



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส โปรตีเอส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพในการควบคุมน้ำหนัก

Inhibitory effect of Thai vegetable extracts on activities of lipase, alpha-amylase, protease and alcohol-dehydrogenase

สลิลา ชัยโรจน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802140

สัญญาเลขที่ 84/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส โปรตีเอส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพในการควบคุมน้ำหนัก

Inhibitory effect of Thai vegetable extracts on activities of lipase, alpha-amylase, protease and alcohol-dehydrogenase

สลิล ชั้นโรจน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันโรคอ้วนจัดเป็นปัญหาหลักทางสุขภาพทั่วโลกเนื่องจากภาวะโรคอ้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงที่นำไปสู่การเกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยแนวทางในการป้องกันและแก้ภาวะโรคอ้วนที่เป็นที่นิยมคือการรับประทานยาลดน้ำหนักเนื่องจากใช้เวลาน้อยแต่ได้ประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น อย่างไรก็ตามการรับประทานยาลดน้ำหนักไม่ใช่แนวทางที่ดีที่สุดในการรักษาโรคอ้วนเพราะยาอาจส่งผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการควบคุมน้ำหนักคือการลดการย่อยแป้งและไขมันอันเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและไลเปส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านจำนวน 30 ชนิดต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารที่ได้มาจากตับอ่อน ได้แก่ ไลเปส แอลฟาอะไมเลส และทริปซิน ในหลอดทดลอง และเอนไซม์ในกระบวนการเผาผลาญ แอลกอฮอล์ ได้แก่ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยนำผักพื้นบ้านที่เก็บเกี่ยวในสามฤดูที่แตกต่างกัน ได้แก่ ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มาสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นสารสกัดหยาบที่ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ Orlistat® (ยารักษาโรคอ้วน) Acarbose® (ยารักษาโรคเบาหวาน) phenylmethylsulfonyl fluoride (สารยับยั้งโปรตีเอส) และ nicotinic acid (วิตามินบี 3) เป็นชุดควบคุม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจาก ชะอม ขึ้นฉ่าย มะกรูด กะเพรา เตยหอม และย่านาง มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) น้อยกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจาก ชะอม กุ้ยฉ่าย ตำลึง กระถิน สะระแหน่ เตยหอม ย่านาง และขิง มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดี ในขณะที่สารสกัดหยาบจาก กระเทียม ข่า สะระแหน่ ชะพลู และมะเขือพวง มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้ดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผักพื้นบ้านกลุ่มนี้อาจไม่เหมาะสมในการรับประทานเพื่อควบคุมน้ำหนักเนื่องจากการรบกวนการย่อยโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากข่า ขึ้นฉ่าย และขิง มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดี ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมอื่นของร่างกายได้ถ้ารับประทานผักพื้นบ้านกลุ่มนี้เข้าไปในปริมาณมาก ดังนั้นผักพื้นบ้านที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อใช้ควบคุมน้ำหนัก ได้แก่ ชะอม เตยหอม และย่านาง เนื่องจากสารออกฤทธิ์ในผักพื้นบ้านดังกล่าวมีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้

คำสำคัญ: ผักพื้นบ้าน การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส แอลฟาอะไมเลส ทริปซิน แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

Abstract

Obesity is a major public health risk causing diabetes, hypertension, and cardiovascular disease. In general, taking medication is the most popular approach to weight loss because it takes less time, yet patients can lose more weight than other methods. However, prescription drugs can also bring about deadly adverse effects. An alternative way to lose weight is to reduce lipase and alpha-amylase activities in the digestive system. Thus, this research aimed to study in vitro inhibitory effect of extracts from 30 Thai vegetables on the activities of digestive enzymes (pancreatic lipase, pancreatic alpha-amylase, and trypsin) and an enzyme in alcohol metabolism (alcohol dehydrogenase). Local Thai vegetables were sampled from three different seasons, including summer, spring and winter, and were extracted with water, ethanol or hexane at 37 °C or at 90°C. Each extract was subsequently assayed for enzyme inhibition using Orlistat®, Acarbose®, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), or nicotinic acid as positive controls. Results indicated that crude extracts of *Acacia pennata* (Cha om), *Apium graveolens* (Khuen-chai), *Citrus hystrix* (Makrut lime), *Ocimum tenuiflorum* (Kaphrao), *Pandanus amaryllifolius* (Bai toei) and *Tiliacora triandra* (Ya nang) possessed compelling anti-lipase activities as their IC₅₀ (the half maximum inhibitory concentration) were less than 300 µg/ml. Furthermore, crude extracts of *A. pennata*, *Allium tuberosum* (Kow choi), *Coccinia grandis* (Tum lung), *Leucaena glauca* (Kra thin), *Mentha cordifolia* (Saranae), *P. amaryllifolius*, *T. triandra* and *Zingiber officinale* (Khing) also demonstrated significant anti-alpha amylase activities. Interestingly, crude extracts of *Allium sativum* (Kra tium), *Alpinia galanga* (Khaa), *M. cordifolia*, *Piper sarmentosum* (Chaphlu) and *Salanum torvum* (Ma khuea phuang) embraced considerable anti-trypsin activities, implying that these extracts might not be suitable for weight loss due to an interference with protein digestion. Moreover, crude extracts of *A. galangal*, *A. graveolens* and *Z. officinale* had additional anti-alcohol dehydrogenase activities, suggesting that these extracts would interfere with other drug metabolisms in our body, therefore the application should be

handled with care. Taken together, the favorable Thai vegetables and their extracts recommended for functional food development and natural anti-obesity remedy are *A. pennata*, *P. amaryllifolius*, and *T. triandra* based on their specific anti-lipase and anti-alpha amylase activities.

Keywords: vegetable, enzyme inhibition, lipase, α -amylase, trypsin, alcohol dehydrogenase

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
1. บทนำ	8
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	8
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	10
1.3 ขอบเขตการวิจัย	10
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	11
2. วิธีการดำเนินการวิจัย	13
2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน	13
2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์	17
2.3 การคำนวณและวิธีทางสถิติ	19
3. ผลการวิจัย	20
3.1 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน	20
3.2 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน	22
3.3 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน	25
3.4 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. อภิปรายผลการวิจัย	30
4.1 การสกัดร่วมด้วยเอทานอลและเฮกเซน	30
4.2 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	30
4.3 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	31
4.4 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน	32
4.5 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	33
4.6 ผักพื้นบ้านที่ไม่ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	34
4.7 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสแต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	34
5. สรุปผลการวิจัย	35
6. ผลผลิต	36
6.1 ผลงานตีพิมพ์	36
6.2 ผลงานเชิงพาณิชย์	36
6.3 ผลงานเชิงสาธารณะ	36
รายงานสรุปการเงิน	37
เอกสารอ้างอิง	38
ประวัตินักวิจัย	39

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผักพื้นบ้านที่ใช้ในการศึกษา	13
ตารางที่ 2 Anti-lipase activities of crude extracts from Thai vegetables	21
ตารางที่ 3 Anti-lipase activities as demonstrated by IC ₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables	22
ตารางที่ 4 Anti-alpha-amylase activities of crude extract from Thai vegetables	23
ตารางที่ 5 Anti alpha-amylase activities as demonstrated by IC ₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables	25
ตารางที่ 6 Anti-trypsin activities of crude extract from Thai vegetables	27
ตารางที่ 7 Anti-trypsin activities as demonstrated by IC ₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables	27
ตารางที่ 8 Anti alcohol dehydrogenase activities of crude extract from Thai vegetables	29
ตารางที่ 9 Anti alcohol dehydrogenase activities as demonstrated by IC ₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables	29

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 Inhibitory effect of Orlistat® on pancreatic lipase activity	20
ภาพที่ 2 Inhibitory effect of Acarbose® on pancreatic α -amylase activity	23
ภาพที่ 3 Inhibitory effect of phenylmethylsulfonyl fluoride on pancreatic trypsin activity	26
ภาพที่ 4 Inhibitory effect of nicotinic acid on yeast alcohol dehydrogenase (ADH) activity	28

