ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HYPOGLYCEMIC EFFECT OF PANDANUS AMARYLLIFOLIUS ROXB.LEAF EXTRACT

Miss Nattakarn Nooron

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด
โดย	นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.อัญชลี เฉียบฉลาด

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.อัญชลี เฉียบฉลาด)

…….. กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา ปุรินทราภิบาล)

ณัฐกานต์ หนูรุ่น : ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด (HYPOGLYCEMIC EFFECT OF PANDANUS AMARYLLIFOLIUS ROXB. LEAF EXTRACT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.อัญชลี เฉียบฉลาด, 114 หน้า.

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่มีความสำคัญในเมืองไทยและทั่วโลก ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงและเกิดโรคแทรกซ้อนตามมามากมายจนอาจเสียชีวิตได้ จากการศึกษาฤทธิ์ของใบเตยหอม (Pandanus amaryllifolius Roxb.) ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยวิธี Standard Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) ในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีและระดับน้ำตาลในเลือดปกติจำนวน 30 ราย เปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือด ในกลุ่มที่ไม่ดื่ม (control) และดื่มชาเตยหอม (test) ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ในน้ำ 300 มิลลิลิตร พบว่าระดับน้ำตาลเฉลี่ยสูงสุดในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง คือ 125 ±17.66 และ 111 ± 14.16 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) เพื่อศึกษากลไกในการลดน้ำตาลในเลือด ได้นำใบเตยหอมมาสกัดสาร 4 รูปแบบด้วยกันคือ ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส (method 1) ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 25 องศาเซลเซียส (method 2) ใบเตยหอมแห้งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส (method 3) ใบเตยหอมแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล (method 4) ได้พบว่า สารสกัดใบเตยหอมทั้ง 4 รูปแบบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase โดยพบว่าสารสกัดใบเตยหอม method 3 และ 4 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นในรูปแบบ dose dependent โดยมีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และสารสกัด method 2 มีแนวโน้มในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารฟินอลิกและฟลาโวนอยด์โดยสารที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกันจะให้สารทั้งสองที่แตกต่างกันโดยตัวทำละลายเอทานอลให้สารฟินอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด และเมื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวทำละลายต่างๆกันพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแปรผันตามสารฟินอลิกที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการนำเตยหอมไปใช้เป็นยารักษาโรคต่อไป

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553 .....

5277206337 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEYWORDS : HYPOGIYCEMIC / PANDANUS AMARYLLIFOLIUS ROXB

NATTAKARN NOORON : HYPOGLYCEMIC EFFECT OF PANDANUS AMARYLLIFOLIUS ROXB. LEAF EXTRACT ADVISOR : ANCHALEE CHIABCHALARD, Ph.D., 114 pp.

Diabetes Mellitus is one of the leading chronic diseases in Thailand and all over the world. In the patients who have poor glycemic control, high blood glucose level may lead to other life threatening complications. This study tried to examine the effect of crude extract from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. (PA) leaf, which is found locally in Thailand, on blood glucose level and the hypoglycemic mechanism. Thirty healthy volunteer were asked to drink (test - group) or not drink (control group) PA tea 15 minutes after glucose load (75 g) in standard OGTT. We found that the average of blood glucose level in control group is 125 ± 17.66 mg/dl, while in test – group is 111 ± 14.16 mg/dl. The level of blood glucose in both groups are statistically different ($P<0.001$). To study hypoglycemic mechanism four methods of PA extracts were prepared; method 1 is fresh PA extracted with distilled water at 90 ºC, method 2 is fresh PA extract with distilled water at 25 ºC, method 3 is dry PA extract with distilled water at 90 ºC and method 4 is dry PA extract with ethanol. We found that PA extract, all methods, can inhibit α-glucosidase enzyme. Methods 2 and 3 can induce rat pancreatic cell (RINm5F) to produce insulin with dose - dependent manner ($P < 0.05$). Method 2 can stimulate glucose uptake of muscle cell (L6) . Moreover, study of the amount of phenolic and flavonoid compounds found that the extraction with ethanol give the highest amount of those two compounds, and the capacity of antioxidant scavenging depends on the amount of phenolic and flavonoid compounds. The knowledge of this research can be used as a guideline to discover a new drug to treat the diabetes patient.

Department : Clinical Chemistry . Student's Signature :

Field of Study : Clinical Biochemistry and Molecular Medicine . Advisor's Signature :

Academic Year : 2010 .

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.อัญชลี เฉียบฉลาด ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ระหว่างการทำงานวิจัย ศิษย์ขอขอบพระคุณอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา ปุรินทราภิบาล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2553 ทุนค่าลงทะเบียน และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ สวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม ที่อนุเคราะห์ สมุนไพรเพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี (Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project) ที่มีส่วนสำคัญในการผลักดันให้การดำเนินโครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ

ขอขอบคุณ โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัย ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว อาจารย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกๆท่าน เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ป.โท และ ป.เอก ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจ ร่วมทุกข์ร่วมสุขในการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

ลำดับขั้นในการเสนอผลงาน..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

โรคเบาหวาน..... 4

การแบ่งประเภทโรคเบาหวาน..... 4

สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวาน..... 6

โรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน..... 9

การรักษาเบาหวาน..... 10

ข้อมูลเกี่ยวกับเตยหอม..... 17

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร..... 20

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24

กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย..... 24

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 25

การสำรวจและรวบรวมความรู้เกี่ยวกับใบเตยหอม..... 29

บทที่ หน้า

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด..... 31

การหาปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay..... 32

การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay..... 33

หาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS assay..... 35

ตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยวิธี MTT assay..... 37

การทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์..... 37

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ α –Glucosidase.... 39

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน. 41

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)..... 43

ศึกษาผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในมนุษย์..... 45

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 51

ผลการสกัดใบเตยหอมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันและโดยวิธีที่แตกต่างกัน. 51

การวัดสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ความสามารถต้านออกซิเดชันของใบเตยหอม 52

ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด..... 52

ผลการวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 53

ผลการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay..... 54

ผลการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay..... 55

ผลการทดสอบวิธี MTT assay..... 56

ผลสารสกัดจากใบเตยหอมต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนหนู..... 56

ผลสารสกัดจากใบเตยหอมต่อความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู 60

ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ α –Glucosidase 65

การทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน..... 67

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์... 69

บทที่ หน้า

ผลการทดสอบผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในคน..... 69

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 70

รายการอ้างอิง..... 81

ภาคผนวก..... 93

ภาคผนวก ก..... 94

ภาคผนวก ข..... 97

ภาคผนวก ค..... 100

ภาคผนวก ง..... 102

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 114

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงถึงตัวอย่างของยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 การออกฤทธิ์ของยาและผลข้างเคียงของการใช้ยาในการรักษา…….. 15
2.2 แสดงถึงสารประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของเตยหอม……... 19
3.1 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด……... 32
3.2 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดปริมาณสาร flavonoids……... 33
3.3 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay…… 34
3.4 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay…… 36
3.5 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส…… 40
3.6 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส…… 41
3.7 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน…….... 43
4.1 ค่าที่ได้จากการทดสอบสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเตยหอม…… 52
4.2 ค่าที่ได้จากการทดสอบสารฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดใบเตยหอม…… 53
4.3 ค่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี DPPH assay……... 54
4.4 ค่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี ABTS assay…… 55
4.5 ค่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน…….... 68
4.6 ตารางแสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดของผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัย 30 ราย……... 71

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 กลไกการยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด..... 13
2.2 เตยหอม..... 17
3.1 เซลล์ตับอ่อนหนู RIN-m5F (Insulinoma cell line)..... 24
3.2 เซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)..... 25
3.3 แสดงใบเตยหอมที่ใช้ในการวิจัย..... 30
3.4 แสดงวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบเตยหอม..... 31
3.5 แสดงถึงความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ..... 34
3.6 แสดงถึงสูตรโครงสร้างของ ABTS ที่อยู่ในรูปไม่เป็นอนุมูลอิสระ..... 35
3.7 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay..... 37
3.8 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมกำหนด เมื่อเติมสารละลาย MTT..... 38
3.9 แสดงถึงโครงสร้างของสาร O-dianisidine dihydrochloride..... 39
3.10 แสดงถึงหลักการทำงาน Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)..... 42
3.11 แสดงถึงการเกิดแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์..... 44
3.12 แสดงขั้นตอนการทดสอบชาใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด 50
4.1 ปริมาณสารที่สกัดได้จากใบเตยหอมที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน..... 51
4.2 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส..... 57
4.3 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 58
4.4 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส..... 59
4.5 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล..... 60
4.6 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส..... 61

ภาพที่ หน้า

4.7 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 62
4.8 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส..... 63
4.9 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล..... 64
4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์มอลเตสด้วยสารสกัดจากใบเตยหอม... 65
4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ซูเครสด้วยสารสกัดจากใบเตยหอม..... 66
4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน..... 67
4.13 ผลการทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน..... 68
4.14 ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์..... 70
4.15 ผลการทดสอบชาใบเตยหอมฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในกระแสเลือด..... 73
4.16 ผลการทดสอบชาใบเตยหอมฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในกระแสเลือด..... 74
5.1 โครงสร้างของ quercetin..... 79

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากกรรมพันธุ์ การดำเนินชีวิตประจำวันที่เร่งรีบ และสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปก็นับว่าเป็นสาเหตุสำคัญเช่นกัน ในปี ค.ศ. 2005 มีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลก 220 ล้านคน และเสียชีวิตถึง 1.1 ล้านคน (1) โรคเบาหวานสามารถพบได้ตั้งแต่แรกเกิด โดยพบอุบัติการณ์ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย และพบในประเทศกำลังพัฒนาเป็นส่วนใหญ่ (2-4) โรคเบาหวานเป็นอีกโรคหนึ่งที่เป็นแล้วรักษาไม่หายขาดและมีอาการแทรกซ้อนในระบบต่างๆของร่างกาย เช่น ระบบหลอดเลือดและหัวใจ ตา ไต รวมถึงเนื้อเยื่อต่างๆ (5) การรักษาโรคเบาหวานต้องใช้ระยะเวลานาน และสูญเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยเบาหวานมีอาการแทรกซ้อนลุกลามไปถึงอวัยวะต่างๆ การรักษาโรคเบาหวานจึงเน้นเรื่องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ หรือใกล้เคียงปกติมากที่สุด การรักษาด้วยการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย เป็นวิธีที่จะใช้กับผู้ป่วยในรายที่เป็นในระยะเริ่มแรกและอาการไม่รุนแรง การรักษาด้วยยาที่ใช้กับผู้ป่วยเบาหวานมีหลายกลุ่ม เช่น ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ลดการดื้อต่ออินซูลินและเพิ่มความสามารถในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเป็นต้น แต่ยาเหล่านี้มักมีราคาแพงและมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น ปวดหัว ท้องเสีย คันตามผิวหนัง (6) ดังนั้นการแก้ไขอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นคือ การลดขนาดยาที่ใช้ลง

ในระยะหลายปีที่ผ่านมามีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการลดน้ำตาลในเลือดเพิ่มมากขึ้น (7) โดยมีงานวิจัยศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถต้านออกซิเดชัน สามารถรักษาโรคเบาหวานได้ และยาที่สกัดจากสมุนไพร มีราคาถูกกว่าและมีผลข้างเคียงน้อยกว่า ใบเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) เป็นพืชพื้นเมืองของไทย ที่นิยมนำมาใช้ในการประกอบอาหาร ราคาถูก ปลอดภัยและหาได้ง่าย มีผู้สนใจนำเตยหอมมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาเบาหวาน เช่น Peungvicha P. และคณะ ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากรากของเตยหอมมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ (8, 9) แต่มีผลเสียคือทำให้เอนไซม์ในตับสูงขึ้น มีอาการคั่งของน้ำในตับ ไต ปอด ในหนูทดลอง (10) โดยทั่วไปแล้วเราไม่รับประทานรากของเตยหอม ส่วนของเตยหอมที่นิยมนำไปบริโภคคือส่วนของใบ เช่น ชาใบเตย หรือ น้ำคั้นจากใบเตยหอม ซึ่งนำไปเป็นส่วนประกอบอาหารหรือขนม ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากใบเตยหอมมาศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดว่าจะ

สามารถได้ผลเช่นเดียวกับรากหรือไม่ หากสารสกัดใบเตยหอมมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้จริง ก็ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวานได้ นอกจากนั้นจากการศึกษานำร่อง (pilot study) พบว่าสารสกัดใบเตยหอมมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากเตยหอมและมะระโดยใบเตยหอมสามารถลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือดโดยวิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) และPost-prandial ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.008$) (11) นอกจากนี้ชาเตยหอมยังไม่ทำให้การทำงานของตับของอาสาสมัครผิดปกติ เมื่อดื่มติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน (11)

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากใบเตยหอม และกลไกการลดน้ำตาลในเลือด หากคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จอาจจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยและนำไปใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยเบาหวานและเป็นประโยชน์ในการนำข้อมูลการวิจัยไปปรับปรุงเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดใบเตยหอม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถต้านออกซิเดชัน

2. เพื่อศึกษาผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) ในคน

3. เพื่อศึกษากลไกของสารสกัดใบเตยหอมในการลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยเน้นการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ทดสอบการกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์อินซูลินจากตับอ่อน และการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)

ขอบเขตของการวิจัย

1. คณะผู้วิจัยจะศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเตยหอมโดยการตรวจวัดด้วย 4 วิธี คือ Total phenolic content, Aluminium chloride colorimetric assay DPPH assay และ ABTS assay

2. ศึกษาผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) ในคน

3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเบาหวานของสารสกัดจากใบเตยหอมโดยประเมินฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยศึกษา 3 กลไก คือ

   1. กลไกการออกฤทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase
   2. การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน
   3. การกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ (glucose uptake)

ข้อจำกัดการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้จะทำการทดสอบสมุนไพรไทยจากสวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม และนำมาทดสอบปฏิกิริยากับเซลล์เพาะเลี้ยงจากหนูเท่านั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงกลไกของใบเตยหอมในการลดระดับน้ำตาลในเลือด
2. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรไทยสำหรับการรักษาโรคเบาหวานที่ไม่มีผลข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยลง
3. คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับประเทศหรือระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) คือ กลุ่มโรคเมตาบอลิซึม ที่เกิดมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน เกิดจากขาดอินซูลินโดยปริมาณ (Absolute insulin deficiency) หรือการขาดอินซูลินโดยคุณภาพ (Relative insulin deficiency) โดยเกิดจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินหรือความผิดปกติในการออกฤทธิ์ของอินซูลินหรือทั้งสองประการ การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานในโรคเบาหวานก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต หลอดเลือดและหัวใจ (12)

❖ การแบ่งประเภทของโรคเบาหวาน

สมาคมโรคเบาหวานสหรัฐอเมริกา (ADA) แบ่งโรคเบาหวาน เป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ

1. เบาหวานประเภทที่ 1 (Type 1 diabetes mellitus)

   ผู้เป็นเบาหวานจะขาดอินซูลินเนื่องจากเบต้าเซลล์ (β cell) ถูกทำลาย ตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้ เนื่องจากออโตอิมมูนไปทำลายเบต้าเซลล์ ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้เพื่อให้เกิดพลังงานได้ ส่งผลให้น้ำตาลในเลือดสูง เมื่อร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้เป็นพลังงานได้ ร่างกายจะมีการสลายไขมันและโปรตีนมาใช้เป็นพลังงานทดแทน ในกระบวนการนี้จะได้สารคีโตนซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดและเป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้เกิดภาวะกรดคั่งในเลือดจากสารคีโตน (Diabetic ketoacidosis) โดยจะพบลักษณะพิเศษคือ เมื่อหายใจออกมาจะมีกลิ่นผลไม้ มีอาการหอบหายใจแรง ชีพจรเต้นเร็ว อาการที่เกิดขึ้นมักจะรุนแรงและรวดเร็ว

2. เบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 diabetes mellitus)

   ผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้มักมีอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป นอกจากนี้กรรมพันธุ์ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค อาการของโรคมีทั้งแบบที่ค่อยเป็นค่อยไป จนถึงขั้นรุนแรง การทำงานของตับอ่อนของผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้สามารถทำงานได้บ้าง ไม่เหมือนกับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จึงไม่พบคีโตนอินซูลินนั้นจะออกฤทธิ์ไม่ดีในคนอ้วน ดังนั้นคนอ้วนจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานได้มากกว่าคนผอม

3. เบาหวานชนิดอื่นๆ (Other specific types)

เกิดจากโรคทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการหลั่งอินซูลินได้น้อยลง หรืออินซูลินทำหน้าที่ได้น้อยลง โดยมีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์แบบ autosomal dominant พบว่ามีความผิดปกติของยีนส์ 5 ตำแหน่ง ที่พบบ่อยที่สุดคือมีการกลายพันธุ์ (mutations) (13) ของโครโมโซมที่ 12 ใน hepatic transcription factor (HNF) 1 α (14) นอกจากนี้ยังมีการ mutation ของ glucokinase gene บนโครโมโซม 7p (15) และกลายพันธุ์ของ hepatic transcription factor (HNF) 4 α gene บนโครโมโซม 20q (16) เกิดจากโรคของตับอ่อน เช่น ตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง (Chronic pancreatitis) มะเร็งตับอ่อน (Glucaconnomas) เป็น A-cell tumor ของ islet ซึ่งจะมีการเจริญของโรคช้าแต่ร้ายแรง อาการที่เด่นชัดคือ ผื่นคัน (Rash) ที่เรียกว่า necrolytic migratory การมีระดับกลูคากอนที่สูงขึ้น ทำให้เกิด hyperglycemia จนเกิดเบาหวาน (17) ยาหรือสารเคมี เช่น pentamidine ทำให้มีการหลั่งอินซูลินน้อยลง หรือยาบางชนิดมีฤทธิ์ต้านอินซูลินได้ เช่น nicotinic acid

4. เบาหวานในระยะตั้งครรภ์ (Gestational diabetes mellitus)

คือ ผู้ที่ไม่เป็นเบาหวานมาก่อน และมาตรวจพบความผิดปกติของระดับกลูโคสในเลือดเป็นระยะแรกขณะตั้งครรภ์ โดยปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ได้แก่ ความอ้วน ประวัติครอบครัวที่เคยเป็นเบาหวานชนิดที่สอง เคยเป็นเบาหวานในระยะตั้งครรภ์มาก่อน ผู้ที่เป็นเบาหวานในระยะตั้งครรภ์จะหายเป็นปกติหลังคลอด (ถ้าไม่หายแสดงว่าเปลี่ยนเป็นเบาหวานอย่างถาวร) และผู้ที่หายจะมีโอกาสเปลี่ยนไปเป็นเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ได้อีกในครรภ์ต่อไป (18)

❖ สาเหตุการเกิดโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานชนิดที่ 1 ส่วนใหญ่เกิดจากออโตอิมมูนโดยประกอบด้วย 2 ปัจจัยได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic susceptibility) (19, 20) และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยปัจจัยทั้งสองจะส่งเสริมกันทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมาทำลายเซลล์ตับอ่อน โดยมีการอธิบายถึงกลไกการทำลายเบต้าเซลล์ว่า เกิดจากความผิดปกติของการทำงานของ T cell โดยเริ่มจาก antigen presenting cell (APC) คือ macrophage, dendritic cell หรือ เม็ดเลือดขาวชนิดบีเซลล์ (B cell) จับกับเบต้าเซลล์ (β cell) แอนติเจน HLA class II บน APC ที่มีเบต้าเซลล์ (β cell) แอนติเจนจะจับกับรีเซพเตอร์ของ T cell ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ที่จำเพาะกับ β cell แอนติเจน แล้วไปกระตุ้นเซลล์ T- helper ($CD4^+$) ให้หลั่ง cytokine หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ interferon gamma (IFN-Y) ซึ่งสามารถไปกระตุ้น macrophage และ cytotoxic ($CD8^+$) T cell macrophage ที่กระตุ้นจะหลั่งสารจำพวกอนุมูลอิสระ เช่น superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide และ cytokine เช่น interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเบต้าเซลล์ ส่วน cytotoxic T cell สามารถทำลายเบต้าเซลล์ได้โดยตรงโดยจับกับรีเซพเตอร์ของ T cell หรือมีการหลั่ง TNF- α (21) มาทำลายเบต้าเซลล์ นอกจากนี้ vascular endothelial cell ของเส้นเลือดบริเวณตับอ่อนอาจมีส่วนช่วยในการทำลายเบต้าเซลล์โดยการหลั่ง IL-1, IL-6 และ adhesion molecule ซึ่ง adhesion molecule จะกระตุ้นให้ macrophage และ lymphocyte เคลื่อนย้ายมาบริเวณ islet มากขึ้น และทำลายเบต้าเซลล์ในที่สุด (22)

1. ปัจจัยทางพันธุกรรม โรคเบาหวานชนิดที่1 มีความสัมพันธ์กับ human leukocyte antigen (HLA) complex จากการศึกษา DNA ด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism ของผู้เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 พบว่าการเกิดเบาหวานชนิดที่ 1 สัมพันธ์กับ HLA DQ บริเวณ HLA-DQ β chain (23) โดยพบว่าถ้า amino acid ในตำแหน่ง Asp-57 เป็น alanine, vanine หรือ serine (non- Asp-57) จะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานแต่ถ้าถูกแทนที่ด้วย aspartic acid (Asp-57) จะเสี่ยงกับการเป็นเบาหวานชนิดนี้น้อยลง (24)

2. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

- การติดเชื้อไวรัส มีการศึกษาไวรัส Coxackie B, Rubella, Mumps, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Retrovirus (25) มีความสัมพันธ์กับการเกิดเบาหวานชนิดที่ 1 เช่น โครงสร้างของไวรัส Coxackie B (26) มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (molecular mimicry) โดยเฉพาะส่วน peptide PEVKEK (27) เมื่อมีการศึกษาโปรตีน P2-C ของไวรัส Coxackie B_4 มีการเรียงตัวของ amino acid คล้ายคลึงกับบางส่วนของ glutamic acid decarboxylase (GAD_{65}) ซึ่งเป็นแอนติเจนของเบต้าเซลล์ ทำให้ cytotoxic T cell ที่จำเพาะกับไวรัสสามารถไปจับ (cross-react) กับ GAD_{65} ได้และเกิดการทำลายเบต้าเซลล์ (28)
- สารอาหาร มีรายงานว่าสารอาหารอาจมีความสำคัญกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้แก่ gluten, nitrate และ intrite gliadin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดได้จาก gluten พบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 1 (29) ในหนูทดลอง แต่ยังไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนในคน
- สภาพแวดล้อมในครรภ์มารดา มีการบ่งชี้ว่า การเกิดโรคของเบาหวานชนิดหนึ่งในเด็ก มีความสำคัญกับอายุของมารดาที่มากขึ้น โดยเฉพาะมารดาที่อายุมากกว่า 35 ปี (30) โดยมีการสันนิษฐานว่าอายุของมารดามีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันของลูก

<u>โรคเบาหวานชนิดที่ 2</u> สาเหตุหลักที่เกิดเบาหวานชนิดนี้คือ คือ มีความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินที่ลดลง การดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ส่วนการสร้างกลูโคสจากตับที่มากขึ้นนั้น มาจากผลการหลั่งอินซูลินที่ลดลง ภาวะ insulin resistance คือ ภาวะที่ความสามารถของอินซูลินในการทำให้กลูโคสเข้าเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับอินซูลินที่เท่ากัน ในสภาวะปกติเนื้อเยื่อจำเป็นต้องอาศัยอินซูลินในการทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจำเป็นต้องมีรีเซพเตอร์ (receptor) ของอินซูลิน หลังจากอินซูลลินจับกับรีเซพเตอร์ซึ่งเป็น transmembrane receptor แล้วจะกระตุ้นให้เกิด autophosphorylation ของ tyrosine kinase โดยผ่านทาง insulin receptor substrate (IRS) หลังจากนั้นจะไปกระตุ้น phosphor-inositide-3 kinase และ kinase อื่นๆ เพื่อให้มีการเคลื่อนย้ายของ glucose transportor-4 (GLUT-4) ซึ่งอยู่ใน vesicle ภายในเซลล์ไปที่ cell membrane เพื่อทำ

ให้กลูโคสเข้ามาภายในเซลล์ หลังจากนั้น glucose-6-phosphate จะอาศัยเอนไซม์ hexokinase เปลี่ยนกลูโคสเป็น glycogen โดย glycogen synthase ส่วนหนึ่งของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น lactase และส่วนหนึ่งจะเข้า Kreb cycle เพื่อสร้างพลังงานในรูปของ adenosine triphosphate หรือ ATP (Oxidative glucose metabolism) ซึ่งจะเห็นว่า insulin resistance อาจเกิดจากความผิดปกติของโปรตีนที่ใช้สื่อสาร (insulin signaling pathway) เช่น protein kinase, GLUT-4 หรือจะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ เช่น hexokinase โดยในปัจจุบันพบว่าความผิดปกติหลักของ insulin resistance จะอยู่ที่การเคลื่อนย้าย GLUT-4 ไปยัง cell membrane ลดลง ทำให้การนำกลูโคสเข้าเซลล์ลดลงด้วย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด insulin resistance มีดังนี้ (31)

1. ปัจจัยทางพันธุกรรม ยีนส์ที่เกียวข้องกับ insulin resistance ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีความผิดปกติในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ IRS-1, glycogen synthase, fatty acid-binding-pretein 2 (FABP 2) (32) แต่พบความผิดปกติแค่บางชนชาติและพบน้อย และมียีนส์หลายตัว (33) ที่เมื่อศึกษาแล้วพบว่าไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้ (34) ได้แก่ insulin- stimulated protein kinase 1, protein phosphatase 1, GLUT-4 hexokinase II

2. ปริมาณและตำแหน่งของไขมันในร่างกาย เบาหวานชนิดที่ 2 จะมีการเกิด insulin resistance เกิดขึ้นเป็นพื้นฐานอยู่แล้วไม่ว่าจะอ้วนหรือไม่ แต่ความอ้วนจะทำให้มีโอกาสที่จะเกิด insulin resistance มากขึ้น โดยผู้ป่วยโรคอ้วนส่วนใหญ่จะมี free fatty acid ที่ได้จากการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ เมื่อมี free fatty acid ที่เพิ่มสูงมากขึ้นสามารถยับยั้งการนำกลูโคสเข้าเซลล์และยับยั้งกระบวนการ glucose oxidation และการสังเคราะห์ glycogen ภายในเซลล์ด้วย (35) นอกจากปริมาณไขมันจะทำให้เกิด insulin resistance แล้ว ตำแหน่งสะสมไขมันก็มีส่วนสำคัญโดยเฉพาะไขมันที่สะสมอยู่ที่หน้าท้องจะทำให้เกิดสลายตัวให้ free fatty acid มากกว่าไขมันที่สะสมบริเวณสะโพก (36) นอกจากนี้ TNF-α ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ insulin resistance ในคนอ้วน (37) โดยพบว่า TNF-α ที่ให้เข้าไปจะทำให้เกิดความผิดปกติของ insulin autophosphorylation และเกิด insulin resistance ในหนูทดลอง (38)

3. อายุ ผู้สูงอายุมักมี insulin resistance ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับ ความอ้วน การขาดการออกกำลังกาย (39) หรือยาบางชนิด เช่น ยาขับปัสสาวะ, β-blocker ซึ่งเป็นยาที่ใช้บ่อยในผู้สูงอายุ และจากการสำรวจประชากรในประเทศไทยพบว่าประชากรที่อายุมากขึ้นจะมีระดับ plasma glucose และ Body mass index (BMI) ที่มากขึ้น (40)

4. การขาดการออกกำลังกาย ข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการออกกำลังกายและ insulin sensitivity พบว่าผู้ที่ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอจะมี insulin sensitivity ที่ดีกว่าผู้ที่ไม่ออกกำลังกาย และการออกกำลังกายสามารถลดปริมาณไขมันในร่างกาย (total body fat) และไขมันหน้าท้องที่เป็นสาเหตุให้เกิด insulin resistance ได้ (41)

5. สภาพแวดล้อมในครรภ์มารดา มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแรกคลอดกับการเกิด insulin resistance เมื่อโตขึ้น พบว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวแรกคลอดต่ำกว่า 2.5 กิโลกรัม หรือมากกว่า 4.5 กิโลกรัม จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (42) มากกว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวแรกคลอดอยู่ในเกณฑ์ปกติ เนื่องจากยีนส์ที่ทำให้เกิด insulin resistance นั้นมีสาเหตุให้เด็กมีน้ำหนักแรกคลอดน้อย และอินซูลินมีผลต่อการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ทำให้เกิดความผิดปกติของ glucose metabolism และ metabolic syndrome เมื่อเด็กโตเป็นผู้ใหญ่ (43)

❖ โรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน

- ภาวะแทรกซ้อนทางตา

เบาหวานขึ้นตา คือ เส้นเลือดของจอรับภาพของตาจะโป่งพองหรือมีเส้นเลือดแตก แต่ไม่มีอาการแสดงออก ผู้ป่วยจะไม่รู้ตัว ยกเว้นความผิดปกติเกิดที่ตำแหน่งศูนย์กลางของการมองเห็นหรือเส้นเลือดแตกมากจนบังจอรับภาพ ทำให้ตาบอดได้

ต้อกระจก เป็นภาวะที่เลนส์ของตาขุ่นมัว ทำให้มองไม่ชัดหรือไม่เห็น พบในผู้สูงอายุ ผู้เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ดีจะเกิดต้อกระจกได้เร็วมากขึ้น (44, 45)

- ภาวะแทรกซ้อนทางไต

ภาวะแทรกซ้อนทางไต เป็นผลมาจากการที่น้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ทำให้การไหลเวียนเลือดผิดปกติ และเกิดความผิดปกติที่เนื้อไตโดยตรง นำไปสู่การมีโปรตีนในปัสสาวะและเกิดไตวายในที่สุด ปัจจัยทางพันธุกรรมมีบทบาทให้เกิดภาวะแทรกซ้อนทางไตด้วย (46)

- ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท

การสูญเสียประสาทรับความรู้สึกส่วนปลายของอวัยวะ อาการชานี้จะเกิดขึ้นทำให้ผู้ป่วยเบาหวานไม่รู้สึกเจ็บเมื่อเกิดแผลขึ้น ซึ่งนำไปสู่การเป็นแผลเรื้อรังในที่สุด (47)

