วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

การทดสอบสารพฤกษเคมี ปริมาณฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบกระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.)

Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Phenolic Compound Contents, and Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activities of Tummy-Wood (*Careya sphaerica* Roxb.) Leaf Extract

รุ่งอรุณ ตรีภพ[1], สุพรรนี อะโอกิ[2], ปริญญา มูลสิน[2], พักพล มุ่งลือ[2]*

Rung-arun Treepop[1], Supannee Aoki[2], Parinya Moonsin[2], Phukphon Munglue[2]*

[1] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

[1] Program of Science Education, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University

[2] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

[2] Program of Biology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University,

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการทดสอบสารพฤกษเคมี ปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดใบกระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.) ตัวอย่างใบกระโดนสกัดด้วยเมทานอล ผลการทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดใบกระโดนพบไกลโคไซด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ และคูมารินส์ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดใบกระโดนมีค่าเท่ากับ 2.88 ± 0.59 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดและ 10.02 ± 0.58 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิทินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ ปริมาณแทนนินมีค่าเท่ากับ 1.29 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของพืช ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.42 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสมีค่าเท่ากับ 2.97 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกระโดนเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลได้

คำสำคัญ: พฤกษเคมี กระโดน แอลฟาอะไมเลส แอลฟากลูโคซิเดส

Abstract

This study aimed to evaluate phytochemicals, total flavonoid and phenolic compound contents, and alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of Tummy-Wood (*Careya sphaerica* Roxb.) leaf extract (TLE). Leaf samples were methanolic extracted. Phytochemical screening presents glycosides, alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, saponins, terpenoids, and coumarins. Total phenolic and flavonoid contents of TLE were 2.88 ± 0.59 mg GAE/g of extract and 10.02 ± 0.58 mg QE/g of extract, respectively. The tannin content detected in the extract was 1.29 ± 0.14 mg/100 mg of dry plant weight. The IC_{50} values of alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities produced by TLE were 0.42 ± 0.01 and 2.97 ± 0.09 mg/ml, respectively. These results indicated that TLE might be an excellent source of various phytochemicals with antihyperglycemic potential.

Keywords: Phytochemicals, Tummy-Wood, alpha-Amylase, alpha-Glucosidase

** Corresponding author: phukphon.m@ubru.ac.th*

***Received**: 2 กรกฎาคม 2566* ***Revised**: 23 สิงหาคม 2566* ***Accepted**: 25 สิงหาคม 2566*

1. บทนำ

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับการใช้ชีวิตประจำวัน ลักษณะอาการปรากฏของโรคนี้ คือ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง และความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมของโปรตีน ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่ออวัยะในร่างกาย เช่น ตับ ตัวอ่อน ดวงตา เซลล์ประสาท และไต เป็นต้น (Alberti and Zimmet, 1998) สาเหตุของโรคเบาหวานมักเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการสังเคราะห์ การหลั่ง และการตอบสนองของอินซูลิน รวมทั้งตัวรับสัญญาณอินซูลิน (Bjorntorp et al., 1999) องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานว่าประชากรโลกประมาณ 6% หรือ 420 ล้านคน เป็นผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 หรือชนิดที่ 2 มีอัตราการตายที่เกิดขึ้นจากอาการเบาหวานในปี 2016 สูงกว่าในปี 2000 ถึง 5% และยังได้คาดการณ์ว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 629 ล้านคนในปี 2045 (World Health Organization, 2022)

วิธีการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน คือ การออกกำลังกายและการควบคุมอาหาร (Ahmad and Crandall, 2010) ส่วนวิธีการรักษาอื่น ๆ คือ การกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน การส่งเสริมการทำงานของอินซูลินที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะเป้าหมาย และการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Tundis et al., 2010; Talimi and Gulcin, 2017) ยาสังเคราะห์หลายชนิดถูกนำมาใช้เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ อะคาร์โบส (acarbose) ไมกลิทอล (miglitol) และ โวกลิโบส (voglibose) อย่างไรก็ตามการใช้ยาสังเคราะห์เหล่านี้มักมีผลข้างเคียง เช่น มีอาการท้องอืด ท้องร่วง หรืออาการแน่นท้อง เป็นต้น (Chiasson et al., 2002) และหากใช้ยาเหล่านี้อย่างต่อเนื่องจะส่งผลให้เกิดอาการดื้อยาและการรักษาไม่ได้ผล ดังนั้น ปัจจุบันจึงมีการวิจัยและศึกษาสารสำคัญที่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ มากขึ้น (Shawky et al., 2022; Talimi and Gulcin, 2017; Tundis et al., 2010)

