การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอสเทอเรสจากพืชในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

1. นางสาวจุฑามาศ ซิ้มอำพร 513 65190 33
2. นายเฉลิมพร สารกูลวัฒนา 513 65211 33
3. นางสาวชญานิศ สุจริตจันทร์ 513 65228 33

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

Screening for Medicinal plants with Acetylcholinesterase Inhibiting Activity from Plants in The Plant Genetic Conservation Project Area Under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

1. Jutamas Simumporn 513 65190 33
2. Chalermporn Sarakulwattana 513 65211 33
3. Chayanis Sutcharitchan 513 65228 33

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอส-เทอเรสจากพืชในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ	
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวจุฑามาศ ซิ้มอำพร	513 65190 33
	นายเฉลิมพร สารกูลวัฒนา	513 65211 33
	นางสาวชญานิศ สุจริตจันทร์	513 65228 33
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์ แขนงการค้นพบยา	
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรัตนา อำนวยผล	

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

..... ประธานแขนงการค้นพบยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.บุญศรี องค์พิพัฒนกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรัตนา อำนวยผล)

โครงการลำดับที่ 3.6
วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอสเทอเรสจากพืชในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Screening for medicinal plants with acetylcholinesterase inhibiting activity from plants in The Plant Genetic Conservation Project Area Under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

หัวหน้าโครงการ นายเฉลิมพร สารกูลวัฒนา 513 65211 33
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวจุฑามาศ ซื้มอำพร 513 65190 33
นางสาวชญานิศ สุจริตจันทร์ 513 65228 33
อาจารย์ที่ปรึกษา อ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา, รศ. ภญ. ดร.สุรัตนา อำนวยผล
ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สมองมีภาวะเสื่อมถอยในผู้สูงอายุซึ่งพบบ่อยที่สุดในประเทศโลกตะวันตก ในประเทศไทยโรคนี้นับวันก็จะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้น

สมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์นั้นพบว่าจะมีระดับสารสื่อประสาทอะเซตทิลโคลีนลดลง ดังนั้นจึงมีการใช้ยายับยั้งการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงอะเซตทิลโคลีนเป็นยารักษาหลัก ได้แก่ ยากลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) แต่ยาในกลุ่มนี้ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ราคาแพง ผลการรักษายังอยู่เพียงระดับปานกลาง มีประสิทธิภาพในช่วงเวลาสั้น และมีผลข้างเคียงมาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อค้นหาศักยภาพของพืชเหล่านี้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดใหม่

ในการวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอสเทอเรสในพืชสมุนไพรจากพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพสธ.) บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี จำนวน 49 ต้น (53 ตัวอย่าง) โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชความเข้มข้น 1 mg/ml เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Tacrine ความเข้มข้น 0.74 µg/mlจากนั้นนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nmจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% โดยเรียงลำดับความแรงจากน้อยไปมาก โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ได้ดังนี้ ช้ามะขามป้อม(ใบ) 68.94 µg/ml พะวา(ใบ) 81.19 µg/ml จำปีแขก(ใบ) 100.35 µg/ml ฝาดดอกขาว(ใบ) 103.50 µg/ml มะค่าแต้(ใบ) 115.01 µg/ml พรวด(ใบ) 147.02 µg/ml เขยตาย(ใบ) 195.15 µg/ml เกด(ใบ) 221.81 µg/ml พลองใบใหญ่(ใบ) 452.16 µg/ml พลองใบเล็กหนา(ใบ) 487.48 µg/ml ช้างน้าว(ใบ) 569.87 µg/ml มะลิวัลย์ดง(กิ่ง) 581.66 µg/ml และก้างปลา(ใบ) 705.05 µg/ml ผลการวิจัยนี้เป็นการคัดกรองเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคอัลไซ-เมอร์จากธรรมชาติ ซึ่งต้องทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในพืชซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ดังกล่าวต่อไป

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

…….....

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ. ภญ. ดร.สุรัตนา อำนวยผล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้แนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนชี้ให้เห็นถึงข้อบกพร่องที่ควรแก้ไขในโครงการนี้ จนทำให้การดำเนินโครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ขอขอบคุณ ภญ.ปุญญิศา งานกรณาธิการ และรุ่นพี่นิสิตปริญญาโทและเอกทุกท่านของภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ที่คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการดำเนินโครงการ รวมทั้งคุณศศิมา จันทร์แย้ม นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชา และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกให้เป็นอย่างดี

คำนำ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2555 ซึ่งมีจุดประสงค์ให้นิสิตเกิดกระบวนการเรียนรู้ การทำงาน การวางแผน ตลอดจนการแก้ปัญหาต่างๆด้วยตนเอง โดยได้ทำการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase จากพืชในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี เพื่อเป็นองค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทย และเป็นแนวทางในการวิจัยคิดค้นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดใหม่ต่อไปในอนาคต

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยรุ่นต่อๆไป รวมถึงนักวิจัยที่ประสงค์จะทำการวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้อง หากมีข้อผิดพลาดประการใดจึงกราบขออภัยไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์ ง
กิตติกรรมประกาศ จ
คำนำ ฉ
สารบัญ ช
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญรูปภาพ ฎ
คำย่อ 1

บทที่ 1 บทนำ 2
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 2
วิธีดำเนินการวิจัย 3
วัตถุประสงค์การวิจัย 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 วรรณกรรมปริทัศน์ 4
โรคอัลไซเมอร์ 4
อาการแสดงและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ 4
พยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ 5
อุบัติการณ์ของโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทย 6
การรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ยาที่ใช้รักษา และหลักการใช้ยา 12
สารและสมุนไพรอื่นๆที่ใช้โรคอัลไซเมอร์ 15
แนวทางการวิจัยเพื่อค้นพบยาใหม่จากธรรมชาติในการรักษาอัลไซเมอร์ 20

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 23
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 23
วิธีการที่ใช้ในการวิจัย 26
การหาค่า IC50 จากสารสกัดจากพืชสมุนไพร 29

บทที่ 4 ผลการวิจัย 30
การยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรตัวอย่าง 30
การหาความแรงของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้งการทำงาน AchE 32

บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการวิจัย 35

เอกสารอ้างอิง 39

ภาคผนวก 41

น้ำหนักสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ 41

วิธีเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE (สำหรับทดสอบ 53 ตัวอย่าง) 43

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพร 45

วิธีเตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ
ที่ใช้ในการทดสอบหาค่า IC_{50} (สำหรับทดสอบ 1 ตัวอย่าง) 47

ผลการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชสมุนไพร 48

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 สรุปยาสมุนไพรและสารอาหารที่ใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 16
ตารางที่ 2 รายชื่อพืชที่นำมาทดลอง 23
ตารางที่ 3 ปริมาณและชนิดสารที่ใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลอง 28
ตารางที่ 4 ผลการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition < 70% 30
ตารางที่ 5 ผลการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition ≥ 70% 32
ตารางที่ 6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชสมุนไพรจำนวน 13 ตัวอย่าง 32
ตารางที่ 7 ระดับความแรง ของการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition ≥ 70% 33
ตารางที่ 8 น้ำหนักแห้งพืชสมุนไพร และสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ 41
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml) จำนวน 53 ตัวอย่าง 45
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AchE และค่า IC_{50} ของ (7) สารสกัดมะลิวัลย์ดง – กิ่ง 48
ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (10) สารสกัดก้างปลา – ใบ 49
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (11) สารสกัดจำปีแขก – ใบ 50
ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (13) ช้ามะขามป้อม– ใบ 51
ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC50 ของ (17) สารสกัดช้างน้าว – ใบ 52
ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (23) สารสกัดพะวา – ใบ 53
ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (25) สารสกัดพรวด – ใบ 54
ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (26) สารสกัดเขยตาย – ใบ 55
ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (34) สารสกัดเกด – ใบ 56
ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (39) สารสกัดพลองใบใหญ่ – ใบ 57
ตารางที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (43) สารสกัดพลองใบเล็กหนา – ใบ 58
ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (46) สารสกัดฝาดดอกขาว – ใบ 59

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (52) มะค่าแต้ – ใบ 60

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้ง Lipase และ AchE เทียบกับผลการทดสอบหาสารแทนนิน 61

ตารางที่ 24 ระดับความแรง ของการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition $\geq$ 70% 63

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 ขั้นตอนแสดงบทบาทของ Aβ และโปรตีนเทาที่นำไปสู่โรคอัลไซเมอร์ 6
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Acetylcholine 7
รูปที่ 3 ภาพรวมของสารสื่อประสาท Acetylcholine ตั้งแต่ขั้นตอนการสังเคราะห์
จนถึงการทำลาย 8
รูปที่ 4 การสังเคราะห์สารสื่อประสาท Acetylcholine 9
รูปที่ 5 การหลั่งสารสื่อประสาท Acetylcholine 10
รูปที่ 6 การทำลายสารสื่อประสาท Acetylcholine 10
รูปที่ 7 อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ของผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกในประเทศไทย
ตั้งแต่ปี 2542 ถึง 2552 11
รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ tacrine 12
รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Donepezil 13
รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ rivastigmine 13
รูปที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ galantamine 14
รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ memantine 15
รูปที่ 13 โครงสร้างสาร 19,20-dihydrotabernamine และ19,20-dihydroervahanine 20
รูปที่ 14 โครงสร้างตัวอย่างสารในกลุ่ม protoberberine alkaloids ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE 21
รูปที่ 15 โครงสร้างตัวอย่างสาร bisbenzylisoquinoline alkaloids ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE 21
รูปที่ 16 โครงสร้างตัวอย่างสารในกลุ่ม Dihydroisoquinoline derivatives และกลุ่ม
Isoquinoline derivatives ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesteraseที่ดี 22
รูปที่ 17 โครงสร้างสารประกอบ dihydroisoquinoline ring analog ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์
acetylcholinesterase ที่แรง 22
รูปที่ 18 ตำแหน่งของกลุ่มการทดลองใน 96-wells microplate 28
รูปที่ 19 สมการการเกิดปฏิกิริยาในวิธีการ Ellman 35
รูปที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (7) สารสกัดมะลิวัลย์ดง – กิ่ง
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 48

รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (10) สารสกัดก้างปลา – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 49
รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (11) สารสกัดจำปีแขก – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 50
รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (13) ช้ามะขามป้อม– ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 51
รูปที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (17) สารสกัดช้างน้าว – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 52
รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (23) สารสกัดพะวา – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 53
รูปที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (25) สารสกัดพรวด – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 54
รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (26) สารสกัดเขยตาย – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 55
รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (34) สารสกัดเกด – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 56
รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (39) สารสกัดพลองใบใหญ่ – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 57
รูป 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (43) สารสกัดพลองใบเล็กหนา – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 58
รูป 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (46) สารสกัดฝาดดอกขาว – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 59
รูป 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (52) มะค่าแต้ – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE 60

คำย่อ

Ach	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
AChEI	Acetylcholinesterase inhibitor
ACTI	Acetylthiocholine iodide
Aβ	Beta amyloid
BBIQ	Bisbenzylisoquinoline
ChAT	Choline acetyltransferase
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DMSO	Dimethylsulphoxide
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
g	กรัม
IC_{50}	ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 50%
M	โมลาร์
MAP-2	Microtubule-associated protein-2
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
NFTs	Neurofibrillary tangles
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NPs	Neuritic plaques
SD	Standard deviation
U	Unit
VAChT	Vesicular cholinergic transporter
µg	ไมโครกรัม
µl	ไมโครลิตร
อพ.สธ.	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สมองมีภาวะเสื่อมถอยในผู้สูงอายุซึ่งพบบ่อยที่สุดในประเทศโลกตะวันตก ในประเทศไทยโรคนี้นับวันก็จะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้น จากข้อมูลสถิติสุขภาพของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข[1] ตั้งแต่ปี 2542 – 2552 พบว่าอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ของผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก เพิ่มขึ้นจาก 94.31 คนต่อแสนคน เป็น 218.85 คนต่อแสนคน และจาก 36.40 คนต่อแสนคน เป็น 44.93 คนต่อแสนคน ตามลำดับ[2]

สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ คือ การตายของเซลล์สมองซึ่งผ่านทางกลไกการทำลายได้หลายทาง กระบวนการหนึ่งคือ การสะสมของ beta amyloid กลายเป็น plaque แข็งในเนื้อเยื่อสมอง มีผลขัดขวาง acetylcholine (ACh) ในการสื่อกระแสประสาท ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen specie โดยพบว่าสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับ ACh ลดลง[3] ซึ่งเป็นที่มาในการใช้ยายับยั้งการทำลายหรือเปลี่ยนแปลง ACh ในกลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) โดยยากลุ่มนี้ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในประเทศไทย[4] ได้แก่ donepezil (Aricept®) rivastigmine (Exlon®) galantamine (Reminyl®)

อย่างไรก็ตามยาในกลุ่ม AChEI ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ราคาแพง ผลการรักษายังอยู่เพียงระดับปานกลาง มีประสิทธิภาพในช่วงเวลาสั้น และมีผลข้างเคียงมาก[5] ดังนั้นจึงมีความพยายามอย่างต่อเนื่องที่จะค้นคว้าหายาใหม่จากหลายแหล่ง เช่น จากการสังเคราะห์ หรือค้นหาจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา

กลุ่มผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย จึงสนใจที่จะศึกษาและคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholine มาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้งเอนไซม์และหวังว่าการศึกษาการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคอัลไซเมอร์จากธรรมชาติ

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

1. สุ่มเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ที่หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี
2. สกัดสารพืชสมุนไพรโดยวิธีแช่สกัด (maceration) และระเหยแห้งโดยใช้ rotary evaporator
3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่ได้โดยใช้หลักการ microscopy โดยใช้เครื่อง microplate reader
4. หาและเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

<u>วัตถุประสงค์การวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาและคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AchE) จากพืชในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ
2. เปรียบเทียบความแรงในการยับยั้ง AchE ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AchE ด้วยค่า IC_{50}

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

พบพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AchE

บทที่ 2
วรรณกรรมปริทัศน์

โรคอัลไซเมอร์ [6] [7]

โรคอัลไซเมอร์ ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1906 โดย อาลอยส์ อัลไซเมอร์ (Alois Alzheimer) เป็นโรคในกลุ่มภาวะสมองเสื่อม (dementia)ที่พบบ่อย เกิดจากมีการเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative disease) ชนิดหนึ่ง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีปัญหาเกี่ยวกับเรื่องความจำ ความรอบรู้ มีการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมและบุคลิกภาพ โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคสมองเสื่อมที่มีอาการรุนแรงขึ้นเป็นลำดับ โดยเริ่มจากการสูญเสียความจำและความสามารถทางสติปัญญาด้านอื่นๆมากขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป จนสุดท้ายผู้ป่วยจะไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้และมีชีวิตสั้นลง ในปัจจุบันยังไม่มีแนวทางป้องกันเฉพาะโรค และถือเป็นโรคความเสื่อมที่รักษาไม่หาย แต่เชื่อว่าการทำกิจกรรมต่างๆ เช่น การออกกำลังกายในผู้สูงอายุ ฯลฯ สามารถช่วยชะลอการเกิดโรคหรือชะลอความเสื่อมของสมองลงได้บ้าง

อาการแสดงและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ [8]

นายแพทย์ Barry Reisberg ผู้อำนวยการคลินิก New York University School of Medicine's Silberstein Aging and Dementia Research Center ได้แบ่ง “ขั้น หรือ ระยะ” ของโรคอัลไซเมอร์ เพื่ออธิบายพฤติกรรมและความสามารถในการกระทำสิ่งต่างๆของผู้ป่วยที่เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติจนกลายเป็นผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ขั้น Advanced สามารถแบ่งได้เป็น 7 ขั้น ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 ไม่มีความบกพร่อง

ขั้นที่ 2 การคิด การรับรู้แย่ลงน้อยมาก

ขั้นที่ 3 การคิด การรับรู้แย่ลงเล็กน้อย

ขั้นที่ 4 การคิด การรับรู้แย่ลงปานกลาง

ขั้นที่ 5 การคิด การรับรู้แย่ลงค่อนข้างรุนแรง

ขั้นที่ 6 การคิด การรับรู้แย่ลงรุนแรง

ขั้นที่ 7 การคิด การรับรู้แย่ลงอย่างรุนแรงมาก

อย่างไรก็ตามระยะทั้ง 7 ขั้นนี้ เป็นเพียงแนวทางทั่วไปเท่านั้น อาการของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มักแตกต่างกันมากในแต่ละราย

พยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ [9]

ทางคลินิกสามารถแบ่งสาเหตุการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้เป็น 2 ข้อคือ

ก.) สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียโครงสร้างของเนื้อเยื่อสมอง

ข.) สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการขาดดุลเมแทบอลิซึมของสารสื่อประสาท

ก.) สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียโครงสร้างของเนื้อเยื่อสมอง

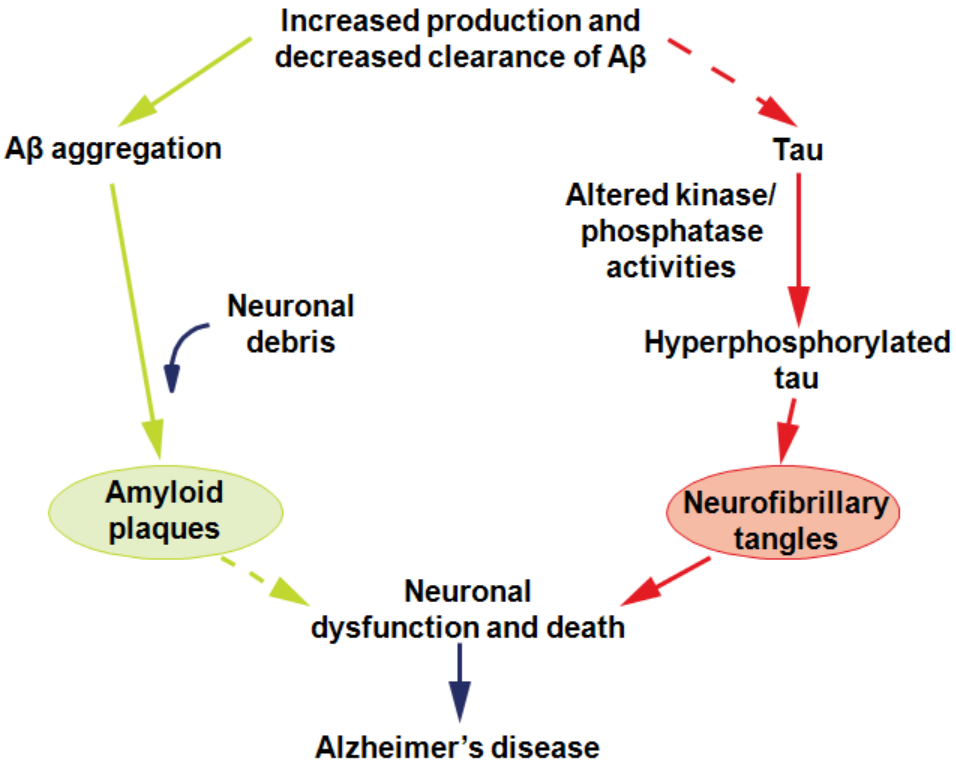
ลักษณะที่สำคัญที่ถือเป็นรอยโรคซึ่งพบในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์คือ ซีไนล์ หรือ นิวริติก พลาก (neuritic plaques; NPs) นิวโรไฟบริลลารีแทงเกิล (neurofibrillary tangles; NFTs) และการสูญเสียเซลล์ประสาท ทำให้เกิดสมองฝ่อในบริเวณนั้นๆ นิวริติก พลากและนิวโรไฟบริลลารีแทงเกิล พบได้บ้างในสมองผู้สูงอายุปกติ แต่จะพบในปริมาณที่มากกว่าในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

1. นิวริติกพลาก (neuritic plaques, senile plaques, amyloid plaques)

Neuritic Plaques เป็นคราบโปรตีนนอกเซลล์ประสาท ประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีนแอมีลอยด์บีต้า (beta amyloid; Aβ) ที่แกนกลาง ล้อมรอบด้วย axon ที่ฝ่อตัว, microglia และ astrocytes พบได้ทั่วไปในสมอง มีพิษต่อประสาท การสะสมของแอมีลอยด์บีต้าจนทำให้เกิดเป็น neuritic plaques นี้เชื่อว่าเป็นสาเหตุหลักของโรคอัลไซเมอร์

2. นิวโรไฟบริลลารีแทงเกิล (neurofibrillary tangles)

Neurofibrillary tangles เป็นซากโปรตีนเทา (tau protein) ที่ผิดปกติ พบในเซลล์ประสาทซึ่งรบกวนการทำงานของเซลล์ โปรตีนเทา หรือ microtubule-associated protein-2 (MAP-2) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับไมโครทิวบูล เมื่อโปรตีนเทาผ่านกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟส (phosphorylation) ที่มากผิดปกติ และเกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตนี้กับโปรตีน Tau ปกติสายอื่นๆ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง neurofibrillary tangles สะสมในเซลล์ประสาท และรบกวนระบบการขนส่งของเซลล์ประสาท



รูปที่ 1 ขั้นตอนแสดงบทบาทของ Aβ และโปรตีนเทา ที่นำไปสู่โรคอัลไซเมอร์[10]

(ที่มา: Citron, 2004. Potential role of beta-amyloid and the tau cascade in AD. Nature Reviews: Neuroscience. 5: 677–685.)

