



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของส่วนสกัดขนุนอ่อน

Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Young Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Extract

ธนากรณ์ ดำสุด^{1*} จูติกร จันทร์วุ่น² นมล ศรีเมฆ³ และสุธรรม ส่งแสง³

¹สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช)

ตำบลฉ่ำใหญ่ อำเภอกงหรา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

²สาขาวิชาเทคโนโลยีน้ำมันปาล์มและโอเลโอเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

(วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) ตำบลฉ่ำใหญ่ อำเภอกงหรา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

³สาขาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช)

ตำบลฉ่ำใหญ่ อำเภอกงหรา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

*Corresponding Author, Email: thanakorndamsud@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส จากส่วนสกัดเสกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลของขนุนอ่อน ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระศึกษาโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Contents) โดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.60 ± 0.18 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 144.76 ± 2.30 มิลลิกรัมแกลลิก/กรัมของสารสกัดหยาบ นอกจากนี้พบว่าส่วนสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูชนิดซูเครสตีที่สูงสุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.32 ± 8.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.44 ± 10.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นศักยภาพของขนุนอ่อนที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน

ABSTRACT

In this research, hexane, dichloromethane and methanol crude extracts of young jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) were first evaluated for antioxidant activities, total phenolic contents and α -glucosidase inhibitory activity. Investigation of antioxidant activities included 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability, total phenolic contents using the Folin-Ciocalteu method. The methanol extract showed the highest DPPH radical scavenging (IC_{50} 0.60 ± 0.18 mg/mL) and total phenolic contents (144.76 ± 2.30 mg gallic acid equivalent/g extract). In addition, the methanol extract revealed highest α -glucosidase inhibitory activity against rat intestinal sucrase with an IC_{50} value of 25.32 ± 8.36 mg/mL while the dichloromethane extract demonstrated inhibitory effect against yeast α -glucosidase with an IC_{50} value of 57.44 ± 10.36 mg/mL. These results suggest that the young jackfruit has a potential to be used for diabetes therapy.

คำสำคัญ: ขนุน การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*, Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activity

บทนำ

เบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin dependent diabetes) โดยที่ร่างกายนั้นสามารถหลั่งและสร้างอินซูลินได้ แต่อินซูลินที่หลั่งมานั้นไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ (Murai et al., 2002) การเป็นโรคเบาหวานในระยะยาวส่งผลต่อการสะสมของอนุมูลอิสระในร่างกาย หรืออาจทำให้ระบบการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นลดลง โดยทั้งสองปัจจัยนี้นำไปสู่การเพิ่มของอนุมูลอิสระในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อนุมูลอิสระที่สร้างนั้นมาจากหลายๆ ปฏิกิริยาในร่างกายได้แก่ กระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส (glucose oxidation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนที่เกาะกับน้ำตาล (oxidative degradation of glycated protein) และการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน (non-enzymatic glycation of protein)

ในร่างกายนั้นจะมีอนุมูลอิสระ 2 กลุ่ม คือ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) เมื่อร่างกายมีการสะสมอนุมูลอิสระดังกล่าว จะส่งผลกระทบต่อการทำลายออร์แกนเซลล์และเอนไซม์ภายในเซลล์ และมีการเพิ่มขึ้นของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของอินซูลิน และการพัฒนาของโรคแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาอีกมากมาย เช่น โรคแทรกเกี่ยวกับระบบประสาท โรคแทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบไต โรคความดันโลหิตสูง ไขมันในเส้นเลือด และ โรคตา (Maritim et al., 2003) การรักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสนับเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังรับประทานอาหาร (postprandial glucose) โดยตัวยาที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ acarbose, voglibose และ miglitol แต่เมื่อรับประทานยาดังกล่าวจะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย

เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และ ปวดท้อง (Borges de Melo et al., 2006) จึงนำไปสู่การศึกษาพืชผัก สมุนไพร ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดส ที่มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งอาหารและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดไปพร้อมๆ กัน

ขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดใหญ่ พบมากในเขตร้อนทางด้านเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขนุนเป็นแหล่งของสารแคโรทีนอยด์ กรดมาลิก และมีปริมาณเส้นใยที่สูงโดยเฉพาะในผลอ่อน ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีการนำส่วนต่างๆมาใช้รักษาโรคต่างๆ ตามตำราแพทย์แผนโบราณเช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านมาลาเรีย ต้านไวรัส ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ รวมถึงลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Jagtap et al., 2010) ได้มีการวิจัยศึกษาการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดโดยให้หนูรับประทานสารสกัดจากรากและใบขนุน พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานได้ รวมทั้งมีการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน (Fernando et al., 1991) และมีการศึกษาการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ (Baker's yeast) (Hossain et al., 2008) โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบ แต่ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสในลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) ซึ่งมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ ดังนั้นจึงทำให้คณะผู้วิจัยนำขนุนอ่อน ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาประกอบอาหารนำมาสกัดและทดสอบการออกฤทธิ์คู่ (dual function) ที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดผ่านการยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ และลำไส้เล็กของหนู ซึ่งการลดระดับน้ำตาล และการกำจัดอนุมูลอิสระเป็นการป้องกันไม่ให้อวัยวะนั้นพัฒนาไปสู่การเกิดโรค

แทรกซ้อนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เพื่อนำไปสู่การพัฒนา และส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคพืชผักมากขึ้น เนื่องจากสามารถเป็นได้ทั้งอาหารและยา จนนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาคือไปในอนาคต

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมส่วนสกัดจากขนุนอ่อน

นำขนุนอ่อนที่ซื้อมาจากตลาดสด อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2558 มาล้างให้สะอาด แล้วนำมาหั่นเป็นแว่นบางๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง แล้วนำมาบดละเอียด นำขนุนอ่อนจำนวน 350 กรัม แช่สกัด (maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไตคลอโรมีเทน และเมทานอลตาม ทีละตัวทำละลายตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลาย อย่างละ 3 ลิตร แช่เป็นเวลา 3 วัน และสกัด 3 ครั้ง จะได้เป็นสารสกัดหยาบออกมา นำสารสกัดหยาบมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) และเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) ตามลำดับ นำส่วนสกัดจาก เฮกเซน ไตคลอโรมีเทน และเมทานอล ทำการชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ และลำไส้เล็กของหนู

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส

2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ (Baker's yeast)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ตามวิธีของ Damsud et al. (2014) ทำโดยเตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1 1 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน

DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 90 ไมโครลิตรตามด้วยสารละลายเอนไซม์ แอลฟาไกลูโคซิเดส จากยีสต์ ความเข้มข้น 0.1 ยูนิต หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosidase (PNP-G) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม Na₂CO₃ เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้อะคาโบส (Acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

เมื่อ A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A₁ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

คำนวณหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ร้อยละ 50) โดยคำนวณจากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูตามวิธีของ Damsud et al. (2014) โดยเตรียมจากเอนไซม์อย่างหยาบ (Rat intestinal acetone power Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, USA)) ซึ่งประกอบด้วย มอลทอส และ ซูโครส ที่มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 0.09 และ 0.45 ยูนิต/มิลลิกรัม

โปรตีน ตามลำดับ โดยชั่งเอนไซม์อย่างหยาบจำนวน 1 กรัม เติม 0.9% NaCl จำนวน 30 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนบนเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่านำมาวิเคราะห์ เตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (0.1 1 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติมซับสเตรต โดยใช้ มอลโตส ความเข้มข้น 0.58 มิลลิโมลาร์ และซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที วัดความเข้มข้นของกลูโคส โดยการทำให้ปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้ glu-kit (Sigma-Aldrich) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้อะคาโบส (Acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ โดยใช้สูตรดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 2.1 และค่า IC₅₀ ของการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

3. การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity)

การศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีของ Ramadhana and Phuwapraisiran (2015) โดยเตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (10 50 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

จำนวน 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 2.1 และค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

4. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu reagent

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีดัดแปลงของ Hossain et al. (2008) ใช้วิธี Folin Ciocalteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร กับส่วนสกัดแต่ละชั้นที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เติม Folin Ciocalteu reagent จำนวน 125 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติม 7% Na_2CO_3 จำนวน 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent: GAE) ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก/กรัมส่วนสกัด

5. การประเมินผลทางสถิติ

ค่าข้อมูลของค่า IC_{50} วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา) ของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเตสจากยีสต์และลำไส้เล็กของหนู แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทดลองจำนวน 3 ครั้ง

