การวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำและฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน

กฤติญา กมลคร[1,2] อัครพงษ์ เครือจันทร์[1] ดำรงศักดิ์ เป๊กทอง[3] และ สุภาวดี พาหิระ[1*]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, [2]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ [3]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[*]supawadeep@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ตีนเป็ดน้ำ (Cerbera odollam) เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae ที่รู้กันดีว่ามีความเป็นพิษสูง ใบและเปลือกต้นของตีนเป็ดน้ำถูกนำมาศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ แต่การศึกษาถึงปริมาณของสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลตีนเป็ดน้ำมีอยู่น้อย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดผลตีนเป็ดน้ำ วิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิและทดสอบฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดนั้น ผลสดของตีนเป็ดน้ำ (20 kg) ถูกอบที่อุณหภูมิ 50 °C นำไปบดได้ผงแห้งของผลตีนเป็ดน้ำ (9 kg) ถูกสกัดด้วยเอทานอล (95 %v/v) ได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล (CO-EtOH, 630.0 g, 7.0 % yield ของผงพืชแห้ง) นำ CO-EtOH (90.4 g) ไปสกัดต่อโดยวิธีลิควิดลิควิดพาร์ติชัน โดยใช้เฮกเซนเอทิลอะซิเตทและน้ำ กำจัดตัวทำละลายออกได้สารสกัดชั้นเฮกเซน (CO-Hexane, 10.3 g, 11.4 % yield) ชั้นเอทิลอะซิเตท (CO-EtOAc, 7.0 g, 7.7 % yield) และชั้นน้ำ (CO-Water, 60.3 g, 66.7 % yield)

สารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำทั้ง 4 ชนิดถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารทุติยภูมิ 4 กลุ่ม โดยวิธีมาตรฐานของแต่ละชนิด ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc และ CO-Water พบปริมาณรวมของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์มาก คือ 169.2±2.43, 65.5±0.90, 267.5±8.51 และ 73.9±1.96 mg DXE/ g extract ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ค่อนข้างมาก คือ 173.5±1.66, 88.7±0.63, 142.9±0.52 และ 137.8±0.86 mg UAE/ g extract ตามลำดับ ส่วนปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบมากพอสมควร คือ 52.5±1.72, 47.5±0.49, 54.9±0.62 และ 24.9±1.04 mg RTE/ g extract ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกพบในปริมาณน้อย คือ 11.7±0.44, 16.5±0.10, 27.6±0.36 และ 2.1±0.07 mg GAE/ g extract ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด พบว่า CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc และ CO-Water มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของอัลบูมินได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 91.9±0.06, 89.5±0.02, 83.8±0.01 และ 85.8±0.03 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินสูงกว่ายาแอสไพริน (208.8±0.26 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.01) สรุปได้ว่าสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำอุดมด้วยสารทุติยภูมิหลายชนิดและมีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินสูง ควรนำไปศึกษาต่อเพื่อค้นหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน

คำสำคัญ: ตีนเป็ดน้ำ, ผล, สารทุติยภูมิ, ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน

Quantitative Analysis of the Secondary Metabolites from *Cerbera Odollam* Fruit Extracts and Their Anti-albumin Denaturation Activities

Kittiya Kamonlakorn[1,2], Akharapong Krueajan[1], Dumrongsak Pekthong[3], and Supawadee Parhira[1*]

[1] *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University*

[2] *Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University*

[3] *Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University*

[*] *supawadeep@nu.ac.th*

Abstract

"Pong pong" (Cerbera odollam), a well-known toxic plant, belongs to the family of Apocynaceae. Its leaves and barks have been reported for their chemical constituents and various pharmacological activities, while the information of its fruits was very less. Therefore, this research aimed to extract the fruits of C. odollam, determine secondary metabolites content and examine anti-albumin denaturation activity. Fresh fruits (20 kg) of C. odollam were dried at 50 ºC then ground to gain dry powder (9 kg). The powder was extracted with 95 %v/v ethanol to obtain total ethanolic extract (CO-EtOH, 630.0 g, 7.0%yield). The CO-EtOH (90.4 g) was further subjected to liquid-liquid partition by using hexane, ethyl acetate and water to furnish CO-Hexane (10.3 g, 11.4%yield), CO-EtOAc (7.0 g, 7.7%yield) and CO-Water (60.3 g, 66.7%yield), respectively.