พืชสมุนไพรหลายชนิดได้นำมาวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ (Cheng and Fantus, 2005) เช่น ในรายงานวิจัยของ Shawky et al. (2022) ทำการทดสอบสารสกัดจากใบลูกชิดพบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์โรคาร์แพน เคอร์ซิทิน และเคอร์ซิทินเฮกโซไซด์ ซึ่งสารพฤกษเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดส นอกจากนี้ Taslimi and Gulçin (2017) ยังรายงานว่าเททระคิส (tetrakis), พารา-คูมาริกแอซิด (p-coumaric acid) เรสวาราทรอล (resveratrol) เคอร์คิวมิน (curcumin) ออลิวีทอล (olivetol) กรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) และ ไอโซลิควิริทิจีนิน (isoliquiritigenin) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดส

กระโดน (*Careya arborea* Roxb.) เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตและกระจายอยู่ทั่วไปในหลายประเทศของเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สารพฤกษเคมีสำคัญที่พบในส่วนของเปลือก ใบ และเมล็ดกระโดนพบอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene derivatives) อนุพันธ์ของอาร์บูทิน (arbutin derivatives) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) อนุพันธ์ของคูมาริน (coumarin derivatives) น้ำมันหอมระเหย ฟลาโวนอยด์ ลิกแนนส์ ซาโปนินส์ ไตรเทอร์พีนส์ และวาลีพอไตรเอท (valepotriates) แต่ในส่วนใบไม่พบแอลคาลอยด์ (Gupta et al., 2019; Khaliq, 2016) นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มแทนนินและฟลาโวนอยด์ เช่น ซิโตสเตอรอล (sitosterol) กรดแอลลาจิก (ellagic acid) และเคอร์ซิทิน สารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนได้แก่ ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) และซาโปนินที่ยับยั้งโรคลิชมาเนีย (Mandal et al., 2006) ส่วนของเปลือกลำต้นและใบมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ (Kumar et al., 2006) พืชชนิดนี้ได้นำมาใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น ใบใช้ในการรักษาอาการไข้และรักษาอาการบวม น้ำคั้นจากใบสดใช้ดื่มเพื่อรักษาอาการกรดไหลย้อนและโรคผิวหนัง นอกจากนี้ยังใช้ในการรักษาแผลเปื่อย อาการปวดหู งูกัด การติดเชื้อ ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก อาการไอ ปวดฟัน หลอดลมอักเสบ และฝีดาษ เป็นต้น (Ambardar and Aeri, 2013; Satish et al., 2010) อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากกระโดนยังคงมีน้อยและการพัฒนาตัวยาชนิดใหม่ที่มีผลข้างเคียงต่ำเพื่อใช้ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวยังมีความจำเป็นมากในปัจจุบัน

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อทดสอบสารพฤกษเคมี ปริมาณฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดใบกระโดน

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบกระโดน

ส่วนใบของกระโดนเก็บจาก อ.ทรายมูล จ.ยโสธร ตัวอย่างพรรณไม้แห้งวิเคราะห์ชนิดโดยนักพฤกษศาสตร์และเก็บไว้ที่สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ตัวอย่างใบกระโดนอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียด สกัดผงใบ กระโดนด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1 กรัม : 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน และกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์1 (ยี่ห้อ Whatman) ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยสมการที่ 1

$$\%yield = \frac{weight\ of\ the\ dry\ extract\ (g)}{weight\ of\ the\ dry\ plant\ (g)} \times 100 \qquad (1)$$