ข.) สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการขาดดุลเมแทบอลิซึมของสารสื่อประสาท

ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบความบกพร่องของสารสื่อประสาทดังต่อไปนี้

1. Acetylcholine ลดลง

สารสื่อประสาท acetylcholine (ACh) เป็นสารสื่อประสาทที่จำเป็นสำหรับหน้าที่เกี่ยวกับความจำระยะสั้น (Short-term memory)

การวิจัยในช่วงปี ค.ศ.1970 ระบุว่า การสูญเสียเอนไซม์ choline acetyltransferase (ChAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ acetylcholine จะทำให้ปริมาณ acetylcholine ลดลงนำไปสู่การสูญเสียการทำงานด้านการคิดและการรับรู้ โดยเฉพาะกับความจำระยะสั้น จากสมมติฐานนี้นำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนายาสำหรับโรคอัลไซเมอร์ คือ acetylcholinesterase inhibitor เพื่อลดการทำลาย acetylcholine ที่ cholinergic synapse ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของ acetylcholine นานขึ้น

2. Glutamate มากเกินไป

มีสมมติฐานที่ว่า สารสื่อประสาท glutamate จะมีความผิดปกติในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ กล่าวคือ มี glutamate เพิ่มขึ้น ทำให้มีการกระตุ้นตัวรับ N-Methyl-D-Aspartate (NMDA receptor) มากเกินจากสารสื่อประสาท glutamate จนอาจมีบทบาทในการเกิดโรคอัลไซเมอร์

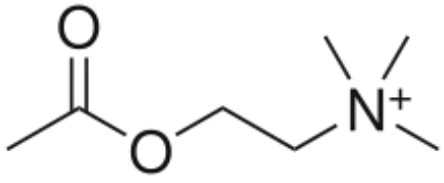
3. สารสื่อประสาทอื่นๆ

สารสื่อประสาทอื่นๆที่บกพร่องได้แก่ serotonin, dopamine และ norepinephrine ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพฤติกรรมที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

<u>สารสื่อประสาท Acetylcholine</u>

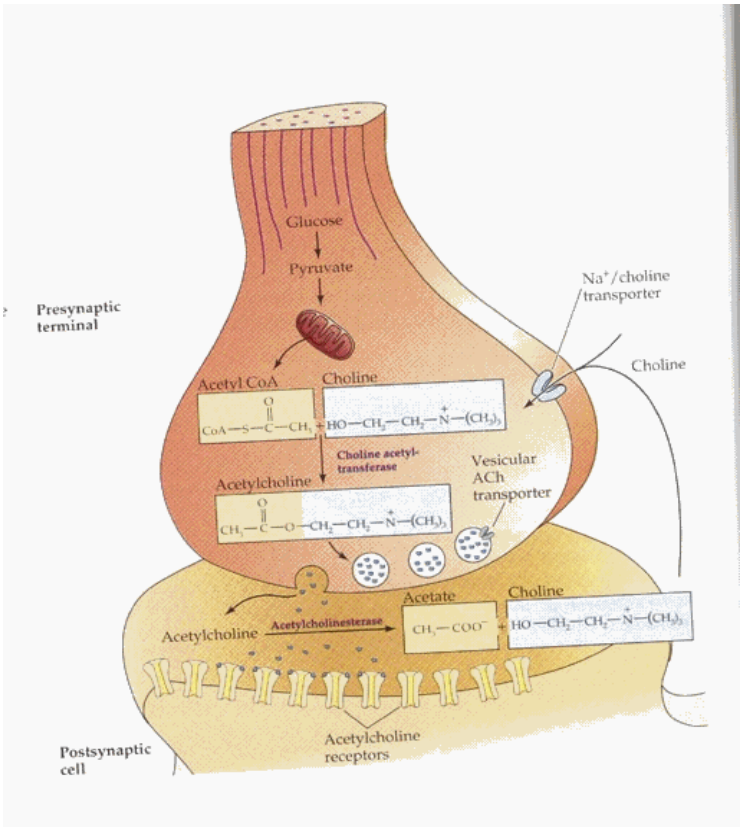
Acetylcholine เป็นสารสื่อประสาทที่ถูกหลั่งจากปลายประสาท มีคุณสมบัติทั้งกระตุ้นและยับยั้งระบบประสาท ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวรับ (receptor) เป็นตัวส่งสัญญาณที่บริเวณ neuro-muscular junction ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการ synapse ระหว่างเซลล์ประสาท

พยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ที่ทราบอย่างแน่ชัด คือ การลดลงของเอนไซม์ ChAT ใน cerebral cortex และ hippocampus 40-90% ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ตามมา



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Acetylcholine

(ที่มา: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/21/Acetylcholine.svg/220px-Acetylcholine.svg.png)

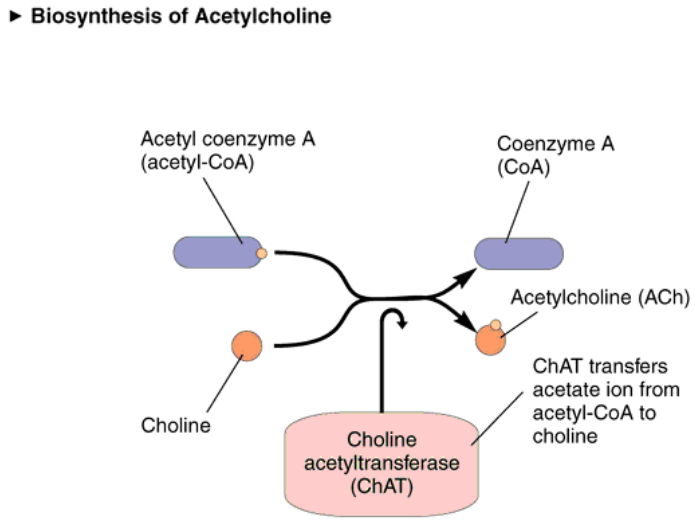


รูปที่ 3 ภาพรวมของสารสื่อประสาท Acetylcholine ตั้งแต่ขั้นตอนการสังเคราะห์จนถึงการทำลาย (ที่มา: http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/NeuroT/Image8.gif)

การสังเคราะห์ acetylcholine (biosynthesis of acetylcholine)

การสังเคราะห์ acetylcholine เกิดขึ้นที่บริเวณปลายประสาทและที่บริเวณตัวเซลล์ประสาท โดยเริ่มต้นจาก acetyl group ของ acetyl-coenzyme A ถูกส่งมารวมตัวกับ choline กลายเป็น acetylcholine โดยเอนไซม์ ChAT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ acetylcholine

Acetyl-coenzyme A ได้มาจากกระบวนการ metabolism ของ glucose ในกระบวนการ pyruvate ส่วน choline ได้จากอาหาร เช่น ไข่แดง ตับ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง จมูกข้าว ข้าวโอ๊ต กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก เนื้อสัตว์ ปลา ฯลฯ หรือจากการนำกลับมาใช้ใหม่ (recycle) choline ที่แยกออกจากการทำลาย acetylcholine และรับกลับเข้ามาใช้ใหม่ผ่านทาง Na^+/choline transporter



รูปที่ 4 การสังเคราะห์สารสื่อประสาท acetylcholine

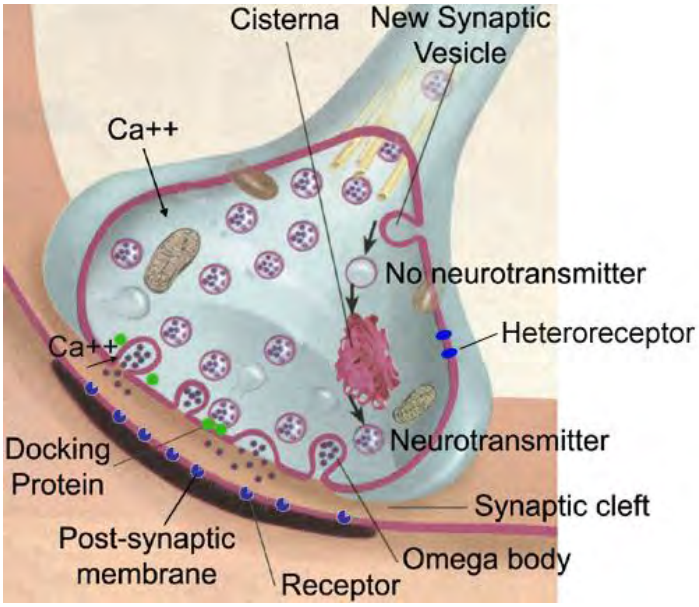
(ที่มา: http://homepage.psy.utexas.edu/homepage/class/Psy308/Salinas/Neurotransmitters/Transmitters.html)

การเก็บ acetylcholine (storage of acetylcholine) [11]

Acetylcholine ที่ผลิตออกมาโดยผ่านเอนไซม์ ChAT จะถูกนำมาเก็บไว้ใน vesicle ที่อยู่บริเวณปลายแอกซอน (axon) โดย vesicular cholinergic transporter (VAChT) ที่มีกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ประสาทบริเวณสมอง

การหลั่งสารสื่อประสาท acetylcholine

เมื่อมีกระแสประสาทวิ่งมาถึงปลายประสาท จะเกิดการเปิดของ calcium channel ทำให้ Ca^{2+} เข้าไปในปลายประสาท แล้วเกิดการส่งสัญญาณกระตุ้น vesicle ที่มี acetylcholine อยู่ภายใน สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วหลั่ง acetylcholine ออกมาจาก presynaptic neuron โดยกระบวนการ exocytosis ผ่านช่องว่าง synapse ไปจับกับ postsynaptic receptor ที่อยู่บนผิวของ postsynaptic neuron

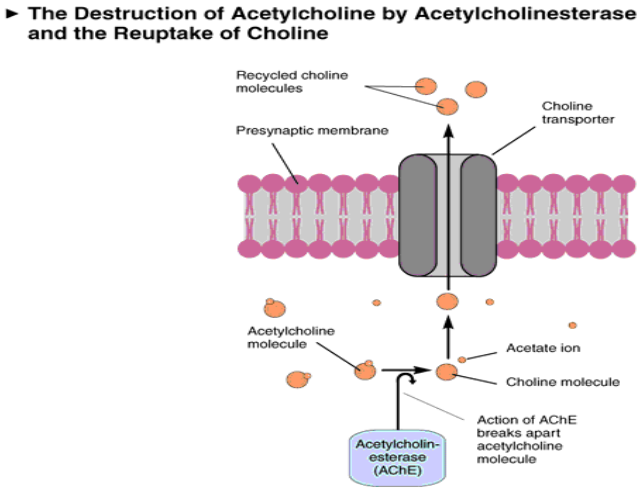


รูปที่ 5 การหลั่งสารสื่อประสาท acetylcholine

(ที่มา: http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3730/image/figure4-9.jpg)

<u>การทำลาย acetylcholine (destruction of acetylcholine)</u>[11]

ภายหลังจากการจับกับ postsynaptic receptor แล้ว acetylcholine จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ acetylcholinesterase (AchE) ที่บริเวณ synaptic cleft ได้เป็น choline และ acetic acid



รูปที่ 6 การทำลายสารสื่อประสาท acetylcholine

(ที่มา: http://homepage.psy.utexas.edu/homepage/class/Psy308/Salinas/Neurotransmitters/Transmitters.html)

อุบัติการณ์ของโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทย [2]

ข้อมูลสถิติสุขภาพของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข [1] ตั้งแต่ปี 2542 – 2552 พบว่าอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ของผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก เพิ่มขึ้นจาก 94.31 คนต่อแสนคน เป็น 218.85 คนต่อแสนคน และจาก 36.40 คนต่อแสนคน เป็น 44.93 คนต่อแสนคน ตามลำดับ

รูปที่ 7 อัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ของผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2542 ถึง 2552[2]

การรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ยาที่ใช้รักษา และหลักการใช้ยา [12]

การรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์โดยการใช้ยาจะช่วยชะลอความเสียหายของสมองจากพยาธิสภาพของโรคและการบรรเทาความรุนแรงของโรคให้เป็นไปในทางที่ดีขึ้น ซึ่งการรักษาโรคอัลไซเมอร์มักใช้หลักการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันในการรักษาอาการต่างๆของโรคอัลไซเมอร์ การรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 2 แนวทาง คือ

1. การรักษาโดยใช้ยา (pharmacologic therapy)

ยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์มี 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ยากลุ่ม acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) และ NMDA Receptor Antagonist

◆ **Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI)**

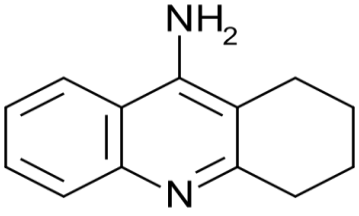
ยากลุ่ม AChEI มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ยับยั้งการทำลาย acetylcholine โดยการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ที่ synaptic cleft

ยากลุ่มนี้ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่อาการของโรคไม่รุนแรงถึงรุนแรงปานกลาง และแพทย์มักใช้ยากลุ่มนี้กับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ทุกราย ยากลุ่มนี้จะช่วยฟื้นฟูความสามารถทางสติปัญญาของผู้ป่วยและมีผลดีต่อการดำเนินกิจวัตรและพฤติกรรม แต่การรักษาด้วยยากลุ่มนี้เป็นการรักษาแบบประคับประคอง ไม่ใช่การรักษาให้หายขาด ผลข้างเคียงจากการใช้ยาส่วนใหญ่เป็นความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร

ยาในกลุ่ม AChEI ที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์มีดังต่อไปนี้

Tacrine (Tetrahydroamioacridine) เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ AChE แบบผันกลับได้โดยการจะออกฤทธิ์นานกว่า physostigmine เมื่อให้โดยการรับประทาน มีฤทธิ์ในการเพิ่มระดับ Ach ในcerebral cortex และช่วยบรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ได้เมื่อให้ในขนาดที่เหมาะสม

Tacrine ไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร เนื่องจากเป็นอันตรายต่อตับ และก่อให้เกิดภาวะดีซ่าน

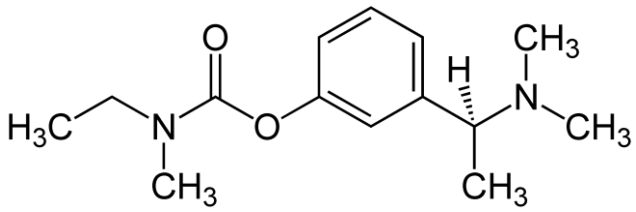


รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ tacrine

ที่มา: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Tacrine.svg/500px-Tacrine.svg.png

Donepezil เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ AChE แบบผันกลับได้ ดูดซึมได้ดีเมื่อให้โดยการรับประทาน สามารถให้รับประทานพร้อมอาหารหรือไม่ก็ได้ เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาผ่าน cytochrome P-450 (isoenzyme 2D6 และ 3A4) ดังนั้นยาที่ยับยั้ง CYP2D6 และ 3A4 จะทำให้ระดับ donepezil ในร่างกายเพิ่มขึ้น ยานี้จะถูกขับออกทางไตในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง และมีค่าครึ่งชีวิตภายในร่างกายนานถึง 72 ชั่วโมง

ผลข้างเคียงที่สำคัญของ donepezil คือ ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ ท้องเสีย, อาการนอนไม่หลับ, เหนื่อย และมีอาการปวดเกร็งกล้ามเนื้อ

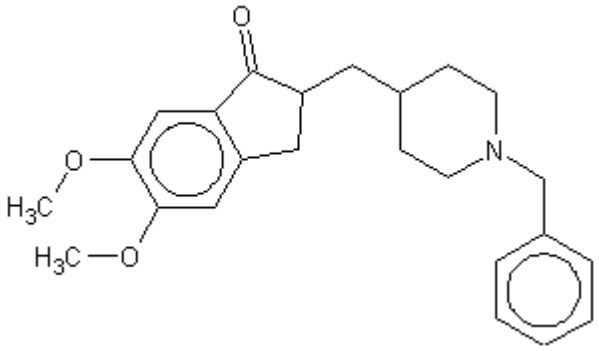


รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ donepezil

(ที่มา: http://www.ganfyd.org/images/7/75/Donepezil.png)

Rivastigmine เป็นยาที่มีคุณสมบัติที่เรียกว่า pseudoirreversible กล่าวคือยับยั้งเอนไซม์ AChE แบบผันกลับได้อย่างช้าๆ มักจะให้ผู้ป่วยรับประทาน 2 ครั้งต่อวัน

ผลข้างเคียงของยานี้ ได้แก่ คลื่นไส้อาเจียน ท้องเสีย ไม่อยากอาหาร ทำให้น้ำหนักตัวลดลง การเพิ่มขนาดของยาจะเป็นการเพิ่มผลข้างเคียงของยาให้มากขึ้น



