

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อัน
เนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -Glucosidase ปีที่ 2

Screening of anti-diabetic activity of medicinal plants in the Plant Genetic
Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness
Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory activity of
 α -glucosidase enzyme

คณะผู้ดำเนินงาน
รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวช และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

จากการนำสารสกัดพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จำนวน 19 ตัวอย่าง 18 ต้น นำมาหาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) พบว่าพืช ที่มีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด 5 อันดับแรก คือ ขันทองพยาบาท, เกล่ง หยี, อบเชยเทศ, ก้างปลาและกระพี้จั่น (2.48, 3.28, 3.32, 3.38 และ 3.39 มคก.ต่อมล. ตามลำดับ) ได้คัดเลือกเปลือกต้นเกล่งหรือหยี นำมาสกัดแยกสารด้วยวิธี Bioassay guided fractionation สามารถแยกสารได้ 3 สาร คือ สาร DC-1, DC-2 และ DC-3 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทั้งสาม พบว่า สารทั้งสาม คือ friedelin, β -Sitosterol และ palmitic acid โดยเทียบกับข้อมูล ¹H-NMR และ ¹³C-NMR spectra ของสารนั้นๆ ได้รายงานมาแล้ว จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase พบว่า friedelin และ β -Sitosterol มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เป็น 32.5 และ 76.3 ตามลำดับ

คำสำคัญ การสกัดแยกสาร, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -Glucosidase, Bioassay guided fractionation, พื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

Abstract

Extracts of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri from 18 plants, 19 samples show high α -glucosidase inhibitory activities, were measured for 50% inhibitory concentration (IC_{50}). The five least IC_{50} plants are *Suregada multiflorum* (A.Juss.) Baill., *Dialium cochinchinense* Pierre, *Cinnamomum zeylanicum*, *Bridelia affinis* Craib, *Millettia brandisiana* Kurz (2.48, 3.28, 3.32, 3.38 and 3.39 μ g/ml, respectively). *Dialium cochinchinense* Pierre was selected for extraction and isolation by using bioassay guided fractionation, 3 compounds, DC-1, DC-2, DC-3 were isolated. Structure elucidation of these compounds (using 1H -NMR and ^{13}C -NMR spectral data compare to the previous reports) show that DC-1, DC-2, DC-3 are friedelin, β -Sitosterol and palmitic acid, respectively. The percent inhibition of α -glucosidase enzyme of friedelin and β -Sitosterol are 32.5 and 76.3, respectively.

Keyword: screening, extraction, isolation, α -Glucosidase inhibitor, Bioassay guided fractionation, the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วิธีดำเนินการศึกษา.....	5
ผลการศึกษา.....	7
สรุปและวิจารณ์ผล.....	24
เอกสารอ้างอิง.....	26
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	30

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 1	แสดงพีชสมุนไพรมะพร้าวที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นบวก และผล การทดสอบแทนนิน.....	7
ตารางที่ 2	แสดงผลค่า IC_{50} ของสารสกัดพืช ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 90 % และไม่มีสารแทนนิน จำนวน 19 ตัวอย่าง 18 ต้น.....	9
ตารางที่ 3	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ ชั้นทองพญาบาท – ใบ.....	9
ตารางที่ 4	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ เกล้ง – เปลือก.....	10
ตารางที่ 5	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ อบเชยเทศ – เปลือกใน.....	11
ตารางที่ 6	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ ก้างปลา – ใบ.....	11
ตารางที่ 7	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ กระจับปี่จั่น – ใบ.....	12
ตารางที่ 8	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ เหมือดแอ – ใบ.....	13
ตารางที่ 9	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ ก้างปลา สามพันตา – ใบ.....	13
ตารางที่ 10	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC_{50} ของ เข็มขาว – ใบ.....	14
ตารางที่ 11	การแยกสิ่งสกัดยาบ EtOAc จากเปลือกหอย ด้วย quick column.....	16
ตารางที่ 12	Fraction รวมที่ได้จากการแยกสิ่งสกัดยาบ EtOAc ด้วย quick column.....	16
ตารางที่ 13	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E2.....	17
ตารางที่ 14	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E3.....	18
ตารางที่ 15	ข้อมูล 1H -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล 1H -NMR spectra ของ friedelin.....	19
ตารางที่ 16	ข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของ friedelin.....	20
ตารางที่ 17	ข้อมูล 1H -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-2) เปรียบเทียบกับข้อมูล 1H -NMR spectra ของ β -sitosterol.....	21
ตารางที่ 18	ข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-2) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของ β -sitosterol.....	22
ตารางที่ 19	ข้อมูล 1H -NMR และ ^{13}C -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-3).....	23

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้น ชั้นทองพยับบาท (<i>Suregada multiflorum</i> (A.Juss.) Baill.) – ใบ..... 10
ภาพที่ 2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเซลล์ (<i>Dialium cochinchinense</i> Pierre) – เปลือก..... 10
ภาพที่ 3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นอบเชยเทศ (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) – เปลือกใน..... 11
ภาพที่ 4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นก้างปลา (<i>Bridelia affinis</i> Craib) – ใบ..... 12
ภาพที่ 5	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นกระพี้จั่น (<i>Millettia brandisiana</i> Kurz.) – ใบ..... 12
ภาพที่ 6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเหมือดแอ (<i>Memecylon pauciflorum</i> Blume) – ใบ..... 13
ภาพที่ 7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นก้างปลา สามพันตา (<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.) – ใบ..... 14
ภาพที่ 8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเข็มขาว (<i>Chassalia curviflora</i> (Wall.)Thw.) – ใบ..... 14
ภาพที่ 9	สูตรโครงสร้างของ friedelin..... 19
ภาพที่ 10	สูตรโครงสร้างของ β -sitosterol..... 21
ภาพที่ 11	สูตรโครงสร้างของ palmitic acid..... 22

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AGH	=	α -glucosidase inhibitors
α	=	alpha
β	=	beta
¹³ C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
DMSO	=	dimethylsulphoxide
EtOAc	=	ethyl acetate
EtOH	=	ethyl alcohol, ethanol
¹ H-NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
IC50	=	50% inhibitory concentration
MeOH	=	methyl alcohol, methanol
μ g/ml	=	microgram per milliliter
mg/ml	=	milligram per milliliter

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α - Glucosidase ปีที่ 2

(ภาษาอังกฤษ) Screening of anti-diabetic activity of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory activity of α - glucosidase enzyme

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล

ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Associate Professor Dr. Surattana Amnuoyopol

ภาควิชาเภสัชวิทยาและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phayathai road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากสถานการณ์โลกปัจจุบันพบว่า มีประชากรที่ป่วยด้วยโรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เพิ่มขึ้น และเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก จากรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขเมื่อปี พ.ศ.2547 พบว่ามีประชากรไทยป่วยด้วยโรคเบาหวานถึง 1,500,000 คน หรือประมาณร้อยละ 6 ของประชากร สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ประชาชนในประเทศ มีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่มีเนื้อสัตว์และไขมันสูง อาหารแป้งและน้ำตาลสูง รสหวานจัด ทำให้เกิดโรคอ้วนและเป็นผลให้เกิดโรคเบาหวานได้

เบาหวานเป็นกลุ่มอาการที่ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง สืบเนื่องมาจากการที่ผู้ป่วยมีระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดต่ำ หรือเนื้อเยื่อต่างๆมีการตอบสนองต่ออินซูลินน้อยลง (Diatewa , 2004) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาแต่ไม่สามารถควบคุมน้ำตาลในเลือดให้ปกติโดยสม่ำเสมอได้ อาจก่อให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดเล็กๆ ที่ไปเลี้ยงยังอวัยวะต่างๆ เช่นไต ตา ปลายมือ ปลายเท้า ทำให้มีอาการแทรกซ้อนของระบบหัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง หลอดเลือดหัวใจตีบตัน ตามัวถึงตาบอด หลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงตามปลายมือปลายเท้าอุดตัน ทำให้เกิดแผลเน่า ไตเสื่อมสภาพจนเกิดไตวาย และยังมีผลลดสมรรถภาพทางเพศในผู้ชายอีกด้วย (Hardman, 2002 และ Huang, 2005)

ปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยเบาหวานถึงร้อยละ 70 – 80 เป็นเบาหวานชนิด Insulin resistance diabetes mellitus คือผู้ป่วยสามารถสร้างอินซูลินได้ แต่เนื้อเยื่อในร่างกายมีความไวหรือมีการตอบสนองต่ออินซูลินที่ลดลง ทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินในการที่จะไปเพิ่มการดูดกลับกลูโคสจากกระแสเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อลดลง ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ดังนั้นยาในกลุ่มหลังที่มีกลไกในการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อโดยเฉพาะบริเวณกล้ามเนื้อให้ตอบสนองต่ออินซูลินได้เพิ่มขึ้นและเพิ่มการใช้กลูโคสโดยเพิ่มการดูดกลับของกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อไปสร้างเป็นพลังงานในกระบวนการหายใจนั้น น่าจะเป็นกลุ่มยากลุ่มใหม่ที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้ (Purintrapibon, 2003) แต่ปัญหาของการใช้มีบ้าง ได้แก่ การมีข้อจำกัดในการใช้ มีราคา

แพง และอาจมีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาโดยอาจทำให้ระดับคลอเลสเทอรอลในเลือดผิดปกติไป มีผลกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ผลต่อตับและไต (Hudson, 2002)

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมียาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานหลายกลุ่ม แต่ยังมีผู้ป่วยบางส่วนที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ และมีความจำเป็นต้องใช้ยาหลายกลุ่มร่วมกันในการชะลอการดำเนินไปของโรค สำหรับยากลุ่ม α -glucosidase inhibitors จะมีกลไกการทำงานโดยการขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ในการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลที่บริเวณลำไส้เล็ก โดยในภาวะปกติเอนไซม์ α -glucosidase จะทำหน้าที่ในการย่อยแบ่งหรือน้ำตาลโมเลกุลสายสั้นและน้ำตาลโมเลกุลคู่ ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อให้สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ โดยในผู้ป่วยโรคเบาหวาน การเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหาร (postprandial plasma glucose) อย่างสูงในเวลารวดเร็ว จะมีผลต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน ดังกล่าวข้างต้น (Lebovitz, 1997)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาที่ใช้ในการรักษาเบาหวานที่ใช้ในปัจจุบันมีกลไกในการออกฤทธิ์หลายกลไก เช่น กลุ่มยาที่มีการออกฤทธิ์บริเวณตับ โดยไปยับยั้งการสร้างกลูโคส และยับยั้งการสลายไกลโคเจนไปเป็นกลูโคสบริเวณตับ หรือยาที่ออกฤทธิ์บริเวณเซลล์ไขมัน โดยลดการเปลี่ยนไขมันเป็นพลังงานแล้วส่งไปยังตับเพื่อใช้ในกระบวนการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) (สังวรินทร์, 2539) รวมทั้งยาที่ออกฤทธิ์โดยเพิ่มการใช้กลูโคสโดยเพิ่มการดูดกลับของกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อไปสร้างเป็นพลังงานในกระบวนการหายใจ

ยังมียาอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้ต้านเบาหวานได้ ซึ่งจะลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยการออกฤทธิ์เฉพาะที่ โดยไปยับยั้งการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดบริเวณลำไส้เล็ก ได้แก่ ยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -Glucosidase หรือที่เรียกว่า glucosidase inhibitor ดังนั้นเอนไซม์ α -Glucosidase จึงถูกนำมาใช้เป็นวิธีหนึ่งในการคัดกรอง (screening) เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ได้มีรายงานการวิจัยสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เช่น *Aegle marmelos* (มะตูมการศึกษาสารสกัดจากใบมะตูม (*Aegle marmelos*) พบว่าสาร anhydroaegeline ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Phenylethyl cinnamides เป็นสารที่มีฤทธิ์แรงที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase (Phuwa praisirisan และคณะ, 2008)

รายงานการวิจัยสารสกัดจาก *Alstonia scholaris* (พญาสัตบรรณ) การศึกษาพืชสมุนไพรไทย 24 ชนิด พบว่าสารสกัด quercetin 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2 \rightarrow)- β -D-galactopyranoside และ (-)-lyoniresinol 3-O- β -D-glucopyranoside จากใบพญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris*) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase แรงที่สุด (Jong-Anurakkun และคณะ, 2007) *Rhus chinensis* (มะเหลียมหิน) การศึกษาสารสกัดจากผลมะเหลียมหิน (*Rhus chinensis*) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เมื่อทดสอบในหลอดทดลอง และเมื่อให้สารสกัดนี้ในหนูร่วมกับน้ำตาล sucrose พบว่ามีการลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ (Shim และคณะ, 2003) รวมถึง *Adhatoda vasica* (เสนียด) (Gao และคณะ, 2008), *Coscinium fenestratum* (แห้ม) (Yibchok-anun และคณะ, 2009), และ *Terminalia chebula* (สมอไทย) (Gao และคณะ, 2007)

ประเทศไทยเป็นแหล่งของพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด และมีการนำพืชพื้นบ้านไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน เช่น บอระเพ็ด มะแว้ง หมากดิบน้ำค้าง หว่า เตื่อย ใบสัก ใบผักเป็ด มะระขี้นก (Grover และ Yadav, 2004), อินทนิลน้ำ (Passwater, 2003) และสมุนไพรอื่นๆ ซึ่งสมุนไพรส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาลในเลือด (วันดี กฤษณพันธ์ และ พิรณช มังมีศรี, 2552) อย่างไรก็ตามได้มีการวิจัยสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase งานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาใน

ต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากพืชสมุนไพรในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างพืชสมุนไพรในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ซึ่งได้ผ่านการคัดกรองจากโครงการวิจัยนี้ เมื่อปีที่แล้ว และพบว่ามีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้แก่ ชันทองพยาบาท, เอลง หยี, อบเชยเทศ, ก้างปลาและกระพี้จั่น และได้คัดเลือกเปลือกต้น เอลงหรือหยี นำมาสกัดแยกสาร ควบคุมไปกับการทดสอบฤทธิ์ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคเบาหวานตัวใหม่ต่อไป

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอลงหรือหยี *Dialium cochinchinense* Pierre วงศ์ Fabaceae – Caesalpinoidae ผลของพืชสกุลนี้ ใช้เป็นอาหาร มีรสเปรี้ยว ไทยนิยมนำมาคลุกกับน้ำตาล และพริก แต่จากการสืบค้น ยังไม่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้าน แต่พืชในสกุลเดียวกัน ได้แก่ *Dialium guineense* (Wild) หรือ Velvet tamarind มีรายงานการใช้ยาพื้นบ้าน สารสำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

ใบและเปลือกต้น มีการใช้เป็นยาพื้นบ้าน ใช้ในโรคติดเชื้อหลายชนิด เช่นท้องเสีย อากาศไอที่รุนแรง หลอดลมอักเสบ แผลที่มีการติดเชื้อ ไข้มาเลเรีย ดีซ่าน แผลในกระเพาะอาหาร และโรคจิตตีดวงทวาร (Bero และคณะ, 2009, Lawal และคณะ, 2010, Hermans และคณะ, 2010, David และคณะ, 2011) ส่วนสารสำคัญที่มีรายงาน พบว่ามีสารกลุ่ม polyphenols ซึ่งจากการตรวจสอบ พบว่ามีทั้ง flavonoids และ tannins (Lamien-Meda และคณะ, 2008) สกัดและตรวจหาปริมาณ total phenolic และ flavonoid พร้อมทั้งการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของผลพืชที่กินได้ จำนวน 14 ต้น จาก Burkina Faso ซึ่ง *Dialium guineense* (Wild) มีปริมาณสาร และฤทธิ์ไม่มากนัก ต่อมา Odukoyo และคณะ, 2009 รายงานการสกัดสารจากพืชที่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรคตีดวงทวาร พบว่า *Dialium guineense* (Wild) มี total phenolic, flavonoids และ tannins ปริมาณสูง ออกฤทธิ์ฝาดสมาน (astringent) flavonoids และ tannins ออกฤทธิ์สมานแผลให้หาย และทำให้หลอดเลือดแข็งแรง ไม่เปราะแตกง่าย Ezeja และคณะ, 2011 รายงานการสกัดเปลือกต้นด้วย methanol ทำการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธีทางเภสัชวิทยาพบว่าออกฤทธิ์แก้ปวดได้

ในส่วนของสารสำคัญที่พบในพืชต้นนี้ มีรายงานการคัดกรองกลุ่มสารที่พบ ได้แก่ flavonoids, tannins, saponins, alkaloids, cardiac glycosides และ steroids (David และคณะ, 2011) รวมถึงการรายงานฤทธิ์ antimicrobial โดยเฉพาะ antivibrio หลายสายพันธุ์ สารสกัดจากผลและใบ สามารถแยกสารกลุ่ม saponins ชนิด triterpenoid glycosides ได้ 4 สาร ซึ่งมีฤทธิ์ molluscicidal (Odukoya และคณะ, 1996)

จากการทบทวนงานวิจัยของพืชสกุลนี้ ยังไม่พบรายงานการออกฤทธิ์ต้านเบาหวาน โดยเฉพาะต้น เอลง หยี ยังไม่มีรายงานทางพิษเภสัชเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากพืชสมุนไพรในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ที่บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี และ เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี มาหาค่า IC₅₀ และคัดเลือกพืชที่จะนำมาแยกสกัดหาสารที่ออกฤทธิ์ เก็บพืชที่คัดเลือกได้ นำมาสกัด แยกสารสำคัญ โดยวิธี bioassay guided fractionation

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) มีความรู้ความเข้าใจในวิธีการนำสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay) โดยเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase
- 2) นำผลที่ได้จากการทดลองไปต่อยอดองค์ความรู้ เกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase แยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาเป็นยาสำหรับโรคเบาหวาน
- 3) ตระหนักในความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสมุนไพรไทย และมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานในกลไกด้านอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อการค้นพบยาใหม่จากทรัพยากรในประเทศ

วิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

Rotary Evaporator	Water bath
Spectrophotometer	TLC tank
Microcentrifuge	Fluorometer
Microplate reader	Incubator 37 →C
Column chromatography	

วิธีการศึกษา

- นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่เก็บจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี และเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 70 % ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ มาทดสอบสารกลุ่มแทนนิน โดยแบ่งสารแต่ละตัวอย่างเป็น 3 ชุด ดังนี้
 - หลอดที่ 1 หลอดควบคุมการดูสีของสาร (control)
 - หลอดที่ 2 เติมสารละลาย gelatin ผลบวกคือเกิดตะกอนขุ่นขาว
 - หลอดที่ 3 เติมสารละลาย lead acetate ผลบวกคือเกิดตะกอนของโลหะหนัก
 โดยจะสรุปว่าสารสกัดจากพืชมีสารกลุ่มแทนนินเมื่อให้ผลการทดสอบเป็นบวก ทั้งในหลอดที่ 2 และ 3

2) ขั้นตอนการหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) จากสารสกัดพืช

2.1 คัดเลือกสารสกัดที่ได้ทำการทดลองไปในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ ซึ่งใช้ความเข้มข้นที่ 2 mg/ml หรือความเข้มข้นสุดท้าย 200 $\mu\text{g/ml}$ ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 90% แล้วได้ผลการทดสอบแทนนินเป็นลบ เจือจางสารสกัดพืชจากความเข้มข้น 2 mg/ml ลงทีละ 5 เท่า 4 ครั้ง ซึ่งเตรียมได้สารสกัดความเข้มข้นต่างๆดังนี้

- ความเข้มข้น 0.4 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 40 $\mu\text{g/ml}$) นำสารละลายความเข้มข้น 40 mg/ml 4 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 76 ไมโครลิตร และ 5% DMSO 320 ไมโครลิตร
- ความเข้มข้น 0.08 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 8 $\mu\text{g/ml}$) นำสารสกัดความเข้มข้น 0.4 mg/ml 80 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% DMSO 320 ไมโครลิตร
- ความเข้มข้น 0.016 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.6 $\mu\text{g/ml}$) นำสารสกัดความเข้มข้น 0.08 mg/ml 80 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% DMSO 320 ไมโครลิตร
- ความเข้มข้น 0.0032 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.32 $\mu\text{g/ml}$) นำสารสกัดความเข้มข้น 0.016 mg/ml 80 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% DMSO 320 ไมโครลิตร

2.2 ทำการทดลองด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในขั้นก่อนหน้า แล้วหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆจะได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดในความเข้มข้นที่เจือจางลง 4 ครั้ง รวมกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทั้งหมด 5 ค่า นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย ($\mu\text{g/ml}$) กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ 50% (IC_{50})

- คัดเลือกพืชที่มีค่า IC_{50} ต่ำ ซึ่งแสดงว่ามีฤทธิ์ดี เพื่อไปเก็บพืชสมุนไพรในปริมาณที่มากพอสำหรับการนำไปสกัดและแยกสารสำคัญ

นำพืชสมุนไพร ที่เก็บได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จนได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบมาแยก โดยใช้เทคนิคทาง chromatography

- 4) แยกสารสำคัญ โดยอาศัยวิธี Bioassay-guided fractionation คือ การแยกสารสกัดหยาบ ออกเป็นส่วนๆ (fraction) โดยใช้วิธีการทาง chromatography แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนใดมีฤทธิ์ จะนำมาทำการแยกสารต่อ เพื่อให้มั่นใจว่าสารที่แยกได้นั้น มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามที่ต้องการจริง
- 5) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาข้อมูลทาง spectrophometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -Glucosidase
- 6) อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

คัดเลือกเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกษะแสมสาร จังหวัดชลบุรี นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

1. นำสารสกัดพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 70% จำนวน 31 ตัวอย่าง 23 ต้น นำมาทดสอบว่ามีสารแทนนินอยู่หรือไม่ (เนื่องจากสารแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ ซึ่งทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ ผลการทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงพืชสมุนไพรที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นบวก และผลการทดสอบแทนนิน

