



รายงานการวิจัย

การศึกษาปริมาณสารเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านส่งเสริมความจำของผู้สูงอายุใน
จังหวัดเพชรบูรณ์

**The study of chemical content and acetylcholinesterase inhibitory
activity of local herbal extracts to boost the memories of elderly in
Phetchabun Province**

น้ำฝน เป้าทองคำ
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2565

รหัสโครงการสัญญา

65A145000014

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปริมาณสารเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านส่งเสริมความจำของผู้สูงอายุใน
จังหวัดเพชรบูรณ์

The study of chemical content and acetylcholinesterase inhibitory
activity of local herbal extracts to boost the memories of elderly in
Phetchabun Province

นำฝน เบ้าทองคำ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป
คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ทุนอุดหนุนโดย
ทุนอุดหนุนงานวิจัย พัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม
ประจำปีงบประมาณ 2565

(ก)

ชื่องานวิจัย	การศึกษาปริมาณสารเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านส่งเสริมความจำของผู้สูงอายุในจังหวัดเพชรบูรณ์
ผู้วิจัย	The study of chemical content and acetylcholinesterase inhibitory activity of local herbal extracts to boost the memories of elderly in Phetchabun Province
สาขาวิชา	นางสาวน้ำฝน เบ้าทองคำ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีเสร็จวิจัย 2566

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้าน และ 2) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง Acetylcholinesterase ของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ พริกไทย ผักคราด ขมิ้นชัน กระชายขาว และบัวบก ในตัวทำละลายน้ำที่อัตราส่วน 1:5 อุณหภูมิ 70 °C จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดของบัวบกมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 461 $\mu\text{g/mL}$ ของวิธี DPPH และ 188 $\mu\text{g/mL}$ ของวิธี ABTS ผลการทดสอบการยับยั้ง Acetylcholinesterase พบว่าสารสกัดของผักคราดมีฤทธิ์การยับยั้งสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 236 $\mu\text{g/mL}$

คำสำคัญ: DPPH, ABTS, Acetylcholinesterase

(๗)

Research Title The study of chemical content and acetylcholinesterase inhibitory activity of local herbal extracts to boost the memories of elderly in Phetchabun Province

Author Namfon Baowthongkum

Department General Science
Phetchabun Rajabhat University, 2023

Abstract

The objectives of this research were 1) to study the free radical scavenging activity of local herbal extracts and 2) to study of acetylcholinesterase inhibition of extracts from 5 local herbs, including *Piper nigrum* L., *Spilanthes acmella* L. Murr, *Curcuma longa* L., *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf and *Centella asiatica* (L.) Urban in water solvent at 1:5 ratio, temperature 70 °C. Then, antioxidant activity was tested by DPPH and ABTS methods. The antioxidant activity was highest of *Centella asiatica* (L.) Urban at concentrations of 461 µg/mL of DPPH and 188 µg/mL of ABTS. And was found that acetylcholinesterase inhibition of *Spilanthes acmella* L. Murr extracts had the highest inhibitory effect at the concentration of 236 µg/mL.

Keywords: DPPH, ABTS, Acetylcholinesterase

(ก)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณาจารย์ในมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ที่สละเวลาให้คำแนะนำคำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่านเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณา ให้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ และให้คำปรึกษาแนะนำ ให้แก่ผู้วิจัย จึงขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

น้ำฝน เบ้าทองคำ

28 กุมภาพันธ์ 2566

$$(1)$$

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 สมมุติฐานการวิจัย	2
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลพื้นฐาน	4
2.2 การยับยั้งอนุมูลอิสระ.....	12
2.3 การยับยั้ง Acetylcholinesterase.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	30
3.1 ขอบเขตการวิจัย.....	30
3.2 กอบแนวคิด	30
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	35
4.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราจากมะขามหวานของสารสกัดจากเปลือก มังคุด.....	35

(จ)

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	40
5.1 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	41
ประวัติคณะผู้วิจัย	

(จ)

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3 - 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer).....	35
3 - 2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer).....	37
4 - 1 แสดงผลความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูล อิสระและเอ็นไซม์อะเซติล โคลีนเอสเทอเรสที่ร้อยละ 50	38

(ข)
สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2 - 1 Piperine (1) Piperyline (2), Piperlonguminine (3) และ Piperettine (4)	8
2 - 2 ผักคราด.....	10
2 - 3 ผักคราด.....	11
2 - 4 ขมิ้นชัน.....	11
2 - 5 โครงสร้างสารสกัดจากขมิ้นชัน.....	12
2 - 6 กระชายขาว.....	16
2 - 7 บัวบก	17
2 - 8 Primary antioxidant	18
2 - 9 Oxygen scavenger.....	19
2 - 10 Secondary antioxidant.....	20
2 - 11 Chelating agent	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาทเป็นกลุ่มของความผิดปกติที่ต่างกันซึ่งมีลักษณะการเสื่อมของโครงสร้างและการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางหรือระบบประสาทส่วนปลาย โรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาทที่พบบ่อย ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease - AD) เป็นโรคที่ซับซ้อน ความเสื่อมของระบบประสาทที่ส่งผลกระทบต่อประชากรสูงอายุเป็นหลัก และคาดว่าจะมีผู้ป่วยสมองเสื่อมถึง 50-60% ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี การจับคู่กันของการส่งกระแสประสาท acetylcholine ส่วนกลาง (ACh) (AK Singh et al., 2010) ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีลักษณะเฉพาะคือมีปัญหาในการรับรู้ เช่น สูญเสียความทรงจำและความพิการทางเหตุผลเนื่องจากประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ประสาทลดลงและความเข้มข้นของสารสื่อประสาทที่ลดลงในช่องว่างระหว่างไซแนปติก ทำให้การส่งผ่านซินแนปติกไม่ดี ซึ่งนำไปสู่การขาดดุลของสารสื่อประสาท cholinergic ในระบบประสาทส่วนกลาง การเกิดโรคของโรคอัลไซเมอร์นั้นซับซ้อนและรวมถึงปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงต้องการแนวทางการรักษาที่หลากหลาย สาเหตุที่รู้จักกันดีบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ การขาด cholinergic, ความเครียด, เส้นประสาทอักเสบ (Tomasz Tuzimski และ Anna Petruczynik, 2022) การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญที่สุดที่สังเกตได้ในสมองคือการลดลงของเยื่อหุ้มสมองระดับของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน โดยอะเซทิลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทที่จุดเชื่อมต่อของประสาทและกล้ามเนื้อ ที่ไซแนปส์ในปมประสาทของระบบอวัยวะภายในและที่จุดต่าง ๆ ภายในระบบประสาทส่วนกลาง หนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการของ AD คือการเพิ่ม neurotransmitter acetylcholine (ACh) ผ่านการยับยั้ง acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำการไฮโดรไลซิส ACh ดังนั้นจึงมีการใช้สารยับยั้ง acetylcholinesterase หลายชนิดสำหรับการรักษาผู้ป่วย AD นอกจากตัวยับยั้งต้นแบบของ AChE physostigmine ที่ได้จากพืช *Physostigma venenosum* แล้ว โมเลกุลอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่มีนัยสำคัญสูง ได้แก่ galantamine, huperzine A ที่ได้จาก *Galanthus nivalis* และ *Huperzia serrata* (Nuttiya Werawattanachai และ Rawiwun Kaewamatawong, 2559)

มีการวิจัยทางวิทยาศาสตร์จำนวนมากเกี่ยวกับสมุนไพร สมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระที่อาจใช้ในการรักษา AD ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีภาวะพร่องอะเซทิลโคลีน สมุนไพร