- ภาวะแทรกซ้อนของหัวใจและหลอดเลือดแดง

ผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดีจะเกิดภาวะเส้นเลือดตีบแข็งเร็วขึ้น ทำให้เกิดปัญหากับอวัยวะที่เส้นเลือดไปหล่อเลี้ยง ก่อให้เกิดอัมพาต เกิดโรคหัวใจขาดเลือดหรือหัวใจวาย ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดเส้นเลือดตีบแข็งคือ ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง ความอ้วน การสูบบุหรี่ (48)

❖ การรักษาโรคเบาหวาน

การรักษาเบาหวานมีเป้าหมายเพื่อลดภาวะแทรกซ้อนแบบเฉียบพลัน เช่น จากระดับน้ำตาลที่สูง การติดเชื้อ ภาวะเลือดเป็นกรด หรืออาการแทรกซ้อนระยะยาว เช่น ไตวาย ตาบอด ปลายประสาทเสื่อม แผลที่เท้า ซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียแขนหรือขา และเพื่อให้มีการดำรงชีวิตที่เป็นไปอย่างปกติ (49) ซึ่งการรักษามีหลายวิธีดังนี้

❖ การรักษาโดยใช้อินซูลิน (Insulin Treatment)

อินซูลิน (Insulin) เป็นฮอร์โมนชนิดโปรตีน ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 51 ตัว และประกอบด้วย 2 สายที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ di-sulfide อินซูลินถูกหลั่งจาก β-cells ในตับอ่อนมีการหลั่งสู่กระแสเลือดและจับกับ receptors ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย proinsulin มีฤทธิ์น้อยกว่าอินซูลิน โดยพบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีระดับโปรอินซูลินสูง แต่มีระดับอินซูลินต่ำลง
อินซูลินที่เป็นชนิดฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) มี 3 ชนิด (50)

- อินซูลินที่ออกฤทธิ์เร็วและสั้น (repid-onset and short-acting) เช่น regular insulin,insulin aspart และ insulin glulisine รักษาโดยการฉีดเข้าผิวหนัง หรือ ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มีผลลดกลูโคสในเลือดอย่างรวดเร็ว ปลอดภัยในสตรีมีครรภ์ และมีความเสี่ยงน้อยต่อการเกิดภาวะกลูโคสต่ำในเลือด (hypoglycemia) โดยทั่วไปนิยมใช้ร่วมกับอินซูลินที่ออกฤทธิ์ระยะยาว

- อินซูลินที่ออกฤทธิ์นานปานกลาง (intermediate-acting) เช่น isophane insulin suspension, NPH, insulin zinc suspension (Lente insulin), neutral protamine lyspro (NPL) ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ใช้รักษาเบาหวานแต่ไม่ใช่ภาวะ diabetes ketoacidosis หรือภาวะกลูโคสสูงในเลือดแบบฉุกเฉิน (emergency hyperglycemia) โดยทั่วไปใช้ร่วมกับ regular insulin
- อินซูลินที่ออกฤทธิ์ยาว (long action) เช่น extended zine insulin ซึ่งเป็นผลึก zinc ทำให้ละลายช้าจึงออกฤทธิ์ช้าแต่นาน insulin glargine และ insulin detemir ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ทำให้ระดับอินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆแล้วคงที่ ทำให้มีฤทธิ์ลดกลูโคสในเลือดนาน

อินซูลินชนิดพ่นสูด เป็นอินซูลินที่ออกฤทธิ์สั้นชนิด regular insulin เรียกว่า inhaled regular insulin ในปัจจุบันอินซูลินของคนซึ่งผลิตโดยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมศาสตร์โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* อินซูลินที่สามารถให้โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ คือ insulin lispro และ regular insulin เนื่องจากออกฤทธิ์เร็วและสั้น ใช้ในกรณีฉุกเฉิน (51)

❖ การรักษาโดยการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย (Diet and Exercise Treatment)

ภาวะของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 หรือ 2 พบว่าบางรายสามารถควบคุมเบาหวานโดยการออกกำลังกายควบคู่กันไป โดยไม่จำเป็นต้องใช้ยา อาหารที่เหมาะสม ได้แก่ อาหารรสจืด งดรับประทานอาหารที่หวานจัด รับประทานผลไม้ที่ไม่หวานจัด ผักและธัญพืช รับประทานอาหารไขมันต่ำและคอเลสเตอรอลต่ำ หลีกเลี่ยงอาหารที่มีไขมันสูง และการออกกำลังกายเพื่อบำบัดรักษา ในกรณีของผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าการออกกำลังกายเป็นสิ่งสำคัญ คือ สามารถควบคุมน้ำหนักและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ และยังสามารถช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด โดยพบว่าการออกกำลังกายนั้นสามารถช่วยให้อินซูลินทำงานได้ดีขึ้น และช่วยกระตุ้นให้น้ำตาลเข้าเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (52)

❖ การรักษาโดยการใช้ยา (Drug Diabetes Treatment) (30)

การใช้ยาเบาหวาน จัดเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาเบาหวานชนิดที่ 2 และยาแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับการตอบสนองในแต่ละบุคคล ในการรักษานั้นสามารถใช้ยาหลายชนิดร่วมกันได้ (53) เนื่องจากยาแต่ละชนิดออกฤทธิ์ผ่านกลไกที่แตกต่างกัน

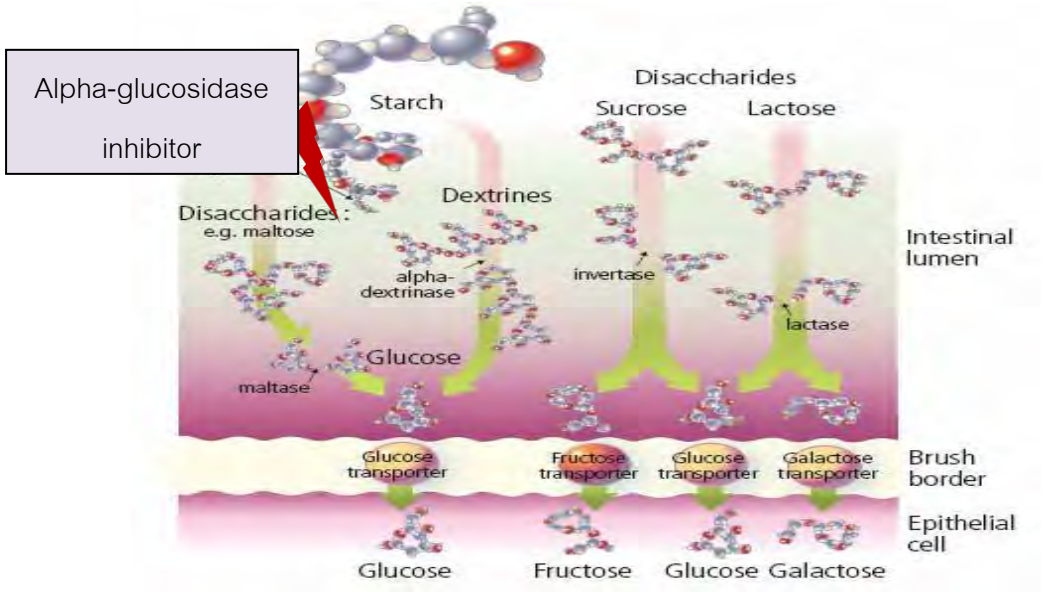
➢ ยากลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Alpha-glucosidase inhibitor)

ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการชะลอและลดการดูดซึมของอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตจากลำไส้เล็ก มีผลโดยตรงต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหาร (Post-prandial blood glucose, PPBG) จึงมีประโยชน์ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการควบคุมอาหารและการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม (54)

■ กลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ยากลุ่มยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (Alpha-glucosidase inhibitor) ยาที่รู้จักกันในกลุ่มนี้คือ อะคาร์โบส โดยอะคาร์โบสมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับโอลิโกแซคคาไรด์ของแป้ง ซึ่งอาจเรียกได้ว่า Pseudotetrasaccharides ออกฤทธิ์โดยแย่งจับกับเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ผนังของลำไส้เล็ก ทำให้ไม่มีเอนไซม์ไปย่อยแป้งและน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Polysaccharide and Disaccharide) ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว(Monosacharide) การดูดซึมคาร์โบไฮเดรตจึงช้าและลดลง ภายในโมเลกุลของอะคาร์โบส จะมีไนโตรเจนอะตอมทำให้โครงสร้างของยาไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ หลังจากจับกับเอนไซม์ระยะหนึ่ง จะถูกปล่อยออกมาจับกับเอนไซม์อื่นในลำไส้ เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งการทำงานนี้ได้แก่ แพนครีเอติก อะไมเลส (Pancreatic amylase) กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซูเครส (Sucrase) ยาจะไม่มีผลต่อแลคเตส (Lactase) จึงไม่ทำให้เกิดภาวะขาดเอนไซม์ย่อยแลคโตส (Lactose intolerance) ที่สำคัญคือ ยานี้ไม่มีผลต่อกลูโคสหรือฟรุกโตส (Fructose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (55) โดยสรุปยานี้มีฤทธิ์ยับยั้งแพนครีเอติกอะไมเลส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็น โอลิโกแซคคาไรด์ภายในลำไส้ และยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคสซิเดส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้กลายเป็นกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ผนังของลำไส้จึงดูดซึมอาหารและคาร์โบไฮเดรตช้าลง อาหารจำพวกแป้งที่ไม่ดูดซึมจะถูกหมักที่ลำไส้ใหญ่และกลายเป็นกรดไขมันชนิดสายสั้น สามารถดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ จึงไม่สูญเสียแคลลอรี่โดยรวม (56)

■ ผลข้างเคียง แน่นท้อง ท้องอืด มีลมในท้องมาก และอุจจาระร่วง



ภาพที่ 2.1 แสดงถึงกลไกการยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด โดยสัญลักษณ์ลูกศรไฟฟ้าแสดงการยับยั้งกระบวนการทำงานของปฏิกิริยา ที่มา (www.diabetesindia.com) ในสภาวะปกติร่างกายจะดูดซึม carbohydrate ผ่านลำไส้เล็ก โดยการทำงานของเอนไซม์ แอลฟากลูโคซิเดส (Alpha-glucosidase) ที่ทำหน้าที่ ย่อยแป้งให้เล็กลงเป็น Oligosaccharide หรือ Disaccharide ซึ่งในที่นี้คือ maltose แป้งจะต้องถูกย่อยเป็นน้ำตาลทั้งสองนี้ก่อน จึงจะผ่านกระบวนการย่อยต่อไปในที่นี้คือ enzyme maltase จะไปย่อย maltose ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และดูดซึมเข้าผนังลำไส้ได้ ตัวยับยั้งเอนไซม์ไปยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสในขั้นตอนการย่อยแป้งให้เล็กลงเป็น Oligosaccharide หรือ Disaccharide นี้ ก็ทำให้แป้งไม่สามารถเปลี่ยนเป็น Oligosaccharide หรือ Disaccharide ดังนั้นการย่อยแป้งต้องใช้เวลานานขึ้น และแป้งถูกขับออกทางอุจจาระมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจะมีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง

- ยากลุ่มที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ของตับอ่อน (Secretagogues) ตัวแทนของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ซัลโฟนิลยูเรีย (Sulfonylurea)

- กลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

กลไกการออกฤทธิ์ประกอบด้วย 2 กลไก คือ การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน โดยยากลุ่มนี้จะปิดกั้น ATP-sensitive K^+ channels (KATP channels) ในเบต้าเซลล์ของตับอ่อนส่งผลให้เกิดการยับยั้งการไหลออกของ K^+ ดังนั้น K^+ ในเบต้าเซลล์จึงมีระดับที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์และกระตุ้น voltage-dependent Ca^{2+} channels Ca^{2+} ไหลเข้าสู่

เซลล์และกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยกระบวนการ exocytosis อีกกลไกหนึ่งคือ การที่ยาไปควบคุมระดับของกลูคากอน (glucagon) ให้น้อยลง ทำให้ร่างกายชะลอขบวนการสลายน้ำตาลที่ตับ (Liver glycogenolysis) จึงกระตุ้นให้มีการผลิตอินซูลินมากขึ้น (57)

- ผลข้างเคียง เกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ ในระยะแรกอาจจะมีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ

➢ ยากลุ่มเพิ่มความไวต่ออินซูลิน (Sensitizers) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม bigunides และกลุ่ม thiazolidinediones

- กลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ยากลุ่ม biguanides ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงเนื่องจาก ลดการสร้างกลูโคสจากตับซึ่งมีความสำคัญในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 เพราะผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้มีกระบวนการ gluconeogenesis มากกว่าปกติถึง 3 เท่า โดยยาจะออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น AMPK (AMP-activated protein kinase) ในเซลล์ตับทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน SHP (Small heterodimer partner) ซึ่งเป็น transcription factor ยับยั้งการแสดงออกของ gene ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) และ glucose-6-phosphatase ซึ่งเกี่ยวข้องใน gluconeogenesis ทำให้กล้ามเนื้อและไขมันไวต่ออินซูลินมากขึ้น ลดการดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหาร ระดับกลูคากอนในเลือดลดลง ยากลุ่ม thiazolidinediones เป็น PPAR gamma (peroxisome proliferator- activated receptor gamma) agonists ส่งผลให้กระตุ้น PPAR gamma receptor ซึ่งเป็น intracellular receptor ควบคุมการแสดงออกของ insulin response gene สุดท้ายคือกระตุ้นเมทาบอลิซึมของกรดไขมันและกลูโคสในเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อ ลดการดื้ออินซูลินของเซลล์เป้าหมาย ลดระดับกรดไขมันอิสระในพลาสมาและเพิ่ม signal transduction ของอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อ (58)

- ผลข้างเคียง ยากลุ่ม biguanides เกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ขาดวิตามินบี 12 (59) และ folate ส่วนยากลุ่ม thiazolidinediones พบว่าเป็นพิษต่อตับ (60) น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น มีการคั่งของน้ำในร่างกาย

ตารางที่ 2.1 แสดงถึงตัวอย่างของยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 การออกฤทธิ์ของยา และผลข้างเคียงของการใช้ยาในการรักษา (53)

ชื่อยา	กลุ่มของยา	ฤทธิ์ของยา	ผลข้างเคียงของยา
Chlorpropamide	Sulfonylurea	-กระตุ้นสร้างและการหลั่งอินซูลินจาก β-cell	-เกิดภาวะโซเดียมต่ำ -เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ -เกิดภาวะความดันต่ำ
Metformin	Biguanide	-ลด gluconeogenesis ในตับ -ลดระดับ plasma glucose	-เกิดภาวะ Lactic acidosis -หากใช้ยาเป็นเวลานานเป็นสาเหตุให้เกิดลดการดูดซึมวิตามิน B12 -เกิดอาการท้องเสีย -มีผลต่อไต
Acarbose	α-Glucosidase inhibitor	-ลดการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตของลำไส้เล็กทำให้ระดับน้ำตาลต่ำลง	-ทำให้เกิดกรดในกระเพาะอาหาร -ท้องเสีย -ปวดมวนท้อง

จะเห็นว่ายาที่ใช้ในทางคลินิกปัจจุบันมีผลข้างเคียงต่อการรักษา บางตัวเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิต เช่น ยากลุ่ม thiazolidinediones ที่ชื่อว่า Troglitazone ถูกสั่งห้ามไม่ให้มีการใช้ยานี้เนื่องจากมีพิษต่อตับและทำให้ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเสียชีวิต (50) อีกทั้งยาบางตัวยังมีข้อห้ามสำหรับคนบางกลุ่ม เช่น ยาในกลุ่ม sulfonylureas ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของตับและไตรุนแรงเพราะยาจะถูกขับออกมาน้อยทำให้เกิดภาวะกลูโคสต่ำในเลือดได้ง่าย ยากลุ่มนี้ห้ามใช้กับสตรีมีครรภ์ เพราะยาสามารถผ่านรกได้และกระตุ้นตับอ่อนของทารกในครรภ์ให้หลั่งอินซูลิน จะเห็นว่าด้วยข้อจำกัดที่มากมายทำให้คนนิยมรักษาด้วยวิธีใหม่ๆเพิ่มมากขึ้น

❖ การรักษาโดยแพทย์ทางเลือก

การฝังเข็ม กดจุดเพื่อลดความอยากอาหาร ควบคุมปริมาณแคลอรี่ในร่างกาย หรือการใช้จิตในการรักษาโรคทางกาย เช่น การนั่งสมาธิ การใช้วิตามินและ mineral supplement ในการรักษา และการใช้ผลิตภัณฑ์ในการรักษา เช่น สมุนไพรไทย ยาหม้อ ยาลูกกลอน และสมุนไพร โดยมีการศึกษาและนำสมุนไพรมาช่วยในการลดระดับน้ำตาลในเลือด เช่น ขมิ้น ใบเตย ชงโค หอม กระเทียม เป็นต้น มีรายงานทางวิชาการเผยแพร่ออกมาอย่างมากมาย เช่น รากของ *Pueraria lobata* (Wild) ohwi ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยกระตุ้นน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ไขมัน (61) รากของ *Salacia kotalanol* สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (62) *Aspalatus linearis* (green rooibos tea) สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อมากขึ้น และช่วยกระตุ้นเซลล์ตับอ่อนในการหลั่งอินซูลิน (63) *Momordica charantia* มีส่วนช่วยในการทำให้น้ำตาลเข้าสู่เซลล์ไขมันและเซลล์กล้ามเนื้อมากขึ้น (64) สารสกัดจากราก *Aegle marmeloss* ที่ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง (65)

❖ ข้อมูลเกี่ยวกับเตยหอม

จากการรวบรวมข้อมูลในการสกัดสารเตยหอมและศึกษาคุณสมบัติของสารสำคัญในใบเตยหอม

ชื่อสามัญ Screw pine
ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pandanus amaryllifolius* Roxb.
ชื่อวงศ์ PANDANACEAE
ชื่อท้องถิ่น เตย (ทั่วไป) หวานข้าวไหม้ (ภาคกลาง)
ปาแนะวองิง (นราธิวาส)

ภาพที่ 2.2 เตยหอม
จาก ณัฐกานต์ หนูรุ่น

- **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเตยหอม**

สีเขียวสด เตยหอมเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชอบขึ้นในที่ชื้นแฉะ ขึ้นเป็นพุ่ม ลำต้นมีลักษณะเป็นข้อ ใบจะยาวเป็นกาบขึ้นมาจากลำต้น ความยาวประมาณ 1 ฟุต ใบเป็นใบเดี่ยว ปลายใบแหลม ตรงกลางใบเป็นร่อง มีรากช่วยค้ำช่วยยึดลำต้น ต้นแก่มีรากอากาศออกจากข้อ มีกลิ่นหอม

- **สรรพคุณ**

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก (2548) ให้รายละเอียดไว้ดังนี้ ส่วนที่เป็นประโยชน์ของเตยหอม คือ ราก และใบ แต่ละส่วนของเตยหอมจะให้สรรพคุณแตกต่างกันดังต่อไปนี้

ราก รากเตยใช้เป็นยาขับปัสสาวะ รักษาเบาหวาน โดยนำรากประมาณครึ่งกำมือหรือต้น 1 ต้น ต้มกับน้ำรับประทาน รักษาเบาหวาน (เนื่องจากมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด) โดยหากใช้ราก 90-120 กรัม ต้มกับน้ำรับประทานวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น มีสารที่สำคัญได้แก่ 4-hydroxybenzoic acid ซึ่งมีรายงานในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ใบเตยสดเป็นยาบำรุงหัวใจ นอกจากนั้นยังใช้รักษาโรคตับและไตอักเสบรักษาแผล

ใบเตย ใบเตยสดเป็นยาบำรุงหัวใจ ใบเตยต้มกับน้ำ ใช้รับประทานแก้หวัด แก้ไอ ดับพิษไข้ ดับร้อน และชูกำลัง ในใบเตยนั้นมีสารสำคัญจำพวกคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) สารหอมในใบเตยประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น ไลนาลิลอะซีเตท (Linalyl acetate) เบนซิลอะซีเตท (Benzyl acetate) ไลนาโลออล (Linalool) และเจอรานิออล (Geraniol) และสารที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ คือ คูมาริน (Coumarin) เอทิลวานิลลิน (Ethyl vanillin) pandamarine, geraniol และ pandamaril actone -1 (66) สารเล็คติน (lectin) สารในน้ำมันหอมระเหย เช่น ไลนาลิลอะซีเตท (Linalyl acetate) และ ไลนาโลออล(Linalool) เป็นสารกลุ่ม terpenoids มีคุณสมบัติ ช่วยลดอาการอักเสบ (67) สำหรับ Linalyl acetate จะมีคุณสมบัติเป็น antioxidant (68) เบนซิลอะซีเตท (Benzyl acetate) ใช้เป็นยาฆ่าแมลง ยาระบาย และลดความดัน และยับยั้งมะเร็ง(69) เจอรานิออล

(Geraniol) มีคุณสมบัติในการยับยั้งมะเร็งลำไส้โดยยับยั้งมะเร็งในช่วง G1/S (70) ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย(71) ใช้ในยาฆ่าแมลง ใช้เป็นส่วนผสมในยากล่อมประสาท (72) และสารที่ได้จากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ คือ คูมาริน (Coumarin) ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (73) ต้านมะเร็งต่อมลูกหมาก (74) ยับยั้งเอนไซม์ Aldose-reductase (75) ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต้อกระจกในผู้ป่วยเบาหวาน ใช้เป็นยากล่อมประสาท ยับยั้งกระบวนการอักเสบ (76) เอทิลวานิลลิน (Ethyl vanillin) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (77) ยับยั้งโรคมะเร็ง (78) ใช้สำหรับเป็นยาฆ่าแมลง (66) pandamarine มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant (79) สามารถยับยั้ง nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ในหลอดเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ สารเล็คติน (lectin) ช่วยในการแข็งตัวของเลือดช่วยเพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกัน รักษาโรคเริม (herpes simplex virus type-1) และไข้หวัดใหญ่ (influenza H_1N_1) (80) ต้านเชื้อ HIV-1 และ HIV- 2 (81)

- **งานวิจัยที่มีการศึกษาเกี่ยวกับเตยหอม**

การศึกษาส่วนของรากเตยหอมนั้นเป็นพืชที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยเพ็ญโฉม พึ่งวิชา (1998) ได้ทำการทดลองโดยนำสาร 4-hydroxybenzoic acid ซึ่งสกัดได้จากรากเตยหอมไปทดสอบกับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่า ระดับน้ำตาลในพลาสมาของหนูทดลองลดลง เนื่องจากสารนี้ไปเพิ่มการใช้กลูโคสใน peripheral blood และ ได้ทดลองทำ OGTT ในหนู 2 กลุ่ม คือ หนูกลุ่มที่ให้น้ำกลั่น (control) และหนูกลุ่มที่ให้สารสกัดจากรากเตยหอม เมื่อมีการตรวจระดับน้ำตาลในเลือด ระดับไกลโคเจนในตับ และระดับอินซูลินพบว่า ระดับน้ำตาลในเลือด ของหนูทั้ง 2 กลุ่มลดลง และระดับไกลโคเจนในตับมีการเพิ่มขึ้น (82) เนื่องจากอินซูลินไปกระตุ้นการสลายไกลโคเจนโดย glycogen synthase และยับยั้ง glycogenolysis โดยลด phosphorylase activity และ Peungvicha. et al (1996) ได้ทำการทดลองโดยให้สารสกัดแก่หนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ในปริมาณ 0.125 – 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูพบว่า สารสกัดดังกล่าวไม่มีผลใดต่อระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูปกติ แต่ทำให้ระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ลดลง เมื่อให้สารสกัด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู (83) นอกจากนี้ยังได้ทดลองทำ OGTT โดยให้สารสกัด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู พบว่าระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูปกติลดลง และเมื่อให้สารสกัด 0.5 และ 1.0 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู ก็พบว่าระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ลดลงเช่นกัน แต่เมื่อนำรากจากเตยหอม

มาศึกษาด้านพิษวิทยากับหนูขาวโดยการฉีดเข้าหน้าท้อง พบว่าระดับเอนไซม์ของตับคือ Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine transaminase (ALT) สูงขึ้น แสดงถึงการเกิดพิษต่อตับ และเมื่อตรวจเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆของหนูขาว เช่น ตับ ไต พบว่ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้นได้แก่ การคั่งของน้ำ การมีเลือดออก ซึ่งเป็นผลมาจากมีสาร coumarin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดอยู่ในสารสกัด

การศึกษาส่วนของใบนั้นมีฤทธิ์เป็นสาร antioxidant มีฤทธิ์เป็นยาแก้ปวดหัว รูมาตอยด์ แก้โรคลมชัก และแก้อาการเจ็บคอ ในใบนั้นพบสารเล็คติน (lectin) ที่สกัดด้วยน้ำเกลือช่วยเพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกัน รักษาโรคเริม (herpes simplex virus type-1) และไข้หวัดใหญ่ (influenza H_1N_1) อัญชลี เฉียบฉลาด (2550) ศึกษาในเบื้องต้นถึงในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ของสารสกัดจากเตยหอมและมะระขี้นก พบว่า เมื่อศึกษาผลของใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) และ Post-prandial ในคนจำนวน 9 คน พบว่าใบเตยหอมสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p= 0.008 นอกจากนี้ชาเตยหอมไม่ทำให้การทำงานของตับของอาสาสมัครผิดปกติ เมื่อดื่มติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงสารประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของเตยหอม

ชื่อสาร	**ส่วนที่พบ**	**ประโยชน์**
4-hydroxybenzoic acid (9)	ราก	รักษาโรคเบาหวาน
Lectin (80)	ใบ	เพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกัน รักษาโรคเริม รักษาไข้หวัดใหญ่
Flavonoid, triterpenoid (84)	ใบ	สารต้านอนุมูลอิสระ
carotenoids, tocopherols tocotrienols (85, 86)	ใบ	สารต้านอนุมูลอิสระ
Quercetin (87)	ใบ	สารต้านอนุมูลอิสระ
คลอโรฟิลล์ (88, 89)	ใบ	สารต้านอนุมูลอิสระ
กลุ่ม alkaloid (90)	ใบ	ไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

❖ **การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร**

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยการสกัดด้วยวิธีเบื้องต้นจะได้สารหลายชนิดหรือสารสกัดแบบหยาบ (crude extract) เป็นการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัด สารสกัดที่ได้มามีองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically active constituents) ที่เรียกว่า สารสำคัญ (active constituent) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) หรือเรียกว่า สารเฉื่อย (inert constituent) แตกต่างไปตามสภาวะของสมุนไพรหรือสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดสมุนไพร คือ เพื่อแยกสารที่สำคัญภายในสมุนไพรออกมาและให้ได้สารสำคัญในปริมาณเข้มข้น หรือเพื่อลดขนาดของสมุนไพรให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (91)

- **น้ำยาหรือตัวทำละลาย**

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัด ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ หรือสารผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้อาจใช้กรดหรือด่างเติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อให้ปรับความเป็นกรดหรือด่างให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

น้ำ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก และปลอดภัยที่จะนำไปทดสอบกับสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เพาะเลี้ยง แต่มีข้อเสียคือสามารถละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ หากเติมกรดลงไปในน้ำจะได้สารสกัดที่เป็นสารประกอบแอลคาลอยด์ สารที่ได้จากน้ำส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล แป้ง และสารที่มีขั้ว

แอลกอฮอล์ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ โดยมีความจำเพาะในการละลายน้ำมากกว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นสามารถเป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่าย แต่ราคาแพงกว่าน้ำ

น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixculture) เป็นน้ำยาสกัดที่ใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้น้ำยาผสมแอกอฮอล์ยังช่วยป้องกันการแยกชั้นของสารต่างๆในเรื่องสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้น้ำยาอย่างเดียวกันในการสกัด นอกจากน้ำยาสกัด การสกัดด้วยน้ำยาสมุนไพรยังสามารถใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮกเซน (hexane) และ ปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ (petroleum ether) เพื่อสกัดสารไขมันออกไปก่อนที่จะสกัดในขั้นตอนต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้นิยมใช้สารสกัดที่ไม่มีขั้ว (non polar componant) เช่น ไขมัน (lipid) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีนอย (terpeniods)

คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และ อีเทอร์ (ether) จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non polar componant) ไปจนถึงมีขั้วปานกลาง

เมทานอล (methanol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญที่มีขั้ว (polar active constituent) เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์มากกว่า เพราะราคาถูกกว่าและมีความเป็นพิษน้อยกว่า

- **การเลือกน้ำยาสกัด**

น้ำยาที่นำมาสกัดควรมีคุณสมบัติดังนี้ มีความสามารถในการละลายสารออกมามากที่สุดและไม่ละลายองค์ประกอบอื่นๆ (Selectivity) เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ อาจมีโครงสร้างซับซ้อนมากน้อยต่างกัน ดังนั้นควรพิจารณาสารสำคัญที่ต้องการสกัดนอกเหนือจากสภาพขั้ว คือ สารสำคัญต้องสามารถละลายในตัวทำละลายที่นำมาสกัดได้ น้ำยาสกัดต้องมีความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป และศึกษาถึงสภาพสมุนไพร เช่น สารสกัดที่มานั้นเป็นสารสกัดส่วนของเมล็ด ซึ่งมีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันออกไปก่อน โดยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลี่ยมอีเทอร์ แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อน

- **วิธีการสกัด**

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีสกัดสารโดยการหมักสมุนไพรกับน้ำยาหมักจนกระทั้งเนื้อสมุนไพรอ่อนนุ่มและน้ำยาสกัดสามารถซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรตัวนั้นๆออกมาได้วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างที่ไม่แข็งมากนัก เช่น ใบ ดอก มีข้อดีคือใช้น้ำยาสกัดน้อย และประหยัด และเนื่องจากไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับสารสกัดที่ไม่ทนความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้ช้าและใช้เวลานาน วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดที่ได้สารออกมาไม่สมบูรณ์โดยสารที่ออกมาจะหยุดออกมาเมื่อมีภาวะที่สมดุลของสารสกัดและน้ำยาสกัด (92)