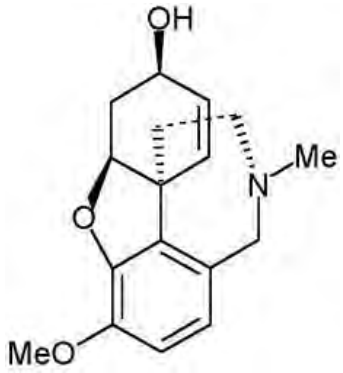
รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ rivastigmine

(ที่มา:http://rpmedia.ask.com/ts?u=/wikipedia/commons/thumb/9/92/Rivastigmine_Structural_Formulae.png/220px-Rivastigmine_Structural_Formulae.png)

Galantamine เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ AChE แบบผันกลับได้ถูก metabolize ที่ตับโดยผ่าน cytochrome P450 (isoenzyme 2D6 และ 3A4) ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดอันตรกิริยากับยาชนิดอื่นที่ metabolize ผ่าน pathway เดียวกัน ซึ่งจะส่งผลให้ยาตัวอื่นมีฤทธิ์ลดลง

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ายาตัวนี้มีความเป็นพิษต่อตับ galantamine มีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารมากกว่า donepezil แต่น้อยกว่า rivastigmine นอกจากนี้แล้วยังมีผลข้างเคียงอื่นที่สำคัญได้แก่ อาการวูบ,กล้ามเนื้อหดเกร็ง และอาการนอนไม่หลับ

Galantamine มีค่าครึ่งชีวิตค่อนข้างสั้นคือ 5-7 ชั่วโมง นิยมให้ผู้ป่วยรับประทานวันละ 2 ครั้ง โดยระยะเริ่มแรกจะให้ผู้ป่วยรับประทาน 4 มิลลิกรัมต่อวัน แล้วจึงเพิ่มขนาดเป็น 8 และ 12 มิลลิกรัมต่อวันตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 อาทิตย์ และไม่ควรให้ผู้ป่วยรับประทานยาเกินกว่า 16 มิลลิกรัมต่อวัน เพราะอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคตับและโรคไต



รูปที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ galantamine

(ที่มา: http://www.biopsychiatry.com/galantamine/galantamine.jpg)

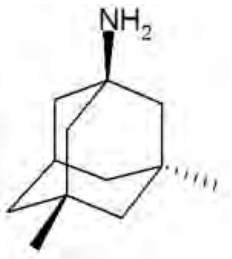
ยากลุ่ม AChEI มีประสิทธิภาพในการรักษาเกี่ยวกับภาวะความจำเสื่อมได้ รวมทั้งอาการที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมของผู้ป่วยเป็นอย่างดี แต่ยากลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารคือ ทำให้เกิดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงห้ามใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้แล้วยังห้ามใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการหอบหืดอย่างรุนแรงและผู้ป่วยที่เป็น COPD (chronic obstructive pulmonary disease)

◆ N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist

Glutamate เป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง โดยจับกับ NMDA receptor ซึ่งเป็น ionotropic glutamate receptor ถ้ามี glutamate มาก

จนเกินไปจะก่อให้เกิดการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางมากจนเกินไป ทำให้เกิดภาวะ excitotoxicity คือ ภาวะที่สมองถูกกระตุ้นมากจนเกินไปจนเซลล์ประสาทเสื่อมสภาพและตายในที่สุด นำไปสู่การภาวะอัลไซเมอร์ ยาที่ขัดขวางการทำงานของ NMDA receptor มีหลายชนิด ได้แก่ amantadine, rimantadine, ketamine, dextromethorphan แต่ยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์โดยตรงในกลุ่มนี้มีเพียงตัวเดียว คือ memantine

Memantine มีกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ ยับยั้งการทำงานของ NMDA receptor และช่วยลดการไหลเข้าของ Cation เช่น Ca^{2+} โดยไป block ที่ Ca^{2+}channel ทำให้ระบบประสาทถูกกระตุ้นจากการจับของ glutamate กับ NMDA receptor ลดลง จึงช่วยชะลออาการของโรคได้



รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ memantine

(http://66.197.58.78/pics/Memantine_1.png)

สารและสมุนไพรอื่นๆที่ใช้โรคอัลไซเมอร์

นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามค้นหาสารหรือแหล่งธรรมชาติที่อาจช่วยเสริมการรักษาอัลไซเมอร์ได้ ซึ่งโดยมาจะยังมีการศึกษาไม่มากนัก และยังอยู่ในขั้นทดลองก่อนระดับคลินิก ดังที่ได้สรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปยาสมุนไพรและสารอาหารที่ใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์[13]

สาร หรือ สมุนไพร	ข้อดี	ข้อเสีย
Acetyl L-carnitine	- สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ง่าย - เสริมฤทธิ์ acetylcholine - กำจัด metabolite ที่เป็นพิษจาก mitochondria - ยับยั้งอนุมูลอิสระ - เพิ่มปริมาณ growth factor ของระบบประสาท - ลดการสร้าง beta amyloid - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	ยังมีการศึกษาไม่มาก
Alpha-lipoic acid	- เพิ่มปริมาณ acetylcholine และ glucose - สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ง่าย - มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่แรงทั้งภายในและภายนอกเซลล์ - สามารถสร้างตัวเองใหม่ได้ - ลดการอักเสบ - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	มีการศึกษาการใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์น้อย
Coenzyme Q10	- ปกป้อง mitochondria และส่งเสริมการสร้างพลังงาน - ลดความเครียดแบบ oxidative, ปริมาณ beta amyloid, การตายของเซลล์แบบ apoptosis และการฝ่อของสมอง - อนุพันธ์สังเคราะห์ idebenone ผ่าน blood brain barrier ได้ดีกว่า - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	- การศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเซลล์ประสาทแทนที่จะเป็นโรคอัลไซเมอร์ - ผลการศึกษา idebenone บางการศึกษาไม่พบผลดีต่อความจำ

Ginko biloba	- มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant และสารต้านการอักเสบ - สามารถชะลอการตายของเซลล์ - ผู้ป่วยทนยาได้ดี - มีการศึกษาสนับสนุนว่ามีผลดีต่อความจำ	ได้ผลกับโรคอัลไซเมอร์ แต่ไม่ได้ผลกับโรคความจำเสื่อมอย่างอ่อน (mild cognitive impairment) และไม่สามารถลดความเสี่ยงการเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้
Huperzine A	- สามารถยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์ของ acetylcholine - ลดการทำลายเซลล์แบบ oxidative, พิษจากการกระตุ้นเซลล์ และการตายแบบ apoptosis - สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ดีกว่า cholinesterase inhibitors - ผู้ป่วยทนยาได้ดี - มีผลดีต่อความจำ	การศึกษามีไม่มาก
Melatonin	- มีคุณสมบัติเป็น antioxidant - ปกป้อง mitochondria - ลดปริมาณ tau tangle และลดผลพิษของ beta amyloid	มีการศึกษาน้อย และยังไม่มีคุณภาพ
Omega-3 fatty acid	- มีฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์มากแต่ไม่จำเพาะกับโรคอัลไซเมอร์ - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	มีการศึกษาน้อย
Panax ginseng	- มีคุณสมบัติปกป้องเซลล์ประสาท ตัวอย่างเช่น ลดปริมาณ beta amyloid - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	ยังมีการศึกษาในมนุษย์ไม่มาก และวิธีการศึกษายังไม่ได้มาตรฐาน

Phosphatidylserine	- เป็นสารสำคัญในกระบวนการสื่อประสาท, การทำงานของ mitochondria, และ cell metabolism - อาจสามารถเสริมฤทธิ์ของ growth factor ของระบบประสาท - เพิ่มปริมาณ acetylcholine - ยับยั้ง beta amyloid - ผู้ป่วยทนยาได้ดี	- ยังไม่มีการศึกษาที่ได้ผลบวกจากการใช้ phosphatidylserine จากวัว - ส่วนการศึกษาซึ่งใช้ phosphatidylserine จากถั่วเหลือง ผลการศึกษายังคลุมเครือ
Polyphenols	Curcumin และ resveratrol มีคุณสมบัติปกป้องเซลล์ประสาทอย่างน้อย 10 ข้อ ตัวอย่างเช่น ยับยั้งความเครียดแบบ oxidative, การอักเสบ, beta amyloid เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลดีต่อความจำ และผู้ป่วยสามารถทนยาได้ดี	- Curcumin มี bioavailability ต่ำเมื่อไม่มี bioavailability enhancer - การใช้ Resveratrol ในการรักษาโรค อัลไซเมอร์ยังมีการศึกษาในมนุษย์น้อย
Vitamins and minerals	- ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มักมีระดับวิตามินและแร่ธาตุต่ำ พบว่าการเสริมวิตามินและแร่ธาตุมีผลดี โดยเฉพาะวิตามินอี, lithium, และสารอาหารรวมบางชนิด	- ยังมีการศึกษาไม่พอที่จะได้ข้อสรุป
Withania somnifera	- มีคุณสมบัติปกป้องเซลล์ประสาท ตัวอย่างเช่น ลดการอักเสบ, oxidation, ลดปริมาณไอออนแคลเซียม, beta amyloid, achetylcholinesterase, และการตายของเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถฟื้นฟู synapse ได้	ยังไม่มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

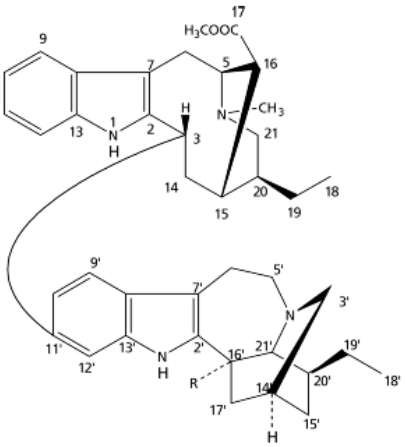
2. การรักษาโดยไม่ใช้ยา (Nonpharmacologic therapy)

นอกเหนือจากการใช้ยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์แล้ว ยังสามารถรักษาผู้ป่วยโดยไม่ใช้ยา โดยการจัดการสิ่งแวดล้อมรอบๆตัวของผู้ป่วยให้มีความเหมาะสม ปลอดภัย มั่นคง และสะดวกสบาย ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นสำหรับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ บรรยากาศรอบๆตัวของผู้ป่วยควรจะสงบ เรียบง่าย สถานที่พักฟื้นของผู้ป่วยต้องไม่กว้างใหญ่จนเกินไป และปราศจากความตึงเครียด โดยผู้ป่วยควรจะมีผู้ดูแลอย่างใกล้ชิด ผู้ดูแลผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะต้องได้รับการอบรมทักษะในการดูแลผู้ป่วยมาเป็นอย่างดี และมีความเห็นอกเห็นใจผู้ป่วย ทั้งทางด้านร่างกาย จิตใจ และภาวะอารมณ์ที่เปลี่ยนแปลงไป อดทนและดูแลผู้ป่วยด้วยความเต็มใจ ผู้ดูแลมีหน้าที่ในการจัดตารางกิจกรรมประจำวันให้กับผู้ป่วย เช่น การออกกำลังกาย เพื่อให้ผู้ป่วยรู้สึกสดชื่น กระปรี้กระเปร่าอยู่ตลอดเวลา และไม่หลับในช่วงกลางวัน เพื่อให้การนอนในตอนกลางคืนมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น รวมทั้งการจดบันทึกช่วยจำให้กับผู้ป่วย การเขียนข้อความบอกไว้บนสิ่งของที่จำเป็น หรือสิ่งที่ผู้ป่วยหยิบใช้บ่อยๆ ว่าสิ่งนี้คืออะไร ใช้เมื่อไหร่ เป็นต้น และไม่นำข้าวของเครื่องใช้ที่เป็นอันตรายต่อผู้ป่วยมาไว้ใกล้ตัวผู้ป่วยด้วย นอกจากนี้ การรับประทานอาหารของผู้ป่วย ผู้ดูแลควรให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ และมีสารอาหารครบถ้วนอีกด้วย

แนวทางการวิจัยเพื่อค้นพบยาใหม่จากธรรมชาติในการรักษาอัลไซเมอร์

การวิจัยเพื่อค้นหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและทำให้ทราบว่าสารสกัดจากสมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChEได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างเช่นสารสกัดเมทานอลจากรากของ *Stephania suberosa* (บอระเพ็ดพุงช้าง) และ *Tabernaemontana divaricata* (พุดจีบ) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้เกินกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mlนอกจากนี้สารสกัดเมทานอลจากลำต้นของ *Piper interruptum* (สะค้าน) เมล็ดของ *Piper nigrum* (พริกไทย) เปลือกรากของ *Butea superba* (กวาวเครือแดง) และรากของ *Cassia fistula* (ราชพฤกษ์) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้ 50-65% ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เช่นเดียวกัน[14]

ต่อมามีการนำสารสกัดเอทานอลจากรากของ *Tabernaemontana divaricata* มาทำ bioassay-guided fractionation โดยใช้ Ellman colorimetric method ในการพิจารณาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE และพบว่าสามารถแยกสารประเภท bis-indole alkaloids ได้ 2 ชนิดคือ 19,20-dihydrotabernamine และ 19,20-dihydroervahanine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้มากกว่า galanthamine (รูปที่ 13) และพบว่าการแทนที่ที่คาร์บอน 11', 12' และ 16' อาจมีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ [15] นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาในสัตว์ทดลองของสารสกัดเอทานอลจากราก *T. divaricata* ที่น่าสนใจคือพบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ในประสาทหนู rat แบบผันกลับได้ [16] และการให้สารสกัดเอทานอลจากราก *T. divaricata* ทางปากแก่หนูmice ก่อนจะชักนำให้เกิดความบกพร่องทางความจำโดย amyloid beta25-35 peptides พบว่าสามารถป้องกันการเกิดความบกพร่องทางความจำนั้นได้โดยสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE [17]

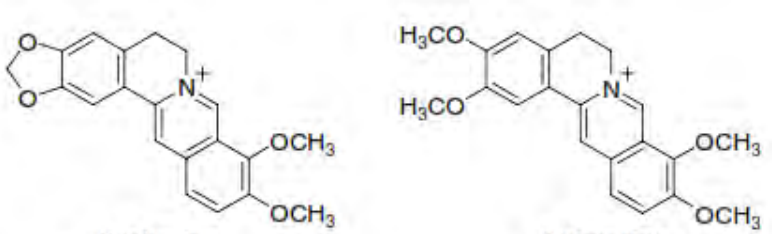


19,20-dihydrotabernamine ;R=H

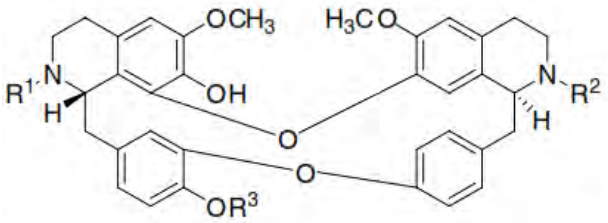
19,20-dihydroervahanine ;R=$COOCH_3$

รูปที่ 13 โครงสร้างสาร 19,20-dihydrotabernamine และ19,20-dihydroervahanine

นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารจากพืชที่มีโครงสร้างเป็น simple rigid isoquinoline อย่างสารในกลุ่ม protoberberine alkaloids เช่น berberine and palmatine (รูปที่ 14) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE [18] และมีสารในกลุ่ม bisbenzylisoquinoline (BBIQ) alkaloidsหลายตัว เช่น fangchinoline, atherospermoline, และ fenfangjine E (รูปที่ 15) ซึ่งสกัดแยกได้จากรากของ *Stephania tetrandra* S. Moore ในวงศ์ Menispermaceae ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ในความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์[19]



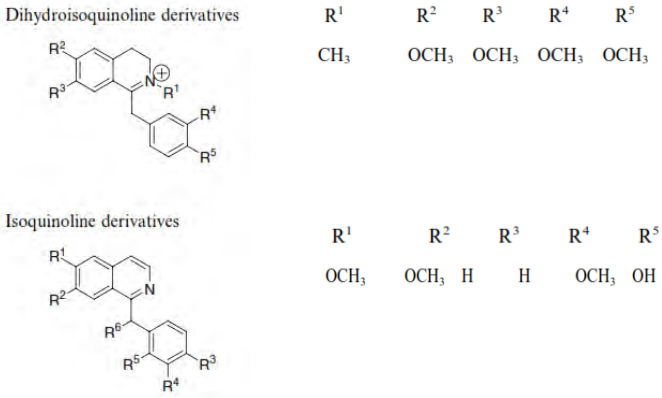
รูปที่ 14 โครงสร้างตัวอย่างสารในกลุ่ม protoberberine alkaloidsที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE



Compound	R^1	R^2	R^3
Fangchinoline	CH_3	CH_3	CH_3
Atherospermoline	CH_3	CH_3	H
Fenfangjine E	CH_3	H	CH_3

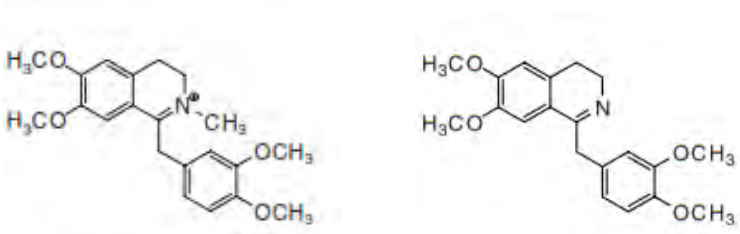
รูปที่ 15 โครงสร้างตัวอย่างสาร bisbenzylisoquinoline alkaloids ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE

ดังนั้นเป็นไปได้ว่า monomeric moiety ของ bisbenzylisoquinoline alkaloid อาจจำเป็นต่อการยับยั้งเอนไซม์ AChE และพบว่าอนุพันธ์ของ simple substituted monomeric 1-benzylisoquinoline แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยเฉพาะสารประกอบ 2 ตัวที่สารหนึ่งเป็นสารในกลุ่ม dihydroisoquinoline derivatives และอีกตัวเป็นสารในกลุ่ม isoquinoline derivatives (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 โครงสร้างตัวอย่างสารในกลุ่ม dihydroisoquinoline derivatives และกลุ่ม isoquinoline derivatives ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ดี

ต่อมามีการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างและฤทธิ์ (structure–activity relationship; SAR) ของระบบ isoquinoline ring ในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChEI) ซึ่งพบว่ามีสารประกอบ dihydroisoquinoline ring analog 2 ตัวที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่แรง (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 โครงสร้างสารประกอบ dihydroisoquinoline ring analogที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่แรง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

พืชสมุนไพร

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 53 ตัวอย่างพร้อมกำหนดหมายเลขตัวอย่างจากพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีฯ (อพ.สธ.)ที่บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นจึงค้นหาชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชนั้นจากแหล่งข้อมูลอิเล็กโทรนิกส์ของสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ตัวอย่างพืชที่นำมาทดลองแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 รายชื่อพืชที่นำมาทดลอง

