การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้

Inhibitory Effects of Crude Leaf Extract of Lemongrass on Digestive Enzyme Activity and Its Antioxidant Property

กมลฉัตร อ่องมะลิ อัจฉรา แสงจันทร์ และ สลิล ชั้นโรจน์*

Kamonchat Ongmali, Adchara Sangchan and Salil Chanroj*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 June 2017

Accepted : 3 July 2017

Published online : 6 July 2017

บทคัดย่อ

ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) เป็นเครื่องเทศสมุนไพรที่พบทั่วไปในอาหารพื้นบ้านไทย เกษตรกรผู้ปลูกตะไคร้จะนำส่วนลำต้นส่งขายตลาด ส่วนใบที่ตัดออกนั้นจะนำไปใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยในราคาถูก ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มมูลค่าให้กับใบตะไคร้โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ จากการศึกษาพบว่าการสกัดใบตะไคร้ด้วยเฮกเซนให้ผลดีในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (IC_{50} = 26.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่การสกัดด้วยเอทานอลให้ผลดีในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (IC_{50} = 97.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} = 96.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี DPPH) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากใบตะไคร้ไม่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารเฉพาะกิจกรรมการย่อยแป้งและไขมัน ดังนั้นใบตะไคร้จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาไปเป็นอาหารสุขภาพในการป้องกัน และรักษาโรคเบาหวาน และโรคอ้วนต่อไป

คำสำคัญ : ใบตะไคร้ แอลฟาอะไมเลส ไลเปส ทริปซิน สารต้านอนุมูลอิสระ

*Corresponding author. E-mail : salil@buu.ac.th

Abstract

Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) is a common herb and spice found in traditional Thai cuisine. Only its stem is commercially available in the market; however, the leaf is taken inexpensively as a source for essential oil extraction. Therefore, the goal of this research is to increase the economical value of lemongrass leaf by providing information on bioactive properties of the crude leaf extract in an attempt to develop a novel healthcare product. Results revealed that hexane extract obtained from lemongrass leaf extremely inhibited alpha-amylase activity (IC_{50} = 26.6 μg/ml), whereas ethanol extract significantly inhibited lipase activity (IC_{50} = 97.2 μg/ml) as well as exhibited strong antioxidant activity (IC_{50} = 96.7 μg/ml from DPPH assay). Interestingly, none of the extract showed anti-trypsin activity, suggesting that the extract selectively inhibited starch and fat hydrolysis in the digestive system. Taken together, lemongrass leaf has the potential to be functional food or herbal medicine for preventing and curing diabetes and obesity.

Keywords : lemongrass leaf, alpha-amylase, lipase, trypsin, antioxidant

บทนำ

ตะไคร้ (Lemongrass) ถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องดื่มและใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหลายชนิด เนื่องจากตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาและป้องกันการเกิดโรคโรคเบาหวาน (Mansour *et al*., 2002) นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (Citronella oil) มีสรรพคุณในการไล่แมลง (Wong *et al*., 2005) ส่งผลให้ตะไคร้เป็นพืชที่มีแมลงรบกวนน้อย การปลูกจึงไม่ต้องการการดูแลรักษามากเหมือนพืชไร่ชนิดอื่นโดยเฉพาะการใช้ยาปราบศัตรูพืช นอกจากนี้ตะไคร้เป็นพืชในตระกูลหญ้า (Poaceae) ซึ่งต้องการน้ำน้อยแต่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยสายพันธุ์ตะไคร้ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อขายและส่งออกคือตะไคร้พันธุ์ขาวเกษตรหรือพันธุ์ขาวหยวกซึ่งจัดเป็นตะไคร้แกง (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf หรือ *Cymbopogon flexuosus*) ซึ่งแตกต่างจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus*) ที่นำมาใช้สกัดน้ำมันตะไคร้หอม อย่างไรก็ตามหลังจากตัดต้นตะไคร้ออกขาย เกษตรกรจะขายใบตะไคร้ในราคาถูกเพื่อนำไปสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลและระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูหลังจากได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ โดยเมื่อแยกวิเคราะห์อย่างละเอียดพบว่าระดับไขมันที่มีความหนาแน่นสูง (HDL) เพิ่มขึ้นแต่ระดับไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ (VLDL และ LDL) ลดลง ควบคู่ไปกับการลดลงของอัตราการเพิ่มน้ำหนักของหนูที่ได้รับสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ตามปริมาณที่ได้รับ (Adeneye and Agbaje, 2007; Agbafor and Akubugwo, 2007) ซึ่งกลไกที่ส่งผลให้เกิดการลดลงของระดับน้ำตาล และระดับโคเลสเตอรอลในหนูโดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจะสามารถอธิบายกระบวนการก่อนการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกายได้ โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (EC 3.2.1.1) ทำหน้าที่ในการสลายพันธะไกลโคซิดิกในแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

