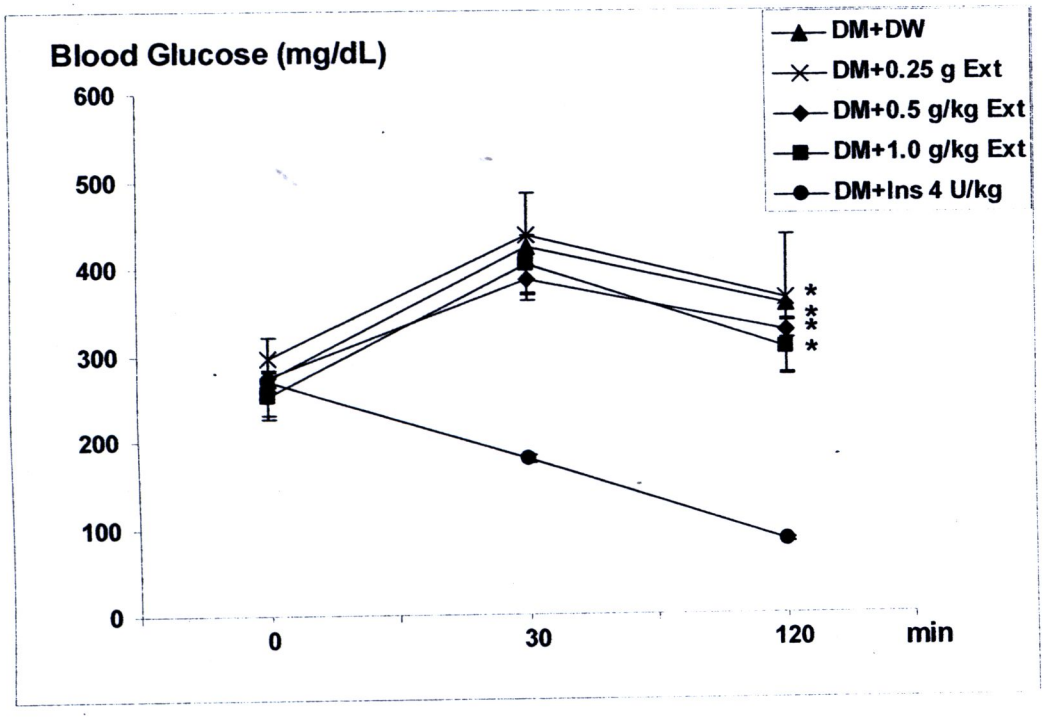
อภิปรายผล

หนูแรทถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อนด้วย streptozotocin หนูมีระดับน้ำตาลสูงมาก การได้รับสารสกัดมีผลให้สามารถลดน้ำตาลในเลือดได้ราวร้อยละ 6-16 เนื่องจาก model หนูเบาหวานที่ได้รับ streptozotocin แบบนี้ยังไม่มีภาวะ insulin resistance ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้คือการกระตุ้นการหลั่งอินซุลิน หรือการเพิ่มการใช้น้ำตาลโดยเนื้อเยื่อต่างๆ นอกจากนี้หนูแรทมีความบกพร่องของ glucose tolerance ดูได้จากระดับน้ำตาลในเลือดที่ 120 นาที ยังคงอยู่ในระดับที่สูงกว่าที่ 0 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเมื่อหนูแรทเบาหวานได้รับอินสุลิน อินสุลินช่วยปรับให้ glucose tolerance ของหนูเบาหวานดีขึ้น สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับฯ นั้น พบว่า สารสกัดตำรับยาฯ ไม่มีผลปรับเปลี่ยน glucose tolerance ของหนูเบาหวานให้ดีขึ้นแต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินสุลินซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการปรับ glucose tolerance

2.2 OGTT **ของหนูแรทเบาหวาน**



รูปที่ 3 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดที่ช่วงเวลาต่างๆ หลังได้รับการป้อนน้ำตาลในขนาดสูง (2 g/kg) ของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับการป้อนน้ำกลั่น, สารสกัดตำรับยาฯ ขนาด 0.25- 1.0 g/kg และอินสุลิน 4 U/kg

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดตำรับยารักษาเบาหวานสกลนคร ในขนาด 0.5-1.0 g/kg มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ประมาณ 14-17 % และคาดว่าการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลนี้อาจมีกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการหลั่งอินสุลิน

III. ผลของสารสกัดยาบรรเทาโรคเบาหวาน ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูแรท

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในส่วนนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดยาบรรเทาโรคเบาหวาน (ตำรับสกลนคร) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของหนูแรทได้แก่ หัวใจ ตับ ไต และตับอ่อน โดย ตั้งสมมติฐานของการวิจัยว่า ยารักษาโรคเบาหวานตำรับสกลนครไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายในสำคัญของหนูแรทได้แก่ หัวใจ ตับ ไตและตับอ่อน

