ว.วิทย. มข. 45(1) 68-82 (2560) KKU Sci. J. 45(1) 68-82 (2017)

ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณสารลูปินิโฟลินและฤทธิ์ทางชีวภาพของเนื้อไม้ชะเอม

Physical characteristics, lupinifolin content, and biological activity of the wood of *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum.

Nantiya Joycharat[1,2*] Decho Thammanee[1] Napat Phrommachan[1] Sarit Trimanee[1]
Thanateap Poongern[1] Chonlatid Sontimuang[1] and Surasak Limsuwan[1,2]
[1]Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[2]Excellent Research Laboratory on Natural Products, Faculty of Science and Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
[*]Corresponding Author, E-mail: nantiya.j@psu.ac.th

บทคัดย่อ

ชะเอม (*Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum.) วงศ์ Apocynaceae เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านสำหรับแก้ไอ บำรุงกำลัง และแก้พิษ พืชสมุนไพรนี้มักพบการใช้ประโยชน์ทดแทนพืชสมุนไพรอื่นที่มีชื่อพ้องกันว่าชะเอม การศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของส่วนเถา *M. extensum* ที่ผ่านการอบแห้งมีลักษณะกลมแข็ง เปลือกเรียบสีน้ำตาลเข้ม เนื้อไม้สีเหลืองนวล รสหวาน ไม่มีกลิ่นเฉพาะของพืช ลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเนื้อเยื่อผงยาต่างๆ ได้แก่ พาเรงคิมาภายในมีเม็ดแป้ง เวสเซลแบบเป็นรูมีขอบ สโตนเซลล์ เซลล์เส้นใย และเม็ดแป้ง การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบลูปินิโฟลินในสารสกัดเฮกเซนจากเนื้อไม้ *M. extensum* โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.063 mg/g การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล ของเนื้อไม้ *M. extensum* พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 80.50 – 474.86 µg/mL ด้วยวิธี DPPH และมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอยู่ในช่วง 70.97 – 434.18 mM $FeSO_4$/g ด้วยวิธี FRAP โดยสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่นๆ (DPPH; IC_{50} 80.50 µg/mL และ FRAP; 434.18 mM $FeSO_4$/g) อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของ *M. extensum* ไม่มีฤทธิ์

ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของฟันผุและไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 1000 และ 25 µg/mL ตามลำดับ

ABSTRACT

Myriopteron extensum (Wight & Arn.) K. Schum. of the family Apocynaceae is the medicinal plant used in folk medicine for its antitussive, tonic and antidote properties. This medicinal plant has often been substituted for other plants that have the same synonyms as Cha-em. This study revealed that the macroscopic characters of the dried stem of the wood of *M. extensum* were spherical liana, externally smooth dark brown, yellow wood inside, sweet, nonunique smell. Powdered drug of the wood of *M. extensum* possessed the microscopical characters including parenchyma cell with starch grains, bordered pit vessels, stone cells, fibers, and starch grains. Chemical identification using High Performance Liquid Chromatography revealed lupinofolin in hexane extract from the wood of *M. extensum* at 0.063 mg/g. The in vitro evaluation of antioxidant activity of the wood of *M. extensum* demonstrated that various solvent extracts including those of ethanol, hexane, dichloromethane, and n-butanol exhibited IC_{50} in the range of 80.50 – 474.86 µg/mL by DPPH assay and showed reducing power in the range of 70.97 – 434.18 mM $FeSO_4$/g by FRAP assay. Among all of the extracts, the highest DPPH scavenging activity and the highest reducing power were found in the dichloromethane extract (DPPH; IC_{50} 80.50 µg/mL and FRAP; 434.18 mM $FeSO_4$/g). However, all these extracts of *M. extensum* did not give antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, the major cause of tooth decay, and did not show **α**-glucosidase inhibitory activity at the highest tested concentrations of 1000 and 25 µg/mL, respectively.

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แอลฟากลูโคซิเดส ลูปินิโฟลิน ชะเอม *Streptococcus mutans*

Keywords: Antioxidant activity, **α**-Glucosidase, Lupinifolin, *Myriopteron extensum*, *Streptococcus mutans*

บทนำ

ชะเอม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Myriopteron exten-sum* (Wight & Arn.) K. Schum. วงศ์ Apocynaceae มีชื่อท้องถิ่นว่ากอน ขมเหลือง ข้าวสาร เครือเขาขมหลวง ป้างไม้ สื่อกี่ปอบอ อ้อยสามสวน อ้อยแสนสวน (เต็ม, 2557) เป็นพืชที่พบในประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย พม่า เวียดนาม และไทย (Wu and Raven, 1995) มีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อยมีน้ำยางสีขาว ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกัน รูปรีหรือค่อนข้างกลม ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ ดอกออกเป็นช่อตามซอกใบ กลีบดอกสีขาว รูปใบหอก 5 กลีบ ผลออกเป็นคู่รูปกระสวย

