



การเตรียมและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงหลวง
**Preparation and Purification of Amylase Inhibitors from
Royal Red Kidney Beans**

นันทิดา ลิ้มเสถียร
Nunthida Limsettho

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงหลวง
ผู้เขียน นางสาวนันธิดา ลิ่มเสถียร
สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อโนชา ตั้งโพธิ์ธรรม) ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทาร์พันธุ์)
 กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อโนชา ตั้งโพธิ์ธรรม)
 กรรมการ (ดร. วชิร ลีห์ชำนาญธุระกิจ)
 กรรมการ (ดร. ทวีสิน นาวาร์ตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเตรียมและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงหลวง
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ผู้เขียน	นางสาวนันทิศา ลิ้มเสฏฐโง
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

สารสกัดจากถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) ประกอบไปด้วยสารยับยั้งอะไมเลส 2 ชนิด คือ สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน และไม่เป็นโปรตีน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสทั้งสองชนิด โดยยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพ การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน (PAI) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีและเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุลพบว่า วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถแยกบริสุทธิ์สาร PAI ได้ดีกว่า เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ PAI ด้วย Native-PAGE พบว่ามีแถบเดียวขนาดโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน มีร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลส 98.98 ± 0.35 การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน (cNAI) ใช้วิธี (1.) สกัดด้วย trichloroacetic acid (2.) สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลตาม Kim et al., (2002) (3.) สกัดด้วยเมทานอล และ (4.) สกัดด้วยเอทานอล พบว่าวิธีเมทานอลสามารถสกัด cNAI ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น โดยให้ค่าร้อยละผลผลิต 74.4 ± 2.2 และร้อยละการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายเท่ากับ 112.7 ± 13.5 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC พบ 3 แถบโดยแถบที่มี R_f 0.304 สามารถยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 4.39 ± 8.75

จลนศาสตร์ของสารสกัดถั่วแดงหลวงเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ต่ออะไมเลสจากน้ำลายและไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibition) ต่ออะไมเลสจากตับอ่อน สารละลาย cPAI ซึ่งได้จากการตกสารสกัดถั่วแดงหลวงด้วย 50 % ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแบบผสม (mixed inhibition) ต่ออะไมเลสจากน้ำลายและไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรงต่ออะไมเลสจากตับอ่อน สารละลาย cNAI ซึ่งได้จากการสกัดสารสกัดถั่วแดงหลวงด้วยเมทานอลเป็นแบบผสมต่ออะไมเลสจากน้ำลายและไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรงต่ออะไมเลสจากตับอ่อน

ผลการศึกษาโครงสร้างของสาร PAI จากการตัดแถบโปรตีนบน SDS-PAGE 3 แถบ ขนาดโมเลกุล 21.02 18.72 และ 17.16 กิโลดาลตัน ไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC/MS/MS เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนสายสั้นๆ ที่ได้เทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารยับยั้งอะไมเลสในพืชตระกูล *Phaseolus vulgaris* gi|126150 ที่ร้อยละความ

เหมือนเท่ากับ 35 34 และ 33 ผลการศึกษาโครงสร้างของ NAI ที่แยกจาก cNAI ด้วย TLC พบว่ามีขนาดโมเลกุล 527.23 ดาลตัน อยู่ในช่วงขนาดโมเลกุลของน้ำตาลมอลโตไตรโอส มอลโตเตตระโอส และอะคาร์โบส ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ NAI ด้วย LC-MS (527.2 [g/mol]) ผล NMR ของ NAI พบ ^1H chemical shift ที่ 8.542 ppm (ในช่วง δ ของ RCOH, HCON, HCOR หรือ HCOO), 3.5 ppm (ในช่วง δ ของ $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, OH, NH, CH_2O หรือ CH_2NO_2) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น มอนอแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส และ ^{13}C ที่ 215.83 ppm (ในช่วง δ ของ RCOR), 181.55 ppm (ในช่วง δ ของ RCHO หรือ RCOOH), 62.72 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHX หรือ R_3CN), 30.22 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHR หรือ R_2CHX) และ 23.61 (ในช่วง δ ของ RCH_2R)

Thesis Title Preparation and Purification of Amylase Inhibitors from Royal Red Kidney Beans
Author Miss Nunthida Limsettho
Major program Biochemistry
Academic Year 2011

ABSTRACT

Amylase inhibitors from Royal red kidney extract (*Phaseolus vulgaris*) had two types, proteinaceous and nonproteinaceous. The aim of this research was to prepare and purify proteinaceous and nonproteinaceous amylase inhibitors which remain their biological activity for further studies. Preparation of proteinaceous amylase inhibitor (PAI) was performed by column chromatography and molecular weight cut off (MWCO). The best method for preparation of PAI was column chromatography. Native-PAGE of PAI revealed a single protein band of 45 kDa with amylase inhibitory activity $98.98 \pm 0.35\%$. Preparation of nonproteinaceous amylase inhibitor (cNAI) involved the procedures of (1.) trichloroacetic acid (TCA) (2.) methanol and ethanol according to Kim et al., 2002 (3.) methanol and (4.) ethanol. The use of methanol gave the highest yield at $74.4 \pm 2.2\%$ with inhibitory activity of saliva amylase at $112.7 \pm 13.5\%$. The purification of cNAI by TLC showed 3 bands which the band of R_f 0.304 had saliva amylase inhibitory activity $4.39 \pm 8.75\%$

Kinetic study showed that the bean extract inhibit saliva amylase and pancreatic amylase in a competitive and uncompetitive manners accordingly. cPAI, from 50% saturated AmSO_4 precipitation of the extract, inhibit saliva amylase and pancreatic amylase in a mixed and uncompetitive manners. cNAI, from methanol extraction, inhibit saliva amylase and pancreatic amylase in a mixed and uncompetitive manners.

The structural study of PAI was performed by cutting the 3 bands of protein on SDS-PAGE of 21.02, 18.72 and 17.16 kDa for amino acid sequence analysis by LC/MS/MS. Blasting the obtained sequence with NCBI data base revealed matching sequence with α -amylase inhibitor of *Phaseolus vulgaris* gi|126150 at 35, 34 and 33 % identity. Structural study of NAI, from the separation of cNAI on TLC, revealed its M.W. at 527.23 Da, which in between M.W. of

maltotriose, maltotetraose and acarbose. This M.W. size was closed to that obtained by LC/MS (527.2 [g/mol]). NMR study of NAI gave ^1H chemical shift at 8.542 ppm (between δ of RCOH, HCON, HCOR or HCOO), 3.5 ppm (between δ of $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, OH, NH, CH_2O or CH_2NO_2) which presumed to be monosaccharide such as glucose. For the ^{13}C chemical shift found at 215.83 ppm (between δ of RCOR), 181.55 ppm (between δ of RCHO or RCOOH), 62.72 ppm (between δ of R_2CHX or R_3CN), 30.22 ppm (between δ of R_2CHR or R_2CHX) and 23.61 (between δ of RCH_2R).

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อโนชา ตั้งโพธิ์ธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ เสียสละเวลาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องแก่ศิษย์เสมอมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ประภาพร อุทาร์พันธุ์ ดร. วัชรวิทย์ สีนันทานนท์ ฐระกิจ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และ ดร.ทวิสิน นาวาร์ตัน กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และขอแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา รวมถึงภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาและเงินเพื่อวิทยานิพนธ์ในโครงการความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ และสถานีวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินเพื่อวิทยานิพนธ์ในโครงการทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีได้กล่าวนามซึ่งเป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาจนสำเร็จ

นันทิศา ลิ่มเสฏฐโฐ

สารบัญ

รายการ	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
รายการสัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่ 1	
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	23
บทที่ 2	
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	24
วิธีดำเนินการ	27
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	84
เอกสารอ้างอิง	87
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาตรของสารสกัดหัวแดงหลวง ร้อยละกิจกรรมยับยั้ง ปริมาณน้ำตาลและปริมาณโปรตีน	41
2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด cNAI ของวิธีสกัด 3 วิธี	48
3 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและ ตับอ่อนของสารสกัดหัวแดงหลวง	52
4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารสกัดหัวแดง	52
5 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย และตับอ่อนของสารสกัดหัวแดงหลวง	55
6 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและ ตับอ่อนของสารละลาย cPAI	57
7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารละลาย cPAI	57
8 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายและ ตับอ่อนของสารละลาย cPAI	60
9 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อน ของสารละลาย PAI ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี	62
10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารละลาย PAI	62
11 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและ ตับอ่อนของสารละลาย cNAI	64
12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารละลาย cNAI	64
13 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายและ ตับอ่อนของสารละลาย cNAI	67
14 %Identity ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 3 แถบจากสาร ละลาย PAI กับสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตระกูล <i>Phaseolus vulgaris</i>	71

รายการภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
1 แสดงจลนศาสตร์การยับยั้งแบบแข่งขัน	19
2 แสดงจลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน	20
3 แสดงจลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง	21
4 แสดงจลนศาสตร์การยับยั้งแบบผสมโดย	22
5 ความบริสุทธิ์ของสารละลาย PAI จากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย Native PAGE	42
6 ความบริสุทธิ์ของ PAI จาก MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน	43
7 ปริมาณมิลลิกรัมโปรตีนของ cPAI เมื่อผ่านการแยกด้วย MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน	44
8 กิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cPAI เมื่อผ่านการแยกด้วย MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน	44
9 ความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของสารละลาย cPAI และ PAI 12% gel, Native-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีน	45
10 ผลการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cNAI จากการสกัดทั้ง 3 วิธีด้วย TLC	49
11 กิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย NAI แถบ A แถบ B และ แถบ C	50
12 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความเข้มด้วยเครื่อง Densitometer ของ cNAI	51
13 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดหัวแดง	53
14 มก.โปรตีน/มล.ของสารสกัดหัวแดงหลวงที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50	54
15 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารสกัดหัวแดงหลวง	56
16 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cPAI	58
17 มก.โปรตีน/มล.ของสารละลาย cPAI ที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50	59
18 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารละลาย cPAI	61
19 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย PAI	63
20 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cNAI	65
21 มก.โปรตีน/มล.ของสารละลาย cNAI ที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50	66
22 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารละลาย cNAI ที่มีต่อ	68

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
23	ผลการหาความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของโปรตีน ในสารละลาย cPAI และ PAI ด้วย 12% gel, SDS-PAGE β -mercaptoethanol	70
24	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 3 แยกจากสารละลาย PAI เปรียบเทียบกับสายที่ยังอะไมเลสจากพืชตระกูล <i>Phaseolus vulgaris</i> : gi 126150	73
25	ผลการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cNAI จากการสกัด 3 วิธีด้วย TLC	73
26	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย NAI จาก TLC	74
27	โครมาโตแกรมของสารละลาย NAI ด้วย HPLC	75
28	มวลโมเลกุลของสารละลาย NAI ที่สกัดด้วยวิธีเมทานอล	76
29	แมสเปกตรัมของ (ก) สารละลาย NAI และ (ข) อะคาร์โบส	77
30	^1H -NMR สเปกตรัมของสารละลาย NAI	79
31	^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารละลาย NAI	80
32	2D-NMR สเปกตรัมของสารละลาย NAI	81

รายการสัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ก.	=	กรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
α	=	แอลฟา
β	=	เบต้า
δ	=	ค่า chemical shift
μ	=	micro
AI	=	Amylase inhibitor
BSA	=	Bovine serum albumin
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
cNAI	=	สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนจากสารสกัดหัวแดงหลวง
cPAI	=	สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากการตกด้วย 50 % 8วามอิมตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต
DNS	=	3, 5-dinitrosalicylic acid
D	=	คาลตัน
kDa	=	กิโลคาลตัน
IC ₅₀	=	ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 50
L	=	ลิตร
LC-MS	=	Liquid chromatography mass spectroscopy
M	=	โมลาร์
M _r	=	ขนาดโมเลกุล
MW	=	ขนาดโมเลกุล
MWCO	=	Molecular Weight cut off
NAI	=	สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนจากการแยกบริสุทธิ์ CNAI
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
PAI	=	สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากการแยกบริสุทธิ์ cPAI
pH	=	ค่าพีเอช (-Log hydrogen ion concentration)

รายการสัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

PPA	=	เอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อน
R _f	=	ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์
SA	=	เอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
TCA	=	Trichloroacetic acid
TEMED	=	N', N', N', N'- tetramethylenediamine
TLC	=	Thin layer chromatography
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	Unit
V	=	ปริมาตร
W	=	น้ำหนัก
%	=	ร้อยละ

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกเป็นโรคอ้วน (obesity) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลกที่ต้องมีการวางแผนป้องกัน เนื่องจากโรคอ้วนเป็นปัจจัยเสี่ยง (risk factor) ของโรคหัวใจ มะเร็ง ข้อเสื่อม ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) และเบาหวานแบบ 2 (type 2 diabetes mellitus) ซึ่งเป็นโรคต้นเหตุของการสูญเสียชีวิตในหลายประเทศ (Giusti, 2007) โรคเบาหวานเป็นโรคที่ได้รับทางพันธุกรรม หรือเกิดขึ้นภายหลัง จากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ส่งผลเกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือดสูง และผลอันตรายต่อระบบร่างกาย รวมไปถึงเส้นเลือดและระบบประสาท (Matsui et al., 2007) วิธีการรักษาผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน ใช้วิธีการควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย ร่วมกับการฉีดอินซูลินในรายที่เป็นมากจนร่างกายมีระดับอินซูลินต่ำ หรือรักษาด้วยการรับประทานยาซึ่งมีกลไกการรักษาแตกต่างกัน ตัวอย่างยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ใช้เพื่อการรักษา เช่น อะคาร์โบส (acarbose) ไมกลิทอล (miglitol) และ วอกลิโบส (voglibose) (Bailey, 2003) และอีกหนึ่งในวิธีการรักษา คือ การลดค่าระดับน้ำตาลในเลือด ทำโดยการยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลกลูโคส (แอลฟา-อะไมเลส และ เอลฟา-กลูโคซิเดส) ทำให้เกิดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดลดลง (Rhabasa Lhoret และ Chiasson, 2004)

สารสกัดจากพืชหรือสารประกอบบริสุทธิ์จากพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Ali, 2006) เช่น สารสกัดจากใบฝรั่ง (Wang et al., 2010) สารสกัดจากเมล็ด Palo Fierro (*Olneyatesota*) (Guzman-Partida et al., 2007) สารสกัดจากหัวหอม และกระเทียม (El-Dermerdash et al., 2005) สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลี (wheat amylase inhibitor) (Koike et al., 1995) สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดถั่ว Tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) (Yamada et al., 2001) มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อน และแอลฟา-กลูโคซิเดสบริเวณลำไส้เล็ก ส่งผลลดปริมาณกลูโคสที่จะดูดซึมผ่านผนังลำไส้สู่กระแสโลหิต นอกจากนี้สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากถั่วขาว (white kidney bean) ได้ถูกนำมาขายเป็นผลิตภัณฑ์นิวทราซูติคัล (nutraceutical) เพื่อควบคุมน้ำหนัก และระดับน้ำตาลในเลือด (Chokshi, 2007) สารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตระกูล

Phaseolus vulgaris ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ในการยับยั้งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชตระกูลอื่น (Leiner et al., 1984)

ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมใช้ในการบริโภคทั้งอาหารคาว หวาน และสลัดในหมู่ประชากรไทย ปิยวรรณ สิทธิพงศ์ (2005) พบว่าสารสกัดจากถั่วแดงหลวงของไทย สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนได้ในหลอดทดลอง ฤทัยวรรณ บุญครองชีพ (2007) ได้ทดลองพบว่า สารสกัดจากถั่วแดงหลวงในสัดส่วน 0.2 กรัม/มล. ของสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 มีผลต่อการลดน้ำตาลในเลือดของหนูขาวใหญ่ น้ำหนักเฉลี่ย 200 ± 10 กรัม ได้ 20 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ระดับน้ำตาลหลังอดอาหารนาน 16 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมเท่ากับ 72.3 ± 2.8 มก.กลูโคส/มล. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเท่ากับ 57.8 ± 2.8 มก.กลูโคส/มล. โดยแต่ละกลุ่มใช้สัตว์ทดลอง 6 ตัว) ภายหลังการให้สารสกัดทางปากปริมาตร 1 มล. เท่ากันทุกตัว วันละ 1 ครั้งในตอนเช้า นาน 15 วัน เมื่อทำการศึกษาถึงองค์ประกอบสำคัญของสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดถั่วแดงหลวงพบว่า มีทั้งสารยับยั้งอะไมเลสแบบที่เป็นโปรตีนและที่ไม่เป็นโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยชุดคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม (conventional chromatography) พบว่ามีขนาดโมเลกุลในสภาพธรรมชาติ 47.7 กิโลดาลตัน ส่วนสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนนั้นเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กในช่วงโมเลกุลระหว่าง 180 ดาลตัน ของน้ำตาลกลูโคส และ 645.6 ดาลตัน ของยารักษาเบาหวานอะคาร์โบส จากผลการแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography) โดย Kim et al. (2002) และ Yoon และ Robyt. (2002)

การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีนจากสารสกัดถั่วแดงหลวงมีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาในการแยกนานและให้ปริมาณสารไม่เพียงพอในด้านการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลในหลอดทดลอง ตลอดจนการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุล เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีนในปริมาณที่มากขึ้น และในระยะเวลาที่สั้นกว่าวิธีเดิม โดยยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพไว้ การคัดแยกตามขนาดโมเลกุลจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาวิธีการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน รวมถึงการพัฒนาวิธีการเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน จากการพัฒนาวิธีของ Kim et al. (2002)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสทั้งสองชนิด จากสารสกัดถั่วแดงให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น โดยยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพไว้ เพื่อการทดสอบศักยภาพ และกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในหลอดทดลอง (*in vitro*) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งทั้งสองชนิด ผลวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่การค้นพบสารใหม่ที่มีคุณสมบัติยับยั้ง การอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดตลอดจนการขยายงานด้านประยุกต์เช่น การตัดแปลงโมเลกุล หรือการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีต่อไป เป็นต้น นอกจากนี้สารยับยั้งอะไมเลสที่เตรียมได้ในปริมาณมาก จะมีประโยชน์ในการทดสอบผลของสารต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง ให้มีความน่าเชื่อถือทางสถิติได้ เพื่อนำไปสู่งานประยุกต์ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหรือลดน้ำหนักต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase)

แอลฟา-อะไมเลส (α - amylase) หรือ α - 1, 4 glycan-4-gluconohydrolase เป็นเอนไซม์ที่ได้รับการจัดกลุ่มไว้ใน E.C.3.2.1.1 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะ α -1, 4 ไกลโคซิดิกของแป้ง (อะมิโลส และอะมิโลแพกทิน) และไกลโคเจน ได้ผลผลิตของมอลโตส มอลโทไตรโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีชื่อว่าเดกซ์ตริน (dextrin) ดังสมการ



ในระบบทางเดินอาหาร เริ่มต้นที่ภายในช่องปากแอลฟา-อะไมเลสจากน้ำลายย่อยแป้งได้ผลผลิตเป็นเดกซ์ตริน มอลโตส และมอลโทไตรโอส เมื่ออาหารเคลื่อนลงไปสู่บริเวณลำไส้เล็กถูกย่อยสลายอีกครั้งด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อน ได้น้ำตาลโมเลกุลคู่คือมอลโตส และ ไอโซมอลโตส ภายในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม คาร์โบไฮเดรตรูปน้ำตาลโมเลกุลคู่อื่น ๆ เช่น แลกโตส ซูโครส จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์จากลำไส้เล็ก เช่น กลูโคสอะไมเลส (ตัดสลายพันธะ α -1, 4 และ α -1, 6 ไกลโคซิดิก) แลกเตส และซูเครส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กาแลกโตส กลูโคส ฟรุคโตส และคูดซิมเข้าสู่ร่างกาย

แอลฟา-อะไมเลสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus oryzae* (Brzozowski et al., 1997) และ *Aspergillus niger* (Boel et al., 1990) *Paecilomyces variotii* (Michelin et al., 2010) ในพืช เช่น *Monascus anka* และ red koji (Yoshizaki et al., 2010) และพบได้มากในธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวมอลต์ เมล็ดถั่วเขียว (Bharagava et al., 2010) เมล็ดถั่วเหลือง (Kumari et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบได้ในแมลง เช่น มอดข้าวเปลือก มอดเมล็ดถั่ว (cowpea weevil) (Priya et al., 2010) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

โครงสร้างของแอลฟา-อะไมเลสประกอบด้วย 3 ส่วนคือ บริเวณ A เป็นศูนย์กลางและเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Van der maarel et al., 2002) บริเวณ B ทำหน้าที่เกี่ยวข้องความจำเพาะเจาะจงในการจับกับสับสเตรท (Svensson, 1994) และบริเวณ C เป็นบริเวณที่จับกับโมเลกุลของแป้ง (Nielsen et al., 2004) อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยบริเวณที่จับกับ Ca^{2+} เพื่อความเสถียรของบริเวณเร่งปฏิกิริยา โดยส่วนมากจะมีตำแหน่งจับกับ Ca^{2+} มากกว่าหนึ่งตำแหน่งเพื่อความเสถียรของโครงสร้าง (Tanaka และ Hoshino, 2002)

ในร่างกายมนุษย์สามารถพบแอลฟา-อะไมเลสทั้งในน้ำลายและตับอ่อนซึ่งมีโครงสร้างที่เหมือนกัน คือเป็นโกลโคโปรตีน มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 51-54 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีหมู่ไทโอซัลเฟต 2 หมู่ มีพันธะไดซัลไฟด์สี่พันธะและมีตำแหน่งจับกับ Ca^{2+} เพื่อความเสถียร (Sigma Aldrich.com)

หลักการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่นิยมใช้มี 4 วิธีคือ

- 1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดจากการย่อยแป้งด้วย dinitrosalicylic acid (DNS) (Bernfeld, 1955) หรือวิธี Nelson-Somogyi (Xiao et al., 2006)
- 2 วัดปริมาณสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวระหว่างแป้งกับไอโอดีนหลังการย่อยแป้งโดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550-700 nm (Fuwa, 1954) ไอโอดีนที่นิยมใช้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 3 μ M ถึง 0.25 mM
- 3 การใช้สับสเตรทที่มีโมเลกุลที่ถูกปลดปล่อยสารที่ให้สีในช่วงการดูดกลืนแสงภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ สับสเตรทเหล่านี้ได้แก่ starch azure, starch-remazol brilliant blue R, amylose azure, 4, 6 ethylenediamine (G₁)- α -nitrophenyl (G₁) α , D-maltoheptaosid
- 4 วัดการเรืองแสง fluorescence เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท เช่น DQ-starch, Cyclodextrin (CDs)

แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดพืช โดยเฉพาะเมล็ดที่กำลังงอก จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งที่สะสมอยู่ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลเพื่อการงอกและการเจริญเติบโต การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นพื้นฐานการทำงานในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การเตรียมหัวเชื้อน้ำตาลกลูโคส การทำขนมปังและกระบวนการหมัก นอกจากนี้แอลฟา-อะไมเลสยังถูกนำไปใช้เป็นยา สารลดแรงตึงผิว การหมักสิ่งปฏิกูล และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ (Van der maarel et al., 2002)

2. สารยับยั้งอะไมเลส

สารยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสสามารถขัดขวางการปลดปล่อยกลูโคสจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ทำให้การดูดซึมน้ำตาลเกิดช้าลง ลดระดับน้ำตาลในเลือดและยับยั้งอาการของภาวะน้ำตาลในเลือดสูงหลังมื้ออาหาร (hyperglycemia) (Lebovitz, 1997) ตั้งแต่มีการค้นพบยาอะคาร์โบสซึ่งใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 สารยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสจึงได้รับความสนใจมากขึ้น สามารถสังเคราะห์ขึ้นและพบได้ในสารสกัดจากธรรมชาติหลากหลายชนิด เช่น ใบชา เมล็ดธัญพืช ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาล ได้แก่ disaccharide, aminosugar, carbasugar และ thiosugar

สารยับยั้งอะไมเลสประกอบไปด้วยสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน (proteinaceous amylase inhibitor, PAI) และที่ไม่เป็นโปรตีน (nonproteinaceous amylase inhibitor, NAI) (Franco et al., 2002)

2.1) สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน พบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช โดยเฉพาะเมล็ดถั่วและธัญพืช เช่น ข้าวไรย์ (Iulek et al., 2000) ข้าวบาเลย์ (Bonsager et al., 2003) เมล็ดข้าวสาลีงอก (Sharma และ Gupta, 2001) และเมล็ดถั่ว tepary (Yamada et al., 2001) โดยขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสในพืชต่างชนิดกัน (species/varieties) มีความแตกต่างกัน

นอกจากนั้นสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชที่แตกต่างกันมีความจำเพาะต่อการยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งที่แตกต่างกันด้วย เช่น ยับยั้งอะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพียงอย่างเดียว หรือออกฤทธิ์ยับยั้งอะไมเลสในแมลงเพียงอย่างเดียว หรือมีความจำเพาะกับอะไมเลสในพืชเพื่อการป้องกันตัวเอง (Franco et al., 2002)

งานวิจัยของ Kluh et al. (2005) ศึกษาความจำเพาะของสารยับยั้งอะไมเลส α -AI ที่สกัดจากเมล็ดถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Magna) ต่อเอนไซม์อะไมเลสในแมลงแตกต่างกัน 30 สายพันธุ์ พบเพียง 3 ลำดับ (order) ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง คือ Coleoptera Hymenoptera และ Diptera สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ (*Secale cereal*) มีขนาดโมเลกุล 13,756 ดาลตัน มีความจำเพาะในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากตับอ่อนของหนู น้ำลายของคน และแบคทีเรียได้ (Iulek et al., 2000) สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดถั่ว (*Phaseolus vulgaris* cv Tendergreen) ขนาดโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่ออะไมเลสจากตับอ่อนของคนและหนู แต่ไม่สามารถยับยั้งอะไมเลสของแบคทีเรียและรา (Le Berre-Anton et al., 1997) สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ด Palo Fierro มีขนาดโมเลกุล 77 กิโลดาลตัน ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 15.8 และ 17.4 กิโลดาลตัน ออกฤทธิ์ยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อนของหนู แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสจาก *Zabrotes subfasciatus* (Guzman-Partida et al., 2007) สารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งข้าวสาลีมีขนาดโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะในการยับยั้งอะไมเลสที่มาจากเชื้อราแต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ที่มาจากแบคทีเรีย (Juge et al., 2004) สารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวฟ่าง (*Panicum sumatrense*) ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจาก *Collosoloruchus chinensis* นอกจากนี้พบว่ายับยั้งอะไมเลสจาก *Acaca janata*, *C. cephalonica*, *Sitophilus oryzae* และ *Tribolium castaneum* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย (Shivkumar et al., 2006)

Gibbs และ Alli (1998) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วขาวและศึกษาคุณสมบัติ พบว่าเป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน คุณสมบัติการยับยั้งขึ้นกับคลอไรด์ไอออน ในขณะที่แคลเซียมไอออนมีผลช่วยเพิ่มอัตราการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์อะไมเลส รูปแบบการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive-inhibition)

2.2) สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น อะคาร์โบส ไอโซอะคาร์โบส acarviosine-glucose หรือ ไซโคลเด็กซ์ตริน (Franco et al., 2002) พบได้ทั้งในพืชและในจุลินทรีย์ เช่น *Thermus maltogenic amylase* สร้างสารอะคาร์โบส ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของ pseudotetrasaccharide และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แอลฟา-กลูโคซิเดส และกลูโคอะไมเลส มีรูปแบบการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) (Kim et al., 1999) แบคทีเรียกลุ่ม Actinoplanes ผลิตอะคาร์โบสซึ่งนำไปใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Brunkhorst และ Schneider, 2005) และ *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC และ B-742CB สามารถผลิตอะคาร์โบสจากกระบวนการหมักยีสต์ (Yoon และ Robyt, 2002)

นอกจากสารที่ยกตัวอย่างข้างต้น ยังมีรายงานสารประเภทอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งอะไมเลส เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ที่ได้จากการหมักกากสับประรด ด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนได้ (Correia et al., 2004) สารประกอบฟีนอลิก rosmarinic acid, protocatechuic acid, quercetin และ *p*-coumaric acid จากการสกัดผลออริกานู (*Origanum vulgare*) ด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส จากตับอ่อนหนูได้ (McCue et al., 2004) สารประเภท flavonoid ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และอะไมเลส จากสารสกัดใบฝรั่ง (Wang et al., 2010)

Ali et al. (2006) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชท้องถิ่นของประเทศมาเลเซีย 6 ชนิด ที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน พบว่า *Phyllanthus amarus* มีส่วนประกอบของสาร triacontanol, dotriacontanyl docosanoate, oleanolic acid และ ursolic acid ที่มีกิจกรรมยับยั้งอะไมเลส

ชนิดา หันสวาสดี (2546) สกัดแยกสารจากสมุนไพรไทย 47 ชนิด พบว่าพืชสมุนไพร 6 ชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซูเครส และแอลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อนหนู ทำให้การย่อยสลายแป้งและโอลิโกแซคคาไรด์เกิดช้าลง ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง และนำไปสู่แนวทางการรักษาโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งพาอินซูลิน

Andrade-Cetto et al. (2008) สกัดพืชพื้นเมืองเม็กซิกัน 4 ชนิด คือ *Cecropia obtusifolia* Bertol, *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham, *Acosmium panamense* (Benth.) Yacolev และ *Malmea depressa* (Baill) R.E. Fries ที่มีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสซึ่งใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และพบว่าสารสกัดจาก *Malmea*, *Acosmium* และ *Cecropia* มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ เหมือนกับยาอะคาร์โบส

สารยับยั้งอะไมเลสสามารถสกัดได้จากพืชหลากหลายชนิด แต่ที่นิยมนำมาสกัดและศึกษา คือ พืชตระกูลถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) และพวงชมพู เมล็ดถั่วประกอบไปด้วยโปรตีนต่างๆ ที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวเองรวมถึง phytohemagglutinin (PHA) arcelin และสารยับยั้งอะไมเลส (Santimone et al., 2004) ตัวอย่างพืชตระกูลถั่วที่นิยมนำมาศึกษาคือ ถั่วขาว (White kidney bean) (Gibbs และ Ali, 1998) ถั่วเขียว (Bharagava et al., 2010) และถั่วแดง (Ren et al., 2008)

