

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากส่วนสกัดเอทานอลของตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.)

Bioactive Compounds, Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities from Ethanolic Extracts of Tot Mu Tot Ma (*Paederia linearis* Hook.f.)

พรทิพย์ ปัดตาเคนัง¹, วิลาวรรณย์ พร้อมพรม^{2*}, วรณชัย ชาแท่น²

Phorntip Padtakenang¹, Wilawan Promprom^{2*}, Wannachai Chatan²

Received: 3 October 2019 ; Revised: 30 January 2020 ; Accepted: 18 February 2020

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดหยาบส่วนราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ซึ่งสกัดด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารพิษเคมีเบื้องต้น ตรวจพบสารพิษเคมีในทุกสารสกัด คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม

การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) พร้อมทั้งวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ก็ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบมีปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 174.42 ± 2.07 mgGAE.g⁻¹ และ 41.32 ± 1.94 mgQE.g⁻¹ ใบของตดหมูตดหมายังแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดของทั้งสองวิธี ด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP คือ ร้อยละ 40.73 ± 6.68 และ 21.35 ± 5.80 mMFe.g⁻¹ นอกจากนี้พบว่าส่วนใบของตดหมูตดหมาแสดงฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสมากที่สุด คือ ร้อยละ 93.04 ± 1.63 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมาอาจจะสามารถใช้ในการบำบัดโรคเบาหวานชนิดที่ 2

คำสำคัญ: ตดหมูตดหมา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แอลฟาไกลูโคซิเดส

Abstract

The aims of this work were to study bioactive compounds, antioxidant and alpha glucosidase inhibitory activities of Tot Mu Tot Ma (*Paederia linearis*) in crude extracts of root, stem and leaf. The maceration method was used with ethanol as solvent. Bioactive compounds in the phytochemical screening study, were flavonoid, terpenoid, saponin, steroid and cardiac glycosides. Total phenolic and flavonoid content were measured in all extracts. Investigation of antioxidant activities used 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In vitro α -glucosidase inhibitory assays were performed in this study. The results showed that the ethanolic leaf extracts had the highest total phenolic content (174.42 ± 2.07 mgGAE.g⁻¹) and flavonoid content (41.32 ± 1.94 mgQE.g⁻¹). Antioxidant activity in leaf extracts was high in both testing methods, i.e. DPPH method ($40.73 \pm 6.68\%$) and FRAP method (21.35 ± 5.80 mMFe.g⁻¹). In addition, the leaf of *P. linearis* revealed highest alpha glucosidase inhibitory activity at $93.04 \pm 1.63\%$. The results suggest that the leaf extract of *P. linearis* may be used to treat type 2 diabetes.

Keywords: *Paederia linearis* Hook. F., Bioactive compound, Antioxidant activities, Alpha glucosidase

¹ นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

¹ Master of Science (Biology Education), Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province. 44150
E-mail: kruphorntip28@gmail.com

² Assistant Professor, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province. 44150

* Correspondent author : Wipromprom@gmail.com

บทนำ

ปัจจุบันโลกเผชิญกับปัญหาสุขภาพ โดยเฉพาะโรคเรื้อรังมีมากขึ้น มีข้อสันนิษฐานว่าอนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาเหตุสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หากพบว่าในร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนเกินความสามารถของกลไกการต้านออกซิเดชันภายในเซลล์แล้ว โมเลกุลอนุมูลอิสระอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ สภาพของโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย เช่น ภาวะความแก่ชรา โรคหัวใจและหลอดเลือด และถ้าอนุมูลอิสระสะสมในร่างกายเป็นระยะเวลายาวนานจะส่งผลทำให้เกิดภาวะโรคเบาหวาน¹ โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) ซึ่งเป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes) แนวทางในการศึกษาการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คือ ศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งนับว่าเป็นแนวทางที่น่าสนใจอย่างหนึ่ง เพราะเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่บริเวณผนังของลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสทำให้สามารถชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการบำบัดรักษาโรคเบาหวาน ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ อะคาโบส (*acarbose*) โวกลิโบส (*voglibose*) และไมกลิทอล (*miglitol*) แต่เมื่อรับประทานในระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้เกิดอาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง² ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงสนใจศึกษาพืชสมุนไพรที่ลดอาการข้างเคียงและมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งอาหารและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและนำมาใช้รักษาโรคเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตดหมุดตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้เถาขนาดเล็กขึ้นตามธรรมชาติเลื้อยตามพื้นดิน หรือเกี่ยวพันต้นไม้อื่น ๆ ก่อนหน้านี้มีรายงานการวิจัยของตดหมุดตดหมา โดยใช้สารสกัดจากรากที่สกัดด้วยเมทานอล ตรวจพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และฟีนอลิก (phenolic) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี α -carotene bleaching assay, DPPH radical-scavenging assay และวิธี Reducing power ability assay พบว่า สารสกัดจากรากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydrotoluene (BHT) และ ascorbic acid ดังนั้นสารสกัดจากรากตดหมุดตดหมาจึงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและไม่เป็นพิษในระดับเซลล์⁴