โคนติดกัน ลักษณะเป็นพูเป็นสันแหลมถี่ ผลแก่แตกแนวเดียว เมล็ดรูปรียาว มีขนสีขาวติดที่ปลายเมล็ด เนื้อไม้ มีรสหวาน สรรพคุณทางการแพทย์พื้นบ้าน แก้ไอ แก้อ่อนเพลีย บำรุงกำลัง และใช้เข้ายาแก้พิษ (ทรรศนีย์และชูจิตร, 2551) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *M. extensum* มีสารกลุ่มฟลาวาโนนชื่อว่าลูปินิโฟลินซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อเริม (Herpes Simplex Virus I; HSV-1) ที่ค่า IC_{50} 0.3 µg/mL ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ที่ค่า MIC 12.5 µg/mL และมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ค่า IC_{50} 3.3 µg/mL (Soonthornchareon-non et al., 2004) นอกจากนั้นยังพบรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจของสารลูปินิโฟลินที่แยกได้จากพืชอื่น ดังนี้ ฤทธิ์ต้านทูเมอร์โปรโมเตอร์ (Itoigawa et al., 2002) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอ็บสไตบาร์ (Epstein–Barr virus; EBV) (Itoigawa et al., 2002) ฤทธิ์ต้านท้องเสีย (Prasad et al., 2013) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Wang et al., 2014) และสารนี้ยังเป็นตัวออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพมากที่สุดของชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) ในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1 และ 2 µg/mL ตามลำดับ (Joycharat et al., 2013) นอกจากนี้ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบกึ่งเฉียบพลันในหนูทดลองพบว่าสารนี้ในขนาด 5 g/kg ไม่มีพิษเฉียบพลัน และพบว่าสารนี้ในขนาด 60 mg/kg ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวสุขภาพและการกินอาหารของหนูแรท (Chivapat et al., 2009) ทั้งนี้พบรายงานการแยกสารลูปินิโฟลินจากพืชที่มีชื่อพ้องกันว่าชะเอมอีก 2 ชนิด ได้แก่ *A. myriophylla* และ *Derris reticulata* Craib. (Innok et al., 2009; Joycharat et al., 2013; Prasad et al., 2013)

องค์ความรู้พื้นบ้านเกี่ยวกับสมุนไพรมีบทบาทมากขึ้นในการรักษาโรคต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าพืชกลุ่มชะเอมเป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งในปัจจุบันนี้ชะเอมที่นำมาใช้นั้นมีหลากหลายชนิดจะเห็นได้ว่าในยาไทยบางตำรับตามคัมภีร์แพทย์แผนไทยที่มีชะเอมเป็นส่วนประกอบไม่ระบุชนิดของชะเอมไว้อย่างชัดเจน (คณะกรรมการคัดสรรและเผยแพร่วรรณกรรมของชาติ, 2542) โดยพืชที่มีชื่อพ้องกันว่าชะเอมและมักพบการใช้ทดแทนกัน ได้แก่ *A. myriophylla, D. reticulata* และ *M. extensum* โดยแต่ละชนิดจะมีเนื้อไม้ที่มีรสหวานคล้ายคลึงกัน ซึ่งในทางการแพทย์พื้นบ้านในภาคใต้ของไทย และในโรงพยาบาลชุมชนบางแห่งมีข้อมูลการใช้พืชในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาโรคปวดฟันซึ่งมีสาเหตุจากฟันผุ (Joycharat et al., 2012) และตำรับยารักษาโรคเบาหวาน (อาทร และคณะ, 2536) สำหรับสมุนไพรที่เลือกมาใช้เป็นวัตถุดิบในรูปแบบต่างๆ นั้นต้องคำนึงถึงการเลือกใช้ให้ถูกต้องตามหลักเภสัชวัตถุ คือ รู้จักรูปยา สี กลิ่น รส และชื่อ (อุบลและกมลภัค, 2543) ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อสรรพคุณที่ต้องการเพื่อจะได้ใช้ประโยชน์จากสมุนไพรนั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและจะทำให้เกิดความมั่นใจต่อการใช้สมุนไพร สำหรับหลักฐานการศึกษาของ *M. extensum* ยังมีค่อนข้างน้อยทั้งทางด้านกายภาพ ด้านเคมี และด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (Macroscopic character) และลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาที่สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ (Histological character) ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รวมถึงทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และต้านเชื้อ *S. mutans* ของเนื้อไม้ชะเอม (*M. extensum*) เพื่อเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่สอดคล้องกับการใช้ประโยชน์ทางยาพื้นบ้านของพืชสมุนไพรชนิดนี้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอม (*Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum.) ได้มาจากแหล่งธรรมชาติ ในพื้นที่ จ.อุตรดิตถ์ ในช่วงเดือนสิงหาคม 2557 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งชะเอม (CB-N24) เก็บรักษาไว้ที่คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การระบุชนิดพืช

นำตัวอย่างพืชมาตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดยเปรียบเทียบกับ Flora of China Vol. 16 (Wu and Raven, 1995) และยืนยันชนิดพืชอีกครั้งโดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ซึ่งตรงกับรหัส SN 123759 จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาจัดทำ Authentic crude drug สำหรับตรวจสอบอ้างอิง โดยนำส่วนเถาของ *M. extensum* มาทำให้แห้ง จัดเก็บในขวดแก้วใสสะอาด ปิดฝามิดชิด จัดทำฉลากกำกับด้วยชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์ และวงศ์

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (Macroscopic character)

ตรวจสอบเครื่องยา (Crude drug) จากรูปร่างลักษณะภายนอก โดยการใช้ประสาทสัมผัส (Organoleptic) คือ ตา จมูก ลิ้น และการสัมผัสด้วยผิวหนัง สังเกตดูรูปร่างลักษณะ ความหยาบ ความละเอียด ความแข็ง ความอ่อนนุ่ม สี กลิ่น และรสเฉพาะ (ถนอมจิต, 2553)

ลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Histological character)