ถั่วแดงหลวง (Royal red kidney beans) เป็นพืชตระกูลถั่วที่จัดอยู่ในตระกูล *Phaseolus vulgaris* L. มีการปลูกมากทางภาคเหนือของประเทศไทย มีทั้งหมดสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ชนิดสีแดงเข้ม (Dark red kidney bean) ที่ประกอบไปด้วยพันธุ์ Montcalm California และ Royal ซึ่งนิยมปลูกมากที่สุด และสายพันธุ์สีชมพู (Light red kidney bean) ที่ประกอบไปด้วยพันธุ์ Moniton เมล็ดถั่วแดงหลวงมีรูปร่างคล้ายไต จึงเรียกว่า “Kidney bean” และถั่วมีเมล็ดสีแดงด้วยก็เรียกว่า red kidney bean ถั่วแดงหลวงถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรกโดยโครงการหลวงปี 2516 เพื่อจุดประสงค์ให้ชาวไทยภูเขา ปลูกเป็นพืชทดแทนฝิ่นและยังรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินบนที่สูงทางภาคเหนือที่มีอากาศหนาวเย็น เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน และแม่ฮ่องสอน เป็นต้น แหล่งปลูกถั่วแดงที่ใหญ่ที่สุดประมาณ ร้อยละ 90 - 95 อยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ ปัจจุบันถั่วแดงหลวงได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของชาวไทยภูเขา และเป็นที่สนใจของเกษตรกรในพื้นที่ราบทั่วไปในเขตภาคเหนือ (คาราวรรณ ทวีศักดิ์บรรกุล, 2549) ถั่วแดงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของโลกไม่ว่าจะเป็นมนุษย์หรือสัตว์ เนื่องจากเมล็ดถั่วอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารที่มีประโยชน์ เช่น มีใยอาหารสูง ไขมันต่ำ ทั้งยังเป็นแหล่งของโปรตีน จึงนิยมใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ทั้งที่เป็นฝักสดและเมล็ดแห้ง ประเทศแถบยุโรปหรืออเมริกาต่างนิยมบริโภคเมล็ดถั่วแดงกันมากเช่นกัน ทั้งอาหารคาวและหวาน และที่สำคัญถั่วแดงยังใช้ประโยชน์ในด้านใช้เป็นอาหารลดความอ้วน และเป็นอาหารสำหรับผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานได้ดีอีกด้วย

ประกาศศรี ภูเสถียร (2546) แบ่งถั่วเมล็ดแห้งเป็น 2 ชนิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบของสารอาหาร หรือคุณค่าอาหาร ชนิดแรก คือ ถั่วที่มีโปรตีนสูงและไขมันสูง ถั่วชนิดนี้สะสมพลังงานในเมล็ดถั่วในรูปของไขมันจึงจัดเป็นพืชน้ำมัน ได้แก่ ถั่วเมล็ดแห้ง ถั่วเหลือง ถั่วลิสง อีกชนิดหนึ่ง คือ ถั่วที่มีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงแต่ไขมันต่ำ ถั่วชนิดนี้สะสมพลังงานในเมล็ดถั่วในรูปของคาร์โบไฮเดรต เมื่อเมล็ดแก่มีลักษณะ รูปร่าง ขนาดและสีของเมล็ดถั่วแตกต่างกัน ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วแดงหลวง ถั่วพุ่ม ถั่วลาย และถั่วปากอ้า

Ren et al., (2008) ทำบริสุทธิ์สาร phytohaemagglutinin จากถั่วแดงหลวงซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หรือกลูโคซิเดส ทั้งยังช่วยยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase (Wang et al., 2001) และยังคงมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวจากการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (D’Costa และ Hurwitz, 2003)

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากธัญพืช อ.ย. เลขที่ 10-1-21142-1-011 Nature Plants S เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากธัญพืชชนิดแคปซูล ที่มีสารออกฤทธิ์ (Active Ingredients) เป็นสารสกัดเข้มข้นจากถั่วแดง ที่ชื่อว่า Glycoprotein "LECITIN" ทำหน้าที่ดักจับไขมัน และขับออกจากร่างกาย ทางระบบอุจจาระ ทำให้ปริมาณไขมันในร่างกายลดลง มีองค์ประกอบกรดอะมิโน Arginine Phenylalanine และ Tryptophan ในผลิตภัณฑ์ ช่วยลดอาการอยากอาหารโดยไม่ทำให้อ่อนล้า ทำให้ระบบขับถ่ายทำงานเพิ่มขึ้นจากปกติเสริมผลการลดน้ำหนัก

(<http://www.chillchillshop.com/product/product.detail.php> 11/7/08)

4. สารยับยั้งอะไมเลสกับการลดระดับน้ำตาลในเลือด และการลดความอ้วน

ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) เป็นภาวะแทรกซ้อนเฉียบพลันของผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวาน (DeFronzo, 1992) อาจมีสาเหตุจากการได้รับอาหารมากเกินไป หรือได้รับอาหารที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม การออกกำลังกายน้อยไป มีความเครียด การมีประจำเดือน สาเหตุอย่างใดอย่างหนึ่งหรือสาเหตุร่วมกันของปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้ อาจนำไปสู่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าภาวะน้ำตาลในเลือดสูงอาจมาจากภาวะติดเชื้อแบคทีเรียแบบเฉียบพลัน หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายผู้ป่วย ซึ่งมักจะเกิดขึ้นกับผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวาน หรือผู้ที่มีความผิดปกติในการสลายน้ำตาลกลูโคส

สัญญาณเตือนของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ได้แก่ อาการเหนื่อยหรืออ่อนเพลีย ผิวหนังแห้งและคัน มีความรู้สึกอยากอาหารเพิ่มขึ้น แผลหายช้า กระหายน้ำบ่อย ครั่นเนื้อครั่นตัว เหมือนเป็นไข้ ปัสสาวะบ่อย ปวดศีรษะ สายตาพร่ามัว อาการอย่างใดอย่างหนึ่งที่กล่าวแล้ว หรืออาการหลายอย่างร่วมกัน ความไม่ชัดเจนของอาการเหล่านี้ ทำให้หลายคนคิดว่าเป็นอาการที่เกิดจากสาเหตุอื่น จึงมักไม่ใส่ใจกับอาการที่เป็นสัญญาณเตือนของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง วิธีที่ดีที่สุดที่จะทราบวาระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมหรือไม่ คือ การตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด

ปัจจุบันพบสารสกัดจากพืชมากมายหลายชนิดที่สามารถรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้

Judith et al. (2006) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของผลอะโวคาโด (*Irvingia gabonensis*) จากวิธีการสกัด 3 วิธีคือ crude seed (CD), defatted seed (DF) และ protein fraction (PF) มีผลในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสหลังอาหาร จากการศึกษาในหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ (normoglycemic) เมื่อใช้สารสกัดในปริมาณ 400 มก./น้ำหนักตัว

Kodama et al. (2005) ศึกษาพบว่า wheat albumin (WA) สามารถควบคุมและลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากการทดสอบกับคนปกติและผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน โดยให้รับประทานชุปก่อนมื้ออาหารที่ผสม WA 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 กรัม ผลการทดสอบพบว่าระดับน้ำตาลในกลุ่มคนปกติมีค่าลดลงดังนี้ คือ 31, 47 และ 50 % จากกลุ่ม 0.25, 0.5 และ 1.0 WA ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานไม่เห็นค่าความแตกต่างเมื่อได้รับที่ 0.5 กรัม และจากการทดสอบในหลอดทดลองพบว่า WA มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ดังนั้น WA สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นอาหารที่มีผลดีต่อสุขภาพ (functional food) ของผู้ป่วยเบาหวาน พร้อมกับการออกกำลังกายและควบคุมอาหาร

Tormo et al. (2006) ศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วขาว (white bean) ต่อการยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อน (α -AI) โดยให้สารสกัดพร้อมกับน้ำและอาหารกับหนูเพศเมียสายพันธุ์ Whistar จำนวน 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน และกลุ่มเป็นโรคเบาหวานชนิดที่สอง 2 กลุ่ม พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสสามารถยับยั้งอาการของโรคเบาหวานได้ทั้งสามกลุ่ม โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ซูเครสและมอลเตส ดังนั้น α -AI สามารถลดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้ทั้งในกลุ่มที่เป็นโรคเบาหวานและไม่เป็นโรค

Bhandari et al. (2008) ทำการศึกษาผลต่อด้านการเกิดโรคเบาหวานในหลอดทดลอง และทำการแยกสารประกอบจากสารสกัด Pakhanbhed ซึ่งเป็นสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศเนปาล พบอนุพันธ์ของ catechin คือ (-)-3-O-galloylepicatechin และ (-)-3-O-galloylcatechin เป็นครั้งแรกในพืชสายพันธุ์นี้ สารทั้ง 2 ตัวสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และแอลฟา-อะไมเลสได้ ดังนั้นพืชสมุนไพรชนิดนี้น่าจะมีประโยชน์เพื่อใช้รักษาผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้ที่มีอาการใกล้เคียง

Xiao-Ping et al. (2010) ศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติของยาสมุนไพรจีนท้องถิ่นที่ใช้รักษาผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อศึกษาหาผลฤทธิ์ทางวิทยาศาสตร์ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน พบว่ามีสารประกอบมากกว่าร้อยละ 40 ที่มีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและแอลฟา-กลูโคซิเดส ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่ช่วยรักษาอาการผู้ป่วยเบาหวาน

5. วิธีการแยกโปรตีนจากสารสกัด

สารสกัดพีชมีสารเจือปนหลายชนิด ทั้งโปรตีน น้ำตาล กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และอื่นๆ การคัดแยกโปรตีนที่สนใจให้ปราศจากสิ่งเจือปนอื่นๆ มีวิธีทำได้หลายวิธีด้วยกันเช่น (1.) การตกตะกอน (precipitation) โปรตีนที่สนใจให้แยกออกจากโปรตีนหรือสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์โดยอาศัยทฤษฎีของ salting in-salting out ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ (salt precipitation) ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ ยังมีวิธีการตกตะกอนโดยการปรับค่า pH ด้วย กรด หรือด่าง ให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ หรืออยู่ที่ pI แต่ไม่นิยมใช้เพราะ ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ หักความสามารถในการทำงานต่างๆ โดยเฉพาะกิจกรรมเอนไซม์ (2.) Ion Exchange Chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และ กรดนิวคลีอิก โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้า สารที่มีประจุสามารถแลกเปลี่ยนกับ ไอออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียวกัน เพื่อจับกับหมู่ที่มีประจุตรงกันข้ามของตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วยแรงดึงดูดอิเล็กตรอน (ion exchanger) สารต่างชนิดกันจะจับด้วยแรงไม่เท่ากัน ขึ้นกับจำนวนประจุและความหนาแน่นของประจุ หรือ charge density (จำนวนประจุ/หน่วยมวลสาร) (3.) การแยกโปรตีนด้วยขนาดโมเลกุล โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ๆ สามารถแยกด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifuge) แต่ไม่นิยมใช้ เพราะมีข้อจำกัดในเรื่องการปนเปื้อน และคุณสมบัติของโปรตีน วิธีที่ใช้มากในปัจจุบัน คือ gel permeation chromatography, electrophoresis และวิธีเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุล

วิธีเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุลเป็นเทคโนโลยีการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย ultrafiltration และ microfiltration ซึ่งมีความแตกต่างของขนาดรูพรุนของเมมเบรน ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีน หรือทำให้สารละลายเข้มข้นมากขึ้น การแยกส่วนและการทำให้บริสุทธิ์สามารถดำเนินการที่อุณหภูมิปกติ ไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อนและสารเคมี จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่ไวต่อการเสียดสภาพ เช่น โปรตีน และเอนไซม์ สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมากง่ายต่อการขยายระดับการทำงานให้มีขนาดเพิ่มสูงขึ้น (scale up)

ผลการตรวจเอกสารการแยกสารยับยั้งอะไมเลส โปรตีน และสารขนาดเล็กโดยวิธีโครมาโตกราฟี และเมมเบรน พบว่าเมมเบรนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถเก็บสารตัวอย่างได้ในปริมาณมากโดยยังคงสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและขนาดของเมมเบรน pH ที่เหมาะสม และอนุภาคของสารที่ต้องการแยกออกจากกัน และปัจจุบันการใช้เมมเบรนในการแยกสาร โมเลกุลขนาดต่างๆ นั้นกำลังเป็นที่สนใจและนิยมใช้กันมาก

Ghosh และ Cui (1998) ศึกษาวิธีการแยก BSA และ Lysozyme ในกระบวนการแยกด้วย ultrafiltration เนื่องจากการแยกสารด้วยเมมเบรนนั้นไม่ได้ขึ้นกับขนาดของสารที่ต้องการแยกเพียงอย่างเดียว ยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นๆ อีกด้วย จากการศึกษาพบว่าค่า pH มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารผ่านเมมเบรนเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูง ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนลดลง แต่การเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนของสารดีขึ้น เมื่อมีการเคลือบบริเวณผิวหน้าของเมมเบรน ด้วยโปรตีนชนิดอื่นเช่น myoglobin ก่อนนำมาใช้

Chiang et al. (1999) ศึกษาการแยกโปรตีน 2 ชนิดที่ได้จากการย่อยสลายถั่วเหลือง ด้วยเอนไซม์ alcalase และ flavourzyme ในระบบที่ต่อเนื่องของเมมเบรนขนาด 30,000 และ 3,000 ดาลตัน พบว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเมมเบรนขนาด 30,000 ดาลตันมีคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเมมเบรนขนาด 3000 ดาลตัน

Feins และ Sirkar (2005) พัฒนาวิธีการแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้หลักการ multimembrane เมื่อใช้เมมเบรนสองชนิดต่างกันแต่มีขนาดคัดแยกโมเลกุล 100,000 ดาลตันเท่ากัน คือ YM100 cellulose membrane และ omega 100 K เพื่อศึกษาการแยกฮีโมโกลบิน (MW 64,677) และ bovine serum albumin (MW 66,430) ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน พบว่าเมมเบรนที่กักโปรตีนไว้จะเพิ่มปริมาณของโปรตีนมากขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนของเมมเบรน

Houngphruk et al. (2006) พบว่าสารสกัดจากยางพาราที่ผ่านการแยกด้วยเมมเบรนขนาด 1 กิโลดาลตัน ในส่วนของ retentate มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ได้ดีที่สุดใน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ได้ดีที่สุดใน

Li et al. (2008) ใช้ระบบอัลตราฟิลเตรชันแยกเอนไซม์โปรตีเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน จากกล้ามเนื้อของปลาทูน่าครีบลีง (yellowfin tuna) โดยเมมเบรนที่ใช้เป็นชนิดเซลลูโลสขนาดคัดแยกโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ผลการศึกษาพบผลของความดัน อัตราการไหล critical flux limited flux มีผลต่อการแยกโปรตีน

Jinapong et al. (2008) ผลิตผงนมถั่วเหลืองอย่างรวดเร็วใน 3 ขั้นตอนคือ ultrafiltration, spray drying และ fluidized bed agglomeration โดยการทำอัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและไขมัน แต่ลดปริมาณของสารโมเลกุลเล็กเล็กๆ ที่เป็นองค์ประกอบในนมถั่วเหลืองอย่างคาร์โบไฮเดรต และของเสียอื่นๆ ที่มีผลรบกวนการทำงานในขั้นตอน spray drying ดังนั้นการใช้เมมเบรนเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารนั้นมีประโยชน์ดังนี้คือ (1.) สารไม่โดนความร้อน (2.) ลดการสูญเสียคุณภาพของสาร (3.) ลดการสูญเสียจากการระเหยของสาร และ (4.) ใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่เปลี่ยนสถานะของสาร

Konrad และ Kleinschmidt (2008) แยก α -lactalbumin (α -LA) ขนาด 14 กิโลดาลตัน จากหางนมด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชันร่วมกับเอนไซม์ทริปซิน โดยใช้เมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุล 10 100 และ 150 กิโลดาลตัน ผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แล้วกรองด้วยเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน สามารถเก็บเกี่ยว α -LA ได้ร้อยละ 15 เมื่อคำนวณเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่แยกได้ มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 90-95

นอกจากการใช้เมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุลในการแยกบริสุทธิ์สารที่สนใจจากสารเจือปนอื่น เพื่อให้ได้ปริมาณมากแล้ว Saxena et al. (2007) ได้พัฒนาวิธีทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส และโปรตีเอสจากเมล็ดข้าวฟ่าง (*Eleusine coracana*) ด้วยหลักการ three-phase partition (TPP) ซึ่งเป็นกระบวนการทำบริสุทธิ์แยกโปรตีนออกจากสารสกัดหยาบในปริมาณมากได้ดำเนินการ โดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการเติมสารละลายบิวทานอล ทำให้เกิดการแยกชั้นของสารละลาย โดยเกิดชั้นของโปรตีนที่เป็นสารยับยั้งระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ การทำบริสุทธิ์พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสและโปรตีเอสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ 20.1 และ 16 เท่า มีร้อยละการเก็บเกี่ยวได้ 39.5 และ 32 ตามลำดับ

6. วิธีการแยกสารที่ไม่ใช่โปรตีน อนุพันธ์น้ำตาลขนาดเล็กจากสารสกัด

สารสกัดจากพืชประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิด นอกจากโปรตีนแล้วยังมีสารในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตตั้งแต่โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น โมโนแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ไดแซคคาไรด์ น้ำตาลมอลโตส ซูโครส และโพลีแซคคาไรด์เช่น แป้ง เพคติน เซลลูโลส ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่มาก นอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์คาร์โบไฮเดรตทั้งที่มีขนาดใหญ่และขนาดเล็กอีกมากมาย รวมถึงสารในกลุ่มของสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิซึ่งมีโครงสร้างหลายรูปแบบ หลายขนาด และอาจเชื่อมต่อกับสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นสารไกลโคไซด์ หรือ

เชื่อมต่อกับอนุพันธ์กรดอะมิโน เช่น อะคาร์โบส ซึ่งเป็นโครงสร้างของน้ำตาลมอลโตสเชื่อมต่อกับอะคาร์วีโนซินด้วยพันธะ α 1-4 ไกลโคซิดิก (Kim et al., 2002) อะคาร์วีโอสตาติน (acarviosatin) เป็นสารประเภท อะมิโนโกลิโกแซคคาร์ไรด์ (Geng et al., 2008) และสารประกอบอินทรีย์ cathechin (Bhandari et al., 2008) เป็นต้น ในการแยกสารที่ไม่ใช่โปรตีนทำได้หลายวิธีตามคุณสมบัติของกลุ่มสารที่สนใจ โดยนิยมตกตะกอนสารโปรตีนออกไปก่อน ด้วยการใส่ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เอทานอล เมทานอล (Kim et al., 2002) เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน (Ali et al., 2006) บิวทานอล (Andra de-Cetto et al., 2008) หรือ เอทิลอะซิเตท (Wang et al., 2010) ไปพร้อมๆ กับการสกัดสารที่มีขั้วไว้ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เมื่อได้สารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์แล้ว ในการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป มักใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับโปรตีน ที่กล่าวข้างต้น ทั้งในแบบคอลัมน์ และ TLC การแยกบริสุทธิ์สารในกลุ่มนี้ด้วยเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุลก็นิยมใช้เช่นกัน

การตรวจเอกสารสารในกลุ่มสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดส เช่นแทนนิน อนุพันธ์น้ำตาลเช่นอะคาร์โบส ตลอดจนสารอื่นๆ ที่ไม่มีคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลสและกลูโคซิเดส พบว่าต่างใช้วิธีการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการเดียวกันของโปรตีน

Seeram et al. (2005) สกัดและทำบริสุทธิ์สารกลุ่มแทนนินที่มีชื่อว่า ellagitannins ที่มีกิจกรรมยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกของผลทับทิม (*Punica granatum* L.) โดยคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Amberlite XAD-16 resin ที่ต่อกับระบบปั๊มสุญญากาศ พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์สารในรูปของ total pomegranate tannins (TPT) ได้ดีถึง 58-60 กรัม/กิโลกรัมเปลือก ภายในระยะเวลาอันสั้น ทั้งยังช่วยลดต้นทุนลงมากกว่าการใช้วิธีแยกด้วยระบบคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุด้วย C-18/ polyamide/ cellulose/ Sephadex Lipophilic LH-20 /Diaion HP20

Scordino et al. (2007) ทำการแยกเม็ดสีจากน้ำผลส้มที่มีส่วนประกอบของ anthocyanin และ hydroxycinnamates ด้วยการประยุกต์วิธี adsorption resins ร่วมกับเมมเบรน พบว่าส่วนประกอบของสาร anthocyanin limonoid flavonones และ hydroxycinnamate ถูกกำจัดออกไปด้วย polystyrene-divinylbenzene resin (PS-DVB) ส่วนกระบวนการแยกด้วยเมมเบรนสามารถกำจัดเอนไซม์และจุลินทรีย์ ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมีเพิ่มขึ้น (กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส 250 กรัม/ลิตร) วิธีการนี้เหมาะแก่การไปประยุกต์ใช้เพื่อเตรียมน้ำตาลในอุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่ม

Sjöman et al. (2007) ศึกษาการใช้ระบบนาโนฟิลเตรชันเพื่อทำการแยกน้ำตาล xylose (MW 150.3) ออกจาก glucose (MW 180.6) ด้วยเมมเบรน 3 ชนิดดังนี้ Desal-5DK, Desal-5DL และ NF270 โดยแต่ละเมมเบรนมีขนาดคัตแอกโมเลกุล CO (g mol^{-1}) 150-300, 150-300 และ 150-200 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า การแยกน้ำตาล xylose กับน้ำตาลกลูโคส ขึ้นกับ สัดส่วนโดยน้ำหนักของ xylose:glucose ค่าความดันที่ใช้ และ permeate flux

Wang et al. (2010) สกัดแยกสารบริสุทธิ์ประเภท flavonoid จากใบฝรั่งด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ 7 ตัวคือ quercetin kaempferol guaijaverin avicularin myricetin hyperin และ apigenin ซึ่งมีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคซิเดส

7. การศึกษาโครงสร้างของโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีนประกอบไปด้วยกรดอะมิโนซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีน ในการทราบโครงสร้างที่สมบูรณ์ของโปรตีนต้องอาศัยหลายเทคนิคประกอบกัน ได้แก่การหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid composition) การหาน้ำหนักโมเลกุลรูพรุนธรรมชาติโดยอาศัยเทคนิค gel filtration (Le Berre-Anton et al., 1997) หาขนาดโมเลกุลและจำนวนของหน่วยย่อยด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งนิยมเรียกสั้นๆว่า SDS-PAGE (Tripathi et al., 2007) เทคนิค mass spectroscopy หรือ MALDI-TOF (Iulek et al., 2000) การตรวจสอบชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายในโตรเจน (N-terminus) หรือปลายคาร์บอน (C-terminus) และ การใช้เทคนิค X-ray crystallographical (Santimone et al., 2004)

การทราบโครงสร้างระดับปฐมภูมิของโปรตีนจากการหาชนิดและลำดับกรดอะมิโนในสาย นำไปสู่การทราบโครงสร้างระดับต่างๆ ของโปรตีนในรูปแบบสามมิติ การเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีนชนิดหนึ่งในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทำให้ทราบถึงความสำคัญของตำแหน่งของกรดอะมิโนต่างๆ บนสายของเปปไทด์ และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ นอกจากนี้ การทราบโครงสร้างของโปรตีนที่สำคัญสามารถนำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีนนั้นขึ้นมาใช้ประโยชน์ได้ด้วยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเช่น การผลิตอินซูลิน ใช้ในการแพทย์ เป็นต้น

Iulek et al. (2000) ทำการแยกบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากเอนโดสเปิร์มของข้าวไรย์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และศึกษาหาขนาดโมเลกุลด้วย mass spectroscopy พบว่าเป็น monomer ขนาด 13,756 ดาลตัน และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminus พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนแบบปฐมภูมิ ดังนี้ SEDCTPWATPITVLAGCRDYVGEQ ซึ่งเหมือนกับสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากข้าวบาเลย์และข้าวสาลี

Yamada et al. (2005) แยกบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน คือ α -AI-Pa1 และ α -AI-Pa2 จากเมล็ดถั่ว tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) เมื่อศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminus ด้วยเครื่อง gas-phase protein sequencer 492 พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ α -AI-Pa1 คือ SNDISFNDFRFXETNLILQG ส่วน α -AI-Pa2 มี 2 หน่วยย่อย คือ ACDTSFNFHS สำหรับหน่วยย่อย α และ SAIGLDFALV สำหรับหน่วยย่อย β

Tripathi et al. (2007) วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลอะไมเลสจากเมล็ดถั่วเขียวด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนแถบเดียวที่มีขนาดโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน พบเปปไทด์จากการย่อยมีลำดับกรดอะมิโนตรงกับอะไมเลส ชนิด amy1 และ amy2 ของข้าวบาร์เลย์ โดยมีค่า % amino acid identity 70 และ 73 ตามลำดับ

Guzman-Partida et al. (2007) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากเมล็ด Palo Fierro (α -AI-PF) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและมีขนาดโมเลกุล 77 กิโลดาลตัน ส่วน SDS-PAGE พบ α -AI-PF ประกอบไปด้วยสามหน่วยย่อยคือ 31, 15.8 และ 17.4 กิโลดาลตัน เมื่อย่อยสลายหน่วยย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และใช้เทคนิค LC-MS/MS พบว่าหน่วยย่อย 31 กิโลดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนสองชนิด (ISDVNNNDIK และ VFSVLSNPSTGK) ซึ่งเหมือนกับหน่วยย่อย 15.8 และ 17.4 กิโลดาลตัน เปปไทด์ทั้งสองนี้เป็นคุณลักษณะสำคัญของโครงสร้าง α -AI ชนิดต่างๆ ของพืชตระกูล *P. vulgaris*

8. การศึกษาโครงสร้างของสารที่ไม่เป็นโปรตีนพวกอนุพันธุ์ของคาร์โบไฮเดรต

การหาโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ปัจจุบันมีด้วยกันหลายวิธีได้แก่ (1.) ผลึกศาสตร์ (Crystallography) ซึ่งเป็นวิธีที่ละเอียดแม่นยำที่สุด แต่มีความยากมากที่จะสร้างผลึกให้มีขนาดใหญ่และมีคุณภาพเพื่อความชัดเจนในการวิเคราะห์ (2.) การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุ (Elemental Analysis) เป็นวิธีการแยกสลายโมเลกุลเพื่อให้ได้แต่ละธาตุสำหรับการวิเคราะห์

(3.) วิธีทางโครมาโตกราฟี เช่น thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบการแยกต่างๆ และใช้สารละลายจำเพาะติดพ่นบนแผ่น TLC เพื่อบ่งบอกชนิดของสาร หรือกลุ่มของสารที่ปรากฏ ภายหลังจากแยก ร่วมกับเทคนิคอื่นๆประกอบ (4.) อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR) เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ functional group (5.) Mass spectrometry เป็นวิธีที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของสารประกอบอินทรีย์และโครงสร้างทางเคมีของสารโดยอาศัยการแตกตัวของโมเลกุลเป็น ไอออน วิธีนี้มีข้อเสียคือสารตัวอย่างที่ใช้ถูกทำลาย แต่มีข้อดีคือใช้สารในปริมาณที่น้อยมากในการวิเคราะห์ (6.) Nuclear magnetic resonance (NMR) เกี่ยวข้องกับการวัดค่าความไวของนิวเคลียสต่อสนามแม่เหล็ก หรือการหมุนรอบของนิวเคลียสภายใต้โมเลกุลของมันเอง หรือสภาวะแวดล้อมที่เป็นไอออนิก ใช้ศึกษาเกี่ยวกับสูตร โครงสร้างของสารทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เทคนิคนี้ไม่ทำลายสารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ จึงนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เช่น การหาร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในของผสม การหาปริมาณน้ำในเนย สภาพของเมล็ดข้าวสาลี และการติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นต้น (7.) UV/VIS spectroscopy เป็นวิธีที่ใช้แสงฉายผ่านสารละลายของสารตัวอย่าง พลังงานแสงบางส่วนถูกดูดซับไว้ในโมเลกุลของสารเพื่อกระตุ้นอิเล็กตรอน ซึ่งได้แก่ อิเล็กตรอนของพันธะในโมเลกุล โดยพันธะคู่ และพันธะสาม จะดูดกลืนแสงได้มากกว่าพันธะเดี่ยว สารที่มีหมู่อะโรมาติกจะดูดแสงช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ได้ดี ส่วนสารที่มีสีจะดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้ (VIS) คุณสมบัติที่ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้ด้วยโมเลกุลแปรผันตามความยาวคลื่นแสง ทำให้ได้เส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและปริมาณที่แสงถูกดูดกลืนไว้ เป็นลักษณะโค้งที่เรียกว่าสเปกตรัม (spectrum) โมเลกุลแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือ ค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสง (λ_{max}) และค่าความเข้มข้นมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ตามกฎของ Beer-Lambert เป็นประโยชน์ในการหาความเข้มข้นของสารต่างๆ

Larson et al. (1994) ใช้เทคนิค X-Ray crystallography ศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร α -cyclodextrin 3 โมเลกุล I-III จับกับเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนหนู (PPA) โดยพบว่า α -cyclodextrin I และ II จับกับเอนไซม์ใกล้เคียงกับบริเวณเร่ง ในขณะที่ α -cyclodextrin III นั้นจับบริเวณอื่นของเอนไซม์

Kim et al. (2002) ค้นพบสารยับยั้งอะไมเลสตัวใหม่จากการทำลายโครงสร้างของโมเลกุลอะคาร์โบสด้วยเชื้อ *Thermus maltogenic* amylase ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^{13}C NMR และ MALDI-TOF พบว่าเป็นสาร α -D-glucopyranosyl- α -acarviosinyl-D-glucopyranose (GlcAcvGlc) ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 645.6 ดาลตัน

Geng et al. (2008) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจาก *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 ศึกษาโครงสร้างของสารยับยั้งนี้ด้วยวิธี electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) และ two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy พบว่าเป็นในกลุ่ม oligosaccharide ที่มีโครงสร้างหลักเป็น acarviosin เช่น acarviostatins III03 และ IV03 มี acarviosin-glucose moieties อยู่ 3 และ 4 ชุดตามลำดับ

Bhandari et al. (2008) สกัดสารออกฤทธิ์จากพืชท้องถิ่นของประเทศเนปาลไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^1H NMR พบว่าเป็นสาร (-) -3 -*O*-galloyl catechin และ (-) -3 -*O*-galloyl catechin ที่มีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคซิเดส

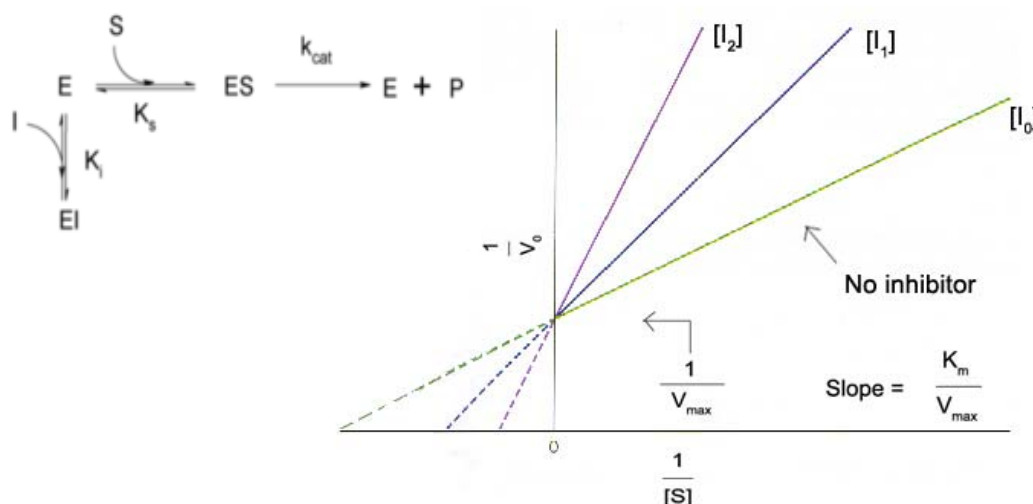
9. การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้ง

สารหลายตัวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยตรงหรือจับยับยั้งที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการทำงาน ตามปกติตัวยับยั้ง อาจเข้าจับหรือทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งแล้วทำให้สับสเตรตไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ตามเดิม หรือหากจับได้ก็ไม่สามารถดำเนินปฏิกิริยาไปตามปกติได้ หรือตัวยับยั้งอาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ส่วนอื่นของโมเลกุล แล้วก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไป ทำให้เอนไซม์หมดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา การยับยั้งเอนไซม์หรือการทำให้ปฏิกิริยาเอนไซม์ดำเนินช้าลงหรือหยุดทำงานนั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่จะควบคุมอัตราเร็วของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย เป็นกลไกการทำงานของยาและสารพิษบางชนิด สารโมเลกุลเล็กที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบ่งออกได้เป็นสองประเภท คือ ตัวยับยั้งแบบทวนกลับไม่ได้ (irreversible-inhibitor) และตัวยับยั้งแบบทวนกลับได้ (reversible-inhibitor)

9.1 ตัวยับยั้งแบบทวนกลับไม่ได้ จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะที่มีความแข็งแรง เช่น พันธะโควาเลนต์ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัว ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ และยังไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่เร่งปฏิกิริยาได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) โดยแอสไพริน (aspirin) หรือ อะซิติลซาลิไซเลต (acetyl salicylate)

9.2 ตัวยับยั้งแบบทวนกลับได้ มีอยู่สามชนิด คือ ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) และตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor)

9.2.1 ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) มักจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรท จึงอาจสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับสับสเตรท ดังนั้นสับสเตรทและตัวยับยั้งชนิดนี้จึงเป็นคู่แข่งกันแย่งกันจับกับเอนไซม์ แต่ตัวยับยั้งไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ดังเช่นสับสเตรทหรือทำปฏิกิริยาต่อไปได้เพียงช้าๆ ตัวยับยั้งแบบแข่งขันอาจจับกับเอนไซม์ที่บริเวณอื่นๆ นอกจากบริเวณที่ตัวเข้าทำปฏิกิริยาจับ แล้วทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจนไม่สามารถจับกับตัวเข้าทำปฏิกิริยาได้อีกก็ได้ ถ้ามีสับสเตรทมากๆ ตัวยับยั้งแบบนี้ก็จะแย่งจับกับเอนไซม์ได้น้อยลง จึงลดผลของการยับยั้งได้ การยับยั้งแบบนี้ค่า V_{max} ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ค่า K_m เพิ่มขึ้น

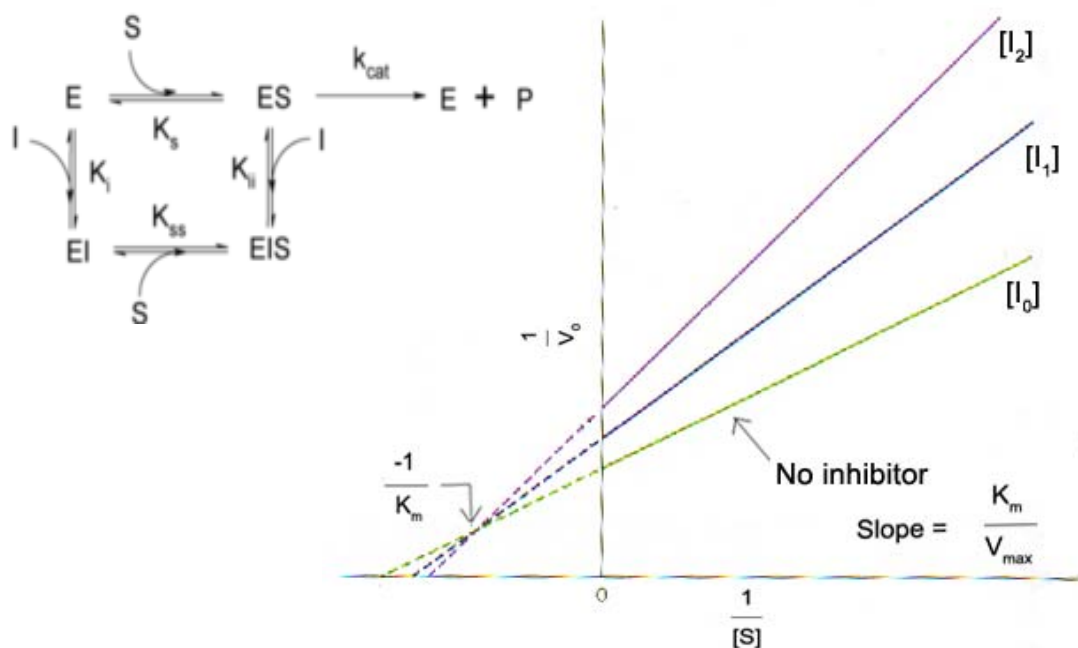


(<http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme/chapter5/ch514.html>)

ภาพที่ 1 จลนศาสตร์การยับยั้งแบบแข่งขัน โดยค่า $[I_0]$ คือ ไม่มีตัวยับยั้ง ค่า $[I_1]$ จะมีความเข้มข้นของตัวยับยั้งน้อยกว่า $[I_2]$

จากกราฟการยับยั้งแบบนี้จะทำให้ค่า V_{max} เท่าเดิม แต่ทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น เพราะสับสเตรทต้องแข่งกับตัวยับยั้งในการจับกับเอนไซม์ถ้ามีความเข้มข้นของสับสเตรทมาก สับสเตรทก็จะแข่งกับตัวยับยั้งได้ดีขึ้น จึงเปรียบเสมือนลดผลของการยับยั้งแบบนี้ลง

9.2.2 ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) จะเข้าจับกับเอนไซม์บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง ลำดับในการเข้าจับนั้นอาจเป็นแบบตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรทก็ได้ เมื่อเกิดเป็น สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้ว จะไม่เกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น การที่มีเอนไซม์มาก ๆ ก็ไม่สามารถลดผลของการยับยั้งนี้ได้ การยับยั้งแบบนี้จะมีค่า V_{max} ลดลง แต่ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง

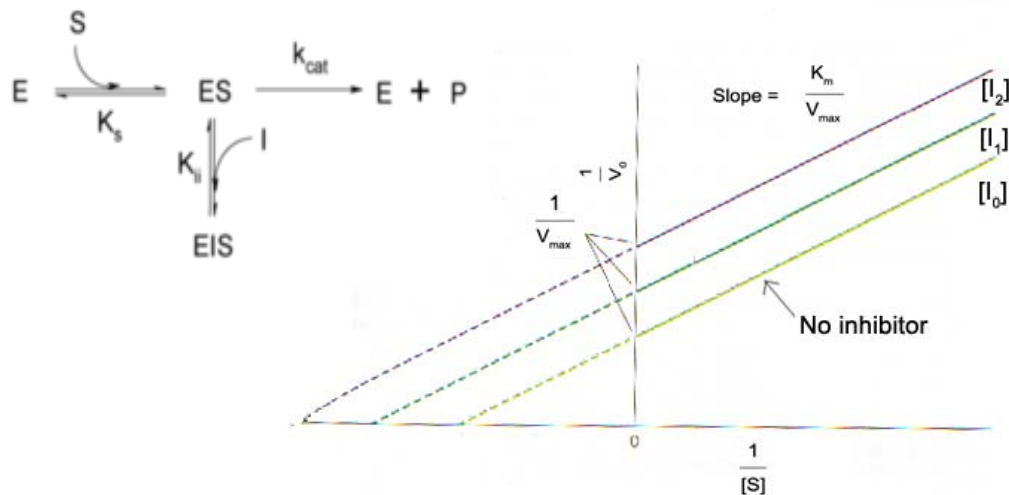


(<http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme/chapter5/ch514.html>)

ภาพที่ 2 จลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยค่า $[I_0]$ คือ ไม่มีตัวยับยั้ง ค่า $[I_1]$ จะมีความเข้มข้นของตัวยับยั้งน้อยกว่า $[I_2]$

จากกราฟ การยับยั้งแบบนี้จะทำให้ค่า V_{max} ลดลง แต่ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง เพราะหากตัวยับยั้งทำให้สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทไม่สามารถเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ นั่นหมายถึง เราสูญเสียเอนไซม์ตัวนั้นไป จึงทำให้ค่า V_{max} ลดลง แต่ค่า K_m เท่าเดิมเพราะเอนไซม์ที่เหลือไม่ได้ลดความสามารถในการจับกับสับสเตรทลง ค่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่จะทำให้อัตราเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุดจึงเท่าเดิม

9.2.3 ตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบนี้จะเข้าจับกับ สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท (ES) เท่านั้น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้วไม่เปลี่ยนแปลงต่อไป เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ การมีสับสเตรทมากๆ ก็ไม่ได้เป็นการลดผลของการยับยั้งแบบนี้ การยับยั้งแบบนี้ทำให้ค่า V_{max} และ K_m ลดลง

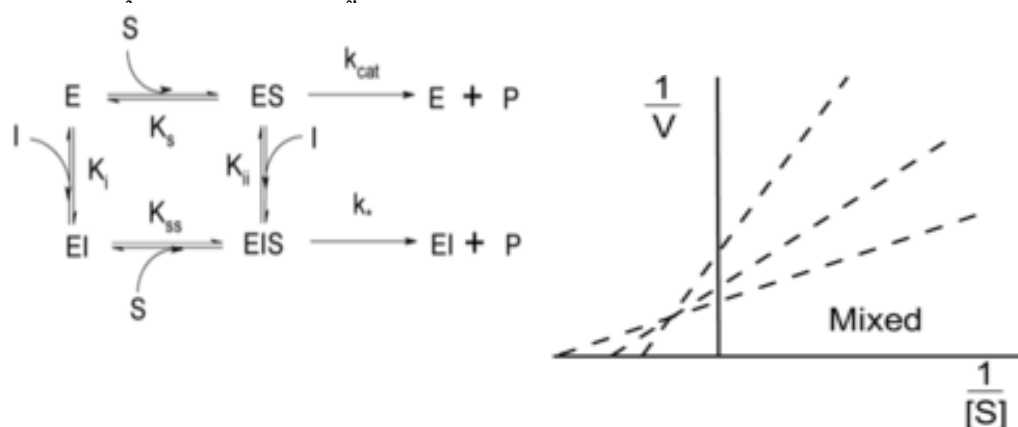


(<http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme/chapter5/ch514.html>)

ภาพที่ 3 จลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง โดยค่า $[I_0]$ คือ ไม่มีตัวยับยั้ง ค่า $[I_1]$ จะมีความเข้มข้นของตัวยับยั้งน้อยกว่า $[I_2]$

จากกราฟ การยับยั้งแบบนี้จะทำให้ค่า V_{max} และ K_m ลดลง เนื่องจากตัวยับยั้งจะจับกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท จึงทำให้ค่าทั้งสองลดลง

9.2.3 ตัวยับยั้งแบบผสม (mixed noncompetitive inhibitor) จะเข้าจับกับเอนไซม์ บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง ลำดับในการเข้าจับนั้นอาจเป็นแบบตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์อิสระ หรือ เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรทก็ได้ เมื่อเกิดเป็น สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรท-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้ว สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้นได้ การที่มีเอนไซม์ มากๆ ก็ไม่สามารถลดผลของการยับยั้งนี้ได้ การยับยั้งแบบนี้จะมีค่า V_{max} ลดลง แต่ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลงแต่จุดตัดของกราฟจะอยู่ทางด้านซ้ายมือของแกน Y



(http://www.search.com/reference/Enzyme_inhibitor)

ภาพที่ 4 จลนศาสตร์การยับยั้งแบบผสม โดยค่า $[I_0]$ คือ ไม่มีตัวยับยั้ง ค่า $[I_1]$ จะมีความเข้มข้นของ ตัวยับยั้งน้อยกว่า $[I_2]$

จลนศาสตร์การยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสที่เคยมีการศึกษา พบว่า สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน α -AI จากสารสกัดถั่วขาวมีรูปแบบการยับยั้งแบบ non-competitive (Marshall และ Lauda, 1975) เช่นเดียวกับสารสกัดจากถั่วเขียว (Tripathi, 2007) และเป็นแบบ mixed noncompetitive จากสารสกัดจาก kidney beans (Le Berre-Anton, 1997) ส่วนสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนเช่น acarbose acarviosine-Glucose และ isoacarbose มีรูปแบบการยับยั้งแบบ competitive inhibition ต่อเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และแบบ mixed noncompetitive ต่อเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Kim et al., 1999)

วัตถุประสงค์

1. ทำปฏิกิริยาสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็น โปรตีนและไม่เป็น โปรตีนจากถั่วแดงหลวงและเก็บเกี่ยวให้ได้ปริมาณเพียงพอ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งอะไมเลสทั้งสองชนิดที่เตรียมได้ต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต แอลฟา-อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อน
3. เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็น โปรตีนและไม่เป็น โปรตีนที่เตรียมได้

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่อง autoclave	HA-300M	Hirayama, Japan
เครื่อง Bench-top refrigerated centrifuge	5804R	Eppendorf, Germany
เครื่องอิเล็กทรอนิกส์	ATTO/AE-6450	ATTO, Japan
เครื่อง Fraction collector	2110	Bio-Rad, USA.
เครื่อง Freeze drier	DW6-85	Heto Drywinner, Denmark
เครื่อง Hot air oven	LR-270	The grieve Co., USA.
Micro-pipettes	P1000	Gilson, France
Micro-pipettes	P10, P50, P100, P250	Merck, Germany
เครื่อง micro centrifuge	C-1200	National Labnet, USA.
เครื่องวัดค่า pH	EcoScan	Utech instrument, Singapore
เครื่อง superspeed refrigerated centrifuge	JA-21	Beckmen, USA.
เครื่อง Ultracentrifuge	L8-70M	Beckmen, USA.
เครื่องวัด UV-VIS spectrophotometer	UV 160 A	Shimadzu, Japan
เครื่องเขย่าสาร (Vortex-2 Genie)	G-560E	Scientific Industries, USA.
เครื่อง water bath	Memmert	Scientific Industries, USA.

1.2 สารเคมี สารเคมีทุกตัวที่ใช้ในการทดลองอยู่ในระดับ analytical grade

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acrylamide (อะคริลาไมด์)	Merck, Germany
Ammonium persulfate (แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต)	Merck, Germany
Ammonium sulfate (แอมโมเนียมซัลเฟต)	BDH Chemical Ltd.
Bromophenol blue	BDH Chemical Ltd.
Bovine serum albumin	Merck, Germany
Coomassie brilliant blue R-250	Merck, Germany
Carboxymethyl cellulose (CMC)	Fluka, Switzerland
3, 5 Dinitrosalicylic acid	Sigma, USA.
Dialysis bag cut off 12,000	Fluka, Switzerland
Ethyl acetate (เอทิลอะซิเตท)	Sigma USA.
Ethanol (เอทานอล)	Lab-Scan, Ireland
Folin reagent	Sigma USA.
Glucose (น้ำตาลกลูโคส)	BDH Chemical Ltd.
Isopropyl alcohol	Lab-Scan, Ireland
Maltose (น้ำตาลมอลโตส)	Sigma USA.
b-mercaptoethanol	BDH Chemical Ltd.
Methanol (เมทานอล)	Lab-Scan, Ireland
N-(1-naphthyl) ethylenediamine	Panreac, E.U.
Pancreatic α -amylase (เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อน)	Sigma USA.
Salivary α -amylase (เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากน้ำลาย)	Sigma USA.
Sodium chloride (โซเดียมคลอไรด์)	Lab-Scan, Ireland
Sodium acetate	Carlo erba
Sodium carbonate anhydrous	APS Finechem, Australia
di-Sodium hydrogen orthophosphate	APS Finechem, Australia
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Sigma USA.
Standard sugar, G1-7 (น้ำตาลมาตรฐาน)	Sigma USA.
Tris (hydroxymethyl) amino methane (Tris-HCl)	Sigma USA.

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Thin layer chromatography (silica gel 60F) aluminium sheets	Merck, Germany
Thin layer chromatography (silica gel 60F) glass plates	Merck, Germany
Standard molecular weight marker for electrophoresis	Sigma USA.
Starch, soluble (แป้ง)	AJAX Finechem, Australia
Sulfuric acid (กรดซัลฟูริก)	Lab-Scan, Ireland

2. วิธีดำเนินการ

2.1 การเตรียมสารสกัดถั่วแดง

นำเมล็ดถั่วแดงตราเกษตรจากห้างสรรพสินค้ามาแยกเปลือกสีแดงออก บดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Warning blender) ร่อนแยกผงละเอียดด้วยตะแกรงร่อน (sieve mesh no. 70, 212 μm) สกัดตามวิธีของ Grant et al. (1995) แต่ไม่ให้ความร้อนครั้งนี้ เติมสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.15 M NaCl ลงในขวดบรรจุผงถั่วแดง ในอัตราส่วน 1:5 (w/v) คนสารผสมอย่างต่อเนื่อง 16 ชั่วโมงที่ 4°C แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 50,000 $\times g$ เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4°C เก็บสารละลายส่วนใส (สารสกัดถั่วแดง) ในภาชนะที่มีฝาปิดที่ -20°C เพื่อทดลองต่อไป โดยแบ่งบางส่วนไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หาปริมาณน้ำตาลและหาปริมาณโปรตีน

2.2 ตรวจสอบกิจกรรมอะไมเลสและการยับยั้งอะไมเลส

2.2.1 กิจกรรมอะไมเลส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายหรือตับอ่อนโดยวิธีดัดแปลงของ Bernfeld (1955) ดังนี้ บ่มเอนไซม์อะไมเลสกับสารละลายน้ำแป้ง 2% ในสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ตรวจวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้มอลโตส (1 มก./มล.) เป็นสารมาตรฐาน กำหนดให้กิจกรรมอะไมเลสหนึ่งหน่วย (1 U) หมายถึงจำนวนเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 มิลลิกรัมมอลโตสที่ 37°C เวลา 3 นาที

2.2.2 กิจกรรมยับยั้งอะไมเลส

วัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยการนำสารละลายตัวอย่างบ่มกับเอนไซม์อะไมเลสที่ทราบค่ากิจกรรมที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนของสารยับยั้งกับเอนไซม์อะไมเลส แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลืออยู่ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที ตามวิธีการข้างต้น กำหนดค่ามิลลิกรัมมอลโตสของแต่ละตัวอย่าง โดยกำหนดให้กิจกรรม

ยับยั้งอะไมเลส 1 หน่วย (1 AIU) เท่ากับปริมาณมอลโตสที่หายไป 1 มิลลิกรัมที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 3 นาที หรือนำไปคำนวณเป็นค่าร้อยละการยับยั้ง อะไมเลสจากสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอะไมเลส} = \frac{(\text{กิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น} - \text{กิจกรรมอะไมเลสที่เหลือจากการยับยั้ง})}{\text{กิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น}} \times 100$$

การหาค่าศักยภาพการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสสูงสุดของสารตัวอย่าง หรือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ทำโดยการเจือจางสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดสอบกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสดังกล่าวข้างต้น จากนั้นเขียนกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อหาค่า IC_{50}

2.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

ตรวจหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างใช้หลักการตรวจหมู่รีดิวซ์ของน้ำตาลเชิงเดี่ยว/เชิงซ้อนโดยใช้สารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) และตรวจวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้มอลโตส (1มก./มล.) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

2.4 การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry et al. (1951) ใช้หลักการทำให้เกิดปฏิกิริยาของพันธะเปปไทด์ในโปรตีนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนกับ Cu^{2+} ในสถานะเบส โดยผสมสารละลายตัวอย่างกับสารอัลคาไลน์คอปเปอร์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 2% $NaKC_4H_4O_6 \cdot H_2O$: 1% $CuSO_4$ ในอัตราส่วน 100:1:1 โดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ซึ่งจะปรีดิคซ์ Cu^{2+} coordination complex เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.5 การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน (PAI) และการตรวจสอบความบริสุทธิ์

2.5.1 แบบโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม

นำสารสกัดหัวแดงมาตกตะกอนด้วย 50% ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตได้สารละลาย cPAI ทำบริสุทธิ์ด้วย

(1.) คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE ion exchange chromatography) ขนาด 17×3.5 ซม. ใช้น้ำเกลือด้วย 0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ที่อัตราการไหล 30 ml/h ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เมื่อเข้าใกล้ศูนย์ ใช้น้ำเกลือด้วย gradient 0-1.0 M NaCl ในสารละลาย 0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา (จนกระทั่งค่าเข้าใกล้ศูนย์) เก็บสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของแต่ละชั้นไว้แล้วเพิ่มความเข้มข้นและปรับปริมาตรด้วย carboxymethyl cellulose (CMC)

(2.) เจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุด้วย Sephadex G-100 ขนาด 109×1.6 ซม. นำสารตัวอย่างที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงจากคอลัมน์แรก ปริมาณโปรตีน (~100 มก.) มาทำการแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นในคอลัมน์ ใช้น้ำเกลือด้วยสารละลาย 0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.9 ในอัตราการไหล 20 ml/h ทำการเก็บตัวอย่าง และวัดหาปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร จนกระทั่งถึงศูนย์ เก็บสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของแต่ละชั้นไว้แล้วเพิ่มความเข้มข้นและปรับปริมาตรด้วย CMC

(3.) คอลัมน์แบบดูดซับที่บรรจุด้วย hydroxyapatite ขนาด 5.2×3 ซม. นำสารละลายตัวอย่างจาก Sephadex G-100 ที่มีกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสสูงสุดมาทำการแยก ใช้น้ำเกลือด้วย 1 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 อัตราการไหล 10 ml/h เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา และติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนชะออกมา ใช้น้ำเกลือด้วย linear gradient ด้วย 0.001-0.07 M sodium phosphate buffer pH 6.8 อัตราการไหล 10 ml/h เก็บตัวอย่าง นำไปวัดหาปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร จนกระทั่งถึงศูนย์ เก็บสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของแต่ละชั้นไว้แล้วเพิ่มความเข้มข้นและปรับปริมาตรด้วย CMC (เรียกว่าสารละลาย PAI)

นำสารละลาย PAI ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย native-PAGE พร้อมตรวจวัดค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสที่ IC_{50} และปริมาณโปรตีน

2.5.2 การแยกสารละลาย PAI ด้วยวิธี molecular weight cut off membrane, (MWCO-membrane)

แยกสารละลาย PAI โดยใช้หลักการคัดแยกตามขนาดโมเลกุล โมเลกุลของสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะถูกกักเก็บไว้ ส่วนที่มีขนาดเล็กกว่าจะถูกกรองผ่านออกไป โดยนำสารละลาย cPAI ปริมาตร 15 ม.ล. ใส่ในหลอด MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน โดยนำไปเช่นตริฟิวจ์ที่ 500×g สำหรับหลอด 100 กิโลดาลตัน 1,500×g สำหรับหลอด 30 กิโลดาลตัน และ 3,000×g สำหรับหลอด 50 และ 10 กิโลดาลตัน นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนที่ถูกชะออก (filtrated) และส่วนที่ถูกกักเก็บไว้ (Retentated) ไปตรวจสอบ (1.) กิจกรรมยับยั้งอะไมเลส (2.) ตรวจสอบโปรตีนส่วนที่ถูกกักเก็บไว้ (retentated) และที่ถูกชะออกด้วย native-PAGE (3.) ตรวจวัดปริมาณโปรตีน

2.5.3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารละลาย PAI

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย PAI ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่เปลี่ยนแปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis, native-PAGE) ตามวิธีของ Davis (1964) ดังนี้

นำสารละลาย PAI ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ native-PAGE ในอัตราส่วน 3:1 ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล และ 0.4% bromophenol blue โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.063 M Tris-HCl pH 6.8 เป็น stacking gel และโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 12% ใน 0.75 M Tris-HCl pH 8.8 เป็น separating gel แยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ 0.25 M Tris-HCl, 0.192 M glycine buffer pH 8.3 ใช้กระแสไฟ ขนาด 15 mA/เจล 1 แผ่นนานประมาณ 2.5 ชม.

นำแผ่นเจลไปย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งประกอบด้วย 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 ใน 40% เมทานอล และ 10% acetic acid นาน 30 นาที ล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของ 40% เมทานอลและ 10% acetic acid

2.6 การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน (cNAI) และการตรวจสอบความบริสุทธิ์

ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการสกัด cNAI (crude nonproteinaceous amylase inhibitor) จากสารสกัดถั่วแดง 4 วิธีคือ วิธีการสกัดโดยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) วิธีการสกัดโดยใช้เอทานอลและเมทานอลของ Kim et al. (2002) วิธีการสกัดโดยใช้เมทานอล และวิธีการสกัดโดยใช้เอทานอล ตัดสินประสิทธิภาพด้วย (1.) ค่าร้อยละเก็บเกี่ยว (%yield) โดยวิธีการชั่งน้ำหนักแห้ง (weight) (2.) ค่าศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสที่ IC_{50} (3.) รูปแบบความบริสุทธิ์บนแผ่น TLC และค่าความเข้มข้นของสารโดยวิธี densitometer และ (4.) ค่าใช้จ่ายในกระบวนการสกัด คัดเลือกวิธีที่ดีที่สุดในการสกัด cNAI ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.6.1 เตรียมสาร cNAI ด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA)

เติมสารละลาย 30% TCA ในอัตราส่วน 1:2 ของสารสกัดถั่วแดงหลวง ผสมให้เข้ากันนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ $4,000 \times g$, $4^{\circ}C$ นาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสในกระบอกตวง ล้างตะกอนด้วย 5% TCA อัตราส่วน 1:2 และเซนตริฟิวจ์ที่ $4,000 \times g$, $4^{\circ}C$ นาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสรวมกับส่วนแรก จากนั้นเติม 95% เอทานอลปริมาตรเป็นสองเท่าของสารละลายส่วนใส คนให้เข้ากันเบาๆ หากไม่มีตะกอนเกิดขึ้นให้เติม NaCl ลงไปเล็กน้อย นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ $4,000 \times g$, $4^{\circ}C$ นาน 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน ละลายด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 ตกตะกอนอีกครั้งด้วย 95% เอทานอล ปริมาตรสองเท่าของสารละลาย นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ $4,000 \times g$, $4^{\circ}C$ นาน 10 นาที เก็บตะกอน (cNAI) ที่ได้ ชั่งน้ำหนัก และละลาย cNAI ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl ในอัตราส่วน 1:10 ของสารสกัดถั่วแดงหลวงเริ่มต้น เก็บสารละลายที่ได้ที่ $-20^{\circ}C$ เพื่อทำการทดสอบต่อไป

2.6.2 เตรียมสาร cNAI ด้วยเมทานอลและเอทานอลของวิธี Kim et al. (2002)

สกัดสาร cNAI จากสารสกัดถั่วแดงด้วยวิธี solvent fractionation ของ Kim et al. (2002) ดังนี้ เติมเมทานอลในสารสกัดถั่วแดงอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร คนต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4,000×g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาเติมเอทานอลอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร แล้วคนตลอดเวลาที่ 4°C นาน 5 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอน นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4,000×g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที ผึ่งแห้งตะกอน cNAI ในตู้ดูดความชื้น 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก cNAI เพื่อคำนวณร้อยละเก็บเกี่ยว ละลาย cNAI ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl ในอัตราส่วน 1:10 ของสารสกัดถั่วแดงหลวงเริ่มต้น เก็บสารละลายที่ -20°C เพื่อการทดสอบต่อไป

2.6.3 เตรียมสาร cNAI ด้วยเมทานอล

เติมเมทานอลในสารสกัดถั่วแดงอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร คนต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4,000×g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสระเหยเมทานอลออกภายใต้ความดัน (evaporator) ที่อุณหภูมิ 60°C และความดัน 337 mbar นาน 20 นาที ชั่งน้ำหนักตะกอน cNAI เพื่อคำนวณร้อยละเก็บเกี่ยว ละลาย cNAI ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl ในอัตราส่วน 1:10 ของสารสกัดถั่วแดงหลวงเริ่มต้น เก็บสารละลายที่ -20°C เพื่อการทดสอบต่อไป

2.6.4 เตรียมสาร cNAI ด้วยเอทานอล

เติมเอทานอลในสารสกัดถั่วแดงอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร คนต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4,000×g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสระเหยเอทานอลออกภายใต้ความดัน (evaporator) ที่อุณหภูมิ 60°C และความดัน 175 mbar นาน 20 นาที ชั่งน้ำหนักตะกอน cNAI เพื่อคำนวณร้อยละเก็บเกี่ยว ละลาย cNAI ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl ในอัตราส่วน 1:10 ของสารสกัดถั่วแดงหลวงเริ่มต้น เก็บสารละลายที่ -20°C เพื่อการทดสอบต่อไป

นำสารละลาย cNAI ที่ได้ไปทดสอบ ศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสที่ IC_{50} ตรวจสอบรูปแบบความบริสุทธิ์บนแผ่น TLC หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง และ โปรตีน เก็บสารละลาย ส่วนที่เหลือที่ $-20^{\circ}C$ เพื่อการทดสอบต่อไป

2.6.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารละลาย cNAI

จำแนกสารละลาย cNAI ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน glucose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), maltoheptaose (G6) maltoheptaose (G7) และอะคาร์โบส คั่งนี้ หยดสารตัวอย่างบนแผ่น Whatman K6F silica gel plate (ปริมาตร 1 μ l) แยกสารตัวอย่างในตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water ในอัตราส่วน 1:3:1 โดยปริมาตร ตรวจสอบตำแหน่งโดยสเปรย์ด้วยสารละลาย 0.3% *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5 % H_2SO_4 ในเมทานอล อบที่ $110^{\circ}C$ นาน 10 นาที สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะปรากฏสีชมพู (Kim et al., 2005)

ตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสโดยนำแผ่น TLC ที่แยกบริสุทธิ์สารตัวอย่างตามวิธีข้างต้นแต่ไม่สเปรย์มาเทียบตำแหน่งกับแผ่นที่สเปรย์สารหาตำแหน่ง จุดสารแต่ละจุดมาสกัดด้วยสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 ที่มี 0.01 M NaCl นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 rpm นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนใสไปตรวจกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสตามวิธีข้างต้น

2.7 การศึกษาผลการยับยั้งอะไมเลส และจลนศาสตร์การยับยั้ง (Kinetic of inhibition)

2.7.1 สารละลาย cPAI

2.7.1.1 ผลการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย (IC_{50})

วัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยการนำสารละลาย cPAI บ่มกับเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายที่ทราบค่ากิจกรรมที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนของสารยับยั้งกับเอนไซม์อะไมเลส แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลืออยู่ที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 3 นาที ตามวิธีข้างต้น

2.7.1.2 ผลการยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อน (IC₅₀)

วัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยการนำสารละลาย cPAI บ่มกับเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนที่ทราบค่ากิจกรรมที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนของสารยับยั้งกับเอนไซม์อะไมเลส แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลืออยู่ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที ตามวิธีข้างต้น

หาค่าศักยภาพการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสสูงสุดของสารตัวอย่าง หรือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ทำโดยการเจือจางสารละลาย cPAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดสอบกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสดังกล่าวข้างต้น จากนั้นเขียนกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสารละลาย cPAI เพื่อหาค่า IC₅₀

2.7.1.3 จลนศาสตร์

ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งของสารละลาย cPAI โดยการใช้สารละลายน้ำแป้งที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 % เป็นสับสเตรท เดิมลงในสารผสมระหว่างอะไมเลสจากน้ำลาย หรือตับอ่อน กับสารละลาย cPAI ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเร็วต้น V₀ กับความเข้มข้นของสับสเตรท [S] ตามวิธีของ Lineweaver-Burk

2.7.2 สารละลาย cNAI

2.7.2.1 ผลการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย (IC₅₀)

วัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยการนำสารละลาย cNAI บ่มกับเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายที่ทราบค่ากิจกรรมที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนของสารยับยั้งกับเอนไซม์อะไมเลส แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลืออยู่ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที ตามวิธีข้างต้น

2.7.2.2 ผลการยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อน (IC₅₀)

วัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส โดยการนำสารละลายตัวอย่างบ่มกับเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนที่ทราบค่ากิจกรรมที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนของสารยับยั้งกับเอนไซม์อะไมเลส แล้วนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลืออยู่ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที ตามวิธีข้างต้น

หาศักยภาพการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสสูงสุดของสารตัวอย่าง หรือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ทำโดยการเจือจางสารละลาย cNAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดสอบกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสดังกล่าวข้างต้น จากนั้นเขียนกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสารละลาย cNAI เพื่อหาค่า IC₅₀

2.7.2.3 จลนศาสตร์

ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งของสารละลาย cNAI โดยการใช้สารละลายน้ำแบ่งที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 % เป็นสับสเตรท เดิมลงในสารผสมระหว่างอะไมเลสจากน้ำลาย หรือตับอ่อน กับสารละลาย cNAI ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเร็วต้น V₀ กับความเข้มข้นของสับสเตรท [S] ตามวิธีของ Lineweaver-Burk

2.8 การศึกษาลักษณะโครงสร้างสารลาย PAI

นำตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสที่เตรียมได้จากคอตมันน์โครมาโทกราฟี hydroxyapatite ไปหาขนาดมวลโมเลกุล จำนวนและขนาดของหน่วยย่อย (subunit) และพันธะ S-S โดยวิธี SDS-PAGE แบบไม่มี β-mercaptoethanol และแบบมี β-mercaptoethanol โดยตัดเจลแบบมี β-mercaptoethanol แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโน เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีนจากฐานข้อมูล และสรุปโครงสร้างระดับปฐมภูมิของโปรตีน

2.8.1 การหาจำนวน ขนาดมวลโมเลกุลของหน่วยย่อย (subunit) และพันธะ S-S โดย SDS-PAGE แบบไม่มี β -mercaptoethanol และแบบมี β -mercaptoethanol

นำตัวอย่างสารละลาย PAI ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE ในอัตราส่วน 3:1 ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS, มี หรือไม่มี 0.4% β -mercaptoethanol และ 0.4% bromophenol blue นำสารตัวอย่างไปต้มที่ 95°C นาน 4 นาที ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี SDS ตามวิธีของ Laemmli et al. (1970) โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 3% ใน 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 เป็น stacking gel และโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12% ใน 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 เป็น separating gel นำสารตัวอย่างหยอดในแต่ละช่องของเจลให้ได้ปริมาณโปรตีนช่องละ 20 ไมโครกรัม

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนใน SDS-PAGE วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างจากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R}_f\text{)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ dye}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน: Phosphorylase b (97 กิโลดาลตัน), albumin (66 กิโลดาลตัน), ovalbumin (43 กิโลดาลตัน), carbonic anhydrase (30 กิโลดาลตัน), trypsin inhibitor (20 กิโลดาลตัน) และ α -lactalbumin (14 กิโลดาลตัน) นำน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างโดยนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.8.2 การหาค่าประกอบกรดอะมิโน

ตัดแถบหน่วยย่อยของสารละลาย PAI ซึ่งแยกด้วย SDS-PAGE แบบมี β -mercaptoethanol ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultimate 3000 LC system (Dionex) coupled to ESI-Ion Trap MS (HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik) นำผลโปรตีนสายสั้นๆ (fragment) ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในระบบ MATRIX SCIENCE Mascot ms/ms ions search (www.matrix science.com)

2.9 การหาโครงสร้างของสารละลาย NAI

นำสารละลาย cNAI ที่ได้จากวิธีเมทานอลมาทำให้บริสุทธิ์ และมีปริมาณมาก ด้วยวิธี TLC เช่นการตรวจสอบความบริสุทธิ์ แต่หยดตัวอย่างลงบนแผ่นในลักษณะแถบ (band) จุดแถบที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสสกัดด้วย 50% เมทานอล กรองแยกผงซิลิกา นำไปประเหยภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 60°C และความดัน 337 mbar ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย TLC อีกครั้ง แล้วนำไป freeze dry เพื่อกำจัดน้ำออก แล้วนำสารละลาย NAI ไปวิเคราะห์โครงสร้าง

2.9.1 ตรวจสอบหมู่เอมีโนของสารละลาย cNAI

ตรวจสอบหมู่เอมีโน เอมีน และน้ำตาลที่มีเอมีโนเป็นองค์ประกอบโดย หยดสารละลาย cNAI ซึ่งเตรียมจากวิธีเมทานอลบนแผ่น Whatman K6F silica gel plate (ปริมาตร 1 μ l) แยกสารตัวอย่างในตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water ในอัตราส่วน 1:3:1 โดยปริมาตร ตรวจสอบตำแหน่งโดยสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.2 กรัมในเอทานอล 100 มิลลิลิตร อบที่ 110°C นาน 10 นาที จะปรากฏสารสีน้ำเงินหรือม่วง

2.9.2 การหาขนาดโมเลกุลด้วย TLC

นำสารละลาย NAI น้ำตาลอะคาร์โบส น้ำตาลมาตรฐาน G1-G7 หยดลงบน TLC แยกสารตัวอย่างในตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water ในอัตราส่วน 1:3:1 โดยปริมาตร ตรวจสอบตำแหน่งโดยสเปรย์ด้วยสารละลาย 0.3% *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5% H₂SO₄ ในเมทานอล อบที่ 110°C นาน 10 นาที สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะปรากฏสีชมพู วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของน้ำตาลมาตรฐาน และตัวอย่างจากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R}_f\text{)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลมาตรฐาน G1-G7 คือ Glucose: 180, maltose: 360.3, maltotriose: 504.44, maltotetraose: 666.6, maltopentaose: 828.73, maltohexaose: 990.9 และ maltoheptaose: 1153.6 กิโลคาลตัน ตามลำดับ หาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลาย NAI โดยนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสารละลาย NAI เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.9.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแถบ NAI

2.9.3.1 ด้วย TLC

นำสารละลาย NAI จากวิธีเมทานอลมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยการหยดลงบน TLC แยกสารตัวอย่างแบบ 1 ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water ในอัตราส่วน 1:3:1 โดยปริมาตร และ 2 Dimension ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol : n-butanol : water ในอัตราส่วน 1:3:1 หรือ dichloromethane : methanol: water ในอัตราส่วน 4 : 0.3 : 0.1 ตรวจหาตำแหน่งโดยสเปรย์ด้วยสารละลาย 0.3% *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5% H_2SO_4 ในเมทานอล อบที่ $110^\circ C$ นาน 10 นาที สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะปรากฏสีชมพู

2.9.3.2 ด้วย HPLC

นำสารละลาย NAI ไปวิเคราะห์ W1-RES-HPLC-001 และ REF-RES-Sampleprep-HPLC-034 ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography 1100, Hewlett Packard, Germany ด้วยเทคนิคการทดสอบ Reverse phase คอลัมน์ APS-2 HYPERSIL 4.6×250 มม. 5 μl อัตราการไหล 1 มล./นาที ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ Acetonitrile:Water (75:25, v/v) ตัว Detector คือ Refractive Index Detector เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน G1-4 และอะคาร์โบส

2.9.4 การหาโครงสร้าง

นำสารละลาย NAI ที่ได้จากแถบ B จากการแยกด้วย TLC ดังกล่าวข้างต้น (1.) หา มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง TLC และ LC-mass spectrometry รุ่น Waters 2690-LCT, ALLIANCE-MICROMASS (2.) หาด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR) รุ่น Unity Inova 500 MHz, VARIAN เปรียบเทียบข้อมูลกับสารที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว

2.10 การคำนวณค่าทางสถิติ

แสดงค่าของข้อมูลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS 10.0 เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ดำเนินการเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan's test ค่า $p \leq 0.05$ เพื่อแสดงค่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดหัวแดงหลวง

สารสกัดจากหัวแดงหลวงเตรียมจากเมล็ดหัวแดงหลวงจากศูนย์การค้าที่ทำการแกะเปลือกเมล็ด (seed coat) สีแดงออก จากนั้นนำไปบดจนเป็นผงละเอียดนำมาสกัดกับสารละลาย 0.02 M phosphate buffer ที่มี 0.15 M NaCl อัตราส่วน 1:5 กรัมต่อปริมาตร ตามวิธีการของ Grant et al. (1995) แบบไม่ให้ความร้อน โดยทำการเตรียมสารสกัดทั้งหมด 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 1 สารสกัดหัวแดงหลวงความเข้มข้น 200 มก. ถั่วแดง/มล. มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 95.62 มีปริมาณน้ำตาล 23.59 มก. มอลโตส/มล. และ ปริมาณโปรตีน 83.32 มก. โปรตีน/มล. Franco et al. (2002) รายงานว่าสารยับยั้งอะไมเลสมีทั้งที่เป็น โปรตีนและที่ไม่เป็นโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาการแยกบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนและที่ไม่เป็นโปรตีนออกจากสารสกัดหัวแดงหลวง เพื่อศึกษากิจกรรมยับยั้งอะไมเลส และวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาตรของสารสกัดถั่วแดงหลวง ร้อยละกิจกรรมยับยั้ง ปริมาณน้ำตาลและปริมาณโปรตีน

Lot	Volume (ml of beans extract)	% Inhibition	sugar (mg/ml)	protein (mg/ml)
N1	1,038	100.73	25.91	86.30
N2	1,030	86.21	23.30	87.60
N3	1,030	91.93	30.40	87.10
N4	1,020	93.69	29.20	79.40
N5	1,040	100.23	16.91	79.20
N6	1,000	100.95	15.83	80.30
average	1,026 ± 14.72	95.62 ± 6.00	23.59 ± 6.10	83.32 ± 4.07

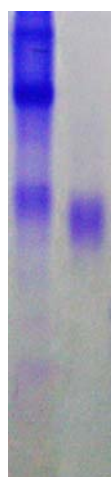
*จากตัวอย่างถั่วแดงที่สุ่มตัวอย่างชุดเดียวกัน

2. การเตรียมสารละลาย PAI และการตรวจสอบความบริสุทธิ์

สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยอาหาร สามารถพบได้ทั่วไปในพืช พบโดดเด่นในธัญพืช (ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์) และพืชตระกูลถั่ว (ถั่วแดง ถั่วขาว) (Le Berre-Anton, 1997) โดยทั่วไปสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจะไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งอะไมเลสในพืช รา และแบคทีเรีย แต่จะออกฤทธิ์ยับยั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลงบางชนิด (Power และ Whitaker, 1977) สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนที่พบในสารสกัดถั่วขาว คือ Phaseolamin (Marshall และ Lauda, 1975) ส่วนในถั่วแดงพบ phytohemagglutinin ซึ่งเป็นสารประเภทเลกตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอะไมเลส (Richard et al., 1976)

2.1 การเตรียมแบบวิธีโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม

เตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากสารสกัดหัวแดงหลวงโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 50% ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (cPAI) นำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม คือ (1.) คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE ion exchange chromatography) (2.) เจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-100 และ (3.) คอลัมน์ hydroxyapatite พบว่า fraction ของโปรตีน (PAI) ที่ได้จากคอลัมน์ลำดับสุดท้าย คือ Hydroxyapatite สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ โดยการเห็นแถบโปรตีน 1 แถบ ดังภาพที่ 5



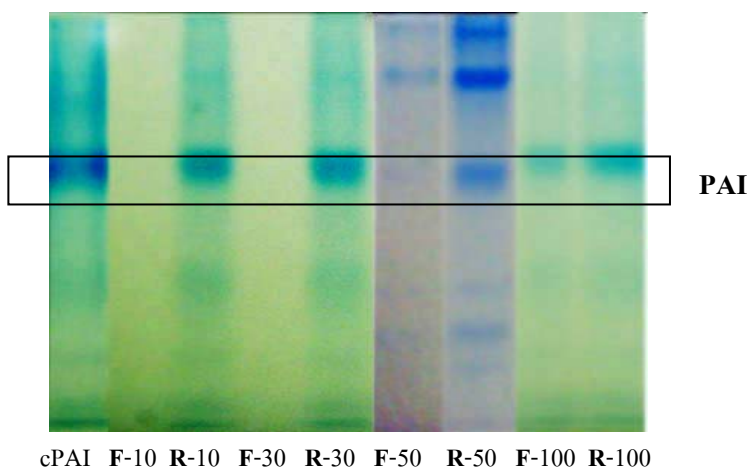
cPAI PAI

ภาพที่ 5 ความบริสุทธิ์ของสารละลาย PAI จากคอลัมน์โครมาโตกราฟี hydroxyapatite ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (12% gel, Native-PAGE) เปรียบเทียบกับสารละลาย cPAI

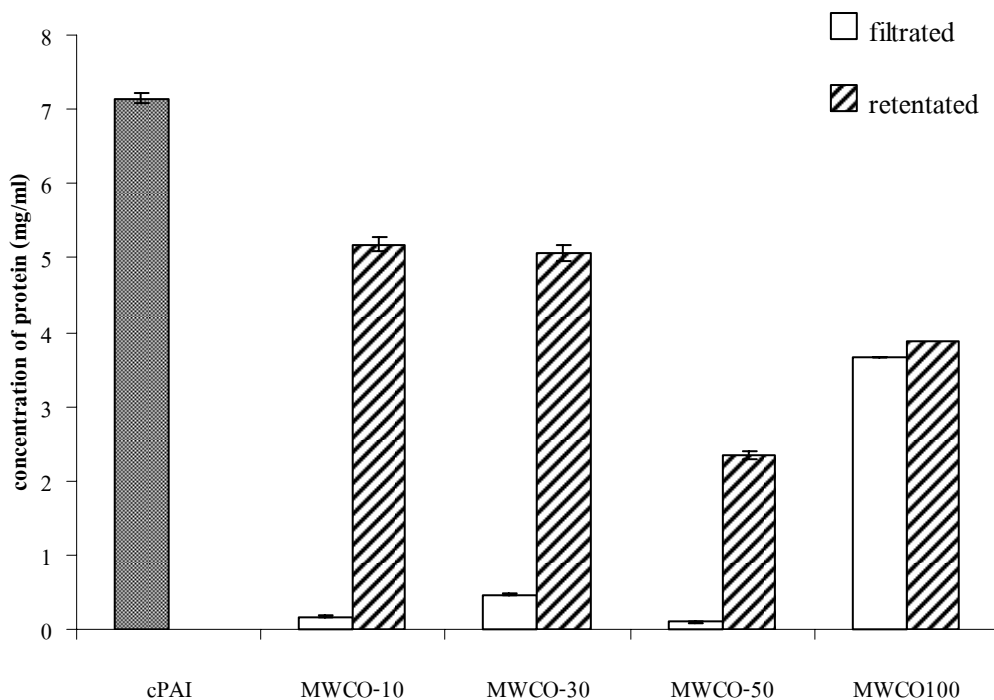
2.2 การเตรียมแบบคัดแยกขนาดโมเลกุล (MWCO)

ผลการแยกด้วยวิธีเมมเบรนคัดแยกขนาดโมเลกุลนั้น พบว่าเมื่อใช้หลอด MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน เพื่อแยกบริสุทธิ์ PAI เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย Native-PAGE (ภาพที่ 6) พบว่าการแยกด้วยวิธี MWCO ไม่สามารถแยกบริสุทธิ์สารละลาย PAI ออกจากสารละลาย cPAI ได้

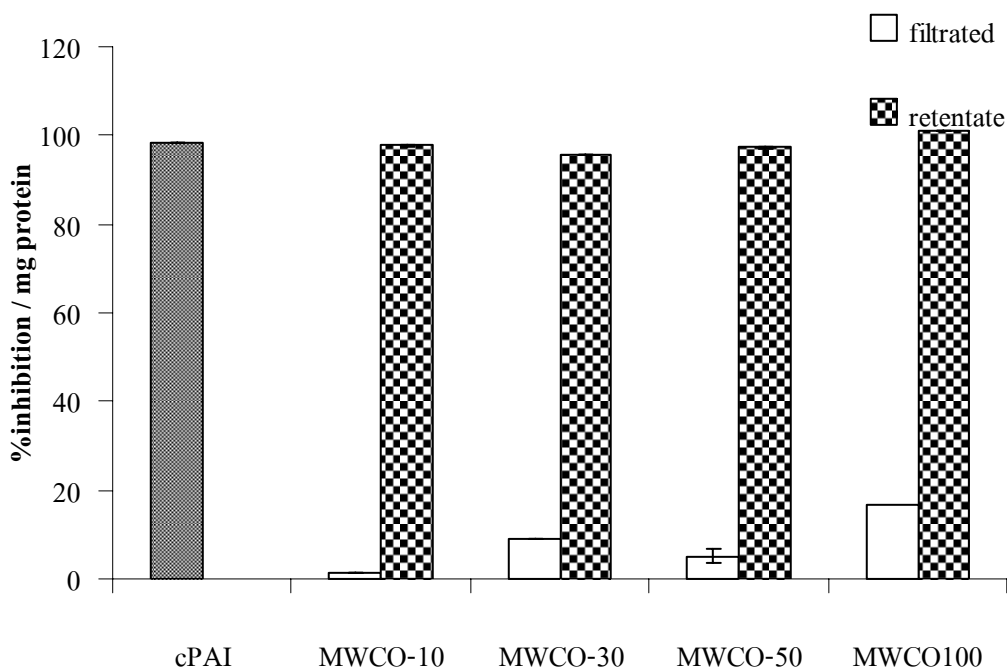
เมื่อกำหนดหาปริมาณโปรตีน พบว่าปริมาณโปรตีนอยู่ในส่วนที่ถูกกักเก็บไว้ในแต่ละขนาดของ MWCO ตามภาพที่ 7 และเมื่อตรวจกิจกรรมยับยั้งอะไมเลส (ภาพที่ 8) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งในส่วนที่ถูกกักเก็บไว้ของ MWCO 10 30 50 และ 100 มีค่ามากกว่าส่วนที่ผ่านการกรองออกมา และมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับสารละลาย cPAI ก่อนผ่าน MWCO



ภาพที่ 6 ความบริสุทธิ์ของสารละลาย PAI จาก MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบไม่เปลี่ยนแปลงสภาพ (12 % gel, Native-PAGE) เปรียบเทียบกับสารละลาย cPAI



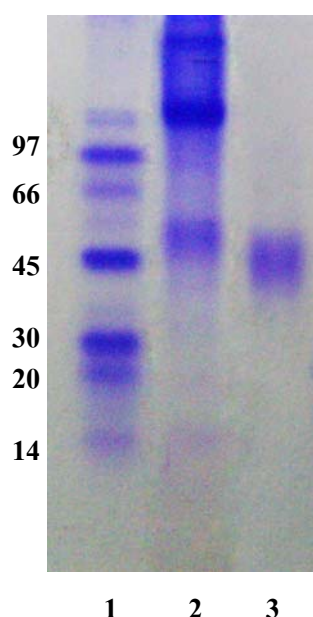
ภาพที่ 7 ปริมาณมิลลิกรัม โปรตีนของสารละลาย cPAI จาก 50 % ความเข้มข้นของแอมโมเนียม ซัลเฟตเมื่อผ่านการแยกด้วย MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน จากการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 8 กิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cPAI จาก 50% ความเข้มข้นของแอมโมเนียม ซัลเฟตเมื่อผ่านการแยกด้วย MWCO ขนาด 10 30 50 และ 100 กิโลดาลตัน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารละลาย PAI

นำสารละลาย PAI ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (12% gel, Native-PAGE) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานและสารละลาย cPAI ปราบกฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 9) ที่มีขนาดโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 9 ความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของสารละลาย cPAI และ PAI ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (12% gel, Native-PAGE) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดย (1) คือแถบโปรตีนมาตรฐาน: Phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa) และ α -lactalbumin (14 kDa) ; (2) คือสารละลาย cPAI และ (3) คือ สารละลาย PAI จากคอลัมน์ Hydroxyapatite

สรุปผลการทดลองการเตรียมสารละลาย PAI และตรวจสอบความบริสุทธิ์ พบว่าการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพมากกว่าการแยกด้วย MWCO เมื่อทราบขนาดโมเลกุลของสารละลาย PAI คือ 45 กิโลดาลตัน จึงทำการเลือกขนาดของ MWCO เพื่อทำการคัดแยกโมเลกุลที่สนใจออกจากโปรตีนอื่นๆ แต่จากผลการทดลองไม่สามารถแยกสารละลาย PAI ออกจาก cPAI ได้ เนื่องจากหลักการของ MWCO คือ ต้องมีแรงขับเคลื่อนที่ทำให้สารละลายไหลผ่านและเกิดการแยก เช่น ผลต่างของความเข้มข้น ผลต่างของความดัน จึงอาจสรุปได้ว่าสารละลาย cPAI มีโปรตีนในสภาพธรรมชาติปะปนอยู่จำนวนมาก และเกิดการรวมตัวกันตามสภาพธรรมชาติ ทำให้ไม่เกิดความแตกต่างของความเข้มข้น หรือเกิดการอุดตันภายในรูพรุนของเมมเบรนทำให้ประสิทธิภาพในการกรองลดลง ส่วนที่ผ่านการกรองนั้นเป็นเพียงอนุภาคเล็กๆ เช่น เกลือ และน้ำ เป็นต้น

3. การเตรียมสารละลาย cNAI และการตรวจสอบความบริสุทธิ์

สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนที่พบได้ในพืชตระกูลถั่ว *Phaseolus vulgaris* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตประเภทต่างๆ เช่น กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ไซโคลมอลโตเดกซ์ตริน กลูคาโนทรานสเฟอเรส (cyclomaltodextrin glucanotransferase) และแอลฟา-อะไมเลส สามารถสกัดได้จาก *Actinoplanes* sp. (Kim et al., 2002) *Bacillus stearothermophilus* และ *Thermus* (Park et al., 1998) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนในสารสกัดถั่วแดงหลวง และวิธีที่สามารถสกัดได้ดีที่สุดเพื่อให้เพียงพอต่อการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการศึกษาโครงสร้าง

3.1 เตรียมสารละลาย cNAI ด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA)

ศึกษาวิธีการสกัดสารละลาย cNIA ด้วยวิธีการสกัดโดยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เพื่อตกตะกอนสารประเภทโปรตีนออกจากสารละลาย พบว่าสามารถสกัด cNAI ได้ 0.22 ± 0.01 กรัม/น้ำหนักแห้ง จากสารสกัดถั่วแดงเริ่มต้น 20 มล. (ถั่วแดง 4 กรัม) สารละลาย cNAI ความเข้มข้น 0.22 กรัม cNAI/มล. ให้ค่าร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลส 5.16 ± 2.76 (3 ซ้ำการทดลอง)

3.2 เตรียมสารละลาย cNAI ด้วยเมทานอลและเอทานอลของ Kim et al. (2002)

เตรียมสารละลาย cNAI ด้วยวิธี Kim et al. (2002) โดยการตักตะกอนโปรตีนออกจากสารสกัดด้วยเมทานอลจากสารสกัดถั่วแดงเริ่มต้น 20 มล. (ถั่วแดง 4 กรัม) แล้วสกัดต่อด้วยเอทานอลพบว่า ให้ค่าน้ำหนัก cNAI 0.06 ± 0.01 กรัม สารละลาย cNAI ความเข้มข้น 0.03 มก. cNAI /มล. ให้ค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 88.99 ± 0.64 (3 ซ้ำการทดลอง)

จากผลการทดลองวิธีการสกัดด้วยสารละลาย TCA ให้ค่ามิลลิกรัม cNAI มากกว่าวิธี Kim แต่เมื่อพิจารณาค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส พบว่า วิธี Kim มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนได้ดีกว่า

ดังนั้นเพื่อเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนจึงเลือกวิธีการสกัดด้วยวิธี Kim แต่เนื่องจากวิธีนี้ ยังเตรียมสารได้น้อย ไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาผลทางชีวภาพ จึงพัฒนาวิธีการของ Kim เพื่อเพื่อเปรียบเทียบหาวิธีการที่ดีที่สุดเพื่อเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน (cNAI) จากสารสกัดถั่วแดงหลวง

3.3 เตรียมสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเมทานอล

เตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนด้วยวิธีที่พัฒนาจาก Kim et al. (2002) โดยการตักตะกอนโปรตีนออกจากสารสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำไปประเหยเมทานอลออกภายใต้ความดันพบว่าให้ค่าน้ำหนักมิลลิกรัม cNAI 0.34 ± 0.01 กรัม และสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนความเข้มข้น 0.17 มก. cNAI /มล. ให้ค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 112.7 ± 13.5 (3 ซ้ำการทดลอง)

3.4 เตรียมสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเอทานอล

เตรียมสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนด้วยวิธีที่พัฒนาจาก Kim et al. (2002) โดยการตักตะกอนโปรตีนออกจากสารสกัดด้วยเอทานอล แล้วนำไปประเหยเมทานอลออกภายใต้ความดันพบว่าให้ค่าน้ำหนักมิลลิกรัม cNAI 0.30 ± 0.02 กรัม และสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนความเข้มข้น 0.15 มก. cNAI /มล. ให้ค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 82.05 ± 6.13 (3 ซ้ำการทดลอง)

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร cNAI 3 วิธี คือ (1) วิธีที่ดัดแปลงจาก Kim et al. (2002) (2) การสกัดด้วยเมทานอล และ (3) การสกัดด้วยเอทานอล พบว่าวิธีที่ 1 ให้ร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 88.99 ± 0.64 แต่เตรียม cNAI ได้น้อย วิธีที่ 2 สกัดด้วยเมทานอลให้ค่าร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสสูงสุดคือ 112.7 ± 13.5 และให้ร้อยละผลผลิตสูงสุดคือ 74.4 ± 2.2 และมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด คือ 0.37 บาทต่อมิลลิตรสารสกัดถั่วแดง วิธีที่ 3 สกัดด้วยเอทานอลมีค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 82.05 ± 6.13 (ตารางที่ 2) ดังนั้นวิธีการสกัดด้วย เมทานอลจึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุดเพื่อสกัด cNAI

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด cNAI ของวิธีสกัด 3 วิธี

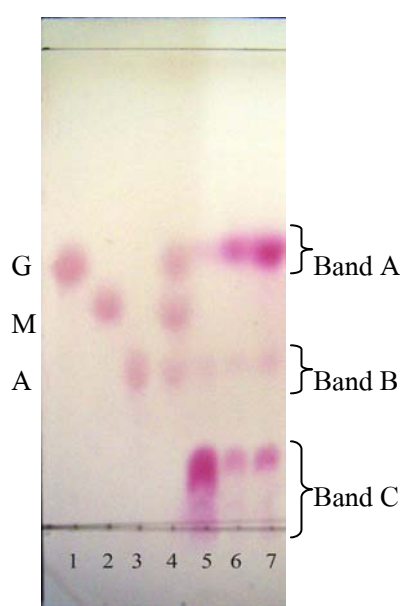
วิธีการสกัด*	Kim	เมทานอล	เอทานอล
น้ำหนัก cNAI (กรัม)	0.06 ± 0.01^a	0.34 ± 0.01^b	0.30 ± 0.02^b
ร้อยละผลผลิต (%yield)	12.1 ± 1.3^a	74.4 ± 2.2^b	61.6 ± 2.9^b
ร้อยละการยับยั้ง (% Inhibition)	88.99 ± 0.6^a	112.7 ± 13.5^b	82.05 ± 6.1^a
ราคาตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ (บาท/มล.สารสกัดถั่วแดง)	5.48	0.37	1.14

* ทุกวิธีเริ่มจากสารสกัดถั่วแดง 200 มก. ถั่วแดง/มล. ปริมาตร 20 มล. และเทียบร้อยละผลผลิตจากน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่หักลบน้ำหนักเกลือจากบัฟเฟอร์ที่สกัดแล้ว

แสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการเตรียมสารสกัดถั่วแดงหลวงด้วยวิธีสกัดแต่ละวิธี (n=3). ตัวอักษร (a-c) บ่งบอกค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า $p \leq 0.05$ ตัวอักษรเหมือนกันหมายความว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารละลาย cNAI

