บทความวิจัย

ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทยบางชนิดในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae

สุพัตร์ หลังยาหน่าย[1,3*], ประภาพร จันทร์เอียด[2] และ จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์[3]

บทคัดย่อ

อัลไซเมอร์เป็นโรคทางระบบประสาทที่พบมากที่สุดในกลุ่มอาการสมองเสื่อม ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในผู้สูงอายุ วิธีหนึ่งสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันคือการเพิ่มระดับสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนในสมองโดยการใช้ยาในกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร 13 ชนิด จำนวน 20 ตัวอย่าง ในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากต้นและใบสาบแมวซึ่งอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่ดีมาก โดยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ได้ร้อยละ 78.50 และ 59.48 ตามลำดับ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากใบและต้นกระดุมหยกมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.96 และ 6.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นคุณประโยชน์ของต้นสาบแมวและต้นกระดุมหยก ว่ามีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิจัย เพื่อสกัดสารที่ออกฤทธิ์ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ต่อไป

คำสำคัญ: โรคอัลไซเมอร์ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส สมุนไพรไทย Asteraceae Cucurbitaceae

[1]โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

[2]สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

[3]ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: patric_dum@hotmail.com

Anti-Acetylcholinesterase and Anti-oxidant Activities of Some Thai Medicinal Plants in Asteraceae and Cucurbitaceae families

Supat Langyanai[1,3*], Prapaporn Chaniad[2] and Jindaporn Puripattanavong[3]

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is neurological disorders which the most prevalent form of dementia and increasing tendency among elderly people. One of several medical treatments of AD is to enhance the neurotransmitter acetylcholine level in the brain using acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs). This research aimed to investigate the anti-acetylcholinesterase (AChE) and anti-oxidant activities of 20 extracts of 13 medicinal plants in Asteraceae and Cucurbitaceae families. The results revealed that the stem and leaves extracts of *Eupatorium catarium* Veldk. in Asteraceae family at the concentration of 100 μg/mL exhibited the most potent anti-AChE activity with the percentage values of 78.50 and 59.48, respectively. The study on anti-oxidant property, the extract of Centratherum punctatum Cass. possessed the strongest activity, leaf and stem extracts showed an EC_{50} value of 5.96 and 6.10 μg/mL, respectively. The results from this research represent the benefit of *Eupatorium catarium* Veldk. and *Centratherum punctatum* Cass. that exhibited anti-acetylcholinesterase and anti-oxidant activities, and will be useful for further research for anti-AChE compounds including for developing dietary supplement for Alzheimer's pateints.

Keywords: Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, Thai medicinal plant, Asteraceae, Cucurbitaceae

[1] Program of Health Sciences, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University

[2] School of Medicine, Walailak University

[3] Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University

*Corresponding author, e-mail: patric_dum@hotmail.com

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) เป็นโรคในกลุ่มอาการสมองเสื่อม (Dementia syndrome) ซึ่งพบได้บ่อยที่สุดคือประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ จำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากวิวัฒนาการทางการแพทย์ที่เจริญขึ้นทำให้คนมีอายุยืนมากขึ้น ปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ทั่วโลกราว 47.5 ล้านคน และคาดว่าจะเพิ่มเป็น 3 เท่าในอีก 40 ปีข้างหน้า [1-2] สำหรับประเทศไทยพบว่าในปี พ.ศ. 2559 มีผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ประมาณ 6 แสนคน และคาดว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 1 ล้านคนในปี พ.ศ. 2573 [3] โรคอัลไซเมอร์เกิดจากความผิดปกติของการทำงานของระบบประสาท เนื่องจากเซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจดจำข้อมูลต่าง ๆ ถูกทำลาย ทำให้การทำหน้าที่ของสมองบกพร่องเกิดอาการที่เรียกว่าความจำเสื่อม ซึ่งจะดำเนินอย่างช้า ๆ แบบค่อยเป็นค่อยไป ผู้ป่วยจะมีความจดจำที่ด้อยลงโดยเฉพาะความจำระยะสั้น จนถึงอาการความจำเสื่อม มีปัญหาเรื่องการพูด การใช้ภาษา การใช้เหตุผล สติปัญญาความเฉลียวฉลาดลดลง บุคลิกภาพและพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงไป อารมณ์หงุดหงิด ไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเองได้ ซึ่งในระยะท้ายของโรคจะสูญเสียความจำทั้งหมด [4-5]

สำหรับสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าน่าจะเกิดจากปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ ความผิดปกติทางชีววิทยาในสมอง คือมีการสะสมของโปรตีนอะมัยลอยด์ (Amyloid plaques) และการเกิดเส้นใยประสาทที่พันกัน (Neurofibrillary tangles) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโปรตีนทอ (Tau protein) การถูกทำลายจากการเกิด oxidative stress และ lipid peroxidation ในสมอง การอักเสบของเซลล์ประสาท ภาวะขาดวิตามินบี 12 และโฟเลต รวมทั้งปัจจัยด้านพันธุกรรมและการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine) ที่ถูกหลั่งจากปลายประสาทในสมอง [6-9] โดยสารสื่อประสาทชนิดนี้มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับความจำ ความคิดและการตัดสินใจ โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มีปริมาณของอะเซทิลโคลีนในสมองลดลงถึงร้อยละ 90 จึงเป็นเหตุให้ผู้ป่วยมีความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลลดลง [10] ปริมาณสารอะเซทิลโคลีนนี้ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่าอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE) ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยอะเซทิลโคลีน ทำให้สารสื่อประสาทชนิดนี้ในสมองมีปริมาณน้อยลง [7] ดังนั้นเป้าหมายสำคัญของการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท

ในปัจจุบันโรคอัลไซเมอร์ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เป็นเพียงการรักษาเพื่อให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น สามารถช่วยเหลือตัวเองได้และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น [11] ยาที่ใช้รักษาในปัจจุบันเป็นยาที่ชะลอความรุนแรงของโรคหรือรักษาตามอาการ ซึ่งยาที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปและเป็นกลุ่มยาหลักที่ใช้รักษาได้แก่ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors; AChEIs) ซึ่งมีผลให้ระดับสารอะเซทิลโคลีนบริเวณ synapse มีระดับสูงขึ้น ในปัจจุบันยากลุ่ม AChEIs ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด ได้แก่ Tacrine, Donepezil, Rivastigmine และ Galantamine [9,12-13] อย่างไรก็ตามพบว่ายาในกลุ่มนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ เช่น ทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย หน้ามืดและอ่อนแรง เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยเลิกใช้ยาเองและมีผลให้การรักษาอาจไม่ได้ผล อีกทั้งเมื่อพิจารณาเรื่องราคายาพบว่ายามีราคาสูงมาก ดังนั้นจากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคนี้ โดยได้มีการค้นพบสารจากพืชที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ เช่น Huperzine A ที่แยกได้จากมอส *Huperzia serrata* [14] EGb 761 จากใบแปะก๊วย [15] Resveratrol ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกของผลองุ่นดำ [16] (-)-Galanthamine จากดอกของพืช *Galanthus nivalis* ซึ่งมีฤทธิ์เป็น competitive AChEI [17] นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากผลและใบของ *Conyza bonariensis* Cronquist. และ *Phagnalon rupestre* (L.) DC. ซึ่งอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส [18] เช่นเดียวกันกับ *Momordica charantia* L. และ Momordica dioica ซึ่งอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae [19]

ดังนั้นการที่จะลดปัญหาของโรคและยาที่ใช้ในการรักษาดังกล่าว จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยหาสารหรือยาตัวใหม่สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการเกิดโรคอัลไซเมอร์และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสนใจที่จะศึกษาสมุนไพรชนิดอื่นๆในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae โดยพืชที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้หลายชนิดเป็นพืชสมุนไพรที่พบมากทางภาคใต้ของประเทศไทยแต่ยังไม่ค่อยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์ ผู้วิจัยจึงสนใจนำพืชบางชนิดในสองวงศ์นี้มาทำการศึกษาเพื่อจะนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปเป็นแนวทางในการใช้สารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติพัฒนาเป็นอาหารเสริมหรือยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