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	ชื่อวิทยาศาสตร์	%inhibition	tannin test
1	อบเชยจีน	เปลือกต้น	<i>Cinnamomum cassia</i>	106.52	+
2	เกด	ใบ	<i>Manilkara hexandra</i> (Roxb.) Dub.	105.96	+
3	กระเจียน	เปลือก	<i>Polyalthia cerasoides</i> (Roxb.) Benth.	104.68	+
4	ตัวขน ตัว	ใบ	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack.) Dyer.	104.1	-
5	อบเชยเทศ	เปลือกใน	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	104.03	-
6	ชันทอง	กิ่ง	<i>Suregada multiflorum</i> (A.Juss.) Baill.	103.89	-
7	พลองเหมือด	กิ่ง	<i>Memecylon edule</i> Roxb.	103.8	+
8	ตัวขน ตัว	กิ่ง	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack.) Dyer.	103.4	-
9	เข็มขาว	ใบ	<i>Chassalia curvifolia</i> (Wall.)Thw.	103.04	-
10	กระพี้จั่น	กิ่ง	<i>Millettia brandisiana</i> Kurz.	101.18	-
11	สามพันตา	ใบ	<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.	100.86	-
12	เขลง	เปลือก	<i>Dialium cochinchinense</i> Pierre	100.51	-
13	แกแลหนามเข	ใบ	<i>Maclura cochinchinensis</i> (Lour.) Corner	100.35	-
14	กระเจียน	ใบ	<i>Polyalthia cerasoides</i> (Roxb.) Benth.	100.07	-
15	ลำป้าง	ใบ	<i>Pterospermum littorale</i> Craib	99.96	n/a
16	เหมือดแอ	ใบ	<i>Memecylon pauciflorum</i> Blume	99.84	-
17	พลองใบรี	ใบ	<i>Mamecylon plebejum</i> Kurz. var.	99.67	-
18	อบเชยเถา	ใบ	<i>Atherolepis pierrei</i> Cost. var.	99.12	-
19	ชันทอง	ใบ	<i>Suregada multiflorum</i> (A.Juss.) Baill.	98.58	-
20	หนามเกี่ยวไก่	ใบ	<i>Capparis diffusus</i> Ridl.	97.79	n/a
21	ช่างน้ำว	กิ่ง	<i>Ochna integerrima</i> Merr.	97.74	-
22	สำเภา	เปลือก	<i>Chaetocarpus castanocarpus</i> (Roxb.) Thwaites	97.51	+
23	สามพันตา	ใบ	<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.	95.6	-
24	โพทะเล	ใบ	<i>Thespesia populnea</i> (L.) Soland.ex Corr.	94.65	-
25	ก้างปลา	ใบ	<i>Bridelia affinis</i> Craib	93.39	-
26	ตะขบป่า	ใบ	<i>Flacourtia indica</i> (Burm.f.) Merr.	93.3	-
27	สำเภา	ใบ	<i>Chaetocarpus castanocarpus</i> (Roxb.) Thwaites	92.61	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงพืชสมุนไพรที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นบวก และผลการทดสอบแทนนิน

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	ชื่อวิทยาศาสตร์	%inhibition	tannin test
28	ข่าน้ำว	ใบ	<i>Ochna integerrima</i> Merr.	92.17	-
29	กระพี้จั่น	ใบ	<i>Millettia brandisiana</i> Kurz.	91.77	-
30	โพทะเล	ผล	<i>Thespesia populnea</i> (L.) Soland.ex Corr.	90.95	n/a
31	ตีนตั่ง	ใบ	<i>Getonia floribunda</i> (Roxb.) Lam.	88.65	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบแทนนิน ,
 - หมายถึงไม่ให้ผลบวกในการทดสอบแทนนิน
 n/a หมายถึงพืชที่ไม่ได้ถูกนำมาทดสอบแทนนิน

2. ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 90 % และไม่มีสารแทนนิน จำนวน 19 ตัวอย่าง 18 ต้น นำมาหาค่า IC₅₀ โดยใช้สารสกัดพืชความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 4 ความเข้มข้น ผลการทดสอบตามตารางที่ 2, 3-10 และภาพที่ 1 – 8

พืช ที่มีค่า IC₅₀ ต่ำกว่า 10 μ g/ml เรียงจากค่าต่ำที่สุด ได้แก่

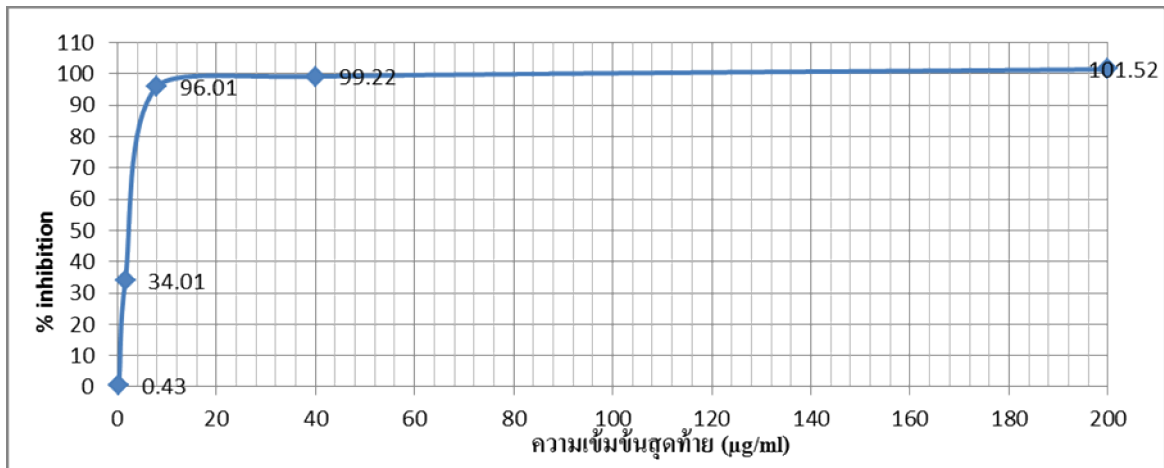
1	ชันทองพญาบาท	<i>Suregada multiflorum</i> (A.Juss.) Baill.	ใบ	2.48
2	เขลง หยี	<i>Dialium cochinchinense</i> Pierre	เปลือก	3.28
3	อบเชยเทศ	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	เปลือกใน	3.32
4	ก้างปลา	<i>Bridelia affinis</i> Craib	ใบ	3.38
5	กระพี้จั่น	<i>Millettia brandisiana</i> Kurz.	ใบ	3.39
6	เหมือดแอ	<i>Memecylon pauciflorum</i> Blume	ใบ	4.95
7	สามพันตา	<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.	ใบ	6.79
8	เข็มขาว	<i>Chassalia curviflora</i> (Wall.)Thw.	ใบ	8.02

ตารางที่ 2 แสดงผลค่า IC₅₀ ของสารสกัดพืช ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 90 % และไม่มีสารแทนนิน จำนวน 19 ตัวอย่าง 18 ต้น

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC ₅₀ (μ g/ml)
1	ชั้นทองพยับบาท	<i>Suregada multiflorum</i> (A.Juss.) Baill.	ใบ	2.48
2	เขลง หยี	<i>Dialium cochinchinense</i> Pierre	เปลือก	3.28
3	อบเชยเทศ	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	เปลือกใน	3.32
4	ก้างปลา	<i>Bridelia affinis</i> Craib	ใบ	3.38
5	กระพี้จั่น	<i>Millettia brandisiana</i> Kurz.	ใบ	3.39
6	เหมือดแอ	<i>Memecylon pauciflorum</i> Blume	ใบ	4.95
7	สามพันตา	<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.	ใบ	6.79
8	เข็มขาว	<i>Chassalia curviflora</i> (Wall.) Thw.	ใบ	8.02
9	อบเชยเถา	<i>Atherolepis pierrei</i> Cost. var.	ใบ	14.57
10	แกแลหนามเข	<i>Maclura cochinchinensis</i> (Lour.) Corner	ใบ	19.78
11	พลองใบใหญ่	<i>Memecylon ovatum</i> J.E.Smith	ใบ	21.15
12	สามพันตา	<i>Cleistanthus gracilis</i> Hook.f.	ใบ	22.98
13	พลองใบรี	<i>Memecylon plebejum</i> Kurz. var.	ใบ	23.29
14	ตี๋ขน ตี๋	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack.) Dyer.	ใบ	24.23
15	โพทะเล	<i>Thespesia populnea</i> (L.) Soland.ex Corr.	ใบ	25.18
16	กระเจียน	<i>Polyalthia cerasoides</i> (Roxb.) Benth.	ใบ	30.58
17	ช้างน้าว	<i>Ochna integerrima</i> Merr.	ใบ	33.69
18	ลำเภา	<i>Chaetocarpus castanocarpus</i> (Roxb.) Thwaites	ใบ	37.25
19	ตะขบป่า	<i>Flacourtia indica</i> (Burm.f.) Merr.	ใบ	95.59

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของ ชั้นทองพยับบาท – ใบ

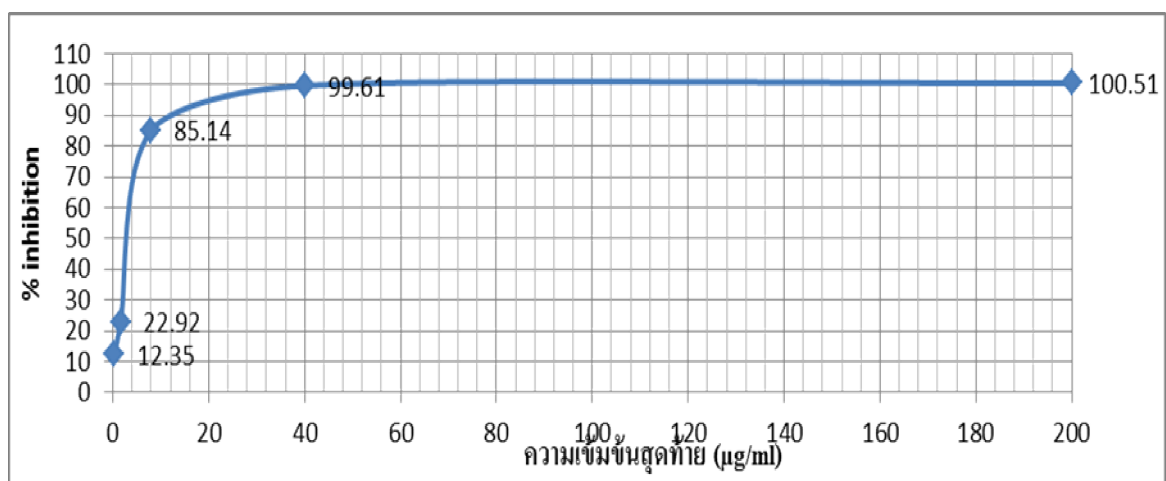
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (μ g/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	4.19	35.32	98.01	99.64	95.1
2	-1.07	33.13	97.28	98.59	99.84
3	-1.82	33.57	96.32	99.42	100.79
ค่าเฉลี่ย	0.43	34.01	96.01	99.22	98.58
SD	3.27	1.16	2.16	0.55	3.05
IC ₅₀	2.48				



