

ชื่อเรื่อง	ผลการยับยั้งของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานต่อฤทธิ์แซนทีนออกซิเดส
ผู้วิจัย	เจนจิรา บุญธิมา
สถานที่ที่ปรึกษา	ดร.เนตรนภิส วรณิสสร
กรรมการที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.ไมตรี สุทธิจิตต์ ดร.อนุสรณ์ วรสิงห์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2552
คำสำคัญ	ไหมข้าวโพดหวาน แซนทีนออกซิเดส เก้าอี้

บทคัดย่อ

แซนทีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์สำคัญในการเปลี่ยนไฮโปแซนทีนเป็นแซนทีนและเปลี่ยนแซนทีนเป็นกรดยูริก หากสะสมในปริมาณมากจะเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะกรดยูริกในเลือดสูงในร่างกายมนุษย์ อัลโลพูรินอลเป็นยาในกลุ่มยับยั้งการสร้างกรดยูริกถูกนำมาใช้รักษาโรคเก๊าต์ แต่เนื่องจากมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาต่างๆ เช่น อาการแพ้ยาแบบสตีเวนส์-จอห์นสัน ไฮเปอร์เร็นชิติวิติต์ซินโดรม หากใช้เป็นระยะเวลาอันยาวนานอาจมีผลเสียต่อไตได้ ปัจจุบันมีการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาใช้ในการรักษาโรค จากการศึกษาที่ผ่านมาของประเทศอินเดียมีการนำสารสกัดจากพืชบางชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสพบว่า สารสกัดจากใบตำลึงที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ได้อย่างร้อยละ 75.10 ± 0.60 ในประเทศไทยมีการนำไหมข้าวโพดมาต้มและนำน้ำมาดื่มช่วยขับและลดกรดยูริกแต่ยังไม่มีการทดลองทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุน งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานและใบตำลึงแก่ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เปรียบเทียบกับยาอัลโลพูรินอลซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากใบตำลึงแก่และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ได้มากที่สุด มีร้อยละการยับยั้งในช่วง 42.12 ± 2.36 ถึง 86.74 ± 0.15 รองลงมาคือ สารสกัดจากใบตำลึงแก่มีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์นี้ในช่วง 22.32 ± 0.78 ถึง 23.03 ± 1.05 เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบชนิดยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส พบว่า มีการยับยั้งเอนไซม์แซนทีน ออกซิเดสแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) และไม่แข่งขัน (Uncompetitive inhibitor) ตามลำดับ ในการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน

ด้วยวิธี Folin Ciocalteu มีค่าเท่ากับ 49 ± 0.04 mg/GAE/g น้ำหนักแห้ง เมื่อนำสารสกัดตัวอย่าง มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Benedict's test พบสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีน้ำตาลรีดิวซ์มาจับ ทำการตัด sugar part ด้วยการ hydrolysis ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสอีกครั้ง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าสารสกัดจากโสมข้าวโพดหวานที่ไม่ทำปฏิกิริยา acid hydrolysis เมื่อนำสารสกัดจากโสมข้าวโพดหวานมาวิเคราะห์แยกด้วยเครื่อง HPLC และนำแต่ละ fractions มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสพบว่า fraction 6 มีร้อยละการยับยั้งมากที่สุด (35.9 ± 1.44) จึงนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท สารสกัดที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากโสมข้าวโพดหวานด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant potential (FRAP) assay สารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทใน fraction 6 มีค่า ascorbic acid equivalent (AAE) มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.532 $\mu\text{mole Ascorbic acid}/1$ mg ของสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากโสมข้าวโพดหวานมีค่า ascorbic acid equivalent (AAE) เท่ากับ 0.272 $\mu\text{mole Ascorbic acid}/1$ mg ของสารสกัด เมื่อนำสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทใน fraction 6 วิเคราะห์แยกองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิค HPLC สามารถตรวจพบสาร Vitexin และ Luteolin จึงนำสารทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส สารมาตรฐาน Luteolin ($IC_{50} = 0.039$ mM) แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสช่วง 65.57 ± 0.02 ถึง 81.60 ± 0.03 ใกล้เคียงกับการใช้ยาอัลโลพูรินอล ($IC_{50} = 0.031$ mM) ขณะที่สารมาตรฐาน Vitexin ($IC_{50} = 0.326$ mM) แสดงค่าในช่วง 20.28 ± 0.03 ถึง 52.83 ± 0.03 จากข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบว่าโสมข้าวโพดหวานมีสารกลุ่มฟีนอลิก กลุ่มฟลาโวนอยด์ชนิดฟลาโวน (Luteolin และ Vitexin) เป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย นอกจากนี้ยังตรวจพบกลุ่มสาร steroids และ terpenes เป็นองค์ประกอบอีกด้วย สามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการนำโสมข้าวโพดหวานมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคเกาต์ต่อไปได้