Four extracts were quantitatively determined for the total content of 4 secondary metabolites. It was found that total cardiac glycosides of CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc and CO-Water were high at 169.2±2.43, 65.5±0.90, 267.5±8.51 and 73.9±1.96 mg DXE/g extract, in the same trend with triterpenoids around 173.5±1.66, 88.7±0.63, 142.9±0.52 and 137.8±0.86 mg UAE/g extract, respectively. Their total flavonoids were quite high at 52.5±1.72, 47.5±0.49, 54.9±0.62 and 24.9±1.04 mg RTE/g extract, while their total phenolic contents were less around 11.7±0.44, 16.5±0.10, 27.6±0.36 and 2.1±0.07 mg GAE/g extract, respectively. The anti-albumin denaturation activities of CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc and CO-Water were expressed as the concentrations which can inhibit albumin denaturation by 50% (IC_{50}) at 91.9±0.06, 89.5±0.02, 83.8±0.01 and 85.8±0.03 µg/ml, respectively. The results indicated that their anti-albumin denaturation activities were significantly higher than that of aspirin (208.8±0.26 µg/ml, P value < 0.01). In conclusion, the fruits of C. odollam contained plenty of secondary metabolites along with exhibited potent inhibitory effect against albumin denaturation. It is a potential material for further studies on purification of anti-albumin denaturation agents.

Keywords: *Cerbera Odollam*, fruit, secondary metabolite, anti-albumin denaturation

1. บทนำ

Cerbera Odollam หรือ ตีนเป็ดน้ำ เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อเรียกทั่วไปในภาษาอังกฤษคือ Pong pong มีชื่อเรียกภาษาไทยหลากหลาย เช่น ตีนเป็ดทะเล ตุม สั่งลา หรือมะตะกอ เป็นพืชท้องถิ่นของหลายประเทศ เช่น ประเทศศรีลังกา ประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มาเลเซีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก รวมทั้งในประเทศไทย (Chopra et al., 1956) ตีนเป็ดน้ำเป็นไม้ต้น สูงประมาณ 15 เมตร ลำต้นทรงร่มและมักแตกกิ่งต่ำ (ภาพที่ 1A) ดอกสีขาวมี 5 กลีบ (ภาพที่ 1B) ผลค่อนข้างกลม มีสีเขียวและมีผิวเรียบ (ภาพที่ 1C) (Samitinand, 2001) ตีนเป็ดน้ำเป็นที่รู้จักดีว่าเป็นพืชที่มีพิษสูง มีรายงานการนำมาใช้เพื่อฆ่าตัวตายในประเทศอินเดีย เนื่องจากพบสารในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์จำนวนมาก เช่น cerberin, cerberoside และ odollin (Shena et al., 2007) ซึ่งเป็นสารที่มีผลทำให้เกิดการเสียชีวิตเนื่องจากรบกวนการทำงานของหัวใจ ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายหลังจากรับประทานเนื้อด้านในของเมล็ดของตีนเป็ดน้ำ (Gaillard et al., 2004 และ Laphookhieo et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบสารพิษชนิดอื่น ที่เป็นส่วนประกอบหลักของต้นตีนเป็ดน้ำ เช่น non-siccative oil (Gaillard et al., 2004) การศึกษาในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากต้นตีนเป็ดน้ำ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น สารสกัดจากเนื้อไม้ของต้นตีนเป็ดน้ำมี ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้หลากหลายชนิด ได้แก่ *Schizophyllum commune*, *Tinea versicolor* และ *Pycnoporus sanguineus* เป็นต้น (Hashim et al., 2009) ทั้งยังมีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากเปลือกของต้นตีนเป็ดน้ำ มีฤทธิ์ anti-acinetobacter และ anti-cancer activity (Chusri et al., 2014) ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเปลือกของต้นตีนเป็ดน้ำมีฤทธิ์เป็น antinociceptive (Ahmed et al., 2006) สารสกัดจากใบตีนเป็ดน้ำ มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของหนู (Hiên et al., 1991) และยังนำมาใช้รักษาอาการจากการโดนงูกัดอีกด้วย (Dharmadasa et al., 2016) ในทางการแพทย์อายุรเวท มีการใช้ส่วน เปลือก ผล ใบ และยาง ของตีนเป็ดน้ำในการรักษาโรคผิวหนังแบบต่าง ๆ อีกด้วย จะเห็นได้ว่าการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชนี้ มักเป็นการศึกษาจากส่วนของ ใบ เปลือกต้น หรือเนื้อไม้ จึงยังขาดองค์ความรู้ในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลตีนเป็ดน้ำ งานวิจัยนี้จึงต้องการวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารทุติภูมิและทดสอบฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการค้นหาสารทุติยภูมิจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินต่อไป

