



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index>

บทความวิจัย

ผลของอุณหภูมิการสกัดด้วยน้ำต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ ฟลาโวนอยด์จากใบกัญชาอบแห้ง

ครองศักดิ์ ภัทรนกก^{1*} รพีพรรณ กองตุม¹ รินราไพ พุทธิพันธ์² และ ศิริชดา เปล่งพานิช³

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี 70150 ประเทศไทย

² วิทยาลัยมหาวิทยาลัยและการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี 70150 ประเทศไทย

³ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 ประเทศไทย

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 24 มกราคม 2568

แก้ไข: 3 มิถุนายน 2568

ตอบรับการตีพิมพ์: 26 มิถุนายน 2568

ตีพิมพ์ออนไลน์: 29 มิถุนายน 2568

คำสำคัญ

แคนนาบิส

สารยับยั้งเอนไซม์

ฟลาโวนอยด์

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วยน้ำจากใบกัญชาอบแห้ง กระบวนการสกัดฟลาโวนอยด์ดำเนินการโดยใช้ที่อุณหภูมิ 40, 80 และ 100 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ดำเนินการโดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetry Assay และการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสใช้วิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS) Assay ผลการศึกษาพบว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดที่ 1.12 mg QE/g extract ฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้เป็นฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ซึ่งละลายน้ำได้ดี และมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยการวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 97.36 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับอะคาโบสซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.81 µg/mL ผลการทดลองยืนยันว่าอุณหภูมิของน้ำที่สูงช่วยเพิ่มการละลายและการปลดปล่อยฟลาโวนอยด์ออกมาอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากใบกัญชาเพื่อช่วยระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่สอง และส่งเสริมการใช้ทรัพยากรจากพืชสมุนไพรในทางการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกอย่างยั่งยืน

บทนำ

เบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes mellitus) เป็นภาวะที่พบมากในผู้ป่วยเบาหวาน คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยส่วนใหญ่พบในผู้ใหญ่หรือผู้สูงอายุ สาเหตุหลักเกิดจากภาวะดื้ออินซูลิน (Insulin resistance) ส่งผลให้อินซูลินทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ และทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น (Zimmet et al., 2001) ปี พ.ศ. 2565 ประเทศไทยมีผู้ป่วยเบาหวานในระบบการรักษาของกระทรวงสาธารณสุขประมาณ 5 ล้านคน โดยพบผู้ป่วยเบาหวานชนิด 2 รายใหม่ในกลุ่มคนอายุ 15 ปีขึ้นไปอยู่ที่ 9.2 เปอร์เซ็นต์ของประชากร หรือคิดเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 3 แสนคนต่อปี (Lertdetkajorn, 2022) การรักษาเบาหวานชนิดที่ 2 จำเป็นต้องควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม หนึ่งในวิธีการรักษาที่นิยมใช้คือการใช้ยาในกลุ่มสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ได้แก่ อะคาโบส (Acarbose) และ มิกลีทอล (Miglitol) โดยออกฤทธิ์ชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตในลำไส้เล็ก ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นช้าลงอย่างมีประสิทธิภาพ จึงไม่ก่อให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบสำคัญของยาในกลุ่มนี้ ข้อจำกัดของยาคือการเกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืดและท้องเสีย ทำให้มักต้องใช้ร่วมกับยาเบาหวานกลุ่มอื่นเพื่อลดผลกระทบจากผลข้างเคียงของยา (Dirir et al., 2022)

ประเทศไทยได้ปลดล็อกกัญชาออกจากบัญชียาเสพติดในปี พ.ศ. 2565 เพื่อส่งเสริมการใช้ในด้านสุขภาพและการแพทย์ การเปิดกว้างทางกฎหมายนี้ได้สร้างโอกาสใหม่ในการศึกษาศักยภาพของกัญชา รวมถึงการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ชากัญชา (Yimsaard et al., 2023) มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกและใบของต้นกัญชา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส รวมถึงเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เช่น เอนไซม์ไดเปปติเดิลเปปติเดส-4 (dipeptidyl peptidase-4) และเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) สารสำคัญในดอกกัญชาที่พบมาก ได้แก่ แคนนาบินอยด์ (Cannabinoid) ซึ่งมีปริมาณ 15 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ มีเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ และมีฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในใบกัญชาพบว่ามีแคนนาบินอยด์น้อยกว่าในดอก โดยพบว่ามีปริมาณเพียง 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ มีเทอร์พีนอยด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แต่มีฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงถึง 8 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยยังได้ระบุอีกว่าสารฟลาโวนอยด์จากใบกัญชา ได้แก่ เควอซีทิน (Quercetin) เคเพอรอล (kaempferol) และ เอพิจินิน (apigenin) มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยฟลาโวนอยด์เหล่านี้สามารถสกัดได้ดีในรูปแบบสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน บิโตรเลียมอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท อีกทั้งยังพบว่า ฟลาโวนอยด์จาก