1. ระเบียบวิธีวิจัย

วางแผนการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มการทดลองที่ 1 ได้แก่กลุ่มหนูแรทควบคุม กลุ่มการทดลองที่ 2 กลุ่มหนูแรทได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม กลุ่มการทดลองที่ 3 กลุ่มหนูแรทได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมและกลุ่มการทดลองที่ 4 กลุ่มหนูแรทได้รับสารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ โดยใช้หนูแรทพันธุ์ Spraque-Dawley เพศผู้จำนวน 20 ตัว น้ำหนักระหว่าง 150+ 30 กรัม โดยจัดซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา นครปฐม นำมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์เพื่อให้หนูแรทปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและสถานที่ซึ่งปรับอุณหภูมิ 25+ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 62 + 10% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ระหว่างการทดลองให้หนูกินอาหารสัตว์สำเร็จรูปและดื่มน้ำตามปกติ แบ่งหนูแรทสำหรับทดลองออกเป็น 4 กลุ่มทดลองๆ ละ 5 ตัว จากนั้นนำสารสกัดยาบรรเทาโรคเบาหวาน (ตำรับสกลนคร) จากห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาละลายน้ำกลั่นตามกลุ่มทดลอง จากนั้นนำมาป้อนให้แก่หนูแรทพันธุ์ Spraque-Dawley แต่ละกลุ่มทดลองที่เตรียมไว้เป็นเวลา 30 วัน ในวันที่ 30 ของการทดลอง นำหนูแรทพันธุ์ Spraque-Dawley จากแต่ละกลุ่มการทดลอง มาฆ่าให้ตายโดยสงบโดยใช้ยาสลบชนิด Pentobarbital sodium ฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นทำการเก็บอวัยวะภายในของหนูแรทแต่ละกลุ่มทดลองได้แก่ หัวใจ ตับ ไตและตับอ่อนของหนูแต่ละตัวจากแต่ละหน่วยทดลอง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาตัดในขนาดที่เหมาะสม แล้วนำไปเก็บรักษาโดยแช่ในสารละลายฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปเตรียมสไลด์ถาวร จากนั้นตัดเนื้อเยื่อแต่ละอวัยวะให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร แล้วนั้นนำไปย้อมด้วยสี Hematoxyline and Eosin (H&E) ตามวิธีของ Luna (1968) จากนั้นนำสไลด์ถาวรที่เตรียมได้ไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อศึกษาความผิดปกติของเนื้อเยื่อในแต่ละอวัยวะ แล้วทำการถ่ายภาพประกอบ รายงานผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจากภาพประกอบ

2. ผลการทดลอง

ทำการศึกษาโดยการป้อนสารละลายยาตำรับเบาหวาน (สูตรสกลนคร) แก่หนูแรทพันธุ์ Spraque-Dawley โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มการทดลองที่ 1 หนูแรทกลุ่มควบคุม กลุ่มการทดลองที่ 2 หนูแรทกลุ่มได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม กลุ่มการทดลองที่ 3 หนูแรทกลุ่มได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมและกลุ่มการทดลองที่ 4 หนูแรทกลุ่มได้รับสารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัม

ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ทำการป้อนยาตำรับเบาหวานให้แก่หนูทดลองแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

2.1 กล้ามเนื้อหัวใจ

กล้ามเนื้อหัวใจของหนูในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความผิดปกติปรากฏ ทั้งในกลุ่มกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25, 0.50 และ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ

2.2 เนื้อเยื่อตับ

เนื้อเยื่อตับของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม (1ข) ไม่พบความผิดปกตปกติใดๆแต่ จะเริ่มมีความผิดปกติปรากฏให้เห็นตั้งแต่ในหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาตำรับเบาหวานตั้งแต่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นต้นไป โดยความผิดปกติที่พบเช่น ในหนูกลุ่มการทดลองที่ 2 (2ข) จะพบมีการตายของเนื้อเยื่อตับแล้วมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาแทรก กลุ่มการทดลองที่ 3 (3ข) พบการตายของเนื้อเยื่อตับและมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งมีกลุ่มของเม็ดเลือดขาวมาแทรก ซึ่งแสดงถึงการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อตับและมีขนาดของความผิดปกติมากขึ้นกว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 และในกลุ่มการทดลองที่ 4 (4ข) พบว่ามีกลุ่มเนื้อเยื่อตับตายแบบเนโครซีส (necrosis) เป็นหย่อมๆกระจายอยู่ทั่วไป

