ฤทธิ์ต้านเบาหวานและการบรรเทาความวิตกกังวลและความเครียดของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย

Antidiabetic activities and relief of anxiety and stress by seed extract from *Mucuna pruriens* var. *utilis* (Wall. ex Wight) Baker ex Burck

นพรัตน์ พุทธกาล[1], มานิดา โชรัมย์[2], ชูศรี ตลับมุข[3], กฤติยา ทิสยากร[4], อรทัย สารกุล[5]*
Nopparat Buddhakala[1], Manida Chorum[2], Chusri Talubmook[3], Krittiya Thisakorn[4], Orathai Sarakul[5]*

Received: 19 December 2021 ; **Revised**: 18 February 2021 ; **Accepted**: 4 March 2022

บทคัดย่อ

หมามุ่ยอินเดีย *Mucuna pruriens* var. utilis (Wall. ex Wight) Baker ex Burck เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านมาเป็นเวลานานในการรักษาโรคต่างๆ เช่น มาลาเรีย มะเร็ง เบาหวาน พาร์คินสัน วิตกกังวล รวมทั้งเสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์บรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย (MPSE) ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ MPSE ด้วยเครื่อง GC-MS พบสารทั้งหมด 48 ชนิด เป็นสารที่มีปริมาณมาก 9 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ 5-Hydroxymethyl furfural, Dodecanamide, N-(2-hydroxyethyl)-, 9,12-Octadecadienoic acid, (*Z,Z*)-, *n*-Hexadecanoic acid, endo-Borneol, 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester, Hexadecanoic acid ethyl ester, Octadecanoic acid และ 9-Octadecenoic acid และสารที่มีปริมาณน้อย 39 ชนิด จากการประเมินด้วยวิธี Light/dark test, Hole board และ Force plate actimeter พบว่า MPSE แสดงผลในการลดอาการวิตกกังวลในหนูถีบจักร โดยเฉพาะหนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีจำนวนครั้งในการเดินเข้าไปในฝั่งมืดและฝั่งสว่าง (Number of entries in chamber) จำนวนครั้งในการยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืด (Number of rear in dark chamber) การใช้เวลาในฝั่งสว่าง (Time spent in light chamber) และจำนวนครั้งของการมุดรูของแผ่นเจาะรู (Hole board) มากกว่าหนูกลุ่มควบคุม แต่มีระยะเวลาที่ใช้ก่อนการเข้าไปในฝั่งสว่าง (Latency to enter the light chamber) ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ยังมีระยะเวลาในการหลับนานกว่าหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ MPSE ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ โดยมีค่า IC_{50} 0.38±0.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งได้ดีกว่ายาอะคาร์โบส ที่มีค่า IC_{50} 1.57±0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย มีฤทธิ์บรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และต้านเบาหวาน โดยมีสาร endo-Borneol และ Octadecanoic acid เป็นสารออกฤทธิ์บรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และสาร 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)- และ n-Hexadecanoic acid เป็นสารออกฤทธิ์ต้านเบาหวาน จึงเป็นการยืนยันการใช้หมามุ่ยอินเดียเป็นยาพื้นบ้านในการบรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และบำบัดโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: หมามุ่ยอินเดีย ความวิตกกังวล ความเครียด เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

---

[1] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, อาจารย์, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, จังหวัดปทุมธานี, 12110
[2] อาจารย์, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, จังหวัดปทุมธานี, 12110
[3] รองศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม, 44150
[4] นักวิจัย, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี, 12111
[5] อาจารย์, สาขาการแพทย์แผนไทย คณะการแพทย์บูรณาการ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, จังหวัดปทุมธานี, 12130
[1] Assistant Professor, Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburii, Pathum Thani, 12110
[2] Lecturer, Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12110
[3] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150.
[4] Researcher, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Tambon Khlong Ha, Amphoe Klong Luang, Pathum Thani, 12120
[5] Lecturer, Faculty of Integrative Medicine, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12130
* Corresponding author ; Orathai Sarakul, Faculty of Integrative Medicine, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12130, Thailand. E-mail: auratai_s@rmutt.ac.th, 081-5724709

Abstract

Mucuna pruriens var. utilis (Wall. ex Wight) Baker ex Burck has been used as a traditional medicine for a long time to treat several diseases such as malaria, cancer, diabetes, Parkinson's disease, anxiety disorder and to improve sexual performance. This research investigated phytochemical constituents, anxiety and stress relieving properties, and antidiabetic activities of seed extract from *M. pruriens* (MPSE) extracted with 95% ethanol. Analysis using GC-MS revealed the presence of 48 chemical compounds with 9 main compounds including 5-Hydroxymethylfurfural, Dodecanamide, N-(2-hydroxyethyl)-, 9,12-Octadecadienoic acid, (*Z, Z*)-, *n*-Hexadecanoic acid, endo-Borneol, 9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester, Hexadecanoic acid, ethyl ester, Octadecanoic acid and 9-Octadecenoic acid, and another 39 trace compounds in the extract. Evaluation using light/dark task, hole board and force plate actimeter (FPA) revealed that the number of entries into the chamber, number of rear in dark chamber, time spent in light chamber and the number of entries to the hole board of the 400 mg/kg body weight, MPSE treated mice were significantly ($p<0.05$) higher than those of the controls, whilst the latency to enter the light chamber was less than that of the controls. In addition, the sleeping time of the MPSE treated mice was significantly ($p<0.05$) longer than that of the controls. Furthermore, MPSE exhibited an inhibitory effect on α-glucosidase activity with IC_{50} of 0.38±0.70 mg/mL, which was better than Acarbose (IC_{50} of 1.57±0.23 mg/mL). The results indicate that MPSE has anxiety and stress relieving properties and also antidiabetic activities. The endo-Bomeol and Octadecanoic acid were responsible for anxiety and stress relieving activity, and 9, 12-Octadecadienoic acid, (Z, Z)- and n-Hexadecanoic acid were responsible for antidiabetic activity. The results obtained also confirmed the traditional used of *M. pruriens* for relieving anxiety disorder and stress, and the treatment of diabetes mellitus.

Keywords: *Mucuna pruriens*, anxiety, stress, α-glucosidase

บทนำ

ภาวการณ์แพร่ระบาดโรคอุบัติใหม่ โรคโควิด 19 (COVID-19) ในปัจจุบัน ทำให้ประชากรทั่วโลกมีการติดเชื้อและเสียชีวิตจากโรคนี้เป็นจำนวนมาก ตลอดจนมีวิถีชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไปจากวิถีชีวิตปกติ เกิดความวิตกกังวลและความเครียด เพื่อหาทางรอด ปลอดภัย และกลับมาดำเนินชีวิตสภาพปกติ ประชากรในประเทศไทยก็ได้รับผลกระทบจากโรคนี้อย่างมากเช่นกัน โดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุ และกลุ่มผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวเรื้อรัง

ความวิตกกังวล เป็นความรู้สึกไม่สบายใจ หวาดหวั่น ไม่มั่นใจต่อสถานการณ์ในอนาคต เกรงว่าจะเกิดอันตราย หรือความเสียหาย เนื่องจากมี หรือคาดว่าจะมีสิ่งคุกคาม หากมีความวิตกกังวลมาก หรือมีความวิตกกังวลเป็นระยะเวลานานๆ จะมีผลเสียต่อสุขภาพของบุคคลได้ (Stuart & Sundeen, 1995) ความเครียด เป็นภาวะของอารมณ์ หรือความรู้สึกที่เกิดขึ้นเมื่อเผชิญหน้ากับปัญหาต่างๆ ที่ทำให้รู้สึกไม่สบายใจ คับแค้นใจ หรือถูกบีบคั้น กดดัน จนทำให้เกิดความรู้สึกทุกข์ใจ สับสน โกรธหรือเสียใจ (กรมสุขภาพจิต, 2541) ความเครียดเป็นกลุ่มอาการที่ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งที่คุกคามบุคคล โดยสิ่งนั้นเป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ และประเมินแล้วว่าเป็นอันตรายต่อตนเอง (Selye, 1976) ความวิตกกังวลและความเครียด ส่งผลกระทบเกือบ 1 ใน 8 ของประชากรทั่วโลก (Eisenberg *et al.*, 1998) หากไม่สามารถขจัด หรือปรับลดพฤติกรรมที่ก่อให้เกิดความวิตกกังวลและความเครียดได้ ย่อมส่งผลกระทบต่อร่างกายและจิตใจ (เจนจิรา เกียรติสินทรัพย์ และคณะ, 2562) นอกจากนี้ ในเพศชายยังส่งผลกระทบในทางลบต่อปัจจัยที่สัมพันธ์กับคุณภาพของอสุจิ ได้แก่ ความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนที่ และรูปร่างของอสุจิ สมรรถภาพทางเพศ และการหลั่งอสุจิ มีความเกี่ยวโยงกับปัจจัยทางด้านจิตใจ และเป็นสาเหตุของภาวะมีบุตรยาก (McGrady, 1984) ความวิตกกังวลและความเครียดมักมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของการนอนหลับ (Beck,1992 ; ดารัสนี โพธารส, 2560) และปัญหาการนอนไม่หลับ (ชลธิชา แย้มมา และ พีรพนธ์ ลือบุญธวัชชัย, 2556) ขณะนอนหลับร่างกายจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่างๆ ลดกิจกรรมที่ใช้กล้ามเนื้อและใช้ความคิดน้อยลง ทำให้รู้สึกคลายเครียด คลายความวิตกกังวล และเกิดอาการผ่อนคลาย (สมภพ เรืองตระกูล, 2550 ; เกษม ตันติผลาชีวะ, 2543 ; อินทิรา ปากันทะ, 2550) นอกจากนี้ ยังมีการลดลงของระดับการรู้สติ อัตราการเผาผลาญ อุณหภูมิของร่างกาย ความดันโลหิต และอัตราการหายใจ ตลอดจนการทำงานของกล้ามเนื้อต่างๆ ของร่างกาย (Yaremchuk & Wardrop, 2010 ; Wilson & Nutt, 2008)

