



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้า
อะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ



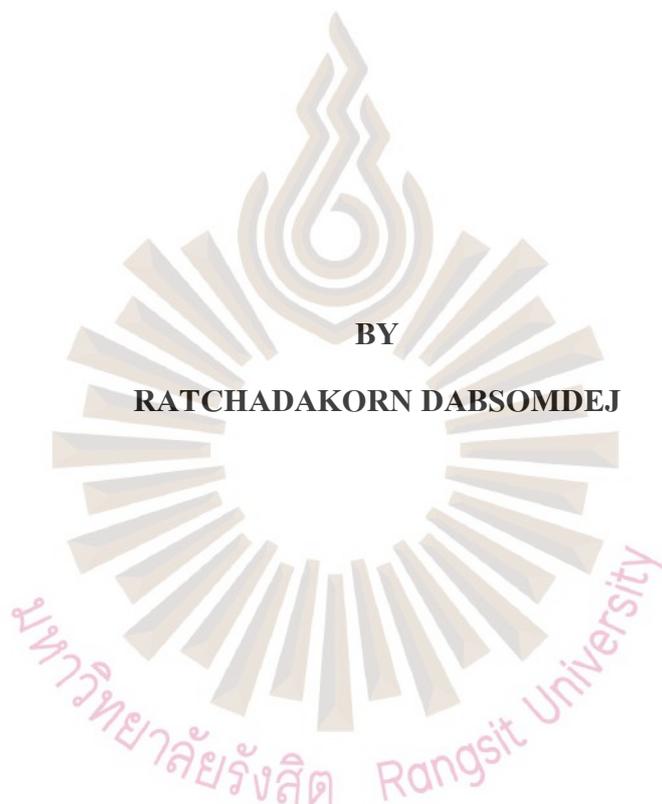
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2567



**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND AMYLOID BETA AGGREGATE-
FORMATION INHIBITORY OF THAI LONGEVITY TONIC REMEDY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE
COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE**

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2024

วิทยานิพนธ์เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์
ของตำรับยาอายุวัฒนะ

โดย

รัชฎากร คาบสมเด็จ

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2567

ดร.ณัฐกาญจน์ แดงมณี
ประธานกรรมการสอบ

ดร.นันทพงศ์ ขำทอง
กรรมการ

ดร.วาตุกา พลาขงาม

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ศ.ดร.สี่อจิตต์ เพ็ชรประสาน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

24 มกราคม 2568

Thesis entitled

**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND AMYLOID BETA AGGREGATE-FORMATION
INHIBITORY OF THAI LONGEVITY TONIC REMEDY**

by

RATCHADAKORN DABSOMDEJ

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University
Academic Year 2024

Nattakan Dangmamee, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Dr. Nanthaphong Khamthong
Member

Waluga Plaingam, Ph.D.

Member and Advisor

Approved by Graduate School

(Prof.Suejit Pechprasarn, Ph.D.)

Dean of Graduate School

January 24, 2025

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้มอบทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดีเนื่องจาก ดร. วาตุกา พลายงาม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ให้ความเอาใจใส่ช่วยเหลือ และคอยให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดีมาโดยตลอด รวมทั้งอาจารย์ผู้สอนในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการของวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ให้การอำนวยความสะดวกเอื้อเฟื้อสถานที่ สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