3.2 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นตามวิธีการของ Iqbal et al. (2015) โดยใช้สารสกัดปริมาณ 0.02 กรัม เพื่อทดสอบสารในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ไกลโคไซด์ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล ลิกนิน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอย คูมารินส์ และแอนทราวิโนนด้วยการหยดรีเอเจนต์หรือสารละลาย จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและการตกตะกอน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมดัดแปลงจาก Baba & Malik (2015) เตรียมตัวอย่างสารมาตรฐานเคอร์ซิทินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร $AlCl_3$ เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร $NaNO_2$ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 40 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกค่าและสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน สำหรับการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากใบกระโดนดำเนินการเช่นเดียวกับการเตรียมสาร ละลายมาตรฐานด้วยการละลายสารสกัดใบกระโดนปริมาณ 4 มิลลิกรัม ในตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดที่เตรียมดังกล่าว สำหรับการเตรียมสารละลายแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนการใช้ $AlCl_3$ เข้มข้น 10% ในปริมาตรที่เท่ากัน คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากสมการ regression โดยแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมสมมูลของเคอร์ซิทิน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4 การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี FolinCiocalteu method ดัดแปลงจากการศึกษาของ Baba & Malik (2015) ดังนี้ ละลายสารสกัดใบกระโดนปริมาณ 4 มิลลิกรัม ในตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดที่เตรียมดังกล่าว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 15% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มนาน 2 นาทีจากนั้นปิเปต Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันนำบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เทียบกับสารละลายแบลงค์สำหรับกราฟมาตรฐานเตรียมจากกรดแกลลิก (0 ถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดำเนินการเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสารสกัด จากนั้นคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดจากสมการ regression โดยแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5 การวัดปริมาณแทนนิน

ปิเปตสารสกัดพืชเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร Folin reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สารละลาย Na_2CO_3 ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันบ่มสารละลายใน

ที่มืดเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก (0 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ตามวิธีการของ Makkar (2003)

3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

งานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนของหมู (**α**-Amylase from porcine pancreas) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืชเข้มข้น 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มสารละลายที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันต้มหลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเจือจางสารละลายด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ในการทดสอบครั้งนี้ใช้อะคาร์โบสเป็นสารควบคุมเชิงบวก สำหรับสารละลายควบคุมเตรียมจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารสกัดจากพืชปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้คำนวณร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสดังสมการที่ 2 และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) (Kwon et al., 2008)

$$\% \, Inhibition = \frac{(A540control - A540treatment)}{A540control} \times 100 \quad (2)$$

โดย $_{A540control}$ คือ ค่า absorbance ที่วัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารสกัด

A540treatment คือ ค่า absorbance ที่วัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในหลอดทดลองที่มีสารสกัด

3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืชเข้มข้น 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารลาย p-nitrophenyl-a-d-glucopyranoside เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันบ่มนาน 60 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ในทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสครั้งนี้ใช้อะคาร์โบสเป็นสารควบคุมเชิงบวก สำหรับสารละลายควบคุมเตรียมจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารสกัดจากพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้คำนวณร้อยละการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสดังสมการที่ 3 และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) (Kwon et al., 2008)

$$\% \, Inhibition = \frac{(A405control - A405treatment)}{A405control} \times 100 \quad (3)$$

โดย $_{A405control}$ คือ ค่า absorbance ที่วัดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารสกัด

A405treatment คือ ค่า absorbance ที่วัดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ในหลอดทดลองที่มีสารสกัด

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้นำเสนอผลการศึกษาในรูปค่าเฉลี่ย ± ความ คลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error of Mean : SEM) ในแต่ละการทดลองทำจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ทั้งนี้ หากค่า $P<0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัย

4.1 ร้อยละของสารสกัด

ทำการสกัดผงแห้งของใบกระโดนปริมาณ 0.45 กรัมด้วยตัวทำละลายเมทานอลปริมาตร 4.50 มิลลิลิตรได้สารสกัดหยาบน้ำหนัก 0.109 ± 0.002 กรัมซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) เท่ากับ 24.22 ± 0.03