* Corresponding author

E-mail address: kongsakda@gmail.com (K. Phakthanakanok)

Online print: 29 June 2025 Copyright © 2025. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2025.16>

กัญชามีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) อยู่ในช่วง 15 ถึง 80 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารกลุ่มอื่น (Lowe et al., 2021) ฟลาโวนอยด์บางชนิดมีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถเลียนแบบลักษณะของซับสเตรตของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เช่น มอลโทส (Maltose) ทำให้สามารถเข้าไปจับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ในลักษณะการแข่งขัน (Competitive inhibition) โดยเมื่อฟลาโวนอยด์จับกับเอนไซม์แล้วจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ฟังก์ชันของฟลาโวนอยด์กับกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ วงแหวนเบนซีนของฟลาโวนอยด์ยังสามารถแทรกตัวเข้าสู่บริเวณที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำของเอนไซม์และเกิดปฏิสัมพันธ์แบบไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interactions) ส่งผลให้การยึดเหนี่ยวระหว่างฟลาโวนอยด์กับเอนไซม์มีความมั่นคงมากขึ้น และสามารถยับยั้งการเข้าถึงของคาร์โบไฮเดรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Proença et al., 2017)

ฟลาโวนอยด์สามารถสกัดได้ด้วยน้ำและพบว่าอยู่ในรูปของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่มีโมเลกุลแซคคาไรด์จับอยู่ด้วยกันในโครงสร้าง แม้ว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะสามารถสกัดสารบางส่วนออกไปจากพืชแล้วก็ตาม แต่ก็ยังสามารถใช้น้ำสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ออกมาเพิ่มเติมได้อีกในปริมาณหนึ่ง การใช้น้ำเป็นตัวสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์มีข้อดีในด้านความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษ ไม่ติดไฟ ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่นำไปใช้ต่อ และยังลดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีนัยสำคัญ กระบวนการสกัดด้วยน้ำจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเทคโนโลยีสีเขียว (green extraction technology) และสนับสนุนการผลิตอย่างยั่งยืนในอุตสาหกรรมชีวภาพ (Lajoie et al., 2022) การศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญชนิดต่างๆจาก *Gyrinops versteegii* รายงานว่าสามารถพบสารประกอบฟีนอล แทนนิน อัลคาลอยด์ และ สเตียรอยด์จากการสกัดด้วยตัวทำละลายในขั้นตอนแรก จากนั้นเมื่อนำมาสกัดฟลาโวนอยด์ต่อด้วยน้ำในขั้นตอนถัดไปก็สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ออกมาได้ 2.29 กรัมสมมูลของควอซิทิน (QE) ต่อสารสกัด 100 กรัม ฟลาโวนอยด์ที่ได้จากน้ำมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.14 ส่วนในล้านส่วน (Parwata et al., 2018) งานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสกัดฟลาโวนอยด์จากผ้าด้วยการแช่ในน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ จำนวน 5 ช่วงได้แก่ 4, 25, 50, 75 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง พบว่าการสกัดในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้เท่ากับ 27.2 มิลลิกรัมสมมูลของควอซิทิน (QE) ต่อสารสกัด 1 กรัม และฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ในอุณหภูมินี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส มอลโทส และซูเครสได้ดีที่สุด (Rucksakaew et al., 2020) การศึกษาเกี่ยวกับยาสมุนไพรไทยตำรับหนึ่งที่ประกอบด้วย สะเดา ก้านเหลียง ขี้เหล็ก และกล้วยน้อย ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่ามีส่วนฟลาโวนอยด์สะสมอยู่ในสมุนไพรเหล่านี้มาก การศึกษาพบว่าสารตำรับยานี้ในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสตามกรรมวิธีการปรุงยาปกติ สามารถสกัดสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสออกมาได้มาก โดยพบว่าสารดังกล่าวเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Thiantongin et al., 2020) มีการศึกษาฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากต้นเถาวัลย์โดยใช้เทคนิคการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 2 ช่วงได้แก่ 80 และ 95

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสในระดับที่ต่ำมาก โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 4.77 ถึง 26.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Suriyaphan et al., 2023) และการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากสารสกัดฟลาโวนอยด์ในสัปดาห์ที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ พบว่าฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี แต่ยังคงกว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอล ประมาณ 4 เท่า (Pantong et al., 2024)