วัยผู้สูงอายุ เป็นวัยที่ต้องเผชิญกับการเปลี่ยนแปลงสภาพร่างกาย จนไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพจิต ทำให้ไม่มีความสุข ท้อแท้ รู้สึกเหงา หมดหวัง

ในชีวิต วิตกกังวล เกิดโรคจิต โรคสมองเสื่อม ในปี 2576 คาดการณ์ว่าจะเป็นปีที่มีสังคมผู้สูงอายุระดับสูงสุด คือ มีสัดส่วนประชากรผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป สูงถึงร้อยละ 28 ของประชากรทั้งหมด (https://www.thaitgri.org.all)

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นโรคเรื้อรังมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และมีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน และมักมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมองไตวาย และความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Hex *et al.*, 2012) โรคเบาหวาน เป็นโรคที่ยังไม่มีวิธีรักษาให้หายขาดได้ ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษาต่อเนื่องและยาวนาน ส่งผลต่อภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตเสื่อมลง อายุสั้นลง และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง จึงเป็นปัญหาด้านสาธารณสุข (สถาบันวิจัยและพัฒนาระบบสาธารณสุข, 2552) โรคเบาหวานเป็นปัญหากับประเทศต่างๆ ทั่วโลก พบได้ในทุกเพศ ทุกวัย คาดว่าในปี พ.ศ. 2583 จะมีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกสูงถึง 642 ล้านคน (Ogurtsova *et al.*, 2017) และประมาณร้อยละ 90 ของผู้สูงอายุเป็นผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (American Diabetes Association, 2006)

ปัญหาสุขภาพจิตโดยเฉพาะที่เกี่ยวกับความวิตกกังวลและความเครียด และโรคเบาหวาน ควรได้รับความสนใจให้การดูแลและบำบัดเป็นอย่างยิ่ง แต่การบำบัดด้วยการใช้ยาแผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น อะคาร์โบส (Acarbose) เมทฟอร์มิน (Metfomin) และไกลเบนคลาไมด์ (Glibenclamide) เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มักมีค่าใช้จ่ายสูง และมักก่อผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยเบาหวาน เช่น ทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องร่วง กระเพาะอาหารอักเสบ และเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Su *et al.*, 2013) การนำพืชสมุนไพรที่สามารถใช้ทดแทน หรือใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน และให้ผลการบำบัดได้ดี จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง มีรายงานว่า ร้อยละ 67 ของผู้ป่วยเบาหวานใช้พืชสมุนไพรในการบำบัดควบคู่กับการใช้ยาแผนปัจจุบัน การควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย สามารถลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ (Kooti *et al.*, 2016) พืชสมุนไพรที่นิยมใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยเบาหวาน เช่น บอระเพ็ด ขิง ชะพลู กระเทียม มะระ กระเจี๊ยบแดง ดอกคำฝอย พริก และบัวหลวง เป็นต้น (อารียา สุฉันทบุตร และคณะ, 2551) สำหรับพืชสมุนไพรที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์ต่อสรีรวิทยาด้านการคลายความวิตกกังวลและความเครียด รักษาโรคเรื้อรัง และสามารถฟื้นฟูภาวะผิดปกติทางเพศได้ เช่น บอระเพ็ด รากสามสิบ โสมอินเดีย โหระพา หมามุ่ยอินเดีย เป็นต้น (Dahanukar & Hazra, 1995 ; Yang *et al.*, 2004)

หมามุ่ยอินเดีย [*Mucuna pruriens* var. utilis (Wall. ex Wight) Baker ex Burck] เป็นพืชในวงศ์ Fabaceae (Rajeshwar *et al.*, 2005) ต้นมีลักษณะคล้ายกับหมามุ่ยไทย แต่แตกต่างกันที่หมามุ่ยอินเดียมีลักษณะฝัก และเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ มีขนสั้น ไม่คันเวลาสัมผัส สีเมล็ดมี 2 ลักษณะ คือ สีขาว และสีดำ แต่หมามุ่ยไทยมีฝักขนาดเล็ก ขนฝักขนาดยาว และคันเวลาสัมผัสขนฝัก มีทั้งเม็ดเล็กและใหญ่แต่มีสีดำเพียงสีเดียว หมามุ่ยอินเดีย เป็นไม้เลื้อยยาวได้ถึง 15 เมตร เมื่อตอนเป็นต้นอ่อนจะมีขนอ่อนปกคลุม เมื่อโตขึ้นขนจะหายไป ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ดอกมีสีม่วงเข้ม รูปดอกถั่วแต่จะมีขนาดใหญ่กว่า ผลเป็นฝักโค้งรูปแถบขอบขนาน ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร มีเมล็ด 4 ถึง 6 เมล็ด (Chinnasamy & Thangamani, 2014 ; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพรม, 2543) หมามุ่ยอินเดีย พบได้ทั่วไปในเขตร้อน และถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านมาเป็นระยะเวลานาน (Longhi *et al.*, 2011) ทั้งในประเทศไทย อินเดีย จีนและประเทศอื่นๆ ในเขตร้อน (Rachsee *et al.*, 2021 ; ระพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ, 2560) โดยมีการใช้หมามุ่ยอินเดียในการจัดการภาวะมีบุตรยาก การเป็นหมันในเพศชาย (Rajeshwar *et al.,* 2005) บำบัดโรคเบาหวาน (Pansare & Sadabal, 2019) และโรคพาร์กินสัน (Fu *et al.*, 2015) ช่วยในการจัดการความเครียด ปรับปรุงคุณภาพของอสุจิ (Shukla *et al.*, 2010 ; Kumar *et al.*, 1994) ในตำรายาโบราณของไทยระบุว่า เมล็ดหมามุ่ยสามารถใช้เป็นยาบำรุงกำลังและเพิ่มสรรถภาพทางเพศได้ (สันติสุข โสภณสิริ, 2557) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรังที่รุนแรง (พราว ศุภจริยาวัตร และคณะ (2561) ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากเมล็ดหมามุ่ย สามารถนำมาใช้ในการบำบัดโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรครูมาตอยด์ โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือด ความผิดปกติของระบบประสาท และการเป็นหมันในเพศชาย (Rajeshwar *et al.,* 2005) ผงเมล็ดหมามุ่ย ช่วยต้านภาวะเครียด (Kumar *et al.*, 1994) บำบัดโรคพาร์คินสัน (Katzenschlager *et al.*, 2004 ; Molloy *et al.*, 2006) Daxenbichler *et al.* (1971) และระพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ (2560) พบว่า สาร L-DOPA (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine) และ 5-HTP (5-Hydroxy tryptophan) เป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของหมามุ่ย และพบมากในส่วนเมล็ด ส่วนสารอื่นที่พบในเมล็ดหมามุ่ย ได้แก่ Glutathione, Lecithin, Gallic acid, beta-Sitosterol และกรดไขมันจำเป็น เช่น Linolenic acid และ Oleic acid (ระพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ, 2560) Norepinephrine, Epinephrine (Molloy *et al.*, 2006 ; Shukla *et al.*, 2010), Alkaloids, Mucunine, Mucunadine, Nicotine, Mucunadinine, Prurienidine, Vernolic acid รวมถึง Tryptamine, Alkylamines, Steroids, Flavonoids,

Coumarins, Cardenolides และโลหะ เช่น ทองแดง แมกนีเซียม สังกะสี แมงกานิส และเหล็ก (Misra & Wagner, 2007) นอกจากนี้ ในเมล็ดยังมีสารอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และเส้นใย (Shahaji, 2011)

หมามุ่ยอินเดีย มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ต้านอนุมูลอิสระ (Kumar *et al*., 2010 ; Longhi *et al.,* 2011 ; Sonpetkar *et al*., 2012) ต้านเนื้องอก ต้านจุลชีพ (Sachan *et al*., 2015) ต้านเบาหวาน (Majekodunmi, 2011) ต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย (Bala, 2011) ต้านคอเลสเตอรอล ลดน้ำตาล ลดไขมัน (Ratnawati, 2011) และปกป้องระบบประสาท (Sharma *et al*., 1978) สารสกัดเมทานอลจากเมล็ดหมามุ่ย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Rajeshwar *et al*., 2005 ; Sonpetkar *et al*., 2012) ขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตท และสารสกัดเอทานอลจากต้นหมามุ่ยอินเดีย มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (Kumar *et al*., 2010) และสามารถเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ (Krishnamoorthy, 2011 ; DeLay *et al*., 2016) นอกจากนี้ ผงและสารสกัดเมล็ดหมามุ่ย มีผลในการปรับระดับฮอร์โมนในเพศชาย และเพิ่มปริมาณและคุณภาพของอสุจิ (Shukla *et al*., 2010 ; Gupta *et al*., 2011 ; Ahmad *et al*., 2008) และต้านความวิตกกังวล (Singh *et al*., 2019 ; Sachan *et al*., 2015)

จากปัญหาของความวิตกกังวล ความเครียด และโรคเบาหวาน และความพยายามในการหาแนวทางในการบำบัดโรค เพื่อลดค่าใช้จ่าย และลดปัญหาข้างเคียงจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ตลอดจนความสำคัญในสรรพคุณ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหมาหมุ่ยอินเดีย การวิจัยครั้งนี้ จึงได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียในการบรรเทาความวิตกกังวลและความเครียดในหนูถีบจักร ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด เพื่อให้ทราบชนิดของสารที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารสกัด อันจะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์หมามุ่ยอินเดียสำหรับบรรเทาความวิตกกังวล คลายความเครียด และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. การเตรียมเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย

เมล็ดหมามุ่ยอินเดีย (*Mucuna pruriens* var. utilis (Wall. ex Wight) Baker ex Burck ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซื้อมาจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เก็บรวบรวมจากการเก็บเกี่ยวใหม่ ๆ ในช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์ 2564 เป็นเมล็ดที่ได้จากต้นหมามุ่ยอินเดียที่ปลูกในสภาวะกึ่งธรรมชาติ ปราศจากการใช้สารเคมี และไม่ผ่านกรรมวิธีและสภาวะทดทดสอบใด ๆ คัดเลือกเมล็ดที่แก่เต็มที่ มีลักษณะสมบูรณ์ ปราศจากโรคและการทำลายของแมลง นำเมล็ดหมามุ่ยมาทำความสะอาด และขจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการล้างในน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำไปสะเด็ดน้ำ ผึ่งในที่ร่ม นำไปอบต่อให้แห้งในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ร่อนผ่านตะแกรง ชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในภาชนะที่สะอาด แห้ง และป้องกันความชื้นได้ ก่อนการนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย

เตรียมสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย (MPSE) โดยดำเนินการตามวิธีของ Buddhakala *et al.* (2020) ด้วยการนำผงเมล็ดหมามุ่ย น้ำหนัก 1,500 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง วางในโหลแก้วใส เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนผงเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย 100 กรัม: เอทานอล 400 มิลลิลิตร หมักไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำส่วนผสมที่หมักไว้ไปกรองเอากากออกโดยใช้ชุดกรองสารระบบสุญญากาศ นำส่วนที่กรองได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย (Rotary evaporator) บรรจุ MPSE ที่ได้ไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ในการบรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และฤทธิ์ต้านเบาหวาน

3. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR เพศผู้ (Male Swiss albino mice) อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 27-33 กรัม ซื้อจากบริษัท Nomura Siam เป็นหนูที่มีหลักฐานแสดงสายพันธุ์ และความคงที่ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่ต้องการใช้ ตลอดจนมีหลักฐานตรวจสอบได้ว่าเป็นสัตว์ที่เลี้ยงด้วยระบบอนามัยเข้มงวด การดำเนินการทดลองได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับและดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์ทดลอง ให้ดำเนินการทดลองและใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี รหัสโครงการ RMUTT. SCI.2019.R005 การทดลองและการเลี้ยงสัตว์ทดลองได้ดำเนินการ ณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ทำการทดลองและเลี้ยงหนูทดลอง ในสภาวะของห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±5% และแสงสว่าง 12 ชั่วโมง หนูทดลองได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับหนูทดลองและน้ำดื่มในปริมาณเพียงพอ ให้หนูทดลองได้ปรับสภาพคุ้นชินสภาพห้องทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์คลายความวิตกกังวลและความเครียด

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำ MPSE ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ซึ่งเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร มีความสามารถในการแยกสารผสมซึ่งกลายเป็นไอได้ง่ายให้ออกเป็นองค์ประกอบเดี่ยวๆ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี และองค์ประกอบของสารแต่ละชนิดที่ผ่านการแยกแล้วจะถูกตรวจวัดด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมตรีที่มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด มีสภาพไวในการตรวจวัดสูง และให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมของสารที่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้ คือ Bruker รุ่น 450 GC Rtx-5MS Capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที มีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นในอัตรา 4.5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส แล้วจึงฉีดสารทดสอบปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับ Mass Spectrometry มีอุณหภูมิแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิส่วนคัดแยก 150 องศาเซลเซียส และมีพลังงานของอิเล็กตรอนที่วิ่งชนโมเลกุลของสารเท่ากับ 70 eV นำข้อมูลที่ได้ไปแยกชนิดของสารโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Wiley 9 GC-MS Library

5. การศึกษาฤทธิ์คลายความวิตกกังวล

ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความวิตกกังวล โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จากวิธีของ Kim & Jonh (2006), Brown & Nemes (2008) และ Krishna *et. al*. (2006) ดังนี้

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ให้สารละลาย Corticosterone ในน้ำดื่มสำหรับหนูทดลอง ในขนาด 13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลา 16 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเกิดความวิตกกังวลและความเครียด จากนั้น ในวันที่ 17 ของการทดลอง ป้อนสารทดสอบแก่หนูทดลองตามที่ได้แบ่งกลุ่มไว้ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนสาร 20% Acacia และ 0.2% Tween 80 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารมาตรฐาน Phenobarbital 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อน MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 ป้อน MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 ป้อน MPSE ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

5.1 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความวิตกกังวล โดยใช้ Hole board ดังนี้ หลังให้สารทดสอบแล้ว 45 นาที นำหนูทดลองวางตรงกลางของแผ่น Hole board เพื่อนับจำนวนครั้งของการมุดสำรวจรูเป็นเวลา 3 นาที ซึ่งในแต่ละรูของแผ่น Hole board มีเครื่องตรวจจับ (Sensor) ในการตรวจจับเมื่อหนูทดลองมุดหัวเข้าไปสำรวจในแต่ละรูของ Hole board จำนวนครั้งของการมุดสำรวจรูที่มากขึ้น แสดงถึงพฤติกรรมที่หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยลง หนูทดลองจึงกล้าที่จะสำรวจรูบนแผ่น Hole board หากหนูทดลองวิตกกังวลหรือกลัว จะแสดงอาการอยู่นิ่งบนแผ่น Hole board และไม่กล้ามุดสำรวจรู

5.2 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความวิตกกังวล โดยวิธี Light/dark test ดังนี้ หลังจากป้อนสารทดสอบแล้ว 1 ชั่วโมง นำหนูเข้าทดสอบใน Light/dark task โดยนำหนูทดลองแต่ละตัววางใน Light/dark chamber ซึ่งเป็นกล่องอะคริลิกใส ขนาด 20 x 60 x 35 เซนติเมตร ด้านบนของกล่องมีช่องระบายอากาศ และช่องเปิดสำหรับใส่หนูทดลอง แบ่งกึ่งกลางของกล่องเป็น 2 ฝั่งด้วยแผ่นพลาสติกสีดำทึบ มีช่องเล็กๆ ที่หนูทดลองสามารถผ่านเข้าออกระหว่าง 2 ฝั่งได้ ด้านฝั่งสว่างมีหลอดไฟสีขาว ขนาด 9 วัตต์ ติดอยู่ด้านบนกล่อง จากนั้น สังเกต และจดบันทึกพฤติกรรมของหนูทดลองเป็นเวลา 10 นาที ได้แก่

1) จำนวนครั้งของการเดินเข้าไปในฝั่งมืดและฝั่งสว่าง (Number of entries in chamber) โดยการนับว่าหนูทดลองได้เดินเข้าไปในฝั่งนั้นๆ เมื่อเท้าทั้ง 4 ได้เดินเข้าไปทั้งหมด ใช้หลักการนับจำนวนครั้งของการเดินที่มากกว่าแสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าหนูที่มีอาการไม่ค่อยเดินเข้าไป หรือมีจำนวนครั้งที่เดินเข้าไปยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืดและฝั่งสว่างมีจำนวนครั้งที่น้อย

2) จำนวนครั้งของการยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืดและสว่าง (Number of rear in chamber) การยืนด้วยเท้าหลังหมายถึง หนูทดลองมีการสำรวจสถานที่นั้นๆ ดังนั้น จำนวนครั้งของการยืนด้วยเท้าหลังที่มากกว่า แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าหนูที่มีอาการไม่ค่อยเดินเข้าไป หรือมีจำนวนครั้งที่เดินเข้าไปยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืดและฝั่งสว่างมีจำนวนครั้งที่น้อย

3) จำนวนครั้งของการเดินตัดแสง Sensor ในฝั่งมืดและสว่าง (Number of locomotor activities) การเดินตัดแสง Sensor แสดงว่า หนูทดลองมีการเดิน หรือเคลื่อนไหวในฝั่งนั้นๆ ดังนั้น จำนวนครั้งของการเดินตัดแสง Sensor ที่มากกว่าจึงแสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อยกว่าการมีจำนวนครั้งที่ไม่ค่อยเดินตัดแสง

4) เวลาที่ใช้ทั้งสิ้นในฝั่งสว่าง (Time spent in light chamber, sec) หากหนูทดลองใช้เวลาในฝั่งสว่างมาก แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อย

5) เวลาที่ใช้ก่อนเข้าไปในฝั่งสว่าง (Latency to enter the light chamber, sec.) หากหนูทดลองใช้เวลาน้อยก่อนการเข้าไปในฝั่งสว่าง แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลน้อย ในทางตรงข้าม หากหนูทดลองใช้เวลานานในการเปลี่ยนจากฝั่งมืดเป็นฝั่งสว่าง แสดงว่า หนูทดลองมีความวิตกกังวลสูง

5.3 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความวิตกกังวล ด้วยการทดสอบการเคลื่อนที่ (Locomotor activity) โดยใช้เครื่อง Force Plate Actimeter (FPA)

นำหนูเข้าเครื่อง FPA เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทดสอบการเคลื่อนที่ และหาค่าเฉลี่ยของระยะทางการเคลื่อนที่ (Distance and Traveled ; mm.) การแปลผลจากการทดสอบจะแบ่งเป็นกรอบแต่ละช่วงเวลาของการเคลื่อนที่ (Frame) ซึ่งมีจำนวนรวมทั้งหมด 15 Frame แต่ละ Frame มีระยะเวลาประมาณ 0.7 นาที Frame ที่ 1-5 เป็นช่วงเวลาในการสำรวจสิ่งแวดล้อมใหม่ ดังนั้น จึงเริ่มคำนวณหาค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนที่เป็นระยะทางที่ใช้จริงตั้งแต่ Frame ที่ 6-10 ส่วน Frame ที่ 11-15 เป็นพฤติกรรมที่แสดงถึงความคุ้นกับสถานที่ใหม่จึงไม่นำมาคำนวณ การเคลื่อนที่เป็นระยะทางที่มากขึ้นแสดงให้เห็นถึงความวิตกกังวลที่ลดลง

6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยผ่อนคลาย และนอนหลับ

6.1 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการช่วยผ่อนคลายและนอนหลับ ด้วยการทดสอบความสัมพันธ์ของกล้ามเนื้อ (Muscle relaxant activity) ซึ่งประยุกต์ใช้วิธีของ Zia *et al.* (1995) ดังนี้

1) ฝึกให้หนูทุกตัวสามารถเดินบนแท่งกลมหมุน (Rota rod) ให้ได้ 20 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีจนกระทั่งไม่ตกจาก Rota rod ซึ่งจะใช้ระยะเวลาในการฝึกประมาณ 6-8 สัปดาห์ บันทึกเวลาเป็นหน่วยวินาที จากเวลาเริ่มต้นการทดลอง จนถึงหนูตกจาก Rota rod

2) แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ป้อนสารทดสอบแก่หนูทดลองแต่ละกลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 ป้อน 20% Acacia และ 0.2% Tween 80 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม 2 ป้อน Caffeine ขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 3 ป้อน MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 4 ป้อน MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 5 ป้อน MPSE ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังจากป้อนสารทดสอบแล้ว 60 นาที ป้อน Diazepam ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แก่หนูทุกตัวหลังจากป้อนยา Diazepam แล้ว 30 นาที ให้หนูเดินบน Rota rod ความเร็วรอบ 20 รอบต่อนาที บันทึกวินาทีที่หนูตกจาก Rota rod โดยกำหนดเวลานานที่สุดเป็น 180 วินาที

6.2 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการช่วยให้ผ่อนคลายและนอนหลับ ด้วยวิธีวัดระยะเวลาในการนอนหลับ (Sleeping time) โดยประยุกต์จากวิธีของ Tsuji *et al.* (1996) และ Helton *et al.* (1998) ดังนี้

ใช้หนูทดลองชุดเดียวกับข้อ 6.1 โดยให้มีช่วงระยะเวลาพัก เพื่อให้แน่ใจว่าสารทดสอบที่หนูทดลองได้รับจากข้อ 6.1 ได้ถูกขับออกจากร่างกายแล้ว (Wash out) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบงดให้อาหารหนูทดลองเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ในวันที่ทำการทดสอบ แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ป้อนสารทดสอบให้หนูทดลองแต่ละกลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 ป้อน 20% Acacia และ 0.2% Tween 80 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม 2 ป้อน Caffeine ขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 3 ป้อน MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 4 ป้อน MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่ม 5 ป้อน MPSE ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังจากป้อนสารทดสอบแล้ว 60 นาที ป้อน diazepam ขนาด10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แก่หนูทุกตัว และสังเกตการณ์หลับทันที โดยการทดสอบ Righting reflex ด้วยการกระตุ้นบริเวณหูและอุ้งเท้าด้วยพู่กัน หากไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่มีการกระตุกรับจึงนับว่าเป็นการหลับสนิท บันทึกช่วงเวลาของการนอนหลับ ได้แก่

1. Onset คือ เวลาตั้งแต่ป้อน diazepam จนถึงสูญเสีย Reflex (เริ่มหลับ)

2. Duration time คือ ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มหลับจนถึงเริ่มตื่น

7. การศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวาน

ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการต้านเบาหวาน โดยการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ดำเนินการทดสอบด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Dong *et al.* (2012) โดยทำการทดสอบในจานหลุมชนิด 96 หลุม (96 well plate) ดังนี้

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution ; 0.1 M PBS, pH 6.8) เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (0.01 unit/ml α-glucosidase enzyme) จาก *Saccharomyces cerevisiae* บริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 4-nitrophenyl-α-D-glucopyra- noside (0.2mM PNPG บริษัท Calbiochem ; Merck, Germany) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, 2.0 M Na_2CO_3) และ MPSE ที่เตรียมในสารละลาย PBS จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย MPSE ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย PNPG ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำให้ปฏิกิริยาสิ้นสุดลงด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 160 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader

ใช้ยาอะคาร์โบส (Acarbose ; Glucobay, Bayer Pharma AG, Germany) เป็นสารเปรียบเทียบ และสารละลาย PBS เป็นสารควบคุม (Blank) ความเข้มข้น MPSE และยาอะคาร์โบส ที่ใช้ คือ 0.02 0.05 0.09 0.19 0.38 0.75 1.50 และ 3.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำนวณเป็นร้อยละการยับยั้งของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดส จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(ABS_{blank} - ABS_{sample})/ABS_{blank}] \times 100$$

เมื่อ

A blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PBS

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ MPSE หรือยาอะคาร์โบส

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดของค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance, One-way ANOVA) และ LSD post-hoc test ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-value <0.05)

ผลการศึกษา

1. องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ MPSE ด้วย GC-MS พบ Peak ของสารองค์ประกอบทั้งหมด 48 ชนิด ซึ่งสามารถบอกชนิดของสารประกอบ จากการเทียบค่า Retention time และ Mass spectrum ขององค์ประกอบทางเคมีของ MPSE กับค่า Retention time และ Mass spectrum ของค่ามาตรฐานที่มีการบันทึกไว้ใน Library ในสารทั้งหมด 48 ชนิด เป็นสารที่มีปริมาณมาก 9 ชนิด และสารที่มีปริมาณน้อย 39 ชนิด โดยมีโครมาโตแกรม ดังแสดงใน Figure 1

สารที่มีปริมาณมากจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 5-Hydroxymethyl-furfural, Dodecanamide, N-(2-hydroxyethyl)-, 9,12-Octadecadienoic acid, (*Z,Z*)-, *n*-Hexadecanoic acid, endo-Borneol, 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester, Hexadecanoic acid ethyl ester, Octadecanoic acid และ 9-Octadecenoic acid ซึ่งมี Retention time (RT) สูตรโมเลกุล (Molecular formula) และเปอร์เซ็นต์ (% of Total) ดังแสดงใน Table 1

2. ฤทธิ์คลายความวิตกกังวล

2.1 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความวิตกกังวล โดยใช้แผ่นเจาะรู (Hole board) โดยให้หนูทดลองได้รับ MPSE ขนาดต่างกัน คือ 200 400 และ 800 มิลลิกรัมกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่า หนูกลุ่มทดลองที่ได้รับ MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีจำนวนครั้งของการมุดรูเข้าไปในแผ่นเจาะรู มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ MPSE ทั้ง 3 ให้ผลไม่แตกต่างจาก กลุ่มที่ได้รับ Phenobarbital ดังแสดงใน Table 2

2.2 การศึกษาพฤติกรรมคลายความวิตกกังวล ด้วยวิธี Light/dark test พบว่า หลังจากให้สารละลาย Corticosterone ในน้ำดื่มแก่หนูเป็นเวลา 16 วัน แล้วให้ MPSE ขนาดต่าง ๆ แก่หนูทดลอง ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Table 2 ที่พบว่า MPSE มีแนวโน้มในการลดอาการวิตกกังวลในหนูทดลอง โดยหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีจำนวนครั้งในการเดินเข้าไปในฝั่งมืดและฝั่งสว่าง (Number of entries in chamber) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน Phenobarbital และยังมีจำนวนครั้งในการยืนด้วยเท้าหลังในฝั่งมืด (Number of rear in dark chamber) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาถึงจำนวนครั้งของการเดินตัดแสง Sensor ในฝั่งมืดและสว่าง (Number of locomotor activities) พบว่า หนูทดลองทุกกลุ่มมีจำนวนครั้งของการเดินตัดแสง Sensor ในฝั่งมืดและสว่างไม่แตกต่างกัน ยกเว้นหนูทดลอง

กลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีจำนวนครั้งของการเดินตัดแสง Sensor ในฝั่งมืดแตกต่างจากหนูกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีการใช้เวลาในฝั่งสว่าง (Time spent in light chamber) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่มีระยะเวลาที่ใช้ก่อนการเข้าไปในฝั่งสว่าง (Latency to enter the light chamber) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.3 การศึกษาพฤติกรรมคลายความวิตกกังวล โดยใช้เครื่อง Force Plate Actimeter (FPA) เมื่อให้ MPSE ขนาด 200 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวแก่หนูทดลอง พบว่า MPSE ทุกขนาด และทุกช่วงระยะเวลาที่บันทึก (ช่วงที่ 6-8) มีค่าระยะทางในการเคลื่อนที่ (Distance and Traveled, mm) ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม แต่มีค่าระยะทางในการเคลื่อนที่น้อยกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Phenobarbital อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้นอกจากในช่วงที่ 8 เท่านั้น ที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่มีค่าระยะทางการเคลื่อนที่มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่สาร Phenobarbital ที่มีค่าการเคลื่อนที่เป็นระยะทางมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทุกช่วงระยะเวลาของการบันทึก ดังแสดงใน Figure 2

3. ฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลาย และนอนหลับ

3.1 ศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในการช่วยให้ผ่อนคลายและนอนหลับ ด้วยการทดสอบความสัมพันธ์ กับการทำงานของกล้ามเนื้อ ด้วยวิธี Muscle relaxant activity พบว่า หลังจากให้หนูทดลองได้รับ Diazepam 30 นาที แล้วให้หนูเดินบน Rota rod ที่ความเร็ว 20 รอบต่อนาที หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ทั้ง 3 ขนาดสามารถเดินบน Rota rot ได้ไม่ถึง 10 วินาที โดยเฉพาะอย่างยิ่งหนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถเดินได้เพียง 3.0±3.0 วินาที ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เดินได้นานถึง 9.3±0.3 วินาที ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ขนาด 200 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถเดินได้นาน 7.57±2.6 และ 6.56±1.3 วินาที ตามลำดับ

