

ผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดเห็ดเห็ด (*Boletus griseipurpureus*)

α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Crude *Boletus griseipurpureus*, Corner Extracted

สุวรรณา ผลไหม¹, ฐิติกร พรหมบรรจง^{1*}, สุไลหมาน หมาดไทยด², สิริวรรณ ปานเมือง¹
Suwanna Pholmai¹, Thitikorn Prombanchong^{1*}, Sulaiman Madyod², Siriwan Panmuang¹

¹สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

¹Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

²Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดส โดยการใช้สารสกัดเห็ดเห็ด ซึ่งเป็นเห็ดป่าที่รับประทานได้ เอนไซม์ทั้งสองนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในระบบทางเดินอาหาร การยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้เป็นวิธีการหนึ่งในการจัดการกับโรคเบาหวานซึ่งเกิดจากการเผาผลาญที่ไม่ปกติ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง สารสกัดเห็ดจากเห็ดเห็ดที่ใช้ในการศึกษาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเห็ดจากตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.082 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.037 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าอะคาโบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8 ± 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเห็ดเห็ดในการใช้เป็นโภชนเภสัชสำหรับการบำบัดโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: เบาหวาน สารสกัดเห็ด เห็ดเห็ด เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

* Corresponding author : thitikorn.p@rmutsv.ac.th

Abstract

This research aimed to investigate the inhibitory effects of crude extracts of Samet mushrooms, an edible wild mushroom, on the enzymes alpha-amylase and alpha-glucosidase. These two enzymes play crucial roles in carbohydrate digestion within the digestive system. Inhibiting these enzymes is a strategy for managing diabetes, a metabolic disorder that results in elevated blood sugar levels. The Samet mushroom extracts used in this study were obtained using hexane, dichloromethane, and methanol as solvents. The results revealed that the crude extract from methanol exhibited the strongest inhibitory effects on alpha-amylase and alpha-glucosidase, with IC_{50} values of 0.082 ± 0.01 mg/mL and 0.037 ± 0.01 mg/mL, respectively. The methanol crude extract demonstrated significantly higher inhibitory activity compared to acarbose, a diabetes medication with an IC_{50} value of 4.8 ± 1.00 mg/mL. This research highlights the potential of Samet mushrooms as a nutraceutical for the treatment of diabetes.

Keywords: diabetes, crude extracts, *Boletus griseipurpureus* Corner, α -glucosidase, α -amylase

1. บทนำ

ปัจจุบันโรคเบาหวานมีแนวโน้มสูงขึ้นในทั่วโลกก่อให้เกิดเป็นปัญหาหลักทางสาธารณสุข โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin dependent diabetes) โดยที่ร่างกายนั้นสามารถสร้างและหลั่งอินซูลินได้ แต่อินซูลินที่หลั่งมานั้นไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ (Murai et al., 2002) เนื่องจากเกิดจากระบบต่อมไร้ท่อทำงานผิดปกติ มีสาเหตุจากพันธุกรรม หรือตับอ่อนสร้างฮอร์โมนอินซูลินน้อยลง หรือเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (สาริซ สุนทรโยธิน และ ปฎิณัฐ บุรณะทรัพย์ขจร, 2555) โรคเบาหวานส่งผลให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกาย หรืออาจทำให้ระบบการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง ส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น อนุมูลอิสระในร่างกายมี 2 กลุ่ม คือ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) อนุมูลอิสระที่สร้างนั้นมาจากหลาย ๆ ปฏิกิริยาในร่างกาย ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส (glucose oxidation) กระบวนการออกซิเดชันของไลโคโปรตีน และกระบวนการรวมตัวระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน เมื่อร่างกายมีการสะสมอนุมูลอิสระจะส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคต่าง ๆ ตามมาในภายหลัง (Lao-ong et al., 2013; Nowotny et al., 2015) เช่น โรคหัวใจ ความดันสูง และโรคไต การทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง

การรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) และแอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และเดี่ยว ตามลำดับ การรักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็นแนวทางที่นิยม เพราะส่งผลให้การดูดซึมกลูโคสเข้ากระแสเลือดเกิดช้าลง (Derosa & Maffioli, 2012) ยาที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ อะคาโบส (acarbose) วอกลีโบส (voglibose) และมิกลิทอล (miglitol) ซึ่งเป็นตัวยามีผลลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังรับประทานอาหาร การยับยั้งด้วย

ยาดังกล่าวมีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย ได้แก่ อาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย และถ่ายเหลว (Borges de Melo et al., 2006) ดังนั้น เพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว จึงนำไปสู่การศึกษาแหล่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์จากพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งอาหารและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่บริเวณปาก (salivary amylase) โดยเอนไซม์ย่อยแบ่งให้เป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น (เดกตริน) ถัดจากนั้นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ตับอ่อนหลั่งออกมา (pancreatic amylase) ได้เป็นมอลโตส (maltose) และมอลโตไตรออส (maltotriose) จากนั้นเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จะย่อยคาร์โบไฮเดรตสายสั้น (oligosaccharides) ให้กลายเป็นกลูโคส การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสสามารถลดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากปฏิกิริยา

ด้วยยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส (α -amylase inhibitor, α -AI) มี 2 ประเภทคือ โปรตีนและไม่ใช่น้ำโปรตีน พบได้ในธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว ด้วยยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสชนิดไม่ใช่น้ำโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์และมีหลายชนิด ได้แก่ อะคาร์โบส (acarbose) , ไอโซอะคาร์โบส (isoacarbose), และไซโคลเดกตริน (cyclodextrins) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย ปัจจุบันใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งจะพบที่บริเวณลำไส้เล็ก แบ่งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ออกเป็น 2 ชนิด คือ แอลฟาไกลูโคซิเดส 1 พบใน แบคทีเรีย ยีสต์ และแมลง โดยมีหมู่เร่งปฏิกิริยา ได้แก่ แอสพาราจีน ฮิสทีดิน และไทโรซีน จำเพาะกับสารตั้งต้นชนิดเฮเทอโรจีนัส (heterogenous) ส่วนเอนไซม์กลูโคซิเดสอีกชนิด คือแอลฟาไกลูโคซิเดส 2 พบในเชื้อรา พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีหมู่เร่งปฏิกิริยา ได้แก่ ทริปโตเฟนและแอสพาราจีน จะจำเพาะกับสารตั้งต้นชนิดโฮโมจีนัส (homogenous) เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่บริเวณผนังเซลล์ของลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (Johnston et al., 1994)

กลไกการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสเกิดในตับอ่อน และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเกิดในลำไส้เล็ก การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองส่งผลให้ระดับของน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง ซึ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเป็นการชะลอ และลดอัตราการสลายคาร์โบไฮเดรต (Fujisawa et al., 2005)

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และแอลฟาไกลูโคซิเดสจากสารสกัดเห็ดเสม็ด ซึ่งเห็ดเสม็ดเป็นเห็ดธรรมชาติที่ขึ้นตามพื้นดินที่มีใบไม้ปกคลุมในป่าเสม็ดขาวหรือป่ายูคาลิปตัส เห็ดเสม็ดเป็นเห็ดที่มีคาร์โบไฮเดรตต่ำประมาณร้อยละ 6-11 มีไขมันต่ำ มีโปรตีนที่สูง มีคุณสมบัติช่วยลดคอเรสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด ซึ่งในอนาคตอาจใช้เห็ดเสม็ดทดแทนยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานซึ่งส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วยเบาหวาน

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดเห็ดเสม็ด

3. วิธีดำเนินการวิจัย

1) การเตรียมสารสกัดเห็ดเสม็ด

นำเห็ดเสม็ดที่เก็บได้ในเดือนมิถุนายน (ช่วงฤดูกลาง) อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง มาล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้น้ำเห็ดเสม็ดแห้ง 100 กรัม ทำการสกัด (maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากบริษัท Merck, Germany ปริมาตร 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้นาน 7 วัน ทำการสกัด 3 ครั้ง และกรองสารละลายด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดเห็ดจากเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล เพื่อบำบัดผลผลิตดั่งสมการและเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันการสัมผัสกับแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลโคซิเดส

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{100 \text{ กรัม (น้ำหนักเห็ดเสม็ดแห้งที่ใช้ในการสกัด)}} \times 100 \quad (1)$$

2) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้รับการปรับปรุงตามงานวิจัยของ Luyen et al. (2013) มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากสารตั้งต้นไปสู่ผลิตภัณฑ์ โดยใช้แป้งมัน (potato starch) เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา ซึ่งแป้งมันจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจนกลายเป็นน้ำตาล การตรวจสอบปริมาณแป้งที่เหลืออยู่จะใช้สารละลายไอโอดีน ขั้นตอนการทดลองเริ่มจากการเตรียมสารตั้งต้นของเอนไซม์โดยการชั่งแป้งมัน 0.1 กรัมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นต้มแล้วรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเตรียมสารสกัดเห็ดเสม็ดที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.03-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พร้อมกับสารละลายแป้ง 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบ่มไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase from hog pancreas จากบริษัท Sigma Chemical) ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่ออีก 15 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไอโอดีน 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์อะไมเลสตามสูตร โดยใช้ยาอะคาโบส ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมเอนไซม์อะไมเลส
 A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติมเอนไซม์อะไมเลส

3) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยดัดแปลงวิธีการของ Babu et al. (2001) ใช้ p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNP-G) จากบริษัท Calbiochem; Merck, Germany เป็นสารตั้งต้นที่ไม่มีสีที่ไฮโดรไลซ์เป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยแอลฟาไกลูโคซิเดสจะเปลี่ยนเป็น p-nitrophenol ซึ่งเป็นสารสีเหลือง การทดลองขั้นแรกเตรียมสารสกัดเห็ดเสม็ดที่ความเข้มข้น 0.02-0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยเติมบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 1 โมลาร์ pH 6.9 และ เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*) จากบริษัท Sigma Chemical ที่มีความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม PNP-G ด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 โมลาร์ ประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้อะคาร์โบสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารสกัด
 A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติมสารสกัด

4) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของส่วนสกัดเห็ดเสม็ดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และค่า IC_{50} สำหรับการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิด แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบซ้ำ 3 ครั้งทุกการทดลอง วิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4. ผลการวิจัย

1) การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

ตัวอย่างเห็ดเสม็ดถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ซึ่งสารสกัดเมทานอลให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งเท่ากับร้อยละ 6.95 ในขณะที่ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเท่ากับร้อยละ 1.59 และเฮกเซนเท่ากับร้อยละ 0.35 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

2) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ทดสอบสารสกัดหยาบของเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลของเห็ดเสม็ด ในด้านคุณสมบัติฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาอะไมเลส ใช้ร่วมกับอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 0.03-0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นยา

เบาหวานชนิดที่ 2 ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดส่วนเมทานอลของเห็ดที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุดคือ ร้อยละ 72±1.82 (ตารางที่ 1) ส่วนอะคาร์โบสมีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 4.8±1.00 (ตารางที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของส่วนสกัดเมทานอลกับส่วนสกัดไคคลอโรมีเทน และส่วนสกัดเฮกเซน พบว่าสารสกัดส่วนเมทานอลมีร้อยละการยับยั้งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ผลการทดสอบพบว่าเมื่อเปรียบเทียบส่วนสกัดเมทานอลกับอะคาร์โบส พบค่า IC₅₀ ของส่วนสกัดเมทานอลคือ 0.0820.01 (ตารางที่ 3) และค่า IC₅₀ ของอะคาร์โบสเท่ากับ 1.181±0.04 ซึ่งพบว่าส่วนสกัดจากเห็ดเมทานอลมีประสิทธิภาพมากกว่าอะคาร์โบสในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ตารางที่ 1 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของส่วนสกัดเห็ดเสม็ดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส			
	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.03	0.06	0.09	0.12
ส่วนสกัดเมทานอล	20±1.75 ^a	40±1.10 ^b	52±1.15 ^c	72±1.82 ^d
ส่วนสกัดไคคลอโรมีเทน	10±0.70 ^a	25±1.27 ^b	37±1.25 ^c	51±1.61 ^d
ส่วนสกัดเฮกเซน	7±1.50 ^a	10±1.87 ^b	25±1.25 ^c	34±0.17 ^d
อะคาร์โบส	1.5±0.95 ^a	2.3±0.85 ^b	4.1±1.68 ^c	4.8±1.00 ^d

^{a,b,c} อักษรภาษาอังกฤษในแนวนอนที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

3) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นวิธีที่ช่วยชะลอการสลายตัวของโพลิโกแซคคาไรด์ในลำไส้เล็ก ส่งผลให้น้ำตาลดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ช้าลง ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด การทดสอบนี้ได้ใช้ส่วนสกัดจากเห็ดเสม็ดในตัวทำละลายเมทานอล ไคคลอโรมีเทน และเฮกเซนที่ความเข้มข้น 0.02-0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้อะคาร์โบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลการทดสอบพบว่าการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยเฉพาะสารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้สูงสุดถึงร้อยละ 94±1.57 (ตารางที่ 2) ซึ่งสูงกว่าการยับยั้งของอะคาร์โบสที่มีเพียง 0.97%±0.07 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากเห็ดเสม็ดมีประสิทธิภาพดีกว่าอะคาร์โบสอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดสอบค่า IC₅₀ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดเมทานอลมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.037±0.01 (ตารางที่ 3) ในขณะที่อะคาร์โบสมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.76±0.09 จากผลการทดลองนี้ สารสกัดเมทานอลจากเห็ดเสม็ดจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสดีกว่าอะคาร์โบสอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 2 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของส่วนสกัดจากเห็ดเสม็ดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.02	0.04	0.06	0.08
ส่วนสกัดเมทานอล	45±0.70 ^a	59±2.76 ^a	84±1.04 ^c	94±1.57 ^d
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	23±0.26 ^a	37±1.25 ^b	55±1.87 ^c	64±0.95 ^d
ส่วนสกัดเฮกเซน	15±1.01 ^a	26±1.53 ^b	45±2.19 ^c	51±0.26 ^d
อะคาร์โบส	0.33±0.04 ^a	0.61±0.05 ^b	0.86±0.06 ^c	0.97±0.07 ^d