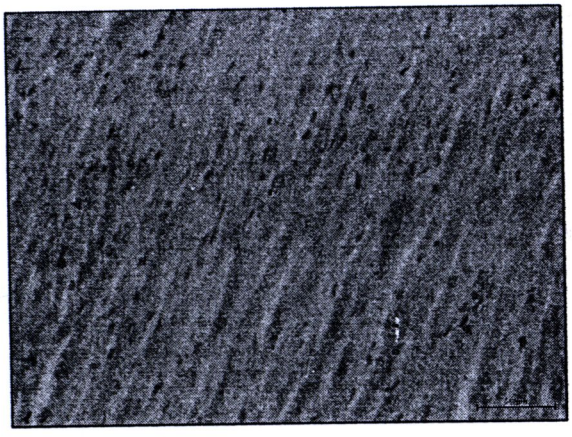
2.3 เนื้อเยื่อไต

เมื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อไตของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม (1ค) ไม่พบความผิดปกติใดๆแต่ จะเริ่มมีความผิดปกติปรากฏให้เห็นตั้งแต่ในหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาตำรับเบาหวานในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นต้นไป โดยความผิดปกติที่พบเช่น ในหนูกลุ่มการทดลองที่ 2 (2ค) จะพบมีการเสียหายบางจุดของเนื้อเยื่อไตแล้วมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาแทรก และพบว่าโกเมอรูลัสของไตซึ่งเป็นหน่วยที่เกี่ยวข้องกับการกรองของเสียของร่างกายเสียหายและบางโกลเมอรูรัสหายไป กลุ่มการทดลองที่ 3 (3ค) พบการตายของเนื้อเยื่อไตมากขึ้นกระจายเป็นหย่อมๆ โครงสร้างท่อไตมีการเปลี่ยนแปลงโดยพบมีความเสียหายมากขึ้น และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาแทรก ซึ่งแสดงถึงการเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อไตมากขึ้นกว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 และในกลุ่มการทดลองที่ 4 (4ค) พบว่ามีกลุ่มเนื้อเยื่อไตตายและมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาแทรกโดยเฉพาะบริเวณท่อภายในเนื้อเยื่อไตกระจายอยู่ทั่วไปเป็นหย่อมๆ

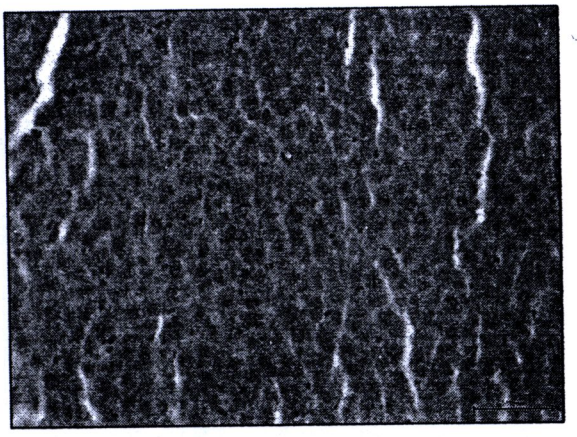
2.4 เนื้อเยื่อตับอ่อน

เมื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อตับอ่อนของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม (1ง) ไม่พบความผิดปกติใดๆ แต่จะพบว่าขนาดของ Islet of Langerhans ในกลุ่มการทดลองที่ 2 (2ง), 3 (3ง) และ 4 (4ง) จะมีขนาดเล็กลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และจำนวนของ Islet of Langerhans ก็มีจำนวนลดลงด้วยเช่นเดียวกัน

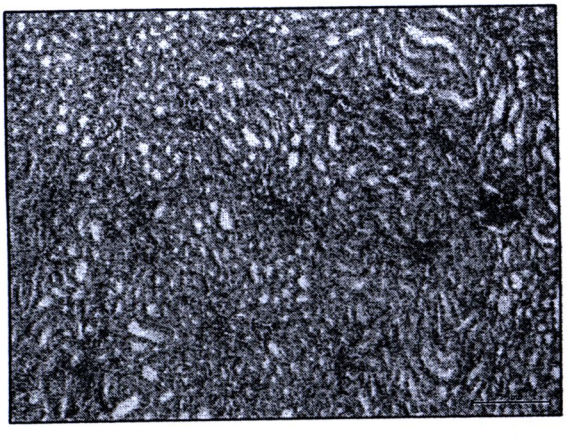
1. พยาธิสภาพอวัยวะภายในของหนูแรทในกลุ่มควบคุม



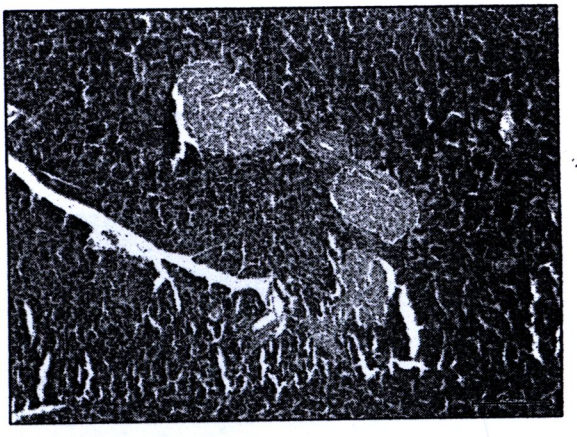
1 (ก) กล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรทกลุ่มควบคุม
(H&E, 100X)



1 (ข) เนื้อเยื่อตับของหนูแรทกลุ่มควบคุม
(H&E, 100X)

