

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเบอร์บีรีนที่แยกจากเถาแห้ง Biological Activities of Berberine Isolated from *Coscinium fenestratum* Stem

ชุตินา แก้วพิบูลย์*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

ณวงศ์ บุญนาค

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Chutima Kaewpiboon*

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,
Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Nawong Boonnak

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University,
Khoa Roob Chang, Muang, Songkhla 90000

บทคัดย่อ

การแยกสารเบอร์บีรีนจากสารสกัดหยาบเมทานอลของเถาแห้งให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีในระบบตัวทำละลายผสมเมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (13 : 0.7 : 1) แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปี จากนั้นทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเบอร์บีรีน ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดส และอะไมเลส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 พบว่าสารเบอร์บีรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ A549 ได้ดีที่สุดในค่า IC₅₀ 20.33±3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังนั้นการศึกษานี้จึงให้ข้อมูลที่สำคัญของสารต้นแบบเพื่อการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง

คำสำคัญ : เหม้; เบอร์บีรีน; ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abstract

Berberine from crude methanol extract of *Coscinium fenestratum* stem was purified by column chromatography using methanol : acetic acid : water solvent system (13 : 0.7 : 1). The

berberine structure was elucidated by spectroscopic techniques. After that, the biological activities of berberine were investigated, including α -glucosidase and amylase inhibitory activities, antioxidant activities, and cytotoxicity against human lung cancer cell line A549. We found that berberine showed effective cytotoxicity against A549 cell line with an IC_{50} value of $20.33 \pm 3.51 \mu\text{g/mL}$. Therefore, this study provided important information for a promising lead compound for anticancer drug development.

Keywords: *Coscinium fenestratum*; berberine; biological activity

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งในพืชสมุนไพรแต่ละชนิดนั้นจะมีสารพฤกษเคมีที่มีสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกัน เช่น การออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนของมนุษย์ การกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ฯลฯ

แห้ว [*Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr.] เป็นพืชในวงศ์ Menispermaceae ซึ่งพบตามท้องถื่นของแต่ละภาคในประเทศไทย มีการนำเอาแห้วมาใช้ป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน ข้ออักเสบ มะเร็ง โคล레스เตอรอลในเลือดสูง เป็นต้น [1] แห้วมีสารเบอร์เบอรีน (berberine) เป็นองค์ประกอบหลัก มีโครงสร้างทางเคมีเป็นไอโซควิโนลีนอัลคาลอยด์ (isoquinoline alkaloid) [2] ซึ่งมีรายงานการทดลองทางคลินิกพบว่าสารเบอร์เบอรีนออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด [3] ต้านอนุมูลอิสระ [4] และต้านมะเร็ง [5,6]

ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจแยกเบอร์เบอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ รวมถึงการนำไปใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บรักษาพรรณไม้แห้งและระบุชนิดของพืช

เลือกชิ้นส่วนพืชที่สมบูรณ์เป็นธรรมชาติ ไม่มีตำหนิ ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผลนำมาวางเรียงในกระดาษหนังสือพิมพ์พับครึ่ง แล้วจัดให้เป็นระเบียบ สลับคว่ำหงาย วางในแนวทแยงหรือเป็นรูปซิกแซกเป็นรูปตัวอักษร M, N, V, W และ Z ปิดด้านบนและด้านล่างด้วยกระดาษสังหรือแผ่นไม้ รัดเชือกรวมกัน แล้วนำไปเก็บรักษาที่เตาอบพันธุไม้ชนิดใช้ความร้อนจากหลอดไฟ 2-3 วัน นำตัวอย่างพืชอัดแห้งที่ดีที่สุด มาจัดวางบนกระดาษแข็ง และเย็บติดกับกระดาษ สำหรับผลที่ตากแห้งใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็กพับปากถุง เย็บตายติดกับกระดาษทางซ้ายด้านล่าง จากนั้นกรอกข้อมูลลักษณะเด่นของพืชลงในแบบฟอร์มให้ครบถ้วนเพื่อนำมาใช้ในการระบุชนิดของพืช และเก็บในห้องรักษาพรรณไม้แห้ง