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้น (A) ดอก (B) ผล (C) ของตีนเป็ดน้ำ (*Cerbera odollam*) และตัวอย่างพืชแห้ง (D) หมายเลข NUCO2016001 จัดเก็บ ณ หอพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินในสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

3. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

สารมาตรฐาน digoxin, gallic acid, rutin, aspirin, bovine serum albumin (BSA) ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน ursolic acid ซื้อจากบริษัท Tokyo chemical ประเทศญี่ปุ่น สำหรับสารละลายอินทรีย์ทุกชนิดในการทดลองนี้ เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ ซื้อจากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย Folin-Ciocalteu reagent ซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี Aluminum chloride hexahydrate และ Sodium hydroxide เกรดสำหรับงานวิเคราะห์ ซื้อจากบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองของการศึกษานี้ ได้แก่ ultrasonicator (บริษัท Elma ประเทศเยอรมนี) analytical balance (บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) rotary evaporator (บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) vacuum freeze dryer (บริษัท Kinetic engineering ประเทศไทย) UV/Vis spectrophotometer (บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น) และ quartz cuvette ขนาด 10 mm (G-10HG, LC PremiumTM)

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการระบุเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการทดลอง

ผลสดของตีนเป็ดน้ำโตเต็มที่ มีขนาดประมาณ 10-15 cm เก็บในช่วงเดือน มิถุนายน 2558 ถึง มีนาคม 2559 นำมาแยกเอาเฉพาะส่วนเนื้อของผล (20 kg) ไม่รวมถึงเปลือกแข็งและส่วนของเมล็ด นำเนื้อของผลมาหั่นเป็นชิ้นบางเล็ก ๆ ขนาด 1-2 cm อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นสมุนไพร จนได้ผงแห้งของผลตีนเป็ดน้ำ (9 kg) เก็บในกล่องพลาสติกปิดสนิท เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป สำหรับตัวอย่างแห้งของตีนเป็ดน้ำจัดทำโดยเก็บ กิ่ง ก้าน ใบ ผล และดอกของตีนเป็ดน้ำ จากบริเวณหอพักนักศึกษา มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก (ละติจูด 16.737745, ลองติจูด 100.198738) นำไปอบแห้ง แล้วระบุเอกลักษณ์โดย ดร.ปราณี นางงาม นักพฤกษศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลขตัวอย่างพืชแห้ง NUCO2016001 แสดงดังภาพที่ 1D เก็บตัวอย่างพืชแห้งเพื่อการอ้างอิง ณ หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

4.2 การเตรียมสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

ผงแห้งของผลตีนเป็ดน้ำ (9 kg) ถูกนำมาสกัดด้วย 95 %v/v เอทานอล โดยวางบน ultrasonicator ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 h กรองแยกกากออก ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45 °C ได้สารสกัดหยาบของตีนเป็ดน้ำ (CO-EtOH) หลังจากนั้นนำ CO-EtOH (90.4 g) กระจายในน้ำ 200 ml แล้วสกัดด้วยเฮกเซน (400 ml) เมื่อแยกเฮกเซนออกทำซ้ำ 3 ครั้ง จึงสกัดต่อด้วยเอทิลอะซีเตท (400 ml) อีก 3 ครั้ง นำสารสกัดชั้นเฮกเซนและชั้นเอทิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ส่วนสารสกัดชั้นน้ำนำไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง ได้สารสกัดชั้น CO-Hexane, CO-EtOAc และ CO-Water ตามลำดับ นำสารสกัดไปชั่งและคำนวณร้อยละผลผลิต