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	หมายเลขตัวอย่างดิบ
1	แจง	*Maerua siamensis*	ใบ	A1 ใบ
2	แจง	*Maerua siamensis*	เปลือก	A1 เปลือก
3	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	ใบ	A2 ใบ
4	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	กิ่ง	A2 กิ่ง
5	ผกากรอง	*Lantana camara*	เถา	A3
6	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	ใบ	A4 ใบ
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	A4 กิ่ง
8	หนามพรม/ พรม / ขี้แฮด	*Carissa cochinchinensis*	ใบ , กิ่ง	A5
9	ลำบิดดง	*Diospyros filipendula*	ใบ	A6
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	A7
11	จำปีแขก/ขนาน/ลำป้าง/จำปาเทศ	*Pterospermum littorale*	ใบ	A8
12	พลับพลา	*Microcos tomentosa*	ใบ	A9
13	ช้ามะขามป้อม/แขนงพร้อย/ค่างเต้น	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	A10
14	ชำมะเลียงป่า	*Lepisanthes fruticosa*	ใบ	A11

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	หมายเลขตัวอย่างดิบ
15	ถอบแถบเครือ/จำเพาะ/ขางขาว	*Connarus semidecandrus*	ใบ	A12
16	สวองตีนนก/ตีนนก/สมอตีนนก/กาสามปีก	*Vitex pinnata*	ใบ	A13
17	ช้างน้าว/กระแจะ/ตาลเหลือง	*Ochna integerrina*	ใบ	A14
19	มะเกลือกา/มะเกือกา/สล้างตัวผู้/ดำดง	*Diospyros rubra*	ใบ	A17
20	นมแมวป่า/น้ำเต้าน้อย	*Cyathostemma micranthum*	เถา	A18 เถา
21	นมแมวป่า/น้ำเต้าน้อย	*Cyathostemma micranthum*	ใบ	A18 ใบ
22	มวกกอ/คำไก่/แดงเขา	*Olea salicifolia*	ใบ	A19
23	พะวา/ขวาด/วาน้ำ	*Garcinia speciosa*	ใบ	A20
24	โปร่งกิ่ว/ติดต่อ	*Dasymaschalon lomentaceum*	ใบ	A21
25	พรวด/พลองแก้มอ้น	*Memecylon lilacinum*	ใบ	A23/A24
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	A25
27	หญ้าหวาน	*Stevia rebandiana*	ใบ	A26
28	หมอน้อย/สามโสก/อ้อยช้าง/หัสคุณ	*Clausena excavate*	ใบ	A27
29	แสม	*Avicennia marina*	ใบ	A28
30	ข่อยหิน/พุดผา	*Gardenia collinsae*	ใบ	A29
31	ยอป่า	*Morinda coreia*	ใบ	A30
32	คันทรง	*Colubrina asiatica*	ใบ	A31
33	ขี้หนอน	*Zolling dongnaiensis*	ผล	A32
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	A33
35	มะกา	*Bridelia ovate*	ผล	A34
36	ประยงค์ใบใหญ่	*Aglaia odorata*	ใบ	A35
37	ตำลึง	*Coccinia grandis*	เถา	A36
38	สำมะงา/สำมะง่า/เขี้นวงู/สำปันนา/สักขรีย่าน	*Clerodendrum inerme*	ใบ	A37
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	B4
40	พลองใบเล็กบาง/พลองขี้ใต้	*Memecylon panciflorum*	ใบ	B5
41	ตะแบกเกรียบ	*Lagerstroemia balansae*	ใบ	B9

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	หมายเลขตัวอย่างดิบ
42	เม่าเหล็ก/ข้าวเม่าเหล็ก	*Diospyros toposia*	ใบ	B12
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	B151
44	แข้งไก่	*Megalaspis cordyla*	ใบ	B162
45	ปอแดง	*Sterculia guttata*	ใบ	B19
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	B20
47	มะพลับใหญ่	*Diospyros malabarica*	ใบ	B21
48	เขลง/หยี	*Dialium cochinchinense*	แก่น	B22 แก่น
49	เขลง/หยี	*Dialium cochinchinense*	ใบ	B22 ใบ
50	ขันทองพยาบาท	*Suregada multiflorum*	ใบ	B23
51	มะกล่ำตาหนู	*Abrus precatorius*	ใบ	B24
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	B25
53	พ้อ/กะพ้อ/กะพ้อหนาม	*Licuala spinosa*	ใบ	B26

สารเคมี

- Dimethylsulphoxide [$(CH_3)_2SO$; DMSO] A.R.; Lab-scan, Bangkok, Thailand, Batch No. 98020017
- Dipotassium hydrogen phosphate[K_2HPO_4]; Carlo Erba , Milan, Italy, Cod.471786
- Potassium dihydrogen phosphate [KH_2PO_4]; Fluka, Switzerland, Analysis number: 299006191
- 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) [[-$SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$; DTNB] Sigma ,USA
- Acetylthiocholine iodide [$CH_3COSCH_2CH_2N(CH_3)_3I$; ACTI] Sigma ,USA Lot No.BCBD5157V
- Tacrine [9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate] USA, Aldrich Lot No.07220AV
- Deionized water จากเครื่อง Maxima ultra pure water บริษัท ELGA
- Acetylcholinesterase from Electrophorus electricus (electric eel), Type VI-S, lyophilized powder, 200-1,000 units/mg protein. Sigma ,USA Lot No.041M7009V

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 96 wells microplates
- Mechanical pipette : Gilson pipette : 0.2-2 µl, 200-1000 µl
  Vipro : 5 – 50 µl,
  Thermo : 20 – 200 µl
- Centrifuge : MIKRO 22 R
- pH meter : ciberscan 510
- เครื่องชั่ง : Mettler Toledo AG 135
- Vortex : 2™ Genie
- Ultrasonic sonicator : Transsonic T570/H
- Dessicator
- Microplate Reader : Beckman ad200 และ Spectramax M5

<u>วิธีการที่ใช้ในการวิจัย</u>

การสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

1. หั่นตัวอย่างพืชที่เก็บมาเป็นชิ้นจากนั้นแช่หมักใน 95% เอทานอล (ethanol) 7 วัน
2. กรองสารสกัดของพืชที่ได้จากข้อ(1)จากนั้นระเหยสารสกัดของพืชให้แห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator
3. เก็บสารสกัดแห้งของพืชในภาชนะดูดความชื้น(dessicator)ที่อุณภูมิห้อง

วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AchE)[20]

* <u>การคัดกรองสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AchE (</u>Bruhlmann C et al.,2004)

1. เติมสารละลาย DTNB 0.15 mM ใน 0.1 M phosphate buffer หลุมละ200 µl ในทุกหลุม 96-wells microplate
2. กำหนดการทดลองเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่
   a) กลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ : สารละลาย DMSO 13.5% ใน 0.01 M phosphate buffer
   b) กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก : สารละลาย tacrine 10 µg/ml ใน 0.01 M phosphate buffer
   c) กลุ่มทดสอบที่ใช้สารสกัดจากพืช : สารละลายสารสกัดพืชตัวอย่างความเข้มข้น 13.5 mg/ml

เติมสารข้างต้นลงใน 96-wells microplate หลุมละ 20 µl และทำซ้ำกันชุดละ 3 หลุม (triplicate)

3. แบ่งสารแต่ละกลุ่มในข้อ (1) เป็นสองกลุ่มย่อยเพื่อควบคุมปัจจัยด้านสีของสารสกัดที่อาจรบกวนผลการทดลองคือ

i) กลุ่มทดสอบ : เติมสารละลาย AchE 0.5 U/ml ใน 0.01M phosphate buffer หลุมละ 20 µl

ii) กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบ(Blank) : เติม 0.01 M phosphate buffer 20 µl

4. เติมสารละลาย acetylthiocholine iodide 1.8 mM ใน deionized water หลุมละ 30 µl ในทุกหลุม 96-wells microplate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส (โดยการทำการทดลองในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศ) เป็นระยะเวลา 3 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

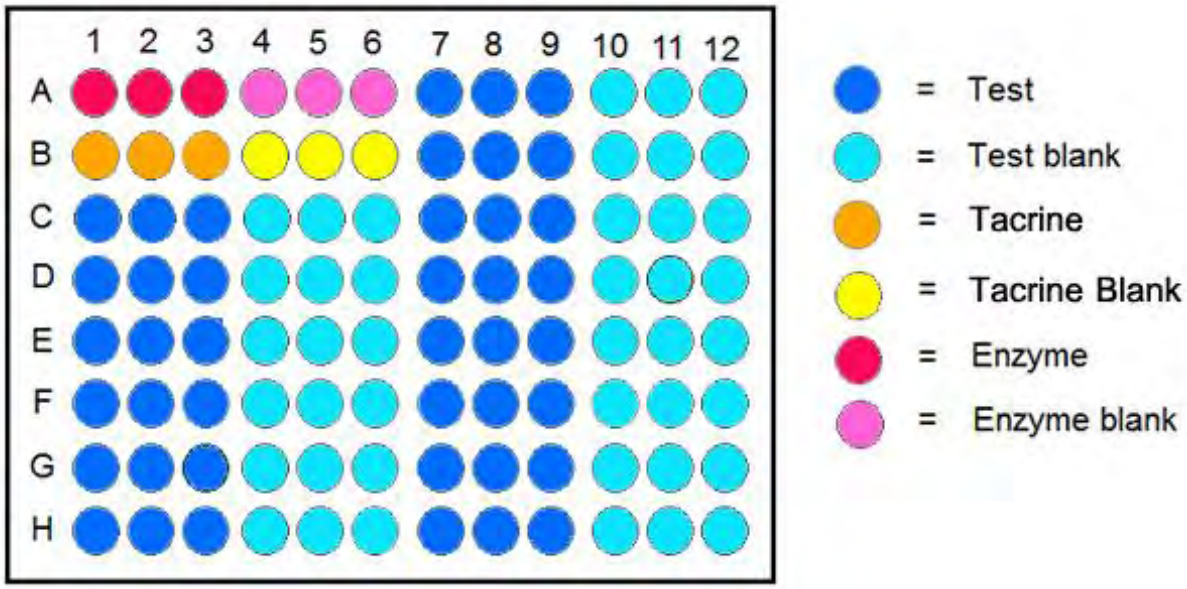
6. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE (% inhibition; %inh) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Enzyme} - \text{Enzyme blank}) - (\text{Test} - \text{Test blank})}{(\text{Enzyme} - \text{Enzyme blank})} \times 100$$

โดยกาหนดให้

Test	=	กลุ่มทดสอบที่ใช้สารสกัดจากพืช
Test blank	=	กลุ่มทดสอบที่ใช้สารสกัดจากพืชซึ่งเติม 0.01 M phosphate buffer แทน AchE
Enzyme	=	กลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ
Enzyme blank	=	กลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบซึ่งเติม 0.01 M phosphate buffer แทน AchE
Tacrine	=	กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก
Tacrine blank	=	กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกซึ่งเติม 0.01 M phosphate buffer แทน AchE

รูป 18 ตำแหน่งของกลุ่มการทดลองใน 96-wells microplate



ตาราง 3 ปริมาณและชนิดสารที่ใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

	ปริมาณที่เติม (µl)					
สารที่เติม	Test	Test blank	Tacrine	Tacrine blank	Enzyme	Enzyme blank
0.15mM DTNB	200	200	200	200	200	200
13.5 mg/ml sample	20	20	-	-	-	-
10 µg/ml tacrine	-	-	20	20	-	-
13.5 % DMSO	-	-	-	-	20	20
0.5 U/ml enzyme	20	-	20	-	20	-
0.01 M phosphate buffer	-	20	-	20	-	20
1.8 mM ACTI	30	30	30	30	30	30

*หมายเหตุ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวในหลุม

- 1 mg/ml สารสกัดจากพืชสมุนไพร
- 0.74 µg/ml tarcrine
- 1% DMSO
- 0.037 U/ml เอนไซม์ AchE
- 0.2 mM ACTI

* <u>การหาความแรงของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของ AchE</u>
นำสารละลายของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ความเข้มข้นมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้ายสารสกัดจากพืชสมุนไพรกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้ง AchE ได้ 50% (IC50) โดยใช้ tacrine เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control)

<u>การหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) จากสารสกัดจากพืชสมุนไพร</u>

1. จากผลการทดลองในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ เลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรตัวอย่างที่สารละลายสารสกัดจากพืชสมุนไพรความเข้มข้น13.5 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 1 mg/ml)มีค่าการยับยั้ง AchE มากกว่าหรือเท่ากับ 70%
2. นำสารละลายสารสกัดพืชจากความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml เจือจาง ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ ได้แก่ 0.90, 0.75, 0.60, 0.50, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/ml
3. สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถ AchE ได้ 50% (IC50)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การยับยั้งเอนไซม์ acethylcholinesterase (AchE) ของสารสกัดพืชสมุนไพรตัวอย่าง

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรจำนวน 53 ตัวอย่างใน โดยใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรความเข้มข้น13.5 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 1 mg/ml) มาทดสอบ และใช้สารละลายสารละลาย tacrine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นตัวควบคุมผลบวกพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรแต่ละตัวอย่างจะมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE (% inhibition) ต่างๆ ดังแสดงในตาราง 4 และ 5โดย 40 ตัวอย่างมีค่า % inhibition น้อยกว่า 70% และมี 13 ตัวอย่างที่มีค่า % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 70% ซึ่งจะนำสารสกัดพืชสมุนไพรตัวอย่างที่มีค่า % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 70% ทั้ง 13 ตัวอย่างนี้ไปตรวจสอบความแรงในการยับยั้งการทำงาน AchE ต่อไป

ตาราง 4 ผลการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition < 70%

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	% inhibition	
				average	SD
1	แจง	*Maerua siamensis*	ใบ	56.83	7.25
2	แจง	*Maerua siamensis*	เปลือก	35.84	4.79
3	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	ใบ	64.03	8.55
4	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	กิ่ง	23.79	1.36
5	ผกากรอง	*Lantana camara*	เถา	26.01	2.32
6	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	ใบ	43.53	4.58
8	หนามพรม	*Carissa cochinchinensis*	ใบ,กิ่ง	24.59	2.78
9	ลำบิดดง	*Diospyros filipendula*	ใบ	66.58	5.63
12	พลับพลา	*Microcos tomentosa*	ใบ	32.04	3.29
14	ชำมะเลียงป่า	*Lepisanthes fruticosa*	ใบ	23.24	1.08
15	ถอบแถบเครือ	*Connarus semidecandrus*	ใบ	47.75	4.31
16	สวองตีนนก	*Vitex pinnata*	ใบ	16.1	0.13
18	มะนาวผี	*Atalantia monophylla*	ใบ	26.14	0.15

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	% inhibition	
				average	SD
19	มะเกลือกา	*Diospyros rubra*	ใบ	6.11	0.86
20	นมแมวป่า	*Cyathostemma micranthum*	เถา	61.93	4.62
21	นมแมวป่า	*Cyathostemma micranthum*	ใบ	42.45	3.68
22	มวกกอ	*Olea salicifolia*	ใบ	45.64	1.96
24	โปร่งกิ่ว	*Dasymaschalon lomentaceum*	ใบ	34.41	4.02
27	หญ้า Stevia	*Stevia rebandiana*	ใบ	23.57	2.37
28	หมอน้อย	*Clausena excavate*	ใบ	10.69	1.43
29	แสม	*Avicennia marina*	ใบ	54.86	2.91
30	ข่อยหิน	*Gardenia collinsae*	ใบ	69.51	4.15
31	ยอป่า	*Morinda coreia*	ใบ	39.34	5.45
32	คันทรง	*Colubrina asiatica*	ใบ	33.42	2.09
33	ขี้หนอน	*Zolling dongnaiensis*	ผล	11.16	0.47
35	มะกา	*Bridelia ovate*	ผล	49.25	2.64
36	ประยงค์ใบใหญ่	*Aglaia odorata*	ใบ	15.91	0.5
37	ตำลึง	*Coccinia grandis*	เถา	7.61	0.91
38	สำมะงา	*Clerodendrum inerme*	ใบ	43.12	5.58
40	พลองใบเล็กบาง	*Memecylon panciflorum*	ใบ	54.37	5.99
41	ตะแบกเกรียบ	*Lagerstroemia balansae*	ใบ	46.08	5.29
42	เม่าเหล็ก	*Diospyros toposia*	ใบ	47.79	7.1
44	แข้งไก่	*Megalaspis cordyla*	ใบ	26.68	1.57
45	ปอแดง	*Sterculia guttata*	ใบ	12.28	0.92
47	มะพลับใหญ่	*Diospyros malabarica*	ใบ	50.82	6.35
48	เขลง	*Dialium cochinchinense*	แก่น	17.36	1.02
49	เขลง	*Dialium cochinchinense*	ใบ	26.15	2.66
50	ขันทองพยาบาท	*Suregada multiflorum*	ใบ	47.27	0.61
51	มะกล่ำตาหนู	*Abrus precatorius*	ใบ	46.89	4.5
53	กะพ้อ	*Licuala spinosa*	ใบ	20.13	1.15

ตาราง 5 ผลการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition ≥ 70%

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	% inhibition	
				average	SD
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	95.66	5.97
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	111.44	3.3
11	จำปีแขก	*Pterospermum littorale*	ใบ	110.48	3.17
13	ช้ามะขามป้อม	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	109.26	11.03
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrina*	ใบ	95.19	4.32
23	พะวา	*Garcinia speciosa*	ใบ	93.35	6.7
25	พรวด	*Memecylon lilacinum*	ใบ	154.74	6.77
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	83.7	3.19
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	85.07	3.77
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	274.17	24.51
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	87.76	9.8
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	95.43	4.33
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	119.09	3.9

<u>การหาความแรงของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้งการทำงาน AchE</u>

จากการนำสารสกัดพืชสมุนไพรตัวอย่างความเข้มข้น 13.5 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 1 mg/ml) ที่มีค่า % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 70% จำนวน 13 ตัวอย่างมาหาค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง AchE ได้ 50% (IC_{50}) ของสารสกัดพืชสมุนไพรพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ มีค่า IC_{50} ดังตารางที่ 6

ตาราง 6 ค่า IC50 ของสารสกัดพืชสมุนไพรจำนวน 13 ตัวอย่าง

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC_{50} (µg/ml)
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	581.66
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	705.05
11	จำปีแขก	*Pterospermum littorale*	ใบ	100.35

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC_{50} (µg/ml)
13	ช้ามะขามป้อม	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	68.94
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrina*	ใบ	569.87
23	พะวา	*Garcinia speciosa*	ใบ	81.19
25	พรวด	*Memecylon lilacinum*	ใบ	147.02
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	195.15
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	221.81
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	452.16
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	487.48
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	103.50
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	115.01

ตาราง 7 ระดับความแรง ของการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition $\geq$ 70%

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC_{50} (µg/ml)	ระดับความแรง*	Tannin
13	ช้ามะขามป้อม	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	68.94	มาก	✓
23	พะวา	*Garcinia speciosa*	ใบ	81.19	มาก	✓
11	จำปีแขก	*Pterospermum littorale*	ใบ	100.35	มาก	✓
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	103.50	มาก	✓
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	115.01	มาก	
25	พรวด	*Memecylon lilacinum*	ใบ	147.02	มาก	✓
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	195.15	กลาง	✓
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	221.81	กลาง	✓
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	452.16	น้อย	
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	487.48	น้อย	
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrina*	ใบ	569.87	น้อย	✓
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	581.66	น้อย	
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	705.05	น้อย	