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันภาวะน้ำหนักเกินและอ้วนเป็นปัญหาสำคัญทางสุขภาพอันดับต้นๆของประเทศไทยทำให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพชีวิตและเศรษฐกิจในวงกว้าง อันเนื่องมาจากภาวะพิการหรือการตายก่อนวัยอันควรและรัฐบาลต้องแบกรับภาระค่าใช้จ่ายทางสุขภาพที่เป็นผลสืบเนื่องมาจากภาวะอ้วนในแต่ละปีเป็นจำนวนเงินมหาศาล จากการสำรวจสุขภาพประชาชนไทยครั้งที่ 4 (พ.ศ. 2551-2552) โดยสำนักงานสำรวจสุขภาพประชาชนไทย พบว่าความชุกของภาวะอ้วนในประชากรไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับการสำรวจสุขภาพประชาชนไทยครั้งที่ 3 (พ.ศ. 2546-2547) โดยในผู้ชายเพิ่มจากร้อยละ 22.5 เป็นร้อยละ 28.4 และในผู้หญิงจากความชุกร้อยละ 34.4 เป็นร้อยละ 40.7 ทั้งนี้ปัญหาหลักที่ทำให้เกิดภาวะอ้วนคือการขาดการออกกำลังกาย และรับประทานอาหารที่ไม่สมดุล โดยพบว่ามีจำนวนประชากรไทยเพียงร้อยละ 23.8 ที่รับประทานผักเพียงพอตามข้อเสนอแนะ (มากกว่า 3 ส่วนต่อวัน) ในขณะที่ร้อยละ 1.1 ของประชากรไทยใช้ยาลดความอ้วน ซึ่งผู้หญิงมีความชุกในการใช้ยาลดความอ้วนสูงกว่าผู้ชาย (ร้อยละ 1.9 และ 0.3 ตามลำดับ) และกลุ่มอายุผู้หญิงที่ใช้ยาลดความอ้วนมากที่สุดอยู่ในช่วง 15-29 ปี (ร้อยละ 4.9) อย่างไรก็ตามจากการการสำรวจพฤติกรรมการบริโภคอาหารของประชากร พ.ศ. 2556 โดยสำนักงานสถิติแห่งชาติ พบว่าประชากรไทยร้อยละ 54.5 บริโภคผักและผลไม้สดเป็นประจำทุกวัน ซึ่งมากกว่ากลุ่มอาหารประเภทอื่นๆ และสิ่งที่มีค่าถึงเป็นอันดับแรกในการเลือกซื้ออาหารคือรสชาติ (ร้อยละ 24.5) ในขณะที่ประชากรไทยร้อยละ 80.9 ไม่นิยมบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริม แสดงให้เห็นว่าการป้องกันภาวะอ้วนที่ยั่งยืนสามารถดำเนินการได้ 2 วิธี คือสนับสนุนให้คนไทยออกกำลังกายอย่างเหมาะสม และเลือกรับประทานอาหารที่สมดุลโดยคำนึงถึงรสชาติและพฤติกรรมการบริโภคเป็นสำคัญ

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาแนวทางความเป็นไปได้ในการใช้ผักพื้นบ้านที่คนไทยรับประทานเป็นประจำทุกวันมาใช้เป็นอาหารสุขภาพเพื่อใช้ในการควบคุมน้ำหนัก โดยอาหารสุขภาพ (functional food) หมายถึงอาหารที่มีสารอื่นที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกเหนือจากมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ โดยเมื่อพิจารณาจากการเลือกบริโภคอาหารของคนไทย การรับประทานผักที่รับประทานเป็นประจำทุกวันซึ่งให้ใยอาหาร แกลีโอลและวิตามินแล้วยังให้สารบางชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ในการควบคุมระบบเมตาบอลิซึมในร่างกายที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมหรือสะสมพลังงานส่วนเกินซึ่งก่อให้เกิดปัญหาภาวะอ้วนจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราภาวะอ้วนในประชากรไทยได้ในระยะยาวและยั่งยืน โดยผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน 30-

40 ชนิดที่นำมาใช้ในการปรุงอาหารไทย ต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์โปรตีเอส และเอนไซม์ในระบบกำจัดของเสีย ได้แก่ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีส่วนสำคัญในการย่อยไขมันและแป้งเพื่อที่จะดูดซึมในลำไส้ในรูปของกรดไขมันและน้ำตาลตามลำดับ การใช้สารเคมีบางชนิดในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นหลักการในการผลิตยาลดไขมัน (Orlistat®) และยารักษาเบาหวาน (Acarbose®) ในขณะที่เอนไซม์โปรตีเอสจะช่วยย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน ซึ่งพืชหลายชนิดผลิตสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสทำให้เมื่อรับประทานพืชดังกล่าวเข้าไปจะเกิดการท้องอืด เช่น ตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ในถั่วเหลือง เป็นต้น และเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นแอลดีไฮด์ที่ดับ และจะเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกตามลำดับ ซึ่งช่วยทำลายพิษของแอลกอฮอล์ในร่างกาย นอกจากนี้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในยีสต์ยังเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการหมักแอลกอฮอล์ด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้เอนไซม์โปรตีเอสและเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ควบคุม โดยผักพื้นบ้านที่จะใช้เป็นอาหารสุขภาพเพื่อการควบคุมน้ำหนักนั้นต้องสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนแต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (ทริปซิน) จากตับอ่อนและเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์

งานวิจัยชิ้นนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่เคยมีรายงานมาเพราะเป็นงานวิจัยบูรณาการที่ทำให้สามารถอธิบายการย่อยและการดูดซึมสารอาหารที่ก่อให้เกิดการสะสมพลังงานในร่างกายได้อย่างครบวงจร และสามารถบอกถึงความจำเพาะเจาะจงของการเลือกผักพื้นบ้านเป็นอาหารสุขภาพเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของแต่ละบุคคล ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ได้ในชีวิตประจำวันโดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคเหมือนการรับประทานยาหรืออาหารเสริมสุขภาพที่ได้จากการสกัดสมุนไพรหรือถูกสังเคราะห์ขึ้นมา นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้สามารถช่วยส่งเสริมให้ประชากรไทยสามารถเลือกรับประทานอาหารให้เหมาะสมในรูปแบบของอาหารสุขภาพแล้ว ยังช่วยสนับสนุนข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ให้กับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากผักพื้นบ้านบางชนิดที่ขายในท้องตลาดปัจจุบัน เช่น ชามะเขือพวง ซึ่งผู้ผลิตอ้างสรรพคุณในการลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น และสามารถใช้อ้อมมูลดังกล่าวในการศึกษาหาสารออกฤทธิ์เพื่อใช้ผลิตเป็นยารักษาโรคต่างๆได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมน้ำหนัก
- 1.2.2 ศึกษาสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรับประทานอาหารสุขภาพ
- 1.2.3 ศึกษาสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเพื่อใช้เป็นแนวทางผลิตแอลกอฮอล์โดยกระบวนการทางชีวภาพ
- 1.2.4 ศึกษาสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส โปรตีเอส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ผักพื้นบ้านที่ใช้ในการศึกษา

ผักพื้นบ้านไทยที่เลือกมาทำการศึกษาคือผักที่หาซื้อได้และพบทั่วไปในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ กุยช่าย กระเทียม ข่า ขึ้นฉ่าย มะกรูด ตำลึง ตะไคร้ ผักกูด กระถิน บวบ ผักแว่น ผักหวาน สะระแหน่ มะระ ขึ้นฉะ พริกขี้หนู หัวปลี สายบัว โหระพา กะเพรา ใบเตย ชะพลู ถั่วพู แค มะเขือพวง ขจร ย่านาง และขิง โดยสามารถหาซื้อได้ที่ตลาดหนองมน ต.แสนสุข อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี

1.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากผักพื้นบ้าน

สารที่ใช้ในการสกัดผักพื้นบ้านประกอบไปด้วย น้ำ เอทานอล และเฮกเซน โดยจะทำการสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ 90 องศาเซลเซียส

1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จะใช้สารสกัดที่ 3 ความเข้มข้น และใช้เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนหมู ในขณะที่ใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์ โดยใช้ตัวควบคุมเชิงบวกได้แก่ Orlistat®, Acarbose®, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ nicotinic acid สำหรับเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์โปรตีเอส (ทริปซิน) และเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ โดยใช้สถานที่ทดลองคือห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1.3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอลกอฮอล์ในสิ่งมีชีวิต

ทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตทางอ้อมได้โดยการศึกษาผลของสารสกัดจากผักพื้นบ้านต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli*

1.3.5 การวิเคราะห์และการแปลผล

วิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติเป็นปัจจัยหลักในการตัดสินใจว่าสารสกัดจากผักพื้นบ้านมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดหรือไม่โดยเทียบกับการยับยั้งของตัวควบคุมเชิงบวก โดยทดลองซ้ำในแต่ละช่วงฤดูกาลและปีที่เก็บเกี่ยวเพื่อดูความแปรปรวนของผลการทดลอง

