

รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างของ
ไซยานิดินและอนุพันธ์ไซยานิดินชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้ง
เอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและอัลฟาอะไมเลส
ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว

**Comparative studies between different structures
of cyanidin and derivatives on α -glucosidase
and α -amylase inhibition as well as their
anti-hyperglycemic activities in rats**

โดย

รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์
ภาควิชา เกษัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

ผศ.ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจาก เงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551-2552



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไซยานิดินและอนุพันธ์ เป็นสารพวกแอนโธไซยานินจากธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในอาหารที่มนุษย์รับประทาน เช่น ธัญพืช ถั่ว ผลไม้ ผัก และ ไวน์แดง การบริโภคแอนโธไซยานินเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น หลอดเลือดแข็งตัว โรคหัวใจ มะเร็ง และเบาหวาน การยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและอัลฟาอะไมเลส เป็นหนึ่งในวิธีการรักษาที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต ช่วยชะลอการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กระบวนการดังกล่าวช่วยลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสและมีผลให้ลดระดับน้ำตาลภายหลังรับประทานได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ของไซยานิดิน และอนุพันธ์ รวมถึงกลไกการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและอัลฟาอะไมเลส นอกจากนี้ยังศึกษาถึงการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและอัลฟาอะไมเลสของไซยานิดิน และอนุพันธ์ร่วมกับอะคาร์โบส รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของไซยานิดิน หรือ อนุพันธ์ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว ผลการทดลองพบว่า ลำดับการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครส (อัลฟาไกลูโคซิเดส) ของไซยานิดิน และอนุพันธ์เป็นดังนี้ คือ ไซยานิดิน-3- รุติโนไซด์ > ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ > ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน > ไซยานิดิน-3,5-กลูโคไซด์ และในขณะเดียวกัน ลำดับการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส คือ ไซยานิดิน-3- รุติโนไซด์ > ไซยานิดิน \cong ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ \cong ไซยานิดิน-3,5-กลูโคไซด์ ในความเข้มข้นต่ำของไซยานิดิน-3- รุติโนไซด์ ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เสริมฤทธิ์แบบซินเนอร์จิสกับอะคาร์โบส ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครส อย่างไรก็ตามมีเพียงแต่ไซยานิดิน-3-รุติโนไซด์ เท่านั้นที่เสริมฤทธิ์แบบซินเนอร์จิสกับอะคาร์โบสที่ความเข้มข้นต่ำต่อการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส และจากการวิเคราะห์ชนิดการยับยั้งพบว่าไซยานิดิน-3-รุติโนไซด์และไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์มีการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันผสมต่อการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

ไซยานิดิน-3- รุติโนไซด์ (Cya3R) ขนาด 100 และ 300 mg/kg สามารถชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในหนูขาวภายหลังที่ได้รับการป้อนแป้ง น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหลอดทดลอง นอกจากนี้ การให้ Cya3R ขนาด 30 mg/kg ร่วมกับ acarbose สามารถเสริมฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสัตว์ทดลองภายหลังได้รับการป้อนแป้ง น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบในหลอดทดลองเช่นกัน จากผลการศึกษารูปได้ว่า ไซยานิดินและอนุพันธ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและอัลฟาอะไมเลสที่มีประสิทธิภาพ จึงอาจสามารถนำมาใช้เพื่อชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสภายหลังการรับประทานอาหาร หรือใช้ร่วมกับอะคาร์โบสในการรักษาโรคเบาหวานได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Cyanidin and its derivatives, the natural anthocyanins, are widely distributed in human diet through crops, beans, fruits, vegetables, and red wine. Consumption of anthocyanins is associated with a reduced risk of several degenerative diseases such as atherosclerosis, cardiovascular disease, cancer, and diabetes. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase is one of the therapeutic approaches for carbohydrate absorption, by delaying digestion of disaccharides to absorbable monosaccharides. This leads to a reduction in glucose absorption and, subsequently, the rise of postprandial hyperglycemia is attenuated. Thus, this study was to evaluate the inhibitory effects of cyanidin and its derivatives both *in vivo* and *in vitro* and their kinetic inhibitions on α -glucosidase and α -amylase. Moreover, the study was also investigated the synergistic inhibition of cyanidin derivatives and acarbose on α -glucosidase and α -amylase. It was found that the order of potency on intestinal maltase and sucrase (α -glucosidase) was cyanidin-3-rutinoside > cyanidin-3-galactoside > cyanidin-3-glucoside > cyanidin > cyanidin-3,5-diglucoside. In the meantime, it was cyanidin-3-rutinoside > cyanidin \cong cyanidin-3-glucoside > cyanidin-3-galactoside \cong cyanidin-3,5-diglucoside on α -amylase. A low dose of cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside showed a synergistic inhibition on intestinal α -glucosidase (maltase and sucrase) when combined with acarbose. However, only cyanidin-3-rutinoside exhibited a synergistic inhibition on α -amylase at the low dose of acarbose. A kinetic analysis showed that cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-galactoside exerted a mixed type inhibition against intestinal sucrase.

Cyanidin-3-rutinoside (Cya3R) at concentration of 100 and 300 mg/kg delayed post-prandial hyperglycemia in rat after receiving maltose, sucrose and starch. In addition, the administration of Cya3R (30 mg/kg) simultaneously with acarbose exerted a synergistic effect on decreasing an elevation of blood glucose concentration in rats after loading maltose, sucrose and starch. These results were consistent with the ones obtained from *in vitro* experiments. Taken together, the results indicated that cyanidin and its derivatives were the effective α -glucosidase and α -amylase inhibitors and could be used to delay an elevation of blood glucose concentration after meal or to combine with acarbose for treatment of diabetes.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	2
บทคัดย่อภาษาไทย.....	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	4
สารบัญภาพ.....	6
สารบัญตาราง.....	7
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	8
บทนำ.....	9
วิธีการทดลอง.....	12
ผลการทดลอง.....	16
วิจารณ์ผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง.....	32
การเผยแพร่ผลงานวิจัย.....	34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของแอนโธไซยานิน	10
2	แสดงสูตรโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	11
3	Lineweaver Burk plot ของ cyanidin-3-rutinoside (A) และ cyanidin-3-galactoside (B) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส	20
4	% enzyme inhibition ของ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไซยานิดินและอนุพันธ์ (A) Cya (B) Cya3Glu (C) Cya3Gal (D) Cya3R (E) Cya35Glu ที่ความเข้มข้น 1 μM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส	22
5	% enzyme inhibition ของ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไซยานิดินและอนุพันธ์ (A) Cya (B) Cya3Glu (C) Cya3Gal (D) Cya3R (E) Cya35Glu ที่ความเข้มข้น 1 μM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส	24
6	ระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลมอลโตส 3 g/kg	26
7	ระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลซูโครส 3 g/kg	26
8	ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลมอลโตส 3 g/kg	27
9	ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลซูโครส 3 g/kg	27
10	ระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำแป้ง 3 g/kg	28
11	ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำแป้ง 3 g/kg	29

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	ฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 mM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครส	16
2	ค่า IC ₅₀ ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครส	17
3	ฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 μ M ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase	17
4	ค่า IC ₅₀ ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase	18
5	ฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 0.1 μ M ในการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase	25



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

IDDM	=	Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
NIDDM	=	Noninsulin-Dependent Diabetes mellitus
Cya	=	Cyanidin
Cya3Glu	=	Cyanidin-3-glucoside
Cya3,5Glu	=	Cyanidin-3, 5-diglucoside
Cya3Gal	=	Cyanidin-3-galactoside
Cya3R	=	Cyanidin-3-rutinoside
mM	=	millimolar
μ M	=	micromolar
nM	=	nanometre
mg	=	miligram
ml	=	milliliter
μ l	=	microlitre
dl	=	deciliter
SEM	=	Standard Error of Mean
IC ₅₀	=	ค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

Diabetes Mellitus (DM) เป็นโรคความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตภายในร่างกาย แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ 1) เกิดเนื่องจากภาวะการขาดฮอร์โมนอินซูลิน β -cell ของตับอ่อนไม่สามารถสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินได้ เรียกโรคเบาหวานชนิดนี้ว่า “Insulin Dependent Diabetes Mellitus” (IDDM) ซึ่งโรคเบาหวานชนิดนี้ จะต้องอาศัยฮอร์โมนอินซูลินในการรักษา 2) ภาวะโรคเบาหวานที่ตับอ่อนสามารถสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินเข้าสู่กระแสเลือดได้ แต่ฮอร์โมนอินซูลินไม่สามารถทำงาน หรือออกฤทธิ์ได้ เรียกโรคเบาหวานชนิดนี้ว่า “Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus” (NIDDM) การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานทำให้เกิดความผิดปกติเกี่ยวกับโครงสร้างและการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆ ของร่างกายตามมา โดยเฉพาะระบบ ตา ไต หัวใจ และหลอดเลือด ซึ่งจัดเป็นภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานอันเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญ (WHO, 1999; Caterson et al., 2004) แนวโน้มในอนาคตองค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่า จำนวนของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกจะเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 380 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2025 ซึ่งปัจจุบันพบจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลก 246 ล้านคน และพบจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากถึง 90-95% ของจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด (WHO, 2006) สำหรับประชากรในประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.536 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2000 และคาดว่าปี ค.ศ. 2030 จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.739 ล้านคน จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทุกปี ทั้งนี้เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นสิ่งสำคัญในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานคือ การทำให้ผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกับภาวะปกติให้มากที่สุด เพื่อช่วยในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้ ทั้งนี้ยังช่วยทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตดีขึ้นและอายุยืนยาวขึ้น (Rohlfing et al., 2002)

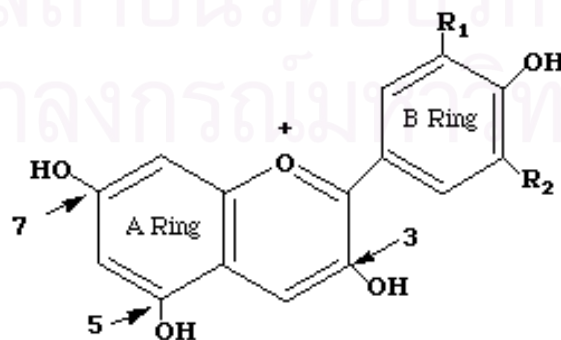
การรักษาโรคเบาหวานนอกเหนือจากการควบคุมอาหาร ออกกำลังกาย ยังมีความจำเป็นที่จะต้องให้อินซูลินทดแทนในผู้ป่วยเบาหวานชนิดชนิดที่ 1 และให้ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งถ้าหากให้การรักษาเป็นระยะเวลายาวนานและไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ก็อาจมีการให้อินซูลินร่วมด้วย (Clinical Guideline Task Force, 2005; ADA, 2007; American College of Endocrinology, 2007) ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานในปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ 1) sulfonylureas เช่น glibenclamide และ glipizide กลไกในการออกฤทธิ์คือ กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อน (Malaisse et al., 1990) 2) biguanide เช่น metformin กลไกในการออกฤทธิ์คือ การไปกระตุ้นการทำงานของอินซูลินโดยเพิ่มกระบวนการกลูโคสเมแทบอลิซึม (Herman et al., 1979) 3) thiazolidinediones เช่น rosiglitazone กลไกในการออกฤทธิ์คือ ไปกระตุ้นการทำงานของตัวรับฮอร์โมนอินซูลินส่งผลทำให้การดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Perfetti et al., 2005) 4) α -glucosidase inhibitors เช่น acarbose กลไกในการออกฤทธิ์คือ ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่บริเวณผนังลำไส้เล็ก ช่วยชะลอกระบวนการย่อยและการดูดซึมของคาร์โบไฮเดรต ส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลง (Vannasaeng et al., 1995; Decrecharawong et al., 1996) ในปัจจุบันยาในกลุ่มของ α -glucosidase inhibitors เช่น อะคาร์โบส (acarbose) ส่วนหนึ่งได้ถูกนำมาใช้รักษาในกรณีผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารได้ (American Diabetes Association, 2007) ซึ่งการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารจะสามารถช่วยลดหรือชะลออัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังจากโรคเบาหวานที่เกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและหัวใจได้ โรคดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Apichati et al., 2001) นอกจากนี้ยังใช้รักษาผู้มีภาวะ Impaired fasting glucose