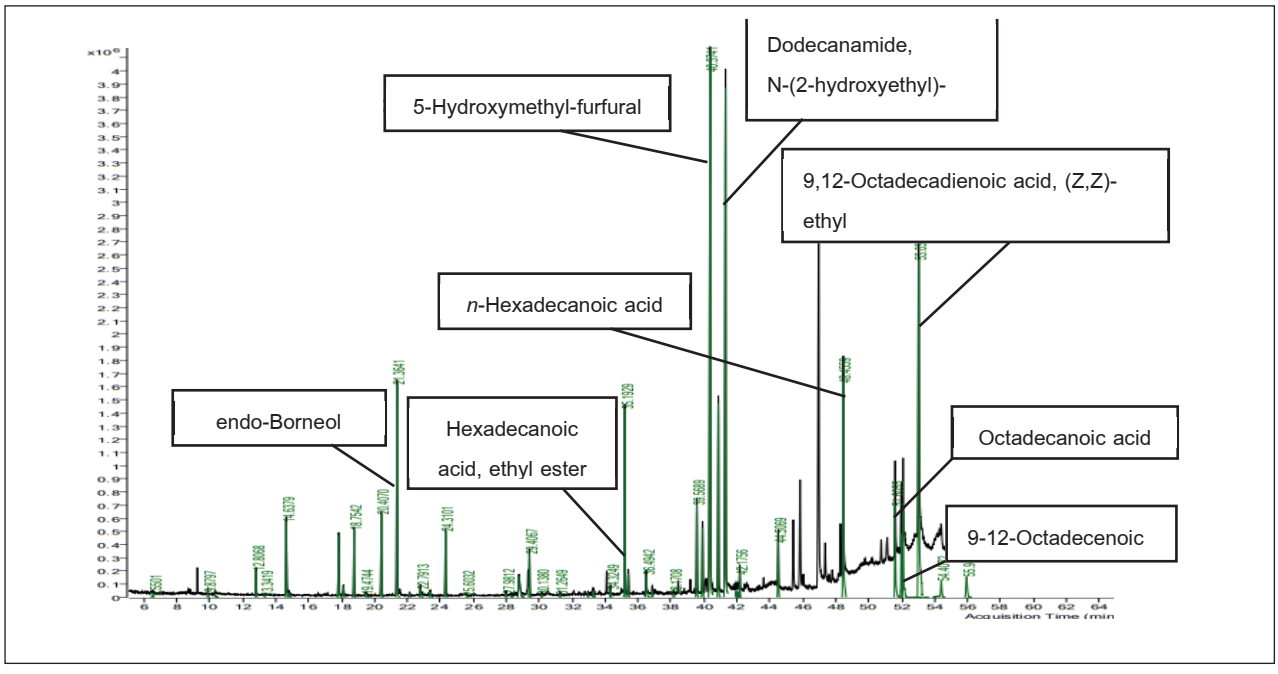

Figure 1 GC-MS chromatogram of chemical components in MPSE

Table 1 The main chemical components in MPSE

RT (min)	Compound Name	Molecular formula	% of Total
40.37	5-Hydroxymethylfurfural	$C_6H_6O_3$	12.07
41.36	Dodecanamide, N-(2-hydroxyethyl)	$C_{14}H_{29}NO_2$	10.92
53.03	9,12-Octadecadienoic acid, (*Z,Z*)-	$C_{18}H_{32}O_2$	8.92
48.45	*n*-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	4.45
21.36	endo-Borneol	$C_{10}H_{180}$	3.98
40.87	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	$C_{20}H_{36}O_2$	3.76
35.19	Hexadecanoic acid, ethyl ester	$C_{37}H_{34}O_2$	3.42
51.60	Octadecanoic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	2.06
52.08	9-Octadecenoic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	1.79

Table 2 Relieving activity of MPSE and Phenobarbital in mice using Hole board

	Groups				
	Control	**Phenobarbital**	**MPSE 200 mg/kg**	**MPSE 400 mg/kg**	**MPSE 800 mg/kg**
No. of Hole Board					
Mean	29.2	35.6	30.7	43.6*	34.1
S.E.M.	3.4	3.6	1.9	3.0	4.2

Mean in the same row, * indicate statistical significant different ($p<0.05$) from control group. Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test.

Table 3 Relieving activity of MPSE and Phenobarbital in mice using Light/dark task

Groups	No. of entries in Chamber		No. of rear in Chamber		No. of locomotor activities		Time spent in light chamber (sec)	Latency to enter the light chamber (sec)
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark		
Control	12.8±0.8	12.8±0.5	11.5±2.5	23.5±2.5	17.3±5.6	31.5±12.5	184.8±38.1	432.3±25.9
Phenobarbital	17.5±0.5*	18.5±0.6*	12.0±1.9	26.8±3.7	16.5±4.6	31.0±3.9	194.3±27.3	405.3±27.8
MPSE 200	17.6±0.5*	18.2±0.6*	18.6±5.3	45.6±0.6*	16.6±4.5	27.0±6.4*	184.6±14.3	412.8±14.1
MPSE 400	14.2±1.2	14.3±1.1	18.5±1.1	22.0±0.8	23.0±5.2	31.0±9.4	251.0±9.8*	350.7±12.3*
MPSE 800	12.3±1.8	13.0±1.7	15.2±2.5	28.8±3	15.0±1.8	25.2±12.4	221.5±15.8	390.0±12.8

Values are expressed as means ± S.E.M, n=6 rats in each group. In the same column, * indicate statistical significant different from control at $p<0.05$. Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test.

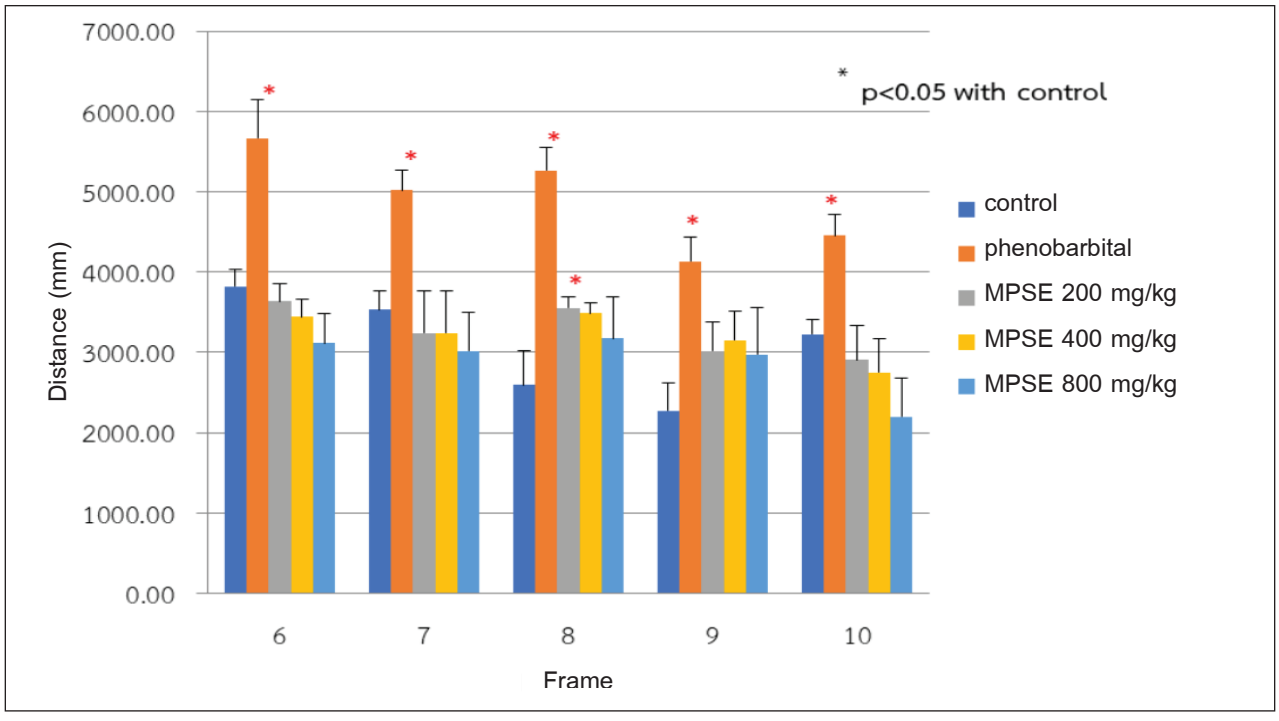

Figure 2 Relieving activity of MPSE and Phenobarbital in mice using Force Plate Actimeter. Values are expressed as means ± S.E.M, n=6 rats in each group. * indicate statistical significant different at p<0.05 compared to control. Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test.

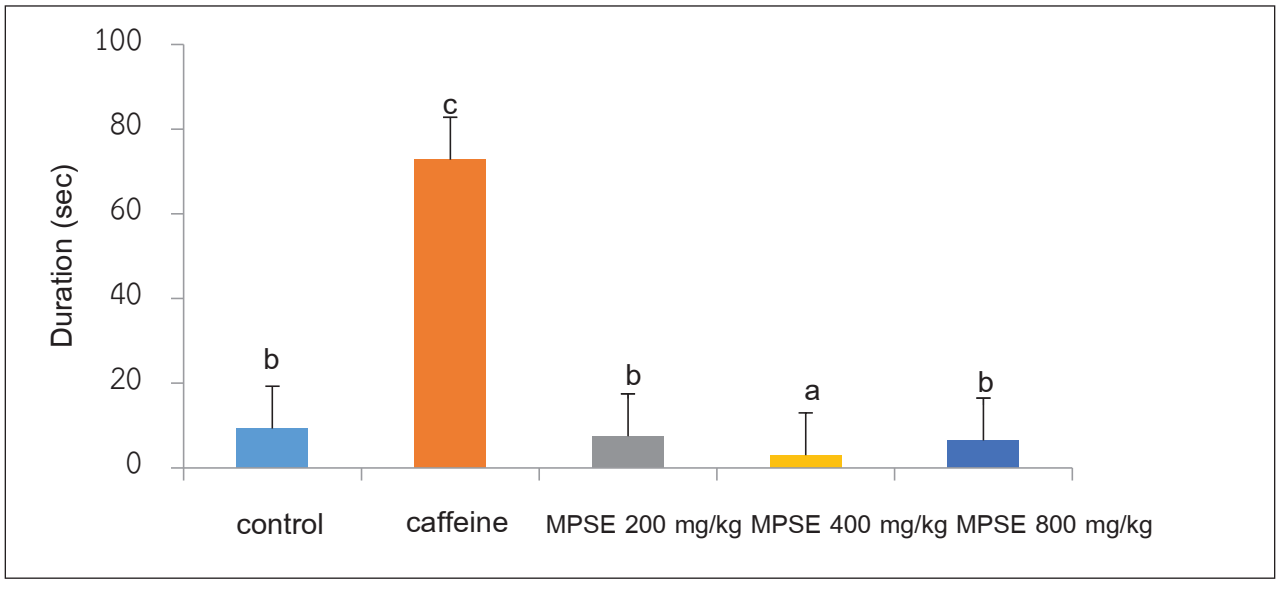

Figure 3 Effect of MPSE and Caffeine on muscle relaxant activity (duration on the Rota rod ; sec.) after the treatment of Diazepam for 30 min, compared to control group. a, b, c indicate statistical significant different at p<0.05. Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test.

แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับCaffeine สามารถเดินได้นานถึง 72.8±2.4 วินาที ซึ่งนานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงใน Figure 3

3.2 ศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลายและนอนหลับ ด้วยการทดสอบโดยวิธี Sleeping time พบว่า หลังจากให้หนูทุกตัวได้รับ Diazepam แล้วสังเกตการนอนหลับทันที ด้วยการทดสอบ Righting reflex โดยการกระตุ้นบริเวณหู และอุ้งเท้าด้วยพู่กัน แล้วบันทึกช่วงเวลาของการหลับทั้งในส่วนของ ระยะเวลาที่เริ่มหลับ (Onset) และระยะเวลาที่นอนหลับ (Duration time) หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ทั้ง 3 ขนาด มี ระยะเวลาเริ่มหลับสั้นกว่า แต่มีระยะเวลาในการนอนหลับยาวกว่ากลุ่มควบคุม การออกฤทธิ์นี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของสารที่ได้รับ (Dose dependent manner) นอกจากนี้ยังให้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ ทั้งระยะเวลาที่เริ่มหลับ และระยะเวลาที่นอนหลับในหนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ทั้งขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว อย่างไรก็ตาม ไม่พบการนอนหลับ (ระยะเวลาในการนอนหลับ เท่ากับ 0) ของหนูทุกตัวในกลุ่มที่ได้รับ Caffeine ผลดังกล่าวแสดงใน Table 4

Table 4 Effect of MPSE and Caffeine on sleeping time (Onset and Duration time) after treating with Diazepam compared to control group

Groups	Sleeping time	
	Onset (min)	Duration time (min)
Control	51.2±0.60	41.0±0.12
Caffeine	0	0
MPSE 200 mg/kg	36.8±0.39	25.2±3.9
MPSE 400 mg/kg	28.8±0.97*	142.8±3.76*
MPSE 800 mg/kg	19.8±0.44*	164.0±5.38*

Values are expressed as Means±S.E.M, n=6 rats in each group. In the same column, * indicate statistical significant different from control at $p<0.05$. Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test. 0 = without Sleeping time

4. ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

การศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส พบว่า MPSE และยาอะคาโบส ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ และฤทธิ์ในการยับยั้งผันแปรตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ 3.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซเดสมากที่สุด คือ MPSE สามารถยับยั้งได้ 68.31±0.34 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากันยาอะคาร์โบสยับยั้งได้ 73.37±0.59 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อประมวลโดยรวม พบว่า MPSE มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} 0.38±0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่ายาอะคาร์โบส ซึ่งมีค่า IC_{50} 1.57±0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงใน Table 5 และ Figure 4

Table 5 Inhibitory effect of MPSE and Acarbose on α-Glucosidase activity Values are expressed as means ± S.E.M, n= 3 replications. There was significant difference between means have the different alphabetical superscript letters (a,b,c and d) in the same column ($p<0.05$), andthere was significant difference between means have * in the same row ($p<0.05$). Statistical analysis was carried out using One way ANOVA followed by LSD post-hoc test. ND = Not Detected

Concentrations (mg/mL)	% α- Glucosidase Inhibition		LC_{50} (mg/mL)	
	MPSE	Acarbose	MPSE	Acarbose
3.00	68.31 ± 0.34^{f*}	73.37 ± 0.59^{e}	0.38+0.07*	1.57±0.23
1.50	60.34 ± 0.75^{e*}	48.98 ± 0.69^{d}		
0.75	54.28 ± 0.67^{d*}	40.11 ± 0.57^{c}		
0.38	50.11 ± 0.62^{d*}	24.60 ± 0.35^{b}		
0.19	41.12 ± 0.51^{c*}	14.71 ± 0.21^{a}		
0.09	30.11 ± 0.38^{b*}	12.36 ± 0.18^{a}		
0.05	22.81 ± 0.29^{a*}	8.73 ± 0.13^{a}		
0.02	19.32 ± 0.02^{a}	ND		

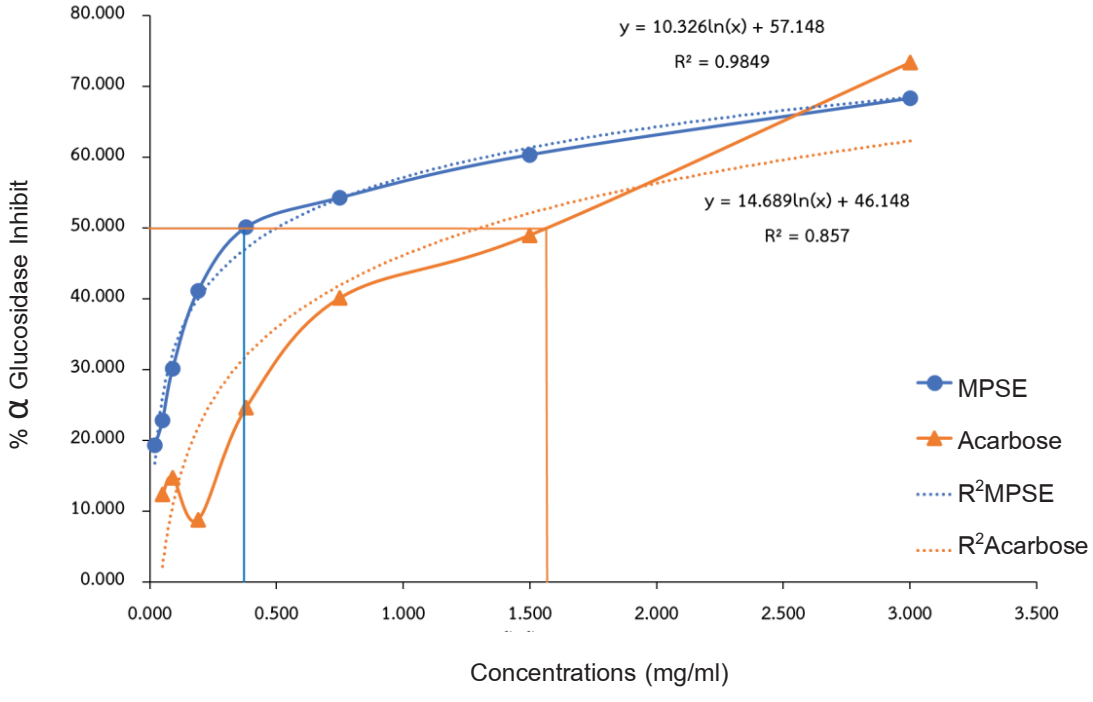

Figure 4 Inhibitory effect (IC_{50}) of MPSE and Acarbose on α-glucosidase

วิจารณ์และสรุปผล

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ MPSE โดยใช้เครื่อง GC-MS พบสารทั้งหมด 48 ชนิด เป็นสารที่มีปริมาณมาก 9 ชนิด ได้แก่ 5-Hydroxymethyl-furfural, Dodecanamide, N-(2-hydroxyethyl)-, 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-, n-Hexadecanoic acid, endo-Borneol, 9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester, Hexadecanoic acid ethyl ester, Octadecanoic acid และ 9-Octadecenoic acid และสารที่มีปริมาณน้อย 39 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่พบว่า เป็นสารในกลุ่มของกรดไขมัน ซึ่งมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ซึ่งกลุ่มสารที่พบครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานของ รพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ (2560) ที่รายงานว่า สารพฤกษเภสัชภัณฑ์ที่พบในหมามุ่ย

เป็นจำพวกกรดไขมัน ได้แก่ Linolenic acid และ Oleic acid อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยอื่นๆ ที่พบสารอื่นๆ เป็นองค์ประกอบในเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย ได้แก่ สาร 3, 4-dihydroxyphenylalanine, (Levodopa ; L-DOPA) และ 5-Hydroxy tryptophan, 5-HTP (Daxenbichler *et al.*, 1971), Epinephrine, Norepinephrine (Molloy *et al.*, 2006 ; Shukla *et al.*, 2010), Alkaloids, Mucunine, Mucunadine, Mucunadinine, Prurienidine, Nicotine, beta-Sitosterol, Glutathione, Lecithin, Vernolic acid, Gallic acid, Tryptamine, Alkylamines, Steroids, Flavonoids, Coumarins, Cardenolides และโลหะ เช่น แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี แมงกานิส เหล็ก (Misra & Wagner, 2007) รวมทั้งสารอาหาร ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และเส้นใย (Shahaji, 2011)

การศึกษาจากเอกสาร พบว่า พฤกษเคมีที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์บรรเทาความวิตกกังวลและความเครียด และฤทธิ์ต้านเบาหวาน เช่น 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-ต้านการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง (Morenike *et al.*, 2018) n-Hexadecanoic acid ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Morenike *et al.*, 2018) Octadecanoic acid คลายความกังวล (วารุณี ธนะแพสย์, 2549) และ 9-Octadecenoic acid กล่อมประสาท และคลายความวิตกกังวล (ปิยานี รัตนชำนอง, 2562) เนื่องจากมีการพบสารเหล่านี้ เป็นองค์ประกอบใน MPSE ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่า สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบใน MPSE มีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์คลายความวิตกกังวลและความเครียด และฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดีย

จากการศึกษาฤทธิ์ของ MPSE ในหนูถีบจักร ในการคลายความวิตกกังวล ด้วยวิธี Light/dark test, Hole board และ FPA จะเห็นได้ว่า MPSE ขนาด 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ช่วยคลายความวิตกกังวล ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยเกี่ยวกับการประเมินฤทธิ์ในการต้านความวิตกกังวลด้วยวิธี Elevated plus maze (EPM) ของ Singh *et al.* (2019) ที่พบว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ย ขนาด 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถลดระยะเวลา และจำนวนครั้งในการเข้าไปใน Closed arm แต่เพิ่มระยะเวลาและจำนวนครั้งในการเข้าไปใน Opened arm แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอาจมีคุณสมบัติในการต้านความวิตกกังวลได้ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sonpetkar *et al.* (2012) และ Sachan *et al.* (2015) ที่ศึกษาฤทธิ์ช่วยคลายความวิตกกังวลด้วยวิธี Elevated plus-maze model พบว่า สารสกัดเอทานอลของหมามุ่ยอินเดีย มีฤทธิ์ช่วยคลายความวิตกกังวลได้ โดยสามารถทำให้หนูทดลองมีระยะเวลาที่ใช้ และจำนวนครั้งในการอยู่ใน Open arms เพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนครั้งในการเข้าไปใน Y-maze ลดลง

MPSE ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีฤทธิ์ช่วยบรรเทาความวิตกกังวลได้ เนื่องจาก มีสารที่ช่วยผ่อนคลายและคลายกังวล ได้แก่ Octadecanoic acid (วารุณี ธนะแพสย์, 2549) และ Octadecenoic acid-9 (ปิยานี รัตนชำนอง, 2562)

นอกจากนี้ มีรายงานว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยช่วยให้เกิดความผ่อนคลายได้ เนื่องจากมีสารสื่อประสาทโดปามีนซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เกิดความผ่อนคลาย (Ankita *et al.*, 2017)

จากผลการทดสอบความสัมพันธ์ของ MPSE กับการทำงานของกล้ามเนื้อด้วยวิธี Muscle relaxant activity พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ทั้ง 3 ขนาด มีแนวโน้มในการคลายกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะ MPSE ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งสามารถแสดงผลที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลายและนอนหลับเมื่อทดสอบด้วย Sleeping time พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ MPSE ทั้ง 3 ขนาด มีแนวโน้มในการช่วยให้นอนหลับได้ ซึ่ง MPSE ขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แสดงผลที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และ MPSE ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ทำให้หนูหลับได้นานที่สุด ผลจากการวิจัยในครั้งนี้ สอดคล้องกับการวิจัยของ Longhi *et al.* (2011) และระพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ (2560) ที่พบว่า การป้อน สารสกัดเมล็ดหมามุ่ย ขนาด 250, 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทำให้หนูหลับได้ (ระพีพันธุ์ ศิริเดช และคณะ 2560) และสารสกัด ขนาด 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ทำให้หนูหลับได้นานที่สุด (Longhi *et al.* (2011) ซึ่งต่างจาก Caffeine ที่ไม่สามารถทำให้หนูทุกตัวนอนหลับ (ระยะเวลาในการนอนหลับ เท่ากับ 0) เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า Caffeine เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาท ทำให้ไม่ง่วงนอน ดังนั้น จึงไม่พบการนอนหลับในหนูทุกตัวที่ได้รับ Caffeine

จากการทดสอบฤทธิ์ของ MPSE ในการคลายความกังวลและความเครียด ในการวิจัยครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า MPSE ทั้ง 3 ขนาด คือ 200, 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ในการคลายความวิตกกังวลและความเครียด และช่วยในการนอนหลับของหนูทดลอง นอกจากนี้ MPSE ยังออกฤทธิ์ในทิศทางเดียวกับสาร Phenobarbital ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับลด หรือคลายความวิตกกังวลและความเครียด อย่างไรก็ตาม MPSE ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดของการทดสอบในแต่ละวิธี ในขนาดที่ใช้แตกต่างกัน จึงอาจกล่าวได้ว่า สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียบรรเทาอาการวิตกกังวล และช่วยในการนอนหลับในหนูทดลองได้ดีขึ้นอยู่กับขนาดของสารสกัดที่ใช้

การศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของ MPSE พบว่า MPSE มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ MPSE พบว่า มี n-Hexadecanoic acid และ 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)- เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย และจากการศึกษาของ Morenike *et al.* (2018) พบว่า สารสกัดเอทานอลของ *Lentinus squarrosulus* ประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส คือ n-Hexadecanoic acid และ 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-

ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า MPSE มีฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ อันเป็นผลมาจาก n-Hexadecanoic acid และ 9,12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)- และ MPSE มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน (IC_{50} 0.38±0.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ดีกว่ายาอะคาร์โบส ที่มีค่า IC_{50} 1.57± 0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบค่า IC_{50} ของยาอะคาร์โบส ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จะมีค่าสูงกว่าค่า IC_{50} การศึกษาของ Wongnawa *et al.*, (2014) ที่รายงานว่า ยาอะคาร์โบสที่นำมาใช้เป็นสารควบคุมมีค่า IC_{50} 816.87±99.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 0.817± 9.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาอะคาร์โบสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีฤทธิ์อ่อนกว่าในการศึกษาของ Wongnawa *et al.*, (2014) ทั้งนี้เพราะในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งใช้สารทดสอบความเข้มข้นน้อยกว่า แสดงว่า สารทดสอบนั้นยิ่งมีฤทธิ์สูงกว่า

แต่เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสยาอะคาร์โบสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยับยั้งได้เพียง 48.98±0.69% ขณะที่ในงานวิจัยของ Wongnawa *et al.* (2014) ใช้ยาอะคาร์โบส เพียง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สามาถยับยั้งได้สูงกว่า คือยับยั้งได้ 50.04±3.55% นอกจากนี้ งานวิจัยของพรชนก ชโลปกรณ์ & พงศธร กล่อมสกุล (2560) ใช้ยาอะคาร์โบส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นกัน แต่สามารถยับยั้งได้สูงถึง 73.99 ±7.50%

ดังนั้นการออกฤทธิ์ของสารทดสอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส จึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารทดสอบ สำหรับ MPSE นั้น พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.02-1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ดีกว่ายาอะคาร์โบส แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น 3.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งได้น้อยกว่ายาอะคาร์โบส

เมื่อกล่าวโดยสรุป สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีฤทธิ์ในการคลายความวิตกกังวลและคลายเครียด ช่วยให้ผ่อนคลาย และช่วยให้นอนหลับได้นานขึ้น เช่นเดียวกับการใช้สาร phenobarbital โดยมี endo-Borneol, Octadecanoic acid และ 9-Octadecenoic acid เป็นสารออกฤทธิ์ นอกจากนี้ สารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียยังมีฤทธิ์ต้านเบาหวานโดยมีกลไกผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส โดยมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ n-Hexadecanoic acid และ 9.12-Octadecadienoic acid, (Z,Z)-

จึงมีความเป็นไปได้ในการนำเอาสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียไปพัฒนา และประยุกต์ใช้ในบุคคลทั่วไป และผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อคลายความวิตกกังวลและความเครียด ตลอดจนเพิ่มระยะเวลาในการนอนหลับพักผ่อนให้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อสุขภาพ และการนำไปศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์อื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ วัสดุ-อุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติการ และขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และให้บริการทางวิชาการในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข. (2541). *คู่มือ การดำเนินงานในคลินิกคลายเครียด* (พิมพ์ครั้งที่ 2). (ม.ป.ท.)

เกษม ตันติผลาชีวะ. (2543). *การนอนหลับ และวงจรการนอนหลับ: ใกล้หมอ*. (ม.ป.ท.)

เจนจิรา เกียรติสินทรัพย์ สาริณี โต๊ะทอง และ ทานตะวัน แย้มบุญเรือง. (2562). ผลของการใช้โปรแกรมจัดการความเครียดต่อความสามารถจัดการความเครียดและระดับความเครียดของผู้สูงอายุ ในเขตอำเภอเมืองนนทบุรี. *วารสารเกื้อการุณ*, 67-77.

ชลธิชา แย้มมา และ พีรพนธ์ ลือบุญธวัชชัย. (2556). ปัญหาการนอนหลับ ความเหนื่อยล้า และประสิทธิภาพในการปฏิบัติงานของพยาบาลวิชาชีพในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. *วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย, 58*(2), 183-196.

ดารัสนี โพธารส. (2560). *ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพการนอนหลับของนิสิตพยาบาล. วารสารคณะพยาบาลศาสตร์.* มหาวิทยาลัยบูรพา.

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2543). *สมุนไพรพื้นบ้าน.* บริษัท ประชาชน จำกัด.

ปิยานี รัตนชำนอง. (2562). ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะเขือพวง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 21*(2), 124-27.

พรชนก ชโลปกรณ์ & พงศธร กล่อมสกุล (2560). ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดฝาง ม้ากระทืบโรงและปลาไหลเผือก. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 12*(1), 63-73.

พราว ศุภจริยาวัตร เดชมนตรี วจีสุนทร บุญญาณี ศุภผล ธนวัฒน์ ทองจีน บรรจง ชาวไร่ และพรชัย สินเจริญโภไคย. (2561). การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยอินเดียในสัตว์ทดลอง. *วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์, 10*(12), 24-26.

ระพีพันธุ์ ศิริเดช, วัลวิภา เสืออุดม, วิภาพรรณ ชนะภักดิ์ และนารีลักษณ์ ตั้งศรีศักดา. (2560). ฤทธิ์ทางชีวภาพของหมามุ่ย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*, *3*(2), 103-108.

วารุณี ธนะแพสย์. (2549). *การศึกษาวิธีการสกัดปริมาณและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ในน้ำมันเมล็ดเสาวรสเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทลบริ้วรอยที่มีส่วนผสมของน้ำมันเมล็ดเสาวรส.* สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมภพ เรืองตระกูล. (2550). *ความผิดปกติของการนอนหลับการประเมินและการรักษา*. เรือนแก้วการพิมพ์.

อารียา สุฉันทบุตร ชูศรี ตลับมุข และสนอง จอมเกาะ. (2551). ผลของผงและสารสกัดจากใบชะพลูและลำต้น บอระเพ็ดต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด และค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเบาหวาน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, *27*(3), 227-232.

สถาบันวิจัยและพัฒนาระบบสาธารณสุข. (2552). *การจัดการเบาหวานแบบบูรณาการ.* นนทบุรี. (ม.ป.ท.)

อินทิรา ปากันทะ. (2550). ปัญหาการนอนหลับและวิธีการแก้ไข. *วารสารพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*, (2), 31-38.

Ankita, C.B., Gohil, N.K., Kale, K.A., Vijay, L., & Vipul,G. (2017). Review: Phytochemistry, therapeutic use and pharmacological activity of *Mucuna Pruriens* Linn. *Pharma Science Monitor*, *8* (2), 136-142.

American Diabetes Association. (2006). Standards of medical care in diabetes-2006. *Diabetes Care*, (29), 4-42.

Ahmad, MK., Mahdi, AA., Shukla, KK., Islam, N., Jaiswar, SP., & Ahmad, S. (2008). Effect of *Mucuna pruriens* on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertility Steril*ity, *90*(3), 627-635.

Bala, V. (2011). *Anti-inflammatory, diuretic and antibacterial activities of aerial parts of Mucuna pruriens Linn. International Journal of Pharmacology,* (7), 498-503.

Beck, S.L. (1992). Measuring sleep. In M. Frank Stromborg (Ed.), *Instrument of clinical nursing research* (pp. 255-267). F.A. Davis Company.

Buddhakala, N., & Talubmook, C. (2020). Toxicity and antidiabetic activity of ethanolic extract of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski flower in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *262*(2), 113-128 DOI:10.1016/j.jep.2020,113-128

Brown, G.R. & Nemes (2008). The exploratory behavior of rats in the hole-board apparatus. *Behavioral Processes, 78*(3), 442-448.

Chinnasamy, K. & Thangamani, C. (2014). Amazing bean Mucuna pruriens: A comprehensive review. *Journal of Medicinal Plants Research, 8*(2), 138-43.

Daxenbichler, M.E., Van Etten, C.H., Hallinan, E.A., Earle, F.R., & Barclay, A.S. (1971). Seeds as sources of L-dopa. *Journal of Medical Chemistry*, (14), 463-465.

Dahanukar, S.A. & Hazra, A. (1995). In Dahanukar, S.A. (ed). *Heal with Herbs* (p. 53-74). Publications and Information Directorate, Council of Scientific and Industrial Research.

DeLay, K.J., Haney, N., & Hellstrom, W.J. (2016). Modifying risk factors in the management of erectile dysfunction: a review. *World Journal Mens Health*, (34), 89-100.

Dong, H.Q., Li, M., Zhu, F., Liu, F.L., & Huang, J.B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry,* (130), 261-266.

Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., & Kessler, R.C, (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, results of a follow-up national survey. *JAMA International Medicine, 280(*18),1569-1575. doi: 10.1001/jama.280.18.1569. PMID: 9820257.

Fu, W., Zhuang, W., Zhou, S., & Wang, X. (2015). Plant-derived neuroprotective agents in Parkinson's disease. *American Journal Trans Research*, *7*(7), 1189-1202.

Gupta, A., Mahdi, A., Ahmad, M.K., Shukla, K.K., Bansal, N., & Jaiswer, S.P, *et al.* (2011). A proton NMR study of the effect of Mucuna pruriens on seminal plasma metabolites of infertile males. *Journal Pharmacological & Biomedical Analysis*, (55), 1060-1066.

Hex, N., Bartlett, C., Wright, D., Taylor, M., & Varley, D. (2012). Estimating the current and future costs of type 1 and type 2 diabetes in the UK, including direct health costs and indirect societal and productivity costs. *Diabetes Medicine,* (29), 855-862.

Helton, D.R., Tizzano, J.P., Monn, J.A., Schoepp, D.D., & Kallman, M.J. (1998). Anxiolytic and side-effect profile of Ly 354740: A potent, highly selective, orally active agonist for group II metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 284*, 651-660.

Katzenschlager, R., Evans, A., Manson, A., Patsalos, P.N., Ratnaraj, N., Watt, H., Timmermann, L., Van der Giessen, R., & Lees, A.J. (2004). *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. *Journal Neurological and Neurosurgical Psychiatry*, *75*(12),1672-1677. doi: 10.1136/jnnp.2003.028761. PMID: 15548480 ; PMCID: PMC1738871.

Kim, Y. S., & Joh, T. H. (2006). Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular. Medicine, 38*, 333-347. doi: 10.1038/emm, 40.

Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D., & Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic physician, 8*(1), 1832-1842. https://doi.org/10.19082/1832

Krishna, A.B., Manikyam, HK., Sharma, VK., & Sharma, N. (2015). Cytotoxicity study in non malignant fibroblast L929 cell line with *Mucuna pruriens* seed extract. *International Journal of Phytomedicine, 7*(4), 366-369.

Krishnamoorthy, M. (2016). Evaluation of andro- genic activity of *Mucuna pruriens* in male rats. *African Journal of Biotechnolology*, *10*(66), 150-179.

Kumar, K.V.A,, Srinivasan, K.K., Shanbhag, T., & Rao, S.G. (1994). Aphrodisiac activity of the seeds of *Mucuna pruriens*. *Indian Drug*, (31), 321-327.

Kumar, D.S., Muthu, K.A., Smith, A.A., & Manavalan, R. (2010). In vitro antioxidant activity of various extracts of whole plant of *Mucuna pruriens* (Linn). *International Journal of PharmTech Research,* (2), 2063-2070.

Longhi, J.G., Perez, E., Lima, J.J., & Bileski Cândido, L.M. (2011). In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *47*(3), 535-544.

Majekodunmi, S.O., Oyagbemi, A.A., Umukoro, S., & Odeku, O.A. (2011). Evaluation of the anti-diabetic properties of *Mucuna pruriens* seed extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4*(8),632-636. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60161-2.

McGrady, A.V. (1984). Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Archives of Andrology*, (13), 1-7. doi:10.3109/01485018408987495.

Misra, L., & Wagner, H. (2007). Extraction of bioactive principle from *Mucuna pruriens* seeds. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, (44), 56-60.

Molloy, S.A., Rowan, E.N., O'Brien, J.T., McKeith, I.G., Wesnes, K., & Burn, D.J. (2006). Effect of levodopa on cognitive function in Parkinson's disease with and without dementia and dementia with Lewy bodies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, (77), 1323-1328.

Morenike, O.A-I., Olufunmiso, O.O., Segun, G.J., & Coopoosamy, R.M. (2018). Bioactive compounds in ethanol extract of *Lentinus squarrosulus* Mont - A nigerian medicinal macrofungus. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 15*(2), 42-50.

Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J.D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, NH., Cavan, D., Shaw, JE., & Makaroff, L.E. (2017). *IDF* Diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice,* (128), 40-50.

Pansare, T.A., & Sadabal, B.G. (2019). Ayurvedic phytochemical therapeutic and pharmaco- logical overview for Kapikacchu (*Mucuna pruriens* Linn.). *International Journal of Engineering Science and Computing, 5*(3), 215-218.

Rachsee, A., Chiranthanut, N., Kunnaja, P., Sireeratawong, S., Khonsung, P., Chansakaow, S., & Panthong, A. (2020). *Mucuna pruriens* (L.) DC. seed extract inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells. *Journal of Ethnopharmacology, 1*(267), 113518. doi: 10.1016/j.jep.2020.113518. Epub 2020 Oct 26.

Rajeshwar, Y., Kumar, G.P.S., Gupta, M., & Mazumder, U.K. (2005). Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *European Bulletin of Drug Research*, (13), 31-39.

Ratnawati, H., (2011). Anticholesterol activity of velvet bean towards hypercholesterolemic rats. *Medicinal Research Center*, (40), 317-321.

Sachan, A., Kumar, S., Singh, H., Shankar, P., Kumar, D., Kumar, A., & Sachan Kumar, D. (2015). Potential anti-anxiety effect of *Mucuna pruriens* in experimental model of Swiss albino mice. *PTB Reports*,*1*(1).

Selye, H. (1976). *Stress and inflammation*. In Selye, H. (ed). *The stress of life* (pp. 129-144). McGraw-Hill.

Shahaji, P.S., & Parnu, S.A. (2011). Estrogenic activity of *Mucuna pruriens* in Swiss albino mice. *International Research Journal of Pharmacy, 2*(4), 191-193.

Sharma, M.L., Chandhoke, N., Ray Ghatak, BJ., Jamwal, K.S., Gupta, O.P., & Singh, G.B. (1978). Pharmacological screening of Indian medicinal plants. *Indian Journal of Experimental Biology*, (16), 228-235.

Shukla, K.K., Mahdi, A.A., Ahmad, M.K., Jaiswar, S.P., Shankwar, S.N., & Tiwari, S.C. (2010). *Mucuna pruriens* reduces stress and improves the quality of semen in infertile men. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *7*(1), 44-137.

Singh, S., Gupta, P., & Gupta, R. (2019). Evaluation of anti-anxiety activity of *Mucuna pruriens*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 9*(4-A), 104-107.

Sonpetkar, J.M., Nipate, S.S., Shenoy, P.A., & Chaudhari, P.D. (2012). *In vitro* anti-oxidant activity of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* (L.) DC. seeds. *Journal of Pharmaceutical Research*, *5*(5), 2769-2772.

Stuart, G.W., & Sundeen, S.J. (1995). *Principle and practice of psychiatric nursing*. (5th ed). ST Louis: Mosby.

Su, C.H., Lai, M.N., & Ng, L.T. (2013). Inhibitory effects of medicinal mushrooms on alpha -amylase and alpha-glucosidase-enzymes related to hyperglycemia. *Food Function*, (4), 644-649.

Tsuji, H., Larson, M.N., Venditti, F.J., Manders, E.F., Evans, J.C., Feldman, C.L., & Levy, D. (1996). Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. *Circulation*, *94*(11), 2850-2855. https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.11.2850Circulation.

Wilson, S., & Nutt, D.J. (2008). *Sleep Disorders*. OUP Oxford.

Wongnawa, M., Tohkayomatee, R., Bumrungwong, N., & Wongnawa, S. (2014). Alpha-glucosidase inhibitory effect and inorganic constituents of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Ash. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 36*(5), 541-546.

Yang, N.Y.J., Kaphle, K., Wang, P.H., Jong, D.S., Wu, L.S., & Lin, J.H. (2004). Effect of aqueous extracts of “Betel quid” and its constituents on testosterone production by dispersed mouse interstitial cells. *American Journal of Chinese Medicine*, (32), 705-715.

Yaremchuk, K.L., & Wardrop, P.A. *(2010). Sleep Medicine.* Plural Publishing Inc.

Zai, A., Bina, S., Siddiqui, S, Begum, S., Siddiqui, S. & Suria, A. (1995). Studies on the constituents of the leaves of Nerium oleander on behavior pattern in mice. *Journal of Ethnopharmacology, 49*(1), 33-39.