

ศิริพร ริยะจันทร์ : การประเมินฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดชั้นน้ำและ
ชั้นเอทิลอะซิเตทที่สกัดจากผล *Withania coagulans* และกลไกการออกฤทธิ์ในการลด
ระดับน้ำตาลในเลือด (EVALUATION OF ANTIDIABETIC ACTIVITY OF THE
WATER AND ETHYL ACETATE FRACTIONS FROM *WITHANIA COAGULANS*
FRUITS AND THE MECHANISM UNDERLYING THEIR HYPOGLYCEMIC
EFFECTS). อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.นวลน้อย จุฑะพงษ์, 117 หน้า.

Withania coagulans เป็นยาแผนโบราณของประเทศอินเดีย ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์
อายุรเวทพื้นเมืองเพื่อรักษาโรคเบาหวาน มีการศึกษารายงานฤทธิ์ต้านเบาหวานในหลอดทดลอง
และในสัตว์ทดลองของสารสกัดหยาบซึ่งมีสารประกอบจำนวนมากจากพืช *W. coagulans* อย่างไรก็ตาม
ก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ต้านเบาหวานของพืชชนิดนี้มีการศึกษาและตรวจสอบเฉพาะกลไกการ
ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารสกัดชั้นเอทิลอะซิ
เตทและชั้นน้ำที่สกัดจากผลของพืช *W. coagulans* มาทำการทดสอบเพื่อลดจำนวนชนิดของ
สารประกอบที่อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ของพืชลง โดยได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี
ความเป็นพิษ ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวานและสารประกอบในสารสกัดที่สามารถดูดซึมได้ ผลจาก
HPLC-MS แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทมีจำนวนชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ
ทางเคมีมากกว่าสารสกัดชั้นน้ำ จากโครมาโตแกรมของ HPLC พบว่าสารสกัดทั้งสองมีแท่งกราฟที่
มีมวลเท่ากัน คือ ที่ 471 และ 453 โดยมีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นสาร 17 β -Hydroxywithanolide
K หรือ Withanolide F สำหรับมวล 471 และ Coagulin C สำหรับมวลที่ 453 ผลการทดสอบความ
เป็นพิษในเซลล์แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชั้นน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG-2 น้อยกว่า แต่อย่างไร
ก็ตามเมื่อทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทและชั้นน้ำในหนูปกติ แสดงให้
เห็นว่าสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็น
พิษใดๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเป็นพิษต่อตับ ไต และตับอ่อน ฤทธิ์ที่ทำให้น้ำตาลในเลือดลดลง
ของหนูปกติถูกตรวจสอบโดยการทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลกลูโคส (OGTT) ผลการทดลอง
พบว่าสารสกัดชั้นน้ำเพิ่มความทนทานต่อน้ำตาลกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผล
ศึกษาในหนูเบาหวานที่ถูกชักนำโดย alloxan พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทลดน้ำตาลในเลือด
ได้เฉพาะวันที่ 5 ของการให้ยา แต่ไม่ลดลงในวันที่ 10 ขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน
ที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำมีการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดอย่างต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญจนกระทั่ง
วันที่ 10 ของการทดลอง ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสพบว่า
มีฤทธิ์เฉพาะในสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท ขณะที่ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินและฤทธิ์ยับยั้งการ

ดูดซึมกลูโคสถูกพบในสารสกัดทั้งสองชนิด จากผลการทดสอบการดูดซึมสารผ่านลำไส้โดยใช้ Caco-2 monolayer model และฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินชี้แนะว่า C1-C3 ที่มีมวล 471 และ 453 น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่ไปกระตุ้นการหลั่งอินซูลินเนื่องจากสารจะไปถึงบีต้าเซลล์ของตับอ่อนที่เป็นตำแหน่งที่ออกฤทธิ์จำเป็นจะต้องถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารก่อน ในลำดับสุดท้าย จากผลการทดลองด้านความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเบาหวาน สารสกัดชั้นน้ำจึงถูกเลือกเพื่อนำมาพัฒนาระบบนำส่งยา เมื่อเปรียบเทียบตัวนำส่งยาที่ประกอบด้วยอนุภาคนาโนไลโปโซมบรรจุสารสกัดชั้นน้ำ (Chnp+WF) อนุภาคนาโนไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดชั้นน้ำและเคลือบด้วยแป้งที่ย่อยง่าย (Chnp+SS+WF) และอนุภาคนาโนไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดชั้นน้ำและเคลือบด้วยแป้งที่ทนต่อการย่อย (Chnp+RS+WF) พบว่า Chnp+SS+WF เป็นระบบการนำส่งยาที่ดีที่สุด เนื่องจากสามารถเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์ต้านโรคเบาหวานของสารสกัดชั้นน้ำในสัตว์ทดลองได้ ดังนั้นตัวพาขนาดนาโนที่ผลิตขึ้นนี้น่าจะสามารถนำไปใช้ในการห่อหุ้มสารสกัดจากพืชเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาได้