ด้านการอักเสบอาจลดการอักเสบของเนื้อเยื่อสมองในโรคอัลไซเมอร์ เช่น ดอกคาโมไมล์เยอรมัน, โสม, ชะเอมเทศ, และขมิ้น สารประกอบใด ๆ ที่ช่วยเพิ่มระบบ cholinergic ในสมองอาจมีประโยชน์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์และการทำงานผิดปกติของสมองที่คล้ายคลึงกัน สมุนไพรที่ยับยั้ง Acetylcholinesterase (AChE) มีสารยับยั้ง COX-2 ตามธรรมชาติ มีรายงานว่าสมุนไพรสำหรับการรักษาอาการ AD สมุนไพรอายุรเวทบางชนิด เช่น Guduchi, Yashtimadhu, Padma (Nelumbo nucifera), Vacha, Convolvulus pluricaulis, Shankhpushpi, Pancha-Tikta-Ghruta Gugguli, Amalaki, Musta Arjun, Amalaki, Ashwagandha, Galo Satva, Kutaj และอื่น ๆ เป็นสมุนไพรที่ขอยกย่องสำหรับการชะลอความแก่ ความเสื่อมของเซลล์สมองที่เกิดจากอัลไซเมอร์ ช่วยเพิ่มความสามารถในการทำงานของสมอง (Anil Kumar Singhal, Vijay Naithani, และ Om Prakash Bangar, 2012) สารสกัดหรือสารที่ได้จากพืชยังคงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการค้นหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ปัจจุบันมีสารประกอบตามธรรมชาติของพืชอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น อัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ที่มีผลป้องกันระบบประสาทซึ่งพิจารณามาใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์หรือโรคพาร์กินสัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 5 ชนิด

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง Acetylcholinesterase ของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 5 ชนิด

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสามารถยับยั้ง Acetylcholinesterase ได้

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

1.4.1 รูปแบบการวิจัย

การพัฒนาทดลอง (Experimental development)

1.4.2 เครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1.5 ประโยชน์ของการวิจัย

สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในการเลือกรับประทานสมุนไพรที่เป็นอาหารพื้นบ้านได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยฉบับนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรรพินบ้านจำนวน 5 ชนิด และ 2) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง Acetylcholinesterase ของสารสกัดจากสมุนไพรรพินบ้านจำนวน 5 ชนิด จึงได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

- 2.1 ข้อมูลพื้นฐาน
- 2.2 การยับยั้งอนุมูลอิสระ
- 2.3 การยับยั้ง Acetylcholinesterase

2.1 ข้อมูลพื้นฐาน

2.1.1 พริกไทย

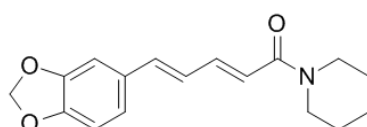
มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Piperaceae เป็นพืชที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นราชาของเครื่องเทศที่มีกลิ่นฉุน และเป็นเครื่องเทศที่ให้รสเผ็ดร้อน สามารถนำมาทำพริกไทยแห้งเป็นเครื่องปรุงอาหาร ซึ่งถ้าทำแห้งทิ้งเปลือกจะได้พริกไทยดำเนื่องจากเปลือกเมื่อทำให้แห้งจะมีสีดำ ส่วนพริกไทยขาวได้จากการลอกเปลือกออกก่อน พบทั้งการใช้ประกอบอาหารทั้งผลแห้งและผลสดที่มีสีเขียว หรือผลแห้งป่นเป็นผงเรียกพริกไทยป่น ซึ่งพริกไทยเป็นพืชคนละสายพันธุ์กับพริก (Chilli)

พริกไทยเป็นพืชประจำถิ่นในแถบตอนใต้ของเทือกเขาภาคของรัฐเกรละในประเทศอินเดีย นอกจากนั้นยังเป็นพืชเศรษฐกิจในเขตร้อน เช่น ในประเทศเวียดนาม อินโดนีเซีย บราซิล และอินเดีย เป็นไม้เลื้อยเจริญในแนวตั้ง สูงได้โดยการพันเกาะสิ่งอื่นได้ประมาณ 10 เมตรหรือมากกว่า มีลำต้นหลักและแตกแขนงออกเป็นพุ่ม มีการสร้างรากพิเศษสั้นๆ บริเวณข้อเพื่อยึดเกาะสิ่งรอบข้าง ช่วยในการพยุงลำต้น ใบเดี่ยว รูปรี เรียงสลับ โคนใบและปลายใบแหลม หลังใบสีเขียวเข้ม มันวาว ท้องใบสีเขียวอ่อน ช่อดอกแบบช่อเชิงลด ดอกย่อยสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน 50-150 ดอกต่อช่อ ผลทรงกลมแบบเมล็ดเดี่ยวแข็ง เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มม. ผลอ่อนมีสีเขียวเมื่อสุกมีสีแดง ติดผลประมาณ 50-60 เมล็ดต่อช่อผล การเก็บเกี่ยว 7-8 เดือนนับจากการออกดอก หรือเมื่อผลเหลืองถึงแดง

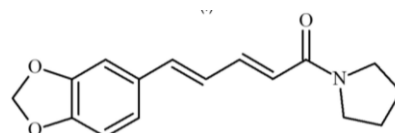
สารไพเพอริน (1-piperoylpiperidine) ซึ่งเป็นสารฐานไนโตรเจน เป็นสารอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในผลของพริกไทยดำ (*Piper nigrum*) พริกยาว (*Piper longum*) และไพเพอร์สปีชีส์อื่น ๆ

(วงศ์: Piperaceae) พืชเหล่านี้ทั่วโลกนิยมนำใช้เป็นเครื่องเทศในครัวเรือน เช่น วัตถุเจือปนอาหารและเครื่องปรุงรส นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมสำคัญสำหรับวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ต่าง ๆ ในยาแผนโบราณในหลายประเทศในเอเชีย เนื่องจากไพเพอรินได้รับการยอมรับว่าเป็นอัลคาลอยด์หลักในพืชเหล่านี้ การศึกษาจำนวนมากจึงมุ่งเน้นไปที่การตรวจสอบกิจกรรมทางเภสัชวิทยาของไพเพอริน การศึกษาทางเภสัชวิทยาแสดงว่า ไพเพอรินมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและยาแก้ปวด, ฤทธิ์กันชัก และต้านแผลในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้า, ผลการเสริมสร้างความรู้ความเข้าใจ, ฤทธิ์ป้องกันเซลล์ไฮโดรและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สำหรับผลของไพเพอรินต่อการทำงานของตับรับรู้และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีการศึกษาผลของไพเพอรินต่อความจำเสื่อมและการเสื่อมของระบบประสาทในแบบจำลองโรคอัลไซเมอร์ (Pennapa Chonpathompikunlert, Jintanaporn Wattanathorn, Supaporn Muchimapura, 2010) ทำการศึกษาสมบัติของสารสกัด amyloid beta(1–42) จากพืชในตระกูลพริกไทยในตัวทำละลายเมทานอลในการเพิ่มประสิทธิภาพหน่วยความจำโดยการทดลองในหนู เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการศึกษา amyloid beta(1–42) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพหน่วยความจำและมีความสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถลดความเครียดในหนูได้ (Lucian Hritcu et al., 2015)

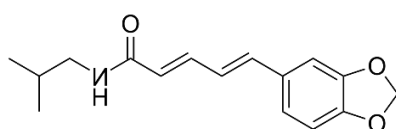
สารสกัดจากพริกไทยที่ตรวจสอบแล้วว่าแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ยาด้านโรคอัลไซเมอร์ ยากล่อมประสาท ยาแก้ชัก สารต้านอนุมูลอิสระด้านการขาดเลือด สารต้านการกลายพันธุ์ สารต้านจุลชีพของเนื้องอก สารต้านการอักเสบ มีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับอัลคาลอยด์ เช่น Piperine (1) Piperyline (2), Piperlonguminine (3) และ Piperettine (4)