ร่วมกับการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย (Chang et al., 2003) หรือใช้รักษา ร่วมกับกับยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่นในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดชนิดที่ 2 (American Diabetes Association, 2007) อย่างไรก็ตามยาในกลุ่ม α -glucosidase inhibitors ยังพบผลข้างเคียง คือ ท้องอืด แน่นอึดอัดท้อง ท้องร่วง เป็นต้น (Coniff et al., 1995) และนอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมพบว่า เมื่อให้ในขนาดที่สูงและมีการดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตจะส่งผลทำให้เกิดพิษต่อตับได้ (Andrade et al, 1996)

ดังนั้นนักวิจัยจึงได้พยายามคิดค้นนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของของสารเคมีให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น เช่น voglibose เป็นยาในกลุ่ม α -glucosidase inhibitors ใช้สำหรับในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ยาดังกล่าวได้ปรับปรุงโครงสร้างของสารตั้งต้นคือ valiolamine ที่ได้จากการหมัก *Streptomyces hygroscopicus* (Chen et al., 2006) รวมทั้งการนำสารธรรมชาติในกลุ่ม alpha-amylase inhibitors มาใช้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลงได้เช่นเดียวกัน (Yong-Mu et al., 2003) เนื่องจากเอนไซม์ α -amylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในขั้นตอนแรก ก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตต่อไป (Rhabasa-Lhoret and Chiasson, 2004)

แอนโธไซยานิน (Anthocyanins) เป็นสารเคมีที่ได้จากธรรมชาติ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ดี เป็นรงควัตถุที่พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิดที่นำมาใช้เป็นอาหารในชีวิตประจำวัน (Wang et al., 1997) เช่น ผลองุ่น ผลสตอร์เบอร์รี่ ดอกกระเจี๊ยบแดง แอลเดอร์เบอร์รี่ (elderberries) แบลคเคอแรนท์ (black currants) ราสเบอร์รี่ (rasberries) ดอกอัญชัน เป็นต้น ซึ่งรงควัตถุนี้มีบทบาทต่อสีในพืช ผัก ผลไม้ โดยให้ช่วงสีตั้งแต่สีแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน ละลายได้ดีในน้ำ (Matsui et al., 2006)

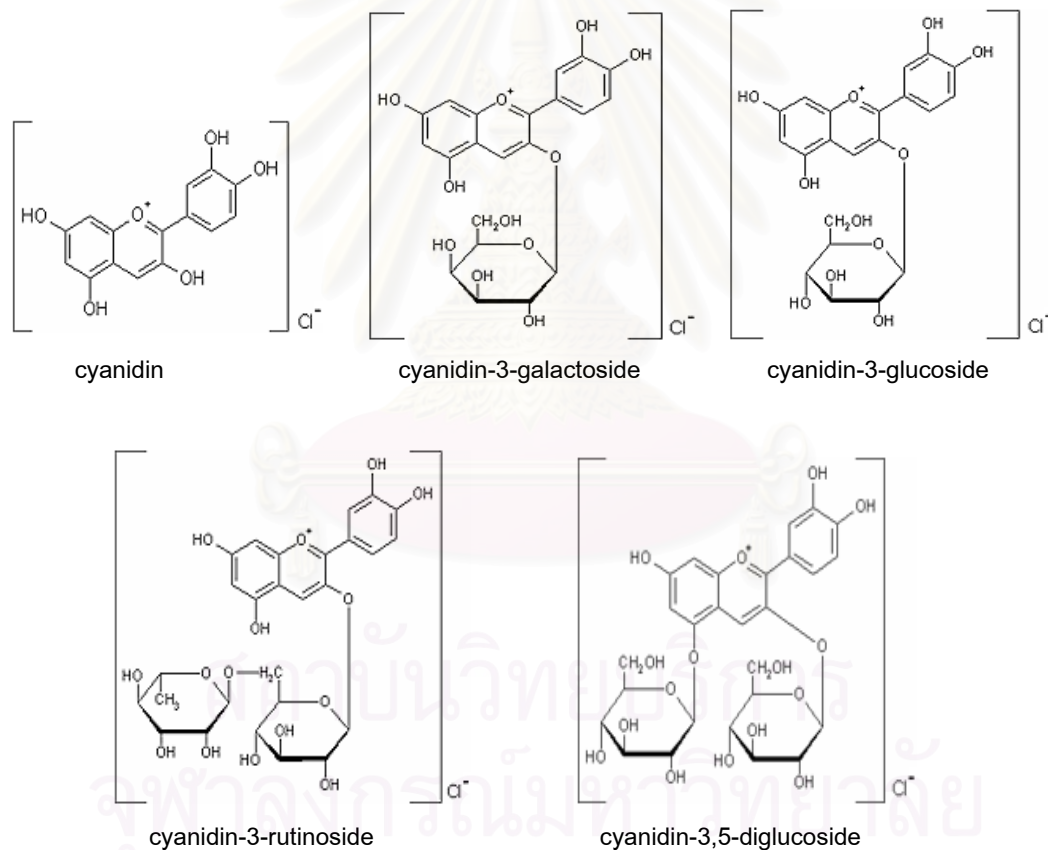
โครงสร้างหลักทางเคมีของแอนโธไซยานิน คือ $C_{15}H_{11}O_6$ (ภาพที่ 1) โมเลกุลประกอบด้วย aglycone จับตัวกับพันธะน้ำตาลไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) (Brouillard, 1982) น้ำตาลที่จับกับแอนโธไซยานินที่พบบ่อยคือ glucose นอกจากนี้ยังพบ monosaccharide เช่น xylose, galactose และ fructose เป็นต้น ส่วน disaccharides ส่วนใหญ่เป็น rutinose, sambubiose เป็นต้น โดยน้ำตาลส่วนใหญ่จะเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 บางครั้งจะพบคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ด้วย ดังนั้น แอนโธไซยานินที่พบได้บ่อยจะเป็น 3-monoside ซึ่งมีน้ำตาลเกาะ 1 ตัวที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ส่วน 3-bioside คือมีน้ำตาลมาเกาะ 2 ตัวที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 3,5-diglycoside คือมีน้ำตาลมาเกาะ 2 ตัว ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และที่ 5 น้ำตาลเหล่านี้จะช่วยให้แอนโธไซยานินมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น และละลายในน้ำได้ดีขึ้น



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของแอนโธไซยานิน

ไซยานิดิน (cyanidin) เป็นสารตัวหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโธไซยานิน มีอนุพันธ์ที่พบได้หลายชนิด (Wang et al., 1997; Seeram et al., 2001) โดยอนุพันธ์ที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ (cyanidin-3-galactoside), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside), ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) และ ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ (cyanidin-3,5-diglucoside) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่สนใจศึกษาในครั้งนี้

อนุพันธ์ต่างๆของไซยานิดินมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ชนิดของน้ำตาลและตำแหน่งที่น้ำตาลมาจับทำให้เกิดความแตกต่างทางโครงสร้างในแต่ละอนุพันธ์ โดยอนุพันธ์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาจับคือ น้ำตาล galactoside และ glucose จับยังตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 คือ cyanidin-3-galactoside และ cyanidin-3-glucoside ตามลำดับ ส่วน cyanidin-3,5-diglucoside มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นน้ำตาล glucose 2 ตัว มาจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และที่ 5 อนุพันธ์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ น้ำตาล rutinose มาจับคือ cyanidin-3-rutinoside (ภาพที่2)



รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไซยานิดินมากมาย เช่น ช่วยลดภาวะการเกิดโรคต่างๆ เช่น การเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular disease) มะเร็ง (cancer) และโรคเบาหวาน (diabetes) (Jayaprakasam et al., 2004) ซึ่งตัวอย่างเกี่ยวกับ

ฤทธิ์ลดการเกิดโรคเบาหวาน (diabetes) เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase (Matsui et al., 2001a, 2001b; Adisakwattana et al., 2004) เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Rie et al., 2007) และกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อนในสัตว์ทดลอง (Bolleddula et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ของ cyanidin-3-glucoside ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aldose reductase โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.7-27.5 μ g/mL ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว cyanidin-3-glucoside อาจสามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ด้วย (Robert et al., 2007)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของอนุพันธ์แอนโทไซยานินต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารโดยผ่านทางกรยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase มาก่อนรวมถึงการศึกษาชนิดของปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิด และการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของอนุพันธ์แอนโทไซยานิน กับยาแผนปัจจุบันในกลุ่มของ α -glucosidase inhibitor

ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของไซยานินต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase จากลำไส้เล็กของหนูขาวและเอนไซม์ α -amylase รวมทั้งศึกษาชนิดของปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์และการเสริมฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวร่วมกับ acarbose ซึ่งเป็นยาหลักในการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด นอกจากนี้การวิจัยยังทดสอบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังได้รับอาหารของไซยานินและอนุพันธ์ในหนูขาว งานวิจัยนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของไซยานินและอนุพันธ์ต่อการชะลอการย่อยและดูดซึมน้ำตาลกลูโคส และนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อปรับสภาพร่างกาย โดยควบคุมให้มีอุณหภูมิห้อง $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงสแตนเลส ขนาด 16 นิ้ว x 10 นิ้ว x 6 นิ้ว พร้อมด้วยวัสดุรองนอน ให้อาหารสำเร็จรูป CP082 mice feed และน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง ดูแลสัตว์ทดลองตามระเบียบของสภาวิจัยแห่งชาติ ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. Cyanidin	Chromadex, CA, USA
2. Cyanidin-3-glucoside	Chromadex, CA, USA
3. Cyanidin-3-rutinoside	Chromadex, CA, USA
4. Cyanidin-3-galactoside	Chromadex, CA, USA
5. Cyanidin-3,5-diglucoside	Chromadex, CA, USA
6. ชุดตรวจน้ำตาล (PGO enzyme)	Chromadex, CA, USA
7. 3,5-Dinitrosalicylic acid	Chromadex, CA, USA
8. Acarbose	Bayer, Germany

9. Heparin sulfate	Chromadex, CA, USA
10. Starch (analytic grade)	Chromadex, CA, USA
11. Alpha amylase (Procrine)	Chromadex, CA, USA
12. Maltose	Chromadex, CA USA
13. Sodium Potassium tartrate	Merck, Germany
14. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany
15. Phenol	Merck, Germany
16. Sodium sulfate (Na ₂ SO ₃)	Merck, Germany
17. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
18. Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
19. Sodium dihydrogenphosphate (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Germany
20. Methanol	Merck, Germany
21. Hydrochloric acid	Merck, Germany
22. Rat intestinal acetone powder	Sigma-Aldrich, USA
23. PGO enzyme	Sigma-Aldrich, USA
24. o-Dianistidine	Sigma-Aldrich, USA

