



การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจาก
ส่วนเนื้อดินของพืชบอนเต่า



จันทรา จันทราภิรมย์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจาก
ส่วนเนื้อดินของพืชบอนเต่า



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอเรส
จากส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่า"
ของ จันทรา จันทราภิรมย์
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ)
..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์)
..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริน ศรีปรางค์)
..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทัย วิชัย)

อนุมัติ

.....
(ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่า
ผู้วิจัย	จันทรา จันทราภิรมย์
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ดีพีพีเอช, บอนเต่า

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นถึงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของสารสกัดหยาบจากบอนเต่าด้วยเทคนิค At-line LCMS/MS โดยการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะใช้วิธีการดักจับดีพีพีเอชเรดิคัลและวิธีของแอลแมนตามลำดับจากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลที่ความเข้มข้น 1000 ppm แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสดีที่สุด คิดเป็น 80.67% และ 34.36% ตามลำดับ จากการศึกษาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ในโหมดที่เป็นบวกและลบ พบว่าในสารสกัดหยาบดังกล่าวพบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 58 สาร โดยในโหมดที่เป็นบวกจะพบ 17 สาร ในขณะที่ 46 สารพบในโหมดที่เป็นลบ จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชขององค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิด พบว่า cucurbitacin I 2-glucoside และ gingerglycolipid C แสดงสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีที่สุดคิดเป็น 31.13% และ p-coumaroylquinic acid, genistic acid, 6-c-fucosylluteolin และ protocatechuic acid ซึ่งเป็นสารประเภทสารประกอบฟีนอลิกแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดคิดเป็น 51.51% จากองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดที่พบสามารถแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีที่พบทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่ amino acid, phenolic acid, flavonoid, fatty acid, carboxylic acid, Steroid และ monosaccharide/Disaccharide derivative จากผลการทดลองที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าพืชชนิดนี้สามารถเป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และ

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีซึ่งคาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ในการนำไปรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไปได้



Title	INVESTIGATION OF CHEMICAL CONSITUENTS AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR FROM AERIAL PARTS OF <i>HAPALINE BENTHAMIANA</i> SCHOTT.
Author	JANTRA JANTRAPIROM
Advisor	Assistant Professor Professor Boonjira Rutnakornpituk, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Chemistry, Naresuan University, 2020
Keywords	Acetylcholinesterase, Antioxidant, DPPH, Hapaline benthamina Schott

ABSTRACT

This research focused on the investigation of chemical constituent couple with their antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitor activity of *Hapaline benthamiana* Schott. crude extracts via At-line LCMS/MS technique. The antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities were determined by using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and Ellmen's methods, respectively. The results showed that the methanol crude extract showed the highest antioxidant activity (80.67) and highest acetylcholinesterase inhibitory activities (34.36) with the concentration at 1000 ppm. The chemical compositions of plant crude methanolic extract were analyzed by at-line LCMS/MS technique in positive and negative modes. The results indicated that the 17 compounds were identified in positive mode, while 46 compounds were detected in negative mode. From antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitor activity of all compounds, it was found that the Cucurbitacin I 2-glucoside and Gingerglycolipid C showed highest acetylcholinesterase inhibitory activity (31.13%) and p-Coumaroylquinic acid, Genistic acid, 6-C-Fucosylluteolin and Protocatechuic acid exhibited strong antioxidant activity with a highest percentage of inhibition (51.51%) From all compounds, it can be divided into 8 classes including amino acid, phenolic acid, flavonoid, fatty acid, carboxylic acid, Steroid and monosaccharide/Disaccharide derivative The results suggest that this plant species may provide a substantial source of secondary metabolites, which act as

natural antioxidants and acetylcholinesterase inhibitors and may be beneficial in the treatment of Alzheimer's disease (AD).



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงในความกรุณาของ รศ.ดร.บุญจิรา รัตนกรพิทักษ์ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่เอาใจใส่ดูแลตี ให้คำปรึกษา คำแนะนำแนวทางการคิดในการทำงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ความช่วยเหลือด้านเงินสนับสนุนค่าใช้จ่ายส่วนตัว และค่าพัฒนาตนเองในการทำงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ นักวิจัยร่วม และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดการทำงานวิจัยและการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผศ. ดร.อุทัย วิชัย และผศ.ดร.สรินศรีปรางค์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะในการแก้ไขปัญหาต่างในงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ตลอดระยะเวลาที่ผู้วิจัยเข้ารับการศึกษ ณ สถาบันแห่งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภายในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และนิสิตปริญญาโทปริญญาเอกสาขาวิชาเคมีทุกคนที่ให้คำนำ คำปรึกษา และช่วยเหลือในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์นี้

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ของผู้วิจัยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆด้านแก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

จันทรา จันทราภิรมย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
ประกาศศุณฺพการ	๗
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	๗
สารบัญรูปภาพ	๗
บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และสรรพคุณของบอนเต่า.....	5
อะซิติลโคลีน และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	5
อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
การศึกษาหาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนโดยวิธีของแอลแมน.....	21
การศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	21
เทคนิค At-line couple LC-MS/MS.....	26
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	27
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	64

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	64
การดำเนินการวิจัย.....	65
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	74
การเตรียมสารสกัดหยาบของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่าในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล	75
การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และฤทธิ์การ ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมนของสารสกัดหยาบบอน เต่าแต่ละชนิด	76
การแยกอย่างหยาบของสารสกัดหยาบเมทานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟี .	82
การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนแยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี	83
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกองค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับฤทธิ์การยับยั้ง เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การอนุมูลอิสระรวมถึงการวิเคราะห์ โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค At-line LC-MS/MS	85
การศึกษาโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่พบด้วยเทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) และการแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบ ทางเคมีที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้าน อนุมูลอิสระ	89
บทสรุป	105
บรรณานุกรม	107
ประวัติผู้วิจัย	112

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ความเข้มข้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในกาแฟ ..	30
ตาราง 2 ความเข้มข้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในกาแฟ ..	31
ตาราง 3 ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดหยาดน้ำของหญ้าหนวดแมว ..	35
ตาราง 4 แสดงการแตกแฟรกเมนต์ (MS/MS fragmentation) ใน positive mode ของสารที่ ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดเถาวัลย์เปรียง ..	40
ตาราง 5 ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ	44
ตาราง 6 Retention times และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะรุ่ยในตัวทำ ละลาย อะซิโตน 70% โดยเทคนิค HPLC-ESI-MS.....	46
ตาราง 7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะรุ่ยที่ ซึ่งแสดงเป็น เปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนของสัญญาณดีพีพีเอชที่ 515 นาโนเมตรและสัญญาณของ สารประกอบ-.....	48
ตาราง 8 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารประกอบที่ แยกได้จากเมล็ด <i>M. disticha</i> และ <i>E. japonicus</i>	51
ตาราง 9 ร้อยละการกลับคืน (% yield) ของสารสกัดหยาดของพืชวงศ์พริกไทย	52
ตาราง 10 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาด และสารสกัดที่แยกจากรากของ <i>S. syriaca</i>	56
ตาราง 11 ผลการ docking ระยะห่าง H-bond ที่วัดจากความสัมพันธ์ของอะตอม.....	57
ตาราง 12 ปริมาณสารประกอบ (โพลีฟีนอล ฟลาโวน โพรแอนโธไซยานิน) จากสารสกัด ที่ผ่านการทดสอบ	59

ตาราง 13 แสดง HPLC–MS values ของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจาก <i>C.umbellatum</i> และ <i>P.officinalis</i> ในตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล.....	61
ตาราง 14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด.....	62
ตาราง 15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด.....	63
ตาราง 16 แสดงสถานะในการแยก At-line LCMSMS ของสารสกัดบอนเต่า.....	67
ตาราง 17 ปริมาณสารละลายต่างๆในการทดสอบฤทธิ์ในการการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	69
ตาราง 18 ปริมาณสารละลายต่างๆ ในการทดสอบฤทธิ์ในการการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสร่วมกับเทคนิค at line LCMS/MS.....	70
ตาราง 19 น้ำหนักและผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบบอนเต่า.....	75
ตาราง 20 ค่าเฉลี่ย velocity และ %การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบจากผงบอนเต่าในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล.....	78
ตาราง 21 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย.....	81
ตาราง 22 น้ำหนักของสารสกัดบอนเต่า และผลผลิตร้อยละของส่วนของแต่ละเฟสเคลื่อนที่.....	82
ตาราง 23 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของแต่ละส่วนที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	83
ตาราง 24 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	84
ตาราง 25 แสดงสถานะในการแยก At-line LCMSMS ของส่วนที่แยก.....	85
ตาราง 26 MS/MS (positive mode) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดบอนเต่า..	89
ตาราง 27 MS/MS (negative mode) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดบอนเต่า..	92

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะของต้นบอนเต่า	5
ภาพ 2 การสังเคราะห์แอซิติลโคลีน.....	6
ภาพ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในการส่งผ่านประสาท	6
ภาพ 4 ลักษณะของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส	8
ภาพ 5 การสลายอะซิติลโคลีนด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	8
ภาพ 6 ก.กลไกการไฮโดรไลซิสอะซิติลโคลีนของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และ ข. ตำแหน่ง binding site ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (11, 12).....	9
ภาพ 7 ก. โครงสร้างของแทครีน และ ข. โครงสร้าง 3D crystal ของ Tacrine-AChE complex (PDB code 1ACJ) (16).....	11
ภาพ 8 ก.ROCS รูปร่างสามมิติของโดเนเพซิล ข.โครงสร้างหลักของยาจาก co-crystal structure of donepezil bound to human AChE (PDB ID:4EY7).ค.โครงสร้าง 3D crystal ของ TcAChE-donepezil complex(PDB ID:1EVE) (16, 17).....	12
ภาพ 9 ก.รูปร่างสามมิติของไรวาสติกมีน และ ข.อันตรกิริยาของไรวาสติกมีนกับ เอนไซม์อะซิติล-โคลีนเอสเทอเรสในตำแหน่ง active site (18)	13
ภาพ 10 ก.โครงสร้างของกาแลนทามีน และ ข.ตำแหน่งการเข้ายับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีน เอส เทอเรส (19)	14
ภาพ 11 ก.โครงสร้างเมมเบรนทีน และ ข. แผนภาพแสดงโครงสร้าง quaternary สี่หน่วย ย่อยของ NMDARs (ส่วนด้านบน) และโครงสร้าง transmembrane (ส่วนด้านล่าง) ของสอง หน่วยย่อย NMDAR	15
ภาพ 12 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากการกระบวนกรสังเคราะห์ทางเคมี	18

ภาพ 13 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ.....	18
ภาพ 14 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป.....	19
ภาพ 15 โครงสร้างทางเคมีของสารฟีนอลิกจากธรรมชาติ.....	20
ภาพ 16 กลไกทางเคมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	21
ภาพ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอปี้ทีเอส กับสาร Trolox (29).....	22
ภาพ 18 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีพีพีเอชกับสารต้านอนุมูลอิสระ.....	23
ภาพ 19 กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) ของสารต้านอนุมูลอิสระ (29).....	25
ภาพ 20 การรีดิวซ์ $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	26
ภาพ 21 แผนผังของ At-line LC-MS/MS ควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	27
ภาพ 22 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากกาแฟ.....	28
ภาพ 23 โครมาโตแกรม On-line HPLC-ABTS ⁺ ของกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่ว.....	29
ภาพ 24 โครมาโตแกรม On-line HPLC-ABTS ⁺ ของกาแฟที่ผ่านการคั่วในระดับปานกลาง.....	29
ภาพ 25 โครมาโตแกรม HPLC-UV/PAD ($\lambda = 360 \text{ nm}$) ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ล....	32
ภาพ 26 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ล.....	33
ภาพ 27 แผนผังของ on-line HPLC-ESI-MS และ DPPH assay.....	33
ภาพ 28 โครมาโตแกรมของการแยกสารประกอบหญ้าหนวดแมวด้วย HPLC และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรมิเตอร์.....	34
ภาพ 29 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหญ้าหนวดแมว.....	35

ภาพ 30 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดยาสหัสธารา โดยใช้ LC-ESI-MS/MS ควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay: ภาพแสดงพีคของ สารประกอบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ตรวจพบที่ 515 nm.....	36
ภาพ 31 โครงสร้างขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 13 ตัว.....	37
ภาพ 32 โครมาโตแกรมของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ได้จาก LC-QTOF-MS ควบคู่ไปกับการ ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ชนิ PDE5 (a) และโครมาโตแกรมของการยับยั้งเอนไซม์(b)	38
ภาพ 33 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสชนิด PDE5A1, PDE6 และ PDE1B... 39	
ภาพ 34 HPLC-UV โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบมะรุมในตัวทำละลาย 70% อะซิ โตน	45
ภาพ 35 แผนผังการติดตั้งอุปกรณ์สำหรับวิธีออนไลน์ HPLC-DPPH screening.....	47
ภาพ 36 โครมาโตแกรม HPLC-DPPH ของสารสกัดจากใบมะรุม ในตัวทำละลาย (a) น้ำ, 49	
ภาพ 37 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดของเมล็ด <i>M.disticha</i>	50
ภาพ 38 เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$	53
ภาพ 39 ความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์การยับยั้งสารเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	54
ภาพ 40 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ได้ 50 % ...	54
ภาพ 41 โครงสร้างสารประกอบที่แยกได้ (1-5).....	55
ภาพ 42 พันธะไฮโดรเจน ระหว่าง หมู่ไฮดรอกซีของ β -sitosterol และ Glu202.....	58
ภาพ 43 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซของสารสกัด <i>C.umbellatum</i> และ 60	
ภาพ 44 แผนผังการทดลอง	73
ภาพ 45 แสดงปฏิกิริยาการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วย	76

ภาพ 46 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีพีพีเอชกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิด BHT 80

ภาพ 47 แสดงโครมาโตแกรม LC-MS/MS ของสารสกัดหยาบบอนเต้าชั้นเมทานอล..... 86

ภาพ 48 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การยับยั้ง และส่วนขององค์ประกอบที่แยกได้ (chromatogram bioactivity)..... 87

ภาพ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และ fraction ขององค์ประกอบที่แยกได้ (chromatogram bioactivity)..... 88

ภาพ 50 โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดบอนเต้าที่แยกได้จากเทคนิค At-line LC-MS/MS และ Characterization จากแมสสเปกตรัม..... 100



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ในปัจจุบันมนุษย์เราให้ความสำคัญกับการศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญทางธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับสารอนุมูลอิสระค่อนข้างมากเนื่องจากสารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มนุษย์เราเกิดโรคร้ายต่างๆ มากมาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารหรือสมุนไพรที่มีผลดีต่อสุขภาพและมีสารสำคัญที่มีสมบัติในด้านอนุมูลอิสระเช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบ คาร์โรทีนอยด์ และสารประกอบแอนโทไซยานินท์ เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นผลผลิตเมทาโบไลต์ทุติยภูมิที่พบได้ในพืชทั่วไป จัดเป็นสารประกอบที่มีศักยภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันและมีความสามารถในการจับและทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี นับเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์หลายประการนอกจากนี้สารประกอบเหล่านี้ยังสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคได้หลายโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) ซึ่งในปัจจุบันมนุษย์มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคอัลไซเมอร์กันมากขึ้น ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท และเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคสมองเสื่อม (Neurodegenerative disease) ในปัจจุบันมนุษย์มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคอัลไซเมอร์มากขึ้น โดยพบมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งยังพบอีกว่าผู้สูงอายุหญิงมีสัดส่วนการเป็นโรคมกกว่าชายเล็กน้อย ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้แล้วจะไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเองได้ มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสียไป ความจำเสื่อม สาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด คาดว่าน่าจะมาจากความถดถอยในการทำงานของสมองซึ่งเกิดจากการสูญเสียเซลล์สมอง โดยเริ่มจากส่วนใดส่วนหนึ่งแล้วจึงลุกลามไปยังสมองส่วนอื่นๆ โดยที่ความเสื่อมถอยจะดำเนินอย่างช้าๆ แบบค่อยเป็นค่อยไป (1) โดยทั่วไปการสื่อสารที่สำคัญต่างๆ ในร่างกายรวมถึงการควบคุมความรู้สึก และการตอบสนองจะถูกส่งผ่านสมอง โดยมีสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) เป็นตัวสื่อสาร สารนี้จะช่วยนำคำสั่งจากสมองไปยังอวัยวะเป้าหมาย เพื่อให้เกิดการทำงาน สำหรับ

สารสื่อประสาทที่มีความสำคัญต่อความจำของร่างกาย คือสารอะซิติลโคลีน (Acetylcholine) สารนี้เป็นสารเคมีในสมองทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำ และกระบวนการเรียนรู้ช่วยทำให้มนุษย์มีความสามารถในการจำ หากในสมองมีสารนี้ลดน้อยลง จะทำให้เซลล์สมอง มีปัญหาในการสื่อสารเป็นเหตุทำให้ความสามารถในการจดจำ ลดลง โดยทั่วไปปริมาณสารอะซิติลโคลีน นี้ ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า เอนไซม์อะซิติล-โคลีนเอสเทอเรส ซึ่งจะทำหน้าที่ ย่อยสารอะซิติลโคลีน ทำให้สารอะซิติลโคลีน มีปริมาณน้อยลง ซึ่งการลดลงของอะซิติลโคลีนในสมอง เป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยสมองเสื่อมที่เกิดจากโรคอัลไซเมอร์นั้น รักษาโดยการให้ยาที่สามารถช่วยยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors ; AChEIs) ที่ทำการย่อยสารอะซิติลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ส่งผลโดยตรงกับความทรงจำ ปัจจุบันยาที่ได้รับการรับรองให้ใช้สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้แก่ แทครีน (Tacrine), เมแมนทีน (Memantine), กาแลนทามีน (Galantamine), ริวาสติจมีน (Rivastigmine) และ โดเนเพซิล (Donepezil) ยาดังกล่าวนี้จะช่วยให้ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีอาการดีขึ้น และชะลอการทรุดลงของโรคถ้าได้รับในระยะแรกเริ่ม แต่จะไม่สามารถรักษาอาการของให้โรคหายขาด นอกจากนี้ยังมีผลข้างเคียงทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ที่สำคัญ คือ ทำให้หัวใจเต้นช้าลง (2, 3) นอกจากนี้ยังมีการนำพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาแล้วนำมาเป็นต้นแบบในการพัฒนาและสังเคราะห์ยาต่อไป หรือการสกัดสารจากสมุนไพรและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์โดยการนำมาใช้หาผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติใหม่ๆ ต่อไปซึ่งเป็นที่ได้รับความสนใจทำการศึกษา และทำวิจัยเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันได้มีนักวิจัยได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติล-โคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรไทยต่างๆ เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เพื่อค้นหาสารที่แสดงฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป ซึ่งพบว่าพืชสมุนไพรไทยแต่ละชนิดจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่แตกต่างกันออกไป (4, 5)

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้าน โดยพืชที่ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาคือส่วน

เหนือดินของพืชบอนเต่า ซึ่งจัดเป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นเป็นกอ ก้านใบคล้ายบอนแต่มีขนาดเล็กกว่า หาง่าย ในฤดูฝน นิยมนำมาทำเป็นอาหาร สามารถรับประทานได้ทุกส่วน และยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ส่วน หัวของบอนเต่าใช้เป็นยาบำรุงเลือด และสมอง จากสรรพคุณดังกล่าวเห็นได้ว่าพืชบอนเต่ามีความ น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ในการพัฒนาอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้ และที่สำคัญยัง พบว่าจากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มียานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทาง ชีวภาพต่างๆของสมุนไพรบอนเต่าอย่างชัดเจนและรายงานข้อมูลอย่างเป็นระบบ ดังนั้นเพื่อให้ได้ ข้อมูลที่สมบูรณ์ ชัดเจนและเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคมากขึ้นรวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ และเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรบอนเต่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทาง เคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในจากส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่า โดยการศึกษาโปรไฟล์ของ องค์ประกอบทางเคมีจะใช้เทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (At-line LC-MS/MS) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการรวมของเทคนิคการแยกสารด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography ; LC) และการวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิค แมสสเปกโตรสโกปี (Mass spectroscopy ; MS) และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแฟรกชันที่แยกได้ ควบคู่ไปด้วยซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้คือ สะดวก รวดเร็ว และใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย ซึ่งจาก เทคนิคดังกล่าวจะทำให้ทราบถึงโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพร บอนเต่าควบคู่กันไป ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors ; AChEI) จะใช้วิธีของแอลแมน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะใช้วิธีวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay ; DPPH assay) ซึ่งถ้าหากองค์ประกอบทางเคมีต่างๆที่พบในสมุนไพรบอนเต่ามีคุณสมบัติใน การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ก็จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็น ประโยชน์แก่ผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์เพื่อเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการใช้สมุนไพรไทยมาทำการ รักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไปได้ รวมไปถึงเป็นแหล่งข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรชนิดนี้ให้ องค์การทั้งภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยารักษาโรคอัลไซเมอร์จากสมุนไพรไทยในเชิง อุตสาหกรรม และเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคตได้

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อศึกษาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในจากส่วนเหนือดินของพืชบอนเต๋าด้วยเทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (At-line LC-MS/MS) เพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำสมุนไพรชนิดนี้มาพัฒนาเป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุต่อไป รวมไปถึงได้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดนี้เพื่อพัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคตได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรบอนเต๋าด้วย

ขอบเขตของงานวิจัย

1. รวบรวมส่วนเหนือดินของพืชบอนเต๋าดจาก อ.ทองแสนขัน จ.อุตรดิตถ์
2. เตรียมผงของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต๋าดและสารสกัดหยาบของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต๋าดในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล
3. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitor; AChEI) โดยใช้วิธีของแอลแมน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay; DPPH assay) จากสารสกัดหยาบ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต๋าด
4. แยกองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของสารสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแต่ละส่วนที่แยกได้
5. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อศึกษาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยจะศึกษาโครงสร้างควบคู่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบทางเคมีที่พบด้วยเทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (At-line LC-MS/MS)
6. ศึกษาการแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และสรรพคุณของบอนเต่า

สมุนไพรบอนเต่ามีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hapaline benthamiana* Schott อยู่ในวงศ์ Araceae พบที่ประเทศพม่า ลาว และเวียดนาม ส่วนในประเทศไทยพบแทบทุกภาค ส่วนมากขึ้นตามเชิงเขา และลำห้วย ความสูงถึงประมาณ 1200 เมตร บอนเต่าเป็นไม้ล้มลุก มีหัวใต้ดิน ใบเดี่ยว รูปรี ปลายใบแหลม จัดเป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นเป็นกอ ก้านใบคล้ายบอนแต่มีขนาดเล็กกว่า หาง่ายในฤดูฝน นิยมนำมาทำเป็นอาหาร สามารถรับประทานได้ทุกส่วน และยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ส่วนหัวของบอนเต่าใช้เป็นยาบำรุงเลือด และสมอง (6, 7)



ภาพ 1 ลักษณะของต้นบอนเต่า

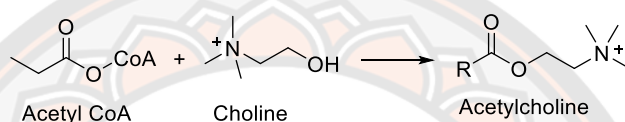
อะซิติลโคลีน และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

1. อะซิติลโคลีน (acetylcholine)

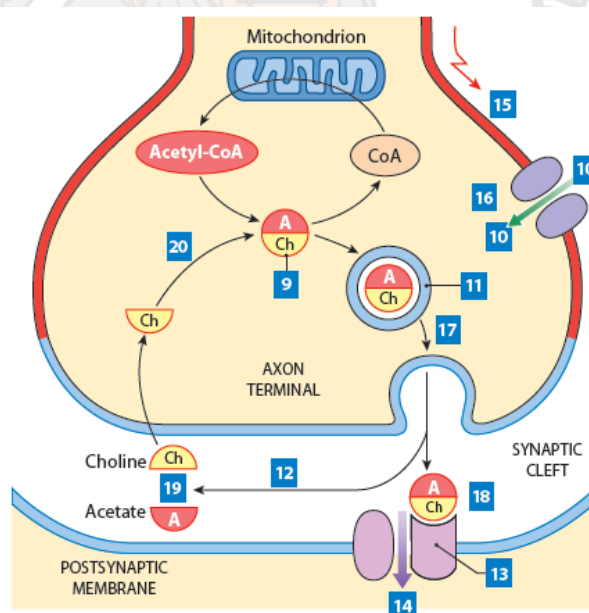
อะซิติลโคลีน เป็นสารสื่อประสาทตัวแรกที่ถูกค้นพบ ซึ่งถูกหลังจากปลายประสาทโดยมีโคลีน (Choline) จากตับ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ปลายประสาทที่สร้างอะซิติลโคลีน

ซึ่งจะดูดซึมโคลีน เข้าสู่ไซโตพลาสซึม(Cytoplasm) โดยระบบตัวพาที่ใช้พลังงาน เพื่อรวมกับกลุ่มอะซิติลโคเอนไซม์ เอ(Acetyl CoA) โดยใช้เอนไซม์โคลีนอะซิติลทรานสเฟอเรส(Choline

acetyltransferase) ได้อะซิติลโคลีน ดังภาพ 2 สะสมไว้ในกระเปาะเวสซิเคิล(Vesicle) ที่ปลายแอกซอน เมื่อกระแสประสาทวิ่งมาถึงปลายประสาทจะเปิดช่องให้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เข้าไปในปลายประสาท เพื่อช่วยดึงกระเปาะเวสซิเคิล ให้สัมผัสเยื่อหุ้มเซลล์แล้วหลังอะซิติลโคลีน หลุดพ้นโมเลกุลผ่านช่องว่างไซแนปส์ ไปกระทำต่อรีเซปเตอร์ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ถัดไป (เซลล์หลังไซแนปส์) แสดงดังภาพ 3 บทบาทของอะซิติลโคลีนจะกระตุ้นหรือยับยั้งระบบประสาทส่วนกลาง (ขึ้นกับชนิดของรีเซปเตอร์) และทำหน้าที่เกี่ยวกับ การรับความรู้สึกเจ็บปวด ร้อน หนาว การรับรสชาติเกี่ยวข้องกับ ศูนย์คลื่นไส้ อาเจียน สรีรวิทยาของการตื่น การนอน การฝัน และอาการซึมเศร้า (8)



ภาพ 2 การสังเคราะห์อะซิติลโคลีน



ภาพ 3 กลไกการทำงานของอะซิติลโคลีนเอสเทอร์ในการส่งผ่านประสาท

2. เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AchE) (9)

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสมีหน้าที่ในการทำลายสารอะซิติลโคลีนซึ่งสารตัวนี้เป็นตัวกลางในการส่งกระแสประสาท (Nerve impulses) ของใยประสาทอัตโนมัติ preganglionic automatic fibers เซลล์ประสาทตัวที่สอง ใยประสาทหลังไขแฉะของพาราซิมพาเทติก (Postganglionic parasympathetic fibers) และ ใยประสาทหลังปมประสาทซิมพาเทติก (Postganglionic sympathetic fibers) บางชนิด ซึ่งเส้นประสาทเหล่านี้จะส่งกระแสประสาทไปยังหัวใจ ม่านตา ต่อม้ำลาย กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก กระเพาะปัสสาวะ ต่อมเหงื่อ ต่อมที่เยื่อหู หลอดลม รวมทั้งอวัยวะ และเนื้อเยื่ออื่นๆในร่างกาย นอกจากนี้ อะซิติลโคลีนยังทำหน้าที่ของตัวกลางในการส่งกระแสประสาทที่รอยต่อระหว่างปลายประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อลาย (Neuromuscular junction) และที่ไขแฉะต่างๆของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) เมื่อร่างกายได้รับสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสแล้ว ก็จะมีการสะสมของสารอะซิติลโคลีนขึ้นในร่างกายสารอะซิติลโคลีน จะไปกระตุ้นรีเซปเตอร์ของตัวมันทั้งตัวรับมัสคารินิก (Muscarinic receptor) และ ตัวรับนิโคติินิก (nicotinic receptor) ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการทาง over-cholinergic activity คือมีการส่งกระแสประสาทอยู่ตลอดเวลา ซึ่งจะแบ่งอาการที่เกิดขึ้นตามแหล่งที่สะสมของสารอะซิติลโคลีน ได้ดังนี้

-อาการทางประสาท จะเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน เหงื่อออก แขนงหน้าอก หรือถ้าอาการรุนแรงขึ้นอาจปวดท้อง ท้องเดิน น้ำลายฟูมปาก น้ำตา และน้ำมูกไหล ถ่ายอุจจาระ และปัสสาวะโดยกลั้นไม่อยู่ หลอดลมมีเสมหะมาก หายใจหอบ หลอดลมตีบ หน้าเขียวคล้ำ เป็นต้น

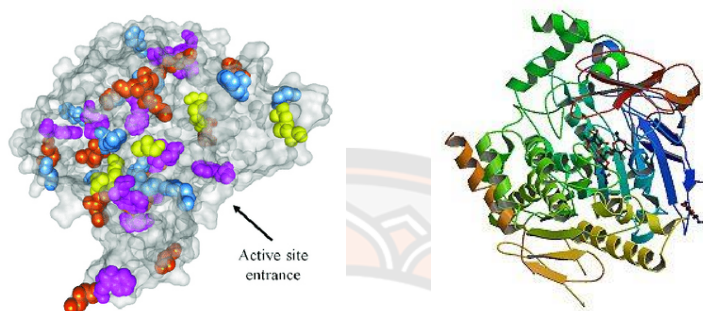
-อาการทางกล้ามเนื้อ จะเกิดอาการกระตุกของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะที่ลิ้น บริเวณหน้าและลำคอ หรือกระตุกทั่วร่างกาย เกิดอาการอ่อนเพลียและเป็นอัมพาต