เตรียมผงยาสมุนไพรที่บดละเอียดแล้ว มาผ่านแร่ง เบอร์ 100 จากนั้นตรวจสอบสมุนไพรในรูปผงยา โดยใช้น้ำกลั่นเป็นน้ำยาย้อม ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400x ดูลักษณะของเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ในผงยา ซึ่งจะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าผงยานั้นๆ เป็นส่วนใดของพืช ผงยาบางชนิดจะมีรูปร่างของเนื้อเยื่อเฉพาะอย่าง แตกต่างจากผงยาอื่นๆ หรือไม่พบในผงยาอื่นเลย ก็จะเป็นเครื่องยืนยันได้แน่นอนว่าเป็นตัวยาชนิดนั้นๆ (ถนอมจิต, 2553)

3. การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างเนื้อไม้ *M. extensum* มาล้างให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C บดหยาบ ชั่งตัวอย่างแห้ง จำนวน 500 กรัม สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธีแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง กรองแยกสารสกัดมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator และระเหยแห้งต่อด้วย water bath บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้ จากนั้นนำสารสกัดหยาบเอทานอลมาสกัดต่อใน separatory funnel ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ hexane dichloromethane และ butanol ด้วยวิธี partition ระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดต่างๆ ด้วยเครื่อง rotary evaporator และระเหยแห้งต่อด้วย water bath บันทึกน้ำหนัก คำนวณค่าร้อยละ (% yield) ของสารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4. การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของเนื้อไม้จาก *M. extensum* ดัดแปลงจากวิธีของ Joycharat

et al. (2016) โดยใช้เครื่อง HPLC ตัวตรวจวัดคือ UV–detector และใช้สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ คอลัมน์: Hypersil ODS (4.0×250 mm, 5 μm) เฟสเคลื่อนที่ methanol: 15% glacial acetic acid; (80:20 %v/v) อัตราการไหล: 1.0 mL/min ปริมาตรในการฉีด: 10 μL อุณหภูมิของคอลัมน์: 25°C ความยาวคลื่นของการตรวจวัด: 254 nm การศึกษาวิเคราะห์เชิงคุณภาพของเนื้อไม้ *M. extensum* ทำโดยการระบุพีคของสารลูปินิโฟลินในโครมาโทแกรมสารสกัดจากการเปรียบเทียบค่าเวลาการคงอยู่ (retention time) ของพีคสารในโครมาโทแกรมของสารสกัดและค่าเวลาการคงอยู่ของสารมาตรฐานลูปินิโฟลินในโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดเนื้อไม้ *M. extensum* โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสมการเส้นตรง y = ax + b เมื่อค่า x คือ ความเข้มข้นของสารลูปินิโฟลินที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ค่าความเข้มข้น ดังนี้ 1.0 5.0 25.0 50.0 100.0 mg/L และ ค่า y คือ พื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารลูปินิโฟลินที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้พีคของสารลูปินิโฟลินในสารสกัด *M. extensum* กับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน ทำการวิเคราะห์ซ้ำสารสกัดละ 2 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณค่าที่ได้เป็นมิลลิกรัมของสารลูปินิโฟลินต่อ 1 กรัมน้ำหนักสารสกัด

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของ *M. extensum* และสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน ด้วยวิธี Broth microdilution (CLSI, 2009) โดยวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและชนิดแข็ง วิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และวิธีการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ได้แสดงไว้แล้วในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย (นันทิยา และคณะ 2557)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากชะเอม (*M. extensum*) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams et al. (1995) ดังนี้ สารละลายของสารสกัดตัวอย่างเตรียมโดยการเจือจาง stock solution แบบ two-fold dilution ด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล สารละลาย 0.031 g/L DPPH เตรียมในตัวทำละลายเมทานอล ผสมสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น และสารละลาย DPPH ใน 96-well microplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Tecan Austria GmbH, Austria) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการลดปริมาณอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากกราฟระหว่างค่า % radical scavenging กับค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบ โดยชุดควบคุมแบบ positive คือสารมาตรฐาน ascorbic acid

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดจากชะเอม (*M. extensum*) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Butsat and Siriamornpun (2010) การ

เตรียมสารละลาย FRAP ทำโดยผสมสารละลาย 0.3 M Acetate buffer (pH 3.6) กับ สารละลาย 20 mM Ferric chloride และ สารละลาย 20 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 10:1:1 และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1000 µg/mL ด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ผสมสารละลายตัวอย่างและสารละลาย FRAP ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys, U.S.A.) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา total reducing power ของสารสกัดตัวอย่างที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} จากกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) (ความเข้มข้นของ $FeSO_4$; 0.008, 0.016, 0.032, 0.065 และ 0.129 mM มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 596 nm เท่ากับ 0.205, 0.382, 0.722, 1.447, 2.823 ตามลำดับ) โดยต้องเจือจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า $FeSO_4$ Equivalent (mM $FeSO_4$/g)

8. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bachhawat et al. (2011) การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเจือจาง stock solution ของสารตัวอย่างด้วยสารละลาย 20% DMSO การทดสอบของสารตัวอย่างจะเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารละลาย 5% DMSO แทนสารตัวอย่าง และชุดควบคุมแบบ positive ซึ่งใช้สารมาตรฐาน acarbose การทดสอบจะทำซ้ำสามครั้ง การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสแสดงในรูปร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) และวิธีการทดสอบหาค่า % inhibition ได้แสดงไว้แล้วในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย (ปภาวรินทร์และนันทิยา, 2558)

ผลการวิจัย

1. การระบุชนิดพืช (Plant Identification)