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารทุติยภูมิในสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารทุติยภูมิแต่ละกลุ่มของตีนเป็ดน้ำ ทำการทดสอบในสารสกัด CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc และ CO-Water โดยใช้วิธีการ colorimetric method ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมีสี ที่เกิดจากปฏิกิริยาของน้ำยาที่ใช้ทดสอบสารทุติยภูมิแต่ละชนิดกับสารสกัดที่ทดสอบ โดยวัดที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กันด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยรายงานผลการทดสอบเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยการใช้ Baljet's reagent ดัดแปลงจากวิธีของ Tofighi et al. (2016) โดยใช้สารตัวอย่าง 1 ml (1 mg/ml ในสารละลายเอทานอล:น้ำ อัตราส่วน 1:1) ผสมกับ Baljet's reagent 1 ml ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้ทันที (เตรียมจากการผสม สารละลาย 1 % picric acid 95 ml กับ 10 % Sodium hydroxide solution 5 ml) ตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 h เติมน้ำกลั่น 2 ml เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 482 nm นำมาคำนวณค่าปริมาณรวมจากสมการเส้นตรงที่ได้จากสารมาตรฐาน digoxin (ช่วงความเข้มข้น 5-50 µg/ml, Y=0.0154x+0.05, R^2=0.9989) รายงานผลเป็นปริมาณสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ในหน่วย mg digoxin equivalent (DXE)/g extract

4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยใช้วิธี Aluminum chloride colorimetry ดัดแปลงวิธีจาก Baba and Malik (2015) และวิธีของ Layzon et al. (2015) โดยใช้ rutin เปนสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ที่ช่วงความเข้มข้น 10-100 µg/ml (Y=0.025+0.0053, R^2=0.9989) โดยนำสารตัวอย่างละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml (1 ml) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2 % Aluminum chloride solution (1 ml) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 min จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm รายงานผลเป็นปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในหน่วย mg rutin equivalent (RTE) /g extract

4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิก โดยการทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteau reagent โดยปรับเปลี่ยนวิธีจากการทดสอบของ Tofighi et al. (2016) และของ Chang et al. (2012) เล็กน้อย โดยค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจะนำมาคำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ช่วงความเข้มข้น 1.7-13.3 µg/ml (Y=0.1439x-0.0664, R^2=0.9973) ละลายสารตัวอย่างในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ปิเปตมา 1 ml นำมาทำปฏิกิริยากับ 10% Folin-Ciocalteu reagent 1 ml เขย่าผสมแล้วทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 min ณ อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวของ Sodium bicarbonate 1 ml (Sodium bicarbonate ในน้ำ 60 g/l) เขย่าผสมแล้วทิ้งไว้ในที่มืดเพื่อรอทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 90 min ณ อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm รายงานผลเป็นปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE) /g extract

4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มไตรเทอพีนอยด์

ปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ ทดสอบโดยดัดแปลงวิธีของ Wei et al. (2015) โดยปิเปตสารตัวอย่างมา 200 µl (1 mg/ml ใน acetic acid) แล้วเติมสารละลาย 5 % vanillin-acetic 0.5 ml เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.8 ml นำไปทำปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นตามอุณหภูมิห้อง ตามด้วยการเติม acetic acid 2 ml แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 573 nm โดยใช้สารมาตรฐานในการเปรียบเทียบคือ ursolic acid ที่ช่วงความเข้มข้นต่าง 2-40 µg/ml (Y=0.0502x-0.0135, R^2=0.9987) รายงานผลเป็นปริมาณสารกลุ่มไทรเทอร์ปีนอยด์หน่วย mg ursolic acid equivalent (UAE)/ g extract

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน ทำการทดสอบโดยใช้วิธีการวัดความขุ่น (turbidimetry) ของสารละลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเสื่อมสลายของอัลบูมินภายหลังการได้รับความร้อน โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer วิธีการที่ใช้ในการทดลอง ปรับเพียงเล็กน้อยจากวิธีของ Hayakawa et al. (1992) โดยนำสารตัวอย่าง หรือ aspirin ซึ่งใช้เป็น positive control มาละลายในเมทานอล (200 µl) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ในช่วง 25 – 600 µg/ml เติมสารละลายผสมของ 2 % BSA ใน 5 % tris hydrochloride buffer solution (1.8 ml) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 min ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (Abs) แล้วนำค่าไปคำนวณ % inhibition albumin denaturation โดยการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ vehicle control (เมทานอล 200 µl) จากสมการที่ 1 นำมาหาค่าความเข้มข้นที่สารตัวอย่างสามารถยับยั้งการเสื่อมสภาพของอัลบูมินได้ 50% (IC_{50}) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วรายงานค่า IC_{50} เป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