Title INHIBITORY EFFECT OF SWEET CORN-SILK
EXTRACT ON XANTHINE OXIDASE ACTIVITY

Author Janejira Boontima

Advisor Netnaphis Warnnissorn, Ph.D.

Co - Advisor Emeritus Professor Maitree Suttajit, Ph.D.
Anusorn Vorasingha, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Biochemistry, Naresuan University, 2009

Keywords Sweet corn-silk, Xanthine oxidase, Gout

ABSTRACT

Xanthine oxidase (XO) is a key enzyme which oxidizes hypoxanthine to xanthine and oxidized again uric acid. The overproduction of uric acid can cause hyperuricemia and gout in humans. allopurinol is a xanthine oxidase inhibitor used to treat gout. However, allopurinol has side effects such as hypersensitivity syndrome, Steven-Johnson syndrome and renal toxicity. There are various types herbal preparations, that can be used for the treatment of various ailments. A previous report that a *Coccinia grandis* extract at 100 µg/ml inhibits xanthine oxidase activity by 75%. In Thailand, boiled corn-silk water is used as a diuretic and also to reduce hyperuricemia. This mechanism of this action is unknown but one possibility is that it inhibits xanthine oxidase. This work studies aqueous extracts from corn-silk of *Zea mays saccharata* and leaves of *Coccinia grandis* and its ability to inhibit XO activity compared with the standard drug allopurinol. It was carried out by optimizing enzyme kinetic's condition for the XO activity assay. Sweet corn-silk extract, *Coccinia grandis* extract and allopurinol were assayed for xanthine oxidase inhibitory (XOI) activity at 10, 25, 50 and 100 µg/ml. Sweet corn silk extract had the greatest XOI activity (range 42.12 ± 2.36 to 86.74 ± 0.15%, IC₅₀ = 17 µg/ml) followed by *Coccinia grandis* extract (range 22.32 ± 0.78 to 23.03 ± 1.05%). Line weaver-Burk plots showed that the inhibition modes were competitive and uncompetitive, respectively. Total phenolic content was 49 ± 0.04 mg/GAE/g dry extract as determined by the Folin-Ciocalteu method. The reducing property of sweet corn-silk extract was assayed with

Benedict's test and showed that the phenolic compounds were bound to glycosides via reducing sugar group. In a previous study, xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medicinal plants it was found that *Coccinia grandis*, at 100 µg/ml showed 75.10 ± 0.60% inhibition of xanthine oxidase. After the sugar moiety was denatured in the corn-silk extract by acid hydrolysis. The XOI activity of hydrolysate was increased. Sweet corn-silk crude extract was fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC). Each fraction was collected to investigate their XOI activity. Fraction 6 (Fr.6) had the highest XOI activity (35.9 ± 1.44%). Further separation of Fr.6 used ethyl acetate (Fr.6-EtOAc). Determination of the antioxidant activity of crude corn-silk and Fr.6-EtOAc was performed using ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay (expressed as the ascorbic acid equivalent, AAE) was 0.532 µmole ascorbic acid/1 mg. This was higher than crude sweet corn-silk extract at 0.272 µmole ascorbic acid/1mg extract. Identification of substances in fr.6-EtOAc by HPLC found to be Vitexin and Luteolin. The XOI activity of Luteolin showed high XOI activity (ranging 65.57 ± 0.02 to 81.60 ± 0.02, IC₅₀ = 0.039 mM) similar to allopurinol (IC₅₀ = 0.031 mM). In contrast, Vitexin showed lower XOI activity (20.28 ± 0.03 to 52.83 ± 0.03, IC₅₀ = 0.326 mM). These results indicated that sweet corn-silk contain phenolic compounds, flavones (Luteolin and Vitexin) a subclass of flavonoids. These results suggest that Luteolin could form a treatment of gout.