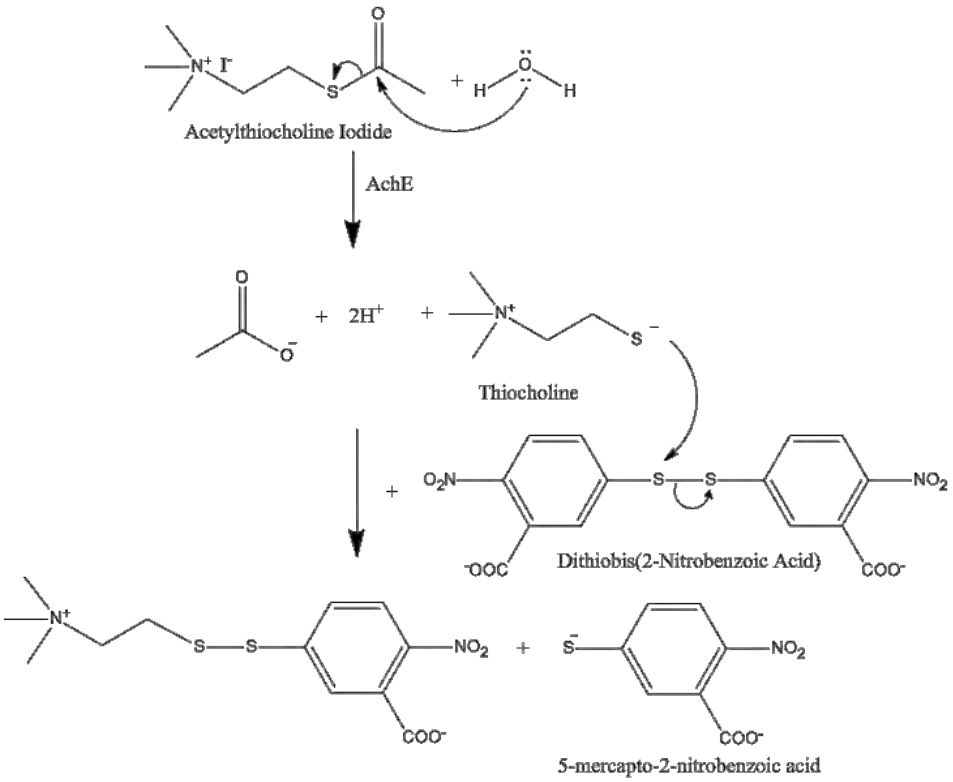
* ระดับความแรงในการยับยั้ง AchE แบ่งเป็น

- น้อย คือ $IC_{50} > 450$ µg/ml
- กลาง คือ $IC_{50} = 150 - 450$ µg/ml
- มาก คือ $IC_{50} < 150$ µg/ml

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acethylcholineesterase (AchE) จากสารสกัดเอทานอล 95% ของพืชสมุนไพร 48 ชนิด 53 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการของ Ellman ซึ่งเป็นการวิธีการทดสอบฤทธิ์ของ AchE ในหลอดทดลองและติดตามการไฮโดรไลซิสของอะซีติลโคลีนโดย AchE หรือ butyrylcholinesterase โดยการเปรียบเทียบความเข้มของสี (colorimetric procedure) ของ 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTNB) และไทโอโคลีน (thiocholine) โดยมี AchE เป็นตัวเร่งปฏิกริยา 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid มีสีเหลืองและมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร หากสารตั้งต้น (acetylthiocholine) ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย AchE เกิดเป็น 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid มากก็จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรมากขึ้นด้วย สมการการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูป 19 และในทางกลับกันหากสารสกัดพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้ง AchE น้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรก็จะน้อยตามไปด้วย



รูปที่ 19 แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาในวิธีการของ Ellman

การคัดกรองพืชสมุนไพรในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี จำนวน 48 ชนิด 53 ตัวอย่าง โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดพืชเป็น 1 mg/ml พบว่ามีสารสกัดของพืชสมุนไพรที่มี % inhibition ต่อ AchE มากกว่าหรือเท่ากับ 70% จำนวน 13 ตัวอย่าง และพบว่าสารสกัดของพืชชนิดเดียวกันจากส่วนที่ต่างกันในพืชบางชนิดให้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE ที่ต่างกันอย่างชัดเจน เช่น สารสกัดจากใบของ *Jasminum nobile* (มะลิวัลย์ดง) มีค่า % inhibition เท่ากับ 43.53 ในขณะที่สารสกัดจากส่วนกิ่ง มี % inhibition เท่ากับ 95.66 เป็นต้น

จากการหาความแรงในการยับยั้งการทำงานของ AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยหาค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชที่มีค่า % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 70% ทั้ง 13 ตัวอย่างพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 13 ตัวอย่างอยู่ในช่วง 60-710 µg/ml โดยความแรงในการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ *Garcinia speciosa* (ใบช้ามะขามป้อม) IC_{50} 68.94 µg/ml, *Phyllanthus collinsae* (ใบพะวา) IC_{50} 81.19 µg/ml, *Pterospermum littorale* (ใบจำปีแขก) IC_{50} 100.35 µg/ml, *Lumninitzera racemosa* (ใบฝาดดอกขาว) IC_{50} 103.50 µg/ml, *Sindora siamensis* (ใบมะค่าแต้) IC_{50} 115.01 µg/ml, *Memecylon lilacinum* (ใบพรวด) IC_{50} 147.02 µg/ml, *Glycosmis pentaphylla* (ใบเขยตาย) IC_{50} 195.15 µg/ml, *Manilkara hexandra* (ใบเกด) IC_{50} 221.81 µg/ml, *Memecylon ovatum* (ใบพลองใบใหญ่) IC_{50} 452.16 µg/ml, *Memecylon edule* (ใบพลองใบเล็กหนา) IC_{50} 487.48 µg/ml, *Ochna integerrina* (ใบช้างน้าว) IC_{50} 569.87 µg/ml, *Jasminum nobile* (กิ่งมะลิวัลย์ดง) IC_{50} 581.66µg/ml และ *Cleistanthus hirsutulus* (ใบก้างปลา) IC_{50} 705.05 µg/ml โดยจะถือว่าสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 150 µg/ml ตั้งแต่ 150-450 µg/ml และมากกว่า 450 µg/ml มีความแรงในการยับยั้ง AchE มาก ปานกลาง และน้อยตามลำดับ

ในการทดลอง tacrine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถยับยั้ง AchE ได้ 100% แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพืชสมุนไพรเหล่านี้มีความแรงน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับสารละลาย tacrine ซึ่งน่าจะเป็นเพราะสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองเป็นสารสกัดหยาบที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดทั้งที่ออกฤทธิ์และไม่ออกฤทธิ์ อีกทั้งปริมาณสารออกฤทธิ์อาจมีอยู่ในปริมาณน้อย ต่างกับ tacrine ที่เป็นสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์

นอกจากนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดพืชสมุนไพรที่มี % inhibition ต่อ AchE ถึง 8 ชนิดใน 13 ชนิด มีส่วนประกอบเป็น tannin ซึ่งมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ดังนั้นเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นั้น อาจเป็นผลมาจากการตกตะกอนโปรตีนอย่างไม่จำเพาะของ tannin

สารสกัดกัดพืชสมุนไพรที่ไม่มี tannin เป็นส่วนประกอบและยังมีค่า % inhibition ในการยับยั้ง AchE มากกว่า 70% อยู่นั้น คือ *Sindora siamensis* (ใบมะค่าแต้) *Memecylon ovatum* (ใบพลองใบใหญ่) *Memecylon edule* (ใบพลองใบเล็กหนา) *Jasminum nobile* (กิ่งมะลิวัลย์ดง) และ *Cleistanthus hirsutulus* (ใบก้างปลา) โดยเฉพาะ *Sindora siamensis* (ใบมะค่าแต้) ซึ่งเป็นพืชชนิดเดียวใน 13 ชนิดที่มีฤทธิ์มาก (IC50 < 150 μg/ml) และไม่มี tannin เป็นส่วนประกอบ

เมื่อพิจารณาพืชที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ในงานวิจัยก่อนหน้านี้แล้วพบว่า มีพืชสมุนไพร 7 ชนิดที่สามารถยับยั้งทั้ง pancreatic lipase และ AchE โดยมีค่า % inhibition มากกว่า 70% คือ *Garcinia speciosa* (ใบช้ามะขามป้อม) *Phyllanthus collinsae* (ใบพะวา) *Memecylon lilacinum* (ใบพรวด) *Manilkara hexandra* (ใบเกด) *Memecylon edule* (ใบพลองใบเล็กหนา) *Lumninitzera racemosa* (ใบฝาดดอกขาว) *และ Sindora siamensis* (ใบมะค่าแต้) โดยมีเพียง *Sindora siamensis* (ใบมะค่าแต้) และ *Memecylon edule* (ใบพลองใบเล็กหนา) เท่านั้นที่ไม่มี tannin เป็นส่วนประกอบ[21]

ในการวิจัยเพื่อค้นหาหรือทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์จากสารสกัดพืชบางการวิจัยมีการกำจัด tannin ออกจากสารสกัดพืชที่จะนำมาทดสอบก่อนจะนำมาทดสอบเพื่อป้องกันผลบวกลวงด้วยวิธีต่างๆกัน ตัวอย่างเช่น polyamide chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, polyvinylpyrrolidine (PVP) method, collagen method, differential solvent trituration, silica gel chromatography, solvent partition หรือ การใช้ collagen fiber adsorbent เป็นต้น แต่เนื่องจากการสนับสนุนและระยะเวลาในการทำโครงการปริญญานิพนธ์นี้มีจำกัด จึงใช้สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรเพื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนี้

จากการวิจัยนี้ กลุ่มผู้วิจัยเห็นว่าพืชที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง AchE โดยมี % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 70% มีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาวิจัยต่อ โดยผ่านกระบวนการการแยกสารสำคัญและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่แน่นอนของสารต่างๆอีกครั้ง โดยเฉพาะพืชที่สามารถยับยั้ง AchE ด้วย

ความแรงมากโดยไม่มี tannin เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ใบ *Sindora siamensis* (มะค่าแต้) เนื่องจากน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่จำเพาะกว่าพืชที่มี tannin เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชสกุล *Memecylon* 4 ชนิดที่นำมาทดสอบมีถึง 3 ชนิดที่มี % inhibition มากกว่า 70% ซึ่งแม้ว่าการค้นพบนี้อาจจะยังไม่สามารถนำไปสู่ข้อสรุปใดๆได้ เนื่องจากพืชสกุล *Memecylon* ในธรรมชาติมีหลายร้อยชนิดด้วยกัน แต่ก็นับว่าเป็นประเด็นที่น่าสนใจและควรค่าแก่การศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. Alzheimer's Disease [online] available from http://www.pharmacy.cmu.ac.th/dic/newsletter/ newpdf /newsletter85/Alzheimer.pdf [accessed date 25/12/2011]
2. "สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงปลัดกระทรวงสาธารณสุข" [online] Available: http://bps.ops.moph.go.th 2011
3. Wollen, Keith A. Alzheimer's Disease: The Pros and Cons of Pharmaceutical, Nutritional, Botanical, and Stimulatory Therapies, with a discussion of Treatment Strategies from the Perspective of Patients and Practitioners. Alternative Medical Review 15,3 (2010): 223-244
4. "สำนักยา :: Bereau of drug control" [online]. Available: http://www.fda.moph.go.th 2011
5. Green C, Picot, Loveman E, et al. Modeling the cost effectiveness of cholinesterase inhibitors in the management of mild to moderately severe Alzheimer's disease. Pharmacoeconomics 2005, 23: 1271-1282
6. Alzheimer's Association, 2011. Alzheimer's Association Report : 2011 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia 7: 208-217.
7. Berchtold, N. C., Cotman, C. W. 1997. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. Neurobiology of Aging. 3: 173–189.
8. Reisberg, B. 2010. Stages of Alzheimer's. Alzheimer's Disease [Online]. Available from: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp[accessed date 12/4/2012]
9. DeKosky, S. T. 2000. Epidemiology and Pathophysiology of Alzheimer's Disease. Dementia 4: 15-22.
10. Citron. 2004. Potential role of beta-amyloid and the tau cascade in AD. Nature Reviews. Neuroscience 5: 677–685.
11. Squire, L. R., Bloom, F. E., McConnelll, S. K., James , L.R., Zigmond, M.J., 1999. Neurotransmitter. Fundamental Neuroscience 2: 181-186.
12. Helms, R. A., et al. 2006. Alzheimer's disease.In: Rawls N.editor. Textbook of Therapeutics:Drug and Disease Management. 8: 1811-1828.
13. Ingkaninan K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003): Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J. Ethnopharmacol. 89: 261-264.

14. Ingkaninan, K,. Changwijita, K., Suwanborirux, K., (2006) Vobasinyl-Iboga Bisindole Alkaloids, Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. J. Pharm. Pharmacol. 58: 847-852
15. Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K., Chattipakorn, N. 2007. *Tabernaemontana divaricata* Extract Inhibits Neuronal Acetylcholinesterase Activity in Rats. J. Ethnopharmacol. 110:61-68.
16. Nakdook, W., Khongsombat, O., Taepavarapruk, P., Taepavarapruk, N., Ingkaninan, K. 2010. The effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid beta-peptide 25-35 peptides induced cognitive deficits in mice. J. Ethnopharmacol. 130:122-6
17. Shigeta, K., Ootaki, K., Tatemoto, H., Nakanishi, T., Inada, A., Muto, N. 2002 Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2491
18. Markmee, S., Ruchirawat, S., Prachyawarakorn, V., Ingkaninan, K., Khorana N., 2006 Isoquinoline Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett., 16:2170-2172
19. Wollen, K. (2010) Alzheimer's Disease: The Pros and Cons of Pharmaceutical, Nutritional, Botanical, and Stimulatory Therapies, with a Discussion of Treatment Strategies from the Perspective of Patients and Practitioners. Altern Med Rev 2010;15(3): 223-224
20. Bruhlmann C, Marston A, Hostettmann K, Carrupt P A, Testa B. Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors. Chemistry and Biodiversity, 1:2004;819-29.
21. กุลกันยา นิ่งเจริญ, นัฐวุฒิ เศรษฐศิริมงคล และ เอกวรรณ อยู่สกุล.<u>การคัดกรองพืชสมุนไพรในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส</u>. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554.
22. K. M. DeAngelis. phosphate buffer protocol . 2007;[1]. Available at:http://www.unl.edu/cahoonlab/phosphate%20buffer.pdf. [accessed date 22/6/2012]

ภาคผนวก

น้ำหนักสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ

ตาราง 8 น้ำหนักแห้งพืชสมุนไพร และสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
1	แจง	*Maerua siamensis*	ใบ	33.25	25.14
2	แจง	*Maerua siamensis*	เปลือก	48.51	29.93
3	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	ใบ	22.21	30.66
4	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	กิ่ง	51.95	28.82
5	ผกากรอง	*Lantana camara*	เถา	17.29	23.21
6	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	ใบ	54.57	45.56
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	111.62	17.13
8	หนามพรม	*Carissa cochinchinensis*	ใบ , กิ่ง	31.99	29.33
9	ลำบิดดง	*Diospyros filipendula*	ใบ	15.22	17.2
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	22.37	27.71
11	จำปีแขก	*Pterospermum littorale*	ใบ	33.14	38.53
12	พลับพลา	*Microcos tomentosa*	ใบ	22.26	22.01
13	ช้ามะขามป้อม	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	21.35	30.30
14	ชำมะเลียงป่า	*Lepisanthes fruticosa*	ใบ	25.63	26.69
15	ถอบแถบเครือ	*Connarus semidecandrus*	ใบ	175.74	59.90
16	สวองตีนนก	*Vitex pinnata*	ใบ	19.31	32.94
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrina*	ใบ	25.46	40.54
18	มะนาวผี	*Diospyros rubra*	ใบ	22.40	21.74
19	มะเกลือกา	*Cyathostemma micranthum*	ใบ	16.02	32.67
20	นมแมวป่า	*Cyathostemma micranthum*	เถา	81.30	27.10
21	นมแมวป่า	*Olea salicifolia*	ใบ	10.99	17.54
22	มวกกอ	*Garcinia speciosa*	ใบ	32.50	34.95
23	พะวา	*Vitex pinnata*	ใบ	93.50	48.88
24	โปร่งกิ่ว	*Dasymaschalon lomentaceum*	ใบ	16.65	26.94

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
25	พรวด	*Memecylon lilacinum*	ใบ	45.60	31.51
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	34.18	44.95
27	หญ้า Stevia	*Stevia rebandiana*	ใบ	41.60	23.20
28	หมอน้อย	*Clausena excavate*	ใบ	41.98	32.00
29	แสม	*Avicennia marina*	ใบ	75.95	49.62
30	ข่อยหิน	*Gardenia collinsae*	ใบ	53.94	48.85
31	ยอป่า	*Morinda coreia*	ใบ	101.27	45.56
32	คันทรง	*Colubrina asiatica*	ใบ	43.74	48.56
33	ขี้หนอน	*Zolling dongnaiensis*	ผล	19.00	31.59
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	105.45	80.38
35	มะกา	*Bridelia ovate*	ผล	145.91	66.33
36	ประยงค์ใบใหญ่	*Aglaia odorata*	ใบ	120.37	42.43
37	ตำลึง	*Coccinia grandis*	เถา	324.91	86.80
38	สำมะงา	*Clerodendrum inerme*	ใบ	57.90	40.38
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	53.99	26.58
40	พลองใบเล็กบาง	*Memecylon panciflorum*	ใบ	30.91	29.99
41	ตะแบกเกรียบ	*Lagerstroemia balansae*	ใบ	12.01	19.57
42	เม่าเหล็ก	*Diospyros toposia*	ใบ	22.20	42.34
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	407.62	205.91
44	แข้งไก่	*Megalaspis cordyla*	ใบ	20.39	38.81
45	ปอแดง	*Sterculia guttata*	ใบ	86.62	56.20
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	231.98	80.75
47	มะพลับใหญ่	*Diospyros malabarica*	ใบ	38.99	30.59
48	เขลง	*Dialium cochinchinense*	แก่น	127.50	39.93
49	เขลง	*Dialium cochinchinense*	ใบ	24.73	34.76
50	ขันทองพยาบาท	*Suregada multiflorum*	ใบ	440.37	116.34
51	มะกล่ำตาหนู	*Abrus precatorius*	ใบ	7.40	15.07
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	74.60	36.36

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
53	กะพ้อ	*Licuala spinosa*	ใบ	59.30	65.02

<u>วิธีเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AchE) (สำหรับทดสอบ 53 ตัวอย่าง)</u>

<u>การเตรียม 0.1 M phosphate buffer pH 7.4</u>[22]

1. เตรียม 1 M K_2HPO_4 (MW = 174.18 g) โดยชั่ง K_2HPO_4 43.54 g ละลายใน deionized water 250 ml
2. เตรียม 1 M KH_2PO_4 (MW = 136.09 g) โดยชั่ง KH_2PO_4 34.02 g ละลายใน deionized water 250 ml
3. ผสม1M KH_2PO_4 19.8 ml และ1M K_2HPO_4 80.2ml จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml
4. วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter ciberscan 510 และปรับ pH ด้วย 6 N NaOH และ 10 N HCl จนได้ pHใกล้เคียง 7.4

ผลการเตรียม 0.1 M phosphate buffer

pH ครั้งที่ 1 = 7.47, ครั้งที่ 2 = 7 .44, ครั้งที่ 3 = 7.42, ครั้งที่ 4 = 7.42

<u>การเตรียม 0.01 M phosphate buffer pH 7.4</u>

1. ตวง 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 100 ml
2. ปรับปริมาตรด้วย deionized water จนครบ 1000 ml

<u>การเตรียมสารละลายกลุ่มทดสอบจากสารสกัดพืชตัวอย่างความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml</u>

1. ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ (crude extract) จากพืชตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างละ 3 mg เติมใน Micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. เติม DMSO 30 µl และ 0.01 M phosphate buffer (pH**7.0)** 192 µl และทำให้ละลายโดย Vortex และUltrasonic sonicatorได้สารละลายสารสกัดความเข้มข้น 13.5 mg/ml และมีความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบฤทธิ์เป็น 1 mg/ml

<u>การเตรียมสารละลาย 10 µg/ml Tacrine ใน 0.01 M phosphate buffer 2 ml</u>

ใช้สารละลาย tacrine เข้มข้น (stock solution) ซึ่งมีความเข้มข้น 25 mg/ml ปริมาตร 0.8 และปรับปริมาตรด้วย 0.01 M phosphate buffer จนครบ 2ml. ได้สารละลาย Tacrine ความเข้มข้น 10 µg/ml และมีความเข้มข้นสุดท้ายใน 96-wells microplateเป็น 0.74 µg/ml

การเตรียมสารละลาย 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 15 ml

เตรียมโดยปิเปตสาร 100% DMSO มา 1.35 ml เติม 0.01 M phosphate buffer จนครบ 10 ml

การเตรียมสารละลาย 0.5 U/ml AchE ใน 0.01 M phosphate buffer 4 ml.