ภาพที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นของพญาบาท (*Suregada multiflorum* (A.Juss.) Bail.) – ใบ

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของ เอลง – เปลือก

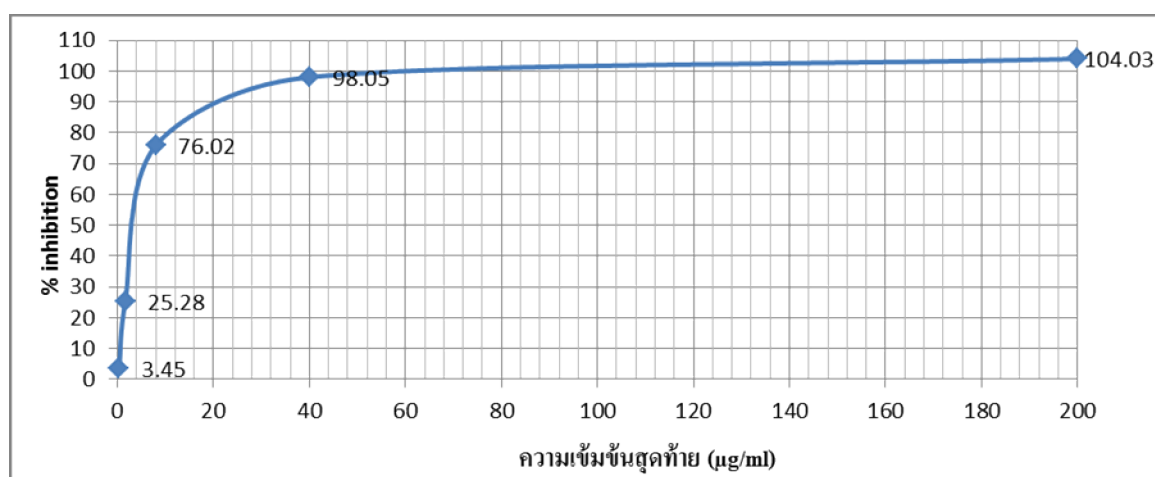
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	16.19	20.40	79.45	99.24	100.93
2	10.55	25.36	91.22	98.99	99.87
3	10.3	22.99	84.75	100.60	100.74
ค่าเฉลี่ย	12.35	22.92	85.14	99.94	100.51
SD	3.33	2.48	5.89	0.97	0.57
IC ₅₀	3.28				



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเอลง (*Dialium cochinchinense* Pierre) – เปลือก

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของอบเชยเทศ - เปลือกใน

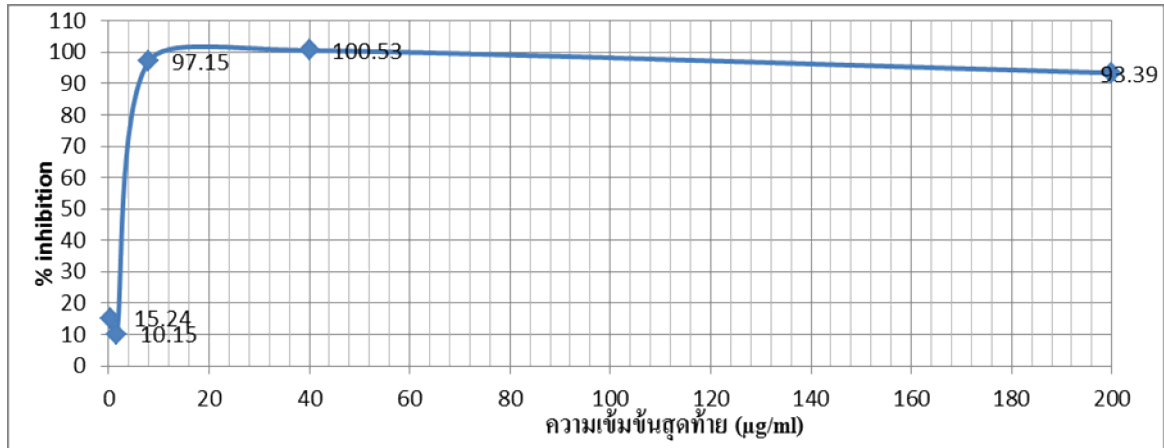
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	1.47	29.05	75.35	97.95	100.61623
2	4.56	21.71	75.78	98.59	111.08
3	4.32	25.09	76.94	97.62	100.38
ค่าเฉลี่ย	3.45	25.28	76.02	98.05	104.03
SD	1.72	3.68	0.82	0.49	6.11
IC ₅₀	3.32				



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นอบเชยเทศ (*Cinnamomum zeylanicum*) - เปลือกใน

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของก้างปลา - ใบ

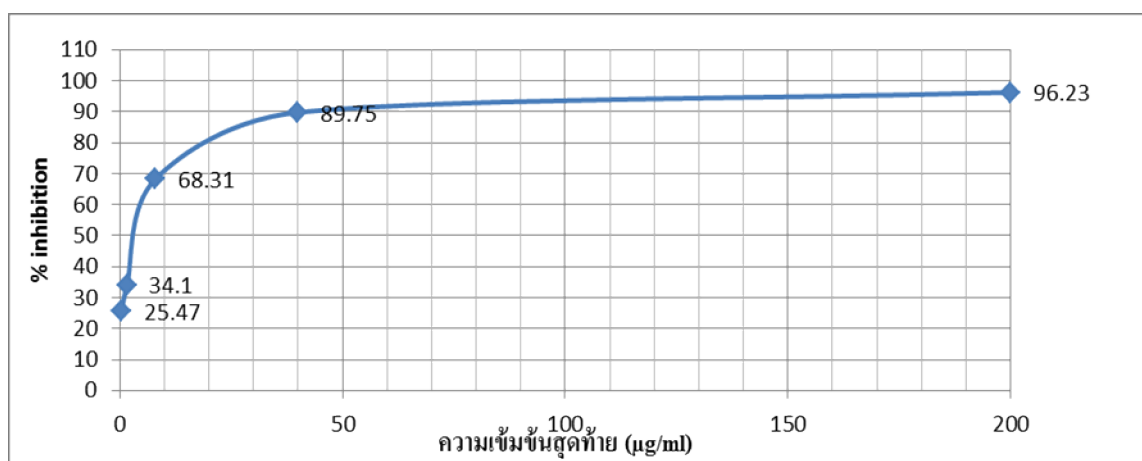
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	14.40	12.52	98.27	100.06	90.16
2	18.29	9.32	91.12	101.11	100.24
3	13.04	8.62	102.07	100.42	89.78
ค่าเฉลี่ย	15.24	10.15	66.43	100.53	93.39
SD	2.73	2.08	3.19	0.45	5.93
IC ₅₀	3.38				



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นก้างปลา (*Bridelia affinis* Craib) – ใบ

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของกระทิ์จัน – ใบ

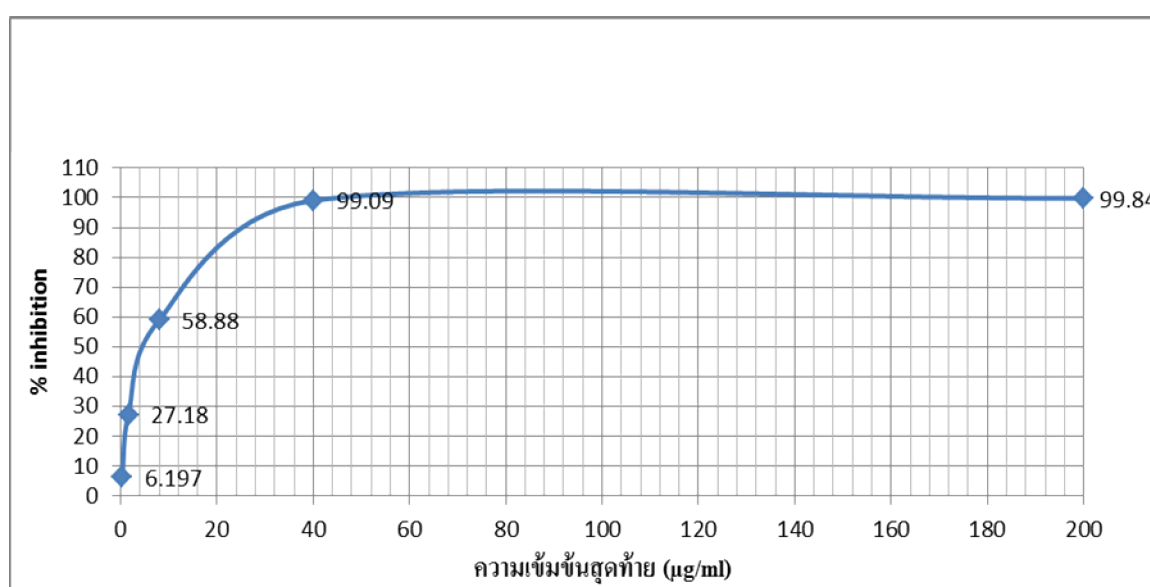
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (μg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	16.06	32.76	69.15	88.14	91.79
2	18.57	34.87	68.97	91.40	91.76
3	15.31	34.67	66.81	89.73	91.77
ค่าเฉลี่ย	25.47	34.1	68.31	89.75	91.77
SD	1.71	1.16	1.30	1.63	0.02
IC ₅₀	3.39				



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นกระทิ์จัน (*Millettia brandisiana* Kurz.) – ใบ

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของเหือดแอ - ใบ

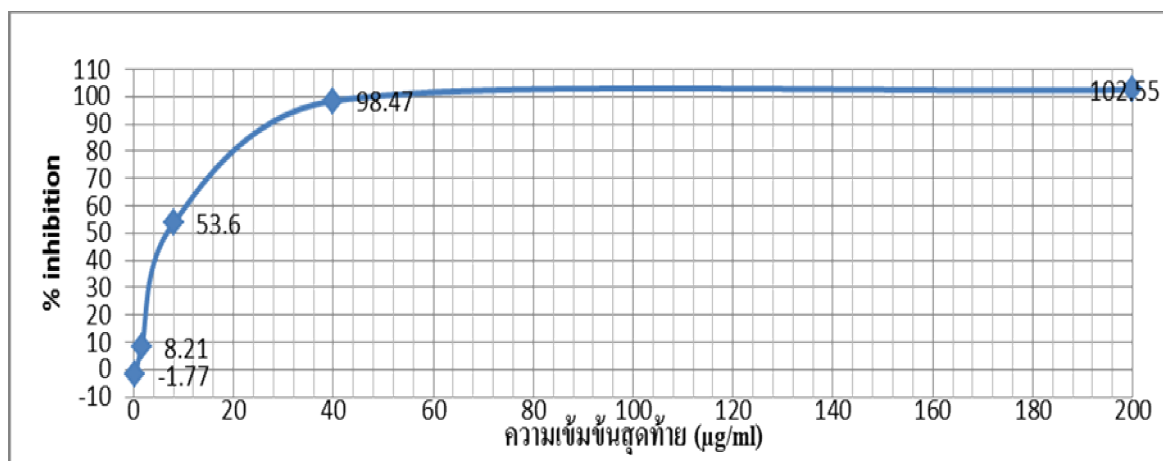
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	1.84	18.69	60.71	100.01	99.48
2	10.67	27.73	56.31	99.08	100.0186
3	6.08	35.13	59.62	98.16	100.0252
ค่าเฉลี่ย	6.20	27.18	58.88	99.09	99.84
SD	4.42	14.20	2.29	0.93	0.31
IC ₅₀	4.95				



