สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากส่วนสกัดเอทานอลของตดหมูตดหมา (*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 ปัดตาเคนัง[1], วิลาวัณย์ พร้อมพรม[2*], วรรณชัย ชาแท่น[2]
Phorntip Padtakenang[1], Wilawan Promprom[2*], Wannachai Chatan[2]

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

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคสซิเดสของสารสกัดหยาบส่วนราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ซึ่งสกัดด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ตรวจพบสารพฤกษเคมีในทุกสารสกัด คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม

การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) พร้อมทั้งวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 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} นอกจากนี้พบว่าส่วนใบของตดหมูตดหมาแสดงฤทธิ์การยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสมากที่สุด คือ ร้อยละ 93.04±1.63 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมาอาจจะสามารถใช้ในการบำบัดโรคเบาหวานชนิดที่ 2

คำสำคัญ: ตดหมูตดหมา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แอลฟากลูโคซิเดส

Abstract

The aims of this work were to study bioactive compounds, antioxidant and alpha glucosidase inhibitory activites 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 activites 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±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±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 สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา 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 มีข้อสันนิฐานว่าอนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาเหตุสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หากพบว่าในร่างกายมีอนุมูลอิสระมากจนเกินความสามารถของกลไกการต้านออกซิเดชันภายในเซลล์แล้ว โมเลกุลอนุมูลอิสระอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ สภาพของโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย เช่น ภาวะความแก่ชรา โรคหัวใจและหลอดเลือด และถ้าอนุมูลอิสระสะสมในร่างกายเป็นระยะเวลายาวนานจะส่งผลทำให้เกิดภาวะโรคเบาหวาน[1] โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) ซึ่งเป็นเบาหวานชนิดที่ไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes) แนวทางในการศึกษาการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คือ ศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ซึ่งนับว่าเป็นแนวทางที่น่าสนใจอย่างหนึ่ง เพราะเอนไซม์แอลฟากูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่บริเวณผนังของลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเอนไซม์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสทำให้สามารถชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการบำบัดรักษาโรคเบาหวาน ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ *อะ*คาโบ*ส* (*acarbose*) โวกลิโบ*ส* (*voglibose*) และไมกลิทอล (*miglitol*) แต่เมื่อรับประทานในระยะเวลาที่ยาวนานจะทำให้เกิดอาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลมบ่อย ถ่ายเหลว และปวดท้อง[2] ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงสนใจศึกษาพืชสมุนไพรที่ลดอาการข้างเคียงและมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งอาหารและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและนำมาใช้รักษาโรคเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้เถาขนาดเล็กขึ้นตามธรรมชาติเลื้อยตามพื้นดิน หรือเกี่ยวพันต้นไม้อื่น[3] ก่อนหน้านี้มีรายงานการวิจัยของตดหมูตดหมา 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 ดังนั้นสารสกัดจากรากตดหมูตดหมามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและไม่เป็นพิษในระดับเซลล์[4]

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของพืชสกุล *Paederia* เช่น สารสกัดจากใบ *P. foetida* ที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานไกลเบนคลาไมด์[5] และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในปริมาณสูง ที่ทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (*DPPH*)[6]

จากความสำคัญของตดหมูตดหมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณสารกอบฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรตดหมูตดหมาไปใช้เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

ต้นพืชตดหมูตดหมา เก็บจากบ้านท่าขอนยาง บริเวณหนองตีนบ้าน 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 และใบของตดหมูตดหมามาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปบดให้ละเอียด สกัดด้วยเอทานอล 95%[7] ด้วยวิธีการแช่หมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Hei-VAP Advantage

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นดัดแปลงมาจากวิธีของ Ayoola และคณะ (2008)[7] โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้

3.1 การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมสารละลาย 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 ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.3 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

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

3.4 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthra quinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมสารละลาย 10% (H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 mL เขย่านำ ไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย 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 เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1% ($FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

3.6 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.2 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 mL นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

3.7 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (steroids)

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

3.8 การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 mL เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1% ($FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเชียลแอซีติก จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 mL ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging[7]

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 mM โดยชั่ง DPPH 10.0 mg ละลายในเอทานอล 500 mL และเตรียมสารสกัดราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ppm โดยนำสารสกัดจากที่เตรียมข้างต้น จำนวน 750 µL และ DPPH 0.1 µL 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

$$\% \text{ Radical Scavenging} = \frac{(\text{A control} - \text{A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

เมื่อ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี FARP[8]

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

ร้อยละการต้านออกซิเดชัน = [(A595-B)/M] × 100

โดยที่ A 595 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส[9]

เตรียม alpha-glucosidases และสารตัวอย่าง 0.2 g ละลายใน DMSO 10 mL ให้มีความเข้มข้น 2000-50 ppm โดยนำสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา 1 mg/mL ปริมาตร 20 µL ใน 100 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 เติมสารละลายไนโตรฟีนิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มีความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 50 µL จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายแอลฟากลูโคซิเดส ปริมาตร 0.1 Unit/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วทำการคำนวณร้อยละของกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส และค่า IC_{50} โดยใช้สูตร [(ABSblank-ABSsample)/ABSblank]x100

เมื่อ ABSblank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

ABSsample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

7. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

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

8. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยสารละลายสารสกัดหยาบเอทานอล 1 mg/mL ปริมาตร 200 µL เติมสารละลาย 5%($NaNO_2$) ปริมาตร 75 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µL แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที หลังจากนั้นเติม 1 M (NaOH) ปริมาตร 500 µL และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 2 mL ด้วยน้ำกลั่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, $mgQE.g^{-1}$dried extract)

