รายงานการวิจัย

สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากใบมะม่วงหิมพานต์ *Anacardium occidentale* (Linn.)

α-Glucosidase inhibitor from the leaves of cashew tree (*Anacardium occidentale* (Linn.))

ธนากรณ์ ดำสุด

ฐิติกร จันทร์วุ่น

ชุติมา แก้วพิบูลย์

Thanakorn Damsud

Thitikorn Chanwun

Chutima Kaewpiboon

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากใบมะม่วงหิมพานต์ *Anacardium occidentale* (Linn.)

ธนากรณ์ ดำสุด

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านไกลเคชั่น และฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส จากส่วนสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และ เฮกเซนของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ ฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นโดยใช้อัลบูมินจากวัวและน้ำตาลฟรุกโตส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ นอกจากนี้พบว่าส่วนสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดซูเครส และชนิดมอลเทส ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 90 ± 0.025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า IC_{50} เท่ากับ 91 ± 0.047 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ การแยกส่วนสกัดเมทานอล สามารถแยกสารได้ 4 ชนิด คือ kaempferol (1), isoquercetin (2), myricetin (3) และ gallic acid (4) ซึ่ง isoquercetin สามารถยับยั้งมอลเทส และซูเครสสูงสุดที่ IC_{50} 62.80±0.45 และ 12.32±0.25 ไมโครโมล ตามลำดับ การศึกษาการยับยั้งทางไคเนติกส์ของ isoquercetin พบว่าเป็นแบบ mixed type inhibition ในมอลเทส จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน และโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ

คำสำคัญ: การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส มะม่วงหิมพานต์

α-Glucosidase inhibitor from the leaves of cashew tree (*Anacardium occidentale* (Linn.))

Thanakorn Damsud

Abstract

The objective of this study, methanol, dichloromethane and hexane crude extracts shoots of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) were evaluated for anti-glycation and α-glucosidase inhibitory activity. Investigation of protein glycation inhibitory activity of crude extracts in abovin serum albumin (BSA)/fructose system. The methanol extract showed the highest anti-advanced glycation end-product (AGEs) In addition, the methanol extract revealed highest α-glucosidase inhibitory activity against rat intestinal sucrose and maltase with an IC_{50} value of 0.90 ± 0.02 and IC_{50} value of 0.91 ± 0.04 mg/mL, respectively. The methanol crude extracts afford 4 named kaempferol (1), isoquercetin (2), myricetin (3) and gallic acid (4). Isoquercetin revealed highest inhibition against maltase and sucrose with IC_{50} values of 62.80±0.45 and 12.32±0.25 mM, respectively. The kinetic analysis of isoquercetin showed mixed type inhibition against maltase and sucrase. These results suggest that the shoots of cashew nut have a potential to be used for diabetes therapy and its complications.

Keyword: Anti-advanced glycation end-product, α-glucosidase inhibitory activity,

Anacardium occidentale L.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ และขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการชีววิทยา ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และขอบคุณ รศ.ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษามาโดยตลอด

ธนากรณ์ ดำสุด

กันยายน 2561

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก
Abstract .....ข
กิตติกรรมประกาศ .....ก
สารบัญตาราง .....ค
สารบัญภาพ .....ง
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 14
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย 19
เอกสารอ้างอิง 22
ภาคผนวก ..... **ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า**

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การยับยั้งไกลเคชั่น (AGEs) และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนสกัดจากยอดมะม่วงหิมพานต์และตัวควบคุม..... **ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า**

ตารางที่ 2 ฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ (*A. occidental*).. 16

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของต้นมะม่วงหิมพานต์ (ก) ยอด (ข) ผลและเมล็ด (ค) ดอก (ง) ต้น 3
รูปที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นมะม่วงหิมพานต์ (*A. occidentale*) 5
รูปที่ 3 การทำงานของแอลฟากลูโคสิเดส 8
รูปที่ 4 โครงสร้างสามมิติของแอลฟากลูโคซิเดส 9
รูปที่ 5 การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสของ acarbose บริเวณลำไส้ 10
รูปที่ 6 โครงสร้างของยารักษาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส 10
รูปที่ 7 การวัดปริมาณกลูโคสจากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) **ผิดพลาด! ไม่ได้กำหนดที่คั่นหน้า**
รูปที่ 8 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ (*A. occidental*) 12
รูปที่ 9 การยับยั้งกราฟ Lineweaver-Burk plot ทางไคเนติกส์ของ isoquercetin (2) ในแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูชนิดมอลเทส 12
รูปที่ 10 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of kaempferol 25
รูปที่ 11 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of isoquercetin 25
รูปที่ 12 The ^{13}C NMR ($CDCl_3$) spectrum of of isoquercetin 26
รูปที่ 13 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of of myricetin 26
รูปที่ 14 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of gallic acid 27
รูปที่ 15 The ^{13}C NMR ($CDCl_3$) spectrum of gallic acid 27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเบาหวานคือสภาวะที่ร่างกายนั้นมีความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมของ ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ลักษณะสำคัญของโรคก็คือร่างกายไม่สามารถรักษาน้ำตาลให้อยู่ในสภาวะปกติได้ ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ โดยเฉพาะ ตา ไต หัวใจและหลอดเลือด ปัจจุบันนี้พบว่าประชากรทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin dependent diabetes) กันมากขึ้น เกิดจากการกินอาหารและสภาวะการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป (King, Aubert, & Herman, 1998) การรักษาโรคเบาหวานคือการให้ร่างกายนั้นมีระดับน้ำตาลที่ลดลง ซึ่งปัจจุบันได้มีแนวทางในการรักษามากมาย แนวทางหนึ่งคือการยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสนับเป็นวิธีที่นิยม เพราะสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังรับประทานอาหาร (postprandial glucose) โดยมีกลไกไปลดการดูดซึมของกลูโคสบริเวณลำไส้ โดยตัวยาที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ acarbose, voglibose และ miglitol แต่เมื่อรับประทานยาดังกล่าวจะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง (Borges de Melo, da Silveira Gomes, & Carvalho, 2006) มีการศึกษาพบอีกว่าหลังจากรับประทานยา กลุ่มยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส อาจมีน้ำตาลที่หลงเหลือและสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ถ้าร่างกายมีการสะสมน้ำตาลเป็นระยะเวลานานอาจนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ผลกระทบดังกล่าวนับว่าเป็นผลเสียต่อสุขภาพ โดยก่อให้เกิดการรวมตัวของน้ำตาลในเลือดกับโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า advanced glycation end-product (AGEs) ซึ่งสารชนิดนี้มีอัตราการเกิดที่ช้าในร่างกาย แต่ถ้าเกิดขึ้นแล้วจะมีความเสถียรและมีการกำจัดออกจากร่างกายได้ยาก และจะมีการสะสมตามบริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ และยังพบอีกว่าปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน การป้องกันการเกิดไกลเคชั่นในร่างกายปัจจุบันได้มีการใช้ตัวยา aminoguanidine แต่ก็มีรายงานว่ายาดังกล่าว มีความเป็นพิษต่อผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการแทรกซ้อนทางไต (Charernboon & Phanasathit, 2014) ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น และแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่รับประทานได้นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา เพื่อเป็นการส่งเสริมและลดการใช้ยาในผู้ป่วย และเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาและป้องกันโรคเบาหวาน รวมถึงโรคแทรกซ้อนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

สกัด แยก พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น และการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) พร้อมทั้งศึกษา จลนพลศาสตร์ รูปแบบการยับยั้งจากยอดมะม่วงหิมพานต์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อ สกัด แยก พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น และการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตผ่านการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) พร้อมทั้งศึกษา จลนพลศาสตร์ รูปแบบการยับยั้งจากยอดมะม่วงหิมพานต์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ด้านวิชาการ ได้ทราบถึงสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจาก Baker's yeast และลำไส้เล็กของหนู รวมทั้งรูปแบบการยับยั้งของสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ และได้ผลงานทางวิชาการเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการภายในประเทศ หรือต่างประเทศ

2 ด้านสังคมและชุมชน นำผลงานวิจัยไปสู่การส่งเสริมการบริโภคผัก ที่มีคุณสมบัติเป็นอาหารและมีความสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดไปพร้อมๆกัน อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้ยาที่มีราคาแพง และผลข้างเคียง ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*)

2.1.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์

มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นพืชพื้นบ้านของตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ปัจจุบันได้แพร่กระจายในภูมิภาคเขตร้อน รวมทั้งมีการปลูกแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เป็นต้นไม้ที่ไม่ผลัดใบ สูงราว 6-12 เมตร แผ่กิ่งก้านสาขาเป็นพุ่มกว้างออกไปโดยรอบ 4-10 เมตร ใบหนาคล้ายรูปไข่ ปลายใบป้อม โคนใบแหลมยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5-7.5 เซนติเมตร ออกช่อดอกที่ปลายกิ่ง ช่อดอกยาว ประมาณ 15-25 เซนติเมตร บางดอกมีแต่เกสรตัวผู้ บางดอกมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย อยู่ในช่อดอกเดียวกัน ดังนั้น การผสมพันธุ์จึงทำการผสมในช่อเดียวกัน ลักษณะดอกเป็นช่อ ในหนึ่งดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ กลีบดอกสีขาวนวล 5 กลีบ เมื่อแรกบานกลีบดอกจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีชมพูอมเหลือง แต่ละดอกมีขนาด เล็กมาก เมื่อเวลาดอกบานกลีบดอกทั้ง 5 ม้วนเข้าหากลีบเลี้ยง คงโผล่ให้เห็นยอดเกสรตัวเมียชัดเจน เกสรตัวผู้ อยู่ภายในดอก 9 อัน และมีรังไข่อยู่ที่ก้านเกสร ตัวเมีย (de Brito, de Araújo, Lin, & Harnly, 2007) ดังในรูปที่ 1

(ก) **(ข)** **(ค)** **(ง)**

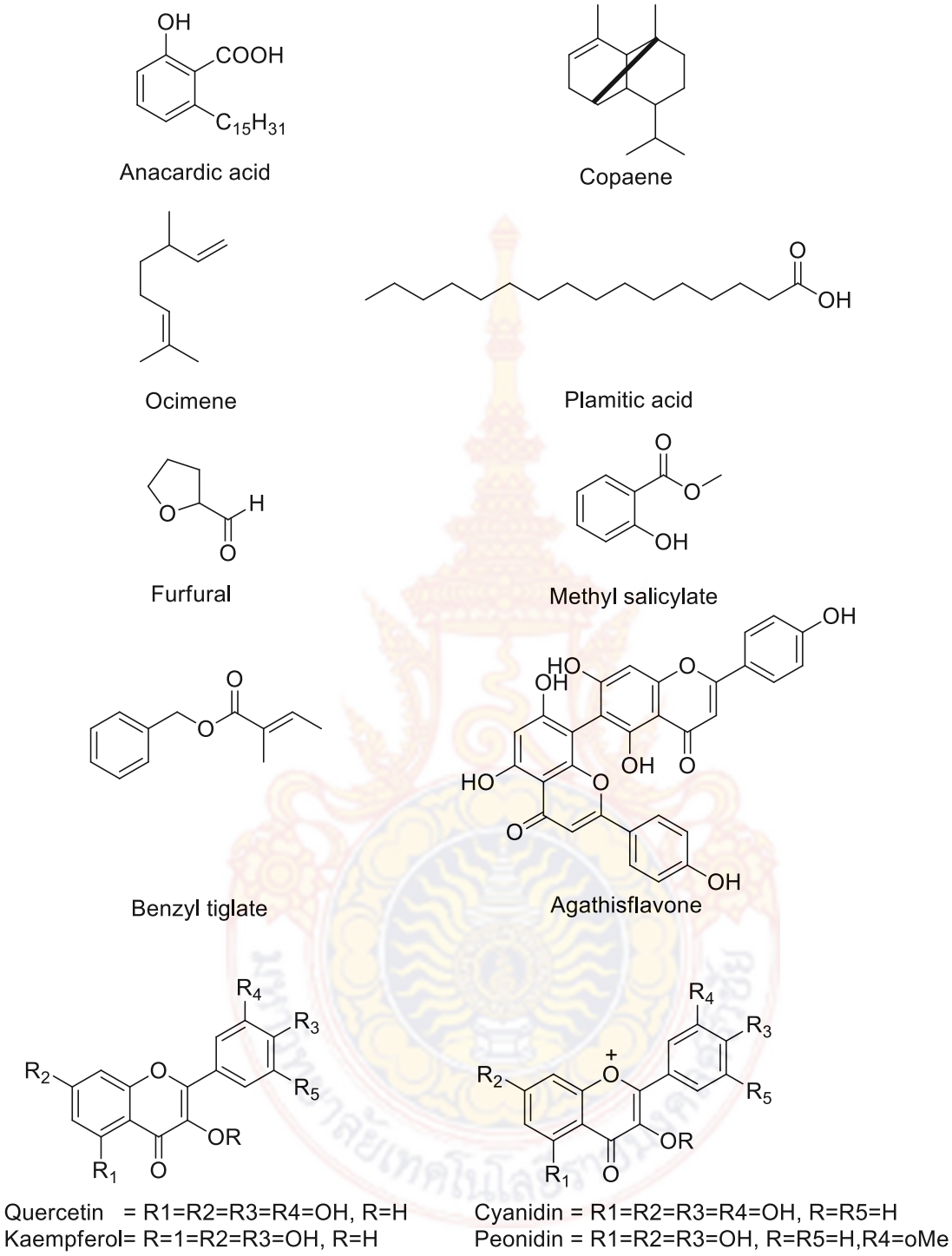
รูปที่ 1 ลักษณะของต้นมะม่วงหิมพานต์ (ก) ยอด (ข) ผลและเมล็ด (ค) ดอก (ง) ต้น

