

***In vitro* Study of Antioxidant, Anti-glycation and Anti-inflammatory Effects of Thai Medicinal Plants for Diabetic Patients**

Kanyanath Piumngam

*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum thani Province, Thailand*

Abstract

This study aimed to determine total phenolic contents, antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of freeze-dried juices and 70% ethanol extract from 6 Thai anti-diabetes plants namely holy basil leaves (*Ocimum sanctum* L.), pandan leaves (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), ivy gourd leaves (*Coccinia grandis* (L.) Voigt), aloe jelly (*Aloe vera* Linn), bitter cucumber fruits (*Momordica charantia* Linn.) and wild pepper leaves (*Piper sarmentosum* Roxb.ex Hunter). The findings demonstrated that the ethanol extracts had higher antioxidant activity than that of the freeze-dried juices in accordance with the total amount of phenolic compounds. The ethanol extract of holy basil leaf had the highest antioxidant activity ($IC_{50} = 7.39 \pm 1.56 \mu\text{g/mL}$) which was higher than that of the standard butylatedhydroxytoluene (BHT, $IC_{50} = 78.56 \pm 8.34 \mu\text{g/mL}$). Only the ethanol extracts showed the anti-glycation activity. With the concentration of 0.1 mg/mL, ivy gourd leaf extract had the highest percentage of inhibition of glycation, 36.86 ± 2.19 , which was higher than that of the standard aminoguanidine (32.55 ± 1.56). For the anti-inflammatory activity, pandan leaf extract inhibited nitric oxide generation up to 88.6 ± 1.85 percent which was similar to that of the standard aminoguanidine (89 ± 4.36). For the inhibition of prostaglandin E_2 production, the ethanol extract of wild pepper leaf produced 81.7% inhibition compared to the standard indomethacin with 85.1% inhibition. The results could lead to further development in pharmacological studies and nutritional supplements for diabetes patients.

Keywords: Diabetes Antioxidant, Anti-glycation, Anti-inflammation, Thai medicinal plants

*Corresponding author E-mail address: mim9_p@yahoo.com, kanyanath.p@allied.tu.ac.th

Received: 5 November 2020

Revised: 4 December 2020

Accepted: 25 December 2020

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และ ต้านการอักเสบของสมุนไพรไทยสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบในสารสกัดจากพืชที่มีสรรพคุณรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบกะเพรา ใบเตย ใบตำลึง รุนว่นทางจระเข้ ผลมะระขี้นก และใบชะพลู ที่เตรียม 2 วิธี คือ วิธีคั้นสดแล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) และวิธีสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ สารสกัดเอทานอลจากใบกะเพรา ($IC_{50} = 7.39 \pm 1.56$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งออกฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) ($IC_{50} = 78.56 \pm 8.34$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนฤทธิ์ต้านไกลเคชันพบเฉพาะในสารสกัดเอทานอลเท่านั้น โดยสารสกัดเอทานอลจากใบตำลึง (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีร้อยละความสามารถต้านไกลเคชันสูงที่สุด คือ 36.86 ± 2.19 ซึ่งสูงกว่าของสารมาตรฐาน aminoguanidine (32.55 ± 1.56) สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารสกัดเอทานอลจากใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ถึงร้อยละ 88.6 ± 1.85 และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีเทียบเท่าสารมาตรฐาน aminoguanidine (89 ± 4.36) นอกจากนี้ผลทดสอบความสามารถยับยั้งการผลิตกรดไขมันอิสระ E_2 พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบชะพลูมีฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 81.7 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งร้อยละ 85.1 ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการศึกษาทางยาและอาหารเสริมซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: โรคเบาหวาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ สมุนไพรไทย

บทนำ

โรคเบาหวาน เป็นโรคที่ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินปกติ (hyperglycemia) แบบเรื้อรัง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายจากความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จากโรคเบาหวานจึงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา^(1,2) โดยร้อยละ 90 - 95 ของผู้ป่วยทั้งหมดเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งเกิดจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) (จากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม) ร่วมกับภาวะขาดอินซูลิน

