extract)	FRAP (mg Fe2+/g extract)
PNW	2.13 ± 0.07	14.71 ± 0.15
PNE	53.21 ± 1.74	120.37 ± 3.60
AEW	113.85 ± 1.72	245.77 ± 3.55
AEE	140.22 ± 4.90	301.42 ± 1.08
SAW	37.63 ± 0.23	88.15 ± 0.48
SAE	56.07 ± 0.57	126.28 ± 1.18
RNW	157.95 ± 0.38	336.99 ± 0.78
RNE	64.71 ± 1.96	144.16 ± 4.05
RMDW	103.37 ± 1.07	224.11 ± 2.22
RMDE	76.63 ± 2.92	165.94 3.78

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (n=3)

Extract	Alpha-glucosidase inhibition (%) of different concentration (µg/mL)				IC_{50} value (µg/mL)
	62.5	125	250	500	
PNW	0.57±0.44	2.19±0.37	2.83±0.56	3.56±0.44	>500
PNE	3.62±0.78	10.19±1.81	18.11±2.29	31.98±1.96	>500
AEW	0.57±0.57	1.65±0.38	3.51±0.49	7.54±0.51	>500
AEE	2.98±1.08	6.25±0.92	10.43±0.91	28.11±2.53	>500
SAW	6.49±1.02	13.62±1.22	25.31±0.79	43.06±0.39	>500
SAE	12.81±1.89	20.72±1.28	33.99±1.65	45.91±1.48	>500
RNW	0.20±1.16	2.45±0.27	3.54±0.93	6.76±1.43	>500
RNE	4.09±0.61	6.67±1.06	11.97±0.37	19.99±0.88	>500
RMDW	2.67±0.26	2.88±0.52	8.30±1.41	15.20±0.54	>500
RMDE	19.00±0.43	28.75±0.36	36.30±0.97	51.96±0.40	474.11±2.30
Acarbose	17.54±1.57	30.06±0.51	51.73±0.13	62.24±0.70	237.02±1.40

ภาพที่ 1 สมุนไพรในตำรับยากรมหลวงชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ขนานที่ 9
ก) ผลพริกไทยล่อน ข) ใบเหงือกปลาหมอ ค) ใบชุมเห็ดเทศ ง) ใบทองพันชั่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Thummajitsakul S, et al. (2023) Comparison of FTIR fingerprint, phenolic content, antioxidant and anti-glucosidase activities among *Phaseolus vulgaris* L., Arachis hypogaea L. and *Plukenetia volubilis* L. **Electronic Journal of Biotechnology.** 61, 14–23.
2. Lin X, et al. (2020) Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. **Scientific Reports 10:14790.** Available from Internet: https://doi.org/10.1038/s41598-020-71908-9.
3. IDF Diabetes Atlas. (2021**). Thailand diabetes report 2000-2045.** Available from Internet: https://diabetesatlas.org/
4. Assefa ST, et al. (2019). Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. **Plants.** 9(1), 2. https://doi.org/10.3390/plants9010002
5. Djeujo FM, et al. (2021). Pharmacology. **α**-Glucosidase and advanced glycation end products inhibition with *Vernonia amygdalina* root and leaf extracts: New data supporting the antidiabetic properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** 73(9), 1240–1249.
6. ไกรสีห์ ลิ้มประเสริฐ. **เวชกรรมไทยประยุกต์ ตอนทฤษฎีธาตุและการวินิจฉัยโรค.** กรุงเทพฯ : เพจเมคเกอร์, ม.ป.ป..)
7. Magaña-Barajas E, et al. (2021). In vitro **α**-amylase and **α**-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant activity by capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits. **Journal of environmental science and health.** 56(3), 282-91.
8. Nutmakul T & Chewchinda S. (2023). Synergistic effect of Trikatuk, a traditional Thai formulation, on antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Heliyon.** 9(1), 13063.
9. Sompong W & Adisakwattana S. (2015). Inhibitory effect of herbal medicines and their trapping abilities against methylglyoxal-derived advanced glycation end-products. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 15, 1-8.
10. Thilak B, et al. (2023). Identification of bioactive compounds from the ethnomedicinal plant *Senna alata* (L.) Roxb. (fabaceae) through in vitro and molecular docking analysis against **α**-glucosidase enzyme: a diabetic drug target. **Plant Science Today.** 10(3), 235-249.
11. Yaowachai W, et al. (2023). In vitro callus induction and evaluation of antioxidant activity of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. Biology Methods and Protocols. 8(1), 19.
12. Shah MA, et al. (2017). **α**-Glucosidase inhibitory effect of rhinacanthins-rich extract from *Rhinacanthus nasutus* leaf and synergistic effect in combination with acarbose. **Journal of Functional Foods.** 36, 325-331.
13. Olatunji OJ, et al. (2022). New insights on *Acanthus ebracteatus* Vahl: UPLC-ESI-QTOF-MS profile, antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. **Molecules.** 27(6), 1981.

14. ชานนท์ นัยจิตร และอนุรักษ์ เชื้อมั่ง. (2559). การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบรวมฟีนอลและนิโคตินของสมุนไพรไทย 15 ชนิด. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 24(2), 252-355.
15. Huu DMN, et al. (2021). Pipercyclobutanamide D, a new member of the cyclobutanamide-type alkaloid, from the roots of *Piper nigrum*. **Journal of Asian Natural Products Research.** 23(9), 906-12.
16. Atanu FO, et al. (2022). Hydroethanolic extracts of *Senna alata* leaves possess antimalarial effects and reverses haematological and biochemical pertubation in plasmodium berghei-infected mice. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine.** 27, 1-7.
17. สิรินภา จิระกิตติเจริญ และคณะ. (2567). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดผสมจากใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำ และใบหนาดใหญ่. **วารสารหมอยาไทยวิจัย.** 10(2), 99-103.
18. รุ่งรวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (ไม่ปรากฏ). **สมุนไพรเดี่ยวกับสมุนไพรตำรับแตกต่างกันอย่างไร.** สืบค้นจาก: https://pharm.tu.ac.th/uploads/pharm/pdf/articles/20230719_002.pdf
19. Sadeer NB, et al. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants.** 9(8), 709.
20. พิชชานันท์ เธียรทองอินทร์ และคณะ. (2063). ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่ากลูโคซิเดสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยารักษาโรคเบาหวาน. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.** 8(1), 2287-0083.
21. ธนากรณ์ ดำสุด และคณะ. (2560). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งแอลฟ่ากลูโคซิเดสของสารสกัดขนุนอ่อน.** ว.วิทย. มข. 45(3), 543-550.