ว.วิทย. มข. 48(1) 086 - 094 (2563) KKU Sci. J. 48(1) 086 - 094 (2020)

สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคนของสารสกัดผลมะตาดสดและผลมะตาดต้มสุก

Phytochemicals and Human Pancreatic α-Amylase Inhibitory Activities of Fresh and Boiled Elephant Apple (*Dillenia indica*) Fruit Extracts

รัตวรรณ พูดเพราะ[1*] นฤมล ธนานันต์[2] และจุฬา วิริยะบุบผา[3]

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

[2]หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

[3]สาขาเวชกรรมไทย คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

Rattawan Poodproh[1*] Narumol Thanananta[2] and Chula Viriyabuppa[3]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110 Thailand.

[2]Program in Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, Khlong Luang, Pathum Thani, 13180 Thailand.

[3]Department of Thai Medicine, Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110 Thailand.

[*]Corresponding Author, Email: rattawanpoodpro@yahoo.com

Received: 27 August 2019 | Revised: 8 November 2019 | Accepted: 19 November 2019

บทคัดย่อ

ผลของมะตาด (*Dillenia indica* L.) สามารถรับประทานและใช้ประกอบอาหารได้ และยังมีสรรคุณในการรักษาโรคเบาหวาน โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และคอนเดนส์แทนนินรวม และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคนของสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนที่รับประทานได้ของผลมะตาดสดและผลมะตาดต้มสุก รวมถึงศึกษาความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ผลการทดลองพบว่า ในสารสกัดผลมะตาดต้มสุกมีปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และคอนเดนส์แทนนินรวมสูงกว่าในสารสกัดผลมะตาดสด และสารสกัดผลมะตาดต้มสุก (ร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 100.00 ± 0.00 ให้ค่า IC_{50} ที่ 25.40 ± 2.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคนได้ดีกว่าสารสกัดผลมะตาดสด (ร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 98.17 ± 3.96 ให้ค่า IC_{50} ที่ 51.39 ± 2.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ มีความคงตัวในที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 3 เดือน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เป็นที่น่าสนใจในการที่จะนำผลมะตาดไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ซึ่งจะมีผลช่วยลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่จะดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ นอกจากนี้ ยังเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นโภชนเภสัชสำหรับผู้ป่วยเบาหวานในเชิงพาณิชย์

ABSTRACT

Fruits of elephant apple (*Dillenia indica*) are edible and also used for treatment of diabetes by action as the inhibitor of carbohydrate hydrolyzing enzyme. In this research, the aqueous extracts from edible parts of fresh and boiled fruits of *D. indica* were determined the presence of phytochemicals; including total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents, evaluated of human pancreatic α-amylase inhibitory activity and studied of the stability of active phytochemicals. The results showed that the boiled fruit extract contained more total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents than the fresh fruit extract. In addition, the boiled fruit extract (% inhibition = 100.00 ± 0.00, IC_{50} = 25.40 ± 2.42mg/ml) had a higher capacity to inhibit the human pancreatic α-amylase than the fresh fruit extract (% inhibition = 98.17 ± 3.96, IC_{50} = 51.39 ± 2.65 mg/ml). Moreover, the active phytochemicals were stable under dark condition at –20 ºC for 3 months. These results suggested that fruits of *D. Indic* are suitable to develop as a nutraceuticals for diabetes management.

คำสำคัญ: ผลมะตาด เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส เบาหวาน

Keyword: *Dillenia indica* fruit, α-amylase, Diabetes

บทนำ

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) หรือ ภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดสูง (Hyperglycemia) เป็นผลมาจากความผิดปกติในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้น้ำตาลกลูโคสที่อยู่ในกระแสเลือดไม่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลังงาน ผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษาหรือไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติได้ ปล่อยให้น้ำตาลในกระแสเลือดสูงอยู่เป็นเวลานาน จะมีผลให้การทำงานของหลอดเลือดและอวัยวะต่าง ๆ บกพร่อง จนเกิดเป็นโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ ตามมา เช่น โรคหัวใจ (Heart disease) โรคไต (Kidney disease) โรคตา (Diabetic retinopathy) และโรคในระบบประสาท (Diabetes neuro- pathy) เป็นต้น (Watkins et al., 1996) โรคแทรกซ้อนเหล่านี้นอกจากจะเพิ่มปัญหาด้านสุขภาพให้กับผู้ป่วยเบาหวานแล้ว ยังมีผลให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มสูงขึ้นด้วย ทั้งค่าใช้จ่ายในระดับบุคคลและระดับประเทศ ทางเลือกหนึ่งที่จะลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดและลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคเบาหวาน คือ การรับประทานอาหารที่ปรุงจากพืชผักพื้นบ้านราคาถูก และมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต (Nutraceuticals for diabetes management) (Derosa et al., 2014; Nimesh et al., 2018)

