

การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่
ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้ง
การสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ ปีที่ 2

**Isolation of anti-diabetic substances 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 advanced glycation end product formation (year 2)**

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล
Associate Professor Dr. Surattana Amnuoypol

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University, Phyathai road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่จัดว่าเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลก ในปัจจุบัน
โรคเบาหวาน มีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากข้อมูลรายงานขององค์การอนามัยโลก (World
Health Organization) พบว่า ในปี พ.ศ. 2549 มีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกสูงถึง 171 ล้านคน และคาดว่า
ในปี พ.ศ. 2573 จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ส่วนในประเทศไทย จากรายงานของกรมควบคุมโรค
กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี พ.ศ.2547 พบว่ามีประชากรไทยป่วยด้วยโรคเบาหวานถึง 1,500,000 คน
หรือประมาณร้อยละ 6 ของประชากรไทย

นอกจากนี้ พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวานทั่วโลก ประมาณ 3.2
ล้านคนต่อปี หรือมีผู้เสียชีวิต 6 คนต่อนาที (ธีระ ฤทธิรอด และคณะ, 2551)

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากร่างกายขาดฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin) หรือมีระดับ
อินซูลินในเลือดต่ำ หรือเนื้อเยื่อต่างๆมีการตอบสนองต่ออินซูลินน้อยลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงใน
กระบวนการใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ซึ่งอินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ผลิตโดยตับอ่อน ทำหน้าที่
ควบคุมให้เซลล์ต่างๆในร่างกายใช้น้ำตาลในกระแสเลือดเป็นพลังงาน (วันดี กฤษณพันธุ์, 2552) เมื่อ
ร่างกายขาดฮอร์โมนอินซูลินจะส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลสูงนานๆทำ
ให้อวัยวะต่างๆเกิดการเปลี่ยนแปลงผิดปกติ และนำมาซึ่งโรคแทรกซ้อนมากมายได้ โรคเบาหวาน

สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทหลักๆ คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type I Diabetes Mellitus : Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่ได้เลย หรือผลิตได้น้อยมาก โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type II Diabetes Mellitus: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) เกิดจากตับอ่อนสามารถผลิตอินซูลินได้ แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย หรือผลิตได้พอ แต่เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (สุรเกียรติ์ อาชานุกาพ, 2551)

ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงนั้นมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานโดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเติมน้ำตาลให้กับโมเลกุลของโปรตีน (Protein Glycation Reaction) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากปฏิกิริยาไกลเคชัน (Advanced Glycation End Products : AGEs) ที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย สาร AGEs ที่เกิดขึ้นนี้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกับโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นในร่างกายก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันและทำให้เกิดสาร AGEs มากขึ้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย จากการศึกษาวิจัยพบว่า มีตัวรับของ AGEs (receptor of AGEs : RAGE) ในเซลล์ร่างกายหลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน เมื่อ AGEs เกิดปฏิกิริยากับ RAGE แล้วจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการสื่อสารภายในเซลล์ การแสดงออกของยีน (gene expression) การหลั่งของสาร proinflammatory และอนุมูลอิสระ นำไปสู่พยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อน (Ahmed, 2005) อาจก่อให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดเล็กๆ ที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ เช่นไต ตา ปลายมือ ปลายเท้า ทำให้มีอาการแทรกซ้อนของระบบหัวใจและหลอดเลือด ความดันเลือดสูง หลอดเลือดหัวใจตีบตัน ตามัวถึงตาบอด หลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงตามปลายมือปลายเท้าอุดตัน ทำให้เกิดแผลเน่า ไตเสื่อมสภาพจนเกิดไตวาย และยังมีผลลดสมรรถภาพทางเพศในผู้ชายอีกด้วย (Hardman, et al., 2002: Huang, et al., 2005)

จากความสำคัญของการเกิด AGEs ในผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้สนใจค้นหาแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดสาร AGEs ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากความเป็นพิษของน้ำตาล

ในปัจจุบัน นอกจากมีรายงานถึงพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการต้านเบาหวานและลดระดับน้ำตาลในเลือดแล้ว ยังพบว่ามีพืชสมุนไพรที่มีกลไกยับยั้งการสร้างสาร AGEs ด้วย ตัวอย่างเช่น พืชสกุลเบญจมาศ (*Chrysanthemum sp.*) (Tsuji-Naito, et al., 2009), บัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) (Jung, et al., 2008), หอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*), โป๊ยกั๊กญี่ปุ่น (*Illicium religiosum*), Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), ออริกาโน (*Origanum officinalis*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), สาลี่ (*Pyrus pyrifolia*), โสมไซบีเรีย (*Acanthopanax senticosus*), กานพลู (*Eugenia caryophyllata*), Daisy (*Erigeron annuus*) (Kim and Kim, 2003)

ดังนั้นการคัดกรองหาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเพื่อเก็บ

เป็นข้อมูล เนื่องจากมีศักยภาพในการศึกษาและเพื่อนำไปพัฒนาใช้เป็นยาต้านเบาหวานต่อไปได้ นอกจากนี้ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำรินั้นมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสมุนไพร จึงมีโอกาสูงในการได้พืชใหม่ๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน

จากการวิจัยการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เมื่อปีพ.ศ. 2555 และ พ.ศ. 2553 พบว่าใบพลองใบรี *Memecylon plebejum* Kurz. var. *ellipsoideum* Craib วงศ์ Melastomataceae เป็นพืชที่มีฤทธิ์ดี จึงคัดเลือกใบพลองใบรี มาทำการสกัดแยกสารสำคัญโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี ควบคู่กับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และ ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

พลองใบรี (*Memecylon plebejum* Kurz. var. *ellipsoideum* Craib)

วงศ์ Melastomataceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้ขนาดเล็ก ไม่ผลัดใบ เป็นพรรณไม้เด่นชนิดหนึ่งในป่าดิบแล้ง ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามเป็นคู่ แผ่นใบหนา ด้านบนมีสีเขียวเข้ม เป็นมัน ดอกสีฟ้าเข้ม ออกบนช่อสั้นๆ รวมเป็นกลุ่มตามง่ามใบ

ข้อมูลทางพฤกษเคมีของพืชสกุล *Memecylon* :

สารสกัดเฮกเซนจากรากของต้น *Memecylon umbellatum* (Burm.) พบสารกลุ่ม fatty acids ได้แก่ octocosanoic acid, cerotic acid, ethyl palmitate, palmitic acid , butyric acid นอกจากนี้ยังมี β -amyrin, sitosterol, oleanolic acid, ursolic acid, sitosterol- β -D-glucoside, umbelactone (Joshi, et al, 2009)

สารสกัดจากใบของต้น *Memecylon umbellatum* (Burm.) พบสารหลายชนิดมาก ได้แก่ Alkane ได้แก่ Hexadecanoic acid, Undecane , 7-Tetradecane, Hexadecane , 1-Hexadecanol , Heptacosane Alkene ได้แก่ 2,3,3-trimethyl-1-Butene Alkylated phenol ได้แก่ Tetradecanoic acid, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-Phenol Cycloalkane ได้แก่ Dodecane Fatty acid ได้แก่ Octadecanoic acid, n-Hexadecanoic acid, 15-methyl-methyl ester hexadecanoic acid, Ethyl ester hexadecanoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid, Oleic acid, 4,8,12,16-Tetramethyl-heptadecan-4-olide, Eicosanoic acid, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl- (all-E)-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene, Nonacosane Fatty alcohol ได้แก่ 3,7,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, Phytol, 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, methyl cyclooctane Terpene ได้แก่ 1-Nonadecene Phytosterol ได้แก่ Stigmasterol, β -Sitosterol Triterpene ได้แก่ 5,6,7,7a-tetrahydro- 4,4,7a-trimethyl-2(4H)-Benzofuranone