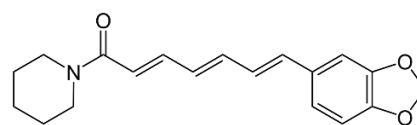
Piperine (1)



Piperyline (2)



Piperlonguminine (3)



Piperettine (4)

รูปที่ 2-1 Piperine (1) Piperyline (2), Piperlonguminine (3) และ Piperettine (4)

(สุวิชาดา ใจเปีย; 2565)

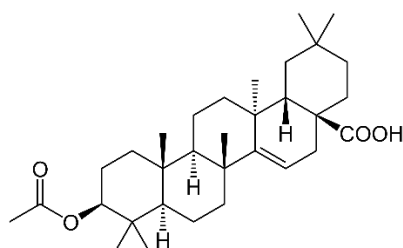
2.1.2 ผักคราด



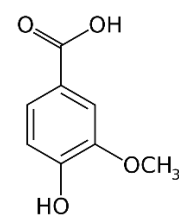
รูปที่ 2-2 ผักคราด

ที่มา: https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_236450

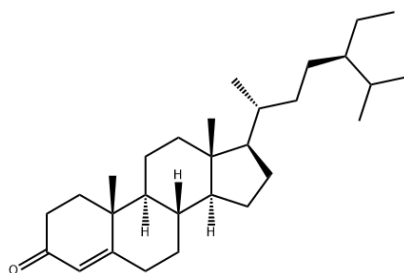
ผักคราด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Spilanthes acmella* L. Murr. หรือ *Acmella oleracea* เป็นพืชทางตอนเหนือของบราซิล ซึ่งรู้จักกันในชื่อ “jambú” หรือ “paracress” ใบและดอกถูกนำมาใช้โดยประชากรในการแพทย์พื้นบ้านและเป็นเครื่องปรุงอาหารในอาหารทั่วไป เนื่องจากรสชาติที่ฉุนของมัน จัมบูจึงมักใช้แทนพริกเผ็ดในอาหารท้องถิ่น ทำให้ลิ้นรู้สึกซ่าและชา โดยปกติจะใช้เป็นยาชาเพื่อรักษาอาการปวดฟัน ในยาแผนโบราณ มีการใช้สารเตรียม jambú ในการรักษาบาดแผล โรคไขข้อ เช่น antispasmodic, febrifuge, tonic, anti-inflammatory และ anti-malarial agents กิจกรรมทางชีววิทยาที่อธิบายไว้สำหรับ *A. oleracea* ส่วนใหญ่มาจาก lipophilic N-alkyl-amides ซึ่งเป็นสารประกอบที่แสดงลักษณะของทั้งชนิดและสกุล *Acmella* ในหมู่ สปีคันทอล (แอฟฟีนิน) เป็นอัลคาไมด์ ซึ่งมีผลกระทบทางประสาทสัมผัสเฉพาะที่และการดำเนินการรักษาโรค ชาและด้านการอักเสบ (Renan Stein et al., 2021) นอกจากนี้สารสกัดจากผักคราดถูกแยกให้มีความหลากหลายทางสารออกฤทธิ์ชีววิทยา เช่น 3-acetylauritolic acid, vanillic acid, b-sitosterone, scopoletin, ferulic acid และ isoferulic acid พืชสมุนไพรนี้อาจเป็นแหล่งของสารป้องกันระบบประสาทชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท การแสดงออกด้านการป้องกันระบบประสาทของ *S. acmella* Murr มีรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อระบบประสาทที่เกิดจาก pirimicarb ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y (Wilasinee Suwanjang et al., 2017)



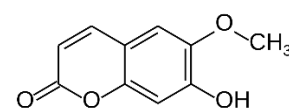
3-acetylaleuritic acid (1)



vanillic acid (2)



b-sitosterone (3)



scopoletin (4)

รูปที่ 2-3 ผักคราด

2.1.3 ขมิ้นชัน

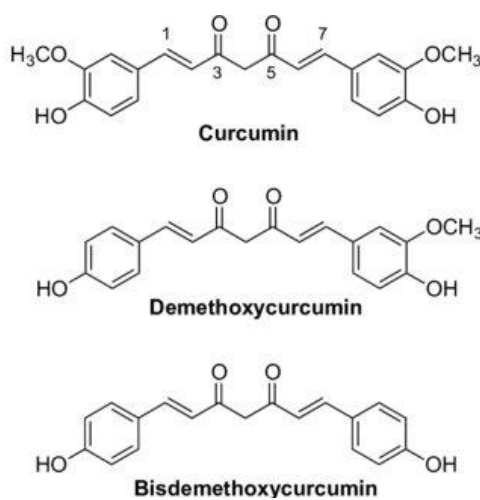


รูปที่ 2-4 ขมิ้นชัน

ที่มา: <https://prayod.com/turmeric>

ขมิ้นชัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Curcuma longa* L. จัดอยู่ในวงศ์ขิง (ZINGIBERACEAE) ใช้ในแกงและอาหารรสเผ็ดอื่น ๆ จากอินเดีย เอเชีย และตะวันออกกลาง คล้ายกับสมุนไพรอื่น ๆ หลายคนใช้เคอร์คูมินเป็นอาหารก่อนและค้นพบในภายหลังว่ามีคุณสมบัติทางยาที่น่าสนใจเช่นกัน มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอายุรเวท (ระบบการแพทย์ของอินเดีย) มานานหลายศตวรรษในฐานะยาบรรเทาอาการปวด ตัวแทนด้านการอักเสบเพื่อบรรเทาอาการปวดและการอักเสบของผิวหนังและกล้ามเนื้อ ได้รับการพิสูจน์ว่ามีคุณสมบัติต้านมะเร็ง

เคอร์คูมินถือเป็นยาอายุรเวทที่มีความสำคัญสูงในฐานะ "สารทำความสะอาดร่างกาย" และในปัจจุบัน วิทยาศาสตร์กำลังค้นหารายชื่อโรคที่สามารถรักษาได้ด้วยส่วนผสมที่ออกฤทธิ์ของขมิ้น เคอร์คูมินเป็นยาต้านการอักเสบในอัลไซเมอร์ การเกิดโรคอัลไซเมอร์ คือการอักเสบเรื้อรังของเซลล์ประสาท งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของการอักเสบที่เกี่ยวข้อง เช่น microgliosis, astrocytosis และสารกระตุ้นการอักเสบที่มาพร้อมกับการสะสมของเปปไทด์ amyloid- β ($A\beta$) ผู้ป่วยที่ใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAID) บางชนิดเป็นเวลานาน เช่น ไอบูโพรเฟน แสดงให้เห็นว่ามีความเสี่ยงในการเกิดอาการของโรค AD ลดลง อย่างไรก็ตาม การใช้ NSAID เรื้อรังอาจทำให้เกิดพิษต่อไต ตับ และทางเดินอาหาร เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงที่จะส่งผลต่อการเกิดการอักเสบได้สูง อาจมีบทบาทในการรักษา AD เคอร์คูมินยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Egr-1 ที่เกิดจาก $A\beta$ และเกิดการจับกับ DNA Egr-1 ในเซลล์ THP-1 monocytic การศึกษาได้แสดงให้เห็นบทบาทของ Egr-1 ในการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกิดจากอะไมลอยด์เปปไทด์ในโมโนไซต์ โดยการยับยั้งกิจกรรมที่จับกับ DNA ของ Egr-1 โดยเคอร์คูมิน จะช่วยลดการอักเสบ คีโมทาคซิสของโมโนไซต์ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากการตอบสนองต่อคีโมไคน์จากการกระตุ้นไมโครเกลียและแอสโตรไซต์ในสมองสามารถลดลงได้ด้วยเคอร์คูมิน (Shrikant Mishra และ Kalpana Palanivelu, 2008)