2.1.2 พฤษเคมีและเภสัชวิทยา

มะม่วงหิมพานต์มีคุณค่าทางโภชนาการมากมาย ในใบนั้นประกอบด้วย วิตามินเอ วิตามินซี โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส เหล็ก และน้ำ ส่วนในเมล็ดนั้นจะอุดมไปด้วย วิตามินอี เหล็ก และแมกนีเซียม มะม่วงหิมพานต์มีสาระสำคัญต่างๆ มากมายที่สามารถสกัดออกมาในแต่ละส่วนของต้น เช่น ผลของมะม่วงหิมพานต์ (cashew apple juice) ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย หลายชนิดซึ่งได้แก่ resorcinolic acid, anacardic acid, carotenoids, phenols (รูปที่ 2) และ tannin (de Brito, de Araújo, Lin, & Harnly, 2007) และมีงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหิมพานต์มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง, ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง เนื่องจากมีสารในกลุ่ม

ของสารประกอบ phenolic ในปริมาณสูง ,ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบโดยวิธี TRAP ส่วนสารประกอบ phenolic ที่แยกได้จะเป็น anacardic acid, cardols, cardanols ส่วนของใบนั้นจะเป็นสารชนิด agathisflavavone สารพวก ฟาโวนอยด์เช่น quercetin, kaempferol, และกลุ่มแอนโทรไซนินเช่น cyaniding, peonidin ซึ่งสารกลุ่มดังที่กล่าวมานั้นมีรายงานหลายชนิดพบว่าสามารถลดการเกิดโรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด (Rico, Bulló, & Salas-Salvadó, 2016)

การใช้ใบมะม่วงหิมพานต์ในการรักษาโรคเบาหวานมีรายงานระบุว่า ใบมะม่วงหิมพานต์สามารถยับยั้งภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง โดยมีรายงานการทดลองถึงสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกชักนำให้เกิดเบาหวานด้วยสาร streptozotocin โดยศึกษาสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล (300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ โดยกลไกการลดระดับน้ำตาลคือสารสกัดไปกระตุ้นการทำงานของเบต้าเซลล์ ซึ่งเบต้าเซลล์นั้นจะมีผลต่อการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนที่มากขึ้นส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมื่อให้สารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยน้ำ (300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) แก่กระต่ายที่เป็นเบาหวานหลังจากได้รับสารสกัดไปเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Ojewole, 2003) ส่วนในการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส พบว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจาก Baker's yeast (IC_{50} = 9.11 ppm) และพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่า acarbose (IC_{50} = 117.06 ppm) ซึ่ง acarbose เป็นยาที่ใช้ในการรักษาเบาหวานชนิดที่สองในปัจจุบัน (Mun'IM, A.,et al., 2013). แต่ยังไม่ทราบถึงสารที่ออกฤทธิ์ และกลไกการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้ของหนู



รูปที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นมะม่วงหิมพานต์ *(A. occidentale)*

2.2 โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus)

โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus) เป็นความผิดปกติของร่างกายที่มีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอ อันส่งผลทาให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงเกินปกติ โรคนี้มีความรุนแรงสืบเนื่องมาจากการที่ร่างกายไม่สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างเหมาะสม โดยปกตินำ้ตาลจะเข้าสู่เซลล์ร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลที่เกิดขึ้นทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในระยะยาวจะมีผลในการทำลายหลอดเลือด ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมอาจนำไปสู่สภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้

อินซูลิน (Insulin) เป็นฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้เป็นปกติ ผลิตโดยเบต้าเซลล์ (β-Cell) ของไอส์เล็ทออฟลังเกอร์ฮันส์ (Islets of Langerhans) ในตับอ่อน ตับ อ่อนเป็นอวัยวะที่อยู่ในช่องท้องด้านหลังของกระเพาะอาหาร อินซูลินสามารถควบคุมระดับ น้ำตาลในเลือดให้เป็นปกติ โดยเป็นตัวนำกลูโคส กรดอะมิโนและกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ ช่วยให้เซลล์ต่างๆ ใช้กลูโคสเป็นพลังงานได้ ช่วยให้มีการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเป็นไกลโคเจนเก็บสะสมไว้ในตับและกล้ามเนื้อ ช่วยให้มีการสังเคราะห์ไขมันจากกลูโคส เพื่อเก็บไว้เป็นพลังงานสำรองโดยสะสมไว้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย และช่วยให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายเมื่อร่างกายขาดอินซูลินหรืออินซูลินที่มีอยู่ออกฤทธิ์ไม่ได้จะมีผลให้การเผาผลาญโปรตีนคาร์โบไฮเดรต และไขมันในร่างกายผิดปกติ มีการสลายมากกว่าการสร้าง กล่าวคือ กลูโคสจะเข้าสู่เซลล์ไม่ได้ ทำให้ร่างกายไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นพลังงานหรือเปลี่ยนกลูโคสเป็นไกลโคเจนหรือไขมันสะสมเพื่อเก็บไว้เป็นพลังงานสำรองในร่างกาย ระดับ น้ำตาลในเลือดจึงสูง และถูกขับออกมาทางปัสสาวะมีการสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อมาใช้เป็นพลังงานเพื่อการดำรงชีวิต ทำให้กล้ามเนื้อเหี่ยวลีบน้ำหนักลด และเมื่อมีการสลายไขมันที่สะสมไว้ในร่างกายเป็นพลังงานเพิ่มขึ้นทำให้เกิดสารคีโตนเพิ่มมากขึ้นด้วย ในภาวะปกติ ผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเบาหวานร่างกายสามารถใช้กลูโคสเป็นพลังงานได้จึงมีสารคีโตนเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยและร่างกายสามารถใช้กลูโคสเป็นพลังงานได้หมด แต่สำหรับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน เมื่อมีการเผาผลาญไขมันเป็นพลังงานมากๆ จะเกิดสารคีโตนเพิ่มขึ้น จนเกินความสามารถของร่างกายที่จะใช้เป็นพลังงานได้ทันทำให้เกิดการคงที่ ของสารคีโตนในเลือดเรียกว่า คีโตซีส (Ketosis) ผู้ป่วยมีอาการอ่อนเพลีย กระหายน้ำ หากเป็นมากก็จะหอบและหมดสติถึงตายได้

องค์การอนามัยโลกได้แบ่งโรคเบาหวานตามสาเหตุเป็น 4 ชนิด แต่ที่เป็นปัญหามากและมีผู้สนใจศึกษามากมี 2 ชนิด คือ

โรคเบาหวานชนิดที่ 1 หรือ โรคเบาหวานพึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (Type 1 Diabetes Mellitus หรือ Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนไม่สามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินหรือผลิตได้ไม่เพียงพอ เนื่องจากเซลล์บีตาถูกทาลายจากระบบภูมิคุ้มกันที่ทางานผิดปกติ มักพบในเด็ก และพบประมาณร้อยละ 5-10 อาการของโรคที่มักพบ ได้แก่ ปัสสาวะบ่อย กระหายน้ำบ่อยน้ำหนักลด และอ่อนเพลีย

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือ โรคเบาหวานไม่พึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (Type 2 Diabetes Mellitus หรือ Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) เซลล์บีตาในตับอ่อนสามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้ แต่ฮอร์โมนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เซลล์ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนเกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin Resistance) เป็นโรคเบาหวานชนิดที่พบได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90 ของเบาหวานที่พบทั่วโลก อาการในระยะแรกๆ ไม่เด่นชัดผู้ป่วยทราบว่า ตนเป็นโรคก็ต่อเมื่อมีอาการของภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น

- โรคเบาหวานชนิดอื่นๆ ได้แก่

  - โรคเบาหวานที่เกิดจากเบต้าเซลล์ทำงานบกพร่องจากความผิดปกติทางพันธุกรรม
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากความบกพร่องในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอินซูลินจากความผิดปกติทางพันธุกรรม
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากโรคของตับอ่อน
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากโรคต่อมไร้ท่อต่างๆ
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากยาและสารเคมี
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากภาวะติดเชื้อ
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากกระบวนการออโตอิมมูนแบบอื่นๆ
  - โรคเบาหวานที่เกิดจากโรคพันธุกรรมอื่นๆ

- โรคเบาหวานที่เกิดขึ้นขณะตั้งครรภ์ (Gestational Diabetes Mellitus)

ยาที่ใช้ลดระดับกลูโคสในเลือด

ยาที่ใช้ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ใช้ระดับกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหาร ร่วมกับอาการ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ยากระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin Secretogogues) แบ่งเป็นกลุ่ม sulfonylurea เช่น glipizide, glibenclamide และ glicazide ออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับของยาที่เยื่อหุ้มเซลล์บีตาและทำให้เกิดการผ่านของแคลเซียมอิออนเข้าเซลล์เพิ่มขึ้น มีผลกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน และกลุ่ม non-sulfonylurea เช่น repaglinide และ nateglinide เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับกลุ่มแรกและออกฤทธิ์เร็ว ค่าครึ่งชีวิต 1 ชั่วโมง แต่มีราคาแพง เหมาะสำหรับผู้ป่วยเบาหวานที่แพ้ยาซัลฟา หรือผู้ป่วยสูงอายุที่เสี่ยงต่อภาวะระดับ กลูโคสในเลือดต่ำ
2. ยาเพิ่มความไวต่อฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin Sensitizer) แบ่งเป็น biguanideได้แก่ metformin ออกฤทธิ์ลดการสร้างกลูโคสจากตับ เพิ่มการสลายไกลโคเจนแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพิ่มการใช้กลูโคสของเซลล์กล้ามเนื้อ ลดการดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหาร และกลุ่ม thiazolidinedione ได้แก่ troglitazone, rosiglitazone และ pioglitazone ออกฤทธิ์โดยเพิ่มการใช้กลูโคสของเซลล์กล้ามเนื้อและลดการสร้างกลูโคสจากตับ ยาในกลุ่มนี้แนะนำให้ใช้สำหรับผู้ป่วยที่แพ้ metformin