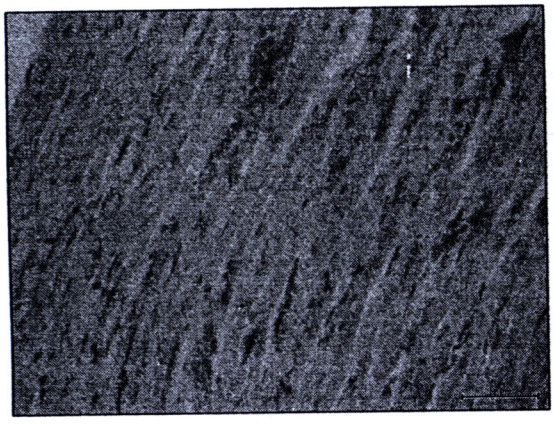


1 (ค) เนื้อเยื่อไตของหนูแรทกลุ่มควบคุม
(H&E, 40X)

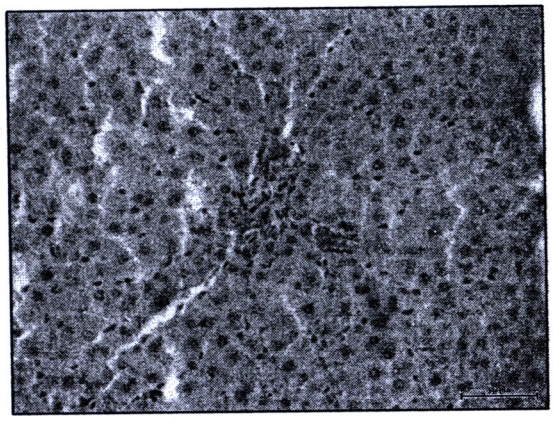


1 (ง) เนื้อเยื่อตับอ่อนและ Islet of Langerhans
(H&E, 40X)

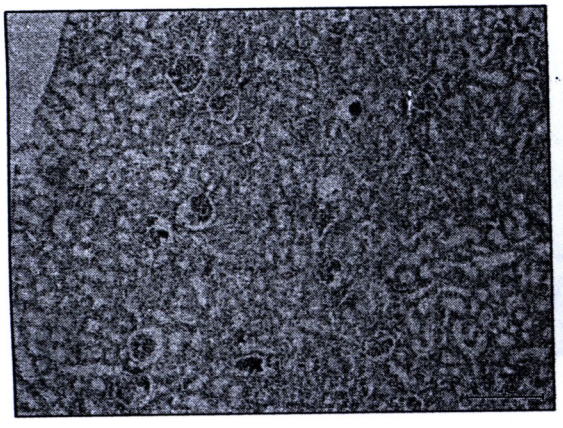
2. พยาธิสภาพอวัยวะภายในของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบาหวาน (ตำรับสกลนคร) ที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม



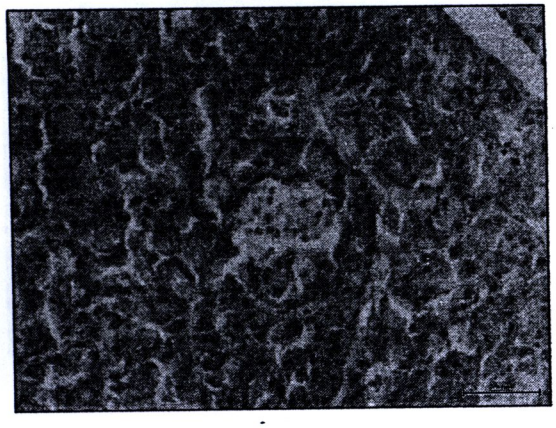
2 (ก) กล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)



2(ข) เนื้อเยื่อตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)

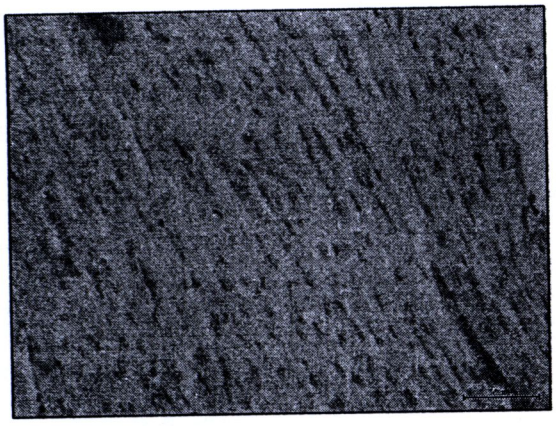


2 (ค) เนื้อเยื่อไตของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 40X)