2.2 การสกัดสารจากแห้ว

นำเปลือกแห้วมาทำให้แห้ง โดยอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นบดให้ละเอียด และนำผงแห้ว 500 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์เขย่าเป็นครั้งคราว

และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) และคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิตของสาร (% extraction yield) จากสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = (\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ} \div \text{น้ำหนักของพืช}) \times 100 \quad (1)$$

2.3 การแยกสารเบอร์บีรีนให้บริสุทธิ์

แยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ใช้ silica gel 100 (Merck) เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้ตัวทำละลายผสมเมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (13:0.7:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMRs, nuclear magnetic resonance spectroscopy) ความถี่ 300 MHz โดยนำสารที่ได้ละลายในตัวทำละลาย CDCl₃ และวิเคราะห์ จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิง [7]

2.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้นจาก Baker's yeast

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสตัดแปลงจากวิธีของ Babu และคณะ (2001) [8] เพื่อติดตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ โดยมี p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosidase (PNP-G) เป็นสารตั้งต้นที่ไม่มีสี เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น PNP-G ไปเป็น p-nitrophenol ซึ่งเป็นสารสีเหลืองใส โดยการทดลองมีดังนี้ เติมนอร์บีรีน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม 1 โมลาร์

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ปริมาตร 38 ไมโครลิตร ใน 96 well plate ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปป่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม (PNP-G) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ของแอลฟาไกลูโคซิเดสจากสมการที่ 2 โดยใช้อะคาร์โบส (acarbose) ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นสารควบคุมการทดลองเชิงบวก (positive control)

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}}) \div A_{\text{Blank}}] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ A_{Blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมสาร; A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เติมสาร

2.5 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ แอลฟาอะไมเลสเบื้องต้นจาก *Aspergillus oryzae's* amylase

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดแปลงจาก Moazzami และคณะ (2005) [9] เพื่อติดตามปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ โดยมีการใช้แป้งมัน (potato starch) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาและจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อะไมเลสไปเป็นน้ำตาล ซึ่งสามารถตรวจสอบแบ่งที่เหลื่ออยู่ โดยใช้สารละลายไอโอดีน การทดลองมีดังนี้ เติมนอร์บีรีน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์อะไมเลส และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำแป้ง (soluble starch) และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ใน 96

well plate จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเติม สารละลายไอโอดีน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร วัดค่า ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาว คลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ของเอนไซม์อะไมเลสจากสมการที่ 3 โดยใช้ยาอะคาโบส (acarbose) ซึ่งเป็นยารักษาโรค เบาหวานชนิดที่ 2 เป็นสารควบคุมการทดลองเชิงบวก

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \div A_{\text{control}}] \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่เติมเอนไซม์อะไมเลส; A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของของปฏิกิริยาที่เติมเอนไซม์อะไมเลส

2.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธีการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazylradical) [8] โดยเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเอทานอล 10, 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วนำเบอร์ปรีนทุกความเข้มข้นใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติม สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร โดยทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการ กำจัด อนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH radical scavenging) จากสมการที่ 4 เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่สามารถทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (EC_{50})

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) \div A_{\text{control}}] \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH;

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ด้วยวิธี MTT ดัดแปลงจากวิธีของ Kaewpiboon และคณะ (2018) [9] โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด และเซลล์ปกติในอาหาร RPMI และ DMEM ตามลำดับ ที่เติม FBS ร้อยละ 10 สารยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin ร้อยละ 1 เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ร้อยละ 5 ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนมี ความหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมดในขวด เพาะเลี้ยงเซลล์จึงแยกเซลล์ออกจากภาชนะและนับ จำนวนเซลล์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96-well plate โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมเบอร์ปรีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปใน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม เป็น เวลา 72 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย MTT 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่ สภาวะเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโน เมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการ อยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) จากสมการที่ 5 นำค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อ หาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

$$\% \text{ cell viability} = (OD_C \div OD_T) \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ OD_T คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับสาร ทดสอบ; OD_C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้ รับสารทดสอบ (ชุดควบคุม)

