



ฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และอิริโดยด์ไกลโคไซด์จากลำต้นตดหมุดตหมา Anti-diabetic effect of terpenoids and iridoid glycosides from the stems of *Paederia linearis*

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์¹ และกนกอร ระย้านิล²

¹สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร
โทรศัพท์ 083-0381288 email: kae_2028@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และอิริโดยด์ไกลโคไซด์จากลำต้นของตดหมุดตหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ของสารที่แยกได้ สกัดสารสำคัญออกจากลำต้นตดหมุดตหมาด้วยเอทานอล 95% การแยกองค์ประกอบทางเคมีจะใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารทั้งหมด 4 ชนิด คือ สารผสมของเทอร์พีนอยด์ 2 ชนิด คือ stigmasterol (1) และ β -sitosterol (2) และสารบริสุทธิ์ในกลุ่มอิริโดยด์ไกลโคไซด์ 3 ชนิด ได้แก่ paederosidic acid methyl estr (3) paederosidic acid (4) และ 10-*O*-caffeoyl scandoside methyl ester (5) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ โดยใช้สารตั้งต้นเป็น *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosidase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า สารที่แยกได้ทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่ายารักษาเบาหวานอะคาร์โบส โดยสาร 10-*O*-caffeoyl scandoside methyl ester (5) เป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุดร้อยละ 54.26

คำสำคัญ: ตดหมุดตหมา, สมุนไพรรักษาเบาหวาน, แอลฟาไกลูโคซิเดส

Abstract

This research was aim to analyze the chemical structure of the terpenoids and iridoid glycosides from the stems of *Paederia linearis* and test the activity of the isolated compounds against α -glucosidase from Baker's yeast. Separation the active constituents from the stem of *P. linearis* by 95% ethanol. The isolations were made by column chromatography to give 4 compounds including a mixture of 2 terpenoids as stigmasterol (1) and β -sitosterol (2), three pure iridoid glycosides, paederosidic acid methyl estr (3), paederosidic acid (4) and 10-*O*-caffeoylscandoside methyl ester (5). All the isolated compounds were tested the anti- α -glucosidase inhibitor by using *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosidase as substrate. Measured the absorbance at 405 nm. The result demonstrated that all of them possessed anti- α -glucosidase but weaker than the anti-diabetic drug, acarbose. 10-*O*-caffeoyl scandoside methyl ester (5) is the most α -glucosidase inhibitor with the percent inhibition of 54.26

Keywords: *Paederia linearis*, herbal, diabetes mellitus, α -glucosidase

1. บทนำ

เบาหวาน (diabetes mellitus, DM) เป็นโรคที่เซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน ทำให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่า 126 มิลลิกรัม/100 มิลลิตร เป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น สายตาพร่ามัว ไตวาย แผลเรื้อรัง และโรคหัวใจ เป็นต้น (อนุสรณ์ ลังกาพินธ์, 2552) สมาคมเบาหวานนานาชาติรายงานว่า ในปี พ.ศ. 2560 ทั่วโลกมีผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 425 ล้านราย และคาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 629 ล้านรายในปี 2588 (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2017) สำหรับประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยเบาหวาน 4.8 ล้านคน และมีอัตราการเสียชีวิตวันละ 200 คน ในปี 2557 (กรุงเทพฯธุรกิจ, 2563) เบาหวานแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ตามสาเหตุการเกิดโรค ชนิดที่มีผู้ป่วยมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90-95 ของจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด คือเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus) ซึ่งเกิดจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) มักพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และอ้วน อาการที่บ่งบอกถึงภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ กระหายน้ำบ่อย น้ำหนักลด อ่อนเพลีย ตามัว แผลหายช้า และปัสสาวะบ่อย (Olokoba et al., 2012) ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ต้องได้รับยาต้านเบาหวาน (antidiabetic drug) เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ ยาในกลุ่มหนึ่งที่ได้รับนิยามมากคือ ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง จนได้เป็นน้ำตาลกลูโคสในที่สุด เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมีหลายชนิด เช่น อะไมเลส (amylase) มอลเทส (maltase) และซูเครส (sucrase) ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะทำให้การเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสทำได้ช้าลง ส่งผลให้ปริมาณกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เป็นการควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสของผู้ป่วยเบาหวานให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย ตัวยาที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ อะคาร์โบส (acarbose) วอลกลีโบส (voglibose) และไมกลิทอล (miglitol) ถึงแม้ว่ายาในกลุ่มนี้สามารถรักษาผู้ป่วยเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มักจะมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น รู้สึกไม่สบายท้อง รู้สึกไม่สบายตัว ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน (Mohammed et al., 2013; Meneses et al., 2015) ดังนั้นการค้นหายาต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสชนิดใหม่ที่ผลข้างเคียงน้อยกว่าจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง แหล่งของยาต้านเบาหวานที่สำคัญคือพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณรักษาเบาหวานนั่นเอง

ตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f) มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ ตำยานตัวผู้ เครือตดหมา หญ้าตดหมา และพังโหม ตดหมูตดหมาเป็นไม้เลื้อยขนาดเล็ก เนื้ออ่อน จัดอยู่ในสกุล *Paederia* วงศ์ Rubiaceae ซึ่งเป็นวงศ์ไม้ดอก ประกอบด้วยพืชประมาณ 13,000 ชนิด สกุล *Paederia* เป็นสกุลขนาดเล็กมีพืชในสกุลนี้เพียง 31 ชนิดเท่านั้น (Nie et al., 2013) ตดหมูตดหมามีลักษณะดังนี้ ใบรูปหอกหรือยาวรีเวียงตรงข้าม ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ลำต้นสีเขียวอ่อน ดอกออกที่ปลายยอด และซอกใบ รูปกรวยปลายแยก 5 แฉก หักต้นกลีบดอกด้านนอกสีขาว ด้านในสีม่วงเข้ม ผลรูปไข่ ก้านใบ หลังใบ ซ่อดอก ลำต้น และผล มีขนสั้นๆ สีขาวปกคลุม (ชุมชนคนรักพรรณไม้, 2016) ทุกส่วนจะมียางขาว ส่วนใบและลำต้นจะมีกลิ่นเหม็นเขียวที่เกิดจากสารประกอบที่มีกำมะถัน (Puff, 2007) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพืชในสกุลนี้ ทั้งต้นมีรสขม ตดหมูตดหมาพบได้ทุกภาคของประเทศไทย และยังพบได้ในประเทศอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมอยานำส่วนต่างๆ ของตดหมูตดหมาไปใช้เพื่อบำรุงร่างกาย และรักษาอาการเจ็บป่วยต่างๆ ได้แก่ ขับลม แก้อ่อนเพลีย ขับพยาธิ ขับปัสสาวะ แก้อักเสบ แก้อักเสบ แก้อักเสบ แก้อักเสบ แก้อักเสบ ลดน้ำตาลและไขมัน เป็นยาอายุวัฒนะ และเพิ่มพลังทางเพศ (พิชานันท์ ลีแก้ว, 2558) รายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตดหมูตดหมาพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน (สมุนไพรรักษาเบาหวาน, 2562) สารสกัดจากรากด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับปานกลาง (Suta et al, 2013) พืชใน

สกุล *Paederia* ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับตดหมุดตดหมาในประเทศไทยพบ 3 ชนิด คือ กะพังโหม (*Paederia foetida*) ย่านพาโหม (*Paederia scandens*) และหญ้าตดหมา (*Paederia pilifera*) ซึ่งแต่ละต้นก็มีสรรพคุณที่แตกต่างกันไป



รูปที่ 1 ลักษณะของตดหมุดตดหมา
ที่มา (ชุมชนคนรักสุขภาพ, 2016)

การศึกษางานวิจัยด้านองค์ประกอบทางเคมีที่พบในส่วนใบ ลำต้น และราก ของพืชในสกุลเดียวกับตดหมุดตดหมา คือ กะพังโหม และย่านพาโหม สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญแบ่งออกเป็นกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี คือ เทอร์พีนอยด์ อิริไดอยด์ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ และแอนทราควิโนน (anthraquinones) (Inoyue et al., 1969; Shukla et al., 1989; Ishikura et al., 1990; Quang et al., 2002; Zou et al., 2006; Quang, 2009) สารเหล่านี้มักมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และอิริไดอยด์ไกลโคไซด์มีรายงานว่ามียุทธิต้านเบาหวานด้วยกลไกที่แตกต่างกัน (Yamabe et al., 2007; Tundis et al., 2008; Jusmine et al., 2018; Li et al., 2020) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสาร 2 กลุ่มนี้จากลำต้นตดหมุดตดหมา

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 พืชตัวอย่าง

ลำต้นของตดหมุดตดหมาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร เก็บมาจาก จากอำเภอวังยาง จังหวัดนครพนม นำมาผึ่งลมให้แห้ง (5 กิโลกรัม) บดให้เป็นผง