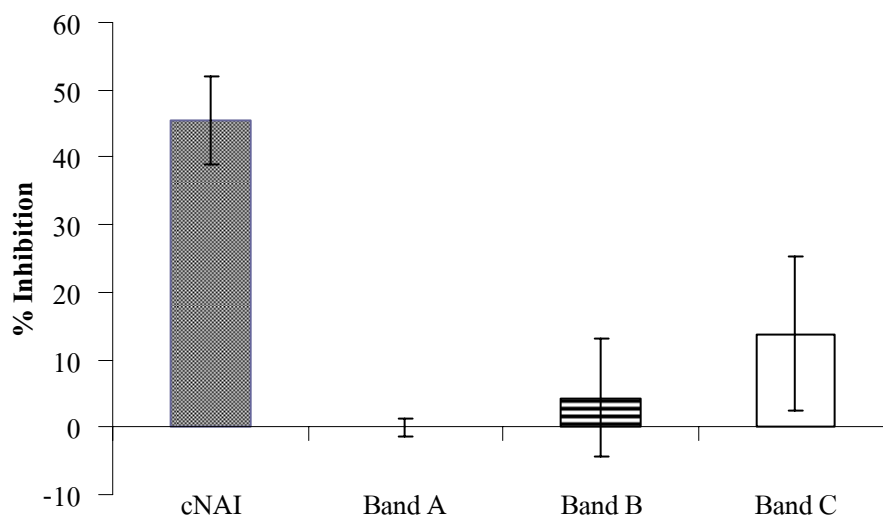
ตรวจสอบความบริสุทธิ์สารละลาย cNAI ที่สกัดจากสารสกัดแห้งแดงหลวงทั้ง 3 วิธี ข้างต้นด้วยวิธี TLC สเปรย์หาตำแหน่งสารประกอบน้ำตาลด้วยสารละลาย 0.3% (w) *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5% (v) H_2SO_4 ในเมทานอล เปรียบเทียบกับอะคาร์โบส และน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส (G1) มอลโตส (G2) และมอลโตไตรโอส (G3) ตามลำดับ ปรากฏแถบติดสีชมพู (positive test) ของแซกคาไรด์ 3 แถบ เรียกว่า แถบ A, B และ C ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ผลการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cNAI จากการสกัดทั้ง 3 วิธีด้วย TLC เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน

- | | | |
|--------------------|-----------------|--------------------|
| 1. กลูโคส :G | 2. มอลโตส :M | 3. อะคาร์โบส :A |
| 4. น้ำตาล G1-3 | 5. สกัดวิธี Kim | 6. สกัดวิธีเอทานอล |
| 7. สกัดวิธีเมทานอล | | |

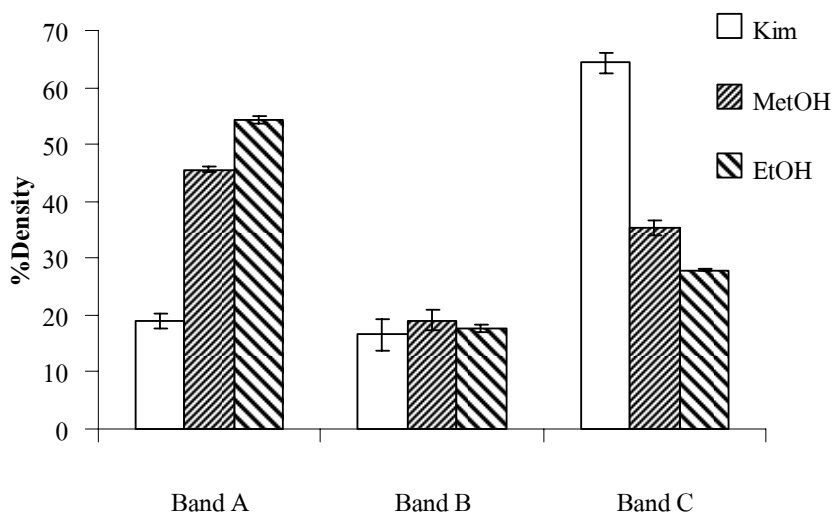
เมื่อสกัดแถบ A B และ C จากแผ่น TLC ไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส พบว่า แถบ B มีค่าการยับยั้งร้อยละ 4.39 ± 8.75 (ความเข้มข้น 0.24 มก.มอลโตส/มล.) แถบ C มีค่าการยับยั้งร้อยละ 13.77 ± 11.41 (ความเข้มข้น 0.18 มก.มอลโตส/มล.) และแถบ A ไม่พบการยับยั้ง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 กิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย NAI แถบ A แถบ B และ แถบ C จากแผ่น TLC

ในการทดลองต่อไปได้เลือกแถบ B เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเคลื่อนที่กับน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าแถบ B มีระยะทางการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับอะคาร์โบส ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้เพื่อลดน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Bailey, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าแถบ B จะเป็นอนุพันธ์น้ำตาลชนิดเดียวกับอะคาร์โบสหรือมีโครงสร้างใกล้เคียง แม้มีค่าร้อยละการยับยั้งน้อยกว่าแถบ C แถบ C มีค่าร้อยละการยับยั้งมากกว่าเนื่องจากยังติดส่วนของ cNAI ที่จุด spot สารอยู่ด้วยดังภาพแสดง จึงไม่คัดเลือกในการทดลอง

เมื่อนำแผ่น TLC ที่สเปรย์ด้วย 0.3% (w) *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5% (v) H_2SO_4 ในเมทานอล ไปวัดความเข้มแถบด้วยเครื่อง Densitometer พบว่า การสกัดด้วยวิธีเมทานอลสามารถสกัดแถบ B ได้มากที่สุด คือร้อยละความเข้ม 19.5 ± 0.05 เมื่อเทียบกับวิธี Kim และเอทานอล (ภาพที่ 12) สอดคล้องกับร้อยละผลผลิตที่แสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความเข้ม (%Density) ด้วยเครื่อง Densitometer ของการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cNAI จากการสกัด 3 วิธีด้วย TLC

4. การศึกษาผลการยับยั้งอะไมเลส และจลนศาสตร์

4.1 สารสกัดถั่วแดง

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Diabetes mellitus) เป็นหนึ่งในโรคชนิดเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและโรคในผู้สูงอายุในหมู่ประชากรทั่วไป วิธีการรักษาโรคนี้นี้มีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่ใช้ในการรักษาคือการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยลด/ชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด ด้วยการให้สารยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย คาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์อะไมเลส และ เอนไซม์กลูโคซิเดส การศึกษาผลการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของสารสกัดถั่วแดงหลวงซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นที่ยอมรับประทานของประเทศไทย ได้ผลของการศึกษาดังนี้

ผลของสารสกัดถั่วแดงหลวงต่อการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย (saliva α -amylase enzyme, SA) และอะไมเลสจากตับอ่อน (pancreatic amylase enzyme, PPA) ดังตารางที่ 3 4 และภาพที่ 13 สารสกัดถั่วแดงหลวง 200 มก.ถั่ว/มล. ยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายได้ร้อยละ 102.72 ± 5.25 และที่ 3.60 มก. ถั่ว/มล. ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) สารสกัดถั่วแดงยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนได้ร้อยละ 92.28 ± 11.38 และที่ 4.20 มก. ถั่ว/มล. ให้ผลยับยั้ง

เอนไซม์ได้ร้อยละ 50 โดยสรุปสารสกัดถั่วแดงหลวงสามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายได้ดีกว่า ตับอ่อนเนื่องจากใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าในการยับยั้งที่ร้อยละ 50

ศึกษาภาพในการยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ที่เคยมีการรายงานไว้ เช่น สารสกัดจากเมล็ดถั่ว *Phaseolus vulgaris* ความเข้มข้น 8.1×10^{-8} M มีค่ากิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนร้อยละ 64 ที่ อุณหภูมิ 37 °C (Le-Berre-Anton et al., 1997) สารสกัดเมทานอลจาก Pakhanbhed (*Bergenia ciliate*, Haw) ความเข้มข้น 0.2 ml ใน 50% DMSO มีค่ากิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสร้อยละ 93.5 (Bhandari et al., 2008) สารสกัดจาก *Phyllanthus amsrus* ความเข้มข้น 20 มก./มล. มีค่า กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสร้อยละ 24.3 (Ali et al., 2006) สารสกัดจากใบฝรั่งด้วยเอทิลอะซิ เตท และบิวทานอลความเข้มข้น 1.5 มก./มล. มีค่าการร้อยละกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจาก ตับอ่อน 43.9 ± 8.7 และ 54.4 ± 6.6 ตามลำดับ (Wang et al., 2010)

ตารางที่ 3 ศึกษาภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารสกัดถั่วแดงหลวง

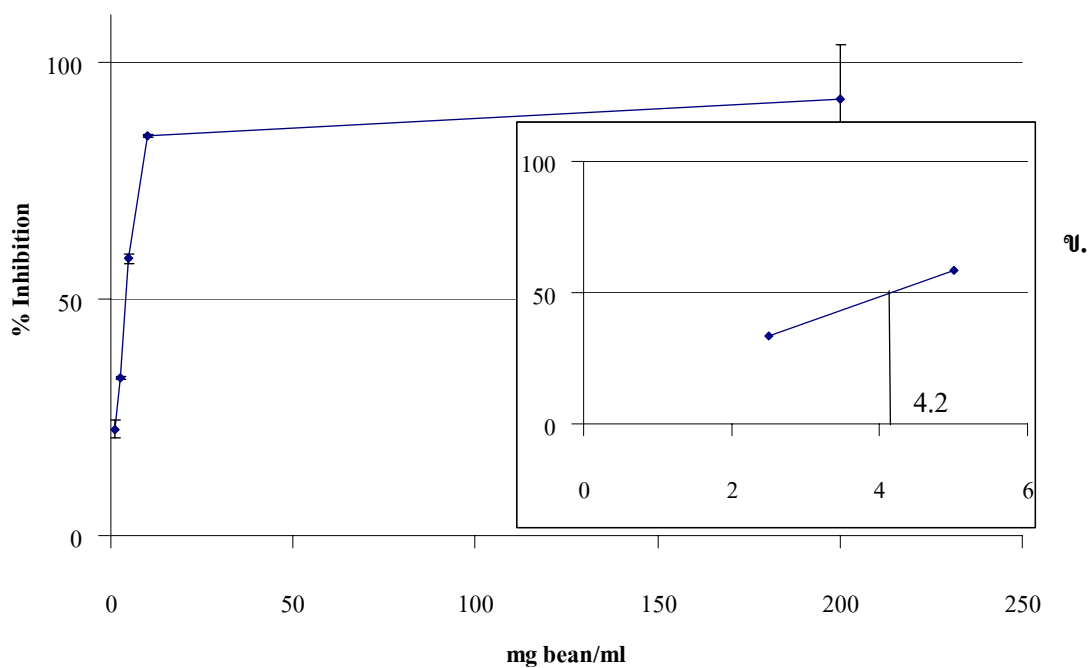
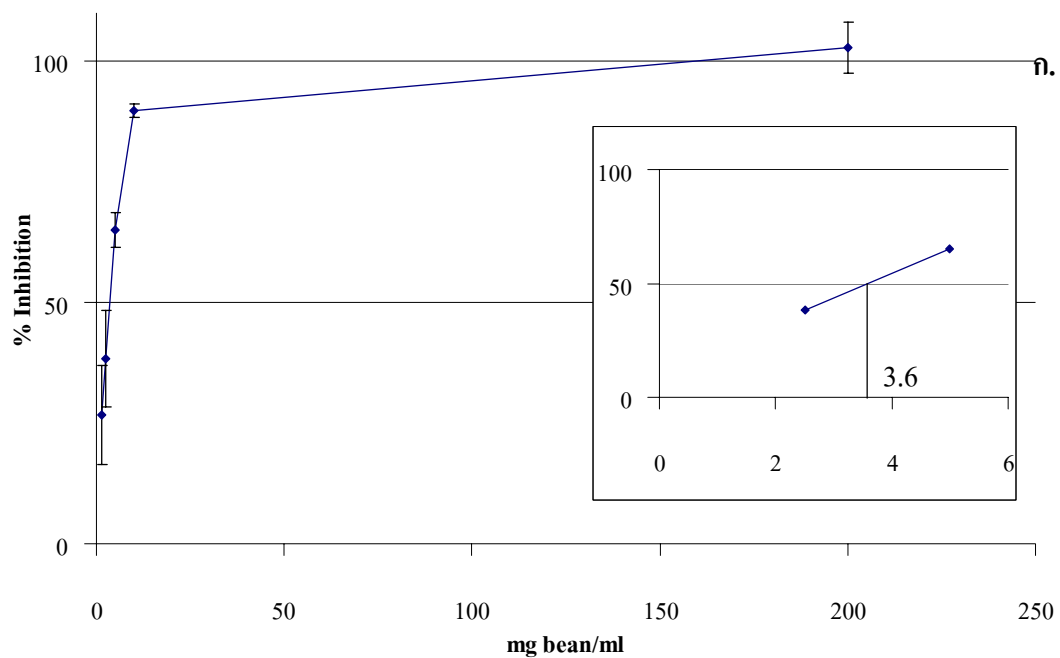
	Salivary amylase	Pancreatic amylase
%Inhibition of amylase activity by extract	$102.7 \pm 5.3^*$	$92.3 \pm 11.4^*$
^a mg/ml of bean extract for 50% inhibition	3.60	4.20
^b mg protein/ml of bean extract for 50% inhibition	0.55	0.66

* แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c หาค่าได้จากกราฟ IC_{50} ในลำดับภาพที่ 13 และ 14

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งและปริมาณโปรตีนในสารสกัดถั่วแดงใน 1 มล.ของสารตัวอย่าง

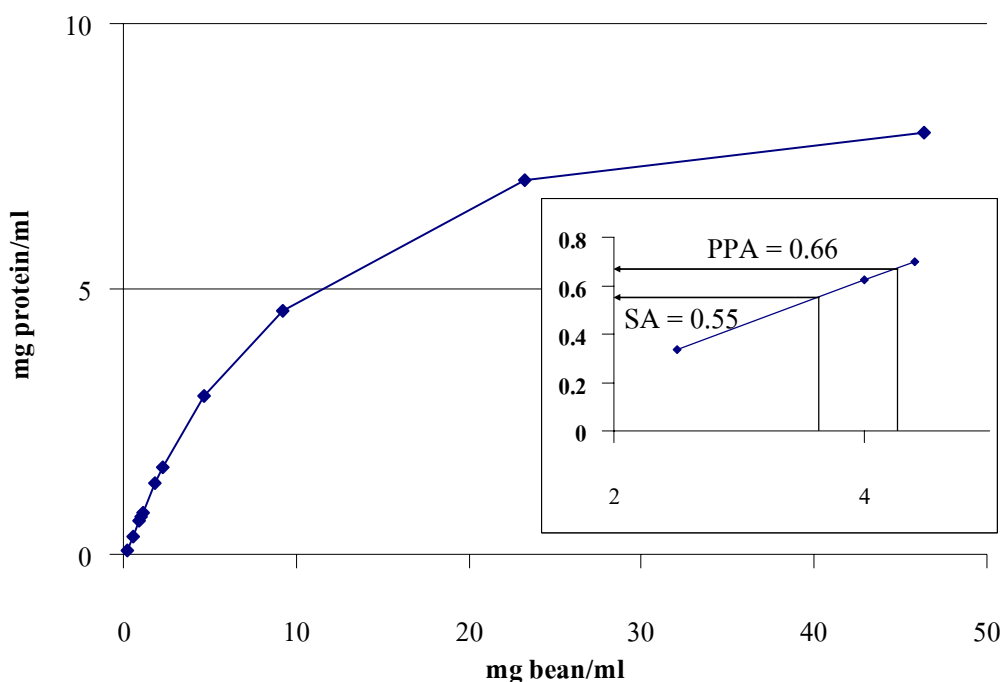
Endogeneous reducing sugar of the extract	1.85 ± 0.07 mg maltose/ml
Endogeneous amylase activity	2.90 ± 0.07 mg maltose/ml
^c mg protein/ml of bean extract	7.96 ± 0.006 mg protein/ml



ภาพที่ 13 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดหัวแดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย

ข. อะไมเลสจากตับอ่อน



ภาพที่ 14 มก. โปรตีน/มล.ของสารสกัดถั่วแดงหลวงที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมื่อปมเอนไซม์ สารยับยั้ง และสับสเตรตพร้อมกัน จะไม่เกิดกิจกรรมยับยั้ง แต่การปมเอนไซม์กับสารยับยั้งก่อนการเติมสับสเตรตนั้นสามารถเกิดกิจกรรมยับยั้งได้ดีกว่า (Le Berre-Anton, 1997) ช่วงระยะเวลาของการปมทำให้เอนไซม์จับกับสารยับยั้งกลายเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้งอย่างสมบูรณ์และทำให้เกิดกลไกการยับยั้ง ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งตามวิธีของ Lineweaver-Burk

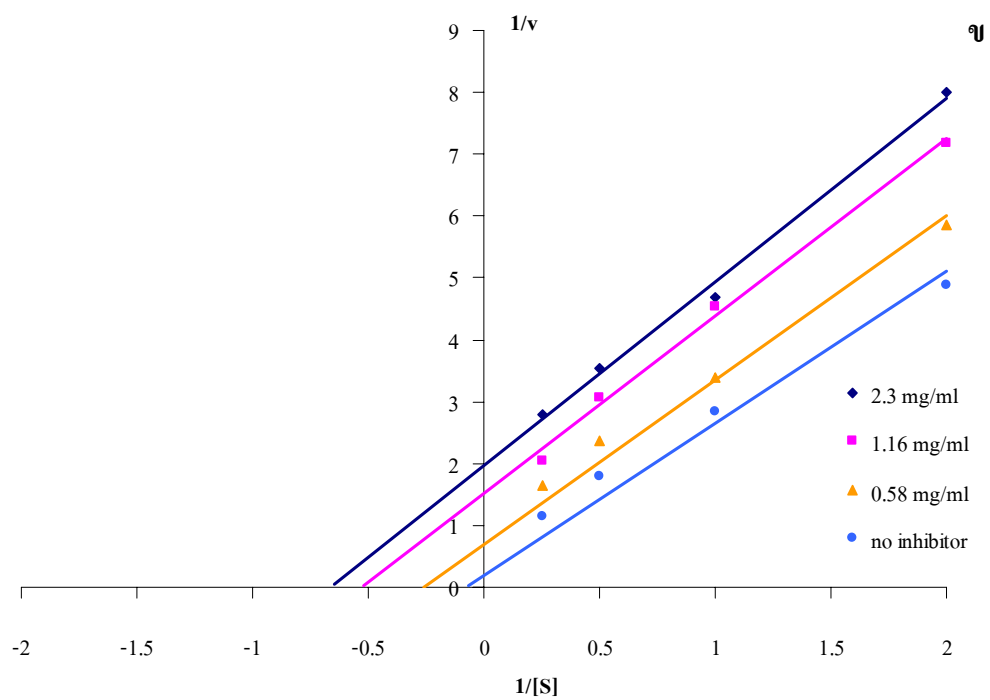
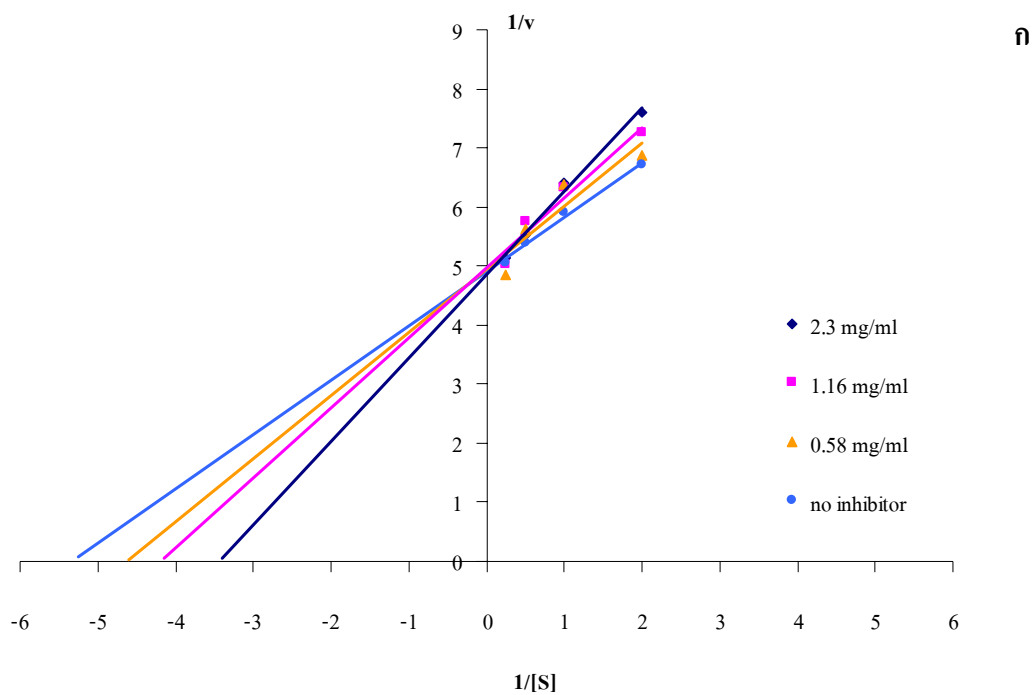
จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย ของสารสกัดถั่วแดงหลวง โดยการพิจารณาค่า K_m และ V_{max} เมื่อค่า K_m บอกถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ค่า K_m น้อย หมายความว่าเอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรตได้ดี และค่า V_{max} บอกถึงความสามารถในการสลายตัวของสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์-สับสเตรต จากการทดลอง (ตารางที่ 5 และภาพที่ 15) พบรูปแบบการยับยั้งของสารสกัดจากถั่วแดงหลวงต่ออะไมเลสจากน้ำลายเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เมื่อพิจารณาค่า K_m มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ค่า V_{max} คงที่

จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสตับอ่อนของสารสกัดถั่วแดง พบว่าค่า K_m และ V_{max} มีค่าลดลง เป็นรูปแบบการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) โดยตัวยับยั้งจะเข้าจับกับสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรต (ES) เท่านั้น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรต-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้วไม่เปลี่ยนแปลงต่อไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ การมีสับสเตรตมากๆ ก็ไม่ได้เป็นการลดผลของการยับยั้งแบบนี้

ตารางที่ 5 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารสกัดถั่วแดงหลวง

Concentration of inhibitor (beans extract)	Salivary amylase (SA)*		Pancreatic amylase (PPA)*	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
No inhibitor	0.188	0.204	11.111	5.000
5 mg/ml (25% Inhibition)	0.217	0.202	3.846	1.667
2.5 mg/ml (50% Inhibition)	0.238	0.200	1.852	0.667
1.25 mg/ml (75% Inhibition)	0.292	0.206	1.493	0.500

* แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ 15 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารสกัดหัวแดงหลวงที่มีต่อ

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย

ข. อะไมเลสจากตับอ่อน

4.2 สารละลาย cPAI

สารละลาย cPAI ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนสารสกัดหัวแดงหลวงด้วย 50% ความเข้มข้นของ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 9.17 มก./มล.ของ cPAI มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 92.87 ± 5.16 และที่ 0.02 มก./มล.ของ cPAI ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ร้อยละ 50 (IC_{50}) สารละลาย cPAI ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนร้อยละ 99.95 ± 2.27 และที่ 0.034 มก./มล.ของ cPAI ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยสรุปสารละลาย cPAI สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายได้ดีกว่าเอนไซม์อะไมเลส จากตับอ่อนเนื่องจากใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (ตารางที่ 6 และ 7)

สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากหัวแดงหลวงที่ศึกษานี้มีกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสใกล้เคียงกับสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) ซึ่งมีรายงานที่ร้อยละ 99.5 แต่มีค่ากิจกรรมยับยั้งมากกว่าถั่วสายพันธุ์ tepary (*Phaseolus acutifolius*) ที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งร้อยละ 2.7 (Yamada et al., 2001)

ตารางที่ 6 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารละลาย cPAI

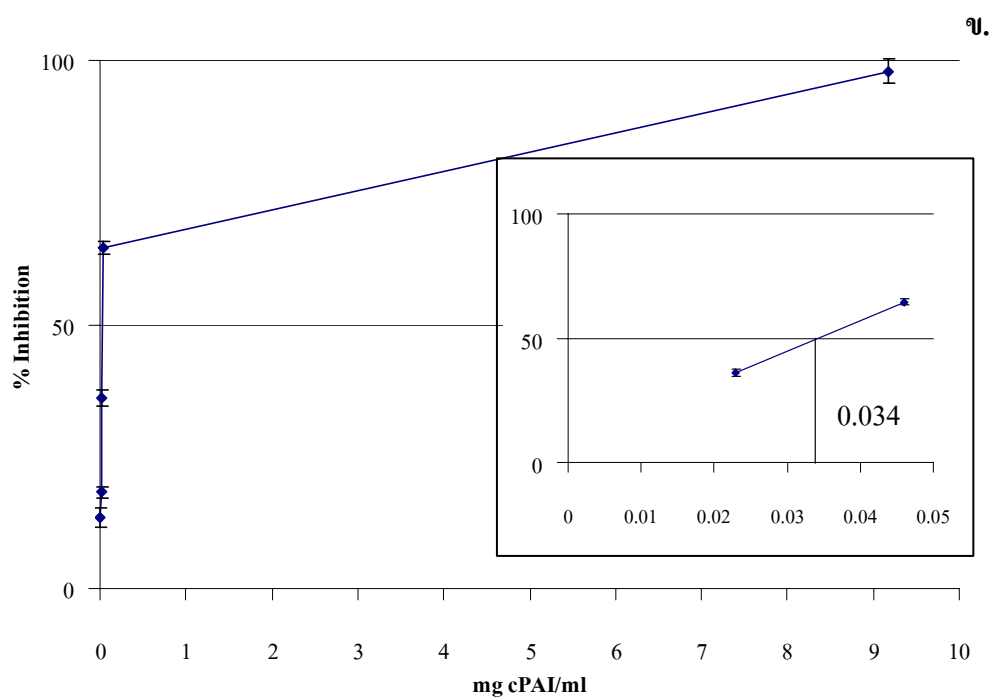
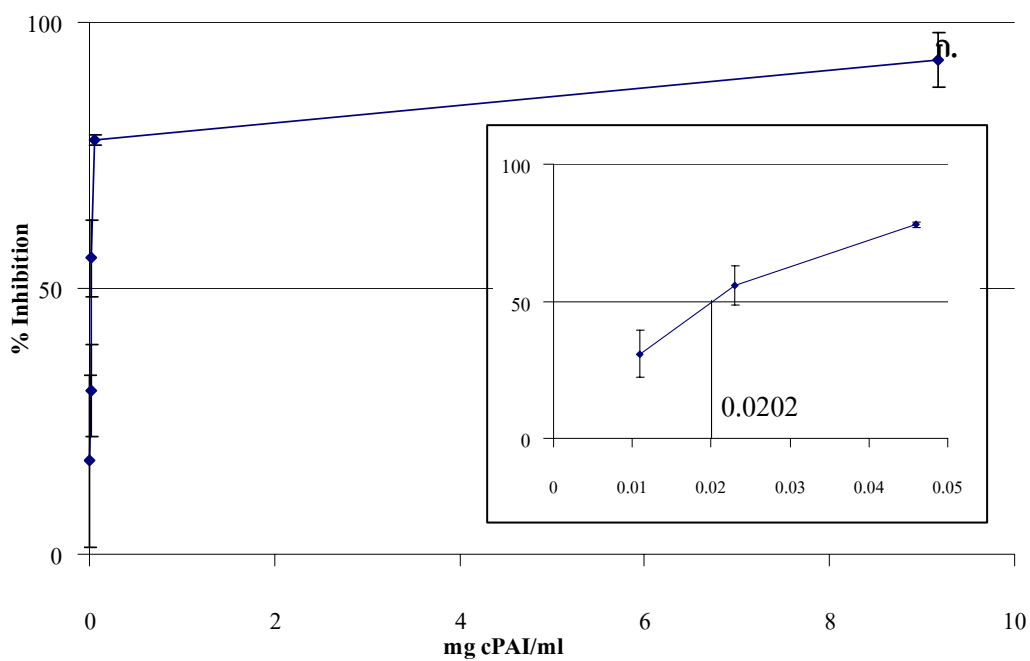
	Salivary amylase	Pancreatic amylase
%Inhibition of amylase activity by cPAI	$92.87 \pm 5.16^*$	$97.95 \pm 2.27^*$
^a mg/ml of cPAI for 50% inhibition	0.020	0.034
^c mg protein/ml of cPAI for 50% inhibition	0.200	0.350

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c หาค่าได้จากกราฟ IC_{50} ในลำดับภาพที่ 16 และ 17

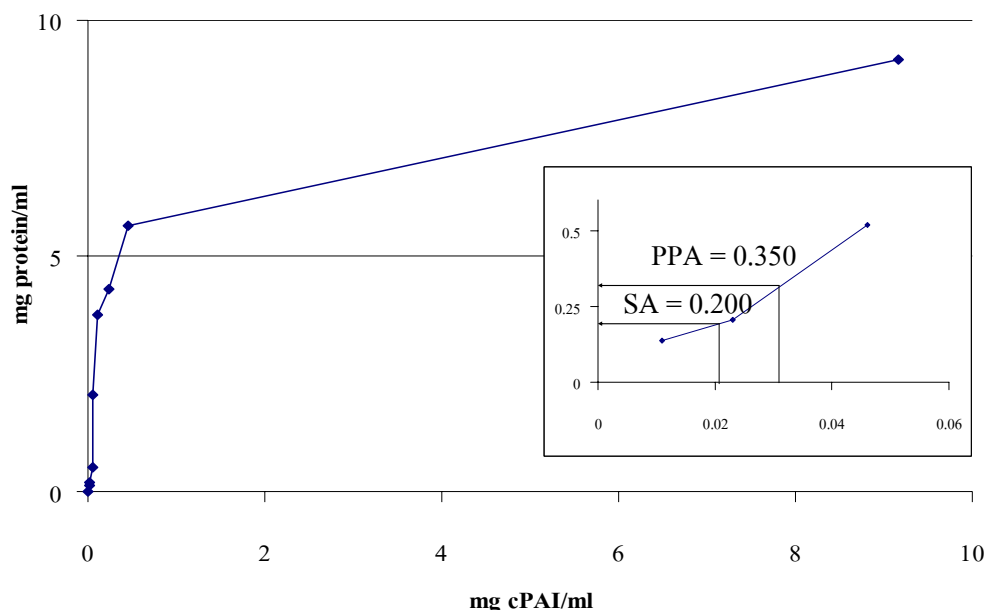
ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนในสารละลาย cPAI ใน 1 มล.สารตัวอย่าง

Endogeneous reducing sugar of the extract	3.23 ± 0.05 mg maltose/ml
Endogeneous amylase activity	4.70 ± 0.10 mg maltose/ml
^c mg protein/ml of cPAI extract	9.17 ± 0.44 mg protein/ml



ภาพที่ 16 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cPAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย ข. อะไมเลสจากตับอ่อน



ภาพที่ 17 มก. โปรตีน/มล.ของสารละลาย cPAI ที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย (ตารางที่ 8 และภาพที่ 18) ของสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนเป็นแบบผสม (mixed inhibition) เมื่อพิจารณา K_m มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ค่า V_{max} ลดลง แต่เส้นตรงจะตัดกันตรงจุดที่อยู่ทางซ้ายมือของแกน $1/v$ ค่า K_m

