

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้ง แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเปลือกอบเชย

Activities of Cinnamon Bark Extract on Antioxidant and Alpha-Glucosidase Inhibition

จุฑามาส สุขเอ็ม, ชัญญุ ผลประไพ*, ศรีญญ อุ่นทวี และสุดาทิพย์ จันทร
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Jutamas Sukaim, Chanan Phonprapai*, Saranyou Oontawee and Sudathip Chanthon

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: February 27, 2020; Accepted: March 13, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเปลือกอบเชย เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคแทรกซ้อน โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) โดยใช้เวลาในการสกัดด้วยวิธีการเขย่าเป็น 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการสกัดเปลือกอบเชยด้วย MeOH เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีผลได้จากการสกัดสูงสุด 16.75 ± 0.59 เปอร์เซ็นต์ และพบอีกว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่สกัดด้วย EtOH, MeOH และ EtOAc ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า IC_{50} $2.36-5.47 \mu\text{g/mL}$ และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด 108.53 ± 0.00 , 118.86 ± 2.24 และ $116.28 \pm 0.00 \text{ mg GAE/g extract}$ เมื่อสกัดด้วย EtOH เป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง และสกัดด้วย MeOH เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่ามีค่า IC_{50} 34.82 ± 0.25 , 34.43 ± 0.03 และ $36.15 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวพบว่าตัวทำละลายและระยะเวลาของการสกัดมีผลต่อผลได้จากการสกัดและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งจะเห็นได้ว่าการสกัดโดยใช้ EtOH เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้บรรเทาอาการโรคเบาหวานชนิดที่ 2

คำสำคัญ : โรคเบาหวาน; ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ; ฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส; เปลือกต้นอบเชย

Abstract

This study aimed to examine extraction yield, antioxidant activity, total phenolic content, and alpha-glucosidase inhibitory activity of cinnamon bark extracts for being used as an alternative for type

2 diabetes treatment including diabetic complications alleviation. In this experiment, powdered cinnamon bark was extracted by immersing in 95 % ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), and n-hexane (HEX) under various shaking periods. The results revealed that shaking cinnamon bark with MeOH for 48 h provided the highest extraction yield of 16.75 ± 0.59 %w/w. However, the extracts obtained from shaking with EtOH, MeOH, and EtOAc, possessed approximately the similar high antioxidant activity. In addition, the IC_{50} values against DPPH radical of the extracts were not statistically different, as the values were found in a range of 2.36 - 5.47 $\mu\text{g/mL}$. The total phenolic content (TPC) of the ethanolic extracts gained from shaking for 36 and 48 h, expressed the TPC values of 108.53 ± 0.00 and 118.86 ± 2.24 mg GAE/g extract, respectively, while the methanolic extract gained from shaking for 48 h also expressed the TPC value of 116.28 ± 0.00 mg GAE/g extract. Furthermore, the IC_{50} against alpha-glucosidase of two ethanolic and a methanolic extracts revealed the respective values of 34.82 ± 0.25 , 34.43 ± 0.03 , and 36.15 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$, which were highly effective and insignificant differences. One-way analysis of variance also confirmed that the types of extraction solvent and shaking time could affect the extraction yield, antioxidant activity, total phenolic content, and alpha-glucosidase inhibitory activity. The results obviously supported that the 36-h shaken ethanolic extract could be potentially used for alleviating type 2 diabetes.

Keywords: diabetes; antioxidant activity; alpha-glucosidase inhibitory activity; cinnamon bark

1. คำนำ

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขของไทยที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Guariguata *et al.*, 2014) เบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) เป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes) เนื่องจากร่างกายยังผลิตและหลั่งอินซูลินได้ปกติ อย่างไรก็ตาม อินซูลินที่หลั่งออกมานั้นไม่สามารถทำงานอย่างปกติ จึงทำให้ไม่เกิดกระบวนการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และเป็นเหตุให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูงขึ้น (Wu *et al.*, 2014) ในระยะยาวภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูงนั้นส่งผลต่อการสะสมของอนุมูลอิสระในร่างกายหรืออาจทำให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของร่างกายลดลง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับของอนุมูลอิสระในผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มสูงขึ้น (Wang *et al.*, 2016) ซึ่งส่งผลให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ มีการ

เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เพิ่มขึ้น และอาจส่งผลต่อการดื้อต่ออินซูลิน รวมไปถึงการเกิดโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคตา โรคไต เป็นต้น (Maritim *et al.*, 2003; Colhoun *et al.*, 2004; Marcovecchio, 2017)

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังของลำไส้เล็กทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ตัดน้ำตาลกลูโคสออกจากปลายอนรีดิวซ์ของโอลิโกแซคคาไรด์หรือพอลิแซคคาไรด์ที่มีความยาวตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไป ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก เพื่อดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด (de Melo *et al.*, 2006; Tundis *et al.*, 2010; Loh and Hadira, 2011) ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจึงเป็นที่นิยมในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจากสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด

หลังมื้ออาหาร อย่างไรก็ตาม ยาที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ อะคาโบส (acarbose) โวกลิโบส (voglibose) ไมกลิทอล (miglitol) เป็นต้น ส่งผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยมีอาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง (Santos *et al.*, 2018) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารสกัดจากพืชที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร เครื่องดื่ม และขนม ซึ่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด

อบเชย (cinnamon) เป็นพืชวงศ์ Lauraceae อยู่ในสกุล *Cinnamomum* ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ทางอาหารและยาอย่างกว้างขวาง โดยอบเชยเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอล มักพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญของแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ รวมถึงลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Mathew and Abraham, 2006; Muhammad and Dewettinck, 2017)

Shihabudeen และคณะ (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของอบเชยลังกา (*Cinnamomum zeylanicum*) ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าอบเชยสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารทั้งในหนูปกติและหนูที่ถูกชักให้เป็นเบาหวาน อบเชยลังกา เป็นอบเชยที่มีราคาสูงและหาซื้อได้ยากในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส ของอบเชยทางการค้าภายในประเทศไทยและมุ่งหวังให้เกิดการพัฒนาสารสกัดจากอบเชยเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมผงอบเชย

นำเปลือกอบเชยจาก บริษัท ไร่ขวัญชะงัด เครื่องยาอ้างอิงพืชมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cinnamomum burmanni* (Nees & T.Nees) Blume

รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์สมุนไพร “2001201801” นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หักให้เป็นท่อนเล็ก ๆ และนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำผงอบเชยมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีช่องขนาด 600 ไมโครเมตร เพื่อนำผงละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีที่คัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

2.2 การสกัดผงพืช

ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับสกัดเปลือกอบเชย ได้แก่ เอทานอล (EtOH) 95 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนผงอบเชยต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 10 จากนั้นบรรจุลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 24 (SK24) 36 (SK36) และ 48 (SK48) ชั่วโมง แล้วนำมารองเพื่อแยกกากออก นำสารละลายของสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดแห้งมาใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้ (WE) กับน้ำหนักผงพืชที่ใช้ (WP) มาคำนวณผลได้จากการสกัด (extraction yield, EY) ดังสมการที่ 1

$$EY (\%w/w) = (WE + WP) \times 100 \quad (1)$$

2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกอบเชย

นำสารสกัดมาละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH assay ด้วยการเติมสารละลาย 100 ไมโครลิตร เจือจางสารสกัดแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยเอทานอลในไมโครเพลท (microplate) เติมอนุมูล DPPH เข้มข้น 1.2 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในเอทานอล 100 ไมโครลิตร โดยที่ตัวควบคุมจะเติมเอทานอลลงไปแทน DPPH และตัวควบคุม

DPPH จะเติมเอทานอลลงไปแทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, BioTek, PowerWave XS2, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด (OD_E) ตัวควบคุมสี (OD_C) และ DPPH (OD_{DPPH}) โดยใช้วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวควบคุมเชิงบวก นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging, RD) ดังสมการที่ 2 แล้วนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นในการยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยโปรแกรม R-Studio 1.0.143 (Ritz *et al.*, 2016)

$$RD (\%) = \frac{[OD_{DPPH} - (OD_E - OD_C)]}{OD_{DPPH}} \times 100 \quad (2)$$

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเปลือกอบเชย

นำสารสกัดมาละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์เอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic content, TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร นำสารสกัดมาเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยเอทานอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในไมโครเพลท เติม Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจาง 5 เท่า 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่า 1 นาที และบ่มต่อเป็นเวลา 4 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ 75 ไมโครลิตร นำไปเขย่าและบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader, BioTek, PowerWave XS2, USA) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และนำค่าความชัน (SE) ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบ เทียบกับความชันของกราฟจากสารมาตรฐานกรดแกลลิก (SGA) เพื่อคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (gallic acid

equivalent, GAE) ดังสมการที่ 3

$$TPC (mg \text{ GAE/g extract}) = (SE + SGA) \times 1,000 \quad (3)$$

2.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งแอลฟา กลูโคซิเดสของสารสกัดจากเปลือกอบเชย

นำสารสกัดมาละลายด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งแอลฟา กลูโคซิเดสที่ได้จาก *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Shihabudeen และคณะ (2011) โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เจือจางสารสกัดแบบอนุกรม 2 เท่า ในไมโครเพลท เติมเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร ที่ละลายอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (100 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมซับสเตรตไนโตรฟีนอล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside) 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 200 ไมโครโมลลาร์ 80 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา (OD_R) ของตัวควบคุมสี (OD_C) และของไนโตรฟีนอล (OD_{NP}) ที่ได้ มาคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส (IB) ตามสูตรในสมการที่ 4 แล้วนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นในการยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยโปรแกรม R-Studio 1.0.143

$$IB (\%) = \frac{[OD_{NP} - (OD_R - OD_C)]}{OD_{NP}} \times 100 \quad (4)$$

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 2.3, 2.4, และ 2.5 มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 และหาค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์เพียร์สันด้วยโปรแกรม R-Studio 1.0.143

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเตรียมและการสกัดเปลือกอบเชย

การสกัดเปลือกอบเชยด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) พบว่าผลได้การสกัดของการเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายได้ผลได้การสกัดมากที่สุด คือ 16.75 ± 0.59 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (เท่ากับตัวอักษรเหมือนกัน) เมื่อเขย่าเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลได้การสกัด 14.4 ± 0.66 และ 15.02 ± 0.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเห็นได้ว่า EtOH และ MeOH เป็นตัวทำละลายที่สกัดสารออกฤทธิ์จากผงบอบเชยได้ดีกว่า EtOAc และ HEX ที่มีขั้วต่ำกว่า

นอกจากตัวทำละลายแล้ว ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดยังมีผลต่อการละลายของสารออกฤทธิ์ด้วยเช่นกัน เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 36 ชั่วโมง พบว่าผลได้การสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่มีการเพิ่มระยะเวลาการสกัดจาก 36 เป็น 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ EtOH, MeOH และ EtOAc เป็นตัวทำละลายมีผลได้การสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่ละลายออกมาแล้วมีความเข้มข้นเข้าใกล้จุดอิ่มตัว

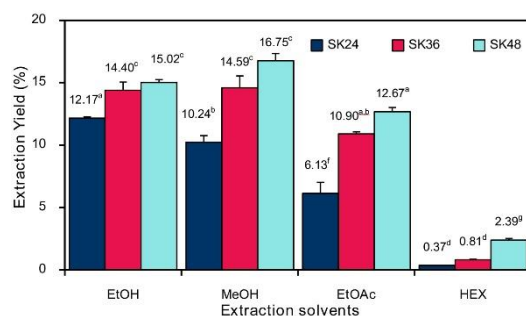
3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกอบเชย

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยการเขย่าเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

พบว่าสารสกัดจากอบเชยแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือค่า IC_{50} ตั้งแต่ 2.36 ± 0.10 ถึง 5.47 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ในการใช้ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เมทานอล หรือเอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย และไม่แตกต่างกับกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} 4.84 $\mu\text{g/mL}$ ยกเว้นสารสกัดที่ได้จากการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีค่า IC_{50} ที่สูง หรือมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ โดยพบว่าค่า IC_{50} เป็น 859.37 ± 8.85 , 467.70 ± 13.42 และ 187.34 ± 0.64 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเขย่าเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจาก HEX มีความเป็นขั้วต่ำทำให้สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้น้อย เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ค่อนข้างมีขั้วจากหมู่รีดิวซ์ (Barchan *et al.*, 2014)

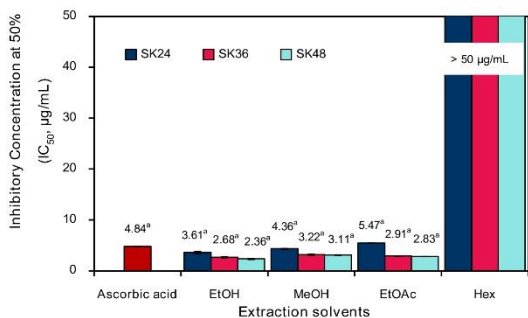
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากอบเชย

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยหาปริมาณ

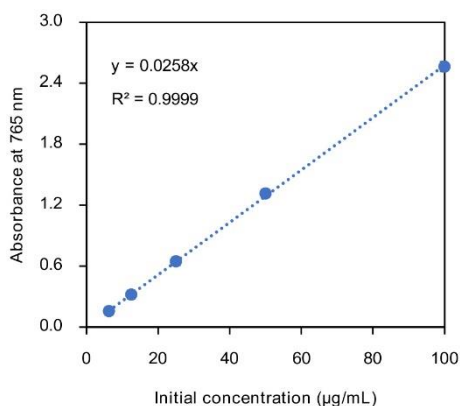


รูปที่ 1 ผลได้การสกัดจากเปลือกอบเชยเมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) ที่เวลา 24 (SK24), 36 (SK36) และ 48 (SK48) ชั่วโมง

สารประกอบฟีนอลรวมจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการของกราฟ คือ $y = 0.0258x$, $R^2 = 0.9997$ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซนต์ (IC_{50}) ของสารสกัดเปลือกอบเชย เมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) เป็นเวลา 24 (SK24), 36 (SK36) และ 48 (SK48) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 100 µg/mL กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

พบว่าสารสกัดจากเปลือกอบเชยด้วย 95 เปอร์เซนต์ EtOH โดยใช้เวลาเป็นเวลา 36

และ 48 ชั่วโมง และการสกัดด้วย MeOH โดยใช้เวลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม 108.53 ± 0.00 , 118.86 ± 2.24 และ 116.28 ± 0.00 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract) และไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การสกัดด้วย MeOH โดยใช้เวลาเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม 89.15 ± 0.00 mg GAE/g extract และพบว่าการสกัดอบเชยด้วยเฮกเซนได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเพียง 27.13 ± 0.00 และ 23.26 ± 0.00 mg GAE/g extract เมื่อใช้เวลาเป็นเวลา 48 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ และไม่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากอบเชยที่สกัดด้วยเฮกเซนที่ใช้เวลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลมีโครงสร้างของหมู่ฟีนอลที่สามารถรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจึงสอดคล้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล (มีค่าสูงสุด 1000 mgGAE/g extract) มีความรวดเร็วมากกว่าการวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล DPPH (มีค่าสูงสุด 100 เปอร์เซนต์) เนื่องจากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทำให้สามารถเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (รูปที่ 7) ระหว่างค่า IC_{50} ต่อ DPPH และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม พบว่ามีค่า -0.58 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงลบ แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงจะทำให้ค่า IC_{50} ต่อ DPPH ลดลง