4.2 ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนจำนวน 11 กลุ่มสารประกอบด้วยไกลโคไซด์ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล ลิกนิน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอย คูมารินส์ และแอนทราวิโนน ผลการศึกษาพบสารในกลุ่มไกลโคไซด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ และคูมารินส์ ในขณะที่สเตอรอยด์และแอนทราควิโนนส์ไม่ตรวจพบในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน

กลุ่มสารที่ตรวจสอบ	ผลการทดสอบ
Glycosides	+
Steroids	-
Alkaloids	+
Flavonoids	+
Phenolics	+
Saponins	+
Tannins	+
Terpenes	+
Coumarins	+
Anthraquinones	-

หมายเหตุ: + = พบสารพฤกษเคมี, - = ไม่พบสารพฤกษเคมี, n = 3.

4.3 ผลการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนมีค่าเท่ากับ 2.88 ± 0.59 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ดังตารางที่ 2

4.4 ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนมีค่าเท่ากับ 10.02 ± 0.58 มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิทินต่อกรัมของสารสกัด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมสมมูลเคอร์ซิทินต่อกรัมของสารสกัด)
กระโดน	2.88 ± 0.59	10.02 ± 0.58

หมายเหตุ : ค่าที่เสนอคือ Mean ± SEM, n=3.

4.5 ผลการวัดปริมาณแทนนิน

การวัดปริมาณแทนนินในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนจากการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 1.29 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของพืช ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณแทนนินในสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ปริมาณแทนนิน (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง)
กระโดน	1.29 ± 0.14

หมายเหตุ : ค่าที่เสนอคือ Mean ± SEM, n=3.

4.6 ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้กิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าลดลง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.42 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอะคาร์โบสซึ่งเป็นสารควบคุมเชิงบวกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.39 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (%)	IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน	0	0.00 ± 0.00^{d}	0.42 ± 0.01^{b}
	1	90.95 ± 3.81^{a}	
	2	82.77 ± 2.59^{b}	
	3	77.98 ± 1.49^{c}	
	4	76.98 ± 0.78^{C}	
	5	75.78 ± 1.42^{c}	
อะคาร์โบส			0.39 ± 0.02^{a}

หมายเหตุ : ค่าที่นำเสนอ คือ Mean ± SEM, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), n=3

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้กิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาแอลฟากลูโคซิเดสมีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.97 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อะคาร์โบสมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (%)	IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดน	0	0.00 ± 0.00^{e}	2.97 ± 0.09^{b}
	1	30.97 ± 5.05^{c}	
	2	22.25 ± 5.98^{d}	
	3	68.08 ± 4.84^{b}	
	4	99.40 ± 1.02^{a}	
	5	100.00 ± 0.00^{a}	
อะคาร์โบส			0.48 ± 0.03^{a}

หมายเหตุ : ค่าที่นำเสนอ คือ Mean ± SEM, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), n=3

5. อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนพบสาร สำคัญ ได้แก่ ไกลโคไซด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ และคูมารินส์ แต่ไม่พบสเตอรอยด์และแอนทราควิโนนส์ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kamble et al. (2022) ที่พบว่าสารสกัดจากคลอโรฟอร์มของใบกระโดนพบฟลาโวนอยด์ ฟีนอล เทอร์พีน และไกลโคไซด์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Gupta et al. (2019) ที่รายงานว่าส่วนของใบกระโดนพบอนุพันธ์ของแอนทราซีน อนุพันธ์ของอาร์บูติน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ อนุพันธ์ของคูมารินส์ น้ำมันหอมระเหย ฟลาโวนอยด์ ลิกแนน ซาโปนิน ไตรเทอร์พีน และวาลอีโพไตรเอท แต่ไม่พบแอลคาลอยด์ ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีที่พบในพืชนั้นมักเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ปริมาณน้ำฝน แมลงศัตรูพืช และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น (Munglue et al., 2022) ในสารในกลุ่มไกลโคไซด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ คูมารินส์ และแทนนิน

สารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอล และแทนนินสามารถเข้าไปจับที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสหรือแอลฟากลูโคซิเดสด้วยการสร้างพันธะไฮโดรเจนและแรงวันเดอร์วาลส์ เนื่องจากสารสำคัญเหล่านี้สามารถสร้างแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลภายในโครงสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสหรือแอลฟากลูโคซิเดสด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือแรงวันเดอร์วาลส์กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งแตกต่างกัน เช่น 1) ในตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) 2) ตำแหน่งที่ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรแบบอิเล็กโทรสตาติก (electrostatic stabilization) ซึ่งสำคัญต่อกลไกการเกิดปฏิกิริยาการย่อย (catalytic mechanism) และ 3) ตำแหน่งจดจำโครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลคู่จึงส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง กลไกดังกล่าวข้างต้นเป็นรูปแบบหนึ่งของการออกฤทธิ์ของอะคาร์โบสซึ่งเป็นลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการสร้างพันธะไฮโดรเจนยึดติดกับกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของเอนไซม์จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง Tyr59 Arg195 His201 Glu233 และ Asp300 ตามลำดับ และสร้างแรงยึดเหนี่ยวกับกรดอะมิโนด้วยแรงวันเดอร์วาลส์ได้ถึง 9 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง Trp58 Tyr62 Tyr151 Asp197 Lys200 Ile235 Gly306 His305 และ Ala307 ตามลำดับ (Kamble et al., 2022) ซึ่งฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลเป็นกลุ่มพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือด

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนทำหน้าที่ย่อยสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ซึ่งโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นประกอบด้วยมอลโทส มอลโทไตรโอส รวมทั้ง α (1-6) และ α (1-4) โอลิโกกลูแคนส์ (Gulcin et al., 2018) ที่จะเคลื่อนที่ผ่านตำแหน่ง brush border membrane ของลำไส้เล็ก จากนั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสให้กลายเป็นกลูโคสเพื่อดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดด้วยการขนส่งสารแบบจำเพาะต่อไป (Tundis et al., 2010) เมื่อระดับกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งอินซูลินเพื่อส่งเสริมให้โปรตีนขนส่งกลูโคส (glucose transporter proteins) ทำการขนส่งกลูโคสเข้า

สู่เซลล์ ดังนั้น การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสจึงเป็นการลดการย่อยโมเลกุลของแป้งและลดระดับกลูโคสในเลือดหลังจากรับประทานอาหารลง

ปัจจุบันมีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคเบาหวาน (Grover et al., 2002) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันของสารพฤกษเคมีที่ช่วยลดกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ยังคงมีน้อยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้เริ่มต้นศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากใบกระโดน ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 0.42 ± 0.06 ซึ่งใกล้เคียงกับสารควบคุมเชิงบวก คือ อะคาร์โบส ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.39 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเท่ากับ 2.97 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าอะคาร์โบสที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบกระโดนมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาลดระดับน้ำตาลในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ (Grover et al., 2002) ดังนั้น สารสกัดจากเมทานอลของใบกระโดนจึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งต่อไปควรมีการแยกสารออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญเพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนายาลดระดับน้ำตาลในเลือด

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษาและสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานีที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

Ahmad, L.A., & Crandall, J.P. (2010). Type 2 diabetes prevention: a review. *Clinical diabetes*, *28*(2), 53–59. https://doi.org/10.2337/diaclin.28.2.53

Alberti, K.G.M.M., & Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, *15*(7), 539–553. https://apps.who.int/iris/handle/10665/66040

Ambardar, N., & Aeri, V. (2013). A better understanding of traditional uses of *Careya arborea* Roxb. phytochemical and pharmacological review. *Tang (humanitas medicine)*, *3*(4), 1-7.