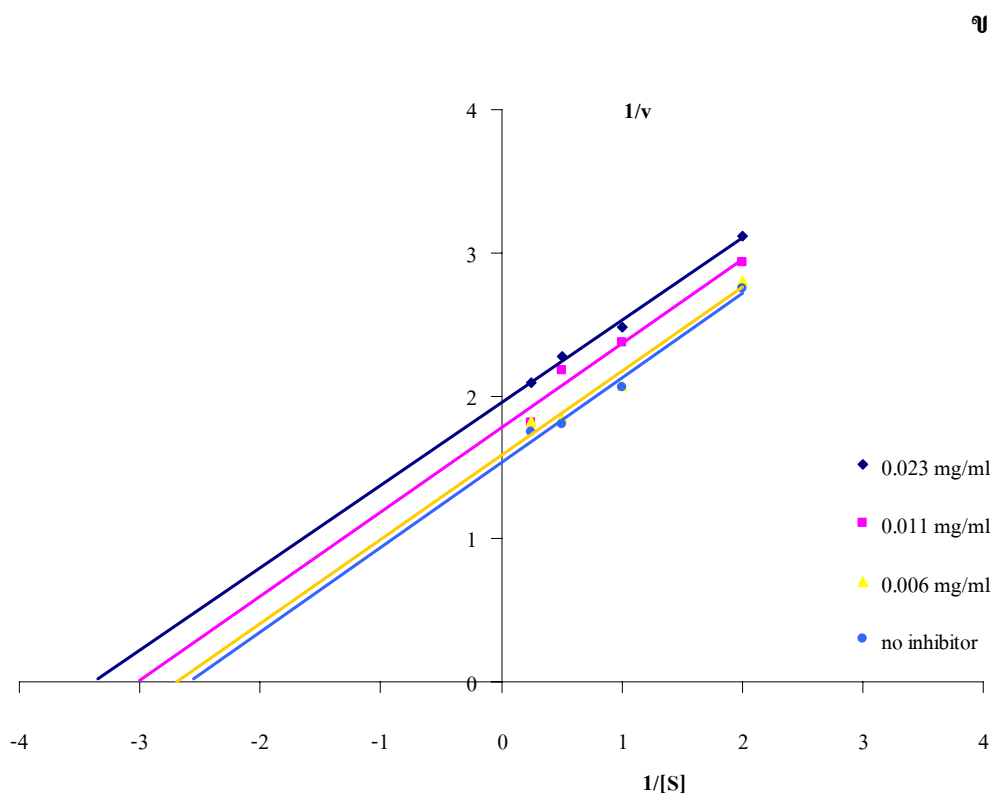
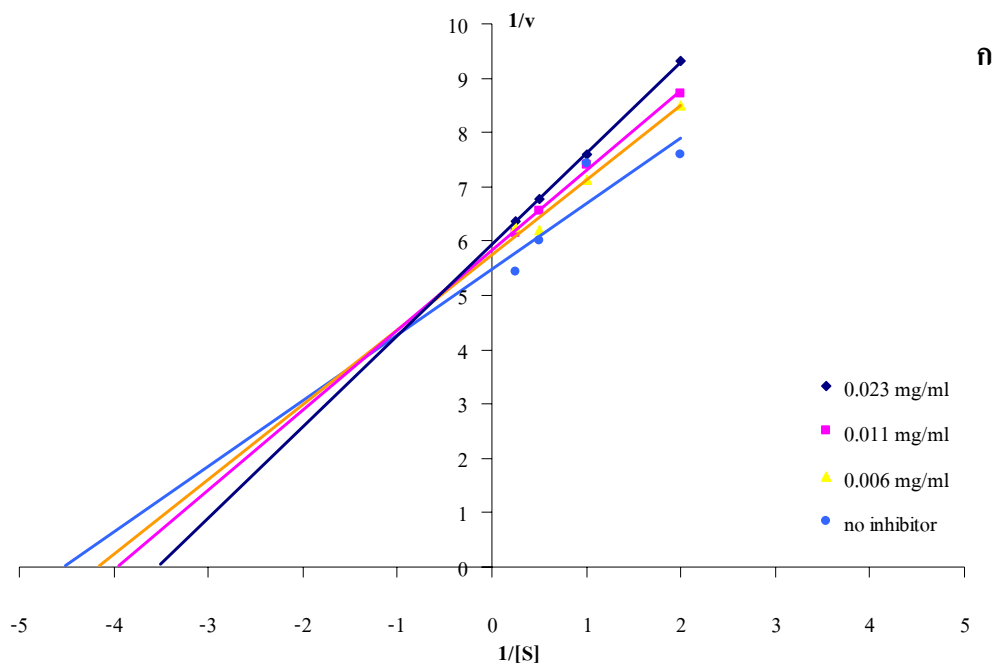
จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อน K_m และ V_{max} มีค่าลดลง เป็นรูปแบบการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) โดยตัวยับยั้งจะเข้าจับกับสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรต (ES) เท่านั้น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรต-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้วไม่เปลี่ยนแปลงต่อไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ การมีสับสเตรตมากๆ ก็ไม่ได้เป็นการลดผลของการยับยั้งแบบนี้

ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนจากสารสกัดถั่วแดง สอดคล้องกับจากรายงานที่ผ่านมา พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนที่สกัดจากพืชตระกูลถั่ว (kidney bean) มีรูปแบบการยับยั้งแบบผสม (mixed noncompetitive) (Le Berre-Anton, 1997) สารยับยั้งจากถั่วขาว (*P. vulgaris* var. Great Northern) มีจลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) (Marshall และ Lauda, 1975) เช่นเดียวกับสารยับยั้งจากเมล็ดถั่วเขียว (Tripathi, 2007)

ตารางที่ 8 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารละลาย cPAI

Concentration of inhibitor (cPAI)	Salivary amylase*		Pancreatic amylase*	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
No inhibitor	0.221	0.182	0.385	0.667
0.06 mg/ml (25% Inhibition)	0.253	0.174	0.370	0.629
0.011 mg/ml (50% Inhibition)	0.269	0.172	0.333	0.562
0.023 mg/ml (75% Inhibition)	0.220	0.168	0.294	0.513

* ค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ 18 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารละลาย cPAI ที่มีต่อ

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย

ข. อะไมเลสจากตับอ่อน

4.3 สารละลาย PAI

สารละลาย PAI ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีความเข้มข้น 1.18 ม.ก. โปรตีน/ม.ล.ของสารละลาย PAI มีกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 98.98 ± 0.35 และที่ 0.36 ม.ก. โปรตีน/ม.ล.ของสารละลาย PAI ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 สารละลาย PAI มีกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อนร้อยละ 98.26 ± 0.23 และที่ 0.16 ม.ก. โปรตีน/ม.ล.ของสารละลาย PAI ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 โดยสรุปสารละลาย PAI ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนได้ดีกว่าน้ำลายเนื่องจากใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (ตารางที่ 9 และ 10)

ตารางที่ 9 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารละลาย PAI ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

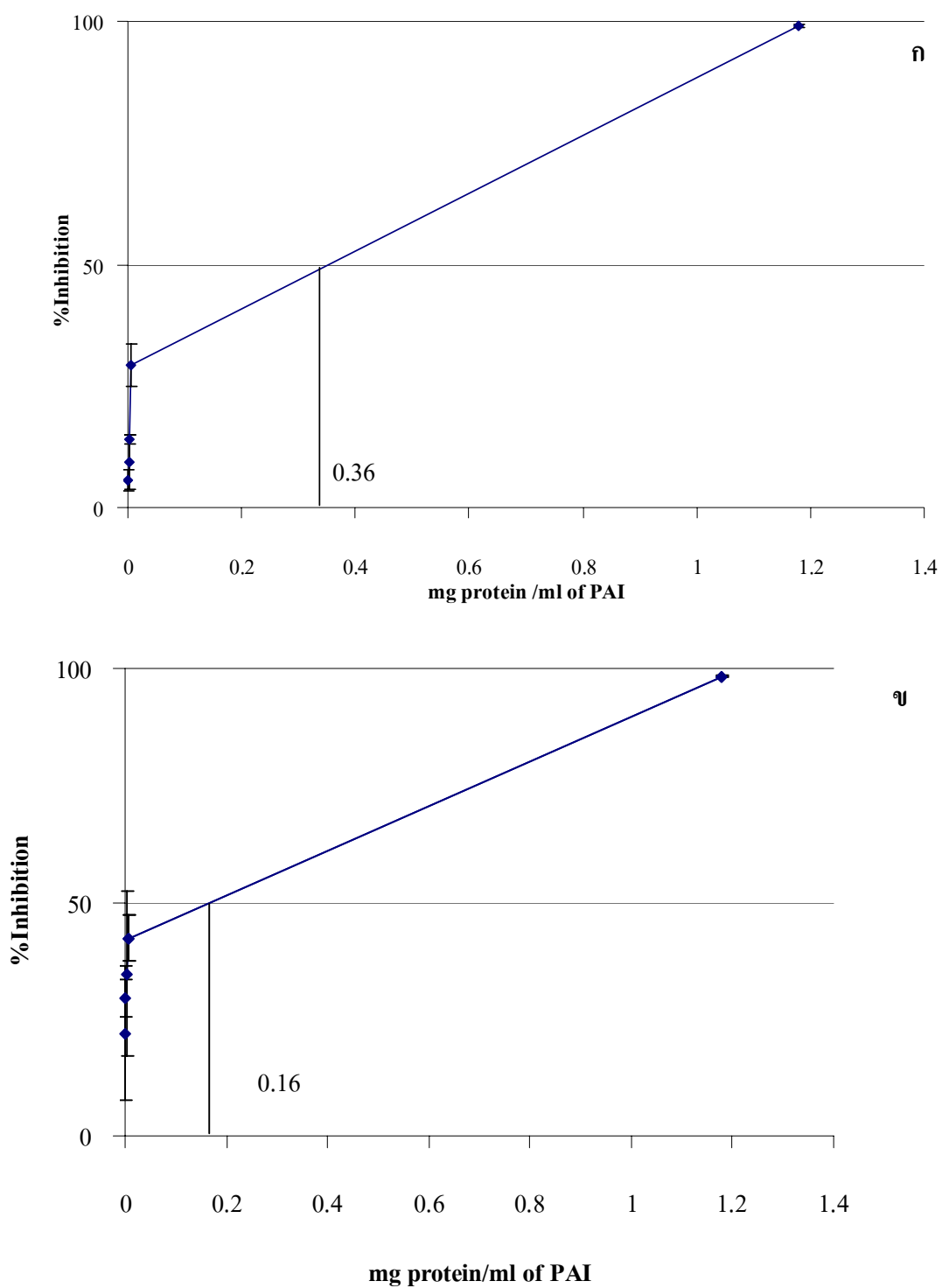
	Salivary amylase	Pancreatic amylase
%Inhibition of PAI amylase activity by PAI	$98.98 \pm 0.35^*$	$98.26 \pm 0.23^*$
^a mg protein/ml of PAI for 50% inhibition	0.36	0.16

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b หาค่าได้จากกราฟ IC_{50} ในภาพที่ 19

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งและปริมาณโปรตีนในสารละลาย PAI ใน 1 มล.สารตัวอย่าง

Endogeneous reducing sugar of the extract	0.39 ± 0.0 mg maltose/ml
Endogeneous amylase activity	0.52 ± 0.0 mg maltose/ml
^b mg protein/ml of PAI extract	0.64 ± 0.01 mg protein/ml



ภาพที่ 19 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย PAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย

ข. อะไมเลสจากตับอ่อน

4.4 สารละลาย cNAI

สารละลาย cNAI ที่ได้จากสารสกัดหัวแดงหลวงด้วยเมทานอลมีค่ากิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายสูงสุดร้อยละ 104.53 ± 25.9 ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) คือ 14.7 มก.สารละลาย cNAI /มล. ค่ากิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนสูงสุดร้อยละ 30.45 ± 3.83 จากผลการทดลองพบว่า สารละลาย cNAI สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายได้ดีกว่าเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อน (ตารางที่ 11 และ 12)

ตารางที่ 11 ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารละลาย cNAI

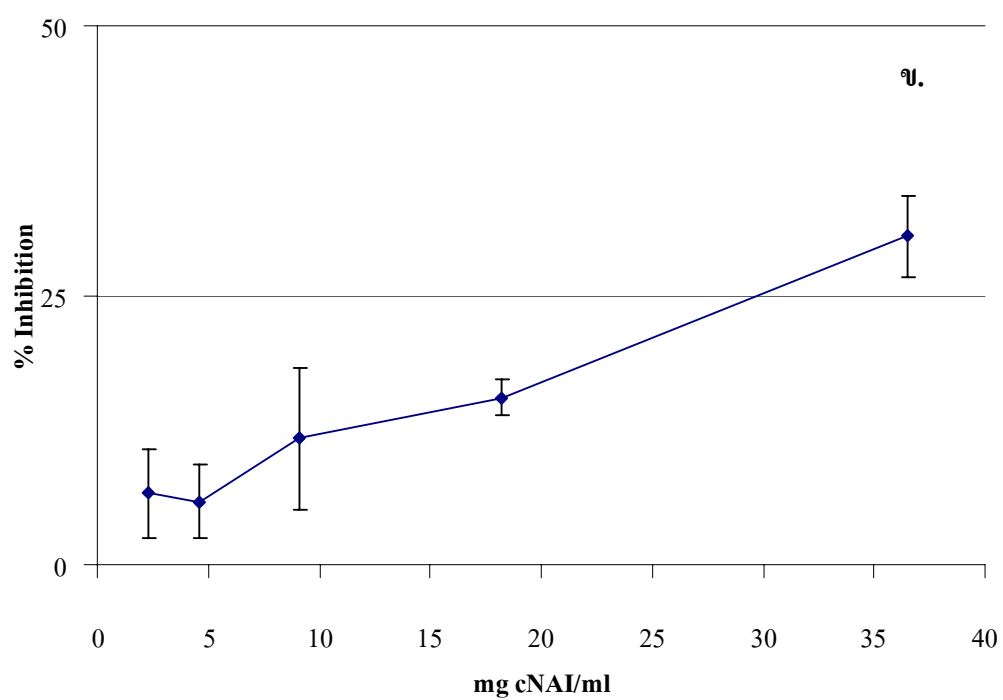
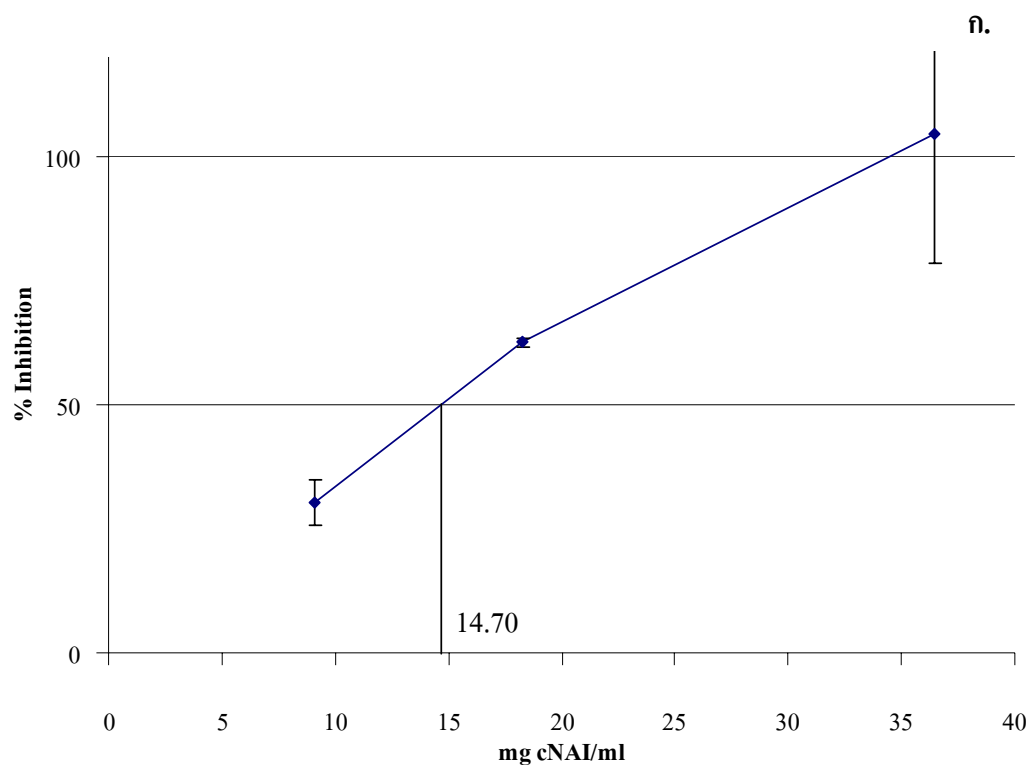
	Salivary amylase	Pancreatic amylase
%Inhibition of amylase activity by extract	$104.53 \pm 25.91^*$	$30.54 \pm 3.83^*$
^a mg/ml of cNAI for 50% inhibition	14.7	-
^b mg protein/ml of cNAI extract for 50% inhibition	0.50	-

*แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c หาค่าได้จากกราฟ IC_{50} ในลำดับภาพที่ 21 และ 22

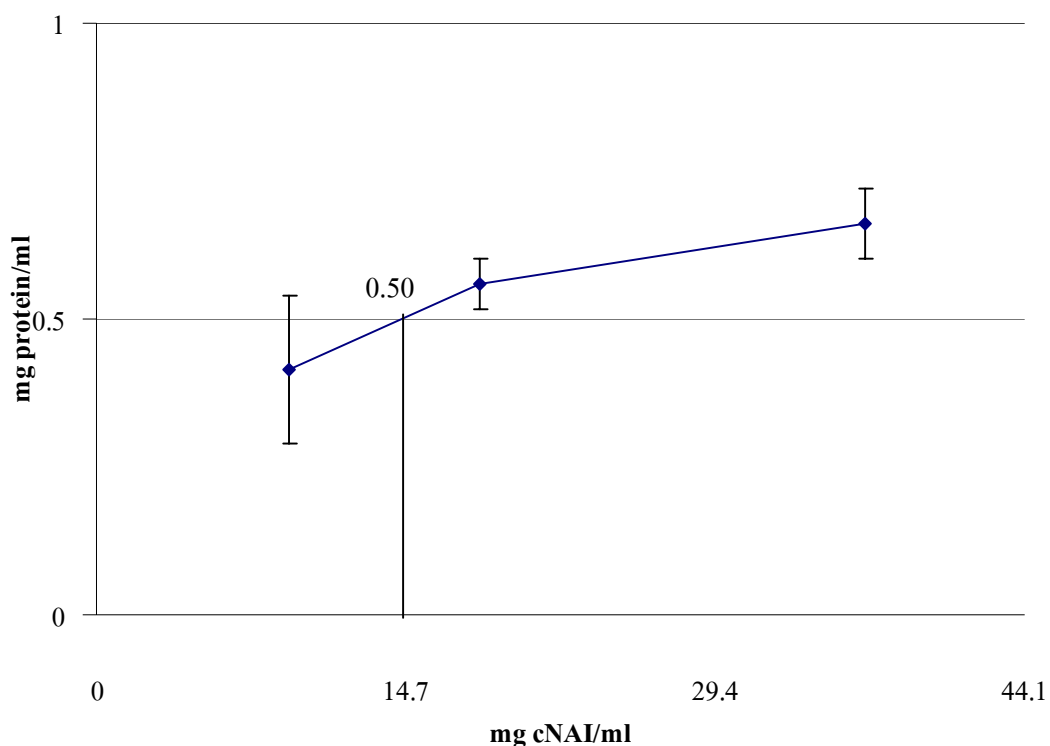
ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณ โปรตีนในสารละลาย cNAI ใน 1 มล.สารตัวอย่าง

Endogeneous reducing sugar of the extract	8.25 ± 0.05 mg maltose/ml
Endogeneous amylase activity	7.13 ± 0.07 mg maltose/ml
^c mg protein/ml of cNAI extract	4.36 ± 0.002 mg protein/ml



ภาพที่ 20 ร้อยละกิจกรรมยับยั้งอะไมเลสของสารละลาย cNAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

ก. อะไมเลสจากน้ำลาย ข. อะไมเลสจากตับอ่อน



ภาพที่ 21 มก.โปรตีน/มล.ของสารละลาย cNAI ที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย (ตารางที่ 13 และภาพที่ 22) ของสารละลาย cNAI พบว่ามีรูปแบบการยับยั้งเป็นแบบผสม (mixed inhibition) เมื่อพิจารณา K_m มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ค่า V_{max} ลดลง แต่เส้นตรงจะตัดกันตรงจุดที่อยู่ทางซ้ายมือของแกน $1/v$ ค่า K_m

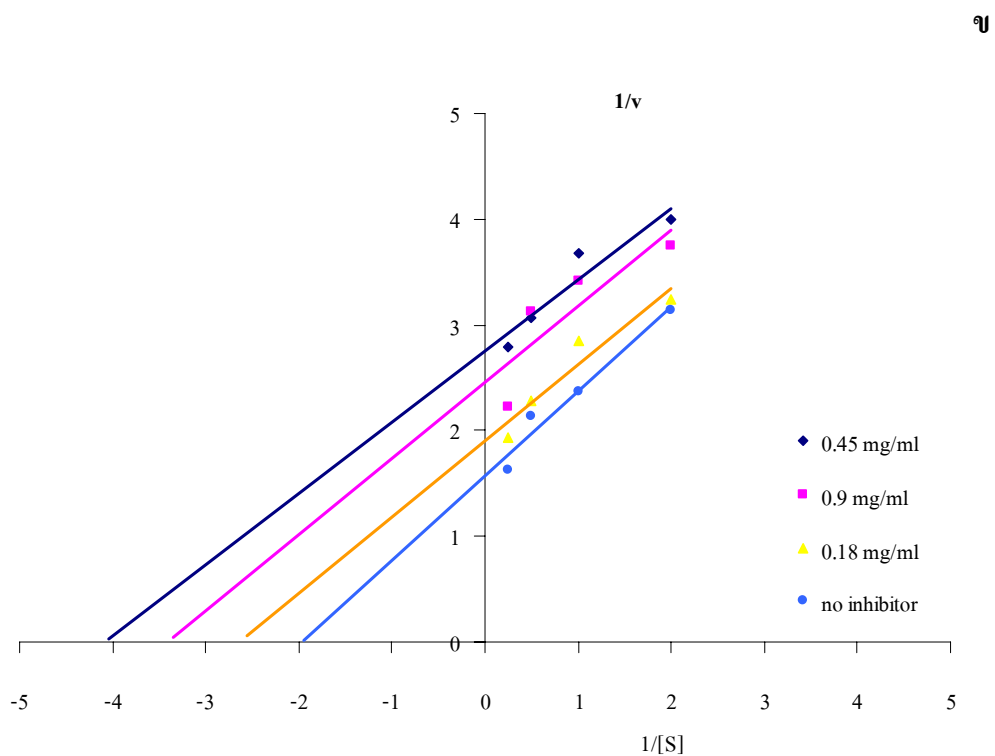
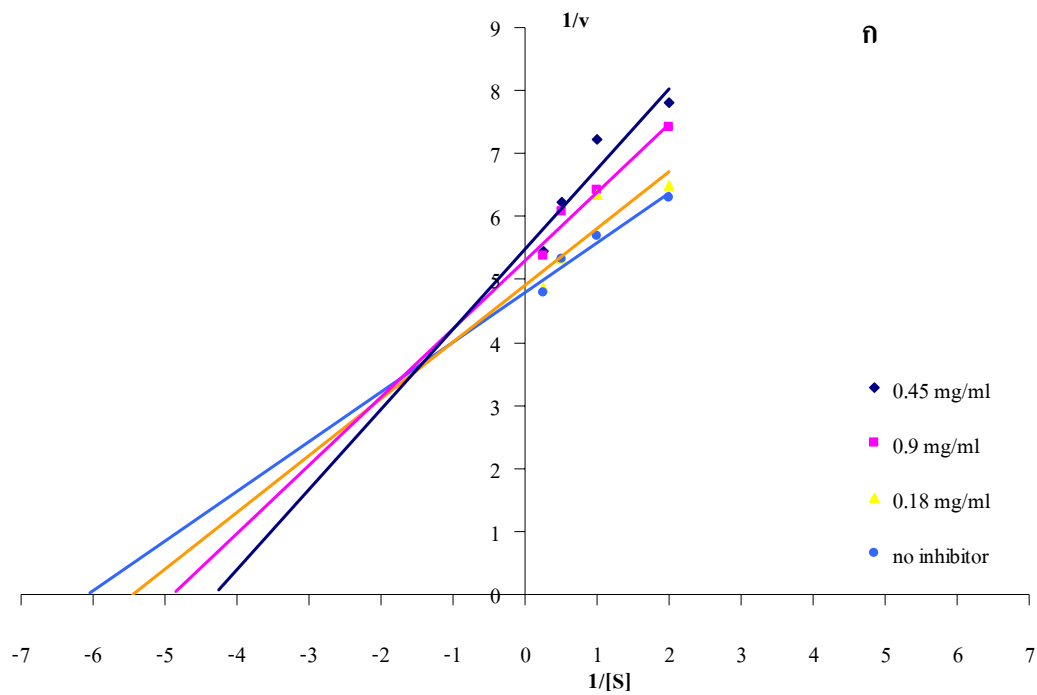
จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนมีค่า K_m และ V_{max} ลดลงแสดงว่าเป็นรูปแบบการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor)

จลนศาสตร์ของอะไมเลสจากน้ำลายให้ผลสอดคล้องกับ อะคาร์โบส acarviosin-glucose และ อนุพันธ์ของอะคาร์โบส ที่มีรูปแบบการยับยั้งแบบผสม (mixed noncompetitive) ต่อเอนไซม์อะไมเลส ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และแหล่งที่มา (Kim et al., 1999)

ตารางที่ 13 ค่า K_m และ V_{max} ของจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของสารละลาย cNAI

Concentration of inhibitor (cNAI)	Salivary amylase*		Pancreatic amylase*	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
No inhibitor	0.164	0.208	0.500	0.637
0.45 mg/ml (25%Inhibition)	0.183	0.204	0.382	0.526
0.9 mg/ml (50%Inhibition)	0.204	0.189	0.294	0.412
1.8 mg/ml (75%Inhibition)	0.233	0.182	0.244	0.365

* ค่าที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 22 Lineweaver-Burk plot การยับยั้งของสารละลาย cNAI ที่มีต่อ
 ก. อะไมเลสจากน้ำลาย ข. อะไมเลสจากตับอ่อน

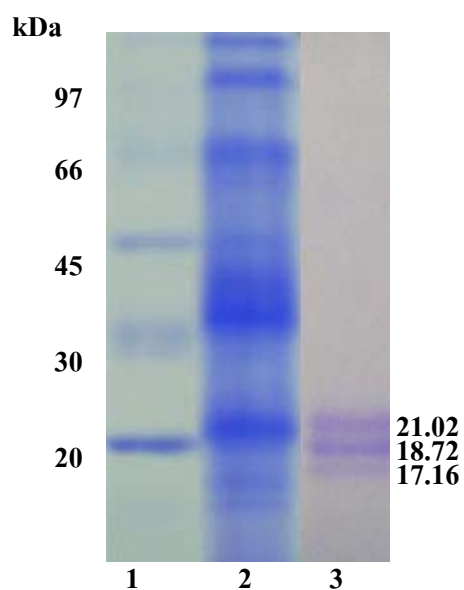
5. การศึกษาลักษณะโครงสร้างสารละลาย PAI

5.1 การหาขนาดน้ำหนักโมเลกุล

ตัวอย่างสารละลาย PAI เมื่อผ่านแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิมแล้ว นำมาหาขนาดโมเลกุลด้วยวิธีเจลฟิวเรชันเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่ามีขนาดโมเลกุล 47.7 กิโลดาลตัน (ฤทัยวรรณ บุญครองชีพ, 2007)

การหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย (sub-units) และพันธะ S-S ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพแบบไม่มีและ มี β -mercaptoethanol เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าสารละลาย PAI มีแถบโปรตีน 3 แถบที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล ดังนี้ แถบบน 21.02 แถบกลาง 18.72 และแถบล่าง 17.16 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทั้งแบบไม่มีและ มี β -mercaptoethanol (ภาพที่ 23) แสดงว่าทั้ง 3 หน่วยย่อยไม่ได้จับกันด้วยพันธะ S-S

สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่ามีความหลากหลายขนาดแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เช่น สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลีมีขนาดโมเลกุล 14,000 ดาลตัน (Feng, 1995) จากข้าวไรย์ 13,756 ดาลตัน (Iulek, 2000) ส่วนในพืชตระกูลถั่ว นั้น มีขนาดโมเลกุล 54,847 ดาลตัน จากเมล็ดถั่วขาว (Gibbs และ Ali, 1998) 46 กิโลดาลตัน จากเมล็ดถั่วเขียว (Tripathi et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบหน่วยย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ด Palo Feirro ที่ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาด 15.8 และ 17.4 กิโลดาลตัน (Le Berre-Anton, 1997)



ภาพที่ 23 ผลการหาความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของโปรตีนในสารละลาย cPAI และ PAI ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพที่มี β -mercaptoethanol (12% gel, SDS-PAGE) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน แถบ (1) คือแถบโปรตีนมาตรฐาน: Phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa) และ α -lactalbumin (14 kDa) (2) สารละลาย cPAI และ (3) สารละลาย PAI

5.2 การหาลำดับกรดอะมิโน

ตัดแถบโปรตีนจากการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cPAI ด้วย SDS-PAGE แบบมี β -mercaptoethano หลังจากย้อม Coomassie brilliant blue-R ทั้ง 3 แถบไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Ultimate 3000 LC system (Dionex) coupled to ESI-Ion Trap MS (HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik) ได้ข้อมูลเป็นลำดับกรดอะมิโนสายสั้นๆ (fragments) ของสายโปรตีนทั้งหมด นำแต่ละ fragment ของกรดอะมิโนจากแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบเปรียบเทียบ (Blast) ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม MASCOT ms/ms ions search (MATRIX SCIENCE) พบว่าข้อมูลของโปรตีนทั้ง 3 แถบตรงกับ gi|126150 ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส (α -amylase inhibitor) ที่พบในพืชตระกูลถั่ว *Phaseolus vulgaris* เมื่อจัดลำดับการเรียงลำดับกรดอะมิโนเทียบกันได้ผลดังภาพที่ 24 โดยมีร้อยละความเหมือน (%identity) ของลำดับกรดอะมิโนดังนี้ แถบ A 35 แถบ B 34 และ แถบ C 33 (ตารางที่ 14) สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีนมีการรายงานศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าพบในธัญพืชต่างๆ ข้าวสาลี ข้าวโพด พืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะถั่วขาว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในถั่วแดงสายพันธุ์ที่ปลูกและบริโภคในไทย และผลการศึกษา แสดงว่าโปรตีน PAI มีความสัมพันธ์กับสารยับยั้งอะไมเลสที่พบในพืชตระกูลถั่ว *Phaseolus vulgaris*