รัชฎากร ดาบสมเด็จ

ผู้วิจัย



6206352 : รัชฎากร ดาบสมเด็จ
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ
 หลักสูตร : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. วาตุกา พลายงาม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด คือ ข่อย ตะโกนา ฝรั่งอ่อน บอระเพ็ด พริกไทย และเห็ดห่ม เป็นตำรับยาที่ถูกบรรจุไว้ในตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ มีสรรพคุณช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย แต่ยังคงขาดข้อมูลการวิจัยกลไกออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาโดยมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยา และสมุนไพรเดี่ยว 6 ชนิด ด้วยวิธี Folin Ciocalteu Colorimetric assay และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยา และหัวเห็ดห่ม เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดแห้ง ตามลำดับ และจากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยา และเปลือกฝรั่งอ่อน เท่ากับ 185.44, 154.94 และ 138.90 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีดินต่อกรัมสารสกัดแห้ง ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า หัวเห็ดห่ม เปลือกฝรั่งอ่อน เถาบอระเพ็ด ตำรับยา เมล็ดพริกไทย เปลือกตะโกนา และเมล็ดข่อย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1867 ± 0.0087 , 0.5502 ± 0.0124 , 0.6262 ± 0.0276 , 0.8600 ± 0.0567 , 0.8548 ± 0.1934 , 1.7865 ± 0.0007 และ 5.5956 ± 1.2342 mg/mL ตามลำดับ และวิธี ABTS พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นของ 1 mg/mL เท่ากับ 48.0 ± 0.3 , 50.9 ± 0.8 , 9.2 ± 1.2 , 49.6 ± 8.4 , 26.0 ± 0.8 , 29.1 ± 0.8 และ 6.0 ± 0.4 ตามลำดับ และพบว่าตำรับยามีฤทธิ์ในการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ 42 ที่ดี โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.15 %

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 47 หน้า)

คำสำคัญ: ตำรับยาอายุวัฒนะ, โปรตีนเบต้าอะไมลอยด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

6206352 : Ratchadakorn Dabsomdej
 Thesis Title : Antioxidant Activity and Amyloid Beta Aggregate-Formation
 Inhibitory of Thai Longevity Tonic Remedy
 Program : Master of Science in Oriental Medicine
 Thesis Advisor : Waluga Plaingam, Ph.D.

Abstract

The objectives of the research are to investigate the Antioxidant activity and Amyloid beta (Aβ) aggregate-formation inhibition of Thai longevity tonic remedy composed of six herbs: *Streblus asper* L., *Diospyros rhodcalyx* Kurz., *Albizia procera* (Roxb.) Benth, *Tinospora crispa* L., *Piper nigrum* L., and *Cyperus rotundus* L. This formulation is included in the Thai National Traditional Medicine Repertory and is purported to possess anti-aging properties. Nevertheless, the underlying mechanisms of its antioxidant and Aβ aggregate-formation inhibition activities remain unclear. In this study, the total phenolic and flavonoid contents of the remedy and the six individual herbs were determined using the Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride colorimetric assays, respectively. The results indicated that *P. nigrum* exhibited the highest total phenolic content, followed by the remedy extract and *C. rotundus*, with corresponding values of 861.67, 786.67, and 653.33 mg GAE/g extract, respectively. The three highest total flavonoid contents were also found in *P. nigrum*, the remedy extract, and *A. procera* with values of 185.44, 154.94, and 138.90 mg (QE/g ext.) respectively. Subsequently, the antioxidant activity was assessed using the DPPH and ABTS methods. The IC₅₀ values for DPPH radicals with *C. rotundus*, *A. procera*, *T. crispa*, the remedy, *P. nigrum*, *D. rhodcalyx*, and *S. asper* were 0.1867±0.0087, 0.5502±0.0124, 0.6262±0.0276, 0.8600±0.0567, 0.8548±0.1934, 1.7865±0.0007 and 5.5956±1.2342 mg/ml, respectively. For ABTS the %Inhibition at a concentration of 1.0 mg/ml values of 48.0±0.3, 50.9±0.8, 9.2±1.2, 49.6±8.4, 26.0±0.8, 29.1±0.8, and 6.0±0.4 mg/ml, respectively. Finally, the remedy exhibited a 67.15% inhibition rate against Aβ₄₂ aggregate formation.

(Total 47 pages)

Keywords: Thai longevity tonic remedy, Amyloid beta, Antioxidant activity

Student's Signature Thesis Advisor's Signature

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1	
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 คำถามการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2	
ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 ตำรับยาอายุวัฒนะ	5
2.2 ฟ้าทะลายโจร	6
2.3 เหงือกปลาหมอ	7
2.4 บอระเพ็ด	8
2.5 พริกไทย	9
2.6 ตะโกนา	10
2.7 ข่อย	11
2.8 ไรคอัลไซเมอร์	12
2.9 อนุมูลิอิสระ	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3	
ระเบียบวิธีการวิจัย	18
3.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	18
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย	18
3.2.1 การเตรียมสารสกัดและการสกัดแยกสาร	18
3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	19
3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay	22
3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay	23
3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thioflavin T assay	24
บทที่ 4	
ผลการวิจัย	26
4.1 การสกัดสารตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	26
4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา 4	26
4.3 ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	27
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	29
4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thaioflavin T Assay ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ	33
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	35
5.1 สรุปผลการวิจัย	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม	37
ประวัติผู้วิจัย	47