โดยปกติ น้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ที่อยู่ในกระแสเลือดเป็นผลผลิตมาจากการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต (Levin, 1994) โดยเมื่อคนเรารับประทานคาร์โบไฮเดรตประเภทข้าวและแป้งเข้าไป คาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการย่อยผ่านระบบย่อยอาหารที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น เอนไซม์แรกในระบบย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตได้แก่ เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α-Amylase) ซึ่งพบส่วนใหญ่อยู่ในลำไส้เล็ก จากการสังเคราะห์ของตับอ่อน และทำหน้าที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ให้ไปเป็นน้ำตาลมอลโตส (Maltose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccha ride) สายสั้น ๆ ซึ่งต่อมา คาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จะถูกย่อยต่อ จนได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส (Levin, 1994) และถูกดูดซึมผ่านผนังของลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด ในคนปกติ น้ำตาลเหล่านี้จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์เพื่อเปลี่ยนให้เป็นพลังงาน หรือเปลี่ยนให้เป็นสารอื่นตามความต้องการของร่างกาย ในผู้ป่วยเบาหวานที่ร่างกายไม่สามารถผลิตอินซูลินได้ (Type 1 diabetes) หรือไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน (Type 2 diabetes) น้ำตาลเหล่านี้จะไม่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ แต่จะสะสมอยู่ในกระแสเลือด จนเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ดังนั้น วิธีการหนึ่งที่จะลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดได้ คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ปัจจุบันมีรายงานว่าสารพฤกษเคมี เช่น สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน จากพืชหลายชนิด

สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (Barrett and Ndou, 2013; Toh et al., 2015; Martinez-Gonzalez et al., 2019)

มะตาด (*Dillenia indica* L.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง จัดอยู่ในวงศ์ DILLENIACEAE พบได้เกือบทุกประเทศในภูมิภาคเอเชีย เช่น ไทย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย บังกลาเทศ และ ศรีลังกา สำหรับประเทศไทย สามารถพบมะตาดได้ในทุกภาค แต่ละภาคจะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป เช่น ส้มปรุ ส้านกว้าง ส้านท่า ส้านใหญ่ (สุราษฎร์ธานี) ส้านป้าว (เชียงใหม่) แส้น (ตรัง สงขลา นครศรีธรรมราช) สั้น บักสั้นใหญ่ (อีสาน) (วุฒ, 2540; พงษ์ศักดิ์, 2550) ผลอ่อนของมะตาดสามารถนำมารับประทานและใช้ประกอบอาหารได้ โดยจะมีรสชาติเปรี้ยวจัด อมฝาดเล็กน้อย คนไทยเชื้อสายมอญนิยมนำผลมะตาดไปประกอบในอาหารที่ต้องการรสเปรี้ยว เช่น แกงส้ม แกงกะทิ หรือรับประทานเป็นผักสดจิ้มกับน้ำพริก โดยส่วนของผลมะตาดที่สามารถนำมารับประทานหรือใช้ประกอบอาหารได้เป็นส่วนของกลีบเลี้ยงที่หุ้มผลอยู่ (องค์, 2553; 2557) ส่วนของผลมะตาดที่รับประทานได้ 100 กรัม จะมีโปรตีนประกอบอยู่ 8% ไขมัน 22.5% เส้นใยอาหาร 2.1-2.5% แคลเซียม 16 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 26 มิลลิกรัม และ วิตามิน ซี 4 มิลลิกรัม และจะให้พลังงานเท่ากับ 59 กิโลแคลอรี่ (kcal) (Deshmukh et al., 2017) นอกจากจะรับประทานและนำมาประกอบอาหารได้แล้ว ผลและส่วนต่าง ๆ ของมะตาดยังสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้