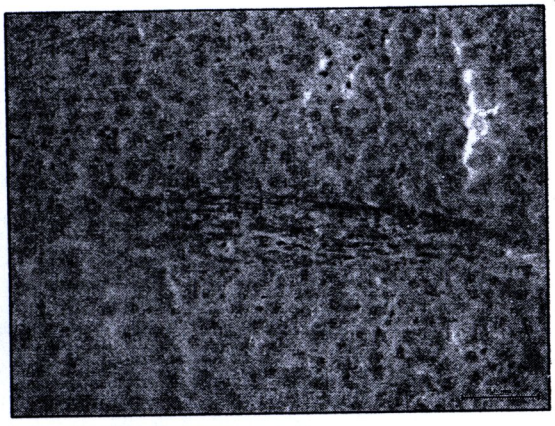


2 (ง) เนื้อเยื่อตับอ่อนและ Islet of Langerhans สารสกัดที่ระดับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)

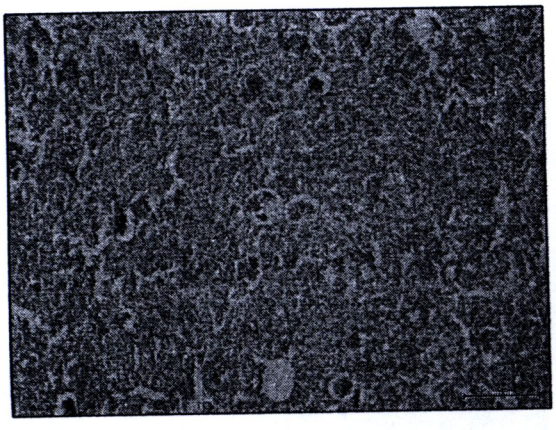
3. พยาธิสภาพอวัยวะภายในของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบาหวาน (ตำรับสกลนคร) ที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม



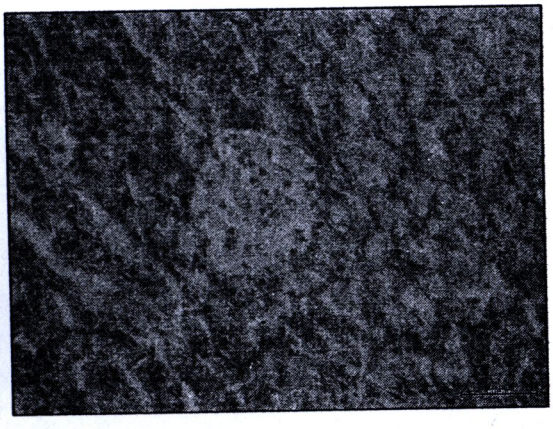
3 (ก) กล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)



3(ข) เนื้อเยื่อตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)

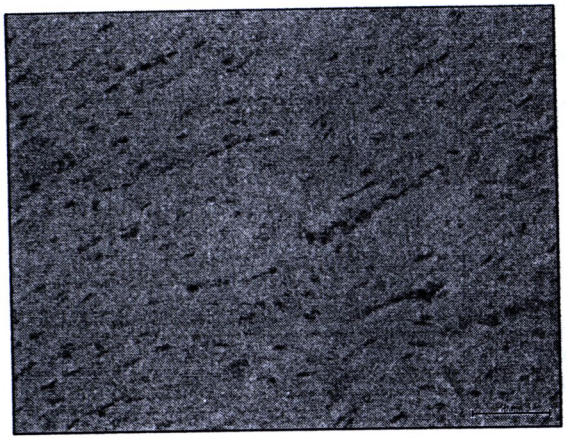


3(ค) เนื้อเยื่อไตของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 40X)

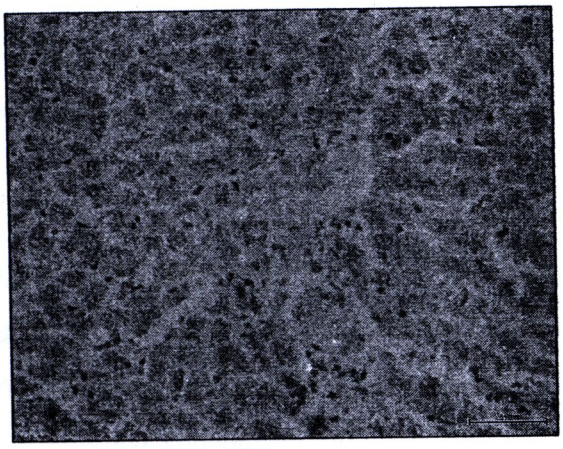


3(ง) เนื้อเยื่อตับอ่อนและ Islet of Langerhans สารสกัดที่ระดับ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)

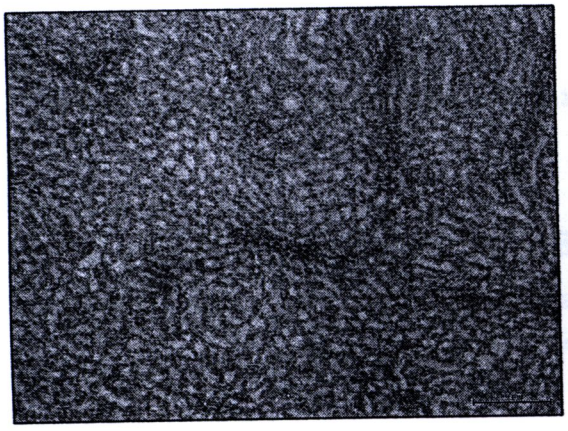
4. พยาธิสภาพอวัยวะภายในของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบาหวาน (ตำรับสกลนคร) ที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม



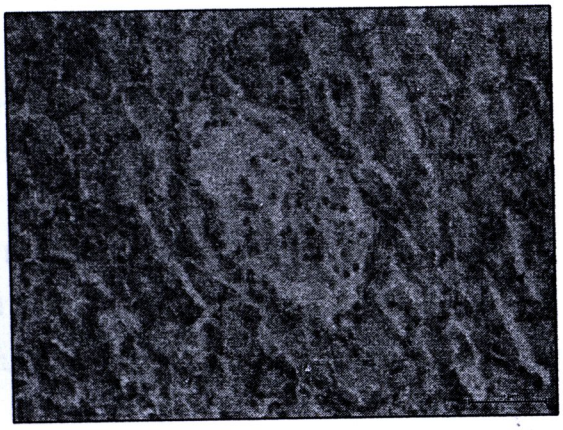
4(ก) กล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)



4(ข) เนื้อเยื่อตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)



4(ค) เนื้อเยื่อไตของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 40X)



4(ง) เนื้อเยื่อตับอ่อนและ Islet of Langerhans สารสกัดที่ระดับ 1.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H&E, 100X)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3. วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการศึกษาโดยการป้อนยารักษาโรคเบาหวานตำรับสกลนครในหนูแรท พบว่าเมื่อหนูแรทได้รับยาเป็นเวลานาน 30 วันพบว่ายาตำรับเบาหวานดังกล่าวมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ ไต เมื่อระดับความเข้มข้นของยาตำรับบรรเทาโรคเบาหวานเพิ่มขึ้น โดยพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับยาจะทำให้เกิดความผิดปกติของ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 14 พ.ย. 2556
เลขทะเบียน 248704

เนื้อเยื่อตับและไต เกิดเนื้อตายและเมื่อเวลาผ่านไปจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาแทรก นั่นแสดงว่าการได้รับยาบรรเทาโรคเบาหวานดังกล่าวตั้งแต่ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นต้นไป จะมีผลทำให้เกิดความเสียหายของตับและไต แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวนและขนาดของ Islet of Langerhans ซึ่งมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับน้ำตาลในหนูกลุ่มที่ได้รับยาบรรเทาโรคเบาหวานมีขนาดและจำนวนลดลง ซึ่งอาจมีผลทำให้การควบคุมน้ำตาลในกระแสเปลี่ยนไป สำหรับกลไกการควบคุมระดับน้ำตาลอาจจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

เมื่อหนูแรทได้รับยาเบาหวาน ตำรับสกลนคร พบว่ามีผลทำให้เนื้อเยื่อตับและไตเกิดความเสียหายเมื่อได้รับยาในปริมาณเพิ่มขึ้นและพบจำนวนและขนาดของ Islet of Langerhans ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของหนูลดลง นั้นแสดงว่าการได้รับยาตำรับเบาหวาน ตั้งแต่ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและไตของหนูแรท นอกจากนี้ยังมีผลทำให้จำนวนและขนาดของ Islet of Langerhans ในเนื้อเยื่อตับอ่อนลดลง แต่ไม่พบความผิดปกติในกล้ามเนื้อหัวใจ

5. เอกสารอ้างอิง

1. Luna, L.T., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Force Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York.

IV. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารหอมระเหยของยาตำรับเบาหวาน

1. วิธีการทดลอง

1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

เตรียม 2,2 diphemyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล โดยการชั่ง DPPH 0.004 g /ml ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมด้วยเครื่อง Vortex ปิดด้วยฟอยล์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

ทดสอบตัวอย่างสารสกัดซึ่งปริมาณสารที่ใช้เป็นstock solution คือ 0.1 g/ml โดยดูดสารสกัดอย่างละ 0.1มิลลิลิตรในหลอดทดลอง อย่างละ 3 หลอด จากนั้นปิเปิตสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ใส่หลอดที่ใส่สารสกัดตัวอย่างไปแล้วหลอดละ 3 ml เพื่อให้ทำปฏิกิริยากัน แล้วทำการเขย่า ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{(A_{DPPH} - A_{SAMPLE}) \times 100}{A_{DPPH}}$$

เมื่อ A_{DPPH} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง

A_{SAMPLE} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP)

การวิเคราะห์เริ่มจากการนำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร และสารสกัดจำนวน 60 ไมโครลิตร หรือ สารละลายมาตรฐาน ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย FRAP reagent เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เพื่อหาความสามารถในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

นำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 180 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ในแต่ละความเข้มข้น (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมล) อย่างละ 60 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Total Phenolic โดยวิธี Folin- Ciocalteus method