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบอัตราส่วนของตำรับยาอายุวัฒนะและการวิเคราะห์ตำรับยาอายุวัฒนะ	6
3.1	แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay	20
3.2	แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay	23
3.3	แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay	24
4.1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้หุ้ม เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	27
4.2	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้หุ้ม เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา	28
4.3	แสดงค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 % (IC50)	30
4.4	แสดง % Inhibition at a concentration of 1.0 mg/ml	30

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กรอบแนวคิดการวิจัย	3
2.1	กระบวนการเมทาบอลิซึมของโปรตีนต้นกำเนิดอะไมลอยด์ (APP) ผ่านทางสองเส้นทาง Nonamyloidogenic pathway และ Amyloidogenic pathway	14
3.1	แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	21
3.2	แสดงการเรืองแสงของ Thioflavin T เมื่อจับกับอะไมลอยด์บนพื้นผิว	25



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะสมองเสื่อม เป็นภาวะที่สามารถพบได้มากในผู้สูงอายุ ซึ่งเกิดได้จากความเสื่อมหรือความผิดปกติของสมอง สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease, AD) โรคหลอดเลือดสมอง (Vascular Dementia) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's Disease) โดยพบว่าร้อยละ 60-70 มีสาเหตุมาจากโรคอัลไซเมอร์นับว่าเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุด องค์การอนามัยโลกได้มีการคาดการณ์ว่าทั่วโลกจะมีผู้ป่วยกว่า 50 ล้านคน (World Health Organization, 2017) สำหรับประเทศไทย ในปี 2558 มีผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 600,000 คน และได้มีการคาดการณ์ว่าในปี 2573 นั้นจะมีผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1,117,000 คน และยังมีโอกาสที่จะเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต และโรคอัลไซเมอร์นั้นเป็นโรคที่มักเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุมากกว่า 65 ปี (ศุภวุฒิ สายเชื้อ, 2562) สำหรับโรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมและการตายของเซลล์สมอง ทำให้การทำงานของสมองเสื่อมลง ซึ่งอาการสำคัญของผู้ป่วยโรคนี้จะค่อย ๆ สูญเสียความทรงจำและการเรียนรู้ โดยไม่สามารถปฏิบัติกิจวัตรตามปกติได้ดั้งเดิม เมื่อเวลาผ่านไปอาการจะถดถอยไปเรื่อย ๆ เนื่องจากเซลล์สมองเสื่อมเพิ่มมากขึ้น มีการศึกษาพบว่า มีสารชนิดหนึ่งชื่อว่าเบต้า อะไมลอยด์ (Amyloid Beta, A β) โดยสารนี้เป็น โปรตีนชนิดหนึ่งที่สะสมในสมอง เมื่อมีเพิ่มมากขึ้นจะเกิดการเกาะตัวรวมกันเป็นอะไมลอยด์พลาค (Amyloid Plaques) (ก้องเกียรติ ภูษะกัณฑ์, 2557) การรวมตัวกันที่ผิดปกติของ A β หรือการที่ร่างกายกำจัด A β ออกไปไม่ได้ จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ เช่น การตอบสนองต่อการอักเสบเริ่มต้น (Pro-Inflammatory Response) ไมโทคอนเดรียไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ (Mitochondrial Dysfunction) การเกิดสารอนุมูลอิสระ (Oxidative Stress) จนนำไปสู่ภาวะเซลล์ตาย (Apoptosis) เป็นต้น (Daniel, 2010)

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ มีเพียงแต่ชะลออาการของโรคไม่ให้รุนแรงมากขึ้น และรักษาตามอาการเพื่อให้สมองทำงานได้นานที่สุด การรักษาอัลไซเมอร์นั้นมีทั้งการรักษาแบบที่ไม่ใช่ยา (Non-pharmacological) เช่น ฝึกกระตุ้นประสาทสัมผัสด้วยการบีบ จับ นวด การจดสมุดบันทึกชีวิตประจำวัน เป็นต้น (กรมการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา,