จะส่งผลให้เกิดการดูดซึมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งน้อยลง ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส (EC 3.1.1.3) ทำหน้าที่ในการสลายพันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์หรือไขมันกลายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลก่อนถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กต่อไป การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจะส่งผลให้ร่างกายดูดซึมกรดไขมันและกลีเซอรอลน้อยลง นอกจากนี้เอนไซม์ทริปซิน (EC 3.4.21.4) ทำหน้าที่ในการสลายพันธะเพปไทด์บริเวณที่มีหมู่อะมิโนที่มีประจุบวก เช่น อาร์จินีน หรือไลซีน การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินจะส่งผลให้ร่างกายดูดซึมกรดอะมิโนได้น้อยลง

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของใบตะไคร้ โดยศึกษาผลของตัวทำละลายและผลของอุณหภูมิที่ใช้สกัดสารจากใบตะไคร้พันธุ์ขาวหยวกต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (แอลฟาอะไมเลส ไลเปส และทริปซิน) โดยเทียบกับตัวควบคุมคือ อะคาร์โบส (ยารักษาโรคเบาหวาน) ออริสแตท (ยารักษาโรคอ้วน) และ ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (สารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส) และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ในสารสกัดดังกล่าว เพื่อนำข้อมูลประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากใบตะไคร้ในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวานและโรคอ้วนต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้

ตัวอย่างใบตะไคร้สดสายพันธุ์ขาวหยวกได้มาจากไร่เกษตรกรบริเวณหมู่ 2 ตำบล ปากแพรก อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤศจิกายน เมื่อต้นตะไคร้มีอายุประมาณ 6 เดือนหลังการปลูก โดยนำมาทำความสะอาดและบดให้ละเอียดภายใต้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำตัวอย่างใบตะไคร้ที่บดละเอียดมาสกัดด้วยน้ำหรือเอทานอลผสมเฮกเซนในอัตราส่วน 1:2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสไประเหยตัวสกัดออกภายใต้สภาวะสุญญากาศ ยกเว้นการสกัดด้วยเอทานอลผสมเอกเซนที่แยกวัฏภาคเอทานอลออกจากเฮกเซนก่อนนำไประเหย จากนั้นชั่งน้ำหนักและละลายตะกอนด้วยไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนหมู (10 U.mg^{-1}; A3167, Sigma-Aldrich) เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหมู (100 U.mg^{-1}; L3126, Sigma-Aldrich) และเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนหมู (1,000 U.mg^{-1}; T4799, Sigma-Aldrich) โดยใช้ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ได้แก่ อะคาร์โบส (Acarbose; Glucobay®, Bayer) ออริสแตท (Orlistat; Xenical®, Roche) และฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF) ตามลำดับ โดยทำการศึกษาการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดตามงานวิจัยของ Sangchan *et al*. (2016) และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมในทุกการทดลอง

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ดัดแปลงจาก Kähkönen *et al*., 1999)

DPPH Assay บ่มสารสกัดจากใบตะไคร้กับ DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 0.1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล 95% ไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระโทรลอกซ์ (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) เป็นสารมาตรฐาน

ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ผสมสารสกัดจากใบตะไคร้กับสารละลาย 1 นอร์มอล Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเติม 3.75% โซเดียมคาร์บอเนต 800 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน

การคำนวณและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าร้อยละกิจกรรมเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละช่วงเวลามาสร้างกราฟเพื่อหาค่าอัตราเร็ว (V) ในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้กราฟเส้นตรงเท่านั้นเพื่อให้ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ที่สุด แล้วนำมาเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อใช้ตัวควบคุม (Vc) ดังสมการด้านล่าง (1)

$$\text{ร้อยละกิจกรรมเอนไซม์} = \frac{V}{Vc} \text{ x } 100 \qquad (1)$$

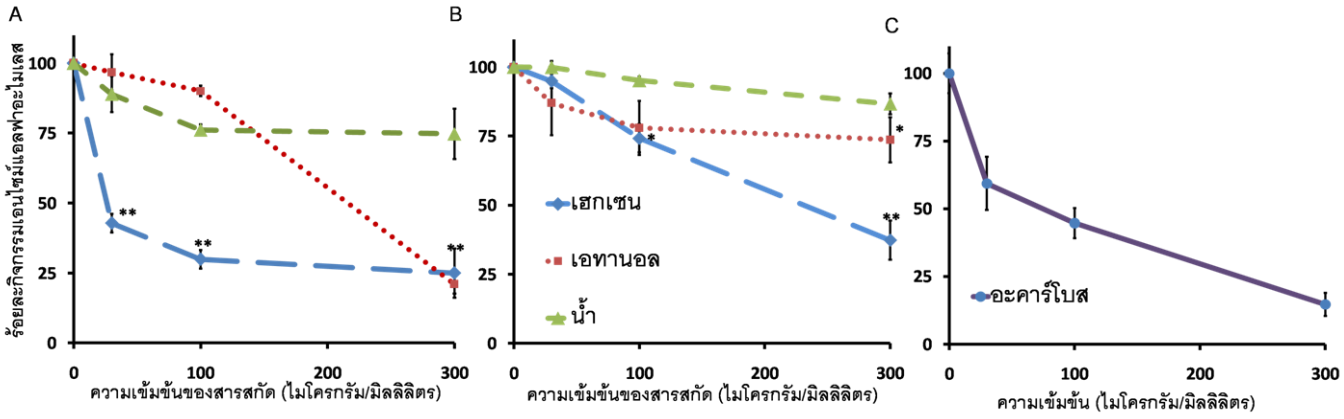
ค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง 50% (IC_{50}) สามารถหาได้โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหรือตัวควบคุมกับร้อยละกิจกรรมเอนไซม์หรือร้อยละของ DPPH ในรูปอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ร้อยละ 50 และใช้โปรแกรม ED50 plus v.1.0 ใน Microsoft Excel ช่วยในการประมาณค่าดังกล่าว

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ความแตกต่างของข้อมูลภายในกลุ่มทดลองถูกวิเคราะห์โดยวิธี One Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) และวิเคราะห์ต่อเพื่อหาค่าความแตกต่างระหว่างข้อมูลด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (p<0.01) และ 99.9 (p<0.001) ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ (ภาพที่ 1) จากการศึกษาโดยใช้อะคาร์โบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (IC_{50} = 79.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน (IC_{50} = 26.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้บางส่วนเมื่อสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50} = 206.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 90 องศาเซลเซียสพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรม

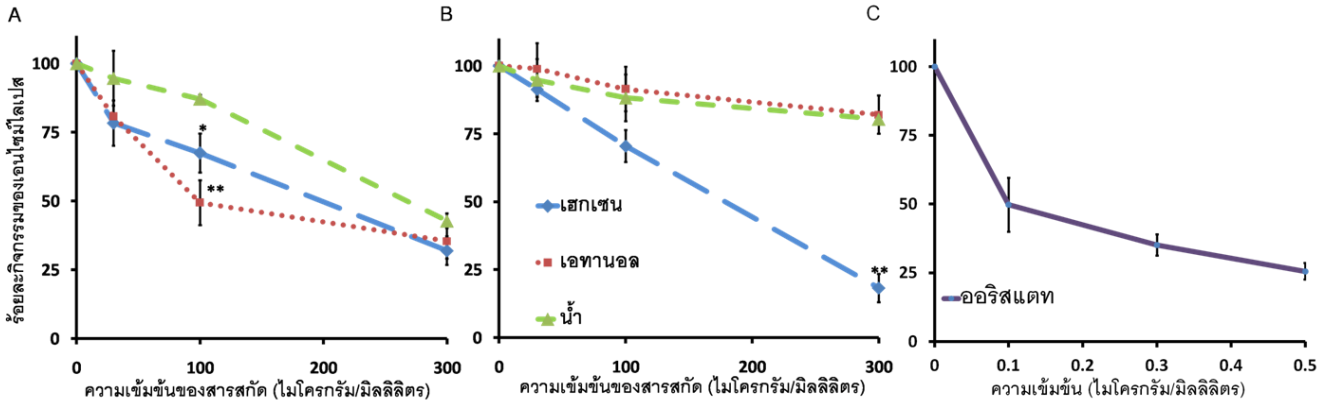


ภาพที่ 1 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สกัดที่อุณหภูมิ A) 37 องศาเซลเซียส B) 90 องศาเซลเซียส C) อะคาร์โบส * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำ (* p<0.01, ** p<0.001)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสลดลงในทุกวิธีการสกัด (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วน้อยและไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง ยกเว้นสารในกลุ่มที่ไม่มีขั้วบางชนิดที่สกัดได้โดยเฮกเซนที่ยังสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้บางส่วน (IC_{50} = 234.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่บ่งชี้ว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นและกาบใบตะไคร้สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ (Boaduo *et al*., 2014; Wongsa *et al*., 2012) ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากการสกัดใบตะไคร้ด้วยน้ำร้อนส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูลดลงตามปริมาณสารสกัดที่ได้รับ (Adeneye and Agbaje, 2007) และสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าอะคาร์โบส (Jumepaeng *et al*., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการสกัดใบตะไคร้ด้วยเฮกเซนในการศึกษานี้ ดังนั้นผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยสารออกฤทธิ์ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงดังกล่าวอาจจะเป็นสารในกลุ่มไม่มีขั้วซึ่งพบได้ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบตะไคร้ ได้แก่สารในกลุ่ม citral (geranial และ neral) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Jelenkovic *et al*., 2014) และเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 77.2) ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบตะไคร้ (Jumepaeng *et al*., 2013)

การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

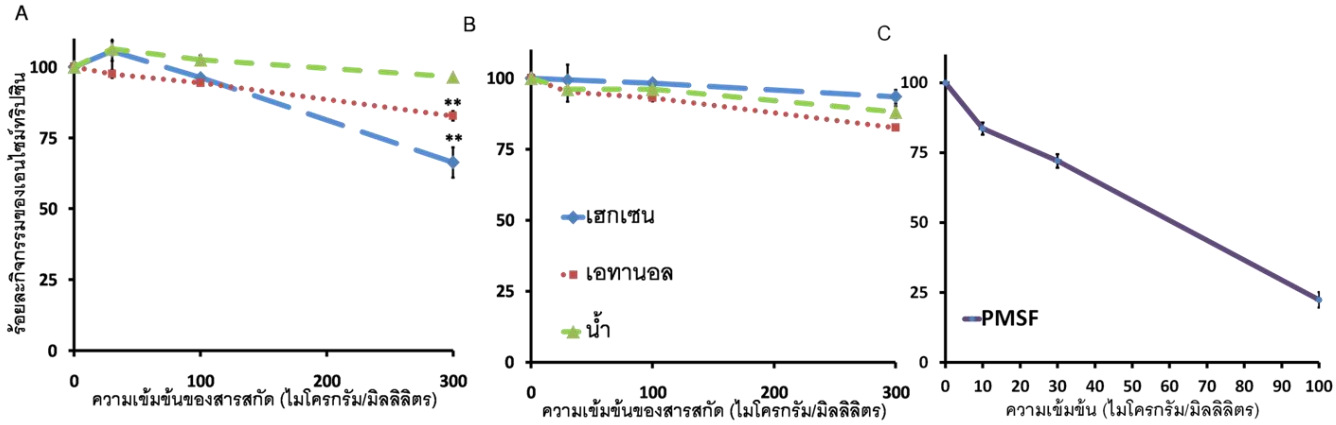
สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ (ภาพที่ 2) จากการศึกษาโดยใช้ออริสแตทซึ่งเป็นยารักษาโรคอ้วนเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (IC_{50} = 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดเมื่อสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (IC_{50} = 97.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยน้ำและเฮกเซนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ใกล้เคียงกัน (IC_{50} = 260.4 และ 202.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็น 90 องศาเซลเซียสพบว่าฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลหายไป (ภาพที่ 2) แต่กลับพบฤทธิ์ยับยั้งมากขึ้นในสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยเฮกเซน (IC_{50} = 181.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในใบตะไคร้มีทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วโดยสารในกลุ่มที่ไม่มีขั้วซึ่งสกัดออกมาโดยเฮกเซนมีความเสถียรมากกว่าสารในกลุ่มที่มีขั้วที่อุณหภูมิสูง โดยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอาจเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์บางชนิดที่มีแนวโน้มในการจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไลเปสและเปปติเดส ได้แก่ myrcenol linalool α-elemol และ β-eudesmol (Bharti *et al*., 2013) ซึ่งคิดเป็นประมาณร้อยละ 5 ของสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ (Elhassan *et al*., 2016) นอกจากนี้การลดลงของระดับโคเลสเตอรอลและระดับไขมันในรูปไลโปโปรตีนในหนูที่ได้รับสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ (Adeneye and Agbaje, 2007; Agbafor and Akubugwo, 2007) อาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการลดอัตราการย่อยไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสซึ่งถูกยับยั้งโดยสารสกัดเมทานอลจากใบตะไคร้ (Souza *et al*., 2012) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้น้อยกว่าออริสแตทซึ่งเป็นยารักษาโรคอ้วนในปัจจุบัน โดยอาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่มีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส



ภาพที่ 2 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สกัดที่อุณหภูมิ A) 37 องศาเซลเซียส B) 90 องศาเซลเซียส C) ออริสแตท * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำ (* p<0.01, ** p<0.001)

การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน

จากการศึกษาการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินโดยใช้ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสเป็นสารควบคุมเชิงบวก (IC_{50} = 61.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินได้เพียงเล็กน้อย โดยการสกัดด้วยเฮกเซนให้ผลในการยับยังดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำตามลำดับเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) และมีค่า IC_{50} มากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในทุกตัวสกัด (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นที่ 90 องศาเซลเซียส การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินโดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดได้จากทุกตัวสกัดมีแนวโน้มลดลงและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3) โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในทุกตัวสกัด (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษาพืชที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสที่ไม่พบการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินและทริปซินในสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้เมื่อสกัดด้วยน้ำ (Padul *et al*., 2012) จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่นในระบบทางเดินอาหาร



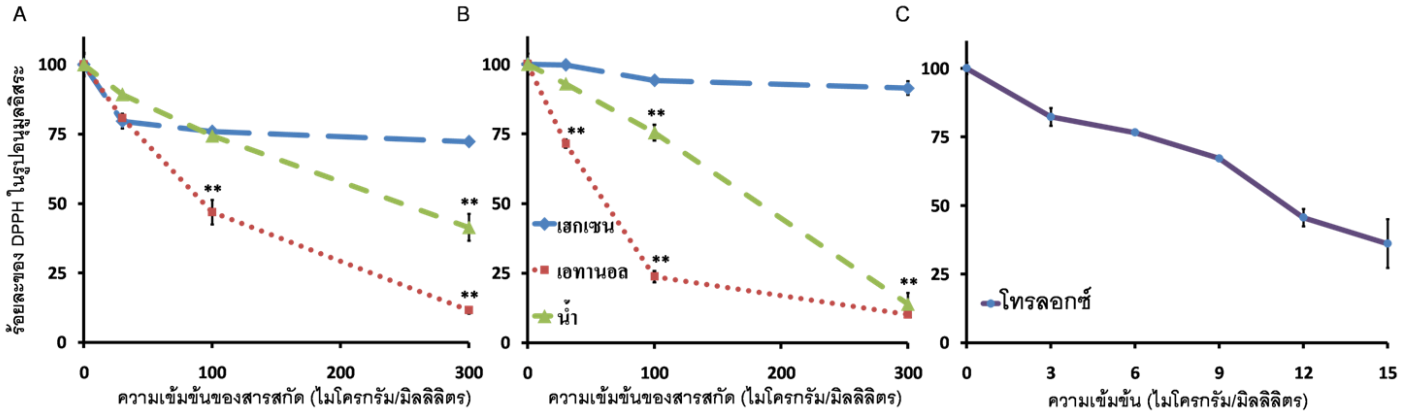
ภาพที่ 3 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินโดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สกัดที่อุณหภูมิ A) 37 องศาเซลเซียส B) 90 องศาเซลเซียส C) PMSF * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำ (** p<0.001)