3. ยาลดการดูดซึมกลูโคส (Glucose Inhibitor) ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิเดสที่ผนังลำไส้ทำให้ลดการดูดซึมกลูโคส ได้แก่ acarbose และ voglibose โดย voglibose มีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารน้อยกว่า

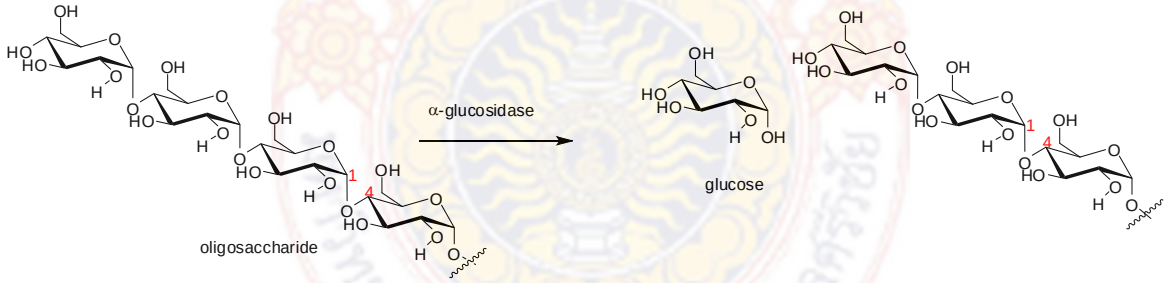
2.3 เอนไซม์เกี่ยวกับการย่อยอาหาร

2.3.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไขมันเพื่อให้ไขมันเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆภายในเซลล์ได้ เอนไซม์ไลเปสพบในทางเดินอาหาร การย่อยเริ่มต้นที่กระเพาะอาหารโดยมีเอนไซม์แก๊สติกไลเปส (Gastric Lipase) ย่อยไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันประมาณ 15 % หลังจากนั้นไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสที่หลังจาก pancreatic acinar cells อย่างสมบูรณ์ที่ลาไส้เล็กส่วนต้น ปัจจุบันมีการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้หลายวิธีเพื่อป้องก้นโรคอ้วน เช่น การใช้ยา orlistat เพื่อยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไลเปสและช่วยลดน้ำหนัก

2.3.2 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) และเอนไซม์กลูโคซิเดส (Glucosidase)

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยตำแหน่งพันธะ 4-glucan ของแป้ง การย่อยคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นที่ปาก โดยเอนไซม์ salivary amylase ย่อยแป้งให้เป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น ถัดจากนั้นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pancreatic ∝-amylase กลายเป็น maltose และ maltotriose จากนั้นเอนไซม์กลูโคซิเดส (Glucosidase) จะย่อย oligo-saccharides ให้กลายเป็น glucose การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสสามารถลดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากปฏิกิริยา (รูปที่ 3)



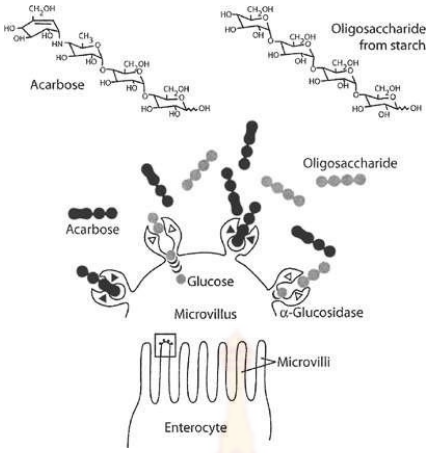
รูปที่ 2 การทำงานของแอลฟากลูโคสิเดส

แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase, α-D-glucoside glycohydrolase EC.3.2.1.20) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (รูปที่ 4) ซึ่งจะพบพี่บริเวณลำไส้เล็ก แอลฟากลูโคซิเดส สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ แอลฟากลูโคซิเดส I (α-glucosidase I) พบใน แบคทีเรีย ยีสต์ และ แมลง โดยมีหมู่เร่งปฏิกิริยาได้แก่หมู่ แอสพาราจีน (Asp) ฮีสทิดีน (His) และ ไทโรซีน (Tyr) จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิด heterogenous และอีกชนิดคือ แอลฟากลูโคซิเดส II (α-glucosidase II)พบใน เชื้อรา พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีหมู่เร่งปฏิกิริยาได้แก่

หมู่ ทริปโตเฟน (Trp) และ แอสพาราจีน (Asp) จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิด homogeneous (Zechel & Withers, 2000) ในส่วนแอลฟากลูโคซิเดสที่พบในมนุษย์นั้นจะเป็นแบบ maltase-glucoamylase (MGAM) โดยจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิด maltose, isomaltose, sucrose, และ oligosacharide สายสั้นๆ แอลฟากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตที่มากกว่า 10 โมเลกุลขึ้นไปที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส ที่เข้าสู่กระแสเลือด และนำไปเลี้ยงเซลล์ทั่วร่างกาย ซึ่งจะพบแอลฟากลูโคซิเดสในระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ เช่น น้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน ดังนั้นถ้ามีสารยับยั้งการทำงาน หรือลดประสิทธิภาพของแอลฟากลูโคซิเดสให้น้อยลง สารดังกล่าวก็จะช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Abesundara, Matsui, & Matsumoto, 2004)

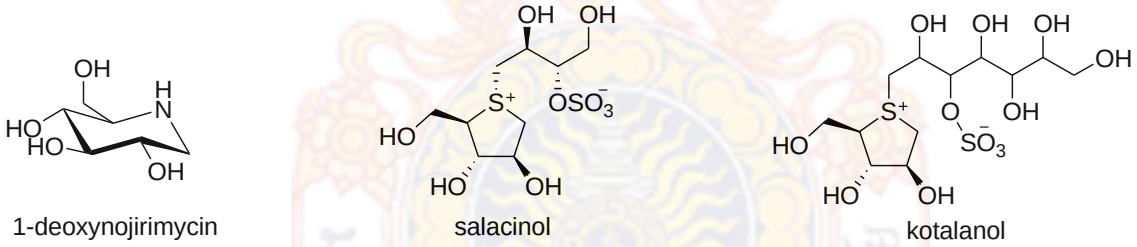
รูปที่ 3 โครงสร้างสามมิติของแอลฟากลูโคซิเดส

สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase inhibitors) บริเวณลำไส้เล็กจะทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์บริเวณปลายที่เป็นนอนรีดิวซิ่งชูก้า (non-reducing sugar terminal) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสได้ จะช่วยให้การย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เป็นกลูโคสได้ช้าลง และชะลอการเพิ่มของระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสยังช่วยเพิ่มระดับอินซูลิน ลดไตรกลีเซอไรด์ (Johnston et al., 1994) และสามารถต้านโรคมะเร็ง การติดเชื้อจากไวรัส HIV (Borges de Melo, da Silveira Gomes, & Carvalho, 2006) รวมถึงช่วยต้านโรคที่เกิดกับไลโซโซม (Gloster et al., 2007) จากรูปที่ 5 เป็นการทำงานของยาที่ชื่อว่า acarbose ซึ่งการทำงานของยาชนิดนี้จะเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ส่งผลให้โอลิโกแซคคาไรด์เป็นกลูโคสได้ช้าลง แต่ผลเสียหายาชนิดนี้มีมากมาย



รูปที่ 4 การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสของ acarbose บริเวณลำไส้

ปัจจุบันยารักษาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสเช่น acarbose, voglibose, metformin และ miglitol (รูปที่ 6) มีผลในการลดระดับน้ำตาลหลังอาหาร (postprandial glucose) เป็นส่วนใหญ่ในขณะที่ลดระดับน้ำตาลขณะอดอาหาร (fasting plasma glucose) ได้ไม่มากนักผลข้างเคียงที่พบบ่อยเมื่อรับประทานยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว ปวดท้อง โดยเฉพาะถ้าได้รับยาในปริมาณสูงจึงส่งผลให้มีการศึกษาสมุนไพรที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยาในกลุ่มยาที่ยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสในลำไส้ (α-glucosidase inhibitor) (Borges de Melo, da Silveira Gomes, & Carvalho, 2006)



รูปที่ 5 โครงสร้างของยารักษาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส

พืชสมุนไพรมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบันนี้ได้มีการค้นพบพืชมากกว่า 800 ชนิดที่สามารถรักษาโรคเบาหวานได้ ที่เทียบเท่าหรือดีกว่ายาแผนปัจจุบัน ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในพืช เช่น 1-deoxynojirimycin ซึ่งแยกได้จากพืชในวงศ์ Moraceae และสารกลุ่ม thiosugar ได้แก่ salacinol และ kotalanol ซึ่งแยกจากพืช *Salacia reticulate* Wight. ที่พบในประเทศศรีลังกา มีผลต่อการรักษาเบาหวานชนิดที่ 2 และได้มีการศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์การยับยั้งของเอนไซม์ พบว่า salacinol นั้น มีค่าการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสในลำไส้ของมนุษย์ได้ดีกว่า acarbose และ miglitol และไม่มีความเป็นพิษในระยะยาว จึงนำมาเป็นยารักษาโรคเบาหวานในปัจจุบัน (Morikawa et al., 2015)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการวิจัย

สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

ยอดมะม่วงหิมพานต์ เก็บจากอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 จากนั้นล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียดจำนวน 750 กรัม แช่มาเซอเรชัน (maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายอย่างละ 3 ลิตร แช่เป็นเวลา 3 วัน และสกัด 3 ครั้ง จะได้เป็นสารสกัดหยาบออกมา นำสารสกัดหยาบมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) และเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) ตามลำดับ นำส่วนสกัดจาก เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ทำการชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น และการทำงานแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

3.2.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกลูโคซิเดส มาแยกบริสุทธิ์เบื้องต้นโยใช้ VCC (Quick column chromatography) (MeOH-CH_2CL_2) ได้ทั้งสิ้น 3 fraction จากนั้นนำ fraction หมายเลข 3 แยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการใช้ Sehadex LH-20 (MeOH) และต่อด้วย Silica gel column chromatography (MeOH-CH_2Cl_2) ได้สาร kaempferol (1), isoquercetin (2), myricetin (3) และ gallic acid (4)

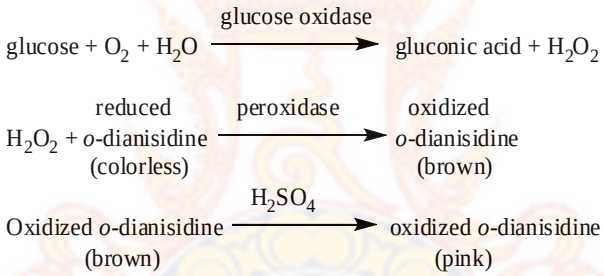
3.2.3 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี โดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) โดยการวิเคราะห์ ^{1}H, ^{13}C, 2D-NMR

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูดัดแปลงวิธีมาจาก Damsud และคณะ (Damsud, Adisakwattana, & Phuwapraisirisan, 2013) การเตรียมเอนไซม์มอลเทส ซูเครส นั้นเตรียมได้จากสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบจากลำไส้เล็กของหนู เตรียมโดยชั่งเอนไซม์หยาบมา 1 กรัม เติม 0.9%โซเดียมคลอไรด์

(0.9% NaCl) จำนวน 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปหาความจำเพาะ (specific activity) ต่อซับสเตรต (มอลโทส และซูโครส) ทุกครั้งก่อนการทดสอบ การวิเคราะห์เตรียมตัวอย่างของส่วนสกัดชั้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น (0.1 0.25 0.5 1 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายสารตัวอย่างใน DMSO จำนวน 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ (มอลเทส และ ซูเครส) จำนวน 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มปฏิกิริยาเบื้องต้นเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมซับสเตรต มอลโทส ที่ความเข้มข้น 0.58 มิลลิโมลาร์ และซูโครส ที่ความเข้มเข้ม 20 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โดยการ ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา โดยใช้ glu-kit (Sigma-Aldrich) (รูปที่ 7) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ยาโวลกลิโบส (voglibose)เป็นตัวควบคุมเชิงบวก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและค่า IC_{50} โดยใช้สูตร