จากการศึกษาพบว่าโรคอ้วนมีความสัมพันธ์กับระดับของภาวะ oxidative stress โดยกลไกที่สำคัญอาจเกิดจากความบกพร่องในการควบคุมการหลั่ง adipocytokine ได้แก่ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), resistin, leptin และ adiponectin ที่หลั่งจากเซลล์ไขมันซึ่งมีมากในคนอ้วนลงพุงที่มีการสะสมไขมันหน้าท้องปริมาณมาก ทำให้มีการหลั่ง PAI-1 และ TNF- α จากเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่มีการลดลงของ adiponectin ซึ่งทำหน้าที่เพิ่มความไวต่ออินซูลิน⁽³⁾ นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง resistin เพิ่มมากขึ้น โดยที่ระดับของ resistin มีความสัมพันธ์กับภาวะดื้อต่ออินซูลินและโรคเบาหวานชนิดที่ 2⁽⁴⁾ ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงในผู้ป่วยโรคเบาหวานอาจส่งผลต่อระดับการสร้างอนุมูลอิสระ และการเพิ่มขึ้นของระดับเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน รวมถึงกระทบต่อกลไกการต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย และน้ำตาลในเลือดจะสามารถจับกับโปรตีนได้โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ซึ่งเรียกว่าการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน ผลจากไกลเคชันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

การทำงานของโปรตีนให้เสื่อมหน้าที่ลง ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาในผู้ป่วยโรคเบาหวาน⁽⁵⁾ การศึกษาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 โดยการให้กรดแอลฟา-ลิโพอิก วิตามินอี หรือซีลีเนียมนาน 12 สัปดาห์ พบว่าช่วยลดภาวะแทรกซ้อน และทำให้การเกิดออกซิเดชันของไขมันลดลงได้⁽⁶⁾

การอักเสบเป็นพยาธิสภาพรูปแบบหนึ่งที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้น เซลล์แมคโครฟาจจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน E₂ และไซโตไคน์ ทำให้พบการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลังเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง⁽⁷⁾ ซึ่งแม้ว่าการหลั่งสารเหล่านี้จะเกิดขึ้นเพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน แต่การหลั่งในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้มีการทำลายเนื้อเยื่อและหลอดเลือดในร่างกายได้ ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่างๆ

สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านไกลเคชัน และสารต้านการอักเสบ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาหรือลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยทั่วไปมนุษย์สามารถป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายเองได้⁽⁸⁾ แต่มีหลักฐานว่าการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมากจะช่วยทำให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด ซึ่งจะช่วยป้องกันอันตรายจากโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ เช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชราได้⁽⁹⁻¹⁴⁾

จากการติดตามรายงานการใช้พืชสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคเบาหวาน ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของพืชพื้นบ้านและพืชสมุนไพรไทย 6 ชนิด ในกลุ่มที่มีสรรพคุณใช้รักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.)

ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) ใบตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) ใ้วานหางจระเข้ (*Aloe vera* Linn) ผลมะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn.) และใบชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.ex Hunter) เนื่องจากเป็นพืชที่มีการรับประทานอย่างแพร่หลาย และหาซื้อได้ทุกฤดูกาล โดยศึกษาในสารสกัด 2 ชนิด คือ ชนิดน้ำคั้นสดและชนิดสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดพัฒนาการนำพืชผักสมุนไพรไทยมาใช้ประโยชน์สำหรับการดูแลรักษาและลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพรไทย

พืชผักสมุนไพรไทย 6 ชนิดที่ศึกษา ได้แก่ เตยหอม ชะพลู มะระขี้นก ตำลึง กะเพรา และ ใ้วานหางจระเข้ ซื้อจากตลาดไท อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

เตรียมสารสกัดพืชผักสมุนไพรไทย 2 วิธีคือ วิธีคั้นสด โดยการคั้นน้ำและกรองแยกกาก ทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze Dryer, dry LABCONCO Freeze Dry System) และวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง บดเป็นผงละเอียด แล้วสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70

(น้ำหนักแห้ง 10 กรัม ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) กรองแยกกาก แล้วลดปริมาตรโดยการระเหย จดบันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และเก็บให้แห้งที่ -80 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay⁽¹⁵⁾

ทดสอบตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH⁽¹⁵⁾ โดยผสมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 กับ 0.1 โมลาร์ DPPH ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 100 ทั้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง และทำ sample blank ด้วยทุกครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง DPPH (% DPPH inhibition) โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม (control) เพื่อหาค่า Ac และ เขียนกราฟ หาค่า IC₅₀ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) ซึ่งเป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ โดยการคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ความสัมพันธ์

$$\% \text{ DPPH inhibition} = \frac{(Ac - As) \times 100}{Ac}$$

เมื่อ Ac คือค่า absorbance ของหลอดควบคุม; As คือค่า absorbance ของหลอดตัวอย่าง

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

วิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสมุนไพรด้วย Folin-Ciocalteu

Reagent โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก⁽¹⁶⁾ ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิกมาสร้างกราฟ

มาตรฐาน แล้วหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg gallic acid equivalent)

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชันในหลอดทดลอง

ทดสอบปฏิกิริยาไกลเคชันโดยอาศัยเทคนิค albumin glycation⁽¹⁷⁾ ที่ใช้ BSA ที่ปราศจากกรดไขมัน (fatty acid-free bovine serum albumin) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ดี-กลูโคส แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดสมุนไพรเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชัน โดยการทดสอบใช้ BSA (bovine serum albumin) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ น้ำตาล ดี-กลูโคส เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย PBS (phosphate buffer saline), พีเอช 7.2-7.4 และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นจึงนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ ที่ excitation wavelength 370 นาโนเมตร และ emission wavelength 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) โดยใช้หลอดที่มีสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นหลอดควบคุมเพื่อหาค่า Ac

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100$$

เมื่อ Ac คือค่า absorbance (A_{440}) ของหลอดควบคุม และ As คือค่า absorbance (A_{440}) ของหลอดตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีกลูโคส 25 มิลลิโมลต่อลิตร fetal bovine serum ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน และสเตรปโตมัยซิน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี CO₂ ร้อยละ 5

การทดสอบ cell cytotoxicity ด้วย MTT assay

ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้ 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ได้ผลิตผลเป็นฟอร์มazan (formazan) ซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วง โดยปริมาณฟอร์มazanที่เกิดขึ้นสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด

เพาะเลี้ยงเซลล์ แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี CO₂ ร้อยละ 5 นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย LPS (lipopolysaccharide) จะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบกับสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย

dimethyl sulfoxide (DMSO) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร คำนวณความมีชีวิตของเซลล์ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{550}) \text{ ของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (A}_{550}) \text{ ของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์ด้วย Griess assay

ความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นดัชนีบ่งบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) เนื่องจากไนไตรต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรต์โดยปฏิกิริยาของ Griess ใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum เข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-naphthyl) ethylene-diaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid] ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) และคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแต่ละชนิด โดยเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และเปรียบเทียบกับ aminoguanidine ที่เป็นสารควบคุมผลบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2

นำเซลล์ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี fetal bovine serum เข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยชุดตรวจสอบที่อาศัยหลักการทาง immunoassay (PGE2 competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และใช้สารมาตรฐาน indomethacin เป็นสารควบคุมผลบวกในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองได้จากอย่างน้อย 3 การทดลองที่แยกอิสระต่อกัน ผลที่ได้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบทางสถิติด้วย Analysis of Variance, ANOVA และ t test โดยคำนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $p < 0.05$

ผลและวิจารณ์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพียงวิธีเดียว เนื่องจากเป็นวิธีที่นิยม

มีความสะดวกและรวดเร็ว วิธี DPPH เป็นการตรวจกลไกต้านอนุมูลอิสระแบบ radical scavenging capacity โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระคือ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ ทำให้เกิดการออกซิเดชันของ DPPH และเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ติดตามปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด (Table 1) พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด แสดงว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (หมู่ไฮดรอกซิล) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (หมู่แอลคิล) จึงถูกสกัดออกมาได้ดีในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ แต่ละลายในน้ำได้น้อยกว่า เนื่องจากน้ำเป็นโมเลกุลที่มีขั้วสูงกว่า ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไปในการสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ยังขึ้นกับชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่เป็นองค์ประกอบในพืชแต่ละชนิดด้วย⁽¹⁸⁾