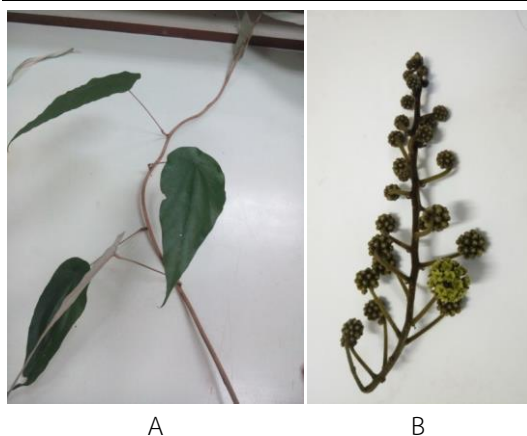


Figure 1 *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. (A) leaves sample, alternate, exstipulate, broadly ovate, rounded, truncate or shallowly cordate at base, acuminate at apex, (B) flowers unisexual, small, yellowish or whitish; sepals 9, in 3 whorls, imbricate, densely sericeous-pilose; petals absent

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 การเก็บรักษาพรรณไม้แห้งและระบุชนิดของพืช

แห้งที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae ซึ่งลักษณะเด่นของพืชที่นำมาระบุวงศ์ คือ เป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็งหรือเนื้ออ่อน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ไม่มีหูใบ ดอกขนาดเล็กมากปกติดอกแยกเพศอยู่คนละต้น กลีบเลี้ยงมักมี 6 กลีบ เรียงเป็นสองชั้น กลีบดอกมักมี 6 กลีบ หรือน้อยกว่าหรือไม่มีกลีบดอก เกสรเพศผู้ 3 หรือ 6 อัน เป็นผลแบบชนิดผลเมล็ดเดี่ยว (รูปที่ 1)

3.2 การสกัดสารจากเถาแห้ง

การสกัดเถาแห้งด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7

วัน และเมื่อระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งได้ร้อยละผลผลิต (% yield) 4.6 จากนั้นตรวจสอบสารพฤษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์ที่แยกได้ด้วยวิธีของดราเจนดรอพ (Dragendorf) พบว่าสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เนื่องจากสีเกิดตะกอนสีส้ม

3.3 การแยกสารเบอร์บีรีนให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel 100 (Merck) เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายผสมเมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (13 : 0.7 : 1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเก็บสารละลายได้ทั้งหมด 22 ส่วน และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่าสารส่วนที่ 4-7 มีความบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกัน และจัดเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เมื่อทดสอบด้วยวิธีของดราเจนดรอพ (รูปที่ 2) จากนั้นจึงรวมส่วนที่ 4-7 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี เพื่อระบุโครงสร้างของสารที่แยกได้ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัม ¹H-NMR (ตารางที่ 1) สามารถยืนยันโครงสร้าง คือ สารเบอร์บีรีน (รูปที่ 3)

การวิเคราะห์ UV-Vis spectrum และ ¹H NMR spectrum ของสารที่แยกได้พบการปรากฏสัญญาณ (ตารางที่ 1) ซึ่งตรงกันกับข้อมูลของ Natural Products Chemistry III [7] จึงสรุปได้ว่าสารที่แยกได้คือ เบอร์บีรีน ดังนั้นการแยกสารเบอร์บีรีนจากเถาแห้ง เมื่อตรวจสอบทางพฤษเคมีของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และระบุโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี พบว่าสามารถแยกสารเบอร์บีรีนบริสุทธิ์

Table 1 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) spectral data of isolated compound from *C. Fenestratum* and standard berberine

