



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปริมาณสารลูปีโนไฟลีน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียใน  
ช่องปากของพืชสมุนไพรไทยที่มีชื่อท้องถิ่นว่าชะเอม : *Albizia myriophylla*, *Derris*  
*reticulata* และ *Myriopteron extensum*

นันทิยา จ้อยชะรัต ชลทิต สนธิเมือง สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ  
คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ TTM580894S

## กิตติกรรมประกาศ

This work was supported by a research grant for general researcher, the annual income budget of Prince of Songkla University (TTM580894S).

The authors would like to thank BIOTEC laboratories, NSTDA, Thailand for performing part of mass spectroscopic experiment of the isolated compounds.

The authors also acknowledge the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University for performing part of 1D- and 2D-NMR spectroscopic experiments of the isolated compounds.

## บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรไทยที่มีชื่อท้องถิ่นป้องกันว่าชะเอม 3 ชนิด ได้แก่ *Albizia myriophylla* (Leguminosae-Mimosoideae), *Derris reticulata* (Leguminosae-Papilionoideae) และ *Myriopteron extensum* (Apocynaceae) มีการนำมาใช้ในยาไทยเพื่อเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาโรคปวดฟันซึ่งมีสาเหตุจากฟันผุ และตำรับยารักษาโรคเบาหวาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพืชในกลุ่มชะเอม 3 ชนิด ดังกล่าว เพื่อใช้รักษาโรคที่สอดคล้องกับการใช้ในการแพทย์พื้นบ้านไทย วิเคราะห์ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์ต้านฟันผุของสารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดพาร์ทิจันด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอ็น-บิวทานอล จากเนื้อไม้ของ *A. myriophylla*, *D. reticulata* และ *M. extensum* และสารเคมีบริสุทธิ์ โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ด้วยวิธีทางสเปกโทรเมตรี (spectrophotometric method) และโดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ 2 ชนิด คือ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33478 ด้วยวิธี broth microdilution ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณสาร lupinifolin ในสารสกัดเฮกเซนของ *A. myriophylla*, *D. reticulata* และ *M. extensum* ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลของเนื้อไม้ *A. myriophylla*, *D. reticulata* และ *M. extensum* มีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 25  $\mu\text{g/mL}$  เท่ากับ  $9.83 \pm 3.63\%$ ,  $77.93 \pm 1.11\%$  และ  $7.21 \pm 8.05\%$  ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบเอทานอลของ *D. reticulata* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดหยาบเอทานอลจากพืชกลุ่มชะเอมอีก 2 ชนิด มีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้เล็กน้อย นอกจากนี้ *D. reticulata* ยังมีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดเฮกเซน และสารสกัดเอ็น-บิวทานอล สูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ  $69.30 \pm 2.13\%$  และ  $54.71 \pm 5.19\%$  ตามลำดับ ในขณะที่ *A. myriophylla* มีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดไดคลอโรมีเทนสูงสุด ซึ่งเท่ากับ  $11.10 \pm 7.24\%$  ทั้งนี้สารมาตรฐาน acarbose ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25  $\mu\text{g/mL}$  มีค่าร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เท่ากับ  $22.33 \pm 3.63\%$  จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนจาก *D. reticulata* มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ดีที่สุด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 7.81  $\mu\text{g/mL}$  รองลงมาคือสารสกัดหยาบเอทานอลจาก *D. reticulata* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 15.62  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่สารสกัดอื่นๆ ที่ศึกษาไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อนี้ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ 1000  $\mu\text{g/mL}$  จากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC พบว่าปริมาณสารลูปีโนลินต่อน้ำหนัก 1 กรัมของสารสกัดเฮกเซนของ *A. myriophylla*, *D. reticulata* และ *M. extensum* เท่ากับ 0.048, 604.88 และ 0.063 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยสารสกัดเฮกเซนจาก *D. reticulata* ซึ่งมีปริมาณสารลูปีโนลินมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชนิดเดียวกันของพืชสมุนไพรอื่นอีก 2 ชนิดที่ศึกษา แสดง

คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนของ *A. myriophylla* และ *M. extensum* ซึ่งมีปริมาณสารลูปีโนไฟลีนเพียงเล็กน้อยจะไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้เล็กน้อย เมื่อนำสารสกัดเฮกเซนจากเนื้อไม้ของ *D. reticulata* มาแยกส่วนผสมและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารเคมีบริสุทธิ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว 3 ชนิด ได้แก่ lupinifolin (1), lupeol (2) และ  $\beta$ -sitosterol (3) โดยพบว่าสาร 1–3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ในระดับดีมาก โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 7.88-11.74  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่สารมาตรฐาน acarbose มีค่า  $IC_{50}$  125  $\mu\text{g/mL}$  นอกจากนี้จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า lupinifolin (1) ที่แยกได้จากสารสกัดเฮกเซนของ *D. reticulata* แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ได้ในระดับดีมาก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.39  $\mu\text{g/mL}$  เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน chlorhexidine ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.39  $\mu\text{g/mL}$  อย่างไรก็ตามสาร 1 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. sobrinus* ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 100  $\mu\text{g/mL}$  เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน chlorhexidine ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. sobrinus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.39  $\mu\text{g/mL}$  เมื่อนำสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากเนื้อไม้ของ *A. myriophylla* มาแยกส่วนผสมและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารเคมีบริสุทธิ์ 1 ชนิด ซึ่งพบได้น้อยในธรรมชาติ คือ indenoic acid (4) และสารบริสุทธิ์ที่เคยมีรายงานไว้แล้วอีก 2 ชนิด คือ 3,4,7,3'-tetrahydroxyflavan (5) และ 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone (6) โดยพบว่าสาร 5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารอีก 2 ชนิดที่แยกได้จาก *A. myriophylla* โดยมีค่า  $IC_{50}$  98  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่สารมาตรฐาน acarbose มีค่า  $IC_{50}$  125  $\mu\text{g/mL}$  อย่างไรก็ตามพบว่าสาร 4–6 จาก *A. myriophylla* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของฟันผุที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 250  $\mu\text{g/mL}$