1. ใช้สารละลาย AchE เข้มข้น(stock solution) ซึ่งมีความเข้มข้น20 U/ml 100 µl และปรับปริมาตรด้วย 0.01 M phosphate buffer จนครบ 4 ml ได้สารละลาย AchE ความเข้มข้น 0.5 U/ml และมีความเข้มข้นสุดท้ายใน 96-wells microplate เป็น 0.037 U/ml

การเตรียมสารละลาย 1.8 mM Acetylthiocholine iodide (ACTI) ใน deionized water 15 ml

1. เตรียมสารละลาย acetylthiocholine iodide เข้มข้น (stock solution) ซึ่งมีความเข้มข้น 84 mM โดยเตรียมจากการชั่งสาร acetylthiocholine iodide 24.20 mg ละลายด้วย deionized water 1 ml
2. ใช้สารละลาย 84 mM acetylthiocholine iodide 321 µg และปรับปริมาตรด้วย deionized water จนครบ 15 ml.ได้สารละลาย acetylthiocholine iodide ความเข้มข้น 1.8 mM และมีความเข้มข้นสุดท้ายใน 96-wells microplate เป็น 0.2 mM

การเตรียมสารละลาย 0.15 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ใน 0.1 M phosphate buffer 100 ml

1. เตรียมสารละลาย DTNB เข้มข้น(stock solution) ซึ่งมีความเข้มข้น 5 mM โดยเตรียมจากการชั่งสารDTNB 39.64 mg ละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer 20 ml
2. ใช้สารละลาย 5 mM DTNB 3 ml และปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer จนครบ 100 ml ได้สารละลาย DTNB ความเข้มข้น 0.15 mM

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพร

ตาราง 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AchE ของสารสกัด

พืชสมุนไพร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml) จำนวน 53 ตัวอย่าง

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	% inhibition			average	SD
			1	2	3		
1	แจง	ใบ	60.45	61.55	48.49	56.83	7.25
2	แจง	เปลือก	39.98	30.59	36.96	35.84	4.79
3	กระเจียน	ใบ	73.76	60.57	57.74	64.03	8.55
4	กระเจียน	กิ่ง	23.16	22.86	25.36	23.79	1.36
5	ผกากรอง	เถา	26.64	27.95	23.44	26.01	2.32
6	มะลิวัลย์ดง	ใบ	38.24	46.36	45.98	43.53	4.58
7	มะลิวัลย์ดง	กิ่ง	93.06	102.50	91.43	95.66	5.97
8	หนามพรม	ใบ,กิ่ง	21.40	26.54	25.84	24.59	2.78
9	ลำบิดดง	ใบ	68.76	70.80	60.19	66.58	5.63
10	ก้างปลา	ใบ	115.17	108.89	110.27	111.44	3.30
11	จำปีแขก	ใบ	108.03	111.52	111.88	110.48	3.17
12	พลับพลา	ใบ	30.10	35.84	30.20	32.04	3.29
13	ช้ามะขามป้อม	ใบ	101.27	104.67	121.84	109.26	11.03
14	ชำมะเลียงป่า	ใบ	23.53	22.95	21.43	23.24	1.08
15	ถอบแถบเครือ	ใบ	48.65	43.06	51.53	47.75	4.31
16	สวองตีนนก	ใบ	16.18	16.16	15.95	16.10	0.13
17	ช้างน้าว	ใบ	94.62	91.18	99.77	95.19	4.32
18	มะนาวผี	ใบ	26.31	26.01	26.09	26.14	0.15
19	มะเกลือกา	ใบ	5.35	7.04	5.94	6.11	0.86
20	นมแมวป่า	เถา	56.77	65.65	63.38	61.93	4.62
21	นมแมวป่า	ใบ	38.29	45.25	43.82	42.45	3.68
22	มวกกอ	ใบ	47.53	45.79	43.62	45.64	1.96
23	พะวา	ใบ	94.37	86.19	99.48	93.35	6.70
24	โปร่งกิ่ว	ใบ	30.46	34.29	38.49	34.41	4.02

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	% inhibition			average	SD
			1	2	3		
25	พรวด	ใบ	158.18	159.10	146.95	154.74	6.77
26	เขยตาย	ใบ	84.62	86.33	80.15	83.70	3.19
27	หญ้า Stevia	ใบ	24.47	25.35	20.87	23.57	2.37
28	หมอน้อย	ใบ	12.33	9.73	10.01	10.69	1.43
29	แสม	ใบ	53.21	53.14	58.21	54.86	2.91
30	ข่อยหิน	ใบ	72.84	64.86	70.83	69.51	4.15
31	ยอป่า	ใบ	37.06	45.55	35.40	39.34	5.45
32	คันทรง	ใบ	31.89	35.81	32.57	33.42	2.09
33	ขี้หนอน	ผล	10.61	11.48	11.38	11.16	0.47
34	เกด	ใบ	80.74	86.92	87.56	85.07	3.77
35	มะกา	ผล	46.58	49.33	51.86	49.25	2.64
36	ประยงค์ใบใหญ่	ใบ	16.48	15.66	15.58	15.91	0.50
37	ตำลึง	เถา	8.45	6.65	7.73	7.61	0.91
38	สำมะงา	ใบ	37.23	48.33	43.81	43.12	5.58
39	พลองใบใหญ่	ใบ	301.98	264.82	255.72	274.17	24.51
40	พลองใบเล็กบาง	ใบ	50.09	51.80	61.21	54.37	5.99
41	ตะแบกเกรียบ	ใบ	52.16	42.55	43.54	46.08	5.29
42	เม่าเหล็ก	ใบ	33.88	41.60	46.24	47.79	7.10
43	พลองใบเล็กหนา	ใบ	94.81	76.56	91.90	87.76	9.80
44	แข้งไก่	ใบ	28.32	26.55	25.18	26.68	1.57
45	ปอแดง	ใบ	12.15	13.26	11.43	12.28	0.92
46	ฝาดดอกขาว	ใบ	93.68	92.24	100.36	95.43	4.33
47	มะพลับใหญ่	ใบ	47.00	58.15	47.30	50.82	6.35
48	เขลง	แก่น	17.65	16.22	18.20	17.36	1.02
49	เขลง	ใบ	23.88	25.49	29.07	26.15	2.66
50	ขันทองพยาบาท	ใบ	47.90	47.22	46.68	47.27	0.61
51	มะกล่ำตาหนู	ใบ	48.96	41.73	49.98	46.89	4.50
52	มะค่าแต้	ใบ	114.59	121.09	121.59	119.09	3.90

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ใช้	% inhibition			average	SD
			1	2	3		
53	กะพ้อ	ใบ	21.09	20.45	18.85	20.13	1.15

<u>วิธีเตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบหาค่า IC_{50} (สำหรับทดสอบ 1 ตัวอย่าง)</u>

เตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพรเข้มข้น (stock solution) ซึ่งมีความเข้มข้น 13.5 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 1 mg/ml) โดยเตรียมจากสารสกัดหยาบ (crude extract) 6 mg ละลายด้วย 100% DMSO 60 µl และ 0.01% phosphate buffer 384 µl จากนั้นนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายใน 96-well microplate ดังนี้

- ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.9 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 12.15 mg/ml สำหรับปฏิบัติการ (working concentration) ซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายสารสกัดเข้มข้น (stock solution) 410 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 45.5 µl

- ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.75 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 10.125 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 12.15 mg/mL 125 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 25 µl

- ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.6 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 8.1 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 12.15 mg/mL 100 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 50 µl

-ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.5 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 6.75 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายสารสกัดเข้มข้น 150 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 150 µl

-ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.25 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 3.375 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 6.75 mg/mL 150 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 150 µl

-ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.125 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1.6875 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 3.375 mg/mL 150 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 150 µl

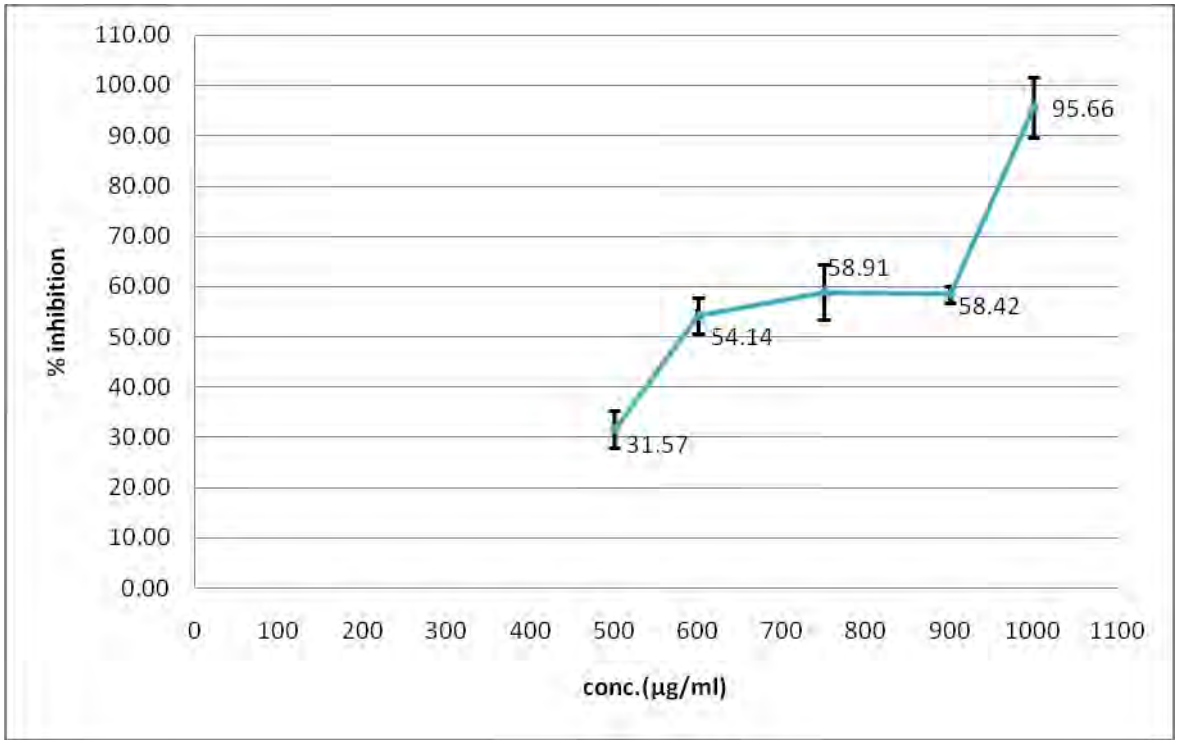
- ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบคือ 0.0625 mg/ml : ได้จากสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.84375 mg/ml สำหรับปฏิบัติการซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1.6875 mg/mL 150 µl + 13.5% DMSO ใน phosphate buffer 150 µl

ผลการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชสมุนไพร

ตาราง 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AchE และค่า IC_{50} ของ (7) สารสกัดมะลิวัลย์ดง – กิ่ง

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	93.06	102.50	91.43	95.66	5.97	581.66
900	57.10	60.23	57.93	58.42	1.62	
750	52.88	63.24	60.60	58.91	5.38	
600	52.17	51.90	58.35	54.14	3.65	
500	30.04	35.83	28.84	31.57	3.73	

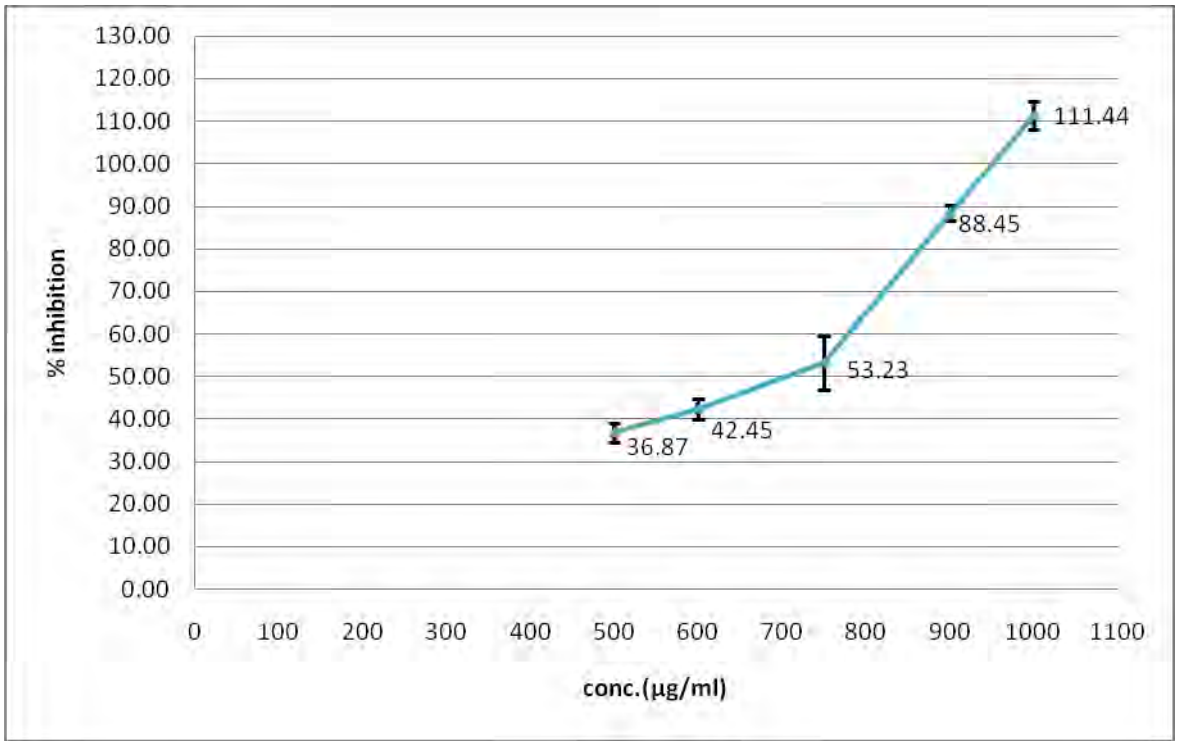
รูป 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (7) สารสกัดมะลิวัลย์ดง – กิ่ง กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(10) สารสกัดก้างปลา – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	115.17	108.89	110.27	111.44	3.30	705.05
900	89.78	86.37	89.20	88.45	1.82	
750	56.07	57.61	46.02	53.23	6.29	
600	39.65	43.54	44.16	42.45	2.44	
500	39.42	35.25	35.93	36.87	2.23	

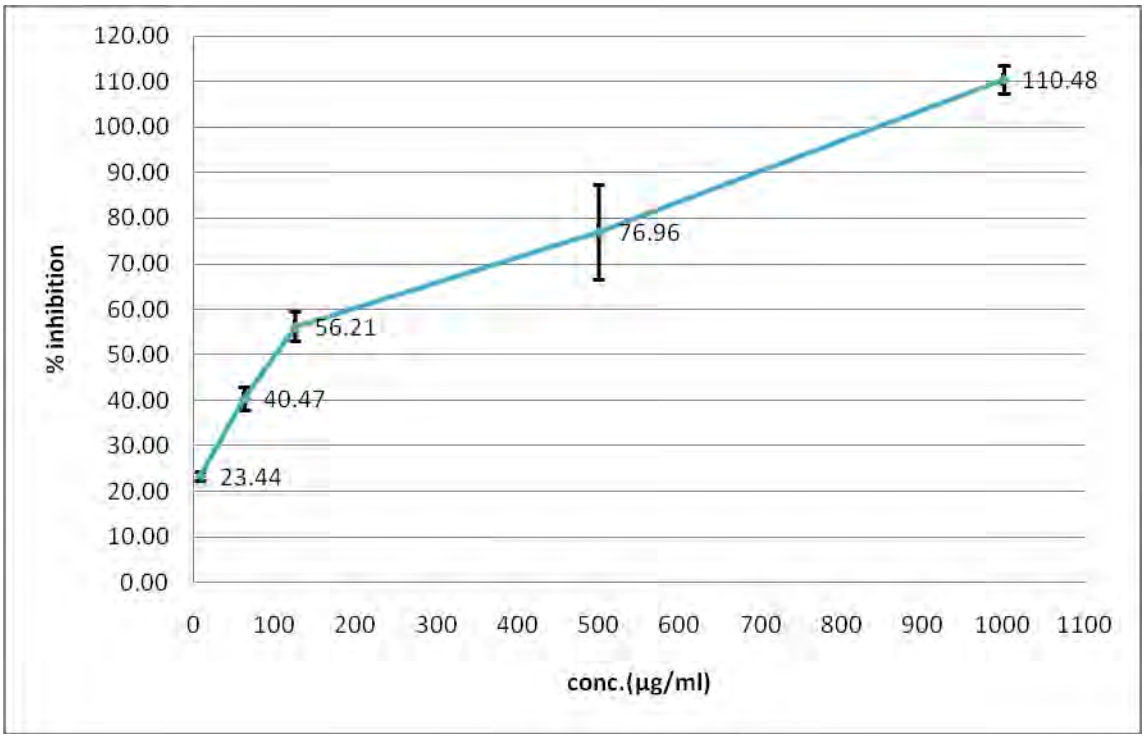
รูป 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (10) สารสกัดก้างปลา – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(11) สารสกัดจำปีแขก – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	108.03	111.52	111.88	110.48	3.17	100.35
500	66.59	77.04	87.25	76.96	10.33	
125	53.19	55.85	59.58	56.21	3.21	
62.5	37.74	40.78	42.88	40.47	2.59	
8	24.19	23.94	22.19	23.44	1.09	

