ว.วิทย. มข. 47(4) 708-718 (2562) KKU Sci. J. 47(4) 708-718 (2019)

# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดใบดีปลากั้ง

# Antioxidant and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Leaf Extracts from *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson

พิชิต โนนตูม[1] สมจินตนา ทั่วทิพย์[2] อำภา คนซื่อ[3*]

[1]สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[2]สาขาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[3]สาขาแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[*]Corresponding Author, E-mail: ampa_ice@hotmail.com

Received: 5 July 2019 | Revised: 16 September 2019 | Accepted: 29 October 2019

## บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันได้แก่ 50% ethanol (PPHE), 80% ethanol (PPE) และน้ำ ซึ่งเตรียมโดยใช้เครื่อง Water bath (PPWB) และเครื่อง Ultrasonic bath (PPSO) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด PPHE มีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 16.36±0.45 mg gallic acid equivalence / gram Extract และ10.82±0.54 mg quercetin equivalence / gram Extract ตามลำดับ และยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.63±0.04 mg/mL ส่วนสารสกัด PPE เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH assay พบว่า มีความสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด 23.61±0.54 mg Trolox equivalence /gram Extract และ $IC_{50}$เท่ากับ 4.60±0.20 mg/mL ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox สำหรับสารสกัดน้ำ PPSO และ PPWB สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.24±0.00 และ 0.32±0.08 mg/mL ตามลำดับ และสามารถยับยั้งได้ดีกว่า Acarbose ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 1.05±0.11 mg/mL ผลจากการทดลองในครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยเอทานอล 50% และ 80% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำโดยเฉพาะการต้มด้วยเครื่อง Ultrasonic มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสดีที่สุด เพื่อความปลอดภัยและการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรศึกษาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ดังกล่าว รวมทั้งกลไกอื่นๆ ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด และพัฒนาเป็นยารักษาหวานต่อไป

## ABSTRACT

This study was aimed to determined antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of leaf extracts from *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson. The extracts were prepared by using different solvents (50% ethanol (PPHE), 80% ethanol (PPE) and water extracts using water bath (PPWB) and sonicator bath (PPSO), to enhance solubility. The results revealed that PPHE had the highest total phenolic and total flavonoid contents of 16.36±0.45 mg gallic acid equivalence /gram Extract and 10.82±0.54 mg quercetin equivalence / gram Extract, respectively.

PPHE also showed the highest antioxidant capacity by ABTS assay with $IC_{50}$= 0.63±0.04 mg/mL. PPE had the highest antioxidant capacity by FRAP and DPPH assay with FRAP values of 23.61±0.54 mg Trolox equivalence /gram Extract and and $IC_{50}$ = 4.60±0.20 mg/mL, respectively. However, its free radical scavenging activity was less than the standard controls, ascorbic acid and Trolox. According to the **α**-glucosidase inhibitory activity study, the aqueous extracts; PPSO and PPWB exerted more potent activity to inhibit **α**-glucosidase emzyme with $IC_{50}$ = 0.24±0.00 and 0.32±0.08 mg/mL, respectively compared to standard control, acarbose (1.05±0.11 mg/mL). These results indicate that the ethanolic extracts; 50% ethanol (PPHE) and 80% ethanol (PPE) possess the highest effect on antioxidant activity. The aqueous extract using sonicator bath provided the most potent inhibiotory activity to against **α**-glucosidase enzyme. For the effectiveness and safety application of the extracts, further investigation on their chemical constituents, active compounds, mechanisms of action on hypoglycemic activity, and toxiciological study should be carried out for further development to anti-diabetic drug.

**คำสำคัญ:** ดีปลากั้ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม

**Keywords**: *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson, Antioxidant, **α**-Glucosidase, Total phenolic contents, Total flavonoid contents