การทดลองที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase โดยมีอนุพันธ์ของไซยานิดิน ทั้งหมดห้าชนิดด้วยกัน ได้แก่ cyanidin, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3,5-diglucoside โดยเตรียมความเข้มข้นของสารดังกล่าว 6 ความเข้มข้นผสมกับซับสเตรตได้แก่น้ำตาลมอลโตสเข้มข้น 25.9 mM หรือกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 48 mM ร่วมกับเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสจากหนู (ซึ่ง 100 mg ของเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้เล็กหนูขาวและละลายในสารละลาย 3 mL ของ 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0) โดยการทดลองที่ใช้น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครสมีความจำเพาะเอนไซม์เท่ากับ 0.68 และ 0.20 units/mg protein ตามลำดับ ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที (สำหรับน้ำตาลมอลโตส) และเวลา 60 นาที (สำหรับน้ำตาลซูโครส) จากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปตรวจสอบน้ำตาลกลูโคส โดยใช้วิธี glucose oxidation เปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่มีสารไซยานิดินเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ทำการทดลองซ้ำโดยใช้ acarbose ซึ่งใช้เป็นตัวยอ้างอิง (Pluempanupat et al., 2007)

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase โดยมีอนุพันธ์ของไซยานิดิน ทั้งหมดห้าชนิดด้วยกัน ได้แก่ cyanidin, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3,5-diglucoside โดยเตรียมความเข้มข้นของสารดังกล่าว 6 ความเข้มข้น เตรียมสารละลายไซยานิดินแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 mM ผสมกับ 1g/L น้ำแป้ง และเอนไซม์ α -amylase (3 units/mL) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย DNS reagent (1% 3,5-dinitrosalicylic acid, 0.2%

phenol, 0.05% Na₂SO₃, and 1% NaOH) นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาทีและเติมสารละลาย 40% Sodium potassium tartate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm (Kandra et al., 2005)

การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดของการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

เลือกสารที่แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดมาศึกษาชนิดการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ทำการเลือกความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์ 3 ความเข้มข้น เป็นความเข้มข้นที่อยู่ระหว่างค่า IC₅₀ ในการทดลองที่ 1 ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของซับสเตรตได้แก่ น้ำตาลซูโครส 5 ความเข้มข้นตามลำดับ จากสมการของ Lineweaver-burk พล็อตกราฟระหว่าง 1/V และ 1/[S] คำนวณ ค่า K_i และ K'_i กำหนดชนิดของการยับยั้งเอนไซม์

การทดลองที่ 4 ศึกษาชนิดของการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

เลือกสารที่แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด มาศึกษาชนิดการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ทำการเลือกความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์ 3 ความเข้มข้น เป็นความเข้มข้นที่อยู่ระหว่างค่า IC₅₀ ในการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 2 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของซับสเตรตได้แก่ น้ำตาลซูโครส 5 ความเข้มข้นตามลำดับ จากสมการของ Lineweaver-burk พล็อตกราฟระหว่าง 1/V และ 1/[S] คำนวณ ค่า K_i และ K'_i กำหนดชนิดของการยับยั้งเอนไซม์

การทดลองที่ 5 ศึกษาการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์ร่วมกับ acarbose

เลือกความเข้มข้นของอนุพันธ์ไซยานิดิน ณ ที่การยับยั้งต่ำที่สุด โดยผสมกับ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 หรือ การทดลองที่ 2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของอนุพันธ์ไซยานิดินแต่ละชนิด

การทดลองที่ 6 การทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของสารไซยานิดินในหนูขาว

ศึกษาผลเฉียบพลัน ในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของสารไซยานิดินในหนูขาว โดยการทำ oral carbohydrate tolerance test โดยใช้น้ำตาล maltose sucrose และ แป้ง ขนาด 3 ก./กก. เป็นสับสเตรท อดอาหารหนู 12 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง ใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว สำหรับสารที่จะทดสอบจะเลือกจากผลการทดลองที่ 1 และ 3 โดยเลือกสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase

การป้อนน้ำตาลมอลโตส (maltose)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 1 มล.

กลุ่มที่ 2 ป้อน acarbose 3 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารไซยานิดิน 30 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารไซยานิดิน 100 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารไซยานิดิน 300 มก./กก.

การป้อนน้ำตาลซูโครส (sucrose)

กลุ่มที่ 2 ป้อน acarbose 3 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารไซยานิดิน 30 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารไซยานิดิน 100 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารไซยานิดิน 300 มก./กก.

การป้อนแป้ง (starch)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 1 มล.

กลุ่มที่ 2 ป้อน acarbose 5 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารไซยานิดิน 30 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารไซยานิดิน 100 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารไซยานิดิน 300 มก./กก.

เก็บเลือดหนูโดยวิธีเจาะจากหลอดเลือดดำที่หาง (tail vein) ก่อนให้สารทดสอบ (t=0) หลังจากนั้น 10 นาทีจึงป้อนน้ำตาล (maltose หรือ sucrose) หรือ แป้ง แล้วเก็บเลือดที่ระยะเวลา 30, 60, 120 และ 180 นาทีภายหลังจากป้อนน้ำตาลหรือ แป้ง ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือด หลังจากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมาด้วยความเร็วรอบ 4,000 rpm นำพลาสมามาทดสอบหาความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในพลาสมา โดยใช้วิธี glucose oxidase test แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

การรายงานผล

การคำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์ จากสมการดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{[C_c - C_i]}{C_c} \times 100$$

เมื่อ C_c คือ ความเข้มข้นของกลูโคส ที่ปล่อยออกมาเมื่อไม่มีไซยานิดิน

C_i คือ ความเข้มข้นของของกลูโคส ที่ปล่อยออกมาเมื่อมีไซยานิดิน

การคำนวณความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50})

พล็อตกราฟระหว่าง % การยับยั้งเอนไซม์ กับ log ความเข้มข้นของสารยับยั้ง

คำนวณ IC_{50} จากโปรแกรม Sigma Plot

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ยของ $IC_{50} \pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ IC_{50} จำนวนค่า $IC_{50} = 3$ ในแต่ละการทดลอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของไซยานิดินแต่ละชนิด ประเมินความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase คำนวณสถิติโดยใช้ Student t

test มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ กับการเปรียบเทียบในหลอดทดลอง การทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุมโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) ในสัตว์ทดลอง

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของอนุพันธ์ไซยานิดินที่ความเข้มข้น 1 mM ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส (ตารางที่ 1) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีค่า enzyme activity เท่ากับ 0.68 units/mg protein พบว่า cyanidin-3-rutinoside มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวมากที่สุด แต่ cyanidin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งจากมากไปน้อยได้ดังนี้ cyanidin-3-rutinoside > cyanidin-3-galactoside > cyanidin-3-glucoside > cyanidin > cyanidin-3,5-diglucoside

นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของอนุพันธ์ไซยานิดินที่ความเข้มข้น 1 mM ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส เอนไซม์ดังกล่าวมีค่า enzyme activity เท่ากับ 0.10 units/mg protein โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ให้ผลในลักษณะเช่นเดียวกันกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส คือ cyanidin-3-rutinoside > cyanidin-3-galactoside > cyanidin-3-glucoside > cyanidin > cyanidin-3,5-diglucoside

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 mM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครส

ความเข้มข้นของสารในกลุ่มไซยานิดินและอนุพันธ์ (1 mM)	% Enzyme inhibition	
	Maltase	Sucrase
Cyanidin (Cya)	13.75 ± 1.88	43.36 ± 0.07
Cyanidin-3-glucoside (Cya3Glu)	22.38 ± 1.42	51.96 ± 0.93
Cyanidin-3,5-diglucoside (Cya35Glu)	5.23 ± 0.78	10.41 ± 0.18
Cyanidin-3-galactoside (Cya3Gal)	34.76 ± 1.05	64.00 ± 0.36
Cyanidin-3-rutinoside (Cya3R)	41.37 ± 2.40	72.21 ± 0.43

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean ± SEM, n = 3

จากการคัดกรองไซยานิดินและอนุพันธ์พบว่า ไซยานิดินและอนุพันธ์มีความจำเพาะกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสมากกว่าเอนไซม์มอลเตส ดังในการทดลองต่อไปจึงทำการทดลองเพื่อหาค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ต่อเอนไซม์ซูเครสและมอลเตส ตารางที่ 2 แสดงถึงค่า IC_{50} ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสและมอลเตส พบว่า Cya3R มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ไซยานิดินตัวอื่นๆ acarbose ใช้เป็นยาหลักในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส และซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.67 ± 0.05 และ $21.63 \pm 3.48 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

ซึ่งต่ำกว่า Cya3R อยู่ประมาณ 528 เท่า และ 17 เท่า แสดงว่า Cya3R เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ซูเครสในระดับปานกลาง แต่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์มอลเตสได้ไม่ดี

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC₅₀ ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครส

เอนไซม์	ค่า IC ₅₀					
	(Cya) (mM)	Cya3Glu (mM)	Cya35Glu (mM)	Cya3Gal (mM)	Cya3R (mM)	Acarbose (μM)
(Maltase) มอลเตส	>3	> 3	> 3	3.83± 0.21	1.41 ± 0.09	2.67 ± 0.05
(Sucrase) ซูเครส	1.42 ± 0.25	0.97 ± 0.05	0.52 ± 0.06	> 1	0.38 ± 0.02	21.63 ± 3.48

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean±SEM, n= 3

2. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของอนุพันธ์ไซยานิดินที่ความเข้มข้น 1 mM ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase (ตารางที่ 3) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีค่า enzyme activity เท่ากับ 1 units/ml พบว่า cyanidin-3-rutinoside มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวมากที่สุด cyanidin และ cyanidin-3-glucoside มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์รองลงมา เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งจากมากไปน้อยได้ดังนี้ คือ cyanidin-3-rutinoside > cyanidin \cong cyanidin-3-glucoside > cyanidin-3-galactoside \cong cyanidin-3,5-diglucoside

ตารางที่ 4 แสดงถึงค่า IC₅₀ ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase พบว่า Cya3R มีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ตัวอื่นๆ acarbose ใช้เป็นยาหลักในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.10±0.05 μM ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Cya3R แสดงว่า Cya3R เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ในระดับที่ดีมาก

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 mM

ความเข้มข้นของสารในกลุ่มไซยานิดินและอนุพันธ์ (1 mM)	% Enzyme inhibition
	α -amylase
Cyanidin (Cya)	64.82±0.01
Cyanidin-3-glucoside (Cya3Glu)	63.06±0.01
Cyanidin-3,5-diglucoside (Cya35Glu)	31.34±0.01
Cyanidin-3-galactoside (Cya3Gal)	32.76±0.01
Cyanidin-3-rutinoside (Cya3R)	70.31±0.01

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean±SEM, n= 3

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase

ค่า IC_{50}					
(Cya) (μ M)	Cya3Glu (μ M)	Cya35Glu (μ M)	Cya3Gal (μ M)	Cya3R (μ M)	Acarbose (μ M)
381.23 \pm 0.02	302.80 \pm 0.05	>1	> 1	24.45 \pm 0.03	18.10 \pm 0.05