ตัวอย่างพืช

พืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ กระดุมหยก ขลู่ ตีนตุ๊กแก ผักกาดนกเขา ผักคราดหัวแหวน ผักแครด สาบเสือ สาบแมว สาบแร้งสาบกา และหญ้าดอกขาว และพืชในวงศ์ Cucurbitaceae จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ บวบบ้าน ฟักข้าว และมะระขี้นก ตัวอย่างพืชทั้ง 13 ชนิด จำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บจากจังหวัดพัทลุง สงขลา และสตูล ในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2559 (ตารางที่ 1) โดยตัวอย่างพืชทั้งหมดได้ทำการตรวจสอบและระบุชนิดโดยนักพฤกษศาสตร์ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นำตัวอย่างพืชมาล้างด้วยน้ำเพื่อทำความสะอาด จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ และนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปบดหยาบ แล้วชั่งน้ำหนักแห้งและเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างพืชแต่ละชนิด

วงศ์	ตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง
Asteraceae	กระดุมหยก	พัทลุง
	ขลู่	สงขลา
	หญ้าตีนตุ๊กแก	พัทลุง
	ผักกาดนกเขา	สงขลา
	ผักคราดหัวแหวน	พัทลุง
	ผักแครด	พัทลุง
	สาบเสือ	สตูล
	สาบแมว	พัทลุง
	สาบแร้งสาบกา	พัทลุง
	หญ้าดอกขาว	พัทลุง
Cucurbitaceae	บวบบ้าน	สตูล
	ฟักข้าว	สตูล
	มะระขี้นก	พัทลุง

สารเคมี

Acetylthiocholine iodide (ATCI), Bovine serum albumin (BSA), 5,5-Dithiobis [2-nitro-benzoic acid] (DTNB), 95% methanol, Galanthamine, Tris-HCl buffer pH 8.0, Acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า (type VI-S lyophilized powder, 480 U/mg solid, 530 U/mg protein) เอนไซม์ถูกเตรียมให้เป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 1130 U/mL ในบัฟเฟอร์ และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการทดลองนำมาทำให้เจือจางในบัฟเฟอร์ที่มี 0.1% BSA

การสกัด

การสกัดใช้วิธีการหมักโดยนำตัวอย่างพืช 100 กรัม แช่ในตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator นำตัวอย่างพืชหมักด้วยเมทานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร อีกครั้งเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปกรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการเดียวกันกับในครั้งแรก เก็บสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งรวมกันไว้ในภาชนะปิดสนิทและควบคุมอุณหภูมิที่ 4-7 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัด

นำสารสกัดของตัวอย่างพืชมาเตรียมเป็น stock solution ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั่งสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ใส่ลงใน eppendorf นำมาละลายด้วยเอทานอล 100 ไมโครลิตร และเติม Tris/HCl buffer pH 8.0 อีก 900 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ทดสอบตามวิธีการของ Ellman และคณะ [20] และดัดแปลงตามวิธีการของ Ingkaninan และคณะ [21] โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีและอ่านผลด้วยวิธีการทาง Spectrometry ในการทดสอบใช้ 96-well plate ซึ่งจะเติมสารลงใน well ตามลำดับดังนี้ บัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร, 1.5 mM ATCI 25 ไมโครลิตร, สารสกัดของตัวอย่างพืช 25 ไมโครลิตร, 3 mM DTNB 125 ไมโครลิตร และ AChE 25 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (CERES UV 900C, Bio-Tek Instrument, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทุก 10 วินาทีเป็นเวลา 2 นาที ในการทดสอบนี้ใช้ galantamine ความเข้มเป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน โดยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันข้อมูล ค่า Enzyme activity คำนวณจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อเวลา (mean velocity) ซึ่งคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (% AChE inhibition) จาก Enzyme activity ของตัวอย่างเทียบกับตัวควบคุม (control) โดยคำนวณจากสมการด้านล่างนี้ และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$\% \text{ AChE inhibition} = [(V_{control} - V_{sample})/V_{control}] \times 100$$