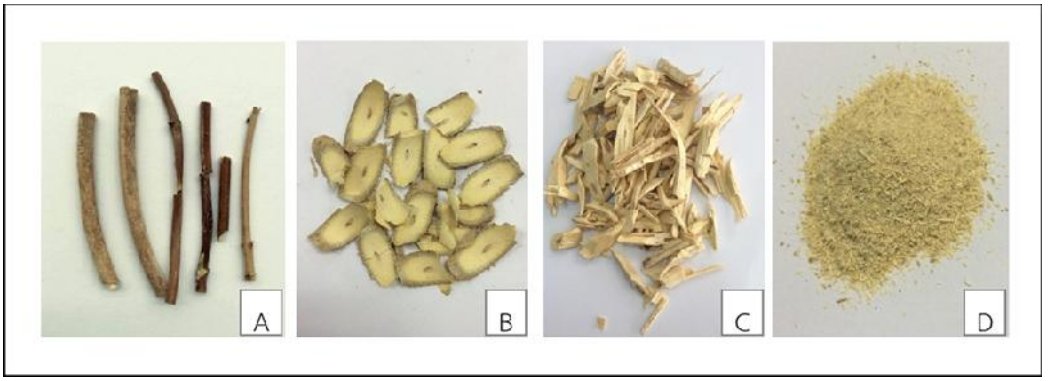
จากการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างพืชสมุนไพร “ชะเอม” พบว่าเป็นไม้เถาเลื้อย ใบเดี่ยวออกตรงกันข้าม ลักษณะใบรีรูปไข่ ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ ผลเป็นฝักคู่ โคนติดกัน รูปกระสวย เป็นสันถี่ เมล็ดเป็นรูปไข่ มีขนสีขาวที่ปลายเมล็ด (รูปที่ 1A-C) โดยมีลักษณะตรงกับพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum. วงศ์ Apocynaceae

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของ *M. extensum* ที่ผ่านการอบแห้งมีเถาลักษณะกลมแข็ง เปลือกด้านนอกมีผิวเรียบสีน้ำตาลเข้ม เนื้อไม้ด้านตัดตามขวางมีสีเหลือง ลักษณะผงยาส่วนเนื้อไม้มีสีเหลืองนวล (รูปที่ 2A-D) รสหวาน ไม่มีกลิ่นเฉพาะของพืช

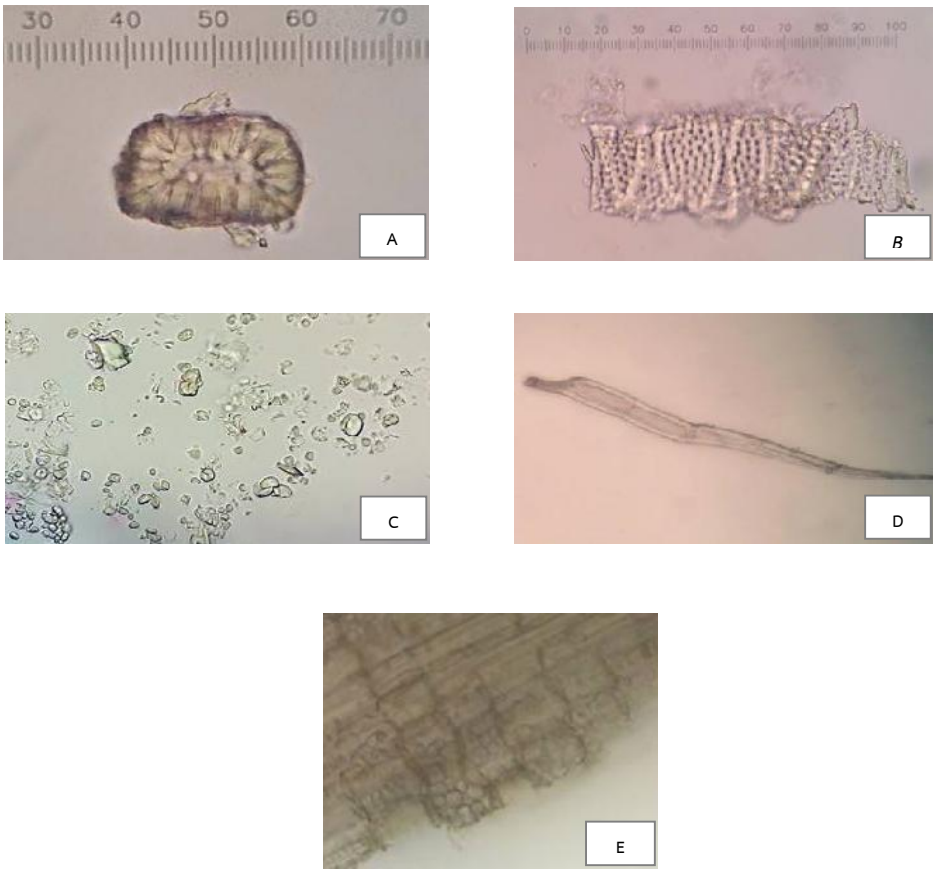
ลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *M. extensum* ที่ผ่านการทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากส่วนอื่นของพืชก่อนนำมาบดผง และใช้น้ำกลั่นเป็นน้ำยาย้อมเพื่อเป็นการตรวจเนื้อเยื่อพื้นฐานของพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ดังนี้ สโตนเซลล์ (stone cell) ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม สั้นไม่แตกแขนง มีผนังหนา มีช่องว่างภายในเซลล์ (รูปที่ 3A) เวสเซลแบบเป็นรูมีขอบ (bordered pit vessel) ลักษณะเซลล์กลวงทรงกระบอก มีขนาดกว้างสั้น พบรอยเว้ามีขอบ (รูปที่ 3B) เม็ดแป้ง (starch grains) พบเป็นจำนวนมาก

กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อของผงยา (รูปที่ 3C) เซลล์เส้นใย (fiber) ลักษณะเซลล์รูปร่างยาวและแคบ ไม่แตกแขนง มีช่องว่างภายในเซลล์ หัวท้ายเรียวแหลม (รูปที่ 3D) และพาเรงคิมาภายในมีเม็ดแป้ง (parenchyma cell with starch grains) ลักษณะรูปร่างเหลี่ยม จัดเรียงระเบียบของเซลล์อย่างหนาแน่น พบเม็ดแป้งภายในเซลล์ (รูปที่ 3E)

รูปที่ 1 A-C *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum.; A. ใบ B. ผล C. เมล็ด



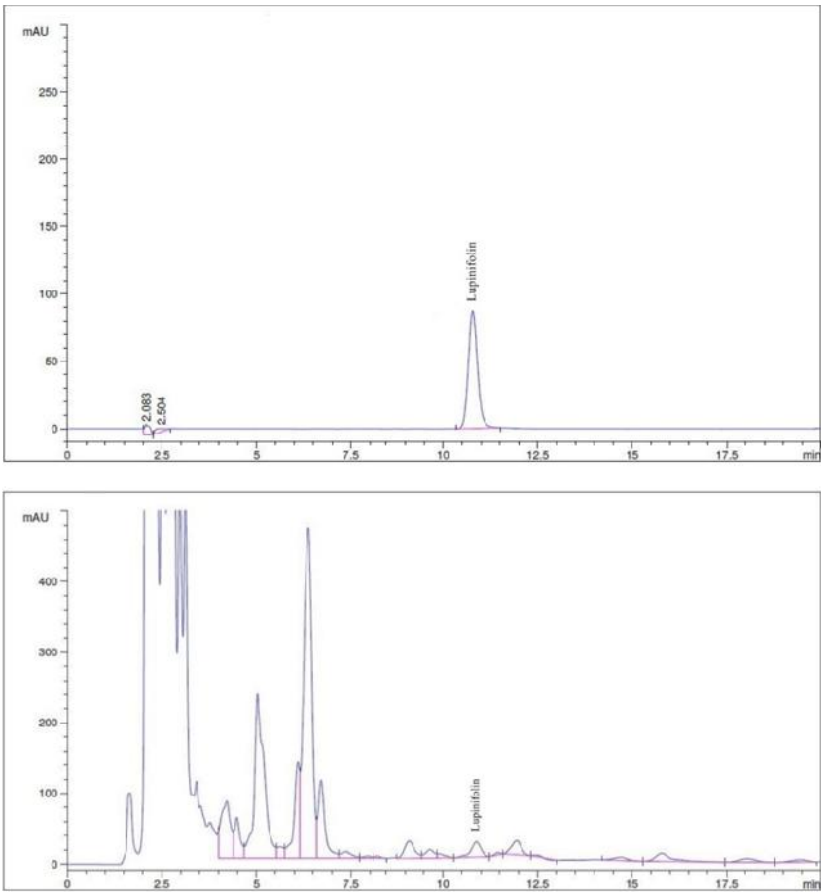
รูปที่ 2 A-D ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก Crude drug ของ *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum. A.ส่วนเถาแห้ง B. ส่วนเถาตัดตามขวาง C. ส่วนเนื้อไม้แห้ง D. ผงยาส่วนเนื้อไม้ผ่านแร่งเบอร์ 100



รูปที่ 3 A-E เนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum. กำลังขยาย 400x A. Stone cell B. Bordered pit vessel C. Starch grains D. Fiber E. Parenchyma cell with starch grains

2. เอกลักษณ์ทางเคมีและปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดจากเนื้อไม้ชะเอม (*M. extensum*)

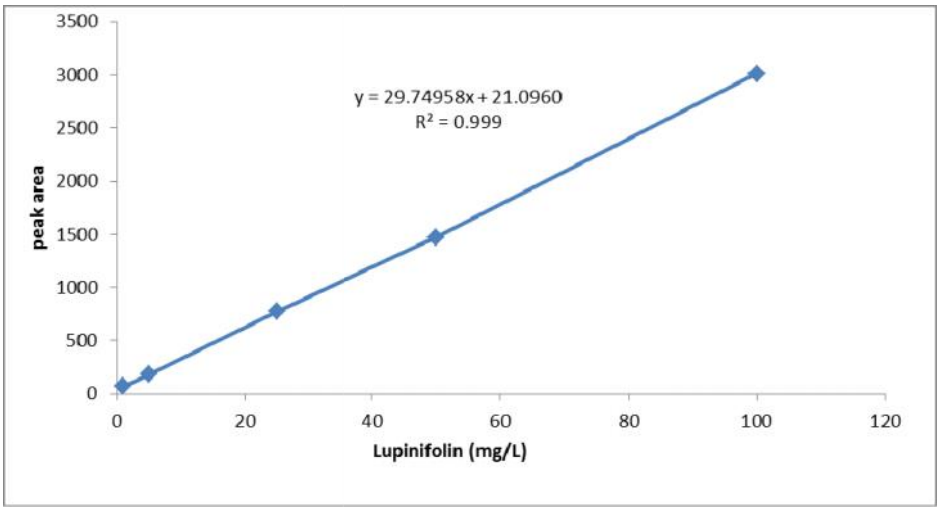
ลักษณะ HPLC chromatogram ของสารสกัดเฮกเซนจากเนื้อไม้ ***M. extensum*** ที่มีระยะเวลาการฉีด (run time) เท่ากับ 20 นาที แสดงดังรูปที่ 4B ซึ่งจะเห็นพีคขนาดเล็กที่เวลาการคงอยู่ 10.883 นาที ซึ่งตรงกับพีคของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน (รูปที่ 4A) กราฟมาตรฐานของสารลูปินิโฟลิน (รูปที่ 5) ที่แสดงโดยสมการเส้นตรง y = 29.74958x+21.09660 เมื่อค่า x คือ ความเข้มข้นของสารลูปินิโฟลินมีหน่วยเป็น mg/L และ y คือ พื้นที่ใต้พีค มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น เท่ากับ 0.9998 เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารลูปินิโฟนินในโครมาโทแกรมสารสกัดเนื้อไม้ของ ***M. extensum*** ที่ศึกษาด้วยเทคนิค HPLC ไปคำนวณค่าความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน พบว่าปริมาณสารลูปินิโฟลินต่อน้ำหนัก 1 กรัมของสารสกัดเฮกเซนเท่ากับ 0.063 มิลลิกรัม