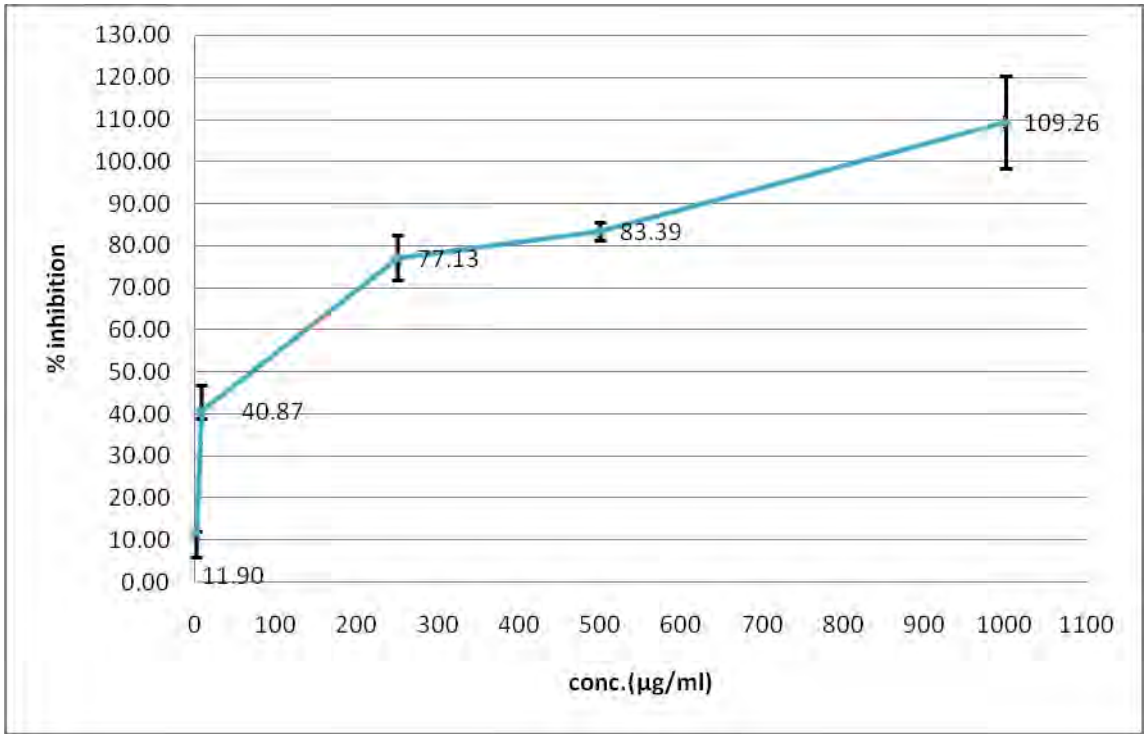
รูป 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (11) สารสกัดจำปีแขก – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(13) ช้ามะขามป้อม– ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	101.27	104.67	121.84	109.26	11.03	68.94
500	84.00	80.94	85.23	83.39	2.21	
250	71.40	78.01	81.98	77.13	5.35	
8	39.89	48.36	34.36	40.87	5.84	
1.6	11.69	11.96	12.04	11.90	0.18	

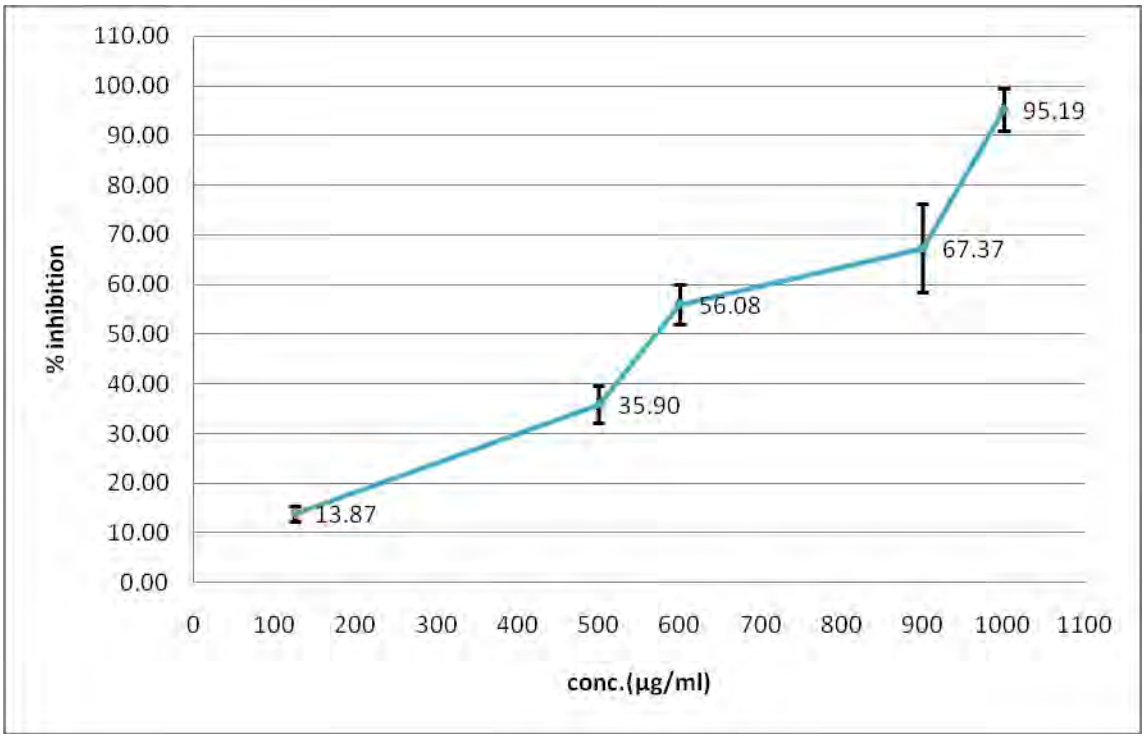
รูป 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (13) ช้ามะขามป้อม– ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC50 ของ
(17) สารสกัดช้างน้าว – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	94.62	91.18	99.77	95.19	4.32	569.87
900	57.31	70.88	73.93	67.37	8.85	
600	56.76	51.85	59.63	56.08	3.94	
500	39.32	36.31	32.07	35.90	3.64	
125	13.88	15.38	12.36	13.87	1.51	

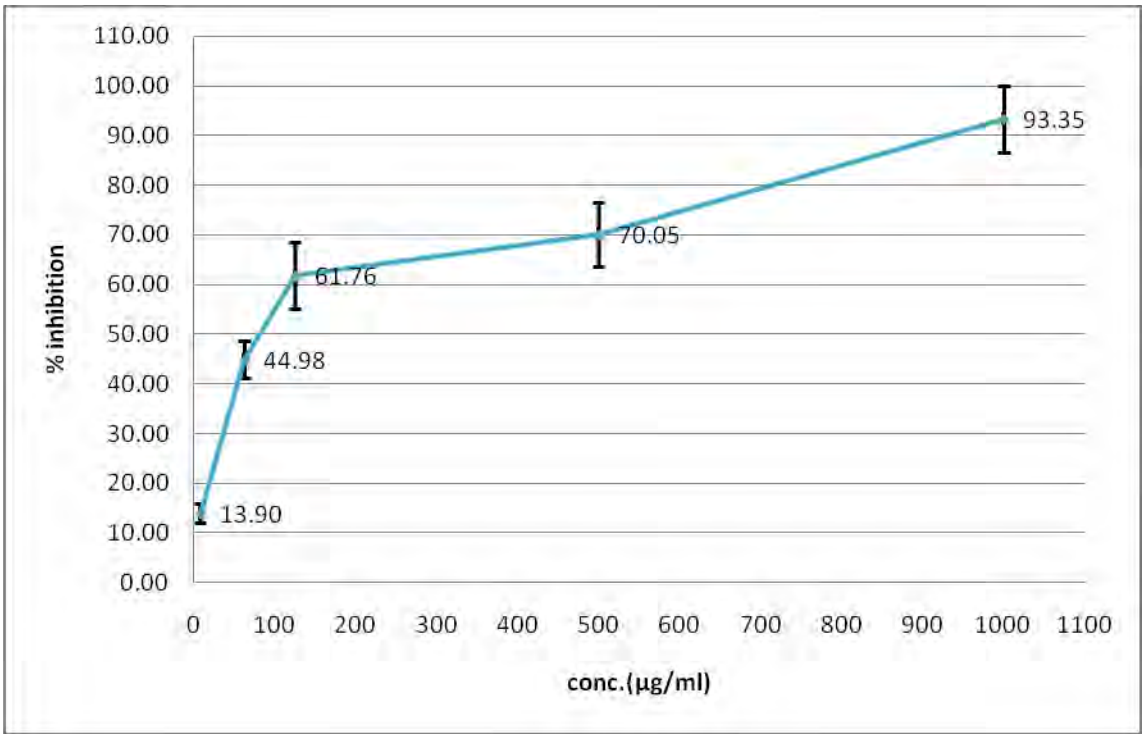
รูป 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (17) สารสกัดช้างน้าว – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(23) สารสกัดพะวา – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	94.37	86.19	99.48	93.35	6.70	81.19
500	74.32	63.50	72.34	70.05	6.46	
125	59.56	69.33	56.40	61.76	6.74	
62.5	42.06	43.72	49.16	44.98	3.71	
8	12.20	16.03	13.46	13.90	1.95	

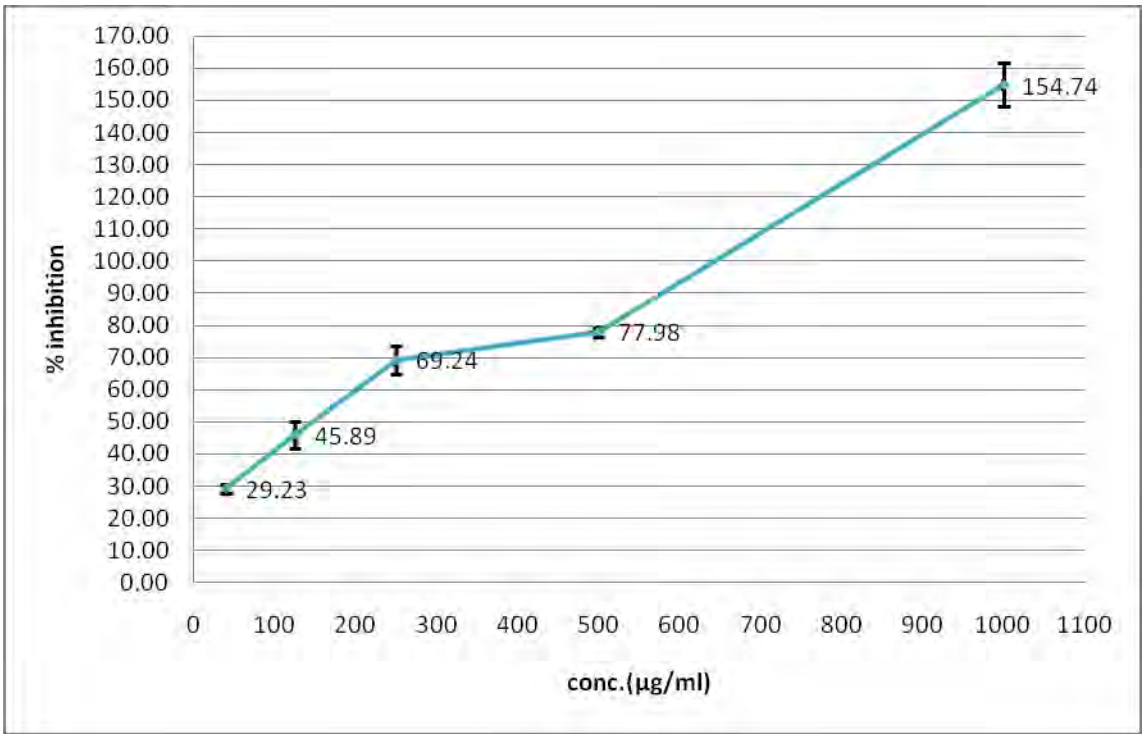
รูป 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (23) สารสกัดพะวา – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (25) สารสกัดพรวด – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	158.18	159.10	146.95	154.74	6.77	147.02
500	78.11	79.30	76.52	77.98	1.40	
250	68.94	65.12	73.65	69.24	4.27	
125	41.73	45.84	50.09	45.89	4.18	
40	30.56	29.31	27.83	29.23	1.36	

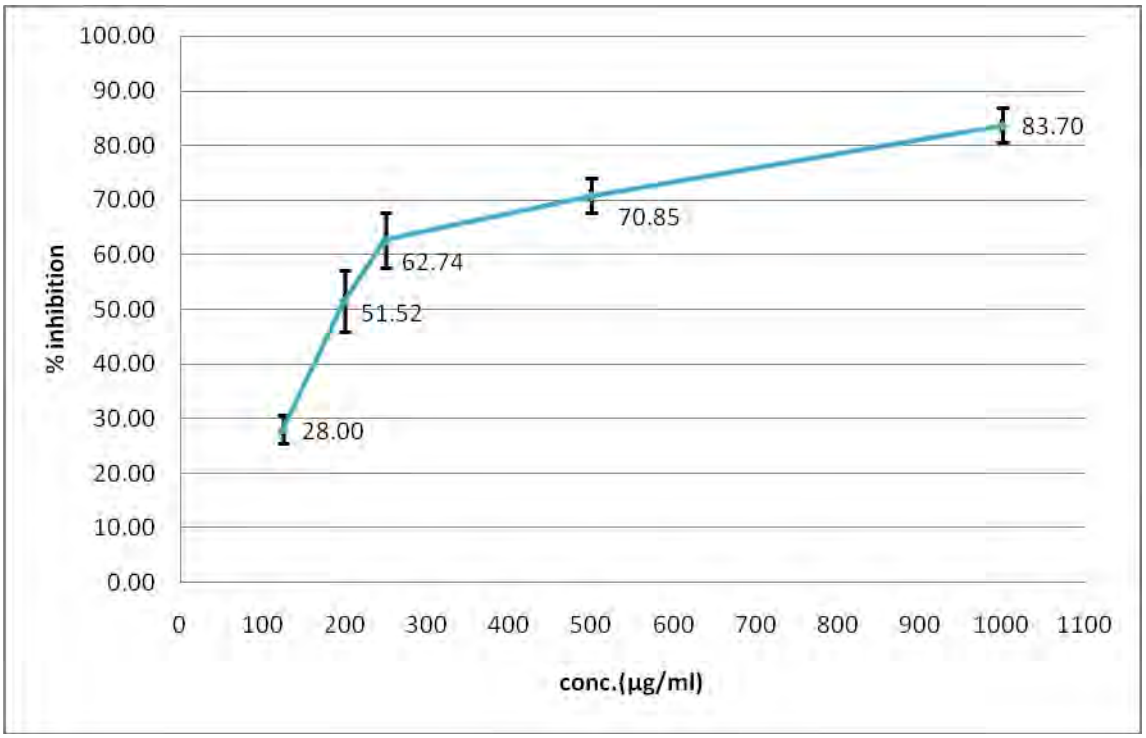
รูป 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (25) สารสกัดพรวด – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(26) สารสกัดเขยตาย – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	84.62	86.33	80.15	83.70	3.19	195.15
500	67.19	73.12	72.24	70.85	3.20	
250	68.41	61.06	58.75	62.74	5.05	
200	50.49	46.58	57.49	51.52	5.53	
125	30.89	25.78	27.33	28.00	2.62	

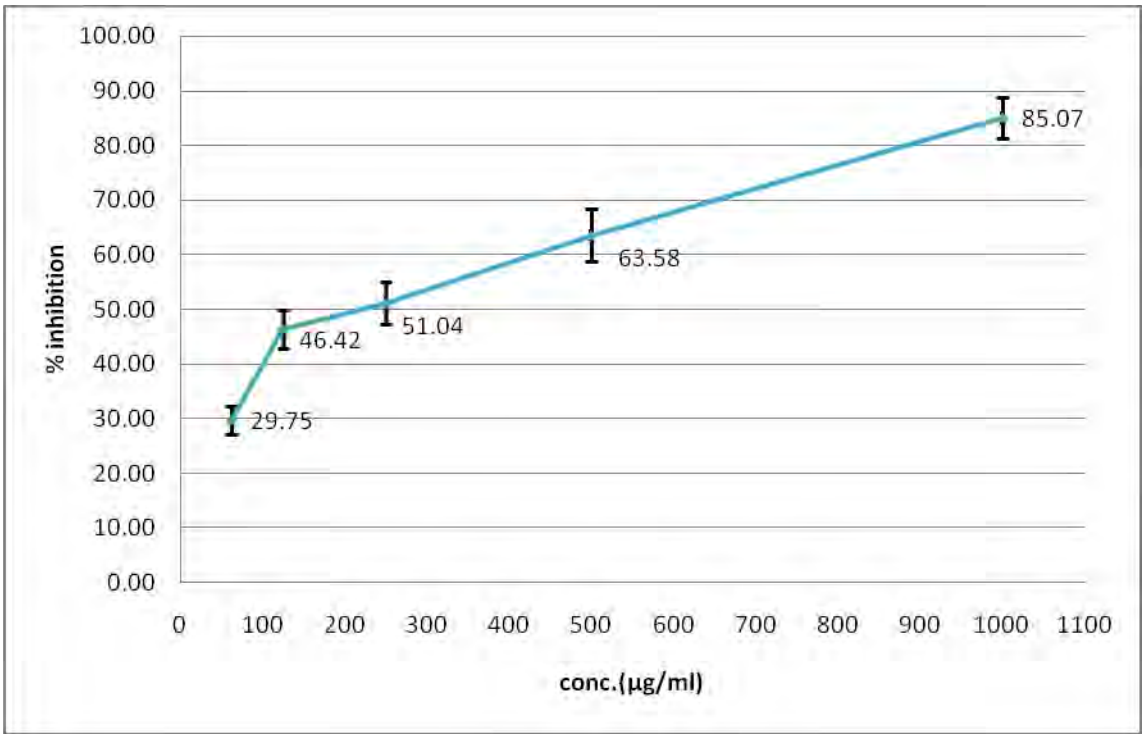
รูป 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (26) สารสกัดเขยตาย – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (34) สารสกัดเกด – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	80.74	86.92	87.56	85.07	3.77	221.81
500	67.42	58.17	65.15	63.58	4.82	
250	52.75	46.61	53.76	51.04	3.87	
125	50.34	43.71	45.21	46.42	3.48	
62.5	27.56	29.04	32.65	29.75	2.62	