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่มุ่งหาพืชหรือสารชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคหรือใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามจากการสำรวจพฤติกรรมผู้บริโภคของไทยพบว่าคนไทยส่วนใหญ่ไม่นิยมรับประทานยาหรืออาหารเสริมสุขภาพและละเลยในการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะผักต่างๆ จึงก่อให้เกิดปัญหาภาวะอ้วนเพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะรณรงค์ให้คนไทยรับประทานผักเพิ่มขึ้นโดยไม่ต้องเปลี่ยนพฤติกรรมผู้บริโภค แนวทางหนึ่งคือการส่งเสริมให้รับประทานผักพื้นบ้านหรือผักพื้นบ้านตามท้องตลาดที่รับประทานเป็นประจำอยู่แล้ว โดยให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเป็นอาหารสุขภาพนอกเหนือจากการให้คุณค่าทางอาหารแล้วยังมีสรรพคุณในการควบคุมกระบวนการเผาผลาญอาหารของร่างกายเพื่อให้สามารถเลือกบริโภคอาหารได้ตามภาวะทางโภชนาการของแต่ละบุคคล โดยผู้วิจัยสนใจกระบวนการย่อยแป้งและไขมันซึ่งเป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นหลังจากการรับประทานอาหาร โดยมีสมมติฐานที่ว่าสารออกฤทธิ์ในผักพื้นบ้านไทยบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการย่อยแป้งและไขมันในลำไส้ซึ่งจะส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมน้ำตาลและกรดไขมันได้ทำให้ระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดลดลง เช่นเดียวกับการรับประทานยารักษาโรคเบาหวาน (Acarbose®) และยาลดไขมันในเลือด (Orlistat®) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์ไลเปสตามลำดับ

เนื่องจากสารออกฤทธิ์ในพืชมีมากมายหลายชนิดดังนั้นความจำเพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์จึงมีความสำคัญดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวควบคุม โดยมีสมมติฐานว่าสารสกัดจากผักพื้นบ้านที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นอาหารสุขภาพในการควบคุมน้ำหนักจะต้องสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดร

จีนส เพื่อให้เกิดการยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงต่อกระบวนการย่อยแป้งและไขมันเท่านั้น ทั้งนี้สารสกัดจากผักพื้นบ้านอาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ โดยถ้าสารสกัดจากผักพื้นบ้านนั้นยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสอย่างเดียวนั้น อาจเหมาะสมในการใช้เป็นอาหารสุขภาพของผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือถ้าสารสกัดจากผักพื้นบ้านนั้นยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอย่างเดียวนั้น ผักพื้นบ้านดังกล่าวอาจเหมาะสมในการใช้เป็นอาหารสุขภาพของผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง ในขณะที่ถ้าสารสกัดจากผักพื้นบ้านนั้นยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสอาจส่งผลให้เกิดภาวะท้องอืดและขาดโปรตีนเมื่อรับประทานผักพื้นบ้านชนิดนั้นในปริมาณมากได้ แต่สามารถพัฒนาและศึกษาสารออกฤทธิ์ที่พบในผักพื้นบ้านดังกล่าวเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากไวรัสได้ และถ้าสารสกัดจากผักพื้นบ้านใดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีนส ผักพื้นบ้านนั้นอาจมีฤทธิ์ในการชะลออาการเมาแอลกอฮอล์ซึ่งในระยะยาวไม่เป็นผลดีต่อดับ หรือการใช้ผักพื้นบ้านดังกล่าวในการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์เพื่อเพิ่มรสชาติหรือกลิ่นอาจส่งผลให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ลดลง อย่างไรก็ตามถ้าสารสกัดจากผักพื้นบ้านชนิดใดสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด อาจแสดงถึงความไม่จำเพาะเจาะจงในการยับยั้งปฏิกิริยาในร่างกาย ซึ่งอาจส่งผลเสียต่อร่างกายเมื่อรับประทานในปริมาณที่มากเกินไป แต่อาจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เป็นต้น

นอกจากนี้ชนิดของสารที่ใช้สกัดและอุณหภูมิส่งผลโดยตรงต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะใช้สารที่มีความต่างของขั้วเช่น น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ในการสกัดเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ที่ต่างกันตามการละลายในสารแต่ละชนิด โดยเรียงลำดับสารที่มีขั้วมากไปน้อยตามลำดับซึ่งสามารถสื่อถึงการปรุงอาหารได้ เช่น การคั้นน้ำ การดองเหล้า หรือการผัด เป็นต้น และเนื่องจากผักพื้นบ้านหลายชนิดนิยมรับประทานสุก ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดดังกล่าวโดยเปรียบเทียบการสกัดที่อุณหภูมิห้องร่างกาย 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูง 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลงานวิจัยดังกล่าวจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการประกอบอาหารและรับประทานผักพื้นบ้านเพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพได้ในอนาคต






2. วิธีการดำเนินการวิจัย


2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน











2.1.1 การเตรียมตัวอย่างผักพื้นบ้าน

ผักพื้นบ้านดังแสดงในตารางที่ 1 ซื้อมาจากตลาดหนองมน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี โดยเลือกเก็บตัวอย่างมาศึกษาในช่วง 3 ฤดู ได้แก่ ฤดูหนาว (ธันวาคม – กุมภาพันธ์) ฤดูร้อน (มีนาคม – เมษายน) และฤดูฝน (มิถุนายน – กรกฎาคม) จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบในไนโตรเจนเหลว โดยผงผักพื้นบ้านที่ได้ถูกนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ผักพื้นบ้านที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปผักพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป	ส่วนที่ใช้
<i>Abelmoschus esculentus</i> L. Moench.		Kajiang kheow	Fruit
<i>Acacia pennata</i> (L.) Willd.		Cha om	Leaves
<i>Allium cepa</i> Linn.		Hom hua yai	Clove
<i>Allium tuberosum</i> Rottler.		Kow choi	Leaves
<i>Allium sativum</i> L.		Kra tium	Clove

ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปผักพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป	ส่วนที่ใช้
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.		Khaa	Rhizome
<i>Apium graveolens</i> Linn.		Khuen-chai	Leaves
<i>Citrus hystrix</i> DC.		Makrut lime	Leaves
<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt.		Tum lung	Leaves
<i>Cymbopogon citrates</i> Stapf.		Ta khrai	Stem
<i>Diplazium esculentum</i>		Phak kuut khaao	Leaves
<i>Leucaena glauca</i> Benth.		Kra thin	Leaves
<i>Luffa acutangula</i>		Buab	Fruit
<i>Marsilea crenata</i> C. Presl		Phak waen	Leaves

ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปผักพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป	ส่วนที่ใช้
<i>Melientha suavis</i> Pierre.		Phak waan	Leaves
<i>Mentha cordifolia</i> Opiz ex Fresen		Saranae	Leaves
<i>Momordica charantia</i> Linn.		Ma ra kee nok	Fruit
<i>Momordica charantia</i> Linn. (Chinese)		Ma ra	Fruit
<i>Musa paradisiaca</i> L. var. <i>sapientum</i> O. Ktze., <i>M. sapientum</i> L.		Hua pli	Flowers
<i>Nymphaea pubescens</i> Willd.		Sai bua	Stem
<i>Ocimum basilicum</i> L.		Horapha	Leaves
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.		Kaphrao	Leaves
<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.		Bai toei	Leaves
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.		Chaphlu	Leaves

ชื่อวิทยาศาสตร์	รูปผักพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป	ส่วนที่ใช้
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (L.) DC.		Thua phuu	Fruit
<i>Sesbania grandiflora</i> (L.) Desv.		Khae	Flowers
<i>Salanum torvum</i> SW.		Ma khuea phuang	Fruit
<i>Telosma minor</i> Craib		Kha chon	Flowers
<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels		Ya nang	Leaves
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.		Khing	Rhizome

2.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

การสกัดร่วมด้วยเฮกเซนและเอทานอล

ซึ่งผงผักพื้นบ้าน 6 กรัม และนำมาสกัดร่วมด้วยเฮกเซนและเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,700xg เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว แยกชั้นเอทานอลและเฮกเซนด้วยกรวยแยก แล้วนำส่วนใสในแต่ละชั้นไประเหยแห้งโดยใช้โถดูดความชื้นและปั๊มสุญญากาศ จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดด้วยน้ำ