Isolated compounds		Standard berberine*	
Proton positions	Chemical shift	Proton positions	Chemical shift
1	7.67 (1H,s)	1	7.79 (1H,s)
4	6.97 (1H,s)	4	7.09 (1H,s)
5	3.31 (17H,m)	5	3.22 (2H,t)
6	4.89 (2H,m)	6	4.95 (2H,t)
8	9.77 (1H,s)	8	9.91 (1H,s)
11	8.13 (1H,d,9Hz)	11	8.20 (1H,d)
12	8.00 (1H,d,9Hz)	12	8.01 (1H,d)
13	8.71 (1H,s)	13	8.96 (1H,s)
2,3-OCH ₂ O	6.11 (2H,s)	2,3-OCH ₂ O	6.17 (2H,s)
9-OCH ₃	4.20 (3H,s)	9-OCH ₃	4.07 (3H,s)
10-OCH ₃	4.21(3H,s)	10-OCH ₃	4.10 (3H,s)

*Natural Products Chemistry III [7]



$R_f = 0.71$

Figure 2 TLC of (A) standard berberine and (B) isolated compound from *C. Fenestratum* was performed along with on a silica gel plate using methanol:acetic acid: water (13: 0.7: 1). The orange spots were visualized by spraying with Dragendorff's reagent.

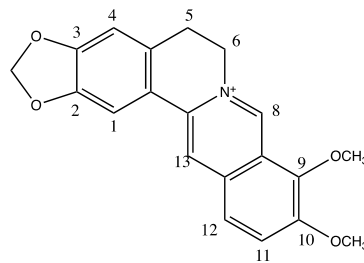


Figure 3 Structure of berberine

3.4ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสและอะไมเลส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสและอะไมเลสของเบอร์เบอรีน โดยใช้อะคาร์โบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่าสารเบอร์เบอรีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส และอะไมเลส มีค่า IC_{50} 126.24 ± 12.14 และ 396.67 ± 33.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอะคาร์โบสที่มีค่า IC_{50} 12.35 ± 0.92 และ 32.00 ± 1.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสารเบอร์เบอรีน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับ การลดระดับน้ำตาลในเลือดได้น้อยกว่าสารควบคุมเชิงบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jhong และคณะ (2015) ที่พบว่าเบอร์เบอรีนมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสและอะไมเลสค่อนข้างต่ำ (ต่ำกว่าอะคาร์โบสประมาณ 6 เท่า) [10] อย่างไรก็ตาม เบอร์เบอรีนอาจมีกลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดอื่นในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว เช่น เอนไซม์เบต้า กลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ในลำไส้เล็ก [11]

3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay พบว่าเบอร์เบอรีนมีค่า

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) 201.67 ± 12.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอบิกซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกที่มีค่า EC_{50} 8.5 ± 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าเบอร์บีรีนมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารควบคุมเชิงบวก โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pongkittiphan และคณะ (2015) [12] ที่พบว่าสารเบอร์บีรีนมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ มีค่า EC_{50} มากกว่า 500 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของสารเบอร์บีรีนไม่เหมาะสมในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจากสารที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน NH_2 หรือ OH ในตำแหน่ง ortho [13]

3.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549 cell lines) โดยมียาต้านมะเร็งอีโทโพไซด์ (etoposide) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลการทดลองพบว่าเบอร์บีรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) 20.33 ± 3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับยาอีโทโพไซด์ที่มีค่า IC_{50} 65.00 ± 1.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ ที่พบว่าเบอร์บีรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด โดยกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ อะพอโทซิสผ่านการยับยั้งวิถี MMP2 และ Bcl-2/Bax [14] นอกจากนี้พบว่าสารเบอร์บีรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ อีก [15,16] รวมถึงสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการทำงานของ N-acetyl transferase (NAT) ในเซลล์ มะเร็งปอด ซึ่งมีผลต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม [17]

ดังนั้นสารเบอร์บีรีนจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งน่าสนใจในการนำไปศึกษา กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งในรูปแบบอื่น ๆ เช่น การยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis) การลดการดื้อยา (drug resistance) และการสร้างเซลล์ใหม่ (cancer stem cell) ของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการศึกษาความเป็นพิษของสารเบอร์บีรีนที่มีต่อเซลล์ปกติ เพื่อให้ทราบแน่ชัดถึงความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งของเบอร์บีรีน