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดกับสารมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า $IC_{50} = 78.56 \pm 8.34$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม พบว่าสารสกัดสมุนไพรจากใบกะเพรา ใบชะพลู ใบตำลึง และใบเตยหอม ที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และสารสกัดผลมะระขี้นกแบบน้ำคั้นสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐาน BHT คิดเป็น 10, 9, 8, 5 และ 4 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากขมิ้นชันทางจะแห้งทั้งที่สกัดด้วยเอทานอลและแบบน้ำคั้นสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ยังไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าให้ผลที่ดีกว่า ดังนี้ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบกะเพรา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (0.00739 ± 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)

Table 1 Antioxidant activity by DPPH assay (IC_{50} values) and total phenolic contents of plant extracts

Plant extracts	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		Total phenolic content (mgGAE / mg of plant extracts)	
	Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract	Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract
Holy basil leaves	31.59 ± 7.47	7.39 ± 1.56	130.50 ± 8.15	299.90 ± 6.11
Pandan leaves	38.93 ± 1.65	15.00 ± 1.94	175.14 ± 2.59	231.56 ± 8.05
Ivy gourd leaves	100.79 ± 21.74	9.64 ± 2.75	94.77 ± 5.91	279.45 ± 8.15
Aloe jelly	> 500	> 500	11.27 ± 0.35	6.72 ± 0.43
Bitter cucumber fruits	19.68 ± 0.80	119.29 ± 27.82	70.12 ± 1.16	121.80 ± 2.83
Wild pepper leaves	87.27 ± 15.01	8.55 ± 2.21	234.36 ± 13.77	405.44 ± 23.83
BHT	78.56 ± 8.34		-	-

เทียบกับ 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่รายงานโดย Hakkim FL และคณะ (2007)⁽¹⁹⁾ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบชะพลูมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.55 ± 2.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 80.19 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเมทานอลของใบชะพลู โดย พัชรินทร์ บุญหล้า (2014)⁽²⁰⁾ ในขณะที่ผลการศึกษาค้นพบว่า BHT มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าถึง 9 เท่า ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบตำลึง พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.64 ± 2.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.00964 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่รายงานโดย M Umamaheswari และ TK Chatterjee (2008)⁽²¹⁾ ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของใบเตยหอมพบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.00 $\pm$ 1.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 0.810 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากรายงานของ Ampa Jimtaisong และ Panvipa Krisdaphong (2013)⁽²²⁾ ในขณะที่ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากงู้นว่านทางจระเข้ ตามรายงานของ Nurten Ozsoy และคณะ (2009)⁽²³⁾ พบค่า IC_{50} ของสารสกัดงู้นว่านทางจระเข้เท่ากับ 41.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จากการศึกษาค้นคว้าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้จากการสกัดทั้งสองวิธี แต่หากคำนวณจากสมการความสัมพันธ์ การสกัดโดยวิธีคั้นน้ำสดและการสกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 828.27 ± 392.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 776.81 ± 38.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าที่รายงานโดย Nurten Ozsoy และคณะ ข้างต้น

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวม ด้วย Folin-Ciocalteu Reagent โดยวิธีที่

ดัดแปลงจากวิธีของ Chan *et al.*, 2009 ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg gallic acid equivalent; mgGAE) ต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ผลการวิเคราะห์พิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก มีสมการดังนี้ $y = 0.0057x + 0.0838$, $R^2 = 0.9994$ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสมุนไพรไทย 6 ชนิด (Table 1) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีค่าสูงกว่าที่ได้จากการสกัดโดยวิธีคั้นน้ำสด ซึ่งจากผลการศึกษาค้นพบว่า สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานของ Lou NS และคณะ (2016)⁽²⁴⁾ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระได้ง่าย จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังขึ้นกับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดแต่ละชนิดด้วย⁽²⁶⁾

สมุนไพรไทยที่เลือกนำมาศึกษาทั้ง 6 ชนิด เป็นกลุ่มที่มีรายงานว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้⁽²⁷⁻³⁰⁾ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปการต้านอนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายกลไก เช่น 1) สารคีเลต (chelating agent) คือสารที่มีโครงสร้างเป็น ortho-dihydroxyl group ทำหน้าที่จับกับโลหะทรานซิชัน เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ 2) สารดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) สารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกหลายชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เกิดเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ที่มีความเสถียรเพิ่มขึ้นเนื่องจากโครงสร้างสามารถเกิดการเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนได้ 3) การ