การต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ด้วยวิธี DPPH Assay (Sharma and Bhat, 2008) โดยใช้โทรลอกซ์ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเป็นสารควบคุมเชิงบวก (IC_{50} = 11.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระของ DPPH ได้ (ภาพที่ 4) โดยสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดจาก 37 องศาเซลเซียสเป็น 90 องศาเซลเซียส (IC_{50} = 96.7 และ 65.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบตะไคร้โดยวิธี DPPH Assay ที่รายงานก่อนหน้านี้ (97.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; Pereira *et al*., 2009) ในขณะที่ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลลิกทั้งหมดที่สกัดได้ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน (30.9 และ 31.4 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงปริมาณสารสกัดหยาบที่เพิ่มขึ้นเมื่อสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้น และความเสถียรของสารต้านอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยเอทานอลในในการศึกษาครั้งนี้ (354.1 – 490.5 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด) พบว่ามีปริมาณมากกว่าที่เคยรายงานไว้ (ประมาณ 88.2 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด; Pereira *et al*., 2009) แต่ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำในการศึกษานี้ (25.6 – 41.2 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด) พบน้อยกว่าที่เคยรายงานไว้ (ประมาณ 54.5 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด; Pereira *et al*., 2009) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการสกัดที่เพิ่มขึ้นเมื่อสกัดด้วยวิธีการสกัดร่วมเอทานอล-เฮกเซน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบตะไคร้เมื่อสกัดด้วยน้ำจะพบลักษณะที่คล้ายกับการสกัดด้วยเอทานอล กล่าวคือการสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นและได้ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่การสกัดด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ต่ำกว่าการสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50} อยู่ในช่วง 160.9 – 248.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และให้ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าเช่นกัน (13.2 – 21.6 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ (Pereira *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดโดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแนวโน้มลดลงเมื่อสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้นถึงแม้ว่าจะมีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกเพิ่มขึ้นและมีปริมาณไม่แตกต่างจากสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่สกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบตะไคร้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วและทนร้อนได้ดี ซึ่งอาจจะเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในใบตะไคร้ เช่น orientin และ isoorientin (Cheel *et al*., 2005) ในขณะที่สารในกลุ่มฟีนอลิกที่มีขั้วน้อยที่สกัดได้ด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำและไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้ด้วยวิธี DPPH ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอีมาก โดยมีค่า IC_{50} ต่างกันประมาณ 1,000 เท่า (Jumepaeng *et al*., 2013)

การพัฒนาใบตะไคร้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มมูลค่าให้ใบตะไคร้ โดยศึกษาหาแนวทางในการพัฒนาใบตะไคร้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เนื่องจากมีผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือดได้ (Adeneye and Agbaje, 2007; Agbafor and Akubugwo, 2007) และมีการใช้ทุกส่วนของตะไคร้เป็นสมุนไพรในการรักษาอาการเจ็บป่วยมาเป็นเวลานานทั่วโลก (Avoseh *et al*., 2015) ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงสรรพคุณและความจำเพาะเจาะจงของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์ไลเปสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีในขณะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่ำ (ตารางที่ 1) ซึ่งบ่งชี้ถึงความจำเพาะเจาะต่อกระบวนการย่อยแป้งและไขมันแต่กระทบกระบวนการย่อยโปรตีนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่การศึกษาทางพิษวิทยาในหนูและในมนุษย์ไม่พบความแตกต่างระหว่างทางพยาธิวิทยาในหนูหรือในมนุษย์ที่ได้รับประทานชาใบตะไคร้ติดต่อกันแต่ให้ผลในการลดปริมาณโคเลสเตอรอล (Carlini *et al*., 1986; Leite *et al*.,1986; Costa *et al*., 2011) ดังนั้นการใช้ใบตะไคร้ในรูปสมุนไพรจึงมีความปลอดภัย แต่ผู้ป่วยโรคไต โรคตับ หรือหญิงตั้งครรภ์อาจจะต้องระมัดระวังในการรับประทานในปริมาณที่สูงและติดต่อกันเป็นเวลานาน (Ekpenyong *et al*., 2014) นอกจากนี้สารสกัดจากใบตะไคร้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีโดยสารออกฤทธิ์ดังกล่าวในใบตะไคร้คือ geranic acid (Masuda *et al*., 2007) ส่งผลให้มีความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดจากใบตะไคร้ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Bassolé *et al*., 2011) ผสมเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยและความเป็นไปได้ในการพัฒนาและใช้ใบตะไคร้หรือสารสกัดจากใบตะไคร้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและเครื่องสำอางในอนาคต