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean \pm SEM, n= 3

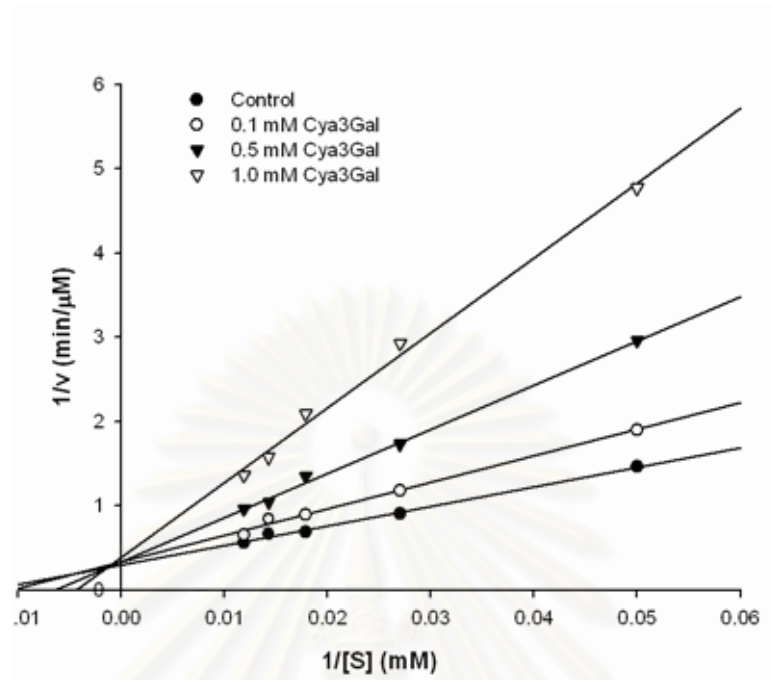
3. กลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสและเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์

ภายหลังจากทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสของไซยานิดินและอนุพันธ์ จึงได้เลือก Cya3R และ Cya3Gal เพื่อศึกษาถึงกลไกในปฏิกิริยายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส จากการศึกษาโดยใช้ Lineweaver-burk plot (รูปที่ 3A และ 3B) พบว่า Cya3R และ Cya3Gal มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสแบบแข่งขันได้ชนิดผสม (mixed noncompetitive) และเมื่อคำนวณค่าคงที่ในการยับยั้งเอนไซม์โดยอาศัย secondary plot พบว่า Cya3R มีค่า $K_i = 0.32$ และ Cya3Gal มีค่า $K_i = 0.40$ ตามลำดับ และมีค่า K'_i ของ Cya3R = 2.90 และ Cya3Gal = 3.22 เมื่อพิจารณาจากค่า K_i และ K'_i ของทั้ง Cya3R และ Cya3Gal พบว่า สารทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส โดยจับกับเอนไซม์ในสถานะที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับสับสเตรต (enzyme substrate complex (ESI)) มากกว่าการจับกับเอนไซม์ (EI) โดยตรง

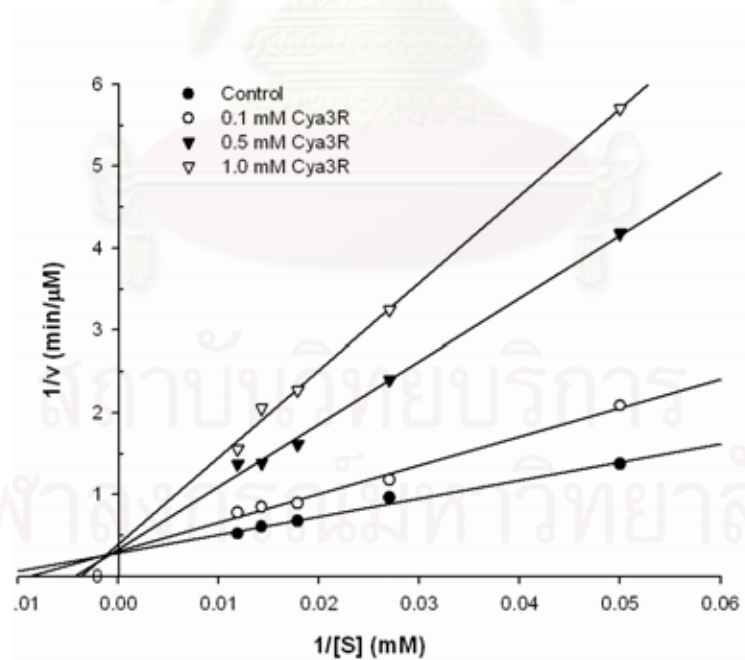
จากกราฟ Lineweaver-burk plot (รูปที่ 3C) และตารางที่ 4 แสดงค่า V_{max} และ K_m พบว่า ค่าของ V_{max} คือ จุดตัดบนแกน y ลดลง เมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเพิ่มขึ้น และค่า K_m คือ จุดตัดบนแกน X ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงสรุปได้ว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ของ Cya3R นั้นเป็นชนิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน และในขณะเดียวกันเมื่อทำการคำนวณหาค่า K_i และ K'_i ที่ได้จากสมการ รวมทั้งจากจุดตัดบนแกน X ของ secondary plot พบว่า มีค่าที่ใกล้เคียงกันคือ 1.6×10^{-5} M จึงสรุปได้ว่าค่าความสามารถในการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์อิสระกับ Cya3R ซึ่งจัดว่าเป็นตัวยับยั้ง (K_i) มีค่าใกล้เคียงกันกับค่าความสามารถในการจับกันระหว่าง Cya3R กับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์อิสระกับสับสเตรต (K'_i)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

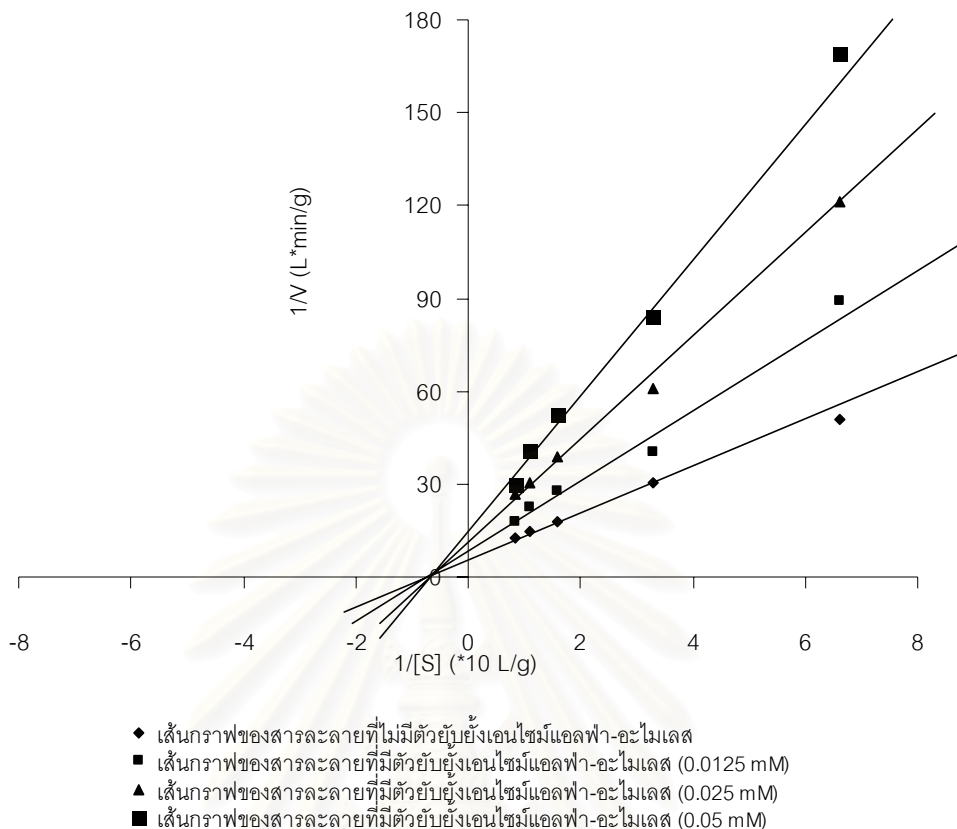
(A)



(B)



(C)

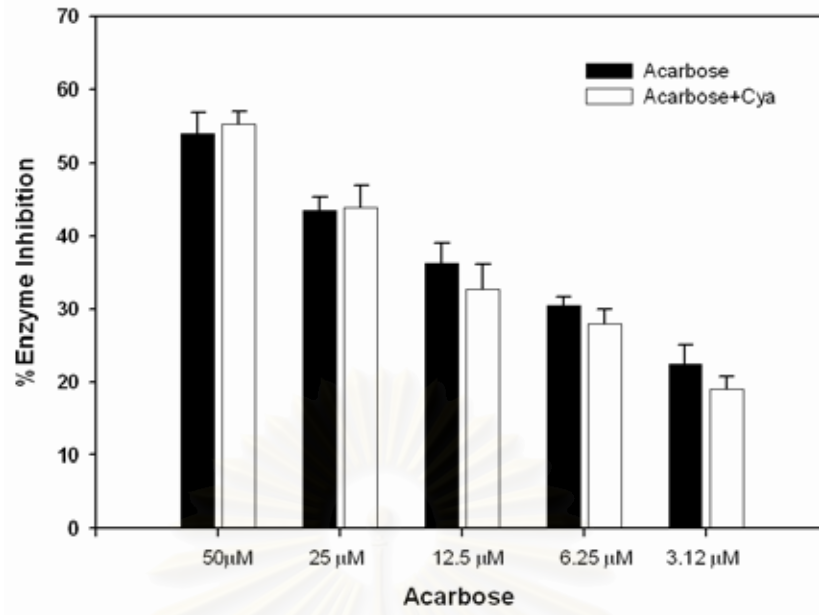


รูปที่ 3 Lineweaver Burk plot ของ (A) Cya3Gal และ (B) Cya3R ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส และ (C) Lineweaver Burk plot ของ Cya3R ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ผลการทดลอง แสดงเป็นค่า mean \pm SEM, n = 3

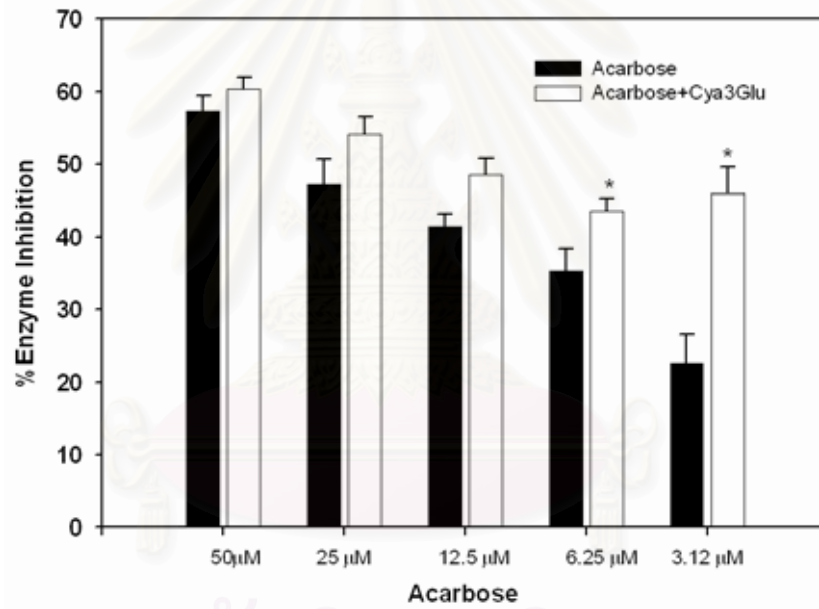
4. การเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของ acarbose ร่วมกับไซยานิดิน และอนุพันธ์