รูปที่ 2-5 โครงสร้างสารสกัดจากขมิ้นชัน

ที่มา: Tsuyoshi Hamaguchi, Kenjiro Ono¹ และ Masahito Yamada, (2010)

2.1.4 กระชายขาว



รูปที่ 2-6 กระชายขาว

ที่มา: สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดสุรินทร์

กระชายขาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. จัดอยู่ในวงศ์ขิง (ZINGIBERACEAE) พบมากในประเทศแถบเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา และจีนตอนใต้ มักใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร เช่นเดียวกับในยาแผนโบราณเพื่อรักษาเนื้องอก ท้องเสีย บวม และผิวหนังอักเสบ สารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ *B. rotunda* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ flavanones และ chalcones สารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลัก เช่น pinocembrin และ pinostrobin และ chalcones ที่สำคัญ ได้แก่ คาร์ดาโมนิน ทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ด้านเนื้องอก และต้านไวรัส นอกจากนี้ มีรายงานว่าสารประกอบเหล่านี้ส่งเสริมผลการป้องกันระบบประสาทต่อ $A\beta$, กลูตาเมต, ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน, การอักเสบ และการบาดเจ็บจากการขาดเลือดในการศึกษาในหลอดทดลองและในร่างกาย จากการวิจัย pinocembrin ลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำด้วย 6-OHDA- และ $A\beta$ ผ่านวิถี Nrf ในเซลล์ SH-SY5Y การให้ยาพิโนเซมบรินทางปาก (10 มก./กก.) เป็นเวลา 7 วัน ยับยั้งการอักเสบของฮิปโปแคมปัส ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการตายของเซลล์ในหนูทดลองของการไหลเวียนของเลือดในสมองขาดเลือด และเมื่อให้ pinocembrin รับประทานที่ 20 มก./กก. เป็นเวลา 8 วัน ความบกพร่องทางสติปัญญาจะดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าในช่องท้อง ยิ่งกว่านั้น การบริหารให้สารนี้แบบต่อเนื่อง (40 มก./กก.) เป็นระยะเวลา 3 เดือนยังลดความบกพร่องทางสติปัญญาและปกป้องหน่วยประสาทและหลอดเลือดในหนูหนูทดลองที่ดัดแปลงพันธุกรรม APP/PS1 ในขณะที่ Pinostrobin ก็ลดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและการตายของเซลล์ประสาท

แบบไมโทคอนเดรียลที่เป็นสื่อกลางอย่างมีนัยสำคัญต่อความเป็นพิษต่อระบบประสาทที่เกิดจาก $A\beta$ ในเซลล์ PC12 เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีรายงานว่า pinostrobin ปรับปรุงการสูญเสียเซลล์ประสาท (Kumju Youn และ Mira Jun, 2019)

2.1.5 บัวบก



รูปที่ 2-7 บัวบก

ที่มา: <https://medthai.com/>

บัวบก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (L.) Urban จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมบริโภคในสลัดหรือน้ำผลไม้ในหลายประเทศ รวมถึงมาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย และจีน มีการประยุกต์ใช้ทางชีววิทยาเภสัชวิทยาที่หลากหลาย รวมถึงการรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร โรคผิวหนัง ไข้ และปัญหาเกี่ยวกับความรู้ความเข้าใจและความจำ การศึกษาสารสกัดจากพืชและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เผยให้เห็นผลทางเภสัชวิทยาและการรักษาที่หลากหลาย รวมถึงคุณสมบัติต้านแผลในกระเพาะอาหาร ด้านจุลินทรีย์ ป้องกันเซลล์ไขมัน การอักเสบ ต่อต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติปกป้องเซลล์ไมโท ส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของบัวบก สามารถข้ามสิ่งกีดขวางของเลือดในสมองได้อย่างง่ายดาย และออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท ซึ่งรวมถึงโรคอัลไซเมอร์ (AD) และโรคพาร์กินสัน (PD) การศึกษาที่ผ่านมาเชื่อมโยงผลการป้องกันระบบประสาทและด้านการอักเสบเหล่านี้กับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นซึ่งจำเป็นต่อพลังงานชีวภาพของไมโทคอนเดรียและยีนต้านอนุมูลอิสระ (Jia Hui Wong¹, Anna M. Barron และ Jafri Malin Abdullah, 2021)

2.2 พฤษเคมีของพืช

2.2.1 ความหมายพฤษเคมี

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข กล่าวว่า สารพฤษเคมี หรือ ไฟโตนิวเทรียนท์ (อังกฤษ: Phytochemical หรือ Phytonutrients) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้น ๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤษเคมีเหล่านี้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคบางชนิดและโรคสำคัญที่มักจะกล่าวกันว่าสารกลุ่มนี้ช่วยป้องกันได้คือ “โรคมะเร็ง” กลไกการทำงานของสารพฤษเคมีเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจเป็นไปโดยการช่วยให้เอ็นไซม์บางกลุ่มทำงานได้ดีขึ้น เอ็นไซม์บางชนิดทำหน้าที่ทำลายสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย มีผลทำให้สารก่อมะเร็งหมดฤทธิ์ ซึ่งปัจจุบันพบสารพฤษเคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิด สารพฤษเคมีที่อยู่ในผักแสดงออกเป็นสารสีต่าง ๆ กัน ดังนี้

สารสีเขียว ได้แก่ บร็อคโคลี่ กระเทียม ผักชี บวบ หน่อไม้ฝรั่ง กุยช่าย ผักบุ้ง ผักโขม ผักปวยเล้ง ผักกาดหอม แตงกวา ถั่วลันเตา เป็นต้น สีเขียวนั้นเกิดจากสารคลอโรฟิลล์ และยังมีแร่ธาตุอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น ซีแซนทีน ธาตุเหล็ก แคลเซียม และวิตามินบี 2 ที่ช่วยในการเผาผลาญอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคและช่วยเร่ง กำจัดฤทธิ์สารก่อมะเร็ง

สารสีน้ำเงิน-ม่วง ได้แก่ หัวบีท กระหล่ำปลีม่วง หอมแดง ดอกอัญชัน เผือก มะเขือม่วง ฯลฯ มีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์และดวงตา ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคหัวใจอัมพาต

สารสีส้ม เหลือง ได้แก่ แครอท ฟักทอง อุดมไปด้วยสารเบต้าแคโรทีนและฟลาโวนอยด์ มีบทบาทช่วยให้มองเห็นในที่มืดได้ดี ลดความเสื่อมของเซลล์ของลูกตา ลดความเสี่ยงต่อการเป็นต้อกระจก ช่วยป้องกันผิวที่อาจเกิดจากอันตรายของรังสีอัลตราไวโอเลตที่มากับแสงแดดได้ จึงทำให้ผิวพรรณมีสุขภาพดี ไม่มีริ้วรอยแก่ก่อนวัย แลดูสดใสนุ่มนวล นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสภาพปกติของเซลล์เยื่อบุตาขาว กระจกตา ช่องปาก ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ รวมถึงทางเดินปัสสาวะให้เป็นปกติ และยังช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานได้ดีอีกด้วย

สารสีแดง ได้แก่ มะเขือเทศ พริกแดง แตงโม กระเจี๊ยบแดง หัวบีทรูท มีสารไลโคปีน (lycopene) และ เคปไซซินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชั้นดี ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ต่างๆ ในร่างกายโดยเฉพาะเซลล์ผิวหนัง และช่วยลดปริมาณไขมันตัวร้ายในเลือด ช่วยป้องกันการเกิดลิ้มเลือด ช่วยลดการเจ็บป่วย และ เพิ่มการเผาผลาญไขมัน

