ประสิทธิภาพของสารสกัดจากดอกคำฝอยต่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส
The Effect of Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Crude Extract on α-Amylase Activity

สมฤดี อันทะบาล[1] สิริลักษณ์ สำราญรถ[1] กมณชนก วงศ์สุขสิน[1]
ปนัดดา ผ่านสำแดง[1] วิลาสินี สถิตเดชกุญชร[1] และวนิดา ชูหมื่นไวย[1]*
Somreudee Anthaban[1], Sirilak Samranrot[1] Kamonchanok Wongsooksin[1]
Panadda Phansamdang[1], Wilasinee Sathitdetkunchorn[1] and Vanida Choomuenwai[1]*

รับบทความ 10 เมษายน 2565/ ปรับแก้ไข 24 ธันวาคม 2565/ ตอบรับบทความ 26 ธันวาคม 2565
Received: April 10, 2022/ Revised: November 24, 2022/ Accepted: December 26, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที โดยศึกษาจลนศาสตร์ของรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสระหว่างสารสกัดหยาบจากดอกคำฝอยกับยาอะคาร์โบส จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนทั้งสามแบบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5.331 - 5.726 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยาอะคาร์โบสมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาจลนศาสตร์ของรูปแบบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่า สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นแบบผสมเช่นเดียวกับยาอะคาร์โบส

คำสำคัญ : โรคเบาหวาน เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สารสกัดดอกคำฝอย จลนศาสตร์เอนไซม์

---

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
[1] Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Nakhonratchasima Rajabhat University
Coresponding Authour E – mail address ; vanida.c@nrru.ac.th

Abtract

The objective of this research were to evaluate the effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) aqueous extracts on **α**-amylase activity and study enzyme kinetic of these crude extract on **α**-amylase inhibition compared with Acarbose. Dried safflowers were extracted with boiling water for 5, 10 and 15 minutes, respectively. Compared with acarbose, the inhibitory of **α**-amylase activity of all *Carthamus tinctorius* L. extracts were weaker, however three crude extracted with various times of extraction exhibited not significantly different of IC_{50} on **α**-amylase, with the IC_{50} value ranges from 5.331 – 5.726 mg/mL. Acarbose inhibited enzyme **α**-amylase with IC_{50} value of 0.056 ± 0.005 mg/mL. In addition, the enzyme kinetic analysis of both 15-minute extract and acarbose revealed that they displayed a mix-type-inhibition mode on **α**-amylase activity.

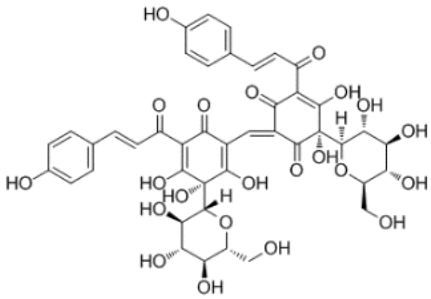
Keywords : Diabetes, Alpha-amylase, *Carthamus Tinctorius* L. crude extract, Enzyme kinetics