-อาการทางสมอง จะเกิดอาการปวดศีรษะมึนงง อาจชักหมดสติได้

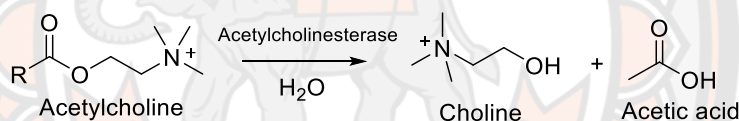
โดยทั่วไปในร่างกายของคนจะพบเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส 2 ประเภทด้วยกันคือ

1. อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (True-cholinesterase enzymes) เป็นเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงในการสลายสารอะซิติลโคลีน สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ประสาทและรอยต่อระหว่างปลายประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อลาย เอนไซม์นี้ถูกสร้างขึ้นมาพร้อมๆ กับการสร้างเม็ดเลือดแดง

2. ปิวทิวโรโคลีนเอสเทอเรส (Pseudocholinesterase enzymes) เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ตับ จะพบตามบริเวณ เช่น ระบบประสาทส่วนปลายตับ สมอง ผิวหนัง กล้ามเนื้อเรียบของทางเดินอาหาร พลาสมา ตับ เป็นต้น มีความเฉพาะเจาะจงในการสลายสารอะซิติลโคลีน น้อยกว่าอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (10)



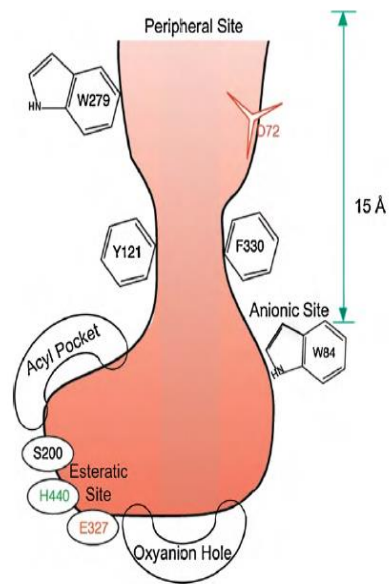
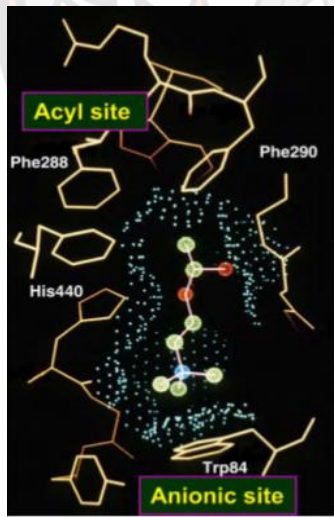
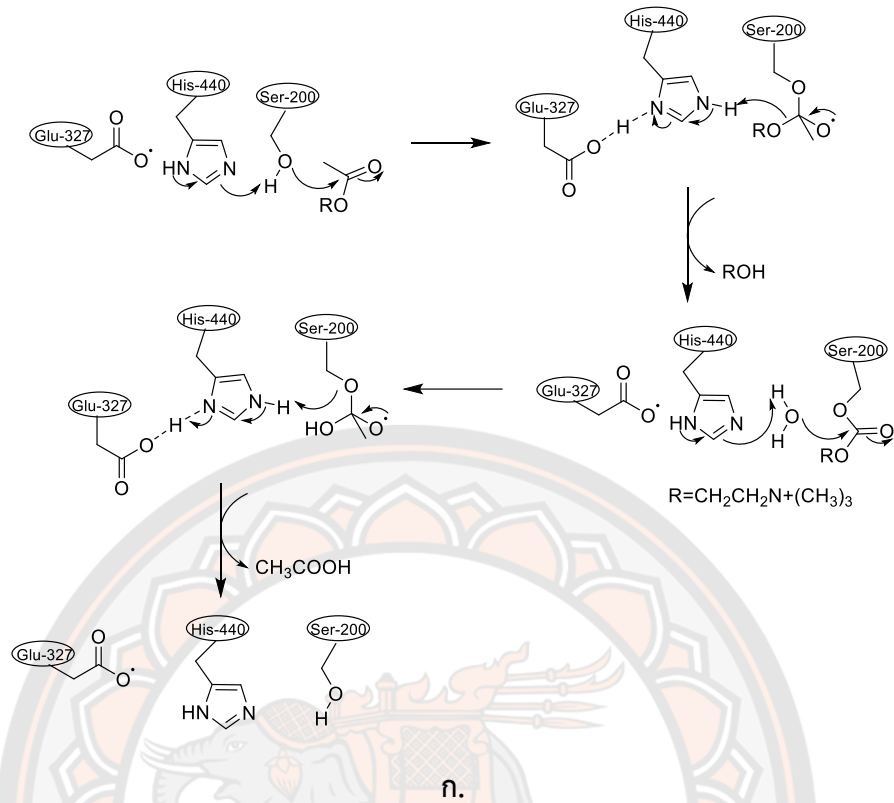
ภาพ 4 ลักษณะของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส



ภาพ 5 การสลายอะซิติลโคลีนด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

3. การทำงานของอะซิติลโคลีน และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (11)

การทำงานของอะซิติลโคลีนมีคุณสมบัติเป็นทั้งแบบกระตุ้น และแบบยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดของรีเซปเตอร์ ที่กระทำต่ออะซิติลโคลีนนั้น ซึ่งเมื่อทำงานเสร็จ จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดยอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่อยู่ตามผิวเยื่อหุ้มเซลล์ให้กลายเป็นโคลีน และกรดอะซิติก (ภาพ 5) นอกจากนี้โคลีนส่วนหนึ่งจะถูกดูดกลับเข้าปลายประสาทเพื่อใช้สังเคราะห์อะซิติลโคลีนใหม่ โดยกลไกการไฮโดรไลซิสอะซิติลโคลีนของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแสดงดังภาพ 6ก. และรูปร่างตำแหน่ง active site ของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแสดงดังภาพ 6ข.



ข.

ภาพ 6 ก.กลไกการไฮโดรไลซิสอะซิติลโคลีนของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และ ข.ตำแหน่ง binding site ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (11, 12)

4. โรคอัลไซเมอร์ (13)

โรคอัลไซเมอร์เกิดจากความผิดปกติของเซลล์สมองถูกทำลาย มีการตั้งสมมติฐานเพื่ออธิบายสาเหตุของโรคนี้ 3 สาเหตุ คือ

1. โคลิเนอร์จิก (Cholinergic Hypothesis) ซึ่งเชื่อว่าโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการลดการสังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิดอะซิติลโคลีน
2. แอมิลอยด์ (amyloid hypothesis) ซึ่งเชื่อว่าการสะสมของแอมิลอยด์บีตา (amyloid beta; A β) เป็นสาเหตุหลักของโรคอัลไซเมอร์
3. โพรตีนเทา (tau hypothesis) ซึ่งเชื่อว่าความผิดปกติของโปรตีนเทา เป็นตัวริเริ่มให้เกิดความผิดปกติตามมาเป็นลำดับ สมมติฐานนี้เชื่อว่าโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylated tau) จะจับคู่กับโปรตีนเทาปกติสายอื่นๆ เกิดเป็นนิวโรไฟบริลลารี แทงเกิล (neurofibrillary tangles) สะสมภายในตัวเซลล์ประสาท ผลดังกล่าวทำให้ไมโครทิวบูลสลายตัว และทำลายระบบการขนส่งสารในเซลล์ประสาท กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดความผิดปกติในการสื่อสารทางชีวเคมีระหว่างเซลล์ประสาท และทำให้เซลล์ตายในเวลาต่อมา

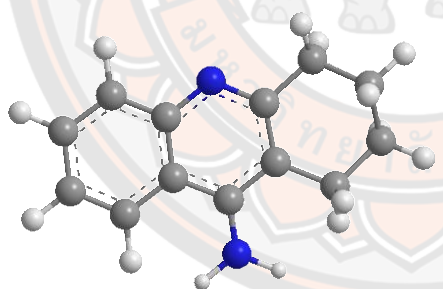
5. ยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (14)

โรคอัลไซเมอร์ เกิดจากโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่า เบต้า-อะไมลอยด์ (beta-amyloid) ชนิดไม่ละลายน้ำซึ่งเมื่อไปจับกับเซลล์สมองจะส่งผลให้เซลล์สมองเสื่อมและฝ่อลง รวมถึงทำให้การสื่อสารระหว่างเซลล์สมองเสียหายจากการลดลงของสารอะซิติลโคลีน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ส่งผลโดยตรงกับความทรงจำในปัจจุบันโรคอัลไซเมอร์ยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดได้ การรักษาเป็นเพียงการบรรเทาอาการของโรค เนื่องจากสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์คือเกิดจากการลดลงของปริมาณสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน จึงมีการพัฒนายาที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณของอะซิติลโคลีน ในส่วนของยาที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา และหน่วยงานด้านยาของยุโรปในการรักษาอาการทางการรับรู้ในโรคอัลไซเมอร์ มี 5 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่เป็นยาด้านโคลีนเอสเทอเรส คือ แพคริน (ชื่อการค้า Cognex), ไรวาสติกมีน (ชื่อการค้า Exelon และ Exelon Patch) กาแลนทามีน (ชื่อการค้า Razadyne และ Reminy) และโดเนเพซิล (ชื่อการค้า Aricept) ยาทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นยาที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitor ;AChEI) นอกจากนี้ยังมียาอีก

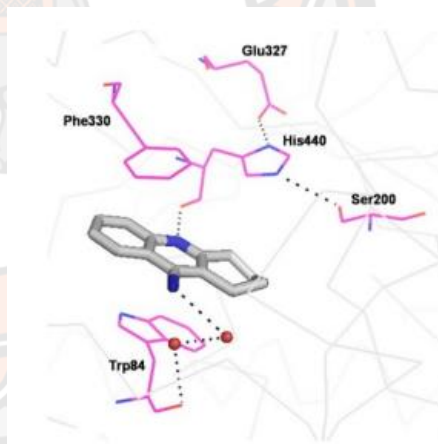
หนึ่งชนิดที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (NMDA receptor antagonist) คือ เมแมนทีน (Memantine) อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงของการใช้ยาเหล่านี้ที่พบบ่อยคือคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เวียนศีรษะและเบื่ออาหาร เนื่องจากมีปริมาณโคลิเนอร์จิกมากเกินไป และมีความรุนแรงในระดับน้อยถึงปานกลาง ส่วนผลข้างเคียงที่พบบได้น้อยคือตะคริว หัวใจเต้นช้า เบื่ออาหารน้ำหนักลด และเพิ่มการสร้างกรดในกระเพาะ

5.1 แทครีน (Tacrine) (15)

แทครีนเป็นยาตัวแรกที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง cholinesterase ที่สามารถย้อนกลับได้ และไม่ selective ใช้รักษาภาวะสมองเสื่อมชนิดอ่อนถึงปานกลาง ผลข้างเคียงคือคลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง อาหารไม่ย่อยเบื่ออาหาร ปวดกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยาชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อดับหากไม่ใช้ในปริมาณที่จำกัด



ก.

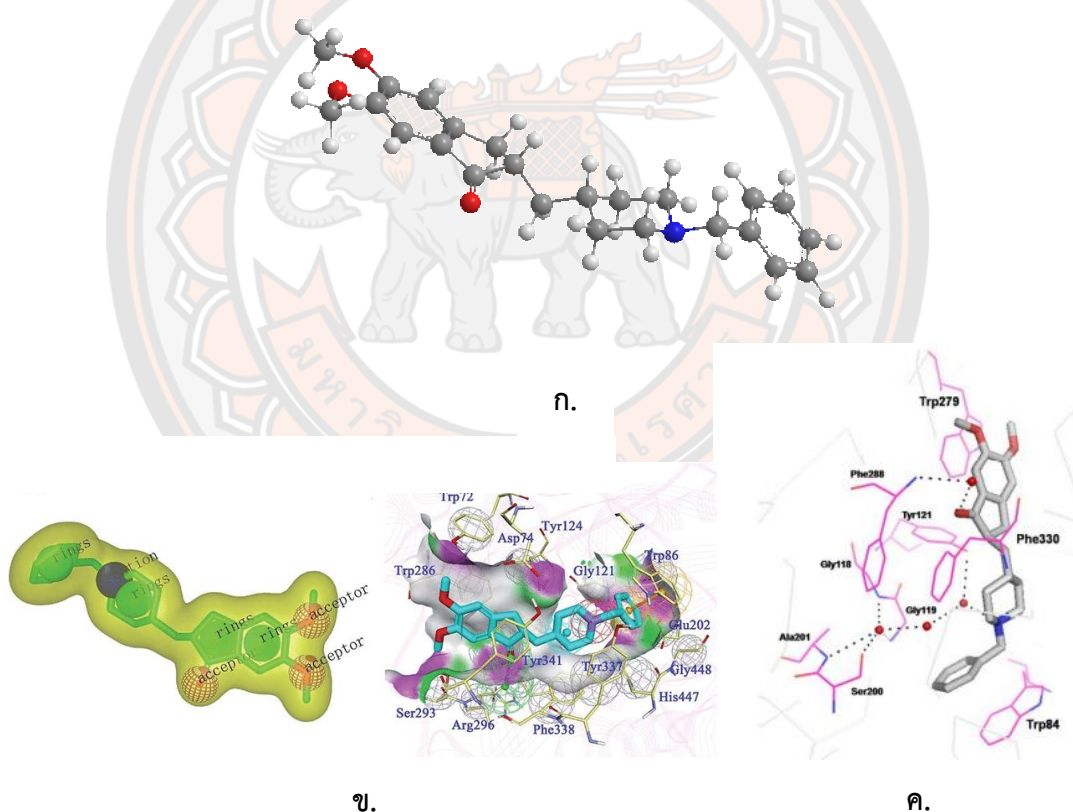


ข.

ภาพ 7 ก. โครงสร้างของแทครีน และ ข. โครงสร้าง 3D crystal ของ Tacrine-AChE complex (PDB code 1ACJ) (16)

5.2 โดเนเพซิล (Donepezil) (11)

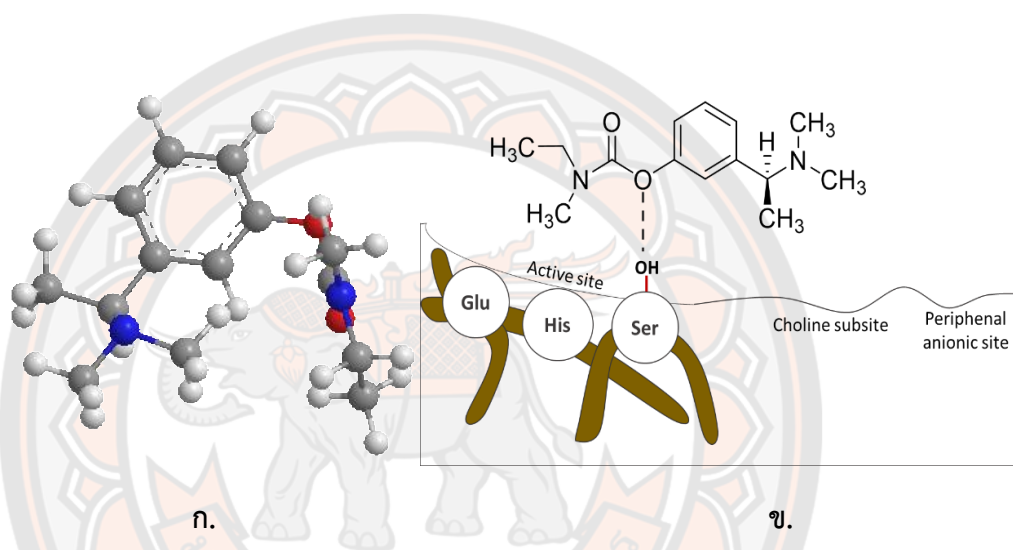
โดเนเพซิลเป็นยาที่ยับยั้ง AChE ที่ selective (CNS-selective piperidine) และสามารถย้อนกลับได้ ซึ่งจับกับส่วน peripheral anionic site ที่อยู่รอบนอก ซึ่งไม่เพียงส่งผลต่ออาการในการรักษาโรคเท่านั้น แต่ยังมีผลของการชะลอการสะสมของแผ่นอะไมลอยด์ แม้ว่าจะใช้ในการรักษาเพื่อบรรเทาอาการของโรคในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง แต่มีการศึกษาหนึ่งได้ระบุว่า โดเนเพซิลช่วยปรับปรุงการทำงานของสมองในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคในระดับรุนแรงได้เช่นกัน ผลข้างเคียงที่ของการได้รับยาในปริมาณสูงที่พบบ่อย ได้แก่ ความผิดปกติของทางเดินอาหาร คลื่นไส้ ท้องร่วง เบื่ออาหาร อาการปวดท้อง รวมไปถึงทำให้หัวใจเต้นช้าลง



ภาพ 8 ก.ROCS รูปร่างสามมิติของโดเนเพซิล ข.โครงสร้างหลักของยาจาก co-crystal structure of donepezil bound to human AChE (PDB ID:4EY7).ค.โครงสร้าง 3D crystal ของ TcAChE-donepezil complex(PDB ID:1EVE) (16, 17)

5.3 ไรวาติกมีน (Rivastigmine) (11)

ไรวาติกมีนเป็นตัวยาคีที่ยับยั้งที่มีประสิทธิภาพ และสามารถย้อนกลับได้ช้าซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แท้จริงผ่านการจับบริเวณส่วนที่เป็นส่วนของ Esteric site ซึ่งแตกต่างจากโดเนเพซิลที่เลือกยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ไรวาติกมีนยับยั้งทั้ง BuChE และ AChE แต่ผลข้างเคียงของยาชนิดนี้ก็คืออาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ ปวดท้อง และเวียนศีรษะ

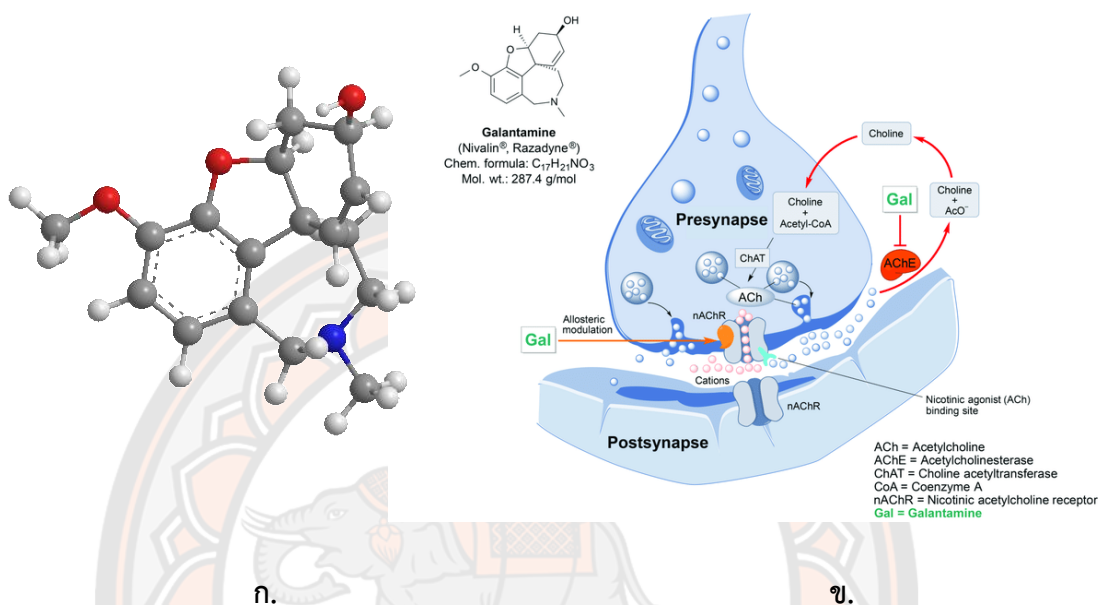


ภาพ 9 ก.รูปร่างสามมิติของไรวาติกมีน และ ข.อันตรกิริยาของไรวาติกมีนกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในตำแหน่ง active site (18)

5.4 กาแลนทามีน (Galantamine) (11)

กาแลนทามีนเป็นสารกลุ่ม tertiary อัลคาลอยด์ที่สกัดได้ส่วนเหง้าของต้นกาแลนธัส (Galanthus หรือ Snowdrop) เป็นพืชดอกที่อยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae ซึ่งถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการในระดับน้อยถึงปานกลาง เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขัน และสามารถย้อนกลับได้อย่างรวดเร็ว ผลข้างเคียงของกาแลนทามีน ส่วนใหญ่มีอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารคลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ลำไส้เคลื่อนไหวบ่อย และเนื่องจากกาแลนทามีนมีมีฤทธิ์ allosteric potentiating effects ที่ ตัวรับนิโคตินิก (nicotinic receptors) ไม่ได้เพียงส่งผลต่อการส่งผ่านโคลิเนอร์จิกเท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อระบบสารสื่อประสาทอื่นๆ เช่น โมโนเอมีนกลูตาเมต (monoamines glutamate)

และ กรดอะมิโนแอลฟา (alpha-aminobutyric acid ;GABA) ผลเหล่านี้ อาจส่งผลให้เกิดประโยชน์ มากขึ้นและปรับปรุงความผิดปกติทางความคิดและความเจ็บป่วยทางจิตเวชในผู้ป่วยโรคจิตเภท โรค ซึมเศร้า โรคอารมณ์แปรปรวน และพิษสุราเรื้อรัง

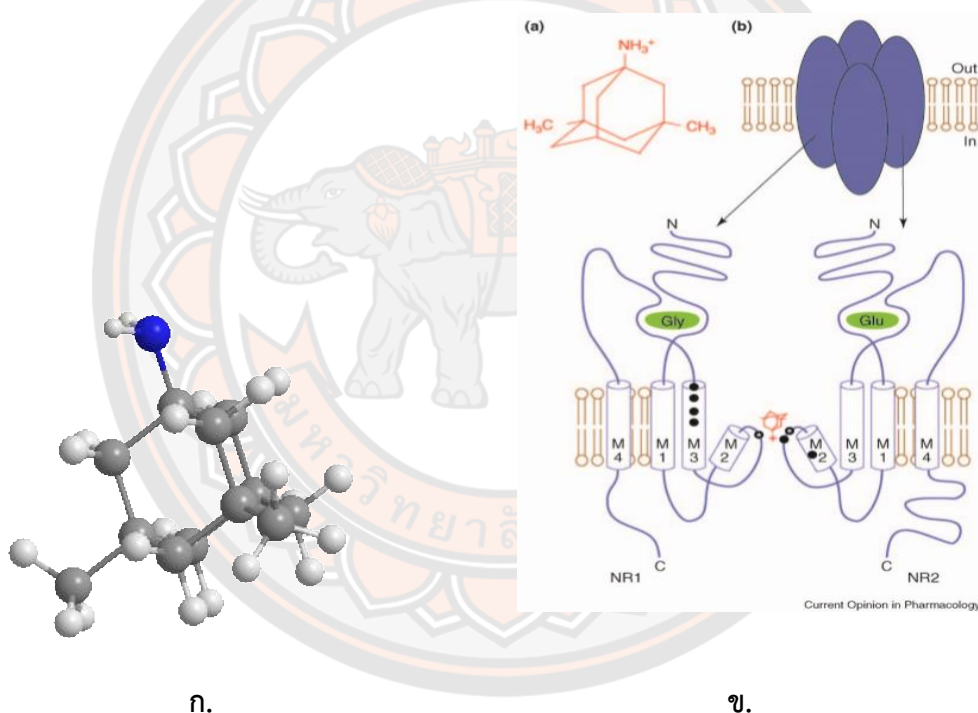


ภาพ 10 ก.โครงสร้างของกาแลนทามีน และ ข.ตำแหน่งการเข้ายับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (19)

5.5 เมแมนทีน (Memantine) (11)

เมแมนทีนเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ระดับปานกลางถึงรุนแรง เป็นกลุ่มของยาที่ออกฤทธิ์ต้านตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist) ยานี้จะควบคุมสารกลูตาเมต ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทระหว่างเซลล์ประสาทสำหรับการเรียนรู้ และความจำ ซึ่งในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับกลูตาเมตในปริมาณมาก เมื่อปริมาณกลูตาเมตมากเกินไปจึงทำให้มีปริมาณแคลเซียมเข้าไปสู่เซลล์สมองมากเกินไปส่งผลให้เกิดความเสียหาย ดังนั้นยาเมแมนทีนสามารถบล็อกตัวรับกลูตาเมตได้ จึงช่วยป้องกันไม่ให้แคลเซียมเข้าสู่เซลล์สมองมากเกินไป แสดงดังภาพ 11 โดยไกลซีนถูกผูกไว้กับหน่วยย่อย NR1, กลูตาเมตผูกพันกับหน่วยย่อย NR2 และเมแมนทีน (สีแดง) ปิดกั้นช่อง N-sites, กรดอะมิโนแอสพาราจินิกต่างเกี่ยวข้องกับการบล็อกโดย Mg²⁺ และตัวบล็อกอินทรีย์จำนวนมาก(*) จุดสีดำคือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่การกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าสามเท่าใน memantine IC₅₀ กรดอะมิโนเหล่านี้ตามการทดลองกับตัวรับ

ประกอบด้วย NR1 และ NR2B (หนึ่งในสี่ของหน่วยย่อยหน่วยย่อย NR2) หน่วยย่อยคือ N616 (N-site), A645, Y647, A653 และ V656 ใน NR1; และ W607, N615 (N-site) และ N616 ใน NR2B กรดอะมิโนที่เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันที่ได้รับการยืนยันว่ามีความสำคัญในการบล็อกช่อง memantine นั้นขึ้นอยู่กับ การทดลองกับตัวรับประกอบด้วยหน่วยย่อย NR1 และ NR2A คือ N616 และ A645 ใน NR1; N614 (N-site) และ N615 ใน NR2A (20) ซึ่งเมแมนทีนเป็นหนึ่งในยาที่ใช้ในการรักษาอาการปานกลางถึงโรคอัลไซเมอร์อย่างรุนแรง และหากใช้ยานี้ร่วมกับกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสนั้น อาจเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มากขึ้นได้ แต่ผลข้างเคียงของยานี้ได้แก่ ปวดศีรษะ ท้องผูก สับสน มึน เป็นต้น



ภาพ 11 ก.โครงสร้างเมแมนทีน และ ข. แผนภาพแสดงโครงสร้าง quaternary สี่หน่วยย่อยของ NMDARs (ส่วนด้านบน) และโครงสร้าง transmembrane (ส่วนด้านล่าง) ของสองหน่วยย่อย NMDAR

อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

1 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังพบในกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระ และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา ดังสมการ 1 และ 2



นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid), โปรตีน (protein), เอนไซม์ (enzyme), ดีเอ็นเอ (DNA), อาร์เอ็นเอ (RNA), คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate), เซลล์เมมเบรน (cell membrane), คอลลาเจน (collagen) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคชรา (aging), โรคมะเร็ง (cancer), โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease), โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease), โรคข้ออักเสบ (arthritis), โรคภูมิแพ้ (allergies), โรคความดันโลหิต ความผิดปกติของระบบประสาท, โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (21)

อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่

-เกิดจากการได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัส หรือเชื้อแบคทีเรีย

-โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์

-เกิดจากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา

-เกิดจากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหรือ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนโตรสออกไซด์ ไนโตรเจนได-ออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้ใหม่ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง

-เกิดจากยารักษาโรคบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin), เพนนิซิลลามิน (penicillamine) และพาราเซตามอล (paracetamol) (22)

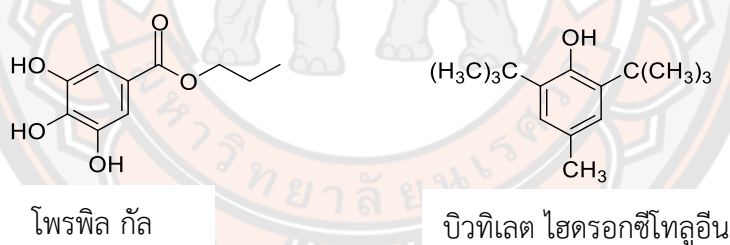
2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้าอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4 (23)

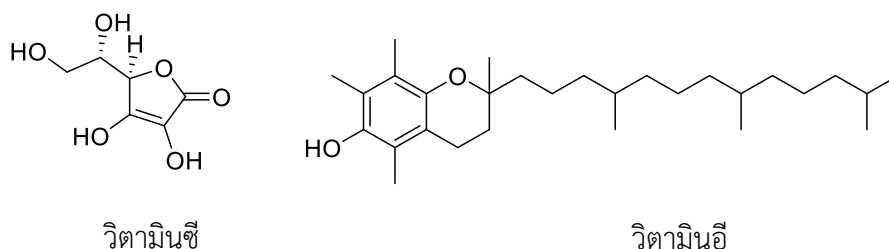


โดย R^{\cdot} และ RO^{\cdot} คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระแหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ โพรพิล กัลเลต, 2-บิวทิลเลต ไฮดรอกซีอะนิโซล, บิวทิลเลต ไฮดรอกซีโทลูอิน และเทอเทียรีบิวทิลไฮโดรควิโนน สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็น

สาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไปสารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่นๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี และ กลูต้าไธโอน ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) กลูต้าไธโอนรีดักเทส และกลูตา-ไธโอนทรานสเฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเทส (SOD) สามารถเปลี่ยน O^{2-} เป็น H_2O_2 สารต้านอนุมูล-อิสระอื่นๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และ ยูบิควินอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมี การป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไป จำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ที่พบมากในพืชผักและผลไม้ เช่น ตำลึง ผักบุ้ง แครอท มะละกอกุสุมะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง และฝรั่ง เป็นต้น (22)