2.2 การเตรียมสารสกัด

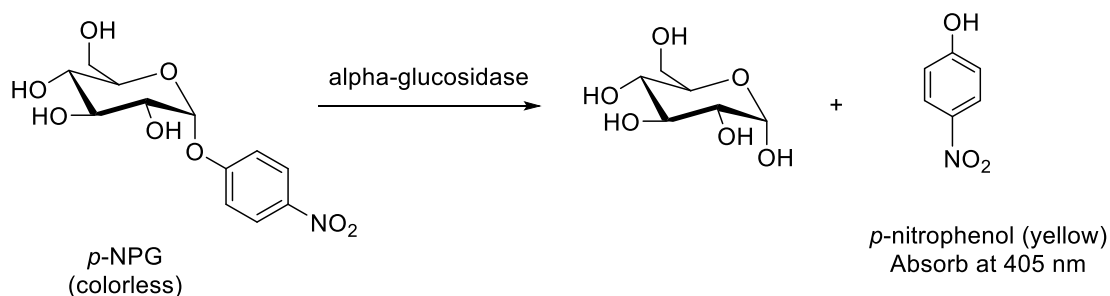
สกัดสารสำคัญจากลำต้นตดหมุดตดหมาด้วยเอทานอล 95 % ด้วยวิธีแช่หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วันจำนวน 3 รอบ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดเอทานอลที่มีองค์ประกอบทางเคมีปนกันเป็นจำนวนมาก จึงต้องมีการแยกสารสกัดเอทานอลออกเป็นส่วนๆ เพื่อให้ง่ายต่อการแยกสารให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ละลายสารสกัดเอทานอลในน้ำกลั่น แล้วสกัดสารจากชั้นน้ำด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปสูง โดยเริ่มจาก เฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีที่มีขั้วแตกต่างกันจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ เรียกว่า ส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล และน้ำ

2.3 การแยกสารในกลุ่มเทอร์พินอยด์และอิริโดยด์ไกลโคไซด์

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการแยกสารในกลุ่มเทอร์พินอยด์และอิริโดยด์ไกลโคไซด์ โดยอิริโดยด์ไกลโคไซด์ที่พบในสกุล *Paederia* มักเป็นอิริโดยด์ไกลโคไซด์ที่มีกำมะกักเป็นองค์ประกอบ (sulfur-containing iridoid glycosides) ด้วย ก่อนจะทำการแยกสาร ต้องตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography) ก่อนซึ่งจะสามารถระบุได้ว่าส่วนสกัดใดมีเทอร์พินอยด์และอิริโดยด์ไกลโคไซด์ที่มีกำมะกักเป็นองค์ประกอบ โดยพิจารณาจากสีที่ปรากฏเมื่อย้อมสีด้วยรีเอเจนต์ 1% $Ce(SO_4)_2$ ใน 10% H_2SO_4 แล้วให้ความร้อนที่ $100^\circ C$ 1-2 นาที เทอร์พินอยด์จะปรากฏจุดสีชมพู-บานเย็น ส่วนอิริโดยด์ไกลโคไซด์ที่มีกำมะกักเป็นองค์ประกอบจะปรากฏจุดสีฟ้าเข้มอย่างชัดเจน จากการตรวจสอบจะพบว่า ในส่วนสกัดเฮกเซนปรากฏจุดสีชมพูอย่างชัดเจน ในขณะที่ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท บิวทานอล และน้ำ ปรากฏจุดสีฟ้าเข้ม แต่ในส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทปรากฏองค์ประกอบสีฟ้ามากกว่าอีกสองส่วนสกัด ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษาสารเทอร์พินอยด์จากส่วนสกัดเฮกเซน และอิริโดยด์ไกลโคไซด์จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท การแยกสารจะใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ใช้เฟสหยุดนิ่งเป็น siliga gel และ RP-18 siliga gel เฟสเคลื่อนที่เป็นทำละลายผสมระหว่าง เอทิลอะซีเตท-เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล-น้ำ และ เมทานอล-น้ำ โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ใช้เครื่อง Brüker AVANCE 300 MHz สำหรับวิเคราะห์โปรตอน (1H -NMR) และ 75 MHz สำหรับวิเคราะห์คาร์บอน (^{13}C -NMR) ใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ ซึ่งสารตัวอย่างประมาณ 15 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเกรดสำหรับวิเคราะห์ด้วย NMR ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ deuterated chloroform ($CDCl_3$) และ deuterated methanol (CD_3OD)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

การประเมินฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ (Baker's yeast) ดัดแปลงจากวิธีของ Damsud et al. (2013) ทำได้โดยเตรียมสารละลายของสารที่แยกได้ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน DMSO ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาณ 100/120 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNP-G) ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง $37^\circ C$ เป็นเวลา 8 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 40 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ใช้อะคาร์โบส (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ปฏิกริยาเคมีของการทดสอบแสดงดังสมการ



คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

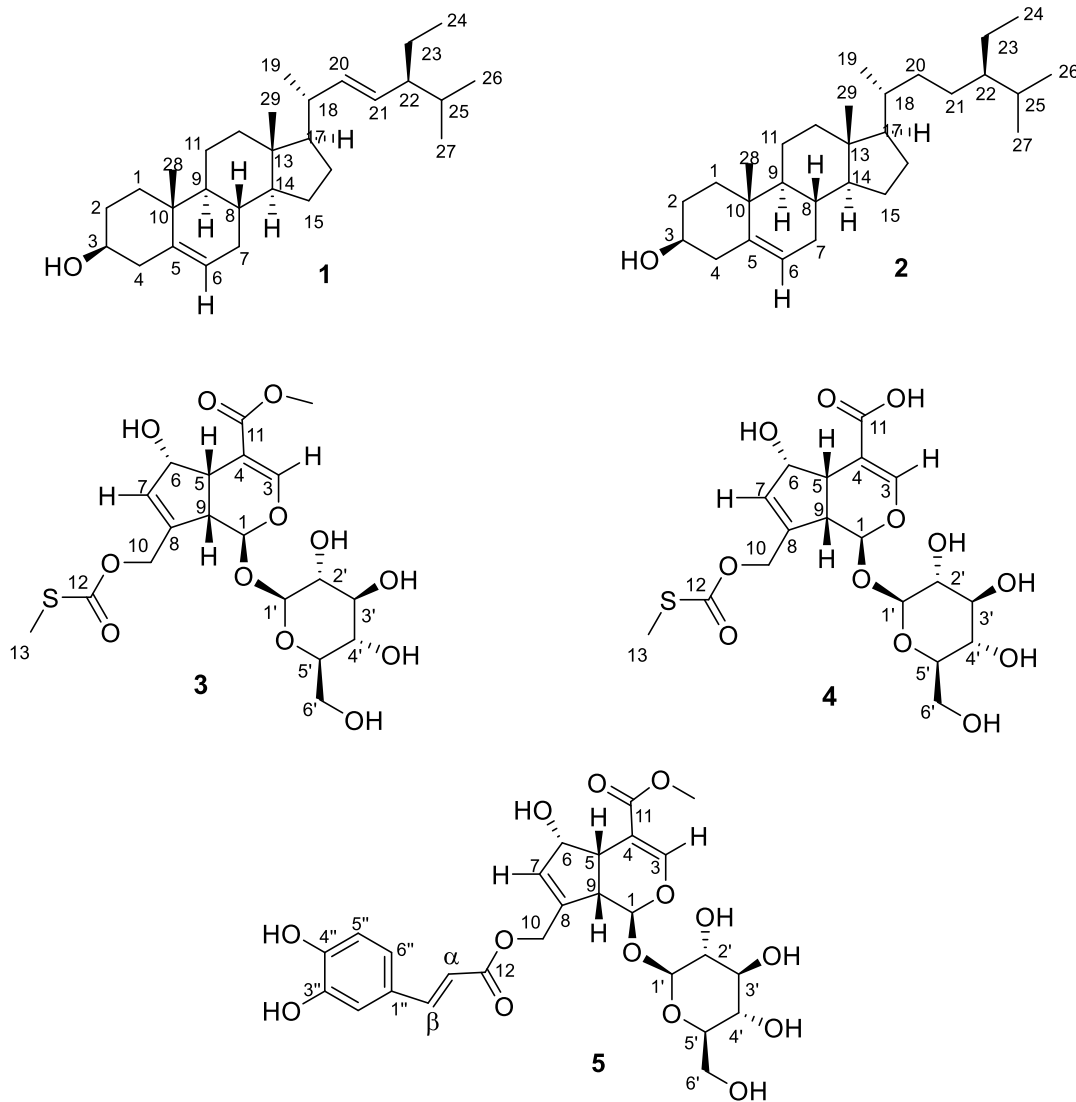
เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการแยกสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และอิริดอยด์ไกลโคไซด์

การแยกและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และอิริดอยด์จากลำต้น ตดหมูตดหมา สามารถแยกสารผสมของเทอร์พีนอยด์ 2 ชนิด คือ β -sitosterol (1) และ stigmasterol (2) และอิริดอยด์ไกลโคไซด์ 3 ชนิด คือ paederosidic acid methyl ester (3) paederosidic acid (4) และ 10-O-caffeoyl-scandoside methyl ester (5) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีที่แยกได้จากลำต้นของตดหมูตดหมา

สารแรกมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว สเปกตรัม IR ปรากฏสัญญาณที่เลขคลื่น 3547.4 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ O-H stretching และสัญญาณที่ 1638.8 cm^{-1} ซึ่งเป็นสัญญาณของ C=C stretching เมื่อพิจารณาสเปกตรัมของโปรตอน พบสัญญาณของ methine proton ปรากฏที่ δ_{H} 5.01 (1H, dd, $J = 15.2, 8.5\text{ Hz}$, H-22) และ 5.16 (1H, dd, $J = 15.2, 8.5\text{ Hz}$, H-23) และ 5.35 (1H, brt, $J = 5.1\text{ Hz}$, H-6) และสัญญาณของ H-3 ของสเตอรอลซึ่งเป็นไตรเทอร์พีนชนิดหนึ่ง ปรากฏที่ δ_{H} 3.52 (1H, br t, $J = 4.8\text{ Hz}$) ซึ่งคาดว่าสาร 1 น่าจะมีโครงสร้างเป็นสเตอรอล สอดคล้องกับสัญญาณของคาร์บอนปรากฏ δ_{C} 72.4 (C-3) แสดงว่าคาร์บอนนี้มีออกซิเจนต่ออยู่ด้วย และพบสัญญาณของ alkene carbon จำนวน 4 สัญญาณ ที่ δ_{C} 121.7 และ 140.7 ซึ่งเป็นสัญญาณของ $\text{C}_6=\text{C}_5$ และที่ δ_{C} 129.3 และ 138.3 เป็นสัญญาณของ $\text{C}_{23}=\text{C}_{22}$ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ methyl proton 6 สัญญาณปรากฏที่ δ_{H} 0.68, 0.80, 0.83, 0.84, 0.92 และ 1.00 ซึ่งเป็นหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 28, 27, 26, 24, 19 และ 29 ตามลำดับ จากข้อมูลของโปรตอนและคาร์บอนดังที่กล่าวมา รวมถึงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับข้อมูลของ Chaturvedula (2012) ทำให้สรุปได้ว่าสารนี้คือ stigmasterol (1) แต่เมื่อพิจารณาการอินทิเกรตจำนวนโปรตอนปรากฏว่า การอินทิเกรตโปรตอนของสองสัญญาณโปรตอนที่ δ_{H} 5.01 (1H, H-22) และ 5.15 (1H, H-23) ได้เท่ากับ 0.65 ในขณะที่การอินทิเกรตโปรตอนที่ δ_{H} 3.52 (1H, H-3) และ δ_{H} 5.36 (1H, H-6) ได้เท่ากับ 2.0 และ 2.0 ตามลำดับ ซึ่งถ้าสาร 1 เป็น stigmasterol การอินทิเกรตจำนวนโปรตอนที่ δ_{H} 3.52 และ δ_{H} 5.36 ควรได้เท่ากับ 0.65 ตามสัดส่วนที่ถูกต้อง แสดงว่าสาร 1 ยังไม่บริสุทธิ์มีสารอื่นปน และสารที่ปนคือ β -sitosterol (2) เนื่องจากโครงสร้างของ β -sitosterol และ stigmasterol แตกต่างกันเพียงตำแหน่งที่ 20 และ 21 เท่านั้น (รูปที่ 2)

สารชนิดที่สองมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน การวิเคราะห์ด้วย HRESIMS ได้สูตรโมเลกุลของสารนี้คือ ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{12}\text{S}$) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ปรากฏสัญญาณที่เลขคลื่น 3374 cm^{-1} (OH), 1700 cm^{-1} (C=O) และ 1633 cm^{-1} (C=C) ใน ^1H NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 1) พบสัญญาณที่แสดงว่าเป็นสารกลุ่มอิริตอยด์ไกลโคไซด์ คือสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_{H} 7.66 (1H, d, $J = 1.1\text{ Hz}$, H-3) และ 6.02 (1H, d, $J = 1.7\text{ Hz}$, H-7) และ methine proton ที่ δ_{H} 5.04 (1H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-1) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลกลูโคสปรากฏที่ δ_{H} 4.70 (1H, d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-1') 3.23 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$, H-2'), 3.38 (1H, m, H-3'), 3.26 (1H, dd, $J = 9.3, 8.8$, H-4'), 3.27 (1H, m, H-5'), 3.63 (1H, dd, $J = 11.8, 1.9\text{ Hz}$, H-6'a) และ 3.86 (1H, dd, $J = 11.8, 6.0\text{ Hz}$, H-6'b) คาร์บอนสเปกตรัม (ตารางที่ 2) พบสัญญาณ carbonyl carbon 2 คาร์บอนปรากฏที่ δ_{C} 173.1 (H-11) ซึ่งมี correlation กับ methoxy group (OCH_3) ในสเปกตรัม HMBC และอีก 1 คาร์บอนปรากฏที่ δ_{C} 169.5 ซึ่งแสดง correlation กับ proton ของ sulfur methyl group (H-13) และ H-10 (δ_{H} 4.96; 5.12) ส่วนตำแหน่งการเชื่อมต่อน้ำตาลกับโครงสร้างส่วนอิริตอยด์ยืนยันได้จาก HMBC สเปกตรัม พบว่า H-1' (δ_{H} 4.70) มี correlation กับ C1 (101.4) สำหรับ H-5 และ H-9 จะปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 3.05 (1H, brs) และ 2.63 (1H, dd, $J = 8.5, 7.4\text{ Hz}$) ตามลำดับ สำหรับ H-6 จะปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่า H-5 และ H-9 เนื่องจากมีหมู่ hydroxyl มาเกาะที่ C-6 (4.73 (dd, $J = 6.0, 2.5\text{ Hz}$) โครงสร้างทางเคมีของสาร 3 คือ paederosidic acid methyl ester (Quang et al., 2002)