เสริมฤทธิ์ (synergism) ของวิตามินอี เมื่อวิตามินอี (α -tocopherol) ให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลเปอร์ออกไซด์ (ROO-) จะเปลี่ยนเป็นอนุมูลวิตามินอี ซึ่งสารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกจะรีดิวส์ อนุมูลวิตามินอีกลับเป็นวิตามินอีเหมือนเดิม ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ต่อไปอีก จากผลการศึกษาพบว่าใบกะเพราที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงมาก มีรายงานว่าใบกะเพรามีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ สารฟลาโวนอยด์ luteolin และ orientin ในใบกะเพรามีโครงสร้างตรงกันที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกตกับหมู่ 4-oxo ในวงคาร์บอน ซึ่งสารที่มีโครงสร้างลักษณะนี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง⁽³¹⁾

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชันในหลอดทดลองด้วยวิธี BSA glycation assay (Table 2) พบว่า สารสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรไทยทั้ง 6 ชนิด มีฤทธิ์ต้านไกลเคชัน ในขณะที่สารสกัดแบบ

คั้นสด ไม่มีฤทธิ์ต้านไกลเคชัน โดยสารสกัดตำลึงมีร้อยละความสามารถต้านไกลเคชันสูงที่สุดเท่ากับ 36.86 ± 2.19 รองลงมา ได้แก่ สารสกัดจากกะเพรา (34.82 ± 5.48) และชะพลู (34.62 ± 5.33) ซึ่งมีความสามารถสูงกว่าสารมาตรฐาน aminoguanidine (32.55 ± 1.56) สำหรับฤทธิ์ต้านไกลเคชันของสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้ (30.50 ± 2.61) ผลมะระขี้นก (27.89 ± 3.90) และใบเตยหอม (26.63 ± 0.89) แม้จะมีฤทธิ์น้อยกว่า แต่เมื่อพิจารณาแล้วไม่แตกต่างกันมากนัก สอดคล้องกับผลการศึกษาที่มีรายงานว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดย Munasinghe MA และคณะ (2011) ได้ทำการทดลองในอาสาสมัคร พบว่าสารสกัดใบตำลึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽³⁰⁾ ในขณะที่ใบกะเพรามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ streptozotocin ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง⁽³²⁾ และ Raju Patil และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) ช่วยลดระดับกลูโคสและไขมันในเลือดของหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานจากการกระตุ้นด้วย Alloxan⁽²⁹⁾ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสารสกัดใบ

Table 2 Anti-glycation activity of plant extracts (percent inhibition)

Plant extracts	Plant species	% Inhibition of glycation	
		Freeze-dried juice extract	70% Ethanol extract
Holy basil leaves	<i>Ocimum sanctum</i> L.	0 (-19.18 $\pm$ 4.99)	34.82 $\pm$ 5.48
Pandan leaves	<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.	0 (-12.55 $\pm$ 5.14)	26.63 $\pm$ 0.89
Ivy gourd leaves	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	0 (-13.46 $\pm$ 1.92)	36.86 $\pm$ 2.19
Aloe jelly	<i>Aloe vera</i> Linn	0 (-10.99 $\pm$ 3.43)	30.50 $\pm$ 2.61
Bitter cucumber fruits	<i>Momordica charantia</i> Linn.	0 (-16.58 $\pm$ 4.57)	27.89 $\pm$ 3.90
Wild pepper leaves	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.ex Hunter	0 (-8.77 $\pm$ 1.83)	34.62 $\pm$ 5.33
Aminoguanidine		32.55 $\pm$ 1.56	

ชะพลู มีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นและใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานได้⁽³³⁻³⁴⁾ Alper Okyar และคณะ (2001) ได้ทดสอบความสามารถระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้หนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ให้อาหารมา 8 ชั่วโมง พบว่า หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเนื้อวุ้นของวุ้นหางจระเข้ มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง⁽³⁵⁾ ส่วนผลมะระขี้นก มีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นและมีความเป็นไปได้ที่จะลดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้⁽³⁶⁾ และ Sreenivasan Sasidaran และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดใบเตยหอมช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานได้⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ Anchalee Chiabchalard และคณะ (2015) ได้ทดสอบ OGTT (oral glucose tolerance test) ในอาสาสมัครสุขภาพดี 30 คนโดยให้ดื่มน้ำต้มใบเตยหอมหลังจากกินกลูโคส 75 กรัม โดยใช้น้ำร้อนเป็นสารควบคุมผลลบ พบว่าน้ำต้มใบเตยหอมช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มทดสอบได้⁽²⁸⁾