บทนำ

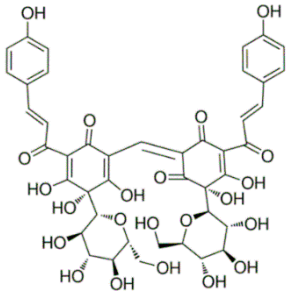
โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อที่สำคัญมากในปัจจุบัน จากข้อมูลของสมาคมเบาหวานแห่งประเทศไทย พบว่าโรคเบาหวานในประชากรอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป พบว่าคนไทยเป็นโรคเบาหวานมากขึ้น จากร้อยละ 6.9 เป็นร้อยละ 8.9 ซึ่งเบาหวานชนิดที่ 2 พบมากที่สุด (ประมาณร้อยละ 90) ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2559) (จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2553) โรคเบาหวานเกิดจากภาวะดื้ออินซูลิน (Insulin resistance) เมื่อรับประทานอาหาร ตับอ่อนพยายามผลิตอินซูลิน เพื่อนำน้ำตาลจากอาหารเข้าเซลล์ไปใช้เป็นพลังงาน แต่ภาวะดื้ออินซูลิน ทำให้อินซูลินทำหน้าที่ลดน้ำตาลในเลือดได้ไม่ดี ส่งผลให้น้ำตาลในเลือดสูง เกิดเป็นเบาหวาน (จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2553) และเมื่อเป็นเบาหวานที่ไม่ได้รักษา น้ำตาลในเลือดสูง เป็นระยะเวลานาน ยังส่งผลให้เกิดภาวะเป็นพิษ ต่อเซลล์ตับอ่อน (Glucotoxicity) ทำให้ตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่ได้เกิดภาวะขาดอินซูลิน (Insulin secretory defect) (จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2553) โดยทั่วไปแล้วพืชสมุนไพรหลายชนิดมีสรรพคุณเป็นยาบำรุงร่างกาย บำบัด รักษาโรค ซึ่งคนส่วนใหญ่นิยมนำพืชสมุนไพรมาใช้รักษาโรคโดยการบริโภคในรูปแบบต่าง ๆ เช่น กินสด ต้ม ชง บด เป็นต้น (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539) เนื่องจากการใช้ชีวิตของผู้คนมีความเร่งรีบ ดังนั้นเพื่อให้ง่ายต่อการบริโภครูปแบบในการผลิตจึงมาอยู่ในรูปแบบการชงแบบชา

งานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยต้องการสกัดสารออกฤทธิ์จากดอกคำฝอย โดยคำฝอยมีชื่อสามัญว่า คำยอง หรือ ดอกคำ Amercac thistie หรือ False saffron หรือ Safflower อยู่ในวงศ์ Compositae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Carthamus tinctorius* Linn. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์คำฝอยเป็นไม้ล้มลุกลำต้นเป็นสัน เกลี้ยง ใบเป็นใบเดี่ยว ไม่มีก้าน หรือก้านใบสั้น เรียงสลับ รูปวงรี ขอบขนานหรือรูปใบหอกขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ปลายใบเป็นหนามแหลม ดอกเป็นช่อออกที่ปลายยอด มีดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมากกลีบดอกมีสีเหลืองเมื่อแรกออก แล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงอมส้ม ใบประดับแข็งเป็นหนามรองรับช่อดอก ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก เมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็กสีขาว (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านยีสต์ ต้านไวรัส ต้านจุลชีพในพืช ช่วยคลายกล้ามเนื้อลาย ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ กระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ ต้านการชัก กดภูมิคุ้มกัน กระตุ้นภูมิคุ้มกัน กดการสร้างแอนติบอดี้ ทำให้แพ้ ต้านการแพ้ ลดน้ำตาลในเลือด ลดการอักเสบเหนี่ยวนำให้สร้างพรอสตาแกรนดิน ยับยั้งเนื้องอก ขยายเส้นเลือด ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ยับยั้งการขาดเลือดไปเลี้ยงหัวใจ ลดการตีบตันของเส้นเลือด ลดความดันโลหิต ยับยั้งฟันผุ กระตุ้นการงอกของเส้นผม ลดอาการบวมของสมอง ช่วยฆ่าพยาธิ แก้ปวด แก้แพ้ ต้านความเป็นพิษต่อตับ เพิ่มการหลั่งน้ำดี ป้องกันรังสีต้านการขาดออกซิเจน ยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท กระตุ้นการคลอด

(นันทวัน บุณยะ ประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539) และสารสำคัญที่พบในดอกคำฝอยมีสารคาร์ทามิน (Carthamin) เป็นสีแดงสดไม่ละลายน้ำ และ แซฟฟาว-เวอร์เยลโลว์ (Safflower yellow) ละลายน้ำได้ สูตรโครงสร้างของสารทั้งสองชนิดดังแสดงในรูปที่ 1 (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)