สารสีขาว-น้ำตาล ได้แก่ กระเทียม เซเลอรี (ขึ้นฉ่ายฝรั่ง) หอมหัวใหญ่ เห็ด ขิง ข่า ลูกเดือย งาขาว ฯลฯ มีสารอัลลิซิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเนื้อ

งอก ช่วยกระตุ้นเอนไซม์ในการทำลายพิษช่วยลดโคเลสเตอรอลในเลือด และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.1 ความหมายฤทธิ์ทางชีวภาพ

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) คือสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะ ต่อเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และสารนั้นจะต้องไม่มีผลในทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อย จากการศึกษาของ สาเหตุของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ปกติร่างกายมีกลไกในการป้องกันโดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายแต่ยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้นร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อย จึงควรได้รับจากภายนอกโดยการรับประทานอาหารที่อุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นองค์ประกอบของสารอาหารที่มีความพิเศษ (Extranutritional) ที่มีปริมาณน้อยในอาหาร มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมี และหน้าที่แตกต่างกัน รวมทั้ง พบว่าสารฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันโรคมะเร็ง และมีผลต่อการลดระดับโคเลสเตอรอล แล้วยังมีงานวิจัยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารพิษที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อมรอบๆตัว ช่วยชะลอความทรุดโทรมของร่างกายและป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยทั่วไปการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ มี 2 วิธีดังนี้

2.2.2.1.1 วิธี DPPH เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คือ อนุมูลอิสระดีฟิพิเอซ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล จะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง

2.2.2.1.2 วิธี ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอปียีเอส เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสี ABTS ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จากนั้นนำ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจาง ซึ่งจะทำให้สีเขียว หรือสีน้ำเงิน จางลงหรือไม่มีสี

2.2.3 อนุมูลอิสระ

2.2.3.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

อะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโคดเดี่ยว เนื่องจากการสูญเสียอิเล็กตรอนโคดเดี่ยว หรือมีอิเล็กตรอนโคดเดี่ยวเพิ่มขึ้น อาจเป็นประจุลบ ประจุบวก หรือเป็นกลางก็ได้ ปกติโมเลกุลจะสมดุลเมื่ออิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ แต่มีบางครั้งที่มีโมเลกุลบางชนิดสูญเสียอิเล็กตรอนไปหนึ่ง ทำให้อิเล็กตรอนขาดคู่ จึงไปดึงเอาอิเล็กตรอนจากอะตอม หรือโมเลกุลอื่นมาเข้าคู่เพื่อให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นเสถียรมากขึ้น ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอน จึงกลายเป็นอนุมูลอิสระขึ้นมาแล้ว ไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นที่อยู่ใกล้ซัดกันทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระมีอายุสั้นมากประมาณ 10-3 หรือ 10-10 วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและไม่เฉพาะเจาะจง ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นได้กับ ทุกโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน ความเสียหายจะเกิดขึ้นได้กับโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบย่อยของเซลล์ เมื่อเกิดขึ้นจะทำให้เซลล์เสียหายและสูญเสียหน้าที่ไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงเคมีหรือเชิงกายภาพของเซลล์ ในที่สุดก็เกิดเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของร่างกาย (degenerative disease) อนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1) อนุมูลอิสระที่เกิดในร่างกายของเราเอง เป็นผลจากในร่างกายของเรา มีกระบวนการ เมตาบอลิซึม (metabolism) เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกาย ต้องดำเนินการตามปกติ ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนี้สามารถรวมตัวกับไขมัน LDL (Low Density Lipoproteins) ได้ดี และยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย เช่น เอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (lipoxygenase) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) โมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็น

องค์ประกอบ ทาหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจาก กรดไขมัน และเติมออกซิเจนให้กรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้

2) อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย ซึ่งเกิดได้หลายปัจจัยด้วยกัน คือ จากการได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหริ้ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง หรือการใช้น้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และหน่วยสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ ความเสื่อมของร่างกาย และรวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ที่ทำให้ เกิดมะเร็งบางชนิด เป็นต้น โดยอนุมูลอิสระจะถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเองในสภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายได้รับมลภาวะแวดล้อมจะส่งผลให้ร่างกายสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระจะว่องไวมาก และทำให้เกิดความเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีระบบป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ และสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาปกป้องตนเองเพื่อไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (อนันต์ สกุลกิม, 2551)

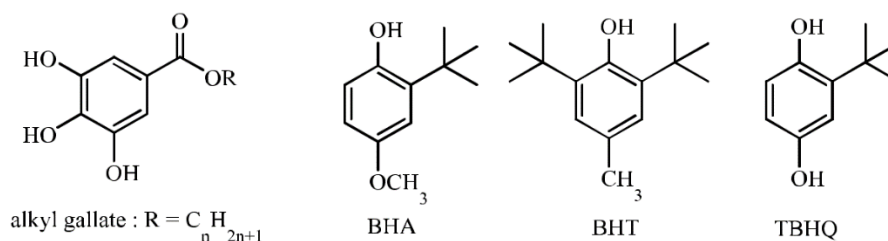
2.2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.2.4.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระคือ สารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมี ที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์หรือเกิดการเปลี่ยนเซลล์ปกติเป็น เซลล์มะเร็ง ซึ่งสารอาหารเช่นเบต้าแคโรทีน วิตามินซีและซีลีเนียมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารพิษที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวและช่วยลดการทำลายเซลล์โดยอนุมูลอิสระจึงช่วยชะลอความทรุดโทรมของร่างกายและป้องกันไม่ให้เกิด การเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง (อนันต์ สกุลกิม, 2551)โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

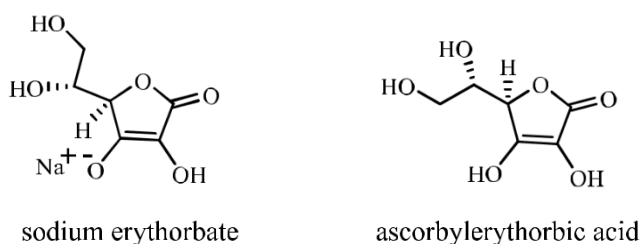
1) Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่สารประกอบฟีนอลิก (phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและรวมกระทั่งสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (natural and synthetic tocopherol), alkyl gallate, butylated hydroxynisole (BHA), butylated hydroxytoluene

(BHT), tertiary butyl hydro quinine (TBHQ) และสารอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน



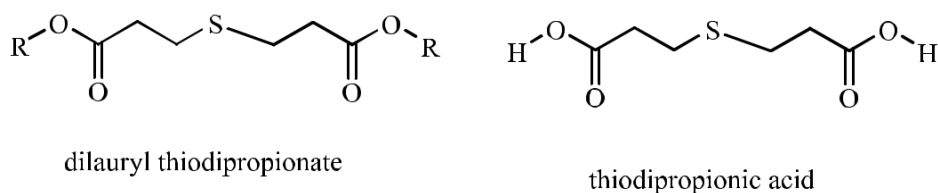
รูปที่ 2-8 Primary antioxidant

2) Oxygen scavenger สารกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี, ascorbylerythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้