## Abstract

Three medicinal plants that have the same Thai local name as Cha-Em, *Albizia myriophylla* (Leguminosae-Mimosoideae), *Derris reticulata* (Leguminosae-Papilionoideae) and *Myriopterum extensum* (Apocynaceae), are used for the treatment of dental caries and diabetes in Thai folk remedies. The purpose of this research was to compare the efficacy of those three medicinal plants locally known as Cha-Em for the treatment of diseases corresponding to their ethnomedical claims in Thai traditional medicine. Alpha-glucosidase inhibitory activity assay of ethanol extract, the various solvent soluble fractions, including those of hexane, dichloromethane, and *n*-butanol, from the wood of *A. myriophylla*, *D. reticulata* and *M. extensum* and pure compounds was performed using spectrophotometric method. The antibacterial activity of ethanol extract, the various solvent soluble fractions, including those of hexane, dichloromethane, and *n*-butanol, from the wood of *A. myriophylla*, *D. reticulata* and *M. extensum* and pure compounds against two standard strains of carcinogenic bacteria, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *S. sobrinus* ATCC 33478, was evaluated by broth microdilution assay. Lupinifolin content in hexane extract of *A. myriophylla*, *D. reticulata* and *M. extensum* was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Chemical structure of bioactive compounds was identified by spectroscopic method. The results revealed that the respective inhibition percentages against  $\alpha$ -glucosidase of the crude ethanol extracts of *A. myriophylla*, *D. reticulata* and *M. extensum* at the tested concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  were  $9.83 \pm 3.63\%$ ,  $77.93 \pm 1.11\%$  and  $7.21 \pm 8.05\%$ . Among the ethanol extract of three plants tested, that of *D. reticulata* was the most active toward  $\alpha$ -glucosidase, while the others had mild  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. Furthermore, the hexane and *n*-butanol soluble fractions of *D. reticulata* exhibited the best  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with the respective inhibition percentages of  $69.30 \pm 2.13\%$  and  $54.71 \pm 5.19\%$ , compared with that of corresponding fractions from other two plants tested. Among the dichloromethane fraction of three plants tested, that of *A. myriophylla* had the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with the inhibition percentage of  $11.10 \pm 7.24\%$ . The inhibition percentage of standard acarbose at the concentration tested of 25  $\mu\text{g/mL}$  was found to be  $22.33 \pm 3.63\%$ . The results also revealed that the hexane fraction of *D. reticulata* had the best antibacterial activity against *S. mutans* with MIC at 7.81  $\mu\text{g/mL}$ ,

followed by the crude ethanol extract of this plant species with MIC at 15.62  $\mu\text{g/mL}$ . On the contrary, the other extracts tested in this study did not show antibacterial activity against *S. mutans* and *S. sobrinus* at the highest concentration tested of 1000  $\mu\text{g/mL}$ . The results of quantitative analysis of lupinifolin content by HPLC showed that the quantities of lupinifolin in hexane extract of *A. myriophylla*, *D. reticulata* and *M. extensum* were 0.048, 604.88 and 0.063 mg/g, respectively. The hexane extract of *D. reticulata* with the highest amount of lupinifolin demonstrated the best antibacterial and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, while that of other two plants, *A. myriophylla* and *M. extensum*, with low amount of lupinifolin showed weak or no activities against the tested bacterial pathogens and  $\alpha$ -glucosidase. Chromatographic separation of hexane extract from *D. reticulata* wood led to the isolation of three known compounds, namely lupinifolin (**1**), lupeol (**2**) and  $\beta$ -sitosterol (**3**). The isolates **1–3** exhibited very good  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, with the  $\text{IC}_{50}$  values in the range of 7.88–11.74  $\mu\text{g/mL}$ , whereas acarbose had an  $\text{IC}_{50}$  of 125  $\mu\text{g/mL}$ . In addition, lupinifolin (**1**) isolated from *D. reticulata* also showed potent antibacterial activity against *S. mutans* with MIC of 0.39  $\mu\text{g/mL}$ , comparable to that of the standard chlorhexidine with MIC of 0.39  $\mu\text{g/mL}$ . However, compound **1** did not show antibacterial activity against *S. sobrinus* at the highest concentration tested of 100  $\mu\text{g/mL}$ , while chlorhexidine exhibited inhibitory activity against *S. sobrinus* with MIC of 0.39  $\mu\text{g/mL}$ . Chromatographic separation of dichloromethane extract from *A. myriophylla* wood led to the isolation of a rare compound named indenoic acid (**4**), together with two known compounds named 3,4,7,3'-tetrahydroxyflavan (**5**) and 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone (**6**). The isolate **5** exhibited the best  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with an  $\text{IC}_{50}$  of 98  $\mu\text{g/mL}$ , compared to that of the other two isolates from *A. myriophylla*, while the standard acarbose had an  $\text{IC}_{50}$  of 125  $\mu\text{g/mL}$ . However, it was found that the isolates **4–6** from *A. myriophylla* did not have inhibitory activity against the bacterial pathogens of tooth decay, *S. mutans* and *S. sobrinus*, at the highest concentration tested of 250  $\mu\text{g/mL}$ .