% inhibition= [(Abs vehicle control- Abs sample)/Abs vehicle control] × 100 .....สมการที่ 1

4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่า IC_{50} แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำและยา aspirin ทดสอบโดยใช้วิธี One-way ANOVA ตามด้วย Post Hoc test แบบวิธี Bonferroni โดยจะถือว่ามีความแตกต่างกันหากค่า *P*-value < 0.01 โดยใช้โปรแกรม SPSS version 15.0

5. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ลักษณะทั่วไปและร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

จากการสกัดผงแห้งของผลตีนเป็ดน้ำ 9 kg ด้วยเอทานอล (95 %v/v) ทำให้ได้สารสกัดหยาบเอทานอล CO-EtOH ที่มีลักษณะเป็นสารข้นเหนียวสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 630.0 g (คิดเป็นร้อยละของผลผลิต 7.0 ของผลตีนเป็ดน้ำแห้ง) แล้วเมื่อนำ CO-EtOH จำนวน 90.4 g ไปสกัดต่อด้วยวิธีลิควิดลิควิดพาร์ติชัน ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ทำให้ได้สารสกัดชั้นเฮกเซน CO-Hexane ซึ่งมีขั้วน้อยที่สุดมีลักษณะเป็นสารข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ จำนวน 10.3 g คิดเป็น ร้อยละผลผลิต 11.4 ของ CO-EtOH ส่วนสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท CO-EtOAc มีขั้วปานกลาง มีลักษณะเป็นสารข้นเหนียวสีน้ำตาลอ่อน จำนวน 7.0 g

คิดเป็น ร้อยละผลผลิต 7.7 ของ CO-EtOH ส่วนสารสกัดชั้นน้ำ CO-Water ซึ่งมีขั้วมากที่สุด มีลักษณะเป็นสารข้นเหนียวสีน้ำตาลเข้ม จำนวน 60.3 g ร้อยละผลผลิต 66.7 ของ CO-EtOH

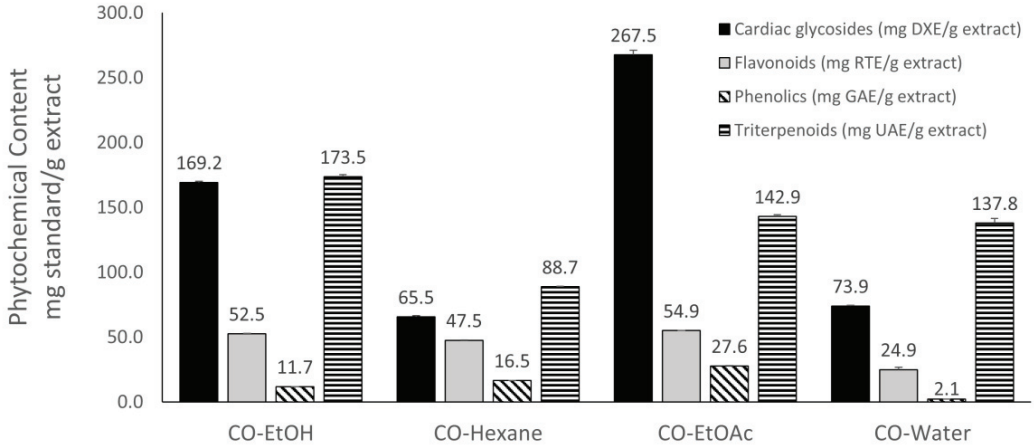
5.2 ปริมาณรวมของสารทุติภูมิในสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณรวมสารทุติยภูมิ 4 กลุ่มของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ 4 ชนิด ได้แก่ CO-EtOH, CO-Hexane, CO-EtOAc และ CO-Water ประกอบด้วยปริมาณรวมของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และไตรเทอร์พีนอยด์ พบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีสัดส่วนของสารทุติยภูมิในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ปริมาณรวมของสารทุติยภูมิแต่ละชนิดในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของสารมาตรฐาน/กรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg standard equivalent/g extract) แสดงผลดัง ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่า สารสกัดทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CO-EtOAc และ CO-EtOH มีปริมาณรวมของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ในปริมาณมากถึง 267.5±8.51 และ169.2 mg DXE/g extract และปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์สูงถึง 142.9±0.52 และ 173.5 ± 1.66 mg UAE/g extract ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดทุกชนิดยังมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ใกล้เคียงกันในปริมาณค่อนข้างมากโดยพบในช่วง 24.9 ถึง 54.9 mg RTE/g extract แต่กลับพบสารกลุ่มฟีนอลิกในปริมาณน้อยในช่วง 2.1 ถึง 27.6 mg GAE/g extract เท่านั้น จากผลการทดลองชี้ให้เห็นศักยภาพของผลตีนเป็ดน้ำ ในการนำมาสกัดสารทุติยภูมิหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบสารกลุ่มนี้ในใบและเปลือกต้นของตีนเป็ดน้ำ (Gaillard et al., 2004, Laphookhieo et al., 2004 และ Shena et al., 2007)