โดย $V_{control}$ คือ mean velocity ของตัวควบคุม

V_{sample} คือ mean velocity ของตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลายของตัวอย่างพืชแต่ละชนิดเป็น stock solution ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันในช่วง 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างจาก stock solution ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลายของ DPPH ใน absolute ethanol 100 ไมโครลิตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5, 1, 2, 4, 5, 10, 20, 40, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (CERES UV 900C, Bio-Tek Instrument, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ L-Ascorbic acid เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน โดยตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันข้อมูล นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% DPPH radical scavenging) จากสมการ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = [(A_{contro} - A_{sample})/A_{contro}] \times 100$$

โดย A_{contro} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (EC50) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับ % DPPH radical scavenging

ผลการทดลอง

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทยในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

วงศ์	ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	AChE inhibition (%)	DPPH (EC_{50})
Asteraceae	กระดุมหยก	*Centratherum punctatum* Cass.	ใบ	43.95 ± 3.98	5.96
			ต้น	29.00 ± 2.03	6.10
	ขลู่	*Pluchea indica* (L.) Less.	กิ่งและใบ	16.57 ± 2.97	12.94
	หญ้าตีนตุ๊กแก	*Tridax procumbens* (L.) L.	ใบ	16.60 ± 2.88	48.11
			ต้น	43.57 ± 3.08	35.07
	ผักกาดนกเขา	*Emilia sonchifolia* (L.) DC.	ทั้งต้น	28.29 ± 3.45	19.52
	ผักคราดหัวแหวน	*Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen.	ใบ	43.42 ± 2.86	62.13
			ต้น	23.65 ± 2.85	31.39
			ดอก	47.93 ± 2.21	49.44
	ผักแครด	*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.	ใบ	55.88 ± 1.31	24.27
			ต้น	30.80 ± 2.08	54.65
	สาบเสือ	*Eupatorium odoratum* L.	ต้น	34.25 ± 2.91	6.83
	สาบแมว	*Eupatorium catarium* Veldk.	ใบ	59.48 ± 1.24	24.09
			ต้น	78.50 ± 2.10	71.87
	สาบแร้งสาบกา	*Ageratum conyzoides* L.	ใบ	48.42 ± 1.33	55.42
			ต้น	50.08 ± 3.49	68.02
	หญ้าดอกขาว	*Vernonia cinerea* Less.	ทั้งต้น	52.02 ± 2.61	48.11
Cucurbitaceae	บวบบ้าน	*Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.	ผล	6.86 ± 2.67	58.23
	ฟักข้าว	*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.	ใบ	16.92 ± 3.57	99.86
	มะระขี้นก	*Momordica charantia* L.	ใบ	11.38 ± 2.77	73.24
	Galantamine			97.95 ± 0.07	
	L-Ascorbic acid				1.60

ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสมุนไพรไทยในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae 13 ชนิด จำนวน 20 ตัวอย่างในครั้งนี้ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากต้นสาบแมวซึ่งอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยสามารถต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ร้อยละ 78.50 รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสาบแมวมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ร้อยละ 59.48 ในขณะที่ galantamine ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารอ้างอิงมาตรฐานมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ได้ร้อยละ 97.95 (ตารางที่ 2) ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่าสารสกัดจากใบผักแครด ต้นของหญ้าดอกขาว และต้นสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ปานกลางโดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสร้อยละ 55.88, 52.02 และ 50.08 ตามลำดับ พบว่าพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างส่วนมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ได้ต่างกัน เช่น สารสกัดจากส่วนใบของผักแครดมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ได้ปานกลาง (ร้อยละ 55.88) ในขณะที่สารสกัดจากส่วนต้นมีฤทธิ์น้อย (ร้อยละ 30.80) เป็นต้น