สารที่ชนิดที่สามมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\text{S}$ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HRESIMS IR สเปกตรัมปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3380 cm^{-1} (OH) 1696 cm^{-1} (C=O) และ 1636 cm^{-1} (C=C) ข้อมูล ^1H -NMR พบสัญญาณของสารในกลุ่มอิริตอยด์ไกลโคไซด์คล้ายกับสาร 3 (ตารางที่



1) คือสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 7.60 (d, $J = 0.9$ Hz, H-3) และ 6.02 (d, $J = 1.1$ Hz, H-7) methine proton ที่ δ_H 5.02 (d, $J = 8.5$ Hz, H-1) พบสัญญาณ แต่ไม่พบสัญญาณของโปรตอนและคาร์บอนของหมู่ methoxy group ดังนั้นสาร 4 มีโครงสร้างคล้ายสาร 3 แต่ไม่มี methoxy group เกาะอยู่ที่ C-11 สาร 4 คือ paederosidic acid (He et al., 2010)

ตารางที่ 1 $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz) data of compounds 3-5 (δ in ppm, J in Hz) in CD_3OD .

ตำแหน่ง	สาร 3	สาร 4	สาร 5
1	5.07 (d, $J = 8.5$ Hz)	5.02 (d, $J = 1.1$ Hz)	5.08 (d, $J = 6.8$ Hz)
3	7.66 (d, $J = 1.1$ Hz)	7.60 (d, $J = 0.9$ Hz)	7.66 (d, $J = 1.2$ Hz)
4	-	-	-
5	3.05 (brs)	3.03 (m)	3.07 (m)
6	4.73 (dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz)	4.74 (m)	4.82 (m)
7	6.02 (d, $J = 1.7$ Hz)	6.02 (d, $J = 1.1$ Hz)	6.06 (m)
8	-	-	-
9	2.63 (dd, $J = 8.5, 7.4$ Hz)	2.60 (dd, $J = 8.3, 8.3$ Hz)	2.68 (t)
10	4.96 (brs)	4.96 (d, $J = 15.4$ Hz)	4.84 (d, $J = 15.2$ Hz)
	5.12 (dd, $J = 14.6, 1.3$)	5.05 (d, $J = 15.4$ Hz)	4.96 (d, $J = 15.2$ Hz)
11	-	-	-
12	-	-	-
S-CH ₃		2.34 (s)	
O-CH ₃	3.74 (s)	-	3.74 (s)
α		-	6.32 (d, $J = 15.9$ Hz)
β		-	7.59 (d, $J = 15.9$ Hz)
1'	4.70 (d, $J = 8.0$ Hz)	4.70 (d, $J = 7.8$ Hz)	-
2'	3.23 (dd, $J = 9.1, 8.0$)	3.23 (dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz)	7.04 (d, $J = 1.9$ Hz)
3'	3.38 (m)	3.38 (t, $J = 9.0$ Hz)	-
4'	3.26 (m)	3.26 (m)	-
5'	3.27 (m)	3.27 (m)	6.77 (d, $J = 8.1$ Hz)
6'	3.63 (dd, $J = 11.8, 1.9$ Hz)	3.63 (m) 3.81 (dd, $J = 11.6, 2.0$ Hz)	6.96 (dd, $J = 9.1, 1.9$ Hz)
	3.86 (dd, $J = 11.8, 6.0$ Hz)	3.86 (m) 3.59 (dd, $J = 11.6, 5.0$ Hz)	
1''	-	-	5.08 (d, $J = 8.0$ Hz)
2''	-	-	3.30 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz)
3''	-	-	3.31 (m)
4''	-	-	3.31 (m)
5''	-	-	3.30 (m)
6''	-	-	3.66 (dd, $J = 11.6, 5.3$ Hz)
			3.86 (br d, $J = 11.6$ Hz)

ตารางที่ 2 $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz) data of compounds 3-5 (δ in ppm, J in Hz) in CD_3OD .

ตำแหน่ง	สาร 3	สาร 4	สาร 5
1	101.4	101.4	101.5
3	155.5	155.5	55.5
4	108.2	108.2	108.2
5	42.5	42.5	42.6
6	75.4	75.4	75.5
7	132.5	132.5	132.2
8	145.6	145.6	146.3
9	46.3	46.3	46.5
10	66.4	66.4	63.8
11	173.1	173.1	170.0
12	169.5	169.5	169.0
S-CH ₃	13.6	13.6	-
O-CH ₃	52.0	-	52.0
α	-	-	114.8
β	-	-	147.6
1'	100.8	100.8	127.7
2'	75.0	75.0	115.2
3'	78.0	78.0	147.0
4'	71.7	71.7	150.1
5'	78.7	78.7	116.7
6'	63.1	63.1	123.2
1''	-	-	100.8
2''	-	-	75.1
3''	-	-	78.0
4''	-	-	71.6
5''	-	-	78.6
6''	-	-	63.0