ในตำรับยาแผนโบราณของไทย มีการนำใบของมะตาดไปต้มกับน้ำหรือนำผลสดของมะตาดไปคั้นน้ำดื่มเพื่อรักษาโรคเบาหวาน (จุไรรัตน์, 2548) ในตำรับยาแผนโบราณของอินเดีย มีการนำใบ ผลและเปลือกของต้นมะตาด ไปใช้รักษาอาการท้องร่วง ขับลม สมานแผล บรรเทาปวด และลดไข้ (Saiful and Armania, 2014) ปัจจุบันนี้ มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ว่า สารสกัดจากผลมะตาดสามารถต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้ (Kumar et al., 2013; Rasamalla et al., 2017; Barua et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากส่วนที่รับประทานได้ของผลมะตาด ทั้งผลมะตาดสดและผลมะตาดที่ผ่านการปรุงสุก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี ซึ่งได้แก่ ฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และคอนเดนส์แทนนินรวม และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อนคน ของสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนที่รับประทานได้ของผลมะตาดสดและผลมะตาดต้มสุก เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำผลมะตาดไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานเพื่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตนเอง รวมถึงศึกษาความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ เพื่อประโยชน์ในการนำผลมะตาดไปพัฒนาเป็นโภชนเภสัชสำหรับผู้ป่วยเบาหวานในเชิงพาณิชย์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำผลมะตาดที่ซื้อจากตลาดสด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในช่วงเดือน กันยายน-ตุลาคม พ.ศ. 2561 มาล้างทำความสะอาดโดยให้น้ำประปาไหลผ่านและตามด้วยการล้างน้ำกลั่น นำผลมะตาดไปผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตัดส่วนที่ไม่สามารถรับประทานได้ออก เหลือไว้แต่ส่วนของกลีบเลี้ยงที่สามารถรับประทานหรือใช้ประกอบอาหารได้เท่านั้น นำส่วนของกลีบเลี้ยงมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน สำหรับใช้เพื่อการสกัดแบบสดและแบบต้มสุก

ด้านขั้วผล ด้านล่างผล ภาพตัดขวาง ส่วนของกลีบเลี้ยง ส่วนของกลีบเลี้ยงที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

รูปที่ 1 แสดงผลมะตาด ภาพตัดขวาง และส่วนของกลีบเลี้ยงที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

2. วิธีการเตรียมสารสกัด

2.1 การเตรียมสารสกัดผลมะตาดสด เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิห้อง 75 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ใส่ผลมะตาดที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 15 กรัม ลงไป เทของผสมลงในเครื่องปั่น ปั่นให้ละเอียดนาน 3 นาที แล้วเทใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร 2 หลอด นำไปวางบนเครื่องผสม (Rotary mixer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (rpm) แล้วแยกตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่อัตราเร็ว 10,000 rpm แล้วแยกส่วนใสแบ่งเก็บในหลอดทึบแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมสารสกัดผลมะตาดต้มสุก เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิห้อง 75 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ นำบีกเกอร์ไปชั่งน้ำหนัก ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปให้ความร้อนจนน้ำเดือด ใส่ผลมะตาดที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก 15 กรัม ลงในบีกเกอร์ ต้มต่ออีก 3 นาที แล้วยกบีกเกอร์มาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง โดยปรับให้น้ำหนักของบีกเกอร์เท่ากับน้ำหนักเดิมรวมกับน้ำหนักของผลมะตาดด้วยน้ำกลั่น เทของผสมลงในเครื่องปั่น แล้วสกัดและเก็บตามวิธีในข้อ 2.1

3. การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี

3.1 ปริมาณฟีนอลรวม ปริมาณฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีของ Singleton et al. (1999) นำสารสกัดมาอย่างละ 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นอีก 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau 200 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม 8% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 3 มิลลิลิตร วางในที่มืดอีก 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ปริมาณฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัด ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ช่วงความเข้มข้น 0-0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วคำนวณปริมาณฟีนอลรวมเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของผลมะตาดสด (mg GAE/g fresh weight)

3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีของ Zhishen et al. (1999) นำสารสกัดมาอย่างละ 100 ไมโครลิตร เติม 5% โซเดียมไนเตรท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที จากนั้นเติม 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาที แล้วเติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 2 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิ ห้องอีก 15 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในสารสกัด ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของเควอซิทิน (Quercetin) ที่ความเข้มข้น 0-160 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทิน/กรัมของผลมะตาดสด (mg QE/g fresh weight)