ซึ่งผงผักพื้นบ้าน 2 กรัม และนำมาสกัดด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว นำส่วนใสที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้โถดูดความชื้นและปั๊มสุญญากาศ จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์

2.2.1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหนู (L3126, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย reagent A (ทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ pH 7.8 ปริมาตร 16.2 มิลลิลิตร เอนไซม์ไลเปส 10 มิลลิกรัม (50 U) โซเดียมดีออกซีโคเลต 72 มิลลิกรัม และ แคลเซียมคลอไรด์ 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร) ปริมาตร 940 ไมโครลิตร และตัวควบคุมเชิงบวก (ความเข้มข้น 0.9 2.7 หรือ 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน (ความเข้มข้น 2.7 9.0 หรือ 30.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมพาราไนโตรฟีนิลพาลมิเตท (*para*-nitrophenylpalmitate, p-NPP) เป็นสารตั้งต้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที โดยใช้ออริสแตท (Orlistat® (Tetrahydrolipstatin), Xenical, Switzerland) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

2.2.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนหนู (A3176, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (20 มิลลิโมลาร์, pH 6.9) ปริมาตร 3.6 มิลลิลิตร ตัวควบคุมเชิงบวก (ความเข้มข้น 0.9 2.7 หรือ 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน (ความเข้มข้น 2.7 9.0 หรือ 30.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่น ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (0.4 U) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำแป้งความเข้มข้น 0.35 กรัม/ลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายผสมดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ และเติมสารละลายไอโอดีน 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้อะคาร์โบส (Acarbose®; Glucobay, Indonesia) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

2.2.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนหนู (T7168, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6 ปริมาตร 390 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ทริปซิน (เอนไซม์ทริปซิน 1 มิลลิกรัม (20 U) และแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และตัวควบคุมเชิงบวก (ความเข้มข้น 0.9 2.7 หรือ 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน (ความเข้มข้น 2.7 9.0 หรือ 30.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอ็นเบนโซอิลอาร์จินีนพาราไนโตรอะนีน (N-Benzoyl-D,L-Arginin-*p*-nitroaniline, BAPNA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 นาที โดยใช้ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); AppliChem, Germany) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

2.2.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์ (Sigma-Aldrich, A7011, USA) โดยผสมตัวควบคุมเชิงบวก (ความเข้มข้น 0.9 2.7 หรือ 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน (ความเข้มข้น 2.7 9.0 หรือ 30.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 10 ไมโครลิตร (1.5 U) ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์และสารตั้งต้น (โซเดียมไพโรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร, β -NAD 3.75 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที โดยใช้กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid; Gruppo montedison, Italy) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

2.3 การคำนวณและวิธีทางสถิติ

2.3.1 การคำนวณร้อยละกิจกรรมเอนไซม์

กิจกรรมเอนไซม์คำนวณจากอัตราความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาที่ได้จากค่าเฉลี่ยของความชันที่ได้จากข้อมูลอย่างน้อย 5 จุด บนเส้นกราฟระหว่างเวลาที่ใช้ในการทดลองกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารตั้งต้นที่ลดลงหรือผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นได้ และเป็นเส้นตรงโดยมีค่า r^2 มากกว่า 0.95 โดยกำหนดให้ชุดควบคุมเชิงลบที่เติมไดเมทิลซัลโฟลออกไซด์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 100% เป็นตัวเปรียบเทียบ ได้เป็นค่าร้อยละกิจกรรมเอนไซม์ (% activity) ดังสมการด้านล่าง

$$\text{ร้อยละกิจกรรมเอนไซม์} = \frac{\text{อัตราความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของชุดควบคุม} - \text{อัตราความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของชุดทดสอบ}}{\text{อัตราความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของชุดควบคุม}} \times 100$$

2.3.2 การคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้

ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50} : the half maximal inhibitory concentration) และ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ร้อยละ 25 (IC_{25} : the quarter maximal inhibitory concentration) คำนวณได้โดยใช้ ED50 plus v.1 (Apostolidis et al., 2006) ซึ่งเป็นส่วนเพิ่มขยายใน Microsoft Excel

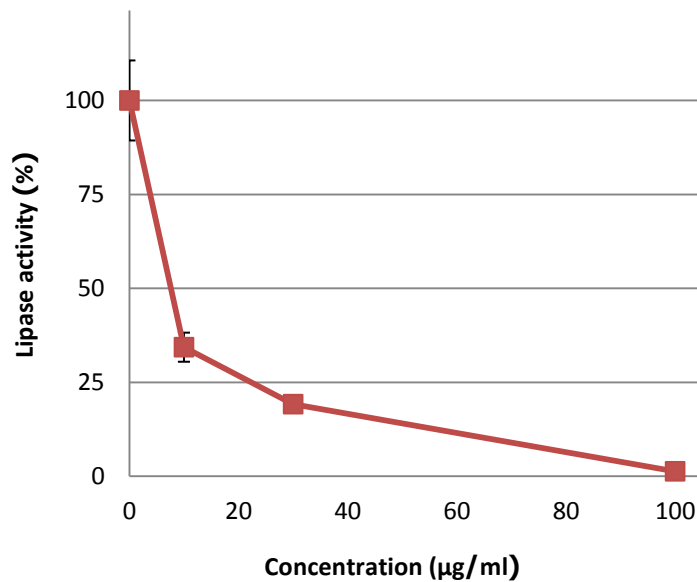
2.3.3 การวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติ

วิเคราะห์และเปรียบเทียบผลโดยโดยใช้โปรแกรม Minitab® ด้วยวิธี one-way ANOVA ร่วมกับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และวิเคราะห์สมการถดถอยโดยใช้ Microsoft Excel

3. ผลการวิจัย

3.1 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ผู้วิจัยใช้ Orlistat® ซึ่งเป็นยารักษาโรคอ้วนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยมีรายงานว่าค่าความเข้มข้นของ orlistat ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) อยู่ที่ 9.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kaewpiboon et al., 2012) โดยในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยพบค่า IC_{50} ของ orlistat อยู่ที่ 6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) โดยคำนวณได้จากภาพที่ 1 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษาคั้งนี้สามารถเปรียบเทียบได้กับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้



ภาพที่ 1 Inhibitory effect of Orlistat® on pancreatic lipase activity

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 6 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (<300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก ใบชะอม ใบขึ้นฉ่าย ใบมะกรูด ใบกะเพรา ใบเตย และใบย่านาง (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากใบมะกรูดแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส (IC_{50} =253.6 และ 181.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนจากใบชะอมแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวมากกว่าหนึ่งฤดูที่เก็บตัวอย่างมา (IC_{50} =286.3±11.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Anti-lipase activities of crude extracts from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₅₀ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. pennata</i>	Cha om	Hexane	286.3±11.2	>300
<i>A. graveolens</i>	Khuen-chai	Hexane	283.4	>300
<i>C. hystrix</i>	Makrut lime	Hexane	253.6	181.1
<i>O. tenuiflorum</i>	Kaphrao	Hexane	265.8	>300
<i>P. amaryllifolius</i>	Bai toei	Hexane	>300	231.8
<i>T. triandra</i>	Ya nang	Hexane	264.9	>300
Positive control			IC ₅₀ (µg/ml)	
Orlistat			6.2	

Note: Mean ± SD denotes an average of IC₅₀ obtained from different seasons.