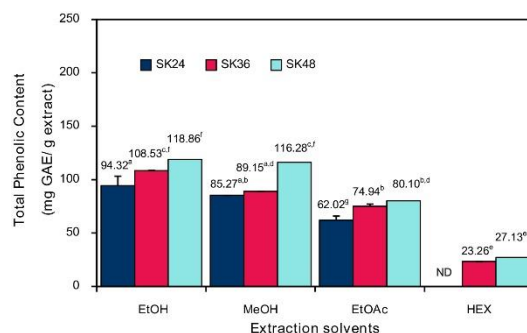
3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การศึกษาการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากสารสกัดจากเปลือกอบเชยพบว่าการสกัดเปลือกอบเชยด้วย EtOH โดยใช้เวลาเป็นเวลา 36

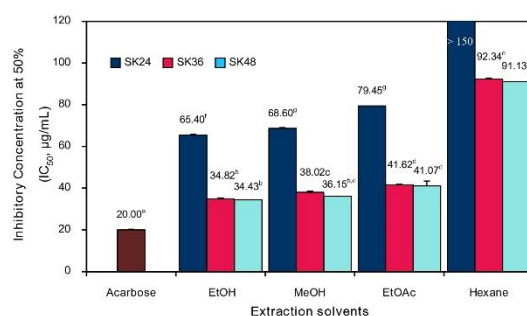
และ 48 ชั่วโมง และการสกัดด้วย MeOH โดยเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เป็น 34.82 ± 0.25 , 34.43 ± 0.03 และ 36.15 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และเมื่อสกัดอบเชยที่ด้วยเมทานอล เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าค่า IC_{50} เป็น 38.02 ± 0.06 $\mu\text{g/mL}$ รองลงมาเป็นการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตโดยเขย่าเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า IC_{50} เป็น 92.34 ± 0.11 และ 91.13 ± 2.36 $\mu\text{g/mL}$ ขณะที่การสกัดด้วยเฮกเซนโดยเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือค่า IC_{50} มากกว่า 500 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 5) ในการเปรียบเทียบค่า IC_{50} กับตัวควบคุมบวก ได้แก่ อะคาร์โบส พบว่าค่าความเข้มข้นในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ร้อยละ 50 ของอะคาร์โบส คือ 20 ± 0.38 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 6) ซึ่งมากกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดอบเชยอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ผลได้การสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (รูปที่ 7) ปรากฏว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) และผลได้การสกัดมีค่า -0.9 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงลบแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ทำให้ผลได้การสกัดสูงจะทำให้ IC_{50} ต่อเอนไซม์ลดลง (ยับยั้งได้ดีขึ้น) ขณะที่ IC_{50} ต่อเอนไซม์ และ IC_{50} ต่อ DPPH มีความสัมพันธ์เชิงบวก คือ 0.94 นอกจากนี้ ค่า IC_{50}

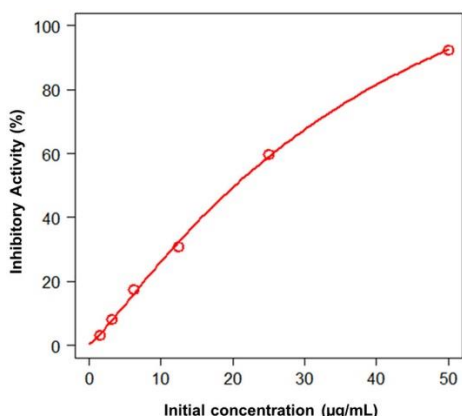
ต่อเอนไซม์และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมีสัมพันธ์เชิงลบต่อกัน เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.62 ซึ่งให้ถือว่าเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากจะสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้มากเช่นกัน