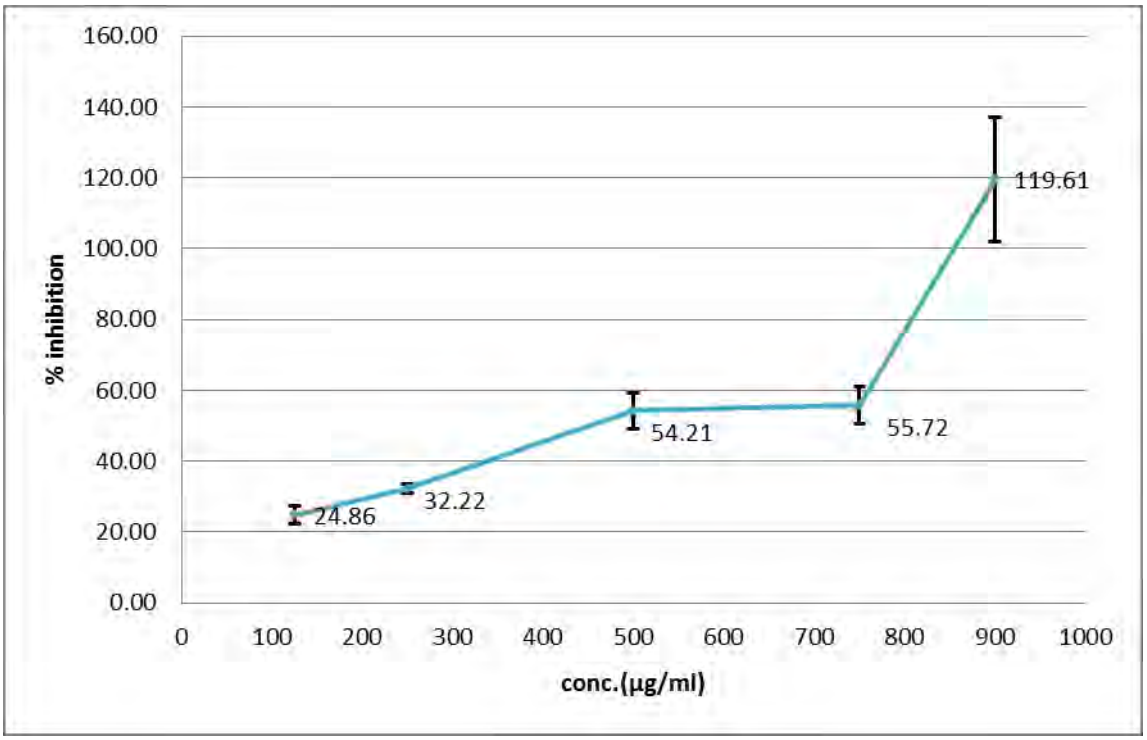
รูป 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (34) สารสกัดเกด – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (39) สารสกัดพลองใบใหญ่ – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
900	103.09	117.74	138.01	119.61	17.53	452.16
750	61.38	54.92	50.87	55.72	5.30	
500	48.50	56.26	57.85	54.21	5.00	
250	31.17	33.49	32.01	32.22	1.17	
125	26.62	25.85	22.11	24.86	2.41	

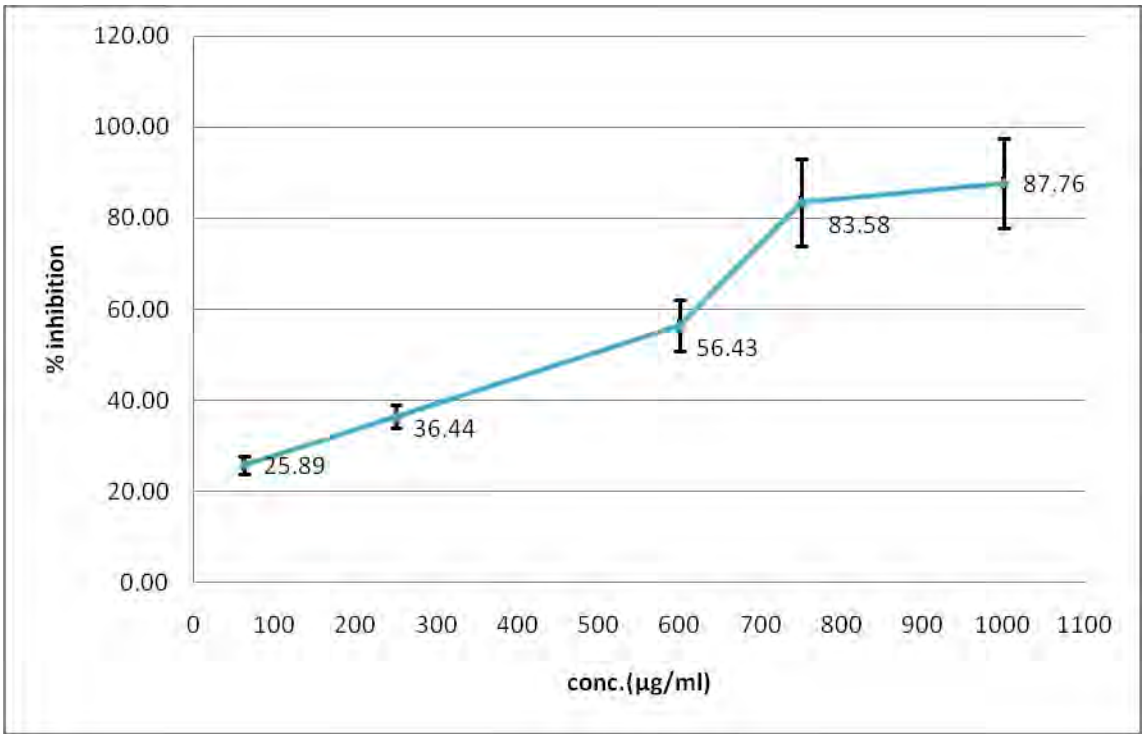
รูป 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (39) สารสกัดพลองใบใหญ่ – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 20 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(43) สารสกัดพลองใบเล็กหนา – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	94.81	76.56	91.90	87.76	9.80	487.48
750	85.88	91.77	73.08	83.58	9.56	
600	55.86	62.26	51.15	56.43	5.57	
250	34.50	35.59	39.23	36.44	2.48	
62.5	25.74	27.90	24.02	25.89	1.95	

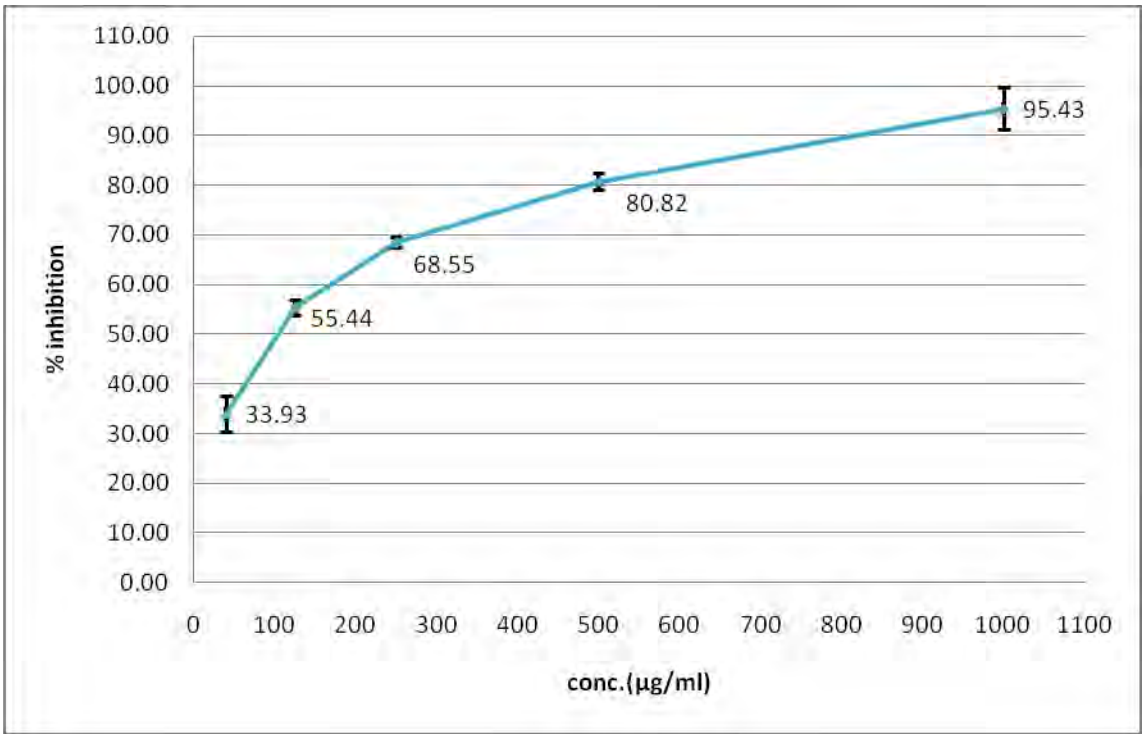
รูป 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (43) สารสกัดพลองใบเล็กหนา – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 21 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ
(46) สารสกัดฝาดดอกขาว – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	93.68	92.24	100.36	95.43	4.33	103.50
500	80.11	82.66	79.69	80.82	1.61	
250	68.07	69.62	71.68	68.55	0.94	
125	55.86	53.73	56.74	55.44	1.54	
40	29.71	36.34	35.73	33.93	3.67	

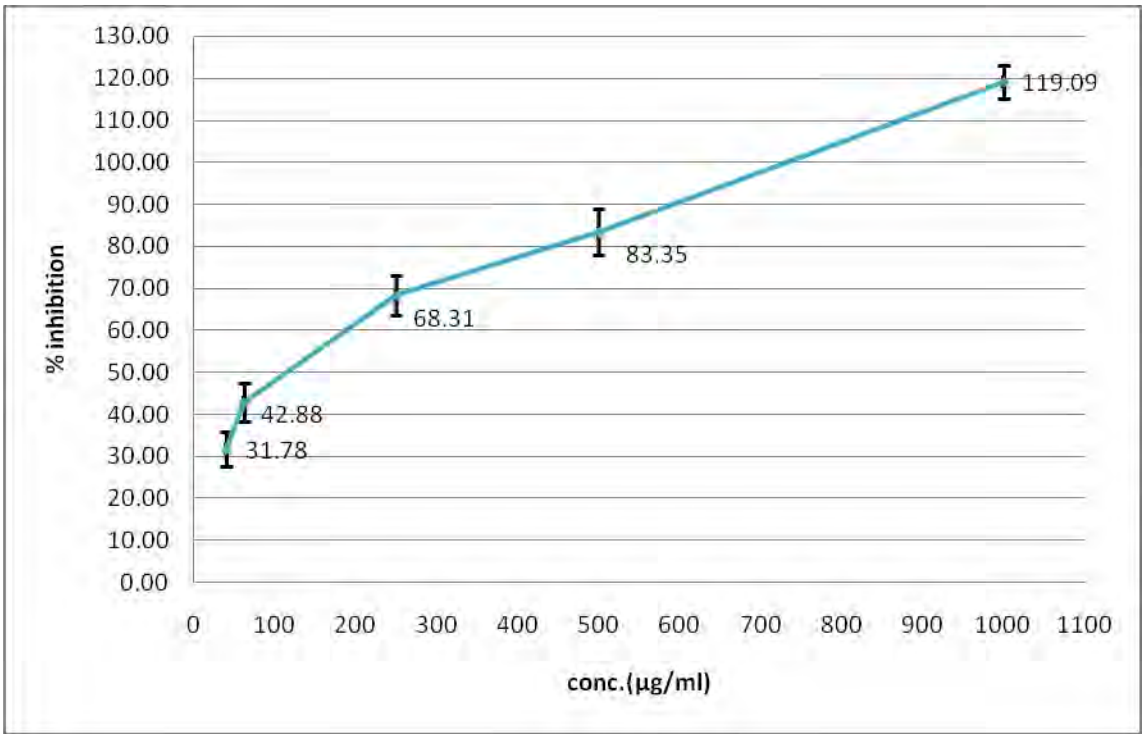
รูป 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (46) สารสกัดฝาดดอกขาว – ใบ
กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 22 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE และค่า IC_{50} ของ (52) มะค่าแต้ – ใบ

ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	% inhibition					IC_{50}
	1	2	3	average	SD	
1,000	114.59	121.09	121.59	119.09	3.90	115.01
500	80.38	89.73	79.95	83.35	5.53	
250	70.88	71.17	62.87	68.31	4.71	
62.5	48.12	40.54	39.98	42.88	4.55	
40	27.22	32.71	35.40	31.78	4.17	

รูป 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสุดท้าย (52) มะค่าแต้ – ใบ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AchE



ตาราง 23 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้ง lipase และ AchE เทียบกับผลการทดสอบหาสารแทนนิน

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	Anti-lipase*	AchEI**	Tannin***
1	แจง	*Maerua siamensis*	ใบ			
2	แจง	*Maerua siamensis*	เปลือก	✓		
3	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	ใบ			
4	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides*	กิ่ง			
5	ผกากรอง	*Lantana camara*	เถา			
6	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	ใบ			
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง		✓	
8	หนามพรม/ พรม / ขี้แฮด	*Carissa cochinchinensis*	ใบ , กิ่ง			
9	ลำบิดดง	*Diospyros filipendula*	ใบ	✓		
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ		✓	
11	จำปีแขก/ขนาน/ลำป้าง/จำปาเทศ	*Pterospermum littorale*	ใบ		✓	✓
12	พลับพลา	*Microcos tomentosa*	ใบ			
13	**ช้ามะขามป้อม/แขนงพร้อย/ค่างเต้น**	***Phyllanthus collinsae***	**ใบ**	✓	✓	✓
14	ชำมะเลียงป่า	*Lepisanthes fruticosa*	ใบ			
15	ถอบแถบเครือ/จำเพาะ/ขางขาว	*Connarus semidecandrus*	ใบ	✓		✓
16	สวองตีนนก/ตีนนก/สมอตีนนก/กาสามปีก	*Vitex pinnata*	ใบ			
17	ช้างน้าว/กระแจะ/ตาลเหลือง	*Ochna integerrina*	ใบ		✓	✓
19	มะเกลือกา/มะเกือกา/สล้างตัวผู้/ดำดง	*Diospyros rubra*	ใบ			
20	นมแมวป่า/น้ำเต้าน้อย	*Cyathostemma micranthum*	เถา			✓

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	Anti-lipase*	AchEI**	Tannin***
21	นมแมวป่า/น้ำเต้าน้อย	*Cyathostemma micranthum*	ใบ			
22	มวกกอ/คำไก่/แดงเขา	*Olea salicifolia*	ใบ			
23	**พะวา/ขวาด/วาน้ำ**	***Garcinia speciosa***	**ใบ**	✓	✓	✓
24	โปร่งกิ่ว/ติดต่อ	*Dasymaschalon lomentaceum*	ใบ			
25	**พรวด/พลองแก้มอ้น**	***Memecylon lilacinum***	**ใบ**	✓	✓	✓
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ		✓	✓
27	หญ้าหวาน	*Stevia rebandiana*	ใบ			
28	หมอน้อย/สามโสก/อ้อยช้าง/หัสคุณ	*Clausena excavate*	ใบ			
29	แสม	*Avicennia marina*	ใบ			
30	ข่อยหิน/พุดผา	*Gardenia collinsae*	ใบ			
31	ยอป่า	*Morinda coreia*	ใบ			
32	คันทรง	*Colubrina asiatica*	ใบ			
33	ขี้หนอน	*Zolling dongnaiensis*	ผล			✓
34	**เกด**	***Manilkara hexandra***	**ใบ**	✓	✓	✓
35	มะกา	*Bridelia ovate*	ผล			✓
36	ประยงค์ใบใหญ่	*Aglaia odorata*	ใบ			
37	ตำลึง	*Coccinia grandis*	เถา			
38	สำมะงา/สำมะง่า/เขี้นวง/สำปันนา/สักขรีย่าน	*Clerodendrum inerme*	ใบ			✓
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ		✓	
40	พลองใบเล็กบาง/พลองขี้ใต้	*Memecylon panciflorum*	ใบ			
41	ตะแบกเกรียบ	*Lagerstroemia balansae*	ใบ			✓
42	เม่าเหล็ก/ข้าวเม่าเหล็ก	*Diospyros toposia*	ใบ			
43	**พลองใบเล็กหนา**	***Memecylon edule***	**ใบ**	✓	✓	

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	Anti-lipase*	AchEI**	Tannin***
44	แข้งไก่	*Megalaspis cordyla*	ใบ			✓
45	ปอแดง	*Sterculia guttata*	ใบ			
46	**ฝาดดอกขาว**	**Lumninitzera racemosa**	**ใบ**	✓	✓	✓
47	มะพลับใหญ่	*Diospyros malabarica*	ใบ			
48	เขลง/หยี	*Dialium cochinchinense*	แก่น			
49	เขลง/หยี	*Dialium cochinchinense*	ใบ			
50	ขันทองพยาบาท	*Suregada multiflorum*	ใบ	✓		
51	มะกล่ำตาหนู	*Abrus precatorius*	ใบ			
52	**มะค่าแต้**	***Sindora siamensis***	**ใบ**	✓	✓	
53	พ้อ/กะพ้อ/กะพ้อหนาม	*Licuala spinosa*	ใบ			

* สารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมากกว่าหรือเท่ากับ 70%

** สารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition ในการยับยั้ง AchE มากกว่าหรือเท่ากับ 70%

*** สารสกัดพืชสมุนไพรให้ผลบวกในการทดสอบแทนนิน

ตาราง 24 ระดับความแรง ของการยับยั้ง AchE ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีค่า % inhibition $\geq$ 70%

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC50 (µg/ml)	ระดับความแรง*	Tannin
13	ช้ามะขามป้อม	*Phyllanthus collinsae*	ใบ	68.94	มาก	✓
23	พะวา	*Garcinia speciosa*	ใบ	81.19	มาก	✓
11	จำปีแขก	*Pterospermum littorale*	ใบ	100.35	มาก	✓
46	ฝาดดอกขาว	*Lumninitzera racemosa*	ใบ	103.50	มาก	✓

หมายเลข	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	IC50 (µg/ml)	ระดับความแรง*	Tannin
52	มะค่าแต้	*Sindora siamensis*	ใบ	115.01	มาก	
25	พรวด	*Memecylon lilacinum*	ใบ	147.02	มาก	✓
26	เขยตาย	*Glycosmis pentaphylla*	ใบ	195.15	กลาง	✓
34	เกด	*Manilkara hexandra*	ใบ	221.81	กลาง	✓
39	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum*	ใบ	452.16	น้อย	
43	พลองใบเล็กหนา	*Memecylon edule*	ใบ	487.48	น้อย	
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrina*	ใบ	569.87	น้อย	✓
7	มะลิวัลย์ดง	*Jasminum nobile*	กิ่ง	581.66	น้อย	
10	ก้างปลา	*Cleistanthus hirsutulus*	ใบ	705.05	น้อย	

* ระดับความแรงในการยับยั้ง AchE แบ่งเป็น

- น้อย คือ IC_{50} > 450 µg/ml
- กลาง คือ IC_{50} = 150 - 450 µg/ml
- มาก คือ IC_{50} < 150 µg/ml