รูปที่ 2-9 Oxygen scavenger

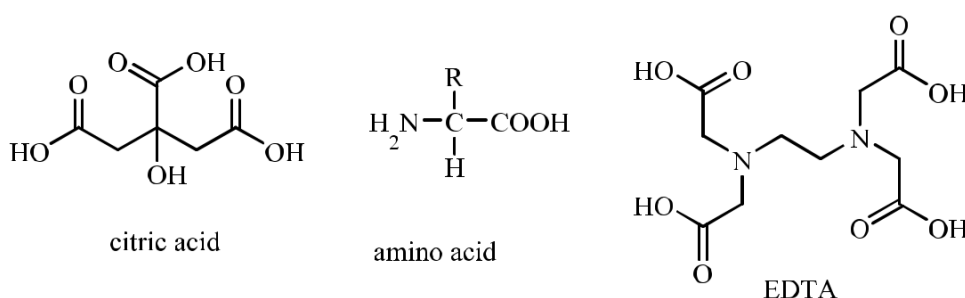
3) Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiodipropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร



รูปที่ 2-10 Secondary antioxidant

4) Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme ซึ่งสารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจน หรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

5) Chelating agent หรือ sequestrant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ citric acid, amino acid, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของ โลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริม และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร



รูปที่ 2-11 Chelating agent

สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารที่สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ (free radicals หรือ oxidants) สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทในการป้องกันการทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกายจากอนุมูลอิสระซึ่งทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้สารต้านอนุมูลอิสระเกิดจากการสังเคราะห์หรือพบในธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติได้แก่สารประกอบในกลุ่ม โพลีฟีนอลซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีนตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) กรดฟีนอลิก (phenolic acids) แทนนิน (tannins) เป็นต้น สารประกอบโพลีฟีนอลสามารถพบในพืช ผัก ผลไม้และสมุนไพรหลายชนิด

2.2.4.2. หน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันยับยั้งการเกิดออกซิเจนในรูปแอคทีฟซึ่งพบในขั้นตอนอินิทิเอชันของปฏิกิริยาออกซิเดชันหน้าที่ต่างๆเหล่านี้มีผลในการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสามารถหยุดปฏิกิริยาถูกใช้โดยการทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy ให้สารที่มีความเสถียรหรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ

2.2.4.3. การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบัน ใช้ อนุมูลอิสระ ที่ค่อนข้างเสถียรคือ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในการทดสอบและตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากพืชผักผลไม้และสมุนไพรและใช้ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) เป็นสารมาตรฐานตัวแทน

ของสารต้านอนุมูลอิสระที่จะไปทำปฏิกิริยากับ DPPH เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วเที่ยงพอสมควรและค่อนข้างง่ายโครงสร้างของสารประกอบ DPPH และ BHA

2.2.4.4. การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ทางเคมี (chemical base assay) DPPH radical scavenging assay โมเลกุลของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl มีลักษณะเป็น stable free radicals ซึ่งวิธีนี้ ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH radicals มีลักษณะพิเศษคือ ละลายในเอทานอลจะมีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อสารละลาย DPPH เข้าทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปปรีดิคซ์ ทำให้จากสีม่วงของ DPPH radicals จะจางลง ดังนั้น การวิเคราะห์นี้จึงประเมินความสามารถของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH radicals อนึ่ง วิธี DPPH นี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการวิเคราะห์ รวดเร็วและมีราคาถูกเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์อื่นๆ ABTS radical scavenging assay หรือ TEAC assay , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) คือ การตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระจากค่าการดูดกลืนแสงของ 2, 2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate) radicals (ABTS) ABTS ละลายในเอทานอลและน้ำ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงถึง 734 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้วิเคราะห์ความสามารถรวมของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการไม่มีสีของ ABTS radicals ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง ABTS ให้มีโครงสร้างที่ทำให้มองเห็นเป็นสี จากการเกิดออกซิเดชันของ ABTS และ potassium –persulfate การวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์เข้าได้กับสารประกอบ lipophilic และ hydrophilic สารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว จะทำการวิเคราะห์ได้หลังจากผ่านไป 120 นาที ที่มีการผสมเข้ากับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขั้นตอนแรก trolox เป็นแอนาลอกของวิตามินอีที่สามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปก็จะใช้ trolox ในการวัดเทียบค่ามาตรฐาน

Reducing power method เป็นหลักการพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยารวมของการเปลี่ยนรูปจาก Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ในการทดลองนี้สารต้านอนุมูลอิสระจะอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนที่มีสีกับ potassium ferricyanide, trichloro acetic acid และ ferric chloride ซึ่งจะวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จะแสดงผลของสารรีดิวซ์ที่เข้าไปเปลี่ยน Fe^{3+} (ferric cyanide complex) เป็น Fe^{2+} (Perl's Prussian blue formation) ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ของตัวอย่าง

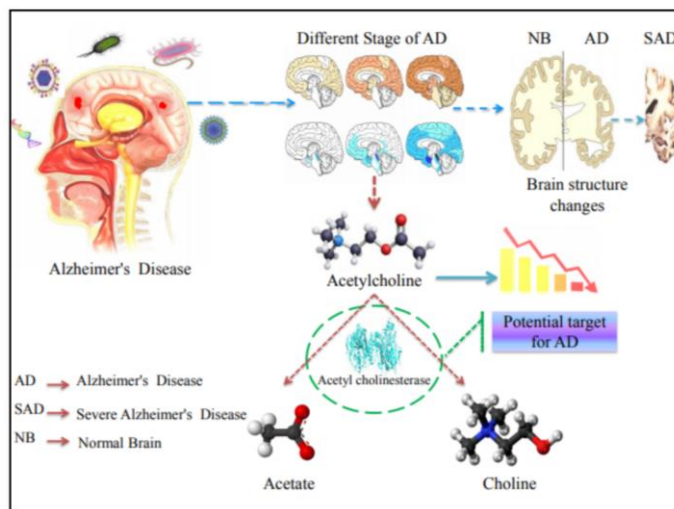
Ferric reducing antioxidant power assay เป็นเทคนิคที่ใช้วัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถรีดิวซ์เหล็ก ferric ได้ โดยพื้นฐานของการวิเคราะห์นี้คือการ

เกิดปฏิกิริยารีดักชันของโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ TPTZ เกิดเป็นสารสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในรูป ferrous ในสถานะที่เป็นกรด ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับค่า pH ในร่างกาย ข้อดีของการทดลองนี้คือ ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันนี้ สามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร

2.3 การยับยั้ง Acetylcholinesterase

สารยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (AChEIs) มักเรียกว่าสารยับยั้งโคลีนเอสเตอเรส ยับยั้งเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสจากการสลายสารสื่อประสาท สารยับยั้ง Acetylcholinesterase เป็นหนึ่งในสองประเภทของสารยับยั้ง cholinesterase อีกตัวเป็นสารยับยั้ง butyryl- cholinesterase Acetylcholinesterase เป็นสมาชิกหลักของ ตระกูล เอนไซม์ cholinesterase สารยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสถูกจัดอยู่ในประเภทปฏิริยาย้อนกลับได้ ย้อนกลับไม่ได้ หรือกึ่งกลับไม่ได้