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ได้สกัดแยกส่วนของขนุนอ่อน ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ส่วนสกัดหยาบที่ได้ น้ำหนักออกมาสุงที่สุดคือ ส่วนสกัดเมทานอล เท่ากับร้อยละ 34.32 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือส่วนสกัดเฮกเซน และไดคลอโรมีเทน (ร้อยละ 3.89 และ 1.59) ตามลำดับ เมื่อนำส่วนสกัดมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่คงตัว ที่จะเปลี่ยนเป็น diphenylpicrylhydrazine เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ ให้อิเล็กตรอน พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH รองลงมาคือ ส่วนสกัดของ ไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดของเฮกเซน ตามลำดับ โดยการยับยั้งนั้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของส่วนสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.60 ± 0.18 ถึง 3.87 ± 0.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าค่า IC_{50} ของส่วนของสารสกัดขนุนอ่อนนั้นมีค่าต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงบวก คือ กรดแอสคอร์บิก โดยมีค่า 0.11 ± 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้นน่าจะมาจากฟลาโวนอยด์ ในกลุ่ม prenylfavonoids และ cycloheterophyllinartonins A และ B ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหยุดปฏิกิริยาถูกไข้การเกิดลิปิดออกซิเดชัน (lipid oxidation) (Ko et al., 1998)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ที่แสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนสกัดของขนุนอ่อน พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน ดังแสดงในตารางที่ 1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดรวมนั้นหาได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย

กรดแกลลิก สมการของกราฟคือ $y = 0.0034x$, $R^2 = 0.985$ โดยกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟีนอลิกได้แก่ การกำจัด reactive species การหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดลิพิดออกซิเดชันหรืออาจมีการเคลือบกับโลหะ ซึ่งเป็นตัวเร่งการสร้างอนุมูลอิสระตัวอื่นตามมา (Rice-Evans et al., 1995)

การยับยั้งการทำงานของแอลฟาโทโคฟีโนลิก คือ การยับยั้งการย่อยและการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตในระบบย่อยอาหารบริเวณลำไส้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังมื้ออาหารที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็น

การศึกษาการยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิกที่มาจากสองแหล่ง คือ ยีสต์ และลำไส้เล็กของหนู แอลฟาโทโคฟีโนลิกจากลำไส้เล็กของหนูนั้นเป็นเอนไซม์อย่างหยาบประกอบด้วย มอลเทสและซูเครส ซึ่งเอนไซม์สองแหล่งที่กล่าวมาจะมีความจำเพาะหมู่ที่เร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อซับสเตรตที่แตกต่างกัน (Borges de Melo et al., 2006) จากการศึกษาส่วนสกัดทั้งหมดจากขนุนอ่อนพบว่า ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากยีสต์โดยมีค่า

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิก และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากส่วนสกัดจากขนุนอ่อนและตัวควบคุม

สารทดสอบ	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมส่วนสกัด)	IC ₅₀ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH	ยีสต์ (Baker's yeast)	มอลเทส	ซูเครส
ส่วนสกัดเฮกเซน	1.83±1.40	3.87±0.20	230.43±11.36	NI	NI
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	13.79±1.12	1.20±0.05	57.44±10.36	NI	NI
ส่วนสกัดเมทานอล	144.76±2.30	0.60±0.18	85.21±4.76	76.43±5.62	25.32±8.36
Ascorbic acid	-	0.11±0.02	NI	NI	NI
Acarbose	-	NI	3.23±0.22	0.59±0.02	1.59±0.12

NI = No inhibition (ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร).

IC₅₀ เท่ากับ 57.44±10.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดเมทานอลยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากลำไส้เล็กของหนูชนิดซูเครสกับมอลเทสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 25.32±8.36 และ 76.43±5.62 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากยีสต์ จากการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่พบว่าสารที่มีสภาพขั้วต่ำจนถึงขั้วปานกลาง จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดี เช่นสารในกลุ่มของลิกแนนที่พบมากในเมล็ดงา (Wikul et al., 2012)

หรือ สารกลุ่มฟีนิลโพรพานอลเอไมด์ (phenylpropanoly amides) ในข้าพลุ (Damsud et al., 2013) สารขั้วสูงที่พบในส่วนสกัดเมทานอลพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากลำไส้เล็กของหนูชนิดซูเครส กับมอลเทสได้ดีกว่าแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากยีสต์ ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าสารขั้วสูงนั้นสามารถจับกับโครงสร้างแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากลำไส้เล็กของหนูได้ดีกว่าแอลฟาโทโคฟีโนลิกจากยีสต์ จึงทำให้ส่วนสกัดชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ทั้งแอลฟาโทโคฟี-