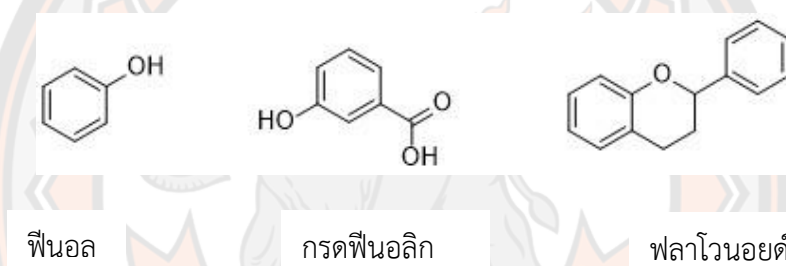
ภาพ 12 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี



ภาพ 13 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

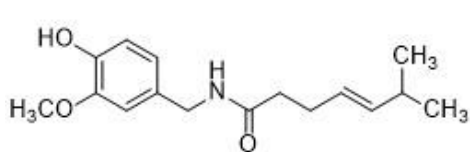
3. สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) (24)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช สารประกอบฟีนอลมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ คือสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สามารถละลายได้ในน้ำ โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีนมี หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (Phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ รวมไปถึงถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ลิกนิน (lignin), กรดซินนามิก(cinnamic acid) และโคเอ็นไซม์คิว (coenzyme Q)

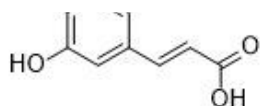


ภาพ 14 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป

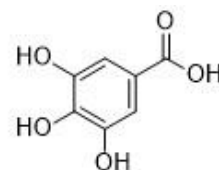
สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิดและมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอล กับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acid) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ (Alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) เป็นต้น แหล่งที่พบสารประกอบฟีนอลิก เช่น ถั่วเมล็ดแห้ง ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว และ งา ผลไม้ ได้แก่ องุ่น ส้ม กระท้อน เครื่องเทศ เช่น พริกไทย พริก ขิง กระเทียม หอมแดง หอมหัวใหญ่ พืชเครื่องดื่ม ได้แก่ ชา โกโก้ พืชหัว ได้แก่ มันเทศ เป็นต้น



แคปไซซิน ที่พบในพริก



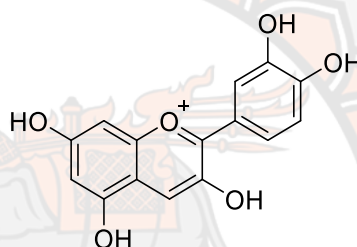
กรดคาเฟอิก พบในกาแฟ



กรดแกลลิก พบในใบชา



เคอร์คูมิน พบในขมิ้น



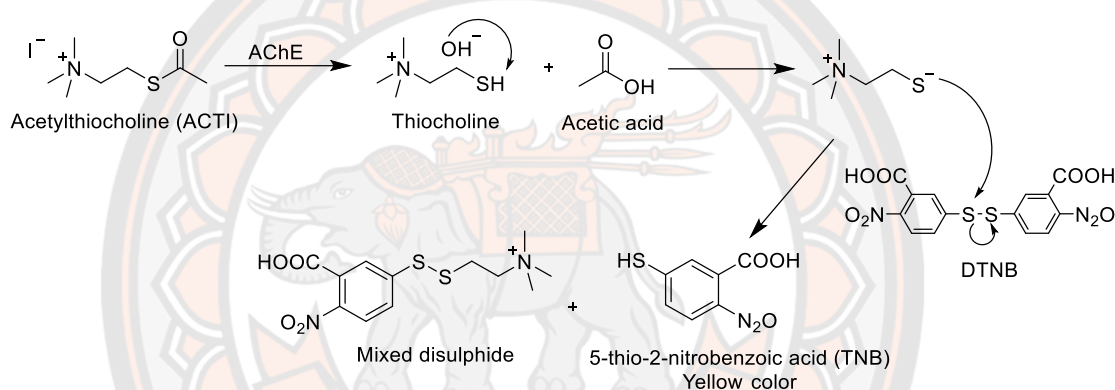
ไซยานิดิน พบผลไม้ตระกูลเบอร์รี่

ภาพ 15 โครงสร้างทางเคมีของสารฟีนอลิกจากธรรมชาติ

สารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ สามารถป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือดและมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระ ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระจะถูกทำลายไปด้วย นอกจากนี้ยังใช้เพื่อการถนอมอาหาร โดยใช้เป็นสารกันหืน ป้องกันปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation)

การศึกษาหาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (25) โดยวิธีของแอลแมนเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลายโดยจะอาศัยหลักการติดตามปฏิกิริยา และอ่านผลด้วยวิธีการทางสเปกโตรเมตรี โดยใช้อะซิติลโคลีนไอโอไดด์ เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อมีเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จะเกิดไทโอโคลีนออกมาเมื่อทำปฏิกิริยากับดีทีเอ็นบี (5,5-dithiobis[2-nitrobenzoic acid]) ได้สารสีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid แสดงดังภาพ 16 ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร



ภาพ 16 กลไกทางเคมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมน

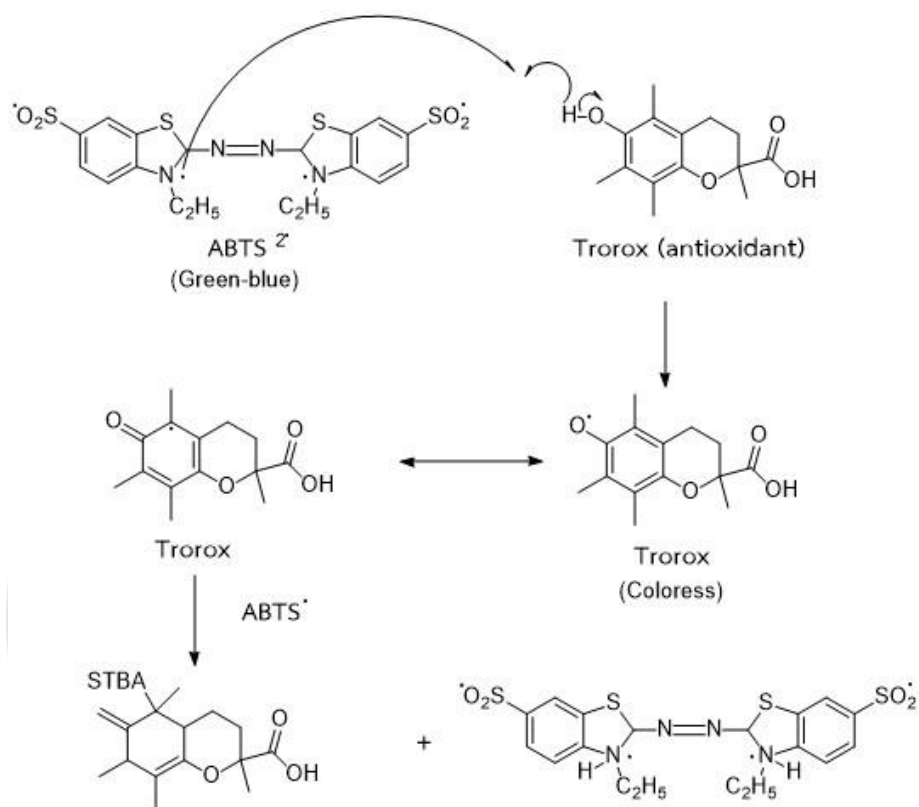
การศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

โดยทั่วไปการศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น

1. วิธีการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization: ABTS assay) (27, 28)

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2'-อะซิโน-บิส (3-เอทิลเบนโซไทโอะโซลีน-6-ซัลโฟนิค แอซิด) หรือ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{\cdot+}$ free radical ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีฟ้า-เขียว มี λ_{max} ที่ความยาวคลื่น 734

nm เมื่อเติมสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะมีผลทำให้สารต้านอนุมูลอิสระจับกับ $ABTS^{2\cdot+}$ มีซึ่งทำให้สีของ $ABTS^{2\cdot+}$ จางลง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร แสดงปฏิกิริยาดังภาพ 17

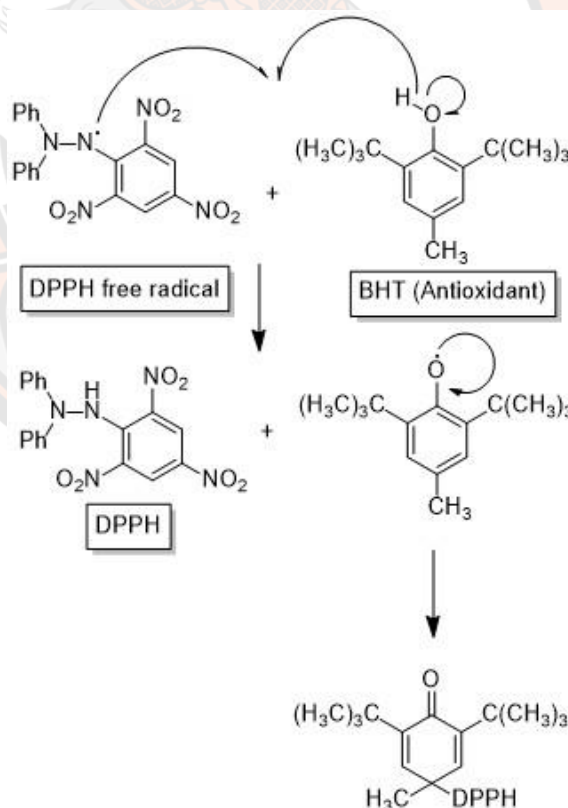


ภาพ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอบีทีเอส กับสาร Trolox (29)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ $ABTS^{2\cdot+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{2\cdot+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (30)

2. วิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay: DPPH assay) (27, 28)

วิธีนี้เป็น การทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้ดีพีพีเอชฟรีแรดิคัลรับไฮโดรเจนฟรีแรดิคัลจากสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ดีพีพีเอชฟรีแรดิคัลเป็นโมเลกุลที่เสถียรมากขึ้น มีผลทำให้สีของสารละลายดีพีพีเอช จางลงซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพ 18



33

ภาพ 18 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีพีพีเอชกับสารต้านอนุมูลอิสระ

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ส่วนข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง (30)

3. การดักจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical scavenging)

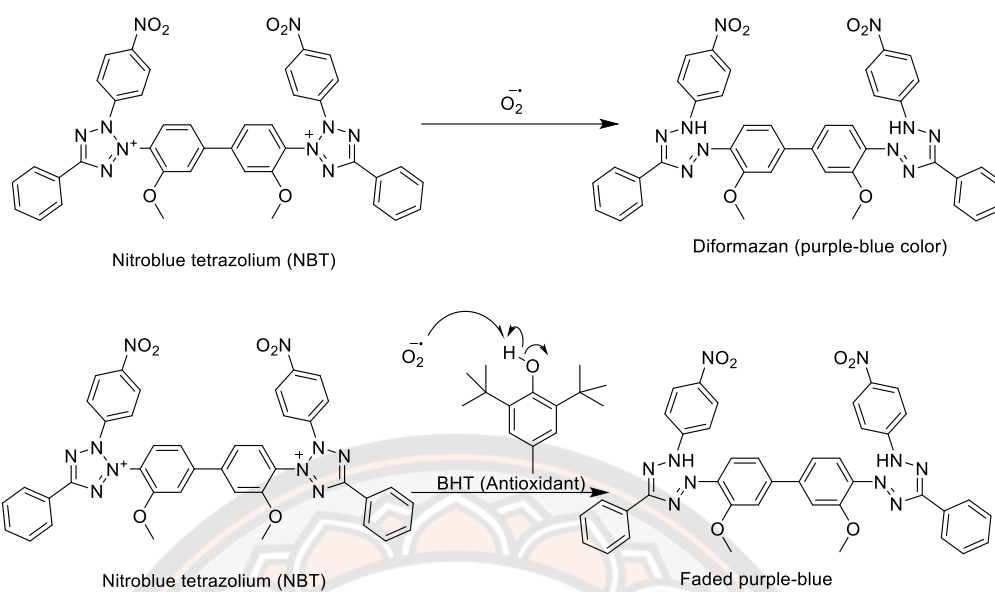
Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงยิ่งขึ้นด้วย แต่ตัวของ $O_2^{\cdot-}$ จะมีความว่องไวน้อยกว่า OH^{\cdot} ซึ่งการเกิด $O_2^{\cdot-}$ แสดงปฏิกิริยาดังสมการ 5 และ 6 (31)



เมื่อ $O_2^{\cdot-}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิด OH^{\cdot} เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction แสดงปฏิกิริยาดังสมการ 7



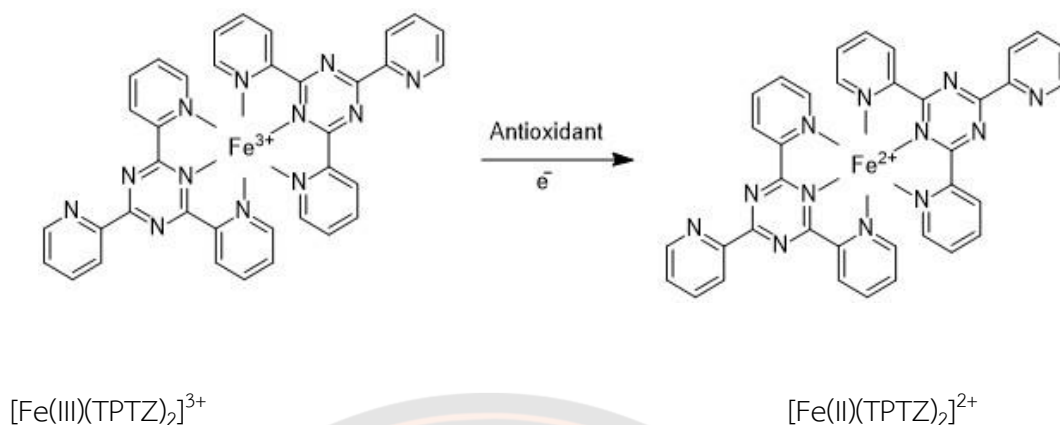
โดยทั่วไป $O_2^{\cdot-}$ จะเกิดจากกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) และ $O_2^{\cdot-}$ สามารถตรวจสอบได้โดยการเติมสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อ $O_2^{\cdot-}$ ทำปฏิกิริยากับ NBT จะเกิดเป็นสารประกอบ Diformazan ได้สารละลายสีน้ำเงินสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 nm เมื่อเติมสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระจับกับ $O_2^{\cdot-}$ มีผลทำให้ปริมาณของ $O_2^{\cdot-}$ ลดลง ซึ่งเมื่อเติมสาร NBT ลงไปมีผลทำให้สารละลายสีน้ำเงินจางลง แสดงกลไกปฏิกิริยาดังภาพ 19



ภาพ 19 กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ Superoxide anion radical (O_2^-) ของสารต้านอนุมูลอิสระ (29)

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) (30)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ (แสดงปฏิกิริยาดังภาพ 20) ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)



ภาพ 20 การรีดิวซ์ $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ เป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ของสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิมแต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน

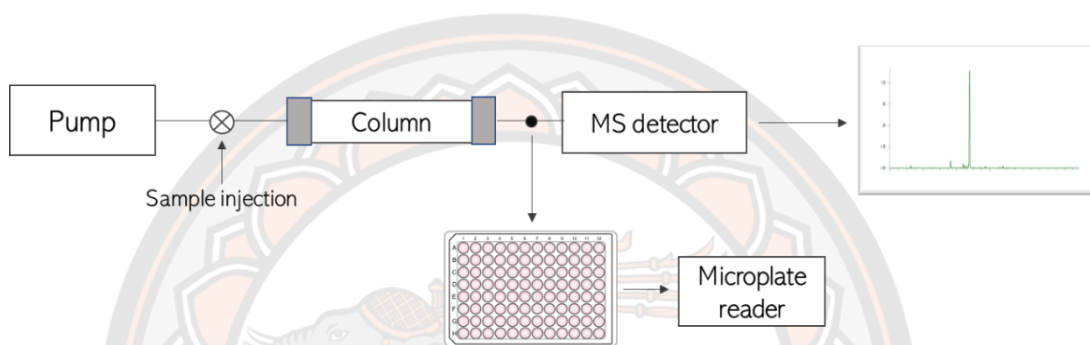
เทคนิค At-line couple LC-MS/MS

เทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) (32) เป็นเทคนิคขั้นสูงสำหรับแยกสารให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์สารที่มีความซับซ้อน หรือต้องการวิเคราะห์เมแทบอไลต์ของยาหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเป็นการรวมของเทคนิคการแยกสารด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Liquid chromatography; LC) และการวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี (Mass spectroscopy; MS) และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้ควบคู่ไปด้วยเพื่อประหยัดเวลา และสารตัวอย่างที่ใช้

ขั้นตอนการวิเคราะห์ At-line couple Liquid LC-MS/MS จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1. สารตัวอย่างจะเกิดการแยกด้วยเทคนิค LC จากนั้นเข้าสู่ MS เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหรือเมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้น 2. สารตัวอย่างจะเกิดการแยกด้วยเทคนิค LC จากนั้นเก็บแฟรกชันของสารในถาดไมโครเพลท(96-well plates) เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้ ตัวอย่างแผนผังแสดงดังภาพ 21

ข้อดีของเทคนิค At-line couple LC-MS/MS

1. สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์เมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนเดียว
2. สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ และเก็บแฟรกชันในภาตไมโครเพลท
3. สามารถวิเคราะห์เมแทบอไลต์ที่เกิดขึ้นและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนเดียว
4. สะดวก รวดเร็ว และประหยัดเวลา



ภาพ 21 แผนผังของ At-line LC-MS/MS ควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

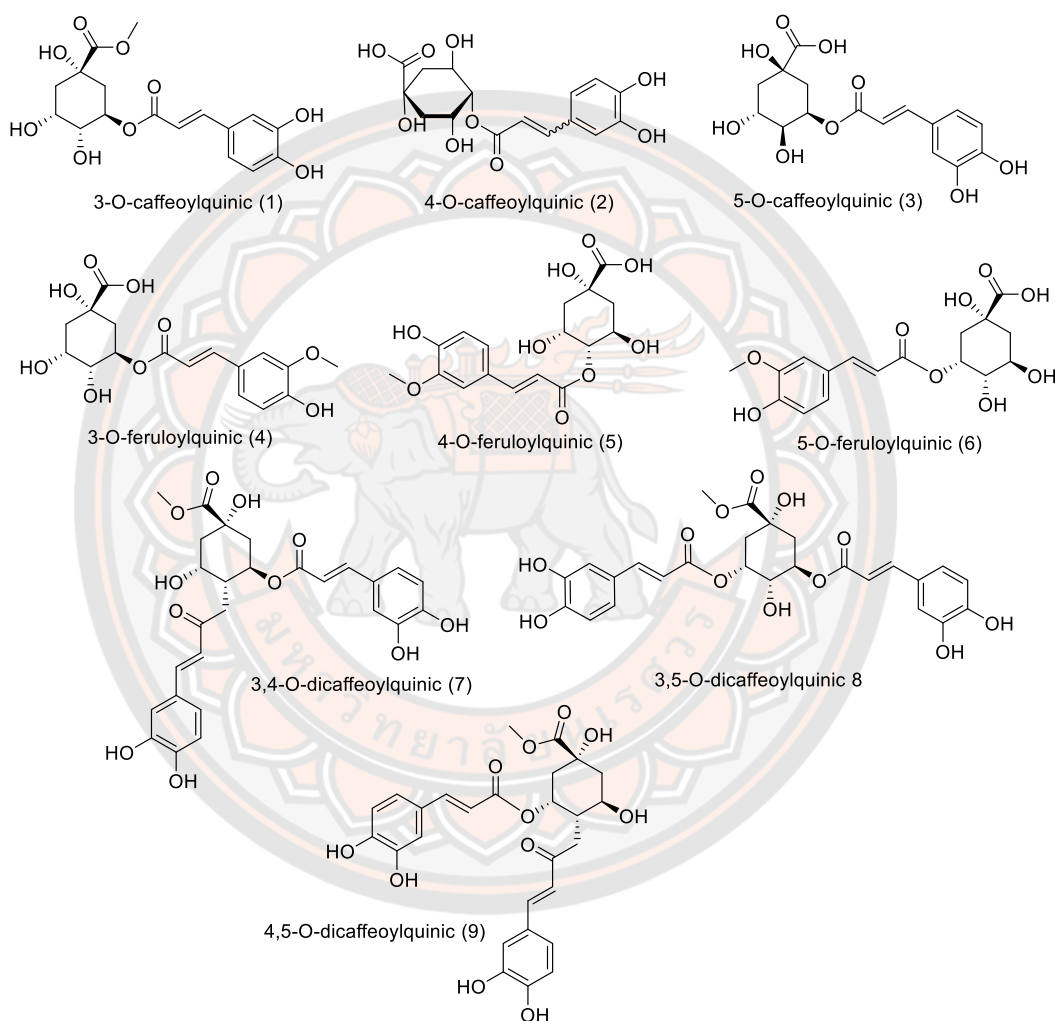
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยบางส่วนที่นำเอาเทคนิค On-line HPLC หรือ LC/MS มาทำการศึกษาร่องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติมาแล้วบ้างเช่น

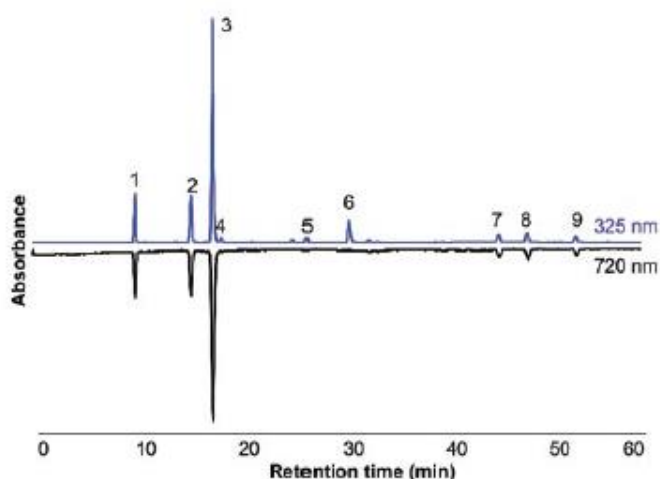
ปีพ.ศ. 2549 Stalmach และคณะ (33) ได้ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่ว และกาแฟที่ผ่านการคั่วในระดับกลาง (medium roasted) โดยการนำกาแฟแต่ละชนิดมาบดแล้วนำมาผ่านน้ำร้อนด้วยเครื่องชงกาแฟ จากนั้นนำมาศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค On-line HPLC-ABTS⁺

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของกาแฟที่ผ่านการคั่ว และไม่ผ่านการคั่วพบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 9 ชนิด แสดงดังภาพ 22 ซึ่งจากโครมาโตแกรมที่แสดงในภาพ 23 และ 24 จะเห็นว่ากาแฟทั้งสองชนิดมีพีคในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน และในส่วนของกาแฟที่ผ่านการคั่ว นั้นจะมีขนาดของพีคที่สูงกว่าที่ไม่ผ่านการคั่ว ซึ่งจะเห็นว่าพีค 1, 2 และ 3 คือกรด กรดคาเฟอิลควินิก (3, 4 และ 5-O-caffeoylquinic) เป็นองค์ประกอบหลักของกาแฟที่ผ่านและไม่ผ่านการคั่ว ตามลำดับ พีค 4, 5 และ 6 คือกรดเฟอร์ูโรลควินิก (3, 4 และ 5-O-feruloylquinic ตามลำดับ) และพีค 7 8

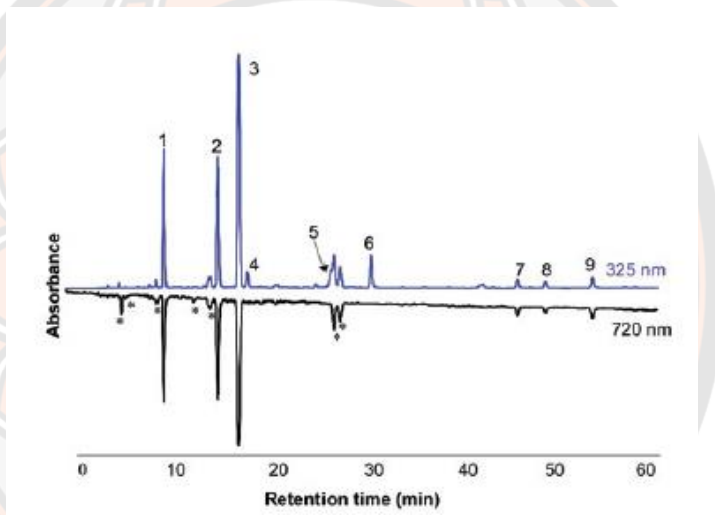
และ 9 คือองค์ประกอบของกรดไดคาเฟอิลควินิก (3,4- 3,5- และ 4,5-O-dicaffeoylquinic ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่ากาแฟที่ผ่านการคั่วจะพบปริมาณของกรด 3- and 4-O-caffeoylquinic ที่สูงขึ้น แต่จะพบปริมาณของกรด 5-O-caffeoylquinic ลดลง และมีปริมาณกรดคลอโรจีนิกอื่นๆ เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่วโดยโครงสร้างขององค์ประกอบทั้ง 9 ชนิด



ภาพ 22 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากกาแฟ



ภาพ 23 โครมาโตแกรม On-line HPLC-ABTS⁺ ของกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่ว



ภาพ 24 โครมาโตแกรม On-line HPLC-ABTS⁺ ของกาแฟที่ผ่านการคั่วในระดับปานกลาง

เมื่อศึกษาความเข้มข้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ขององค์ประกอบทางเคมีทั้ง 9 ชนิดของกาแฟที่ผ่านและไม่ผ่านการคั่ว นั้น โดยวิธีเอบีทีเอส ผลการทดลองแสดงดังตาราง 1 และ 2

จากตาราง 1 และตารางที่ 2 พบว่าเมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของสารฟีนอลิกรวมของกาแฟที่ผ่าน และไม่ผ่านการคั่ว พบว่าความเข้มข้นของสารฟีนอลิกรวมของกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่วมีปริมาณที่สูงกว่ากาแฟที่ผ่านการคั่ว และนอกจากนี้ยังพบว่าในการแป้ที่ผ่านและไม่ผ่านการคั่วจะพบสารฟีนอลิกประเภทกรด คาเฟอิลควินิก (Caffeoylquinic) ซึ่งจะพบในปริมาณที่สูงที่สุด และสารฟีนอลิกประเภทกรดไดคาเฟอิลควินิก (Dicaffeoylquinic) พบในปริมาณที่ต่ำที่สุด และเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีเอบีทีเอส โดยเทียบกับปริมาณของโทรลล็อกซ์ ขององค์ประกอบทางเคมีทั้ง 9 ชนิดพบว่า 5-O-caffeoylquinic ที่พบในกาแฟที่ผ่านและไม่ผ่านการคั่ว

จะแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยดูได้จากค่า Trolox equivalent ที่สูงที่สุด ในขณะที่องค์ประกอบทางเคมีชนิดกรดเฟอร์ูโลอิลควินิก (Feruloylquinic) ทั้ง 3 ชนิด จะไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 1 ความเข้มข้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในกาแฟที่ไม่ผ่านการคั่ว

Peak	Compound	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Trolox equivalents		TEAC
			($\mu\text{mol/L}$)	(% of total)	
1	3-O-caffeoylquinic acid	108 \pm 3.5	90 \pm 0.2	12	1.2
2	4-O-caffeoylquinic acid	134 \pm 3.7	108 \pm 0.9	14	1.2
3	5-O-caffeoylquinic acid	675 \pm 14	486 \pm 1.9	64	1.4
	Total caffeoylquinic acids	917	684	90	-
4	3-O-feruloylquinic acid	14 \pm 0.5	n.d.	-	-
5	4-O-feruloylquinic acid	18 \pm 0.6	n.d.	-	-
6	5-O-feruloylquinic acid	84 \pm 1.8	n.d.	-	-
	Total feruloylquinic acids	116	n.d.	0	-
7	3-O-dicaffeoylquinic acid	27 \pm 0.6	23 \pm 0.2	3	1.2
8	4-O-dicaffeoylquinic acid	43 \pm 0.7	32 \pm 0.3	4.2	1.3
9	5-O-dicaffeoylquinic acid	27 \pm 0.8	21 \pm 0.1	2.8	1.3
	Total dicaffeoylquinic acids	97	76	10	-
	Total	1130	760 \pm 2.5	100	-

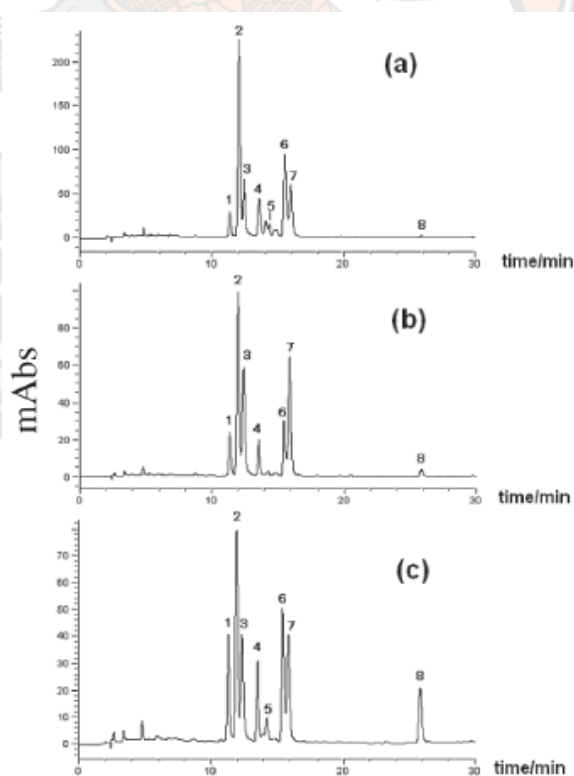
*TEAC -Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; n.d. - not detected for peak numbers and unidentified antioxidant peaks