ตารางที่ 14 %Identity ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 3 แถบจากสารละลาย PAI กับสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตระกูล *Phaseolus vulgaris*

Band of protein on SDS-PAGE	% Identity of amino acid sequence compare to α -amylase inhibitor gi 126150
A	35
B	34
C	33

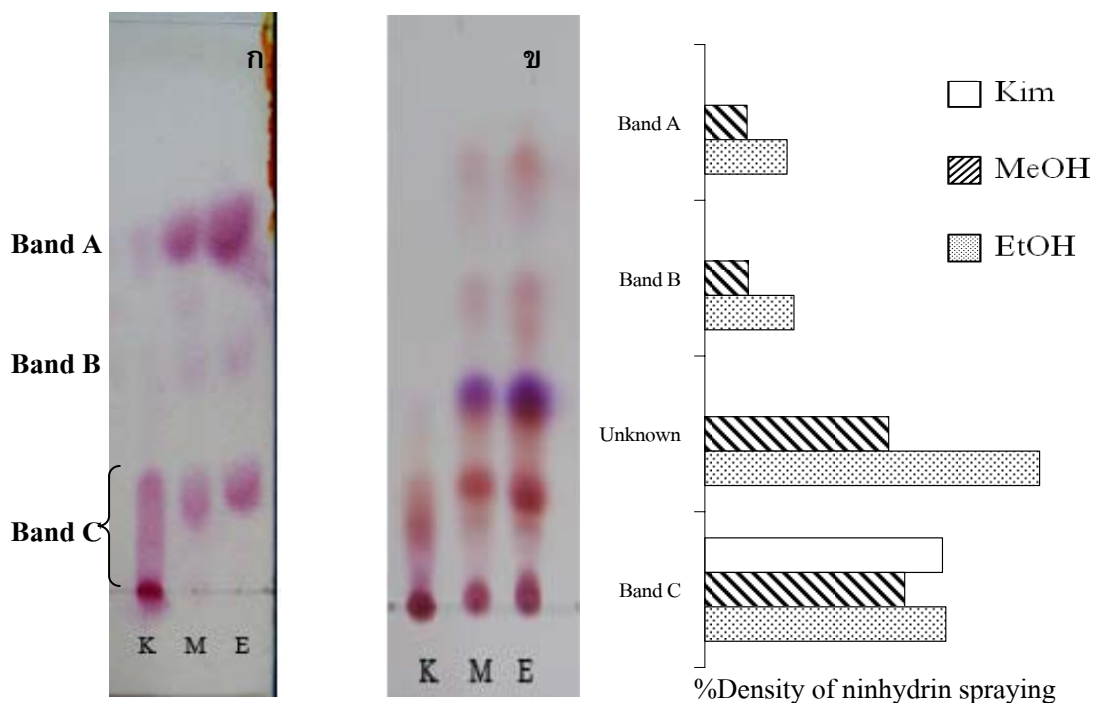
Band A		1	50
α-AI		MIMASSKLLSIALFLALLSHANSATETSFIIDAFNKTNLILQGDATVSSN	
Band A		LLVASLVYPSLK---VLSAAGSALLR-----QFLLLQK-----	
		51	100
α-AI		GNLQLSYNSYDSMSRAFYSAPIQIRDSTTGNVASEDTNFTMNIRTHRQAN	
Band A		GHLGLDVNSLTK---AFYSAPIQ-----TNDLSEASNYR-----	
		101	150
α-AI		SAVGLDFVLVPVQPEESKGDVTVEFDTFLSRISIDVNNNDIKSVPWVDVHD	
Band A		-HLGLDFVLHTLLE-----EAGAFLLGQAGK-----DVHD	
		151	200
α-AI		YDQNAEVRITVNSSTKVFVSVLSNPSTGKSNNVSTTVELEKEVYDWSV	
Band A		YDQNAEVRGLSSSEK--SVLSNPSTGK--LVSEVDLK-----	
		201	246
α-AI		GFSATSGAYQWSYETHDVLWSWFSKFINLKDQKSERSNIVLNKIL	
Band A		GHLGLDGGVAVR--TNDVLWSWFSK-----SLCGLNK--	
Band B		1	50
α-AI		MIMASSKLLSIALFLALLSHANSATETSFIIDAFNKTNLILQGDATVSSN	
Band B		LLVASLVYPSLK-----EENLLLVGKSLVSSN	
		51	100
α-AI		GNLQLSYNSYDSMSRAFYSAPIQIRDSTTGNVASEDTNFTMNIRTHRQAN	
Band B		NSLR-----YSAPIQIR-----	
		101	150
α-AI		SAVGLDFVLVPVQPEESKGDVTVEFDTFLSRISIDVNNNDIKSVPWVDVHD	
Band B		SSVGLQR--VPVQVWR--DTVGVTWDTR--HLGLDVNAER-----DVHD	
		151	200
α-AI		YDQNAEVRITVNSSTKVFVSVLSNPSTGKSNNVSTTVELEKEVYDWSV	
Band B		YDANNAEVR-----VFSVLSN-----NNQQPTVGQER-----	
		201	246
α-AI		GFSATSGAYQWSYETHDVLWSWFSKFINLKDQKSERSNIVLNKIL	
Band B		GFTATTG-----NDVLWSWFSKFLNLR---GATLNLVLGK--	
Band C		1	50
α-AI		MIMASSKLLSIALFLALLSHANSATETSFIIDAFNKTNLILQGDATVSSN	
Band C		-----LALLLQRMQHEPVAEAEFFK--GELLNSLFLKDNRSS	
		51	100
α-AI		GNLQLSYNSYDSMSRAFYSAPIQIRDSTTGNVASEDTNFTMNIRTHRQAN	
Band C		GLR-LMDSYDLK--AFYSAPI-----EFDTNQG-----	
		101	150
α-AI		SAVGLDFVLVPVQPEESKGDVTVEFDTFLSRISIDVNNNDIKSVPWVDVHD	
Band C		---DLTYVLQVVSPEQKLLDYNVEAEQFL--LSLDVNNNDLK-----VHD	
		151	200
α-AI		YDQNAEVRITVNSSTKVFVSVLSNPSTGKSNNVSTTVELEKEVYDWSV	
Band C		YDANANNR-----SGVSLSGGPSTGK-----LVELTAR-----	
		201	246
α-AI		GFSATSGAYQWSYETHDVLWSWFSKFINLKDQKSERSNIVLNKIL	
Band C		GYLHTKGAYVHALR---VLSLNPSAQFVSHR-----GLVLSR--	

ภาพที่ 24 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 3 แถบจากสารละลาย PAI เปรียบเทียบกับสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตระกูล *Phaseolus vulgaris*: gi|126150

6. การศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารละลาย NAI

6.1 ตรวจสอบหมู่เอมีโนของสารประกอบ cNAI ที่แยกบน TLC

เนื่องจากการหาค่าปริมาณโปรตีนของสารสกัด cNAI ด้วยวิธี Kim et al. (2002) วิธีเมทานอล และวิธีเอทานอล พบว่ามีปริมาณโปรตีน (Lowry's method) ในสารสกัด cNAI ร่วมกับค่ามิลลิกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS test) จึงทำการสเปรย์แผ่น TLC การแยกบริสุทธิ์ cNAI ด้วยสารละลายนินไฮดริน ได้ผลดังภาพที่ 25



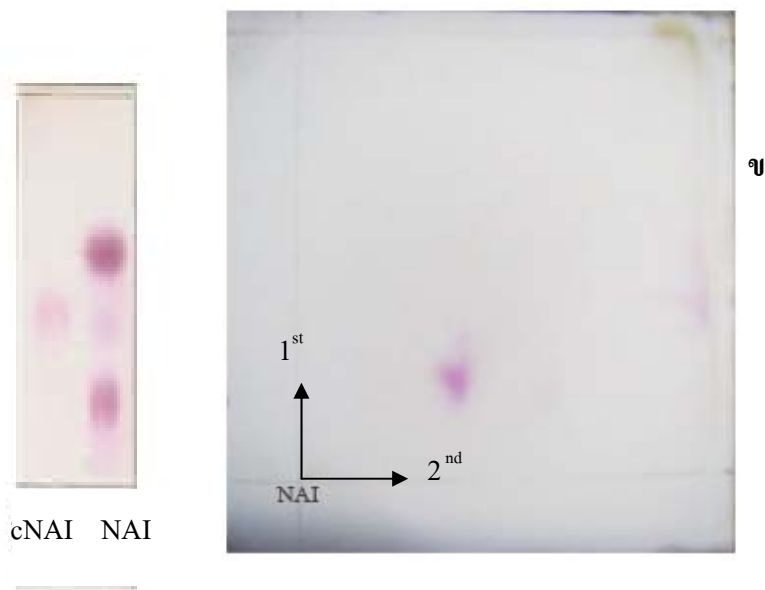
ภาพที่ 25 ผลการแยกบริสุทธิ์สารละลาย cNAI จากการสกัด 3 วิธีด้วย TLC (ก) สเปรย์ด้วยสารละลายตรวจสอบน้ำตาล 0.3% (w) *N*-(1-naphthyl-ethylenediamine), 5% (v) H_2SO_4 ในเมทานอล (ข) สเปรย์ด้วยนินไฮดริน

K คือ วิธี Kim M คือ วิธีเมทานอล E คือ วิธีเอทานอล

6.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแถบ NAI (แถบ B) ที่ขูดจากแผ่น TLC

ก่อนนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาโครงสร้างได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ NAI จาก TLC โดย

6.2.1 การทดสอบด้วย TLC พบว่าได้แถบเดียวทั้ง 1 และ 2 dimension ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย NAI จาก TLC

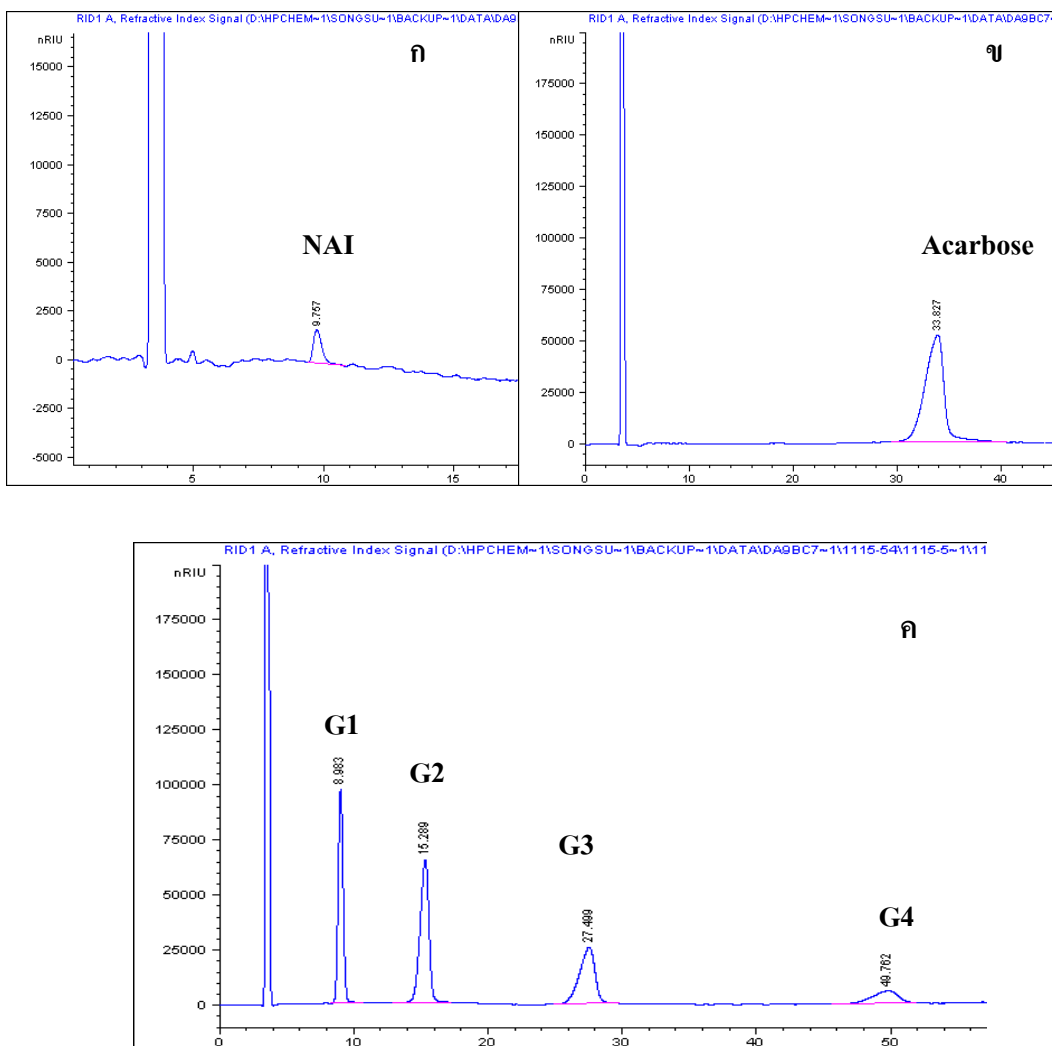
ก. 1 dimension

ข. 2 dimension

ตัวทำละลายเคลื่อนที่ 1st dimension คือ ethylacetate: isopropanol: water (1:3:1 v/v/v)

ตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2nd dimension คือ dichloromethane: methanol: water (4:0.3:0.1 v/v/v)

6.2.2 การทดสอบด้วย HPLC คอลัมน์ APS-2 HYPERSIL 4.6×250 มม. ที่อัตรา
การไหล 1 มล./นาที ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ Acetonitrile:Water 75:25 (v/v) เปรียบเทียบกับ
น้ำตาลมาตรฐาน G1-4 และอะคาร์โบส ผลการทดลองพบสารเพียงแถบเดียวของสารละลาย NAI ที่
เวลาชะ 9.757 นาที โดยไม่พบสารอื่นๆ เจือปน ดังภาพที่ 27



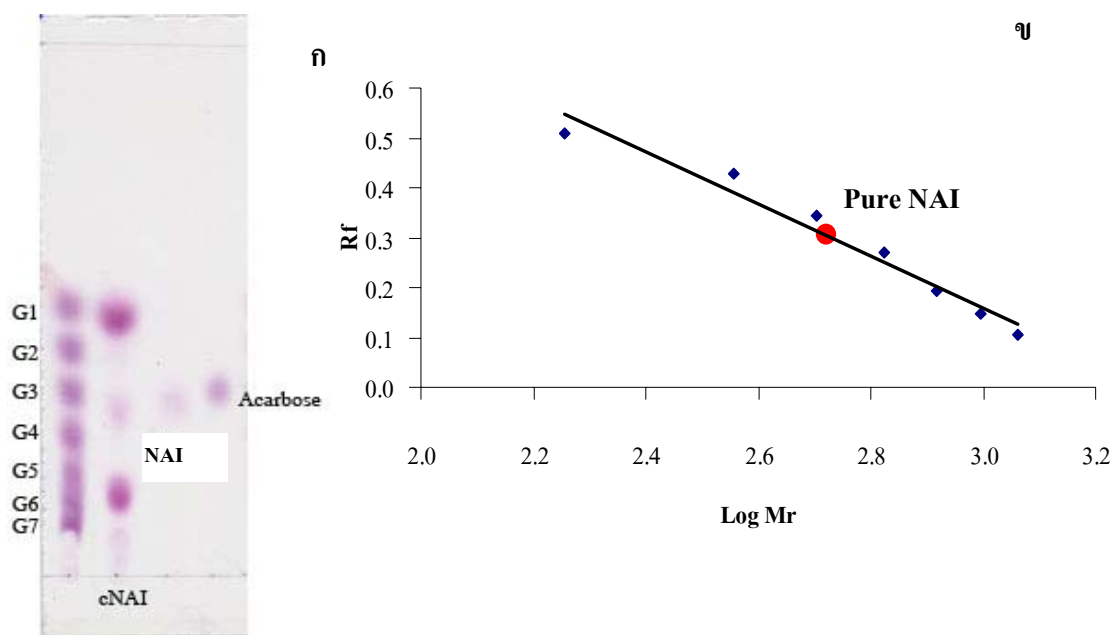
ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมของสารละลาย NAI ด้วย HPLC

ก. สารละลาย NAI ข. อะคาร์โบส ค. น้ำตาลมาตรฐาน G1-4

6.3 การหาขนาดโมเลกุล

6.3.1 โดย TLC

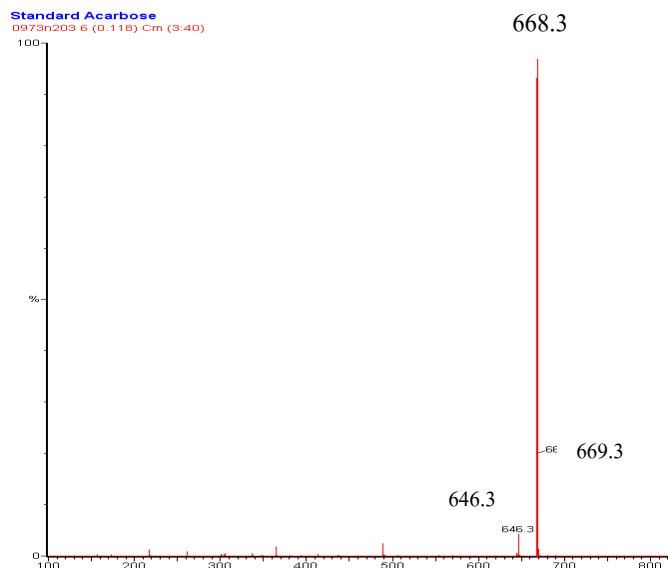
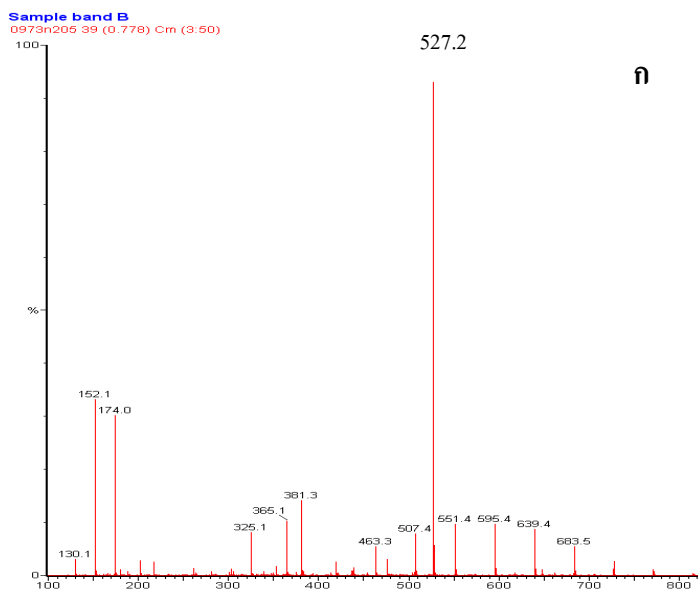
ผลการจำแนก cNAI ที่สกัดด้วยวิธีเมทานอล ด้วย TLC พบว่า NAI มีคุณสมบัติในการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 4.39 ที่กล่าวข้างต้น และมีค่า R_f บน TLC ในระบบที่ใช้อยู่ที่ 0.304 ซม. ซึ่งอยู่ระหว่าง R_f ของ G3 (0.345 ซม.) G4 (0.269 ซม.) และอะคาร์โบส (0.351 ซม.) (ภาพที่ 28 ก) เมื่อนำค่าน้ำหนักโมเลกุล (MW) และค่า R_f เขียนกราฟ (ภาพที่ 28 ข) พบว่ามวลโมเลกุลของแถบ NAI จากการ spot ด้วย cNAI มีขนาดประมาณ 475.3 ดาลตัน ส่วน NAI จากการ spot ด้วย NAI ที่บริสุทธิ์แล้วมีขนาดประมาณ 527.2 ดาลตัน และอะคาร์โบสประมาณ 429.5 ดาลตัน



ภาพที่ 28 มวลโมเลกุลของสารละลาย NAI ที่สกัดด้วยวิธีเมทานอล (ก) การแยกบน TLC (ข) กราฟ R_f กับ $\log Mr$ ของ Glucose: 180, maltose: 360.3, maltotriose: 504.44, maltotetraose: 666.6, maltopentaose: 828.73, maltohexaose: 990.9 และ maltoheptaose: 1153 กิโลดาลตัน

6.3.2 โดย LC-MS

การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลาย NAI (ที่บริสุทธิ์จาก TLC) ด้วยเครื่อง LC-mass spectrometry พบว่า NAI มีมวลโมเลกุล 527.2 [g/mol] อะคาร์โบสมีมวลโมเลกุล 645.3 [g/mol] ดังภาพที่ 29



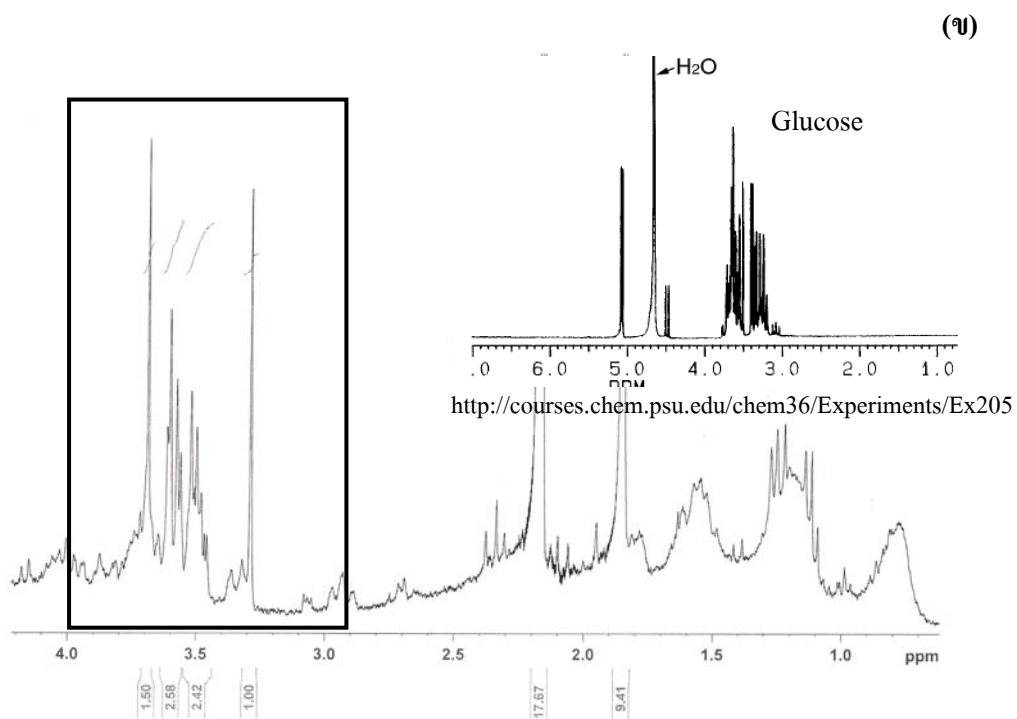
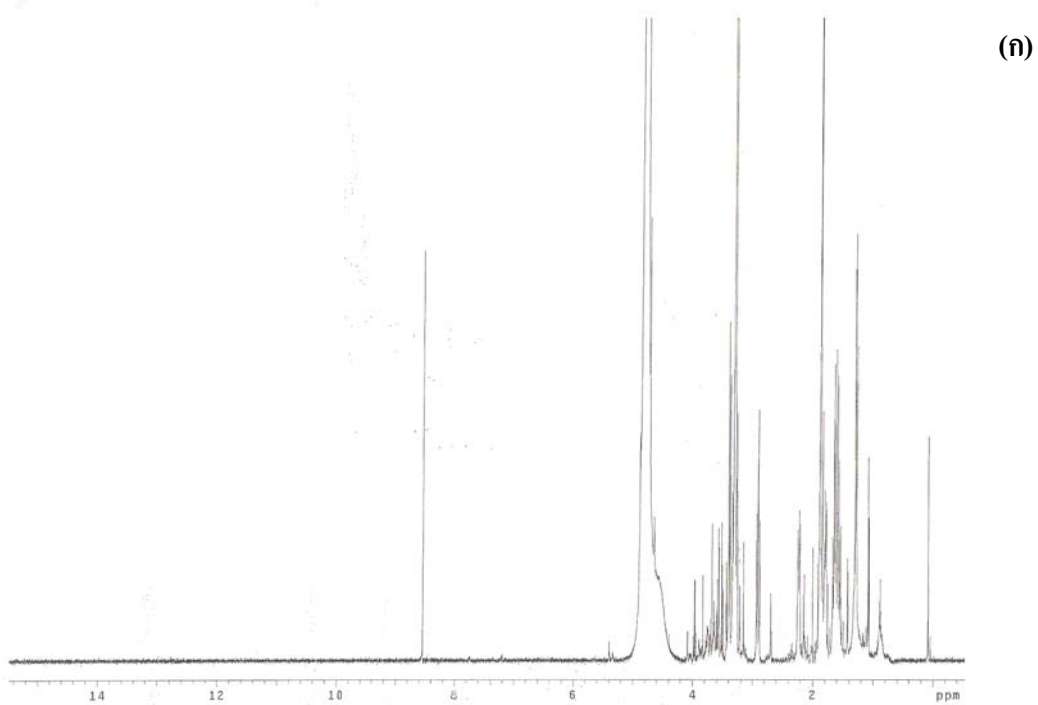
ภาพที่ 29 แมสสเปกตรัมของ (ก) สารละลาย NAI และ (ข) อะคาร์โบส

6.4 การหาโครงสร้างด้วย NMR

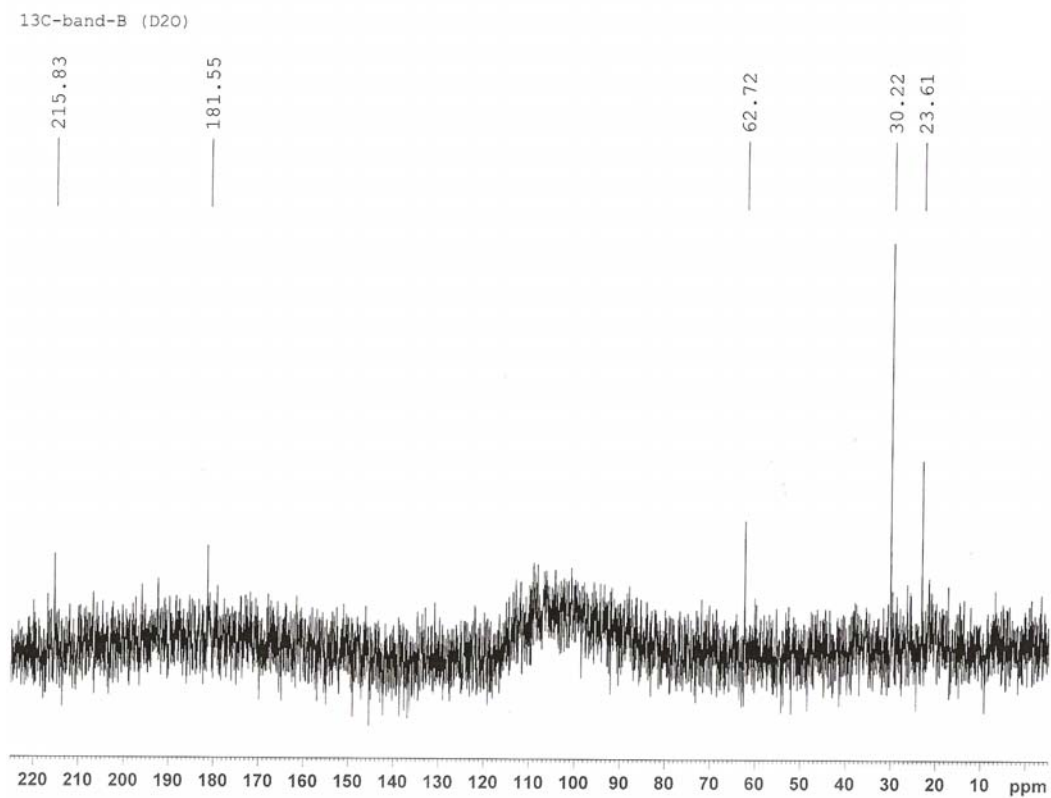
ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารละลาย NAI จากการแยกบริสุทธิ์ด้วย TLC โดย $^1\text{H-NMR}$ (ภาพที่ 30) พบว่ามีสัญญาณของโปรตอนของสารละลาย NAI ที่ตำแหน่งค่า ^1H ที่ตำแหน่ง 8.542 ppm (ในช่วง δ ของ RCOH , HCON , HCOR หรือ HCOO), 3.5 ppm (ในช่วง δ ของ $\text{CH}_2\text{C=O}$, OH , NH , CH_2O หรือ CH_2NO_2) คาดว่าน่าจะเป็นมอนอแซคคาไรด์เช่น กลูโคส (ภาพที่ 30 ข)

ผลการวิเคราะห์ด้วย ^{13}C (ภาพที่ 31) ที่ตำแหน่ง 215.83 ppm (ในช่วง δ ของ RCOR), 181.55 ppm (ในช่วง δ ของ RCHO หรือ RCOOH), 62.72 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHX หรือ R_3CN), 30.22 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHR หรือ R_2CHX) และ 23.61 (ในช่วง δ ของ RCH_2R)

จากผลการวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วย TLC LC-MS และ NMR พบว่าสาร NAI มีขนาดโมเลกุลประมาณ 527 ดาลตัน ระหว่างน้ำตาล maltotriose และ maltotetraose และมีค่า R_f ใกล้เคียงกับอะคาร์โบสบน TLC การตรวจสอบ NAI ด้วยนินไฮดรินบนแผ่น TLC ไม่ปรากฏแถบสีน้ำเงินหรือม่วงแสดงว่าไม่มีหมู่ amine ในโครงสร้าง แต่มี N ในโครงสร้าง จากข้อมูลมวลที่เป็นเลขคี่ของ LC-MS คล้ายกับอะคาร์โบสที่มี N ในโครงสร้างและมวลเป็นเลขคี่ (645 ดาลตัน) หรืออาจเป็นสารชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีหมู่อะมิโนอยู่ในโครงสร้าง เช่น สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนเป็นแซคคาไรด์ อะคาร์วีโอซินที่มีโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสเกาะอยู่ในโครงสร้าง (Kim et al., 2002) อนุพันธ์ของอะมิโนโอลิโกแซคคาไรด์ (aminooligosaccharide) เช่น อะคาร์โบส (Schmidt, 1977) อะไมโลสตาติน (Fukuhara, 1982) โอลิโกสตาติน (Omoto, 1981)