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ผลทดสอบ cell cytotoxicity ด้วย MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด ทั้งสารสกัดน้ำคั้นสด และสารสกัดเอทานอล โดยวิธี MTT assay เป็นการทดลองเพื่อศึกษาว่าเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 ในสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะมีการเจริญเติบโตเท่ากับเซลล์ที่เลี้ยงปกติหรือไม่ เพื่อพิสูจน์ว่าฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดที่ต่างกันไม่ได้ขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสารสกัดนั้นไม่ได้ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ผลการทดสอบจำนวนเซลล์

แมคโครฟาจ Raw 264.7 ที่เลี้ยงในสถานะที่มี LPS 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด จากการคำนวณทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่า สารสกัดเอทานอลจากสมุนไพร 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดน้ำคั้นสดมะระขี้นก ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p -value < 0.05) ดังนั้น จึงไม่นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ผลทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

ผลทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรไทย 6 ชนิด โดยทดสอบการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัด หลังจากเซลล์ Raw 264.7 ถูกกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย LPS แล้ว 24 ชั่วโมง (Table 3) พบว่า aminoguanidine (สารควบคุมผลบวก) มีความสามารถด้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด Raw 264.7 ได้ร้อยละ 89 ± 4.36 และ 105 ± 3.03 ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงกว่า โดยสารสกัดใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ถึงร้อยละ 88.6 ± 1.85 และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบดีเทียบเท่า aminoguanidine (89 ± 4.36) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน รองลงมาได้แก่สารสกัดใบชะพลู และสารสกัดใบกะเพรา และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำคั้นสด ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก็พบว่า สารสกัดใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ถึงร้อยละ 112.1 ± 0.91 และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบซึ่งดีกว่า aminoguanidine (105 ± 3.03) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน รองลงมาได้แก่สารสกัดจากใบตำลึง ใบชะพลู และใบกะเพรา

Table 3 Anti-inflammatory activity of plant extracts by Griess assay

Plant extracts	% Inhibition of nitric oxide generation		
	Freeze-dried juice extract conc. = 0.1 mg/mL	Freeze-dried juice extract conc. = 1 mg/mL	70% Ethanol extract conc. = 0.1 mg/mL
Holy basil leaves	29.1 ± 5.75	75.5 ± 1.37	40.5 ± 7.17
Pandan leaves	5.9 ± 11.80	112.1 ± 0.91	88.6 ± 1.85
Ivy gourd leaves	37.2 ± 3.88	86.1 ± 7.02	26.4 ± 2.49
Aloe jelly	0	20.1 ± 5.82	38.6 ± 6.38
Bitter cucumber fruits	22.2 ± 11.08	-	27.5 ± 12.56
Wild pepper leaves	0	82.1 ± 6.17	80.8 ± 9.21
Aminoguanidine	89.0 ± 4.36	105.6 ± 3.03	

ผลทดสอบการยับยั้งการผลิตพรอสตา
แกลนดิน E_2

ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิต PGE_2 ของ
สารสกัดสมุนไพร ในเซลล์ Raw 264.7 หลังถูก
กระตุ้นด้วย LPS 24 ชั่วโมง (Table 4) พบว่าสาร
มาตรฐาน indomethacin (สารควบคุมผลบวก)
ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้าน

การอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด Raw 264.7
จากการยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้ร้อยละ 85.1 และ
เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น
0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก
ใบชะพลูสามารถยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้สูงที่สุด คือ
ร้อยละ 81.7 เกือบเทียบเท่าฤทธิ์ของ indomethacin
และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ

Table 4 Anti-inflammatory activity of plant extracts by prostaglandin E_2 immunoassay