ตาราง 2 ความเข้มข้น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในกาแฟ
ที่ผ่านการคั่วในระดับปานกลาง

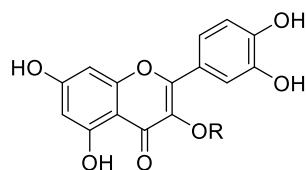
Peak	Compound	Concentration	Trolox equivalents		TEAC
		($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	(% of total)	
1	3-O-caffeoylquinic acid	191 \pm 1.0	164 \pm 4.3	17	1.2
2	4-O-caffeoylquinic acid	234 \pm 3.0	192 \pm 3.0	20	1.2
3	5-O-caffeoylquinic acid	453 \pm 6.6	335 \pm 13	34	1.4
	Total caffeoylquinic acids	878	691	71	-
4	3-O-feruloylquinic acid	33 \pm 0.5	n.d.	-	-
5	4-O-feruloylquinic acid	36 \pm 0.4	n.d.	-	-
6	5-O-feruloylquinic acid	74 \pm 1.4	n.d.	-	-
	Total feruloylquinic acids	143	n.d.	0	-
7	3-O-dicaffeoylquinic acid	22 \pm 1.1	21 \pm 1.7	2.1	1
8	4-O-dicaffeoylquinic acid	16 \pm 0.7	12 \pm 0.8	1.2	1.3
9	5-O-dicaffeoylquinic acid	26 \pm 0.7	29 \pm 2.3	2.9	0.9
	Total dicaffeoylquinic acids	64	62	6	-
	Total chlorogenic acids	1085	753	77	-
	Total unidentified antioxidant peaks	-	231 \pm 2.2	23	-
	Total	-	984 \pm 26	100	-

ในปีพ.ศ 2550 Tiberti และคณะ (34) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแอปเปิ้ลสามชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ลกาล่า แอปเปิ้ลสีทอง และแอปเปิ้ลฟูจิ ด้วยเทคนิค On-Line LC/UV/MS ซึ่งในงานวิจัยได้นำเปลือกของแอปเปิ้ลอบที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และทำให้เป็นผง แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำกับเมทานอล หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค On-line HPLC/UV/MS

จากผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแอปเปิ้ลทั้งสามชนิด ด้วยเทคนิค On-line HPLC/UV/MS พบว่าโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแอปเปิ้ลแต่ละชนิดมีโปรไฟล์ที่คล้ายกัน โดยแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 8 ชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน แสดงดังภาพ 25 และเมื่อศึกษาโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีทั้ง 8 ชนิด พบว่าเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ แสดงดังภาพ 26 ประกอบด้วยพีค 1 คือรูทีน(rutin) พีค 2 คือไฮเปอร์โรไซด์(Hyperoside) พีค 3 คือไอโซเคอควิทิน(isoquercetin)พีค 4 คือ เคอควิทิน-3-ออโร-เพนโตไซด์ (Quercetin-3-O-pentoside) พีค 5 และ 6 คือ เคอควิทิน-3-โอโร-เพนโตไซด์ (Quercetin-3-O-pentoside) พีค 7 คือ เคอควิทริน (Quercetrin) และพีค 8 คือ เคอควิทิน (quercetin)



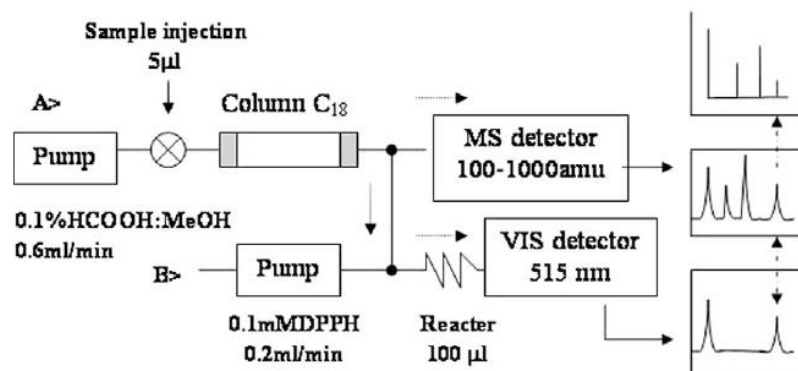
ภาพ 25 โครมาโตแกรม HPLC-UV/PAD ($\lambda = 360 \text{ nm}$) ของสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ล
(a) แอปเปิ้ลกาล่า (b) แอปเปิ้ลสีทอง และ (c) แอปเปิ้ลฟูจิ



		R	MM
1	rutin	Glu-Rha	610
2	hyperoside	Gal	464
3	isoquercetin	Glu	464
4-6	quercetin-3-O-pentose	pentose	434
8	quercetrin	Rha	448
7	quercetin	H	302

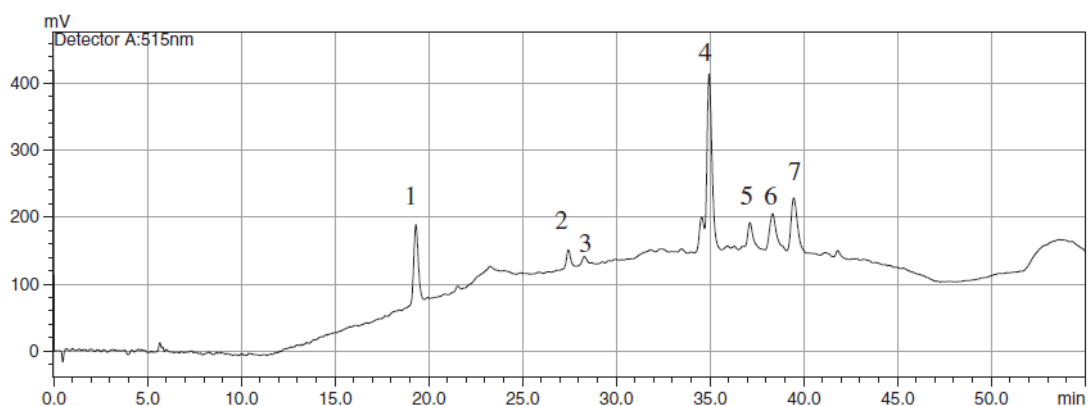
ภาพ 26 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสารสกัดเปลือกแอปเปิ้ล

ในปีพ.ศ 2554 Nuengchamnong และคณะ (35) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของน้ำจากหูก้าหนดแมว โดยใช้เทคนิค Online LCMS/MS (ภาพ27) การทดลองได้ทำการแยกสารสกัดควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช จากแฟรกชันที่แยกได้จาก LCMS/MS เพื่อระบุตำแหน่งที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และเลือกตำแหน่งนั้นไปพิสูจน์โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีต่อไป



ภาพ 27 แผนผังของ on-line HPLC-ESI-MS และ DPPH assay

จากภาพ 28 แสดงโครมาโตแกรมของสารประกอบที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดพบว่ามีทั้งหมด 7 พีค หลังจากนั้นทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพีคที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรมิเตอร์



ภาพ 28 โครมาโตแกรมของการแยกสารประกอบหญ้าหนวดแมวด้วย HPLC และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรมิเตอร์

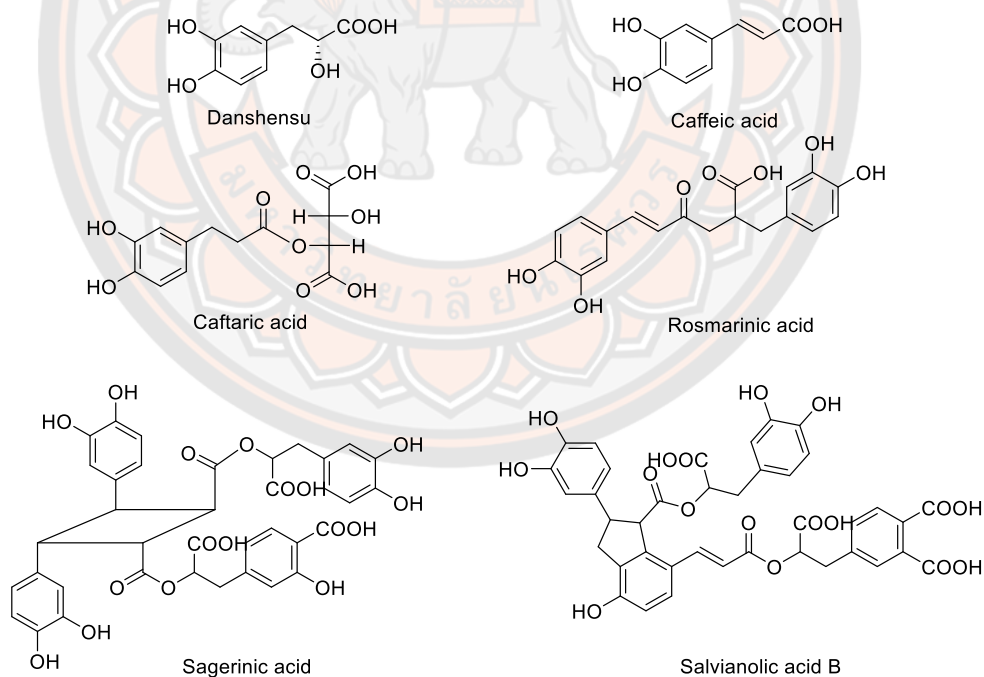
จากการศึกษาโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของทั้ง 7 พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วย เดนเซนสุ (Danshensu), กรดคาเฟอิก (Caffeic acid), กรดคาฟทาริก (Cafaric acid), โรสมารินิก (Rosmarinic acid), กรดซาจีรีนิก (Sagerinic acid), กรดซัลเวียโนลิกบี (Salvianolic acid B) และ อนุพันธ์ของกรดคาเฟอิก (Caffeic acid derivative) แสดงดังภาพ 29 ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบสารประกอบ เดนเซนสุ (Danshensu), กรดคาเฟอิก (Caffeic acid), กรดซาจีรีนิก (Sagerinic acid) และกรดซัลเวียโนลิกบี (Salvianolic acid B) ในพืชชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดกรด โรสมารินิกมีปริมาณมากที่สุด คิดเป็น 1478.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรดซัลเวียโนลิกบี มีปริมาณน้อยที่สุดคิดเป็น 31.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดหย้าบนำของหญ้าหนวดแมว

Compound	Content ($\mu\text{g/ml}$)
Danshensu (Peak 1) ^a	502.68 \pm 82.0
Caffeic acid (Peak 2)	251.6 \pm 40.0
Caftaric acid (Peak3)	1070 \pm 27.8
Rosmarinic acid (Peak 4)	1478.0 \pm 98.5
Caffeic acid derivative (Peak 5) ^a	146.0 \pm 19.2
Sagerinic acid (Peak 6) ^b	50.4 \pm 7.6
Salvianolic acid B (Peak 7) ^b	31.8 \pm 3.2

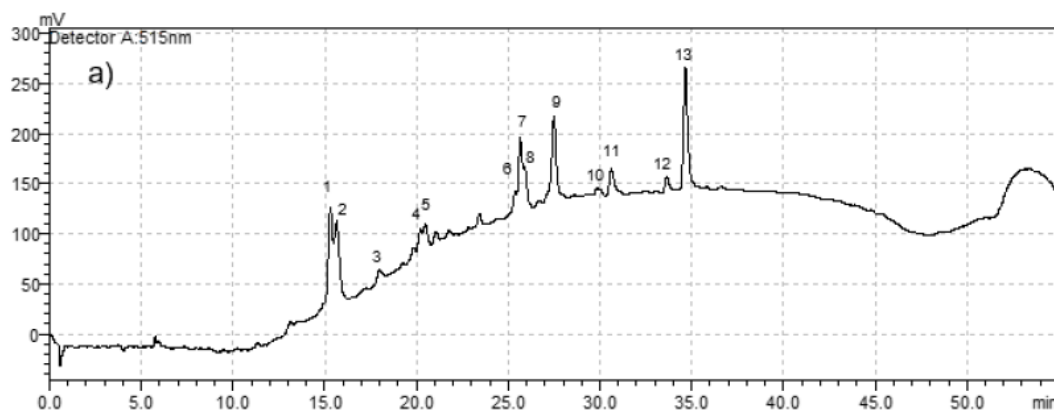
^a Calculated as caffeic acid equipvalent.

^b Calculated as Rosmarinic acidequipvalent.



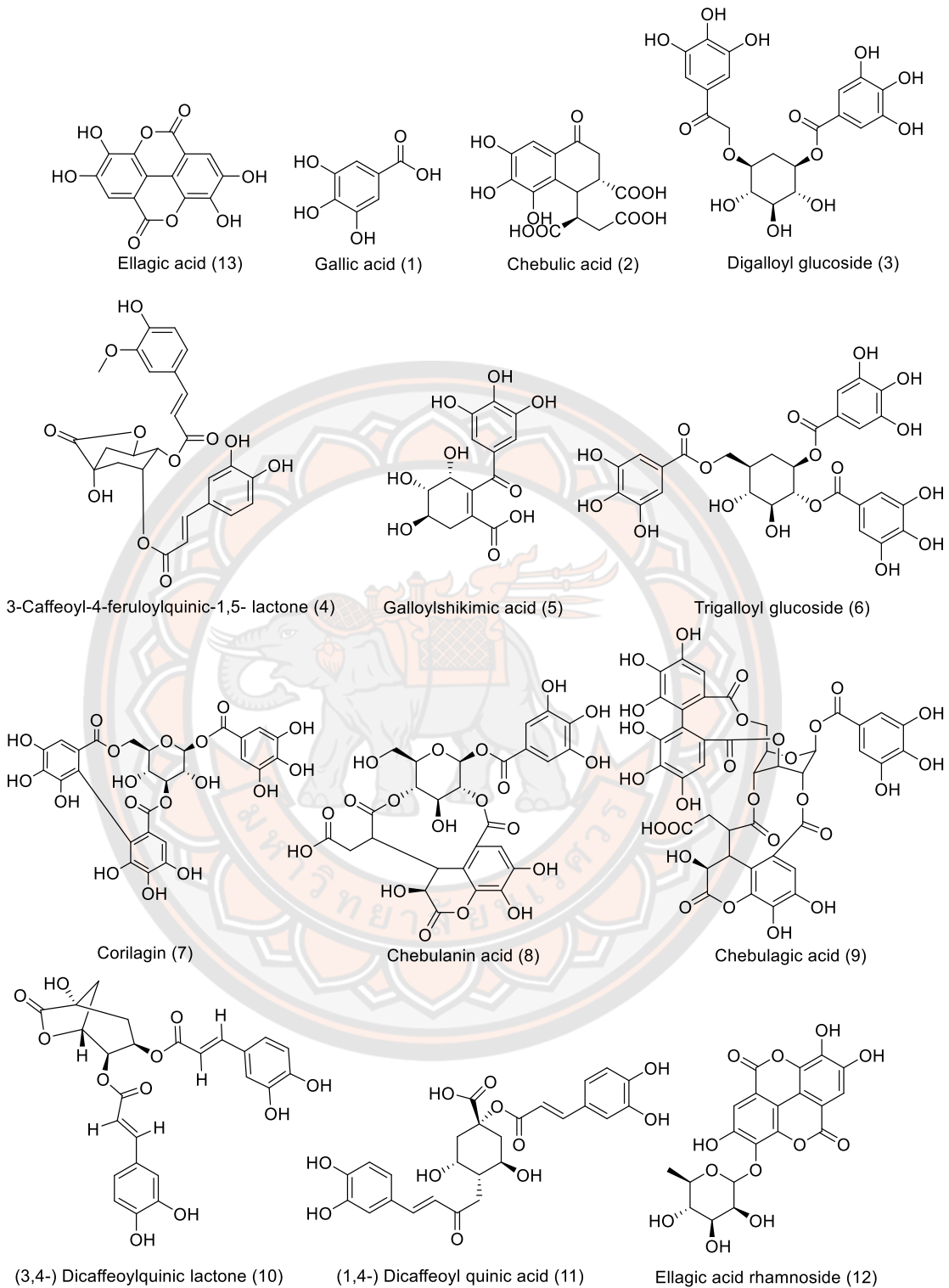
ภาพ 29 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหย้าบนำของหญ้าหนวดแมว

ในปีพ.ศ 2560 Nuengchamnong และ Ingkaninan (36) ได้แยกสารจากตำรับยาสหัชธารา ด้วยเทคนิค On-line LC-MS ควบคุมการการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งจากโครมาโตแกรมของ LC-MS พบพีคที่น่าสนใจทั้งหมด 13 พีค ของสารสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังภาพ 30



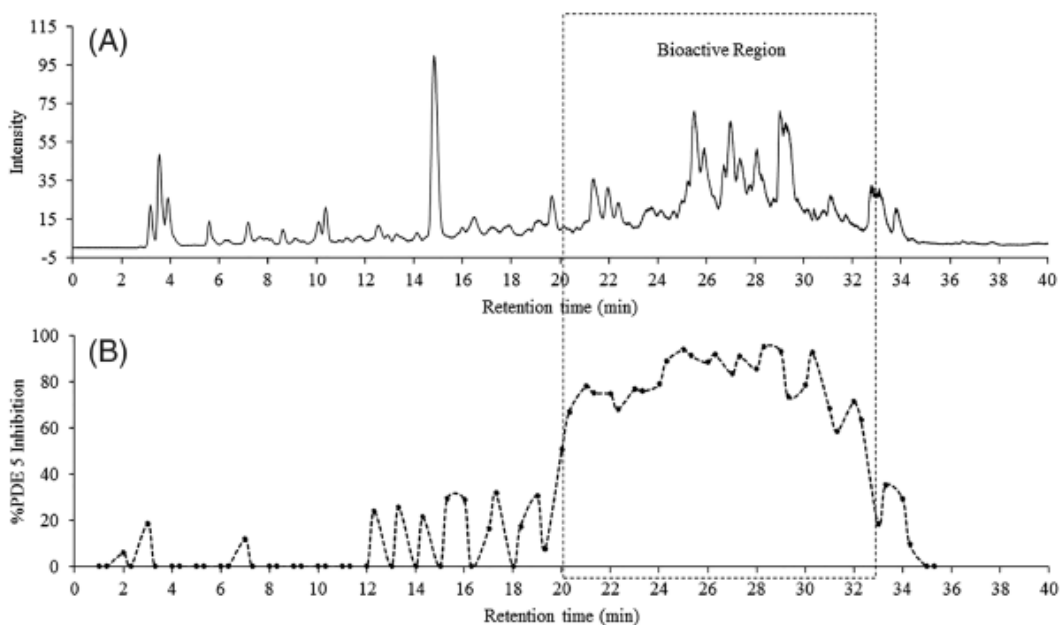
ภาพ 30 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดยาสหัชธารา โดยใช้ LC-ESI-MS/MS ควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay: ภาพแสดงพีคของสารประกอบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ตรวจพบที่ 515 nm

จากการศึกษาการโครงสร้างขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 13 ตัว ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรมิเตอร์ พบว่าประกอบด้วยสารประกอบกรดแกลลิก (Gallic acid), กรดชิบูลิก (Chebulic acid), ไตแกลโลอิลไกลโคไซด์ (Digalloyl glucoside), 3-คาเฟอิล-4-เฟอร์อิลควินิก-1,5-แลคโตน (3-Caffeoyl-4-feruloylquinic-1,5- lactone), กรดแกลโลอิลชิคิมิก (Galloylshikimic acid), ไตรแกลโลอิลไกลโคไซด์ (Trigalloyl glucoside) กรดคอร์ลาจिन (Corilagin), กรดชิบูลานิน (Chebulanin acid), กรดชิบูลาจิก (Chebulagic acid), ไตคาเฟอิลควินิกแลคโตน (dicafeoylquinic lactone), กรดไดคาเฟอิลควินิก (Dicafeoyl quinic acid), กรดอัลลาจิกรามโนไซด์ (Ellagic acid rhamnoside) และ กรดอัลลาจิก (Ellagic acid) ตามลำดับ แสดงดังภาพ 31



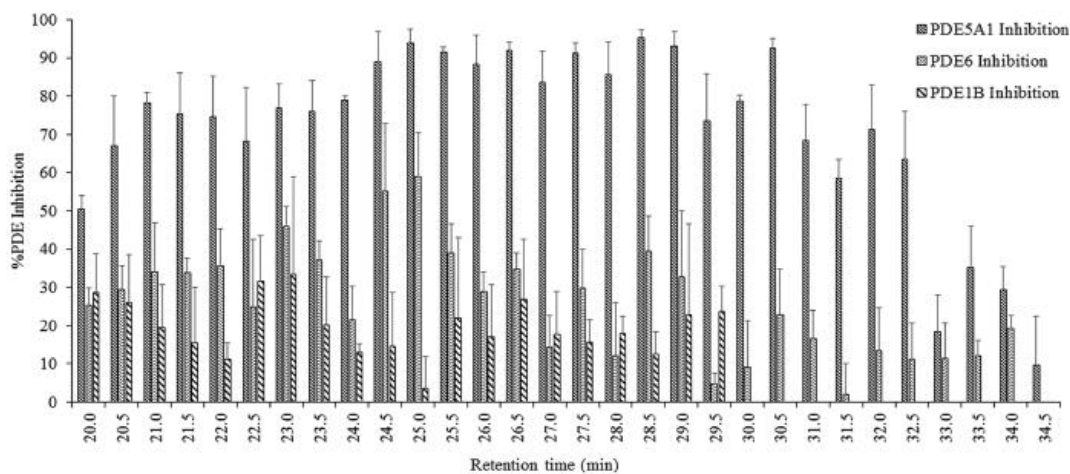
ภาพ 31 โครงสร้างขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 13 ตัว

ในปีพ.ศ 2562 Bhandari และคณะ (37) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ชนิด PDB5 ของเถาวัลย์เปรียงโดยใช้เทคนิค At-line LC-QTOF-MS micro-fractionation ในงานวิจัยได้ใช้ส่วนของลำต้นของเถาวัลย์เปรียงมาสกัดด้วย 95% เอทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอลและทำการแยกสารสกัดด้วย LC-MS/MS และเก็บแฟรกชัน ด้วย 96-well plate จากนั้นทำการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (Phosphodiesterase) ชนิด PDE5 และนำแฟรกชันที่แสดงฤทธิ์มาศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสชนิด PDE5A1, PDE1B และ PDE6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อรวบรวมข้อมูลและศึกษาหาความเลือกจำเพาะต่อการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ของแฟรกชันที่ได้



ภาพ 32 โครมาโตแกรมของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ได้จาก LC-QTOF-MS ควบคุมไปกับการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ชนิด PDE5 (a) และโครมาโตแกรมของการยับยั้งเอนไซม์(b)

จากภาพ 32 จะเห็นว่าในช่วง retention time ที่ 20-32 นาที เป็นช่วงที่องค์ประกอบทางเคมีแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ชนิด PDE5 ดังนั้นจึงเลือกแต่ละแฟรกชัน ของช่วงเวลานี้ไปศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสชนิด PDE5A1, PDE1B และ PDE6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งพบว่าแฟรกชันของเถาวัลย์เปรียงส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสชนิด PDE5A1 มากกว่า PDE1B และ PDE6 แสดงดังภาพ 33



ภาพ 33 กุทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์ชนิด PDE5A1, PDE6 และ PDE1B ของแต่ละส่วนที่แยกได้ (n = 3)

จากภาพ 33 จะเห็นว่าแต่ละแฟรกชันแสดงการยับยั้งเอนไซม์เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์ชนิด PDE5A1 มากกว่า 50% เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแต่ละส่วนที่แยกได้ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์ดังกล่าวด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตริกพบว่าส่วนของ retention time ในช่วง 20-34.5 นาที พบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 32 ชนิดแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 แสดงการแตกแฟรกเมนต์ (MS/MS fragmentation) ใน positive mode ของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดเถาวัลย์เปรียง

Compound	Retention time (min)	m/z [M + H] ⁺	Formula	Tentative identification	Classification
1	20.18	532.2820	Unidentified	-	-
2	21.02	269.0824	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetin	Isoflavone
3	21.14	299.0929	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	7-Hydroxy-8,4'-Dimethoxyisoflavone	Flavone
4	21.38	423.1827	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	Derrisoflavone B	Isoflavone
5	21.59	453.1934	C ₂₆ H ₂₈ O ₇	Brousoflavanol B	Flavone
6	22.42	395.1523	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	Robustic acid methylether	Coumarin
7	23.73	285.0783	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Prunetin	Flavone
8	23.86	453.1950	C ₂₆ H ₂₈ O ₇	3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6,8-bis(3-methyl-2-buten-1-yl)-4H-chromen-4-one	Flavone
9	24.22	618.2867	Unidentified	-	-
10	24.52	618.2866	Unidentified	-	-
11	24.68	439.2143	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	Kanzonol G	Isoflavone

ตาราง 4 (ต่อ)

Compound	Retention time (min)	m/z [M + H] ⁺	Formula	Tentative identification	Classification
12	25.24	407.1888	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	5,7-Dihydroxy-2-[4-hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-6-(3-methyl-2-buten-1-yl)-4Hchromen-4-one	Flavone
13	25.52	437.1999	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	Derrisoflavone D	Isoflavone
14	25.92	437.2004	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	Derrisoflavone E	Isoflavone
15	26.32	435.1851	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	6-(2-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)-3-(4-hydroxyphenyl)-5-methoxy-8,8-dimethyl-4H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one	Cyclised isoflavone
16	26.65	481.2215	Unidentified	-	-

ตาราง 4 (ต่อ)

Compound	Retention time (min)	m/z [M + H] ⁺	Formula	Tentative identification	Classification
17	26.98	481.2208	Unidentified	-	-
18	27.40	437.1949	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	Derrisoflavone C	Cyclised Isoflavone
19	28.06	437.1947	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	6,8-Diprenylpratensein	Isoflavone
20	28.50	423.1792	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	Derrisoflavone F	Isoflavone
21	29.06	421.2004	C ₂₆ H ₂₈ O ₅	Derrisoflavone A	Isoflavone
22	29.35	421.1998	C ₂₆ H ₂₈ O ₅	7-O-Methyl-iso-lupalbigenin	Isoflavone
23	30.58	407.1850	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	Lupalbigenin	Isoflavone
24	30.86	435.1798	C ₂₆ H ₂₆ O ₅	Lonchocarpic A	Coumarin
25	31.12	407. 1851	C ₂₆ H ₂₆ O ₅	5,7,4'-Trihydroxy-6,8-diprenylisoflavone	Isoflavone
26	31.35	435.1798	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	Scandenin	Coumarin
27	31.60	505.2575	Unidentified	-	-

ตาราง 4 (ต่อ)

Compound d	Retention time (min)	m/z [M + H] ⁺	Formula	Tentative identification	Classification
28	31.74	451.2108	Unidentified	-	-
29	32.83	419.1850	C ₂₆ H ₂₆ O ₅	Scandinone	Cyclised isoflavone
30	33.27	435.2164	C ₂₇ H ₃₀ O ₅	7-Hydroxy-5-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)- 6,8-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-4H-chromen-4- one	Isoflavone
31	34.28	405.1693	C ₂₅ H ₂₄ O ₅	Scanderone	Cyclised isoflavone
32	34.50	405.1693	C ₂₅ H ₂₄ O ₅	Osajin	Cyclised isoflavone

ในปี 2562 Braham และคณะ (38) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของสารสกัดจากใบมะรุมและศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC-DAD-ESI-MS ซึ่งในงานวิจัยได้ใช้ใบมะรุมที่ผ่านทำให้แห้ง บด และร่อนเป็นผงแบ่ง นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอลและอะซิโตน (อัตราส่วน 50 และ 70%) จากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมได้มาศึกษาหาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช การรีดิวซ์เฟอริก และความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระออกซิเจน โดยผลการทดลองแสดงดังตาราง 5

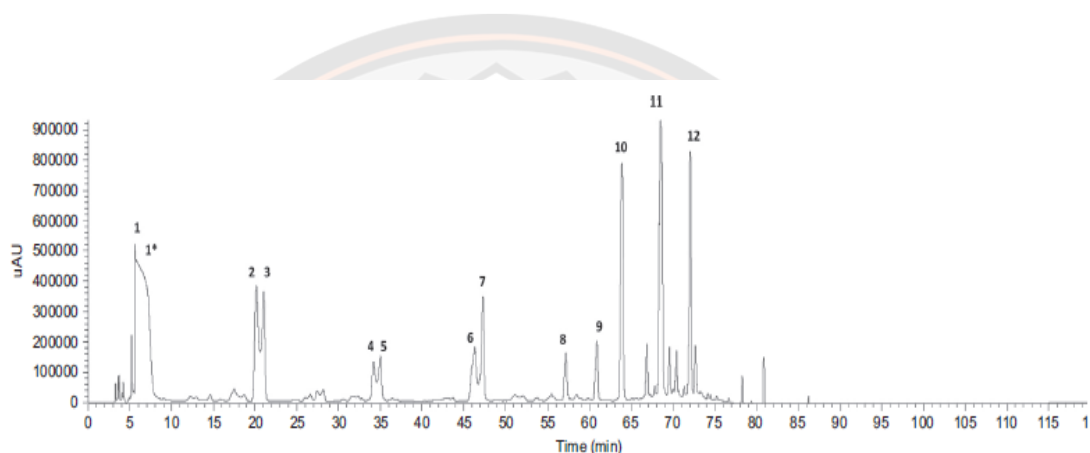
ตาราง 5 ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