สารชนิดสุดท้ายมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน การวิเคราะห์ด้วย HRESIMS ได้สูตรโมเลกุลของสารนี้คือ $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_{14}$ มี IR $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ คล้ายสาร 3 แต่พบสัญญาณของ *trans*-caffeoyl moiety แบบ ABX ปรากฏที่ δ_{H} 6.77 (d, $J = 8.1$ Hz) 6.96 (dd, $J = 8.1, 1.9$) และ 7.04 (d, $J = 1.9$ Hz) (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นการแทนที่แบบ 1,3,4-trisubstitution ของวงเบนซีน นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ *trans* olefinic ปรากฏที่ δ_{H} 6.30 (d, $J = 5.8$ Hz, H- α) และ 7.58 (d, $J = 15.8$ Hz, H- β) HMBC สเปกตรัมแสดงให้เห็น correlation ระหว่าง H- α (δ_{H} 6.30) กับ C-12 (δ_{C} 128.8), H-10 (δ_{H} 4.84, 4.96) กับ C7 (δ_{C} 132.6) และระหว่าง anomeric proton (δ_{H} 4.68) กับ C1 (101.5) ดังนั้นสรุปได้ว่าสาร 5 คือสารที่ชื่อว่า 10-*O*-caffeoylcandoside methyl ester (Raju et al., 2004)



3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์พบว่าสารที่แยกได้ทุกชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ในจำนวนสารที่ทดสอบ 10-O-caffeoyl scandoside methyl ester แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้ที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 54.26 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

สารทดสอบ	% Inhibition at 1 mg/mL
β-sitosterol + stigmasterol	49.21
paederosidic acid methyl ester	43.99
paederosidic acid	32.37
10-O-caffeoyl scandoside methyl ester	54.26
acarbose in DMSO	94.77

4. สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยสามารถวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์และอิริตอยด์ไกลโคไซด์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้สำเร็จ โดยสามารถแยกสารเคมีจากลำต้นตดหมุดตดหมาได้ดังนี้ สารผสมของเทอร์ปีนอยด์ 2 ชนิด stigmasterol (1) และ β-sitosterol (2) และสารบริสุทธิ์ในกลุ่มอิริตอยด์ไกลโคไซด์ 3 ชนิด คือ paederosidic acid methyl ester (3), paederosidic acid (4), และ 10-O-caffeoyl scandoside methyl (5) สารทั้งหมดสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ในระดับปานกลาง โดยมี 10-O-caffeoylscandoside methyl ester สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดแต่น้อยกว่าอะคาร์โบส การที่ 10-O-caffeoylscandoside methyl ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสดีกว่าอิริตอยด์อีก 2 ชนิด คาดว่าน่าจะมีผลมาจาก caffeoyl ที่พบในสาร 5 แต่ไม่พบในอิริตอยด์อีก 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phuwapraisrisan (2009) ที่พบว่าส่วน caffeoyl มีผลอย่างมากต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

5. ข้อเสนอแนะ

ควรแยกสารกลุ่มอิริตอยด์ไกลโคไซด์อื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และควรพัฒนาตดหมุดตดหมาไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่บริโภคได้ง่าย เพื่อใช้ดูแลอาการเบาหวานด้วยตนเอง

6. เอกสารอ้างอิง

- กรุงเทพฯธุรกิจ. (2563). *ห้วง! ไทยป่วยเบาหวานพุ่งสูงต่อเนื่อง ทะลุ 4.8 ล้านคน*. สืบค้นเมื่อ 29 เมษายน 2563 จาก <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/853944>.
- คมชัดลึก. (2558). *ตดหมุดตดหมาสมุนไพรลดเบาหวาน*. สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563 จาก <https://www.komchadluek.net/news/knowledge/209878>.
- ชุมชนคนรักสุขภาพธรรมชาติ. (2016). *ตดหมุดตดหมา*. สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563 จาก <https://www.facebook.com/ChumchnKhnRaksPhrmMi/posts/1257099174312438/>