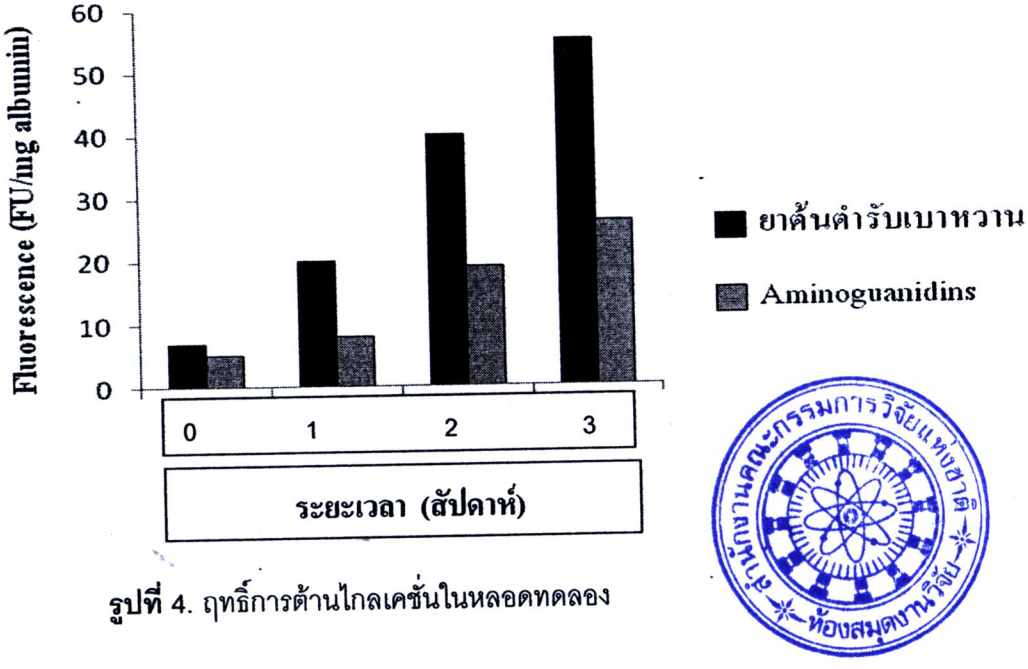
ปิเปตสารละลาย Gallic acid มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 100, 50, 25, 12.5, และ 6.25 ppm อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin- Ciocalteus reagent 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน Gallic acid

ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin- Ciocalteus reagent 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย sodium carbonate 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid เพื่อหาความเข้มข้นของ phenolic compoundในสารสกัดที่ทดลอง

1.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดไกลเคชั่น

การทดสอบฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานโดยการทดสอบสารสกัดตำรับยาเบาหวานในหลอดทดลอง(*in vitro*) สารที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน โดยการทำปฏิกิริยาของสารคือ bovine serum albumin (BSA) กับ D-fructose ใน potassium phosphate buffer (pH 7.4) บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การทดสอบทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย

เครื่อง spectrofluorometer มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น excitation ; 370 nm และ emission; 440 นาโนเมตร และใช้ Aminoguanidine เป็นตัวเปรียบเทียบในการยับยั้งไกลเคชั่น ความสามารถในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นคำนวณได้จาก Inhibition (เปอร์เซ็นต์) = 100-[fluorescence intensity (sample) - fluorescence intensity (blank of sample)] × 100 / [fluorescence intensity (control) –fluorescence intensity (blank of control) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4. ฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นในหลอดทดลอง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1. 4 การวิเคราะห์ปริมาณ Total flavonoid

ปิเปตสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 2.25 มิลลิลิตรและ สารละลาย $NaNO_2$ (5%) 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย $AlCl_3.6H_20$(10%) 0.3 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 5นาที แล้วเติมสารลาย NaOH (1 M)1มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน rutin เพื่อหาความเข้มข้นของ flavonoid ในสารสกัดที่ทดลอง

1.5 การวิเคราะห์สารหอมระเหยโดยใช้ GC–MS

นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผง 0.2 กรัม ใส่ในขวด vials จากนั้นปิดฝาขวดด้วย aluminium–rubber septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค headspace sampling การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS รุ่น -QP2010 (Shimadzu, Japan) ตัวอย่างจะถูกแยกใช้คอลัมน์ Rtx-5Ms (5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane, 30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness; Restek, U.S.) and Rtx-5 (5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane, 30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness; Restek, U.S.). แก๊สตัวพาได้แก่ helium; constant pressure, 134.2 kPa;

injector temperature, 250 °C (apolar column) or 230 °C (polar column); split ratio, 1:5; temperature program, 80 to 250 °C at 10 °C /min then held isothermal (2 min) at 250 °C (a polar column) or 220 °C (polar column); ion source temperature, 200 °C; transfer line temperature, 250 °C (apolar column) or 230 °C (polar column); ionization energy, 70 eV; electron ionization mass spectraอยู่ในช่วง 35-550 u.