เพอร์โคเลชั่น (Percolation) เป็นวิธีการสกัดโดยแช่น้ำยาสกัดและสมุนไพรไว้ 24 ชั่วโมง และปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านในความเร็วที่พอเหมาะละลายองค์ประกอบสารออกมา โดยใช้เครื่องมือ เพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่มีข้อเสียคือเปลืองน้ำยาสกัดและใช้เวลาในการสกัดนาน (93)

การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) เป็นการสกัดสมุนไพรแบบเดียวกับเพอร์โคเลชั่น แต่ต้องใช้ความร้อนช่วยในการสกัดและใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (solexhlet extraction) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องเหมาะสำหรับการสกัดสารที่ทนความร้อนและใช้สารสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสีย คือไม่เหมาะที่จะใช้องค์ประกอบที่ไม่ทนความร้อนและน้ำยาสกัดไม่ควรเป็นสารผสมเพราะจะเกิดการแยกชั้นของตัวทำละลายเพราะมีจุดเดือดที่แตกต่างกันทำให้น้ำยาสกัดมีสัดส่วนในการสกัดที่แตกต่างไปจากเดิม (94)

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil) มีมากมายหลายวิธีขึ้นกับสมุนไพรที่ใช้ศึกษา (95)

การกลั่นโดยใช้น้ำ ใช้กับสมุนไพรที่แห้งไม่ถูกทำละลายเมื่อต้ม เนื่องจากพืชที่นำมากลั่นจะแช่อยู่ในน้ำเดือดตลอดเวลาการกลั่น

การกลั่นโดยการใช้น้ำและไอน้ำ ใช้กับพืชที่อบแห้ง ซึ่งอาจทำลายได้ง่ายเมื่อต้ม การกลั่นวิธีนี้จะสะดวกที่สุดและใช้กันอย่างแพร่หลาย

การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ วิธีนี้เป็นการผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่ต้องมีการหมัก จัดเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย

การสกัดโดยการบีบหรืออัด (Expression) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่สามารถกลั่นได้และถูกทำลายได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน การบีบที่นิยมใช้คือ วิธีเอกควิเอล คือใช้ของแหลมขูดเปลือกด้านนอกของสมุนไพรเพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออก และเก็บน้ำมัน

วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (Enfleurage) ใช้กับน้ำมันหอมของกลีบดอกไม้ต่างๆ โดยวิธีนี้จะใช้ไขมันเป็นตัวดูดซับสารและจึงเอามาสกัดสารออกด้วยแอลกอฮอล์ (96)

การสกัดด้วยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ ปีโตเลียมอีเทอร์ แอซีโทน เมทานอล แอลกอฮอล์ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ทำให้สารที่ได้มีโครงสร้างของสารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารที่สำคัญออกมาต้องคำนึงถึงหลายปัจจัย

ธรรมชาติของพืชสมุนไพร ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ถ้าเป็นดอกหรือใบที่มีความอ่อนอาจจะสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชั่น หากเป็นสมุนไพรที่แข็งและเหนียว เช่น เปลือก ราก หรือเนื้อไม้ควรสกัดด้วยวิธีเพอร์โคเลชั่นหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่าย นิยมใช้ตัวดูดซับแต่ถ้าละลายได้น้อยจำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชั่นหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชั่น

คุณค่าในการสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด ขึ้นอยู่กับเราจะนำสารสกัดไปใช้เพื่ออะไร นอกจากนี้ยังควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมไว้ ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

ความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจางการใช้วิธีวิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่หากต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชั่นหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

วิธีการสกัดอย่างเป็นขั้นตอน ทำได้หลายแบบ คือ

การสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยสารสกัดแอลกอฮอล์หรือ เมทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากแอลกอฮอล์ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นก่อนที่จะนำมาพาทิชันกับตัวทำละลายที่มีขั้วต่างๆกันโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ไปถึงตัวทำละลายมีขั้ว เช่น เฮกเซน เอทิลแอซีเทต บิวทานอล

การสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นกรดและด่างของสาร โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นจึงแยกกลุ่มโดยพาร์ทิชั่นกับกรดและด่าง หรือพาร์ทิชั่นกับกรดและด่างก่อน แล้วจึงสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

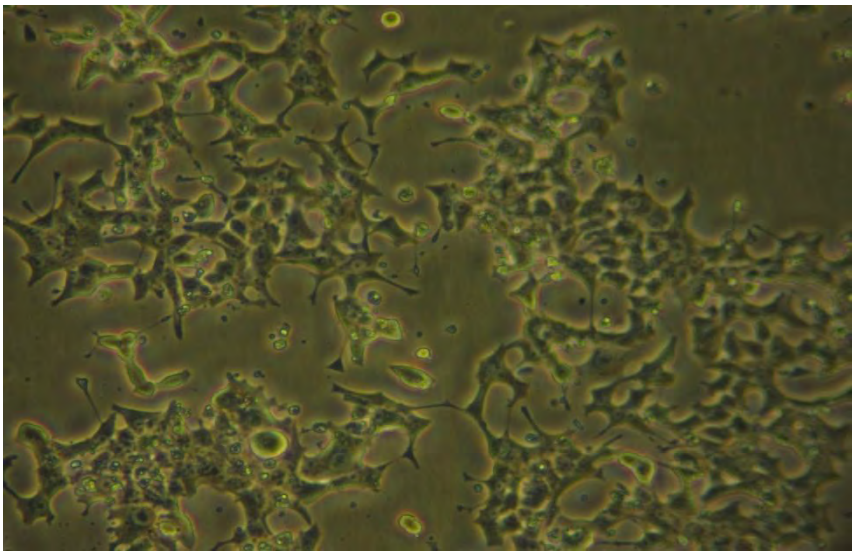
บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1.กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

1.1.1 เซลล์ตับอ่อนหนู (RIN-m5F) CRL-11605 นำมาจาก ATCC เป็นเซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิด beta cell ที่พัฒนามาจาก clone เซลล์ RIN-m ของหนู

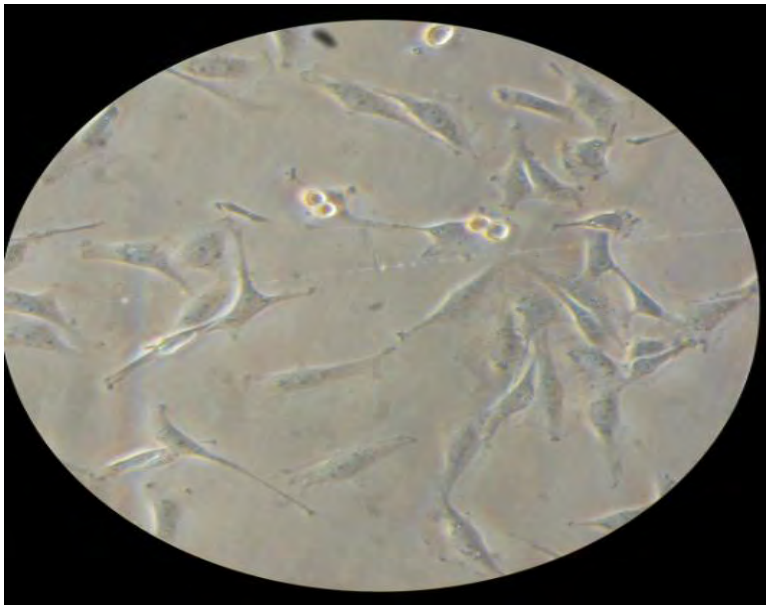
อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ RIN-m5F คือ RPMI 1640 medium (Hyclone) ที่มี fetal bovine serum (Hyclone) อยู่ 10 เปอร์เซนต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะที่ใช้ คือ Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 µg/ml (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (97)



ภาพที่ 3.1 เซลล์ตับอ่อนหนู RIN-m5F (Insulinoma cell line)
ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscopy) กำลังขยาย 40 เท่า

1.1.2 เซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทิภา ปุรินทราภิบาล จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) (Hyclone) ที่มี fetal bovine serum (Hyclone) อยู่ 10 เปอร์เซนต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 µg/ml (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (98, 99)



ภาพที่ 3.2 เซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)

ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscopy) กำลังขยาย 40 เท่า

2. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 4 หมวดคือ

I. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพร

Ethanol	Merck, เยอรมนี
Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products
สารดูดความชื้น	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ไทย

II. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Folin Ciocalteu's phenol reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Gallic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium carbonate	Merck, เยอรมนี

III. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณสาร flavonoids

Aluminium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium acetate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมนี

IV. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Ascorbic acid	Merck, เยอรมนี
DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Merck, เยอรมนี

V. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ABTS reagent	Merck, เยอรมนี
Potassium persulfate	Merck, เยอรมนี

VI. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดเตยหอมที่มีผลต่อตรวจวัดการทำงานของเซลล์

Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM: with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose Without Sodium Pyruvate)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Peniciliin/10,000 µg/ml Streptomycin)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS: without calcium without magnesium)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
RPMI 1640 Medium	HyClone, สหรัฐอเมริกา
3-(4,5-dimethylthianisol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Calbiochem, เยอรมนี
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

VII. สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ α –Glucosidase

Rat intestinal acetone powder	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium Chloride	Merck, เยอรมนี
Sodium phosphate monobasic anhydrous	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium phosphate dibasic anhydrous	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
PGO enzyme	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
O-dianisidine dihydrochloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Maltose	Merck, เยอรมนี
Sucrose	Merck, เยอรมนี

VIII. การทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน

Krebs–Ringer bicarbonate buffer	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Mercodia High Range Rat Insulin ELISA Kit (10-1145-01)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

IX. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)

Adenosine 5'-triphosphate disodium salt	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Diaphorase	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
G6PDH	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Hexokinase	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Insulin solution	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Resazurin sodium salt	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Triethanolamine hydrochloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
2-Deoxy-d-glucose	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

X. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
Cell Culture Flask (25, 75 cm^2)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO_2 incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Larminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Microcentrifuge tube (0.2 และ 0.6 ml)	Axigen scientific, สหรัฐอเมริกา

Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Biologix Research company, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10, 200, 1000 µl)	Sorenson™ BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Sonicator	Soniclean, สหรัฐอเมริกา
Sterile aerosol pipette tip (10, 200, 1000 µl)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
Vortex Mixer (FINE VORTEX)	FINEPCR, เกาหลีใต้
Water Bath	Memmert, เยอรมนี
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C ULT Deep Freezer	IlShin Lab, เกาหลีใต้
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสำรวจและรวบรวมความรู้เกี่ยวกับเตยหอม

ใบเตยหอมที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม เตยหอมที่นำมาศึกษาเป็นเตยหอมที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Pandanus amaryllifolius* Roxb. อยู่ในวงศ์ PANDANACEAE มีลำดับเลขตัวอย่างคือ BCU 013409 ผู้ที่พิสูจน์ชนิดเตยหอมที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บตัวอย่างของเตยหอมในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การสกัดสารสำคัญจากใบเตยหอม

เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของใบเตยหอมโดยการสกัดจะใช้การเทียบเคียงกับ การปรุงยาไทย โดยใช้วิธีต้ม วิธีชง วิธีคั้น และวิธีหมักหรือวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) โดยวิธีการสกัดแบ่งออกเป็น 4 วิธี

1.สกัดด้วยน้ำกลั่น 90 องศาเซลเซียส โดยใช้ใบเตยหอมสด (เทียบเคียงกับการต้มน้ำใบเตยหอม) เรียกแทนด้วย Method 1

2.สกัดด้วยน้ำกลั่น 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ใบเตยหอมสด (เทียบเคียงกับการคั้นน้ำใบเตยหอม) เรียกแทนด้วย Method 2

3.สกัดด้วยน้ำกลั่น 90 องศาเซลเซียส โดยใช้ใบเตยตากแห้ง (เทียบเคียงกับการชงชาใบเตยหอม) เรียกแทนด้วย Method 3

4.สกัดด้วยเอทานอล 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ใบเตยหอมตากแห้ง (วิธีมาเซอเรชัน Maceration) เรียกแทนด้วย Method 4

การสกัดเริ่มจากการนำใบเตยหอมมาล้างให้สะอาดจากนั้นผึ่งให้แห้ง นำมาตัดส่วนรากทิ้งโดยคัดเลือกใบส่วนที่เป็นสีเขียว นำมาหั่นให้ได้ขนาด 1-1.5 เซนติเมตร แบ่งส่วนหนึ่งนำไปอบให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน เมื่อใบเตยแห้งนำมาเก็บโดยการใช้สารดูดความชื้น

ภาพที่ 3.3 แสดงใบเตยหอมที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 **การสกัดด้วยน้ำ**

ชั่งใบเตยหอมทั้งสดหรือแห้งในอัตราส่วนใบเตยหอม:น้ำกลั่น คือ 1:10 คนให้เข้ากันในกรณีสกัดด้วยน้ำกลั่น 90 องศาเซลเซียส แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที กรณีสกัดด้วยน้ำกลั่น 25 องศาเซลเซียส แช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที เช่นเดียวกันก่อนนำมาคั้นน้ำ โดยขณะที่นำใบเตยมาแช่ในตัวทำละลาย ปิดฝาภาชนะป้องกันการระเหยออกมา และในขั้นตอนการสกัดสาร ทำในที่ที่มีแสงสว่างน้อย เพื่อหลีกเลี่ยงการนำสารสกัดไปสัมผัสกับแสง จากนั้นนำน้ำที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman Limited) น้ำที่ได้นำไปใส่ขวดที่ห่อด้วยกระดาษป้องกันแสงแล้วปิดพาราฟิล์มนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่นำไปทำ Lyophilize ประมาณ 3-4 วัน ผงที่ได้จากการทำ Lyophilize ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้และควรหลีกเลี่ยงความชื้น

3.2.2 **การสกัดด้วยเอทานอลโดยวิธีมาเซอเรชัน** (Maceration)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการหมักกับตัวทำละลายจนกระทั่งตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบออกมา โดยงานวิจัยนี้ได้นำใบเตยแห้งไปหมักกับตัวทำละลาย (ในอัตราส่วนใบเตยแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร) เมื่อผสมสารเข้ากันแล้วปิดปากขวดแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แรงเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำกากที่เหลือสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม แล้วรวมสารสกัดที่ได้เข้าด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธี evaporation ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ออกมา เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 3.4 แสดงวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบเตยหอม

3.3 การวัดสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และความสามารถต้านออกซิเดชันของใบเตย

3.3.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพรที่ต้องการศึกษาโดยอ้างอิงจากวิธีของ Chang et al. (2002) (100) โดยหลักการคือการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของสารประกอบฟีนอล โดยสารละลาย Folin-Ciocalteau ในสภาวะเป็นด่างให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA Reader ติดตามผลการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาของไอออน Mo (VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้อิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วจะเปลี่ยนเป็น Mo(V) ซึ่งเป็นสีน้ำเงินดังปฏิกิริยา

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \longrightarrow (\text{phenol-}MoW_{11}O_{40})^{-4}$$

$$\text{Mo(VI) (yellow)} + e^- \longrightarrow \text{Mo(V) (blue)}$$

การทดลองจะต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 และ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิค 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียม Sodium carbonate (Na_2CO_3) 1 โมลาร์ โดยชั่ง Na_2CO_3 5.2995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนออกก่อนใช้ นำ Sodium carbonate (Na_2CO_3) 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วนจะได้ 10 เปอร์เซ็นต์ Sodium carbonate (Na_2CO_3) และเตรียมสารละลายของสารสกัดจากใบเตย โดยนำสารจากใบเตยมา 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ให้ ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองและวัดด้วยเครื่อง ELISA Reader ทำตามวิธี Folin Ciocalteu's colorimetric ดังนี้

ตารางที่ 3.1แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Reagents	Blank (µl)	Standard (µl)	Sample (µl)
สารสกัด	-	-	50
สารละลายกรดแกลลิค	-	50	-
น้ำกลั่นปราศจากอิออน	50	-	-
สารละลาย working Folin Ciocalteu's Phenol Reagent	50	50	50
สารละลาย Na_2CO_3	50	50	50
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ 750 นาโนเมตรเทียบกับ blank			

จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคซึ่งเป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิค แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่างใบเตยหอม 1 กรัม (mg GAE / g sample)

3.3.2 การหาปริมาณสาร flavonoids ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay (100)

เป็นเทคนิควัดสาร flavonoids โดย Aluminium chloride จะทำปฏิกิริยากับสาร flavonoids เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีสีชมพู สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ขั้นแรกเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 0, 25, 50 และ100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง quercetin 0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียม Aluminium chloride 1 โมลาร์โดยชั่งสาร Aluminium chloride 6.667 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนออกก่อนใช้ นำ Aluminium chloride 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วนจะได้ 10 เปอร์เซ็นต์ Aluminium chloride ขั้นตอนสุดท้ายเตรียมสารสกัดจากใบเตย โดยนำสารสกัดจากเตยหอมมา 10 มิลลิกรัมละลายในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองและวัดค่าด้วยเครื่อง ELISA Reader

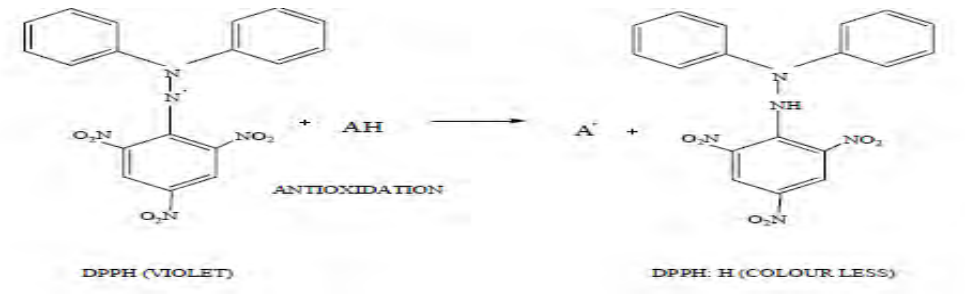
ตารางที่ 3.2 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดปริมาณสาร flavonoids

Reagents	สร้างกราฟมาตรฐาน		วัดปริมาณ flavonoids	
	Blank (µl)	Standard (µl)	Blank (µl)	Flavonoid (µl)
สารสกัด	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐาน quercetin	50	50	-	-
95 % ethanol	150	150	150	150
10 % Aluminum Chloride	-	10	-	10
80 % ethanol	-	-	10	-
1 M Sodium acetate	10	10	10	10
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่ 415 นาโนเมตร เทียบกับ blank				

จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin เป็นตัวแทนของสาร flavonoids แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่าง ใบเตยหอม 1 กรัม (mg QE / g sample)

3.3.3 **การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี** DPPH assay (101)

เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) โดยเมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรเป็นสารละลายจะมีสีม่วงใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพราะเมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากพืชหรือกรดแอสคอร์บิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ติดตามผลการทดลองโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.5 แสดงถึงความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ (101)

ละลายสารมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ใช้เป็นสารมาตรฐานแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายตัวอย่างพืชให้ได้ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.25, 1.5, 1.75 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.3 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Reagents	Blank (µl)	Control (µl)	Standard (µl)	Sample (µl)
สารสกัด	-	-	-	50
สารละลาย Ascorbic acid	-	-	50	-
สารละลายมาตรฐาน DPPH	50	50	50	50
สารละลาย absolute ethanol	25	-	-	-
น้ำกลั่นปราศจากอิออน	25	-	-	-
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ 517 นาโนเมตร เทียบกับ blank				

คำนวณ % Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

สมการ % Radical Scavenging = $[(A_B - A_A)/ A_B] \times 100$

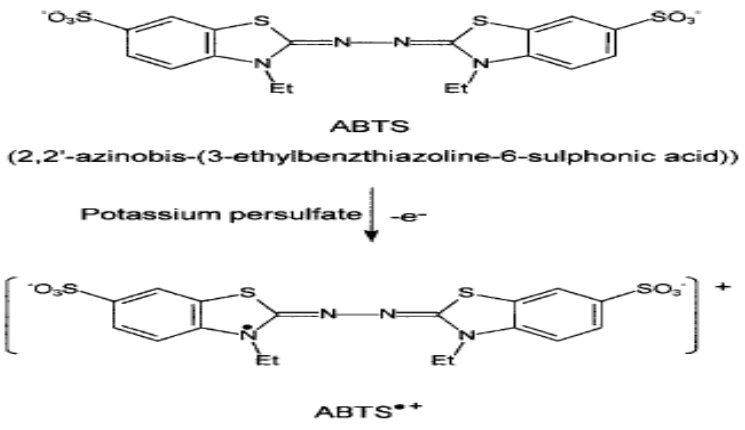
เมื่อ A_A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_B = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในตัวอย่างใบเตยหอม 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant)

3.3.4 **หาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ** ABTS

วิธี ABTS เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหลักการคล้ายกับวิธี DPPH คือ สร้างอนุมูลอิสระที่มีสีขึ้น โดยสร้างอนุมูลอิสระจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์ ด้วย oxidizing agent จะเกิด ABTS free radical (ABTS•+) สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการนำมาทดสอบจะขจัด ABTS•+ ที่เกิดขึ้นแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยหากค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากหรือสีของสารละลายจางลงมากจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (102)



ภาพที่ 3.6 แสดงถึงสูตรโครงสร้างของ ABTS ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (รูปบน) และเป็นอนุมูลอิสระ (รูปล่าง) (103)

โดยเตรียม ABTS reagent (2,2-azino-bis(3-ethybenzene-thiazoline-6-sulfonic acid),diamonium salt) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 10 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารละลาย Potassium persulfate 2.45 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 12 มิลลิลิตร อัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตรเก็บในที่มืดและเย็นเป็นเวลา 16-18 ชั่งโมง และนำไปเจือจางในเอทานอลด้วยอัตราส่วน 5 มิลลิลิตร:100 มิลลิลิตร ของเอทานอล ก่อนนำมาใช้เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สุดท้ายเตรียมสารละลายตัวอย่างพืชให้ได้ ความเข้มข้นต่างๆ คือ1,1.25,1.5,1.75 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

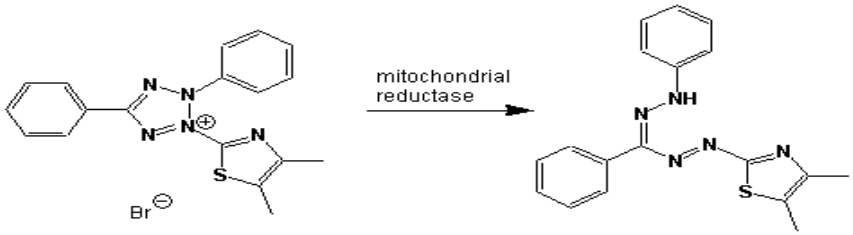
ตารางที่ 3.4 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

Reagents	Blank (µl)	Control (µl)	Standard (µl)	Sample (µl)
สารสกัด	-	-	-	50
สารละลายกรดแอสคอร์บิก	-	-	50	-
สารละลายมาตรฐาน ABTS	50	50	50	50
สารละลาย absolute ethanol	25	-	-	-
น้ำกลันปราศจากอิออน	25	-	-	-
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ 734 นาโนเมตร เทียบกับ blank				

แสดงผลเป็น (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) / 1 g sample)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคเบาหวานของสารสกัดจากใบเตยหอมด้วยการตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยวัดเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการวัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) ซึ่งวัดปฏิกิริยารีดักชั่นของสารสีเหลือง MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) ซึ่งถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ NADPH ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนให้เป็นตะกอนของ formazan สีม่วง ซึ่งการละลายตะกอน formazan สามารถละลายด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น isopropanol, DMSO หรืออาจใช้ sodium dodecyl sulfate ที่เจือจางด้วยกรด hydrochloric จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500-600 นาโนเมตร (104)



tetrazole formazan

ภาพที่ 3.7 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay (105)

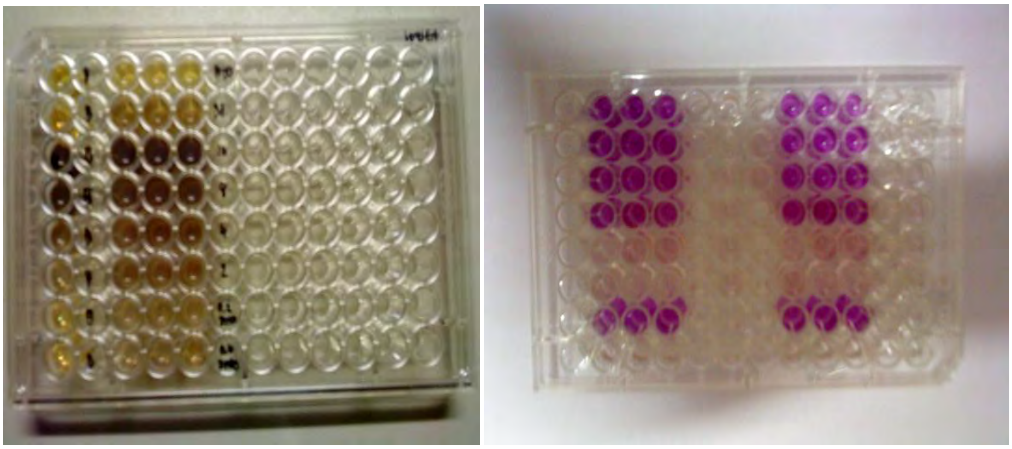
3.4.1 การตรวจวัดการทำงานของเซลล์ RINm5Fและ L6 ด้วยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ RINm5F และ L6 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1*10^4$ เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารดังนี้ 1.) สารสกัดจากเตยหอมทั้ง 4 ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) DMSO ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.) DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (positive control) 4.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายทุกหลุมการทดสอบเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากใบเตยหอมคือ นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มาทำให้เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 และ 1.953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สารสกัดจะถูกเจือจาง

ลงอีก 10 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในสารสกัดทุกความเข้มข้นที่ใช้จะไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด และในการทดสอบได้เปรียบเทียบ DMSO ความเข้มข้นที่ใช้กับเซลล์เพื่อแสดงให้เห็นว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หลังจากครบเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5 ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 20 ไมโครลิตร นำกลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งทั้งหมด เติม DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมดเกิดเห็นสีม่วงที่เนื้อเดียวกัน ปั่นจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จานใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader คำนวณหาเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) และค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เซลล์ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) จาก Logarithmic graph สูตรคำนวณ % cell viability มีดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{treated cell-blank})*100}{(\text{untreated cell} - \text{blank})}$$

นำค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ไปทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนและทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่อไป



(a) (b)

ภาพที่ 3.8 (a) จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมกำหนดเมื่อเติมสารละลาย MTT
(b) จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมกำหนดเมื่อเติม DMSO

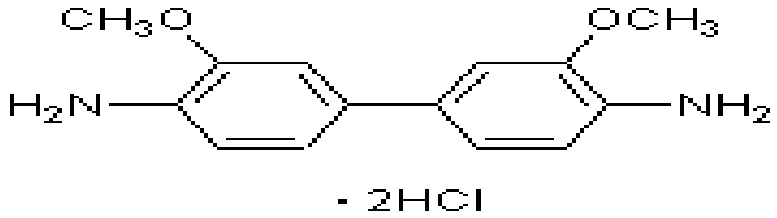
3.5 การศึกษากลไกของใบเตยหอมในการลดระดับน้ำตาลในเลือด

3.5.1 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ α –Glucosidase

หลักการของสารละลายน้ำตาลมอลโตสและซูโครสเมื่อถูกเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดสย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส ตรวจหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายเอนไซม์ peroxidase-glucose oxidase (PGO enzyme) ซึ่งมี O-dianisidine dihydrochloride เป็นตัวช่วยให้เกิดสี ความเข้มของสีจะขึ้นกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หากมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นในปริมาณมาก สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ซึ่งนำไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม จะสามารถหาค่า % Enzyme inhibition ได้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็น coupled enzymatic reaction (106)

$$\text{Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{- glucosidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{O-dianisidine} - HCl \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{oxidized O-dianisidine}$$



ภาพที่ 3.9 แสดงถึงโครงสร้างของสาร O-dianisidine dihydrochloride (107)

เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดส (มอลเตส, ซูเครส) จากลำไส้เล็กของหนูที่ผ่านการสกัด (rat intestinal acetone powder) โดยนำมาชั่งจำนวน 100 มิลลิกรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเตรียมสารละลาย phosphate buffer pH 6.9 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 59 มิลลิลิตร (Na_2HPO_4 1.56 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร) นำมาผสมกับ $NaHPO_4$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 41 มิลลิลิตร ($NaHPO_4$ 1.78 กรัม ละลายด้วยน้ำ กลั่นปราศจากอิออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 37 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งมอลโตส 0.13 กรัม ละลายด้วย phosphate buffer 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งซูโครส 0.41 กรัม ละลายด้วย phosphate buffer 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมสารสกัดจากใบเตย ให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัม

ละลายใน DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย PGO enzyme โดยนำ PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร และชั่ง O-dianisidine dihydrochloride 50 มิลลิกรัม และละลายน้ำ 20 มิลลิลิตร ปิเปตมา 1.6 มิลลิลิตร นำไปผสมกับ PGO enzyme ที่เตรียมไว้ เก็บให้พ้นแสงและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทดลองโดยผสมสารให้เข้ากันตามตารางด้านล่างนำไปอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับเอนไซม์มอลเตสและเป็นเวลา 60 นาที สำหรับเอนไซม์ซูเครส หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารจากหลอดมา 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นปิเปต PGO enzyme 1 มิลลิลิตร ลงไป นำไปอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาค่า % enzyme inhibition จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดส (มอลเตส, ซูเครส) ใช้โปรแกรม SPSS (version 17) โดย One Way ANOVA กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

$$\% \text{ enzyme inhibition} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสง control-ค่าการดูดกลืนแสง test)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง control}}$$

ตารางที่ 3.5 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส

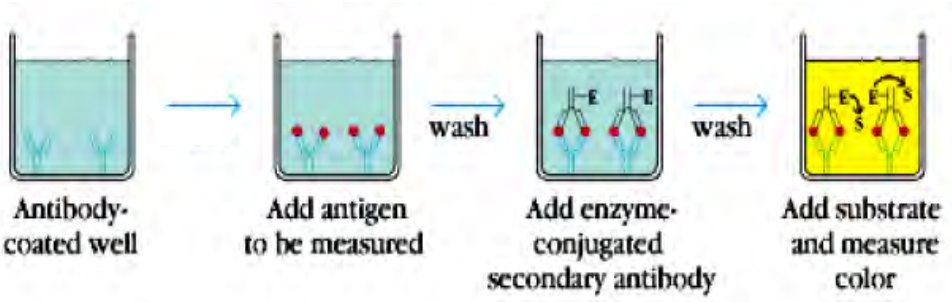
Reagents	Control (µl)	Test (µl)
มอลโตส 37 mM	70	70
ตัวยับยั้ง (สารสกัดเตยหอม)	-	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10
DMSO	10	-
เอนไซม์ α –Glucosidase	10	10