เพื่อให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านชนิดอื่นซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 6 ชนิดข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้แสดงผลการคำนวณค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 25 (IC₂₅) โดย orlistat มีค่า IC₂₅ อยู่ที่ 4.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน ได้แก่ ใบกุยฉ่าย ใบตำลึง ใบกระถิน ใบสะระแหน่ ใบโหระพา ใบชะพลู ผลมะเขือพวง และเหง้าขิง มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้บางส่วน (ตารางที่ 3) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่ามีสารสกัดจากผักพื้นบ้านที่ไม่ได้สกัดด้วยเฮกเซน 2 ชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้บางส่วน ได้แก่ สารสกัดน้ำจากใบกุยฉ่ายที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (IC₂₅=248.1±57.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดเอทานอลจากเหง้าขิงที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (IC₂₅=241.2±18.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Anti-lipase activities as demonstrated by IC₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₂₅ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. pennata</i>	Cha om	Hexane	155.7±31.3 ^c	206.6±1.0 ^{abc}
<i>A. tuberosum</i>	Kow choi	Water	248.1±57.3 ^{abc}	>300
<i>C. grandis</i>	Tum lung	Hexane	246.8±28.6 ^{ab}	240.4±37.9 ^{abc}
<i>L. glauca</i>	Kra thin	Hexane	212.0±18.6 ^{abc}	215.8±4.5 ^{abc}
<i>M. cordifolia</i>	Saranae	Hexane	>300	231.0±3.0 ^{abc}
<i>O. basilicum</i>	Horapha	Hexane	>300	272.3±12.6 ^a
<i>P. sarmentosum</i>	Chaphlu	Hexane	175.3±26.9 ^{abc}	229.7±16.3 ^{abc}
<i>S. torvum</i>	Ma khuea phuang	Ethanol	>300	233.6±50.5 ^{abc}
<i>T. triandra</i>	Ya nang	Hexane	161.6±27.8 ^{bc}	207.7±47.0 ^{abc}
<i>Z. officinale</i>	Khing	Hexane	241.2±18.5 ^{abc}	>300
Positive control			IC₂₅ (µg/ml)	
Orlistat			4.2	

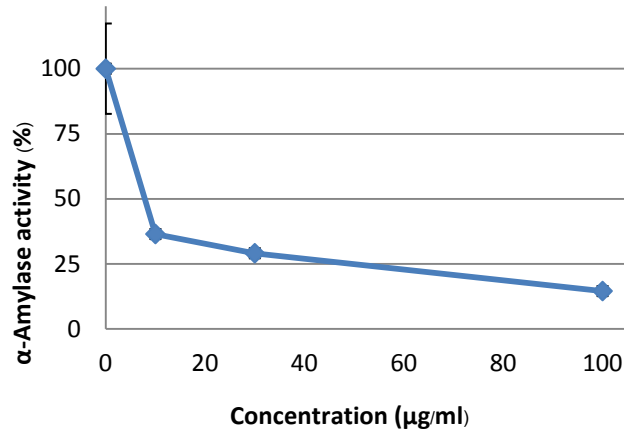
Note: Different characters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

3.2ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ผู้วิจัยใช้ Acarbose® ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยมีรายงานว่าค่าความเข้มข้นของ acarbose ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) อยู่ที่ 14.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chakrabarti et al., 2014) โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบค่า IC₅₀ ของ acarbose อยู่ที่ 6.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) โดยคำนวณได้จากภาพที่ 2 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าผลการศึกษานี้สามารถเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 8 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยสามารถคำนวณหาค่า IC₅₀ ได้ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (<300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก ใบชะอม ใบกุยฉ่าย ใบตำลึง ใบกระถิน ใบสะระแหน่ ใบเตย ใบย่านาง และเหง้าขิง (ตารางที่ 4) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากใบชะอมแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส (IC₅₀=264.8±44.4 และ 238.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนจากใบเตยแสดง

ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวมากกว่าหนึ่งฤดูที่เก็บตัวอย่างมา ($IC_{50}=232.5\pm 3.6$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เช่นเดียวกับสารสกัดเฮกเซนจากใบชะอม ซึ่งให้ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไม่ต่างกันเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 2 Inhibitory effect of Acarbose® on pancreatic α-amylase activity

ตารางที่ 4 Anti-alpha-amylase activities of crude extract from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₅₀ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. pennata</i>	Cha om	Hexane	264.8±44.4 ^a	238.8
<i>A. tuberosum</i>	Kow choi	Hexane	>300	296.9
<i>C. grandis</i>	Tum lung	Hexane	256.7	>300
<i>L. glauca</i>	Kra thin	Hexane	297.0	>300
<i>M. cordifolia</i>	Saranae	Hexane	267.1	>300
<i>P. amaryllifolius</i>	Bai toei	Hexane	232.5±3.6 ^a	>300
<i>T. triandra</i>	Ya nang	Hexane	253.5	>300
<i>Z. officinale</i>	Khing	Hexane	>300	252.0
Positive control			IC₅₀ (µg/ml)	
Acarbose			6.5	

Note: Mean ± SD denotes an average of IC₅₀ obtained from different seasons. Different characters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

เพื่อให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านชนิดอื่นซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 8 ชนิดข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้แสดงผลการคำนวณค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 25 (IC_{25}) โดย acarbose มีค่า IC_{25} อยู่ที่ 3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน ได้แก่ หัวกระเทียม ใบขึ้นฉ่าย ใบมะกรูด ผลมะระขี้นก ใบกะเพรา ใบชะพลู และผลมะเขือพวง มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้บางส่วน (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่า มีสารสกัดจากผักพื้นบ้านที่ไม่ได้สกัดด้วยเฮกเซน 6 ชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้บางส่วน ได้แก่ สารสกัดน้ำจากใบย่านางที่สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=240.6\pm 21.6$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดเอทานอลจากหัวกระเทียมที่สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=215.5\pm 33.5$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดเอทานอลจากผลมะเขือพวงที่สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=176.4\pm 11.4$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดเอทานอลจากใบกระถินที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=188.3\pm 22.1$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดเอทานอลจากใบย่านางที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=269.3\pm 12.9$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดเอทานอลจากใบชะอมที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{50}=144.7\pm 30.6$ และ 209.8 ± 31.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 5

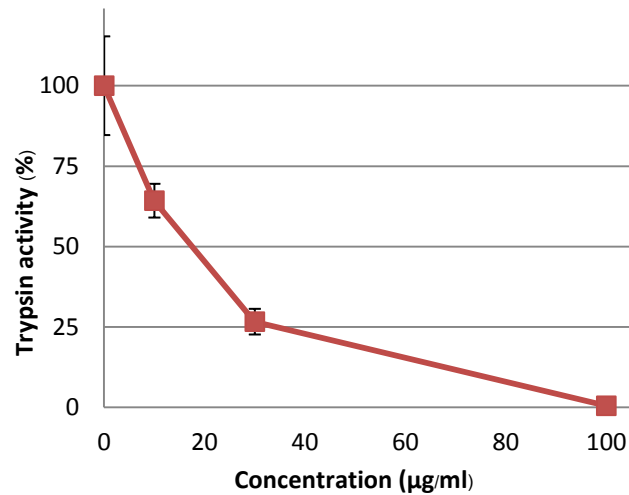
ตารางที่ 5 Anti alpha-amylase activities as demonstrated by IC₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₂₅ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. pennata</i>	Cha om	Ethanol	144.7±30.6 ^a	209.8±31.3 ^a
<i>A. sativum</i>	Kra tium	Ethanol	>300	215.5±33.5 ^a
<i>A. graveolens</i>	Khuen-chai	Hexane	>300	252.8±55.3 ^a
<i>C. grandis</i>	Tum lung	Hexane	116.7 ^a	212.3±54.5 ^a
<i>C. hystrix</i>	Makrut lime	Hexane	266.3±51.0 ^a	>300
		Hexane	170.4 ^a	227.0±18.3 ^a
<i>L. glauca</i>	Kra thin	Ethanol	188.3±22.1 ^a	>300
		Hexane	191.5 ^a	194.0±47.6 ^a
<i>M. cordifolia</i>	Saranae	Hexane	232.1±31.6 ^a	>300
<i>M. charantia</i>	Ma ra kee nok	Hexane	>300	220.1±81.3 ^a
<i>O. tenuiflorum</i>	Kaphrao	Hexane	>300	252.0±58.3 ^a
<i>P. sarmentosum</i>	Chaphlu	Hexane	193.6±14.8 ^a	176.4±11.4 ^a
		Ethanol	>300	223.0±19.4 ^a
<i>S. torvum</i>	Ma khuea phuang	Ethanol	>300	>300
		Hexane	157.7 ^a	240.6±21.6 ^a
<i>T. triandra</i>	Ya nang	Ethanol	269.3±12.9 ^a	>300
		Water	>300	>300
Positive control			IC₂₅ (µg/ml)	
Acarbose			3.0	

Note: Different characters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

3.3ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน ผู้วิจัยใช้ PMSF ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอส (Turini et al., 1969) ซึ่งนิยมใช้ในกระบวนการแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยผู้วิจัยพบค่า IC₅₀ ของ PMSF อยู่ที่ 15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) โดยคำนวณได้จากภาพที่ 3 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน โดยเฉพาะเพื่อหาค่า IC₅₀ ดังนั้นผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินนี้จึงยังไม่อาจเทียบกับการวิจัยอื่นได้โดยตรง



ภาพที่ 3 Inhibitory effect of phenylmethylsulfonyl fluoride on pancreatic trypsin activity