Extract	TPC (mgGEA/g)	TPC (mgQE/g)	FRAP (mmol TE/g)	DPPH (mmol TE/g)	ORAC (mmol TE/g)
water	14±1	3.71±0.02	0.08±0.01	0.07±0.01	0.45±0.01
50%Ethanol	13±1	4.72±0.01	0.60±0.01	0.56±0.01	1.46±0.03
70%Ethanol	32±1	7.82±0.03	0.55±0.01	0.53±0.02	1.49±0.05
50%Acetone	49±1	5.13±0.03	0.68±0.02	0.68±0.01	0.9±0.1
70%Acetone	57±3	9.12±0.01	0.86±0.03	0.73±0.01	1.1±0.2

จากตาราง 5 ซึ่งเป็นการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดใบมะรุมในตัวทำละลาย 70% อะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ 57 และ 9.12 mg GAE/g ตามลำดับซึ่งสารสกัดในตัวทำละลายน้ำนั้นมีปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวมต่ำที่สุด คือ 14 และ 3.71 mg GAE/g และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) และการวัดความสามารถในการออกซิเดชันของเฟอริก (FREP assay) พบว่าสารสกัดใบมะรุมของในตัวทำ

ละลาย 70% อะซิโตนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด คือ 0.86 และ 0.73 mmol TE/g ในทางกลับกันการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระออกซิเจน (ORAC assay) พบว่า สารสกัดในตัวทำละลาย 70% เอทานอล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คือ 1.49 mmol TE/g

จากผลการศึกษาข้างต้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกสารสกัดในตัวทำละลาย 70% อะซิโตน ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดมาศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC-DAD-ESI-MS จากผลการศึกษาจะพบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 12 ชนิด แสดงดังภาพ 34 และตาราง 6



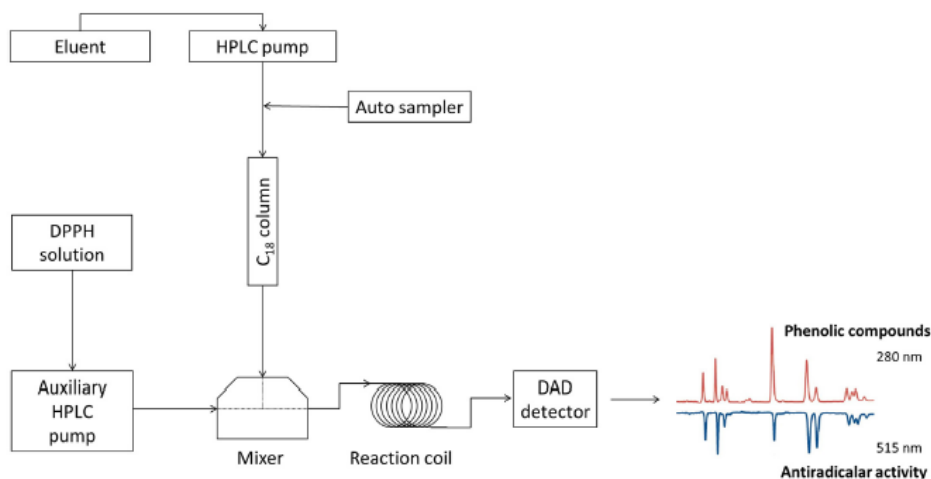
ภาพ 34 HPLC-UV โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบมะรุ้มในตัวทำละลาย 70% อะซิโตน ที่ความยาวคลื่น 280 nm

ตาราง 6 Retention times และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะรุมนในตัวทำละลายอะซิโตน 70% โดยเทคนิค HPLC-ESI-MS

Peak No.	RT (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Formular [M-H] ⁻	dtm (ppm)	MS ² /MS ² fragments (m/z)	identification
1	5.61	252	191.02	C ₆ H ₇ O ₇	1.9	110.90, 172.94	Citric acid
1*			191.06	C ₆ H ₁₁ O ₆	4.9	84.89, 92.88, 110.96, 126.89, 172.90	Quinic acid
2	20.16	321	353.09	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-4.5	134.89, 179.02, 191.07 3-	Caffeoylquinic acid
3	21.04	323	353.09	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-4.5	134.89, 179.02, 191.07	cis-3-Caffeoylquinic acid
4	34.21	325	353.09	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-4.5	134.89, 173.09, 179.02, 191.07	cis-4-Caffeoylquinic acid
5	35.04	325	353.09	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-4.5	134.89, 173.09, 179.02, 191.07 4	4-Caffeoylquinic acid
66	46.35	329	593.15	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-7.9	353.22, 383.18, 473.17, 503.26	Vicenin-2
7	47.33	329	593.15	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-7.9	353.22, 383.18, 473.17, 503.26	Vicenin-2
8	57.11	328	431.10	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	2.7	311.11, 341.18	Vitexin or Isovitexin
9	60.84	329	431.10	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	2.7	311.11, 341.18	Vitexin or Isovitexin

ตาราง 6 (ต่อ)

Peak No.	RT (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Formular [M-H] ⁻	dtm (ppm)	MS ² /MS ² fragments (m/z)	identification
10	63.85	357	463.09	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	2.9	301.03	Quercetin-3-O-glucoside or Quercetin-3-O-galactoside
11	68.46	355	549.09	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	2.5	301.06, 463.25, 505.28	Quercetin 3-O-(6"-malonyl) glucoside
12	72.02	327	533.10	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	7.4	489.15, 447.23, 285.03	Luteolin 7-O-(6"-malonyl) glucoside



ภาพ 35 แผนผังการติดตั้งอุปกรณ์สำหรับวิธีออนไลน์ HPLC-DPPH screening

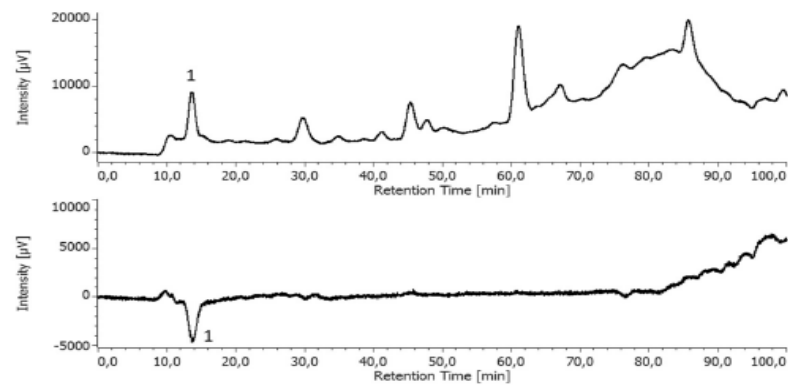
เมื่อทำการศึกษารายละเอียดประกอบเคมีควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (ผังการทดลองแสดงดังภาพ 35) ของสารสกัดในตัวทำละลายน้ำ จะพบองค์ประกอบหลัก 2 ชนิดคือกรดซิตริก (citric acid) และ ควินิก (quinic) ในส่วนของสารสกัดของตัวทำละลาย 70% เอ

ทานอล และ 70% อะซิโตนจะพบองค์ประกอบ 5 ชนิด กรดซิตริก หรือ ควินิก (พีค1), กรด 3-คาเฟอิลควินิก (3-caffeoylquinic acid) (พีค2) , กรด 4-คาเฟอิลควินิก (4-caffeoylquinic acid) (พีค3), เควอร์ซีติน (quercetin-3-O-glucoside หรือ quercetin-3-O-galactoside) (พีค 10) และ quercetin 3-O-(6''-malonyl glucoside (พีค11) แสดงดังตาราง 7 นอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดของตัวทำละลาย 70% อะซิโตนมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งดูได้จากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของแต่ละสารประกอบแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของดีพีพีเอช และสัญญาณสารประกอบฟีนอลิก อัตราส่วนที่สูงขึ้นหมายถึงค่าดีพีพีเอชที่สูงขึ้น หรือสัญญาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง จะส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และสารสกัดในตัวทำละลายน้ำ พบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็นกรด กรดซิตริก หรือ ควินิก ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังภาพ 36

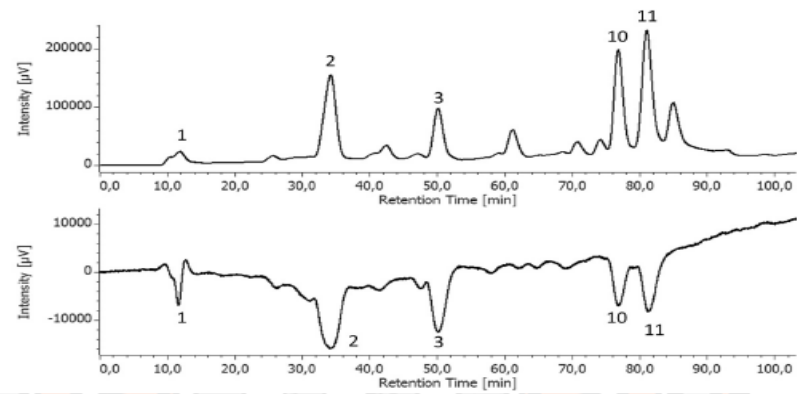
ตาราง 7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะรุมาที่ ซึ่งแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนของสัญญาณดีพีพีเอชที่ 515 นาโนเมตรและสัญญาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ 280 นาโนเมตร

Extract	Compound	DPPH radical scavenging capacity (% DPPH signal/compound signal)
Water	Citric/quinic acid	73
70%	Citric/quinic acid	24
Ethanol	3-Caffeoylquinic acid	12
	4-Caffeoylquinic acid	17
	Quercetin-3-O-glucoside and/or quercetin-3-O-galactoside	6
	Quercetin 3-O-(6''-malonyl) glucoside	7
70%	Citric/quinic acid	1
Acetone	3-Caffeoylquinic acid	7
	4-Caffeoylquinic acid	15
	Quercetin-3-O-glucoside and/or quercetin-3-O-galactoside	8
	Quercetin 3-O-(6''-malonyl) glucoside	8

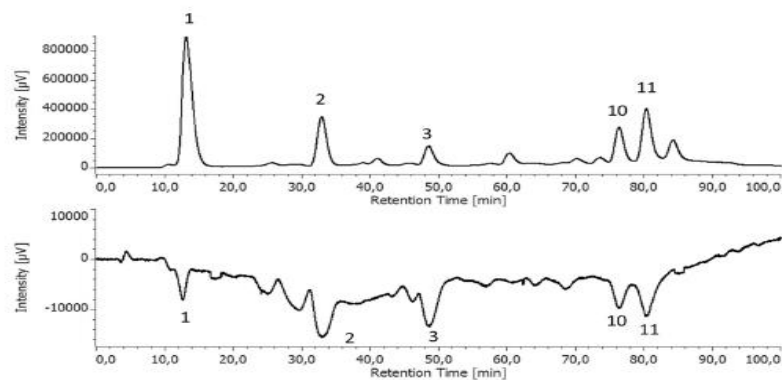
a water



b ethanol

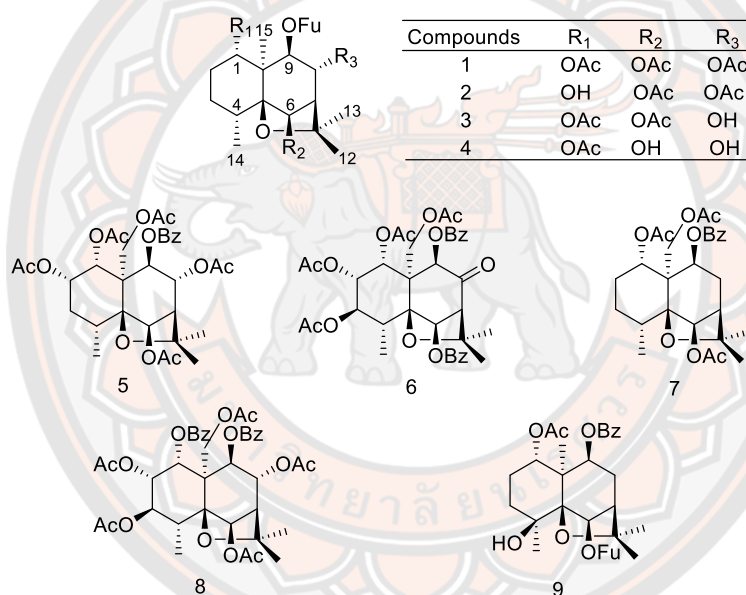


c acetone



ภาพ 36 โครมาโตแกรม HPLC-DPPH ของสารสกัดจากใบมะรุม ในตัวทำละลาย (a) น้ำ, (b) 70% เอทานอล และ (c) 70% อะซิโตน (โครมาโตแกรมข้างบนคือ สารประกอบฟีนอลิก ที่ 280 nm และข้างล่างคือโครมาโตแกรมที่สัมพันธ์กับการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ที่ 617 nm)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษากฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากธรรมชาติมาแล้วบ้าง เช่น ในปี 2558 Alarcón และคณะ (39) ได้ทำการศึกษากฤทธิ์การต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในเมล็ดและส่วนเหนือดินของ *maytenus disticha* และ *Euonymus japonicus* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Celastraceae โดยพืชในวงศ์นี้มีการนำมาใช้ในการเกษตรแบบดั้งเดิม และใช้สำหรับรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคไขข้ออักเสบ และมะเร็ง เป็นต้น จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดของเมล็ด *M. disticha* พบสารทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ 1-4 และ 9 ส่วนในส่วนเหนือดินของ *M. disticha* พบสารสกัดทั้งหมด 1 ชนิด คือ สารประกอบ 5 และสารสกัดจากเมล็ด *E.japonicus* พบสารประกอบ 8 แสดงดังภาพ 37



ภาพ 37 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดของเมล็ด *M.disticha*

จากนั้นเมื่อนำสารประกอบแต่ละชนิดมาทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้กาแลนทามีนเป็นตัวควบคุมเชิงบวก(Positive control)ผลการทดลองแสดงดังตาราง 6 ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดจากเมล็ด *M. disticha* ตัวที่ 1 และ 4 มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.098 และ 0.097 mg/ml ตามลำดับ และสารประกอบที่ 9 มีฤทธิ์ที่น้อยที่สุด ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0381 mg/mL

ตาราง 8 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารประกอบที่แยกได้จากเมล็ด *M. disticha* และ *E. japonicus*

Compound	AChE		BuChE
	IC ₅₀ ± SE (mg/mL)	IC ₅₀ ± SE (mM)	IC ₅₀ ± SE (mg/mL)
1	0.098 ± 0.012	0.243 ± 0.030	
2	0.098 ± 0.013	0.738 ± 0.045	
3	0.341 ± 0.016	0.161 ± 0.006	
4	0.097 ± 0.006	0.312 ± 0.019	
5	0.070 ± 0.002	0.122 ± 0.003	>0.500
6	0.299 ± 0.015	(0.463 ± 2.0) × 10 ⁻⁵	
7	0.359 ± 0.006	(0.695 ± 1.16) × 10 ⁻⁵	
8	0.363 ± 0.009	(0.482 ± 1.19) × 10 ⁻⁵	
9	0.381 ± 0.007	0.122 ± 0.003	
Galantamine	0.001	0.1	

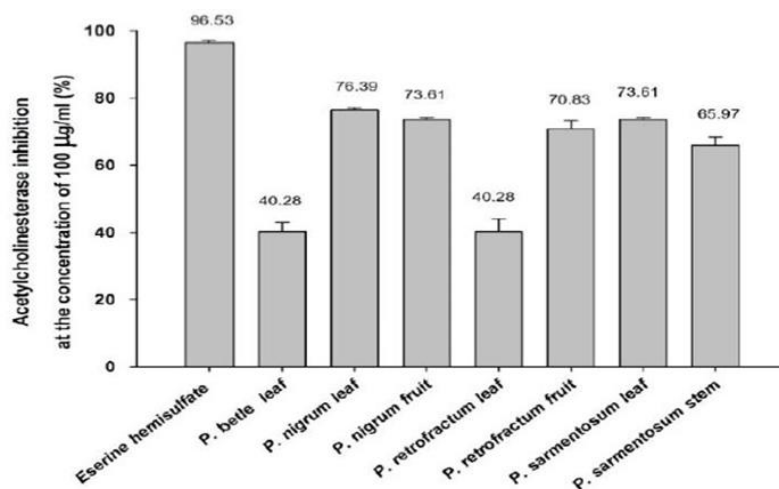
ในปี 2559 Werawattanachai และ Kaewamatawong (40) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากสารสกัดหยาบพืชวงศ์พริกไทย ได้แก่ พริกไทย (*P. nigrum*), ชะพลู (*P. sarmentosum*), ดีปลี (*P. retrofractum*) และพลู (*P. betle*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากการสกัดพืชวงศ์พริกไทยพบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนของสารสกัดดังตาราง 6

ตาราง 9 ร้อยละการกลับคืน (% yield) ของสารสกัดหยาบของพืชวงศ์พริกไทย

Plant name	Parts used	Weight of original sample (g)	Weight of the crude extract (g)	Extract yield (%)
<i>P.betle</i>	Leaf	268.15	48.41	18.05
<i>P.nigrum</i>	Leaf	108.75	15.74	14.48
	Fruit	518.68	8.99	1.73
<i>P.retrofractum</i>	Leaf	407.7	39.52	9.69
	Fruit	299.74	35.68	11.9
<i>P.samentosum</i>	Leaf	212.5	25.35	11.93
	Stem	112.23	4.71	4.2

จากตาราง 7 พบว่าสารสกัดจากใบพลูมีร้อยละการกลับคืนมากที่สุด และสารสกัดจากเมล็ดพริกไทยน้อยที่สุด คือ 18.05 และ 1.73 % ตามลำดับ

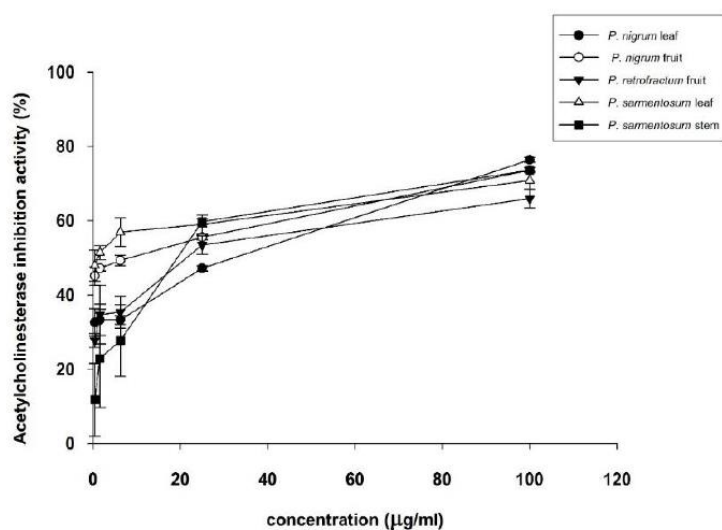
จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนของผลพริกไทย ลำต้นชะพลู ผลติบลิ ใบชะพลู และใบพริกไทย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี สามารถยับยั้งได้ 65.97-76.39%



ภาพ 38 เพอร์เซินต์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 100 µg/mL

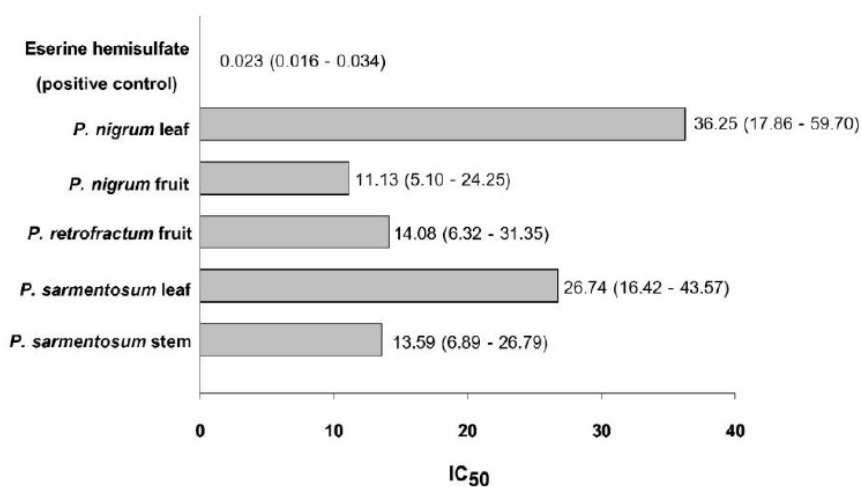
จากภาพ 38 พบว่าสารสกัดใบชะพลูมีฤทธิ์การยับยั้งดีที่สุดคือ 76.30% รองลงมาคือสารสกัดของผลพริกไทย ใบชะพลู ผลของดีปรี เปลือกลำต้นของชะพลู มีฤทธิ์การยับยั้ง 73.61, 70.83 และ 65.97% ตามลำดับ และสารสกัดที่มีฤทธิ์การยับยั้งน้อยที่สุดได้แก่สารสกัดจากใบพลูและใบดีปรี คือ 40.28% ซึ่งในการทดลองมี Eserine hemisulfate เป็นตัวควบคุมเชิงบวก มีการยับยั้งถึง 96.53% แสดงดังภาพ 30

จากการศึกษาพบว่า มีสารสกัด 5 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุดได้แก่ สารสกัดจากใบพริกไทย ผลพริกไทย ผลดีปรี ใบชะพลู และลำต้นชะพลู ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยการเตรียมสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.39, 1.56, 6.25, 25 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นแสดงดังภาพ 39



ภาพ 39 ความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์การยับยั้งสารเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.39, 1.56, 6.25, 25 และ 100 µg/mL

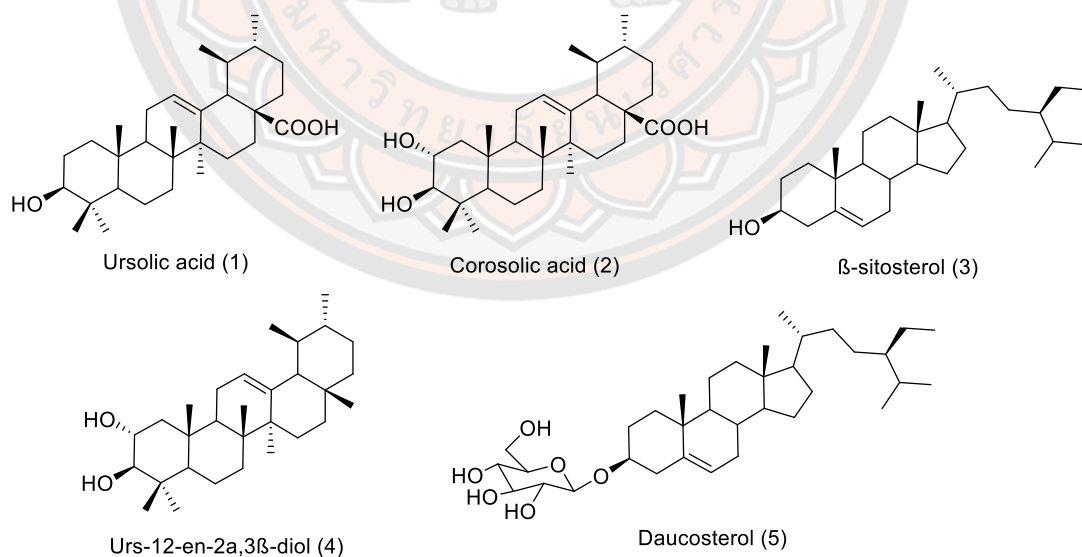
จากภาพ 39 พบว่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้งได้มากกว่า 60% ส่วนที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากผลพริกไทย ผลดีปลี ใบชะพลู และลำต้นชะพลู สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ 50-60% และ ที่ความเข้มข้น 0.39, 1.56 และ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดจากลำต้นชะพลู มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสน้อยที่สุด และ เมื่อทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดแต่ละชนิด พบว่าได้ผลการศึกษาดังภาพ 40



ภาพ 40 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ได้ 50 %

จากภาพ 40 พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ของ Escherine hemisulfate และสารสกัดจากผลพริกไทย เปลือกลำต้นชะพลู ผลดีป्ली ใบชะพลู และ ใบพริกไทย เท่ากับ 0.003, 11.13, 13.59, 14.08, 26.74, และ 36.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่า IC₅₀ สารสกัดที่มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดคือสารสกัดจากผลพริกไทย และสารสกัดที่มีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยที่สุดคือสารสกัดจากใบพริกไทย

ในปีพ.ศ. 2559 Bahadori และคณะ (41) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และศึกษาการสร้างแบบจำลองทางเคมีคอมพิวเตอร์ของการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจาก *Salvia syriaca* L. โดยใช้การจำลองโมเลกุล (molecular docking) โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเหนือดินของพืชชนิดนี้ ต่อมาในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารจากรากของ *Salvia syriaca* ด้วยอะซิโตน และแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี หลังจากแยกแล้วได้สารทั้งหมด 5 ชนิด คือ กรดยูโซลิก (ursolic acid)(1), กรดคอโรโซลิก (corosolic acid) (2), เบต้าซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) (3), urs-12-en-2 α ,3 β -diol (4) and เดาคอสเตอรอล (daucosterol) (5) แสดงดังภาพ 41 ซึ่งสารประกอบตัวที่ 2 4 และ 5 นั้นพบครั้งแรกในพืชชนิดนี้



ภาพ 41 โครงสร้างสารประกอบที่แยกได้ (1-5)

จากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารประกอบที่แยกได้ โดยใช้กาแลนทามีนเป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่า β -sitosterol (3) แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 58.1 ไมโครโมล ในขณะที่ urs-12-en-2 α ,3 β -diol (4) แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสน้อยต่ำที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 142.4 ไมโครโมล แสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบ และ สารสกัดที่แยกจากรากของ *S. syriaca*.

	IC_{50} (μ g/mL)	IC_{50} (μ M)
Acetone extract	499.5 \pm 6.8	–
Ursolic acid (1)	46.3 \pm 1.2	101.4 \pm 2.6
Corosolic acid (2)	55.2 \pm 1.6	116.7 \pm 3.3
β -sitosterol (3)	24.1 \pm 0.7	58.1 \pm 1.6
urs-12-en-2 α ,3 β -diol (4)	63.0 \pm 1.3	142.4 \pm 2.9
Daucosterol (5)	34.3 \pm 0.3	59.6 \pm 0.5
Galantamine ^b	8.7 \pm 0.2	30.2 \pm 0.7

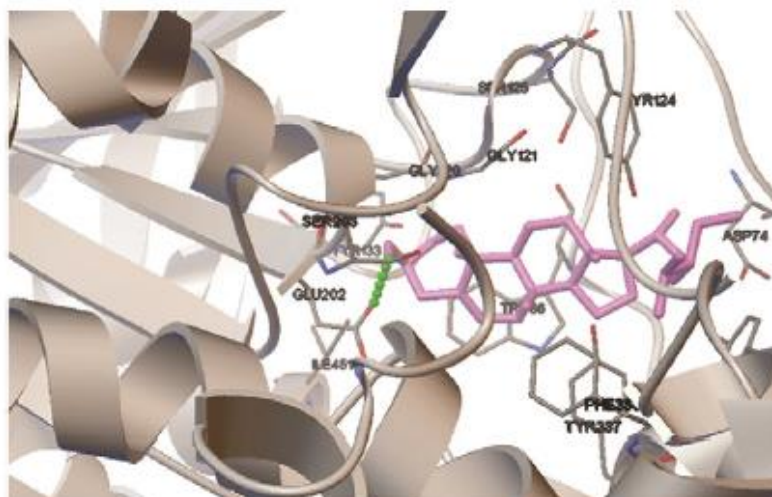
a Values are the mean \pm SEM of three experiments (p b 0.05).

b Standard drug.