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของพืชสกุล *Paederia* เช่น สารสกัดจากใบ *P. foetida* ที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานไกลเบนคลาไมด์⁵ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในปริมาณสูง ที่ทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)⁶

จากความสำคัญของตดหมุดตดหมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ เบื้องต้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรรตดหมุดตดหมาไปใช้เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

ต้นพืชตดหมุดตดหมา เก็บจากบ้านท่าขอนยาง บริเวณหนองดินบ้าน หมู่ที่ 3 ตำบลท่าขอนยาง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ในช่วงเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2560 โดยมีตัวอย่างพรรณไม้ที่ใช้อ้างอิงงานวิจัย คือ *P. Pad-takenang* No. 01 ที่เก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และระบุชนิดพืชจากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย ตรวจสอบจากเอกสารทางอนุกรมวิธานคือ Puff (2007)³

2. วิธีการสกัดสารตัวอย่าง

นำราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมามาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปบดให้ละเอียด สกัดด้วยเอทานอล 95%⁷ ด้วยวิธีการแช่หมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Hei-VAP Advantage

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นดัดแปลงมาจากวิธีของ Ayoola และคณะ (2008)⁷ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้

3.1 การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10% (H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 mL เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำของเหลวที่ได้จากการกรองไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (dragendorff) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

3.2 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 g ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 mL เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.3 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 mL เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 mL ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

3.4 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมน้ำกลั่น 10% (H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 mL เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปเติมน้ำละลายแอมโมเนีย 10% (NH_3) ปริมาตร 0.5 mL เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3.5 การตรวจสอบแทนนิน (tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 mL นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1% ($FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

3.6 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมน้ำกลั่นปริมาณ 5.0 mL นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

3.7 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 mL เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเอซีติก ปริมาตร 0.5 mL เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์

3.8 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 mL เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1% ($FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมน้ำละลายเอซีติก จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมน้ำละลายซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 mL ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging⁷

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 mM โดยชั่ง DPPH 10.0 mg ละลายในเอทานอล 500 mL และเตรียมสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ppm โดยนำสารสกัดจากที่เตรียมข้างต้น จำนวน 750 μ L และ DPPH 0.1 μ L ในอัตราส่วน 1:1 ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm วัดค่าดูดกลืนแสงทุกหลอดรวมทั้งหลอดควบคุม (DPPH) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่า % Radical scavenging activity และค่า IC_{50} โดยใช้สูตรคำนวณ % Radical scavenging ดังนี้

$$\% \text{ Radical Scavenging} =$$

$$\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A_{\text{control}}$$

เมื่อ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP⁸

เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power) reagent และสารตัวอย่าง 0.2 g ละลายในเอทานอล 10 ml แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 2000-50 ppm โดยเปิดสารละลาย FRAP ปริมาตร 950 μ L ลงในหลอดทดลอง เติมสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 50 μ L ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm สารมาตรฐานทำเช่นเดียวกันกับสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน และค่า IC_{50} โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละการต้านออกซิเดชัน} = [(A_{595}-B)/M] \times 100$$