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 6 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมทร립ซิน โดยสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (<300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก หัวกระเทียม เหง้าข่า ใบสะระแหน่ ใบชะพลู และผลมะเขือพวง (ตารางที่ 6) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าข่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส (IC_{50} =220.7 และ 281.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยมีฤทธิ์ลดลงเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนจากหัวกระเทียมแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวมากกว่าหนึ่งฤดูที่เก็บตัวอย่างมา (IC_{50} = 278.8 ± 15.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดน้ำจากผลมะเขือพวงให้ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (IC_{50} =262.8 และ 286.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 6

เพื่อให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านชนิดอื่นซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 6 ชนิดข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้แสดงผลการคำนวณค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินได้ร้อยละ 25 (IC_{25}) โดย PMSF มีค่า IC_{25} อยู่ที่ 6.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน ได้แก่ ใบชะพลูและเหง้าขิง มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทร립ซินได้บางส่วน (ตารางที่ 7) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่ามีสารสกัดจากผักพื้นบ้านที่ไม่ได้สกัดด้วยเฮกเซน 2 ชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้บางส่วน ได้แก่ สารสกัดเอทานอลจากหัวกระเทียมที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (IC_{25} = 210.2 ± 51.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดเอทานอลจากเหง้าข่าที่สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

(IC₂₅=176.9±29.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้บางส่วนเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส (IC₅₀=183.8±17.2 และ 254.3±25.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 Anti-trypsin activities of crude extract from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₅₀ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. sativum</i>	Kra tium	Hexane	278.8±15.6	>300
<i>A. galanga</i>	Khaa	Hexane	220.7	281.8
<i>M. cordifolia</i>	Saranae	Hexane	279.3	>300
<i>P. sarmentosum</i>	Chaphlu	Water	286.6	>300
<i>S. torvum</i>	Ma khuea phuang	Hexane	262.8	>300
		Water	286.6	>300
Positive control			IC ₅₀ (µg/ml)	
PMSF			15.0	

Note: Mean ± SD denotes an average of IC₅₀ obtained from different seasons.

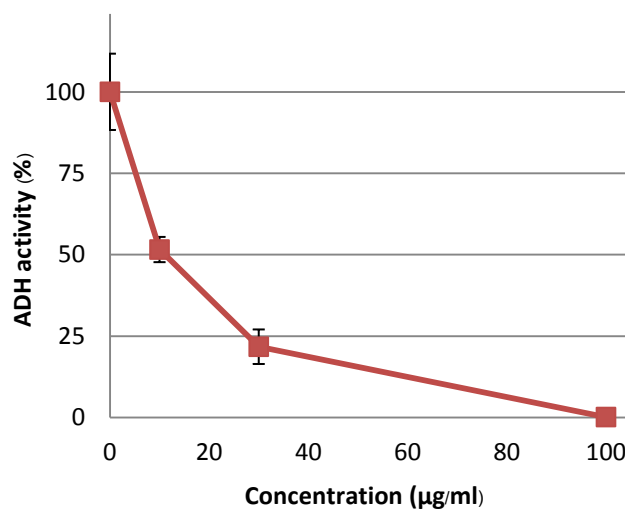
ตารางที่ 7 Anti-trypsin activities as demonstrated by IC₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₂₅ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. sativum</i>	Kra tium	Ethanol	210.2±51.8 ^a	>300
<i>A. galanga</i>	Khaa	Ethanol	>300	176.9±29.4 ^a
<i>P. sarmentosum</i>	Chaphlu	Hexane	>300	236.9±87.0 ^a
<i>Z. officinale</i>	Khing	Hexane	183.8±17.2 ^a	254.3±25.4 ^a
Positive control			IC ₂₅ (µg/ml)	
PMSF			6.0	

Note: Different characters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

3.4 ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ผู้วิจัยใช้ nicotinic acid หรือ Niacin ซึ่งเป็นวิตามินบี 3 แต่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ (Baker et al., 1973) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยผู้วิจัยพบค่า IC_{50} ของ nicotinic acid อยู่ที่ 9.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8) โดยคำนวณได้จากภาพที่ 4 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน โดยเฉพาะเพื่อหาค่า IC_{50} ดังนั้นผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสนี้จึงยังไม่อาจเทียบกับงานวิจัยอื่นได้โดยตรง



ภาพที่ 4 Inhibitory effect of nicotinic acid on yeast alcohol dehydrogenase (ADH) activity

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 4 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (<300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ สารสกัดหยาบจาก เหง้าข่า ใบขึ้นฉ่าย และเหง้าขิง (ตารางที่ 8) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทานอลจากเหง้าข่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($IC_{50}=259.5\pm 30.3$ และ 280.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยพบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าข่าได้มากกว่าหนึ่งฤดูที่เก็บตัวอย่างมา นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดีในสารสกัดเอทานอลจากเหง้าขิงที่สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($IC_{50}=287.3$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดน้ำจากใบขึ้นฉ่ายที่สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{50}=292.8$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 Anti alcohol dehydrogenase activities of crude extract from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₅₀ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. galanga</i>	Khaa	Hexane	259.5±30.3	>300
		Ethanol	280.1	>300
<i>A. graveolens</i>	Khuen-chai	Water	>300	292.8
<i>Z. officinale</i>	Khing	Ethanol	287.3	>300
Positive control			IC₅₀ (µg/ml)	
Nicotinic acid			9.8	

Note: Mean ± SD denotes an average of IC₅₀ obtained from different seasons.

ตารางที่ 9 Anti alcohol dehydrogenase activities as demonstrated by IC₂₅ values of crude extracts from Thai vegetables

Thai vegetables	Common name in Thai	Extract solvent	IC ₂₅ (µg/ml)	
			Extract temperature (°C)	
			37	90
<i>A. tuberosum</i>	Kow choi	Hexane	>300	257.8±8.7 ^a
<i>A. galanga</i>	Khaa	Ethanol	211.5±101.7 ^a	252.3±1.4 ^a
<i>C. hystrix</i>	Makrut lime	Hexane	247.9±17.4 ^a	>300
<i>O. tenuiflorum</i>	Kaphrao	Hexane	261.5±43.8 ^a	>300
<i>S. torvum</i>	Ma khuea phuang	Hexane	225.5±87.5 ^a	>300
<i>Z. officinale</i>	Khing	Hexane	251.8±24.1 ^a	>300
Positive control			IC₂₅ (µg/ml)	
Nicotinic acid			4.7	

Note: Different characters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

เพื่อให้เห็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านชนิดอื่นซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 4 ชนิดข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้แสดงผลการคำนวณค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ร้อยละ 25 (IC₂₅) โดย nicotinic acid มีค่า IC₂₅ อยู่ที่ 4.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน ได้แก่ ใบกุ่ม่าย ใบมะกรูด ใบกะเพรา และผลมะเขือพวง มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้บางส่วน (ตารางที่ 9) ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่านอกเหนือจากสารสกัดเอทานอลจากเหง้าข่าออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สารสกัดเอทานอลจากเหง้าข่ายังออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์

แอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสได้บางส่วนเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ($IC_{25}=252.3\pm 1.4$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 9

4. อภิปรายผลการวิจัย

4.1 การสกัดร่วมด้วยเอทานอลและเฮกเซน

ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องคำนึงถึงสภาพขั้วของสารที่ต้องการสกัดเป็นหลัก ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันได้แก่ น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ซึ่งมีความมีขั้วสัมพัทธ์ (relative polarity) 1.000 0.654 และ 0.009 ตามลำดับ เมื่อทำการแยกสกัดผงผักพื้นบ้านด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่าเฮกเซนสกัดสารสกัดออกมาได้น้อย อันเนื่องมาจากความไม่มีขั้วของเฮกเซน กอปรกับเซลล์พืชประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่จึงส่งผลให้เฮกเซนไม่สามารถเข้าไปทำละลายสารภายในเซลล์ได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิคการสกัดร่วมโดยใช้เอทานอลผสมเฮกเซนในอัตราส่วน 1:2 ส่งผลให้ได้สารสกัดที่ย่อยละลายอยู่ในชั้นเฮกเซนออกมาในปริมาณมาก เนื่องจากเฮกเซนและเอทานอลสลับกันทำหน้าที่ในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตซอลเพื่อละลายสารภายในเซลล์และสกัดออกมา โดยเมื่อนำมาแยกชั้นจะได้ออกมาในชั้นที่ไม่มีขั้วละลายอยู่ในชั้นเฮกเซนและสารที่มีขั้วละลายอยู่ในชั้นเอทานอล ตามลำดับ นอกจากนี้ปัญหาที่ผู้วิจัยพบอีกส่วนหนึ่งคือในการสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้สูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด (68.7 และ 78.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) ดังนั้นในการสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยการให้ความร้อนผ่านทางน้ำพร้อมกับการเขย่า จึงใช้เวลา 1 นาที และเมื่อเสร็จสิ้นการสกัดอัตราส่วนระหว่างเอทานอลและเฮกเซน จะอยู่ที่ประมาณ 1:1