ตาราง 11 ผลการ docking ระยะห่าง H-bond ที่วัดจากความสัมพันธ์ของอะตอม

Compound	Estimated $\Delta G_{\text{Binding}}$ (kcal/mol)	Hydrogen bonding			
		Interacted ligand Functional group	Interacted amino acid	Distance ($^{\circ}\text{A}$)	Interacted residues
Ursolic acid	+18.98	-	-	-	SER203, HIS447, GLU202, GLY448, TRP86, TYR337, PHE338, PHE295, TYR341, TYR124, TRP286, PHE297, GLY121, GLY122
Corosolic acid	+21.04	-	-	-	PHE295, PHE338, TYR337, HIS447, GLY448, GLU202, TRP86, GLY121, GLY122, TYR124, SER203, PHE297
β -sitosterol-	-11.31	- OH	GLU202	1.832	TYR133, TRP86, GLU202, ASP74, TYR124, TYR341, PHE338, TYR337, SER203, GLY121, GLY120, SER125
urs-12-en- $2\alpha,3\beta$ -diol	+14.96	-	-	-	PHE295, PHE338, TYR341, TYR337, HIS447, GLU202, GLY448, TRP86, GLY120, GLY121, GLY122, TYR124, TRP286, PHE297, TYR341
Daucosterol	-5.22	-O-	TYR341	2.999	ILE451, GLY448, HIS447, TRP86, SER125, ASP74, TYR124, TRP286, TYR341, VAL294, PHE336, TYR337, SER203, GLY121, GLY120
Galantamine	-9.30	-O- -OH	TYR124 TYR337	2.599 2.645	SER203, HIS447, TYR337, GLU202, GLY120, TRP86, TYR124, PHE297, GLY121

จากการศึกษาการสร้างแบบจำลองทางเคมีคอมพิวเตอร์ ในการจับของสารทั้ง 5 ชนิด กับ เอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเทอเรส โดยเทียบกับกาแลนทามินที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่าสารตัวที่ β -sitosterol (3) และ daucosterol (5) มีค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ในการจับกับเอนไซม์ที่สอดคล้องกับกาแลนทามิน ตัวที่ 3 และ 5 มีค่าพลังงานอิสระเท่ากับ -11.31 และ -5.22 kcal / mol ตามลำดับ ในขณะที่กาแลนทามินมีค่าพลังงานอิสระเท่ากับ -9.3 kcal / mol นอกจากนี้ยังพบว่า สารตัวที่ 3 และ 5 ยังมีตำแหน่งการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเอนไซม์ที่สอดคล้องกับกาแลนทามินอีกด้วย แสดงดัง ตาราง 11 และภาพ 42



ภาพ 42 พันธะไฮโดรเจน ระหว่าง หมู่ไฮดรอกซีของ β -sitosterol และ Glu202

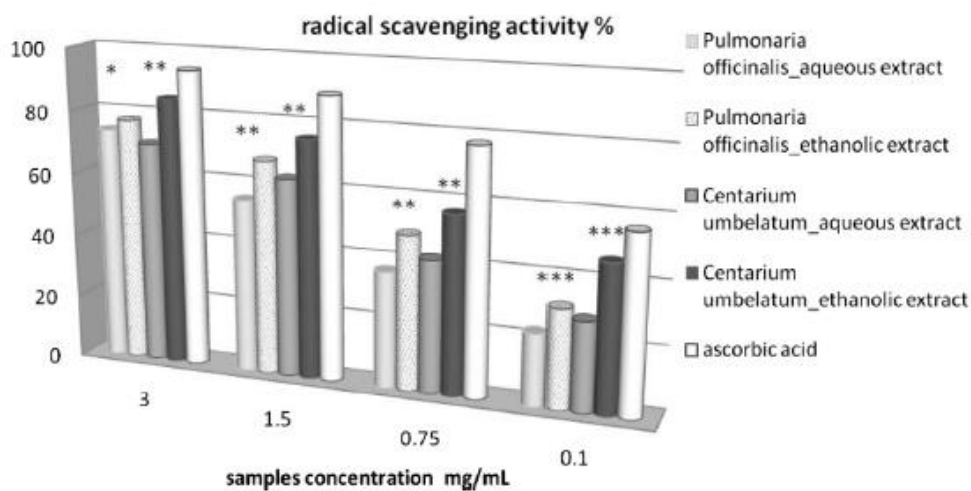
ในปี 2560 Neagu และคณะ (42) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเทอเรส และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบในเอทานอลและน้ำจาก *Pulmonaria officinalis* (*P.officinalis*) และ *Centarium umbellatum* (*C.umbellatum*) ซึ่ง *P.officinalis* (lungwort) ใช้รักษาโรคหลอดลมอักเสบ โรคกล่องเสียงอักเสบ ไต และโรคทางเดินหายใจรวมทั้งในแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น และ *C.umbellatum* (centaury) ใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาอาการไข้ เบาหวาน ตับอักเสบ ตับอักเสบและโรคเกาต์ นอกจากนี้ยังใช้บรรเทาอาการบีบเกร็งท้องระงับประสาท และขับปัสสาวะ พืชสมุนไพรสองชนิดนี้ เป็นครั้งแรกที่ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเทอเรส และไทโรซิเนส

จากการศึกษาหาปริมาณโพลีฟีนอล โปรแอนโธไซยานิดินส์ และฟลาโวนทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่าปริมาณโพลีฟีนอล โปรแอนโธไซยานิดินส์ และฟลาโวนทั้งหมดในสารสกัดหยาบเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบน้ำตัวทำของพืชทั้งสองชนิด และนอกจากนี้พบว่าในสารสกัดหยาบเอทานอลของ *C.umbellatum* มีปริมาณของสารฟีนอลิก โปรแอนโธไซยานิดินส์ และฟลาโวนทั้งหมดสูงกว่าในสารสกัดเอทานอลของ *P.officinalis* แสดงดังตาราง 12

ตาราง 12 ปริมาณสารประกอบ (โพลีฟีนอล ฟลาโวน โปรแอนโธไซยานิดินส์) จากสารสกัดที่ผ่านการทดสอบ

Sample	Polyphenols (lg GAE/ mL)	Proanthocyanidins (lg CE/mL)	Flavones (lg RE/mL)	
Pulmonaria officinalis (lungwort)	Aqueous extract (10% mass)	486.60± 2.12	41.83±3.25	104.28±3.25
	70% ethanolic extract (10% mass)	576.62± 6.32	61.5±6.23	272.81±9.21
Centarium umbellatum (common centaury)	Aqueous extract (10% mass)	560.11± 8.59	43±5.23	160.75±5.12
	70% ethanolic extract (10% mass)	656.61± 7.56	63.33±2.63	496.28±8.91

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของพืชแต่ละชนิดโดยวิธีดีพีพีเอชพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลของ *C.umbellatum* มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงที่สุด 84.9% ที่ความเข้มข้น 3 mg/mL ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนที่สูงที่สุด (496.28 ug RE/mL) สารสกัดในตัวทำละลายเอทานอลมีผลทำให้การฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง แสดงดังภาพ 43



ภาพ 43 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระตีพีพีเอชของสารสกัด *C.umbellatum* และ *P.officinalis* ในตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล

จากการศึกษาหาชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของพืชแต่ละชนิดโดยใช้เทคนิค HPLC-MS ภายใต้สภาวะโครมาโตกราฟีที่เหมาะสม ผลการศึกษาหาชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด แสดงดังตารางแสดงดังตาราง 13

จากตาราง 13 จะเห็นว่า *P. officinalis* ในตัวทำละลายเอทานอล มีความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกสูง (124.59 µg/mL), ไฮโปโรไซด์ (Hyperoside) และรูติน (Rutin) และ *P. officinalis* ในตัวทำละลายน้ำประกอบด้วยกรดคาเฟอิก (12.94 µg/mL) สารสกัด *C. umbellatum* ในตัวทำละลายน้ำมีกรดไซรอนจิก (syringic) ปริมาณสูง (45.96 µg/mL) และกรดคาเฟอิก (caffeic) ในขณะที่ปริมาณกรดคลอโรจินิก และโรสมานินเท่าๆกันในสารสกัดทั้งสอง นอกจากนี้รูตินและไฮเปอร์ออกไซด์ยังมีปริมาณในสารสกัด *C. umbellatum* ในตัวทำละลายเอทานอล

ตาราง 13 แสดง HPLC–MS values ของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจาก *C.umbellatum* และ *P.officinalis* ในตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล

Compound [M/z] name	<i>Pulmonaria officinalis</i> L.		<i>Centarium umbellatum</i>	
	water (µg/mL)	70%ethanol (µg/mL)	water (µg/mL)	70%ethanol (µg/mL)
Quercetin 301	-	+	0.35	-
Rutin 609	0.20	8.76	11.08	14.09
Kaempferol 285	+	+	+	+
Isorhamnetin 315	-	+	+	+
Naringin 579	-	-	+	-
Hyperoside 463	0.54	3.97	0.66	2.26
Gallic acid 169	0.97	-	1.07	-
Syringic acid 197	-	-	45.96	16.11
p-Coumaric acid 163	0.46	-	0.95	-
Caffeic acid 179	12.94	3.36	8.03	+
Ferulic acid 193	+	-	0.31	-
Rosmarinic acid 359	41.94	124.59	2.99	2.71
Chlorogenic acid 353	3.53	3.03	11.99	12.53
Luteolin 285	-	+	+	+
Apigenin 269	-	+	+	+

-under the limit of detection; + under the limit of quantification.

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบเอทานอล และน้ำของพืชแต่ละชนิดโดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3, 1.5 และ 0.75 mg/mL โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ตัวคือ กรดโกลจิิก, กรดคาเฟอิก, กรดโรสมารินิก, กรดคลอโรจินิก และรูทีน พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลที่ความเข้มข้น 3 mg/mL มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของ *C.umbellatum* มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดคือ 94.24% และ 92.28% ในขณะที่สารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของ *P.officinalis* ฤทธิ์การยับยั้ง 87.72% และ 72.24% นอกจากนี้จะเห็นว่ากาแลนทามินตัวควบคุมเชิงบวกที่ใช้เป็นยาในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 0.75 mg/mL มีฤทธิ์การยับยั้งได้ถึง 99.98% แสดงดังตาราง 14

ตาราง 14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด

Sample		AChE inhibition %		
		3 mg/mL	1.5 mg/mL	0.75 mg/mL
Pulmonaria officinalis	Aqueous extract (10% mass)	72.24±7.12*	62.12± 6.23*	43.61± 2.57*
	70% ethanolic extract (10% mass)	87.72±2.35*	69.21± 3.56*	50.70± 6.54*
Centarium umbellatum	Aqueous extract (10% mass)	92.28±7.24*	70.21± 6.28*	58.85± 6.89*
	70% ethanolic extract (10% mass)	94.24±6.35*	72.36± 6.25*	64.27± 5.59*
Galanthamine		–	–	99.98± 2.02
Caffeic acid		–	62.67± 7.32	42.19± 6.57
Rosmarinic acid		–	52.89± 6.93	30.64± 5.46
Rutin		–	59.46± 3.65	31.23± 2.57
Chlorogenic acid		–	75.34± 2.39	54.11± 5.24

Data represent the mean±SD of triplicate samples of three independent experiments.

* $p < 0.05$, compared the activity of the ethanolic extracts with that of the aqueous extracts.

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดเอทานอลและน้ำของพืชแต่ละชนิดโดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3, 1.5 และ 0.75 mg/mL โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ตัวคือ กรดโกลจิิก, กรดอัลลาจิก, เคอร์ซีติน, กรดคลอโรจีนิก และรูทีน พบว่าสารสกัดหยาดที่ความเข้มข้น 3 mg/mL มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดหยาดเอทานอลและน้ำของ *C.umbellatum* และ *P.officinalis* มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดคือ 74.39% และ 71.69% ตามลำดับ และในส่วนของสารสกัดหยาดเอทานอลจาก *C.umbellatum* และ *P.officinalis* มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดคือ 69.05% และ 59.96%ตามลำดับ และนอกจากนี้สารมาตรฐานกรดโกลจิิกก็มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.75, 1.5 และ 3 mg/mL สามารถยับยั้งได้ 89.7, 94.2 และ 98.7% ตามลำดับ แสดงดังตาราง 15

ตาราง 15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด

Sample		Tyrosinase inhibition %		
		3 mg/mL	1.5 mg/mL	0.75 mg/mL
Pulmonaria officinalis	Aqueous extract (10% mass)	56.96±5.21*	43.62±6.23*	30.56± 6.56*
	70% ethanolic extract (10% mass)	71.69±8.23*	59.36±3.56*	* 46.52± 3.23*
Centarium umbellatum	Aqueous extract (10% mass)	69.05±6.63*	46.21±6.28*	38.76± 5.67*
	70% ethanolic extract (10% mass)	74.39±7.89*	65.36±3.64*	54.36± 4.36*
Kojic acid		98.7 ±4.23	94.2±2.87	89.7± 5.24
Ellagic acid		–	45.77±1.71	25.42± 1.52
Quercetin		–	62.60±3.65	33.45± 2.59
Chlorogenic acid		–	58.09±2.31	41.45± 2.83
Rutin		–	47.23±6.54	32.30± 1.37

Data represent the mean±SD of triplicate samples of three independent experiments.

* p< 0.05, compared the activity of the ethanolic extracts with that of the aqueous extracts.

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

1.1 เครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (liquid chromatography mass spectrometry mass spectrometry, LC/MS/MS) ของบริษัท Agilent Technologies รุ่น 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

1.2 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ของบริษัท Buchi Rotarator รุ่น R-114

1.3 เครื่องทำแห้งเยือกแข็งระบบสุญญากาศ (freeze drying)

1.4 เครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท (microplate reader) ของบริษัท Synergy H1 Hybrid Reader

1.5 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ของบริษัท Sigma รุ่น 203

1.7 ไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plate)

1.8 เครื่องวัด pH ของบริษัท Mettler toledo รุ่น SG2

1.9 เครื่องเขย่าไมโครเพลท 96 หลุม (Mixmate) ของบริษัท Eppendorf

1.10 เครื่องเป่าสารละลาย (Sample concentrator) ของบริษัท TECHNE รุ่น DB100/3

2. สารเคมี

2.1 เมทานอล (Methanol: CH₃OH) HPLC grade ของบริษัท ACI Labscan

- 2.2 เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate: $C_4H_8O_2$) AR. grade ของบริษัท ACI Labscan
- 2.3 เฮกเซน (Hexane: C_6H_{14}) AR grade ของบริษัท ACI Labscan
- 2.4 ทริส ไฮดรอกซีเมทิล อะมิโนมีเทน (tris (hydroxymethyl) aminomethane) ของบริษัท Carlo Erba
- 2.5 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl) AR. grade ของบริษัท Labscan
- 2.6 อะซีทิลโคลีน ไอโอไดด์ (Acetylcholine iodide, ACTI) ของบริษัท Sigma-aldrich
- 2.7 เอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้า (Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* : AchE) ของบริษัท Sigma-aldrich
- 2.8 Ellman's reagent (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid): DTNB) ของบริษัท Sigma-aldrich
- 2.9 เซรั่มอัลบูมิน (bovine serum Albumin: BSA) ของบริษัท Sigma-aldrich
- 2.10 กาแลนทามีน (Galantamine hydrobromide) ของบริษัท Sigma-aldrich
- 2.11 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH): $C_{18}H_{12}N_5O_6$) ของบริษัท Sigma-aldrich

การดำเนินการวิจัย

1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างส่วนเหนือดินของบอนเต่าจาก อ.ทองแสนขัน จ.อุตรดิตถ์ เก็บในนช่วงฤดูฝน ล้างทำความสะอาด นำมาตากให้แห้ง จากนั้นนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze Dryer) แล้วไปปั่นให้ละเอียดเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

1.1 การสกัดผงผักตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

ชั่งผงบอนเต่า 100 กรัม ลงในหลอดเซนตริฟิวพลาสติก (Plastic centrifuge tubes) นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันแบบ partion โดยเริ่มจากเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะ-

ซีเตท (Ethyl acetate : $C_4H_8O_2$) และเมทานอล (Methanol : CH_3OH) ตามลำดับ โดยเติมเฮกเซน 500 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกสารละลายในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์เก็บไว้ และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายทั้ง 3 ครั้งรวมกัน จากนั้นทำการสกัดส่วนที่ตกที่เหลือนจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) และทำการกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในสารสกัดหยาบด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze Dryer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่ง และบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การแยกสารสกัดแบบหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1.2.1 นำซิลิกาเจลใส่ในตัวทำละลายเฮกเซน รอให้ซิลิกาเจลอิมมัวด้วยเฮกเซน

1.2.2 เทซิลิกาเจลที่อิมมัวด้วยเฮกเซนแล้วลงคอลัมน์ซ้ำๆ ใจในความสูงของซิลิกาเจลในคอลัมน์มีปริมาณเหมาะสม

1.2.3 จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากเมทานอลมาละลายด้วยเฮกเซนต่อเมทานอล (1:1) จากนั้น ค่อยๆ โหลลงในคอลัมน์

1.2.4 ชะสารด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากนั้นเก็บแฟร็กชันของแต่ละตัวทำละลาย

1.2.5 นำแต่ละส่วนที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) และทำการกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในสารสกัดหยาบด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze Dryer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักของสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

1.3 ศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค At-line LCMS/MS

เตรียมสารสกัดบอนเต่าละลายในเมทานอล (ความเข้มข้น 20000 ppm) จากนั้นนำมาแยกด้วยเทคนิค At-line LCMSMS สภาวะดังตาราง 16 เทคนิคนี้เป็นการแยกพร้อมกับการเก็บแฟรกชัน ซึ่งจะเก็บลงในภาชนะไมโครเพลท 96 หลุม จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย Vacuum Concentrator ที่ 60°C เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 16 แสดงสภาวะในการแยก At-line LCMSMS ของสารสกัดบอนเต่า

HPLC	Agilent 1260 Series HPLC			
Reversed column	VertiSep UPS C18 HPLC COLUMN, 4.6 x 250 mm, 5 μ m			
Detector	QTOF-MS			
Mobile phase	Acetonitrile: formate buffer (3:97: 1, v/v)			
Flow rate	0.9 mL/min			
Column temperature	25 °C			
Injection volume	20 μ l			
Mobile phase	Time	%A (H ₂ O)	%B (formate buffer)	%C (Acetonitrile)
	0	0	95	5
	20	0	5	95
	33	0	5	95
	35	0	95	5
	40	0	95	5

1.4 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) โดยวิธีเอลแมนของสารสกัดหยาบบอนเต่า

1. วิธีการเตรียมสาร

1.1. สารละลายนำอะซิติลโคลีน ไอโอไดด์ : นำอะซิติลโคลีน ไอโอไดด์ 0.004 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 1.5 mM) จากนั้นเก็บไว้ในที่เย็น

1.2. สารละลายบัฟเฟอร์: ชั่ง tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1514 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น pH 8 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก

1.3. สารละลายดีทีเอนบี (DTNB) : นำดีทีเอนบี 0.0119 กรัม ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 3 mM) จากนั้นปิดฝอยล์ เก็บไว้ในที่มีด (สารละลายดีทีเอนบีต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

1.4. สารละลาย 0.1 % เซรั่มอาบูมิน (0.1% BSA) : นำเซรั่มอาบูมิน 0.0100 กรัม ละลายในทริสบัฟเฟอร์ pH 8 10 มิลลิลิตร

1.5. สารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) : เตรียมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสความเข้มข้นเป็น 1/2000 ยูนิต/มิลลิลิตร จากเอนไซม์ความเข้มข้น 137 ยูนิต/มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ เก็บไว้ในตู้ -40 องศาเซลเซียส (สกรีนความเข้มข้นของเอนไซม์ก่อนทำการทดสอบทุกครั้งโดยการใช้บัฟเฟอร์แทนสารละลายตัวอย่าง)

1.6. สารละลายกาแลนทามีน : นำกาแลนทามีน 1.000 กรัม ละลายในทริสบัฟเฟอร์ pH 8 ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ เป็น 5 มิลลิลิตร (สารละลายเข้มข้น 200 ppm)

1.7. สารละลายของสารสกัดหยาบบอนเต่า : นำสารสกัดหยาบบอนเต่า 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (สารละลายเข้มข้น 10000 ppm)

2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) โดยวิธีเอลแมน ในระดับหลอดทดลอง

การทดสอบจะทำการผสมสารละลายตามตาราง 17 ลงในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทุกๆ 5 วินาที ใช้เวลาใน

การวัดทั้งหมด 2 นาที (ก่อนทำการวัดทุกครั้งจะต้องสกรีนความเข้มข้นของเอนไซม์ให้อยู่ในช่วง 90-120% ก่อนโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายตัวอย่างแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร)

ตาราง 17 ปริมาณสารละลายต่างๆในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.5 mM ACTI	25
3 mM DTNB	125
สารละลาย Tris buffer	50
สารตัวอย่าง	25
AChE	25

*ควรวัดการดูดกลืนแสงภายใน 15 นาที หลังจากเติมเอนไซม์

คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดย มีวิธีการคำนวณแสดงดังสมการ 8

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{ค่าเฉลี่ย velocity ของblank} - \text{ค่าเฉลี่ย velocity ของสาร}}{\text{ค่าเฉลี่ย velocity ของblank}} \times 100 \quad (8)$$

**ค่าเฉลี่ย velocity คือ ค่าอัตราความเร็วเฉลี่ย

**blank คือ ตัวทำละลายที่ปราศจากสารตัวอย่าง

3 การทดสอบฤทธิ์ในการการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ร่วมกับเทคนิค at line LCMS/MS

การทดสอบจะทำการผสมสารละลายตามตาราง 18 ลงในภาชนะไมโครเพลท 96 หลุม ที่มีสารสกัดบองเต่าที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค At line LCMS/MS และทำให้แห้งแล้ว จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทุกๆ 5 วินาที ใช้เวลาในการวัดทั้งหมด 2 นาที (ก่อนทำการวัดทุกครั้งจะต้องสกรีนความเข้มข้นของเอนไซม์ให้อยู่ในช่วง 90-120% ก่อนโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายตัวอย่างแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร)

ตาราง 18 ปริมาณสารละลายต่างๆ ในการทดสอบฤทธิ์ในการการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสร่วมกับเทคนิค at line LCMS/MS

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.5 mM ACTI	25
3 mM DTNB	125
สารละลายบัฟเฟอร์	75
AChE	25

*ควรวัดการดูดกลืนแสงภายใน 15 นาที หลังจากเติมเอนไซม์

คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดย มีวิธีการคำนวณแสดงดังสมการ 8

1.5 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบบอนเต่าโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging: DPPH) [13]

1. วิธีการเตรียม

1.1 สารละลายของสารสกัดบอนเต่า: นำสารสกัดบอนเต่า 0.010 กรัม ละลายด้วยเมทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 มิลลิลิตร (สารละลายเข้มข้น 1000 ppm)

1.2 สารละลายดีพีพีเอช: นำดีพีพีเอช 0.0059 กรัม มาละลายด้วยเมทานอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายลงในหลอดทดลอง แล้วใช้กระดาษฟอยล์หุ้มหลอดทดลองไว้ เนื่องจากดีพีพีเอชเป็นอนุมูลอิสระ ดังนั้นแสงอาจทำให้ดีพีพีเอชเกิดการสลายตัวได้ (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 0.3 mM)

1.3 สารละลายดีพีพีเอช: นำดีพีพีเอช 0.0019 กรัม มาละลายด้วยเมทานอล จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายลงในหลอดทดลอง แล้วใช้กระดาษฟอยล์หุ้มหลอดทดลองไว้ (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 0.1 mM)

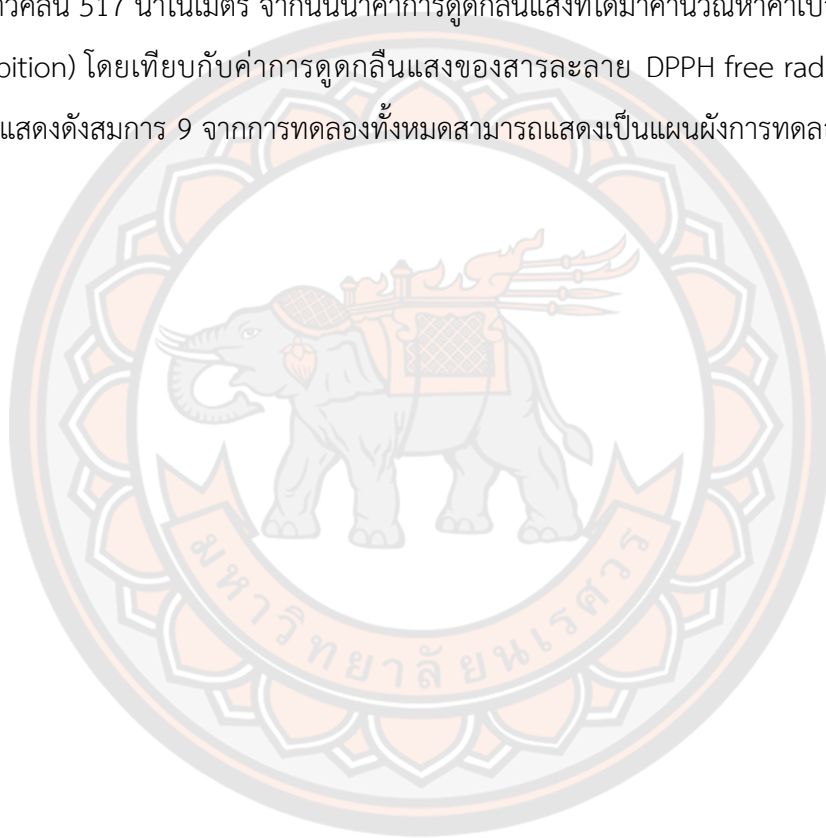
2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบบอนเต่าโดยวิธีดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในระดับหลอดทดลอง

การทดสอบจะทำการผสมสารละลายของสารสกัดหยาบบอนเต่าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตาราง 3.1 ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 0.3 mM ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลาย blank โดยการทดลองจะทำทั้งหมด 5 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH free radical โดยมีวิธีการคำนวณแสดงดังสมการ 9

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสาร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH}} \times 100 \quad (9)$$

3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบผงผักตัวอย่างโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง ร่วมกับเทคนิค At-line LC-MS/MS

การทดสอบจะทำการเติมเมทานอล 50 ไมโครลิตร ลงในกรดไมโครเพลท 96 หลุม ที่มีสารสกัดบอนเต่าที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค At-line LC-MS/MS และทำให้แห้งแล้วเพื่อละลายสารสกัด จากนั้นเติมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH free radical โดยมีวิธีการคำนวณแสดงดังสมการ 9 จากการทดลองทั้งหมดสามารถแสดงเป็นแผนผังการทดลองดังภาพ 44





ภาพ 44 แผนผังการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แบ่งผลการทดลองออกเป็นดังนี้

1 การเตรียมสารสกัดหยาบของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่าในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

2 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors; AChEI) และฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay; DPPH assay) จากสารสกัดหยาบ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่า

3 การแยกองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของสารสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแต่ละส่วนที่แยกได้

4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อศึกษาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีในส่วนแสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยจะศึกษาโครงสร้างควบคู่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบทางเคมีที่พบด้วยเทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

5 การแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การเตรียมสารสกัดหยาบของส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่าในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

การสกัดผงบอนเต่าที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze-drying) ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล สกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเทคนิคระเหยแห้งแบบสุญญากาศ และทำการกำจัดตัวทำละลายและนำที่เหลืออยู่ในสารสกัดหยาบด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze-drying) จากนั้นคำนวณหาผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ (% Yield) ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังสมการ 10 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.8557-6.6341% แสดงดังตาราง 19

$$\% \text{ Yield} = \left(\frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักของผงผักตัวอย่าง}} \right) \times 100\% \quad (10)$$

ตาราง 19 น้ำหนักและผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบบอนเต่า

น้ำหนักผงบอนเต่า (g)	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	Yield (%)
100.40	เฮกเซน	1.863	1.856
	เอทิลอะซิเตท	1.809	1.802
	เมทานอล	6.661	6.634

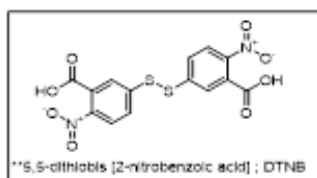
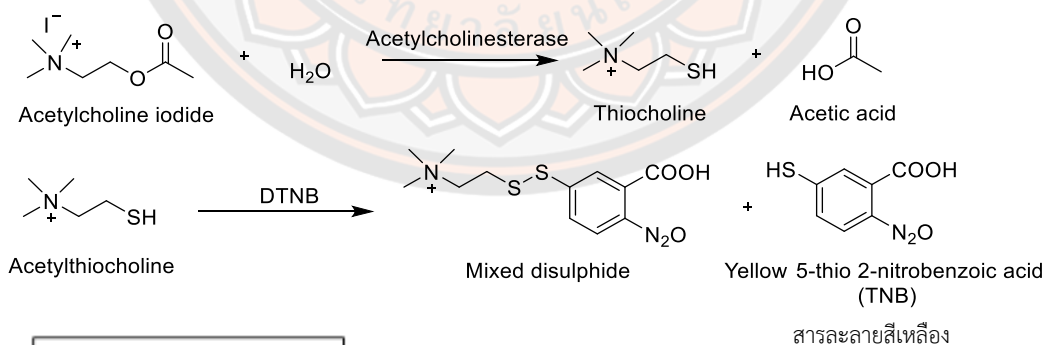
จากตาราง 19 พบว่าผลของการสกัดผงบอนเต่าโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วที่ต่างกัน คือเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล มีปริมาณผลผลิตร้อยละมากที่สุดคือ 6.634 รองลงมา คือเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท คือ 1.856 และ 1.802 ตามลำดับ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืชบอนเต่าส่วนใหญ่เป็นสารที่มีความเป็นขั้วค่อนข้างสูงจึงทำให้ปริมาณของสารสกัดหยาบของเมทานอลมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการสกัด

นั้นขึ้นอยู่กับเวลาในการสกัด ปริมาณของตัวทำละลาย และปริมาณของความสามารถในการละลายของสารที่สกัดที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายนั้นๆ

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมนของสารสกัดหยาบบอนเต่าแต่ละชนิด

1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมนของสารสกัดหยาบบอนเต่า

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบบอนเต่าจะอาศัยหลักการติดตามปฏิกิริยาและอ่านผลด้วยวิธีการทางสเปกโตรเมตรี โดยวิธีแอลแมน โดยวิธีนี้จะใช้อะซิติลโคลีน ไอโอไดด์เป็นสารตั้งต้น ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยมีเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไธโอโคลีนออกมาเมื่อทำปฏิกิริยากับดีทีเอ็นบี (5,5-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]) ได้สารละลายสีเหลืองของทีเอ็นบี ดังภาพ 45 ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 nm ซึ่งถ้าสารสกัดหยาบบอนเต่ามีสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะทำให้เกิดสารไธโอโคลีนน้อยลง เมื่อทำปฏิกิริยากับดีทีเอ็นบีจึงมีผลทำให้การเกิดสารละลายสีเหลืองของทีเอ็นบีจางลง



ภาพ 45 แสดงปฏิกิริยาการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธีของแอลแมน

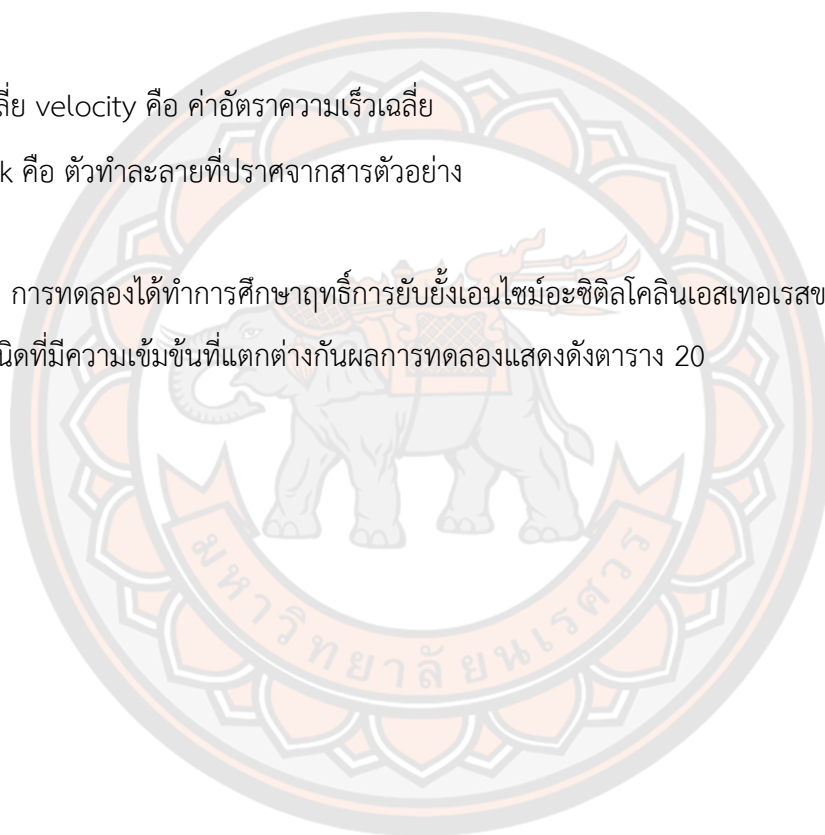
จากภาพ 45 สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายได้ที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยการทดลองนี้ได้ใช้ กาแลนทามีน (galantamine) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากนั้นนำผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังสมการ 11 ได้ผลการทดลองแสดงดังตาราง 20

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{ค่าเฉลี่ย velocity ของ blank} - \text{ค่าเฉลี่ย velocity ของสาร}}{\text{ค่าเฉลี่ย velocity ของ blank}} \times 100 \quad (11)$$

**ค่าเฉลี่ย velocity คือ ค่าอัตราความเร็วเฉลี่ย

**blank คือ ตัวทำละลายที่ปราศจากสารตัวอย่าง

การทดลองได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันผลการทดลองแสดงดังตาราง 20



ตาราง 20 ค่าเฉลี่ย velocity และ %การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด
 หยาบจากผงบอนเต่าในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล

สารสกัดหยาบบอนเต่า	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ย velocity				% การยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย±SD	
เฮกเซน	100	98.879	98.718	101.364	99.654±1.48	0.00
	1000	128.864	128.811	127.421	128.770±0.119	N/A
เอทิลอะซิเตท	100	105.271	104.954	103.229	104.485±1.10	3.37
	1000	73.361	73.361	72.593	73.105±0.443	24.42
เมทานอล	100	95.364	95.957	95.957	95.524±0.34	14.65
	1000	66.85	66.582	65.432	66.288±0.753	34.36
กาแลนทามีน (ตัวควบคุมเชิงบวก)	100	1.482	1.464	1.736	1.560±0.660	98.79

หมายเหตุ : N/A คือ not applicable

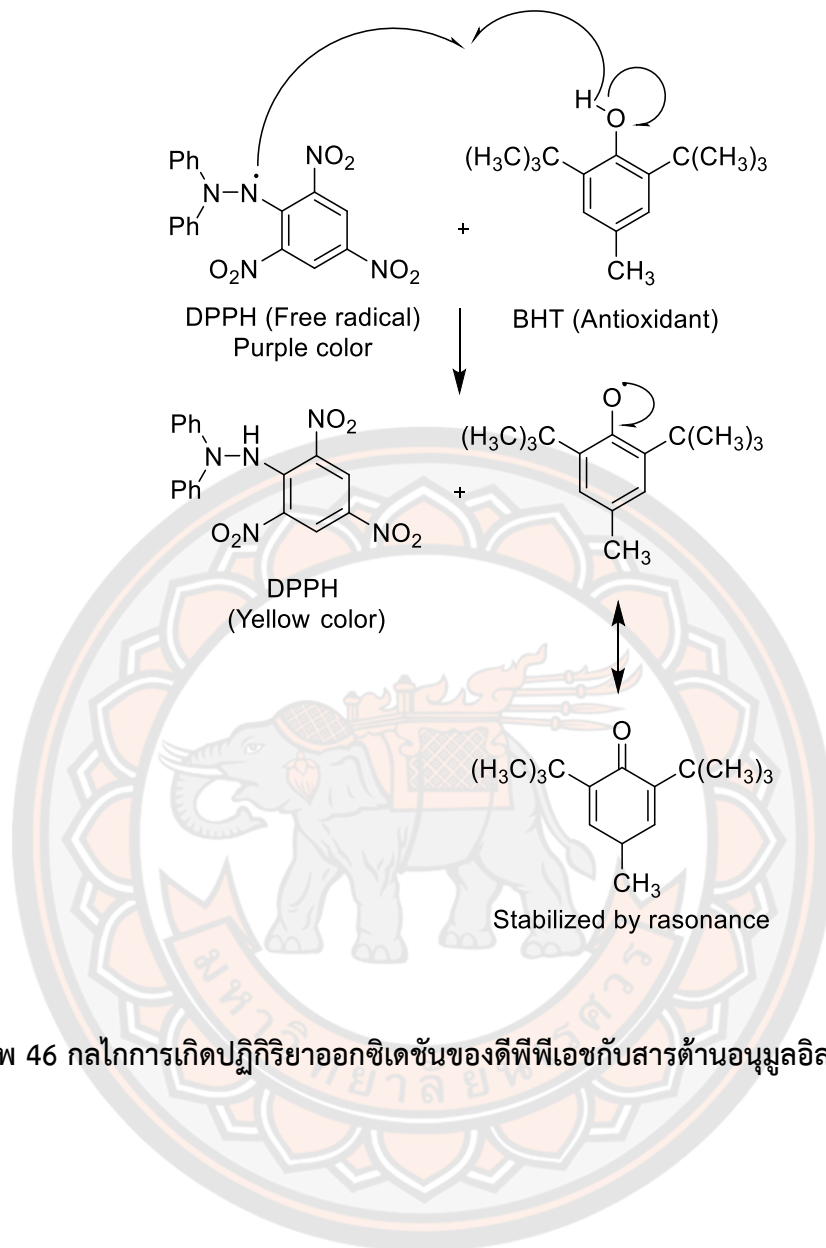
จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันพบว่าสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นที่ 1000 ppm มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีที่สุดคิดเป็น 34.36 % ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์การยับยั้งคิดเป็น 24.42% และสารสกัดเฮกเซนไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้ง ดังแสดงในตาราง 20ซึ่งกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ส่วนใหญ่มีความเป็นขี้คว่อนข้างสูงจึงทำให้สารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่สูงที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดหยาบเมทานอลมีสีเขียวเข้มซึ่งมีผลต่อการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอาจมีผลรบกวนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายได้ทำให้ผลการศึกษาอาจคลาดเคลื่อน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงสนใจที่จะ

ทำการศึกษากการแยกสารสกัดหยาบเมทานอลแบบหยาดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) ต่อไปเพื่อลดความเข้มข้นของสีของสารสกัดหยาบ

2 การศึกษาอนุโมลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุโมลอิสระดีพีพีเอช

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช ฟรีเรดิคัล สแคเวนจิง โดยใช้รีเอเจนท์ ดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ นำมาละลายในตัวทำละลาย เมทานอลให้เป็นสารละลายสีม่วง เมื่อมีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในสารละลายดีพีพีเอช สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนฟรีเรดิคัล กับดีพีพีเอชฟรีเรดิคัล จึงมีผลทำให้เกิดเป็นโมเลกุลดีพีพีเอชที่เสถียร ซึ่งทำให้เกิดสารละลายสีม่วงที่จางลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังภาพ 46 จากนั้นนำผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีพีพีเอชฟรีเรดิคัล ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังสมการ 12 ได้ผลการทดลองแสดงดังตาราง 21

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของดีพีพีเอชฟรีเรดิคัล}} \times 100 \quad (12)$$



ภาพ 46 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีพีพีเอชกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิด BHT

จากการทดลองได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันผลการทดลองแสดงดังตาราง 21

ตาราง 21 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย

สารสกัดหยาบบอนเต่า	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			เฉลี่ย±SD	% การยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
เฮกเซน	100	0.551	0.555	0.556	0.554±0.002	8.83
	1000	0.473	0.477	0.470	0.473±0.003	22.11
เอทิลอะซิเตท	100	0.404	0.402	0.401	0.402±0.001	20.38
	1000	0.287	0.285	0.288	0.287±0.806	52.38
เมทานอล	100	0.342	0.345	0.349	0.345±1.036	42.64
	1000	0.098	0.097	0.098	0.098±0.000	80.67

จากตาราง 21 พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันพบว่าสารสกัดหยาบแต่ละชนิดที่มีความที่ 1000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีที่สุด โดยสารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีพีไอเอชได้ดีที่สุดคิดเป็น 80.67% ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์การต้าน คิดเป็น 52.38% และสารสกัดเฮกเซนแสดงฤทธิ์การต้านต่ำที่สุดคิดเป็น 22.11% ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีความเป็นขั้วค่อนข้างสูงจึงทำให้สารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งที่สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารสกัดหยาบเมทานอลมีสีเขียวย้ำซึ่งมีผลต่อการศึกษากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลาย ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงสนใจที่จะทำการศึกษา

การแยกสารสกัดหยาบเมทานอลแบบหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) ต่อไป เพื่อลดความเข้มข้นของสีของสารสกัดหยาบต่อไป

การแยกอย่างหยาบของสารสกัดหยาบเมทานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟี

การทดลองทำได้โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลละลายในตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วแตกต่างกันคือเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากนั้นเก็บส่วนของแต่ละเฟสเคลื่อนที่และนำแต่ละส่วนที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลาย และทำให้แห้ง บันทึกน้ำหนัก แสดงดังตาราง 22 จากนั้นเก็บไว้ในอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

ตาราง 22 น้ำหนักของสารสกัดบอนเต่า และผลผลิตร้อยละของส่วนของแต่ละเฟสเคลื่อนที่

ตัวอย่าง	น้ำหนัก สารสกัดหยาบ (g)	เฟสเคลื่อนที่	น้ำหนักของ ส่วนที่แยก(g)	Yield (%)
สารสกัดหยาบ เมทานอล	6.6606	เฮกเซน	0.497	7.465
		เอทิลอะซิเตท	0.573	8.603
		เมทานอล	4.614	69.276

จากตาราง 22 พบว่าส่วนของชั้นเมทานอลมีปริมาณมากที่สุดคิดเป็น 4.614 กรัม และสีของสารสกัดมีสีเขียวที่ลดลง จากนั้นนำแต่ละส่วนที่แยกมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนแยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมน

จากการนำแต่ละส่วนที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ผลการทดลองพบว่าส่วนของชั้นเมทานอล (3) มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดคิดเป็น 46.27 และเอทิลอะซิเตท (2) มีค่าการยับยั้ง 32.81 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนของชั้นเฮกเซน (1) ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง แสดงดังตาราง 23

ตาราง 23 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของแต่ละส่วนที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

สารที่แยกได้	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ย velocity			ค่าเฉลี่ย±SD	% การยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1	1000	98.879	98.718	101.364	99.654±1.48	0.00
2	1000	67.890	68.061	67.229	67.727±0.439	32.81
3	1000	53.889	54.174	54.429	54.164±0.270	46.27
กาแลนทามีน	20	3.622	3.529	3.532	3.561±0.053	96.47

2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

จากนั้นนำแต่ละส่วนที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 24

ตาราง 24 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนที่แยกได้	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 517 นาโนเมตร				% การยับยั้ง
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย±SD	
1	1000	0.444	0.443	0.441	0.443±0.001	15.14
2	1000	0.147	0.156	0.151	0.151±0.005	61.29
3	1000	0.048	0.047	0.049	0.048±0.001	87.72

จากตาราง 24 พบว่า 3 ซึ่งเป็นชั้นของเมทานอล มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชที่ดีที่สุดคิดเป็น 87.72 % ในขณะที่ 2 (เอทิลอะซิเตท) และ 1 (เฮกเซน) แสดงความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชคิดเป็น 61.29% และ 15.14% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

จากผลการทดลองของตาราง 25 และ 26 สามารถอธิบายได้ว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์หรือสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ [13,18,20] ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงจึงทำให้ส่วนของชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุดในทำนองเดียวกันจากการศึกษาสารมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (30,32) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงเช่นกันจึงมีผลทำให้ให้ส่วนของชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเช่นกัน

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกส่วนของชั้นเมทานอลไปศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของแต่ละองค์ประกอบทางเคมี

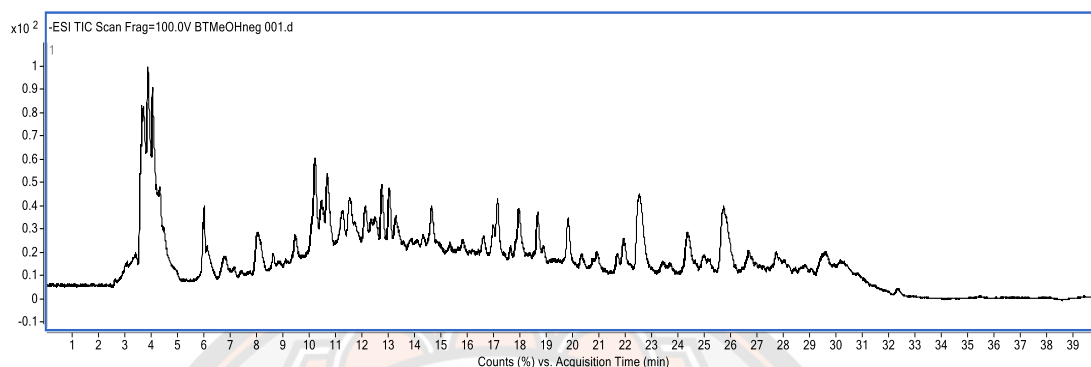
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกองค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การอนุมูลอิสระรวมถึงการวิเคราะห์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค At-line LC-MS/MS

การศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ของเมทานอลที่ความเข้มข้น 20000 ppm โดยใช้เทคนิค At-line LC-MS/MS จะทำการศึกษาสภาวะการแยก 2 สภาวะ คือสภาวะที่เป็นบวก (positive mode) และ สภาวะเป็นลบ (negative mode) โดยสภาวะที่ใช้ในการศึกษาแสดงดังตาราง 25

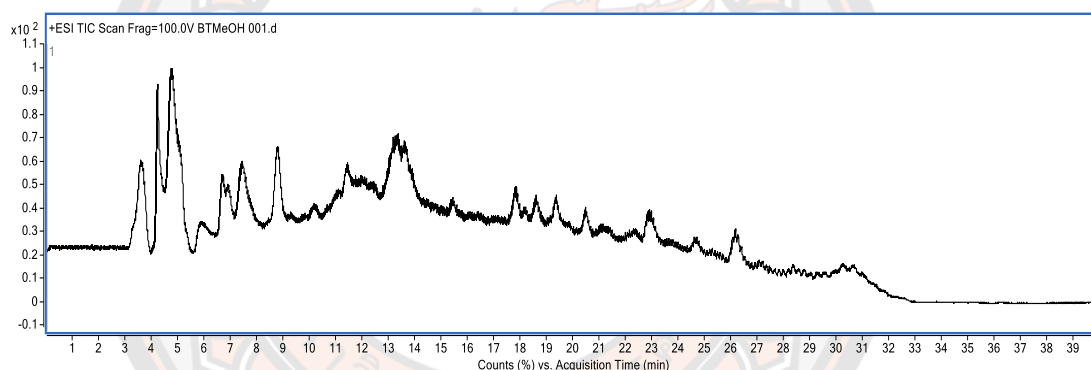
ตาราง 25 แสดงสภาวะในการแยก At-line LCMSMS ของส่วนที่แยก

HPLC	Agilent 1260 Series HPLC			
Reversed column	VertiSep UPS C18 HPLC COLUMN, 4.6 x 250 mm, 5 μ m			
Detector	QTOF-MS			
Mobile phase	Acetonitrile: formate buffer (3:97 :1, v/v)			
Flow rate	0.9 mL/min			
Column temperature	25 $^{\circ}$ C			
Injection volume	20 μ l			
Mobile phase	Time	%A (H ₂ O)	%B (formate buffer)	%C (Acetonitrile)
	0	0	95	5
	20	0	5	95
	33	0	5	95
	35	0	95	5
	40	0	95	5

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้สภาวะดังกล่าวพบว่าในแต่ละโหมดจะให้โครมาโตแกรมที่แตกต่างกันแสดงดังภาพ 47



ก.



ข.

ภาพ 47 แสดงโครมาโตแกรม LC-MS/MS ของสารสกัดหยาบบอนเต้าชั้นเมทานอล

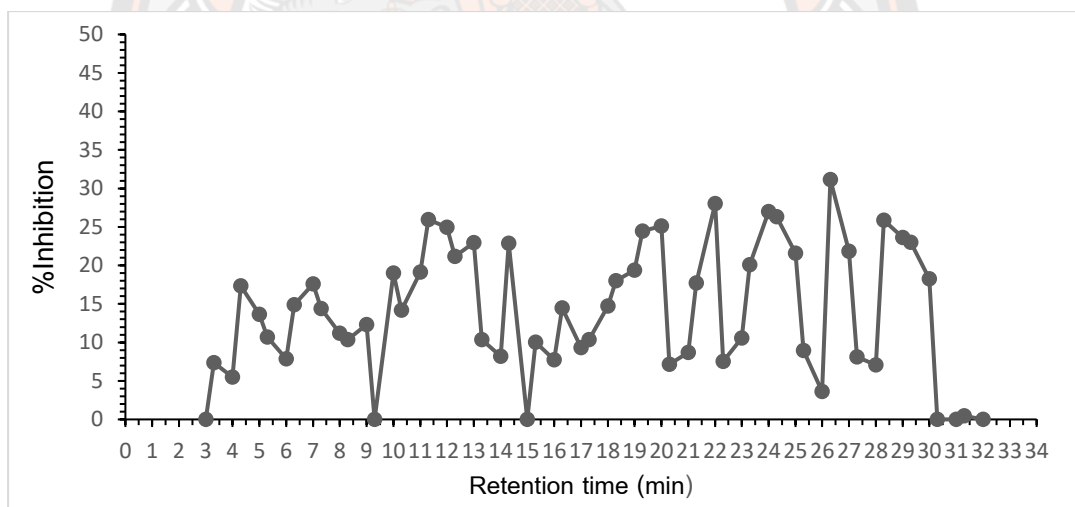
ก. Negative mode และ ข. positive mode

จากโครมาโตแกรมของทั้ง 2 ภาวะ พบว่าโครมาโตแกรมการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนของชั้นเมทานอลมีลักษณะที่แตกต่างกันโดยจะเห็นได้ว่าสภาวะดังกล่าวสามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของ fraction ของเมทานอลของพืชบอนเต้าได้ค่อนข้างชัดเจนในโหมดที่เป็นลบ (negative mode) ซึ่งส่วนใหญ่สารที่ปรากฏในภาวะที่เป็นลบ (negative mode) จะเป็นสารกลุ่มที่มีฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซี (Hydroxy group) เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่โครมาโตแกรมของภาวะที่เป็นบวก (positive mode) แสดงการแยกขององค์ประกอบทางเคมีที่มีจำนวนสาร

น้อยกว่าในภาวะที่เป็นลบ โดยทั่วไปองค์ประกอบทางเคมีที่พบในโหนดนี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จากโครมาโตแกรมทั้ง 2 ภาวะ องค์ประกอบเคมีที่พบจะพบในค่าเวลาที่คงอยู่ (retention time) ในช่วง 3-32 นาที ซึ่งในการทดลองจะทำการเก็บส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในแต่ละช่วงเวลา เพื่อนำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่อไป

1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีเอลแมนขององค์ประกอบทางเคมีในแฟรกชันของเมทานอล

เมื่อนำแต่ละส่วนจากแต่ละช่วงเวลามาทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ของแต่ละส่วนของสารที่แยกได้ดังภาพ 48



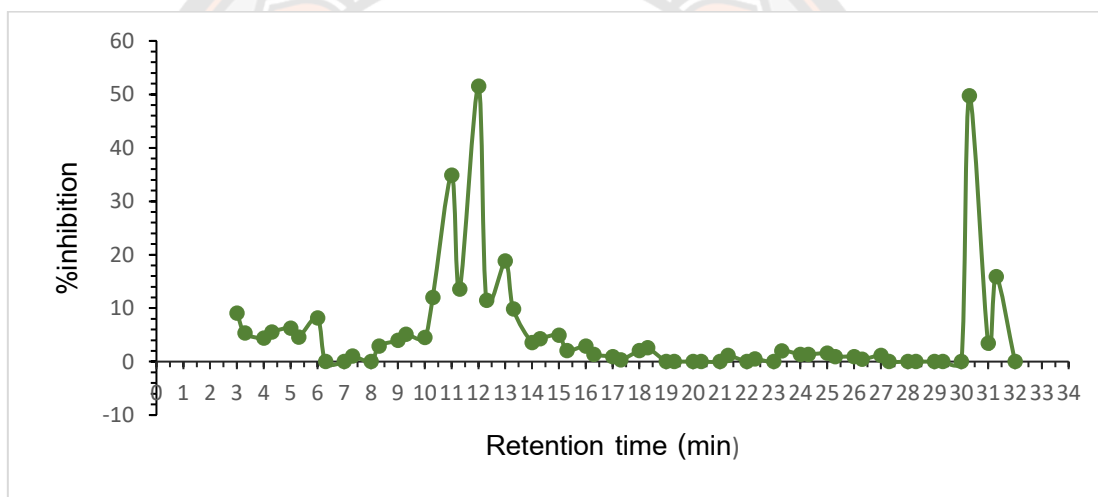
ภาพ 48 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การยับยั้ง และส่วนขององค์ประกอบที่แยกได้ (chromatogram bioactivity)

จากภาพ 48 พบว่าแต่ละส่วนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่แตกต่างกันโดยส่วนขององค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้มากกว่า 25.0 % จะพบในค่าเวลาที่คงอยู่ที่ช่วง ที่ 11.30, 20.00, 22.00, 24.00, 24.30, 26.30 และ 28.30 นาที ในขณะที่

ส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในค่าเวลาที่คงอยู่ที่ช่วง 3.00, 9.30, 15.00 และ 30.30-32.00 นาที จะไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชขององค์ประกอบทางเคมีในส่วนของชั้นเมทานอล

เมื่อนำแฟรกชันเมทานอลที่มีความเข้มข้น 20000 ppm ไปแยกด้วยเทคนิค At-line LC-MS/MS และทำการเก็บส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในแต่ละช่วงเวลาเพื่อทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแต่ละส่วนแสดงดังภาพ 49



ภาพ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และ fraction ขององค์ประกอบที่แยกได้ (chromatogram bioactivity)

การศึกษาการแยกจากภาพ 49 พบว่าแต่ละส่วนแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันโดยแฟรกชันขององค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่า 50% จะพบในค่าเวลาที่คงอยู่ที่ช่วง 12.00 นาที ในขณะที่fraction ขององค์ประกอบทางเคมีที่ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะพบในค่าเวลาที่คงอยู่ที่ช่วง 6.00-8.00, 15.00-30.00 นาที

การศึกษาโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่พบด้วยเทคนิค At-line couple liquid chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) และการแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติกโคลิลินเอสเทอเรสและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติกโคลิลินเอสเทอเรส และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพ 47 และ 48 ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการการศึกษาหาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างคร่าวๆของส่วนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้เทคนิค MS/MS ใน positive และ negative mode ผลการศึกษา แสดงดังตาราง 26 และ 27

ตาราง 26 MS/MS (positive mode) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดบอนเต่า

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS		
			fragmentation of H.	Formular	Tentative identification
1	3.614	107.042	-	-	unidentified
2	4.210	203.050	147.0202	C ₆ H ₁₂ O ₆	Hexose Monosaccharide
3	5.054	132.099	-	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Isoleucine Amino acid
4	7.348	132.100	86.0951	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Leucine Amino acid
5	7.499	294.151	276.1391,230.1345, 132.0994,86.0949	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	N-(1-Deoxy-1-fructosyl) isoleucine Amino acid

ตาราง 26 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS		Formular	Tentative identification	Classification
			fragmentation of H.	bentamiana Schott.			
6	8.741	328.135	310.1225,264.1184, 166.0832,120.0790		C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	N-(1-Deoxy-1-fructosyl) phenylalanine	Amino acid
7	8.781	166.084	120.0788,78.0219		C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-Phenylalanine	Amino acid
8	11.385	217.094	-		-	unidentified	-
9	11.394	437.229	-		-	unidentified	-
10	11.687	595.156	-		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol 3- neohesperidoside	Flavonoid
11	13.100	731.353	-		-	unidentified	-
12	13.163	701.343	-		-	-	-
13	13.631	415.768	-		-	unidentified	-
14	17.792	351.208	-		C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	Fatty acid
15	18.594	353.22	-		C ₁₈ H ₃₄ O ₅	5,8,12-Trihydroxy-9- octadecenoic acid	fatty acid

ตาราง 26 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS		Formular	Tentative identification	Classification
			fragmentation of H. <i>bentamiana</i> Schott.	fragmentation of H. <i>bentamiana</i> Schott.			
16	19.341	351.208	-	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	Fatty acid
17	20.466	353.224	-	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	5,8,12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid	fatty acid
18	22.894	699.344	537.2898, 421.1114		C ₃₅ H ₅₄ O ₁₄	Corchoroside A	Steroid derivatives
19	24.670	701.359			C ₃₆ H ₅₂ O ₁₂	Gingerglycolipid B	Disaccharide
20	26.156	677.36	515.3064, 421.1097, 347.0897		C ₃₆ H ₅₂ O ₁₂	Cucurbitacin I 2-glucoside	Triterpenoid

ตาราง 27 MS/MS (negative mode) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดบอนเต่า

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. bentamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
1	3.652	179.054		C ₆ H ₁₂ O ₆	Hexose	Monosaccharide
2	3.716	377.083	341.1071, 179.0544, 89.0235	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	sucrose	Disaccharide
3	3.871	191.055	85.0288	C ₇ H ₁₂ O ₆	quinic acid	Phenolic acid
4	6.001	290.090	200.0549, 128.0338		unidentified	-
5	6.155	279.039	243.0602, 128.0339	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	Uridine	Amino acid
6	6.771	292.142	130.0861	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	N-(1-Deoxy-1-fructosyl) isoleucine	Amino acid
7	8.039	326.127	164.0707, 101.0235, 72.0083	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	N-(1-Deoxy-1-fructosyl) phenylalanine	Amino acid
8	8.065	164.072	103.0543, 72.0085	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-Phenylalanine	Amino acid
9	8.618	419.195	213.1483, 161.0435, 101.0234	-	unidentified	-

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. benthamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
10	9.423	353.091	191.0549, 135.0439	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Caffeoylquinic acid	Phenolic acid
11	9.477	273.137	211.1329, 193.1223, 181.1222, 163.1114	-	unidentified	-
12	10.197	637.315	257.1384, 155.1063, 57.0343	-	unidentified	-
13	10.433	353.092	191.0547, 173.0443, 135.0437	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Caffeoylquinic acid	Phenolic acid
14	10.667	447.156	401.1438, 269.1018, 161.0441, 101.0231	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	Benzyl O-[arabinofuranosyl-(1->6)-glucoside	Disaccharide
15	10.897	593.156	503.1146, 431.0950, 311.0546	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	3,6-Diglucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyflavone	Flavone
16	11.057	353.087	191.0546	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Caffeoylquinic acid	Phenolic acid

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. benthamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
17	11.189	509.223	463.2165, 331.1749	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	Linalool oxide D 3-[apiosyl-(1->6)-glucoside]	Disaccharide
18	11.281	491.139	445.1325, 293.0864, 233.0651, 151.0388, 89.0237	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	Lucuminic acid	Disaccharide
19	11.494	337.097	173.044	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	p-Coumaroylquinic acid	Phenolic acid
20	11.574	255.126	-	-	unidentified	-
21	11.786	179.036	135.0436	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid	Phenolic acid
22	11.832	367.107	173.0440, 93.0332	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Feruloylquinic acid	Phenolic acid
23	12.013	153.018	109.0277	C ₇ H ₆ O ₄	Protocatechuic acid	Phenolic acid
24	12.091	337.096	-	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	p-Coumaroylquinic acid	Phenolic acid
25	12.139	431.102	311.0549, 283.0601, 117.0332	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6-C-Fucosyl luteolin	Flavone

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. benthamiana</i> α Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
26	12.166	153.019	-	C ₇ H ₆ O ₄	Genistic acid	Phenolic acid
27	12.468	593.156	285.0388	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol 3-neohesperidoside	Flavonoid
28	12.536	547.244	311.0963, 149.0440, 89.0235	C ₂₄ H ₃₈ O ₁₁	3-Oxo-alpha-ionol 9-[apiosyl-(1->6)-glucoside]	Sesquiterpenoid
29	12.719	723.509	-	-	Contaminate from membrane filter	-
30	12.802	577.161	417.1570, 269.0459	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Isorhoifolin	Flavone
31	12.970	173.083	111.0799	C ₈ H ₁₄ O ₄	Ethyladipic acid	Fatty acid
32	13.019	836.595	-	-	Contaminate from membrane filter	-
33	13.197	243.162	197.1540, 139.111	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	trans-Dodec-2-enoic acid	Fatty acid
34	13.264	939.652	-	-	Contaminate from membrane filter	-
35	13.360	431.101	268.0365	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Apigenin 4'-O-glucoside	Flavonoid
36	13.409	261.136	187.0968, 125.0961	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	2-oxo-5,8,12-trihydroxy-dodecanoic acid	Fatty acid