รูปที่ 4 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน (4A) และสารสกัดเฮกเซนจากเนื้อไม้ *M. extensum* (4B)

3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเนื้อไม้ชะเอม (*M. extensum*)

สารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดบิวทานอลของเนื้อไม้ *M. extensum* มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 80.50 – 474.86 µg/mL ด้วยวิธี DPPH และมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่ $[Fe(III)(TPTZ)2]^{3+}$ ได้เป็น $[Fe(II)(TPTZ)2]^{2+}$ อยู่ในช่วง 70.97 – 438.18 mM $FeSO_4$/g ด้วยวิธี FRAP โดยผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากทั้งสองวิธีพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (DPPH; IC_{50} 80.50 µg/mL และ FRAP; 434.18 mM $FeSO_4$/g) รองลงมาคือสารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดบิวทานอล และสารสกัดเฮกเซน ตามลำดับ ในขณะที่จากการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดต่างๆ จาก *M. extensum* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 1000 µg/mL รวมถึงมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้น้อยกว่า 10% ที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 25 µg/mL (ตารางที่ 1)



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารลูปินิโฟลินในช่วงความเข้มข้น 1.0 ถึง 100.0 mg/L

ตารางที่ 1 ค่า % yield และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่างๆ จากเนื้อไม้ชะเอม (*M. extensum*)

สารสกัด	Yield (%)	DPPH (IC_{50}; µg/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g)	*S. mutans* (MIC; µg/mL)	α-Glucosidase (% inhibition; 25 µg/mL)
เอทานอล	4.85	266.91	387.17	>1,000	<10
เฮกเซน	0.41	474.86	70.97	>1,000	<10
ไดคลอโรมีเทน	0.87	80.50	434.18	>1,000	<10
บิวทานอล	1.17	422.87	285.04	>1,000	<10
Lupinifolin	-	-	-	1.5	-
Ascorbic acid	-	2.51	-	-	-
Acarbose	-	-	-	-	22.33

วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุปผลการวิจัย

ชะเอม (*Myriopteron extensum*) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างพืชที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก พบว่าส่วนเถาของ *M. extensum* ตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งมีลักษณะกลมแข็ง ผิวเปลือกไม้เรียบมีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อไม้ด้านตัดตามขวางมีสีเหลือง มีรสหวาน ไม่มีกลิ่นเฉพาะของพืช จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *M. extensum* มีสารกลุ่มไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ (Yang et al., 2004) ซึ่งสารในกลุ่มนี้บางชนิดเคยมีรายงานว่าเป็นสารให้ความหวานของพืชสมุนไพร (Yoshikawa et al., 2002) และการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นน้ำยาย้อมเพื่อเป็นการตรวจเนื้อเยื่อพื้นฐานของพืชตัวอย่าง (สมพร, 2542) สามารถใช้เป็นเอกลักษณ์ที่

บ่งชี้ว่าตัวอย่างเป็นส่วนเนื้อไม้โดยพบว่ามีเม็ดแป้งกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อของผงยา และพบเนื้อเยื่ออื่นๆ มาจากส่วนของเนื้อไม้ ได้แก่ พาเรงคิมาซึ่งมีเม็ดแป้งบรรจุอยู่ภายในเซลล์ เวสเซลแบบเป็นรูมีขอบสโตนเซลล์ และเซลล์เส้นใยของพืช โดยจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานวิจัยการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ผ่านมาของ *A. myriophylla* (นฤมลและประนอม, 2534) และ *D. reticulata* (Ruangrungsi et al., 2013) พบว่าเนื้อเยื่อพาเรงคิมาซึ่งมีเม็ดแป้งบรรจุอยู่ภายในเซลล์ของ *M. extensum* ไม่พบรายงานในผงยาของพืชกลุ่มชะเอมชนิดอื่นดังกล่าวเลย ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *M. extensum* มาก่อนหน้านี้

การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC พบว่าส่วนเนื้อไม้ของ *M. extensum* มีปริมาณสารลูปินิโฟลิน ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของสารสกัดด้วยเฮกเซน เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Soonthornchareonnon et al. (2004) ที่พบสารลูปินิโฟลินจากสารสกัดเฮกเซนจากส่วนเถาของ *M. extensum* ชนิดที่เก็บจากจังหวัดสุโขทัย โดยสารนี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อเริม (HSV-1) และฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบการแยกสารลูปินิโฟลินจากชะเอมไทย (*A. myriophylla*) ซึ่งเป็นพืชในกลุ่มชะเอมอีกชนิดหนึ่งที่มักพบการนำใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พื้นบ้านทดแทนกันอยู่บ่อยครั้ง โดยสารลูปินิโฟลินที่แยกจาก *A. myriophylla* เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* ได้ในระดับดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐานคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) (Joycharat et al., 2013) และจากรายงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลของ *A. myriophylla* ที่ได้จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันในประเทศไทย 3 แหล่ง มีปริมาณสารลูปินิโฟลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัด *A. myriophylla* จากทั้ง 3 แหล่ง มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของตัวอย่างต่างๆ เหล่านั้น (นันทิยา และคณะ 2557) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของ *M. extensum* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดเฮกเซนซึ่งพบว่ามีลูปินิโฟลินเป็นสารองค์ประกอบเช่นเดียวกับ *A. myriophylla* มาทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *S. mutans* พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังกล่าวจากเนื้อไม้ *M. extensum* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 1000 μg/mL ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จาก HPLC chromatogram ของสารสกัดเฮกเซนจากเนื้อไม้ *M. extensum* (รูปที่ 4B) แสดงให้เห็นว่ายังมีพีคของสารอื่นๆ อีกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารองค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดจะไปรบกวนการออกฤทธิ์ของสารลูปินิโฟลิน ซึ่งจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *M. extensum* นอกจากการพบสารลูปินิโฟลินแล้วยังพบสารประกอบอื่นๆ ดังนี้ β-sitosterol, oleanolic acid, α-amyrin acetate, β-amyrin acetate, lupane acetate, uzarigenin, dauco-sterol และ extensumsides A-B และจากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของ *M. extensum* พบว่าสารสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*, *S. epideridis* ที่ความ

เข้มข้น 6.73 mg/disc แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Salmonella typhi* และ *Shigella sonnei* ในขณะที่ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ *M. extensum* โดยพบว่าสารสกัดต่างๆ จากพืชชนิดนี้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 1000 µg/mL รวมถึงได้รายงานข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ จาก *M. extensum* โดยจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ จาก *M. extensum* ซึ่งใช้ 2 วิธีคือ DPPH และ FRAP พบว่าทั้ง 2 วิธี มีผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (DPPH; IC_{50} 80.50 µg/mL และ FRAP; 434.18 mM $FeSO_4$/g) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเอทานอล (DPPH; IC_{50} 266.91 µg/mL และ FRAP; 387.17 mM $FeSO_4$/g) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ ไฮดรอกซี (hydroxy group) ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา โดยเฉพาะ hydroxy group ในวงแหวนอะโรมาติกบี (aromatic B-ring) ซึ่งมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมากต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มนี้ โดยสามารถให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radical, peroxyl radical และ per-oxynitrite radical ทำให้อนุมูลอิสระเหล่านี้มีความเสถียรมากยิ่งขึ้น (Kumar and Pandey, 2013) ทั้งนี้พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะช่วยลดภาวะ oxidative stress จึงช่วยป้องกันหรือลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ (Jin et al., 2012) นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดต่างๆ จาก *M. extensum* โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสซึ่งมีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้น เป็นวิธีการเบื้องต้นในการทดสอบพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Narender et al., 2007) โดยการลดระดับน้ำตาลในเลือดเป็นแนวทางหนึ่งที่ให้ผลดีในการรักษาโรคเบาหวาน และสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสามารถนำไปใช้เพื่อการรักษาโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งพาอินซูลินได้ (Johnston et al., 1994) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก *M. extensum* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 25 µg/mL ในขณะที่สารมาตรฐาน acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานมีค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (% inhibition) เท่ากับ 22.33% โดยรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับโรคเบาหวานของ *M. extensum* ยังมีไม่มากนัก ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนเถาของ *M. extensum* ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ด้วยวิธี DPPH และไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Soonthornchareonnon et al., 2004) ในขณะที่การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดบิวทานอลของพืชสมุนไพรชนิดนี้

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางต่อไปในการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบ *M. extensum* และการศึกษานี้ยังเป็นครั้งแรกของการ

ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC ของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. และเป็นการยืนยันสารสำคัญที่พบใน *M. extensum* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในส่วนของเนื้อไม้ *M. extensum* มีสารลูปินิโฟลินซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ *S. mutans* ได้ดี และหากมีการศึกษาวิจัยต่อไปในด้านการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร สารนี้อาจนำมาใช้เป็นสารเทียบ (marker compound) ของพืชที่มีชื่อพ้องกันว่าชะเอม (*A. myriophylla D. reticulate* และ *M. extensum*) ได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการคัดสรรและเผยแพร่วรรณกรรมของชาติ. (2542). แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ. กรุงเทพฯ: สถาบันภาษาไทย กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ. หน้า 193-194.

ถนอมจิต สุภาวิดา. (2553). การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวทการตรวจเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์. สงขลา: ศูนย์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 9-10.

ทรรศนีย์ พัฒนเสรี และชูจิตร อนันตโชค. (2551). พืชพื้นเมือง: ป่าชุมชนบ้านคุ้ม จังหวัดพะเยา. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยการป่าไม้กรมป่าไม้. หน้า 29.

นันทิยา จ้อยชะรัด จันจีรา บุญมา ศรัญญา เมืองเหนือ และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Strepto-coccus mutans* ของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอม. ว.วิทย. มข. 42(4): 806-819.