(Dihydroactinidiolide), α -Amyrin, Lupeol, Squalene Dicarboxylic acid ได้แก่ 1,2-benzenedicarboxylic acid (Murugesan et al., 2011)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุลเดียวกัน

จากฐานข้อมูล พบว่าพืชในสกุลเดียวกับพลองใบรีมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด¹ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดปวด รักษาบาดแผล ได้แก่ สารสกัดแอลกอฮอล์จากใบ *Memecylon umbellatum* นำมาทดลองในหนู (ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน ด้วยสาร alloxan) โดยผ่านการกิน พบว่ามีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ glibenclamide เป็นยามาตรฐาน รวมทั้งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่มีระดับน้ำตาลผิดปกติได้แต่ยังไม่ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ชัดเจน (Amalraj and Ignacimuthu, 1998; Nualkaew, et al., 2009)

สารสกัดเมทานอลจากใบ *Memecylon umbellatum* สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน พบว่าไม่เกิดอาการข้างเคียงต่อตับและไต โดยดูจากระดับ urea และ creatinine สารสกัดทำให้ระดับของ creatinine, SGPT และ SGOT ลดลง การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง พบว่าทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (Puttaswamy, R., Peethambar S.K. and Rajeshwara N. Achur, 2014)

จากการทดลองในหนู rat สารสกัดจากราก *Memecylon umbellatum* ออกฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับจาก Acetaminophen ที่เกินขนาด (Joshi, et al, 2008)

สารสกัดเมทานอลจากใบ *Memecylon malabaricum* นำมาทดลองในหนู (ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน ด้วยสาร alloxan) .ในขนาด 400 mg/kg body weight ลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ reference standard, gliclazide. (Ramiah; et al., 2013)

สารสกัดแอลกอฮอล์จากใบ *Memecylon malabaricum* มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบบที่เรียกกรมบวก และลบ รวมทั้งเชื้อราได้อีกด้วย แต่สารสกัดชั้น petroleum ether และ chloroform ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

สารสกัดจากใบ *Memecylon edule* Roxb. มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดปวดและรักษาบาดแผล โดยการสกัดพืชด้วยเฮกเซนเอทิลอะซิเตท เมทานอล และเมทานอล 50 % จากการทดลองในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดทั้งหมดสามารถลดการอักเสบได้ แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตทออกฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำมาทดสอบในฤทธิ์ลดการอักเสบและบวมบริเวณหูของหนูซึ่งสามารถลดการบวมได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับตัวควบคุมบวม คือ dexamethasone กับ indomethacin นอกจากนี้สารสกัดเอทิลอะซิเตทยังสามารถลดอาการปวดได้ด้วย ด้านการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น พบว่าสารสกัดเมทานอลออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดเมทานอล 50% และสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ (Nualkaew, et al., 2009)

แต่ไม่มีข้อมูลทางพิษวิทยาและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพลองใบรี ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำพลองใบรีมาผ่านกระบวนการแยกสกัดเพื่อหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารแอดวานซ์

ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์(AGE) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนารักษาโรคเบาหวาน

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกสารสำคัญจากใบพลองใบรี ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุ กรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความรู้ความเข้าใจในวิธีการนำสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay) โดยเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส
2. นำผลที่ได้จากการทดลองไปต่อยอดองค์ความรู้ เกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส แยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาเป็นยาสำหรับโรคเบาหวาน
3. ตระหนักในความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสมุนไพรไทย และมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานในกลไกด้านอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อการค้นพบยาใหม่จากทรัพยากรในประเทศ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

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

วิธีดำเนินการศึกษา

- 1) เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้างสาร AGEs และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสแล้ว พบว่ามีฤทธิ์ ได้แก่ **พลองใบรี** *Memecylon plebejum* Kurz. var. *ellipsoideum* Craib) วงศ์ Melastomataceae โดยทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ บริเวณเกาะเสม็ด จ.ชลบุรี ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะนำมาสกัดแยกสารสำคัญ
- 2) นำส่วนใบมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดหยาบ

- 3) นำสมุนไพรมะพร้าวแห้งไปแช่หมักในเอทานอล กรอง นำไปทำให้เข้มข้น นำมา partition ด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วนำไปทำให้แห้งได้สารสกัดหยาบ
- 4) นำสารสกัดหยาบมาแยก โดยใช้เทคนิคทาง chromatography
- 5) นำสารสกัดหยาบ และ fraction ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง AGEs และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาฟลูโคซิเดส เลือกเฉพาะ fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง มาทำการแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า Bioassay guided fractionation
- 6) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาข้อมูลทาง spectrophotometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง AGEs และหรือออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาฟลูโคซิเดส
- 7) อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

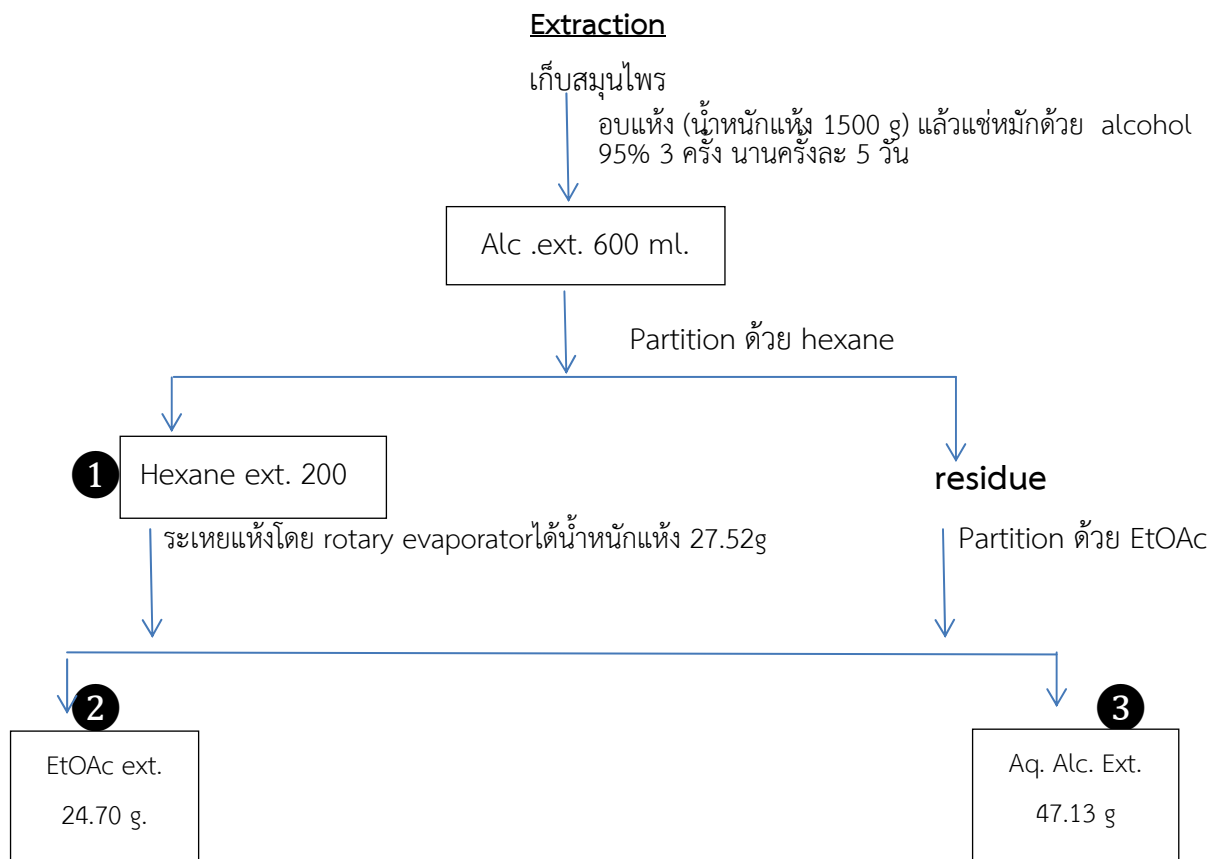
คัดเลือกเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะเสม็ด จังหวัดชลบุรี นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