ตารางที่ 3.6 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

Reagents	Control (µl)	Test (µl)
ซูโครส 120 mM	50	50
ตัวยับยั้ง (สารสกัดเตยหอม)	-	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10
DMSO	10	-
เอนไซม์ α –Glucosidase	40	40

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน

Mercodia High Range Rat Insulin ELISA Kit (10-1145-01) เป็นชุดทดสอบอินซูลิน ใช้หลักการ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดที่เมื่อรวมกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีจะไม่ทำให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีนั้นเสียคุณสมบัติไป เมื่อมีการใส่ substrate ลงไปย่อยจะเกิดการเปลี่ยนสีให้เห็น และยังอาศัยหลักการของ immunoassay ในการหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเกาะบนของแข็ง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์จึงวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA Reader โดยชุดการทดลองนี้จะเคลือบแอนติบอดีบริเวณก้นหลุม (capture antibody) ซึ่งเป็น Anti-insulin antibody เมื่อเติมสารตัวอย่างลงไปในหลุมทดลองจะเกิดการจับกันอย่างหลวมๆระหว่าง Anti-insulin antibody และ insulin ในสารตัวอย่างนั้น จากนั้นเติม antibody ตัวที่ 2 ที่ติดฉลากด้วย enzyme peroxidase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ขึ้น จากนั้นล้างสารส่วนเกินออก ใส่ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ซึ่งเป็น substrate เพื่อนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น A_{450} นาโนเมตร โดยค่าที่วัด absorbance ที่ตรวจวัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของอินซูลินที่มีอยู่ในตัวอย่าง



ภาพที่ 3.10 แสดงถึงหลักการทำงาน Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (108)

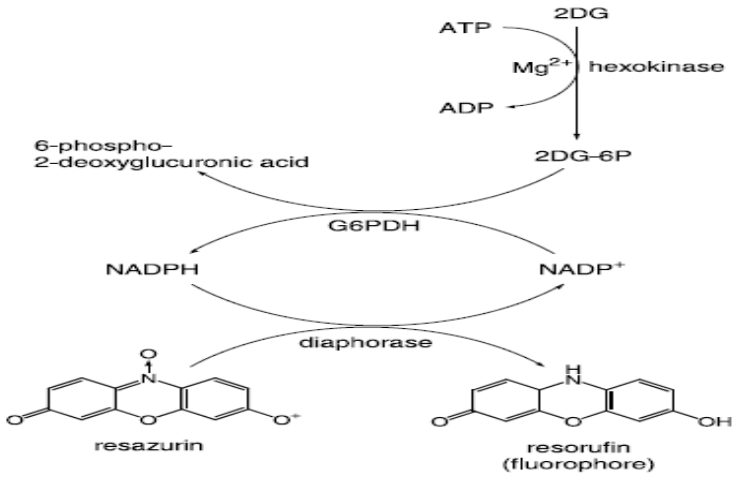
เพาะเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $5*10^5$ เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์และเติมน้ำตาล15 มิลลิโมลาร์ (109) ไว้ด้วย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย Krebs–Ringer bicarbonate buffer 3 ครั้ง และตามด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum แต่มีน้ำตาล15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง และนำเซลล์เข้าไปในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาล้างเซลล์ด้วย Krebs–Ringer bicarbonate buffer 3 ครั้ง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารดังนี้ 1.) สารสกัดจากเตยหอมทั้ง 4 ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum โดยคัดเลือกจากค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ 2.) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Krebs–Ringer bicarbonate buffer แทนสารสกัด (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายทุกหลุมการทดสอบเท่ากับ 2 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์มาปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณอินซูลินที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังตาราง จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับอินซูลินโดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17) โดย paired T-test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3.7 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน (110)

Reagents	Calibator / Control/Test(µl)
Calibrators หรือ น้ำส่วนใสที่ได้จากการ treat เซลล์	10
Enzyme conjugate	50
เขย่าเบาๆให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 18-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	
ล้างด้วย Wash solution 6 ครั้ง	200
ใส่ substrate TMB	200
Incubate 15 นาที	
ใส่ stop solution เขย่าเบาๆให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที	
นำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA Reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)

เป็นเทคนิคการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยระดับน้ำตาลที่เข้าสู่เซลล์จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้ โดยเมื่อทำการทดสอบกับเซลล์ด้วย 2-deoxyglucose (2DG) ในเซลล์จะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ 2-deoxyglucose ให้อยู่ในรูป 2-deoxyglucose-6 phosphate (2DG-6P) ในปฏิกิริยานี้มี hexokinase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้ ATP ช่วยในการเกิดปฏิกิริยาด้วย 2-deoxyglucose phosphate ที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา oxidation ต่อไปโดย glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) ที่ใส่ลงไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพร้อมกับ NADPH ที่เพิ่มขึ้นซึ่ง NADPH ที่เกิดขึ้นถูกขยายสัญญาณด้วย resazurin-diaphorase ที่ใส่ลงไปเมื่อ resazurin-diaphorase เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็น resorufin ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (fluorophoro) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (98)



รูปที่ 3.11 แสดงถึงการเกิดแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (98)

เพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $4*10^3$ เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นชนิด DMEM ที่มี horse serum อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน (เพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อหนูเปลี่ยนรูปร่างเป็น myotubes) เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย Krebs–Ringer bicarbonate buffer 3 ครั้ง และใส่ 2-deoxyglucose (2DG) และ Krebs–Ringer bicarbonate buffer ที่มีความเข้มข้นที่ต้องการลงในหลุมหลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทำ standard และนำเซลล์เข้าไปในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที (pretreated) ครบเวลาล้างเซลล์ด้วย Krebs–Ringer bicarbonate buffer 3 ครั้ง ใส่ cocktail ซึ่งประกอบด้วย (TEA buffer pH 8.1) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์, KCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, BSA 0.02 เปอร์เซ็นต์, ATP ความเข้มข้น 670 มิลลิโมลาร์, NADP+ ความเข้มข้น 0.12 ไมโครโมลาร์, resazurin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์, hexokinase ความเข้มข้น 5.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, 16 units/ml G6PDH ความเข้มข้น 16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ diaphorase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรรวมแล้วหลุมละ 150 ไมโครลิตร ซึ่งสารละลายรวมนี้มีสารที่สามารถเกิดแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เมื่อมีการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นำเซลล์ที่ใส่ cocktail เข้าไปในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ใส่ NaOH เพื่อไปทำลาย NAD(P)H, $NAD(P)^+$ และเอนไซม์ภายในเซลล์จากนั้นนำเซลล์ไปเข้าตู้ที่มีอุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที และ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที ใส่กรด HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เป็นกลาง สุดท้ายใส่ TEA buffer (pH 8.1) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรหลุม

ละ 25 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร อีกส่วนหนึ่งนำมาทดสอบกับสารดังนี้ 1.)สารสกัดจากเตยหอมทั้ง 4 ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คัดเลือกจากค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) Insulin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (positive control) 3.) ยา metformin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (positive control) 4.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายทุกหลุมการทดสอบเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาที่กำหนดครบเวลาล้างเซลล์ด้วย Krebs–Ringer bicarbonate buffer 3 ครั้ง และใส่สารทดสอบที่กล่าวไปแล้วอีกครั้งหนึ่งนำเซลล์กลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใส่ cocktail หลุมละ 150 ไมโครลิตร นำเซลล์เข้าไปในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ใส่ NaOH เพื่อไปทำลาย NAD(P)H, $NAD(P)^+$ และเอนไซม์ภายในเซลล์จากนั้นนำเซลล์ไปเข้าตู้ที่มีอุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียสและ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที ใส่กรด HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เป็นกลาง สุดท้ายใส่ TEA buffer (pH 8.1) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรหลุมละ 25 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader (99) จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับกลูโคสในเซลล์โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17) โดย One Way ANOVA กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

3.6 เพื่อศึกษาผลของใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในคน (111)

3.6.1 การเตรียมผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยเพื่อเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ลักษณะของผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่นำผลมาใช้ในงานวิจัยคือ ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติจำนวน 30 คน (เพศชาย 15 คน เพศหญิง 15 คน) อายุ 18-25 ปี โดยอ้างอิงจากงานวิจัยในการทดสอบสมุนไพรที่ผ่านมาเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากเตยหอมและมะระขี้นก อัญชลี เฉียบฉลาด และคณะ (2550) ประกอบกับงบประมาณที่ใช้ในโครงการวิจัยในครั้งนี้ วิธีที่ใช้ในการคำนวณของจำนวนตัวอย่าง 30 คน คือ สถิติที่ใช้นั้นได้จาก การศึกษาในคน 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน

วิธีการคำนวณ กำหนด α = 0.05 สูตร n pair = ($Z_{\alpha/2} - Z_B)^2 \sigma^2/d^2$

กำหนด β = 0.10 σ^2 = Variance of difference

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2}$ =1.96 (two tail) d = Difference

$Z_B = Z_{0.10}$ =1.28

หา $\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 - 2r\,\sigma_1\,\sigma_2$ เพื่อนำไปแทนค่าในสูตร

หมายเหตุ ถ้าไม่สามารถค่า r ได้ ให้ใช้ค่า r = 0 จะได้ค่า n มากที่สุด

เมื่อ σ_1^2 คือ varinance ของกลุ่มแรก

σ_2^2 คือ varinance ของกลุ่มหลัง

ดังนั้น $\sigma^2 = (29.5)^2 + (14.1)^2 - 2(0)(29.5)(14.1) = 1069.06$

σ=32.7

สูตร n pair = $(Z_{\alpha/2} + Z_B)^2 \sigma^2/d^2$

$= (1.96+1.28)^2 (32.7)^2/ (27.6)^2 = 14.74 = 15$ คน

เหตุผลที่เพิ่มผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยเป็น 30 คน เนื่องจากต้องการลดความแตกต่างที่เกิดจากปัจจัยภายนอกของผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัย เช่น อารมณ์ ความเครียด ความแตกต่างในเมตาบอลิซึมของแต่ละคน ค่าที่นำมาคำนวณมีที่มาจาก การศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากเตยหอมและมะระขี้นก (11)

โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบันชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COA No.120/2553 เลขที่โครงการวิจัย104.1/53 เมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2553

เกณฑ์การคัดเลือกผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยข้าโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องไม่มีโรคประจำตัว
2. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติ
3. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องได้รับอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เพียงพอ อย่างน้อยวันละ 150 กรัม (8 ช้อนโต๊ะ) เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน ก่อนทำการตรวจ
4. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องหายจากอาการเจ็บป่วยโดยเร็วมาแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์
5. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องหยุดยาที่อาจกระทบต่อการตรวจ เช่น ฮอร์โมน ยาคุมกำเนิด (ทั้งชนิดที่กิน ฉีด ฝัง หรือ แปะผิวหนัง) ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด และยาที่มีผลต่อการตรวจน้ำตาลในเลือด เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน

6. ก่อนการตรวจ 1 วัน ให้ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยอดอาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง และให้ดื่มน้ำเปล่าได้ตามความจำเป็น ควรงดกาแฟ และบุหรี่ ให้ดำเนินชีวิตตามปกติ และ ห้ามออกกำลังกายมากอย่างน้อยก่อนการตรวจ 8 ชั่วโมง

ส่วนกรณีที่ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยไม่รู้ผลเลือดมาก่อน ผู้วิจัยจะตรวจระดับน้ำตาลในเลือดให้โดยไม่คิดค่าใช้จ่าย และหากผลระดับน้ำตาลในเลือดไม่ปกติ ผู้วิจัยไม่รับเข้าร่วมโครงการวิจัย

เกณฑ์การคัดเลือกผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

หากเข้าลักษณะข้อใด ข้อหนึ่งเหล่านี้

1. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยไม่ต้องการเข้าร่วมโครงการวิจัยต่อหลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 1
2. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยมีอาการเจ็บป่วยหลังเจาะเลือดครั้งแรก เช่น เป็นไข้หวัด ท้องเสีย

วิธีการได้มาซึ่งผู้มีส่วนร่วมงานวิจัย

ผู้วิจัยประชาสัมพันธ์เปิดรับสมัครผู้ที่สนใจเข้าร่วมโครงการ โดยมีป้ายประกาศดังที่แนบมา ติดในบริเวณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นทำการคัดกรองผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยเข้าร่วมการวิจัยโดยผู้วิจัยซักประวัติ และทำแบบสอบถามเพื่อคัดกรอง ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ผ่านการคัดกรองจำนวน 30 ราย จะเข้ารับการตรวจระดับน้ำตาลในเลือด 2 วัน ตลอดงานวิจัย

3.6.2 วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาผลของใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในมนุษย์

เมื่อผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยยินยอมด้วยความสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยจะได้รับการปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้ ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ได้รับการคัดเลือก จะเข้ารับการเก็บตัวอย่างเลือด 8 ครั้ง ตลอดโครงการ โดยจะแบ่งเป็น 2 วัน

<u>ครั้งที่ 1</u> เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนประมาณ 2 มิลลิลิตร ใน 1 ครั้ง ปั่นแยกซีรัมและนำไปทดสอบเพื่อหาค่าระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อเป็นค่าควบคุม จากนั้นให้ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยดื่มกลูโคส 75 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 มิลลิลิตร เจาะเก็บเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4 เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1ชั่วโมง, และ 2 ชั่วโมง และการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรกเป็นเวลา 7 วัน

<u>ครั้งที่ 2</u> เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนประมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อ 1 ครั้ง ปั่นแยกซีรัมและนำไปทดสอบเพื่อหาค่าระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อเป็นค่าควบคุม จากนั้นให้ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยดื่มกลูโคส 75 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 มิลลิลิตร และหลังจากดื่มกลูโคส 15 นาที ให้ดื่มชาใบเตยหอม 30 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 มิลลิลิตร เจาะเก็บเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4

เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง โดยก่อนการเจาะเลือดทุกครั้งผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยต้องอดอาหาร 10-12 ชั่วโมง

ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างเลือดไปตรวจระดับน้ำตาลในเลือดและวิเคราะห์ผลการรักษาด้วยตนเอง กระบวนการวิจัยเป็นอันเสร็จสิ้น เมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยจะถูกทำลายใน 3 เดือน

ความเสี่ยงเกี่ยวกับการวิจัยนี้

การเจาะเลือด 4 ครั้ง ต่อ 1 วันของการทดลอง อาจจะเกิดรอยช้ำบริเวณที่มีการเจาะเลือด ซึ่งสามารถหายได้เองภายใน 7-10 วัน อุปกรณ์เจาะเลือดใช้ครั้งเดียวทิ้ง จึงปลอดภัยต่อโรคที่ติดต่อทางเลือด และการเจาะเลือดครั้งนี้ผู้ที่เจาะเลือดคือ นักเทคนิคการแพทย์ณัฐกานต์ หนูรุ่น และนักเทคนิคการแพทย์ชนะชัย แซ่ลี้ ซึ่งมีประสบการณ์ในการเจาะเลือดเป็นอย่างดี หากเกิดความผิดปกติใดๆขณะเจาะเลือด จะหยุดการเจาะเลือดทันทีและปฐมพยาบาลเบื้องต้น หากอาการไม่ดีขึ้นจะนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยทันทีเพื่อทำการรักษาต่อไป โดยผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด และหากผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยเกิดความผิดปกติ เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย จากสาเหตุการดื่มชาใบเตย โดยกรณีเหตุการณ์เกิดในขณะที่กำลังดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยจะนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทยทันทีเพื่อทำการรักษา โดยผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด ส่วนในกรณีที่อาการเกิดหลังจากดำเนินการวิจัยเสร็จสิ้นแล้ว ผู้วิจัยยินดีรับผิดชอบค่ารักษาพยาบาลทั้งหมด

ประโยชน์ที่ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยจะได้รับ

ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยในโครงการทุกท่านจะทราบระดับน้ำตาลในเลือด โดยผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ประสงค์จะทราบผลของระดับน้ำตาลในเลือด ผู้วิจัยจะให้ท่านเขียนความประสงค์ซึ่งมีรายละเอียดอยู่ในแบบสอบถาม

สิทธิของผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจ ท่านจะไม่ได้รับค่าตอบแทนในการเข้าร่วมงานวิจัย อย่างไรก็ตามท่านมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากการวิจัยนี้ได้ทุกเมื่อโดยไม่ต้องได้รับโทษใดๆทั้งสิ้น โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุของการถอนตัว และจะไม่มีพันธะใดๆในอนาคต

3.6.3 การทดสอบผลของใบเตยต่อการลดการดูดซึมกลูโคสในเลือดโดยวิธี Post-prandial ในมนุษย์

กลูโคสถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ glucose oxidase เมื่อมีออกซิเจนอยู่ด้วยเกิดเป็น glucuronic acid และ hydrogen peroxide ในปฏิกริยาต่อมา hydrogen peroxide จะออกซิไดซ์ chromogen โดยเอนไซม์ peroxidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา เกิดเป็น oxidized

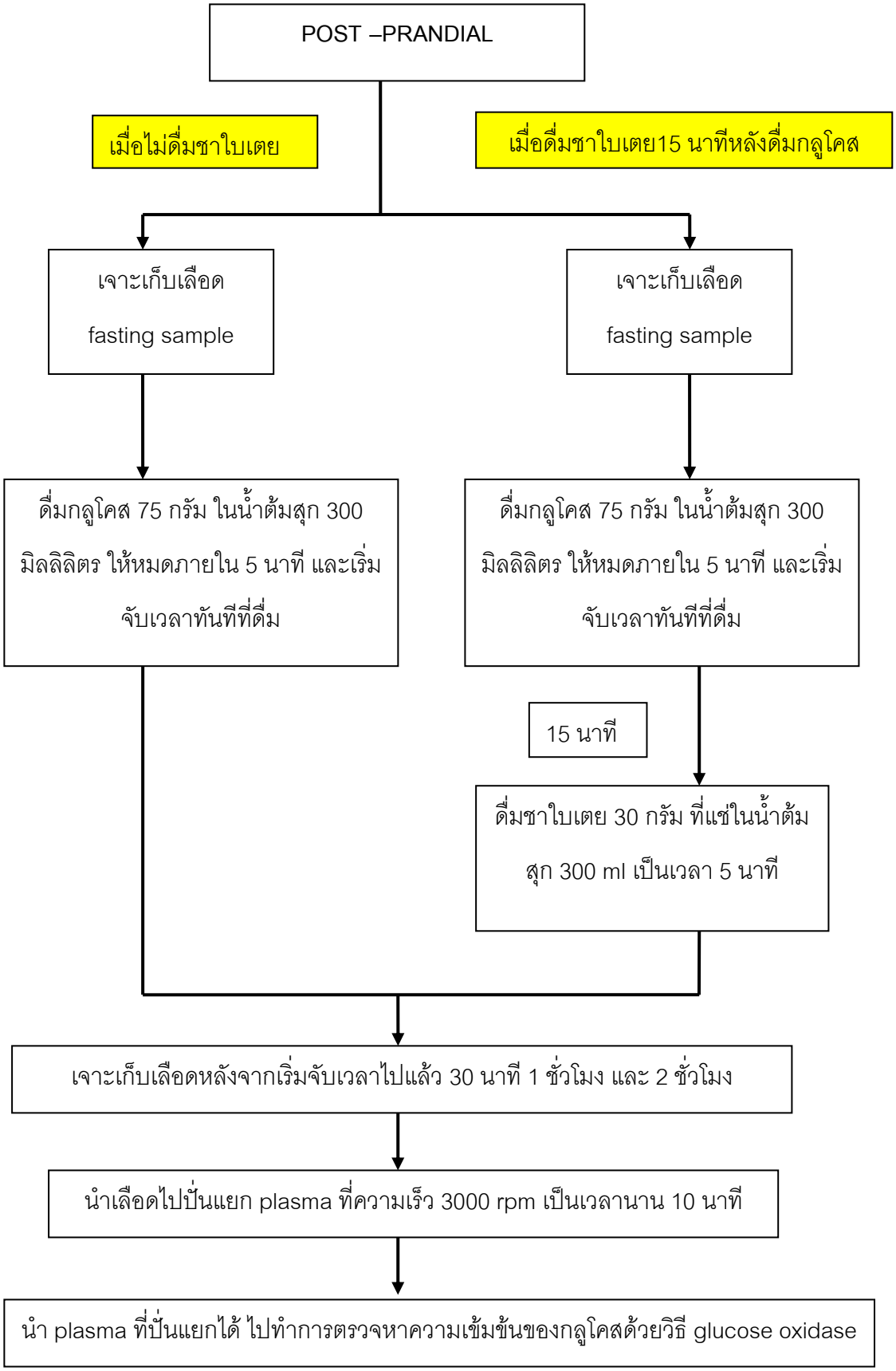
chromogen ซึ่งเป็นสารที่มีสี ปริมาณสารที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของกลูโคสที่มีอยู่ในปฏิกิริยาแรก วิธีนี้มีความจำเพาะสูงสำหรับกลูโคสและถ้าในสิ่งส่งตรวจมี uric acid, bilirumin หรือ ascorbic acid ปริมาณมาก จะสามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่สอง โดยแย่งกับ chromogen ในการรับออกซิเจนที่ถูกปล่อยออกมา มีผลให้ได้ค่าต่ำปลอม โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

$$\beta\text{-glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{glucose oxidase}} \text{glucuronic acid} + H_2O$$

$$H_2O_2 + \text{reduse chromogen} \xrightarrow{\text{peroxid}} \text{oxidized chromogen} + H_2O_2$$

เจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัครปริมาณ 2 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด NaF นำเลือดไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยก plasma glucose นำมาทำการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคส จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับกลูโคสโดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17) โดย Student's paired T-test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

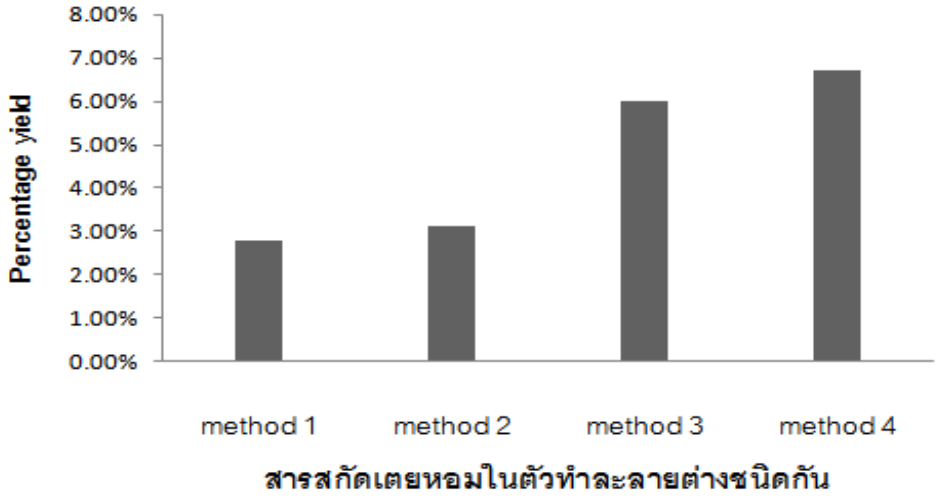
แผนภาพที่ 3.12 แสดงขั้นตอนการทดสอบชาใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด



บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดใบเตยหอมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันและโดยวิธีที่แตกต่างกัน

เมื่อสกัดสารหยาบ (Crude extract) ของใบเตยหอม โดยใช้การสกัดเทียบเคียงกับการปรุงยาไทย โดยใช้วิธีต้ม วิธีชง วิธีคั้น และวิธีหมักหรือวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) คิดเป็น Percentage yield ได้ดังนี้



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณสารที่สกัดได้จากใบเตยหอมที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันและสกัดด้วยวิธีที่ต่างกัน โดยแต่ละ Method คือ

Method 1 ใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส
Percentage yield คือ 2.8 %

Method 2 ใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
Percentage yield คือ 3.1 %

Method 3 ใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส
สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส Percentage yield คือ 6%

Method 4 ใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล
Percentage yield คือ 6.7 %

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่สกัดสดและสกัดโดยนำไปตากแห้งก่อนพบว่าสารสกัดแบบแห้งได้สารที่มีปริมาณออกมามากกว่า โดยพบว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ใบเตยแห้งจะให้ปริมาณสารออกมามากที่สุด ส่วนสารสกัดใบเตยหอมสดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้สารออกมาปริมาณน้อยที่สุด

4.2 การวัดสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และความสามารถต้านออกซิเดชันของใบเตย

4.2.1 ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Scientific name of plants	Part used	Total phenolic contents (mg GAE/g sample)
Pandanus amaryllifolius Roxb.	Method 1	76.98 ± 1.23[a]
	Method 2	72.91 ± 2.29[a]
	Method 3	99.69 ± 0.53[b]
	Method 4	115.13 ± 0.94[c]

ตารางที่ 4.1 ค่าที่ได้จากการทดสอบสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเตยหอม ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี Folin Ciocalteau Phenol assay

พบว่าสารสกัดจากใบเตยหอม มีปริมาณตั้งแต่ 72.91 ± 2.29 ถึง 115.13 ± 0.94 มิลลิกรัมของแกลลิค แอซิคต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg GAE/g sample) ตัวทำละลายเอทานอลมีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 115.13 ± 0.94 mg GAE/g sample รองลงมาคือใบเตยหอมที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มาสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 99.69 ± 0.53 mg GAE/g sample ส่วนสารสกัดที่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุดคือ ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 72.91 ± 2.29 mg GAE/g sample แสดงผลในรูป mean±SD โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้งจำนวน 3 ครั้งการทดลอง $^{a-c}$ หมายถึง ตัวอักษรที่ต่างกันมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.2.2 ผลการวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์

Scientific name of plants	Part used	Total flavonoid contents (mg QE/g sample)
Pandanus amaryllifolius Roxb.	Method 1	11.33 ± 0.29^{a}
	Method 2	10.41 ± 0.25^{b}
	Method 3	14.67 ± 0.12^{c}
	Method 4	15.52 ± 0.12^{d}

ตารางที่ 4.2 ค่าที่ได้จากการทดสอบสารฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดใบเตยหอม ผลการตรวจวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

พบว่าสารสกัดจากใบเตยหอม มีปริมาณตั้งแต่ 10.41 ± 0.25 ถึง 15.52 ± 0.12 มิลลิกรัมของเควอซิทินต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg QE/g sample) ตัวทำละลายเอทานอลมีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 15.52 ± 0.12 mg QE/g sample รองลงมาคือใบเตยหอมที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มาสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 14.67 ± 0.12 mg QE/g sample ส่วนสารสกัดที่พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ น้อยที่สุดคือ ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 10.41 ± 0.25 mg QE/g sample แสดงผลในรูป mean±SD โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง $^{a\text{-}d}$ หมายถึง ตัวอักษรที่ต่างกันมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.2.3 ผลการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Scientific name of plants	Part used	Radical scavenging activity (mg VCEAC /g sample)
Pandanus amaryllifolius Roxb.	Method 1	23.89 ± 6.29 [a]
	Method 2	19.85 ± 5.91 [b]
	Method 3	45.12 ± 2.81 [c]
	Method 4	66.71 ± 1.71 [d]

ตารางที่ 4.3 ค่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี DPPH assay

ผลการตรวจความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเตยหอมซึ่งวัดออกมาเป็นค่า % radical scavenging activity และนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน โดยจะนำไปคำนวณเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.4 ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ 66.71 ± 1.71 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg VCEAC/g sample) รองลงมาคือใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส 45.12 ± 2.81 mg VCEAC/g sample ส่วนความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุดคือ ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 19.85 ± 5.91 mg VCEAC/g sample แสดงผลในรูป mean±SD โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง [a-d] หมายถึง ตัวอักษรที่ต่างกันมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.2.4 ผลการวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Scientific name of plants	Part used	Radical scavenging activity (mg VCEAC /g sample)
Pandanus amaryllifolius Roxb.	Method 1	32.32 ± 0.89[a]
	Method 2	14.57 ± 1.25 [b]
	Method 3	52.24 ± 3.05[c]
	Method 4	54.93 ± 1.73[d]

ตารางที่ 4.4 ค่าที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมด้วยวิธี ABTS assay

ผลการตรวจความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่เกิดขึ้นของสารสกัดจากใบเตยหอม ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานและนำมาคำนวณเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัดเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากตารางที่ 4.5 พบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด คือ 54.93 ± 1.73 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกในน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg VCEAC/g sample) รองลงมาคือใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส 52.24 ± 3.05 mg VCEAC/g sample ส่วนความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระวิธี ABTS น้อยที่สุดคือ ใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 14.57 ± 1.25 mg VCEAC/g sample แสดงผลในรูป mean±SD โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง [a-d] หมายถึง ตัวอักษรที่ต่างกันมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยวัดเมทาบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