สำหรับในประเทศไทย ภาครัฐให้ความสำคัญกับการใช้สมุนไพรในการดูแลสุขภาพ โดยเฉพาะในกลุ่มโรคเรื้อรังอย่างโรคเบาหวาน โดยมีการผลักดันนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อขับเคลื่อนเศรษฐกิจในระดับพื้นที่และประเทศ (Nithiprapawat et al., 2021) ปัจจุบันมีการแปรรูปใบกัญชาในเชิงพาณิชย์ เช่น เครื่องดื่มชาสมุนไพรพร้อมดื่ม ผลิตภัณฑ์โปรตีนทางเลือกจากกัญชา (Pannico et al., 2022) และโภชนเภสัชภัณฑ์ (Pandey et al., 2010) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานที่ศึกษาผลของฟลาโวนอยด์ในชาจากใบกัญชาโดยตรงต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดน้ำจากชาใบกัญชาต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยตั้งสมมติฐานว่าอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นจะเพิ่มปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ และส่งผลให้สารสกัดมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว จึงได้ออกแบบการทดลองโดยสกัดสารจากชาใบกัญชาอบแห้งด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 40, 80 และ 100 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetry Assay และทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสด้วย DNS Assay โดยเปรียบเทียบกับอะคาโบสเป็นสารควบคุม ผลจากการศึกษานี้จะสามารถอธิบายศักยภาพของเครื่องดื่มชาใบกัญชาในการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการดูแลสุขภาพเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยแนวทางการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกได้อย่างเหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การสกัดฟลาโวนอยด์จากใบกัญชาด้วยน้ำ

การสกัดฟลาโวนอยด์จากชาใบกัญชาด้วยน้ำใช้วิธีการของ Wongsa และคณะ (Wongsa et al., 2012) โดยดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่างๆต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งได้เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าสามารถสกัด ฟลาโวนอยด์จากพืชได้ด้วยอุณหภูมิที่หลากหลายและต่ำกว่าจุดเดือด ต้นกัญชาได้มาจากมหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง ซึ่งได้ออนุญาติปลูกกัญชาที่กัญชงเพื่อการวิจัย เลขขอปลูกที่ 65-1-1-0015131 โดยเด็ดใบกัญชาจากต้นที่มีอายุ 4 เดือน มาล้างทำความสะอาด ตัดให้เป็นชิ้นขนาดเท่ากันอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีความชื้นไม่เกินกว่าร้อยละ 8 จึงได้ชาใบกัญชาพร้อมดื่ม จากนั้นนำใบแห้งที่ได้ไปสกัดด้วยน้ำโดยใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน 3 ระดับคือ อุณหภูมิ 40 และ 80 องศาเซลเซียสและต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักใบแห้งต่อน้ำเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 30 มิลลิลิตร และวางในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator)

ที่ความถี่ 80 กิโลเฮิร์ตซ์ตลอดเวลาของการสกัด เมื่อครบเวลาทำการกรองแยกกากด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสารละลายที่แยกได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการระเหยน้ำออกจากสารละลายภายใต้ความดันบรรยากาศ 1 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนปริมาตรลดลง 10 เท่าด้วยเครื่องระเหยน้ำภายใต้สุญญากาศ ยี่ห้อ Labconco ประเทศออสเตรเลีย นำสารสกัดหยาบที่ได้ (Crude) ไปทำแห้งเยือกแข็งโดยนำสารสกัดหยาบเข้มข้นไปบรรจุในหลอดบรรจุสารขนาดเล็ก (Eppendorf) นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไประเหิดที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่ความดันบรรยากาศ 0.1 มิลลิบาร์ นำตัวอย่างที่เปลี่ยนเป็นผงแล้วไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่สภาวะไร้อากาศในช่องอลูมิเนียมฟอยล์ (Nowak & Jakubczyk, 2020)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ใช้วิธี Aluminum chloride colorimetry assay (Chang et al., 2002) ทำการเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ดำเนินการโดยชั่งสารสกัด 2 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) NaNO_2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นละลาย AlCl_3 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นละลาย 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) NaOH ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น Blank ทำการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายฟลาโวนอยด์มาตรฐานเคอซีทิน (quercetin) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน ต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด 1 กรัม (mg QE / g extract) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากอุณหภูมิต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยปริมาณฟลาโวนอยด์ ตัวอย่างที่สกัดจากอุณหภูมิใดที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดให้คัดเลือกไปวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครั้งหนึ่งในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller & Joubert, 2022) โดยตัดแปลงเล็กน้อย มีสารละลายแบ่งเป็นซับสเตรตและเทียบประสิทธิภาพการย่อยแบ่งโดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคส ทำการเตรียมน้ำแบ่ง 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ Phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร นำสารละลายน้ำแบ่งไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารละลายน้ำแบ่งปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ไปผสมกับสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสทางการค้า ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นละลาย DNS เพื่อทำปฏิกิริยาการ

เกิดสีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปลอยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น Blank ทดแทนสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL) กำหนดให้ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึงปริมาณเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 1 มิลลิกรัมที่สามารถย่อยแบ่งได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทำการทดลอง โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (U/mL)} = \frac{A \times 1000}{V \times T \times MW}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

V คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

T คือ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต

MW คือ มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสให้วิเคราะห์ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเปรียบเทียบกับระหว่างอะคาโบสกับสารสกัดหยาบ และคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครั้งหนึ่ง (IC_{50}) โดยเตรียมสารละลายอะคาโบสด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสตามวิธีการข้างต้นโดยใช้สารละลายอะคาโบสและสารสกัดหยาบปริมาตร 0.1 มิลลิกรัม แทนส่วนน้ำกลั่นปราศจากไอออน ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และกำหนดให้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น negative control (เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมีค่ากิจกรรม 100 เปอร์เซ็นต์) การคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ (% Inhibition) ให้ใช้สมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times [1 - (B/A)]$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นซับสเตรต (negative control)

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้อะคาโบส (positive control) หรือสารสกัดหยาบเป็นซับสเตรต

การหาค่า IC_{50} หาได้จากความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ร้อยละ 50 (50% Inhibition) โดยคำนวณด้วยโปรแกรมออนไลน์ IC_{50} Calculator ของบริษัท AAT Bioquest, Inc. (Sennikova et al., 2022)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และค่า IC_{50} เป็นค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ standard deviation) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิเคราะห์ความ

แปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS Freeware



ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการสกัดและปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบกัญชาแห้ง

การอบแห้งใบกัญชาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำให้ใบกัญชาแห้งสนิทได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลักษณะของใบกัญชาหลังจากการอบแห้งพบว่ามีเปลี่ยนสีจากเขียวสด (Figure 1A) เป็นสีเขียวปนน้ำตาลและมีความกรอบ (Figure 1B) โดยน้ำหนักหลังการอบแห้งคิดเป็น 11.25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบสดก่อนการอบแห้ง



Figure 1 Characteristics of fresh cannabis leaves (A) and dried cannabis leaves (B).

เมื่อนำใบกัญชาแห้งไปทำการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการสกัดจำนวน 3 ช่วง ได้แก่ 40, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้คือ 0.29 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 0.85 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด 1 กรัม และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสพบว่า สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด 1 กรัม

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาการสกัดสารฟลักซ์เคมีจากใบกัญชา โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลาย 6 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน (Hexane), ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane), เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate), เอทานอล (Ethanol), เมทานอล (Methanol) และ

น้ำ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) และอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (9 % w/w) แต่สามารถสกัดสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Niyomdechana & Niyomdechana, 2022) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ การเพิ่มอุณหภูมิของน้ำสำหรับการสกัดมีผลโดยตรงต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ โดยผลการทดลองพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง (40, 80 และ 100 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะการสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสซึ่งให้ผลที่ดีที่สุด (Table 1) ดังนั้นสรุปได้ว่าการใช้น้ำร่วมกับอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดฟลาโวนอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 1 Effect of water temperature on total flavonoid content

Water Temperature (°C)	Total Flavonoid Content (mg QE / g extract)
40	0.29 ± 0.12 ^c
80	0.85 ± 0.05 ^b
100	1.12 ± 0.08 ^a

Mean ± SD represents the average value and the standard deviation.

QE refers to quercetin equivalent.

Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

ฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycoside) ซึ่งสารประกอบนี้เกิดจากการรวมตัวของฟลาโวนอยด์กับโมเลกุลแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส แรมโนส หรือกาแลคโตส ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) โดยฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์พบได้มากในส่วนใบและเมล็ดของพืช (Bao

et al., 2018) คุณสมบัติที่โดดเด่นของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์คือความสามารถในการละลายในน้ำได้ดี จึงทำให้สามารถสกัดออกมาได้มากเมื่อนำเป็นต้นทำละลาย โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกชนิดเคเทคอล (Catechol) จำนวนสองวงที่เชื่อมกันด้วยสะพานคาร์บอน 3 อะตอม (C3) และมี

หมู่ ไฮดรอกซิล (-OH) ที่สามารถเชื่อมต่อกับแซคคาไรด์ได้หลายตำแหน่ง มีรายงานว่าพืชตระกูลกุยชาสามารถตรวจพบฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์หลายชนิดได้แก่ รุทีน (Rutin) เควอซิทริน (Quercitrin) เฮสเพรีดิน (Hesperidin) และไบคาลิน (Baicalin) (Bautista et al., 2021) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำที่อุดมด้วยระหว่าง 80-100 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Liau et al., 2017) ที่ใช้เทคนิคสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จาก *Camellia oleifera* ด้วยน้ำร้อนและใช้แรงดันสูง โดยใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส และความดัน 600 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ผลที่ได้คือสภาวะการสกัดนี้สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้มากกว่าการสกัดด้วยน้ำอุณหภูมิห้องที่ความดันปกติ 1.19 ถึง 1.23

เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้มีความเป็นขี้ผึ้งและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ 4.33 U/mL (Table 2) โดยเมื่อเติมสารยับยั้งอะคาโบสลงไปในช่วงขั้นตอนการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงพบว่า อะคาโบสมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี โดยปริมาณอะคาโบสที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่เพิ่มมากขึ้น

Table 2 Analysis of commercial glucosidase enzyme activity

Enzyme	Enzyme Activity (U/mL)
α -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.33 $\pm$ 0.56

Mean $\pm$ SD represents the average value and the standard deviation.