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation		Formular	Tentative identification	Classification
			of <i>H. benthamiana</i>	Schott.			
37	14.623	187.098	125.0962		C ₉ H ₁₆ O ₄	Nonate	Fatty acid
38	15.829	193.052	161.0224,133.0284		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ferulic acid	Phenolic acid
39	16.588	185.083	141.0912,113.0235		C ₉ H ₁₄ O ₄	5-Butyltetrahydro-2-oxo-3-furancarboxylic acid	Carboxylic acid derivative
40	16.944	183.068	139.0754		C ₉ H ₁₂ O ₄	4-Formyl-3-(formylmethyl)-4-hexenoic acid	Fatty acid
41	17.120	327.222	233.1151		C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	Fatty acid
42	17.932	329.237	233.1144		C ₁₈ H ₃₄ O ₅	9,10,13-Trihydroxy-11-octadecenoic acid	Fatty acid
43	18.649	363.194	327.2164,171.1020		C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Corchorifatty acid F	Fatty acid
44	18.862	371.248	327.2541		C ₂₀ H ₃₆ O ₆	9S,11R,15S,19R-tetrahydroxy-13E-prostaenoic acid	Fatty acid
45	19.799	329.237	-		C ₁₈ H ₃₄ O ₅	5,8,12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid	Fatty acid

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. benthamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
46	20.301	307.194	289.1805,	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	Corchorifatty acid D	Fatty acid
			235.1906,185.1171, 97.0649			
47	20.885	837.421	559.1877,397.1322,	-	unidentified	-
			277.2173,179.0552, 89.0235			
48	21.672	711.343	577.2651,397.1347,	C ₃₉ H ₅₂ N ₂ O	Granadaene	Monosaccharide
			277.2167			
49	24.348	723.389	677.3758,397.1356,	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₄	Gingerglycolipid B	Disaccharide
			279.2303			
50	24.960	699.387	653.3719,415.1450,	C ₃₅ H ₆₀ O ₇ P	all-trans-heptaprenyl diphosphate	Sesquiterpenoid
			397.1346,255.2322			

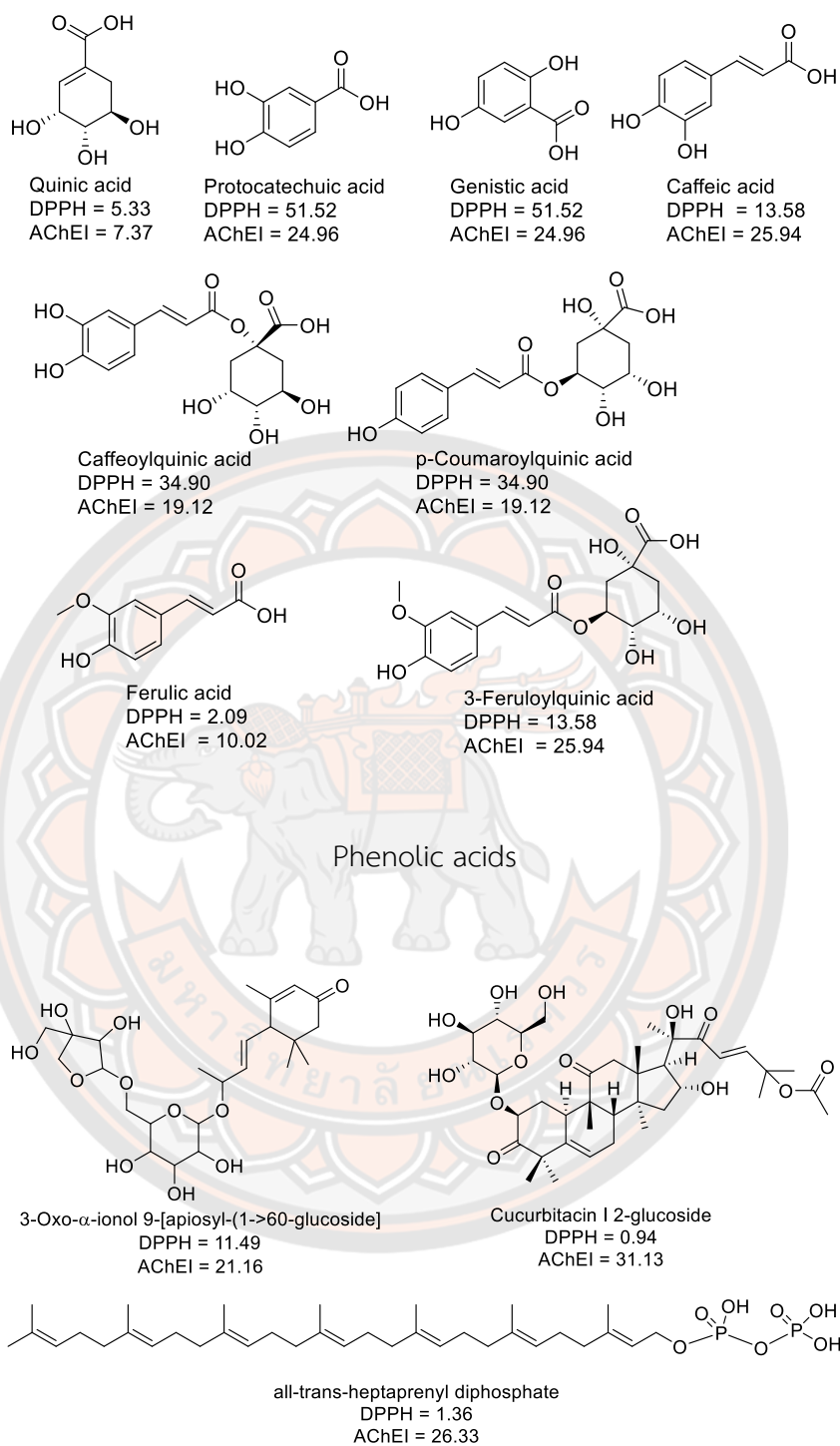
ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS fragmentation of <i>H. benthamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification	Classification
51	25.166	559.317	513.3070, 277.2177, 253.0915	$C_{22}H_{42}N_8O_6$	Asn Leu Ile Arg	Amino acid
52	25.769	699.385	653.3758, 397.1356, 255.2333	$C_{35}H_{60}O_7P_2$	all-trans-heptaprenyl diphosphate	Sesquiterpenoid
53	26.669	725.405	679.3914, 397.1345, 281.2483, 235.0815, 161.0455	$C_{33}H_{60}O_{14}$	Gingerglycolipid C	Disaccharide
54	27.722	561.334	515.3223, 311.1654, 279.2322	$C_{27}H_{48}O_9$	27-nor-campestan- $3\beta, 4\beta, 5\alpha, 6\alpha, 7\beta, 8\beta, 14\alpha, 15\alpha, 24$ -nonol	Steroid derivative
55	29.428	537.327	491.3235, 255.2321	$C_{25}H_{49}O_7P$	1-(11Z-docosenoyl)-glycero-3-phosphate	Carboxylic acid derivative

ตาราง 27 (ต่อ)

Compound	RT (min)	m/z	MS/MS		
			fragmentation of <i>H. bentamiana</i> Schott.	Formular	Tentative identification
56	29.502	727.408	681.4061, 397.1341. 283.2623, 235.0763	-	unidentified
57	30.159	563.336	-	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	(3 α ,25R)-Spirost-5-en-3-yl benzoate Steroid derivative

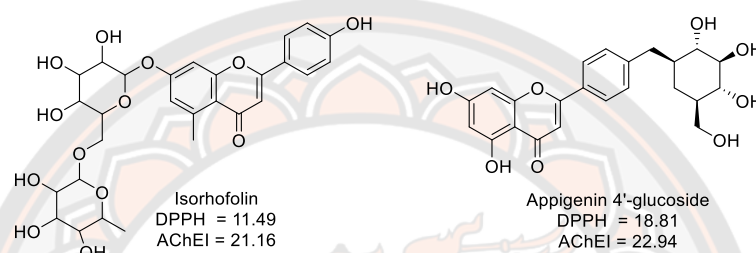
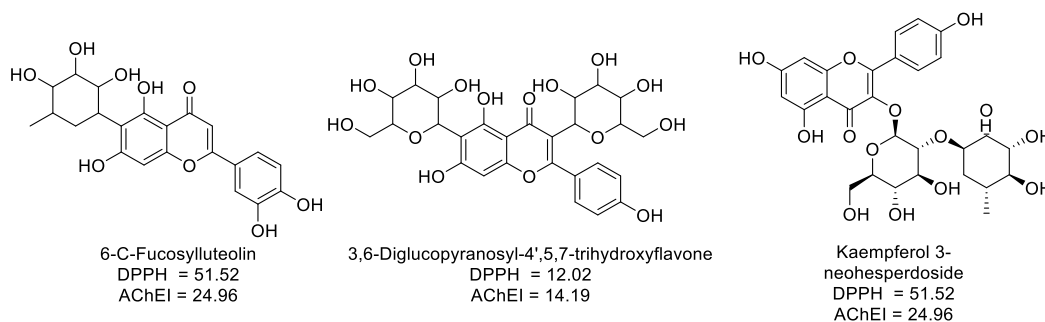
จากโครงสร้างคร่าวๆขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในโครมาโทแกรมทั้ง 2 ภาวะ ดังแสดงในตาราง 26 และ 27 จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในภาวะที่เป็นบวก (positive mode) มีทั้งหมด 17 ตัว โดยสามารถระบุโครงสร้างของสารได้ 12 ตัว และไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ 5 ตัว ในขณะที่ในโครมาโทแกรมในภาวะที่เป็นลบ (negative mode) จะพบองค์ประกอบเคมีทั้งหมด 46 ตัว โดยสามารถระบุโครงสร้างของสารได้ 39 ตัว และไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ 7 ตัว จากองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดที่ระบุโครงสร้างได้จาก MS/MS สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่มใหญ่ๆ แสดงดังตาราง 28



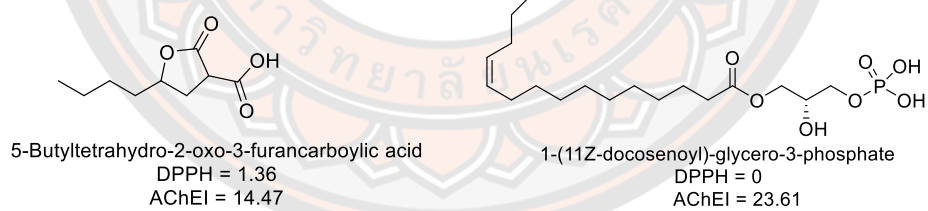
Triterpenoid/Sesquaterpenoid derivative

ภาพ 50 โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดบอนเต่าที่แยกได้จากเทคนิค At-line LC-MS/MS และ Characterization จากแมสสเปกตรัม

ภาพ 50 (ต่อ)

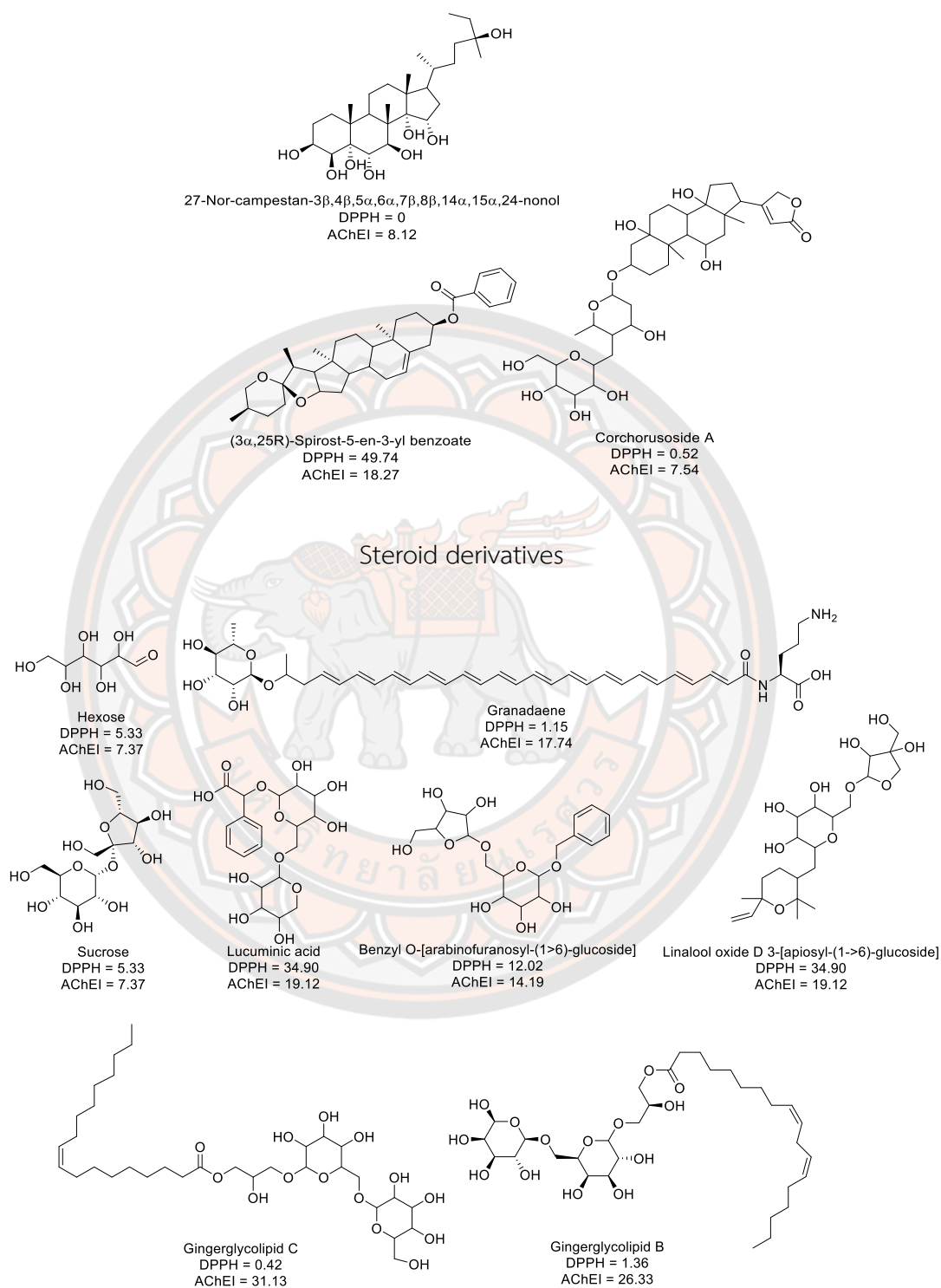


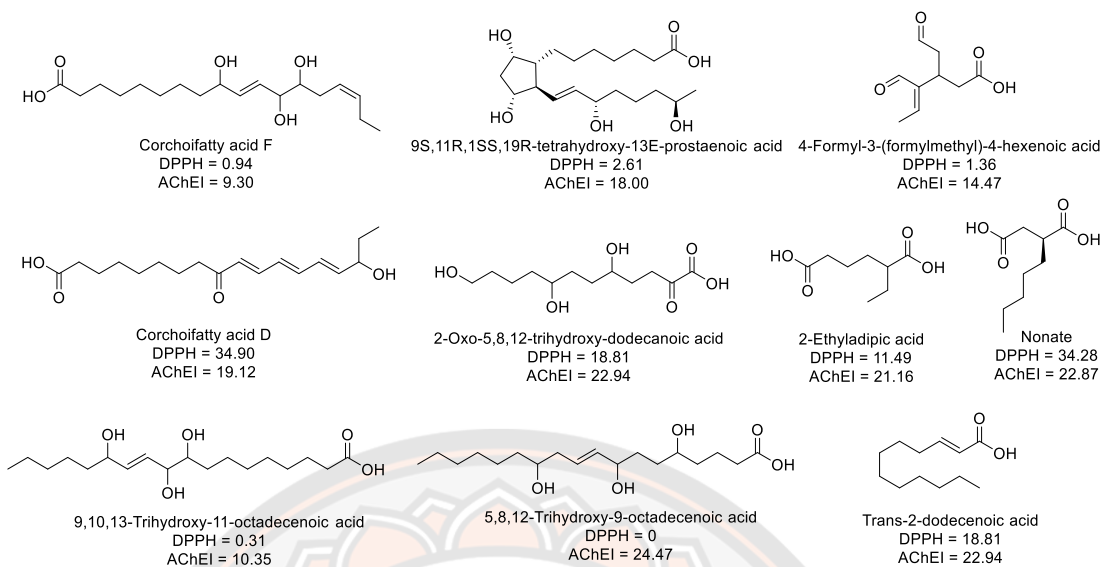
Flavonoid



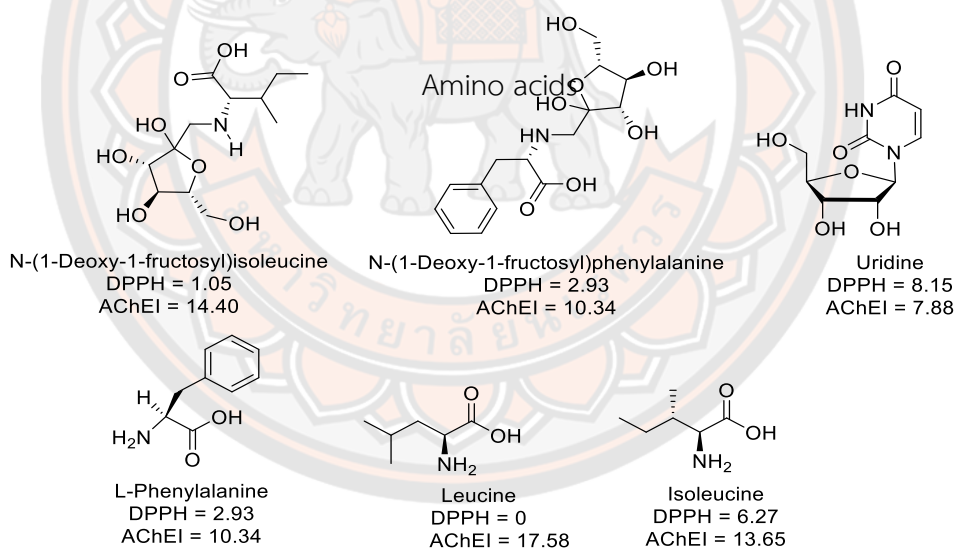
Carboxylic acid derivative

ภาพ 50 (ต่อ)





Fatty acids



Amino acids

จากการวิเคราะห์โครงสร้างคร่าวๆขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในโครมาโทแกรม ทั้ง 2 ภาวะ ด้วยเทคนิค At-line LC-MS/MS ควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และเมื่อทำการจัดกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีของสารที่สามารถระบุโครงสร้างได้ พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีที่สุดคือ Cucurbitacin I 2-glucoside ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Triterpenoid คิดเป็น 31.13% ในขณะที่สารที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ในช่วง 30.00-20.00 % ส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่ม Phenolic acid, flavonoids, sesquiterpenoid และ fatty acid derivative

จากผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชขององค์ประกอบทางเคมีของสารที่สามารถระบุโครงสร้างได้ พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ Protocatechuic acid, p-Coumaroylquinic acid และ Genistic acid ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มกรดฟีนอลิก นอกจากนี้ยังมี Kaempferol 3-neohesperidoside และ 6-C-Fucosylluteolin ที่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยทั้งหมดแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น 51.52% ในขณะที่สารที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในช่วง 50.00-30.00 % ส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่ม Phenolic acid และ steroid derivative ซึ่งสารที่แสดงฤทธิ์ต่ำกว่า 30-10% จะอยู่ในกลุ่ม Carboxylic acid, flavonoid และ fatty Acid derivative

จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในส่วนเหนือดินของพืชบอนเต่าส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มของกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวจัดว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมากและนอกจากนี้จากศึกษาพบว่าสารกลุ่มนี้สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีอีกด้วย ซึ่งนับว่าเป็นข้อมูลที่น่าสนใจ เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับสมุนไพรมอบอนเต่าอย่างชัดเจน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้นับว่าเป็นการรายงานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสมุนไพรมอบอนเต่าครั้งแรกซึ่งคาดว่าข้อมูลเหล่านี้ น่าจะประโยชน์แก่ผู้บริโภครักษาบอนเต่ามากขึ้นและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ รวมไปถึงการเพิ่มมูลค่าของพืชบอนเต่าต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธีของแอลแมน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของบอนเต่า พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซได้สูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบเฮกเซนแสดงการยับยั้งฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดได้ต่ำที่สุดเมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาทำการแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบที่พบ โดยเทคนิค At-line LCMS/MS โดยทำการแยกทั้งภาวะที่บวก (positive mode) และภาวะที่เป็นลบ (negative mode) พบว่าในสารสกัดหยาบดังกล่าวพบองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถระบุได้ทั้งหมด 51 สาร โดยในภาวะที่เป็นบวกจะพบ 12 สาร ในขณะที่สาร 39 สารพบในภาวะที่เป็นลบ จากองค์ประกอบทางเคมีที่พบทั้งหมดสามารถแบ่งกลุ่มขององค์ประกอบทางเคมีที่พบเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ amino acid, flavonoid, phenolic acid, monosaccharide/disaccharide, fatty acid, steroid, Triterpenoid/Sesquaterpenoid และ carboxylic acid derivative นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูล-อิสระขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 10 สารที่มีฤทธิ์การยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่มากกว่า 25% ซึ่งสารดังกล่าวจะอยู่ในกลุ่มของ phenolic acid, flavonoid, triterpenoid/Sesquaterpenoid, carboxylic acid และ fatty acid ส่วนการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีฟิฟิเอซขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดพบว่ามีสารจำนวน 5 สารที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซมากกว่า 50% ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ phenolic acid และ flavonoid, และสารที่ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ amino acid และ fatty acid จากผลการทดลองที่ได้สามารถกล่าวได้ว่าพืชชนิดนี้สามารถเป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีได้ ซึ่งคาดว่าข้อมูลเหล่านี้ น่าจะประโยชน์แก่ผู้บริโภคพืชบอนเต่ามากขึ้นและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่นการพัฒนาเป็นสมุนไพรในการนำไปใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น รวมไปถึงการเพิ่มมูลค่าของพืชบอนเต่าต่อไปในอนาคตได้

จากการใช้เทคนิค At-line LCMS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ พบว่าเทคนิคมีข้อดีเช่น ใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย และทำให้สามารถทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพและโครงสร้างขององค์ประกอบเคมีที่พบในสารตัวอย่างควบคู่กันไป อย่างไรก็ตามสารที่ได้จากการแยกโดยเทคนิคนี้มีปริมาณที่น้อยจึงทำให้มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ รวมไปถึงทำให้ไม่สามารถทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารที่แยกได้ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการศึกษากับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย และต้องการสกรีนฤทธิ์ทางชีวภาพควบคู่กับการหาโปรไฟล์ขององค์ประกอบทางเคมีที่พบด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรสปีของสารตัวอย่างเท่านั้น



บรรณานุกรม

1. Phromswat, D., Mahawijit, N., Nilborworn, P. & Dej-adisai, S. (2012). Anti-Acetylcholinesterase Activity of Traditional Thai Herbal Combination Medicines. *Journal of Thaksin University*, 15(2), 34-42.
2. Adewusi, E. A., Moodley, N. & Steenkamp, V. (2010). Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8257-8276.
3. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
4. Rungsaeng, P., Sangvanich, P. & Karnchanatat, A. (2011). Protein with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity from the Rhizomes of Zingiberaceae Plants. *The 12th graduate research conference, Khon Khaen University*, 654-658.
5. Suwannachart, C., Arunpairojana, V. & Kanjana-Opas, A. (2007). Screening and Preliminary Characterization of Gliding bacteria Isolated from Eastern and Southern Coastlines of Thailand. *SWU Sci J*, 23(2), 66-77.
6. ผักพื้นเมือง :บอนเต่า. สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2560, จาก area-based.lpru.ac.th/veg/www/Native_veg/v165.htm.
7. สุรางค์ เขียรศิริญ. (2557) บอนเต่า. กลุ่มงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้: สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 12, (หน้า 467) สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2560, จาก <http://fbd.forest.go.th/th/?p=5230>.
8. สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยมหิดล. อะซิติลโคลีน สืบค้นเมื่อ 25 มีนาคม 2560, จาก <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nervous/ch1/chapter1/link9.html>.
9. สุจินต์ โตวิวิชัย. (2556). เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส. *วารสารองค์การเภสัชกรรม*, 3, 36-44.
10. กรรณก อิงคนินันท์ และคณะ (2552). การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส จากแหล่งธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 45 หน้า. สืบค้นเมื่อ 1 เมษายน 2560, จาก <http://library.cmu.ac.th/rsc/?newsdetail.php&id=182>.

11. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 187(1-3), 10-22.
12. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*, 187(1-3), 10-22.
13. Patient first. โรคอัลไซเมอร์. (มกราคม-มีนาคม 2561) ฉบับที่ 08 สืบค้นวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2562 จาก www.Chulabhornhospital.com
14. ก้องเกียรติ ภูณท์กันทรารกร. (2561). ภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 18(3), 442-468.
15. Hofmann, M. & Hock, C. (2001). Alzheimer's Disease: Antidementive Drugs. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, 418-423.
16. Chen, Y., Lin, H., Yang, H., Tan, R., Bian, Y., Fu, T. et al. (2017). Discovery of new acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors through structure-based virtual screening. *RSC Advances*, 7(6), 3429-3438.
17. Lomlim, L. & Nualnoi, T. (2011). New Approach in Development of Acetylcholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 6(2), 157-173.
18. Eldufani, J. & Blaise, G. (2019). The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimers Dement (N Y)*, 5, 175-183.
19. Tewari, D., Stankiewicz, A. M., Mocan, A., Sah, A. N., Tzvetkov, N. T., Huminiecki, L. et al. (2018). Ethnopharmacological Approaches for Dementia Therapy and Significance of Natural Products and Herbal Drugs. *Front Aging Neurosci*, 10(3), 1-24.
20. Johnson, J. W. & Kotermanski, S. E. (2006). Mechanism of action of memantine. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 61-67.
21. เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, 1(1), 59-70..
22. Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications. *CRC Press, New York*.

23. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์ ไมตรี สุทธิจิตต์ และสุพัตร์ พ่วงบางโพ. (2553).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่าเพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา. รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา.
24. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ฟีนอล. สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2559. จาก<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenoliccompound>
25. Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A. & 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.
26. Ramsay, R. R. & Tipton, K. F. (2017). Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules*, 22(7).
27. วราภรณ์ สงวนกุล. (2558). การศึกษาปริมาณรวมของสารฟีนอลิก สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์การยับยั้งการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน และการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารสำคัญประเภทสารกลูโคซิโนเลตของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูลผักกาด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร.
28. อีระวัฒน์ รัตนพจน์ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน ชูติมา ศรีมะเร็ง รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ และดวงพร อมรเลิศพิศาล. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 6(2): 23-34.
29. Mathew, S. & Abraham, T. E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, 94(4), 520-528.
30. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยพะเยา, 21(3), 276-286.
31. Nikishimi, M., Rao, N. & Yagi, K. (1976). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46, 849-854.
32. Miadic, M., Scholten, D. J., Niessen, W. M., Somsen, G. W., Smit, M. J. & Kool, J. (2015). At-line coupling of LC-MS to bioaffinity and selectivity assessment for metabolic profiling of ligands towards chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *J Chromatogr B*, 1002, 42-53.

33. Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C. & Crozier, A. (2006). On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz J Plant Physiol*, 18(1), 253-262.
34. Tiberti, L. A., Yariwake, J. H., Ndjokob, K. & Hostettmann, K. (2007). On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. *J Braz Chem Soc*, 18(1), 100-105.
35. Nuengchamnong, N., Krittasilp, K. & Ingkaninan, K. (2011). Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. *Food Chem*, 127(3), 1287-1293.
36. Nuengchamnong, N. & Ingkaninan, K. (2017). An on-line LC-MS/ DPPH approach towards the quality control of antioxidant ingredients in Sahastara. Songklanakarin. *J Sci Technol*, 39(1), 123-129.
37. Bhandari, S., Nuengchamnong, N., Chaichamnong, N., Seesong, T., Ingkaninan, K. & Temkitthawon, P. (2020). At-line LC-QTOF-MS micro-fractionation of *Derris scandens* (Roxb.) Benth, coupled to radioassay for the early identification of PDE5A1 inhibitors. *Phytochem Anal*, 31(3), 297-305.
38. Braham, F., Carvalho, D. O., Almeida, C. M. R., Zaidi, F., Magalhães, J. M. C. S., Guido, L. F. et al. (2020). Online HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from *Moringa oleifera* leaves. *South African Journal of Botany*, 129, 146-54.
39. Alarcon, J., Cespedes, C. L., Munoz, E., Balbontin, C., Valdes, F., Gutierrez, M. et al. (2015). Dihydroagarofuranoid Sesquiterpenes as Acetylcholinesterase Inhibitors from Celastraceae Plants: *Maytenus disticha* and *Euonymus japonicus*. *J Agric Food Chem*, 63(47), A-G.
40. Werawattanachai, N. & Kaewamatawong, R. (2016). Screening for acetylcholinesterase Inhibitory activity from the Piperaceae. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*, 18(3), 26-33.
41. Bahadori, M. B., Dinparast, L., Valizadeh, H., Farimani, M.M. & Ebrahimi, S. N. (2016). Bioactive constituents from roots of *Salvia syriaca* L. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking studies. *South African Journal of Botany*, 106, 1-4.

42. Neagu, E., Radu, G. L., Albu, C. & Paun, G. (2018). Antioxidant activity acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. *Saudi J Biol Sci*, 25(3),578-585.