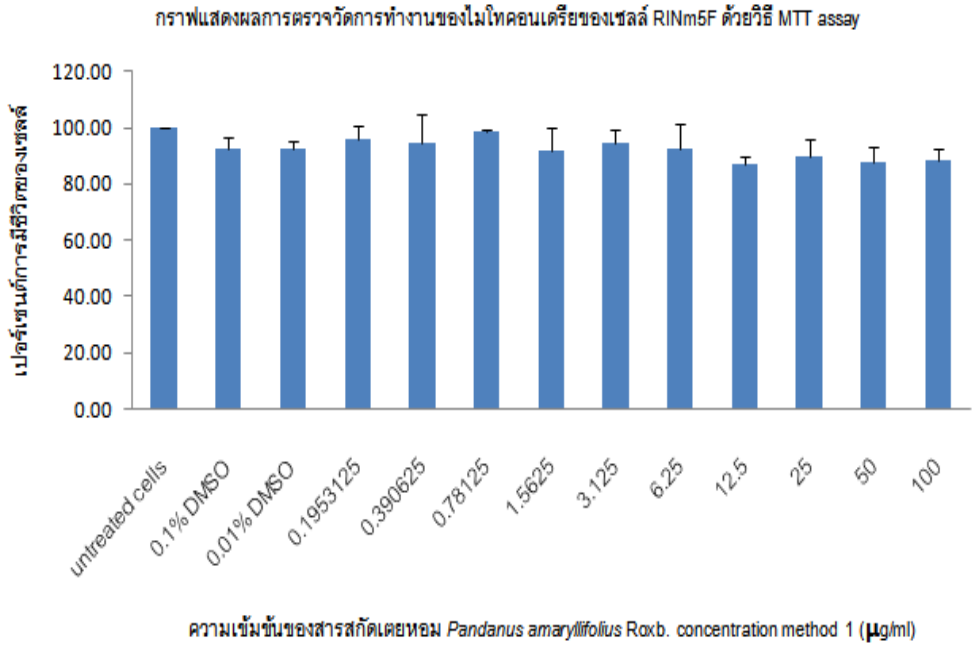
ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดคือ ตับอ่อนหนู (RINm5F) และกล้ามเนื้อหนู (L6) โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อวัดความสามารถในการเมทาบอลิซึมของไมโทคอนเรียของเซลล์ (Metabolic capacity) ทำการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะจานเพาะเลี้ยง นำสารที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธีมาทดสอบที่ความเข้มข้นดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ทดสอบเหมือนกันทั้งสองเซลล์ที่เพาะเลี้ยง จากนั้นใส่สาร MTT และนำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA Reader ค่าที่คำนวณค่าได้จากการกลุ่มควบคุมบวก (positive control) คือเซลล์ที่ถูกทดสอบกับ 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีค่าการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) มีค่าการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบที่ได้จะเป็นการเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม negative control และนำค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ ไปทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนและทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่อไป

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมด้วยการตรวจวัดการทำงานของเซลล์โดยวัดเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบสารสกัดกับเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) จากตัวทำลายที่ต่างกันและวิธีการสกัดที่ต่างกัน ทั้ง 4 สารสกัด

4.4.1.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F)

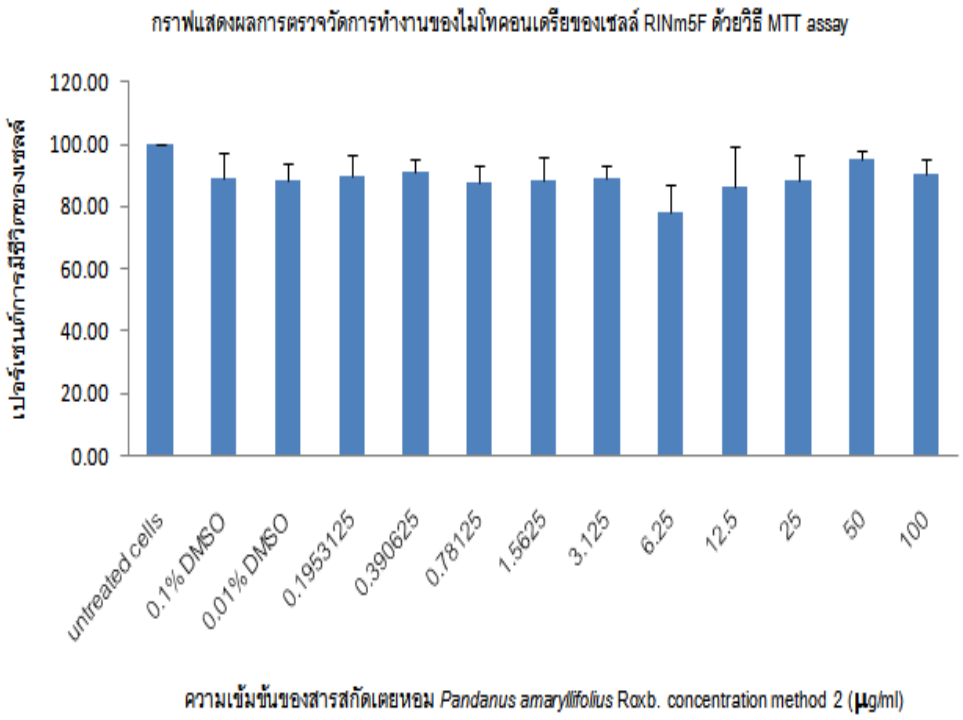
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับอ่อนหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้นดังที่แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F)

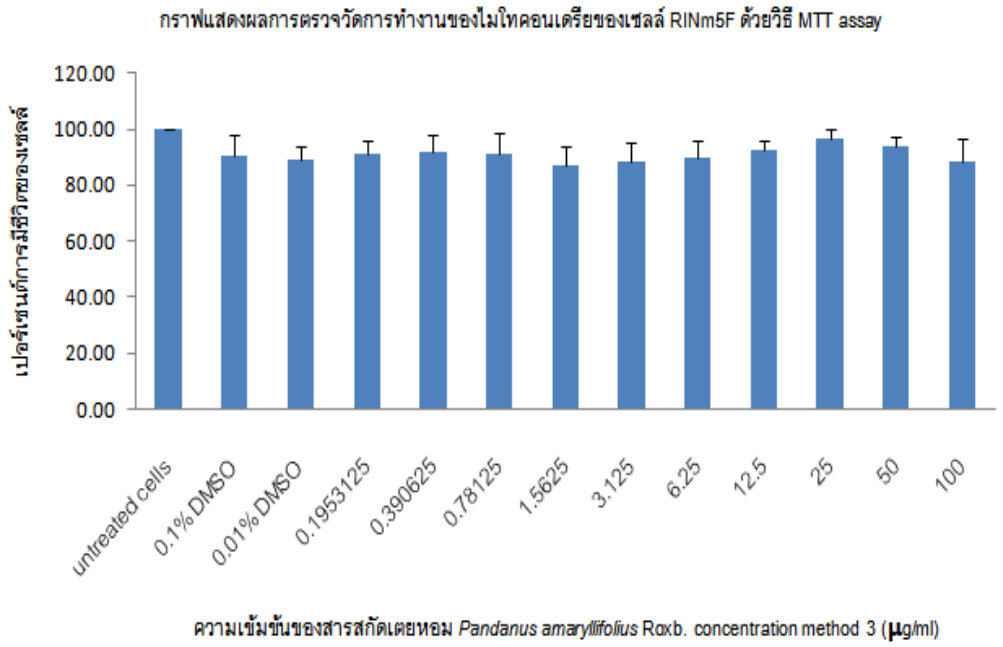
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียสที่มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับอ่อนหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.1.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F)

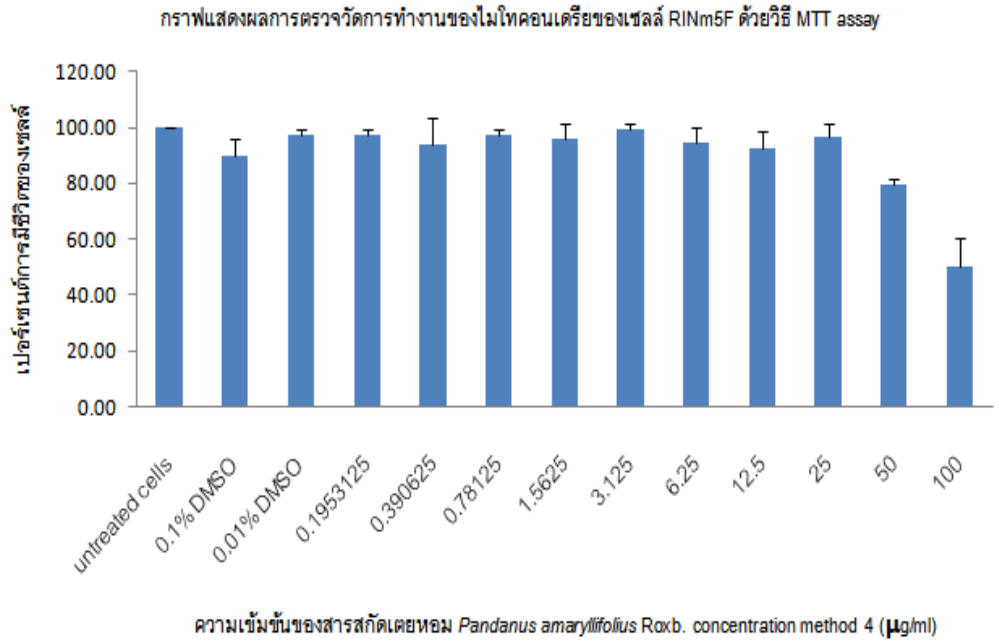
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับอ่อนหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.1.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล ต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนหนู (RINm5F) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับอ่อนหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กล่าวได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

สรุปได้ว่า จากภาพที่ 4.2-4.5 ได้เลือกความเข้มข้นตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เพื่อให้เป็นไปในรูปแบบเดียวกันและเพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นดังกล่าวของสารสกัดเลือกเพราะเมื่อทดสอบกับสารแล้วทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ความเข้มข้นแล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนต่อไป

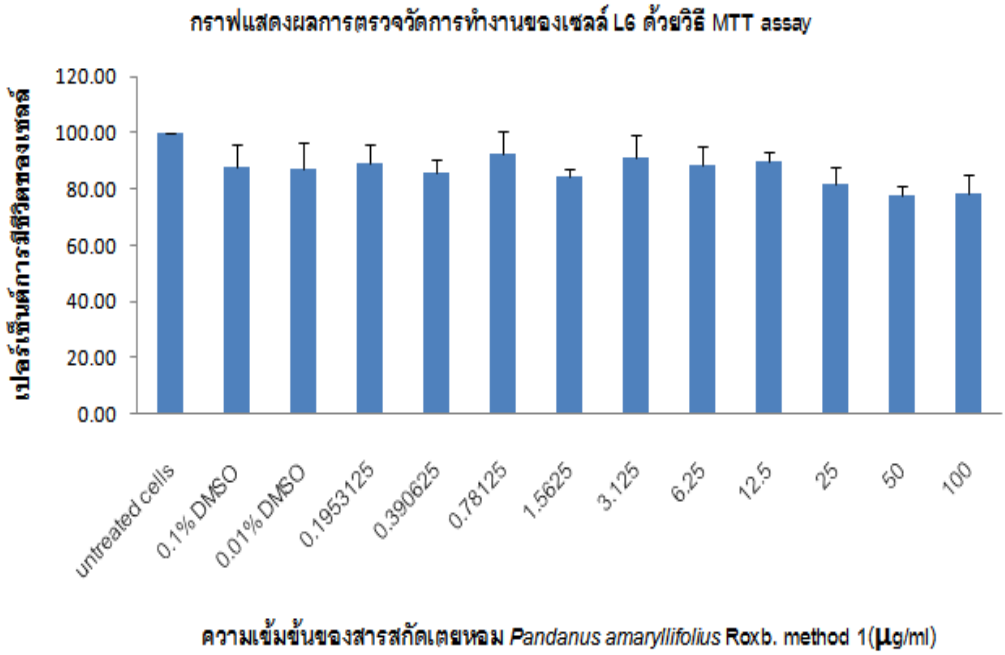
4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบเตยหอมด้วยการตรวจวัดการทำงานของเซลล์โดยวัดเมทาบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบสารสกัดกับเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) จากตัวทำลายที่ต่างกันและวิธีการสกัดที่ต่างกัน ทั้ง 4 สารสกัด

4.4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ไมโครกรัมต่อ

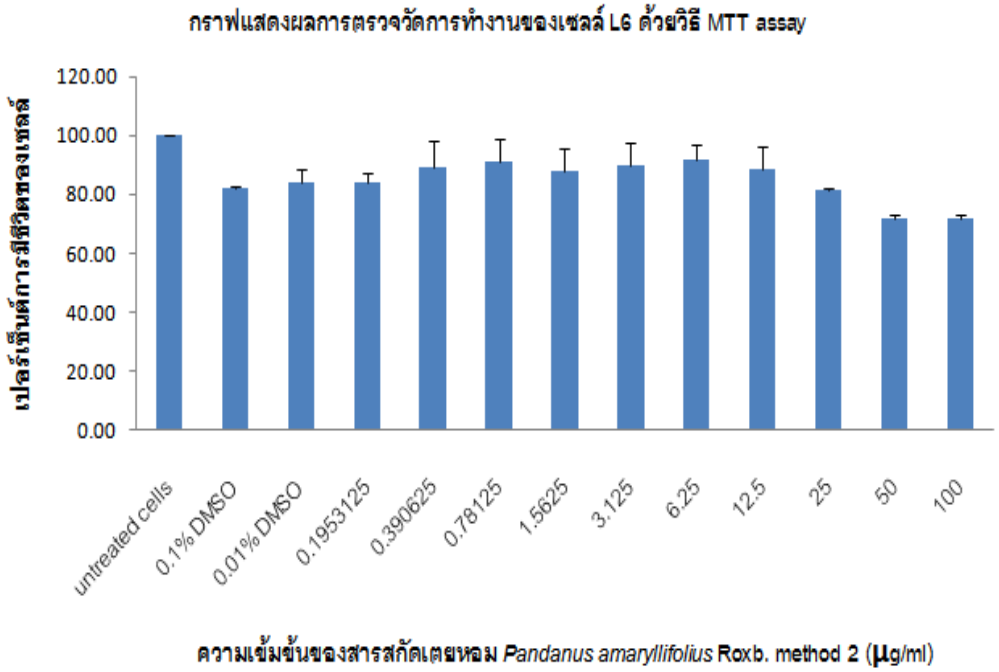
มิลลิลิตร ลงมาไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)

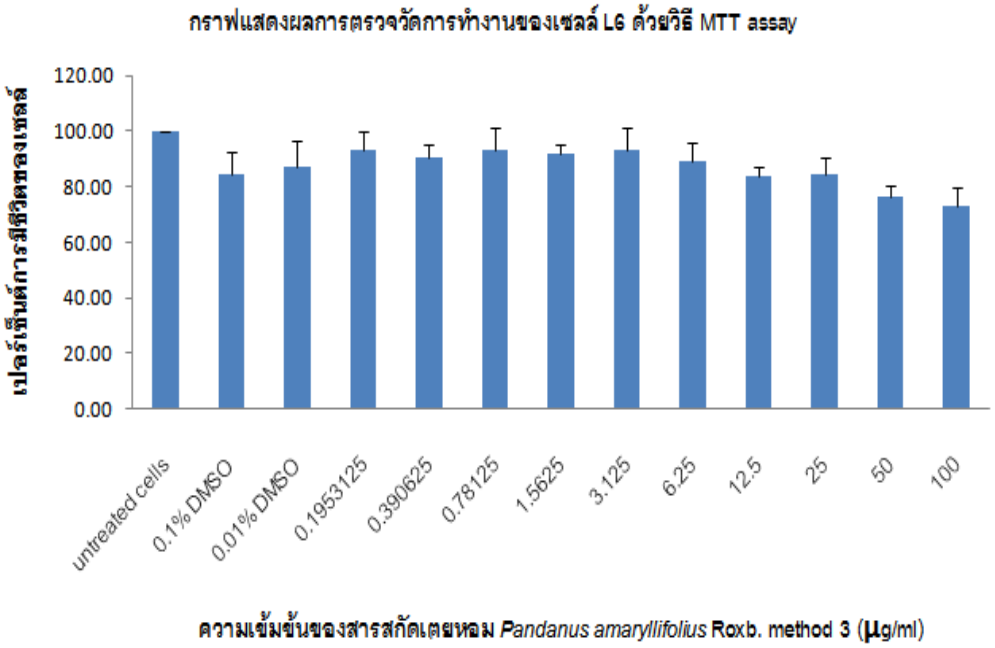
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 25 องศาเซลเซียสที่มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมสดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.2.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)

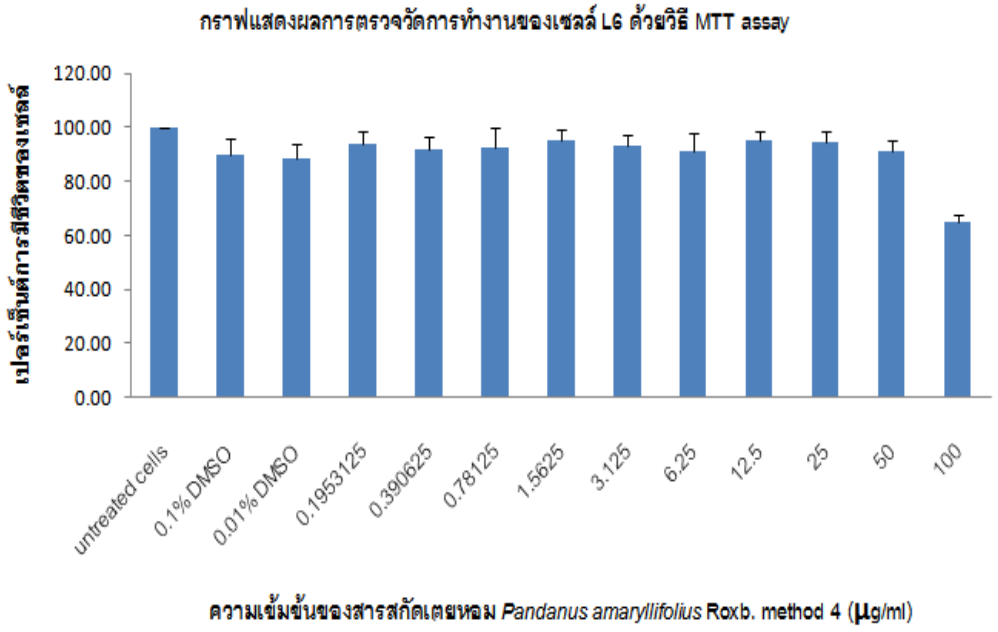
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น 0 -100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6) พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหนู ยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงมาได้ทุกความเข้มข้น ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.4.2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบเตยหอมที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเข้มข้น 0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู พบว่าโดยเมื่อทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหนูยังคงมีชีวิตรอด (% cell viability) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงดังภาพที่ 4.9



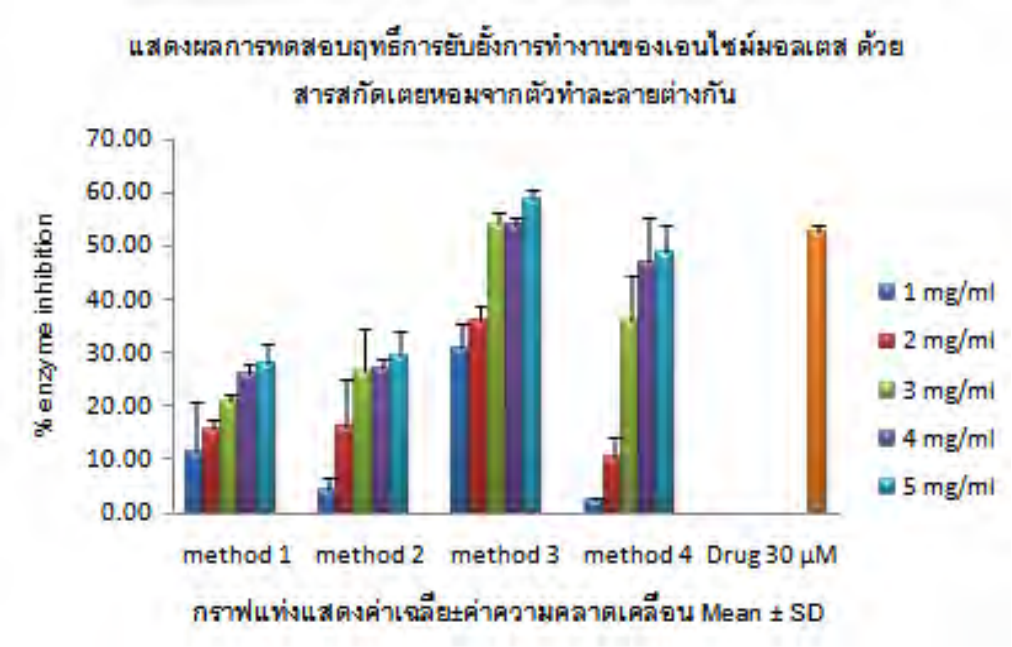
ภาพที่ 4.9 ผลของเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) ที่สารสกัดจากใบเตยหอมอบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี MTT assay ทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ครั้ง และทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

สรุปได้ว่า จากภาพที่ 4.6 - 4.9 ได้เลือกความเข้มข้นตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เพื่อให้เป็นไปในรูปแบบเดียวกันและเพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นดังกล่าวของสารสกัดเลือกเพราะเมื่อทดสอบกับสารแล้วทำให้เซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ความเข้มข้นแล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่อไป

4.5 การศึกษากลไกของใบเตยหอมในการลดระดับน้ำตาลในเลือด

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ α –Glucosidase

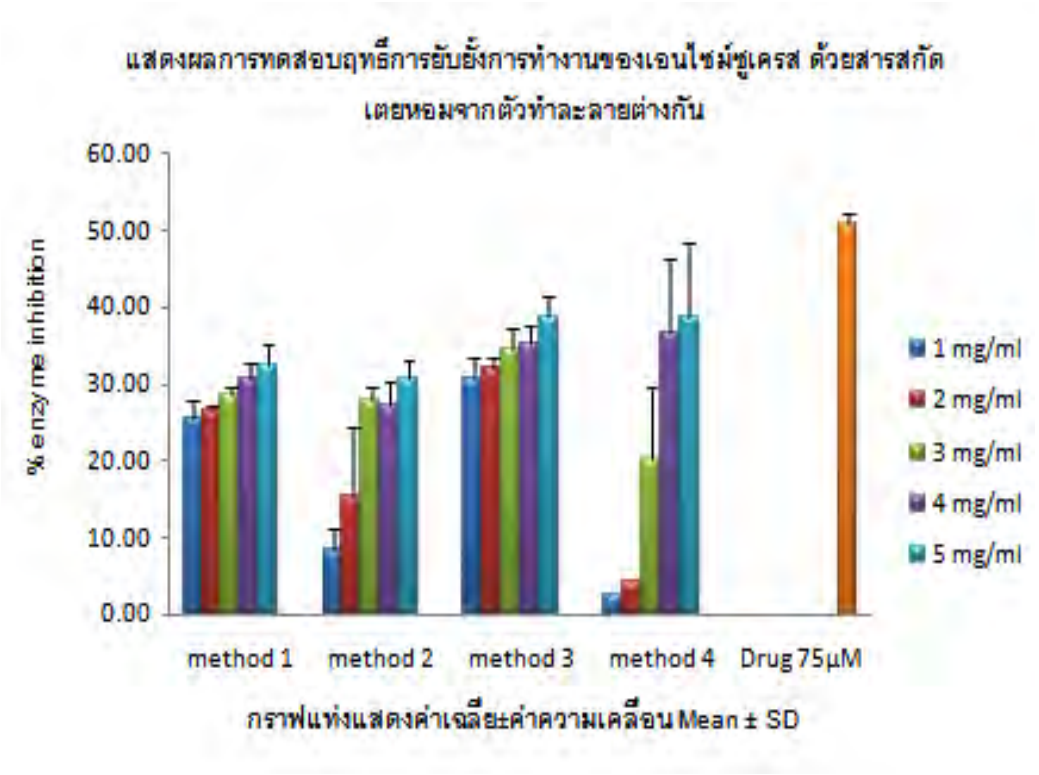
4.5.1.1 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส



ภาพที่ 4.10 ผลจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสด้วยสารสกัดจากใบเตยหอม

พบว่าเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ยาอะคาร์โบส เป็นกลุ่มควบคุมบวกพบว่า สารสกัดจากเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ดีที่สุดโดยดูจากความแรงของยา (potency) สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ถึง 31.05 ± 4.39 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือสารสกัดใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสและใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ และสารสกัดจากใบเตยหอมแต่ละวิธีมีการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสจะแปรผันตามความเข้มข้นโดยความเข้มข้นยิ่งมาก จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มาก ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.5.1.2 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

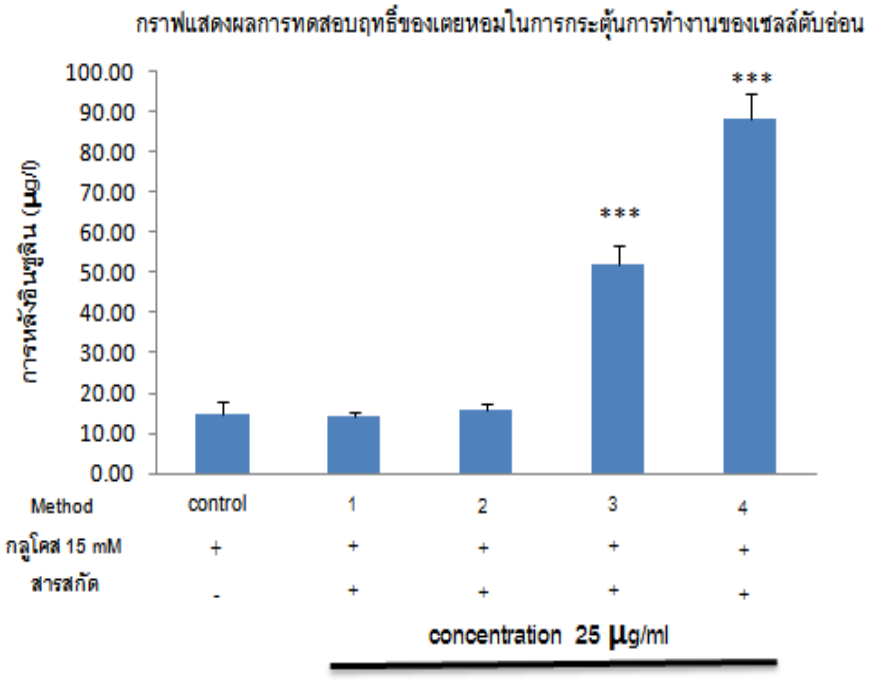


ภาพที่ 4.11 ผลจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสด้วยสารสกัดจากใบเตยหอม

พบว่าเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ยาอะคาร์โบสเป็นกลุ่มควบคุมบวก สารสกัดจากเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ดีที่สุดโดยดูจากความแรงของยา (potency) สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ถึง 30.66 ± 2.78 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือสารสกัดใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสและใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ และสารสกัดจากใบเตยหอมแต่ละวิธีมีการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสจะแปรผันตามความเข้มข้นโดยความเข้มข้นยิ่งมาก จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มาก ทดสอบสารสกัดที่สกัดมาด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน

4.5.2.1 การทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนที่สกัดด้วย 4วิธีที่ต่างกัน



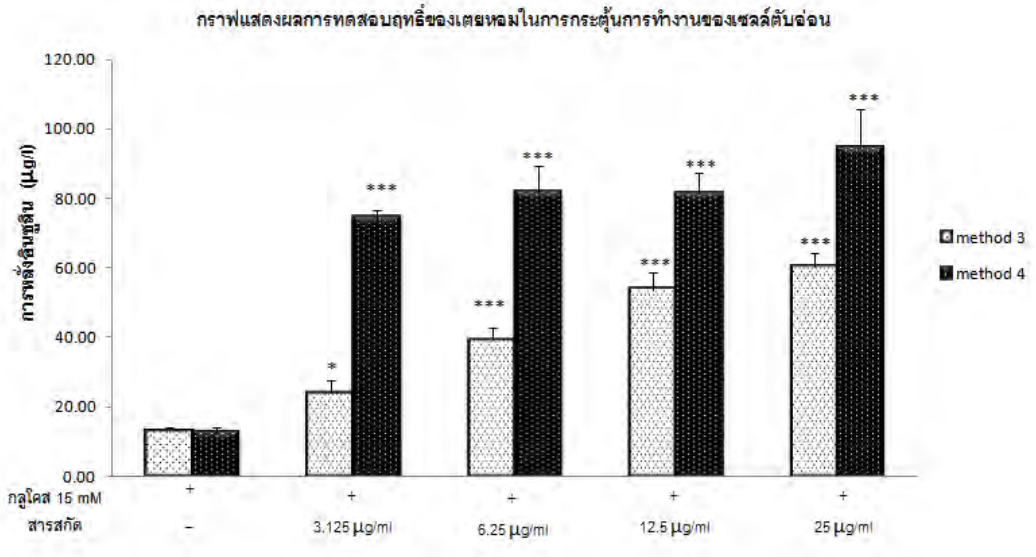
ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน โดยนำสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันทั้ง 4 วิธีความเข้มข้นตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ *** $p < 0.001$

ความเข้มข้นที่ทดสอบกับเซลล์ตับอ่อน ใช้หลักเกณฑ์คือเซลล์มีชีวิตรอด (% cell viability) เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ นำมาทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน ค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด ค่าอินซูลินที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยในการทดสอบเบื้องต้นนี้จะทดสอบความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละวิธีสกัดว่าได้ระดับของอินซูลินแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดหรือไม่ ผลการทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนพบว่าที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียสที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียสและสารสกัดใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียสสกัดด้วยเอทานอล มีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าที่ได้คือ 52.20 ± 4.64 และ 88.15 ± 6.27 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ ค่าที่ได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.001$) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียสและสารสกัดใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล

ความเข้มเข้นของสารสกัด (μg/ml)	การหลั่งอินซูลิน Fraction 3 (μg/l)	การหลั่งอินซูลิน Fraction 4 (μg/l)
0	12.88 ± 1.36	12.88 ± 1.36
3.125	24.08 ± 3.54	74.43 ± 2.23
6.25	38.99 ± 3.93	81.61 ± 7.59
12.5	53.70 ± 4.91	81.46 ± 5.86
25	60.25 ± 3.86	94.38 ± 11.43

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน โดยนำสารสกัดความเข้มข้นตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบและวัดค่าอินซูลินที่หลั่งออกมา