## บทนำ

ดีปลากั้ง หรือดีปลาช่อน ดี (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson) ชื่อพ้อง *Cystacanthus pulcherrimus* C. B. Clarke อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ดีปลากั้งจัด เป็นไม้พุ่มสูง 50-150 ซม. ลำต้น ตั้งตรง ใบ เดี่ยว เรียงตรงข้าม แผ่นใบรูปรีแกมรูปขอบขนาน ยาว 8-16 ซม. กว้าง 3-5 ซม. ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปลิ่ม ขอบใบเรียบ ก้านใบ ยาว 1-3 ซม. ช่อดอก แบบช่อเชิงลด ออกที่ปลายยอด ดอก สมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยง มีสีเขียว รูประฆัง ยาว 5 มม. กลีบดอก สีม่วงอมแดง เชื่อมกันเป็นรูปคนโท ส่วนหลอดกลีบพองออกด้านเดียว ส่วนปลายแยกเป็น 5 แฉก ผล แบบแคปซูล ยาว 2.5-3.5 ซม.เมื่อแห้งแตก เมล็ดเกิดที่ช่วงปลายของผล มีก้านตะขอดีดเมล็ด (jaculator) ดอกดีปลากั้ง ออกดอกเป็นช่อที่ปลายยอด (นันทวันและคณะ, 2541) เป็นผักพื้นบ้านในแถมลุ่มน้ำโขง หมอพื้นบ้านได้มีการนำสมุนไพรดีปลากั้งทั้งต้นมาประกอบเป็นยาตำรับ ในรูปแบบยาต้ม ให้แก่ผู้ป่วยเบาหวาน สรรพคุณตามตำรายาไทย ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ บำรุงร่างกาย ยอด และใบอ่อน มีรสขม ใช้รับประทานเป็นผัก (ปรีชา และคณะ, 2540) ใบดีปลากั้งมีปริมาณสารอาหารและแร่ธาตุหลายชนิดได้แก่ โปรตีน ไขมัน เส้นใย แคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม โครเมียม และเหล็ก (Jongrungruangchok et al., 2014) ใบดีปลากั้ง พบว่ามีสารพฤษเคมีเบื้องต้น เช่น คาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอลิก คูมาริน และอาจเป็น ไตรเทอร์พีน ไดเทอร์-พีน หรือ สเตอรอล และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบดีปลากั้ง พบว่า มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 27.55 ± 0.90 mgGAE/g นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 24.02 ± 1.59 และ 33.42±3.10 mgTEAC/gextract ตามลำดับ (Lordkhem et al., 2015)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันได้แก่ ไดคลอโรมีเธน (DE) เอทธิล อะซีเตท (EE) เอ็น-บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) พบว่า สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลรวมมากที่สุด คือ EE 55.05±3.40 mgGAE/g extract เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น >2000 μg/ml มีค่า $IC_{50}$= 8.25±1.07 mgTEAC/g extract มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่า DE มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ที่ความเข้มข้น >2000 μg/ml มีค่า $IC_{50}$= 15.45 ±1.76 mgTEAC/g extract (Poeaim et al., 2016) อนุมูลอิสระ เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เซลล์ร่างกายเกิดความเสียหาย เช่น โรคเบาหวาน เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างหมู่คาร์บอนิลในโครงสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ และหมู่อะมิโนในโครงสร้างโปรตีน เกิด

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนกระทั่งให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ในรูปของสาร advanced glycation endproducts (AGEs) ซึ่งเป็นสารพิษ และก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ภายในร่างกาย ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะมีประสิทธิภาพน้อยลง เกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน (กิตติพัฒน์ และปานทิพย์, 2560; ทินกร และคณะ, 2556)

โรคเบาหวานทางการแพทย์แผนไทย เกิดจากความร้อนหรือไฟธาตุในร่างกายเป็นเหตุ และเหนี่ยวนำให้ธาตุอื่นๆเกิดความผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติของธาตุนี้จะกำเริบ หย่อน หรือพิการ ขึ้นอยู่กับปัจจัยเสริม หากผู้ป่วยไม่สามารถคุมการเกิดโรคหรือการดำเนินโรคได้ เมื่อถึงจุดจบธาตุไฟจะเกิดความเสื่อมหย่อน หรือพิการ จะแสดงอาการของธาตุน้ำที่กำเริบขึ้น ส่งผลให้ธาตุลม และธาตุไฟอ่อนลงเรื่อยๆ ทำให้ธาตุดินถูกกระทบและเสียสมดุล จนทำให้ธาตุแตกได้ (ภริตา และคณะ, 2559) ในส่วนทางการแพทย์แผนปัจจุบัน มีปัจจัยหลายอย่างที่ก่อให้เกิดโรคเบาหวานหรือภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเอนไซม์แอลฟากลูโคสิเดสเป็นเอนไซม์หนึ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคเบาหวานและภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โดยเป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณผนังของลำไส้เล็ก มีหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคสิเดส จะช่วยทำให้มีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวลดลง ปริมาณน้ำตาลที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดน้อยลง ในที่สุด คือทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง (วิมลพรรณ และคณะ, 2553)