SIRIPORN RIYAJAN : EVALUATION OF ANTIDIABETIC ACTIVITY OF THE WATER AND ETHYL ACETATE FRACTIONS FROM *WITHANIA COAGULANS* FRUITS AND THE MECHANISM UNDERLYING THEIR HYPOGLYCEMIC EFFECTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NUANNOI CHUDAPONGSE, Ph.D. 117 PP.

WITHANIA COAGULANS/ TOXICITY/ ANTIDIABETES/ α -GLUCOSIDASE/ INSULIN SECRETION/ GLUCOSE ABSORPTION/ INTESTINAL ABSORPTION/ CHITOSAN NANOPARTICLES.

Withania coagulans is a traditional medicine of India. It has been used in Ayurvedic and indigenous medicine to treat diabetic mellitus. *In vitro* and *in vivo* activities of crude extracts from *W. coagulans*, which contain many compounds have been reported. However, investigation of mechanism underlying its antidiabetic action was performed only in α -glucosidase inhibition. In this study, ethyl acetate and water fractions of *W. coagulans* fruits were used to narrow down the possible active ingredients of this plant. Evaluation of chemical composition, toxicity, antidiabetic action and absorbed compounds of the extracts were conducted in this study. The results from HPLC-MS showed more chemical components in EAF than in WF. HPLC chromatograms revealed that both fractions contained the same peaks at m/z 471 and 453, which could be 17 β -Hydroxywithanolide K or Withanolide F for m/z 471 and Coagulin C for m/z at 453. The results from the cytotoxicity tests demonstrated that WF produced less toxic effect to HepG-2 cells. However, the toxicity studies of EAF and WF, which were evaluated in normal mice indicated that both fractions did not

induce any signs of toxicity especially to liver, kidney and pancreas at dose 50 mg/kg. The hypoglycemic activity was studied by oral glucose tolerant test (OGTT) in normal mice. It was found that WF significantly improved glucose tolerance similar to glibenclamide ($P < 0.05$). From antidiabetic study in alloxan-induced diabetic mice, EAF showed a significant decrease in blood glucose level at day 5, but not at day 10. While, blood glucose level of diabetic mice treated with WF continuously declined and significantly decreased until day 10. The α -glucosidase inhibitory effect was presented only in EAF, while insulin secretion and inhibitory glucose absorption activities were shown in both of fractions. The results from intestinal absorption in Caco-2 monolayer model and insulin secretion experiment suggested that C1-C3 detected at m/z 471 and 453 may be responsible for insulin secretion activity because a chemical must be absorbed through gastrointestinal tract before reaching pancreatic β -cells, the site of action. Finally, based on the toxicity and antidiabetic efficiency, the WF was selected as a choice model for developing drug delivery system. Among chitosan nanoparticles loaded with water fraction (Chnp+WF), chitosan nanoparticles loaded with water fraction coated with soluble starch (Chnp+SS+WF) and chitosan nanoparticles loaded with water fraction coated with resistant starch (Chnp+RS+WF), the *in vivo* results indicated that (Chnp+RS+WF) was the best drug delivery system, as it extended duration of the antidiabetic effect of WF. Therefore, this synthesized nanocarriers may be used for encapsulate a plant extract as drug delivery system.

School of Preclinic

Academic Year 2018

Student's Signature Siriporn RiyajanAdvisor's Signature 26.6