^{a,b,c} ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของส่วนสกัดเห็ดเสม็ดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของส่วนสกัดจากเห็ดเสม็ดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสได้
ร้อยละ 50 (IC₅₀)

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	α-amylase	α-glucosidase
ส่วนสกัดเมทานอล	0.082±0.01 ^a	0.037±0.01 ^b
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	1.20±0.08 ^a	0.058±0.01 ^b
ส่วนสกัดเฮกเซน	1.90±0.13 ^a	0.75±0.07 ^b
อะคาร์โบส	1.181±0.04 ^a	2.76±0.09 ^b

^{a,b,c} ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของส่วนสกัดเห็ดเสม็ดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

5. อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของส่วนสกัดเห็ดเสม็ดด้วยเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าสารสกัดจากเมทานอลจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสสูงกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน จึงสามารถสกัดสารสำคัญที่มีขั้วสูงจากเห็ดเสม็ด ซึ่งสารที่มีขั้วสูงในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและแอลฟาไกลูโคซิเดสดีกว่าอะคาร์โบส (Yin et al., 2014) การศึกษาส่วนใหญ่พบว่าสารที่มีขั้วสูงในสารสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสารที่มีขั้วสูงขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โดยการออกฤทธิ์เสริมกันหรืออาจเป็นองค์ประกอบหลักที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ หรือแย่งจับบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ (Borges de Melo et al., 2006) ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับซับสเตรตตามธรรมชาติได้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดในส่วนเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 12.32±5.21 และ 10.54±1.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ธนากรณ ดำสุด และ ชุตติมา แก้วพิบูลย์, 2016)

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสำคัญที่มีขั้วสูงที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ซึ่งมีน้ำตาลต่อกับโครงสร้าง (Thanakosai et al., 2013) และพบว่าการเปลี่ยนตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลบนโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ (Tadera et al., 2006)

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) ประจำปีงบประมาณ 2564 นักวิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือต่าง ๆ สำหรับการวิจัยครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

ชนากรณ์ คำสุด และ ชุตติมา แก้วพิบูลย์. (2016).ฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของส่วนสกัดจากผักสลัดน้ำ.

วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร, 11(2), 65-74. https://li01.tci-thaijo.org/index.php/PRRJ_Scitech/article/view/64892

สารัช สุขทรโยธิน และปณิณัฐ บุรณะทรัพย์ขจร. (2555). ตำราโรคเบาหวาน DIABETES MELLITUS. กรุงเทพมหานคร : คณะแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Babu, G. V. R., Kavitha, J., & Subbaraju, G. V. (2001). Justicia lignans: Part 8-Lignans from *Justicia orbiculata* Wall. *Indian J Chem, Sect. B* 40, 864-866.

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. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.055>

Derosa, G., & Maffioli, P. (2012). Alpha-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*, 8, 899-906. http://doi:10.5005/jp/books/12165_5

Fujisawa, T., Lkegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y., & Ogihara, T. (2005). Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism*, 54(3), 387-390. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.10.004>

Johnston, P. S., Coniff, R. F., Hoogwerf, B. J., Santiago, J. V., & Pi-Sunyer, F. X. A. (1994). Effects of the Carbohydrase Inhibitor Miglitol in Sulfonylurea-treated NIDDM Patients. *Diabetes Care*, 17, 20-29. <https://doi.org/10.2337/diacare.17.1.20>

- Lao-ong, T., Jarukamjoorn, K., & Chatuphonprasert, W. (2013). Impacts of Antioxidative System and Oxidative Stress on Progression of Diabetic Mellitus. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 1-14. <http://doi.org/10.14456/ijps.2013.1>
- Luyen, N. T., Hanh, T. T. H., Binh, P. T., Dang, N. H., Van Minh, C., & Dat, N. T. (2013). Inhibitors of α -glucosidase, α -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 322-325. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.03.015>
- Murai, A., Iwamura, K., Takada, M., Ogawa, K., Usui, T., & Okumura, J. (2002). Control of postprandial hyperglycaemia by galactosyl maltobionolacton and its novel anti-amylase effect in mice. *Life Sciences*, 71(12), 1405-1415. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01844-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01844-1)
- Nowotny, K., Jung, T., Hohn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194-222. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.03.015>
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuda, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 149-153. <http://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>
- Thanakosai, W., & Phuwapraisirisan, P. (2013). First identification of alpha-glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Natural Product Communications*, 8(8), 1085-1088. <http://doi.org/10.1177/1934578X13008008>
- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plant. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 136-174. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>