Plant extracts	% Inhibition of prostaglandin E_2 production		
	Freeze-dried juice extract conc. = 0.1 mg/mL	Freeze-dried juice extract conc. = 1 mg/mL	70% Ethanol extract conc. = 0.1 mg/mL
Holy basil leaves	0	67.8	0.0
Pandan leaves	41.2	81.5	0.0
Ivy gourd leaves	25.9	79.7	0.0
Aloe jelly	2.1	41.6	0.0
Bitter cucumber fruits	13.9	-	0.0
Wild pepper leaves	5.5	80.1	81.7
Indomethacine	85.1		

มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดน้ำคั้นสดจากใบเตยหอม ใบชะพลู และใบตำลึง สามารถยับยั้งการการผลิต PGE_2 ได้ถึงร้อยละ 81.5, 80.1 และ 79.7 ตามลำดับ

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบเตยหอม ใบตำลึง ใบชะพลู และใบกะเพรา มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO และ PGE_2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ เนื่องจากในกระบวนการอักเสบจะมีการสร้าง NO และ PGE_2 ซึ่งเป็น inflammatory mediators ในปริมาณสูงมากในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย LPS⁽³⁷⁾ ทั้ง PGE_2 และ NO ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็น inducible enzyme ที่จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นจำนวนมากโดย proinflammatory cytokine และ endotoxin โดย PGE_2 มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง inflammatory mediator หลายชนิด ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดงและมีไข้ ในขณะที่ NO มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งของ PGE_2 และ NO จึงเป็นแนวทางหลักที่สำคัญทางหนึ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง เช่น การศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบของน้ำมันระเหยจากใบกะเพรา ของ Singh S และคณะ (1996)⁽³⁸⁾ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากใบชะพลู ของ Zakaria ZA และคณะ (2010)⁽³⁹⁾ และการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากใบและเถาตำลึง ของ Deshpande SV (2011)⁽⁴⁰⁾

ส่วนการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ด้านอักเสบของสารสกัดจากใบเตยในสัตว์ทดลองยังไม่พบรายงาน อย่างไรก็ตามการศึกษากลไวยับยั้งการอักเสบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การยับยั้งการทำงานของ NF- κ B (Nuclear factor- κ B), TNF- α (Tumor necrosis factor α) และ PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) ยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปพัฒนาต่อไป

สรุป

แม้ว่าสมุนไพรรักษา 6 ชนิดที่ศึกษา ได้แก่ เตยหอม ชะพลู มะระขี้นก ตำลึง กะเพรา และว่านหางจระเข้ ได้มีการรายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้านไกลเคชั่น และด้านการอักเสบ มาก่อนหน้านี้ แต่ยังไม่มียารักษาการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างสมุนไพรรูปสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำคั้นสดว่าให้ผลการทดสอบแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรรักษา 6 ชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านไกลเคชั่น และด้านการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด ยกเว้นใบตำลึงที่สารสกัดน้ำคั้นสดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัดเอทานอล ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในด้านการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรรูปพื้นที่สามารถหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูก ทั้งในรูปแบบการรับประทานเป็นอาหารหรือการนำมาวิจัยพัฒนาเป็นยาจากสมุนไพรรูปพื้นที่เพื่อใช้เป็นยาทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อย่างเหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประเภททุนวิจัยทั่วไป งบประมาณ ปี พ.ศ. 2558-2559

เอกสารอ้างอิง

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-7.
2. Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med* 2006; 12: 62-6.
3. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-61.
4. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-12.
5. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
6. Willcox JK. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 275-95.
7. Van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Res* 2000; 1: 67-72.
8. Ames BM, Shinena MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-22.
9. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increase in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1081-7.
10. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* 1991; 84: 1420-25.
11. Steinmetz KA, Pottor JD. Vegetable, fruit and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 1027-39.
12. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus marylifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. *Food Chem* 2008; 110: 319-27.
13. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem* 1998; 75: 199-212.
14. Moure A, Cruz JM, Franco D. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72: 145-71.
15. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 29: 1199-200.
16. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Alda WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *Int Food Res J* 2009; 16: 203-13.
17. Matsuura N, Aradate T, Sasaki C, *et al.* Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts. *J Health Sci* 2002; 48: 520-26.
18. Kaewamatawong R, Jeungmunkong T. Antioxidant activities DPPH and total phenolics content of some Thai medicinal plant extracts. *J Sci Tech UBU* 2006; 8: 76-8. (in Thai)