4.2 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในการย่อยไขมันในระบบทางเดินอาหาร (Birari & Bhutani, 2007) จากผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 30 ชนิด พบผักพื้นบ้าน 6 ชนิดเท่านั้นที่สารสกัดหยาบมีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ดี โดยสารสกัดหยาบดังกล่าวมีฤทธิ์น้อยกว่า Orlistat® ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ (tetrahydrolipstatin) อยู่ประมาณ 40 - 50 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} โดยผักพื้นบ้านที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพในการลดน้ำหนักซึ่งมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ ใบมะกรูด ใบเตยและใบชะอม เนื่องจากสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในใบ

มะกรูดและใบเตยทนต่ออุณหภูมิสูงหรือสามารถสกัดออกมาได้มากขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น ในขณะที่การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในใบชะอมให้ผลที่น่าเชื่อถือที่สุด เนื่องจากสามารถทำซ้ำได้เมื่อพิจารณาการเก็บตัวอย่างที่มาจากหลายฤดูการผลิต ถึงแม้ว่าอุณหภูมิสูงจะส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของสารออกฤทธิ์ในใบชะอม (ตารางที่ 2 และ 3) ในขณะที่อุณหภูมิสูงส่งผลต่อต่อสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในใบย่านางคล้ายที่พบในใบชะอม กล่าวคือส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในสารสกัดจากใบย่านางมีน้อยกว่าที่พบในสารสกัดจากใบชะอม นอกจากนี้ใบกุยฉ่ายและผลมะเขือพวงเป็นผักพื้นบ้านเพียง 2 ชนิดที่พบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสบางส่วนในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผักพื้นบ้านทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นสารในกลุ่มที่มีขี้และอาจเหมาะสมในการศึกษาพัฒนาแยกสารบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการผลิตยาควบคุมน้ำหนักชนิดใหม่ต่อไป

4.3 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงและไกลโคเจนเป็นกลูโคสและมอลโตสในระบบทางเดินอาหาร (Nair et al., 2013) โดยการรับประทานแป้งมากเกินไปเกินความต้องการของร่างกายเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอ้วนและโรคเบาหวาน ดังนั้นจึงมีการพัฒนายารักษาโรคเบาหวานขึ้นเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยยับยั้งกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ Acarbose® ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์จึงยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสแบบแข่งขัน (Rosak & Mertes, 2012) จากผลการศึกษาพบว่าผักพื้นบ้าน 8 ชนิด มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีโดยมีค่า IC_{50} สูงกว่า Acarbose® ประมาณ 40 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่น้อยกว่า และมีผักพื้นบ้าน 11 ชนิดที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพในการควบคุมการปลดปล่อยน้ำตาลจากการย่อยแป้ง ได้แก่ ใบชะอม ใบเตย ใบกุยฉ่าย เหง้าขิง ใบตำลึง ใบมะกรูด ใบกระถิน ใบสะระแหน่ ใบชะพลู ผลมะเขือพวง และใบย่านาง โดยในใบชะอมและใบเตยนั้นมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขี้และพบได้ในตัวอย่างที่เก็บมามากกว่าหนึ่งฤดู แต่สารออกฤทธิ์ในใบชะอมทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าสารออกฤทธิ์ในใบเตย (ตารางที่ 4 และ 5) ส่วนใบกุยฉ่ายและเหง้าขิงนั้นมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ซึ่งทนอุณหภูมิสูง (ตารางที่ 4) และใบตำลึง ใบมะกรูด ใบกระถิน ใบ

สาระแทน ใบชะพลู และผลมะเขือพวง มีสารออกออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้บางส่วนที่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วโดยพบฤทธิ์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5) และมีฤทธิ์น้อยกว่า Acarbose® ประมาณ 30 - 75 เท่า นอกจากนี้ใบชะอม หัวกระเทียม ใบกระถิน ผลมะเขือพวง และใบย่านางเป็นผักพื้นบ้านที่พบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสบางส่วนในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล โดยใบย่านางนั้นยังพบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสบางส่วนในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำด้วย (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผักพื้นบ้านทั้ง 5 ชนิดนี้ เป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วและอาจเหมาะสมในการศึกษาพัฒนาแยกสารบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการผลิตยาควบคุมน้ำหนักชนิดใหม่ต่อไป โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ในใบย่านางซึ่งละลายในน้ำได้ดีและทนอุณหภูมิสูง (ตารางที่ 5) ซึ่งเหมาะสมในการนำมาผลิตเครื่องดื่มสมุนไพร

4.4 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน

ในการศึกษานี้ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้ถึงความจำเพาะเจาะจงของฤทธิ์ของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้านในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลส เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสจะส่งผลข้างเคียงในการย่อยโปรตีน และการดูดซึมกรดอะมิโนซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของร่างกาย โดยเอนไซม์ทริปซินจะตัดพันธะเพปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก เช่น ไลซีนและอาร์จินีน โดยปกติพืชบางชนิด โดยเฉพาะในกลุ่ม *Leguminosae* เช่น ถั่วเหลือง จะผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอส โดยแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ Bowman-Birk และ Kunitz (Birk, 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่ามีผักพื้นบ้านเพียง 5 ชนิด ที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้ดี โดยมีค่า IC50 มากกว่า PMSF ประมาณ 15 – 20 เท่า ได้แก่ หัวกระเทียม เหง้าข่า ใบชะพลู และผลมะเขือพวง (ตารางที่ 6) โดยสารสกัดเฮกเซนจากเหง้าข่าและขิงมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้และทนต่ออุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นถึงสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในกลุ่มที่ไม่มีขั้วในเหง้าพืชตระกูล *Zingiberaceae* ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทานอลจากหัวกระเทียมมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้โดยพบฤทธิ์ดังกล่าวในตัวอย่างกระเทียมที่เก็บมามากกว่าหนึ่งฤดูแสดงให้เห็นถึงสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินในกลุ่มที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (ตารางที่ 6 และ 7) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังพบผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินที่สกัดและละลายได้โดยใช้น้ำ ได้แก่ ใบชะพลูและผลมะเขือพวง ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 6) จากข้อมูลข้างต้น

แสดงให้เห็นว่าการรับประทานผักพื้นบ้านเหล่านี้ในปริมาณมากอาจส่งผลต่อการย่อยโปรตีนและดูดซึมกรดอะมิโนตามลำดับ โดยสามารถนำสารสกัดจากผักพื้นบ้านดังกล่าวไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับทาภายนอกร่างกาย เช่น ยาสมานแผล เครื่องสำอาง และสารต้านจุลชีพ เป็นต้น

4.5 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ในการศึกษานี้ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้ถึงความจำเพาะเจาะจงของฤทธิ์ของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้านในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร เนื่องจากเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจัดอยู่ในกลุ่ม oxidoreductase ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดอกซ์ ในขณะที่เอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ไลเปส แอลฟาอะไมเลส และทริปซิน จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase ซึ่งใช้น้ำในการตัดพันธะ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นแอลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการเมาเหล้าในมนุษย์ (Eriksson, 2001; Crabb et al., 2004) โดยในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาอาการเมาเหล้าคือ 4-methylpyrazole ซึ่งช่วยยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสไม่ให้เปลี่ยนเอทานอลเป็นอะซีทัลดีไฮด์ ส่งผลให้ระดับอะซีทัลดีไฮด์ในเลือดลดลง (Inoue et al., 1985) ดังนั้นผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอาจนำมาใช้ในการพัฒนาหรือสมุนไพรในการรักษาอาการเมาเหล้าได้ โดยจากการศึกษาพบว่าผักพื้นบ้านเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดี ได้แก่ เหง้าข่า ใบขึ้นฉ่าย และเหง้าขิง โดยสารสกัดจากผักพื้นบ้านดังกล่าวจะละลายในตัวทำละลายมีขั้ว ได้แก่ เอทานอลและน้ำ ยกเว้นในเหง้าข่าที่พบว่ามีสารออกฤทธิ์ที่ละลายในเฮกเซนด้วย (ตารางที่ 8) เมื่อพิจารณาฤทธิ์ที่น่าสนใจจะพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากข่ายับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสารสกัดเอทานอลจากข่ายับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ค่อนข้างดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 และ 90 องศาเซลเซียส และให้ผลสอดคล้องกันจากตัวอย่างที่เก็บมามากกว่าหนึ่งฤดู (ตารางที่ 8 และ 9) ในขณะที่สารสกัดน้ำจากใบขึ้นฉ่ายยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดีเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวทนต่ออุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังมีผักพื้นบ้านบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้บางส่วนแต่ให้ผลคล้ายกันเมื่อเก็บตัวอย่างมามากกว่าหนึ่งฤดู ได้แก่ ใบกุยฉ่าย ใบมะกรูด ใบกะเพรา และผลมะเขือพวง โดยส่วนใหญ่จะให้ผลเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นใบกุยฉ่ายที่ให้ผลเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9) จากข้อมูล