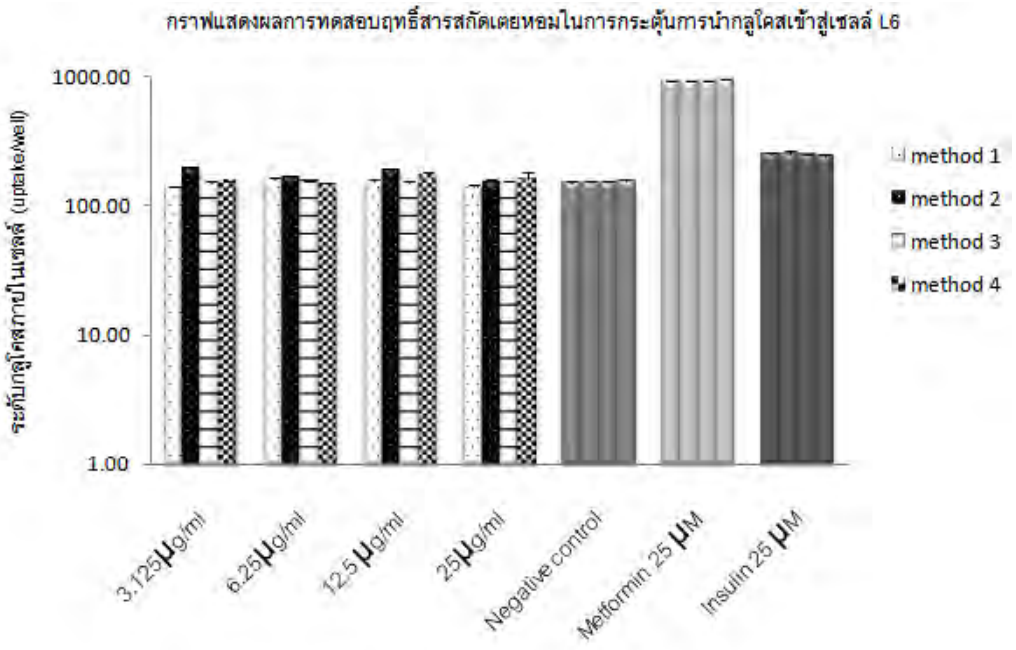


ภาพที่ 4.13 ผลการทดสอบฤทธิ์ของเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อน โดยนำความเข้มข้นตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับของสารสกัดจากเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียสและสารสกัดใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล *** $p < 0.001$ * $P < 0.05$

เมื่อทำการทดลองขั้นแรกพบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนหลั่งอินซูลินได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการทดสอบฤทธิ์ของใบเตยหอมในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนนี้ พบว่าสารสกัดใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอลมีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินได้ดีกว่าสารสกัดจากเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งการหลั่งอินซูลินที่มากขึ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นยิ่งมากจะมีการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ตับอ่อนที่มากขึ้นตามไปด้วย (dose dependent manner) ค่าที่ได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม*** คือ ($p<0.001$) * คือ ($P < 0.05$) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

4.5.3 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดทั้ง 4 วิธี ตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเซลล์กล้ามเนื้อ โดยมีอินซูลินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์และยา metformin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์เป็นกลุ่มควบคุมบวก และทดสอบโดยใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุมลบ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซ็นต์มาเปรียบเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน เมื่อทำการทดลองพบว่าสารสกัดไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ได้ แต่พบว่าใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีแนวโน้มกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ที่ความเข้มข้น 3.125 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง



ภาพที่ 4.14 การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเตยหอมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดทั้ง 4 วิธี ตั้งแต่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 ผลการทดสอบผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในคน

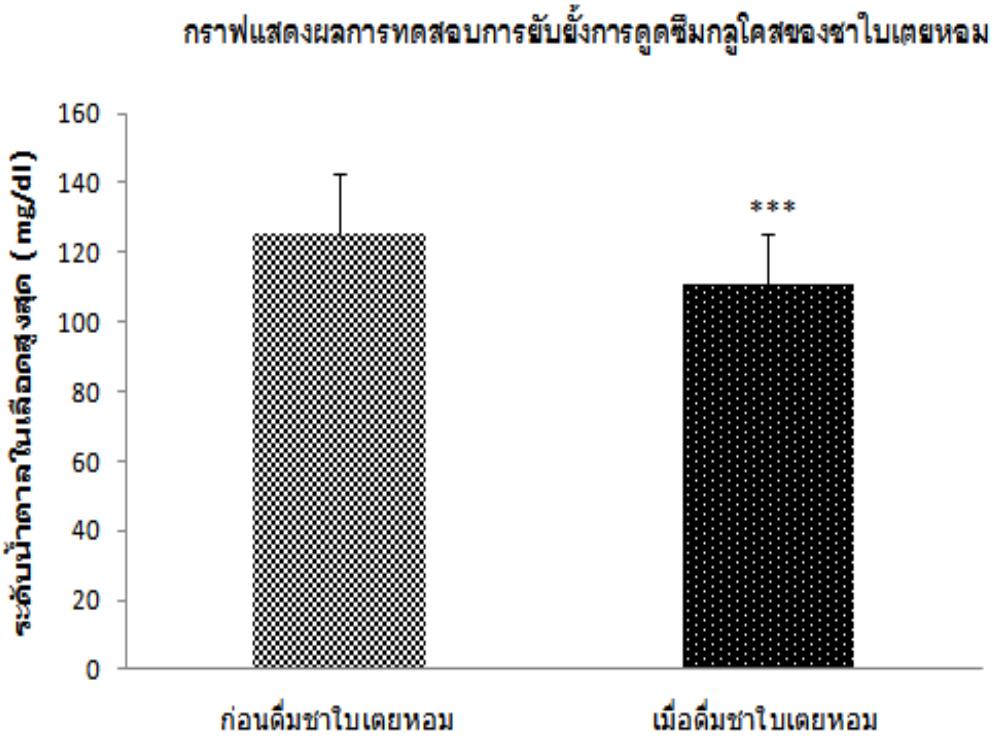
ผลการทดสอบผลของใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลในเลือด โดยวิธี Post-prandial ในมนุษย์ โดยให้ดื่มชาใบเตยหอม 30 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 มิลลิลิตร เจาะเก็บเลือดจำนวน 4 ครั้ง โดยเปรียบเทียบค่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดก่อนดื่มชาใบเตยหอมกับหลังดื่มชาใบเตยหอมเมื่อทำการทดลองพบว่าสามารถลดการดูดซึมกลูโคสในกระแสเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดของผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัย 30 ราย

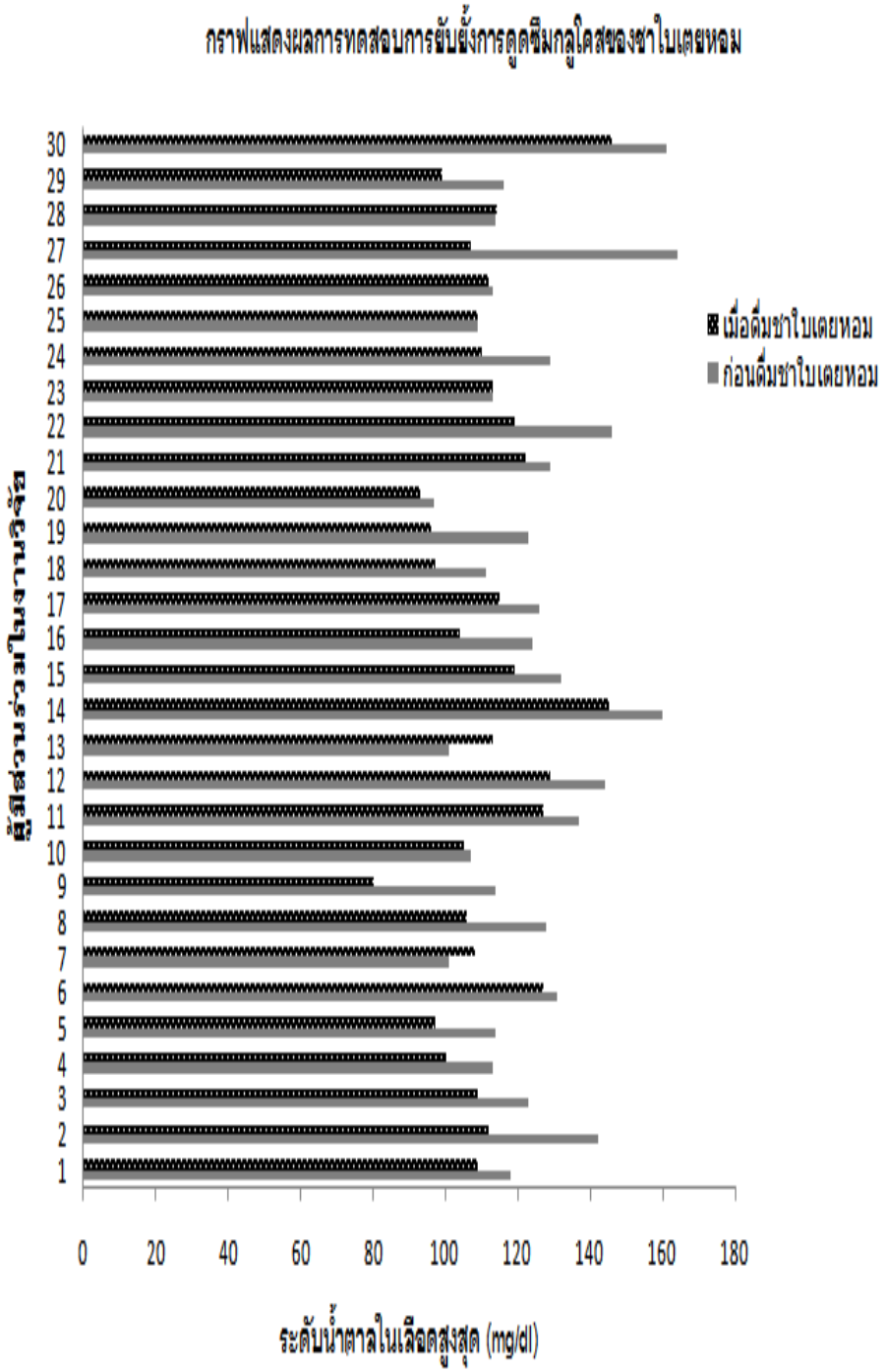
อาสาสมัครคนที่	ระดับน้ำตาลก่อนดื่มชาใบเตยหอม	ระดับน้ำตาลหลังดื่มชาใบเตยหอม	ผลต่างของระดับน้ำตาล
1	118	109	-9
2	142	112	-30
3	123	109	-14
4	113	100	-13
5	114	97	-17
6	131	127	-4
7	101	108	+7
8	128	106	-22
9	114	80	-34
10	107	105	-2
11	137	127	-10
12	144	129	-15
13	101	113	+12
14	160	145	-15
15	132	119	-13
16	124	104	-20
17	126	115	-11
18	111	97	-14
19	123	96	-27
20	97	93	-4
21	129	122	-7
22	146	119	-27

อาสาสมัครคนที่	ระดับน้ำตาลก่อนดื่มชาใบเตยหอม	ระดับน้ำตาลหลังดื่มชาใบเตยหอม	ผลต่างของระดับน้ำตาล
23	113	113	0
24	129	110	-19
25	109	109	0
26	113	112	-1
27	164	107	-57
28	114	114	0
29	116	99	-17
30	161	146	-15
X	125	111	Decrease -398
SD	17.66	14.16	

ผลของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่า ชาใบเตยหอมสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยก่อนดื่มชาใบเตยจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุด 125 ± 17.66 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แต่หลังจากดื่มชาใบเตยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุด 111 ± 14.16 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าที่ได้มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.001$) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง โดย control N และ control P เป็นค่าควบคุมคุณภาพ ดังภาพที่ 4.15



ภาพที่ 4.15 การทดสอบการยับยั้งการดูดซึมกลูโคสของชาใบเตยหอม *** $p < 0.001$



ภาพที่ 4.16 ผลการทดสอบพบว่าชาใบเตยหอมฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในกระแสเลือด แสดงในรูปของกราฟเปรียบเทียบระดับน้ำตาลสูงสุดเมื่อไม่ดื่มชาใบเตยหอมกับเมื่อดื่มใบเตยหอม

เมื่อทำการทดลองพบว่าสามารถลดการดูดซึมกลูโคสในกระแสเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.001$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำสมุนไพรซึ่งก็คือ เตยหอม มาจากสวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัย มหิดล นำมาใช้ตลอดการทดลอง เพื่อควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั้ง สภาพดิน ฟ้า อากาศ น้ำ รวมทั้งอายุของเตยหอม ที่จะส่งผลถึงระดับสารสำคัญต่างๆที่อยู่ในสมุนไพร แต่อย่างไรก็ตาม ผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจมีความหลากหลายได้ หากใช้ใบเตยหอมจากสถานที่อื่น หรือช่วงอายุอื่นๆ สาเหตุที่ผู้ทำการวิจัยได้เลือกใช้เตยหอม เนื่องจากใบเตยหอมเป็นพืชท้องถิ่นของไทย ซึ่งหาได้ง่าย และราคาถูก อีกทั้งมีงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากรากเตยหอมและพบว่ามีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยสารออกฤทธิ์คือ 4-hydroxybenzoic acid (9) แต่มีความเป็นพิษต่อตับ 4-hydroxybenzoic acid ไม่พบในสารสกัดจากใบเตยหอม ผู้วิจัยต้องการศึกษาว่าสารสกัดจากใบเตยหอมจะมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เช่นเดียวกับส่วนรากหรือไม่อย่างไร มีการศึกษานำร่อง (11) โดยดูผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดในคนสุขภาพดี (n=9) พบว่าชาเตยหอมสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.008$) แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนั้น ใช้ปริมาณกลุ่มตัวอย่างน้อยมาก จึงอาจไม่เป็นไปตามหลักทางสถิติ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเพิ่มปริมาณอาสาสมัครขึ้นเป็นจำนวน 30 คน ศึกษาผลการลดระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยวิธี OGTT มาตรฐาน เปรียบเทียบก่อนและหลังดื่มชาเตยหอม พบว่าชาเตยหอม (30 มิลลิกรัมในน้ำร้อน 300 มิลลิลิตร) สามารถลดระดับกลูโคสในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) โดยสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ที่ทำการทดสอบได้ถึง 83.33 เปอร์เซ็นต์ จากผู้ทดสอบทั้งหมดคิดเป็น 100% (30 คน) ซึ่งการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษานำร่องที่มีผู้เคยได้ทำไว้

เพื่อให้ทราบถึงกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ผู้วิจัยได้นำส่วนใบเตยหอมมาสกัดแบบหยาบด้วยวิธีต่างๆ เทียบเคียงกับการปรุงยาแบบไทย โดยแบ่งเป็น 4 ส่วน ตามลำดับดังนี้ Method 1 คือ ใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส Method 2 คือ ใบเตยหอมสดสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) Method 3 คือ ใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียสสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส Method 4 คือ ใบเตยหอมที่อบแห้งที่ 42 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากราคาต้นทุนไม่แพง และสามารถฝึกทักษะในการสกัดสมุนไพร ซึ่งสารสมุนไพรหากอยู่ในสภาพสารเดี่ยวหรือสารบริสุทธิ์อาจจะไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์อ่อน หรืออาจมีพิษต่อร่างกายได้ การสกัด

ด้วยน้ำหรือ เอทานอล เนื่องจากปลอดภัยหากจะนำมาใช้ในการรับประทาน นอกจากนั้นยังเคยมีการศึกษาพบว่า ในใบเตยหอมมีกลุ่มของ geraniol ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (112) ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดก็เป็นได้

สารที่สกัดจากน้ำมีข้อดีคือ น้ำเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก เมื่อทำเป็นผงโดยวิธีการ Lyophiliation แล้ว สารที่ได้จะสามารถละลายได้ทั้งหมดและนำไปใช้ได้สะดวกหากเปรียบเทียบกับเอทานอลหรือตัวทำละลายชนิดอื่น และมีความปลอดภัยสูงเมื่อทดสอบกับเซลล์ แต่มีข้อเสียคือสารที่ได้จะมีสารจำพวกแป้งและน้ำตาลออกมาซึ่งทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ง่าย ดังนั้นการแก้ปัญหาคือ ก่อนใช้ต้องกรองสารด้วยตัวกรองที่มีความสามารถในการดักจับแบคทีเรีย เชื้อรา (113)

เอทานอล เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความจำเพาะ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ข้อเสียของการสกัดด้วยเอทานอลคือ สารที่สกัดได้ต้องใช้เวลานานในการละลายหรือละลายได้ไม่หมดใน DMSO ซึ่งเป็นสารที่สามารถละลายสารที่มีขั้วหรือไม่มีขั้วออกมากได้ดี และนิยมใช้ในการศึกษาแบบ *in vitro* (cell culture) ดังนั้นสารที่ได้ออกมาจะได้ความเข้มข้นที่ไม่ตรงตามความเป็นจริง และมีข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นที่ต้องการใช้ทดสอบกับเซลล์เนื่องจากมีความเป็นพิษสูง เพราะ DMSO ที่ยอมรับให้ใช้ในการทดสอบกับ cell culture คือต้องมีปริมาณ DMSO ไม่เกิน 0.1% DMSO ดังนั้นความเข้มข้นที่สามารถใช้ได้จะเริ่มต้นที่ไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบว่าในใบเตยนั้นจะให้สารประกอบประเภทฟีนอลิก แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ถ้าสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ผลพบว่าใน Method 4 ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด ในขณะที่ Method 2 นั้น มีน้อยที่สุด เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ผลที่ได้เหมือนกันคือ Method 4 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด ในขณะที่ Method 2 นั้น มีปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดสดเหมือนกันแล้ว จะพบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณของสารที่ได้ แสดงว่าสารที่ได้ออกมานั้นมีคุณสมบัติที่ทนความร้อน นอกจากนั้นทางผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ในสมุนไพรแบบสดและแบบแห้ง พบว่าแบบแห้งนั้นให้สารสกัดออกมาในปริมาณที่มากกว่า เนื่องจากในใบเตยนั้นมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก เมื่อนำไปตากแห้งทำให้น้ำระเหยออกไป ทำให้ในสมุนไพรแบบแห้งนั้นมีสารมากกว่าเมื่อเทียบในน้ำหนักที่เท่ากัน และปริมาณของสารสกัดทั้งฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ก็ให้ผลมากที่สุดออกมาไปในทิศทางเดียวกัน คือ สกัดด้วยเตยหอมแบบแห้งและสกัดด้วย แอลกอฮอล์ และไม่เสื่อมสภาพเมื่อเจอความร้อนสูงที่ 90 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษา Robertson (2006) พบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่มากในพืชสามารถลดภาวะ Oxidative Strsst ที่มีมากในคนเป็น

เบาหวาน เนื่องจากในภาวะน้ำตาลสูงเนื้อเยื่อในร่างกายจะเกิดการอักเสบได้ง่าย ทำให้ไซโตไคน์เช่น TNFα หลั่งออกมามากและเกิดการอักเสบได้ง่าย ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะไปช่วยป้องกันและลดการอักเสบ (114) ดังนั้นจึงทำการวัดปริมาณสารกลุ่มฟินอลิกและฟลาโวนอยด์ในเตยหอมว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใดผลที่ได้รับคือ Method 4 ที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าฟินอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 115.13 ± 0.94 มิลลิกรัมของแกลลิคและ15.52 ± 0.12 มิลลิกรัมของเควอซิทิน เมื่อวัดปริมาณสารกลุ่มฟินอลิกและฟลาโวนอยด์ Method 2 ที่สกัดใบเตยหอมสดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสวัดปริมาณสารกลุ่มฟินอลิกและฟลาโวนอยด์ได้น้อยที่สุดคือ 72.91 ± 2.29 มิลลิกรัมของแกลลิค และ 10.41 ± 0.25 มิลลิกรัมของเควอซิทิน

ต่อจากนั้นทางผู้วิจัยได้นำสารสกัดจากเตยหอมที่ได้ ไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay พบว่าความสามารถในการต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระของทั้ง 2 วิธี ไปในทางเดียวกัน ก็คือ แปรผันไปตามปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ที่พบในสารสกัด ที่ผู้วิจัยได้ใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ในการทดสอบ ก็เพื่อยืนยันความถูกต้องของการทดลอง และสรุปได้ว่าสารสกัดในใบเตยหอมมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์หรือฟื้นฟูสภาพเซลล์ซึ่งเป็นผลดีของผู้ป่วยเบาหวาน (115)

เพื่อศึกษากลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเตยหอมในเซลล์เพาะเลี้ยง ในขั้นแรกจึงต้องทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเตยหอม ต่อเซลล์ตับอ่อน (RINm5F) และเซลล์กล้ามเนื้อ (L6) เสียก่อนด้วยวิธี MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ทำให้เซลล์ตายไปอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสารสกัดจากเอทานอลที่มีผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อตายอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลจากการทดลองนี้ ทำให้ผู้วิจัยสามารถเลือกความเข้มข้นของสารที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อๆไปได้ คือ เลือกความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดเกิน 80 เปอร์เซ็นต์มาใช้ทดสอบต่อไป ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 25, 12.5, 6.25, 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องใช้ต่อไปแล้วเพื่อใช้ในการทดสอบกลไกการกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนหลั่งอินซูลินและกลไกกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าเซลล์ต่อไป

ผู้วิจัยได้ศึกษากลไกทั้งสามกลไกคือ ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม α – glucosidase กลไกการกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนหลั่งอินซูลินและกลไกกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าเซลล์เนื่องจากเลียนแบบกลไกออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในผู้ป่วยเบาหวานในปัจจุบัน ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม α - glucosidase เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่

ในการย่อยแป้งและน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากนั้นร่างกายจะดูดซึมน้ำตาลและนำไปใช้ ดังนั้นหากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ จะทำให้การย่อยสลายแป้งและน้ำตาลเกิดขึ้นช้าลง ส่งผลให้การดูดซึมของน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดลดลง จึงเป็นผลดีกับผู้ป่วยเบาหวาน (116) จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดใบเตยหอมสามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้ โดย Method 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสมากที่สุด รองลงมาคือ Method 1, 2 และ 4 ตามลำดับ ส่วนความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสของสารสกัดใบเตยหอมนั้นโดย Method 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาคือ Method 1, 2 และ 4 ตามลำดับเช่นเดียวกับการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส ซึ่งกลไกนี้สามารถพบได้ในสมุนไพรต้านเบาหวานหลายชนิด เช่น *Vaccinium arctostaphylos* (117), *Tournefortia hartwegiana* (118) *Alstonia scholaris* (119)

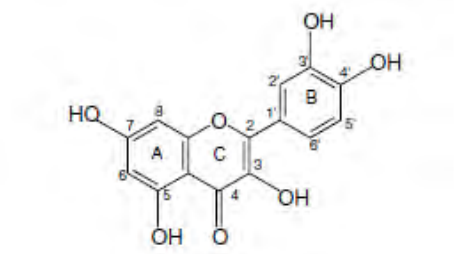
เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบเตยหอมว่ามีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อน (RINm5F) หลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้นหรือไม่ ผลที่ได้คือ ใน Method 3 และ Method 4 สามารถกระตุ้นเซลล์ตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินได้เพิ่มมากขึ้น และเป็นการเพิ่มขึ้นแบบ dose-dependent ส่วน Method 1 Method 2 ไม่กระตุ้นเซลล์ตับอ่อนหลั่งอินซูลินอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นเพราะสารสำคัญ เช่น สารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในใบสดมีน้อยซึ่งได้ผลเช่นดียวกับ ชัชฎาพร องอาจ (2553) และกลไกนี้สามารถพบได้ในสมุนไพรต้านเบาหวานหลายชนิด เช่น *Argyrolobium roseum (97), Spalathus linearis* (63, 120) *Scoparia dulcis* (120)

ในขั้นตอนสุดท้ายนำสารสกัดนี้ ไปทดสอบต่ออีกว่า สารสกัดนี้สามารถกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าเซลล์เพิ่มขึ้นได้หรือไม่ พบว่า Method 2 ที่ความเข้มข้น 3.125, 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มกระตุ้นกลไกการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มขึ้นแต่ไม่ชัดเจน กลไกนี้สามารถพบได้ในสมุนไพรต้านเบาหวานหลายชนิด เช่น *Ganoderma lucidum* (121) Berberine (122,123) *Saccharomyces cerevisiae* (123)

สรุปได้ว่าการสกัดสารด้วยวิธีแตกต่างกัน จะมีการกระตุ้นในกลไกที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าการสกัดสารด้วยวิธีที่แตกต่างกันจะได้สารออกมาหลายชนิด ถ้าจะศึกษากลไกที่ชัดเจนกว่านี้จำเป็นต้องมีการแยกสารสกัดออกมากเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์

จากการศึกษาสารสำคัญในใบเตยหอม อันประกอบด้วย essential oils, caroteniod, tocopherols, tocotrienols, alkaloid fatty acids, esters non-specific lipid transfer protein และ quercetin (87 ,124) ซึ่ง quercetin มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone เป็นสารที่พบในธรรมชาติ เช่น ใบของพืช เป็นสารในกลุ่ม polyphenolic favoniod มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน benzene สองวง (A,B) เชื่อมต่อ

กับ pyran หรือ pyrone (C) มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของ quercetin คือ เป็นสารอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ต้านมะเร็ง และป้องกันโรคหัวใจ quercetin มีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากโครงสร้างของสารนี้ประกอบด้วยหมู่ hydroxyl (OH) บริเวณ 3, 5, 7, 3', และ 4' และ แคทีคอล B ring (125) แสดงดังภาพ



ภาพที่ 5.1 โครงสร้างของ quercetin (125)

Tadera et al (2005) ศึกษาถึงสาร quercetin สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม α – glucosidase โดยการทดลองนี้ทดสอบสาร favonoids ทั้ง 6 กลุ่ม คือ Flavonol, Flavone, Flavanone, Isoflavone, Flavone-3-ol และ Anthocyanidin ซึ่งแต่ละตัวก็มีสารแต่ละกลุ่ม พบว่าสาร quercetin ซึ่งเป็นตัวแทนสารในกลุ่ม Flavoniod มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม α – glucosidase แบบ non-compettitive (126)

Youl (2010) ศึกษาถึงสาร quercetin สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน โดย quercetin จะกระตุ้นการทำงานของ ERK ½ ให้มีการเพิ่ม Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์มากขึ้น หรือไปยับยั้ง sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}- ATPase (SERCA) pump ซึ่งมีหน้าที่นำ Ca^{2+} ออกจากเซลล์ (127)

Strobel และคณะ (2005) และ Bazuine และคณะ (2005) พบว่าสาร apigenin, luteolin, kaempferol, quercetin, genistein, และ fisetin ยับยั้งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ทั้งในหนู และเซลล์ไขมันของหนู (128, 129) ส่วน Method 2 ที่อาจมีการกระตุ้นให้มีการนำกลูโคสเข้าเซลล์นั้นอาจเกิดจากสารสกัดที่ได้จากเตยหอมนั้นมีสารสำคัญหลายตัวผสมอยู่ ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบการนำกลูโคสเข้าเซลล์จะพบว่ามีบาง Method มีแนวโน้มสามารถกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าที่กระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์นั้นจะเป็นสารที่ไม่ทนความร้อน เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกันกับ Method 1 ที่ต้มและสกัดที่ 90 องศาเซลเซียส ไม่พบสารนั้น การศึกษาต่อจากนี้จึงควรนำสารสกัดจาก Method 1 และ Method 2 มาเปรียบเทียบดูว่ามีสารใดแตกต่างกัน โดยการนำมาแยกสารสกัดเป็น fraction โดยใช้ Thin layer chromatography (TLC)โดยใช้ High-performance liquid chromatography (HPLC) น่าจะสามารถ วิเคราะห์ผลได้ชัดเจนขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัย ไม่ได้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ดังนั้นจึงควรทำการแยกสารออกฤทธิ์จากใบเตยหอม อาจด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อที่จะได้สารออกฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการดูระดับกลไกที่ลึกลงไปมากกว่านี้

ในการศึกษากลไกของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ α – glucosidase ควรศึกษาต่อไปว่ามีการยับยั้งเอนไซม์ในรูปแบบใด competitive หรือ uncompetitive

ในการศึกษากลไกของสารสกัดในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าเซลล์ หากต้องการให้ได้ผลที่ชัดเจนขึ้น ควรปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหนูด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกลูโคสในปริมาณต่ำ เพื่อเซลล์จะได้ตอบสนองต่อกลูโคสที่มากขึ้น
2. เปลี่ยนเอนไซม์ G6PDH จากแบคทีเรียชนิด Leuconostoc mescentriodes เป็นยีสต์ชนิด Candida utilis (tolura yeast) ซึ่งจะทำให้แสงฟลูออเรสเซ็นต์มีระยะเวลาในการตรวจวัดนานขึ้น
3. เปลี่ยนเซลล์จากเซลล์กล้ามเนื้อเป็นเซลล์ไขมัน เนื่องจากเซลล์ไขมันมี Glucose transporter 1 (GLUT1) มากกว่าเซลล์กล้ามเนื้อ ทำให้เห็นผลชัดเจนมากขึ้น

นำสารสกัดไปศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไปเพื่อศึกษาถึงพิษของสารสกัดว่าจะมีพิษเหมือนกับสารสกัดในรากหรือไม่ เพื่อจะได้นำสารไปใช้ในคนต่อไป

ชาที่ดื่มในคนยังเป็นการดื่มในระยะสั้นดังนั้นควรมีการทดสอบในระยะเวลานานกว่านี้ว่ามีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดหรือไม่ และควรทดสอบในผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

รายการอ้างอิง

(1.) Wild, SH., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 27,10 (2004) : 2569.

(2.) Honeycutt, A. et al. A dynamic Markov model for forecasting diabetes prevalence in the United States through 2050. Health Care Management Science. 6,3 (2003) : 155-64.

(3.) Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. Global prevalence of diabetes. DiabetesCare. 27,5 (2004) : 1047.

(4.) Wild, S. et al. prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 27,10 (2005) : 25-69.

(5.) Knowler, W. et al. Diabetes Prevention Program Research Group 2002 Reduction in the incidence of type 2diabetes with lifestyle intervention or metformin. N Engl J Med. 346 (2002) : 393-403.

(6.) Scheen, A. Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes Diabetes & metabolism. 33,1 (2007) : 3-12.

(7.) Yeh, G., Eisenberg, D., Kaptchuk, T., and Phillips, R. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. Diabetes Care. 26,4 (2003) : 1277.

(8.) Peungvicha P, Thirawarapan S, Watanabe H. Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of Pandanus odorus root. The Japanese Journal of Pharmacology. 78, 3 (1998) : 395-8.

(9.) Peungvicha, P. et al. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of Pandanus odorus root. Journal of Ethnopharmacology. 62,1 (1998):79-84.

(10.) Peungvicha Peungvicha. Toxicity and Phytochemical Screening of Water extract of Pandanus Odorus Ridl. The Japanese Society for Promotion of Science(JSPS) National Research Council of Thailand (NRCT). 1992.