รูปที่ 7 การวัดปริมาณกลูโคส จากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase)

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ยาโวลกลิโบส (voglibose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวกคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและค่า IC_{50} โดยใช้สูตร

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

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

3.2.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์การยับยั้งของแอลฟากลูโคซิเดส

ศึกษารูปแบบการยับยั้งของแอลฟากลูโคซิเดส โดยใช้เอนไซม์จาก Baker's yeast ซึ่งจะใช้ PNP-G เป็นสับสเทรต ส่วนเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู จะใช้น้ำตาลมอลโตสและซูโครส เป็นสับสเทรต

โดยการใช้สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้ง รวมทั้งหาอัตราเร็ว (V_{max}) ค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) รูปแบบการยับยั้ง จากกราฟ Lineweaver-burk plot

3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นโดยเตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (0.25 0.50 0.75 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ BSA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ น้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ sodium azide ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์โดยสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ความยาวคลื่น excitation wavelength เท่ากับ 355 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 460 นาโนเมตร โดยใช้อะมิโนกลัวนิดีน (Aminoguanidine) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น โดยใช้สูตรดังที่กล่าวดังสมการ และค่า IC_{50} ของการยับยั้งโดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

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

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

3.2.7 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin Cioculteu reagent

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีดัดแปลงของ Hossain et al. (2008) ใช้วิธี Folin Cioculteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร กับส่วนสกัดแต่ละชั้นที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เติม Folin Cioculteu 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

3.2.8 การคำนวณและการรายงานข้อมูล

ค่าข้อมูลของค่า IC_{50} วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา) ของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทดลองจำนวน 3 ครั้ง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

จากการศึกษาส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ ด้วยวิธีมาเซอเรชันโดยใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน โดยใช้ตัวทำละลายในปริมาตร 3 ลิตร ต่อน้ำหนักยอดมะม่วงหิมพานต์ 750 กรัม ซึ่งลักษณะของสารสกัดหยาบในส่วนสกัดเมทานอลจะมีลักษณะเหนียวข้นสีดำ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมีลักษณะหนืดสีเขียว และส่วนสกัดเฮกเซนมีลักษณะหนืดสีน้ำตาล ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละผลได้ของส่วนสกัด เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน เท่ากับ 14.8 1.48 และ0.88 ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น ที่เหนี่ยวนำโดยการใช้น้ำตาลฟรุกโตส โดยใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีตั้งแต่วันที่ 7 ภายหลังการเริ่มปฏิกิริยาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.65±0.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป พบว่าส่วนสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาในวันที่ 14 21 และ 28 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.87±0.62 1.10±0.66 และ 1.98±0.72 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งมีค่าใกล้เคียงกับยาอะมิโนกวานิดีน (aminoguanidin) ในขณะที่ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีในวันที่ 7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.96±0.42 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ภายหลังปฏิกิริยาในวันที่ 14 21 และ 28 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 2.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และส่วนสกัดเฮกเซนไม่พบประสิทธิภาพการยับยั้งไกลเคชั่น (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

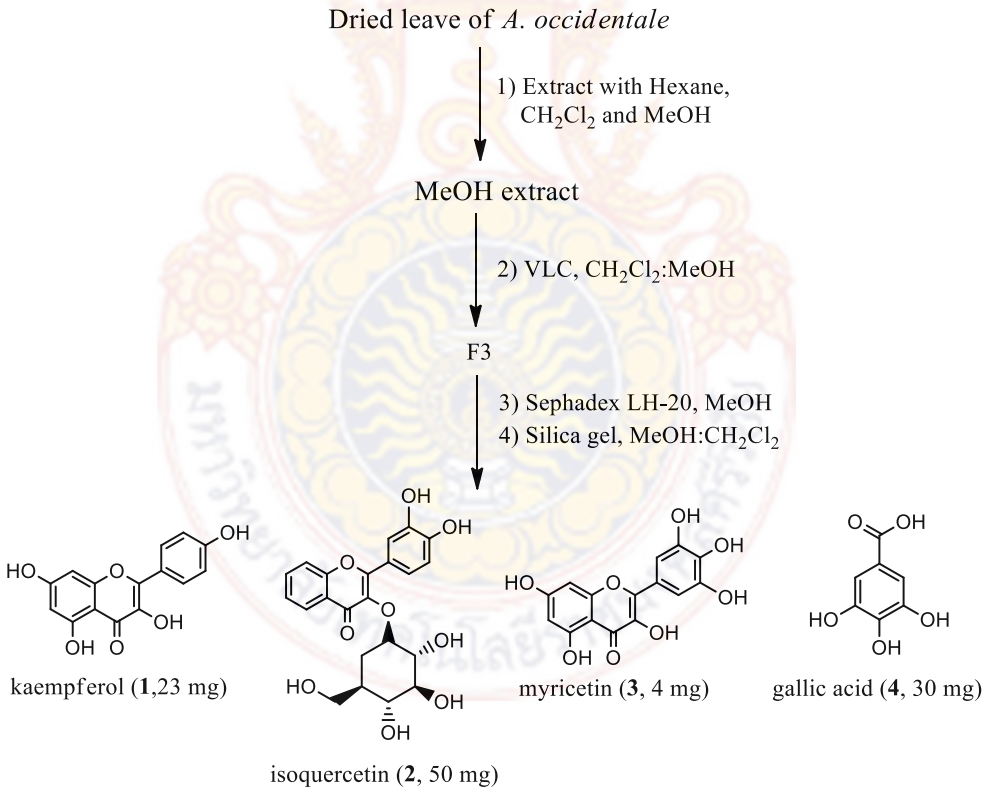
จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) โดยการใช้มอลโทส และซูโครสเป็นซับสเตรต พบว่าทุกส่วนสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยส่วนสกัดเมทานอลให้เปอร์เซ็นการยั้บยั้งได้ดีทั้งชนิดมอลเทส และชนิดซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.91±0.02 และ 0.90±0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน และพบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งเทียบเท่ายาอะคาโบส (acarbose) (ตารางที่ 1)

4. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดนั้นหาได้ด้วยวิธี Folin Cioculteu reagent จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก สมการของกราฟคือ y= 0.0034x, R^2 = 0.985 พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน โดยมีสารประกอบฟีนอลิก 274.81±1.47 140.25±2.56 และ 35.76±1.82 มิลลิกรัมกรดแกลิก/กรัมส่วนสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

5. สารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากยอดมะม่วงหิมพานต์

ยอดมะม่วงหิมพานต์ จัดเป็นพืชผัก ที่นิยมรับประทานในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย และมีรายงานว่าใบนั้นสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ในหนูทดลอง แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษา และพิสูจน์โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว การวิจัยในครั้งนี้ ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู พบว่าสามารถแยกส่วนสกัดเมทานอล สามารถแยกสารได้ 5 ชนิด คือ keampferol (1), isoquercetin (2), myricetin (3) และ gallic acid (4) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ (*A. occidental*)

Kaempforal (**1**): brown solid; ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ_H 7.74 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2′ and H-6′), 6.91(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3′ and H-5′), 6.42 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-6).

isoquercetin (**2**); yellow solid; 1H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ_H7.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-2′′), 7.59 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H-6′′), 6.87 (d, J = 8.4 Hz,1H, H-5′′), 6.40 (s, 1H, H-8), 6.20 (s, 1H, H-6), 5.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-1′′′), 3.72

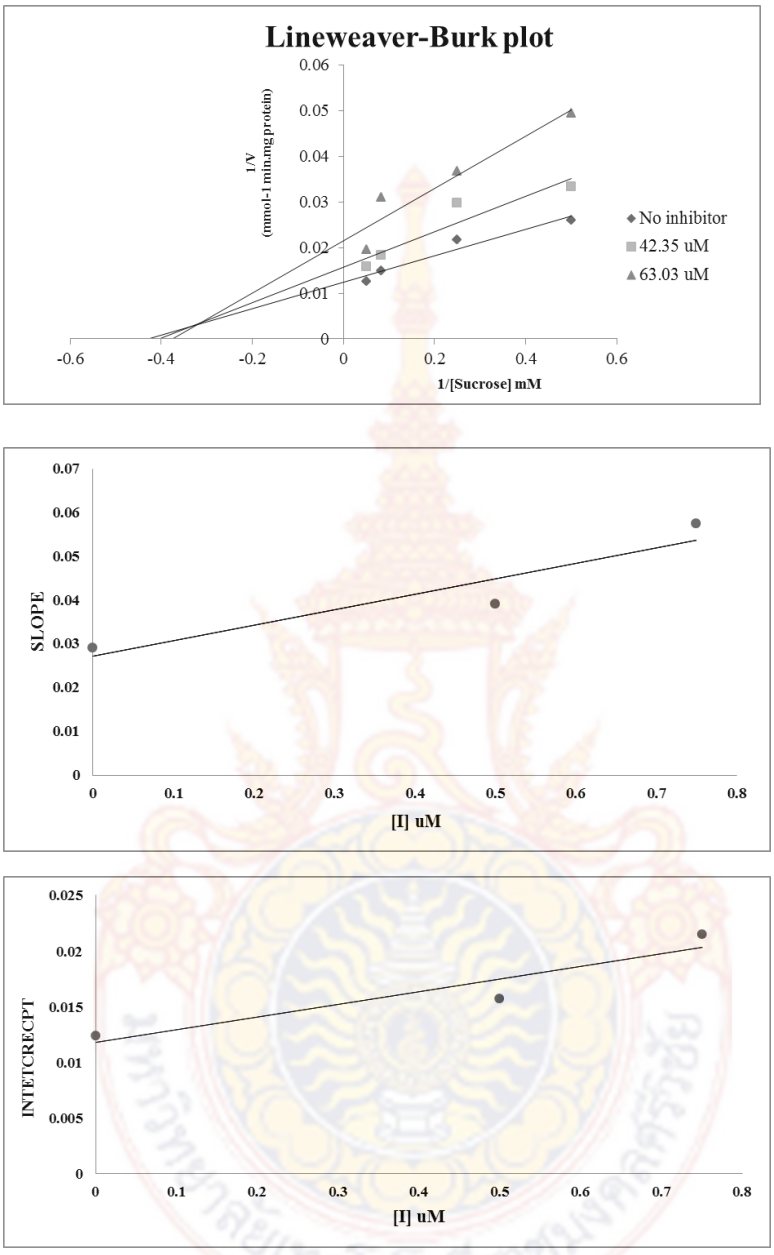
Myricetin (**3**): brown solid; ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ_H 6.95 (2H, s. H-2′ and H-6′), 6.34 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-6).

Gallic acid (**4**): light brown solid; ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ_H 6.91 (1H, s, H-2, and H-6) ; ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) δ_C 121.0 (C-1), 109.0 (C-2 and C-6), 145.9 (C-3 and C-5), 138.3 (C-4), 168.0 (C-7)

เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูของสารที่แยกได้ พบว่า isoquercetin สามารถยับยั้งมอลเทส และซูเครสสูงสุดที่ IC_{50} 62.80±0.45 และ 12.32±0.25 ไมโครโมล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 การศึกษาการยับยั้งทางไคเนติกส์ของ isoquercetin พบว่าเป็นแบบ mixed type inhibition ในมอลเทส กลไกการยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 9

ตารางที่ 2 ฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ (*A. occidental*)

	IC_{50} (μM)	
Compound	Maltase	Sucrase
1	64.14±2.42	58.32±3.25
2	62.80±0.45	12.32±0.25
3	235.42±2.87	386.25±1.52
4	156.28±1.57	275.42±2.32
Acarbose	54.67±1.32	47.08±2.12



รูปที่ 9 การยับยั้งกราฟ Lineweaver-Burk plot ทางไคเนติกส์ของ isoquercetin (2) ในแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูชนิดมอลเทส

ตารางที่ 1 การยับยั้งไกลเคชั่น (AGEs) และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนสกัดจากยอดมะม่วงหิมพานต์และตัวควบคุม

ส่วนสกัด	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลิก/กรัมส่วนสกัด)	ฤทธิ์การยับยั้งไกลเคชั่น (AGEs) IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)				ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้-เล็กของหนู IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
		วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	มอลเทส	ซูเครส
ส่วนสกัดเมทานอล	274.81±1.47	0.65±0.74	0.87±0.62	1.10±0.66	1.98±0.72	0.91±0.02	0.90±0.04
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	140.25±2.56	1.96±0.42	>2.00	>2.00	>2.00	10.98±0.22	1.250±0.14
ส่วนสกัดเฮกเซน	35.76±1.82	NI	NI	NI	NI	43.94±0.13	13.07±0.25
อะมิโนกวานิดีน (AG)	-	0.32±0.84	0.55±0.37	0.72±0.12	0.84±0.43	-	-
อะคาโบส	-	-	-	-	-	0.59±0.02	1.59±0.12

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

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ ด้วยตัวทำละลาย เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่นั้นจะอยู่ในชั้นส่วนสกัดเมทานอล มีลักษณะเหนียวข้นสีดำ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละผลได้ 14.8 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือดผ่านการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู เพื่อลดการดูดซึมกลูโคสบริเวณลำไส้ รวมถึงการศึกษาการป้องกัน และการพัฒนาไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนจากการที่มีน้ำตาลในร่างกาย โดยศึกษาจากการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลฟรุกโตส พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป และจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่เพิ่มขึ้น เมื่อปล่อยปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อย ๆ ส่วนสกัดเมทานอลนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไกลเคชั่นเนื่องจากมีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอล และฟลาโวนอยด์ที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 274.81±1.47 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมส่วนสกัด (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน สารในกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ที่พบในใบมะม่วงหิมพานต์นั้นได้แก่ gallic, protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, cinnamic, *p*-coumaric ferulic acids myricetin quercetin kaempferol rhamnetin cyaniding peonidin delphinidin agathisflavone quercetin 3-*O*-rutinoside และ quercetin 3-*O*-rhamnoside (Ajileye, Obuotor, Akinkunmi, & Aderogba, 2015) (de Brito et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่าสารในกลุ่มดังกล่าว หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น เช่น สาร cinnamic acid และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดไกลเคชั่นโดยเปอร์เซนต์การยับยั้งถึง 63.36 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่า สาร cinamic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดฟรุกโตซามีน β-amyloid carbonyl และ N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML) ที่จะมีผลต่อการเกิดจากในกลุ่ม amadori product ซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น advanced glycation end products (Adisakwattana, Sompong, Meeprom, Ngamukote, & Yibchok-anun, 2012) นอกจากนี้สาร ferulic acid cyanidin และ cyaniding-3-rutinoside ที่ความเข้มข้น 0.1-1 0.125-1 และ 0.25-1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไกลเคชั่นที่ถูกเหนี่ยวนำโดยน้ำตาล กลูโคส ฟรุกโตส และไรโบส และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเมทิลไกลออกซอล (methylglyoxal: MGO) ซึ่งเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดผ่านปฏิกิริยาออโตออกซิเดทีฟไกลเคซิเลชัน (autoxidative glycosylation) โดยสารดังกล่าวจะพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมากกว่าคนปกติถึง 2-6 เท่า หากร่างกายมี MGO ที่สูง ส่งผลให้เกิด

การรวมตัวสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน จนกลายเป็นสารเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ และมีความเชื่อมโยงกับการเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา (Thilavech, Ngamukote, Belobrajdic, Abeywardena, & Adisakwattana, 2016) (Suantawee, Cheng, & Adisakwattana, 2016; Thornalley, 2003) (Sompong, Cheng, & Adisakwattana, 2017)

การยับยั้งการทำงานแอลฟากลูโคซิเดส คือการยับยั้งการย่อยและการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตในระบบย่อยอาหารบริเวณลำไส้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังมื้ออาหารที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสที่มาจากลำไส้เล็กของหนูซึ่งเป็นเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ที่ประกอบด้วย มอลเทส และซูเครส โดยมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ จากการศึกษาส่วนสกัดทั้งหมดจากยอดมะม่วงหิมพานต์พบว่าทุกส่วนสกัดสามารถยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูได้ ทั้งมอลเทส มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.91±0.02 - 43.94±0.13 และ ซูเครส 0.90±0.04 - 13.07±0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพของส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งที่เทียบเท่ายาอะคาโบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจาก Baker's yeast โดยมีค่า IC_{50} 9.11 พีพีเอ็ม และมีรายงานอีกว่าใบมะม่วงหิมพานต์ ที่สกัดด้วยเมทานอล และน้ำ เมื่อนำไปให้หนู และกระต่ายที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานรับประทาน สามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ โดยที่สารสกัดไปมีผลต่อการทำงานของเบต้าเซลล์ ส่งผลให้การหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง จะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์นั้นมีศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลหลาย ๆ กลไกทั้งชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต และการไปกระตุ้นการหลั่งของอินซูลิน หากพิจารณาการลดระดับน้ำตาลผ่านตัวยับยั้งกลูโคซิเดสในลำไส้ของหนู การทำงานของเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะต่อซับสเตรต (มอลโทสและซูโครส) และหมู่ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา (Borges de Melo, da Silveira Gomes, & Carvalho, 2006) นอกจากนี้ความมีขั้วของตัวยับยั้งก็ส่งผลต่อการจับกับโครงสร้างของเอนไซม์ มีการศึกษาว่าตัวยับยั้งขั้วสูงที่มีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีกว่า หรือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของหมู่ OH รวมถึงมีหมู่ตาลมาเกาะที่บริเวณโครงสร้าง (ไกลโคไซด์) ก็ส่งผลต่อการยับยั้งเช่นเดียวกัน (Thanakosai & Phuwapraisirisan, 2013) ในขณะที่ตัวยับยั้งขั้วต่ำจนถึงขั้วปานกลางประสิทธิภาพการจับกับเอนไซม์จะน้อยกว่าตัวยับยั้งขั้วสูง การเข้าจับระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้งนั้น พบว่าจะเข้าตรงบริเวณโครงสร้าง หรือตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ส่งผลให้โครงสร้างของเอนไซม์มีการเปลี่ยน แปลง จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับซับสเตรตตามธรรมชาติได้ จึงส่งผลทำให้มีปริมาณกลูโคสถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กในปริมาณที่น้อยลง

สารบริสุทธ์ที่แยกได้นั้นจะเห็นได้ว่าเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู ทั้งชนิดมอลเทส และซูเครส จากการศึกษาจลพลศาสตร์พบว่าการเข้าจับของสารยับยั้งนั้นสามารถเข้าจับแบบแข่งขัน (competitive inhibition) กล่าวคือสารยับยั้งนั้นเข้าจับเอนไซม์อิสระ (E) บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งรูปร่างของตัวยับยั้งจะมีรูปร่างคล้ายกับซับเสตรทตามธรรมชาติ โดยการยับยั้งแบบนี้จะส่งผลให้เอนไซม์อิสระนั้นลดน้อยลง ส่วนการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) การจับของตัวยับยั้งจะจับตรงบริเวณอื่นของเอนไซม์ที่ไม่ใช่บริเวณเร่งปฏิกิริยา เมื่อจับแล้วจะส่งผลให้เอนไซม์นั้นมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป จนไม่สามารถเร่งปฏิกิริยากับซับเสตรทตามธรรมชาติได้ จากการทดลอง isoquercetin มีการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) หรือ mixed inhibition คือโครงสร้างของ isoquercetin มีการจับกับโครงสร้างของซูเครสและมอลเทส ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ อาจทำเกิดจากโครงสร้างที่มีน้ำตาลเกาะ (glycoside) มีขนาดใหญ่ทำให้ส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ต่อการเร่งปฏิกิริยา ส่งผลให้มีผลผลิตจากปฏิกิริยาที่น้อยลง (Thanakorn Damsud, Adisakwattana, & Phuwapraisirisan, 2013; T. Damsud, Grace, Adisakwattana, & Phuwapraisirisan, 2014)

จากผลวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คู่ (dual function) ที่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไกลเคซั่น และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู ทั้งมอลเทส และซูเครส เพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนา สู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวาน เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการรักษา และใช้ป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Adisakwattana, S., Sompong, W., Meeprom, A., Ngamukote, S., & Yibchok-anun, S. (2012). Cinnamic Acid and Its Derivatives Inhibit Fructose-Mediated Protein Glycation. *International Journal of Molecular Sciences, 13*(2), 1778-1789. doi: 10.3390/ijms13021778

Ajileye, O. O., Obuotor, E. M., Akinkunmi, E. O., & Aderogba, M. A. (2015). Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. *Journal of King Saud University - Science, 27*(3), 244-252.

Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., & Carvalho, I. (2006). α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron, 62*(44), 10277-10302.

Charernboon, T., & Phanasathit, M. (2014). Prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a cross-sectional descriptive study in Thailand. *J Med Assoc Thai, 97*(5), 560-565.

Damsud, T., Adisakwattana, S., & Phuwapraisirisan, 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., & Phuwapraisirisan, P. (2014). Orthosiphol A from the aerial parts of *Orthosiphon aristatus* is putatively responsible for hypoglycemic effect via alpha-glucosidase inhibition. *Nat Prod Commun, 9*(5), 639-641.

de Brito, E. S., de Araújo, M. C. P., Lin, L.-Z., & Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry, 105*(3), 1112-1118.

King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care, 21*(9), 1414-1431.

Ojewole, J. A. (2003). Laboratory evaluation of the hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol, 25*(3), 199-204.

Rico, R., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2016). Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. *Food Science & Nutrition, 4*(2), 329-338.

Sompong, W., Cheng, H., & Adisakwattana, S. (2017). Ferulic acid prevents methylglyoxal-induced protein glycation, DNA damage, and apoptosis in pancreatic beta-cells. *J Physiol Biochem, 73*(1), 121-131.

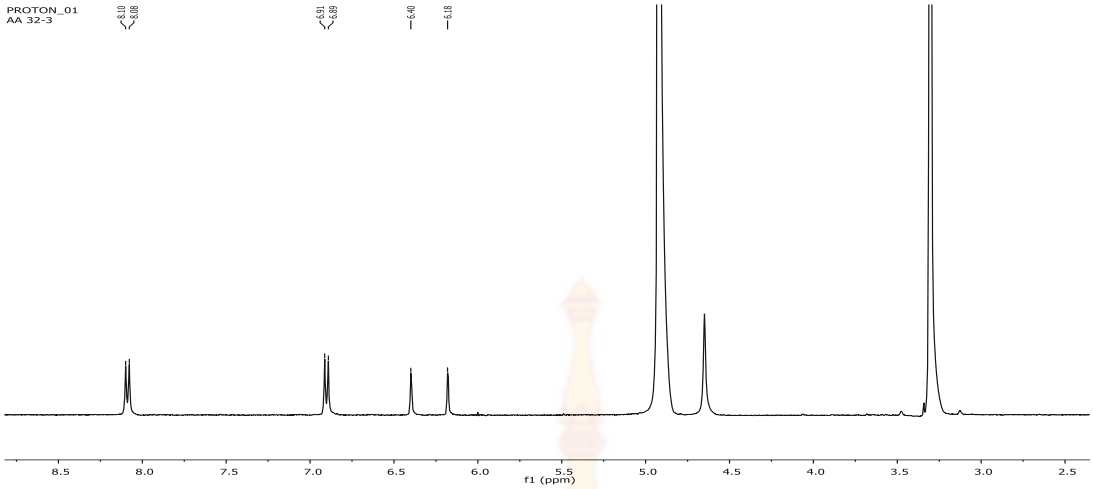
Suantawee, T., Cheng, H., & Adisakwattana, S. (2016). Protective effect of cyanidin against glucose- and methylglyoxal-induced protein glycation and oxidative DNA damage. *Int J Biol Macromol, 93*(Pt A), 814-821.

Thanakosai, W., & Phuwapraisirisan, P. (2013). First identification of alpha-glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Nat Prod Commun, 8*(8), 1085-1088.

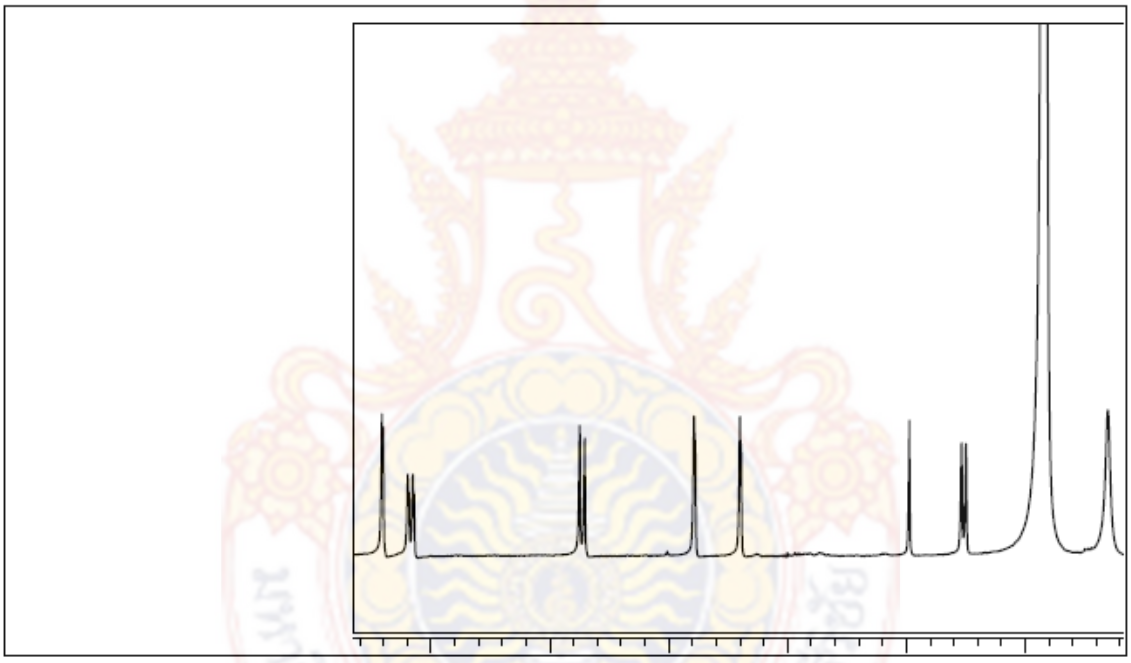
Thilavech, T., Ngamukote, S., Belobrajdic, D., Abeywardena, M., & Adisakwattana, S. (2016). Cyanidin-3-rutinoside attenuates methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage via carbonyl trapping ability and scavenging reactive oxygen species. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 16*, 138.

Thornalley, P. J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys, 419*(1), 31-40.

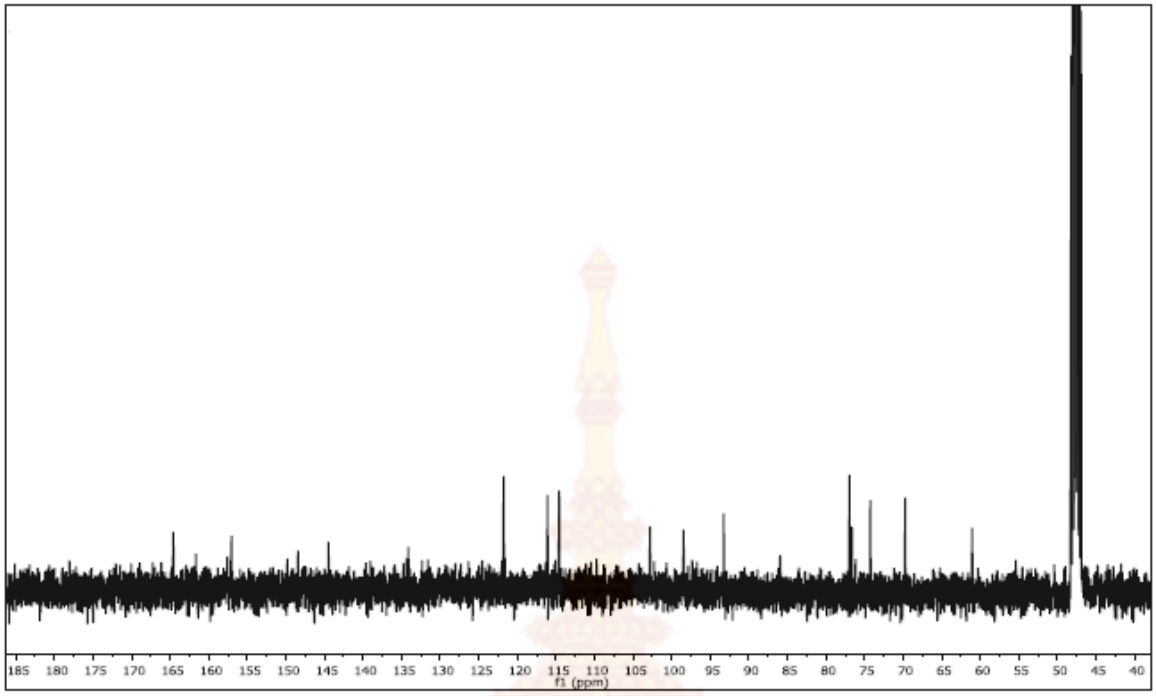
ภาคผนวก



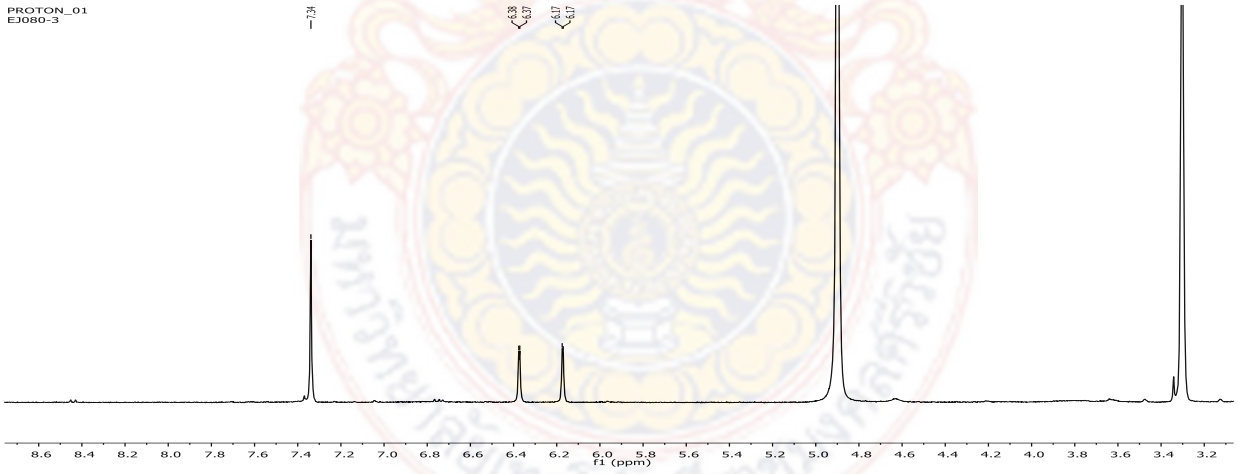
รูปที่ 10 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of kaempferol



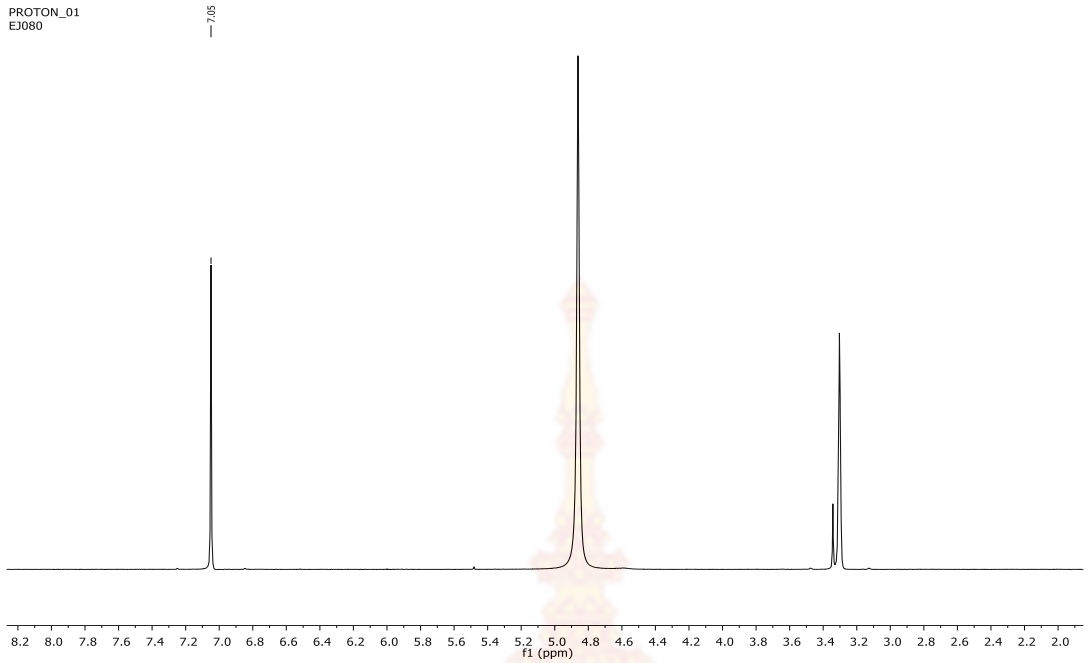
รูปที่ 11 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of isoquercetin



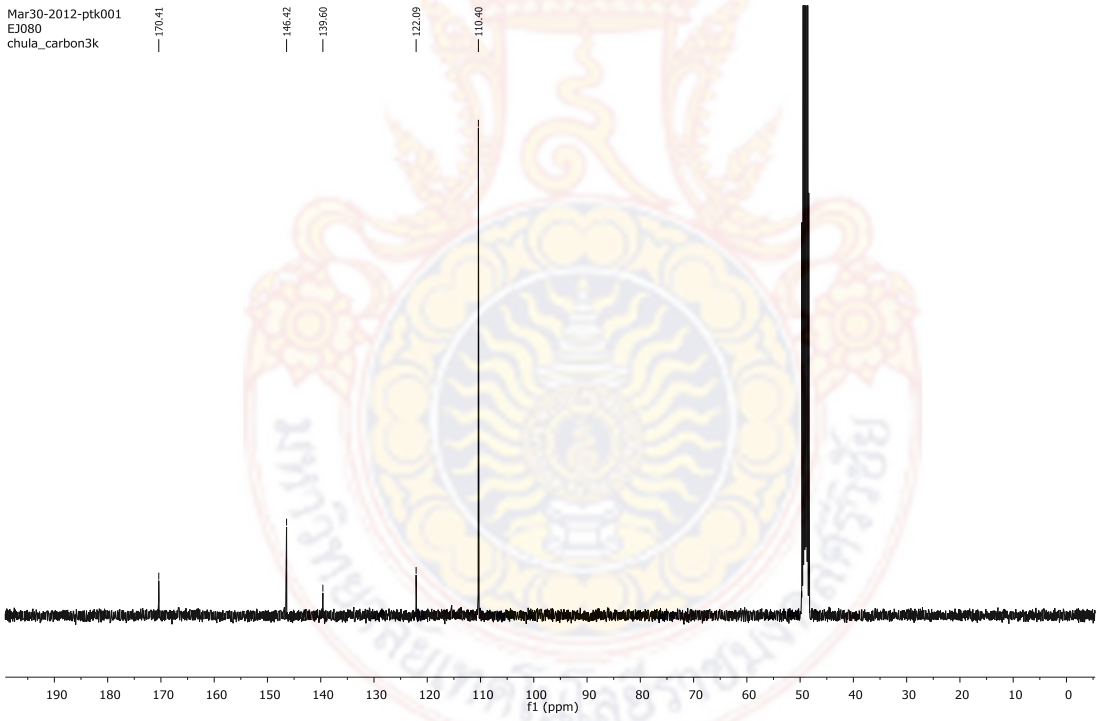
รูปที่ 12 The ^{13}C NMR ($CDCl_3$) spectrum of of isoquercetin