คาร์ทามิน



แซฟฟาวเวอร์เยลโลว์

รูปที่ 1 โครงสร้างของ คาร์ทามินและแซฟฟาวเวอร์เยลโลว์

การทดสอบความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดนิยมนำสารสกัดมาตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้ง และคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งมีความสำคัญกับโรคเบาหวาน ถ้าสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสก็จะสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2560) ในธรรมชาติพืชสมุนไพรหลายชนิดมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เช่น dracoflavan B (Toh, Z. et al., 2012) Ursolic acid (Peddio, S. et al., 2022)

เมื่อเทียบกับยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานทั้ง 3 ชนิด อะคาร์โบส (Acarbose) ไมกลิทอล (Miglitol) โวกลิโบส (Voglibose) ซึ่งตัวยาเหล่านี้ จะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมากจึงต้องมีความระมัดระวังในการรับประทานยา โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่แพ้ยาไม่สามารถรับประทานยาเหล่านี้ได้ (Peddio, S. et al., 2022) ในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากธรรมชาติจะมีผลข้างเคียงน้อยจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีอาการแพ้ยาได้ (Agarwal, P., & Gupta, R., 2016, Toh, Z. et al., 2012)

คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดจากดอกคำฝอย โดยนำดอกคำฝอยมาสกัดในรูปแบบการชงชาที่เวลา 5 10 และ 15 นาที แล้วนำสารสกัดหยาบมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีแป้ง (Soluble starch) เป็นซับสเตรทและเพื่อวิเคราะห์ว่าสารสกัดจากดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเวลาใดมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีที่สุด ในการทดลองจะเปรียบเทียบผลของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสด้วยค่า IC_{50} จากนั้นนำสารสกัด ที่มีค่า IC_{50} ดีที่สุดมาศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น FREEZONE 4.5 บริษัท Labconco Corporation

2) เครื่องยูวี - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV - Visible spectrophotometer) รุ่น UH-5300 บริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

3) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-14 บริษัท Memmert

4) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น AG204 บริษัท Mettler Toledo

5). เตาให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น Thermolyne Cimarec® 3 12x12 Ceramic Top Hot Plate Model HP47135-60 บริษัท American laboratory traddding

6) เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate stirrer) รุ่น C-MAG HS 7 บริษัท IKA

7) เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น UB 10 บริษัท Denver

8) ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร รุ่น Pipette Man P-200 บริษัท Gison

สารเคมี

1) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase enzyme; EC 3.2.1.1) ชนิด Food grade

2) ยาอะคาร์โบส (Acarbose®) ยี่ห้อ Glucobay บริษัท Bayer

3) กลูโคส (D-Glucose) ชนิด AR grade บริษัท Ajex Finechem

4) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate anhydrous; Na_2HPO_4) ชนิด AR grade บริษัท Quality Reagent Chemical

5) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphateanhydrous; Na_2HPO_4) ชนิด AR grade บริษัท Quality Reagent Chemical

6) แป้ง (Soluble starch) ชนิด AR grade บริษัท Ajex Fine chem

7) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ชนิด AR grade บริษัท CARLO ERBA REAGENTS

8) โพแทสเซียมโซดียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate; $KNaC_4H_4O_6$) ชนิด AR grade บริษัท Ajex Fine chem

9) 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid; DNS) บริษัท Sigma - Aldrich

สารตัวอย่าง

ดอกคำฝอยได้มาจากการซื้อที่ตลาดแม่กิมเฮง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง นครราชสีมา การสกัดดอกคำฝอยเป็นทำการสกัดเลียนแบบการชงชาโดยนำดอกคำฝอยมาแช่ในน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที ตามลำดับ กรองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดลดความดันจนแห้ง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส ประยุกต์มาจาก ศุภมาส สบายจิตต์ และคณะ (2560)

วิธีการทดลอง

1) การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคส ประยุกต์มาจาก ศุภมาส สบายจิตต์ และคณะ (2560) โดยปิเปตสารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ยกเว้นแบลงค์ เติมสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่น้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยาอีกครั้ง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดลองออกมาจากอ่างน้ำเดือด แล้วนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องทันที เพื่อทำให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 522 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเป็น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดลองได้กราฟมาตฐานเป็น $y = 4.358x - 0.2336$, $R^2 = 0.9966$