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดของใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันได้แก่ 50% ethanol; hydroethanol (PPHE) 80% ethanol (PPE) และน้ำ สำหรับสารสกัดน้ำสกัดโดยใช้เครื่อง Water bath (PPWB) และเครื่อง Ultrasonic bath (PPSO) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเป็นการศึกษาสารสกัดใบดีปลากั้งในตัวทำละลายที่มีขั้วมากไปหาที่มีขั้วน้อย การศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการนใช้ตามภูมิปัญญาของแพทย์พื้นบ้าน ที่นำมาทำเป็นยาต้มให้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานรับประทาน ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ นับว่าเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน และบุคลากรทางการแพทย์และการสาธารณสุข ทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำเอาสมุนไพรดีปลากั้งมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวานโดยตรงหรือใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## วิธีการดำเนินการวิจัย

**แหล่งที่มาของตัวอย่างพืช**

พืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ สมุนไพรดีปลากั้ง ส่วนของพืชที่ใช้ คือ ใบ เก็บใบพืชมาจากแปลงปลูกพืชสมุนไพรตัวอย่าง กลุ่มงานแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสว่างแดนดิน อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร เก็บเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2561 ตรวจเอกลักษณ์พืชโดยผู้เชี่ยวชาญจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (MED-PP0001/PN) เก็บไว้ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลือกใบดีปลากั้งเฉพาะใบเพสลาด ที่ลักษณะสมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลง นำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง จากนั้นบดจนเป็นผงละเอียด เก็บใส่ภาชนะที่แห้งและปิดสนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้น

**การเตรียมสารสกัดน้ำ (PPWB และPPSO)**

นำผงใบดีปลากั้ง ต้มกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 ต้มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต้มด้วยเครื่อง Water Bath (PPWB) และเครื่อง Ultrasonic bath (PPSO) คลื่นความถี่ 53 kHz ทำการต้มซ้ำอีกสองครั้ง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารที่ได้จากการกรองไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิทและทึบแสง ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

**การเตรียมสารสกัด 50% Ethanol (PPHE)**

นำผงใบดีปลากั้งไปหมักด้วย 50% Ethanol โดยใช้ผงใบดีปลากั้ง : 50% Ethanol ในอัตราส่วน 1 : 4 หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้ไประเหยโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ตามด้วยการทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิทและทึบแสง ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

**การเตรียมสารสกัด 80% Ethanol (PPE)**

นำผงใบดีปลากั้งไปหมักด้วย 80% Ethanol โดยใช้ผงใบดีปลากั้ง : 80% Ethanol ในอัตราส่วน 1 : 4 หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้ไประเหยโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ตามด้วยการทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิทและทึบแสง ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

**การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม**

หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยประยุกต์ตามวิธีของ Zhishen et al.(1999) กล่าวคือ เตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2.5 % $Na_2NO_3$ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin รายงานค่ามีหน่วยเป็น mg quercetin equivalence/gram Extract

**การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม**

ดัดแปลงจากวิธีการของ Singleton et al. (1999) โดยเตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin–Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาบอเนตความเข้มข้น 7.5 % w/v ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 765 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid รายงานค่ามีหน่วยเป็น mg gallic acid equivalence /gram Extract

**การวัดความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) assay**

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Benzie et al. (1999) โดยเตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน นำสารตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม สารละลาย FRAP ปริมาตร 900 ไมโครลิตร (300 mM Acetate buffer (pH 3.6): 10 mM Tripyridyltriazine: 20 mM Ferric chloride ในอัตราส่วน 10: 1: 1) เขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox รายงานค่ามีหน่วยเป็น mg Trolox equivalence /gram Extract

**การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay**

ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Brand-Williams et al. (1995) กล่าวคือ เตรียมสารสกัดทุกตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.16 0.31 0.63 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม DPPH ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 0.1 mM ในเอทานอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้น ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Abs_{\text{DPPH}} - Abs_{DPPH+tes}}{Abs_{\text{DPPH}}} \times 100$$