2557) และแบบการใช้ยา (Pharmacological) กลุ่มยาที่ใช้รักษา ได้แก่ ยากลุ่ม Cholinesterase Inhibitors ใช้ในการรักษาภาวะสมองเสื่อมระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง และ Memantine ใช้ในการรักษาภาวะสมองเสื่อมระดับปานกลางถึงรุนแรง เช่น Donepezil, Rivastigmine และ Galantamine (Thompson & Heath, 2013) ซึ่งยาส่วนใหญ่จะพบผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน เรอบ่อย ถ่ายเหลว ถ่ายหลาย ๆ ครั้ง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด เวียนศีรษะ ใจสั่น เป็นต้น (ศิริินทร์ ฉันทศิริกาญจน, 2560) ทำให้ปัจจุบันพยายามที่จะศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมุนไพรในการรักษาโรคนี้ เนื่องจากสมุนไพรไม่มีผลข้างเคียงหรือมีน้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาว่าผลของสารสกัดที่ได้จากตำรับยาอายุวัฒนะต่อการต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่จะทำลายอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของความเสื่อมของเซลล์ประสาท

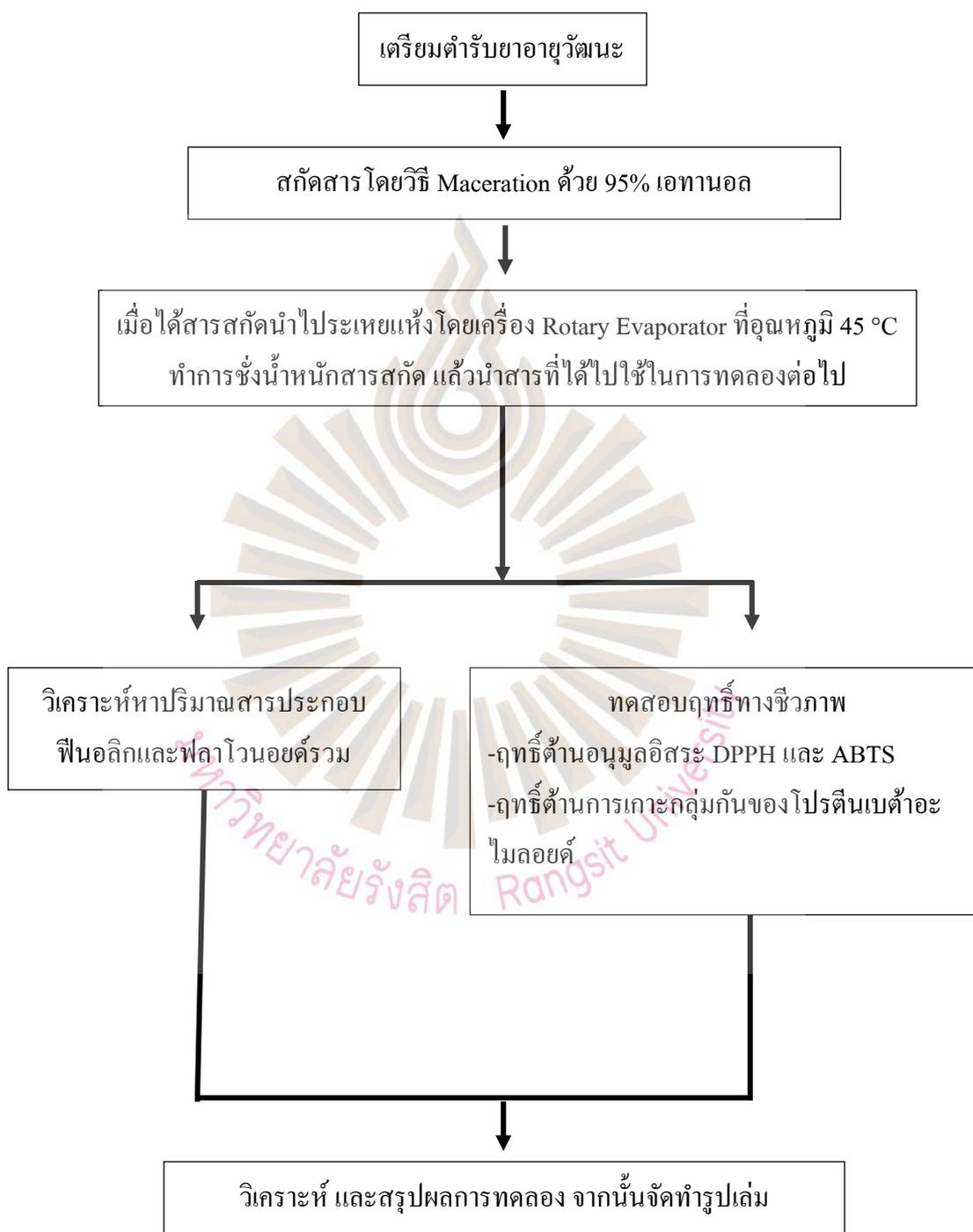
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ
- 1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ
- 1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะ

1.3 คำถามการวิจัย

ตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์หรือไม่

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.5 นิยามศัพท์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) เป็นหนึ่งของสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการสมองเสื่อมสามารถเกิดได้จากการทำงานที่เสื่อมลงของสมองส่งผลให้สมองทำงานได้น้อยลงซึ่งมักพบในผู้สูงอายุ 65 ปีขึ้นไป จึงมีผลให้สูญเสียความทรงจำจนไม่สามารถปฏิบัติกิจวัตรในประจำวันได้

เบต้า อะไมลอยด์ (Amyloid Beta) เป็น โปรตีนขนาดเล็กไม่ละลายน้ำที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 40 หรือ 42 โดยเกิดจากการเมทาบอลิซึมที่ผิดปกติของโปรตีน Amyloid Precursor Protein (APP) เป็นโปรตีนที่ช่วยในการซ่อมแซมเซลล์ประสาท เมื่อมีการสะสมเบต้า อะไมลอยด์เพิ่มมากขึ้นในเนื้อสมองเป็นเหตุทำให้เซลล์สมองเสื่อมลงและตายไป

อนุมูลอิสระ (Free Radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอกวงโคจรของโมเลกุล มีความไม่สมดุลและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่น ๆ โดยจะทำการเข้าไปดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้าง ๆ เพื่อเอามาทำให้ตัวเองมีความสมดุล ทำให้โมเลกุลที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนตอนไปมีความไม่สมดุลเกิดขึ้นและทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปเรื่อย ๆ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ตำรับยาอายุวัฒนะ

ตำรับยาอายุวัฒนะมีที่มาจากตำรับยาพิเศษ กรมพระยาปวเรศวริยาลงกรณ์ ประกอบด้วยตัวยา 6 ชนิด ได้แก่ ingsón, ข่อย, พริกไทย, ตะโกนา, หัวหมู และบอระเพ็ด มีสรรพคุณบำรุงร่างกาย เจริญอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย ซึ่งยาอายุวัฒนะได้ถูกบรรจุไว้ในรายการตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ (กระทรวงสาธารณสุข, 2562, น. 177-178) รูปแบบของยาใช้เป็นยาลูกกลอน โดยการทำยาลูกกลอนนำสมุนไพรมะพร้าวที่เป็นผงแล้วเอามาทำการผสมกับสารที่จะทำให้ตัวยาคายตัวกัน และปั้นได้ง่าย โดยส่วนมากจะนิยมใช้เป็นน้ำผึ้ง นอกจากนี้อาจใช้น้ำแข็ง น้ำเชื่อม เป็นต้น และน้ำผึ้งที่ผสมอยู่ยังช่วยในการปรับสีให้รับประทานง่าย ช่วงการทำยาลูกกลอนเหมาะสมกับสมุนไพรมะพร้าวที่มีกลิ่นหรือรสชาติไม่ดี เช่น ตัวยามีรสขมจัด จึงทำเป็นยาลูกกลอนและสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 1 เดือน หรือมากกว่า แต่ต้องอบให้แห้งสนิทก่อนเก็บใส่ขวดโหลที่สะอาด