2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ประยุกต์มาจาก Wei, M. et al. (2021). ปิเปตสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ยกเว้นแบลงค์ ใส่ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาทีเติมสารละลายน้ำแป้ง ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรพีเอช 5.5 เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดลองออกมาจากอ่างน้ำเดือด แล้วนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องทันที เพื่อทำให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3) การศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยการทดลองนี้ประยุกต์มาจาก Wei, M. et al. (2021). เริ่มจากปิเปตสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่สกัดเป็น

เวลา 5 นาที ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายน้ำแป้ง ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ยกเว้นแบลงค์ ใส่ 20 มิลลิ-โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดลองออกมาจากอ่างน้ำเดือด แล้วนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องทันที เพื่อทำให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.3.1 - 2.4.3.7 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งเป็น 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์

หมายเหตุ : สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 10 และ 15 นาที และยาอะคาร์โบส ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากนั้นนำสมการที่ได้จากกราฟมาคำนวณความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอย โดยแทนค่า y เท่ากับ 50 แล้วกลับสมการหาค่า x ซึ่งค่า x ที่ได้ คือ ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยได้ร้อยละ 50

4) การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ๖ ประยุกต์มาจาก รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์ (2555) ปิเปตสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดลอง 5 หลอด โดยแต่ละหลอดเติมสารละลายน้ำแป้ง เข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่น้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยาอีกครั้ง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดลองออกมาจากอ่างน้ำเดือด แล้วนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องทันที เพื่อทำให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 522 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

แล้วนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ (Lineweaver–Burk plot) ระหว่าง 1/[S] กับ $1/V_0$ ซึ่ง V_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร และ [S] คือ ความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้ง ที่ใช้ในการทดลอง ทำการทดลองเช่นเดิมโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย จากดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนที่เวลา 15 นาที เป็น 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

หมายเหตุ : 1) วิเคราะห์จลนศาสตร์ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จากยาอะคาร์โบส เข้มข้น 0.0046 0.0278 0.1666 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกัน

2) เตรียมสารละลายที่ไม่มีสารยับยั้ง ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 แทนตัวอย่าง

3) ใช้ AovSum : Analysis of variance with contransts sum ในการวิเคราะห์สถิติ

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

1) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

งานวิจัยนี้ใช้สารสกัดหยาบเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการทดลอง คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อดูว่ากิจกรมการทำงานในแต่ละครั้งเท่ากันหรือไม่ ในทางปฏิบัติคณะผู้วิจัยเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

สาร	กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	เฉลี่ย	SD
สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	0.1183	0.0084

จากตารางการทดลองนี้ได้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.1183 ± 0.0084 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2) ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากผลการทดลองเรื่อง สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากสารสกัดหยาบดอกคำฝอย เมื่อนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่ได้มาจากการแช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้ร้อยละ 50 ที่ได้จากการแช่สกัดด้วยน้ำร้อนที่เวลาต่าง ๆ และยาอะคาร์โบส ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยใช้โปรแกรม AovSum : Analysis of variance with contransts sum ในการวิเคราะห์สถิติ

สารสกัด	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	เฉลี่ย	SD
สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 5 นาที	5.405	0.404
สารสกัดหยาบดอกคำฝอย ที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 10 นาที	5.726	0.105
สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที	5.331	0.234
ยาอะคาร์โบส	0.056	0.005
ยาอะคาร์โบส*	0.0014	-

*[8] Figueiredo-González และคณะ (2016)