การสกัดสารจากสมุนไพรมะพร้าว

เก็บสมุนไพรมะพร้าวแห้งไปรีจากเกาะเสม็ด จังหวัดชลบุรี นำส่วนใบมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดหยาบได้น้ำหนักสมุนไพรมะพร้าวแห้ง 1.5 กิโลกรัม นำสมุนไพรมะพร้าวแห้งไปแช่หมักในเอทานอล 95% 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 วัน ได้สารสกัด alcohol 600 มิลลิลิตร ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ความดันต่ำ และนำสารสกัดแอลกอฮอล์มา partition ด้วย hexane และ ethyl acetate ตามลำดับ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยที่ความดันต่ำ (Rotary Evaporator) ได้สารสกัดทั้งหมด 3 ส่วน (น้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเป็น 99.36 กรัม) คือ สารสกัดหยาบด้วย hexane, ethyl acetate และ alcohol น้ำหนัก 27.52, 24.70 และ 47.14 กรัม ตามลำดับ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวานด้วยวิธีทั้งสอง พบว่า สารสกัดหยาบทั้งสามออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกัน จึงเลือกแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate ซึ่งมีความเป็นขี้พานกลาง



AGE inhibition test

1 Hexane ext. 27.52 g	2 EtOAc ext. 24.70 g	3 Aq.- Alc. ext. 47.13 g
% inhibition : 85.64 %	85.08 %	85.68 %

α -glucosidase inhibition (AGH) test

1 Hexane ext. 27.52 g	2 EtOAc ext. 24.70 g	3 Aq.- Alc. ext. 47.13 g
% inhibition : 99.24 %	98.59 %	99.29 %

แผนภูมิที่ 1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบพลองใบรี และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างสาร AGEs และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate โดยวิธี Quick column chromatography

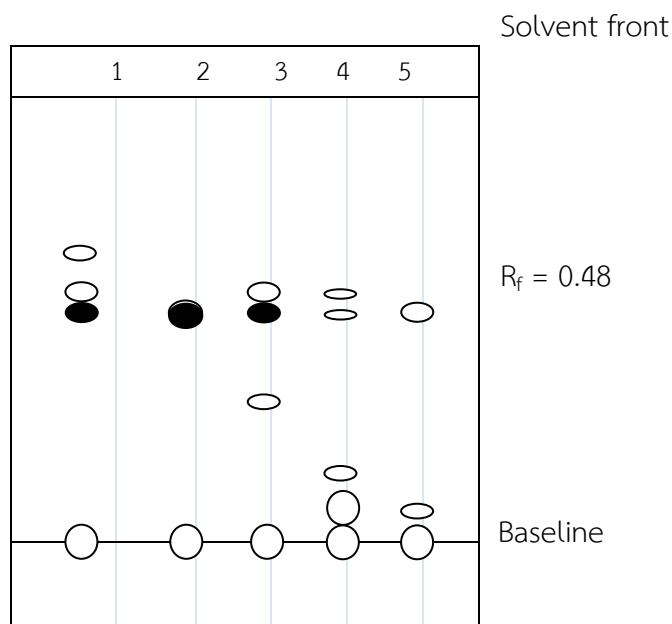
เตรียมคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก โดยบรรจุ silica gel ในคอลัมน์ นำสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate (19.74 g) บรรจุบนตอนบนของคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายตามสัดส่วนและปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 2 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluent) จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสาร

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ที่เก็บด้วยเทคนิค Thin layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ดังตารางที่ 1 และนำแผ่น TLC ไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 1) รวม fraction ได้ 5 fractions คือ F1, F2, F3, F4 และ F5

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลการแยกสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทด้วยวิธี Quick CC

Mobile phase		ปริมาตร (ml)	ขวดเก็บ fraction	Solvent system TLC			Fraction	น้ำหนัก (mg)	% AGE Inhibition	% AGH Inhibition
EtOAc	Hexane			MeOH	EtOAc	Hexane				
0	100	100	1-2	-	8	2	1-8 = F1	81.9	87.59	101.50
20	80	200	3-10				9-11 = F2	65.4	89.63	103.86
40	60	400	11-22				16-33 = F3	153.5	83.92	97.25
60	40	200	23-32							
80	20	200	33-42	5	95	-	34-43 = F4	1.3494 g	87.63	101.54
100	0	200	43-52				44-52 = F5	186.4	87.50	101.39

*น้ำหนักแห้งรวม 1.8348 กรัม



รูปที่ 1 TLC แสดงการแยกสารจาก EtOAc ext. ด้วยวิธี Quick column chromatography

Solvent system EtOAc : MeOH = 8 : 2 ;

1 = F1, 2 = F2, 3 = F3, 4 = F4, 5 = F5

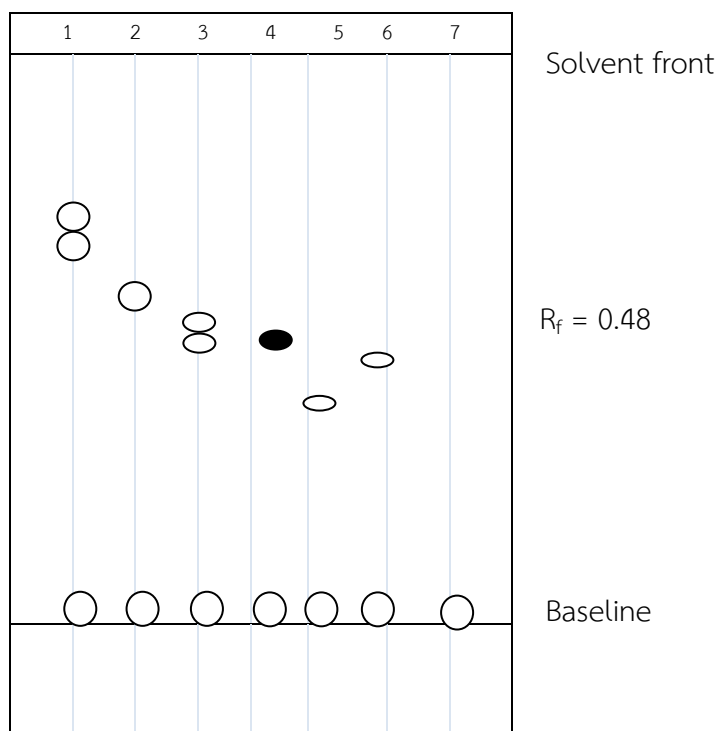
8.2.1 การแยกสารสกัดส่วน F1 ด้วยวิธี Flash column chromatography (Flash CC)

เตรียมคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก โดยบรรจุ silica gel ในคอลัมน์ นำสารสกัดส่วน F1 (81.9 mg) ไปบรรจุคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามสัดส่วน และปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 2 และเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluent) จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสาร

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ที่เก็บ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ดังตารางที่ 2 และนำแผ่น TLC ไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 2) แล้วรวม fraction ที่ให้ผลใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน ได้ 8 fractions คือ F1.1, F1.2, F1.3, F1.4, F1.5, F1.6 และ F1.7 แยกได้สารบริสุทธิ์ จากส่วน F1.4 (2.4 mg) กำหนดชื่อสาร เป็น NP

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลการแยกสารสกัดส่วน F1 ด้วยวิธี Flash column chromatography

Mobile phase			ปริมาตร (ml)	ขวดเก็บ fraction	Fraction	น้ำหนักแห้ง (mg)
MeOH	EtOAc	Hexane				
-	40	60	200	1-10	1-9 = F1.1	46.6
-	50	50	200	11-20	10-12 = F1.2	5.1
-	60	40	100	21-24	13-15 = F1.3	4.2
-	80	20	100	25-27	16-19 = F1.4 (NP)	2.4
-	100	0	100	28-31	20-21 = F1.5	0.3
50	50	-	100	32-33	22-24 = F1.6	1.3
100	0	-	100	34	25-31 = F1.7	10.1



รูปที่ 2 TLC แสดงการแยกสารจาก F1 ด้วยวิธี column chromatography

Solvent system EtOAc : MeOH = 8:2 ;

1 = F1.1, 2 = F1.2, 3 = F1.3, 4 = F1.4 = NP, 5 = F1.5, 6 = F1.6, 7 = F1.7

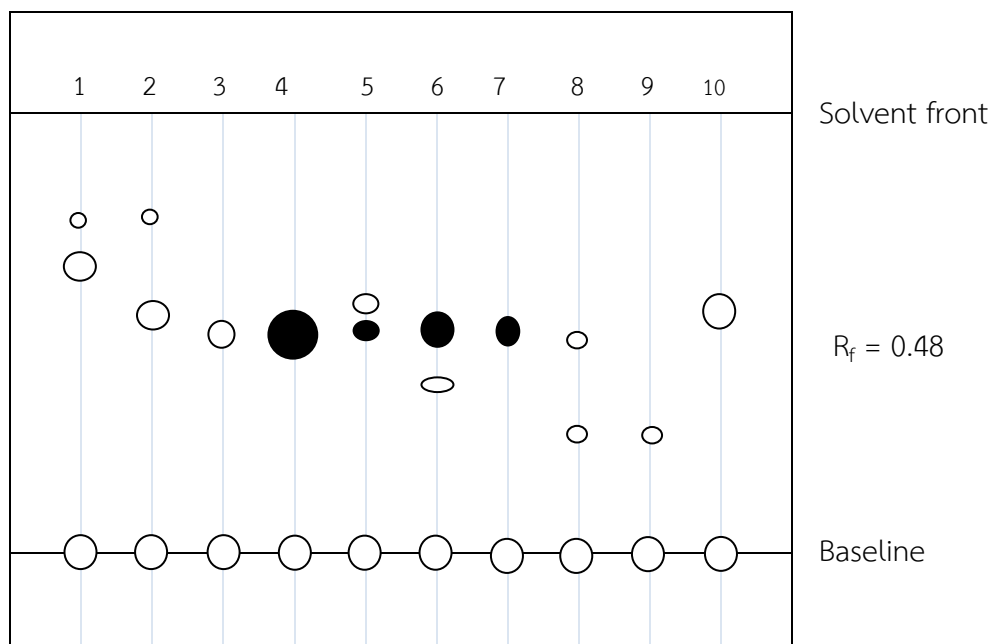
การแยกสารสกัดส่วน F2 ด้วยวิธี Flash column chromatography (Flash CC)

เตรียมคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก โดยบรรจุ silica gel 18 กรัมในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ด้วยวิธี dry packing จากนั้นนำสารสกัดส่วน F2 (65.4 mg) มาทำให้แห้งแล้วบด จากนั้นผสมกับ silica gel ในอัตราส่วนพอเหมาะ จากนั้นทำให้แห้ง นำไปบรรจุคอลัมน์ ปรับผิวหน้าให้เรียบเท่ากัน นำสำลีสับบางๆ วางบนผิวหน้าสารสกัดหยาบ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามสัดส่วนและปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 3 และเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluent) ด้วยขวดเก็บ fraction เป็นจำนวน 69 fractions จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสาร

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ที่เก็บ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ดังตารางที่ 3 และนำแผ่น TLC ไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 3) แล้วรวม fraction ที่ให้ผลใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน ได้ 8 fractions ดังตารางที่ 3 โดยส่วน F2.2, F2.3, F2.5 มีทั้งส่วนที่เป็นผลึก และสารละลาย (solvent) จากการทำ TLC พบว่าส่วน F2.3 น้ำหนักรวม 8.9 mg คือสาร NP และพบว่าส่วน F2.5 น้ำหนักรวม 15.1 mg มีสาร NP อยู่ด้วยแต่ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกสาร NP ต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลการแยกสารสกัดส่วน F2 ด้วยวิธี Flash column chromatography

Mobile phase			ปริมาตร (ml)	ขวดเก็บ fraction	Fraction	น้ำหนักแห้ง (mg)
MeOH	EtOAc	Hexane				
-	70	30	100	1	5-10 = F2.1	2.0
-	60	40	230	2-12	12-14 = F2.2 F2.2.1 (ผลึก) F2.2.2 (solvent)	1.3 5.3
-	50	50	200	13-20	11, 15-26 = F2.3 (F2.3=NP)	8.9
-	60	40	350	21-33	27-39 = F2.4	10.9
-	80	20	200	34-42	40-50 = F2.5 F2.5	15.1
-	100	0	250	43-56		
20	80	-	100	57-59	51-55 = F2.6	1.7
40	60	-	100	60-62	56-59 = F2.7	3.5
60	40	-	100	63-65	60-62 = F2.8	4.1



รูปที่ 3 TLC แสดงการแยกสารจาก F2 ด้วยวิธี column chromatography

Solvent system EtOAc :MeOH = 8:2

1=F2.1, 2 = F2.2.1, 3 = F2.2.2, 4 = F2.3.1 = NP, 5 = F2.3.2 = NP, 6 = F2.5.1,

7 = F2.5.2, 8 = F2.6, 9 = F2.7, 10 = F2.8

การนำสารสกัดส่วน F2.5 มาแยกเพื่อให้ได้สาร NP ด้วยวิธี Flash CC

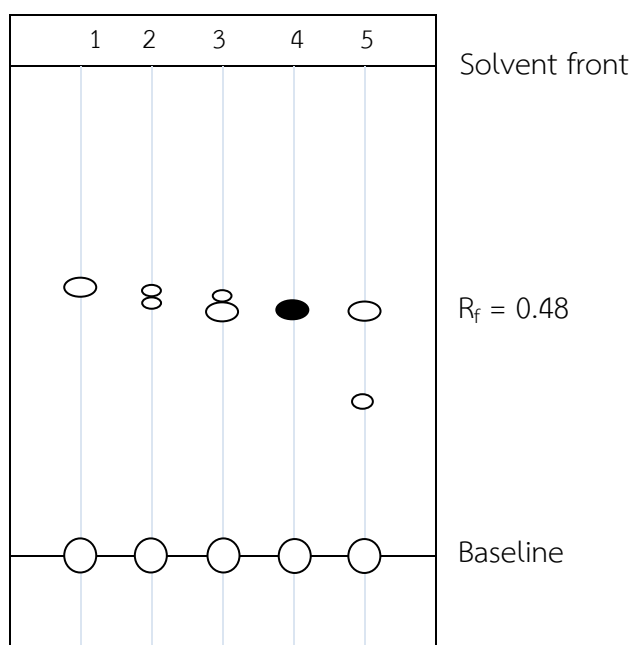
เตรียมคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก โดยบรรจุ silica gel ในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ด้วยวิธี dry packing จากนั้นนำสารสกัดส่วน F2.5 (15.1 mg) มาทำให้แห้งแล้วบด จากนั้นผสมกับ silica gel ในอัตราส่วนพอเหมาะ จากนั้นทำให้แห้ง นำไปบรรจุคอลัมน์ ปรับผิวหน้าให้เรียบเท่ากัน นำสารละลายบางๆ ลงบนผิวหน้าสารสกัดแห้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluent) ด้วยขวดเก็บ fraction เป็นจำนวน 95 fractions จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสาร

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ที่เก็บ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ดังตารางที่ 4 และนำแผ่น TLC ไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 4) แล้วรวม fraction ที่ให้ผลใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน ได้ 5 fractions คือ F2.5.1, F2.5.2, F2.5.3, F2.5.4 และ F2.5.5 โดยพบว่าสารส่วน F2.5.4 (7.2 mg) คือ NP

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลการแยกสารสกัดส่วน F2.5

Mobile phase			ปริมาตร (ml)	ขวดเก็บ fraction	Fraction	น้ำหนัก แห้ง (mg)
MeOH	EtOAc	Hexane				
-	20	80	50	1-7	1-9 = F2.5.1	-
-	40	60	250	8-49	10-18 = F2.5.2	6.9
-	50	50	200	50-70	19 = F2.5.3	-
-	60	40	100	71-78	20-72 = F2.5.4 (NP)	7.2
-	80	20	100	79-85	73-95 = F2.5.5	-
-	100	0	50	86-89		
-	50	50	50	90-93		
100	0	-	50	94-95		

*น้ำหนักแห้งรวม 14.1 มิลลิกรัม



รูปที่ 4 TLC แสดงการแยกสารจาก F2.5 ด้วยวิธี column chromatography

Solvent system EtOAc :MeOH = 8:2

1 = F2.5.1, 2 = F2.5.2, 3 = F2.5.3, 4 = F2.5.4 = NP, 5 = F2.5.5

การแยกสารสกัดส่วน F3 ด้วยวิธี Flash column chromatography (Flash CC)

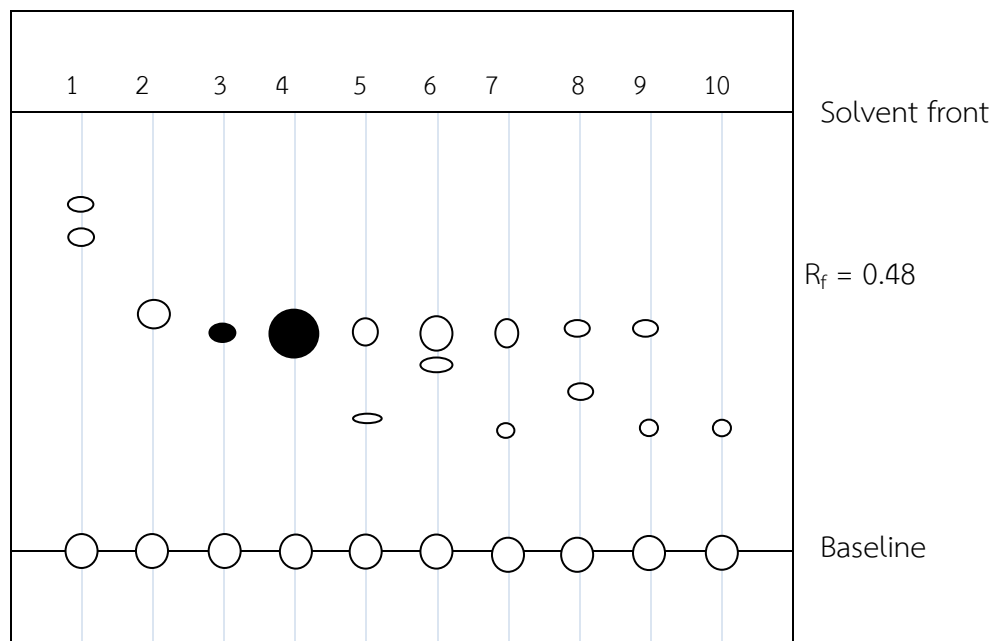
เตรียมคอลัมน์ที่ใช้ในการแยก โดยบรรจุ silica gel ในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ด้วยวิธี dry packing จากนั้นนำสารสกัดส่วน F3 (153.5mg) มาทำให้แห้งแล้วบด จากนั้นผสมกับ silica gel ในอัตราส่วนพอเหมาะ จากนั้นทำให้แห้ง นำไปบรรจุคอลัมน์ ปรับผิวหน้าให้เรียบเท่ากัน นำสารละลายบางๆ ลงบนผิวหน้าสารสกัดแห้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluent) ด้วยขวดเก็บ fraction เป็นจำนวน 46 fractions จากนั้นนำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสาร

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ที่เก็บ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ดังตารางที่ 5 และนำแผ่น TLC ไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (ดังรูปที่ 5) แล้วรวม fraction ที่ให้ผลใกล้เคียงกันได้ด้วยกัน ได้ 10 fractions ดังตารางที่ 6 โดยพบว่าสารส่วน F3.3 (1.4 mg) และ F3.4 (11.3 mg) น้ำหนักรวม 12.7 mg คือสาร NP

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลการแยกสารสกัดส่วน F3

Mobile phase			ปริมาตร (ml)	ขวดเก็บ fraction	Solvent system TLC		Fraction	น้ำหนัก แห้ง (mg)
MeOH	EtOAc	Hexane			EtOAc	Hexane		
-	20	80	100	1	8	2	1-7 = F3.1	11.1
-	40	60	200	2-10			8-12 = F3.2	6.3
-	50	50	200	11-19			13 = F3.3 14-16 = F3.4 (F3.3- F3.4 = NP) 17-19 = F3.5	1.4 11.3 รวม 12.7 5.8
-	60	40	200	20-29			20-25 = F3.6	17.1
-	80	20	100	30-35			26 = F3.7	2.2
-	100	0	100	36-40			27-29 = F3.8	6.6
-	50	50	100	41-45			30-44 = F3.9	45.5
100	0	-	300	46			45-46 = F3.10	13.0

*น้ำหนักแห้งรวม 120.3 มิลลิกรัม



รูปที่ 5 TLC แสดงการแยกสารจาก F3 ด้วยวิธี column chromatography

Solvent system EtOAc :MeOH = 8:2

1= F3.1, 2 = F3.2, 3 = F3.3 = NP, 4 = F3.4 = NP, 5 = F3.5, 6 = F3.6, 7 = F3.7,
8 = F3.8, 9 = F3.9, 10 = F3.10

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักรวมของสาร NP

Fraction ย่อย	น้ำหนักสาร (mg)
F1.4 (NP)	2.4
F2.3 (NP)	8.9
F2.5.4 (NP)	7.2
F3.3 (NP)	1.4
F3.4 (NP)	11.3
น้ำหนักรวม สาร NP	31.2

การแยกสกัดสารจนได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ เอทิลอะซิเตต น้ำหนัก 19.74 กรัม แสดงไว้ในแผนภูมิที่ 2

EtOAc ext.

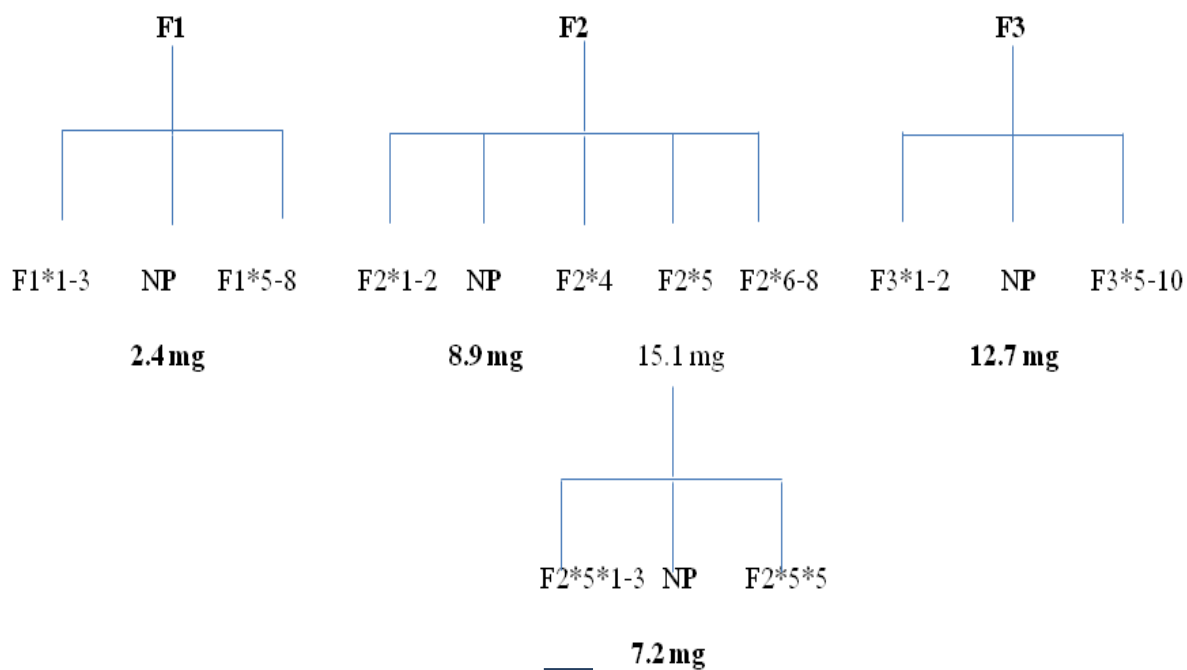
19.74 g

Quick CC (EtOAc :Hexane ; gradient)

ส่วนที่	F1	F2	F3	F4	F5
น้ำหนัก (g)	0.0819	0.0654	0.1535	1.3494	0.1846

นำสารสกัดส่วน F1, F2, F3 มาแยกสารบริสุทธิ์ (NP)

ด้วยวิธี Flash CC (EtOAc :Hexane ; gradient)



นำสาร NP (31.2 g) วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์

และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

แผนภูมิที่ 2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากใบพลองใบรี

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้

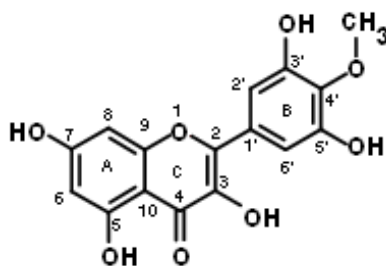
สาร NP มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเขียวมเหลือง ไม่มีกลิ่น ข้อมูลจาก ^1H และ ^{13}C -NMR spectra (รูปที่ 7 และ 8) สาร NP มี C อะตอม ในโมเลกุล 16 อะตอม เป็น Aromatic substance เมื่อศึกษาข้อมูล ^{13}C NMR spectra ของสาร NP เทียบกับสารในกลุ่ม flavonoids พบว่ามี carbonyl C (C4) ที่ δ 177 ppm, มีcarbon ที่ต่อกับ heteroatom O ที่ δ 146 ppm (C2) แสดงถึงโครงสร้างหลักของ flavonol

จากข้อมูล ^1H NMR spectra พบว่าที่ δ = 10.90 ppm แสดงถึง H-bonded OH หมู่ hydroxyl (-OH) ที่ C5 เกิด intramolecular hydrogen bonding กับหมู่ carbonyl (C4) ใกล้เคียง เกิดเป็นวง 6 เหลี่ยม ทำให้มีค่า δ สูงขึ้น (9-12 ppm) และ substitution ของ aromatic ring A ได้ จากค่า δ ที่ 6.17 และ 6.34 ppm แสดง meta-coupling ของ aromatic proton ในตำแหน่งที่ 6 และ 8 ส่วน singlet peak ที่ δ = 3.72 ppm มี H 3 อะตอม แสดงถึงหมู่ methoxy (-O-CH₃) โดยมี ข้อมูลสนับสนุนจาก ^{13}C NMR spectra ที่ δ = 59 ppm ส่วน ring B มี singlet peak ที่สูงเท่ากับ 2 H ที่ δ = 7.15 ppm แสดงว่ามี 2 H ที่ symmetry กัน ที่ 2',6'

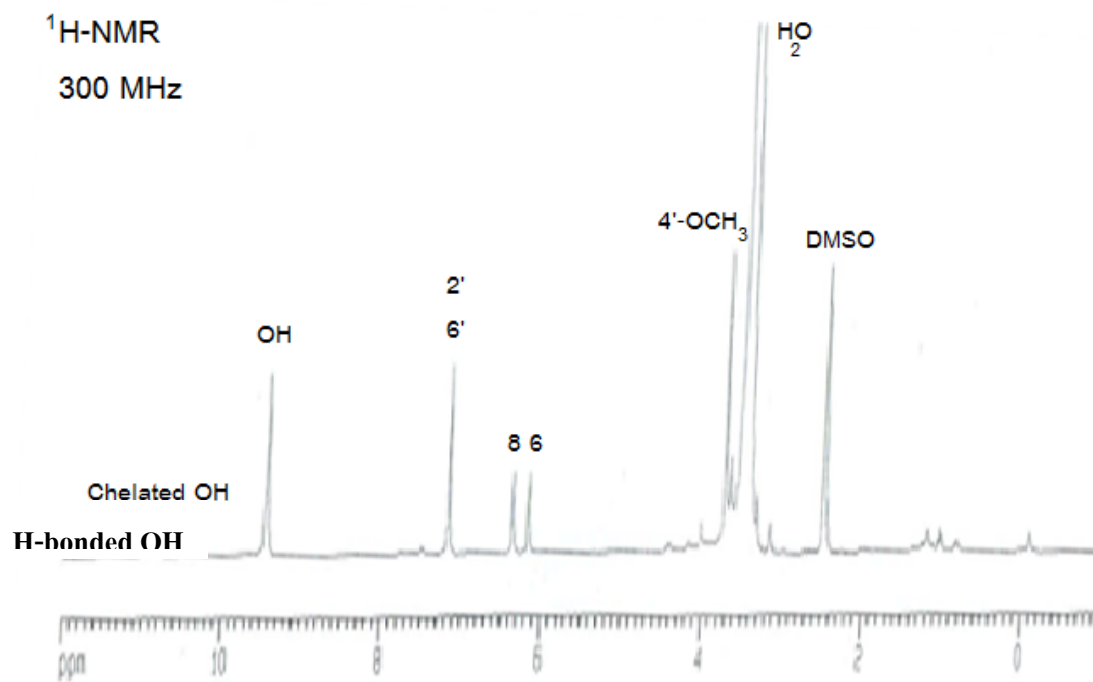
โดยเมื่อศึกษาข้อมูล ^{13}C NMR spectra ของสาร NP เทียบกับสารในกลุ่ม flavonol พบว่า สาร NP มี peak ที่มี intensity หรือความสูงของ peak เป็น 2 เท่าที่ δ = 108 ppm แสดงถึง symmetric carbon 2 carbon ของ C2',6' และ peak ที่มี intensity หรือความสูงของ peak เป็น 2 เท่าที่ δ = 151 ppm แสดงถึง symmetric carbon 2 carbon ของ 3',5'-OH (chemical shift มีค่า สูงกว่า เนื่องจาก C อะตอมต่อกับ Heteroatom (O))

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectra ของสาร NP กับ mearnsetin ดัง แสดงในตารางที่ 7 พบว่าข้อมูลค่า δ ใน ^1H และ ^{13}C NMR spectra ของสารทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน ค่าแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากละลายในdeuterosolvent ที่ต่างกัน คือ ละลายในDMSO และ CD₃OD ตามลำดับ

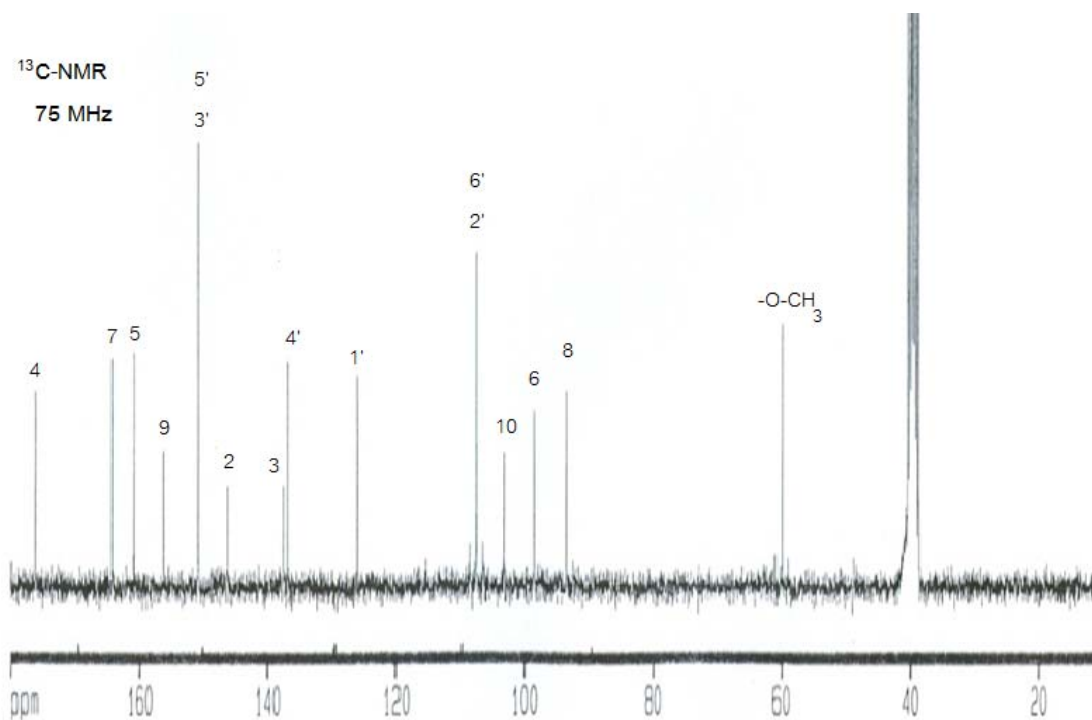
จากข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ดังกล่าว พบว่าสาร NP คือ 2-(3',5'-dihydroxy -4'-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one หรือ mearnsetin (Abbas et al., 2007)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้าง Mearnsetin



รูปที่ 7 ¹H NMR Spectra ของสาร NP



รูปที่ 8 ¹³C NMR Spectra ของสาร NP

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูล ^{13}C และ ^1H spectra ของสาร NP ใน DMSO (^{13}C : 75 MHz ^1H : 300 MHz, δ ppm, J Hz) เทียบกับสาร Mearnsetin ใน CD_3OD (^{13}C : 125 MHz ^1H : 500 MHz, δ ppm, J Hz)

Position	NP ใน DMSO		Mearnsetin ใน CD_3OD	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	146		145.8	
3	138		137.3	
4	177		176.3	
5	161		161.3	
6	98	6.15	98.2	6.17(d, 2.5)
7	165		164.7	
8	94	6.35	93.3	6.36(d, 2.5)
9	157		157.1	
10	103		103.4	
1'	127		126.8	
2'	108	7.15	107.5	7.30(s)
3'	151		150.5	
4'	137		137.3	
5'	151		150.5	
6'	108	7.15	107.5	7.30(s)
4'-OCH ₃	59	3.75	59.7	3.87(s)
3'-OH, 5'-OH		9.42		
5-OH		10.90		

Abbas et al., 2007

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีน และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

จากการนำสารที่แยกได้ NP ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีน พบว่าสาร NP มีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของสาร AGE เป็น 75.62 ส่วนผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสาร NP พบว่ามีร้อยละ 90.47

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการสกัดใบพลองใบรี (*Memecylon plebejum* Kurz. var. *ellipsoideum* Craib) ด้วยเอทานอล 95% เฮกเซนและเอทิลอะซิเตท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ พบว่าสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทน้ำหนักแห้ง 24.70 กรัม มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี % inhibition คิดเป็น 85.08 และ 98.59 % ตามลำดับ และเนื่องจากเป็นชั้นตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายสารได้ทั้งสารมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงเลือกชั้นนี้เพื่อนำมาสกัดแยกหาสารสำคัญ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทของใบพลองใบรีมาผ่านกระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ โดยเทคนิค Chromatography เริ่มจากการทำ Quick column chromatography ตามด้วยการทำ Flash column chromatography สามารถแยกได้สาร NP มีน้ำหนัก 31.20 มิลลิกรัม และนำมาวิเคราะห์โครงสร้างของสาร NP ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy โดยนำข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectra มาเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานมาก่อนหน้าพบว่า NP คือ สาร 2-(3',5'-dihydroxy-4'-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one หรือ mearnsetin

มีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าพืชที่มีสารยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์เป็นพืชที่กระจายอยู่ในวงศ์ต่างๆ และสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์นี้เกี่ยวข้องกับสารกลุ่มที่มี phenolic หรือสาร ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ตัวอย่างของงานวิจัย ได้แก่ การนำสารสกัดด้วย ethanol ของพืช 17 ต้นจากประเทศ Canada มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ พบว่าส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ดี โดยมีค่า IC_{50} จาก 0.4 – 38.6 $\mu\text{g/}$ โดยมีตารางสรุปชื่อพืช วงศ์ สารสำคัญ และค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วย ethanol ดังตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ เกี่ยวโยงกับปริมาณ total phenol ฤทธิ์การแย่งจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) จะเห็นได้ว่าสารส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม phenol, polyphenol เช่น สารกลุ่ม flavonoids, procyanidins, tannins และ glycoside ของสารที่กล่าวข้างต้น (Haris et al., 2011)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสาร mearnsetin ในรูป mearnsetin และ mearnsetin-glycoside (ในรูป glucoside, rhamnoside, mono- หรือ diglycoside) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากใบของ *Artemisia annua* และใบของ *Artemisia argentea* และพบว่า ใบของ *Myrcia multiflora* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลโดสรีดักเทส (aldose reductase) ซึ่งลดอาการแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน เช่น ต้อกระจก, โรคระบบประสาท, โรคไต (Ferreira, et al., 2010; Matsuda, et al., 2002; Abbas, et al., 2007; Han et al., 2008; Gouveia and Castilho, 2011; Mahmond, et al., 2001; Sadasivam and Kumaresan, 2001; Sakushima et al., 1983; Katia et al., 2001)

ตารางที่ 8ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีนของสารที่แยกได้จากสารสกัดพืช

Metabolite	Fluorescent AGE (IC50) ^a	
	µg/mL	µM
Phenolic acid derivatives		
" gallic acid	0.56 ± 0.08	3.29 ± 0.61
" caffeic acid	1.28 ± 0.37	7.12 ± 2.50
" chlorogenic acid	1.31 ± 0.16	3.69 ± 0.57
Flavonoids		
" taxifolin	0.51 ± 0.06	1.68 ± 0.26
" quercetin	1.69 ± 0.33	5.58 ± 1.08
" quercetirin	3.51 ± 1.37	7.82 ± 3.75
" rutin	4.14 ± 0.37	6.77 ± 0.74
" myricetin	0.86 ± 0.03	2.70 ± 0.12
" catechin	3.15 ± 0.32	10.84 ± 1.11
Procyanidins		
" procyanidin B1	2.18 ± 0.23	3.77 ± 0.48
" procyanidin B2	1.41 ± 0.17	2.43 ± 0.37
Nonphenolic compounds		
" 24-hydroxybetulin	Inactive	—
" morronoside	Inactive	—

^a IC50 concentrations ± SEM were calculated as the metabolite concentration required to reduce AGE formation by 50% as determined by regression analysis (n = 3)

เมื่อนำสาร NP (mearnsetin) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีนคิดเป็น 75.62 และ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสคิดเป็น 90.47 ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ดี มี % yield จากน้ำหนักแห้งของใบพลองใบรี คิดเป็น 0.0021 % และจากน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซีเตท คิดเป็น 0.158 % นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีรายงานของสาร mearnsetin ที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด หรือฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีน หรือฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งด้านประสิทธิภาพ อาการไม่พึงประสงค์และความเป็นพิษของสารนี้ เพื่อพัฒนาเป็นยาที่นำมาใช้รักษาโรคเบาหวานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ธีระ ฤทธิรอด, จินตวิ ไชยขุน, สุภาพร น้อยเมธ, ญาณิน ขมะณะรงค์. Sitagliptin ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2. [Homepage on the internet]. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; [updates 2008 Aug; cited 2008 Aug 1] Available from: <http://www.doctor.or.th/node/7131>
- วันดี กฤษณพันธ์, พิรุณ มั่งมีศรี. สมุนไพรลดน้ำตาลในเลือด. วารสารเภสัชกรรมชุมชน 2552, 16–24.
- นายแพทย์สุรเกียรติ์ อาชานุภาพ. ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2. กรุงเทพฯ: บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิง จำกัด, พิมพ์ครั้งที่ 4; 2551: 777-91.
- Abbas F.A., Al-Massarany S.M., Khan S. et al. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L.. *Natural Product Research* Vol. 21, No.5.2007.p. 383-91.
- Ahmed, N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005, 67, 3–21.
- Amalraj T, Ignacimuthu S. Evaluation of the hypoglycaemic effect of *Memecylon umbellatum* in normal and alloxan diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 1998, 62, 247-50.
- Ferreira J.F.S., Luthria D.L., Sasaki T., et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules* 2010, 3135-70.
- Gouveia S., Castilho P.C..Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Her alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Research Intern.* 44, 2011, 1620-31.
- Han J., Ye M., Qiao X., et al. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 2008, 516-25.
- 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.
- Haris, C.S., Beaulieu, L.-P., Fraser, M.-H., McIntyre, K.L., Owen, P.L., Martineau, L.C., Cuerrier, A., Johns, T., Haddad, P.S., Bennett, S.A.L., and Amason, J.T. Inhibition

- of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Med.*, 2011, 77, 196-204.
- Huang H.W., Peng G., Bhavani P.K., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., Li Y. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, 207, 160 – 169.
- Joshi, H. , Joshi, A.B, Sati, H., Gururaja, M.P. et al. Hepatoprotective Activity of *Memecylon umbellatum* Roots Against Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Rats. *J. Res. Educ. Indian Med.*, 2008, 14(2), 49-54.
- Joshi, H. , Joshi, A.B, Sati, H., Gururaja, M.P. et al. Fatty Acids from *Memecylon umbellatum* (Burm.) *Asian J. Research Chem.* 2009, 2(2), 178-180.
- Jung, H.A., Jung, Y.J., Yoon, N.Y., Jeong, D.M., Bae, H.J., Kim, D.W., Na, D.H., Choi, J.S. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation end products formation, and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 3818–26.
- Katia Gluchorr-Fiasson, Bernard Fenet, Jean-Claude Leclerc et al. Three New Flavonol Malonyl rhamnosides from *Ribes alpinum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001, 49 (6), 768-70.
- Kim, H.Y., Kim, K. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51(6), 1586–91.
- Mahmond I.I., Marzouk M.S.A., Moharram F.A., et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 2001, 58, 1239-44.
- Matsuda H., Morikawa T., and Yoshikawa M.. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74(7), 1301-08.
- Murugesan, S., Pannerselvam, A., and Tangavelou, A.C. Phytochemical screening and Antimicrobial activity of the leaves of *Memecylon umbellatum* Burm. F. *J. Applied Pharmac. Sci.* 2011, 1 (1), 42-45.
- Murugesan S, Vijayakumar R, Panneerselvam A. Evaluation of Phytochemical Constituents from the Leaves of *Memecylon umbellatum* Burm. f. *RJPBCS*. 2011, 2(4), 1145-52.

- Nualkaew, S., Rattanamanee, K.,Thongpraditchote.,Wongkrajang, Y.,Nahrstedt, A. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. *J. of Ethnopharmacology*. 2009, 121, 278-81.
- Puttaswamy, R., Peethambar S.K. and Rajeshwara N. Achur. Hypoglycemic Activity of *Memecylon umbellatum* Leaves Methanolic Extract. *World J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 2(6), 6202-6211.
- Ramiah; M., Ganga Rao; B., Chakravarthi, G. Antidiabetic Activity of Methanolic Extract of *Memecylon malabaricum* Cogn. (Melastomataceae) Leaves. *Intern. J. Pharma & Bio Sci.*, 2013, 4 (1), 822.
- Sadasivam K. and Kumaresan R.. Antioxidant behavior of mearsetin and myricetin flavonoid compounds – A DFT study. *Spectrochimica Acta Part A* 2001, 79, 282-93.
- Sakushima A., Coskun M., Hisada S., et al. Flavonoids from *Rhamnus pallasii*. *Phytochemistry* 1983, 22 (7), 1677-78.
- Tsuji-Naito, K., Saeki, H., Hamano, M. Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extracts on formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry* 2009, 116, 854–9.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง สุรัตนา อำนวยผล
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Surattana Amnuoypol
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 00319 79 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชา เกษษเขตและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2188358
โทรสาร 02-2188357
e-mail : asuratta@chula.ac.th

1. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการศึกษาที่มีความชำนาญพิเศษ พฤกษเคมี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α - Glucosidase งบแผ่นดินปี 2553
2. การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α - Glucosidase งบแผ่นดินปี 2554
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ งบแผ่นดินปี 2555
4. การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรดักส์ งบแผ่นดินปี 2556 - 2557

5. โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คลัสเตอร์ สุขภาพ สับคลัสเตอร์ เรื่อง ฐานงานประเมินที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อมุ่งเป้าหาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพืชสมุนไพร งบประมาณปี 2554 - 2556

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

7.3.1 การคัดกรองและการแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α - Glucosidase เผยแพร่ในการประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการอพ.สธ. ครั้งที่ 5 “ทรัพยากรไทย: ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่นใจ” 3 พย. พ.ศ. 2554 จ.นครราชสีมา ทุนโครงการอพ.สธ.จพ. ปี 2552-2554

7.3.2 การคัดกรองและการแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นดีโปรตีนิกส์ งบประมาณปี 2555 – 2556 เผยแพร่ในการประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการอพ.สธ. ครั้งที่ 6 “ทรัพยากรไทย : นำสิ่งดีงามสู่ตาโลก” 21 – 23 ธันวาคม พ.ศ. 2556 ณ เชื้อนครินทร์ อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี ทุนโครงการอพ.สธ.จพ. ปี 2555-2556

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

8. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Publications:

1. Suwanchaikasem, P., Chaichantipyuth, C., **Amnuoypol, S.** and Sukrong, S. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Thunbergia laurifolia* Lindl. And its related species. *J.Med.Plants Res.*, 6(15), 2955-2964, 2012.

2. Daikuhara, N., Tada, Y., Yamaki, S., Charupant, K., **Amnuoypol, 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

3. Charupant, K., Daikuhara, N., Saito, E., **Amnuoypol, 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

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

5. Charupant K., Suwanborirux K., **Amnuoypol 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

6. 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

7. 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

8. **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

9. 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

10. 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

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