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้น รายงานเป็นค่า $IC_{50}$ (50 % Inhibitory concentration) และเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Trolox

**การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS assay**

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Re et al. (1999) โดยเตรียมสารละลาย ABTS ด้วยการเปลี่ยน ABST ให้เป็นอนุมูลอิสระ ABTS•+ ด้วยการเติมสารละลาย $K_2S_2O_8$ จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางสารละลาย ABTS•+ ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS•+ ประมาณ 0.7xx-0.8xx จากนั้นนำสารสกัดทุกตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.04, 0.08, 0.11, 0.15 และ 0.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS•+ ที่เจือจางปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Abs_{\text{ABTS}} - Abs_{ABTS+test}}{Abs_{\text{ABTS}}} \times 100$$

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้น รายงานเป็นค่า $IC_{50}$ (50 % Inhibitory concentration) เทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Trolox

**การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส**

ดัดแปลงจากวิธีของ Dong et al. (2012) ทำการทดสอบเฉพาะสารสกัดน้ำใบดีปลากั้ง (PPWB และ PPSO) โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยน้ำกลั่น ทำให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.01 0.02 0.04 0.08 และ0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างปริมาณ 120 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มให้เกิดปฏิกิริยาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย p-nitrophenyl-$\alpha$-D-glucopyranoside: PNP-G ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรท นำไปบ่มให้เกิดปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 320 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{Abs_{\text{blank}} - Abs_{sample}}{Abs_{\text{blank}}} \times 100$$

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้น รายงานเป็นค่า $IC_{50}$ (50 % Inhibitory concentration) เทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose

**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยของการทดลองละ 5 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance; One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่างและแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ P-value <0.05 คำนวณค่าสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในคอมพิวเตอร์

## ผลการวิจัย

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม**

ในการทดสอบสารสกัดใบดีปลากั้งในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด PPHE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ 16.36±0.45 mg quercetin equivalence/gram Extract รองลงมา คือ PPSO PPE และ PPWB เท่ากับ 8.96±0.10 6.32±0.05 และ 4.35±0.07 mg quercetin equivalence/gram Extract ตามลำดับ

**ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม**

จากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบดีปลากั้งในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด PPHE มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ 10.82±0.54 mg gallic acid equivalence /gram Extract รองลงมา ได้แก่ PPE PPSO PPWB คือ มีปริมาณ 9.41±0.03 4.06±0.15 และ 1.67±0.08 mg gallic acid equivalence/gram Extract ตามลำดับ

**ความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay**

จากการทดสอบ พบว่า สารสกัด PPE เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์ $Fe3^+$ เป็น $Fe2^+$ ได้ดีที่สุด เท่ากับ 23.61±0.54 mg Trolox equivalence /gram Extract รองลงมา คือ PPSO, PPHE และ PPWB เท่ากับ 22.36±0.93, 14.09±1.07 และ 11.13±0.70 mg Trolox equivalence /gram Extract

**ความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay**

สารสกัดจากใบดีปลากั้งในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด PPE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 4.60±0.20 mg/mL รองลงมา คือ PPSO PPWB และ PPHE มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 6.40±0.08, 10.60±2.40 และ 13.87±2.37 mg/mL ตามลำดับ แต่สารสกัดใบดีปลากั้งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ Ascorbic acid และ Trolox ที่มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.02±0.0003 และ 0.04±0.0008 mg/mL ตามลำดับ

**ความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay**

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบดีปลากั้งในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัด PPHE มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.63±0.04 mg/mL รองลงมาคือ PPSO

PPWB และ PPE มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.90±0.03, 1.79±0.06 และ 2.15±0.20 mg/mL ตามลำดับ แต่สารสกัดใบดีปลากั้งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ Ascorbic acid และ Trolox ที่มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.01±0.0002 และ 0.02±0.0004 mg/mL ตามลำดับ

**ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส**

เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส พบว่า สารสกัด PPSO มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.237±0.008 mg/mL รองลงมาคือ PPWB มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.3018±0.082 mg/mL จะเห็นได้ว่า สารสกัดน้ำจากใบดีปลากั้งทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ และยับยั้งได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 1.0543±0.11 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