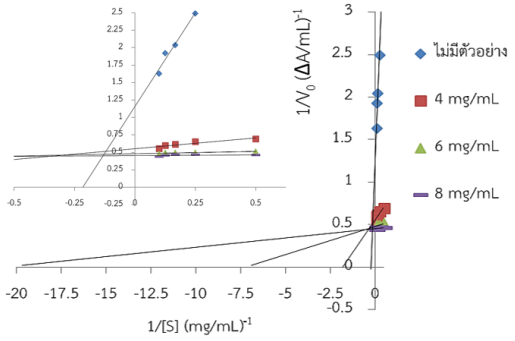
จากตารางพบว่า ค่า IC_{50} สารสกัดหยาบจากดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนทั้งสามแบบมีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (F-test = 1.73 และ p = 0.2547) โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5.331 – 5.726 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับยาอะคาร์โบส ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.056 ± 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าค่า IC_{50} ของยาอะคาร์โบสมีค่าต่ำกว่า แสดงว่า ยาอะคาร์โบสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบดอกคำฝอย

เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของยาอะคาร์โบสกับงานวิจัยของ [10] Figueiredo-González และคณะ (2016) พบว่ายาอะคาร์โบสมีค่า IC_{50} ที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากมีสภาวะในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยของ Figueiredo-González และคณะ ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ใช้ปริมาตรในการทดสอบที่น้อยกว่า ใช้อัตราส่วนของสารละลายต่างกัน และมีการใช้เทคนิคในการวิเคราะห์แตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี ส่วนงานวิจัยของ Figueiredo-González และคณะ ใช้เทคนิคไมโครเพลทในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องใช้ปริมาตรในการทดสอบที่น้อยกว่าค่า IC_{50} ที่ได้จึงมีค่าน้อย

กว่าด้วย และความแตกต่างหลายอย่างที่กล่าวมานี้จึงอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า IC_{50} ให้แตกต่างกัน

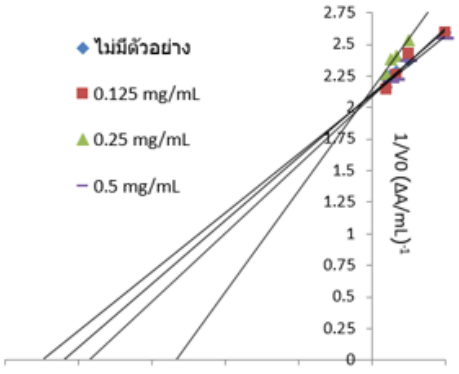
3) ผลการศึกษาจลนศาสตร์รูปแบบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

รูปแบบของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากกราฟในรูป 3.2 จะแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบดอกคำฝอยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นแบบผสม ซึ่งพิจารณาได้จาก เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยเพิ่มขึ้น ค่า V_{max} เพิ่มขึ้น ส่วนค่า K_m มีค่าลดลง ในส่วนรูปแบบของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ของยาอะคาร์โบส จะได้ผลดังแสดง ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 กราฟการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดหยาบอะคาร์โบส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากกราฟในรูป 3.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอะคาร์โบสต่างกัน ค่าตัดแกน Y ที่เป็นค่า $1/V_{max}$ เพิ่มขึ้นทำให้ค่า V_{max} ลดลง ส่วนค่า K_m ของปฏิกิริยานี้มีการเปลี่ยนแปลงที่มีค่าลดลงแต่ไม่ต่างกันมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบอะคาร์โบส มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นแบบผสม (Mix inhibition) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ [13] Wei, M. et al. (2021) ซึ่งใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัวอย่างเดียวกันแล้วพบว่า ยาอะคาร์โบสมีรูปแบบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นแบบผสม

ตารางที่ 3 ผลการคำนวณค่า V_{max} และค่า K_m ในการเขียนกราฟลายวีฟเวอร์เบิร์ก ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยและสารสกัดหยาบยาอะคาร์โบส

สารสกัด	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	V_{max} เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	K_m เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที	4.000	1.783	0.481
	6.000	2.108	0.173
	8.000	2.173	0.052
ยาอะคาร์โบส	0.125	0.531	1.094
	0.250	0.521	1.220
	0.500	0.520	0.820

หมายเหตุ : n = 3

จากตารางพบว่า ค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที มีค่ามากกว่าสารสกัดหยาบยาอะคาร์โบส โดยค่า V_{max} แสดงถึง ความเร็วในการสลายตัวของสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์กับซับสเตรท เพื่อเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ นั่นคือ สาร

สกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที เกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาหรือเกิดน้ำตาลได้ดีกว่ายาอะคาร์โบส และค่าคงที่ของไมเคลิส (K_m) ของสารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อน 15 นาที มีค่าน้อยกว่าสารสกัดหยาบยาอะคาร์โบส โดยค่า K_m แสดงถึง ความจำเพาะของเอนไซม์กับซับสเตรทว่าจับกันได้ดีเพียงใดเพื่อเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ นั่นคือ ในสภาวะที่มีสารสกัดหยาบดอกคำฝอยเป็นตัวยับยั้ง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะจับกับแป้งได้ดีกว่าในสภาวะที่มีสารสกัดหยาบยาอะคาร์โบสเป็นตัวยับยั้ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยาอะคาร์โบสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบดอกคำฝอย

สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากสารสกัดหยาบดอกคำฝอย ด้วยเทคนิคยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดหยาบดอกคำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนทั้งสามแบบ (5 10 และ 15 นาที) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยในการทดลองนี้ใช้ยาอะคาร์โบสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ซึ่งค่า IC_{50} ของยาอะคาร์โบสมีค่าเท่ากับ 0.056 ± 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของซับสเตรท แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟลายวีฟเวอร์เบิร์ก พบว่าสารสกัดหยาบดอก-คำฝอยที่แช่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบผสมเช่นเดียวกับยาอะคาร์โบส

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกคำฝอยจากน้ำที่เลียนแบบการชงชาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแบบผสม คล้ายกันกับยาอะคาร์โบส นั่นหมายถึงการดื่มน้ำชาจากดอกคำฝอยมีแนวโน้มที่จะช่วยลดน้ำตาลในเลือดได้ ทั้งนี้ควรนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดลองในสัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา และขอขอบคุณชั้นปฏิบัติการเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ และขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา สำหรับ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย. (2559). ความรู้ทั่วไป: เบาหวานชนิดที่ 2. สืบค้นเมื่อ 22 พฤศจิกายน 2565, จาก (http://www.dmthai.org/news_and_knowledge/1857.)

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. (2553). สมุนไพรลดไขมันในเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: เซเว่น พริ้นติ้ง กรุ๊ป.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. (2539). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ศุภมาส สบายจิตต์ สาธิยารัตน์ อาษากลาง และ สุกัญญา อำนาจเจริญ. (2559). การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคสซิเดสจากสารสกัดหยาบดอกคำฝอย. (ปริญานิพนธ์หลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา)

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. (2551). เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์. (2555). ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีต่อการทำงานของ เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์กลูโคซิเดส. (วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี)

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. (2560). เทคโนโลยีเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: โอเดียนสโตร์ :

Agarwal, P., & Gupta, R. (2016). Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Res. Rev. J. Med. Health Sci*, *5*(4), pp. 1-8.

Figueiredo-González, M., Grosso, C., Valevtáo, P., Andrade, P., (2016). **α**-Glucosidase and **α**-amylase inhibitor from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. pp. 118*: 322 - 327.

Peddio, S., Padiglia, A., Cannea, F. B., Crnjar, R., Zam, W., Sharifi-Rad, J., Rescigno, A., & Zucca, P. (2022). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **α**-amylase inhibitors as safe nutraceutical strategy against diabetes and obesity: An update review. *Phytotherapy research : PTR*, *36*(7), pp. 2803–2823.

Toh, Z. S., Wang, H., Yip, Y. M., Lu, Y., Lim, B. J., Zhang, D., & Huang, D. (2015). Phenolic group on A-ring is key for dracoflavan B as a selective noncompetitive inhibitor of **α**-amylase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *23*(24), pp. 7641–7649.

Wei, M., Tang, M., Wang, L., Cheng, X., Wu, Y., & Ouyang, J. (2021). Endogenous bioactive compounds of naked oats (*Avena nuda* L.) inhibit **α**-amylase and **α**-glucosidase activity. *LWT, 149*, pp. 111902.