ภาพที่ 30 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารละลาย NAI



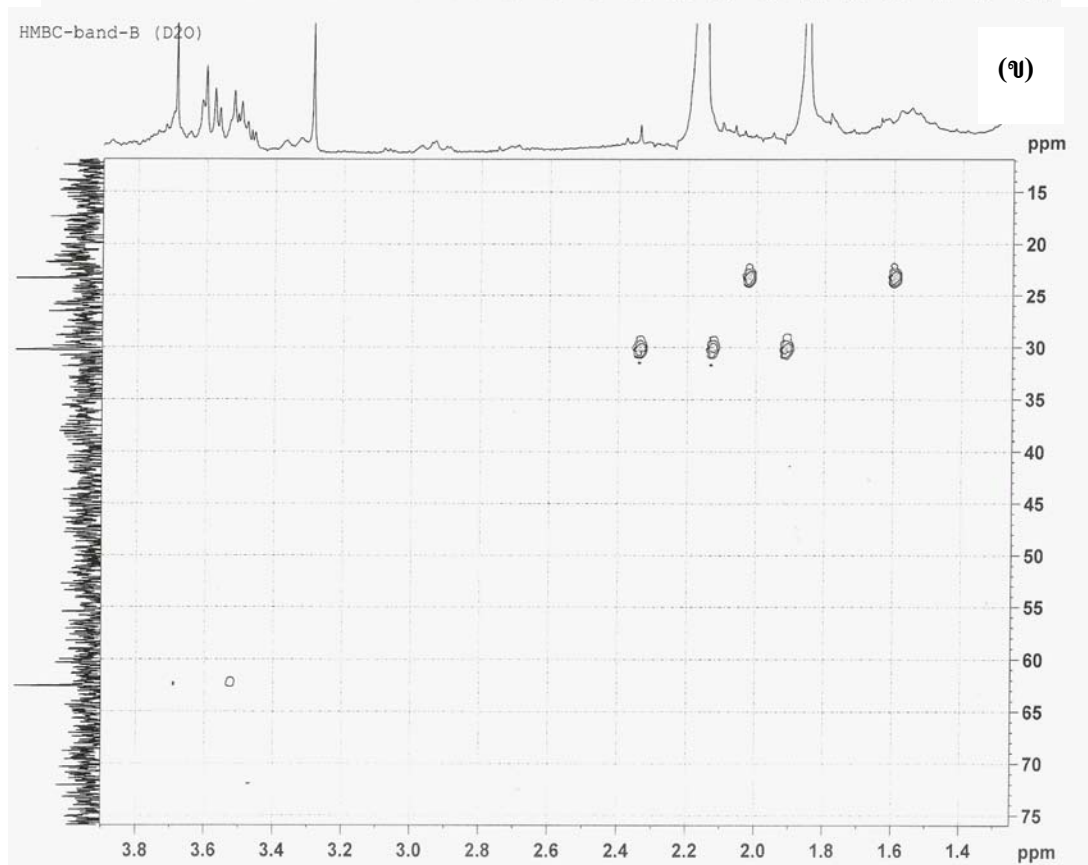
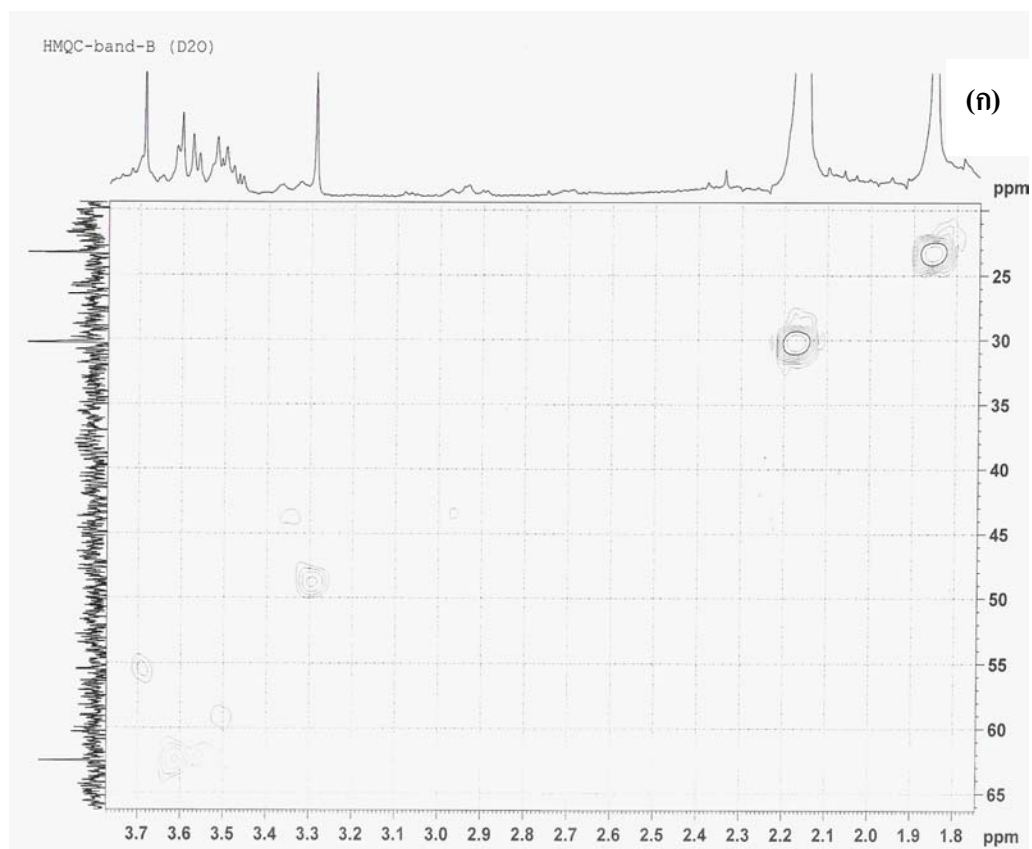
ภาพที่ 31 ¹³C-NMR สเปกตรัมของสารละลาย NAI

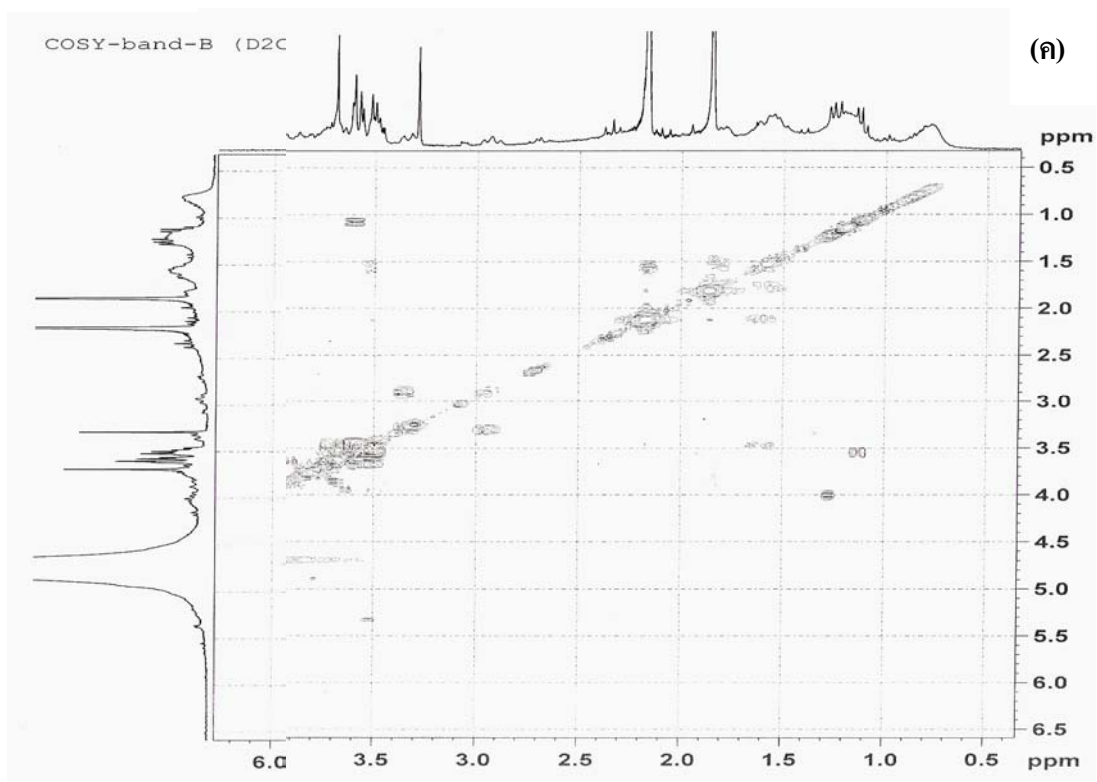
ภาพที่ 32 2D-NMR สเปกตรัมของสารละลาย NAI

ก. HMQC

ข. HMBC

ค. COSY





บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดตัวแดงหลวง

- ก. สารสกัดตัวแดงหลวงประกอบไปด้วยสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีน
- ข. มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 102.7 และจากตับอ่อนร้อยละ 92
- ค. สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายดีกว่าตับอ่อน โดยใช้ 3.6 มก.ตัว/มล.ยับยั้งได้ร้อยละ 50 แต่ต้องใช้ 4.2 มก.ตัว/มล. ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50
- ง. มีรูปแบบการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ต่ออะไมเลสจากน้ำลาย และแบบไม่แข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibition) ต่ออะไมเลสจากตับอ่อน

สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน cPAI และ PAI

- ก. ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ดีที่สุดในการเตรียม PAI คือ คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วย การแยกผ่านคอลัมน์ 3 ระบบที่บรรจุด้วย คือ DEAE-cellulose, Sephadex G-100 และ hydroxyapatite
- ข. cPAI มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 93 และจากตับอ่อนร้อยละ 98
- ค. cPAI สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายได้ดีกว่าตับอ่อนโดยใช้ 0.02 มก./มล. ยับยั้งได้ร้อยละ 50 แต่ต้องใช้ 0.03 มก./มล. ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50
- ง. cPAI มีรูปแบบการยับยั้งเป็นแบบผสม (mixed inhibition) ต่ออะไมเลสจากน้ำลาย และแบบไม่แข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) ต่ออะไมเลสจากตับอ่อน
- จ. PAI มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 99 และจากตับอ่อนร้อยละ 98
- ฉ. PAI สามารถยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อนได้ดีกว่าน้ำลายโดยใช้ 0.16 มก./มล. ยับยั้งได้ร้อยละ 50 แต่ต้องใช้ 0.36 มก./มล. ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50
- ช. PAI มีขนาดโมเลกุล 47.7 kDa จาก เจลฟิลเตรชัน และ 45 kDa จาก Native-PAGE

- ซ. ผลการแยกสารละลาย PAI ด้วย SDS-PAGE แบบไม่มีหรือมี β -mercaptoethanol พบแถบโปรตีน 3 แถบขนาด 21 19 และ 17 kDa เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีพันธะ S-S เชื่อมต่อระหว่างหน่วยย่อยทั้ง 3 โปรตีนทั้ง 3 แถบมีลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตระกูลถั่ว *Phaseolus vulgaris* ด้วยร้อยละความเหมือน (%identity) 35 (แถบ A) 34 (แถบ B) และ 33 (แถบ C)

สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน cNAI และ NAI

- ก. เมทานอลสามารถสกัด cNAI จากสารสกัดถั่วแดงได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับวิธี Kim et al., 2002 ซึ่งใช้ทั้งเมทานอล และเอทานอล และวิธีเอทานอล โดยมีค่าร้อยละการเก็บเกี่ยว 74.4 ± 2.2 และมีค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด
- ข. cNAI มีค่ากิจกรรมยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายร้อยละ 104 และจากตับอ่อนร้อยละ 30
- ค. cNAI สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายดีกว่าตับอ่อนเมื่อใช้ 14.7 มก./มล. ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 ส่วนตับอ่อนใช้ 36.5 มก./มล. ยับยั้งได้แค่ร้อยละ 30
- ง. cNAI มีรูปแบบการยับยั้งเป็นแบบผสม (mixed inhibition) ต่ออะไมเลสจากน้ำลาย และแบบไม่แข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) ต่ออะไมเลสจากตับอ่อน
- จ. สารละลาย cNAI เมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC พบแยกเป็น 3 แถบ A B และ C โดยแถบ B เป็นสาร NAI เพราะมีค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส 4.39 ± 8.75 และมีขนาดโมเลกุล 527.23 ดาลตัน จากการเขียนกราฟ Log Mr กับ R_f ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุล 527.3 เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS
- ฉ. ผลการศึกษา NMR ของ NAI พบสัญญาณ chemical shift ของ ^1H ที่ตำแหน่ง 8.542 ppm (ในช่วง δ ของ RCOH, HCON, HCOR, HCOO), 3.5 ppm (ในช่วง δ ของ $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, OH, NH, CH_2O CH_2NO_2) คาดว่าน่าจะเป็นมอนอแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส และ ^{13}C ที่ตำแหน่ง 215.83 ppm (ในช่วง δ ของ RCOR), 181.55 ppm (ในช่วง δ ของ RCHO, RCOOH), 62.72 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHX , R_3CN), 30.22 ppm (ในช่วง δ ของ R_2CHR , R_2CHX) และ 23.61 (ในช่วง δ ของ RCH_2R) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างที่แน่ชัดด้วยข้อมูลที่มีอยู่นี้

2. ข้อเสนอแนะ

ศึกษาการเตรียม PAI ด้วย MWCO ในรายละเอียดด้านการคัดเลือกขนาดคัดแยกโมเลกุลสถานะในการแยก ได้แก่ ตัวทำละลายโปรตีน PAI ที่สนใจในแง่ของความเข้มข้นของโปรตีนและตัวทำละลาย สัดส่วนระหว่างโปรตีนและตัวทำละลายที่เหมาะสม ค่า pH และค่า ionic strength ที่เหมาะสม เนื่องจากวิธีโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิมใช้เวลานานในการเตรียม และได้สารปริมาณน้อย ในการนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ศึกษาการเตรียม NAI ที่ดีกว่าการใช้ TLC ในงานวิจัยนี้ต้องการใช้ MWCO แต่ไม่มีจำหน่ายในประเทศ จึงไม่ทำการทดลอง

ในการศึกษาโครงสร้างของ NAI ครั้งนี้ ข้อมูลที่ได้รับยังไม่พื่อน้ำหนักเพียงพอในการทำนายโครงสร้าง จึงยังต้องทำการทดลองเพิ่มเติมด้วยเทคนิค IR เพื่อหา functional groups ที่ชัดเจน แก้ไขปัญหาการเห็นสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ไม่ชัดเจนให้ชัดเจนขึ้นด้วยการหาปริมาณตัวอย่างก่อนส่งวิเคราะห์โดยหาปริมาณน้ำตาลแทนการชั่งน้ำหนัก และเพิ่มเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย DEPT COSY และ NOSEY เพื่ออ่านโครงสร้างที่แน่นอนได้

เอกสารอ้างอิง

- ชนิดา หันสวาสดี. 2546. การสกัดแยกสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตจากสมุนไพรไทย. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.
- คาราวรรณ ทวีศักดิ์บรรกุล. 2549 เข้าถึงได้จาก
:http://www.doae.go.th/Library/html/2549/0709/Red_bean/index.htm. (วันที่สืบค้น 16 พฤษภาคม 2551)
- ปียวรรณ สิทธิพงษ์. 2549. สารยับยั้งอะไมเลส มอลเตส และซูโครสจากถั่วแดง : การทำบริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ประภาศรี ภูเสถียร. 2546. บทความมติชน ตอนที่ 5. สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. 19 ตุลาคม
- ฤทัยวรรณ บุญครองชีพ. 2550. คุณลักษณะทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงหลวงและผลการลดระดับน้ำตาล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- Ali, H., P. J. Houghton, and A. Soumyanath. 2006. [alpha]-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107 (3): 449-455.
- Andrade-Cetto, A., J. Becerra-Jiménez, and R. Cárdenas-Vázquez. 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 116 (1): 27-32.
- Bailey, C. J. 2003. New approaches to the pharmacotherapy of diabetes. *Textbook of diabetes 2* (third ed): 73.71-73.21.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β . *Method Enzymology* 1: 149-258.
- Bhandari, M. R., N. Jong-Anurakkun, G. Hong, and J. Kawabata. 2008. [alpha]-Glucosidase and [alpha]-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry* 106 (1):247-252.
- Bharagava, R.M., Chandra R. 2010. Effect of bacteria treated and untreated post-methanated distillery effluent (PDME) on seed germination, seeding growth and amylase activity in *Phaseolus mungo* L. *Journal of Hazardous Materials* 180: 730-734.

- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., Petersen, S. B., Swift, H., Thim, L. and Woldike, H.F. 1990. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1- Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* 29: 6244-6249.
- Bønsager, B. C., M. Prætorius-Ibba, P. K. Nielsen, and B. Svensson. 2003. Purification and characterization of the [beta]-trefoil fold protein barley [alpha]-amylase/subtilisin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 30 (2): 185-193.
- Brunkhorst, C., and E. Schneider. 2005. Characterization of maltose and maltotriose transport in the acarbose-producing bacterium *Actinoplanes* sp. *Research in Microbiology* 156 (8): 851-857.
- Brzozowski, A. M. and Davies, G. J. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36: 10837-10845.
- Chiang, W.-D., C.-J. Shih, and Y.H. Chu. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry* 65 (2): 189-194.
- Chokshi, D. 2007. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45 (1): 32-40.
- Correia, T. Roberta, McCue, Patrick, Vattem, A. Dhiraj, Magalhaes, M. A. Margarida, Macedo, R. Gorete, Shetty, and Kalidas. 2004. Amylase and Helicobacter pylori inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bioprocessed by *Rhizopus oligosporus*. Vol. 28. Hoboken, NJ, ETATS-UNIS: Wiley.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 121 (2): 404-427.
- D'Costa, S. S., and J. L. Hurwitz. 2003. Phytohemagglutinin inhibits lymphoid tumor growth in vitro and in vivo. *Leukemia & Lymphoma* 44 (10): 1785-1791.
- Defranzo, R. A., Bonadonna, R.C., Ferrannini, E. 1992. Pathogenesis of NIDDM.A balance overview. *Diabetes care* 15: 318-368.

- El-Demerdash, F. M., M. I. Yousef, and N. I. A. El-Naga. 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 43 (1): 57-63.
- Feins, M., and K. K. Sirkar. 2005. Novel internally staged ultrafiltration for protein purification. *Journal of Membrane Science* 248 (1-2): 137-148.
- Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan T.D. and Reeck, G. R. 1995. α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylase. *Insect Biochemical Molecular Biological* 26: 419-426.
- Franco, O. L., D. J. Rigden, F. R. Melo, and M. F. Grossi-de-Sá. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *European Journal of Biochemistry* 269 (2): 397-412.
- Fukuhara, K., Murai, H., Murao, S. 1982. Isolation and structure-activity relationship of some amylostatins (F-1b fraction) produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *Amylostaticus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 1941-1945
- Fuwa, H. 1954. A new method of micro-determination of amylase activity. *Journal of Biochemisrty* 41: 583-603.
- Geng, P., F. Qiu, Y. Zhu, and G. Bai. 2008. Four acarviosin-containing oligosaccharides identified from *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 are potent inhibitors of [alpha]-amylase. *Carbohydrate Research* 343 (5): 882-892.
- Ghosh, R., and Z. F. Cui. 1998. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *Journal of Membrane Science* 139 (1): 17-28.
- Gibbs, B. F., and I. Alli. 1998. Characterization of a purified [alpha]-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International* 31 (3): 217-225.
- Giusti, V. 2007. Management of obesity in patients with peripheral arterial disease. *European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 34 (5): 576-582.
- Grant, G., J. E. Edwards, and A. Pusztai. 1995. α -Amylase inhibitor levels in seeds generally available in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67 (2): 235-238.

- Guzman-Partida, A. M., O. Jatomea-Fino, M. R. Robles-Burgueño, M. Ortega-Nieblas, and L. Vazquez-Moreno. 2007. Characterization of [alpha]-amylase inhibitor from *Palo Fierro* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 (9): 711-715.
- Houngphruk, H., Teanpaisan, R., Wititsuwannakul, D. and Wititsuwannakul, R. Inhibitory effect of *Hevea* latex extracts on oral bacteria department of biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla.
- Iulek, J., O. L. Franco, M. Silva, C. T. Slivinski, C. Bloch, D. J. Rigden, and M. F. Grossi de Sá. 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new [alpha]-amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (11-12): 1195-1204.
- Jinapong, N., M. Suphantharika, and P. Jamnong. 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 84 (2): 194-205.
- Judith, L.N., Fossouo, Z., Djiotsa, E.J. and Oben, J. 2006. Glycaemic variations after administration of *Irvingia gabonensis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 3(4): 94-101.
- Juge, N., F. Payan, and G. Williamson. 2004. XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1696 (2): 203-211.
- Kim, M. J., H. S. Lee, J. S. Cho, T. J. Kim, T. W. Moon, S. T. Oh, J. W. Kim, B. H. Oh, and K. H. Park. 2002. Preparation and characterization of alpha-D-glucopyranosyl-alpha-acarviosinyl-D-glucopyranose, a novel inhibitor specific for maltose-producing amylase. *Biochemistry* 41 (29): 9099-9108.
- Kluh, I., M. Horn, J. Hýblová, J. Hubert, L. Dolecková-Maresová, Z. Voburka, I. Kudlíková, F. Kocourek, and M. Mares. 2005. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of [alpha]-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 66 (1): 31-39.
- Kodama, T., T. Miyazaki, I. Kitamura, Y. Suzuki, Y. Namba, J. Sakurai, Y. Torikai, and S. Inoue. 2005. Effects of single and long-term administration of wheat albumin on blood glucose control: randomized controlled clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition* 59 (3): 384-392.

- Koike, D., K. Yamadera, and E. P. Dimagno. 1995. Effect of a wheat amylase inhibitor on canine carbohydrate digestion, gastrointestinal function, and pancreatic growth. *Gastroenterology* 108 (4): 1221-1229.
- Konrad, G., and T. Kleinschmidt. 2008. A new method for isolation of native [alpha]-lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal* 18 (1): 47-54.
- Kumari A., Rosenkranz T., Kayastha A.M. and Fitter J. 2010, The effect of calcium binding on the unfolding barrier: a kinetic study on homologous α -Amylases. *Biophysical Chemistry* 151: 54-60.
- Laemmli, U. K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of Molecular Biology* 47 (1): 69-74.
- Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J. and McPherson, A. 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic α -Amylase at 2.1 Å resolution. *Journal of molecular and Biology* 231: 1560-1584.
- Le Berre-Anton, V., C. Bompard-Gilles, F. Payan, and P. Rougé. 1997. Characterization and functional properties of the [alpha]-amylase inhibitor ([alpha]-AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1343 (1): 31-40.
- Lebovitz, H. E. 1997. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 26 (3): 539-551.
- Leiner, I. E., Donatrucci, D. A. and Tarcza, J. C. 1984. Starch blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectins. *American Journal of nutrition* 39: 196-200.
- Li, Z.-Y., A. H-Kittikun, and W. Youravong. 2008. Separation of protease from yellowfin tuna spleen extract by ultrafiltration: Effect of hydrodynamics and gas sparging on flux enhancement and selectivity. *Journal of Membrane Science* 311 (1-2): 104-111.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-275.

- Marshall, J. J., and C. M. Lauda. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Biological Chemistry* 250 (20): 8030-8037.
- Matsui, T., T. Tanaka, S. Tamura, A. Toshima, K. Tamaya, Y. Miyata, K. Tanaka, and K. Matsumoto. 2007. alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1): 99-105.
- McCue, P., D. Vattem, and K. Shetty. 2004. Inhibitory effect of clonal oregano extracts against porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical and Nutrition* 13 (4): 401-408.
- Michelin, M., T. M. Silva, V. M. Benassi, S. C. Peixoto-Nogueira, L. A. B. Moraes, J. M. Leão, J. A. Jorge, H. F. Terenzi, and M. d. L. T. M. Polizeli. 2010. Purification and characterization of a thermostable [alpha]-amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrate Research* 345 (16): 2348-2353.
- Neilsen, P. K., Bonsager, B. C., Fukuda, K., Svensson, B. 2004. Barley α -amylase/ subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. *Biochimical Biophysical Acta* 1696: 157-164.
- Park, K.H., Kim, M.J., Lee, H.S., Han, N.S., Kim, D. and Robyt, J.F. 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus Stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydrate Research* 313: 235-246.
- Powers, J. R., and J. R. Whitaker. 1978. Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor with porcine pancreatic α -amylase. *Journal of Food Biochemistry* 1 (3): 239-260.
- Priya, S., N. Kaur, and A. K. Gupta. 2010. Purification, characterization and inhibition studies of [alpha]-amylase of *Rhizopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (2): 231-237.
- Omoto, S., Itoh, J., Ogino, H., Iwamatsu, K., Nishizawa, N., Inouye, S. J. 1981. *Antibiotechnology* 34: 1429-1433.
- Ren, J., J. Shi, Y. Kakuda, D. Kim, S. J. Xue, M. Zhao, Y. Jiang, and J. Sun. 2008. Comparison of the phytohaemagglutinin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) purified by different affinity chromatography. *Food Chemistry* 108 (1): 394-401.

- Rhabasa-Lhoret, R., and Chiasson, J. L. 2004. Alpha-glucosidase inhibitors (3rd ed). In R. A. Defranzo, E. Ferrannini, H. Keesa, and P. Zimmet (Eds). *International text book of diabetes mellitus* 1. UK: John Wiley.
- Richard, D. L., Ronald, L.F. and Nicholas, R.B. 1976. Biological and biochemistry properties of *phaseolus vulgaris* isolectins. *Journal of Biological Chemistry* 252: 2961-2966.
- Santimone M., Koukiekolo R., Moreau Y., Le Berre V., Rouge P., Marchis-Mouren G. and Desseaux V. 2004. Porcine pancreatic α -amylase inhibitor (α -AI) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696: 181-190.
- Saxena, L., B. K. Iyer, and L. Ananthanarayan. 2007. Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry* 42 (3): 491-495.
- Scordino, M., A. Di Mauro, A. Passerini, and E. Maccarone. 2007. Highly purified sugar concentrate from a residue of citrus pigments recovery process. *LWT - Food Science and Technology* 40 (4): 713-721.
- Schmidt, D. D., Frommer, W., Junge, B., Miller, L., Wingender, W. and Truscheit, E. 1981. In first international symposium on acarbose (Creutzfeldt, E. W., Ed). *Excerpta Medica*, Amsterdam: 5-15.
- Seeram, N., R. Lee, M. Hardy, and D. Heber. 2005. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 41 (1): 49-55.
- Sharma, A., and M. N. Gupta. 2001. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor. *Process Biochemistry* 37 (2): 193-196.
- Shivkumar S., Mohan M., Franco O. L., and Thayumanavan B. 2006. Inhibition of insect pest α -amylase by little and finger millet inhibitors. *Pesticide Biochemistry Physiological* 85: 155-160.
- Sjöman, E., M. Mänttari, M. Nyström, H. Koivikko, and H. Heikkilä. 2007. Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. *Journal of Membrane Science* 292 (1-2): 106-115.

- Svensson, B. 1994. Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology* 25 (2): 141-157.
- Tanaka, A., and E. Hoshino. 2002. Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase determined by inactivation kinetics. *Biochemical Journal* 364 (Pt 3): 635-639.
- Timur, S., and Ü. Anik. 2007. [alpha]-Glucosidase based bismuth film electrode for inhibitor detection. *Analytica Chimica Acta* 598 (1): 143-146.
- Tormo, M. A., I. Gil-Exojo, A. Romero de Tejada, and J. E. Campillo. 2006. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *British Journal of Nutrition*. 96 (3): 539-544.
- Tripathi, P., L. Lo Leggio, J. Mansfeld, R. Ulbrich-Hofmann, and A. M. Kayastha. 2007. [alpha]-Amylase from mung beans (*Vigna radiata*)-Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling. *Phytochemistry* 68 (12): 1623-1631.
- van der Maarel, M. J. E. C., B. van der Veen, J. C. M. Uitdehaag, H. Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the [alpha]-amylase family. *Journal of Biotechnology* 94 (2): 137-155.
- Wang, H., Y.-J. Du, and H.-C. Song. 2010. [alpha]-Glucosidase and [alpha]-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry* 123 (1): 6-13.
- Wang, J., Ye, X. Y., Ng, T.B., and Tsang, W. K. 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of protein Chemistry*. 20: 367-375.
- Xiao-Ping, Y., S. Chun-Qing, Y. Ping, and M. Ren-Gang. 2010. [alpha]-Glucosidase and [alpha]-amylase inhibitory activity of common constituents from traditional chinese medicine used for diabetes mellitus. *Chinese Journal of Natural Medicines* 8 (5): 349-352.
- Yamada, T., R. Moriyama, K. Hattori, and M. Ishimoto. 2005. Isolation of two [alpha]-amylase inhibitor genes of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) and their functional characterization in genetically engineered azuki bean. *Plant Science* 169 (3): 502-511.
- Yamada, T., Moriyama, K. and Ishimoto, M. 2001. Purification and characterization of two α -Amylase Inhibitors from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry* 58: 59-66.

Yoshizaki, Y., T. Susuki, K. Takamine, H. Tamaki, K. Ito, and Y. Sameshima. 2010. Characterization of glucoamylase and [alpha]-amylase from *Monascus anka*: Enhanced production of [alpha]-amylase in red koji. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110 (6): 670-674.

Yoon, S.-H., and J. F. Robyt. 2002. Synthesis of acarbose analogues by transglycosylation reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC and B-742CB dextransucrases. *Carbohydrate Research* 337 (24): 2427-2435.

<http://www.chillchillshop.com/product/product.detail.php?cat=&id=35&lang=th> วันที่สืบค้น 11 พฤษภาคม 2551.

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/aglucosidase.pdf> วันที่สืบค้น 26 กรกฎาคม 2551

<http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme/chapter5/ch514.html> วันที่สืบค้น 12 มีนาคม 2554

<http://courses.chem.psu.edu/chem36/Experiments/Ex205.pdf> วันที่สืบค้น 2 เมษายน 2554

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนันธิดา ลิ่มเสฏฐ์ โส

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220064

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต/ศึกษาศาสตร์บัณฑิต (เคมี ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2550

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์ เผยแพร่ผลงาน

นันธิดา ลิ่มเสฏฐ์ โส และดร.อโนชา ตั้งโพธิธรรม, 2552, การเตรียมและทำบริสุทธิ์สารยับยั้ง

อะไมเลสจากถั่วแดงหลวง. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ

ครั้งที่ 14, 10-11 เดือนกันยายน พ.ศ. 2552, อาคารนวมินทรราชินี และอาคารบัณฑิต

วิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์นานาชาติสิรินธร ไทย-เยอรมัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอม

เกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพมหานคร.