การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์และแอลฟากลูโคซิเดส ของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์

Anti-advanced glycation end-products and α-glucosidase activities from shoot of *Anacardium occidentale* Linn. extract

ธนากรณ์ ดำสุด[1*] ฐิติกร จันทร์วุ่น[1] ชฎาภรณ์ สุขกรง[2] และ ฐิติวรดา เทศภูมิ[2]

[1] สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) นครศรีธรรมราช 80110

[2] สาขาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) นครศรีธรรมราช 80110

Thanakorn Damsud[1*], Thitikorn Chanwun[1], Chadaporn Sukkrong[2] and Thitiworrada Tedphum[2]

[1] Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya (Nakhon Si Thammarat campus), Nakhon Si Thammarat 80110

[2] Division of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya (Nakhon Si Thammarat campus), Nakhon Si Thammarat 80110

Received: 23 July 2018/ Revised: 9 December 2018/ Accepted: 26 December 2018

บทคัดย่อ

ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เกิดกระบวนการไกลเคชันซึ่งนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการไกลเคชันจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในป้องกันโรคแทรกซ้อนได้ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านไกลเคชันและฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากส่วนสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซนของยอดมะม่วงหิมพานต์ ฤทธิ์การต้านไกลเคชันโดยใช้อัลบูมินจากวัวและน้ำตาลฟรุกโตส ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดมอลเทสและซูเครสได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.91±0.02 และ 0.90±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอะคาร์โบส (IC_{50} เท่ากับ 0.59±0.02 และ 1.59±0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานและโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ

คำสำคัญ: การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส มะม่วงหิมพานต์

Corresponding author: thanakorn.d@rmutsv.ac.th

Abstract

Hyperglycemia promotes the formation of protein glycation, leading to the production of advanced glycation end-products, which play a significant role in the development of complications. Therefore, the inhibition glycation is an attractive strategy in diabetes treatment. The objective of this study, methanol, dichloromethane and hexane extracts of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) shoots were evaluated for anti-glycation and α-glucosidase inhibitory activity. Investigation of protein glycation inhibitory activity of crude extracts in abovine 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 maltase and sucrase with an IC_{50} value of 0.91± 0.02 and 0.90±0.04 mg/ml, respectively, compared with acarbose (IC_{50} value 0.59±0.02 and 1.59±0.12 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

โรคเบาหวานคือ สภาวะที่ร่างกายนั้นมีความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมของไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ลักษณะสำคัญของโรคคือ ร่างกายไม่สามารถรักษาน้ำตาลให้อยู่ในสภาวะปกติได้ ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ โดยเฉพาะบริเวณตา ไต หัวใจ และหลอดเลือด ปัจจุบันนี้พบว่าประชากรทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes) กันมากขึ้น เกิดจากการกินอาหารและสภาวะการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป [1] การรักษาโรคเบาหวานคือ การให้ร่างกายนั้นมีระดับน้ำตาลที่ลดลง ซึ่งปัจจุบันได้มีแนวทางในการรักษามากมาย แนวทางหนึ่งคือ การยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่นิยมอย่างมาก เพราะสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังรับประทานอาหาร (postprandial glucose) โดยมีกลไกไปลดการดูดซึมของกลูโคสบริเวณลำไส้ โดยตัวยาที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ อะคาร์โบส (acarbose) โวกลิโบส (voglibose) และไมกลิทอล (miglitol) แต่เมื่อรับประทานยาดังกล่าวจะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง [2] นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจากรับประทานยากลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดส อาจมีน้ำตาลที่หลงเหลือและสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ซึ่งหากร่างกายมีการสะสมน้ำตาลเป็นระยะเวลานานอาจนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ผลกระทบดังกล่าวนับว่าเป็นผลเสียต่อสุขภาพ โดยก่อให้เกิดการรวมตัวของน้ำตาลในเลือดกับโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า แอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ [advanced glycation end-product; (AGEs)] ซึ่งสารชนิดนี้มีอัตราการเกิดที่ช้าในร่างกาย แต่ถ้าเกิดขึ้นแล้วจะมีความเสถียร กำจัดออกจากร่างกายได้ยาก และจะมีการสะสมตามบริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งยังพบอีกว่าปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน [3] การป้องกันการเกิดไกลเคชันในร่างกายปัจจุบันได้มีการใช้ตัวยาอะมิโนกวานิดีน (aminoguanidine) แต่ก็มีรายงานว่ายาดังกล่าว มีความเป็นพิษต่อผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการแทรกซ้อนทางไต [4] ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชันและแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่รับประทานได้นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา เพื่อเป็นการส่งเสริมและลดการใช้ยา

ในผู้ป่วย และเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาและป้องกันโรคเบาหวาน รวมถึงโรคแทรกซ้อนต่อไป

มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นพืชที่แพร่กระจายในภูมิภาคเขตร้อน รวมทั้งมีการปลูกแพร่หลายในประเทศไทยโดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ มะม่วงหิมพานต์มีคุณค่าทางโภชนาการมากมาย ในใบนั้นประกอบด้วยวิตามินเอ วิตามินซี โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส เหล็ก และน้ำ ส่วนในเมล็ดนั้นจะอุดมไปด้วย วิตามินอี เหล็ก และแมกนีเซียม [5] ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้มีการนำส่วนต่าง ๆ มาใช้รักษาโรค เช่น ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง เนื่องจากมีสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [6] รวมถึงลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ได้มีการศึกษาการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน โดยให้รับประทานสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ และมีการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากยีสต์ (Baker's yeast) พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่ายาอะคาร์โบส [7] แต่ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสในลำไส้เล็กของหนู (มอลเทสและซูเครส) ซึ่งมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์ต่อการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน และการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตผ่านการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทสและซูเครส) เพื่อเป็นข้อมูลแก่ประชาชนในการใช้ประโยชน์ พืช ผัก ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด และป้องกันโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาและส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคพืชผักมากขึ้น เนื่องจากสามารถเป็นได้ทั้งอาหารและยา จนนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

ยอดมะม่วงหิมพานต์เก็บจากอำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช ในวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 จากนั้นล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียด หนัก 750 กรัม แช่แบบหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลาย ปริมาตรละ 3 ลิตร แช่เป็นเวลา 3 วัน และสกัด จำนวน 3 ครั้ง จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบออกมา นำส่วนสกัดหยาบมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) นำสารสกัดหยาบจากชั้นเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซนมาทำการชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันไม่ให้ถูกแสงและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดไกลเคชัน และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชัน [8]

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชันโดยเตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO)) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ abovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 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) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดไกลเคชันโดยใช้สูตรดังที่กล่าวดังสมการ 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. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู [9]

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยเตรียมจากเอนไซม์อย่างหยาบ (rat intestinal acetone power Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, USA)) ซึ่งประกอบด้วยมอลเทสและซูเครสที่มีค่าความจำเพาะ เท่ากับ 0.09 และ 0.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยชั่งเอนไซม์อย่างหยาบ หนัก 1 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตต์สารละลายส่วนบนเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ เตรียมส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น (0.1, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมซับสเตรตโดยใช้มอลโตส ความเข้มข้น 0.58 มิลลิโมลาร์ และซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟสบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดความเข้มข้นของกลูโคสโดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้ glu-kit (Sigma-Aldrich) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้อะคาร์โบสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรดังที่กล่าวดังสมการ และค่า IC_{50} ของการยับยั้งโดยใช้โปรแกรม 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 โดยเตรียม Folin Cioculteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร กับสารสกัดแต่ละชั้นที่ละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Folin Cioculteu reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent; GAE) ในรูปมิลลิกรัมของกรด แกลลิกต่อกรัมสารสกัด

5. การประเมินผลทางสถิติ

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

ผลการวิจัย

1. การสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์

จากการศึกษาส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ด้วยวิธีแช่หมัก โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ซึ่งจะใช้ตัวทำละลาย ปริมาตร 3 ลิตร ต่อน้ำหนักยอดมะม่วงหิมพานต์ หนัก 750 กรัม ซึ่งลักษณะของสารสกัดหยาบในส่วนสกัดเมทานอลจะมีลักษณะเหนียวข้นสีดำ สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนมีลักษณะหนืดสีเขียว และสารสกัดชั้นเฮกเซนมีลักษณะหนืดสีน้ำตาล ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละของผลผลิตได้ของสารสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน เท่ากับ 14.8, 1.48 และ 0.88 ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชัน

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชันที่เหนี่ยวนำโดยการใช้น้ำตาลฟรุกโตส โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีตั้งแต่วันที่ 7 ภายหลังการเริ่มปฏิกิริยาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.65±0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชันได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาในวันที่ 14, 21 และ 28 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.87±0.06, 1.10±0.06 และ 1.98±0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งมีค่าใกล้เคียงกับยาอะมิโนกวานิดีน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.55±0.03, 0.72±0.01 และ 0.84±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีในวันที่ 7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.96±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ภายหลังปฏิกิริยาในวันที่ 14, 21 และ 28 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงโดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดชั้นเฮกเซนไม่พบประสิทธิภาพการยับยั้งไกลเคชัน (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู (มอลเทสและซูเครส) โดยการใช้มอลโทสและซูโครสเป็นซับสเตรต พบว่าทุกสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู โดยสารสกัดชั้นเมทานอลให้เปอร์เซ็นการยับยั้งได้ดีทั้งชนิดมอลเทสและซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.91±0.02 และ 0.90±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน และพบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งเทียบเท่ายาอะคาร์โบส (ตารางที่ 1)

4. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดนั้นหาได้ด้วยวิธี Folin Cioculteu reagent จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก สมการของกราฟ คือ $y = 0.0034x+0.0021$, $R^2 = 0.985$ พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 274.81±1.47, 140.25±2.56 และ 35.76±1.82 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การยับยั้งไกลเคชัน (AGEs) การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนสกัดหยาบของยอดมะม่วงหิมพานต์และตัวควบคุม

สาร/สารสกัด	**สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)**	**ฤทธิ์การยับยั้งไกลเคชัน (AGEs)**				**ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู**	
		IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
		วันที่ 7	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**	**มอลเทส**	**ซูเครส**
สารสกัดเมทานอล	274.81±1.47	0.65±0.07	0.87±0.06	1.10±0.06	1.98±0.07	0.91±0.02	0.90±0.04
สารสกัดไดคลอโรมีเทน	140.25±2.56	1.96±0.04	>2.00	>2.00	>2.00	10.98±0.22	1.25±0.14
สารสกัดเฮกเซน	35.76±1.82	NI	NI	NI	NI	43.94±0.13	13.07±0.25
อะมิโนกวานิดีน (AG)	-	0.32±0.08	0.55±0.03	0.72±0.01	0.84±0.04	-	-
อะคาร์โบส	-	-	-	-	-	0.59±0.02	1.59±0.12

(NI) = No inhibition (ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

(-) = ไม่ได้วิเคราะห์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดส่วนสกัดหยาบจากยอดมะม่วงหิมพานต์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่จะอยู่ในชั้นส่วนสกัดเมทานอล มีลักษณะเหนียวข้นสีดำ โดยมีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ 14.8 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือดผ่านการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนู เพื่อลดการดูดซึมกลูโคสบริเวณลำไส้ รวมถึงการศึกษาการป้องกันและการพัฒนาไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนจากการที่มีน้ำตาลในร่างกาย โดยศึกษาจากการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลฟรุกโตส พบว่าสารสกัดเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป และจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นเมื่อปล่อยปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อย ๆ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 274.81±1.47 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชั้นอื่น ๆ จากรายงานการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดที่พบได้จากส่วนของใบมะม่วงหิมพานต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน เช่น cinnamic acid และอนุพันธ์สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดไกลเคชันได้ถึง 63.36 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดฟรุกโตซามีน β-amyloid carbonyl และ N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML) ที่จะมีผลต่อการเกิดสารในกลุ่ม amadori ซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ [11] นอกจากนี้สาร ferulic acid, cyaniding, quercetin และ cyaniding-3-rutinoside มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไกลเคชันที่ถูกเหนี่ยวนำโดยน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และไรโบส และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเมทิลไกลออกซอล (methylglyoxal; MGO) ซึ่งเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดผ่านปฏิกิริยาออโตออกซิเดทีฟไกลเคซิเลชัน (autoxidative glycosylation) โดยสารดังกล่าวจะพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมากกว่าคนปกติถึง 2-6 เท่า หากร่างกายมี MGO ที่สูง ส่งผลให้เกิดการรวมตัวสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน จนกลายเป็นสารเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ และมีความเชื่อมโยงกับการเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา [12-14]

การยับยั้งการทำงานแอลฟากลูโคซิเดส คือการยับยั้งการย่อยและการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตในระบบย่อยอาหารบริเวณลำไส้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังมื้ออาหารที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสที่มาจากลำไส้เล็กของหนูซึ่งเป็นสารสกัดหยาบเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ประกอบด้วยมอลเทสและซูเครส โดยมีกลไกการทำงานคล้ายกับการทำงานในร่างกายของมนุษย์ การศึกษาส่วนสกัดทั้งหมดจากยอดมะม่วงหิมพานต์ พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีศักยภาพสูงที่สุดในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดมอลเทสและซูเครส โดยผลการยับยั้งนั้นเทียบเท่ายาอะคาร์โบส รองลงมาคือ สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน จากการทดลองดังตารางที่ 1 พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดมอลเทสและซูเครสมาจากสารที่สามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจนถึงขั้วสูง คือสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ พบสารประกอบฟีนอลิก เช่น quercetin, myricetin, catechin, epicatechin, amentoflavone และ proanthocyanidin [15] รวมถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, quercetin 3-*O*-rhamnoside, myricetin และ myricetin-3-*O*-rhamnoside [16] จากรายงานการวิจัยของ Yin และคณะ [17] ได้รวบรวมและรายงานสารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกจากพืชสมุนไพรหลายชนิด และสารบางชนิดนั้นสามารถพบได้ในใบมะม่วงหิมพานต์ เช่น สาร quercetin พบว่ามีประสิทธิภาพในการยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากยีสต์และลำไส้เล็กของหนูชนิดซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.86 และ 216 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งสามารถยับยั้งอะไมเลส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 71 ไมโครโมล

ต่อลิตร และมีการศึกษาถึงรูปแบบการยับยั้งต่อแอลฟากลูโคซิเดสจากยีสต์ โดยมีค่า K_i เท่ากับ 8.5 ไมโครโมลต่อลิตร นอกจากการนี้มีรายงานวิจัยศึกษาสารที่ให้รสฝาดที่พบได้ในทุก ๆ ส่วนของมะม่วงหิมพานต์ คือ tannin พบได้ทั้งในส่วนของใบและผล สารในกลุ่มดังกล่าว ได้แก่ สาร epicatechin, epicatechin-(4β,8)-epicatechin gallate (B2-3′-*O*-gallate), epicatechin gallate (ECG) and 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl 3,4,5- trihydroxybenzoate (HETB) มีประสิทธิภาพการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.85, 0.31, 0.71 และ 4.77 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งศึกษารูปแบบการยับยั้งของ B2-3′-*O*-gallate และ ECG มีรูปแบบการยับยั้งแบบผสม (mixed competitive inhibitors) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 0.30 และ 0.21 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ HETB มีรูปแบบการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitors) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 3.10 ไมโครโมลต่อลิตร [18] สำหรับสารสกัดชั้นเฮกเซนพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งชนิดมอลเทสและซูเครส โดยมาจากสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สอดคล้องกับรายงานที่ได้รวมรวบสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์จากสมุนไพรที่มีศักยภาพในการยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส [17] และมีรายงานถึงการแยกสาร limonene โดยเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่สามารถพบได้จากใบมะม่วงหิมพานต์ในปริมาณสูงถึง 85.9 เปอร์เซ็นต์ [19] และมีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส [20] นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีการใช้สารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำ โดยให้หนูและกระต่ายที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานรับประทาน พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ โดยที่สารสกัดไปมีผลต่อการทำงานของเบต้าเซลล์ ส่งผลให้การหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในปริมาณที่มากขึ้น เป็นผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง [21, 22] จะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์นั้นมีศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลหลายกลไกทั้งชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต และการไปกระตุ้นการหลั่งของอินซูลิน

จากผลวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดยอดมะม่วงหิมพานต์จากสารสกัดชั้นเมทานอลมีศักยภาพในการออกฤทธิ์คู่ (dual function) ที่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไกลเคชันและแอลฟากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูทั้งมอลเทสและซูเครส แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งจะต้องมีการแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ รวมทั้งศึกษากลไกการการยับยั้ง เพื่อเป็นข้อมูลที่ใช้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวาน เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการรักษา และใช้ป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2560 จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช)

เอกสารอ้างอิง

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998;21(9):1414-31.
2. Mohammad S, Ahmad J. Management of obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in primary care. Diabetes Metab Syndr 2016;10(3):171-81.
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):3071-109.
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):329-38.

6. Lopes MMdA, Miranda MRAd, Moura CFH, 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(3):325-32.
7. Mun'im A, Katrin AA, Mahmudah KF, Mashita M. Screening of α-glucosidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants. Int J Med Aromatic Plants 2013;3(2):144-50.
8. Suantawee T, Wesarachanon K, Anantsuphasak K, Daenphetploy T, Thien-Ngern S, Thilavech T, et al. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. J Food Sci Technol 2015;52(6):3843-50.
9. Damsud T, Grace M, 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):639-41.
10. Hossain J, Tsujiyama I, Takasugi M, Islam A, Biswas 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):261-8.
11. 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):1778-89.
12. 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):121-31.
13. Suantawee T, 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(PtA):814-21.
14. 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.
15. Konan A, Bacchi M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethnolic extract from the chashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. J Ethnopharmacol 2007;112(2):237-42.
16. Arya R, Babu V, Lllyas M, Nassim T. Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. J Indian Chem Soc 1989;66:67-8.
17. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α-Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Sci Human Wellness 2014;(3-4):136-74.
18. Chu Y, Wu S, Hsieh J. Isolation and characterization of α-glucosidase inhibitory constituents from *Rhodiola crenulata*. Food Res Int 2014;(57):8-14.

19. Moronkola OD, Kasali AA, Ekundayo O. Composition of the limonene dominated leaf essential oil of Nigerian *Anacardium occidentale*. J Essent Oil Res 2011;19(4):351-3.
20. Zhao J, Zhou XW, Chen XB, Wang QX. α-Glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. Chem Nat Compd 2009;45(2):244-6.
21. Ojewole JA. 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.
22. Jaiswal YS, Tatke PA, Gabhe SY, Vaidya AB. Antidiabetic activity of extracts of *Anacardium occidentale* Linn. leaves on *n*-streptozotocin diabetic rats. J Tradit Complement Med 2017;7(4):421-7.