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามความเข้มข้นของอะคาโบสในช่วง 1–50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 2) แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 100 $\mu\text{g/mL}$ ค่าการยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจากสภาวะอิ่มตัว (Saturation) ของบริเวณเร่งของเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นเอนไซม์ระดับหนึ่ง สารยับยั้งได้จับกับเอนไซม์เกือบทั้งหมดแล้ว ทำให้แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารอีกก็ไม่ก่อให้เกิดประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มเติม ปรากฏการณ์เช่นนี้พบในกลไกการยับยั้งแบบแข่งขัน

(Competitive inhibition) โดยเมื่อสารยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซับสเตรต และเกิดการแย่งจับกับตำแหน่งเร่งของเอนไซม์ในสภาวะที่จำนวนเอนไซม์มีจำกัด การเพิ่มสารยับยั้งในระดับที่เกินกว่าความสามารถของเอนไซม์ในการตอบสนองจะทำให้กราฟร้อยละการยับยั้งเข้าสู่ภาวะคงที่ (Plateau) ดังที่ปรากฏในผลการทดลอง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการกำหนดปริมาณสารสกัดอย่างเหมาะสม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยไม่สิ้นเปลืองสารหรือทรัพยากรโดยไม่จำเป็น (Miller & Joubert, 2022)

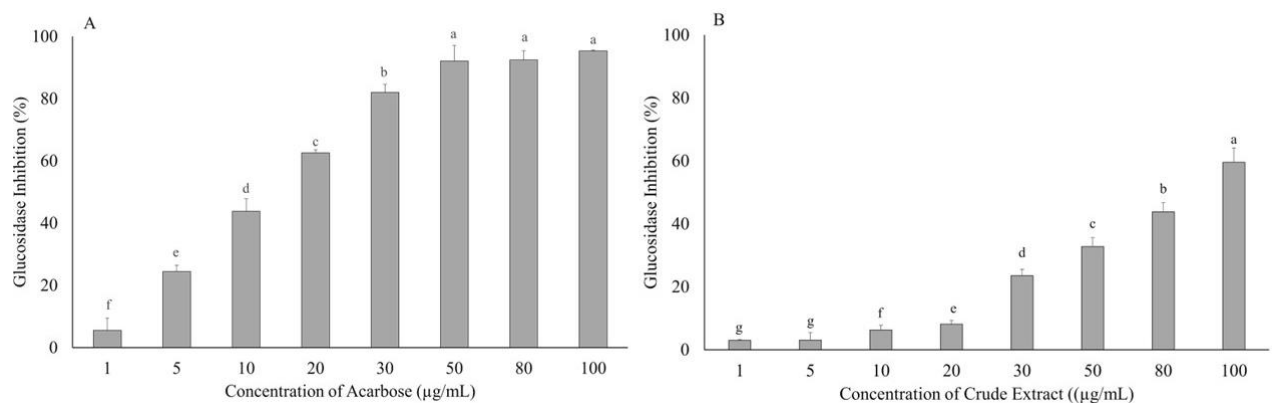


Figure 2 Inhibition of glucosidase activity by (A) acarbose and (B) crude extract at various concentrations. The values represent mean $\pm$ standard deviation (SD) for triplicate measurements. Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารสกัดฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สกัดได้ดีที่สุดมาทำการศึกษการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยผลการศึกษาพบว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ โดยที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดฟลาโวนอยด์แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดที่ 59 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2B) ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดที่ 1 ถึง 80 $\mu\text{g/mL}$ มีประสิทธิภาพการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 30,

50 และ 80 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ที่ 3, 3, 6, 8, 23, 32 และ 42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันของประสิทธิภาพการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

งานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานพบว่าฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากพืชมีศักยภาพที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และสามารถสกัดได้จากสารละลายหลายชนิด ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์บางชนิดที่สกัดได้จากน้ำก็มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษานางานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตาม

ตามฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์มักมีประสิทธิภาพด้อยกว่าฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากโครงสร้างฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จะมีหมู่แซคคาไรด์ เช่น glucose เชื่อมต่อกับวงแหวนในโมเลกุลจะส่งผลให้เกิด Steric hindrance ขณะยึดจับในบริเวณเร่งของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสซึ่งมีลักษณะเป็นโพรง โครงสร้างที่ใหญ่ของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จะไปลดความมั่นคงในการยึดจับกับเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง การศึกษาของ He et al. (2019) เกี่ยวกับฟลาโวนอยด์ 15 ชนิด พบว่าฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ 4 ชนิด ได้แก่ Naringin, Hesperidin, Baicalin และ Rutin มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีค่า $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ แต่กลับมีประสิทธิภาพด้อยกว่าฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นที่สกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น Myricetin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ชนิด aglycone (มีหมู่ฟังก์ชันอื่นที่ไม่ใช่แซคคาไรด์) ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลมีความเป็น Steric hindrance เช่นกันแต่ขนาดเล็กกว่าหมู่แซคคาไรด์มาก โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ทั้ง 4 ชนิดมากถึง 250 เท่า อย่างไรก็ตาม แม้ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากน้ำจะมีข้อดีในเรื่องความปลอดภัย แต่ผลการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าขนาดและ

โครงสร้างโมเลกุลของสารยับยั้งยังมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

ผลการศึกษาค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่สกัดด้วยน้ำจากชาใบกัญชาและอะคาโบสในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนในด้านประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (Table 3) โดยอะคาโบสซึ่งเป็นสารยับยั้งมาตรฐานแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ $14.81 \pm 0.217 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งต่ำกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดฟลาโวนอยด์ที่มีค่าเท่ากับ $97.36 \pm 1.54 \mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าอะคาโบสมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีประสิทธิภาพมากกว่าประมาณ 6.5 เท่า ซึ่งข้อมูลนี้มีความสำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้ฟลาโวนอยด์จากใบกัญชาในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรืออาหารทางการแพทย์รักษาโรคเบาหวาน อย่างไรก็ตาม ฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วยน้ำยังคงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ที่ดี จึงเหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มาจากแหล่งธรรมชาติปลอดภัย และเหมาะสมแก่กลุ่มเป้าหมายที่ต้องการลดการพึ่งพาสารสังเคราะห์ (Jain and Ramawat, 2013)

Table 3 The IC_{50} values of water-extracted flavonoids and acarbose for α -glucosidase inhibition

Inhibitor	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Acarbose	14.81 ± 0.217^b
Flavonoids (water extract)	97.36 ± 1.54^a

Mean $\pm$ SD represents the average value and the standard deviation.

Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับงานวิจัยของ Phan et al., (2013) ระบุว่าสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วยน้ำจากใบ *Epimedium brevicornum* มีค่า IC_{50} เพียง $2.01 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งต่ำกว่าค่า IC_{50} ของฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้อย่างมาก ($97.36 \mu\text{g/mL}$) อีกทั้งประสิทธิภาพของฟลาโวนอยด์ในงานวิจัยดังกล่าวใกล้เคียงกับอะคาโบสมากกว่า ($2.58 \mu\text{g/mL}$) สาเหตุของความแตกต่างนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืชที่ใช้ วิธีการสกัด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในตัวอย่าง นอกจากนี้ งานวิจัยของ Thiantongin et al., (2020) ยังได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำและเอทานอลจากสมุนไพรร 3 ชนิด ได้แก่ จั้ว กระถินไทย และ กำแพงเจ็ดชั้น โดยพบว่าฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.12 \mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าเล็กน้อยที่ $17.12 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากสมุนไพรรในหลากหลายวิธีการสกัด

สารฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้สามารถจับกับเอนไซม์ได้ผ่านพันธะไฮโดรเจนและแรงวนเดอร์วาลส์ ซึ่งเป็นปฏิสัมพันธ์สำคัญที่เกิดขึ้นบริเวณเร่งของเอนไซม์ และเพียงพอที่จะขัดขวางไม่ให้ซับสเตรตที่แท้จริง เช่น มอลโทส เข้าจับและผ่านกระบวนการเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติ การศึกษาทาง molecular docking และ IGM (Independent Gradient Model) จากงานของ He et al., (2019) ช่วยสนับสนุนผลการศึกษานี้ได้อย่างดี โดยพบว่าฟลาโวนอยด์อะไกลโคโคน ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมาก เช่น เควอซิทิน (ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 5 ตำแหน่ง) โดยเฉพาะในบริเวณวงแหวน B จะสามารถจับกับกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์ เช่น Asp215, Tyr72 และ Arg442 ได้มั่นคงยิ่งขึ้น ปฏิสัมพันธ์นี้มีลักษณะของ Competitive

inhibition กล่าวคือ ฟลาโวนอยด์สามารถเลียนแบบโครงสร้างของซับสเตรต และเข้าไปยึดครองบริเวณเร่งก่อนที่ซับสเตรตจริงจะเข้าจับ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจง สำหรับฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ แม้จะมีความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงวนเดอร์วาลส์เช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า จึงเกิด steric hindrance ที่ขัดขวางการเข้าถึงบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จากชา ใบกัญชาที่สกัดด้วยน้ำจะมีค่า IC_{50} สูงกว่าสารมาตรฐานอย่างอะคาโบส แต่ก็ยังแสดงศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสนับสนุนกลไกที่ว่า การยับยั้งเอนไซม์ในงานวิจัยนี้เกิดขึ้นที่บริเวณเร่งจริง ผ่านปฏิสัมพันธ์ระดับโมเลกุลที่มีความเฉพาะเจาะจง เพียงพอ และเสถียรในระดับหนึ่ง