4. สรุป

เบอร์บีรีนที่แยกได้จากเถาห้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} 20.33 ± 3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่ามีค่าต่ำกว่ายาอีโทโพไซด์ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงให้ข้อมูลที่สำคัญของสารต้นแบบ เพื่อการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2558 และทุนสนับสนุนบางส่วนจากเงินรายได้โครงการวิจัยของสาขาวิชาชีววิทยา และสาขาวิชาคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

6. References

- [1] Singburadom, N. , 2015, The alkaloid Berberine isolated from *Coscinium fenestratum* is an inhibitor of phytopathogenic

- fungi, J. Biopest. 8: 28-36.
- [2] Singh, T., Vaid, M., Katiyar, N., Sharma, S. and Katiyar, S. K., 2011, Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase- 2, prostaglandin E₂ and prostaglandin E₂ receptors, Carcinogenesis 32: 86-92.
- [3] Yin, J., Ye, J. and Jia, W., 2012, Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment, Acta Pharm. Sin. B 2: 327-334.
- [4] Pang, B., Zhao, L.H., Zhou, Q., Zhao, T.Y., Wang, H., Gu, C.J. and Tong, X.L., 2015, Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus, Int. J. Endocrinol. 2015: 905749-905749.
- [5] Lin, J.G., Chung, J.G., Wu, L.T., Chen, G.W., Chang, H.L. and Wang, T.F., 1999, Effects of berberine on arylamine N- acetyl transferase activity in human colon tumor cells, Am. J. Chin. Med. 27: 265-275.
- [6] Fukuda, K., Hibiya, Y., Mutoh, M., Koshiji, M., Akao, S. and Fujiwara, H., 1999, Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells, J. Ethnopharm. 66: 227-233.
- [7] Rahman, A. and William, P. L. Q., 1988, Natural Products Chemistry III, Springer, Heidelberg, 359 p.
- [8] Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J. and Assavalapsakul, W., 2012, Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants, BMC Comp. Altern. Med. 12: 217.
- [9] Kaewpiboon, C., Boonnak, N., Kaowinn, S. and Chung, Y.H., 2018, Formoxanthone C, isolated from *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*, reverses anticancer drug resistance by inducing both apoptosis and autophagy in human A549 lung cancer cells, Bioorg. Med. Chem. Lett. 28: 820-825.
- [10] Jhong, C.H., Riyaphan, J., Lin, S.H., Chia, Y.C. and Weng, C.F., 2015, Screening alpha- glucosidase and alpha- amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico, Biofactors 41: 242-251.
- [11] Liu, L., Deng, Y., Yu, S., Lu, S., Xie, L. and Liu, X., 2008, Berberine attenuates intestinal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats, Pharmazie 63: 384-388.
- [12] Pongkittiphan, V., Chavasiri, W. and Supabphol, R., 2015, Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells, Asian Pac. J. Cancer Prev. 16: 5371-5376.
- [13] Valgimigli, L., Amorati, R., Fumo, M.G., DiLabio, G.A., Pedulli, G.F., Ingold, K.U. and Pratt, D.A., 2008, The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular

- oxygen, *J. Org. Chem.* 73: 1830-1841.
- [14] Li, J., Liu, F., Jiang, S., Liu, J., Chen, X., Zhang, S. and Zhao, H., 2018, Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways, *Oncol. Lett.* 15: 7409-7414.
- [15] Li, X., Zhao, S.J., Shi, H.L., Qiu, S.P., Xie, J.Q., Wu, H., Zhang, B.B., Wang, Z.T., Yuan, J. Y. and Wu, X. J. , 2014, Berberine hydrochloride IL-8 dependently inhibits invasion and IL-8-independently promotes cell apoptosis in MDA-MB-231 cells, *Oncol. Rep.* 32: 2777-2788.
- [16] Li, H.L., Wu, H., Zhang, B.B., Shi, H.L. and Wu, X. J. , 2016, MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Med. Rep.* 14: 1430-1438.
- [17] Xi, S., Chuang, K., Fang, K., Lee, Y., Chung, J. and Chuang, Y. , 2014, Effect of berberine on activity and mRNA expression of N-acetyltransferase in human lung cancer cell line A549, *J. Tradit. Chin. Med.* 34: 302-308.