จากรูปที่ 4 acarbose สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ acarbose และเมื่อผสม acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆกับไซยานิดินหรืออนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ พบว่า Cya ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ (รูปที่ 4A) ส่วน Cya3Glu (รูปที่ 4B), Cya3Gal (รูปที่ 4C) และ Cya3R (รูปที่ 4D) สามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ได้ที่ความเข้มข้น 6.25 μ M ของ acarbose แต่การเสริมฤทธิ์กับ acarbose ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (3.12 μ M) สูงกว่าที่ความเข้มข้น 6.25 μ M โดยพบว่าการเสริมฤทธิ์ของ Cya3Glu, Cya3Gal และ Cya3R กับ acarbose ที่ความเข้มข้นต่ำ (3.12 μ M) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2.0 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ acarbose เพียงอย่างเดียว แต่ Cya3,5Glu (รูปที่ 4E) ไม่สามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ได้เลย

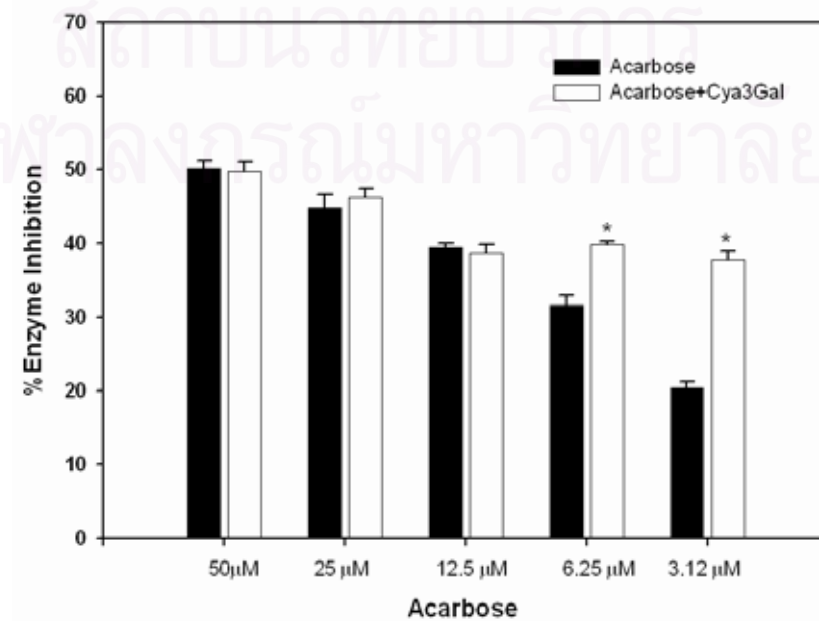
(A)



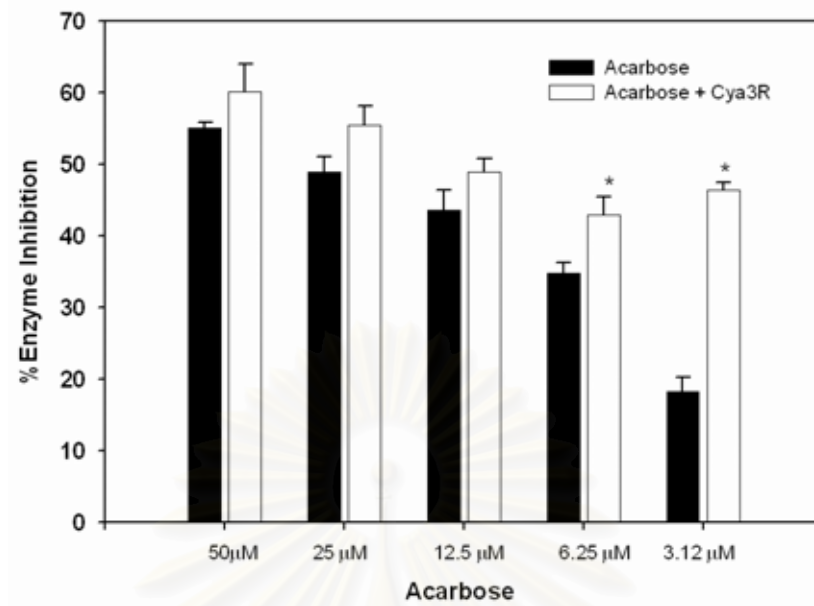
(B)



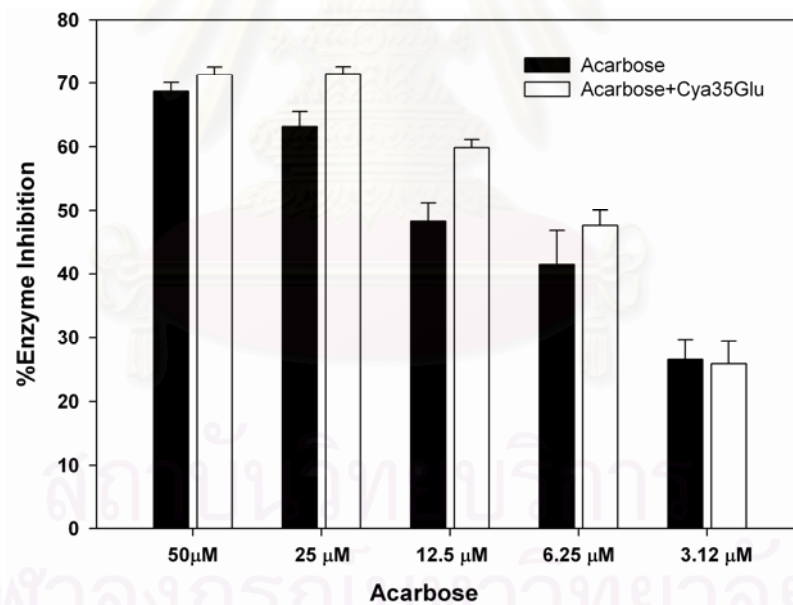
(C)



(D)



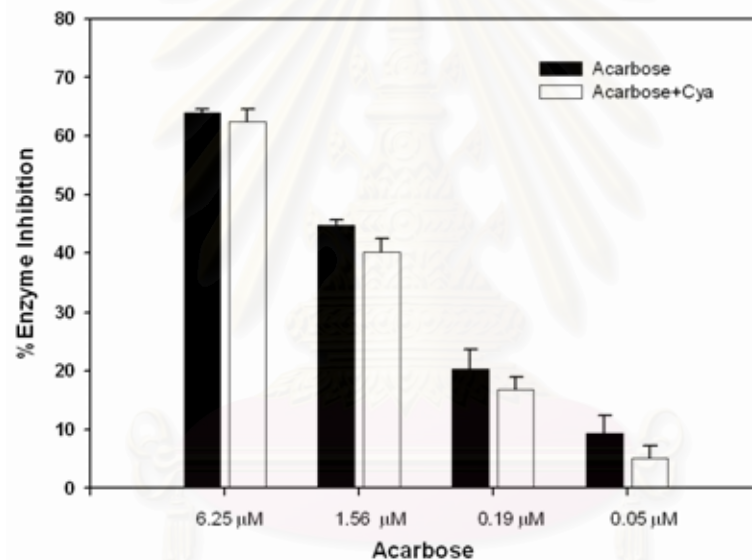
(E)



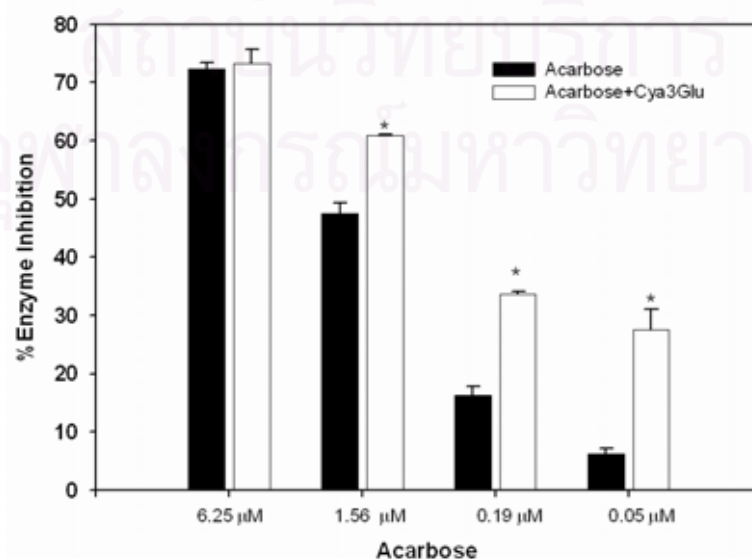
รูปที่ 4 แสดง % enzyme inhibition ของ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไซยานิดินและอนุพันธ์ (A) Cya (B) Cya3Glu (C) Cya3Gal (D) Cya3R (E) Cya35Glu ที่ความเข้มข้น 1 μM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส ผลการทดลองแสดงเป็น Mean±SEM, n= 3

จากรูปที่ 5 Acarbose สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ acarbose เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อผสม acarbose กับไซยานิดินหรืออนุพันธ์ที่มีความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไซยานิดินและอนุพันธ์ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ จากผลการทดลองพบว่า Cya ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ (รูปที่ 5A) ส่วน Cya3Gal (รูปที่ 5C) และ Cya3R (รูปที่ 5D) สามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ได้ที่ความเข้มข้น $0.19 \mu\text{M}$ ของ acarbose ยกเว้น Cya3Glu (รูปที่ 5B) ที่เสริมฤทธิ์ acarbose ที่ความเข้มข้นสูง ($1.56 \mu\text{M}$) สำหรับ acarbose ที่ความเข้มข้นต่ำสุด ($0.05 \mu\text{M}$) Cya3Glu และ Cya3R สามารถเสริมฤทธิ์ได้มากกว่า Cya3Gal โดยที่ความเข้มข้นนี้ Cya3Glu และ Cya3R เสริมฤทธิ์ให้มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 3.0 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสโดยใช้ acarbose เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ Cya35Glu (รูปที่ 5E) สามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ที่ความเข้มข้น 1.56 และ $0.19 \mu\text{M}$ ของ acarbose เท่านั้น และเมื่อลดความเข้มข้นของ acarbose ลง Cya35Glu ไม่สามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้

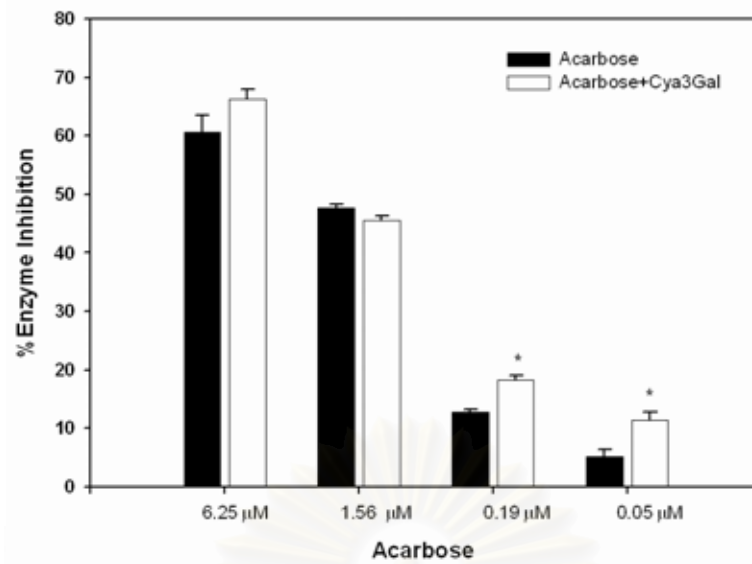
(A)