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเหือดแอ (*Memecylon pauciflorum* Blume) - ใบ

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของก้างปลา สามพันตา - ใบ

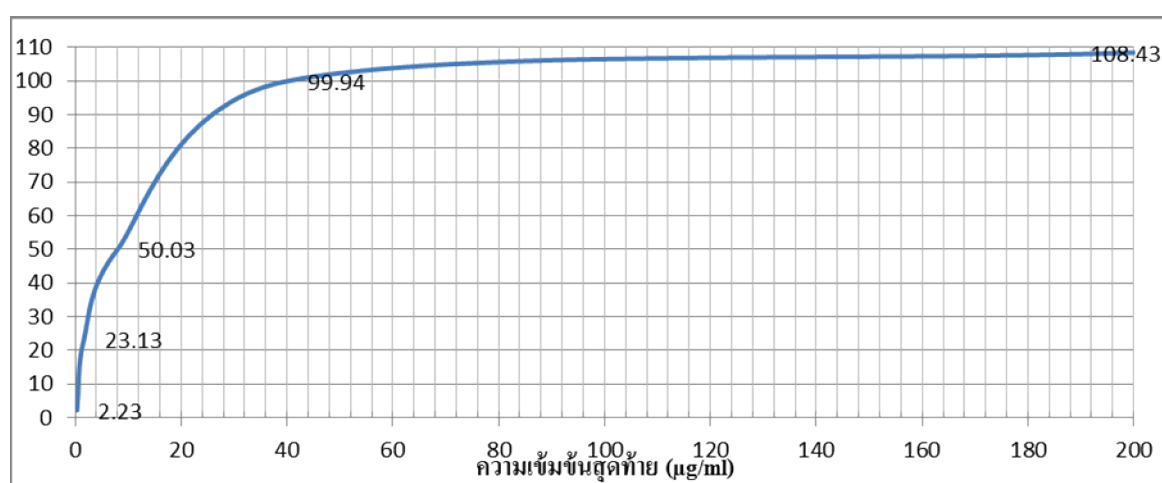
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	0.6	9.02	45.5	98.58	100.3
2	-2.82	8.87	59.01	97.33	98.62
3	-3.11	6.74	56.28	99.50	103.66
ค่าเฉลี่ย	-1.77	8.21	53.6	98.47	100.86
SD	2.06	1.28	7.14	1.04	2.57
IC ₅₀	6.79				



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นก้างปลา สามพัน ตา (*Cleistanthus gracilis* Hook.f.) – ใบ

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และค่า IC₅₀ ของ เข็มขาว – ใบ

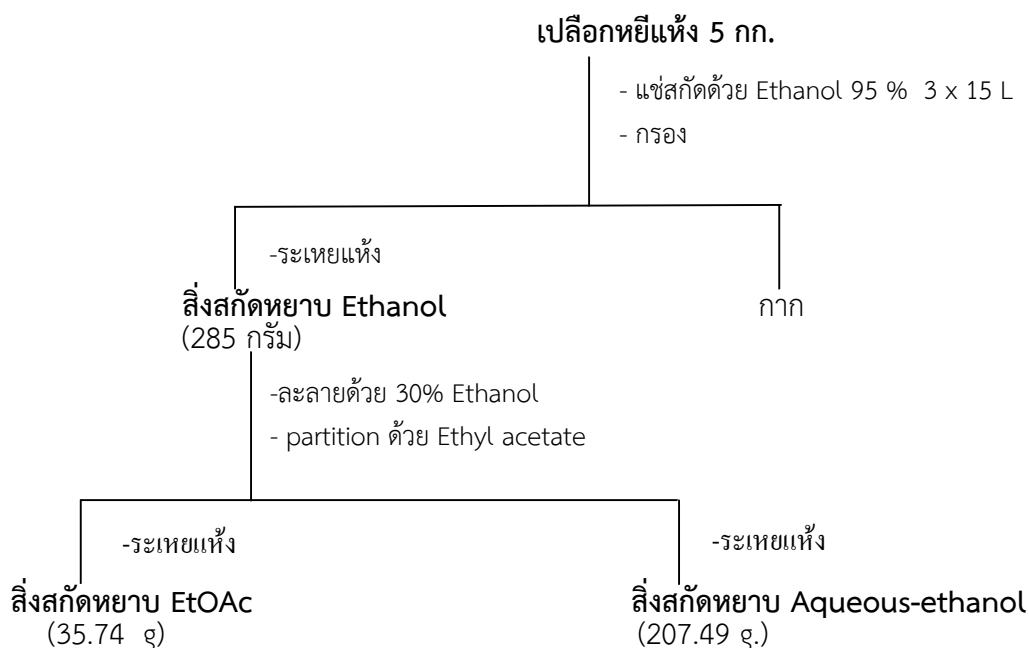
%inh	ความเข้มข้นสุดท้าย (μg/ml)				
	0.32	1.6	8	40	200
1	1.02	22.36	51.75	99.96	99.56
2	0.00	26.84	51.93	100.59	98.98
3	5.66	20.20	48.05	99.27	110.58
ค่าเฉลี่ย	2.23	23.13	50.03	99.94	103.04
SD	3.02	3.39	2.10	1.93	6.54
IC ₅₀	8.02				



ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AGH และความเข้มข้นเข็มขาว (*Chassalia curviflora* (Wall.) Thw.) – ใบ

3. จากพืชทั้ง 8 ต้น นำมาคัดเลือกพืชที่จะนำมาแยกสกัดต่อไป โดยทำการสืบค้นข้อมูลการทำวิจัยของพืชต่างๆเหล่านี้ พบว่าต้นชันทองพญาบาทมีการศึกษาวิจัยมีรายงานค่อนข้างมาก จึงคัดเลือกเปลือกต้นเขลงหรือหยาซึ่งเป็นพืชที่มีศักยภาพมีค่า IC50 ต่ำสุดเป็นอันดับถัดมา และเป็นพืชที่สามารถเก็บได้จากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกษะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในปริมาณที่มากพอสำหรับการสกัดแยกสารได้

4. นำเปลือกต้นเขลง หยา อบแห้ง บดหยาบน้ำหนัก 5 กิโลกรัม มาสกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตร 15 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ใช้เวลาในการแช่เป็นเวลานานครั้งละ 3-5 วัน จากนั้นทำการกรอง นำสิ่งสกัดที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบ Ethanol น้ำหนัก 285 กรัม จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบ Ethanol มาทำการสกัดต่อโดยการ partition กับ Ethyl acetate นำสารสกัดชั้น Ethyl acetate ที่ได้มารวมกัน นำไประเหยจนแห้ง ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบ Ethyl acetate น้ำหนัก 35.74 กรัม จากนั้นนำส่วนที่เหลือไประเหยจนแห้งได้เป็นสิ่งสกัดหยาบ Aqueous-ethanol น้ำหนัก 207.49 กรัม ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 นำสิ่งสกัดทั้งสามไปทดสอบฤทธิ์ การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase พบว่า สิ่งสกัดหยาบ Ethanol, Ethyl acetate และ Aqueous-ethanol มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เป็น 100.51, 99.62, 99.10 ตามลำดับ ทำการแยกสารจากสิ่งสกัดหยาบ Ethyl acetate



แผนภาพที่ 1 แสดงการสิ่งสกัดอย่างหยาบจากเปลือกต้นหยา

การแยกสิ่งสกัดหยาบ Ethyl acetate (EtOAc)

นำสิ่งสกัดหยาบ EtOAc น้ำหนัก 30 กรัม มาแยกด้วยวิธี Quick column chromatography โดยใช้ Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ใช้ระบบตัวทำละลายสำหรับเป็นตัวชะ เริ่มต้นด้วย Hexane กับ Dichloromethane ไปจนถึง Dichloromethane กับ MeOH โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลาย MeOH เพื่อเพิ่มระดับความมีขั้วของตัวทำละลายขึ้นเป็นลำดับ ปริมาตรที่รับ fraction ครั้งละ 1000 มิลลิลิตร แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 25 fraction ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11. การแยกสิ่งสกัดหยาบ EtOAc จากเปลือกหอย ด้วย quick column

Fraction	ระบบตัวทำละลาย
1-2	dichloromethane / Hexane 8 : 2
3-4	100% dichloromethane
5-6	1% MeOH /dichloromethane
7-8	2% MeOH / dichloromethane
9-10	3% MeOH / dichloromethane
11-12	4% MeOH / dichloromethane
13-14	5% MeOH / dichloromethane
15	7% MeOH / dichloromethane
16	10% MeOH / dichloromethane
17	15% MeOH / dichloromethane
18	20% MeOH / dichloromethane
19	25% MeOH / dichloromethane
20	30% MeOH / dichloromethane
21-25	40% MeOH / dichloromethane

จาก fraction ย่อยทั้ง 25 fraction ที่แยกได้จากสิ่งสกัดหยาบ EtOAc นำมาทำ thin layer chromatography เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบที่มีอยู่ในแต่ละ fraction แล้วรวม fraction ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 7 fraction ใหญ่ๆ ดังแสดงในตารางที่ 12 fraction เหล่านี้ fraction E1 ถึง E7 ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ต่อไป

ตารางที่ 12. Fraction ที่ได้จากการแยกสิ่งสกัดหยาบ EtOAc ด้วย quick column

Fraction	รวม fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์
E1	1	0.78	96.88
E2	2	0.37	96.83
E3	3-7	1.65	99.94
E4	8-10	0.54	100.39
E5	11-14	1.87	-1.88
E6	15-17	0.39	31.87
E7	18-25	8.85	96.81

จากการนำ Fraction ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase พบว่า Fraction E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์เป็นดังตารางที่ 12 และได้เลือก Fraction หรือ ส่วนสกัด ที่มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์สูง ซึ่งได้แก่ Fraction E1, E2, E3, E4, E7 นำมาแยกสารสำคัญต่อไป