19. Hakkim FL, Shankar CG, Giriya S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. J Agric Food Chem 2007; 55: 9109-17.
20. Boonla P, Phadungkit M, Mahaweerawat U, Somdee T. Antioxidant and antimutagenic activities of *Piper sarmentosum* Roxb. Leaf extracts. Isan J Pharm 2004; 10: 283-94.
21. Umamaheswari M, Chatterjee TK. *In Vitro* Antioxidant Activities of the Fractions of *Coccinia Grandis* L. Leaf Extract. Afr J Tradit Complement Altern Med 2008; 5: 61-73.
22. Jimtaisong A, Krisdaphong P. Antioxidant activity of *Pandanus amaryllifolius* leaf and root extract and its application in Topical emulsion. Trop J Pharm Res 2013; 12: 425-31.
23. Ozsoy N, Candoken E, Akev N. Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and β -tocopherol in *Aloe vera*. Oxidative med cell longev 2009; 2: 99-106.
24. Lou NS, Lai CY, Hsu SY, Ho TC. Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. Food Chem 2016; 197: 1-6.
25. Benamrouchea LL, Madani K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. Ind Crops Prod 2013; 50: 723-30.
26. Su MS, Shyu YT, Chien PJ. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. Food Chem 2008; 111: 892-6.
27. Sasidharan S, Sumathi V, Jegathambigai NR, Latha LY. Antihyperglycaemic effects of ethanol extracts of *Carica papaya* and *Pandanus amaryfollius* leaf in streptozotocin-induced diabetic mice. Nat Prod Res 2011; 25: 1982-87.
28. Chiabchalard A, Nooron N. Antihyperglycemic effects of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaf extract. Pharmacogn Mag 2015; 11: 117-22.
29. Patil R, Patil R, Ahirwar B, Ahirwar D. Isolation and characterization of anti-diabetic component (bioactivity—guided fractionation) from *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae) aerial part. Asian Pac J Trop Med 2011; 4: 278-82.
30. Munasinghe MAAK, Abeysena C, Yadehige IS, Vidanapathirana T, Piyumal KPB. Blood sugar lowering effect of *Coccinia grandis* (L.) J. Voigt: Path for a new drug for Diabetes Mellitus. Exp Diabetes Res 2011; 2011: 978762 (<https://doi.org/10.1155/2011/978762>)

31. Chaudhary A, Sharma S, Mittal A, Gupta S, Dua A. Phytochemical and antioxidant profiling of *Ocimum sanctum*. J Food Sci Technol 2010 (<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04417-2>)
32. Muzammila MS, Dineshb V, Rahimanc SM, *et al.* Antidiabetic potential of herbal extracts studied in (STZ) Streptozotocin induced diabetic rat. Int J Pharm Biol Sci 2013; 3: 78-85.
33. Deetae P, Parichanon P, Trakunleewathana P, Chanseetis C, Lertsir S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. Food Chem 2012; 133: 953-9.
34. Kavishankar G, Lakshmidhevi N, Murthy S, Prakash HS, Niranjanaet SR. Diabetes and medicinal plants-A review. Int J Pharm Biomed Sci 2011; 2: 65-80.
35. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. Phytother Res 2001; 15: 157-61.
36. Trakoonosot W, Sotanaphun U, Phanachet P, Porasuphatana S, Udomsubpayakul U, Komindr S. Pilot study: Hypoglycemic and antiglycation activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) in type 2 diabetic patients. J Pharm Res 2013; 6: 859-64.
37. Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. Atractylodes japonica suppresses lipopolysacchhalide-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. Biol Pharm Bull 2004; 27: 324-7.
38. Singh S, Majumdar DK, Rehan HMS. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. J Ethnopharmacol 1996; 54: 19-26.
39. Zakaria ZA, Patahuddin H, Mohamad AS, Israf DA, Sulaiman MR. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. J Ethnopharmacol 2010; 128: 42-8.
40. Deshpande SV, Patil MJ, Daswadkar SC, Suralkar U, Agarwal A. A study on anti-inflammatory activity of the leaf and stem extracts of *Coccinia grandis* L. Voigt. Int J Appl Biol Pharm Technol 2011; 2: 247-50.