รูปที่ 13 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of of myricetin



รูปที่ 14 The ^{13}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of gallic acid



รูปที่ 15 The ^{13}C NMR ($CDCl_3$) spectrum of gallic acid

เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

แบบเสนอบทความเพื่อพิจารณาพิมพ์ใน
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
(Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal)

วันที่ 23 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ธนากรณ์ ดำสุด

ขอส่ง ✓บทความวิจัย ☐ บทความวิชาการ

สาขา ✓วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ☐ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

☐ วิทยาศาสตร์สุขภาพ ☐ วิทยาการคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ

☐ วิทยาศาสตร์กายภาพ

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ และแอลฟากลูโคซิเดสของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์

ชื่อเรื่อง (ภาษาอังกฤษ) Anti-Advanced Glycation End-product (AGEs) and α-Glucosidase Activities from shoot of (*Anacardium occidentale* Linn.) Extract

คำสำคัญ (ภาษาไทย) การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส มะม่วงหิมพานต์

(ภาษาอังกฤษ Anti-advanced glycation end-product, α-glucosidase inhibitory activity, *Anacardium occidentale* Linn.

ผู้เขียนทั้งหมด (ภาษาไทย) ธนากรณ์ ดำสุด ชฎาภรณ์ สุขกรง และ ฐิติวรดา เทศภูมิ

ผู้เขียนทั้งหมด (ภาษาอังกฤษ) Thanakorn Damsud, Chadaporn Sukkrong, Thitiworrada Tedphum

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

โทรศัพท์.....-.....โทรศัพท์มือถือ 086-3868360 โทรสาร.....-.....

ชื่อ-นามสกุลผู้เขียนประสานงาน (corresponding author) ผศ.ดร.ธนากรณ์ ดำสุด อีเมล thanakorn.d@rmutsv.ac.th

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าบทความนี้ ☐ เป็นผลงานของข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียว

✓ เป็นผลงานของข้าพเจ้าและผู้ร่วมงานตามที่ระบุในบทความ

โดยบทความนี้ยังไม่เคยได้รับการตีพิมพ์และไม่ได้อยู่ระหว่างการพิจารณาลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นใด ข้าพเจ้าและผู้เขียนร่วมยอมรับหลักเกณฑ์การพิจารณาต้นฉบับ ทั้งยินยอมให้กองบรรณาธิการมีสิทธิ์พิจารณาและตรวจแก้ไขต้นฉบับได้ตามที่เห็นสมควร พร้อมทั้งมอบลิขสิทธิ์บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ให้แก่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และหากมีการฟ้องร้องในเรื่องการละเมิดลิขสิทธิ์เกี่ยวกับส่วนหนึ่งหรือส่วนใด ๆ ในบทความ ให้ถือเป็นความรับผิดชอบของข้าพเจ้าและผู้เขียนร่วมแต่เพียงฝ่ายเดียว

ลงชื่อ .....

(ผศ.ดร.ธนากรณ์ ดำสุด)

วันที่ 23 กรกฎาคม 2561

ต้นฉบับบทความ

การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ และแอลฟากลูโคซิเดสของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์

Anti-Advanced Glycation End-product (AGEs) and α-Glucosidase Activities from shoot of (*Anacardium occidentale* Linn.) Extract

ธนากรณ์ ดำสุด[1*] ฐิติกร จันทร์วุ่น[1] และ ชุติมาแก้วพิบูลย์[2]

[1]สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ตำบลป่าพยอม จังหวัดพัทลุง 93110

Thanakorn Damsud[1*], Thitikorn Chanwun[1], Chutima Kaewpibon[2]

[1]Program of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya (Nakhon Si Thammarat campus), Thung Song, Nakhon Si Thammarat 80110, Thailand

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93110

*Corresponding Author, Email: thanakorn.d@rmutsv.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านไกลเคชั่น และฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส จากส่วนสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และ เฮกเซนของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ ฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นโดยใช้อัลบูมินจากวัวและน้ำตาลฟรุกโตส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ นอกจากนี้พบว่าส่วนสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดซูเครส และชนิดมอลเทส ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 90 ± 0.025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า IC_{50} เท่ากับ 91 ± 0.047 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน และโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ

คำสำคัญ: การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส มะม่วงหิมพานต์

Abstract

The objective of this study, methanol, dichloromethane and hexane crude extracts shoots of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) were evaluated for anti-glycation and α-glucosidase inhibitory activity. Investigation of protein glycation inhibitory activity of crude extracts in abovin serum albumin (BSA)/fructose system. The methanol extract showed the highest anti-advanced glycation end-product (AGEs) In addition, the methanol extract revealed highest α-glucosidase inhibitory activity against rat intestinal sucrose and maltase with an IC_{50} value of 0.90 ± 0.02 and IC_{50} value of 0.91 ± 0.04 mg/mL, respectively. These results suggest that the shoots of cashew nut have a potential to be used for diabetes therapy and its complications.

Keywords: Anti-advanced glycation end-product, α-glucosidase inhibitory activity, Anacardium occidentale L.

บทนำ

โรคเบาหวานคือสภาวะที่ร่างกายนั้นมีความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมของ ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ลักษณะสำคัญของโรคก็คือร่างกายไม่สามารถรักษาน้ำตาลให้อยู่ในสภาวะปกติได้ ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ โดยเฉพาะ ตา ไต หัวใจและหลอดเลือด ปัจจุบันนี้พบว่าประชากรทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin dependent diabetes) กันมากขึ้น เกิดจากการกินอาหารและสภาวะการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป [1] การรักษาโรคเบาหวานคือการให้ร่างกายนั้นมีระดับน้ำตาลที่ลดลง ซึ่งปัจจุบันได้มีแนวทางในการรักษามากมาย แนวทางหนึ่งคือการยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสนับเป็นวิธีที่นิยม เพราะสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังรับประทานอาหาร (postprandial glucose) โดยมีกลไกไปลดการดูดซึมของกลูโคสบริเวณลำไส้ โดยตัวยาที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ acarbose, voglibose และ miglitol แต่เมื่อรับประทานยาดังกล่าวจะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง [2] มีการศึกษาพบอีกว่าหลังจากรับประทานยากลุ่มยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส อาจมีน้ำตาลที่หลงเหลือและสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ถ้าร่างกายมีการสะสมน้ำตาลเป็นระยะเวลานานอาจนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ผลกระทบดังกล่าวนับว่าเป็นผลเสียต่อสุขภาพ โดยก่อให้เกิดการรวมตัวของน้ำตาลในเลือดกับโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า advanced glycation end-product (AGEs) ซึ่งสารชนิดนี้มีอัตราการเกิดที่ช้าในร่างกาย แต่ถ้าเกิดขึ้นแล้วจะมีความเสถียรและมีการ

กำจัดออกจากร่างกายได้ยาก และจะมีการสะสมตามบริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ และยังพบอีกว่าปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน [3] การป้องกันการเกิดไกลเคชั่นในร่างกายปัจจุบันได้มีการใช้ตัวยา aminoguanidine แต่ก็มีรายงานว่ายาดังกล่าว มีความเป็นพิษต่อผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการแทรกซ้อนทางไต [4] ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นและแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่รับประทานได้นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา เพื่อเป็นการส่งเสริมและลดการใช้ยาในผู้ป่วย และเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาและป้องกันโรคเบาหวาน รวมถึงโรคแทรกซ้อนต่อไป

มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นพืชที่แพร่กระจายในภูมิภาคเขตร้อน รวมทั้งมีการปลูกแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ มะม่วงหิมพานต์มีคุณค่าทางโภชนาการมากมาย ในใบนั้นประกอบด้วย วิตามินเอ วิตามินซี โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส เหล็ก และน้ำ ส่วนในเมล็ดนั้นจะอุดมไปด้วย วิตามินอี เหล็ก และแมกนีเซียม [5] ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีการนำส่วนต่าง ๆ มาใช้รักษาโรคเช่น ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง เนื่องจากมีสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [6] รวมถึงลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ได้มีการศึกษาการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน โดยให้รับประทานสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ และมีการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากยีสต์ (Baker's yeast) พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่ายา acarbose โดยใช้สารสกัดจากใบ [7] แต่ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสในลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) ซึ่งมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ต่อการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น และการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตผ่านการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) เพื่อเป็นข้อมูลแก่ประชาชนในการใช้ประโยชน์ พืช ผัก ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนา และส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคพืชผักมากขึ้น เนื่องจากสามารถเป็นได้ทั้งอาหารและยา จนนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

ยอดมะม่วงหิมพานต์ เก็บจาก อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 จากนั้นล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียดจำนวน 750 กรัม แช่มาเซอเรชัน (maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายอย่างละ 3 ลิตร แช่เป็นเวลา 3 วัน และสกัด 3 ครั้ง จะได้เป็นสารสกัดหยาบออกมา นำสารสกัด

หยาบมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) และเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) ตามลำดับ นำส่วนสกัดจาก เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ทำการชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น และการทำงานแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น [8]

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นโดยเตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (0.25 0.50 0.75 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ BSA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ น้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02 เปอร์เซ็นต์ sodium azide ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์โดยสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ความยาวคลื่น excitation wavelength เท่ากับ 355 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 460 นาโนเมตร โดยใช้อะมิโนกลัวนิดีน (Aminoguanidine) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น โดยใช้สูตรดังที่กล่าวดังสมการ และค่า IC_{50} ของการยับยั้ง โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

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

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู [9]

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยเตรียมจากเอนไซม์อย่างหยาบ (Rat intestinal acetone power Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, USA)) ซึ่งประกอบด้วย มอลเทส และ ซูเครส ที่มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 0.09 และ 0.45 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน 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 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40

นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที วัดความเข้มข้นของกลูโคส โดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้ glu-kit (Sigma-Aldrich) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้อะคาโบส (Acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยใช้สูตรดังที่กล่าวดังสมการ และค่า IC_{50} ของการยับยั้ง โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05

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

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

4. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin Cioculteu reagent [10]

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีดัดแปลงของ Hossain et al. (2008) ใช้วิธี Folin Cioculteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร กับส่วนสกัดแต่ละชั้นที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เติม Folin Cioculteu 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) ของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทดลองจำนวน 3 ครั้ง