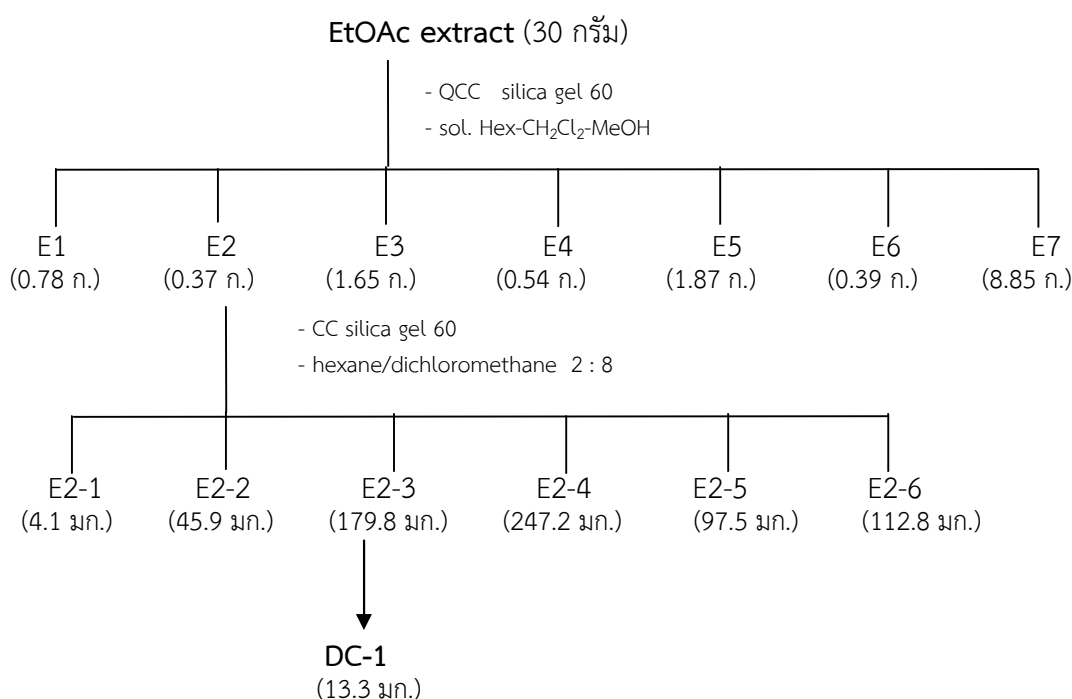
การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E2

นำส่วนสกัด E2 มาแยกเป็นส่วนย่อยๆ โดยการผ่าน column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane/dichloromethane 8:2 ได้ส่วนสกัดย่อย E2-1 ถึง E2-6 ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E2

Fraction	รวม fraction ย่อย	น้ำหนัก (มก.)
E2-1	1-3	4.1
E2-2	4-6	45.9
E2-3	7-11	179.8
E2-4	12-15	247.2
E2-5	16-21	97.5
E2-6	22-25	112.8

ส่วนสกัด E2-3 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ DC-1 จำนวน 13.3 มิลลิกรัมดังแสดงในแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2. แสดงการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ DC-1

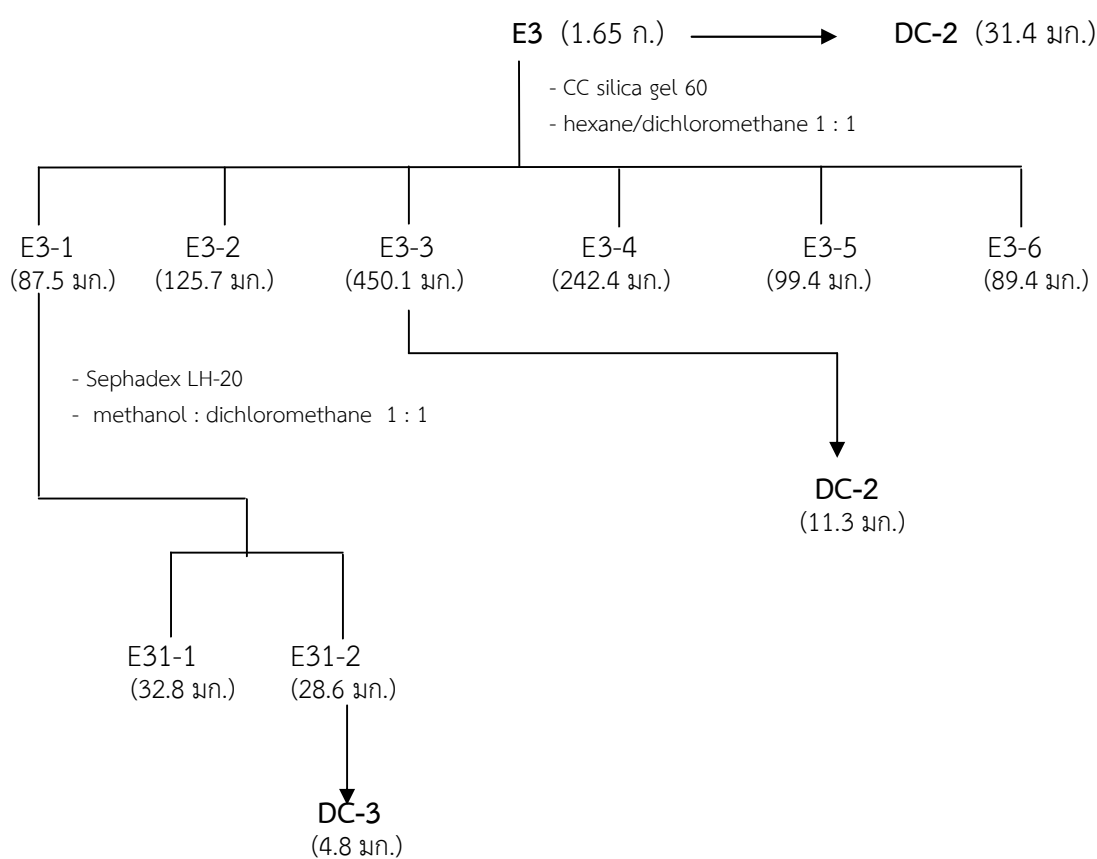
การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E3

ส่วนสกัด E3 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ DC-2 ได้ 31.4 มิลลิกรัม จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาแยกเป็นส่วนย่อยๆ โดยการผ่าน column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane/dichloromethane 1 : 1 ได้ส่วนสกัดย่อย 6 ส่วนคือ E3-1 ถึง E3-6 ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 14 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด E3

Fraction	รวม fraction ย่อย	น้ำหนัก (มก.)
E3-1	2-3	87.5
E3-2	4-8	125.7
E3-3	9-14	450.1
E3-4	15-17	242.4
E3-5	18-20	99.4
E3-6	21-38	89.4

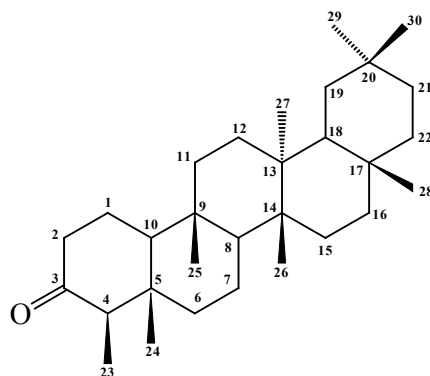
ส่วนสกัด E3-3 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ DC-2 เพิ่มอีกจำนวน 11.3 มิลลิกรัม ส่วนสกัด E3-1 นำมาแยกต่อโดยผ่าน column chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 เป็นตัวดูดซับ ใช้ dichloromethane กับ methanol เป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1:1 และสามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ DC-3 จำนวน 4.8 มิลลิกรัม ดังแสดงในแผนภาพที่ 3



แผนภาพที่ 3 แสดงการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ DC-2 และ DC-3

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้

นำสารที่แยกได้ คือสาร DC-1, DC-2 และ DC-3 นำไปหาข้อมูลทางspectrophotometry ได้แก่ ข้อมูล proton และcarbon NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า สาร DC-1 คือสาร friedelin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoid มีสูตรโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้างของ friedelin

ตารางที่ 15 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectra ของสารที่แยกได้(DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ friedelin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-1)		ข้อมูล friedelin ที่ตีพิมพ์
carbon	^1H Chemical shift	^1H Chemical shift
1	1.69(m), 1.96(m)	1.69(m), 1.97(m)
2	2.31(m), 2.38(m)	2.31(m), 2.39(m)
3	-	-
4	2.25(m)	2.25(m)
5	-	-
6	1.28(m), 1.75(m)	1.29(m), 1.75(m)
7	1.38(m), 1.48(m)	1.38(m), 1.49(m)
8	1.40(m)	1.41(m)
9	-	-
10	1.54(m)	1.55(m)
11	1.38(m), 1.48(m)	1.38(m), 1.49(m)
12	1.33(2H, m)	1.34(2H, m)
13	-	-
14	-	-
15	1.32(m), 1.50(m)	1.32(m), 1.51(m)
16	1.38(m), 1.59(m)	1.39(m), 1.59(m)
17	-	-
18	1.55(m)	1.56(m)
19	1.20(m), 1.38(m)	1.21(m), 1.38(m)
20	-	-
21	1.28(m), 1.42(m)	1.28(m), 1.43(m)
22	0.94(m), 1.52(m)	0.95(m), 1.53(m)
23	0.88(d, 7)	0.88(d, 7)
24	0.72(s)	0.73(s)
25	0.87(s)	0.87(s)

ตารางที่ 15 (ต่อ) ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectra ของสารที่แยกได้(DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ friedelin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-1)		ข้อมูล friedelin ที่ตีพิมพ์
carbon	^1H Chemical shift	^1H Chemical shift
26	1.00(s)	1.01(s)
27	1.05(s)	1.05(s)
28	1.17(s)	1.18(s)
29	0.94(s)	0.95(s)
30	1.00(s)	1.00(s)

Akihisa และคณะ., 1992.

ตารางที่ 16 ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ spectra ของสารที่แยกได้(DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ spectra ของ friedelin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-1)		ข้อมูล friedelin ที่ตีพิมพ์
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
1	22.3	22.3
2	41.5	41.5
3	213.1	213.2
4	58.2	58.2
5	42.1	42.1
6	41.4	41.3
7	18.2	18.2
8	53.1	53.1
9	37.5	37.4
10	59.5	59.4
11	35.6	35.6
12	30.5	30.5
13	39.7	39.7
14	38.3	38.3
15	32.4	32.4
16	36.0	36.0
17	30.0	30.0
18	42.8	42.8
19	35.4	35.3
20	28.1	28.1
21	32.8	32.7
22	39.2	39.2
23	6.8	6.8
24	14.7	14.6
25	17.9	17.9

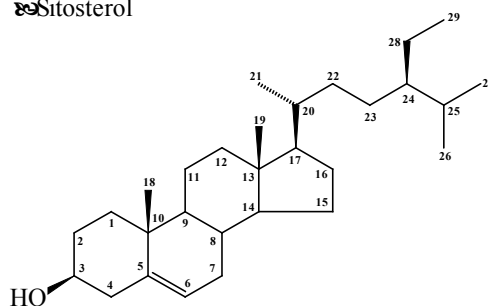
ตารางที่ 16 (ต่อ) ข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของสารที่แยกได้ (DC-1) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของ friedelin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-1)		ข้อมูล friedelin ที่ตีพิมพ์
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
26	20.3	20.2
27	18.7	18.6
28	32.1	32.1
29	35.0	35.0
30	31.8	31.8