(11.) อัญชลี เฉียบฉลาด. ฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากเตยหอมและมะระขี้นก.(2550) : 56. (อัดสำเนา)

(12.) Hocking, M., Crase, J., Rayner, P., and Nattrass, M. Metabolic rhythms in adolescents with diabetes during treatment with porcine or human insulin. Archives of disease in childhood. 61, 4 (1986) : 341.

(13.) Hanis, C. et al. A genome–wide search for human non–insulin–dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. Nature genetics. 13, 2 (1996) : 161-6.

(14.) Bellann - Chantelot, C. et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1 (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. Diabetes. 54,11 (2005) : 3126.

(15.) Froguel, P. et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature. 356, 6365 (1992) : 162-4.

(16.) Chen, J., Knowles, HJ., Hebert, JL., and Hackett, BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. Journal of Clinical Investigation. 102, 6 (1998) : 1077.

(17.) Matsunaga, N., Kohno, Y., Kakimoto, K., Hayashi, A., Koyanagi, S., and Ohdo S. Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes. Toxicology. 280, 3 (2011) : 144-51.

(18.) Buchanan, TA., and Xiang, AH. Gestational diabetes mellitus. J Clin Invest. 115,3 (2005) : 485- 91.

(19.) Wolf, E., Spencer, K., and Cudworth, A. The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. Diabetologia. 24, 4 (1983) : 224-30.

(20.) Platz, P. et al. HLA-D and-DR antigens in genetic analysis of insulin dependent diabetes mellitus. Diabetologia. 21,2 (1981) : 108-15.

(21.) Pociot, F. et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF a and TNF 0 by human mononuclear cells: a possible link to insulin dependent diabetes mellitus. European journal of immunology. 23, 1 (1993) : 224-31.

(22.) Caillat-Zucman, S. et al. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Clinical Investigation. 90, 6 (1992) : 2242.

(23.) Huang, HS., and Peng, JT. HLA-encoded susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus is determined by DR and DQ genes as well as their linkage disequilibria in a Chinese population. Human immunology. 44, 4 (1995) : 210-9.

(24.) Khalil, I. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Clinical Investigation. 85, 4 (1990) : 1315.

(25.) Roep, BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. Diabetologia. 46, 3 (2003) : 305-21.

(26.) Conrad, B., Weissmahr, RN., B ni, J., Arcari, R., Sch pbach, J., and Mach, B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. Cell. 90,2 (1997) : 303-13.

(27.) Vreugdenhil, G., Geluk, A., Ottenhoff, T., Melchers, W., Roep, B., and Galama, J. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. Diabetologia.41, 1 (1998) : 40-6.

(28.) Myers, MA., et al. Conformational epitopes on the diabetes autoantigen GAD65 identified by peptide phage display and molecular modeling. The Journal of Immunology. 165, 7 (2000) : 3830.

(29.) kerblom, HK., Vaarala, O., Hy ty, H., Ilonen, J., and Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. American journal of medical genetics. 115(1)2002;:18-29.

(30.) Bingley, PJ., Douek, IF., Rogers, CA., and Gale EAM. Influence of maternal age at delivery and birth order on risk of type 1 diabetes in childhood: prospective population based family study. Bmj. 321, 7258 (2000) : 420.

(31.) Kahn, BB., and Flier, JS. Obesity and insulin resistance. Journal of Clinical Investigation. 106, 4 (2000) : 473-81.

(32.) Elbein, SC. The genetics of human noninsulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. The Journal of nutrition. 127, 9 (1997) : 1891.

(33.) Horikawa, Y. et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. Naturegenetics. 26, 2 (2000) : 163-75.

(34.) Bajaj, M., and DeFronzo, RA. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. Journal of nuclear cardiology. 10, 3 (2003) : 311-23.

(35.) Boden, G., and Shulman, G. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes : defining their role in the development of insulin resistance and cell dysfunction. European Journal of Clinical Investigation. 32, (2002) : 14-23.

(36.) Miyazaki, Y., Glass, L., Triplitt, C., Wajcberg, E., Mandarino, LJ., and DeFronzo, RA. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism. 283, 6 (2002) : 1135.

(37.) Hotamisligi,l GS., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., and White M. Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- -and obesity - induced insulin resistance. Science. 271, 5249 (1996) : 665.

(38.) Hotamisligil, G. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 107, 2 (1999) : 119-25.

(39.) Ferrannini, E., Vichi, S., Beck-Nielsen, H., Laakso, M., Paolisso, G., and Smith, U. Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Diabetes. 45, 7 (1996) : 947.

(40.) Dunder, K., Lind, L., Zethelius, B., Berglund, L., and Lithell, H. Increase in blood glucose concentration during antihypertensive treatment as a predictor of myocardial infarction: population based cohort study. Bmj. 326, 7391 (2003) : 681.

(41.) Ross, R. et al. Exercise-Induced Reduction in Obesity and Insulin Resistance in Women: a Randomized Controlled Trial* Obesity. 12, 5 (2004) : 789-98.

(42.) Mi, J., Law, C., Zhang, KL., Osmond, C., Stein, C., and Barker, D. Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. Annals of internal medicine. 132, 4 (2000) : 253.

(43.) Conwell, LS., Trost, SG., Brown, WJ., and Batch, JA. Indexes of insulin resistance and secretion in obese children and adolescents. Diabetes Care. 27,2 (2004) : 314.

(44.) Hammes, H., Martin S., Federlin, K., Geisen, K., and Brownlee, M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88, 24 (1991) : 11555.

(45.) Dogru, M., Katakami, C., and Inoue, M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin - dependent diabetes mellitus* 1. Ophthalmology. 108,3 (2001) : 586-92.

(46.) Sharma, K., McCue, P., and Dunn, S. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. American Journal of Physiology- Renal Physiology. 284, 6 (2003) : 1138.

(47.) Vinik, A., Park, T., Stansberry, K., AND Pittenger, G. Diabetic neuropathies. Diabetologia. 43, 8 (2000) : 957-73.

(48.) Steinberger, J., AND Daniels, S. Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). Circulation. 107, 10 (2003) : 1448.

(49.) Jolliffe C, AND Janssen, I. Development of age-specific adolescent metabolic syndrome criteria that are linked to the Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation criteria. Journal of the American College of Cardiology. 49,8 (2007) : 891-8.

(50.) ณัฐวุฒิ สิบหมู่. เภสัชวิทยาเนื้อหาสำคัญและแบบฝึกหัด. กรุงเทพมหานคร : โฮลิสติก พับลิชชิ่ง, 2552.

(51.) Palmer, JP. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. Science. 222, 4630 (1983) : 1337.

(52.) Donahoe, C., Lin, D., Kirschenbaum, D., and Keesey, R. Metabolic consequences of dieting and exercise in the treatment of obesity. Journal of consulting and clinical psychology. 52, 5 (1984) : 827-36.

(53.) Inzucchi, S. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. 287,3 (2002) : 360.

(54.) Seo, W. et al. Sulfonamide chalcone as a new class of [alpha]-glucosidase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 15, 24 (2005) : 5514-6.

(55.) Lee, DS., and Lee, SH. Genistein, a soy isoflavone, is a potent [alpha]-glucosidase inhibitor. FEBS letters. 501,1 (2001) : 84-6.

(56.) Van de Laar, F., Lucassen, P., Akkermans, R., Van de Lisdonk, E., Rutten, G., and Van Weel, C. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. status and date: Edited(no change to conclusions). 1, (2005)

(57.) Fosset, M., De Weille, J., Green, R., Schmid-Antomarchi, H., and Lazdunski, M. Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K+ channels. Journal of Biological Chemistry. 263, 17(1988) : 7933.

(58.) Olefsky, JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. Journal of Clinical Investigation. 106, 4 (2000) : 467-72.

(59.) Adams, J., Clark, J., Ireland, J., Kesson, C., and Watson, W. Malabsorption of vitamin B 12 and intrinsic factor secretion during biguanide therapy. Diabetologia. 24,1 (1983) : 16-8.

(60.) Scheen, A. Thiazolidinediones and liver toxicity. Diabetes & metabolism. 27, 3 (2001).

(61.) Kim, JO., Kim, KS., Lee, GD., and Kwon, JH. Antihyperglycemic and Antioxidative Effects of New Herbal Formula in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Journal of medicinal food. 12, 4 (2009) : 728-35.

(62.) Yoshikawa, M., Morikawa, T., Matsuda, H., Tanabe, G., and Muraoka, O. Absolute Stereostructure of Potent [alpha]-Glucosidase Inhibitor, Salacinol, with Unique Thiosugar Sulfonium Sulfate Inner Salt Structure from Salacia reticulata. Bioorganic & medicinalchemistry. 10, 5 (2002) : 1547-54.

(63.) Kawano, A., Nakamura, H., Hata, S., Minakawa, M., Miura, Y., and Yagasaki, K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from Aspalathus linearis, in type 2 diabetic model db/db mice. Phytomedicine. 16, 5 (2009) : 437-43.

(64.) Tan, MJ. et al. Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chemistry & biology. 15, 3 (2008) : 263-73.

(65.) Kesari, AN., Gupta, RK., Singh, SK., Diwakar, S., and Watal, G. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Aegle marmelos seed extract in normal and diabetic rats. Journal of ethnopharmacology. 107,3 (2006) : 374-9.

(66.) Wakte, KV., Thengane, RJ., Jawali, N., and Nadaf, AB. Optimization of HS-SPME conditions for quantification of 2-acetyl-1-pyrroline and study of other volatiles in Pandanus amaryllifolius Roxb. Food Chemistry. 121, 2 (2010) : 595-600.

(67.) Peana, AT., D'Aquila, PS., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., and Moretti, MDL. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Phytomedicine. 9, 8 (2002) : 721-6.

(68.) Yan, PS., and White, PJ. Linalyl acetate and other compounds with related structures as antioxidants in heated soybean oil. Journal of agricultural and food chemistry. 38, 10 (1990) : 1904-8.

(69.) Squires, MJ. Composition to Treat Herpes, Pseudomonas, Staph, Hepatitis and Other Infectious Diseases. Google Patents. 2008.

(70.) Carnesecchi, S., et al. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 303, 2 (2002) : 711.

(71.) Kim, J., Marshall, M., Cornell, J., and Wei, C. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against Salmonella typhimurium in culture medium and on fish cubes. Journal of food science. 60,6 (1995) : 1364-8.

(72.) Frome, B. Diagnosis and treatment of various neuralgias. US Patent 260,313 (1993).

(73.) Garten, W. et al. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. Biochimie. 76, 3-4 (1994) : 217-25.

(74.) Von Angerer, E., Kager, M., and Maucher, A. Antitumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. Journal of cancer research and clinical oncology. 120 (1994) : 14-6.

(75.) Chaudhry, PS., Cabrera, J., Juliani, HR., and Varma, SD. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. Biochemical Pharmacology. 32, 13 (1983) : 1995-8.

(76.) Fylaktakidou, KC., Hadjipavlou-Litina, DJ., Litinas, KE., AND Nicolaides, DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. Current pharmaceutical design. 10, 30 (2004) : 3813-33.

(77.) Poole, CF., and Poole, SK. Modern thin-layer chromatography. Analytical Chemistry. 61, 22 (1989) : 1257 69.

(78.) Zishen, W. A SURVEY OF THE STUDY OF SCHIFF BASE METAI COMPLEXES AS ANTI-CANCER AGENTS [J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences). (1983) : 1.

(79.) Routray, W., and Rayaguru, K. Chemical Constituents and Post-Harvest Prospects of Pandanus amaryllifolius Leaves: A Review. Food Reviews International. 26, 3 (2010) : 230-45.

(80.) Ooi, LSM., Sun, SSM., and Ooi, VEC. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of Pandanus amaryllifolius (Pandanaceae). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 36, 8 (2004) : 1440-6.

(81.) Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, RJ., Wigdahl, B., and Parveen, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. Virus research. 131, 2 (2008) : 111-20.

(82.) Peungvicha, P., Thirawarapan, S., and Watanabe, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a water extract of Pandanus odorus Ridl. roots in streptozotocin-diabetic rats. ASIA PACIFIC JOURNAL OF PHARMACOLOGY. 12, (1997) : 3-8.

(83.) Peungvicha, P., Wongkrajang, Y., Ruangsomboon, O., Suvitayavat W. Hypoglycemic effect of water of extract of the root of Pandanus odorus II: in alloxan diabetic rats. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science. 17, 2 (1990) : 29–35.

(84.) Nor, M. Antioxidative Activities of Selected Malaysian Herb Extracts during Accelerated Oxidation Test and Deep-Fat Frying. (2008) : 1 .

(85.) Lee, BL., Su, J., and Ong, CN. Monomeric C18 chromatographic method for the liquid chromatographic determination of lipophilic antioxidants in plants. Journal of Chromatography A. 1048, 2 (2004) : 263-7.

(86.) Inada, A., et al. Unusual cyclolanostanes from leaves of Pandanus boninensis. Phytochemistry. 66, 23 (2005) : 2729-33.

(87.) Miean, KH., and Mohamed, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. Journal of agricultural and food chemistry. 49, 6 (2001) : 3106-12.

(88.) Vongsawasdi, P., Nopharatana, M., Sasaeng K., Tantek, P., and Wongphaisitpisan, S. Kinetics of chlorophyll degradation in pandanus juice during pasteurization. (2010). (Typewritten)

(89.) Rayaguru, K., and Routray W. Effect of drying conditions on drying kinetics and quality of aromatic Pandanus amaryllifolius leaves. Journal of Food Science and Technology.1-6 (2009).

(90.) Takayama, H., Ichikawa, T., Kitajima, M., Aimi, N., Lopez, D., and Nonato, MG. A new alkaloid, pandanamine; finding of an anticipated biogenetic intermediate in Pandanus amaryllifolius Roxb. Tetrahedron Letters. 42, 16 (2001) : 2995-6.

(91.) Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants: Lavoisier Publishing (1995).

(92.) Chesson, A. A Review: Maceration in Relation to the Post harvest Handling and Processing of Plant Material. Journal of Applied Microbiology. 48, 1 (1980) : 1-45.

(93.) Bauhofer, W., and Kovacs, JZ. A review and analysis of electrical percolation in carbon nanotube polymer composites. Composites Science and Technology. 69, 10 (2009) : 1486-98.

(94.) Chaintreau, A. Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity—review. Flavour and fragrance journal. 16, 2 (2001) : 136-48.

(95.) Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A., Barroso, J., Coelho, J., and Palavra, A. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. Food Chemistry.111, 1 (2008) : 197-203.

(96.) Eltz, T. et al. Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees.Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 274,1627 (2007) : 2843.

(97.) Ahmed, Z., Bhagat, A., Gupta, OP., Gupta, KK., Ram, G., and Qazi, GN. Insulin secretagogue fraction of Argyrolobium roseum. Diabetologia Croatica. 37 (2008) : 1.

(98.) Yamamoto, N., Sato, T., Kawasaki, K., Murosaki, S., and Yamamoto, Y. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. Analytical biochemistry. 351, 1 (2006) : 139-45.

(99.) Prabhakar, PK., and Doble, M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. Phytomedicine. 16,12 (2009) : 1119-26.

(100.) Chang, L., Yen, W., Huang, S., and Duh, P.. Antioxidant activity of sesame coat. Food chemistry. 78,3 (2002) : 347-54.

(101.) Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., and Sato, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. Chemical & pharmaceutical bulletin. 42,8 (1994) : 1663.

(102.) Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 26, 9-10 (1999) : 1231-7.

(103.) วชิระ จิระรัตนรังษี. Effect of heat processing on the antioxidant properties of Ma-Kaieng juice. ในรายงานผลงานโครงงานที่ได้รับทุน IRPUS ประจำปี 2548. (2549).

(104.) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 65,1-2 (1983) : 55-63.

(105.) Mwanza, M., Kametler, L., Bonai, A., Rajli, V., Kovacs, M., and Dutton, MF. The cytotoxic effect of fumonisin B 1 and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using the Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) assay. Mycotoxin Research. 25, 4 (2009) : 233-8.

(106.) Kennedy, J., Chaplin, M., and Stacey, M. Periodate oxidation, acid hydrolysis, and structure-activity relationships of human-pituitary, follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin. Carbohydrate Research. 36, 2 (1974) : 369-77.

(107.) Venardos, D., Klei, HE., and Sundstrom, DW. Conversion of cellobiose to glucose using immobilized [beta]-glucosidase reactors. Enzyme and Microbial Technology. 2, 2 (1980) : 112-6.

(108.) วิน เชยชมศรี. ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://pirun.ku.ac.th/~fsciwcc/immune8.pdf [2553,พฤษภาคม 1]

(109.) Tiedge, M., H hne, M., and Lenzen, S. Insulin secretion, insulin content and glucose phosphorylation in RINm5F insulinoma cells after transfection with human GLUT2 glucose-transporter cDNA. Biochemical Journal. 296, (1993) : 113.

(110.) Mercodia, AB. Mercodia High Range Rat Insulin ELISA Enzyme immunoassay. [Online]. 2006. Available from : http://www.progeninc.co.kr/pdf/Insulin%20Rat%20high-range%20ELISA.pdf [2006, May 19]

(111.) Chiabchalard, A., Tencomnao, T., and Santiyanont, R. Effect of Gymnema inodorum on postprandial peak plasma glucose levels in healthy human. African Journal of Biotechnology. 9, 7 (2010) : 1079-85.

(112.) Barahona, D., Pfromm, PH., and Rezac, ME. Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid [bmim] PF6. Biotechnology and bioengineering. 93, 2 (2006) : 318-24.

(113.) รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

(114.) Robertson, R. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. Current opinion in Pharmacology. 6, 6 (2006) : 615-9.

(115.) Esmaeili, MA., Zohari, F., and Sadeghi, H. Antioxidant and Protective Effects of Major Flavonoids from Teucrium polium on?-Cell Destruction in a Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. Planta Med. 75, (2009) : 1418-20.

(116.) van de Laar, FA., Lucassen, PL., Akkermans, RP., van de Lisdonk, EH., Rutten, GE., van and Weel, C. -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 28, 1 (2005) : 154.

(117.) Feshani, AM., Kouhsari, SM., and Mohammadi, S. Vaccinium arctostaphylos, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. Journal of ethnopharmacology. (2010).

(118.) Ortiz-Andrade, R. et al. [alpha]-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from Tournefortia hartwegiana: An anti-hyperglycemic agent. Journal of ethnopharmacology. 109,1 (2007) : 48-53.

(119.) Jong-Anurakkun, N., Bhandari, MR., and Kawabata, J. [alpha]-Glucosidase inhibitors from Devil tree (Alstonia scholaris). Food Chemistry. 103, 4 (2007) : 1319-23.

(120.) Latha, M., Par,i L., Sitasawad, S., and Bhonde, R. Insulin-secretagogue activity and cytoprotective role of the traditional antidiabetic plant Scoparia dulcis (Sweet Broomweed). Life sciences. 75, 16 (2004) : 2003-14.

(121.) Jung, KH. et al. Ganoderma lucidum extract stimulates glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. KOREAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY. 10 (2006).

(122.) Cheng, Z. et al. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1760, 11 (2006) : 682-9.

(123.) Bisson, LF., and Fraenkel, DG. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 80, 6 (1983) : 1730.

(124.) Nor, FM., Mohamed, S., Idris, NA., and Ismail, R. Antioxidative properties of Pandanus amaryllifolius leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chemistry. 110, 2 (2008) : 319-27.

(125.) Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J., Flamm, G., Williams, G., and Lines, T. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food and Chemical Toxicology. 45, 11 (2007) : 2179-205.

(126.) TADERA, K., MINAMI, Y., TAKAMATSU, K., MATSUOKA, T. Inhibition of - glucosidase and - amylase by flavonoids. Journal of nutritional science and vitaminology. 52, 2 (2006) : 149-53.

(127.) Youl, E. et al. Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS 1 pancreatic cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. British Journal of Pharmacology. 161, 4 (2010) : 799-814.

(128.) Strobel, P., Allard, C., Perez-Acle, T., Calderon, R., Aldunate, R., and Leighton, F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes.Biochemical Journal. 386, (2005) : 471.

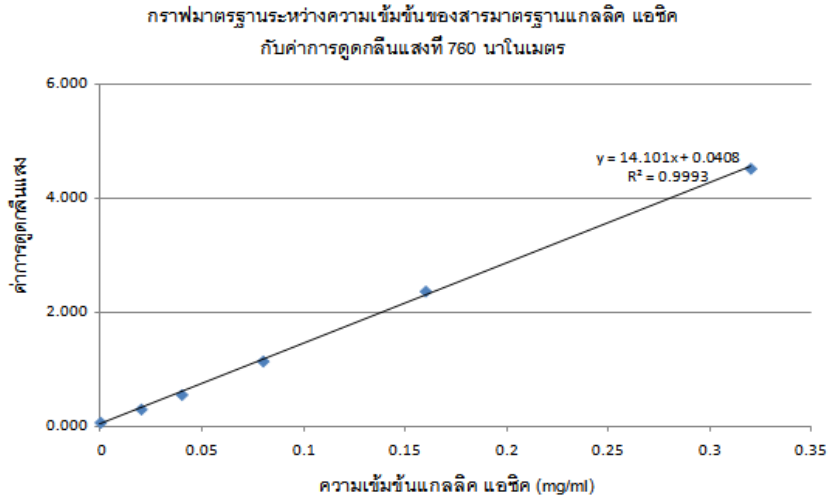
(129.) Bazuine, M., van den Broek, PJA., and Maassen, J. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochemical and biophysical research communications. 326, 2 (2005) : 511-4.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

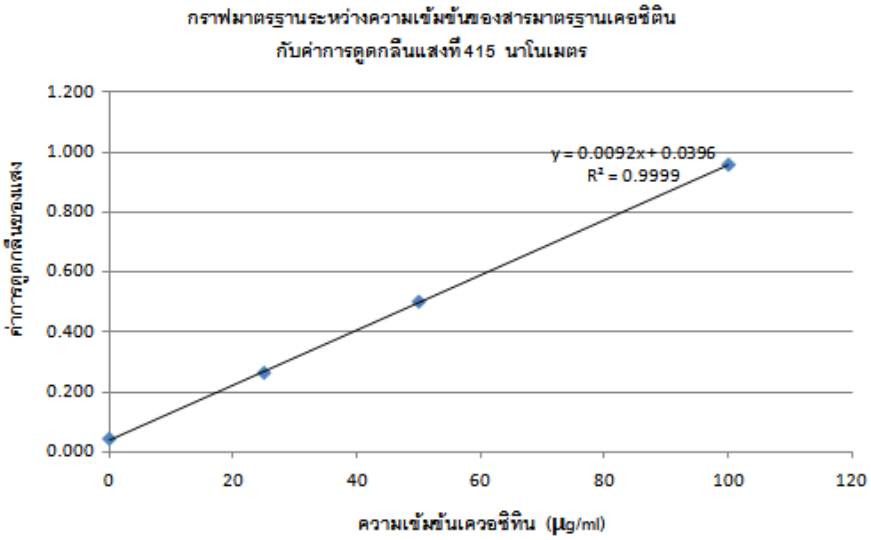
ข้อมูลจากการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเตยหอม



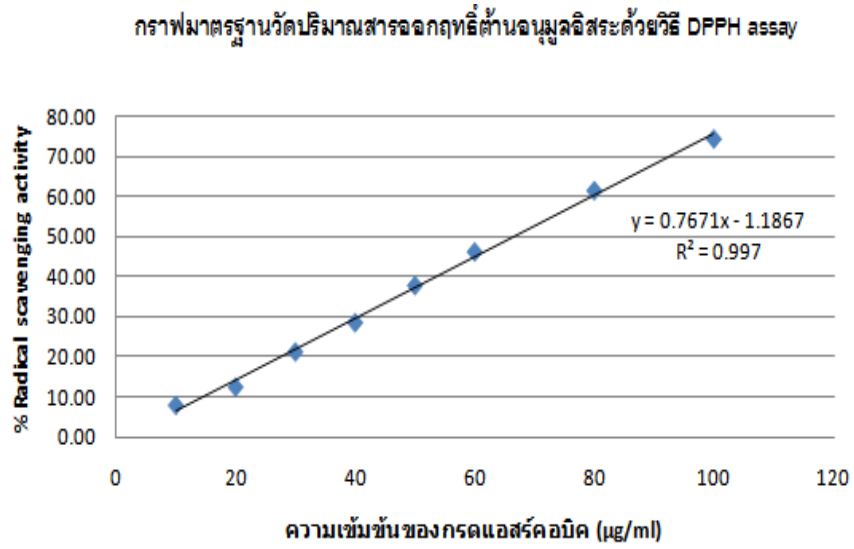
ทำการทดสอบสารมาตรฐานแกลลิค แอซิค
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเตยหอม



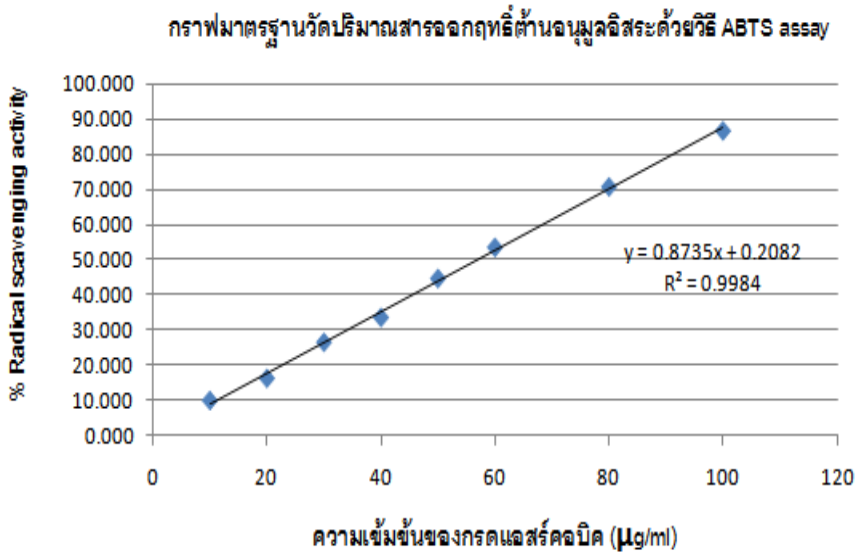
ทำการทดสอบสารมาตรฐานควอซิทิน
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณสารปริมาณฟลาโวนอยด์

3. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH assay



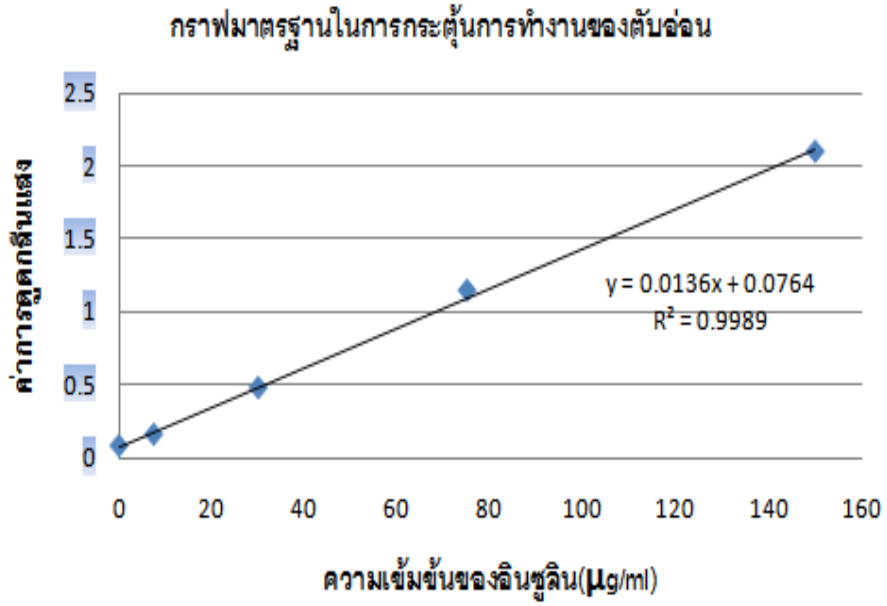
ทำการทดสอบสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณสารสารต้านอนุมูลอิสระ

4. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS assay



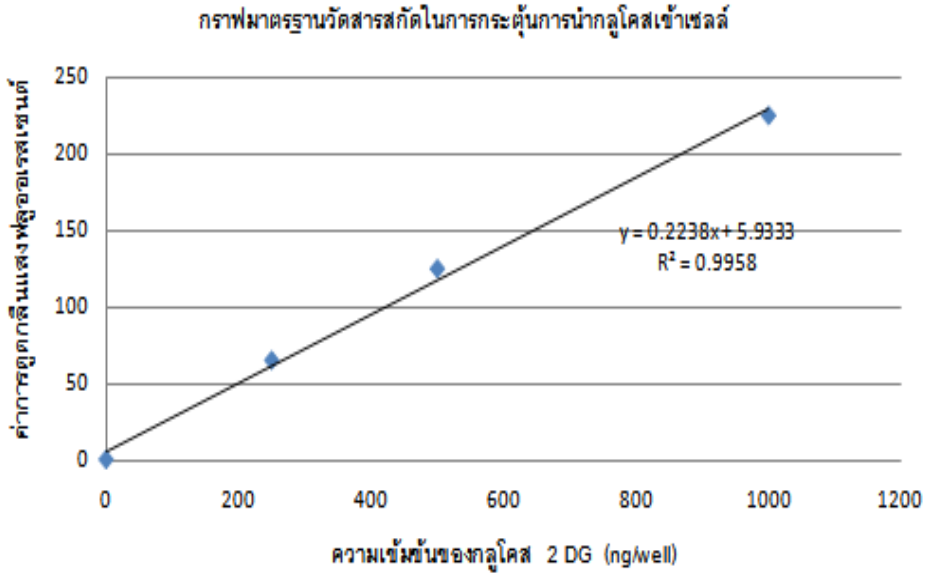
ทำการทดสอบสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

5. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณอินซูลิน



ทำการทดสอบอินซูลินมาตรฐาน
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณอินซูลินที่หลั่งมาจากตับอ่อน

6.กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์



ทำการทดสอบสาร 2 DG มาตรฐาน
ทุกครั้งควบคู่ไปกับทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. Folin Ciocalteu's Phenol assay

1. Folin Ciocalteu's Phenol Reagent	
10% Reagent	1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วน
2. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	
1 M Na_2CO_3	5.2995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนออกก่อนใช้
3. Gallic acid standard stock solution	0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. Aluminium chloride colorimetric assay