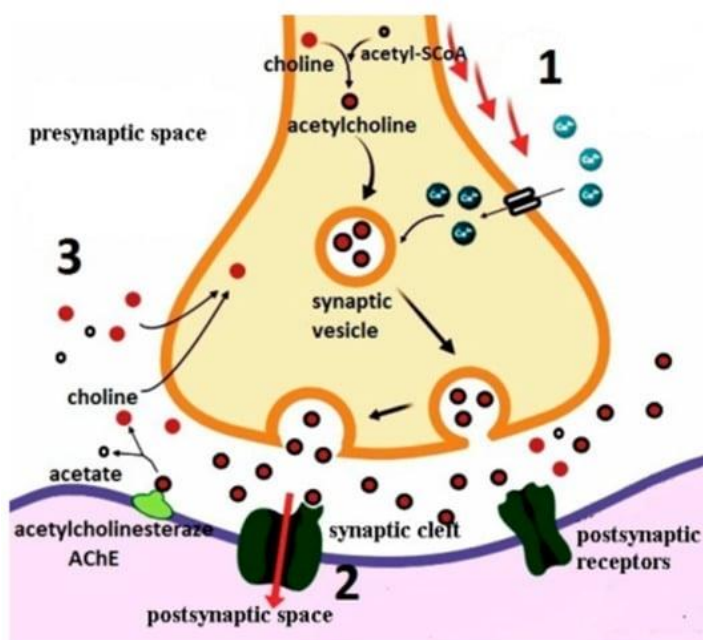
เอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการแตกตัวของ acetylcholine (ACh) เป็น acetate และ choline (รูปที่ 2-12) นอกจากนี้ยังเป็นเป้าหมายที่เป็นไปได้ของยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการรักษา AD การเสื่อมของเซลล์ประสาท cholinergic และการสูญเสียสารสื่อประสาทเป็นสาเหตุหลักของการลดลงของความรู้ความเข้าใจในผู้ป่วยโรคสมาธิสั้น ตามสมมติฐานของ cholinergic สาเหตุหลักของ AD คือการสังเคราะห์ ACh ที่ลดลง ดังนั้นจึงเป็นกลยุทธ์การรักษาที่มีศักยภาพในการเพิ่มระดับ cholinergic โดยการยับยั้งฤทธิ์ทางชีวภาพของ acetylcholinesterase (AChE) นอกจากนี้ สารยับยั้ง AChE ยังช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักในการรักษา AD การทบทวนนี้อธิบายถึงการเกิดโรค ลักษณะทางคลินิก สถานะปัจจุบัน โครงสร้างผลึก และทิศทางการพัฒนายาใหม่เพื่อลดความเป็นพิษและแสดงประโยชน์ในการรักษามากขึ้นสำหรับการรักษา AD



รูปที่ 2-11 ภาพรวมของโรคอัลไซเมอร์ (AD) Acetylcholinesterase (AChE) เป็นเอนไซม์สำคัญในการไฮโดรไลซิสของสารสื่อประสาท acetylcholine ให้เป็น acetate และ choline และเป็นเป้าหมายที่เป็นไปได้ของยาทางคลินิกส่วนใหญ่สำหรับการรักษา AD

ที่มา: Rajesh Basnet, Sandhya Khadka, Buddha Bahadur Basnet และ Radheshyam Gupta, 2020

สารสื่อประสาทโคลีนอร์จิกขึ้นอยู่กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ การเก็บรักษา การขนส่ง และการย่อยสลายของอะซิติลโคลีน สิ่งนี้ถูกสังเคราะห์ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ประสาท cholinergic จากโคลีนและแอคทีฟอะซิเตตที่ประมาณ 20% และสังเคราะห์ส่วนใหญ่ (80%) ที่ปุ่มเทอร์มินัล. โคลีนมาจากภายนอกเซลล์ประสาท (เป็นผลมาจากการสลายตัวของไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเลซิดิน และจากการไฮโดรไลซิสของอะซิติลโคลีน) และถูกจับได้โดยการสิ้นสุดของแอกซอนผ่านการแทรกแซงของกลไกการขนส่งเฉพาะ Acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) เกิดจากไพรูเวตในไมโทคอนเดรีย โคลีนเอสเตอริฟิเคชันกับอนุโมลอะเซทิลถูกเร่งปฏิกิริยาโดย ChAT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีความเข้มข้นสูงในไซโตพลาสซึมของปลายประสาท cholinergic และกิจกรรมของมันถูกควบคุมโดยการเปลี่ยนหัวของเซลล์ประสาท การไหลเข้าของแคลเซียมไอออน และฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ (รูปที่ 2-12)



รูปที่ 2-12 การแสดงแผนผังของหลักสูตรการปลดปล่อย acetylcholine และสมมติฐาน cholinergic ของ AD (1) ศักยภาพในการดำเนินการที่ทำให้เกิดการไหลเข้าของ Ca^{2+} และการเชื่อมต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ synaptic vesicles ตามมา (2) อะเซทิลโคลีนจับกับรีเซพเตอร์ที่เริ่มต้นการดีโพลาไรเซชันอย่างช้า ๆ ในเซลล์หลังไซแนปติก (3) AChE กระตุ้นการแตกตัวของอะเซทิลโคลีน และโมเลกุลของโคลีนจะถูกดูดซึมกลับโดยเซลล์ประสาทพรีซินแนปติก ACh, อะเซทิลโคลีน; AChE, อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส; อะเซทิล-โคเอ, อะเซทิลโคเอนไซม์ เอ.

ที่มา: Gabriela Dumitrita Stanciu et al., 2019

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 5 ชนิด และ 2) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง Acetylcholinesterase ของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านจำนวน 5 ชนิด ทั้งหมดได้จัดให้มีกิจกรรมการดำเนินงานดังนี้

3.1 ขอบเขตการวิจัย

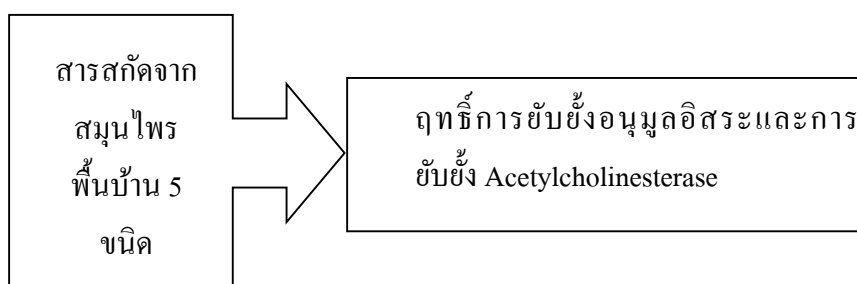
3.1.1 ขอบเขตด้านพื้นที่ดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยตัวอย่างผักที่เป็นสมุนไพรพื้นบ้านมาจากตลาดเทศบาล ๒ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์

3.1.2 ขอบเขตด้านเนื้อหา

เนื้อหาของงานวิจัยนี้ คือ การเตรียมสารสกัดด้วยการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปประเหยเอาตัวทำละลายน้ำออก จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระและการยับยั้ง Acetylcholinesterase

3.2 กรอบแนวคิด



3.3 การดำเนินการวิจัย

3.3.1 วัตถุดิบ

พริกไทย ผักคราด ขมิ้นชัน กระชายขาว และใบบัวบก

3.3.2 การเตรียมสารสกัด

นำพริกไทย ผักคราด ขมิ้นชัน กระชายขาว และใบบัวบก มาล้างน้ำให้สะอาด พักไว้ให้สะเด็ดน้ำ นำไปหั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็กจากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำที่อัตราส่วน 1:5 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองจนใส นำไประเหยน้ำออกจนได้สารละลายที่ข้น นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อร่อนนำไปทดสอบต่อไป

3.3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

- เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในตัวทำละลายเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 100 mL

- นำมะขามผงหนัก 2 กรัม ไปละลายในน้ำ DI ปริมาตร 150 mL จากนั้นทำให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- ชั่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0197 กรัม ละลายด้วยเมทานอลนำมาปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 250 mL นำสารตัวอย่างในข้อ 1

- นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างมาความเข้มข้นละ 1 mL เติมสารละลาย DPPH ลงในหลอดทดลองที่มีสารตัวอย่างอยู่หลอดละ 1 mL ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 3 mL หลังจากนั้นนำหลอดทดลองมาเขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) และนำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิประมาณ 30 นาที

- นำสารมาตรฐานและสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ จากนั้นคำนวณ % radical scavenging และคำนวณค่า (คัดแปลงจาก Re et al., 1999)

$$\% \text{ DPPH radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ชุดควบคุม

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ชุดทดสอบ

3.3.4 ขั้นตอนการทดสอบสารสกัดตัวอย่างกับสารละลาย ABTS⁺

- เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 mg/mL ในตัวทำละลายเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 100 mL
- นำมะขามฝงหนัก 2 กรัม ไปละลายในน้ำ DI จากนั้นทำให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 mg/mL
- ชั่งสาร ABTS ปริมาณ 0.384 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำ DI แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL
- ชั่งสาร Potassium persulphate ปริมาตร 0.06623 กรัม นำมาละลายด้วยเอทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL
- นำ ABTS ที่ปรับปริมาตรแล้ว 100 mL มาผสมกับ Potassium persulphate ปริมาตร 50 mL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- เจือจางสารละลาย ABTS⁺ ด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 1,000 mL
- เจือจางสารละลาย แอคโคบิกที่มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- นำสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ABTS⁺ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 mL ทำการทดสอบสูตรละ 5 ครั้ง จากนั้นเขย่าแล้วสังเกตสีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Re et al., 1999)

3.3.5 ขั้นตอนการเตรียมสารต่าง ๆ เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืช

3.3.5.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

- เตรียมโดยผสมสารละลาย A, B ตามที่ PH และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
- สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
- สารละลาย B : 0.05 M Monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ตารางที่ 3-1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

PH	A (mL)	B (mL)
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

3.3.5.2 วิธีการเตรียม BSA (Bovine serum albumin)

- ชั่งสาร (Bovine serum albumin) BSA น้ำหนัก 50 mg
- ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL

3.3.5.3 วิธีการเตรียม 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

- ชั่งสาร 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) น้ำหนัก 0.119 mg
- เติมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และปรับปริมาตรที่ต้องการ

3.3.5.4 วิธีการเตรียม Acetylthiocholine iodide (ACTI)

- ชั่งสาร Acetylthiocholine iodide (ACTI) น้ำหนัก 0.043 g
- เติมน้ำกลั่นลงไปละลาย และปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL

3.3.5.5 วิธีการเตรียม Acetylcholinesterase enzyme (AChE)

- ชั่งสาร Acetylcholinesterase (AChE) น้ำหนัก 0.0005 g
- ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรตามต้องการ

3.3.5.6 เจือจางสารสกัดพืชที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 800, 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 3-2 ปริมาตรของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส

Chemical	Blank (μ L)	Test sample (μ L)
1. 15 m MATCl	10	10

Chemical	Blank (μL)	Test sample (μL)
2. 3 mM DTNB	20	20
3. 0.1% BSA	15	10
4. Sample	-	5
5. 0.1 units/mL AChE	10	10
Total	55	55

วัดค่าดูดกลืนแสง 405 nm ทุก ๆ 60 วินาที เป็นเวลา 5 นาที

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระและเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่ร้อยละ 50

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบระหว่าง DPPH กับ ABTS โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) และทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ตารางที่ 4-1 แสดงผลความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระและเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่ร้อยละ 50

พืชสมุนไพรพื้นบ้าน	DPPH (IC ₅₀) $\mu\text{g/mL}$	ABTS (IC ₅₀) $\mu\text{g/mL}$	Acetylcholinesterase Inhibition (IC ₅₀) $\mu\text{g/mL}$
พริกไทย	470	526	270
ผักคราด	620	704	236
ขมิ้นชัน	950	875	554
กระชายขาว	835	863	308
บัวบก	461	188	250

จากตารางที่ 4-1 พบว่าสารสกัดจากบัวบกมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดทั้งการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 และ ผักคราด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล และอภิปราย

จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดจากผักกระดามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น $236 \mu\text{g/mL}$ โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น $620 \mu\text{g/mL}$ และ วิธี ABTS ที่ $704 \mu\text{g/mL}$ ที่สามารถทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 รองลงมาเป็นบัวบกมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น $461 \mu\text{g/mL}$ และ วิธี ABTS ที่ $188 \mu\text{g/mL}$ ที่สามารถทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 และมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น $250 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าฤทธิ์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระนั้นสอดคล้องกับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสของพืชแต่ละชนิด (Pennapa Chonpathompikunlert, Jintanaporn Wattanathorn, Supaporn Muchimapura, 2010; Jia Hui Wong¹, Anna M. Barron และ Jafri Malin Abdullah, 2021)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการบริโภคอาหารของผู้สูงอายุ

5.2.2 ศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์ของพืชสมุนไพรพื้นบ้านแต่ละชนิดเพื่อการใช้ประโยชน์ในทางยาได้อีกต่อไป

บรรณานุกรม

- สุวิชาดา ใจเปี้ย. (2565). การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของฟิเพอรินจากพริกไทย. ชลบุรี: สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อดุลย์ศักดิ์ ไชยราช. (2565). ผักคราดหัวแหวน ผักเผ็ด รสเด็ดเป็นยา. สืบค้นจาก https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_236450
- Anil Kumar Singhal, Vijay Naithani, and Om Prakash Bangar. (2012). Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. สืบค้นจาก <http://www.ijnpnd.com> on Wednesday, May 09, 2012, IP: 202.164.48.171]
- Gabriela Dumitrita Stanciu, Andrei Luca, Razvan Nicolae Rusu, Veronica Bild, Sorin Ioan Beschea Chiriac, Carmen Solcan, Walther Bild and Daniela Carmen Ababei. (2020). Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules*. 10, 40.
- Jia Hui Wong¹, Anna M. Barron and Jafri Malin Abdullah. (2021). Mitoprotective Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb.: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Opportunities in Neurodegenerative Disease. *Pharmacol*. 12.
- Kumju Youn and Mira Jun. (2019). Biological Evaluation and Docking Analysis of Potent BACE1 Inhibitors from *Boesenbergia rotunda*. *Nutrients*. 11, 662.
- Lucian Hritcu, Jaurès A Noumedem, Oana Cioanca, Monica Hancianu, Paula Postu¹ and Marius Mihasan. (2015). Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. *Behavioral and Brain Functions*. 11(13).
- Nuttiya Werawattanachai and Rawiwun Kaewamatawong. (2559). Screening for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity from the Piperaceae. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 18(3), 26.
- Pennapa Chonpathompikunlert, Jintanaporn Wattanathorn, Supaporn Muchimapura. (2010) . Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 798–802.

- Rajesh Basnet, Sandhya Khadka, Buddha Bahadur Basnet and Radheshyam Gupta. (2020). Perspective on Acetylcholinesterase: A Potential Target for Alzheimer's Disease Intervention. Current Enzyme Inhibition. 16, 1-8.
- Shrikant Mishra and Kalpana Palanivelu. (2008). The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. Ann Indian Acad Neurol. 11(1), 13–19.
- Tomasz Tuzimski and Anna Petruczynik. (2022). Determination of Anti-Alzheimer's Disease Activity of Selected Plant Ingredients. Molecules, 27, 3222.
- Tsuyoshi Hamaguchi, Kenjiro Ono¹ and Masahito Yamada. (2010). Curcumin and Alzheimer's Disease. CNS Neuroscience & Therapeutics 16, 285–297
- Wilasinee Suwanjang ^a, Waralee Ruankham ^a, Banthit Chetsawang ^b, Sujira Mukda ^b, Sukhonthar Ngampramuan ^b, Sujitra Srisung ^c, Virapong Prachayasittikul ^d, Supaluk Prachayasittikul. (2021). *Spilanthes acmella* Murr. ameliorates chronic stress through improving mitochondrial function in chronic restraint stress rats. Neurochemistry International. 148, 105083