- พิชานันท์ ลีแก้ว. (2558). *ตดหมุดตดหมาเพิ่มพลังทางเพศได้จริงหรือ*. สืบค้นเมื่อ 21 เมษายน 2563 จาก <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/296/ตดหมุดตดหมา-เพิ่มสมรรถภาพทางเพศได้จริงหรือ/>
- สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. (2017). *แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2560*. ปทุมธานี: รมเย็นดี มีเดีย จำกัด.
- สมุนไพรรักษาโรคเบาหวาน. (2562). *ตดหมุดตดหมา (พาโหม) สมุนไพรรักษาโรคเบาหวานไทยใช้ลดน้ำตาล-ไขมันในเลือด* สืบค้นเมื่อ 12 มีนาคม 2563 จาก https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_121550
- อนุสรณ์ ลังกาพันธ์. (2552). ผลกระทบของการเกิดอนุมูลอิสระจากโรคเบาหวานต่อการทำงานของไต. *ลำปางเวชสาร*. 30(2), 75-83.
- Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. (2012). Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.* 1, 239-242.
- Damsud, T., Adisakwattana, S., Phuwapraisiran, P. (2013). Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of *Piper sarmentosum* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochem. Lett.* 6, 350-354.
- He, D.H., Chen, J.S., Wang, X.L., Ding, K.Y. (2010). A new iridoid glycoside from *Paederia scandens*. *Chinese Chemical Letter*. 21(2101), 437-439.
<https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-knowledge-article-info.php?id=296>
- Inouye, H.; Inouye, S.; Shimokawa, N.; Okigawa, M. (1969). Studies on monoterpene glucosides. VII iridoid glucosides of *Paederia scandens*. *Chem. Pharm. Bull.* 17, 1942-1948.
- Ishikura, N.; Yang, Z.Q.; Yoshitama, K.; Kurosawa, K. (1990). Flavonol glycosides from *Paederia scandens* var. *mairei*. *Z. Naturforsch.* 45c, 1081-1084.
- Jusmine, R., Kumar, G. Rajaram, R. (2018). Probing the mechanism of the anti-diabetic potential of a terpenoid from *Elephantopus scaber* L., an Indian ethnomedicinal plant in STZ diabetic rats- In vitro and in silico analysis. *Indian J. Biochem. Biophys.* 55, 384-388.
- Li, Y.H., Dai, J.M., Yang, C., Jiang, M.Y., Xiong, Y., Li, Y.K., Li, H.R., Tian, K., Huang, X.Z. (2020). Phenylpropanoid and iridoid glucoside from the whole plant of *Hemiphragma heterophyllum* and their α -glucosidase inhibitory activities.
- Meneses, M., Silva, B., Sousa, M., Sá, R., Oliveira, F., and Alves, M.G. (2015). Antidiabetic drugs: Mechanisms of action and potential outcomes on cellular metabolism. *Curr. Pharm. Des.* 21(25), 3606-3620.
- Mohammed S.A., Yaqub A.G., Sanda, K.A., Nicholas, A.O., Arastus, W., Muhammad, M., Addullahi, S. (2013). Review on diabetes, synthesis drugs and glycemic effects of medicinal plants. *J. Med. Res.* 7(36), 2628-2637.
- Nie, Z.L., Deng, T., Meng, Y., Sun, H., and Wen, J. (2013). Post-boreotropical dispersals explain the pantropical disjunction in *Paederia* (Rubiaceae). *Ann. Bot.* 111, 873-86.
- Olokoba, A.B., Olusegun, A., Okoloba, L.B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *OMJ.* 27(4), 269-273.



- Phuwapraisirisan, P., Puksasook, T., Kokpol, U., Suwanborirux, K. (2009). Corchorusides A and B, new flavonol glycosides as α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Corchorus olitorius*. *Tetrahedron Lett.* 50, 5864-5867.
- Puff, C. (2007). *Flora of Thailand: Rubiaceae*. Accessed March 8. Available from https://homepage.univie.ac.at/christian.puff/_FTH-RUB/FTH-RUB_HOME.htm.
- Quang, D.N., Hashimoto, T., Tanaka, M., Dung, N.X., Asakawa, Y. (2002). Iridoid glucosides from roots of Vietnamese *Paederia scandens*. *Phytochemistry*. 60 (2002), 505-514.
- Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu, Hsu, F.L. (2004). Antioxidant iridoid glucosides from *Wendlandia formosana*. *Natural Product Research*. 18(4), 357-364.
- Sudta, P., Sabyjai, C., Wanirat, K. (2013). Phytochemical analysis, *in vitro* antioxidant and cytotoxicity activity of extracts of *Paederia linearis* Hook. f. root. *The Sci. J. of Phetchaburi Rajabhat University*. 10(1), 5-18.
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A., Menichini, F. (2008). Biological and pharmacological activities of iridoid: recent developments. *Med. Chem.* 8, 399-420.
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A., Menichini, F. (2008). Biological and pharmacological activities of iridoids: recent development. *Med. Chem.* 8, 399-420.
- Yamabe, N., Kang, K.S., Matsuo, Y., Tanaka, T., Yokozawa, T. (2007). Identification of antidiabetic effect of iridoid glycosides and low molecular weight polyphenol fractions of *Corni Fructus*, A constituent of Hachimi-jio-gan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 30(7), 1289-1296.
- Zou, X.; Peng, S.; Liu, X.; Bai, B.; Ding, L. (2006). Sulfur-containing iridoid glucosides from *Paederia scandens*. *Fitoterapia*. 77, 374-377.