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากกระดุมหยก วงศ์ Asteraceae มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยสารสกัดจากใบและต้นมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.96 และ 6.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) รองลงมาคือสารสกัดจากต้นสาบเสือซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.83 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากกิ่งและใบขลู่และสารสกัดจากทั้งต้นของผักกาดนกเขามีฤทธิ์ที่ดีเช่นเดียวกันโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.94 และ 19.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสมุนไพรไทยในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae จำนวน 13 ชนิด รวม 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากต้นสาบแมวซึ่งอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีคุณสมบัติในการต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้สูงถึงร้อยละ 78.50 ในขณะที่สารสกัดจากต้นสาบเสือซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันมีฤทธิ์น้อยโดยสามารถต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้เพียงร้อยละ 34.25 นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ก็มีความแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากต้นสาบเสือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (EC_{50} = 6.83 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดจากต้นสาบแมวมีฤทธิ์น้อยกว่า (EC_{50} = 71.87 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชทั้ง 2 ชนิดนี้เก็บมาจากต่างสถานที่กันจึงทำให้มีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันซึ่งอาจมีผลต่อฤทธิ์ดังกล่าว โดยพบสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญหลักของต้นสาบแมวคือสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ quercetin, luteolin และ apigenin [22]

สำหรับพืชชนิดอื่นในวงศ์ Asteraceae ที่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ได้แก่ สารสกัดของ Conyza *bonariensis* Cronquist และ *Phagnalon rupestre* (L.) DC. สามารถต้านเอนไซม์ได้มากกว่าร้อยละ 80 [18] ส่วนสมุนไพรในวงศ์ Cucurbitaceae ที่มีรายงานฤทธิ์ต้านเอนไซม์

อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส คือสารสกัดจากใบของ *Momordica charantia* L. และ *Momordica dioica* Roxb. พบว่ามีฤทธิ์ที่ดีสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มากกว่าร้อยละ 75 [19] ในขณะที่สารสกัดจากพืชอีก 3 ชนิด ในวงศ์ Cucurbitaceae ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ ได้แก่ ใบฟักข้าว มะระขี้นก และผลบวบบ้าน ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากใบและต้นกระดุมหยกมีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.96 และ 6.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีรายงานการศึกษาทางพฤกษเคมีของกระดุมหยกพบสารสำคัญในกลุ่ม sesquiterpene [23] สำหรับพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Asteraceae ที่มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น พญามุตติ ดาวเรือง และสิบสองราศี เป็นต้น พบว่ามีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาด้วยวิธี DPPH เช่นเดียวกัน [24-25] จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชหลายชนิดในวงศ์ Asteraceae พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และ sesquiterpene lactone ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระคาดว่าน่าจะเกิดจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญ [26]

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรไทยหลายชนิดในวงศ์ Asteraceae มีความน่าสนใจในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส อีกทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยและขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Alzheimer's Association. 2016. Alzheimer's Association Report. Alzheimer's disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia.* 12(4): 459-509.
2. Klimova, B., and Kuca, K. 2015. Alzheimer's disease: Potential Preventive, Non-Invasive, Intervention Strategies in Lowering the Risk of Cognitive Decline - A Review Study. *Journal of Applied Biomedicine.* 13: 257-261.
3. Sangiam, T., and Ploddee, N. 2016. MOPH: Thailand Expects to Have 1M Alzheimer Patient in 13 years. Available from URL: http://thainews.prd.go.th/website_en/news/news_detail/WNSOC5909210010057. 1 April 2017.
4. Montenegro, J. M. F., and Argyriou, V. 2017. Cognitive Evaluation for the Diagnosis of Alzheimer's disease Based on Turing Test and Virtual Environments. *Physiology & Behavior.* 173: 42-51.