โดยที่ A 595 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานเพอร์ริสไอออน

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเพอร์ริสไอออน

6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส⁹

เตรียม α -glucosidases และสารตัวอย่าง 0.2 g ละลายใน DMSO 10 mL ให้มีความเข้มข้น 2000-50 ppm โดยนำสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา 1 mg/mL ปริมาตร 20 μ L ใน 100 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 เติมสารละลายไนโตรฟีนิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มีความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 50 μ L จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายแอลฟาไกลูโคซิเดส ปริมาตร 0.1 Unit/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วทำการคำนวณร้อยละของกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และค่า IC_{50} โดยใช้สูตร $[(ABS_{blank}-ABS_{sample})/ABS_{blank}] \times 100$

เมื่อ ABSblank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

ABSsample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

7. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากวิธีของ Basma และคณะ (2017)¹⁰ นำสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 1 mg/mL ปริมาตร 200 μ L เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% 500 μ L น้ำกลั่น 500 μ L และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% (w/v) 800 μ L ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

8. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 1 mg/mL ปริมาตร 200 μ L เติมสารละลาย 5% ($NaNO_2$) ปริมาตร 75 μ L ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 μ L แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที หลังจากนั้นเติม 1 M ($NaOH$) ปริมาตร 500 μ L และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 mL ด้วยน้ำกลั่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE.g⁻¹dried extract)

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (standard error means, SEM) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองวิเคราะห์โดย one-way ANOVA ตามด้วย post-hoc Duncan's new multiple range test

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

Table 1 การทดสอบพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากส่วน ราก ลำต้นและ ใบจำนวน 8 กลุ่ม พบสารพิษเคมีจำนวน 5 กลุ่มในทั้ง 3 ส่วน คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

Table 1 Phytochemical analysis of screening of root, stem and leaf of *Paederia linearis* Hook.f.

Phytochemicals	Ethanollic Extracts		
	Root	Stem	Leaf
Alkaloids	+	-	-
Flavonoids	+	+	+
Terpenoids	+	+	+
Anthraquinones	+	-	-
Tannins	-	+	+
Saponins	+	+	+
Steroids	+	+	+
Cardiac Glycosides	+	+	+

+ = Presence, - = Absence

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH และ FRAP

Table 2 Antioxidant test results of root, stem and leaf of extracts of *Paederia linearis* Hook.f. with DPPH assay method and FRAP method

Part of <i>Paederia linearis</i> Hook.f.	DPPH		FRAP	
	% Scavenging activity	IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP value (mM Fe.g ⁻¹)	IC ₅₀ (µg/mL)
Root	17.92±1.70 ^a	1.41±0.63	6.63±3.28 ^b	0.47±0.59
Stem	17.49±2.46 ^a	1.84±0.48	4.36±2.21 ^b	0.52±0.63
Leaf	40.73±6.68 ^b	0.44±0.67	21.35±5.80 ^a	0.04±0.97
Vitamin C	27.09±5.48 ^a	0.77±0.15	-	-

^{a-b} Mean within a column with different letters are different (p < 0.05), One way ANOVA followed by post-hoc Duncan's new multiple range test

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า สารสกัดจากใบตดหมุดหมามีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงที่สุด ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่า เท่ากับ 93.04±1.63 ; 0.81±0.10 µg/mL, 86.62±1.56 ;

Table 2 การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากใบตดหมุดหมามีร้อยละของการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดและค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.73 ± 6.68 ; 0.44±0.67 µg/mL, 17.92±1.70 ; 1.41±0.63 µg/mL และ 17.49±2.46 ; 1.84±0.48 µg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีร้อยละของการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 27.09± 5.48 ; 0.77±0.15 µg/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมุดหมาสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) พบว่า สารสกัดจากใบตดหมุดหมามีร้อยละของการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 21.35±5.80 mM Fe.g⁻¹ ; 0.04±0.97 µg/mL, 6.63± 3.28 mM Fe.g⁻¹ ; 0.47±0.59 µg/mL และ 4.36 ± 2.21 mM Fe.g⁻¹ ; 0.52±0.63 µg/mL ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมุดหมาสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.20± 0.09 µg/mL และ 48.78±2.75 ; 3.65±0.07 µg/mL ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ซึ่งมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เท่ากับ 90.78±0.69 ; 0.98±0.02 µg/mL แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับราก และลำต้น Table 3