ข้างต้นผู้ป่วยอาจใช้ผักพื้นบ้านดังกล่าว เช่น เหง้าข่า เป็นสมุนไพรในการแก้อาการเมา หรือพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรในการบรรเทาอาการเมาต่อไป

4.6 ผักพื้นบ้านที่ไม่ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ผลพลอยได้หนึ่งจากการศึกษาผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือการศึกษาที่ผู้วิจัยพบว่าผักพื้นบ้านบางชนิดที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้น้อยมาก ได้แก่ ผักบวบ ใบผักหวาน สายบัว ผักถั่วพู และดอกแค ซึ่งผักพื้นบ้านดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการประกอบอาหารสำหรับเด็ก ผู้ป่วย หรือผู้ที่มีปัญหาในระบบย่อยอาหาร ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายย่อยอาหารที่รับประทานเข้าไปได้ง่ายขึ้น

4.7 ผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสแต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

จากการวิเคราะห์ผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดโดยสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านพบว่าผักพื้นบ้าน 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสดี แต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ได้แก่ ใบชะอม ใบเตย และใบย่านาง โดยในใบใบย่านางจะพบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสบางส่วนเมื่อสกัดด้วยน้ำด้วย ดังนั้นใบชะอมจึงเหมาะสมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพสำหรับควบคุมน้ำตาลและไขมัน ส่วนใบเตยอาจพัฒนาสารสกัดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น ข้าวน้ำใบเตยลดน้ำหนัก เป็นต้น และใบย่านางเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเครื่องสมุนไพรหรือประกอบอาหารที่ใช้น้ำเพื่อใช้ในการควบคุมน้ำหนัก เป็นต้น

5. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน 30 ชนิด พบว่ามีผักพื้นบ้าน 3 ชนิด ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันและรักษาโรคอ้วนและโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบชะอม (*Acacia pennata*) ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius*) และใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) เนื่องจากสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสที่ดี ($IC_{50} < 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยมีฤทธิ์ต่ำกว่า Orlistat® และ Acarbose® ซึ่งเป็นยารักษาโรคอ้วนและโรคเบาหวานที่เป็นสารเคมีบริสุทธิ์ประมาณ 40 เท่า และพบฤทธิ์ดังกล่าวในตัวอย่างผักพื้นบ้านที่เก็บมามากกว่าหนึ่งฤดู แต่มีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ($IC_{25} > 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนและการสลายแอลกอฮอล์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากเหง้าข่า (*Alpinia galanga*) ให้ผลในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ตรงข้ามกับกลุ่มของสารสกัดหยาบจากใบชะอม ใบเตย และใบย่านาง กล่าวคือสามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์ทริปซินและแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดี ($IC_{50} < 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสได้น้อย ($IC_{25} > 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยาใช้ทาภายนอกหรือยาแก้อาการเมตามลำดับ และผู้วิจัยพบว่ามีผักพื้นบ้าน 5 ชนิดที่สารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านดังกล่าวไม่พบฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดต่ำ ($IC_{25} > 300$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ ฝักบัว (*Luffa acutangula*) ใบผักหวาน (*Meleinthia suavis*) สายบัว (*Nymphaea pubescens*) ฝักถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus*) และดอกแค (*Sesbania grandiflora*) จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาเป็นอาหารสำหรับเด็ก ผู้ป่วย หรือผู้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางด้านอาหารเพื่อสุขภาพจากผักพื้นบ้านไทย และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการบริโภคผักพื้นบ้านให้เหมาะสมกับรายได้และสุขภาพของตนเองเพื่อป้องกันและลดอัตราการเกิดโรคอ้วนและโรคเบาหวานในประชากรไทยอย่างยั่งยืน

6. ผลผลิต

6.1. ผลงานตีพิมพ์

- 6.1.1. อัจฉรา แสงจันทร์, อัจฉรา บุตรดี และสลิลา ชั้นโรจน์. (2559). ผลของสารสกัดหยาบจากอบเชยและส้มแขกต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 21(3), 268-278.
- 6.1.2. กมลฉัตร อ่องมะลิ, อัจฉรา บุตรดี และสลิลา ชั้นโรจน์. (2560). การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 22(พิเศษ), 42-54.

6.2. ผลงานเชิงพาณิชย์

การใช้ใบตะไคร้แปรรูปในการป้องกันและรักษาโรคอ้วน (กำลังดำเนินการพัฒนาร่วมกับภาคเอกชน)

6.3. ผลงานเชิงสาธารณะ

การนำเสนอตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากใบตะไคร้และใบเตยในหัวข้อ “น้ำใบตะไคร้ใบเตยเพื่อสุขภาพสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและโรคอ้วน” ในงาน “มิติใหม่ห่อการค้าชลบุรี สู่เวทีความร่วมมือทุกภาคส่วน และ 7 ผลงานนวัตกรรม” ณ มหาวิทยาลัยบูรพา วันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2561

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A10802140 สัญญาเลขที่ 84/2559

โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แอลฟาอะไมเลส โปรตีเอส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพในการควบคุมน้ำหนัก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.สลิล ชื่นโรจน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2558 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	305,250	บาท	เมื่อ	16 ธันวาคม พ.ศ.2558
งวดที่ 2 (40%)	244,200	บาท	เมื่อ	3 มิถุนายน พ.ศ.2559
งวดที่ 3 (10%)	61,050	บาท	เมื่อ	ยังไม่ได้รับ
รวม	610,500	บาท		

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	54,400	54,400	0
2. ค่าจ้าง	93,100	93,100	0
3. ค่าวัสดุ	380,000	379,890	110
4. ค่าใช้สอย	21,950	22,060	-110
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	61,050	61,050	0
รวม	610,500	610,500	0

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- Baker, H., Luisada-Opper, A., Sorrell, M.F., Thomson, A.D. and Frank, O., 1973. Inhibition by nicotinic acid of hepatic steatosis and alcohol dehydrogenase in ethanol-treated rats. *Experimental and molecular pathology*, 19(1), pp.106-112.
- Birari, R.B. and Bhutani, K.K., 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*, 12(19-20), pp.879-889.
- Birk, Y., 1985. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin-and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International journal of peptide and protein research*, 25(2), pp.113-131.
- Chakrabarti, R., Singh, B., Vanchhawng, L. and Thirumurugan, K., 2014. Screening of nine herbal plants for in vitro α -amylase inhibition. *Screening*, 7(4).
- Crabb, D.W., Matsumoto, M., Chang, D. and You, M., 2004. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the nutrition society*, 63(1), pp.49-63.
- Eriksson, C.P., 2001. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, pp.15S-32S.
- Inoue, K., Kera, Y., Kiriya, T. and Komura, S., 1985. Suppression of Acetaldehyde Accumulation by 4-Methyl pyrazole in Alcohol-Hypersensitive Japanese. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 38(1), pp.43-48.
- Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwapisrisan, P., Svasti, J. and Assavalapsakul, W., 2012. Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), p.217.
- Nair, S.S., Kavrekar, V. and Mishra, A., 2013. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), pp.128-132.
- Rosak, C. and Mertes, G., 2012. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 5, p.357.
- Turini, P., Kurooka, S., Steer, M., Corbascio, A.N. and Singer, T.P., 1969. The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 167(1), pp.98-104.