นฤมล มงคลชัยภักดิ์ และประนอม เดชวิศิษฏ์สกุล. (2534). คุณสมบัติทางเภสัชเวทของเนื้อไม้ชะเอมไทยและเหง้าชะเอมจีน. ว. กรมวิทย. พ. 33(3): 91-100.

ปภาวรินท์ อิสสระโชติ และ นันทิยา จ้อยชะรัด. (2558). ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของเนื้อไม้ชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.). ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติการแพทย์แผนไทย ครั้งที่ 1. คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. หน้า 123-128.

เต็ม สมิตินันทน์. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ. หน้า 393.

สมพร ภูติยานันต์. (2542). การตรวจเอกลักษณ์ พืชสมุนไพรภาคพิเศษ. กรุงเทพ: โครงการพัฒนาตำราสถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 702-713.

อุบล มณีกุล และกมลภัค สาราญจิตร์. (2543). ตำราแพทย์แผนไทยโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม. กองประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ แห่งประเทศไทย. หน้า 7-8.

Bachhawat, A., Shihabudeen, M.S. and Thirumurugan, K. (2011). Screening of fifteen Indian Ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. Inter J Pharm Pharm Sci. 3: 267-274.

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

Butsat, S. and Siriamornpun, S. (2010) Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. Food Chem. 119: 606-613.

Chivapat, P., Chavalittumrong, P., Attawith, A. and Soonthornchareonnon, N. (2009). Toxicity study of lupinifolin from stem of *Derris reticulata* Craib. J Thai Trad Altern Med. 7: 146-155.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Methods for Dilution Antimicrobial

Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 7th ed, CLSI Document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Innok, P., Rukachaisirikul, T. and Suksamrarn, A. (2009). Flavanoids and pterocarpans from the bark of *Erythrina fusca*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 57: 993-996.

Itoigawa, M., Ito, C., Ju-ichic, M., Nobukunid, T., Ichiishid, E., Tokudad, H., Nishinod, H. and Furukawaa, H. (2002). Cancer chemo-preventive activity of flava-nones on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcino-genesis. Cancer Lett. 176: 25-29.

Jin, S.E., Son, Y.K., Min, B-S., Jung, H.A. and Choi, J.S. (2012). Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. Arch Pharm Res. 35(5): 823-837.

Johnston, P.S., Coniff, R.F., Hoogwerf, B.J., Santiago, J.V., Pi-Sunyer, F.X.A. (1994). Effects of the carbohydrase inhibitor miglitol in sulfonylurea-treated NIDDM patients. Diabets Care 17: 20-29.

Joycharat, N., Limsuwan, S., Subhadhirasakul, S., Voravuthikunchai, S.P., Pratumwan, S., Madahin, I., Nuankaew, W. and Promsawat, A. (2012). Anti-*Streptococcus mutans* efficacy of Thai herbal formula used as a remedy for dental caries. Pharm Biol. 50(8): 941-947.

Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S.P., Yingyongnarongkul, B., Dej-adisai, S. and Subhadhirasakul, S. (2013). Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic Streptococcus mutans. Arch Pharm Res. 36: 723-730.

Joycharat, N., Boonma, C., Thammavong, S., Yingyongnarongkul, B., Limsuwan, S. and Voravuthikunchai, S.P. (2016). Chemical constituents and biological activities of *Albizia myriophylla* wood. Pharm Biol. 54(1): 62-73

Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. The Scientific World Journal. pp. 1-16.

Narender, T., Shweta, S., Tiwari, P., Papi Reddy, K., Khaliq, T., Prathipati, P., Puri, A., Srivastava, A.K., Chander, R., Agarwal, C., Raj, K. (2007). Antihyperglycemic and antidyslipidemic agent from *Aegle marmelos*. Bioorg Med Chem Lett. 17: 1808-1811.

Prasad, S.K., Laloo, D., Kumar, M. and Hemalatha, S. (2013). Antidiarrhoeal evaluation of root extract, its bioactive fraction, and lupinifolin isolated from *Eriosema chinense*. Planta Med. 79: 1620-1627.

Ruangrungsi, N., Palanuvej, C., Rungsiyothin, A., Vipunngeum, N., Chuthaputti, A. and Termwiset, P. (2013). Pharmacoognostic Specification of Thai Crude Drugs Vol. II. Bangkok: Sam Charoen Panich (Bangkok) Co., Ltd.

Soonthornchareonnon, N., Ubonopas, L., Kaewsuwan, S. and Wuttiudomlert, M. (2004). Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. stem. Thai J Phytopharm. 11(2): 19-28.

Wang, Y., Curtis-Long, M.J., Lee, B.W., Yuk, H.J., Kim, D.W., Tan, X.F. and Park, K.H. (2014). Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol compounds from *Flemingia philippinensis* roots. Bioorg Med Chem. 22: 1115-1120.

Wu, Z. Y. and Raven, P. H. (1995). Flora of China. Vol. 16 (Gentianaceae through Boraginaceae). Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 479 pp.

Yang, M.F., Li, Y.Y., Gao, X.P., Li, B.G. and Zhang, G.L. (2004). Steroidal saponins from *Myriopteron extensum* and their cytotoxic activity. Planta Med. 70: 556-560.

Yoshikawa, M., Morikawa, T., Nakano, K., Pongpiriyadacha, Y., Murakami, T. and Matsuda, H. (2002). Characterization of new sweet triterpene saponins from *Albizia myriophylla*. J Nat Prod. 65: 1638-1642.

❑❑❑❑❑