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพของฟลาโวนอยด์จากใบกัญชาอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสสามารถสกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้ในปริมาณสูงสุด และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี แม้ว่าฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จะยังน้อยกว่าอะคาโบสซึ่งเป็นสารควบคุมมาตรฐาน แต่ผลที่ได้สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพในการนำสารสกัดจากธรรมชาติไปใช้ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และสนับสนุนแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ชากัญชาเพื่อสุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบกัญชาเพื่อช่วยลดความเสี่ยงของโรคเบาหวาน อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและรอบด้านยิ่งขึ้น ควรมีการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ความเสถียรของสารในระบบย่อย

อาหาร รวมถึงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์จริงในร่างกาย (in vivo) ผ่านการทดลองในสัตว์หรือในมนุษย์ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ทางคลินิกและการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อาคารสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์สำหรับงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยนี้ ซึ่งได้รับจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) ประจำปีงบประมาณ 2566

References

- Bao, Y., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., & Jiang, Y. (2018). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 116-124. doi: [10.1016/j.tifs.2018.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006)
- Bautista, J. L., Yu, S., & Tian, L. (2021). Flavonoids in *Cannabis sativa*: Biosynthesis, bioactivities, and biotechnology. *ACS Omega*, 6(8), 5119-5123. doi: [10.1021/acsomega.1c00318](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00318)
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10, 178-182. doi.org/10.38212/2224-6614.2748
- Dirir, A. M., Daou, M., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2022). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*, 21(4), 1049-1079. doi: [10.1007/s11101-021-09773-1](https://doi.org/10.1007/s11101-021-09773-1)
- He, C., Liu, X., Jiang, Z., Geng, S., Ma, H., & Liu, B. (2019). Interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase: Experimental and molecular modelling studies. *Foods*, 8(9), 355. doi.org/10.3390/foods 8090355
- Jain, N., & Ramawat, K. G. (2013). Nutraceuticals and Antioxidants in Prevention of Diseases. In: Ramawat, K.G., & Mérillon, JM. (eds) *Natural Products* (pp.2559-2580). Berlin, Germany: Springer.
- Lajoie, L., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2022). Water as green solvent: Methods of solubilisation and extraction of natural products -past, present and future solutions. *Pharmaceuticals*, 15(12), 1507. doi.org/10.3390/ph15121507
- Lertdetkajorn, K. (2022). *The latest statistics on type 2 diabetes in Thailand*. Accessed January 3, 2025. Retrieved from <https://www.healthdeliver.asia/blog/the-latest-statistics-on-type-2-diabetes-in-thailand>
- Liau, B.C., Ponnusamy, V. K., Lee, M.-R., Jong, T.-T., & Chen, J.-H. (2017). Development of pressurized hot water extraction for five flavonoid glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds (byproducts). *Industrial Crops and Products*, 95, 296-304. doi: [10.1016/j.indcrop.2016.10.034](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.034)
- Lowe, H., Steele, B., Bryant, J., Toyang, N., & Ngwa, W. (2021). Non-cannabinoid metabolites of *Cannabis sativa* L. with therapeutic potential. *Plants*, 10(2), 400. doi: [10.3390/plants10020400](https://doi.org/10.3390/plants10020400)
- Miller, N., & Joubert, E. (2022). Critical Assessment of In Vitro screening of α -Glucosidase inhibitors from plants with acarbose as a reference standard. *Planta medica*, 88(12), 1078-1091. doi.org/10.1055/a-1557-7379
- Nithiprapawat, P., Therawiwat, M., Vatanasomboon, P., & Iamee, N. (2021). The Promotion Program for Food Consumption to Control Blood Sugar Levels Emphasizing Thai Herbal Food in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine*, 19(1), 74-86.
- Niyomdech, S., & Niyomdech, M. (2022). Phytochemical screening and antioxidant activities of cannabis. *Journal of Academic for Public and Private Management*, 4(2), 155-166. (in Thai)
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods: The characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10), 1488. doi.org/10.3390/foods9101488
- Pandey, M., Verma, R. K., & Saraf, S. A. (2010). Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), 11-15.
- Pannico, A., Kyriacou, M. C., El-Nakhel, C., Graziani, G., Carillo, P., Corrado, G., Ritieni, A., Roupheal, Y., & De Pascale, S. (2022). Hemp microgreens as an innovative functional food: Variation in the organic acids, amino acids, polyphenols, and cannabinoids composition of six hemp cultivars. *Food Research International*, 161, 111863. doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111863
- Pantong, W., Somsap, O., & Sujiwattanasat, P. (2024). Inhibitory effects of stink bean (*Parkia speciosa*) extracts against α -amylase and α -glucosidase activity. *Princess of Naradhiwas University Journal*, 16(3), 301-315. (in Thai)
- Parwata, A., Manuaba, P., & Yasa, S. (2018). The potency of flavonoid compounds in water extract *Gyrinops versteegii* leaves as natural antioxidants sources.