มีการศึกษาฤทธิ์ตำรับยาอายุวัฒนะและสมุนไพรมะพร้าวในตำรับโดยสกัดด้วยน้ำพบว่า ตำรับยาอายุวัฒนะ หัวหมู, เมล็ดพริกไทย, เมล็ดข่อย, เถาบอระเพ็ด และเปลือกตะโกนามีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โดยหลังสารสื่อที่สำคัญในกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายในอนาคตได้ และสารสกัดทุกตัวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Macrophage (กุลนันท์ จงนิมิตไพบูลย์, 2557)

2.1.1 ส่วนประกอบของตำรับยา

2.1.1.1 ตัวยาสำคัญหรือตัวยาตรง คือ ตัวยาที่มุ่งแก้โรคหรืออาการหลัก

2.1.1.2 ตัวยาช่วยหรือตัวยารอง คือ ตัวยาที่ช่วยทำให้ตัวยาสำคัญออกฤทธิ์ดี

ยิ่งขึ้นหรือช่วยรักษาอาการโรคร่วม

2.1.1.3 ตัวยาประกอบหรือตัวยาเสริมหรือตัวยาคุม คือ ตัวยาช่วยคุมความแรงของตัวยาสำคัญและช่วยให้ยาออกฤทธิ์ดีขึ้นหรือตัวยาป้องกันโรคแทรกซ้อนหรือยาบำรุงหรือช่วยเสริมให้ยาหลักมีสรรพคุณสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2.1.1.4 ตัวยาแต่งรส แต่งกลิ่น แต่งสี

หมายเหตุ ยาแต่ละตำรับไม่จำเป็นจะต้องมีครบทั้ง 4 ชนิด

โดยตำรับยาอายุวัฒนะ มีฤทธิ์สุขุมร้อน ช่วยบำรุงร่างกาย เจริญอาหาร ชะลอความเสื่อมของร่างกาย

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบอัตราส่วนของตำรับยาอายุวัฒนะและการวิเคราะห์ตำรับยาอายุวัฒนะ

สมุนไพร	อัตราส่วน	รสนยา	ฤทธิ์ยา
ทิงถ่อน	1 ส่วน	ร้อนสุขุม	ยาตรง
แห้วหมู	1 ส่วน	ซ่าคืดร้อนเผ็ด	ยาตรง
บอระเพ็ด	1 ส่วน	ขม	ยาตรง
พริกไทย	1 ส่วน	ร้อนเผ็ด	ยาตรง
ตะโกนา	1 ส่วน	ฝาดขม	ยาตรง
ข่อย	1 ส่วน	เมามันร้อน	ยาช่วยและยาประกอบ

ที่มา: กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป.

2.2 ทิงถ่อน

ทิงถ่อน ชื่อวิทยาศาสตร์ *Albizia procera* (Roxb.) Benth. วงศ์ Fabaceae ส่วนที่ใช้คือ เปลือกต้น รสร้อนสุขุม สรรพคุณ เจริญอาหาร ขับผายลม บำรุงธาตุ แก้ธาตุพิการ (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 29) รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารกลุ่ม Triterpenoid Saponins ที่แยกได้จากเปลือกต้นทิงถ่อน ได้แก่ สาร 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl] echinocystic acid, 3-O- $[\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 22)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl] echinocystic acid และ 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl] acacic acid lactone มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเรื้อรัง (Human Hepatoma; HEPG2) ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.13 μ g/mL (Melek, Miyase,

Ghaly, & Nabil, 2007) สารสกัดหยาบเปลือกต้นทังถ่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีค่า IC_{50} ระหว่าง 100-1,000 $\mu\text{g/mL}$ (ชุติมา ชัยสนธิ, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์, รัตนา ปานเรียนแสน, และวิชัย เชิดชูวิทยาศาสตร์, 2555) มีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) พบว่าเปลือกทังถ่อนมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้ดีคือ IC_{50} เท่ากับ 2.9 $\mu\text{g/mL}$ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Xanthine Oxidase ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.4 $\mu\text{g/mL}$ (ยุทธนา พงษ์พิริยะเดชะ, พัชรินทร์ นวลศรีทอง, และนฤมล ศิรินทรเวช, 2555) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า สารสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลของเปลือกต้นทังถ่อนนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ HIV-1 integrase ได้ดีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.5 $\mu\text{g/mL}$ และทำการแยกสารบริสุทธิ์ได้สองสาร ได้แก่สาร (+)-catechin และ Protocatechuic Acid พบว่าสาร (+)-catechin สามารถต้านฤทธิ์ได้ดีกว่า Protocatechuic Acid (Pattarapan et al., 2015) และเปลือกต้นทังถ่อนยังมีฤทธิ์ในการต้านเบาหวานโดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ได้ในหลอดทดลอง (Anand, Sathish, & Dhivya, 2018)