1. quercetin standard stock solution	0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
2. 10 % Aluminium chloride	6.667 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรนำ Aluminium chloride 1 ส่วน น้ำกลั่น 9 ส่วน

3. DPPH assay

1. DPPH standard stock solution	3.95 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่หลอด เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
2. Ascorbic acid	17.61 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่หลอด เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. ABTS assay

1. ABTS	36.02 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. Potassium persulfate	7.95 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร
3. ABTS +Potassium persulfate	ผสมกันในอัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตร
4. ABTS +Potassium persulfate	ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 5:100 มิลลิลิตร

5. Inhibit enzyme α –Glucosidase

1. Na_2HPO_4	1.56 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. $NaHPO_4$	1.78 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. motose	0.13 กรัม ละลายด้วย phosphate buffer 10 มิลลิลิตร
4. sucrose	0.41 กรัม ละลายด้วย phosphate buffer 10 มิลลิลิตร
5. PGO enzyme	PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร
6. O-dianisidine dihydrochloride	50 มิลลิกรัม และละลายน้ำ 20 มิลลิลิตร ปิเปตมา 1.6 มิลลิลิตร นำไปผสมกับ PGO enzyme

6. MTT assay

1. MTT stock solution reagents 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT dye 5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μM เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ และแยกตะกอนเล็ก ๆ ที่ยังละลายไม่ดีออก เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายสำหรับละลายตะกอน formazan

100 % DMSO

สารละลาย 1x PBS สำหรับล้างเซลล์

10X PBS 50 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 450 มิลลิลิตร

7. <u>glucose uptake</u>

1. 0.1 N NaOH	200 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. 0.1 N HCl	0.5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 59 มิลลิลิตร
3. NaCl	58.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. KCl 50 mM	186.38 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำเกลือ 50 มิลลิลิตร
5. $MgCl_2$ 0.5 mM	2.38 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร
6. ATP 670 µM	18.4 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร
7. $NADP^+$ 0.12 µM	25 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
8. Resozurin	1.25 มิลลิลิตร ละลายใน NaOH 1 M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
9. TEA 50 mM	0.46 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

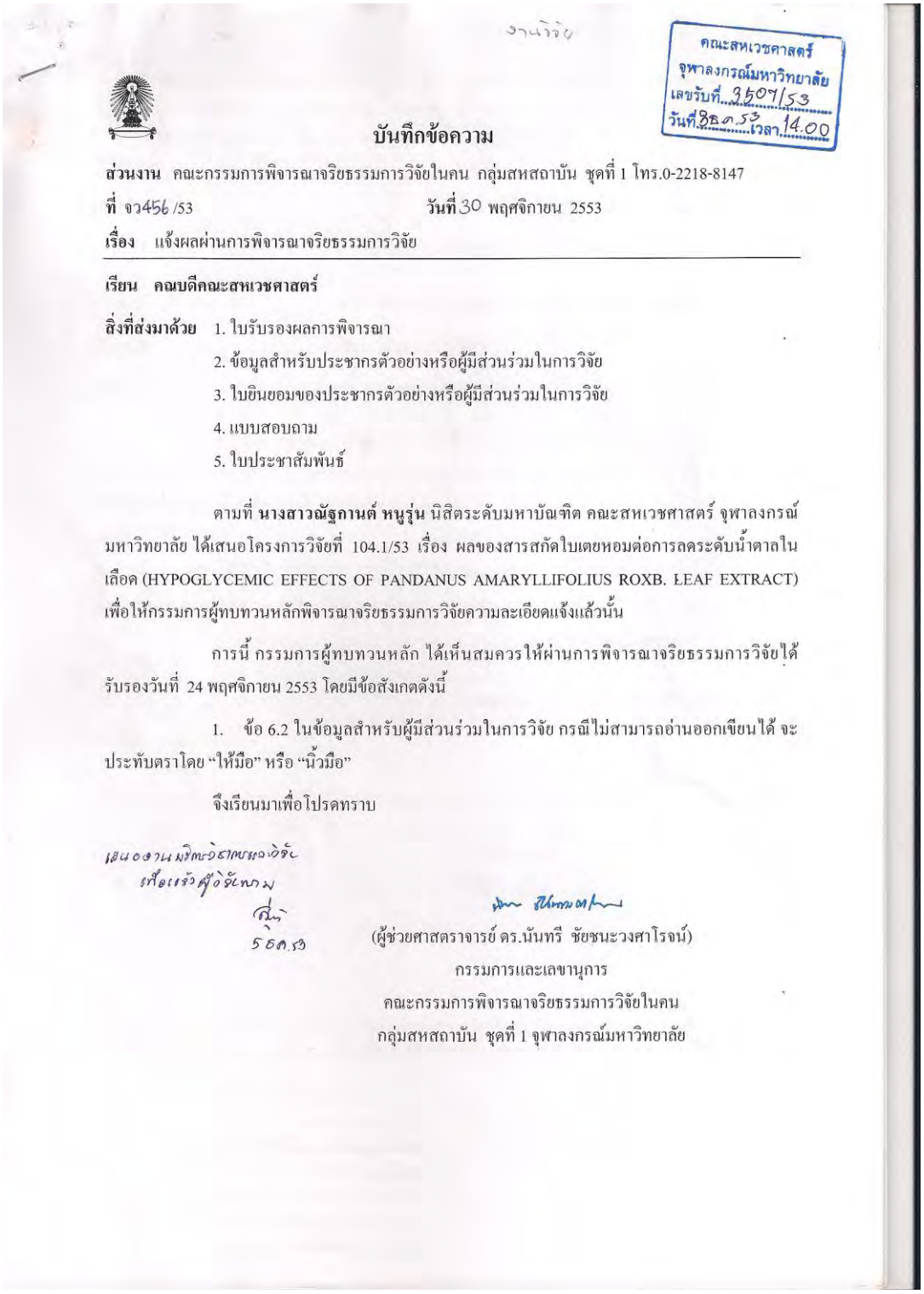
สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย

คำย่อ	**คำอธิบาย**
RIN-m5F	rat insulinoma cell
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethybenzene-thiazoline-6-sulfonic acid),diamonium salt
PGO	peroxidase-glucose oxidase
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G6PDH	glucose 6-phosphate dehydrogenase
2DG-6P	2-deoxyglucose phosphate
2DG	2-deoxyglucose
ATP	Adenosine triphosphate
NaF	Sodium fluoride
Rpm	Revolutions per minute
/	per
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	micro (10^{-6})
μl	microlitre
Abs	Absorbance
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram
M	Molar
mM	Milimolar

mg	Milligram
ml	Millilitre
MAPK	Mitrogen-activated protein kinase
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
nm	Nanometer
P	*P*-value
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Negative logarithm of the hydrogen ion concentration
v / v	Volume by volume
w / v	Weight by volume
^{o}C	องศาเซลเซียส
OD	การดูดกลืนแสง (optical density)
%	เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ง

เอกสารจริยธรรมในคน



งานวิจัย

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขรับที่ 3509/53 วันที่ 3 ธ.ค. 53 เวลา 14.00

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 โทร.0-2218-8147

ที่ จว456 /53 **วันที่** 30 พฤศจิกายน 2553

เรื่อง แจ้งผลผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน **คณบดีคณะสหเวชศาสตร์**

สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. ใบรับรองผลการพิจารณา
2. ข้อมูลสำหรับประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
3. ใบยินยอมของประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
4. แบบสอบถาม
5. ใบประชาสัมพันธ์

ตามที่ **นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น** นิสิตระดับมหาบัณฑิต คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้เสนอโครงการวิจัยที่ 104.1/53 เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด (HYPOGLYCEMIC EFFECTS OF PANDANUS AMARYLLIFOLIUS ROXB. LEAF EXTRACT) เพื่อให้กรรมการผู้ทบทวนหลักพิจารณาจริยธรรมการวิจัยความละเอียดแจ้งแล้วนั้น

การนี้ กรรมการผู้ทบทวนหลัก ได้เห็นสมควรให้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยได้รับรองวันที่ 24 พฤศจิกายน 2553 โดยมีข้อสังเกตดังนี้

1. ข้อ 6.2 ในข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย กรณีไม่สามารถอ่านออกเขียนได้ จะประทับตราโดย "ให้มือ" หรือ "นิ้วมือ"

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

เสนองานมหิดลวิทยานุสรณ์ เพื่อแจ้งผู้อำนวยการ 5 ธค 53

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)
กรรมการและเลขานุการ
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน
กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AF 01-11

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 2 ชั้น 4 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: 0-2218-8147 โทรสาร: 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th

COA No. 120/2553

ใบรับรองโครงการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 104.1/53 : ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

ผู้วิจัยหลัก : นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น

หน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณา โดยใช้หลัก ของ The International Conference on Harmonization – Good Clinical Practice (ICH-GCP) อนุมัติให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องดังกล่าวได้

ลงนาม..... ลงนาม.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปรีดา ทัศนประดิษฐ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)
ประธาน กรรมการและเลขานุการ

วันที่รับรอง : 24 พฤศจิกายน 2553 **วันหมดอายุ** : 23 พฤศจิกายน 2554

เอกสารที่คณะกรรมการรับรอง

1) โครงการวิจัย
2) ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยและใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
3) ผู้วิจัย
4) แบบสอบถาม
5) ใบประชาสัมพันธ์

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

เงื่อนไข

1. ข้าพเจ้ารับทราบว่าเป็นการผิดจริยธรรม หากดำเนินการเก็บข้อมูลการวิจัยก่อนได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยฯ
2. หากใบรับรองโครงการวิจัยหมดอายุ การดำเนินการวิจัยต้องชุดิ เมื่อต้องการต่ออายุต้องขออนุมัติใหม่ล่วงหน้าไม่ต่ำกว่า 1 เดือน พร้อมส่งรายงานความก้าวหน้าการวิจัย
3. ต้องดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
4. ใช้เอกสารข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย ใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัย (ถ้ามี) **เฉพาะที่ประทับตราคณะกรรมการเท่านั้น แล้วส่งสำเนาใบแรกที่ใช้เอกสารดังกล่าวมาที่คณะกรรมการ**
5. หากเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงในสถานที่เก็บข้อมูลที่ขออนุมัติจากคณะกรรมการ ต้องรายงานคณะกรรมการภายใน 5 วันทำการ
6. หากมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินการวิจัย ให้ส่งคณะกรรมการพิจารณารับรองก่อนดำเนินการ
7. โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่งแบบรายงานสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 03-11) และบทคัดย่อผลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น สำหรับโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ให้ส่งบทคัดย่อผลการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น

AF 04-09

ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

ชื่อผู้วิจัย นางสาวฉัฐกานต์ หนูรุ่น ตำแหน่ง นิสิตบัณฑิตศึกษา (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)
สถานที่ติดต่อผู้วิจัย (ที่ทำงาน) ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ที่บ้าน) 173/15 ซ.มั่นสิน 2 ถ.พระรามหก แขวง *ทุ่งพญาไท* เขต ราชเทวี
กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-2181089 โทรศัพท์ที่บ้าน 084-1988642
โทรศัพท์มือถือ 084-1988642 E-mail : nokaran_35605@hotmail.com

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

1. ขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมในการวิจัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย มีความจำเป็นที่ท่านควรทำความเข้าใจว่างานวิจัยนี้ทำเพราะเหตุใด และเกี่ยวข้องกับอะไร กรุณาใช้เวลาในการอ่านข้อมูลต่อไปนี้อย่างละเอียดรอบคอบ และสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมหรือข้อมูลที่ไม่ชัดเจนได้ตลอดเวลา
2. โครงการนี้เกี่ยวข้องกับการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคซึ่งเป็นที่นิยมแพร่หลายในปัจจุบัน และโรคเบาหวานก็เป็นอีกโรคหนึ่งที่มีการรักษาโดยการใช้สมุนไพรร่วมกับการรักษาด้วย การศึกษาในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อศึกษาความสามารถของชาใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยผู้วิจัยได้ออกแบบโครงการวิจัยคือ ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยที่ได้รับการคัดเลือกต้องเข้ารับการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 2 ครั้ง เพื่อศึกษาผลของการดื่มชาใบเตยหอมต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้หรือไม่
3. วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาความสามารถของชาใบเตยต่อการลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อไม่ดื่มชาใบเตยและเมื่อดื่มชาใบเตย
4. รายละเอียดของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
   4.1 ลักษณะของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยเป็นบุคคลที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติอายุ 18-25 ปี

   <u>เกณฑ์การคัดเข้า</u>

   1. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องไม่มีโรคประจำตัว
   2. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติ
   3. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องได้รับอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เพียงพอ อย่าง*น้อย*วันละ 150 กรัม *(8 ช้อนโต๊ะ)* เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน ก่อนทำการตรวจ
   4. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องหายจากอาการเจ็บป่วยโดยเร็วมาแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์
   5. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยต้องหยุดยาที่อาจกระทบต่อการตรวจ เช่น ฮอร์โมน ยาคุมกำเนิด (ทั้งชนิดที่กิน ฉีด ฝัง หรือ แปะผิวหนัง) ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด และยาที่มีผลต่อการตรวจ*ระดับน้ำตาล*เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน

6. ก่อนการตรวจ 1 วัน ให้ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยอดอาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง และให้ดื่มน้ำเปล่าได้ตามความจำเป็น ควรงดกาแฟ และบุหรี่ ให้ดำเนินชีวิตตามปกติ และห้ามออกกำลังกายมากอย่างน้อยก่อนการตรวจ 8 ชั่วโมง

<u>เกณฑ์การคัดออก</u>

1. ผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยมีอาการเจ็บป่วยหลังเจาะเลือดครั้งแรก เช่น เป็นไข้หวัด ท้องเสีย

4.2 มีจำนวนผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติจำนวน 30 คน (เพศชาย 15 คน เพศหญิง 15 คน)

4.3 วิธีการได้มาซึ่งกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยคือ ผู้วิจัยประชาสัมพันธ์ โดยเปิดรับสมัครผู้ที่สนใจเข้าร่วมโครงการ ดังป้ายประกาศที่ติดในบริเวณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นทำการคัดกรองผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยเข้าร่วมการวิจัยโดยผู้วิจัยซักประวัติ และสำรวจเบื้องต้นด้วยแบบคัดกรอง *กรณีที่ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยไม่รู้ผลเลือดมาก่อน ผู้วิจัยจะตรวจระดับน้ำตาลในเลือดให้โดยไม่คิดค่าใช้จ่าย และหากผลระดับน้ำตาลในเลือดไม่ปกติ ผู้วิจัยไม่รับเข้าร่วมโครงการวิจัย* ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ผ่านการคัดกรองจำนวน 30 ราย จะเข้ารับการตรวจระดับน้ำตาลในเลือด 2 วัน ตลอดงานวิจัย

4.4 เหตุผลที่ท่านได้รับเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยคือ ท่านสนใจที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้และมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ปกติอายุ 18-25 ปี

4.5 ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยจะไม่ถูกแบ่งกลุ่มแต่จะตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดก่อนและหลังดื่มชาเตยหอมและเปรียบเทียบค่าทั้งสอง

5. กระบวนการดำเนินการวิจัย เมื่อท่านยินยอมด้วยความสมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย ท่านจะได้รับการปฏิบัติตามขั้นตอน คือ ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ได้รับการคัดเลือก จะเข้ารับการเก็บตัวอย่างเลือด 8 ครั้ง ตลอดโครงการ โดยจะแบ่งเป็น 2 วัน

<u>ครั้งที่ 1</u> เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนประมาณ 3 มิลลิลิตร*(2 ช้อนชา)* ต่อ 1 ครั้ง ปั่นแยกซีรัมและนำไปทดสอบเพื่อหาค่าระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อเป็นค่าควบคุม จากนั้นให้ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยดื่มกลูโคส 75 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 ซีซี ภายใน 5 นาที เจาะเก็บเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4 เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1ชั่วโมง, และ 2 ชั่วโมง และการเก็บตัวอย่างเลือด*ครั้งที่ 2* ห่างจากครั้งแรกเป็นเวลา 7 วัน

<u>ครั้งที่ 2</u> เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนประมาณ 3 มิลลิลิตร*(2 ช้อนชา)* ต่อ 1 ครั้ง ปั่นแยกซีรัมและนำไปทดสอบเพื่อหาค่าระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อเป็นค่าควบคุม จากนั้นให้ผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยดื่มกลูโคส 75 กรัม ในน้ำต้มสุก 300 ซีซี ภายใน 5 นาที และหลังจากดื่มกลูโคส 15 นาที ให้ดื่มชาใบเตยหอม 100 กรัม ในน้ำต้มสุก 200 ซีซี ภายใน 5 นาที เจาะเก็บเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4 เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง โดยก่อนการเจาะเลือดทุกครั้งผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยต้องอดอาหาร 10-12 ชั่วโมง ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างเลือดไปตรวจระดับน้ำตาลในเลือดและวิเคราะห์ผลการรักษาด้วยตนเองกระบวนการวิจัยเป็นอันเสร็จสิ้น *เมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยแล้วข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยจะถูกทำลายภายใน 3 เดือน*

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

6.กระบวนการให้ข้อมูลแก่กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

6.1 กระบวนการให้ข้อมูลแก่กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย *ผู้วิจัยให้ข้อมูลแก่กลุ่มประชากรโดยให้อ่านเอกสาร ประกอบด้วย โครงการวิจัย ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย ใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และมีการอธิบายในรายที่ไม่เข้าใจ จากนั้นทำการคัดกรองผู้มีส่วนร่วมงานวิจัยเข้าร่วมการวิจัยโดยผู้วิจัยซักประวัติและสำรวจเบื้องต้นด้วยแบบคัดกรอง*

6.2 หากเป็นกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยที่อ่านไม่ออก เขียนไม่ได้ หรือไม่พูดภาษาไทย ผู้วิจัยจะขอความยินยอมโดยอ่านข้อมูลให้ฟัง และในกระบวนการขอความยินยอมจะให้ประทับตราโดยให้มือแทนการเขียน

7. การคัดกรองผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยด้วยวิธีใดๆ ก็ตาม หากพบว่าผู้นั้นไม่อยู่ในเกณฑ์คัดเข้า ผู้วิจัยจะแนะนำผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยไปพบแพทย์ เพื่อตรวจหาความผิดปกติในรายที่มีความผิดปกติ

8. อันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นแก่กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยคือ การเจาะเลือด 4 ครั้ง ต่อ 1 วันของการทดลอง *อาจจะเกิดรอยช้ำบริเวณที่มีการเจาะเลือด* ซึ่งสามารถหายได้เองภายใน 7-10 วัน อุปกรณ์เจาะเลือดใช้ครั้งเดียวทิ้ง จึงปลอดภัยต่อโรคที่ติดต่อทางเลือด และการเจาะเลือดครั้งนี้ผู้ที่เจาะเลือดคือ นักเทคนิคการแพทย์ณัฐกานต์ หนูรุ่น และนักเทคนิคการแพทย์ชนะชัย แซ่ลี้ ซึ่งมีประสบการณ์ในการเจาะเลือดเป็นอย่างดี หากเกิดความผิดปกติใดๆขณะเจาะเลือด จะหยุดการเจาะเลือดทันทีและปฐมพยาบาลเบื้องต้น หากอาการไม่ดีขึ้นจะนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยทันทีเพื่อทำการรักษาต่อไป โดยผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด และ*หากผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยเกิดความผิดปกติ เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย จากสาเหตุการดื่มชาใบเตย โดยกรณีเหตุการณ์เกิดในขณะที่กำลังดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยจะนำส่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยทันทีเพื่อทำการรักษา โดยผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด ส่วนในกรณีที่อาการเกิดหลังจากดำเนินการวิจัยเสร็จสิ้นแล้ว ผู้วิจัยยินดีรับผิดชอบค่ารักษาพยาบาลทั้งหมด* สำหรับประโยชน์สำหรับผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยในโครงการทุกท่านจะทราบระดับน้ำตาลในเลือด *โดยผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัยที่ประสงค์จะทราบผลของระดับน้ำตาลในเลือด ผู้วิจัยจะให้ท่านเขียนความประสงค์ ซึ่งมีลายละเอียดอยู่ในแบบสอบถาม*

9. การเข้าร่วมเป็นกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยเป็นโดยสมัครใจ และสามารถปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการวิจัยได้ทุกขณะ โดยไม่ต้องให้เหตุผลและไม่สูญเสียประโยชน์ที่พึงได้รับโดยระบุให้ชัดเจน เป็นต้นว่า ไม่มีผลกระทบต่อการดูแลรักษา

10. "หากท่านมีข้อสงสัยให้สอบถามเพิ่มเติมได้โดยสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอดเวลา และหากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์หรือโทษเกี่ยวกับการวิจัย ผู้วิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบอย่างรวดเร็ว" เพื่อให้ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยทบทวนว่ายังสมัครใจจะอยู่ในงานวิจัยต่อไปหรือไม่ ยกเว้นไม่ต้องระบุข้อความนี้เมื่อทำการตอบแบบสัมภาษณ์ครั้งเดียว และไม่สามารถติดต่อผู้เข้าวิจัยได้อีก

11. "ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับท่านจะเก็บเป็นความลับ หากมีการเสนอผลการวิจัยจะเสนอเป็นภาพรวม ข้อมูลใดที่สามารถระบุถึงตัวท่านได้จะไม่ปรากฏในรายงาน"

รหัสโครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

12.การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจ ท่านจะไม่ได้รับค่าตอบแทนในการเข้าร่วมงานวิจัย อย่างไรก็ตามท่านมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากการวิจัยนี้ได้ทุกเมื่อโดยไม่ต้องได้รับโทษใดๆทั้งสิ้น โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุของการถอนตัว และจะไม่มีพันธะใดๆในอนาคต

13."หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามข้อมูลดังกล่าวสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-8147 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th"

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

AF 05-09

หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ทำที่.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

เลขที่ประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย.....

ข้าพเจ้า ซึ่งได้ลงนามท้ายหนังสือนี้ ขอแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53

วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553

วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

ชื่อผู้วิจัย นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น ตำแหน่ง นิสิตบัณฑิตศึกษา (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)

สถานที่ติดต่อผู้วิจัย (ที่ทำงาน) ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ที่บ้าน) 173/15 ซ.มั่นสิน 2 ถ.พระรามหก แขวง ทุ่งพญาไท เขต ราชเทวี

กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-2181089 โทรศัพท์ที่บ้าน 084-1988642

โทรศัพท์มือถือ 084-1988642 E-mail : nokaran_35605@hotmail.com

ข้าพเจ้า ได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับที่มาและวัตถุประสงค์ในการทำวิจัย รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ที่จะต้องปฏิบัติหรือได้รับการปฏิบัติ ความเสี่ยง/อันตราย และประโยชน์ซึ่งจะเกิดขึ้นจากการวิจัยเรื่องนี้ โดยได้อ่านรายละเอียดในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัยโดยตลอด และได้รับคำอธิบายจากผู้วิจัยจนเข้าใจเป็นอย่างดีแล้ว

ข้าพเจ้าจึงสมัครใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย โดยข้าพเจ้ายินยอม

1. ซักประวัติ และตอบแบบสอบ เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด จำนวน 1 ชุด
2. *ผู้เข้าร่วมการวิจัยยินยอมดื่มกลูโคส 75 กรัม จำนวน 300 ซีซี 1 ครั้งและดื่มให้หมดภายใน 5 นาที ดื่มชาใบเตยจำนวน300 ซีซี 1 ครั้งและดื่มให้หมดภายใน 5 นาที โดยเจาะเลือดวันละ 4 ครั้ง ครั้งละ3 มิลลิลิตร(2 ช้อนชา) จำนวน 2 วัน ห่างกัน 7 วัน*

ข้าพเจ้ามีสิทธิถอนตัวออกจากการวิจัยเมื่อใดก็ได้ตามความประสงค์ โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล ซึ่งการถอนตัวออกจากการวิจัยนั้น จะไม่มีผลกระทบในทางใดๆ ต่อข้าพเจ้าทั้งสิ้น (ระบุเป็นต้นว่า ได้รับการรักษาพยาบาลเช่นเดิม)

ข้าพเจ้าได้รับคำรับรองว่า ผู้วิจัยจะปฏิบัติต่อข้าพเจ้าตามข้อมูลที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และข้อมูลใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับข้าพเจ้า ผู้วิจัยจะเก็บรักษาเป็นความลับ โดยจะนำเสนอข้อมูลการวิจัยเป็นภาพรวมเท่านั้น ไม่มีข้อมูลใดในการรายงานที่จะนำไปสู่การระบุตัวข้าพเจ้า

หากข้าพเจ้าไม่ได้รับการปฏิบัติตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนได้ที่คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0-2218-8147 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th

ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้าพยาน ทั้งนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และสำเนาหนังสือแสดงความยินยอมไว้แล้ว

ลงชื่อ.....
(.....)
ผู้วิจัยหลัก

ลงชื่อ.....
(.....)
ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

ลงชื่อ.....
(.....)
พยาน

แบบสอบถามงานวิจัย

เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

คำอธิบายประกอบแบบสอบถาม

1.แบบสอบถามนี้จัดทำขึ้นเพื่อรวมรวมข้อมูลสำหรับการทำวิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยมีคณาจารย์ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

2.ผู้วิจัยขอความร่วมมือจากท่าน ขอให้ท่านโปรดตอบคำถามทุกข้อตามความเป็นจริง เพราะข้อมูลแต่ละข้อมีความสำคัญในการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง ข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถามนี้ จะถือเป็นความลับและใช้ประโยชน์เพื่อการวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์เท่านั้น

3.โปรดตอบแบบสอบถามตามคำอธิบาย ซึ่งแบบสอบถามชุดนี้มี 1 ส่วน ประกอบด้วย

ส่วนที่1 แบบสอบถามข้อมูลส่วนบุคคล จำนวน 9 ข้อ

หากมีข้อสงสัยเกี่ยวกับแบบสอบถามนี้ ท่านสามารถสอบถามได้จาก*ผู้ที่แจกแบบสอบถามซึ่งเป็นผู้วิจัย* และเมื่อท่านตอบแบบสอบถามครบทุกข้อแล้ว โปรดส่งคืนให้กับผู้ที่แจกแบบสอบถามนี้แก่ท่าน

ขอขอบพระคุณท่านที่กรุณาตอบแบบสอบถามนี้

นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น

นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53

วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553

วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

เลขที่โครงการวิจัย 104-1/53
วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553
วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

แบบสอบถามงานวิจัย

เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

รหัสข้อมูล☐☐

แบบสอบถามข้อมูลส่วนบุคคลครั้งที่1

คำอธิบาย ขอให้ท่านตอบคำถามโดยเติมคำและทำเครื่องหมาย√ ลงใน☐ ที่ตรงกับความเป็นจริงเกี่ยวกับท่าน

ชื่อ..... นามสกุล.....

1. เพศ ☐ เพศชาย ☐ เพศหญิง
2. ปัจจุบันท่านอายุ.....ปี
3. *ท่านรับประทานยาฮอร์โมนเพศหญิงและยาคุมกำเนิด หรือคุมกำเนิดโดยวิธี ฉีด ฝัง หรือแปะผิวหนังอยู่ใช่หรือไม่* ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
4. ท่านมีอาการป่วยภายใน 2 สัปดาห์ใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
5. ท่านได้รับอาหารจำพวกแป้งอย่างน้อยวันละ 2 ถ้วย เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
6. ท่านอดอาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง ก่อนมาเจาะเลือดใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
7. ท่านงดเครื่องดื่มประเภทชา กาแฟ และน้ำอัดลมอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมงก่อนมาเจาะเลือดใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
8. ท่านงดการสูบบุหรี่ ก่อนมาเจาะเลือดการตวจ 1 วันใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
9. ท่านประสงค์จะทราบผลตรวจใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่

ท่านประสงค์จะทราบผลตรวจผ่านทาง

1. โทรศัพท์ หมายเลขโทรศัพท์.....
2. ไปรษณีย์ ที่อยู่ .....
3. E-mail .....

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53
วันที่รับรอง 24 พย 2553
วันหมดอายุ 23 พย 2554

แบบสอบถามงานวิจัย

เรื่อง ผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

รหัสข้อมูล☐☐

แบบสอบถามข้อมูลส่วนบุคคลครั้งที่2

คำอธิบาย ขอให้ท่านตอบคำถามโดยเติมคำและทำเครื่องหมาย√ ลงใน☐ ที่ตรงกับความเป็นจริงเกี่ยวกับท่าน

ชื่อ..... นามสกุล.....

1. เพศ ☐ เพศชาย ☐ เพศหญิง
2. ปัจจุบันท่านอายุ.....ปี
3. *ท่านรับประทานยาฮอร์โมนเพศหญิงและยาคุมกำเนิด หรือคุมกำเนิดโดยวิธี ฉีด ฝัง หรือแปะผิวหนังอยู่ใช่หรือไม่* ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
4. ท่านมีอาการป่วยภายใน 2 สัปดาห์ใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
5. ท่านได้รับอาหารจำพวกแป้งอย่างน้อยวันละ 2 ถ้วย เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
6. ท่านอดอาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง ก่อนมาเจาะเลือดใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
7. ท่านงดเครื่องดื่มประเภทชา กาแฟ และน้ำอัดลมอย่างน้อย 10 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมงก่อนมาเจาะเลือดใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
8. ท่านงดการสูบบุหรี่ ก่อนมาเจาะเลือดการตวจ 1 วันใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่
9. ท่านประสงค์จะทราบผลตรวจใช่หรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่

ท่านประสงค์จะทราบผลตรวจผ่านทาง

1. โทรศัพท์ หมายเลขโทรศัพท์.....
2. ไปรษณีย์ ที่อยู่ .....
3. E-mail .....

เรียนเชิญ ผู้มีสุขภาพดีเข้าร่วมในโครงการวิจัย

เรื่อง การศึกษาผลของสารสกัดใบเตยหอมต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

เพศชาย และ เพศหญิง อายุ 18-25 ปี

ผู้วิจัย นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น

ติดต่อห้อง 1402 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์มือถือ 084-1988642

เลขที่โครงการวิจัย 104.1/53

วันที่รับรอง 24 พ.ย. 2553

วันหมดอายุ 23 พ.ย. 2554

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่น สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552