Akihisa และคณะ, 1992

ส่วนสารDC-2 คือสาร β -sitosterol มีสูตรโครงสร้างดังนี้

๘๘ Sitosterol



ภาพที่ 10 สูตรโครงสร้างของ β -sitosterol

ตารางที่ 17 ข้อมูล ^1H -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-2) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H -NMR spectra ของ β -sitosterol ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-2)		ข้อมูล β -sitosterol ที่ตีพิมพ์
carbon	^1H -NMR chemical shift	^1H -NMR chemical shift
3	3.45 (1H, m)	3.43(1H, m)
6	5.32 (1H, m)	5.33(1H, m)
18- CH_3	0.65 (3H, s)	0.66(3H, s)
19- CH_3	0.98 (3H, s)	0.97(3H, s)
21- CH_3	0.90 (3H, d, J=6.8Hz)	0.91 (3H, d, J=6.5 Hz)
26- CH_3	0.78 (3H, d, J 7Hz)	0.80 (3H, d, J 6.8Hz)
27- CH_3	0.80 (3H, d, J 7 Hz)	0.80 (3H, d, J 6.8Hz)
29- CH_3	0.82 (3H, t, J=6.8Hz)	0.83 (3H, t, J=6.5 Hz)

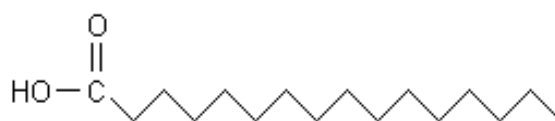
Shameel et al', 1996; Ali และคณะ, 1997

ตารางที่ 18 ข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของสารที่แยกได้(DC-2) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C -NMR spectra ของ β -sitosterol ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-2)		ข้อมูล β -sitosterol ที่ตีพิมพ์
carbon	Chemical shift	Chemical shift
1	37.2	37.2
2	31.6	31.6
3	71.8	71.8
4	42.2	42.2
5	140.8	140.7
6	121.7	121.7
7	31.9	31.9
8	31.9	31.9
9	50.1	50.1
10	36.5	36.5
11	21.1	21.1
12	39.7	39.7
13	42.3	42.3
14	56.8	56.7
15	24.3	24.3
16	28.2	28.2
17	56.1	56.0
18	11.9	11.8
19	19.4	19.4
20	36.1	36.1
21	18.8	18.8
22	34.0	33.9
23	26.1	26.0
24	45.9	45.8
25	29.2	29.1
26	19.8	19.8
27	19.0	19.0
28	23.1	23.0
29	12.0	12.0

De-Eknamkul and Potduang, 2003.

ส่วนสารDC-3 คือสาร palmitic acid มีสูตรโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 11 สูตรโครงสร้างของ palmitic acid

ตารางที่ 19 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectra ของสารที่แยกได้ (DC-3) มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(DC-3)		
carbon	$^1\text{H-NMR}$ chemical shift	$^{13}\text{C-NMR}$ Chemical shift
1	2.08 (1-OH, br s)	176(C=O)
2	2.32 (2H, t, J = 2.5, 2.5 Hz)	34(CH ₂)
3	1.61 (2H, t, J = 2.2, 2.3 Hz)	32(CH ₂)
4 -15	1.23 (24H, s)	29.6(CH ₂)
16- CH ₃	0.85 (3H, m)	25(CH ₃)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ -glucosidase

จากการนำสารที่แยกได้ DC-1(friedelin) และ DC-2 (β -sitosterol) ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase พบว่ามีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็น 32.5 และ 76.3 ตามลำดับ ส่วนสาร DC-3 (palmitic acid) มีปริมาณน้อย จึงยังไม่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์

สรุปและวิจารณ์ผล

มีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าพืชมากกว่า 1200 ชนิดทั่วโลกมีสารยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นพืชที่กระจายอยู่ในวงศ์ต่างๆ ได้แก่ วงศ์ Fabaceae, Crassulaceae, Hippocrateaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Moraceae เป็นต้น และสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์นี้ ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloids, stilbenoids (polyphenol), triterpene, organic acids, phytosterol, flavonoids, flavonolignans, anthraquinones, xanthenes, feruloylglucosides, anthocyanin และอื่นๆ (Benalla และคณะ, 2010)

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเขลงหรือหมี *Dialium cochinchinense* Pierre วงศ์ Fabaceae – Caesalpinoidae ยังไม่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้าน หรือมีข้อมูลทางพิษวิทยา หรือการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่พืชในสกุลเดียวกัน ได้แก่ *Dialium guineense* (Wild) หรือ Velvet tamarind มีรายงานสารสำคัญ กลุ่ม polyphenols, flavonoids และ tannins สารกลุ่ม saponins ชนิด triterpenoid glycosides ส่วนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ฝาดสมาน รักษาโรคผิวหนัง ฤทธิ์แก้ปวด ฤทธิ์ antimicrobial โดยเฉพาะ antivibrio หลายสายพันธุ์ และฤทธิ์ molluscicidal แต่ยังไม่พบรายงานว่ามีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด หรือต้านเบาหวาน จากการสกัดแยกสารสำคัญจากเปลือกเขลง หรือหมี โดยคัดเลือกจากพืชที่มีการคัดกรองแล้วว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase (งานวิจัยนี้และงานวิจัยปีที่แล้ว) โดยอาศัยเทคนิค Bioassay guided fractionation ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในทุกส่วนที่แยก และเลือกแยกเฉพาะส่วนที่มีฤทธิ์เท่านั้น สารทั้งสามที่แยกได้คือ friedelin, β -sitosterol และ palmitic acid เป็นสารที่พบในธรรมชาติ แยกได้จากพืชหลายชนิด จัดเป็นสารกลุ่ม Triterpenoid, phytosterol และกรดไขมัน ตามลำดับ สารเหล่านี้มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

Friedelin

สารสกัดจากไม้ไผ่ที่มีสารกลุ่ม Triterpenoids ปริมาณสูง [triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (EBS)] พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายฤทธิ์ ได้แก่ ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด ทั้งลดระดับ serum total cholesterol และ total triglyceride รวมทั้งลดความดันโลหิตสูง สาร friedelin ซึ่งเป็นสารหลักในกลุ่ม Triterpenoids ที่แยกได้จาก EBS ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (Jiao และคณะ, 2007) นอกจากนี้ friedelin และ friedelan – 3 beta – ol ยังออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบในสารสกัดจาก *Bidens pilosa* ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านที่ใช้ในการรักษาแผล ใช้ต้านอักเสบและใช้ในโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Geissberger and Sequin, 1991)

β -sitosterol

สาร β -sitosterol taraxasterol และสารกลุ่ม phytosterol พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายฤทธิ์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลด cholesterol ฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเนื้องอก ต้านมะเร็ง ยับยั้งการเกิดมะเร็งในลำไส้และมะเร็งเต้านม (Nair และคณะ, 1984, Ovesná และคณะ, 2004) สาร β -sitosterol (BSS) และ glycosides (BSSG) ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลด cholesterol ลดไข้ยับยั้งการเกิดมะเร็งในลำไส้ กระตุ้นการหลั่งของ อินซูลิน ของผสมของ β -sitosterol (BSS) และ glycosides (BSSG) ออกฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันให้สมดุล รวมถึงการทดสอบทางคลินิกในคนไข้ที่มีโรคติดเชื้อเรื้อรัง เช่น วัณโรค HIV และโรคอื่นที่ไม่เกิดจากการติดเชื้อเช่น อาการแพ้ rheumatoid arthritis เป็นต้น (Pegel, 1997, Dwyer, 1988, Raicht และคณะ, 1980, Yamamoto และคณะ, 1991. Gupta และคณะ, 1980, Yamada และคณะ, 1987, Ivorra, D'Ocon, and Paya, 1988, Bouic และคณะ, 1980)

สารสกัดเมล็ดของ *Parkia speciosa* ด้วย chloroform ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan จากการแยกสารสกัดส่วนที่มีฤทธิ์พบว่าเป็นของผสมของ β -sitosterol (66%) และ stigmasterol (34%) ซึ่งเมื่อทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลพบว่า มีฤทธิ์ 83 % (ขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัว) เมื่อเทียบกับยา glibenclamide ที่มีฤทธิ์ 111 % (ขนาด 5 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัว) เมื่อนำสารแต่ละตัวมาทดสอบพบว่าไม่มีฤทธิ์ การออกฤทธิ์ต้องอยู่ในรูปของผสม จึงจะเกิดการเสริมฤทธิ์ (Jamaluddin, Mohamed', and Lajis, 1994)

β -sitosterol-3- β -D-glucoside เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านเบาหวานซึ่งเป็นสารที่แยกได้จาก *Centaurea seridis* L. var. *maritima* โดยออกฤทธิ์ต่อ β -cell ที่ตับอ่อน กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน (Ivorra, Paya, and Villar, 1990) สารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Tournefortia hartwegiana* ออกฤทธิ์ลดน้ำตาลและต้านเบาหวาน จากการแยกสารด้วยวิธี bioassay-guided fractionation สามารถแยกสาร β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, ursolic acid, oleanolic acid, saccharose และ myo-inositol (Ortiz-Andrade, García-Jiménez, Castillo-España, และคณะ, 2007)

Palmitic acid

อาหารที่มี monounsaturated fatty acids (MUFA) กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ลดระดับน้ำตาล ต้านเบาหวาน น้ำมันที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำมันมะกอก (oleic acid, (MUFA) และน้ำมันมะพร้าว (palmitic acid, saturated fatty acid, SFA) จากการทดลองใช้ cell line ที่หลั่ง GLP-1 บ่มเพาะด้วย 100 mM oleic acid (MUFA) หรือ 100 mM palmitic acid (SFA) เป็นเวลา 24 ชม. พบว่า oleic acid เท่านั้นที่กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน Glucagon-like peptide-1 (Rocca และคณะ, 2001)

จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้งสามที่แยกได้ พบว่า มีเพียง β -Sitosterol เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน หรือลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ของสาร friedelin และ β -Sitosterol

เอกสารอ้างอิง

- Akihisa, T., Yamamoto, K., Tamura, T., Kimura, Y., Iida, T., Nambara, T. and Chang, F.C.1992. Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* McClure: arborinone, friedelin and glutinone. *Chem. Pharm. Bull.* 40(3), 789-791.
- Ali, M. S., Shameel, S., Ahmad, V. U., Usmaghani, K., 1997. Chemical constituents of *Caesalpinia bonduc*. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 40, 20–22.
- Benalla, W., Bellahcen, S. and Bnouham, M. 2010. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current Diabetes Reviews* 6: 247-254.
- Bero, J., Ganfon, H., Jonville, M. C., Frederich, M., Gbaguidi, F., De, M. P., Mouda-chirou, M., Quetin, L. J. 2009. In vitro antispasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *J. Ethnopharmacol.*, 122(3), 439-444.
- Bouic, P. J. D. and Lamprecht, J. H. 1999. Plant Sterols and Sterolins: A Review of Their Immune-Modulating Properties. *Altern. Med. Rev.* 4(3), 171-7.
- Bouic, P. J. D., Etsebeth, S., Liebenberg, R. W., Albrecht, C. F., Pegel, K., and Van Jaarsveld, P. P. 1996. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Intern. J. of Immunopharmacol.*, 18(12), 693-700.
- David, A. A., Olaniyi, A. T., Mayowa, A. O., Olayinka, A. A. and Anthony, O. I. 2011. Anti-vibrio and preliminary phytochemical characteristics of crude methanolic extracts of the leaves of *Dialium guineense*(Wild). *J. Med. Pl. Res.*, 5(11), 2398-2404.
- De-Eknamkul, W. and Potduang, B. 2003. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochem.*, 62, 389-398.
- Diatewa M., Badila C., et al. 2004. Hyperglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 229 – 232.
- Dwyer, J. T. 1988. Health aspects of vegetarian diets. *Am J Clin Nutr.* 48, 712-738.
- Ezeja, M. I., Omeh, Y. S., Ezeigbo, I. I., and Ekechukwu, A. 2011. Evaluation of the analgesic activity of the methanolic stem bark extract of *Dialium guineense* (Wild). *Ann. Med. Health Sci. Res.*, 1(1), 55-62.
- Gao, H., Huang, Y., Gao, B., Li, P., Inakaki, C., and Kawabata, J. 2008). Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees. *Food Chemistry*, 108: 965–972
- Gao, H., Huang, Y. N., Xu, P. Y., and Kawabata, J. (2007). Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chemistry*, 105: 628–634.
- Geissberger P, and Sequin U. 1991. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *ACTA TROPICA*. 48(4), 251–61.