ตาราง 3. สารประกอบฟีนอลิครวม, ฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activities และ FRAP ของสารสกัดยาตำรับเบาหวาน

TPC (mg gallic acid equivalent/g)	TFC (mg rutin equivalent/g)	FRAP (mmol $FeSO_4$/g)	DPPH (%inhibition)	IC50 (mg/ml)
20.29±1.02	29.18±0.41	2.91±0.06	79.32±0.25	3.19±0.03

TPC= สารประกอบฟีนอลิครวม

TFC= สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

ตารางที่ 4. สารประกอบหอมระเหย (%) ในสารยาตำรับเบาหวาน

No.	RT	Compounds	% area
1	0.991	Dimethylamine	34.04±0.18
2	1.186	Isovaleraldehyde	34.02±0.14
3	1.233	Actylol	1.96±0.03
4	1.317	2-Ethyl-3-methyl-1-pentene	2.39±0.07
5	1.399	2,3-Dihydroxybutane	4.48±0.09
6	1.468	Dihydro-2-methyl-3-furanone	1.23±0.03
7	1.555	2-Furaldehyde	2.07±0.05
8	1.626	Furfuralcohol	2.86±0.08
9	1.804	Gamma-butyrolactone	0.97±0.02
10	2.791	Benzeneeacetaldehyde	0.49±0.01
11	2.892	Methyl pyrrol-2-yl ketone	1.62±0.07
12	3.767	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	4.30±0.08
13	4.587	Dihydrocoumarone	3.69±0.07
14	5.753	4-vivyl-2-methoxy-penol	1.44±0.03
15	8.008	Curcumene	0.59±0.01
16	11.333	Tetradecamethylhexasiloxane	2.97±0.02
17	11.963	Diisobutyl phthalate	1.03±0.04

Values are expressed as means ± standard deviation (n = 3).

1.6 การอภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของยาต้นตำรับเบาหวาน โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging activity and FRAP เปรียบเทียบกับ BHT และ วิตามินซีพบว่า สารสกัดจากยาต้นตำรับเบาหวานมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity คิดเป็น 79.32 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า IC_{50} เป็น 3.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับวิตามินซี มีค่า IC_{50} 16.75 μg/ml และ วิตามินอี มีค่า IC_{50} 25.69 μg/ml ส่วนวิธี FRAP ซึ่งเป็นวิธีหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระรวม โดยมีหลักการว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเลคตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอกซิเดชัน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (โอภา วัชระคุปต์, 2549) จากผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TRTZ เป็น Fe^{2+}-TPTZ ของสารสกัดยาต้นตำรับเบาหวานมีความสามารถ 2.91 mmol $FeSO_4$/g สำหรับวิตามินซี มีความสามารถในการรีดิวซ์ 7.54 mmol $FeSO_4$/g

การศึกษาผลของฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นหรือปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานในหลอดทดลองของสารสกัดจากตำรับเบาหวาน เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการต้านไกลเคชั่นดีได้ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Aminoguanidine

จากการวิเคราะห์สารหอมระเหยพบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 17 ชนิดที่สามารถจำแนกได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยพบว่า Dimethylamine และ Isovaleraldehyde พบมากที่สุด 34.04% และ 34.02% ตามลำดับ

1.7 เอกสารอ้างอิง

1. โอภา วัชระคุปต์. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พริ้นท์. 200 หน้า.
2. Abu Bakar, M.F., Mohamed, M., Rahmat, A., & Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry, 113*, 479–483.
3. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239*, 70–76.
4. Duh, P. D., Du, P. C., & Yen, G. C. (1999). Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology, 37*, 1055–1061.
5. Hülya Orák , H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, olyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae , 111*, 235–241.

6. Konczak, I., Zabaras, D., Dunstan, M., & Aguas, P. (2010). Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. *Food Chemistry, 122,* 260–266.

7. Miean, H.K. & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106-3112.

8. Naik, G. H., Priyadarsini, K. I., Satav, J. G., Banavalikar, M. M., Sohoni, P. P., Biyani, M. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbalcomponents used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry, 63,* 97–104.

9. Naowaboot, J., Pannangpetch, P., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Nakmareong, S., Itharat, A., 2009. Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. Nutr Res. 29, 602-608.

10. Sakanaka, S., Tachibana,Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry, 89,* 569–575.

VII. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

1. จุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* และ*Bacillus cereus* ส่วน เชื้อยีสต์ คือ *Candida albicans*

2. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* และ *Candida albicans* เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth และ Potato dextrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย มาตรฐาน McFarland scale 0.5 โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ cotton swab จุ่มสารแขวนลอยของเชื้อที่เจือจาง ป้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agars เป็น 3 ระนาบ (three-dimension swab) ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารที่ป้ายเชื้อแห้ง จากนั้นใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบแผ่น disc 1 แผ่น จุ่มลงในสารที่ต้องการทดสอบ แล้วนำ disc ไปวางบนผิวอาหารที่แห้ง จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้ววัดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยดูวงใส (Inhibition zone หรือ clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3. ผลการทดสอบ

สารที่ได้ไม่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