5. Jaworski, T., Dewachter, I., Seymour, C.M., Borghgraef, P., Devijver, H., Kugler, S., and Leuven, F.V. 2010. Alzheimer's disease: Old Problem, New Views from Transgenic and Viral Models. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1802: 808-818.
6. Choombuathong, A. 2008. Alzheimer's disease: Silent Danger in Elderly. *Journal of Health Science* 17(6): 1019-1030. (in Thai)
7. Groner, E., Ashani, Y., Schorer-Apelbaum, D., Sterling, J., Herzig, Y., and Weinstock, M. 2007. The Sinetics of Inhibition of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Two Series of Novel Carbamates. *Molecular Pharmacology.* 71: 1610-1617.
8. Seitz, D. P., Reimer, C.L., and Siddiqui, N. 2013. A Review of Epidemiological Evidence for General Anesthesia as a Risk Factor for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 47: 122-127.
9. Kumar, A., Singh, A., and Ekavali. 2015. A Review on Alzheimer's disease Pathophysiology and Its Management: An Update. Pharmacological Reports. 67: 195-203.
10. Picciotto, M. R., Alreja, M., and Jentsch, J. D. 2002. Neuropsychopharmacology: Acetylcholine. 5th Edition. American College of Neuropsychopharmacology. p.1-14.
11. Tunjaroenrat, A. 2010. Alzheimer's disease. *Journal of Education Naresuan University.* 12(2): 169-182. (in Thai)
12. Thimmappa, S., Anekonda, P., and Reddy, H. 2005. Can Herbs Provide a New Generation of Drugs for Treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews.* 50: 361-376.
13. Nino, J., Hernandez, J. A., Correa, Y.M., and Mosquera, O.M. 2006. In vitro Inhibition of Acetylcholinesterase by Crude Plant Extracts from Colombian Flora. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 101(7): 783-785.
14. Liu, J. S., Zhu, Y. L., Yu, C. M., Zhou, Y. Z., Han, Y. Y., Wu, F. W., and Qi, B. F. 1986. The Structure of Huperzine A and B, Two New Alkaloids Exhibiting Marked Anticholinesterase Activity. *Canadian Journal of Chemistry.* 64: 837-839.
15. Massieu, L., Moran, J., and Christen, Y. 2004. Effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on Staurosporine-Induced Neuronal Death and Caspase Activity in Cortical Cultured Neurons. *Brain Research.* 1002: 76-85.
16. Anekonda, T. S. 2006. Resveratrol - A Boon for Treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews.* 52(2): 316-326.
17. Greenblatt, H. M., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., and Sussman, J. L. 1999. Structure of Acetylcholinesterase Complexed with (-)-Galanthamine at 2.3 Å Resolution. *FEBS Letters.* 463: 321-326.

18. Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Abu Zaitoun, S. Y., and Qasem, I. B. 2014. In-vitro Screening of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Extracts from Palestinian Indigenous Flora in Relation to the Treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease.* 4(9): 381-400.
19. Nagarani, G., Abirami, A., and Siddhuraju, P. 2014. A Comparative Study on Antioxidant Potentials, Inhibitory Activities against Key Enzymes Related to Metabolic Syndrome, and Anti-inflammatory Activity of Leaf Extract from Different Momordica species. *Food Science and Human Wellness.* 3: 36-46.
20. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology.* 7: 88-95.
21. Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., and Thongnoi, W. 2003. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plants Used in Thai Traditional Rejuvenating and Neurotonic Remedies. *Ethnopharmacology.* 89: 261-264.
22. Wang, N, Tang, L., Yang, X., Deng, S. 2011. Chemical Constituents of Eupatorium Catarium as an Alien Invasive Plant. *Pratacultural Science.* 28(10): 1882-1887.
23. Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., and Usman, L. 2005. Composition of the Leaf Oil of *Centratherum punctatum* Cass. Growing in Nigeria. *Journal of Essential Oil Research.* 17: 496-498.
24. Wang-amnauyporn, T., and Saiprajong, R. 2007. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Some Thai Medicinal Plants (Research Report). University of the Thai Chamber of Commerce, Bangkok, Thailand. (in Thai)
25. Prapasanobol, V., and Kaewsasen, S. 2012. Antioxidant Activity and Total Phenolics of *Launaea sarmentosa* Leaves Crude Extracts. *The Science Journal of Phetchaburi Rajabhat University.* 9(1): 12-19. (in Thai)
26. Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Coflkun, M., and Yildirim, A. 2004. Antioxidant Activities and Total Phenolic Compounds Amount of Some Asteraceae Species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1(3): 203-216.

ได้รับบทความวันที่ 21 ตุลาคม 2559
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 5 เมษายน 2560