Table 3 Results of α -glucosidase inhibition of root, stem and leaf of extracts of *Paederia linearis* Hook.f. with *p*-nitrophenol colorimetric method

Part of <i>Paederia linearis</i> Hook.f.	% α -glucosidase inhibition	IC ₅₀ (μ g/mL)
Root	86.62 $\pm$ 1.56 ^a	2.20 $\pm$ 0.09
Stem	48.78 $\pm$ 2.75 ^b	3.65 $\pm$ 0.07
Leaf	93.04 $\pm$ 1.63 ^c	0.81 $\pm$ 0.10
Acarbose	90.78 $\pm$ 0.69 ^{ac}	0.98 $\pm$ 0.02

^{a-c} Mean within a column with different letters are different ($p < 0.05$), One way ANOVA followed by post-hoc Duncan's new multiple range test

4. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

Table 4 พบว่า ส่วนสกัดจากใบตดหมุดหมา มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ ราก และลำต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 174.42 $\pm$ 2.07 mgGAE.g⁻¹, 87.86 $\pm$ 2.51 mgGAE.g⁻¹ และ 85.21 $\pm$ 4.68 mg GAE.g⁻¹ ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมุดหมา มีปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากทุกส่วน

สารสกัดจากใบตดหมุดหมา มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดรองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 41.32 $\pm$ 1.94 mgQE.g⁻¹, 33.38 $\pm$ 3.31mgQE.g⁻¹ และ 29.99 $\pm$ 1.55 mgQE.g⁻¹ ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมุดหมา มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากราก และลำต้น

Table 4 Total phenolic content and total flavonoids content from root, stem and leaf extracts of *Paederia linearis* Hook.f.

Part of <i>Paederia linearis</i> Hook.f.	Total phenolic content (mg GAE.g ⁻¹)	Total flavonoids content (mg QE.g ⁻¹)
Root	87.86 $\pm$ 2.51 ^b	33.38 $\pm$ 3.31 ^b
Stem	85.21 $\pm$ 4.68 ^b	29.99 $\pm$ 1.55 ^b
Leaf	174.42 $\pm$ 2.07 ^a	41.32 $\pm$ 1.94 ^a

^{a-b} Mean within a column with different letters are different ($p < 0.05$), One way ANOVA followed by post-hoc Duncan's new multiple range test

วิจารณ์และสรุปผล

ในตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์จากส่วน ราก ลำต้น และใบได้ดี

โดยพบสารฟลาโวนอยด์จำนวน 5 กลุ่มที่เหมือนกันในทุกสารสกัด คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจากเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร¹¹ นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ผลการศึกษาทั้งสองวิธีนี้มีความสอดคล้องไปในแนวทางเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดหมา มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด และมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร เนื่องจากสารสกัดจากราก ลำต้น และใบในการศึกษครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบตดหมุดหมา อาจมาจากสารจำพวกฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม ที่พบว่าสารสกัดจากใบของตดหมุดหมา ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silpi และคณะ (2014)¹² ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในพืชสกุลเดียวกัน คือ *P. foetida* พบว่า มีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี โดยจะเห็นว่าสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี เป็นทั้งตัวจับอนุมูลอิสระ และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส¹³ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการต้านเบาหวาน โดยศึกษาการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากราก ลำต้น และใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยเฉพาะส่วนสกัดจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มที่มีขั้วค่อนข้างสูง นอกจากนั้นยังพบสารอินทรีย์ที่มีขั้วสูงส่วนใหญ่ที่จะพบเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มีน้ำตาลติดอยู่กับโครงสร้าง¹⁴ ส่งผลต่อการยับยั้งได้ดีขึ้น นอกจากนั้นสารดังกล่าวก็ยังส่งผลทำให้เกิดการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน เช่น ไตรเทอร์พีนอยด์

ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก^{15,16} จากผลการทดลองของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา พบฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเบาหวานได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bhatnagar และคณะ (2016)¹⁷ ที่พบว่าสารสกัดจากใบ *P. foetida* มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส มีปริมาณฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Borgohain และคณะ (2017)⁵ พบว่า สารสกัดจากใบ *P. foetida* สามารถรักษาโรคเบาหวานได้ โดยผ่านการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส อาจเกิดจากตัวยับยั้งของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมุดตดหมา ซึ่งสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยเกิดจากการออกฤทธิ์เสริมกัน หรืออาจจะเป็นสารองค์ประกอบหลักที่อยู่ในส่วนของสารสกัด มีผลทำให้โครงสร้างของแอลฟาไกลูโคซิเดสเปลี่ยนแปลง หรือไปแย่งจับบริเวณเร่งปฏิกิริยา จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับซับสเตรตได้ จากการศึกษาดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งควรจะต้องแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งศึกษากลไกการยับยั้ง เพื่อนำไปพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิด ที่ 2 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำงานวิจัยจนส่งผลให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Maritim AC, Sanders RA and Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003 ; 17(1): 24-38.
- Borges ME, Silverira GA and Carvalho I. α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron 2006 ; 62(44): 10277-10320.
- Puff C. Revision of the genus *Paederia* L. (Rubiaceae-*Paederia*) in Asia. A Multidisciplinary study 2007 ; 3: 207-289.
- Sudta P, Sabyjai C and Wanirak K. Phytochemical analysis, in vitro antioxidant and Cytotoxic activity of extracts of *Paederia linearis* Hook.f. root. J Sci Phetchaburi Rajabhat University 2013 ; 5-18.
- Borgohain MP, Chowdhury L, Ahmed S, Bolshette N, Devasani K, Das TJ, Mohapatra A and Lahkar M. Renoprotective and antioxidative effects of methanolic *Paederia foetida* leaf extract on experimental diabetic nephropathy in rats. J Ethnopharmacology 2017 ; 198: 451-459.
- Kanokporn S, Supap S and Kantarat J. Gastroprotective effects and antioxidant activities of *Paederia pilifera* Hook.f. root extract. J Sci 2014 ; 41(5): 1121-1131.
- Ayoola GA, Coker H, Adesegun SA, Adepoju AA, Obaweya K, Ezennia EC. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. J Pharmaceutical 2008 ; 7(3): 1019-1024.
- Benzie FF, and Anek H. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power : the FRAP assay. J Analytical Biochemistry 1996 ; 239(1): 70-76.
- Wongsa P, Chaiwarit J and Zamaludien A. n vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. J Food Chemistry 2012 ; 131(3): 964-971.
- Basma AA, Zakaria Z, Latha LY, and Sasidharan S. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. J Tropical Medicine 2017 ; 4(5): 386-390.
- Ahmad R, Ali AM, Isral DA, Ismai NH, Sharik, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. J Life Sci 2005 ; 76: 1953-1964
- Silpi C, Sayeed A and Kuldeep S. Comparison of in vitro antioxidant potential of fractioned *Paederia foetida* leaf extract. Int J Drug Dev. & Res 2014 ; 6 (2): 105-109.
- Sung HJ, Kyoung SH, Kyoung SM, Lee OH, Jang HD, Kwon YI. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic effects of Omija (*Schizandra chinensis*) fruit. Int J Mol Sci 2011 ; 12(2): 1359-1370.

14. Thanakosai W, Phuwapraisirisan P. First identification of α -glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. Natural Product Communications 2013 ; 8(8): 1085-1088.
15. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, Hilaly JEI and Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). J Ethnopharmacology 2001 ; 77: 175-182.
16. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Science and Human Wellness 2014 ; 3(3): 136-174.
17. Bhatnagar S and Sahoo M. Cytotoxic and antidiabetic activity of leaf extracts of *Paederia foetida* L. J Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016 ; 8(4): 659-662.