เตสจากลำไส้เล็กของหนู และยีสต์ สารชีวสูงนั้นอาจจับที่โครงสร้าง หรือตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งนั้นจะมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้ง (Borges de Melo et al., 2006) นอกจากนี้พบว่ามีสารชีวสูงส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ หรือฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มีน้ำตาลติดอยู่กับโครงสร้าง (Thanakosai et al., 2013) และยังพบอีกว่าหมู่ไฮดรอกซิล (OH) บนโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ส่งผลต่อการยับยั้งที่ดีขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนตำแหน่งของหมู่ดังกล่าวก็ส่งผลต่อการยับยั้งได้เช่นเดียวกัน อีกทั้งยังส่งผลทำให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Tadera et al., 2006)

แต่อย่างไรก็ตามผลจากการยับยั้งแอลฟา กลูโคซิเดสอาจเกิดจากตัวยับยั้งจากส่วนสกัดไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ โดยเกิดจากการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) หรืออาจจะเป็นสารองค์ประกอบหลัก (major compounds) ที่อยู่ในส่วนสกัด มีผลให้โครงสร้างของแอลฟา กลูโคซิเดสเปลี่ยนแปลง หรือไปแย่งจับบริเวณเร่งปฏิกิริยา จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับซัคเซสเตรตามธรรมชาติได้ จากการศึกษาดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นต่อการวิจัยต่อไป ซึ่งจะต้องมีการแยก และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งศึกษา กลไกการการยับยั้ง เพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาส่วนสกัดทั้งหมดของขนุนอ่อนพบว่า ส่วนสกัดส่วนไดคลอโรมีเทน ยับยั้งกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้สูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดส่วนเมทานอลพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ส่งผลให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ

แอลฟา กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู ชนิด มอลเทส และซูเครส ดังนั้นสารสกัดของขนุนอ่อนจึงมีการออกฤทธิ์คู่ ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดผ่านการยับยั้งการทำงานของแอลฟา กลูโคซิเดส ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุน เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการรักษา และใช้ป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์เครื่องมือจาก สาขาชีววิทยาประยุกต์ และสาขาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช)

เอกสารอ้างอิง

- Borges de Melo, E., Da Silveira Gomes, A. and Carvalho, I. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62(44): 10277-10302.
- Damsud, T., Adisakwattana, S. and Phuwapraisrisan, P. (2013). Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of *Piper sarmentosum* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters* 6(3): 350-354.
- Damsud, T., Grace, M. H., Adisakwattana, S. and Phuwapraisrisan, P. (2014). Orthosiphon A from the aerial parts of *Orthosiphon aristatus* is putatively responsible for hypoglycemic effect via alpha-glucosidase inhibition. *Natural Product Communications* 9(5): 639-641.
- Fernando, M. R., Wickramasinghe, S. M. D. N., Thabrew, M. I., Ariyananda, P. L. and Karunanayake, H. E. (1991). Effect of *Artocarpus heterophyllus*

- and *Asteracanthus longifolia* on glucose tolerance in normal human subjects and in maturity-onset diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology* 31(3): 277-282.
- Hossain, S. J., Tsujiyama, I., Takasugi, M., Islam, M. A., Biswas, R. S. and Aoshima, H. (2008). Total phenolic content, antioxidative, anti-amylase, anti-glucosidase, and antihistamine release activities of Bangladeshi fruits. *Food Science and Technology Research* 14(3): 261-268.
- Jagtap, U. B. and Bapat, V. A. (2010). *Artocarpus*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 129(2): 142-166.
- Ko, F. N., Cheng, Z. J., Lin, C. N. and Teng, C. M. (1998). Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology and Medicine* 25(2): 160-168.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. and Watkins, 3rd J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17(1): 24-38.
- Murai, A., Iwamura, K., Takada, M., Ogawa, K., Usui, T. and Okumura, J. (2002). Control of postprandial hyperglycaemia by galactosyl maltobionolacton and its novel anti-amylase effect in mice. *Life Sciences* 71(12): 1405-1415.
- Ramadhan, R. and Phuwapraisirisan, P. (2015). Arylalkanones from *Horsfieldia macrobotrys* are effective antidiabetic agents achieved by alpha-glucosidase inhibition and radical scavenging. *Natural product communications* 10(2): 325-328.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley P. M. and Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 22(4): 375-383.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. and Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52(2): 149-153.
- Thanakosai, W. and Phuwapraisirisan, P. (2013). First identification of alpha-glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Natural product communications* 8(8): 1085-1088.
- Wikul, A., Damsud, T., Kataoka, K., and Phuwapraisirisan, P. (2012). (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (*Sesamum indicum*) seeds though inhibiting alpha-glucosidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22(16): 5215-5217.