3.3 ปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวม ปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวมทั้งหมดในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีของ Sun et al. (1998) นำสารสกัดมาอย่างละ 100 ไมโครลิตร เติม 4% วานิลลิน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตามด้วยกรดไฮโดร-คลอลิกเข้มข้น ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกนาน 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophoto-meter ปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวมทั้งหมดในสารสกัด ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชิน (Catechin) ที่ช่วงความเข้มข้น 0-12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วคำนวณปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวมเป็นมิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน/กรัมของผลมะตาดสด (mg CE/g fresh weight)

4. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

4.1 การตรวจวัดค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ตรวจวัดโดยดัดแปลงวิธีของ Bernfeld (1955) นำสารสกัดมาอย่างละ 25 ไมโครลิตร บ่มกับเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคน (α-amylase from human pancreatic, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) เข้มข้น 0.01 ยูนิต/ไมโครลิตร ละลายใน 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 6.9 ที่มี 0.01 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย 2% แป้งข้าวจ้าว (starch

from rice, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) ที่ละลายใน 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 6.9 ที่มี 0.01 โมลาร์ โซเดียม-คลอไรด์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่ออีกนาน 3 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายมอลโตส (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐาน และใช้อะคาโบส (Acarbose, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้ง ดังสมการที่ (1) โดยที่

กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือจากการยับยั้ง คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

4.2 การตรวจวัดค่าการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) นำสารสกัดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปตรวจวัดค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสตามข้อ 4.1 จากนั้นเขียนกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้ร้อยละ 50

5. ศึกษาความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

นำสารสกัดซึ่งแบ่งเก็บไว้ในหลอดทึบแสง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0 0.5 1 2 และ 3 เดือน มาตรวจหาค่าการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสตามหัวข้อที่ 4.1 แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละการยับยั้งของเดือนที่ 0 กับเดือนที่ 0.5 1 2 และ 3 ตามลำดับ

6. การคำนวณทางสถิติ

ข้อมูลที่แสดงในงานวิจัยนี้เป็นค่าที่ได้จากการสกัด 3 ครั้ง และแต่ครั้งของการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Independent Sample T-test ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \frac{(\text{กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น} - \text{กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือจากการยับยั้ง})}{\text{กิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น}} \; x\,100 \qquad (1)$$

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารพฤกษเคมี

จากการนำส่วนที่รับประทานหรือใช้ประกอบ อาหารได้ของผลมะตาดสดและผลมะตาดต้มสุกมาสกัดด้วยน้ำ ผลปรากฏว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือ เป็นของเหลวใส มีสีออกเหลืองอ่อนๆ แต่สำหรับสารสกัดของผลมะตาดสดมีสีที่เข้มกว่าสารสกัดผลมะตาดต้มสุกเล็กน้อย และเมื่อนำสารสกัดซึ่งมีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ ปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และคอนเดนส์แทนนินรวม พบว่า ในสารสกัดผลมะตาดต้มสุกมีปริมาณสารพฤกษเคมีสูงกว่าสารสกัดผลมะตาดสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1) โดยสารสกัดผลมะตาดต้มสุกมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 14.16 ± 0.76 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของผลสด ฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 28.54 ± 1.33 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทิน/กรัมของผลสด และคอนเดนส์แทนนินรวมเท่ากับ 116.21 ± 3.38 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน/กรัมของผลสด ขณะที่ในสารสกัดผลมะตาดสดมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 2.67 ± 0.19 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของผลสด ฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 3.20 ± 0.19 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทิน/กรัมของผลสด และคอนเดนส์แทนนินรวมเท่ากับ 10.08 ± 0.59 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน/กรัมของผลสด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และคอนเดนส์แทนนินรวม ในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สารสกัด	ฟีนอลรวม (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของผลสด)	ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทิน/กรัมของผลสด)	คอนเดนส์แทนนินรวม (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน/กรัมของผลสด)
ผลมะตาดสด	2.67 ± 0.19	3.20 ± 0.19	10.08 ± 0.59
ผลมะตาดต้มสุก	14.16 ± 0.76*	28.54 ± 1.33*	116.21 ± 3.38*

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดผลมะตาดสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

จากการนำสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคน โดยใช้สารละลายแป้งข้าวจ้าวเป็นสับสเตรต พบว่า ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2) โดยสารสกัดผลมะตาดสดยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้สูงสุดที่ร้อยละ 98.17 ± 3.96 ขณะที่สารสกัดผลมะตาดต้มสุกยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้สูงสุดที่ร้อยละ 100 ± 0.00 อย่างไรก็ตาม เมื่อนำสารสกัดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปหาค่าร้อยละการยับยั้ง และคำนวณค่า IC_{50} เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ พบว่า สารสกัดผลมะตาดสดให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นสูงกว่าสารสกัดผลมะตาดต้มสุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสารสกัดผลมะตาดสดให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 51.39 ± 2.65 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดผลมะตาดต้มสุกให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25.40 ± 2.42 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผลมะตาดต้มสุกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสสูงกว่าสารสกัดผลมะตาดสด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก กับอะคาร์โบส (acarbose) ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (Hiele et al., 1992) ผลปรากฏว่า ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก เทียบกับ acarbose ที่เข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุกให้ค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นสูงกว่าอะคาร์โบส ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.33 ± 0.11 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส และการยับยั้งอัลฟาอะไมเลสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุกเทียบกับอะคาร์โบส

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้ง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
อะคาร์โบส	100.00 ± 0.00	6.33 ± 0.11 μg/ml
สารสกัดผลมะตาดสด	98.17 ± 3.96	51.39 ± 2.65 mg/ml**
สารสกัดผลมะตาดต้มสุก	100.00 ± 0.00	25.40 ± 2.42 mg/ml*, **

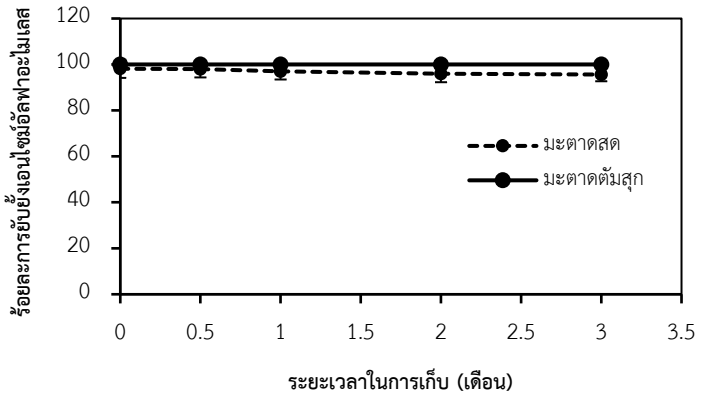
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*มีความแตกต่างกันกับสารสกัดผลมะตาดสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับอะคาร์โบสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. ความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

จากการศึกษาความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก โดยการติดตามค่าร้อยละการยับยั้งหลังจากเก็บสารสกัดไว้ในภาชนะทึบแสงอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2 และ 3 เดือน ตาม ลำดับ พบว่าค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส จากตับอ่อนคนของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุกในเดือนที่ 0 กับ เดือนที่ 0.5, 1, 2 และ 3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงร้อยละการยับยังเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุกหลังจากเก็บสารสกัดไว้ในภาชนะทึบแสง อุณหภูมิ -20 ระยะเวลานาน 3 เดือน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี ในสารสกัดผลมะตาดสดและสารสกัดผลมะตาดต้มสุก แสดงให้เห็นว่า ส่วนของผลมะตาดที่คนทั่วไปนำไปรับประทานหรือใช้ประกอบอาหารนั้นมีสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคอนเดนส์แทนนินที่สามารถละลายและสกัดออกมาได้ด้วยน้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายเดียวกับในระบบต่างๆ ของร่างกาย จากผลการทดลองจึงสันนิษฐานได้ว่า หากเรารับประทานผลมะตาดทั้งในรูปของผลสดหรือที่ผ่านการปรุงสุก สารพฤกษเคมีต่าง ๆ ในมะตาดจะสามารละลายและออกฤทธิ์ได้ในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหาร และจากการนำผลมะตาดไปต้มให้สุกในรูปแบบเดียวกับที่คนทั่วไปนำผลมะตาดไปประกอบอาหาร มีผลให้สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคอนเดนส์แทนนินละลายน้ำและสกัดออกมาได้ในปริมาณที่มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนจะไปเร่งให้ผนังเซลล์และเยื้อหุ้มเซลล์ของพืชสลายตัว (Güneş et al., 2017) ดังนั้นเมื่อนำผลมะตาดที่ต้มสุกมาสกัดสารพฤกษเคมีต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์จึงถูกปล่อยปลดออกมาได้ง่ายขึ้น สารพฤกษเคมีที่พบในมะตาด ทั้งสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้ (Kumar et al., 2013; Rasamalla et al., 2017) โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส และ อัลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase) (Hossain et al., 2008; Kumar et al., 2013; Deshmukh et al., 2016; Rasamalla et al., 2017) ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ส่งผลให้การเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาลกลูโคสในทางเดินอาหารเกิดได้น้อยลง จึงช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด และคาดว่าจะสามารถใช้เพื่อการรักษาโรคเบาหวานได้ นอกจากการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตแล้ว สารพฤกษเคมีจากพืชยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังการรับประทานอาหาร (postprandial blood glucose) ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ โดยการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่ออินซูลิน (Johnston et al., 2005) และขัดขวางการขนส่งกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด โดยการเข้าจับกับโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกลูโคส (Na^+-dependent glucose transporters) ทำให้กลูโคสไม่สามารถเข้าจับได้ จึงไม่ถูกขนส่งเข้าสู่กระแสเลือด (Kobayashi et al., 2000)

สำหรับงานวิจัยนี้ จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากส่วนที่รับประทานได้ของผลมะตาด โดยเลือกใช้เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคน และใช้สารละลายแป้งข้าวจ้าวเป็นสับสเตรท เนื่องจากต้องการให้การทดลองใน

หลอดทดลองมีรูปแบบที่ใกล้เคียงกับในระบบย่อยอาหารของคนให้มากที่สุด และให้เหมาะสมกับคนไทยที่นิยมบริโภคข้าวจ้าวเป็นอาหารหลัก จากผลการตรวจวัดค่าร้อยละการยับยั้ง แสดงให้เห็นว่า ส่วนของผลมะตาดที่คนทั่วไปนำไปรับประทานหรือใช้ประกอบอาหาร มีสารพฤกษเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคนได้ หรือลดอัตราการย่อยสลายแป้งข้าวจ้าวได้ และจากค่า IC_{50} จะเห็นว่า สารสกัดผลมะตาดต้มสุกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าสารสกัดผลมะตาดสดประมาณ 2 เท่า ซึ่งประสิทธิภาพในการยังยั้งนี้ สอดคล้องกับปริมาณสารพฤกษเคมีซึ่งมีในสารสกัดผลมะตาดต้มสุกสูงกว่าในสารสกัดผลมะตาดสด จากข้อมูลดังกล่าวนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจในการที่จะนำผลมะตาดไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อการยับยั้งการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะมีผลช่วยลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่จะดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ (Kumar et al., 2011; Tsujita, 2015) โดยสันนิษฐานได้ว่า ในปริมาณที่เท่ากันการรับ ประทานผลมะตาดที่ผ่านการปรุงสุก จะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสในลำไส้เล็กและลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าการรับประทานผลมะตาดสด และจากการศึกษาความคงตัวของสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส แสดงให้เห็นว่าหากผู้ประกอบการต้องการจะนำผลมะตาดไปใช้ผลิตเป็นโภชนเภสัชสำหรับผู้ป่วยเบาหวานในเชิงพาณิชย์ก็สามารถทำได้ โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ในภาชนะทึบแสงและควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ๆ -20 องศาเซลเซียส ก็จะสามารถรักษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ไว้ได้ในช่วงระยะเวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตาม เพื่อให้มั่นใจว่าการรับประทานผลมะตาดจะสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานได้จริง ควรได้มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิต (in vivo) เป็นลำดับต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ในสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนที่รับประทานได้ของผลมะตาดต้มสุกมีปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคอนเดนส์แทนนินสูงกว่าในสารสกัดผลมะตาดสด และสารพฤกษเคมีดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนคนได้ดีกว่าสารสกัดผลมะตาดสด โดยสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสนี้มีความคงตัวในที่มืดอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 3 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ งบประมาณแผ่นดิน โดยผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณนางสาวชนานันท์ ศุภผลา และนางสาวสุภาพร วรรณา นักศึกษาปริญญาโท คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ช่วยปฏิบัติงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. (2548). สมุนไพรบำบัดเบาหวาน 130 ชนิด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เซเว่นพริ้นติ้งกรุ๊ป. หน้า 129.

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550) พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ปราจีนบุรี: ห้างหุ้นส่วนจำกัดเจตนารมณ์ภัณฑ์. หน้า 154.

วุฒ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย : รวมหลักเภสัชกรรมไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 353.