ภาพที่ 4 การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สกัดที่อุณหภูมิ A) 37 องศาเซลเซียส B) 90 องศาเซลเซียส C) สารต้านอนุมูลอิสระโทรลอกซ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเฮกเซน (** $p<0.001$)

ตารางที่ 1 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้

วิธีสกัด		IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด	
ตัวสกัด	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	เอนไซม์ไลเปส	เอนไซม์ทริปซิน	DPPH Assay	มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด	ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด
เฮกเซน	37	26.6	202.4	>300	>300	13.4 ± 0.8 [a]	17.8 ± 1.1 [a]
	90	234.4	181.2	>300	>300	22.5 ± 0.1 [b]	39.0 ± 0.6 [a]
เอทานอล	37	206.6	97.2	>300	96.7	30.9 ± 0.7 [c]	354.1 ± 13.1 [b]
	90	>300	>300	>300	65.7	31.4 ± 0.2 [c]	490.5 ± 18.2 [b]
น้ำ	37	>300	260.4	>300	248.4	13.2 ± 1.2 [a]	25.6 ± 1.3 [a]
	90	>300	>300	>300	160.9	21.6 ± 0.7 [b]	47.2 ± 1.5 [a]
ตัวควบคุมเชิงบวก						IC_{50} อ้างอิง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
อะคาร์โบส		79.9	-	-	-	89 (Adisakwattana *et al*., 2011)	
ออริสแตท		-	0.1	-	-	0.1 (Arabiyat *et al*., 2016)	
PMSF		-	-	61.5	-	-	
โทรลอกซ์		-	-	-	11.8	-	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ได้นำเสนอฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ ซึ่งสามารถใช้อธิบายสรรพคุณทางสมุนไพรของใบตะไคร้ในเชิงวิทยาศาสตร์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์จากใบตะไคร้ หรือใช้เป็นแนวทางในการปลูกพืชสวนครัวเพื่อใช้เป็นอาหารสุขภาพ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์ไลเปสแต่ไม่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน และสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ใบตะไคร้หรือสารสกัดจากใบตะไคร้เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคเบาหวานและโรคอ้วน นอกจากนี้การให้ความร้อนและชนิดของตัวสกัดยังส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากใบตะไคร้จึงต้องคำนึงถึงวิธีการสกัดด้วย ทั้งนี้ในการศึกษาเพิ่มเติมควรจะมุ่งเน้นถึงผลของการตากแห้ง ผลของอุณหภูมิ และผลของสภาวะในกระเพาะอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรดต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบตะไคร้ เพื่อให้สามารถพัฒนาใบตะไคร้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพตามที่ต้องการได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสานักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 9/2560

เอกสารอ้างอิง

Arabiyat, S., Al-Rabi'ee, A., Zalloum, H., Hudaib, M., Mohammad, M., and Bustanji, Y. (2016). Antilipolytic and hypotriglyceridemic effects of dietary *Salvia triloba* Lf (Lamiaceae) in experimental rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *15*(4), 723-728.

Adeneye, A.A. and Agbaje, E.O. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacol*, *112*, 440-444.

Adisakwattana, S., Lerdsuwankij, O., Poputtachai, U., Minipun, A., and Suparpprom, C. (2011). Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α-glucosidase and pancreatic α-amylase. *Plant Foods for Human Nutrition* (*Formerly Qualitas Plantarum)*, *66*(2), 143-148.

Agbafor, K. and Akubugwo, E. (2007). Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *African Journal of Biotechnology 6*, 596-598.

Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B. and Oyedeji, A. (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules, 20*, 7438-7453.

Bassolé, I., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L., Ilboudo, A., Franz, C., Novak, J., Nebié, R., Dicko, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, *18*, 1070-1074.

Bharti, S. K., Kumar, A., Prakash, O., Krishnan, S., and Gupta, A. K. (2013). Essential oil of *Cymbopogon citratus* against diabetes: Validation by in vivo experiments and computational studies. *Bioanalysis & Biomedicine*, *5*, 194-203.

Boaduo, N. Katerere, D. Eloff, J. and Naidoo, V. (2014). Evaluation of six plant species used traditionally in the treatment and control of diabetes mellitus in South Africa using in vitro methods. *Pharmaceutical Biology, 52*, 756-761.

Carlini, E.A., Contar, J.D.D., Silva-Filho, A.R., Da Silveira-Filho, N.G., Frochtengarten, M.L. and Bueno, O.F. (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology, 17*, 37-64.

Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J. and Schmeda-Hirschmann, G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53,* 2511-2517.

Costa, C.A., Bidinotto, L.T., Takahira, R.K., Salvadori, D.M., Barbisan, L.F. and Costa, M. (2011). Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food and Chemical Toxicology 49*, 2268-2272.

Ekpenyong, C.E., Akpan, E.E. and Daniel, N.E. (2014). Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *3*(1), 133-141.

Elhassan, I. A., Eltayeb, I. M., and Khalafalla, E. B. (2016). Physiochemical investigation of essential oils from three Cymbopogon species cultivated in Sudan. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *5*(1), 24.

Jelenkovic, L., Jovanovic, V. S., Palic, I., Mitic, V., and Radulovic, M. (2014). In Vitro Screening of α-Amylase Inhibition by Selected Terpenes from Essential Oils. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *13*(9), 1421-1428.

Jumepaeng, T., Prachakool, S., Luthria, D.L. and Chanthai, S. (2013). Determination of antioxidant capacity and α-amylase inhibitory activity of the essential oils from citronella grass and lemongrass. *International Food Research Journal* , *20*(1), 481-485.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*, 3954-3962.

Leite, J., Maria De Lourdes, V.S., Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S., Klepacz, S., Calil, H.M. and Carlini, E. (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *Journal of Ethnopharmacology, 17*, 75-83.

Mansour, H.A., Newairy, A.S., Yousef, M.I. and Sheweita, S.A. (2002). Biochemical study on the effects of some Egyptian herbs in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicology, 170,* 221-228.

Masuda, T., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K. and Kuninaga, H. (2007). Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*, 597-601.

Padul, M., Chougale, A., Zambare, V., Naikwade, S., Shaikh, F., Shinde, K., Dama, L. and Salve, A. (2012). In vitro screening of proteinase inhibitors (trypsin, chymotrypsin and Helicoverpa gut proteinase inhibitors) in different plant tissue extracts. *Trends in Biotechnology Research, 1*, 7-14.

Pereira, R.P., Fachinetto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R.L., Santos da Silva, G.N., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Athayde, M.L., Bürger, M.E., Morel, A.F. and Morsch, V.M. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research Journal, 34,* 973-983.

Sangchan, A., Bootdee, A. and Chanroj, S. (2016). Inhibitory Effects of Cinnamon and Garcinia Crude Extracts on Alpha-amylase, Lipase, Trypsin and Alcohol Dehydrogenase. *Burapha Science Journal*, *21*(3), 268-278. (in Thai)

Sharma, O.P. and Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry, 113,* 1202-1205.

Souza, S., Pereira, L., Souza, A. and Santos, C. (2012). Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 14,* 643-648.

Wong, K.K., Signal, F.A., Campion, S.H. and Motion, R.L. (2005). Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53,* 4633-4636.

Wongsa, P., Chaiwarit, J. and Zamaludien, A. (2012). In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α-amylase and α-glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry, 131,* 964-971.