ตารางที่ 1 ปริมาณรวมของสารทุติยภูมิในสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

สารตัวอย่าง	คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (mg DXE/g extract)	ฟลาโวนอยด์ (mg RTE/g extract)	ฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	ไตรเทอร์พีนอยด์ (mg UAE/g extract)
CO-EtOH	169.2 ± 2.43	52.5 ± 1.72	11.7 ± 0.44	173.5 ± 1.66
CO-Hexane	65.5 ± 0.90	47.5 ± 0.49	16.5 ± 0.10	88.7 ± 0.63
CO-EtOAc	267.5 ± 8.51	54.9 ± 0.62	27.6 ± 0.36	142.9 ± 0.52
CO-Water	73.9 ± 1.96	24.9 ± 1.04	2.1 ± 0.07	137.8 ± 0.86

หมายเหตุ ค่าปริมาณรวมของสารทุติยภูมิที่แสดงในตาราง แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดย DXE = ปริมาณสมมูลกับ digoxin, RTE = ปริมาณสมมูลกับ rutin, GAE = ปริมาณสมมูลกับ gallic acid และ UAE = ปริมาณสมมูลกับ ursolic acid



ภาพที่ 2 ปริมาณรวมของสารทุติยภูมิในสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ โดย DXE = ปริมาณสมมูลกับ digoxin, RTE = ปริมาณสมมูลกับ rutin, GAE = ปริมาณสมมูลกับ gallic acid และ UAE = ปริมาณสมมูลกับ ursolic acid แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณรวมของสารทุติยภูมิแต่ละชนิด ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

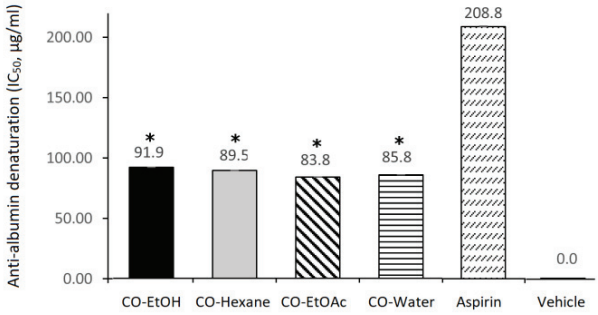
5.3 ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำ

ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3 โดยพบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินดีที่สุดคือ CO-EtOAc (IC_{50} คือ 83.8±0.01 µg/ml) โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ CO-Water, CO-Hexane และ CO-EtOH ซึ่งมีค่า IC_{50} คือ 85.8±0.03, 89.5±0.02 และ 91.9±0.06 µg/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำทั้ง 4 ชนิด สูงกว่าฤทธิ์ของ aspirin (IC_{50} คือ 208.8±0.26 µg/ml) ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P* value < 0.01) ผลการทดลองชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ของการนำสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำมาศึกษาวิจัยต่อ เพื่อสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ หรือฟลาโวนอยด์ ที่อาจมีฤทธิ์สูงในการต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่จะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเช่นกัน (Hayakawa et al., 1992)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำและ aspirin

สารตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมิน (IC_{50}, µg/ml)
CO-EtOH	91.9* ± 0.06
CO-Hexane	89.5* ± 0.02
CO-EtOAc	83.8* ± 0.01
CO-Water	85.8* ± 0.03
Aspirin	208.8 ± 0.26
Vehicle control	0.0 ± 0.02

หมายเหตุ ค่า IC_{50} หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเสื่อมสลายของอัลบูมินได้ร้อยละ 50 แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง *แตกต่างจาก aspirin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value < 0.01)



ภาพที่ 3 ฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของสารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำและ aspirin แสดงค่าเฉลี่ยของ IC_{50} (µg/ml) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, *แตกต่างจาก aspirin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value < 0.01)

6. สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากผลตีนเป็ดน้ำทั้งสารสกัดหยาบเอทานอล, สารสกัดชั้นเฮกเซน, สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทและสารสกัดชั้นน้ำ พบว่ามีสารในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์พบในปริมาณมากในช่วง 65.5 ถึง 169.2 mg DXE/g extract, 88.7 ถึง 173.5 mg UAE/g extract และ 24.9 ถึง 54.9 mg RTE/g ตามลำดับ พบสารฟีนอลิกค่อนข้างน้อย ในช่วง 2.1 ถึง 27.6 mg GAE/g extract โดยสารสกัดทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินค่อนข้างดี มีค่า IC_{50} ในช่วง 83.8 ถึง 91.9 µg/ml ซึ่งสูงกว่าฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินของยา aspirin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value < 0.01) ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการค้นหาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านการเสื่อมสลายของอัลบูมินในระดับสูง จากผลตีนเป็ดน้ำ

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2560 หมายเลข R2560C095

เอกสารอ้างอิง (References)

Ahmed, F., Hossain, M. H., Rahman, A. A., & Shahid, I. Z. (2006). Antinociceptive and sedative effects of the bark of *Cerbera odollam* Gaertn. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine,** 6 (4), 344-348.

Baba, S.A., & Malik S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii.* **Journal of Taibah University for Science,** 9, 449-454.

Chang, C.L., Lin, C.S., & Lai, GH. (2012). Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 984295. https://doi.org/10.1155/2012/984295

Chopra, R. N., Nayar, S. L., & Chopra, I. C., (1956). Glossary of Indian Medicinal Plants. **Council for Scientific and Industrial Research,** New Delhi.

Chusri, S., Siriyong, T., Na-Phatthalung, P., & Voravuthikunchai, S. P. (2014). Synergistic effects of ethnomedicinal plants of Apocynaceae family and antibiotics against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,** 7 (6), 456-61.

Dharmadasa, R. M., Akalanka, G. C., Muthukumarana, P. R. M., & Wijesekara R. G. S. (2016). Ethnopharmacological survey on medicinal plants used in snakebite treatments in Western and Sabaragamuwa provinces in SriLanka. **Journal of Ethnopharmacology,** 179, 110–127.

Gaillard, Y., Krishnamoorthy, A., & Bevalota, F. (2004). *Cerbera odollam:* a 'suicide tree' and cause of death in the state of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology,** 95 (2-3), 123–26.

Hashim, R., Boon, J., Sulaiman, O., Kawamura, F., & Lee, C. (2009). Evaluation of the decay resistance properties of *Cerbera odollam* extracts and their influence on properties of particleboard. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 63 (8), 1013–1017.

Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M., & Fujio, F. (1992). Denaturation of Bovine Serum Albumin (BSA) and Ovalbumin by High Pressure, Heat and Chemicals. **Journal of Food Science,** 57 (2), 288-292.

Hiên, T.T., Navarro-Delmasure, C., & Vy, T. (1991). Toxicity and effects on the central nervous system of a *Cerbera odollam* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology,** 34 (2-3), 201-6.

Laphookhieo, S., Cheenpracha, S., Karalai, C., Chantrapromma, S., Rat-a-pa, Y., Ponglimanont, C. (2004). Cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera odollam*. **Phytochemistry,** 65 (4), 507–10.

Layzon, A., Ramos, B., & Soares, L. (2015) Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. **Pharmacognosy Magazine,** 11 (41), 96-101.

Samitinand, T. (2001). Thai Plant Names. **The Forest Herbarium,** 120, 810.

Shena, L.R., Jinb, S.M., Yina, B.W., Du, X.F., Wanga, Y.L., & Huo, C.H. (2007). Chemical Constituents of Plants from the Genus *Cerbera*. **Chemistry & Biodiversity,** 4 (7), 1438-1449.

Tofighi, Z., Ghazi, N., Hadjiakhoondi, A., & Yassa, N. (2016). Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* suspension culture. **Research Journal of Pharmacognosy,** 3 (2), 25-3.

Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., & Xu, Y., & Chen, F. (2015) Extraction Optimization of Total Triterpenoids from *Jatropha curcas* Leaves using Response Surface Methodology and Evaluations of Their Antimicrobial and Antioxidant Capacities. **Electronic Journal of Biotechnology**, 18 (2), 88-95.