- Biomedicine & Pharmacotherapy Journal*, 11(3). 1501-1511. doi.org/10.13005/bpj/1517
- Phan, M. A. T., Wang, J., Tang, J., Lee, Y. Z., & Ng, K. (2013). Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 492-498. doi: 10.1016/j.lwt.2013.04.002
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2017). Flavonoids as potential therapeutic agents for type 2 diabetes mellitus: A structure–activity relationship study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(19), 8736-8751. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00685
- Rucksakaew, K., Damsud, T., & Chankaew, W. (2020). Flavonoid effects of water extraction on total flavonoid content and biological activities between natural and cultured *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas. *Princess of Naradhiwas Journal*, 12(1). 150-162. (in Thai)
- Rucksakaew, K., Damsud, T., & Chankaew, W. (2019). Effects of water extraction on total flavonoid content and biological activities between natural and cultured *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas. *Princess of Naradhiwas University Journal*, 11(2), 150-162.
- Sennikova, V. V., Zalaltdinova, A. V., Sadykova, Y. M., Khamatgalimov, A. R., Gazizov, A. S., Voloshina, A. D., Lyubina, A. P., Amerhanova, S. K., Voronina, J. K., Chugunova, E. A., Appazov, N. O., Burilov, A. R., & Pudovik, M. A. (2022). Diastereoselective synthesis of novel spiro-phosphacoumarins and evaluation of their anti-cancer activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14348.
- Suriyaphan, O., Tangsathitkulchai, K., Chewchinda, S., Lomarat, P., & Sato, V. H. (2023). Antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of *Mesona chinensis* aqueous extract. *Burapha Science Journal*, 28(3), 1766-1782. (in Thai)
- Thiantongin, P., Thammaporn, C., & Chaweerak, S. (2020). Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Thai herbal recipes for anti-diabetes. *Udon Thani Rajabhat University Journal of Science and Technology*, 8(1), 1-17. (in Thai)
- Wongsa, P., Chaiwarit, J., & Zamaludien, A. (2012). In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 131(3), 964-971. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.088
- Yimsaard, P., Lancaster, K. E., & Sohn, A. H. (2023). Potential impact of Thailand's cannabis policy on the health of young adults: current status and future landscape. *The Lancet Regional Health. Southeast Asia*, 10, 100145. doi: 10.1016/j.lansea.2023.100145
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782-787. doi: 10.1038/414782a

Research article

Effect of Water Extraction Temperature on the Efficiency of α -Glucosidase Inhibition by Flavonoids from Dried Cannabis Leaves

Krongsakda Phakthanakanok^{1*} Rapeepan Kongtoom¹ Rinrampai Puttipan² and Sirichada Plengphanich³

¹ Faculty of Science and Technology, Muban Chombueng Rajabhat University, Chombueng, Ratchaburi, 70150, Thailand

² College of Muaythai Study and Thai Traditional Medicine, Muban Chombueng Rajabhat University, Chombueng, Ratchaburi, 70150, Thailand

³ Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Mueng Nonthaburi, 11000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history

Received: 24 January 2025

Revised: 3 June 2025

Accepted: 26 June 2025

Online published: 29 June 2025

Keyword

Cannabis

Enzyme inhibitors

Flavonoids

α -glucosidase enzyme

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the α -glucosidase inhibitory activity of flavonoids extracted with water from dried cannabis leaves. Flavonoid extraction was performed using water at 40°C, 80°C, and 100°C. The flavonoid content was analyzed using the Aluminum Chloride Colorimetric Assay, while α -glucosidase inhibitory activity was assessed using the Dinitrosalicylic Acid (DNS) Assay. The results indicated that extraction at 100°C yielded the highest flavonoid content (1.12 mg QE/g extract). The extracted flavonoids were identified as water-soluble flavonoid glycosides that demonstrated significant α -glucosidase inhibitory potential. The IC₅₀ value of the flavonoid extract was determined to be 97.36 μ g/mL, compared to 14.81 μ g/mL for acarbose. The results confirmed that higher water temperatures significantly enhance the dissolution and release of flavonoids. This study highlights the potential of developing cannabis leaf tea products to help reduce blood sugar levels, which could be beneficial for managing type 2 diabetes. Furthermore, the findings support the sustainable use of medicinal plants in traditional and alternative Thai medicine.

*Corresponding author

E-mail address: krongsakda@gmail.com (K. Phakthanakanok)

Online print: 29 June 2025 Copyright © 2025. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2025.16>