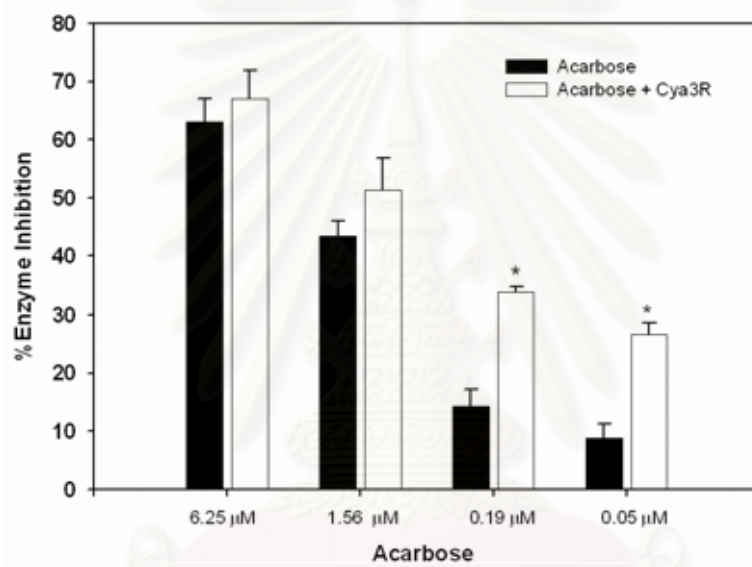
(B)



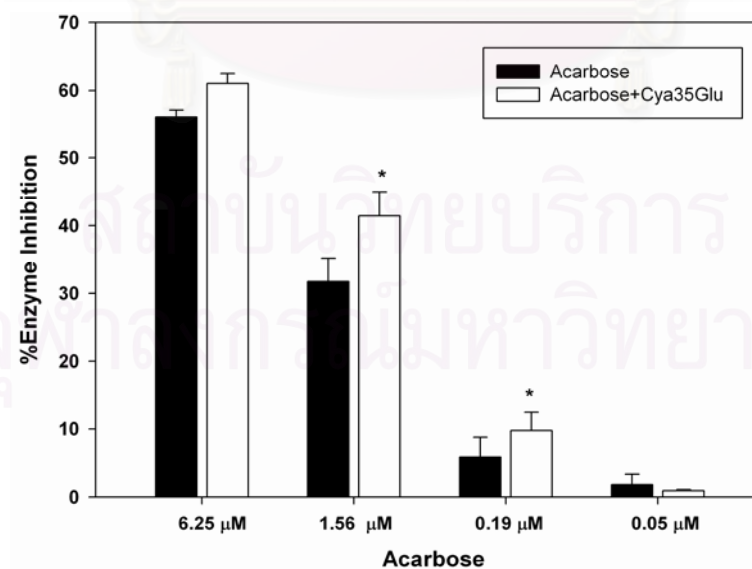
(C)



(D)



(E)



รูปที่ 5 แสดง % enzyme inhibition ของ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไซยานิดินและอนุพันธ์ (A) Cya3Glu (B) Cya3Gal (C) Cya3Gal (D) Cya3R และ (E) Cya35Glu ที่ความเข้มข้น 1 μM ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส ผลการทดลองแสดงเป็น $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 3$

ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ในการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase

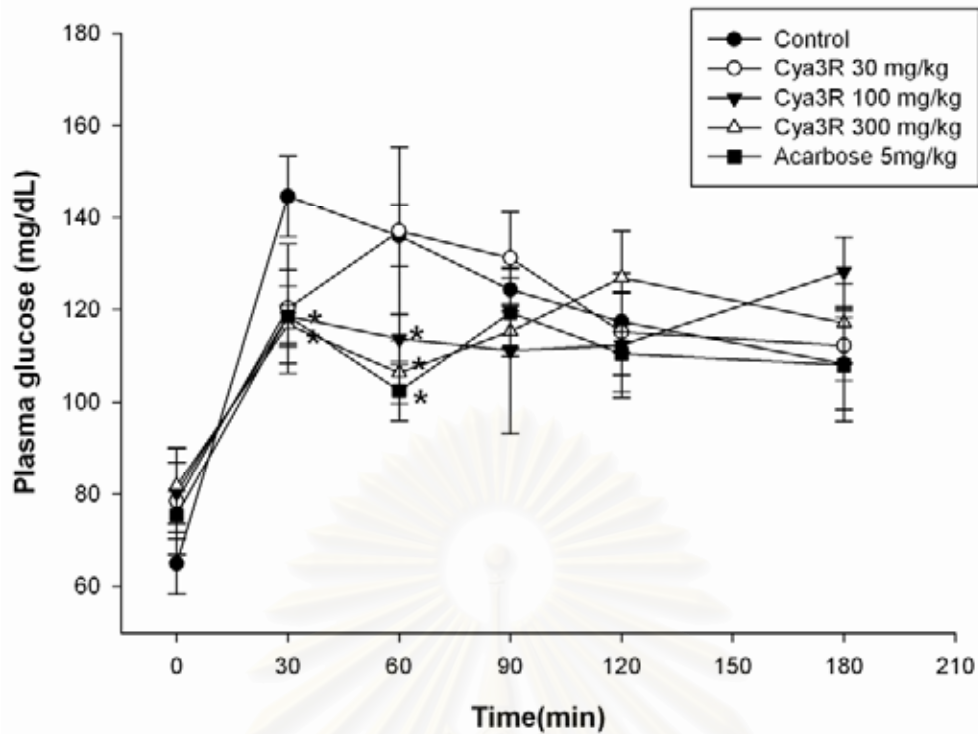
สาร ความเข้มข้น (μM)	% Enzyme inhibition					
	3.1	6.3	12.5	25	50	100
Acarbose	5.68±0.03	14.03±0.01	32.48±0.01	62.18±0.01	69.72±0.01	72.6±0.01
Acarbose+Cya	6.45±0.01*	14.50±0.08	32.62±0.01	62.31±0.01	69.77±0.01	72.63±0.01
Acarbose+Cya3R	9.79±0.01*	15.77±0.02*	33.10±0.01*	62.37±0.01	70.08±0.01	72.69±0.01
Acarbose+Cya3Glu	7.09±0.01*	14.90±0.05	32.96±0.01	62.28±0.01	69.80±0.01	72.64±0.01
Acarbose+Cya3Gal	5.70±0.05	14.20±0.04	32.48±0.01	62.06±0.01	69.99±0.01	72.59±0.01
Acarbose+Cya35Glu	5.69±0.01	14.15±0.01	32.49±0.01	62.22±0.03	69.73±0.01	72.60±0.03

ผลการทดลองแสดงเป็น mean±SEM, n= 3

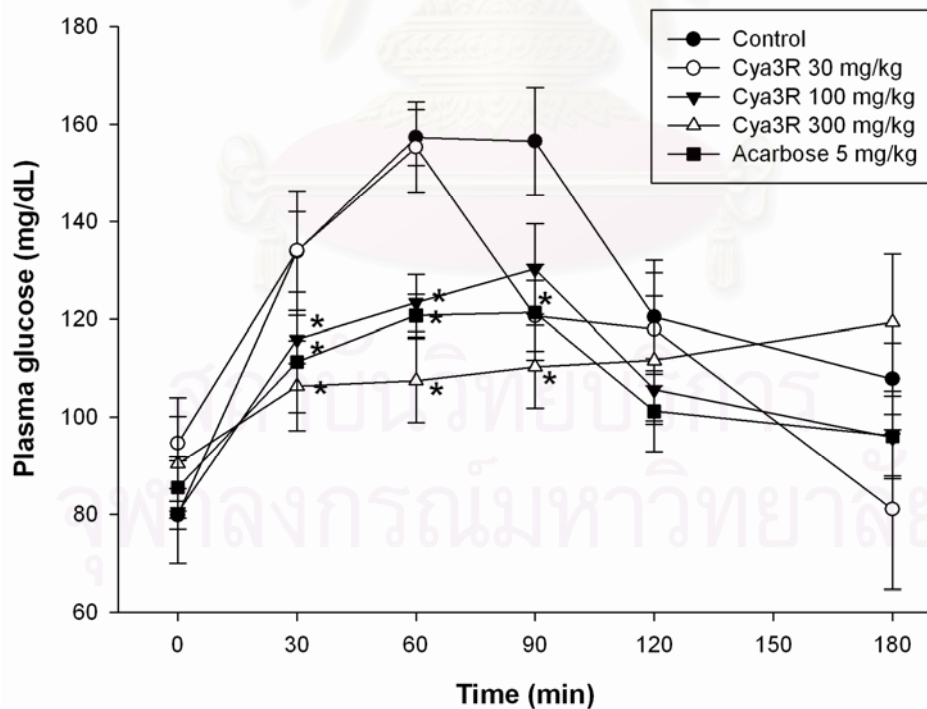
จากตารางที่ 5 Acarbose สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ acarbose เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อผสม acarbose ร่วมกับไซยานิดินหรืออนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 0.1 μM ซึ่งในความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์นี้ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ พบว่า มีเพียง Cya3R เท่านั้นสามารถเสริมฤทธิ์กับ acarbose ได้ที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 3.1 และ 6.3 μM

5. การทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของอนุพันธ์ไซยานิดินในหนูขาวปกติ

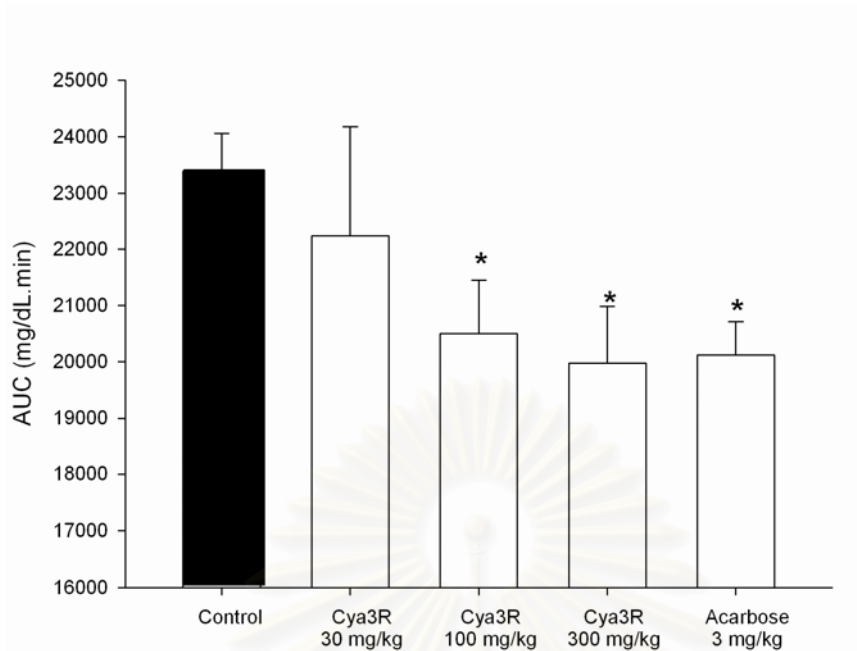
จากการทดลองที่ 1 พบว่าไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) เป็นอนุพันธ์ไซยานิดินที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase ได้ดีที่สุด จึงนำอนุพันธ์ดังกล่าวมาศึกษาต่อในหนูขาวด้วยวิธี oral carbohydrate tolerance test โดยใช้น้ำตาล maltose sucrose และแป้งเพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของอนุพันธ์ดังกล่าว ภายหลังให้น้ำตาล maltose หรือ sucrose พร้อม Cya3R แต่ละความเข้มข้น พบว่า Cya3R (100 และ 300 mg/kg) สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้เป็นเวลา 30 และ 60 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6 และ 7) ซึ่งประสิทธิภาพที่ลดระดับน้ำตาลกลูโคสของ Cya3R ใกล้เคียงกับ acarbose มาก เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ค่า AUC ในการได้รับน้ำตาลมอลโตส (รูปที่ 8) พบว่าไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 mg/kg สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ 13% และ 16% ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มที่ได้รับ acarbose 5 mg/kg ลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ 15% สำหรับค่า AUC ที่คำนวณได้จากการได้รับน้ำตาลซูโครส (รูปที่ 9) พบว่า Cya3R ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 mg/kg สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ 15% และ 16% ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มที่ได้รับ acarbose 5 mg/kg ลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ 18%