องค์ บรรจุน. (2553). แกงมะตาดหลายแนว. วารสารศิลปวัฒนธรรม 31(12): 36-40.

องค์ บรรจุน. (2557). ข้างสำรับมอญ. กรุงเทพฯ: มติชน. หน้า 111 -113.

Barrett, A. and Ndou, T. (2013). Inhibition of α-amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 1477-1486.

Barua, C.C., Yasmin, N. and Buragohain, L. (2018). A review update on Dillenia indica, its morphology, phytochemistry and pharma cological activity with reference to its anticancer activity. MOJ Bioequivalence and Bioavailability 5(5): 244-254.

Bernfeld, P. (1955). Amylase α and β. Enzymol. 1: 149-158.

Derosa, G., Limas, C.P., Macías, P.C., Estrella, A. and Maffioli, P. (2014). Dietary and nutraceutical approach to type 2 diabetes. Archives of Medical Science 10(2): 336–344.

Deshmukh, N.A., Okram, S., Angami, T., Rymbai, H. and Jha, A.K. (2017). Elephant apple (*Dillenia indica*). In Ghosh, S. N., Minor fruits: nutraceutical importance and cultivation. Delhi, India: JAYA Publishing House. pp. 409-420. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 9(2): 209-212.

Güneş, M., Dölek, Ü. and Elmastaş M. (2017). Phytochemical changes in heated Rosa species fruits and seeds. Czech Journal of Food Sciences 35: 345–351.

Hiele, M., Ghoos, H., Rutgeets, P. and Vantrappen, G. (1992). Effects of acarbose on starch hydrolysis. Study in healthy subjects, ileostomy patients, and in vitro. Digestive Diseases and Sciences 37(7): 105-64.

Hossain, S.J., Tsujiyama, I., Takasugi, M., Islam, Md. A., Biswas, R.S., and Aoshima, H. (2008). Total Phenolic Content, Antioxidative, Anti-amylase, Anti-glucosidase, and Antihista mine Release Activities of Bangladeshi Fruits. Food Science and Technology Research 14 (3): 261–268.

Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M. and Morgan, L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. FEBS Letters 579: 1653–1657.

Kobayashi, Y., Suzuki, M. and Satsu, H. (2000) Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5618–5623.

Kumar, S., Kumar, V. and Prakash, Om. (2011). Antidiabetic, hypolipidemic and histopa-thological analysis of Dillenia indica (L.) leaves extract on alloxan induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 4(5): 347-52.

Kumar, S., Kumar, V. and Prakash, Om. (2013). Enzymes inhibition and antidiabetic effect of isolated constituents from *Dillenia indica*. BioMed Research International 2013: 1-7.

Levin, R.J. (1994). Digestion and absorption of carbohydrates–from molecules and mem branes to humans. The American Journal of Clinical Nutrition 59 (3 Suppl): 690S-698S.

Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., de la Rosa, L.A., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla E. (2019). Inhibition of α-amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). Spectrochimica Acta Part A 206: 437–447.

Nimesh, S. and Ashwlayan, V.D. (2018). Nutraceuticals in the management of diabetes mellitus. Pharmacy and Pharmacology International Journal 6(2): 114-120.

Rasamalla, S., Mandava, K., Pal, B.C., Madhira, S., Rajeswari, B.U. and Chandra, J.N. (2017). Bio-assay guided fractionation and isolation of α-glucosidase inhibitory constituents from *Dillenia indica* L. fruit extracts. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 12(6): 68-74.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation sub-strates and antioxi dants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Sun, B., Richardo-Da-Silvia, J.M. and Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proantho-cyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4267–4274.

Saiful, Y.L. and Armania, N. (2014). Dillenia species: A review of the traditional uses, active constituents and pharmacological properties from pre-clinical studies. Pharmaceutical Biology 52(7): 890–897.

Toh, Z.S., Wanga, H., Yip, Y. M., Lu, Y., Lim, B.J.A., Zhang, D. and Huang, D. (2015). Phenolic group on A-ring is key for dracoflavan B as a selective noncompetitive inhibitor of α-amylase. Bioorganic and Medicinal Chemistry 23: 7641–7649.

Tsujita, T. (2015). Persimon-tannin, an α-amylase inhibitor, retards carbohydrate absorption in rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 62: 192-197.

Watkins, P.J., Drury, P.L. and Howell, S.L. (1996). Diabetes and its management. Fifth edition. Oxford: Blackwell Science Ltd. pp 3-217.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555–9.

❑❑❑❑❑