## วิจารณ์ผลการวิจัย

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม**

ผลการทดลองให้ครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวม การใช้ 50% Ethanol เป็นตัวทำละลาย ส่งผลให้สารสกัดใบดีปลากั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น งานวิจัยของ Poeaim et al. (2016) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ ไดคลอโรมีเธน (DE) เอทธิล อะซีเตท (EE) เอ็น-บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) พบว่า สารสกัดหยาบจากใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ทำให้สารสกัดที่ได้มีปริมาณฟีนอลิก รวมแตกต่างกัน สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ EE 55.05±3.40 mgGAE/g Extract รองลงมา คือ BE, DE และ AE 25.02±5.60, 15.16±0.82 และ 13.77±0.57 mgGAE/g Extract ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยของ Lordkhem et al. (2015) พบว่า สารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 27.55 ± 0.90 mgGAE/g เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่พบในสารสกัดนอกจากจะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแล้ว ยังขึ้นอยู่กับวิธีการที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งส่วนของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล ตลอดจนปัจจัยอื่น ๆ เช่น ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว สถานที่ปลูก ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมในส่วนอื่น ๆ ของดีปลากั้ง เช่น ดอก ยอดอ่อน โดยใช้วิธีการในการวิเคราะห์แตกต่างกัน และเก็บตัวอย่างพืชจากสถานที่แตกต่างกัน เป็นต้น

**ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม**

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสารสกัดใบดีปลากั้งจากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของฟลาโวนอยด์รวม ในสารสกัดใบดีปลากั้ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน พบว่า สารสกัด 50% Ethanol (PPHE) มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด แสดงว่า ฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดใบดีปลากั้ง มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับ 50% Ethanol เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีขั้วแตกต่างกันจะสามารถสกัดสารพฤกษเคมีออกมาจากพืชได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน การสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช และส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้จากสารสกัดนั้น ขึ้นอยู่กับโครงสร้าง หรือลักษณะเฉพาะทางเคมี สภาพขั้วของสารออกฤทธิ์ จำนวนของตัวอย่าง รวมทั้งสภาวะหรือวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา และอุณหภูมิ เป็นต้น (วัชชราภรณ์ และพิชิต, 2560) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ James et al. (2012) ได้ทำการศึกษาสารสกัดใบทองพันชั่ง ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับดีปลากั้ง พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบทองพันชั่ง มีฟลาโวนอยด์มากที่สุด (1.15±0.14mg/g$^{-1}$RE) และมากกว่าจากสารสกัดเอทานอลรากทองพันชั่ง (1.13±0.17mg/g$^{-1}$RE)

**ความสามารถของสารสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay**

สารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบดีปลากั้งอาจมาจากสารจำพวก อัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอล หรือคูมาริน (Lordkhem et al., 2015) สารฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) เป็นกลุ่มสารพฤกษเคมีที่มีสรรพคุณ มีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (พร้อมจิต และรุ่งระวี, 2553) จากการศึกษาพืชในวงศ์

Acanthaceae พบว่า สารสกัดใบทองพันชั่งที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP มีค่า FRAP value เท่ากับ 215.19±20.69 mg/g (นวฉัตร, 2559)

**ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัด โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay**

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบดีปลากั้ง การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร ผลที่ได้จากการทดลองวิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบดีปลากั้งด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารสกัดด้วยเอทานอล 80 % (PPE) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แต่น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox ซึ่งก่อนหน้านี้มีงานวิจัยของ Lordkhem et al. (2015) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบดีปลากั้ง มีค่าเท่ากับ 24.02 ± 1.59 mgTEAC/g Extract นอกจากนี้ Poeaim et al. (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบดีปลากั้งที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ ไดคลอโรมีเธน (DE) เอทธิล อะซีเตท (EE) เอ็น-บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัด DE ที่ความเข้มข้น >2000 μg/ml มีค่า $IC_{50}$=8.25±1.07 mgTEAC/g Extract มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากันกับสารสกัด AE ความเข้มข้น >2000 μg/mL มีค่า $IC_{50}$= 9.87±0.26 สารสกัด BE ความเข้มข้น 1422.93 μg/mL มีค่า $IC_{50}$=18.53±1.62 และสารสกัด EE ความเข้มข้น 730.28 μg/mL มีค่า $IC_{50}$=33.27±5.81 mgTEAC/g Extract ตามลำดับ

**ความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay**

การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay ผลที่ได้จากการทดลองด้วยวิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยสารสกัดด้วยเอทานอล 50 % มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แต่น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox และยังสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งก่อนหน้านี้มีการศึกษาของ Lordkhem et al. (2015) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดเมทานอลจากใบดีปลากั้ง มีค่า เท่ากับ 33.42±3.10 mgTEAC/g Extract นอกจากนี้ Poeaim et al. (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากใบดีปลากั้ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไดคลอโรมีเธน (DE), เอทธิล อะซีเตท (EE), เอ็น-บิวทานอล (BE) และ น้ำ (AE) เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัด DE มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ที่ความเข้มข้น >2000 μg/mL มีค่า $IC_{50}$เท่ากับ15.45c±1.76 รองลงมา คือ สารสกัด AE ความเข้มข้น 1065.33 μg/mL มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 23.06b±2.04 สารสกัด BE ความเข้มข้น 1160.41 μg/ml มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 26.44b±2.39 และสารสกัด EE ความเข้มข้น 628.39 μg/mL มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 45.50±3.85 mgTEAC/g Extract

**ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส**

จากภูมิปัญญาของหมอพื้นบ้านที่ได้นำสมุนไพรดีปลากั้งซึ่งมีรสขมมาประกอบเป็นยาตำรับ ในรูปแบบยาต้ม ให้แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเตรียมโดยใช้เครื่อง Water bath (PPWB) และเครื่อง Ultrasonic bath (PPSO) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส พบว่า สารสกัด PPSO มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.237±0.008 mg/mL รองลงมา คือ PPWB มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.3018±0.082 mg/mL จะเห็นได้ว่า สารสกัดน้ำจากใบดีปลากั้งทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ และยับยั้งได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 1.0543±0.11 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ก่อนนี้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรที่มีรสขมซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดี เช่น จากการศึกษาสารสกัดพิกัดตรีญาณรส (TJ) ซึ่งประกอบด้วย หมาก รากสะเดา และเถาบอระเพ็ด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ (ATJ) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.0127±0.02 mg/mL รองลงมา คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 95% (ETJ) และสารสกัด

ด้วยเอทานอล 50% (HETJ) ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.0154±0.01 และ 0.0202±0.01 mg/mL ตามลำดับ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีกว่า acarbose ($IC_{50}$ เท่ากับ 0.745±0.026 mg/mL) (Taepongsorat and Konsue 2019) และยังสอดคล้องกับสารสำคัญจากใบทองพันชั่งซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นวงศ์เดี่ยวกับกับดีปลากั้ง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ได้แก่ Rhinacanthins-rich extract, rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D ซึ่งมีค่า$IC_{50}$ เท่ากับ 25.0, 22.6 และ 71.5 mg/mL สารมาตรฐาน Acarbose มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 395.4 mg/mL (Ajmal et al., 2017) เช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ในหลอดทดลองของสารสกัดเสลดพังพอน ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงค์ Acanthaceae และใช้ในการรักษาโรคเบาหวานในมาเลเซีย ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane (H) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 3.07 ± 0.05 μg/mL รองลงมาคือ hexane : ethyl acetate (HE) มีค่า$IC_{50}$ เท่ากับ 5.54 ± 0.09 μg/mL รองลงมาคือ ethyl acetate (E) มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 8.42 ± 0.17 μg/mL รองลงมาคือ ethyl acetate : methanol (EM) มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 37.45 ± 0.90 μg/mL และ methanol (M) มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 133.57 ± 0.30 μg/mL ตามลำดับ (Murugesu et al.,2018) นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของฟ้าทะลายโจรซึ่งเป็นสมุนไพร รสขมและอยู่ในวงศ์ Acanthaceae พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 20 % ที่ความเข้มข้น 62.5 31.25 15.6 7.8 3.9 1.95 mg/mL โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 17.2 ± 0.15 mg/mL พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (Subramanian et al.,2008)

จากการศึกษาปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิด พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งอาจมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน การยับยั้งการทกงานเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส มีความสำคัญต่อการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ หากเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง จะทำให้สามารถลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่จะเข้าสู่ร่างกาย (Shihabudeen et al.,2011)

**ตารางที่ 1** ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน และความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

| Sample | ปริมาณฟีนอลิกรวม | ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม | FRAP assay |
|---|---|---|---|
| | mgGE/gExt | mgQE/gExt | mgTE/gExt |
| PPWB | 4.35±0.07[d] | 1.67±0.08[d] | 11.13±0.70[c] |
| PPSO | 8.96±0.10[b] | 4.06±0.15[c] | 22.36±0.93[a] |
| PPHE | 16.36±0.45[a] | 10.82±0.54[a] | 14.09±1.07[b] |
| PPE | 6.32±0.05[c] | 9.41±0.03[b] | 23.61±0.54[a] |
| Ascorbic | - | - | - |
| Trolox | - | - | - |

ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยในแนวตั้ง ตามด้วยอักษรแตกต่างกัน a, b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**ตารางที่ 2** ความสามารถของสารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ ABTS และฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

| Samples | DPPH | ABTS | α-Glucosidase |
|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$(mg/mL) | $IC_{50}$(mg/mL) | $IC_{50}$(mg/mL) |
| PPWB | 10.60±2.3997[c] | 1.79±0.0580[d] | 0.3018±0.082[a] |
| PPSO | 6.40±0.0798[b] | 0.90±0.0260[c] | 0.237±0.008[a] |
| PPHE | 13.87±2.3680[d] | 0.63±0.0355[b] | NI |
| PPE | 4.60±0.2043[b] | 2.15±0.2002[e] | NI |
| Ascorbic | 0.02±0.0003[a] | 0.01±0.0002[a] | - |
| Trolox | 0.04±0.0008[a] | 0.02±0.0004[a] | - |
| Acarbose | - | - | 1.0543±0.11[b] |

ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยในแนวตั้ง ตามด้วยอักษรแตกต่างกัน a, b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

NI = No inhibition (ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอเซ็นต์)

## สรุปผลการวิจัย

สารสกัดใบดีปลากั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้แตกต่างกัน

1. สารสกัดที่สกัดด้วย 50% ethanol มีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด

2. สารสกัดที่สกัดด้วย 50% ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วย 80% ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และวิธี DPPH assay แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox

3. สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ โดยใช้ Water bath และ Ultrasonic bath สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีกว่า Acarbose

กล่าวโดยสรุป สารสกัดใบดีปลากั้ง มีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งจะส่งผลให้มีน้ำตาลกลูโคสในเลือดน้อยลงได้ ผลจากการทดลองในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรดีปลากั้งของหมอพื้นบ้านในภาคอีสาน แถบลุ่มแม่น้ำโขง ที่นำสมุนไพรดีปลากั้งทั้งต้นมาเข้าตำรับยาหม้อต้มเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ใบดีปลากั้งจัดเป็นสมุนไพรที่มีรสขม ประชาชนนิยมนำมารับประทานเป็นผักประกอบอาหาร เนื่องจากมีความเชื่อว่า สมุนไพรรสขมสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ เพื่อให้เกิดความปลอดภัย และนำสมุนดีปลากั้งอย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ การศึกษาสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำเนื่องจากมีความสอดคล้องกับตำรับยาต้มของหมอพื้นบ้านที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบัน ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ สารออกฤทธิ์ โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารจากสมุนไพรดีปลากั้ง เพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการ วิจัย และพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากทุนส่งเสริมและพัฒนาการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมาสารคาม ประเภทบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) ประจำปีงบประมาณ 2562 และทุนอุดหนุนวิจัยสำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา (ระดับปริญญาโท) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประจำปี 2563

## เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถ การต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. วารสารวิทย์เทคโน หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 3(1): 86-94.

ทินกร เหล่าออง กนกวรรณ จารุกำจร และ วรัญา จตุพรประเสริฐ. (2556). ผลกระทบของระบบต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชั่นต่อพัฒนาการของภาวะเบาหวาน. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 9(1): 1-14.

นวฉัตร เทียนสุวรรณ บังอร ศรีพานิชกุลชัย และ นภภัค ใจภักดี. (2559). ผลของสาร สกัดสมุนไพรไทยสี่ชนิดต่อการสังเคราะห์เมลานิน. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 11(ฉบับพิเศษ): 33-42.

นันทวัน บุณยะประภัศร อรนุช โชคชัยเจริญพร. (2541) .สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 363-365.

ปรีชา อุปโยคิน เสาวภา พรสิริพงษ์ วิชิต เปานิล พร้อมจิต ศรลัมพ์ และพรทิพย์ อุศุภรัตน์. (2540). การประเมินผลการพัฒนาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเป็นยา.กรุงเทพมหานคร: พี. เอลีฟ วิ่ง. 26-29.

พร้อมจิต ศรลัมพ์ และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2553). รสยาสมุนไพรกับสารเคมี:ความเหมือนที่แตกต่าง. กรุงเทพฯ: หจก. สามลดา จำกัด.

ภริตา เพิ่มผล ทิพาพร ธาระวานิช อรุณพร อิฐรัตน์ ยุทธพงษ์ ศรีมงคล พินิต ชินสร้อย และอรรัตน์ จันทร์เพ็ญ. (2559). การศึกษาประสิทธิผล และความปลอดภัยของยามธุรเมหะ ในการ รักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2. ธรรมศาสตร์เวชสาร 16(4): 589-99.

วิมลพรรณ รุ่งพรหม ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล สัญญา เขียวไสว และมุกดา ทรงไตรย์. (2553). สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน. ว. วิทย์. กษ. 41(3/1)(พิเศษ):301-4.

วัชราภรณ์ ประภาสะโนบล และพิชิต สุดตา. (2560). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง. ว.วิทย. มข. 45(3) 531-42.

Ajmal, Shah, M., Khalil, R., Ul-Haq Z. and Panichayupakaranant, P. (2017). α-Glucosidase Inhibitory Effect of Rhinacanthins-rich Extract from *Rhinacanthus nasutus* Leaf and Synergistic Effect in Combination with Acarbose. J Funct Foods. 36:325-31.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1999). Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 299:15-27.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 28(1): 25-30.

Dong, H.Q., Li, M., Zhu, F., Liu, F.L. and Huang, J.B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and αamylase linked to type 2 diabetes. Food Chemistry. 130: 261-6.

James, M. Brimson, Sirikalaya, J., Brimson, Christopher, A., Brimson, Varaporn Rakkhitawatthana and Tewin, Tencomnao. (2012). *Rhinacanthus nasutus* extracts prevent glutamate and amyloid-β neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: possible active compounds include lupeol, stigmasterol and β-sitosterol. Thailand. Int. J. Mol. Sci. 13: 5074-97.

Jongrungruangchok, S., Songsak, T. and Wongwiwatthananukit, S. (2014). Evaluation of nutrient and mineral content of the leaves of *phlogacanthus pulcherrimus* cultivated in Thailand. BHST. 12(1): 22-26.

Li, B.B., Smith, B. and Hossian, M.M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. SEP *PURIF TECHNOL*, 48:182-8.

Lordkhem, P., Poeaim, S. and Charoenying, P. (2015). Phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities of *Phlogacanthus pulcherrimus* leaves. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. November 17-20, Bangkok, Thailand. 568-74.

Murugesu, S., Ibrahim, Z., Ahmed, Q.U., Uzir, B.F., Nik, Yusoff, N.I., Perumal, V., Abas, F., Shaari, K., and Khatib, A. (2018). Identification of α glucosidase inhibitorsfrom *Clinacanthus nutans* leaf extract using liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics and protein-ligand interaction with molecular docking. J Pharm Anal. 9(2): 91–99.

Poeaim, S., Lordkhem, P., Charoenying, P. and Laipasu, P. (2016). Evaluation of antioxidant, cytotoxic activities and total phenolic content from leaf extracts of *Phlogacanthus pulcherrimus*. IJAT. 12(7.1):1657-7.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 26:1231-7.

Shihabudeen, H.M., Priscilla, D.H. and Thirumurugan, K. (2011). Cinnamon extract inhibits α-glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. Nutrition & Metabolism 8: 46.

Singleton, V.L., Orthofer. R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology 299: 152-78.

Subramanian, M. R., Asmawi, Z. and Sadikun, A. (2008). In vitro α-glucosidase and α-amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide. Department of Pharmaceutical Chemistry,

School of Pharmacy, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia. 55(2):391-8

Taepongsorat, L. and Konsue, A. (2015). Biological Screening of Tri-Jannarose as a Recipe from Thai Traditional Medicine. Pharmacognosy R. 2019. 11(2):110-4.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64: 555-9.

❑❑❑❑❑