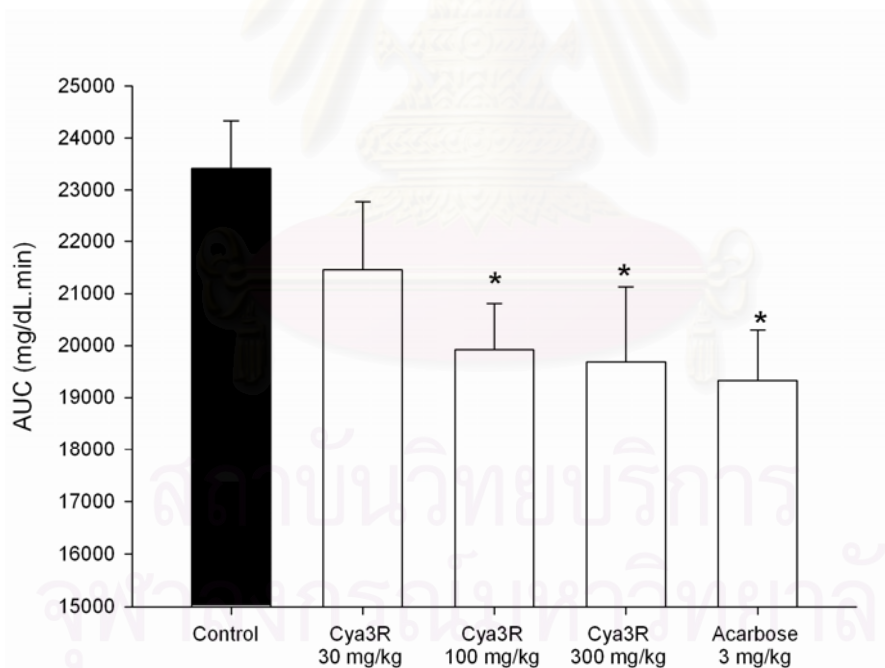
รูปที่ 6 แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ (Cya3R) ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลมอลโตส 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean±SEM, n= 6



รูปที่ 7 แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลซูโครส 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean±SEM, n= 6



รูปที่ 8 ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลมอลโตส 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean \pm SEM, n= 6

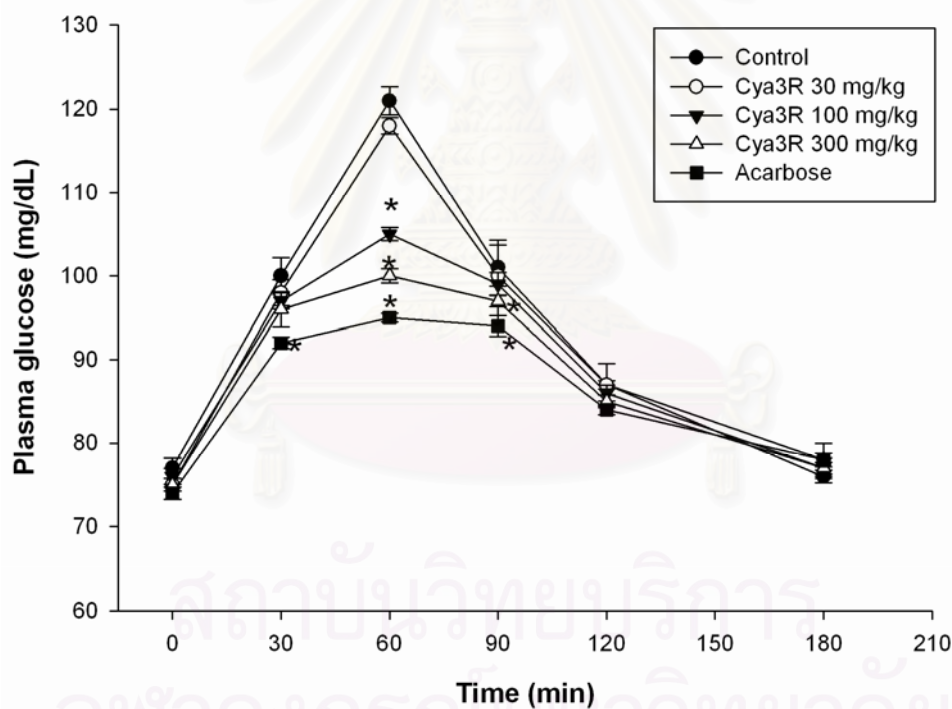


รูปที่ 9 ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำตาลซูโครส 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean \pm SEM, n= 6

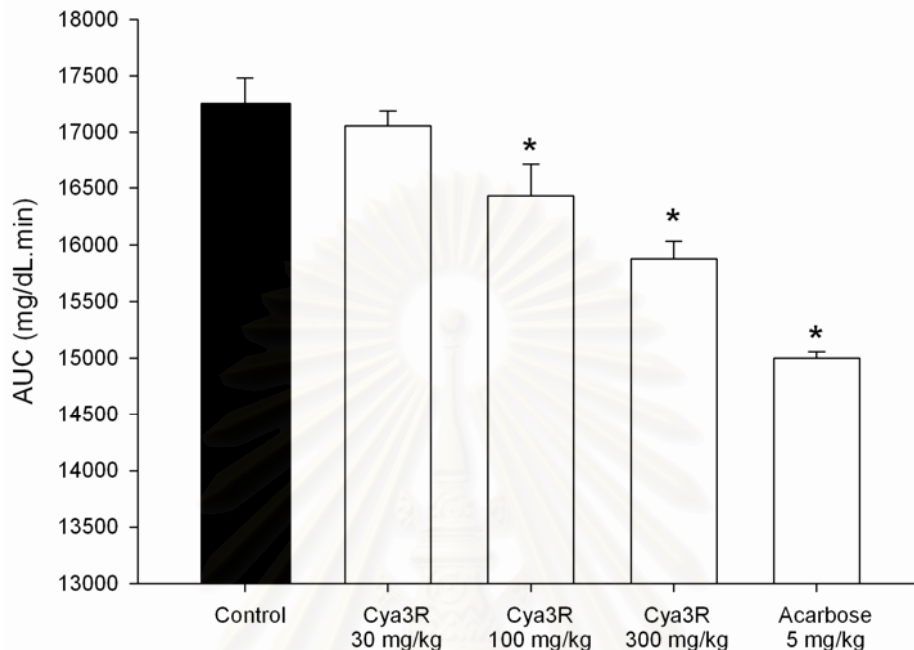
ภายหลังการให้แป้งและ Cya3R ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cya3R ขนาด 100 และ 300 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม โดย Cya3R ขนาด 100 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 3%, 13.22% และ 2% ตามลำดับ และ Cya3R ขนาด 300 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 4%, 17.36% และ 3% ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม Cya3R ยังไม่สามารถลดระดับกลูโคสได้เท่ากับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ซึ่งกลุ่มที่ได้รับ acarbose สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 8%, 21.49% และ 6% ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากรูปที่ 10 เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cya3R ขนาด 100 และ 300 mg/kg ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 สามารถลดค่า AUC ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าลดลงเท่ากับ 5.71% และ 8.69% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cya3R ยังไม่สามารถลดค่า AUC ได้เท่ากับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ซึ่งสามารถลดค่า AUC ได้เท่ากับ 13.87% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11)



รูปที่ 10 แสดงระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวที่ได้รับไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ (Cya3R) ที่ความเข้มข้น (○) 30 mg/kg (●) 100 mg/kg (▼) 300 mg/kg (△) และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำแป้ง 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean ± SEM, n= 6



รูปที่ 11 ค่า AUC ที่คำนวณได้จากระดับน้ำตาลกลูโคสของหนูขาวภายหลังได้รับไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ acarbose 5 mg/kg พร้อมกับน้ำแป้ง 3 g/kg ผลการทดลองแสดงเป็น mean \pm SEM, n= 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ α -amylase จากตับอ่อน และเอนไซม์ α -glucosidase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานบริเวณลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างเล็กลง และถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่สุดท้ายน้ำตาลโมเลกุลคู่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α -glucosidase เช่น มอลเตส และซูเครส ที่บริเวณ brush border membrane ของผนังลำไส้เล็ก ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Josse and Cheng, 2004) ดังนั้นหากสามารถยับยั้งเอนไซม์ α -amylase และเอนไซม์ α -glucosidase ได้ย่อมส่งผลช่วยชะลอการดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้าสู่กระแสเลือดได้เช่นเดียวกัน (Peng and Gang, 2007) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า SOA-4, SOA-6, YGM-3 และ YGM-6 สารเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโธไซยานิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสได้ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ α -glucosidase รวมทั้งสามารถยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ได้ จากนั้นเมื่อนำสารดังกล่าวมาศึกษาในสัตว์ทดลองให้ผลสอดคล้องกันคือ ช่วยชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดในหนูขาวได้ (Mutsui et al., 2001a) และจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ (Adisakwattana et al., 2004)

จากการคัดกรองไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ได้แก่ มอลเตส และซูเครส และ α -amylase พบว่าไซยานิดินและอนุพันธ์มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ มากกว่าเอนไซม์มอลเตส และสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้ดังนี้ Cyanidin-3-rutinoside > Cyanidin-3-galactoside > Cyanidin-3-glucoside > Cyanidin ซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีแล้ว สามารถคาดคะเนได้ว่า โครงสร้างทางเคมีที่มีความจำเพาะและออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ดี ควรมีน้ำตาลเชื่อมต่อกายในโครงสร้างในตำแหน่ง 3' และเมื่อเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวควรเป็นน้ำตาล galactose ซึ่งให้ฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีกว่าน้ำตาล glucose และเมื่อเพิ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อจากโมเลกุลที่มีน้ำตาลอยู่เดิม พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น สรุปได้ว่าลักษณะของน้ำตาลที่ต่อในตำแหน่งดังกล่าวควรเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่จะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด ในขณะที่เดียวกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ของไซยานิดินและอนุพันธ์ให้ผลที่แตกต่างกันออกไป โดยเรียงลำดับได้ดังนี้ Cyanidin-3-rutinoside > Cyanidin \cong Cyanidin-3-glucoside > Cyanidin-3-galactoside \cong Cyanidin-3,5-diglucoside สรุปได้ว่าคาร์บอนมีน้ำตาลกลูโคสหรือไม่มีที่ตำแหน่ง 3' ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันในการยับยั้งเอนไซม์ แต่หากเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่จะให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ที่ดีที่สุด และเมื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น คือ galactose หรือการมีน้ำตาลกลูโคสเพิ่มที่ตำแหน่ง 5' กลับให้ผลการยับยั้งที่ไม่ดี