Baba, S.A., & Malik, S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah university medical sciences*, *9(*4), 449-454. https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001

Björntorp, P., Holm, G., & Rosmond, R. (1999). Hypothalamic arousal, insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a Journal of the British diabetic association*, *16*(5), 373-383. https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.1999.00067.x

Cheng, A.Y., & Fantus, I.G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian medical association journal*, *172*(2), 213-226. https://doi.org/10.1503/cmaj.1031414

Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., & STOP-NIDDM Trail Research Group. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet (London, England)*, *359*(9323), 2072-2077. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08905-5

Grover, J.K., Yadav, S., & Vats, V. (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of ethnopharmacology*, *81*(1), 81-100. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00059-4

Gülçin, İ., Topal, F., Sarikaya, S.B.Ö., Bursal, E., Bilsel, G., & Gören, A.C. (2011). Polyphenol contents and antioxidant properties of Medlar (*Mespilus germanica* L). *Records of natural products*, *5*(3), 158. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053.

Gupta, P., Patil, D., & Patil, A. (2019). Qualitative HPTLC phytochemical profiling of *Careya arborea* Roxb. bark, leaves and seeds. *3 Biotech*, *9*(8), 311. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1846-x

Iqbal, E., Salim, K.A., & Lim, L.B.L. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of king saud university - Science*, *27*(3), 224-232. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2015.02.003

Kamble, R.P., Ghosh, P., & Kulkarni, A.A. (2022). Identification of **α**-amylase inhibitory compounds from leaves of *Careya arborea* Roxb. and in silico docking studies. *South african journal of botany*, *151*, 493-503. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.018.

Khaliq, H.A. (2016). Pharmacognostic, physiochemical, phytochemical and pharmacological studies on *Careya arborea* Roxb: a review. *The journal of phytopharmacology*, *5*(1), 27–34. https://doi.org/10.31254/phyto.2016.5106

Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sundaram, R.S., Sivakumar, P., Nethaji R., & Gupta, M. (2006). Antimicrobial and antioxidant activities of *Careya arborea* Roxb. stem bark. *Iranian journal of pharmacology & therapeutics*, *5*(1), 35-41.

Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). Inhibitory potential of wine and tea against **α**-amylase and **α**-glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of food biochemistry*, *32*(1), 15–31. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00165.x

Makkar, H.P.S. (2003). *Measurement of total phenolics and tannins using Folin-Ciocalteu method*. In: Quantification of tannins in tree and shrub foliage. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_3

Mandal, D., Panda, N., Kumar, S., Banerjee, S., Mandal, N.B., & Sahu, N.P. (2006). Atriterpenoid saponin possessing antileishmanial activity from the leaves of *Careya arborea*. *Phytochemistry*, *67*(2), 183-190.

Munglue, P., Rattana, K., Sangchanjiradet, S., Yaraksa, N., & Aoki, S. (2022). Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of *Dioscorea alata* L. *Advanced science journal*, *22*(2): R83 - R100. Retrieved from https://li02.tci-thaijo.org/index.php/adscij/article/view/400

Satish, K.B.N., Swamy, B.M.V, Kumar, G.K., & Behera, G.M. (2010). Review on *Careya arborea* Roxb. *International journal of research in ayurveda and pharmacy*, *1*(2), 306–315. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113195399

Shawky, E., Sobhy, A.A., Gharee, D.A., Eldin, S.M.S., & Selim, D.A. (2022). Comparative metabolomics analysis of bioactive constituents of the leaves of different *Trigonella* species: Correlation study to **α**-amylase and **α**-glycosidase inhibitory effects. *Industrial crops and products*, *182*, 114947. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114947

Talimi, P., & Gulcin, I. (2017). Antidiabetic potential: *in vitro* inhibition effects of some natural phenolic compounds on a-glycosidase and a-amylase enzymes. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *31*(10), e21956. https://doi.org/10.1002/jbt.21956.

Tundis, R., Loizzo, M.R., & Menichini, F. (2010). Natural products as a-amylase and a-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-reviews in medicinal chemistry*, *10*(4), 315–331. https://doi.org/10.2174/138955710791331007.

World Health Organization. (2022). Report of the first meeting of the WHO Global Diabetes Compact Forum: virtual meeting, 10-11 November 2021. *WHO Global Diabetes*, Geneva, Switzerland.