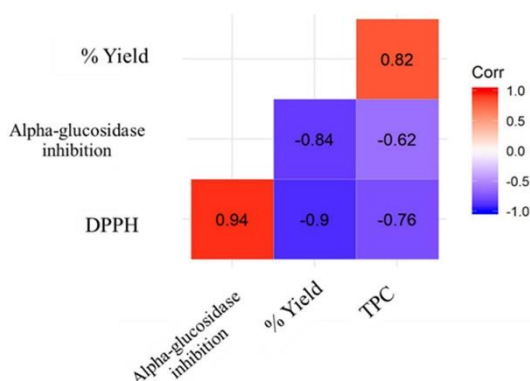
รูปที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (TPC) ของสารสกัดเปลือกอบเชยเมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) ที่เวลา 24 (SK24), 36 (SK36) และ 48 (SK48) ชั่วโมง



รูปที่ 5 ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดเปลือกอบเชย เมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) เมทานอล (MeOH) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเฮกเซน (HEX) ที่เวลา 24 (SK24), 36 (SK36) และ 48 (SK48) ชั่วโมง



รูปที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของอะคาร์โบส



รูปที่ 7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันระหว่างค่าความเข้มข้นในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ผลได้การสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

4. สรุป

ผลการทดลองเห็นได้ว่าการสกัดผงอบเชยด้วย EtOH ทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูง ถึงแม้ว่าจะมีผลได้การสกัดต่ำกว่า MeOH อย่างไรก็ตาม EtOH ก็เป็นตัวทำละลายที่ราคาถูกและไม่เป็นพิษ EtOH จึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออก

ฤทธิ์เพื่อลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด แม้ว่าสารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสต่ำกว่าอะคาร์โบส ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แต่ผลการทดลองก็เห็นได้ชัดว่าการสกัดสารจากเปลือกอบเชยด้วย EtOH เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก็สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาเบาหวานชนิดที่ 2

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ 05/2560)

6. รายการอ้างอิง

- Barchan, A., Kali, M.B., Arakrak, A., Pagan, R. and Laglaoui, A., 2014, The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts, Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3: 399-412.
- Colhoun, H.M., Betteridge, D.J., Durrington, P.N., Hitman, G.N., Neil, H.A., Livingstone, S.J., Thomason, M.J., Mackness, M.I., Charlton-Menys, V. and Fuller, J.H., 2004, Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): Multicentre randomised placebo-controlled trial, Lancet 364: 685-696.
- de Melo, E.B., Silveira, G. and Carvalho, I., 2006, α - and β -Glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity, Tetrahedron 62: 10277-10302.

- Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U. and Shaw, J.E., 2014, Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 103: 137-149.
- Loh, S.P. and Hadira, O., 2011, *In vitro* inhibitory potential of selected Malaysian plants against key enzymes involved in hyperglycemia and hypertension, *Malays J. Nutr.* 17: 77-86.
- Wang, C.C.L., Hess, C.N., Hiatt, W.R. and Goldfine, A.B., 2016, Clinical update: Cardiovascular disease in diabetes mellitus: Atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus, *Mechan. Manag. Clin. Considerat. Circulat.* 133: 2459-2502.
- Marcovecchio, M.L., 2017, Complications of acute and chronic hyperglycemia, *US Endocrinol.* 13: 1-5.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A. and Watkins, J.B., 2003, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 24-38.
- Mathew, S. and Abraham, T.E., 2006, *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies, *Food Chem. Toxicol.* 44: 198-206.
- Shihabudeen, H.M.S., Priscilla, D.H. and Thirumurugan, K., 2011, Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats, *Nutr. Metab.* 8: 46-46.
- Muhammad, D.R.A. and Dewettinck, A., 2017, Cinnamon and its derivatives as potential ingredient in functional food: A review, *Int. J. Food Propert.* 20: 2237-2263.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D., 2016, Dose-response analysis using R., *PLoS One* 10(12): e0146021.
- Santos, C.M.M., Freitas, M. and Fernandes, E., 2018, A comprehensive review on xanthone derivatives as alpha-glucosidase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 157: 1460-1479.
- Tundis, R., Loizzo, M.R. and Menichini, F., 2010, Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update, *Mini. Rev. Med. Chem.* 10: 315-331.
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y. and Zhang, W., 2014, Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention, *Int. J. Med. Sci.* 11: 1185-1200.