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับ acarbose พบว่า เป็นยากกลุ่ม α -glucosidase inhibitor โดยมีการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และเอนไซม์ α -amylase ชนิดแข่งขันแบบผันกลับได้ (reversible and competitive inhibition) (Hollander, 1992; Coniff et al., 1994) จากการทดลอง พบว่าทั้ง Cya3R และ Cya3Gal มีกลไกการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสแบบแข่งขันได้แบบผสม และจากการพิจารณาค่า K_i และ K_i' พบว่ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสโดยไปจับกับเอนไซม์ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสับสเตรต (ESI) มากกว่าในรูปการจับกับเอนไซม์ (EI) โดยตรง นอกจากนี้ Cya3R ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase เป็นแบบชนิดไม่แข่งขัน ซึ่งต่างจากชนิดการยับยั้งเอนไซม์ของ acarbose โดยการยับยั้งแบบชนิดไม่แข่งขัน ตัวยับยั้งชนิดนี้จะสามารถจับกับเอนไซม์รูปอิสระและรูปสารประกอบเชิงซ้อนได้ ดังนั้น จึงทำให้ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป สารตั้งต้นหรือสับสเตรตที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์จึงน้อยลง ส่งผลทำให้ค่า V_{max} ลดลง เมื่อมีความเข้มข้นของสับสเตรตเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_i กับ K_i' พบว่ามีค่าเท่ากัน แสดงให้เห็นชัดเจนว่า การยับยั้งชนิดนี้เป็นแบบ full non-competitive inhibition ซึ่งตัวยับยั้งชนิดนี้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์อิสระ (K_i) ได้เท่ากับค่าความสามารถในการเข้าจับกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต (K_i') (มนตรี จุฬาวัดนทล, 2543) ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งชนิดแข่งขัน (competitive inhibition) ตัวยับยั้งชนิดนี้จะแข่งขันกันกับสับสเตรตในการเข้าจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และหากความเข้มข้นของสารตัวหนึ่งตัวใดระหว่างสับสเตรตหรือตัวยับยั้งสูงกว่า จะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า แต่สำหรับการยับยั้งชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ค่าความเข้มข้นของสับสเตรตหรือตัวยับยั้ง ล้วนแล้วแต่ไม่มีผลต่อค่าความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้ง ดังนั้นปริมาณอาหารประเภทแป้งที่ผู้ป่วยรับประทานจึงไม่มีผลรบกวนการทำงานของไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase (มนตรี จุฬาวัดนทล, 2543)

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ร่วมกับ acarbose พบว่า Cyanidin-3-rutinoside (Cya3R), Cyanidin-3-galactoside (Cya3Gal) และ Cyanidin-3-glucoside (Cya3Glu) สามารถเสริมฤทธิ์แบบ synergism กับ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสและซูเครสได้ ที่ความเข้มข้นต่ำ

ของ acarbose เท่านั้น ยกเว้น cyanidin ที่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ได้ และมีเพียง Cyanidin-3-rutinoside (Cya3R) ที่เสริมฤทธิ์แบบ synergism กับ acarbose ในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase การเสริมฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ในผู้ป่วยเบาหวานที่ได้รับยา acarbose สำหรับควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มนี้พบได้ในพืช และผลไม้ที่มีสีแดง ซึ่งเป็นอาหารที่มนุษย์บริโภคกันอยู่ปัจจุบัน

จากการศึกษาในหลอดทดลองทั้งหมด พบว่า Cya3R เป็นสารที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase ได้ดีที่สุดจึงถูกนำมาศึกษาความสามารถในการชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสภายหลังการรับประทานอาหาร ในการศึกษานี้ได้ให้น้ำตาลโมเลกุลคู่ ทั้งมอลโตสและซูโครสแก่สัตว์ทดลอง รวมถึงการให้แบ่งซึ่งเป็นสารอาหารที่ใช้เป็นตัวแทนอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองพบว่า Cya3R ในขนาด 100 และ 300 mg/kg สามารถชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในหนูขาวที่ได้รับการป้อนแบ่ง น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหลอดทดลอง และผลการทดลองที่ได้ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบว่า การให้ Cya3R ที่ขนาด 30 mg/kg ร่วมกับ acarbose สามารถเสริมฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสัตว์ทดลองที่ได้รับการป้อนแบ่ง น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบในหลอดทดลองเช่นกัน acarbose มีกลไกการออกฤทธิ์คือยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และ α -amylase (Hollander, 1992; Coniff et al. 1994) ประสิทธิภาพของ acarbose ในการลดระดับ postprandial hyperglycemia ไม่สูงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับยาลดระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่น เช่น glibenclamide และ metformin แต่ acarbose ให้ผลต่อการลดระดับ Hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) ได้ใกล้เคียงกับยากลุ่มอื่น คือ 0.5-1 % และจากการศึกษาที่ผ่านมา เมื่อระดับ postprandial hyperglycemia ลดลง จะมีผลโดยตรงในการลดระดับ HbA_{1c} ลงได้เช่นเดียวกัน การช่วยลดระดับ HbA_{1c} นี้มีประโยชน์ต่อผู้ป่วยเบาหวานในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ เช่น โรคเส้นเลือดหัวใจตีบ หลอดเลือดแข็งตัว โรคไต ความดันโลหิตสูง (Salmeron et al. 1997; DECODE Study Group, 2001) สารในกลุ่มแอนโธไซยานิน โดยเฉพาะ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (Cya3R) ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ Cya3R ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดสูงหลังรับประทานอาหาร (postprandial hyperglycemia) ได้โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ acarbose ดังนั้นไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ อาจช่วยลดระดับ HbA_{1c} ได้เช่นเดียวกับ acarbose แต่อย่างไรก็ตามสมมติฐานดังกล่าว ควรต้องทำการศึกษาฤทธิ์ของ Cya3R ในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานเพิ่มเติมเพื่อวัดระดับ HbA_{1c} ในขณะเดียวกันควรต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านพิษวิทยาของ Cya3R ซึ่งการศึกษาดังกล่าวจะช่วยตอบคำถามได้ชัดเจนและครอบคลุมมากยิ่งขึ้นทั้งในกลุ่มหนูปกติและกลุ่มหนูที่เป็นโรคเบาหวาน ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำ Cya3R ไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- มนตรี จุฬาวัดพัฒนา และคณะ. 254-. ชีวเคมี. หน้า 125-129. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Adisakwattana, S., Ngamrojanavanich, N., Kalampakorn, K., Tiravanit, W., Roengsumran, S. and Yibchok-Anun S. 2004. Inhibitory activity of cyanidin-3-rutinoside on alpha-glucosidase. J Enzyme Inhib Med Chem 19(4):313-316.
- American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. 2007. Diabetes Care 31(1): 55-60.
- Andrade, R.I., Lucena, M.I., and Rodriquez-Medizabal, M. 1996. Hepatic injury caused by acarbose. Ann Intern Med 124: 931.
- Apichati, V., Sirirat, P., Monchaya, T., et al. 2002. Efficacy and safety of voglibose in comparison with acarbose in type 2 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 55: 99-103.
- Bolledulla, J., Karl, O., Robert, E., et al. 2006. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian Cherry (*Cornus mas*). J Agric Food Chem 54: 243-248.
- Broillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis (ed.), Anthocyanins as food colors, pp. 163-178, New York: Academic Press.
- Caterson, I., Hubbard, V., and Bray, G. 2004. Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: group III: worldwide comorbidities of obesity. Circulation 110: 476-483.
- Chang, P., Yan, G., Jia-Wei, C., et al. 2003. Efficacy of acarbose in Chinese subjects with impaired glucose tolerance. Diabetes Res Clin Pract 61: 188-190.
- Chen, X., Zheng, Y., and Shen, Y. 2006. Voglibose (Basen, AO-128). One of the most important alpha-glucosidase inhibitors. Curr Med Chem 13: 109-116.
- Coniff, R.F., Shapiro, J.A., and Seaton, T.B. 1994. Long-term efficacy and safety of acarbose in the treatment of obese subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. Arch Intern Med 154: 2442-2448.
- DECODE Study Group, on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. 2001. Glucose tolerance and cardiovascular mortality : comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. Arch Intern Med 161: 397-405.
- Decrecharawong, S., Serirat, S., and Kornthong, P. 1996. Efficacy of Acarbose as monotherapy in NIDDM. J Med Assoc Thai 76: 69-75.
- Hermam, L.S. 1979. Metformin: A review of its pharmacological properties and therapeutic use. Diabetes Med 5: 233-245.
- Hollander, P. 1992. Safety profile of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor. Drugs 44(2): 47-53.
- Jeyaprakasam, B., Strasburg, G.A., and Nair, M.G. 2004. Potent lipid peroxidation inhibitor from *Withania somnifera*. Tetrahedron 60: 3109-3121.
- Josse, R.G., and Cheng, A.Y.Y. 2004. Intestinal absorption inhibitor for type 2 diabetes mellitus : prevention and treatment. Drug discovery today : therapeutic strategies1: 201-206.
-

- Kandra, L., Zajácz, A., Remenyik, J., and Gyémánt, G. 2005. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase. Biochem Biophys Res Commun 334(3): 824-828.
- Matsui, T., Ogunwande, I.A., Abesundara, K.J., et al. 2006. Anti-hyperglycemia potential of natural products. Mini Rev Med Chem 6(3): 349-356.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., and Matsumoto, K. 2001a. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. J Agric Food Chem 49(4):1948-1951.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., and Matsumoto, K. 2001b. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. J Agric Food Chem 49(4):1952-1956.
- Malaisse, W.J., and Lebrun, P. 1990. Mechanism of Sulfonylurea-induced insulin release. Diabetes Care 13(3): 9-17.
- Perfetti, R. and D'Amico, E. 2005. Rational drug design and PPAR agonists. Curr Diab Rep. 5(5):340-345.
- Peng, G., and Gang, B. 2008. Two novel ainoogligosaccharides isolate from aculture off *Steptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of alpha-amylase. Carbohydrate Res 343: 470-476.
- Pluemanupat, W., Adisakwattana, S., Yibchok-Anun, S., and Chavasiri, W. 2007. Synthesis of N-phenylphthalimide derivatives as alpha-glucosidase inhibitors. Arch Pharm Res 30(12):1501-1506.
- Rie, S., Natsumi, N., and Hiromi, H. 2007. Cyanidin-3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to down regulation of retinol binding protein 4 express in diabetes mice. Biochem Pharmacol: 1-9.
- Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M, Litle, R.R., et al. 2002. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c : analysis of glucose profiles and H in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 25: 275-278.
- Rhabasa-Lhoret, R., and Cliasson, J.L. 2004. α -Glucosidase inhibitors In : R.A. DeFronzo., E. Ferrannini., H. Keen., and Zimmet, P. (eds.), International Textbook of diabetes mellitus. 3nd ed, pp. 901-914: John Wiley & Sons Ltd.
- Robert, Y., Shinji, T., and Naofumi, M. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chem 101: 1616-1625.
- Salmeron, J., Manson, J.E., Stampfer, M.J., et al. 1997. Dietary fiber, glycemic load and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus in woman. JAMA 227: 472-477.
- Seeram, N.P., Bourquin, L.D., and Nir, M.G. 2001. Degradation products of cyanidin in glycosides from tart cherries and their bioactivities. J Agric Food Chem: 4924-4929.
- Wang, H., Nair, M.G., Iezzoni, A.F., et al. 1999. Quantification and characterization of anthocyanins in Balaton tart cherries. J Agric Food Chem 45: 2556-2560.
- World Health Organization. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes
-

mellitus and its complications. Report of WHO consultation: 66.

World Health Organization. 2006. <http://www.who.org>. [2009, April 10].

Vannasaeng S, Nitiyanant W, Vichayanrat A, et al. 1995. Effect of alpha-glucosidase inhibitor (acarbose) combined with sulfonylurea or sulphonylurea and metformin in treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus. J Med Assoc Thai 78: 578-585.

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยได้เผยแพร่บางส่วนในวารสาร Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry
Volume 24 เล่มที่ 1 หน้าที่ 65-69 ปี ค.ศ. 2009

ในหัวข้อ “ **α -Glucosidase inhibitory activity of cyanidin-3-galactoside and synergistic effect with acarbose**”

ผู้ประพันธ์ Sirichai Adisakwattana; Piyawan Charoenlertkul; Sirintorn Yibchok-anun



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