- Grover, J. K., Yadav, S. P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 123-132.
- Gupta, M. B., Nath, R., Srivastava, N., et al. 1980. Antiinflammatory and anti-pyretic activities of β -sitosterol. *Planta Med.*, 39, 157-163.
- Hardman J. G., Limbird L.E., et al. 2002. Diabetes Mellitus and Pharmacological effects of Insulin. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th Edition: 1686–1692.
- Hermans, M., Akpovi, A., Vander, M. L. G. J. 2010. Medicinal plants used to treat malaria in Southern Benin. *Eco. Bot.*, 56, 239-252.
- Ivorra, M. D., D'Ocon, M. P., Paya, M., and Villar, A. 1988. Antihyperglycemic and insulin releasing effects of β -sitosterol 3- β -D-glycoside and its aglycone β -sitosterol. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 296, 224-231.
- Ivorra, M. D., Paya, M., and Villar, A. 1990. Effect of beta-sitosterol-3-beta-D-glucoside on insulin secretion in vivo in diabetic rats and in vitro in isolated rat islets of Langerhans. *Pharmazie.*, 45(4):271-3.
- Jamaluddin, F., Mohamed', S., and Lajis, M. N. 1994. Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of β -sitosterol and stigmasterol. *Food Chem.* 49(4), 339-345.
- Jiao, J., Zhang, Y., Lou, D., Wu, X., and Zhang, Y. 2007. Antihyperlipidemic and anti hypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilator effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. *Phytotherapy Res.* 1135–1141.
- Jong-Anurakkun, N., Bhandari, MR., and Kawabata, J. 2007). Alpha-glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry*, 103: 1319–1323.
- Lamien-Meda, A., Lamien, C.E., Compaore, M. M. Y., Meda, R. N. T., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, J. F. and Nacoulma, O. G. 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules* 13, 581-594.
- Lawal, I. O., Nzokwe, N. E., Igboanugo, A. B. I., Adio, A. F., Awosan, E. A., Nwogwugwu, J. O., Faleye, B., Olatunji, B. P., Adesoga, A. A. 2010. Ethnomedicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institute of South-west Nigeria. *Afri. J. Biotech.*, 4(1), 001-007.
- Nair, P. P., Turjman, N., Kessie, G., Calkins, B., Goodman, G. T., Davidovitz, H., and Nimmagadda, G. 1984. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, beta-sitosterol, and stigmasterol. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 40, 927-930
- Odukoya, O. A. and Houghton, P. J. 1996. Moluscicidal triterpenoid glycosides of *Dialium guineense* (Wild). *J. Nat. Prod.*, 59, 632-634.

- Odukoya, O. A., Sofidiya, M. O., Ilori, O. O., Gbededo, M. O., Ajadotui, J. O. and Olaleye, O.O. 2009. Hemorrhoid therapy with medicinal plants: astringency and inhibition of lipid peroxidation as key factors. *Int. J. Biol. Chem.* 3(3), 111-118.
- Ortiz-Andrade, R. R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R., and Estrada-Soto, S. 2007. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *J. of Ethnopharmacol.*, 109(1), 48-53.
- Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K. 2004. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemo preventive effects. *Neoplasma* 51(6):407-14.
- Passwater, R. 2003). Antidiabetic activity of a standardized extract (Glucosol™) from *Lagerstroemia speciosa* leaves in Type II diabetics: A dose-dependence study. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:115-117.
- Pegel, K. H. 1997. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *SAJ Sci.*, 93:263-268.
- Phuwapraisirisan, P., Puksasook, T., Jong-aramruang, J., and Kokpol, U. 2008). Phenylethyl cinnamides: A new series of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aegle marmelos*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18: 4956-4958.
- Raicht, R. F., Cohen, B. I., Fazzini, E. P., et al. 1980. Protective effect of plant sterol against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.*, 40, 403-405.
- Rocca, A. S., LAGreca, J., Kalitsky, J., and Brubaker, P. L. 2001. Monounsaturated Fatty Acid Diets Improve Glycemic Tolerance through Increased Secretion of Glucagon-Like Peptide-1. *Endocrinology* 142, 1148–1155.
- Shameel, S., Usmanghani, K., Ali, M. S., Ahmad, V. U., 1996. Chemical constituents from the seeds of *Pongamia pinnata*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 9, 11–20.
- Shim, Y. J., Doo, H. K., Ahn, S. Y., Kim, Y. S., Seong, J. K., Park, I. S., and Min, B. H. 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 283–287.
- Yamada, H., Yoshino, M., Matsumoto, T., et al. 1987. Effects of phytosterols on anti-complementary activity. *Chem Pharm Bull.*, 35, 4851- 4855.
- Yamamoto, M., Matsui, T., Sugiyama, K., et al. 1991. Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller. *Agric Biol Chem.*, 55, 1627-1629.
- Yibchok-anun, S., Jittaprasatsin, W., Somtir, D., Bunlunara, W., and Adisakwattana, S. 2009. Insulin secreting and a-glucosidase inhibitory activity of *Coscinium fenestratum* and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 646-651.
- สังวรินทร์, ยุพิน และ อัญเชิญ, สุภินันท์ และคณะ. (2539). ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด. *เภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล*: 642-644

วันดี กฤษณพันธ์ และ พิรุณ มั่งมีศรี. (2552). สมุนไพรลดน้ำตาลในเลือด. วารสารเภสัชกรรมชุมชน. ปีที่ 4, ฉบับที่ 45 : หน้า 16.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง สุรัตนา อำนวยผล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Surattana Amnuoyopol
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 00319 79 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
หน่วยงาน ภาควิชา เกษีษเวชและเกษีษพฤษศาสตร์ คณะเกษีษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2188358 โทรสาร 02-2188357
สถานที่อยู่ 22/322 ลุมพินีวิลล์(พหลฯ-สุทธิสาร) ถ.สุทธิสารวินิจฉัย แขวงสามเสนใน กทม. โทรศัพท์ 02-2792137
e-mail : asuratta@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ภบ.	เกษีษศาสตร์	2521
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ภม.	เกษีษเวช	2524
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด.	เคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
พฤษเคมี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Publications:

1. Daikuhara, N., Tada, Y., Yamaki, S., Charupant, K., **Amnuoyopol, S.**, Suwanborirux, K., and Saito, N. Chemistry of renieramycins. Part 7: Renieramycin T and U, novel renieramycin-ecteinascidin hybrid marine natural products from Thai sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron Letters*, 50, 4276-4278, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

2. Charupant, K., Daikuhara, N., Saito, E., **Amnuoyopol, S.**, Suwanborirux, K., Owa, T. and Saito, N. Chemistry of renieramycins. Part 8: Synthesis and cytotoxicity evaluation of renieramycin M-jorunnamycin A analogues. *Bioorg. & Med. Chem.*, 17, 4548-4558, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

3. Wirotasangthong, M., Nagai, T., Yamada, H., **Amnuoyopol, S.**, Mungmee, C. Effect of *Clinacanthus siamensis* Leaf Extract on Influenza Virus Infection. *Microbiol. Immuno.*, 53(2), 66-74, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

4. Charupant K., Suwanborirux K., **Amnuoyopol S.**, Saito, E., Kubo A., and Saito N., Jorunnamycins A-C, New Stabilized Renieramycin-Type Bistetrahydroisoquinolines Isolated

from the Thai Nudibranch *Jorunna funebris*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55(1), 81-86, 2007 ผู้ร่วมวิจัย

5. Puthongking P., Patarapanich C., **Amnuoypol, S.**, Suwanborirux K., Kubo A., and Saito N. Chemistry of Ecteinascidins. Part 2. Preparation of 6'-O-Acyl Derivatives of the stable Ecteinascidins and Evaluation of Antitumor Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(7), 1010-1016, 2006. ผู้ร่วมวิจัย

6. Saito, N., Tanaka, C., Koizumi, Y., Suwanborirux, K., **Amnuoypol, S.**, Pummangura, S., and Kubo, A. Chemistry of Renieramycins. Part 6. Transformation of Renieramycin M into Jorumycin and Renieramycin J Including Oxidative Degradation Products, Mimosamycin, Renierone, and Renierol Acetate. *Tetrahedron*, 60, 3873-3881, 2004. ผู้ร่วมวิจัย

7. **Amnuoypol, S.**, Suwanborirux, K., Pummangura, S., Kubo, A., Tanaka, C., and Saito N. Chemistry of Renieramycins. Part 5. Structure Elucidation of Renieramycin-Type Derivatives O, Q, R, and S, from Thai Marine Sponge Xestospongia Species Pretreated with Potassium Cyanide. *J. Nat. Prod.*, 67, 1023-1027., 2004. ผู้ร่วมวิจัย

8. Suwanborirux K., **Amnuoypol S.**, Plubrukarn A., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C. and Saito N. Chemistry of Renieramycins. Part 3. Isolation and Structure of Stabilized Renieramycin Type Derivatives Possessing Antitumor Activity from Thai Sponge, Xestospongia Species, Pretreated with Potassium Cyanide. *J. Nat. Prod.*, 66, 1441-1446, 2003. ผู้ร่วมวิจัย

9. Saito N., Koizumi Y., Tanaka C., Suwanborirux K., **Amnuoypol S.** and Kubo A. Chemistry of Antitumor Isoquinolinequinone Alkaloids: Unexpected Oxidative Degradation of Saframycin S to Generate Simple Isoquinoline Alkaloids, Mimosamycin and Mimocin. *Heterocycles*, 61, 79-86, 2003. ผู้ร่วมวิจัย

10. Suwanborirux K., Charupant K, **Amnuoypol S**, Pummangura S, Kubo A, and Saito N. Ecteinascidins 770 and 786 from the Thai Tunicate Ecteinascidia thurstoni. *J. Nat. Prod.*, 65, 935-937, 2002. ผู้ร่วมวิจัย