ผลการวิจัย

1. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

จากการศึกษาส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ ด้วยวิธีมาเซอเรชันโดยใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน โดยใช้ตัวทำละลายในปริมาตร 3 ลิตร ต่อน้ำหนักยอดมะม่วงหิมพานต์ 750 กรัม ซึ่งลักษณะของสารสกัดหยาบในส่วนสกัดเมทานอลจะมีลักษณะเหนียวข้นสีดำ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมีลักษณะหนืดสีเขียว และส่วนสกัดเฮกเซนมีลักษณะหนืดสีน้ำตาล ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละผลได้ของส่วนสกัด เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน เท่ากับ 14.8 1.48 และ0.88 ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น ที่เหนี่ยวนำโดยการใช้น้ำตาลฟรุกโตส โดยใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีตั้งแต่วันที่ 7 ภายหลังการเริ่มปฏิกิริยาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.65±0.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป พบว่าส่วนสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาในวันที่ 14 21 และ 28 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.87±0.62 1.10±0.66 และ 1.98±0.72 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งมีค่าใกล้เคียงกับยาอะมิโนกวานิดีน (aminoguanidin) ในขณะที่ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีในวันที่ 7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.96±0.42 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ภายหลังปฏิกิริยาในวันที่ 14 21 และ 28 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 2.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และส่วนสกัดเฮกเซนไม่พบประสิทธิภาพการยับยั้งไกลเคชั่น (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทส และซูเครส) โดยการใช้ มอลโทส และซูโครสเป็นซับสเตรต พบว่าทุกส่วนสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยส่วนสกัดเมทานอลให้เปอร์เซ็นการยั้บยั้งได้ดีทั้งชนิดมอลเทส และชนิดซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.91±0.02 และ 0.90±0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน และพบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งเทียบเท่ายาอะคาโบส (acarbose) (ตารางที่ 1)

4. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดนั้นหาได้ด้วยวิธี Folin Cioculteu reagent จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก สมการของกราฟคือ y= 0.0034x, R^2 = 0.985 พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน โดยมีสารประกอบฟีนอลิก 274.81±1.47 140.25±2.56 และ 35.76±1.82 มิลลิกรัมกรดแกลิก/กรัมส่วนสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การยับยั้งไกลเคชั่น (AGEs) และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนสกัดจากยอดมะม่วงหิมพานต์และตัวควบคุม

ส่วนสกัด	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลิก/กรัมส่วนสกัด)	ฤทธิ์การยับยั้งไกลเคชั่น (AGEs)				ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้-เล็กของหนู	
		IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
		วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	มอลเทส	ซูเครส
ส่วนสกัดเมทานอล	274.81±1.47	0.65±0.74	0.87±0.62	1.10±0.66	1.98±0.72	0.91±0.02	0.90±0.04
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	140.25±2.56	1.96±0.42	>2.00	>2.00	>2.00	10.98±0.22	1.250±0.14
ส่วนสกัดเฮกเซน	35.76±1.82	NI	NI	NI	NI	43.94±0.13	13.07±0.25
อะมิโนกวานิดีน (AG)	-	0.32±0.84	0.55±0.37	0.72±0.12	0.84±0.43	-	-
อะคาโบส	-	-	-	-	-	0.59±0.02	1.59±0.12

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

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ ด้วยตัวทำละลาย เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่นั้นจะอยู่ในชั้นส่วนสกัดเมทานอล มีลักษณะเหนียวข้นสีดำ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละผลได้ 14.8 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือดผ่านการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู เพื่อลดการดูดซึมกลูโคสบริเวณลำไส้ รวมถึงการศึกษาการป้องกัน และการพัฒนาไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนจากการที่มีน้ำตาลในร่างกาย โดยศึกษาจากการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลฟรุกโตส พบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป และจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่เพิ่มขึ้น เมื่อปล่อยปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อย ๆ ส่วนสกัดเมทานอลนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไกลเคชั่น เนื่องจากมีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอล และฟลาโวนอยด์ที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 274.81±1.47 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมส่วนสกัด (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน สารในกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ที่พบในใบมะม่วงหิมพานต์นั้นได้แก่ gallic, protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, cinnamic, *p*-coumaric ferulic acids myricetin quercetin kampferol rhamnetin cyaniding peonidin delphinidin agathisflavone quercetin 3-*O*-rutinoside และ quercetin 3-*O*-rhamnoside [11] [12] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่าสารในกลุ่มดังกล่าว หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น เช่น สาร cinnamic acid และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดไกลเคชั่นโดยเปอร์เซนต์การยับยั้งถึง 63.36 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่า สาร cinamic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดฟรุกโตซามีน β-amyloid carbonyl และ N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML) ที่จะมีผลต่อการเกิดจากในกลุ่ม amadori product ซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น advanced glycation end products [13] นอกจากนี้สาร ferulic acid cyanidin และ cyaniding-3-rutinoside ที่ความเข้มข้น 0.1-1 0.125-1 และ 0.25-1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไกลเคชั่นที่ถูกเหนี่ยวนำโดยน้ำตาล กลูโคส ฟรุกโตส และไรโบส และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเมทิลไกลออกซอล (methylglyoxal: MGO) ซึ่งเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดผ่านปฏิกิริยาออโตออกซิเดทีฟไกลเคซิเลชัน (autoxidative glycosylation) โดยสารดังกล่าวจะพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมากกว่าคนปกติถึง 2-6 เท่า หากร่างกายมี MGO ที่สูง ส่งผลให้เกิดการรวมตัว

สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน จนกลายเป็นสารเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ และมีความเชื่อมโยงกับการเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา [14] [15] [16]

การยับยั้งการทำงานแอลฟากลูโคซิเดส คือการยับยั้งการย่อยและการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตในระบบย่อยอาหารบริเวณลำไส้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังมื้ออาหารที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสที่มาจากลำไส้เล็กของหนูซึ่งเป็นเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ที่ประกอบด้วย มอลเทส และซูเครส โดยมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ จากการศึกษาส่วนสกัดทั้งหมดจากยอดมะม่วงหิมพานต์พบว่าทุกส่วนสกัด สามารถยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูได้ ทั้งมอลเทส มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.91±0.02 - 43.94±0.13 และ ซูเครส 0.90±0.04 - 13.07±0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพของส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งที่เทียบเท่ายาอะคาโบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจาก Baker's yeast โดยมีค่า IC_{50} 9.11 พีพีเอ็ม [7] และมีรายงานอีกว่าใบมะม่วงหิมพานต์ ที่สกัดด้วยเมทานอล และน้ำ เมื่อนำไปให้หนู และกระต่ายที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานรับประทาน สามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ โดยที่สารสกัดไปมีผลต่อการทำงานของเบต้าเซลล์ ส่งผลให้การหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง [17] [18] จะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์นั้นมีศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลหลาย ๆ กลไกทั้งชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต และการไปกระตุ้นการหลั่งของอินซูลิน หากพิจารณาการลดระดับน้ำตาลผ่านตัวยับยั้งกลูโคซิเดสในลำไส้ของหนู การทำงานของเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะต่อซับสเตรต (มอลโทส และซูโครส) และหมู่ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา [19] นอกจากนี้ความมีขั้วของตัวยับยั้งก็ส่งผลต่อการจับกับโครงสร้างของเอนไซม์ มีการศึกษาว่าตัวยับยั้งขั้วสูงที่มีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีกว่า หรือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของหมู่ OH รวมถึงมีหมู่ตาลมาเกาะที่บริเวณโครงสร้าง (ไกลโคไซด์) ก็ส่งผลต่อการยับยั้งเช่นเดียวกัน [20] [21] ในขณะที่ตัวยับยั้งขั้วต่ำจนถึงขั้วปานกลางประสิทธิภาพการจับกับเอนไซม์จะน้อยกว่าตัวยับยั้งขั้วสูง [22] การเข้าจับระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้งนั้น พบว่าจะเข้าตรงบริเวณโครงสร้าง หรือตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ส่งผลให้โครงสร้างของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลง จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับซับสเตรตตามธรรมชาติได้ [23] จึงส่งผลทำให้มีปริมาณกลูโคสถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กในปริมาณที่น้อยลง

จากผลวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คู่ (dual function) ที่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไกลเคชั่น และแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู ทั้งมอลเทส และซูเครส โดยเกิดจากสารในแต่ละส่วนสกัดมีการการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) หรืออาจจะเป็นสารองค์ประกอบหลัก (major compounds) แต่อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งจะต้องมีการแยก และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งศึกษากลไกการการยับยั้ง เพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนา สู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวาน เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการรักษา และใช้ป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. King H, Aubert R E, Herman, W H Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998;21(9):1414-1431.

2. Mohammad S, Ahmad J. Management of obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in primary care. Diabetes Metab Syndr 2016;10(3):171-181.

3. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Auge N, Pamplona R, Portero-Otin M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. Antioxid Redox Signal 2009;11(12):3071-3109.

4. Thornalley P. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys 2003;419(1):31-40

5. Rico R, Bulló M, Salas-Salvadó J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. Food Sci Nutr 2016;4(2):329-338.

6. Lopes M M d A, Miranda M R A d, Moura C F H, Enéas Filho J. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. CIENC AGROTEC 2012;36:325-332.

7. Mun'im A, Katrin A A, Mahmudah K F, Mashita M. Screening of α-glucosidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants. Int J Med Aromatic Plants 2013;3(2):144-150.

8. Suantawee T, Wesarachanon K, Anantsuphasak K, Daenphetploy T, Thien-Ngern S, Thilavech T, Adisakwattana S. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. J Food Sci Technol 2015;52(6):3843-3850.

9. Damsud T, Grace M H, Adisakwattana S, Phuwapraisirisan P. Orthosiphol A from the aerial parts of *Orthosiphon aristatus* is putatively responsible for hypoglycemic effect via alpha-glucosidase inhibition. Nat Prod Commun 2014;9(5):639-641.

10. Hossain S J, Tsujiyama I, Takasugi M, Islam M A, Biswas R S, Aoshima H. Total Phenolic Content, Antioxidative, Anti-amylase, Anti-glucosidase, and Antihistamine Release Activities of Bangladeshi Fruits. J Food Sci Technol 2008;14(3):261-268.

11. Trox J, Vadivel V, Vetter W, Stuetz W, Scherbaum V, Gola U, Biesalski H K. Bioactive Compounds in Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.) Kernels: Effect of Different Shelling Methods. J Agric Food Chem 2010;58(9):5341-5346.

12. Ajileye O O, Obuotor E M, Akinkunmi E O, Aderogba M A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. JKSUS 2015;27(3):244-252.

13. Adisakwattana S, Sompong W, Meeprom A, Ngamukote S, Yibchok-anun S. Cinnamic Acid and Its Derivatives Inhibit Fructose-Mediated Protein Glycation. Int J Mol Sci 2012;13(2):1778-1789.

14. Sompong W, Cheng H, Adisakwattana S. Ferulic acid prevents methylglyoxal-induced protein glycation, DNA damage, and apoptosis in pancreatic beta-cells. J Physiol Biochem 2017;73(1):121-131.

15. SuantaweeT, Cheng H, Adisakwattana S. Protective effect of cyanidin against glucose- and methylglyoxal-induced protein glycation and oxidative DNA damage. Int J Biol Macromol 2016;93(Pt A), :814-821.

16. Thilavech T, Ngamukote S, Belobrajdic D, Abeywardena M, Adisakwattana S. Cyanidin-3-rutinoside attenuates methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage via carbonyl trapping ability and scavenging reactive oxygen species. BMC Complement Altern Med 2016;16:138.

17. Ojewole J A. Laboratory evaluation of the hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2003;25(3):199-204.

18. Jaiswal Y S, Tatke P A, Gabhe S Y, Vaidya A B. (2017). Antidiabetic activity of extracts of *Anacardium occidentale* Linn. leaves on *n*-streptozotocin diabetic rats. J Tradit Complement Med 2017;7(4):421-427.

19. Borges de Melo E, da Silveira Gomes A, Carvalho I. α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron 2006;62(44):10277-10302.

20. Thanakosai W, Phuwapraisirisan P. First identification of alpha-glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. Nat Prod Commun 2013;8(8):1085-1088.

21. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2006;52(2):149-153.

22. Damsud T, Adisakwattana S, Phuwapraisirisan P. Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of *Piper sarmentosum* and their α-glucosidase inhibitory activities. Phytochem Lett 2013;6(3):350-354.

23. Bischoff H.The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. Clin Invest Med 1995;18(4):303-311.