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

Table 1 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากส่วน ราก ลำต้นและ ใบจำนวน 8 กลุ่ม พบสารพฤกษเคมีจำนวน 5 กลุ่มในทั้ง 3 ส่วน คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

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

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

+ = Presence,-= Absence

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH และ FRAP

Table 2 การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดและค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันร้อยละ 50 (IC_{50}) 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 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การทดสอบฤทธิ์ต้านนอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันร้อยละ 50 (IC_{50}) 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 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบตดหมูตดหมาสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

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 *Paederia linearis* 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. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูงที่สุด ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่า เท่ากับ 93.04±1.63 ; 0.81±0.10 µg/mL, 86.62±1.56 ; 2.20± 0.09 µg/mL และ 48.78±2.75 ; 3.65±0.07 µg/mL ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ซึ่งมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 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 *Paederia linearis* Hook.f.	% α-glucosidase inhibition	IC_{50}(μg/mL)
Root	86.62±1.56[a]	2.20±0.09
Stem	48.78±2.75[b]	3.65±0.07
Leaf	93.04±1.63[c]	0.81±0.10
Acarbose	90.78±0.69[ac]	0.98±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 ส่วนสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ ราก และลำต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ174.42±2.07 mgGAE.g^{-1}, 87.86±2.51 mgGAE.g^{-1} และ 85.21±4.68 mg GAE.g^{-1} ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากทุกส่วน

สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดรองลงมา คือ ราก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 41.32±1.94 mgQE.g^{-1}, 33.38±3.31mgQE.g^{-1} และ 29.99±1.55 mgQE.g^{-1} ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติ พบว่า สารสกัดจากใบตดหมูตดหมามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากราก และลำต้น

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

Part of *Paederia linearis* Hook.f.	Total phenolic content (mg GAE.g^{-1})	Total flavonoids content (mg QE.g^{-1})
Root	87.86±2.51[b]	33.38±3.31[b]
Stem	85.21±4.68[b]	29.99±1.55[b]
Leaf	174.42±2.07[a]	41.32±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

ในตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง สามารถสกัดสารพฤกษเคมีจากส่วน ราก ลำต้น และใบได้ดี โดยพบสารพฤกษเคมีจำนวน 5 กลุ่มที่เหมือนกันในทุกสารสกัด คือ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจากเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร[11] นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ผลการศึกษาทั้งสองวิธีนี้มีความสอดคล้องไปในแนวทางเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด และมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร เนื่องจากสารสกัดจากราก ลำต้น และใบในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดของราก ลำต้น และใบตดหมูตดหมา อาจมาจากสารจำพวกฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม ที่พบว่าสารสกัดจากใบของตดหมูตดหมาที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silpi และคณะ (2014)[12] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในพืชสกุลเดียวกัน คือ *P. foetida* พบว่า มีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี โดยจะเห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี เป็นทั้งตัวขจัดอนุมูลอิสระ และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร

เอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส[13] ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการต้านเบาหวาน โดยศึกษากลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากราก ลำต้น และใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส โดยเฉพาะส่วนสกัดจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสเป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มที่มีขั้วค่อนข้างสูง นอกจากนั้นยังพบสารอินทรีย์ที่มีขั้วสูงส่วนใหญ่ที่จะพบเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มีน้ำตาลติดอยู่กับโครงสร้าง[14] ส่งผลต่อการยับยั้งได้ดีขึ้น นอกจากนั้นสารดังกล่าวก็ยังส่งผลทำให้เกิดการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน เช่น ไตรเทอร์พีนอยด์

ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก[15,16] จากผลการทดลองของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา พบฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเบาหวานได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bhatnagar และคณะ (2016)[17] ที่พบว่าสารสกัดจากใบ *P. foetida* มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส มีปริมาณฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Borgohain และคณะ (2017)[5] พบว่า สารสกัดจากใบ *P. foetida* สามารถรักษาโรคเบาหวานได้ โดยผ่านการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

แต่อย่างไรจากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส อาจเกิดจากตัวยับยั้งของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของตดหมูตดหมา ซึ่งสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยเกิดจากการอออกฤทธิ์เสริมกัน หรืออาจจะเป็นสารองค์ประกอบหลักที่อยู่ในส่วนของสารสกัด มีผลทำให้โครงสร้างของแอลฟากลูโคซิเดสเปลี่ยนแปลง หรือไปแย่งจับบริเวณเร่งปฏิกิริยา จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสกับซับสเตรทได้ จากการศึกษาดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งควรจะต้องแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งศึกษากลไกการยับยั้ง เพื่อนำไปพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิด ที่ 2 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำงานวิจัยจนส่งผลให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Maritim AC, Sanders RA and Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003 ; 17(1): 24-38.
2. Borges ME, Silverira GA and Carvalho I. α-and β-glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedrom 2006 ; 62(44): 10277-10320.
3. Puff C. Revision of the genus *Paederia* L. (Rubiaceae-Paederia) in Asia. A Multidisciplinary study 2007 ; 3: 207-289.
4. Sudta P, Sabyjai C and and Wanirat 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.
5. 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 extracton experimental diabetic nephropathy in rats. J Ethnopharmacology 2017 ; 198: 451-459.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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
12. 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.
13. Sung HJ, Kyoung SH, Kyoung SM, Lee OH, Jang HD ,Kwon YI. I*n* 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 JEl 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 *Paedaria foetida* L. J Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016 ; 8(4): 659-662.