2.3 เห้าหุมู

เห้าหุมู ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cyperus rotundus* L. วงศ์ Cyperaceae ส่วนที่ใช้คือ หัวใต้ดิน รสขาคิดจะร้อนเผ็ด สรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร ขับลมในลำไส้ แก้ท้องขึ้นอืดเพื่อ บำรุงกำลัง บำรุงครรภ์รักษา (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 88) พบการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหัวเห้าหุมูโดยพบว่า สารสกัดที่สกัดโดยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลนั้นมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งอาการท้องร่วงได้ การศึกษาในหนูถีบจักร Swiss Albino โดยทำให้หนูนั้นมีอาการท้องร่วงด้วยน้ำมันละหุ่ง สารสกัดหัวเห้าหุมูสามารถลดความถี่ของการถ่ายอุจจาระ และทำให้ระยะเวลาที่จะเกิดอาการท้องร่วงสามารถเกิดได้ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Uddin, Mondal, Shilpi, & Rahman, 2006) สารสกัดที่มีโพลิโกลเมอร์ฟลาโนอยด์สูง (TOF) และสารสกัดหัวเห้าหุมูที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีและให้ฤทธิ์ที่ดีกว่า Quercetin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน และยังพบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและสารสกัด TOF ของหัวเห้าหุมูมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว L1210 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 200 $\mu\text{g/mL}$ และ ค่า IC_{50} เท่ากับ 240 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และมีการทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยเกิดการทำลายแบบ Apoptosis (Kilani et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดน้ำของหัวเห้าหุมูยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (สุพัตรา ชาวลิตพงษ์ และคณะ, 2557) และสารสกัดเอทานอลหัวเห้าหุมูยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ SW-620 (จิรภัทร เจริญคุปต์, 2552) และพบการศึกษาว่าสารสกัดทั้งต้นเห้าหุมู

ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia* และเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (Parekh, & Chanda, 2006)

2.4 บอระเพ็ด

บอระเพ็ด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson ชื่อวงศ์ Menispermaceae ส่วนที่ใช้คือ เถา รสขม สรรพคุณ แก้ไข้ตัวร้อน ขับพิษอักเสบ แก้ร้อนในกระหายน้ำ ทำให้เนื้อเยื่อ แก้วสะอึก บำรุงกำลัง บำรุงน้ำดี บำรุงไฟธาตุ (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 66) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า เถาบอระเพ็ดพบสารกลุ่ม Flavonoid ได้แก่ Apeginin, Diosmetin, Genkwanin, Luteolin 4'-methyl ether 7-glucoside, Genkwanin 7-glucoside, และ Luteolin 4'-methyl ether 3'-glucoside (Lin, 2009; Umi & Noor, 1995) สารกลุ่ม Terpenoids ที่แยกได้จากเถา ได้แก่ Triterpenoids, Cycloeucalenol Cycloeucalenone (Kongkathip et al., 2002) Diterpenoids, Tinocrispol A (Lam, Ruan, Hsieh, Su, & Lee, 2012) Borapetol A และ Borapetols B (Fukuda, Yonemitsu, & Kimura, 1986) สารกลุ่ม Alkaloid ได้แก่ Aporphines, *N*-formylasimilobine 2-O- β -D-glucopyranoside, Tinoscorside A และ *N*-demethyl-*N*-formyldehydronormuciferine (Choudhary, Ismail, Ali, Shaari, & Lajis, 2010; Fukuda, Yonemitsu, & Kimura, 1983) สารกลุ่ม Lignan ได้แก่ Secoisolariciresinol, Syringaresinol (Chung, 2011) Adenosine, Uridine และ Adenine (Praman, Mulvany, Williams, Andersen, & Jansakul, 2012) พบการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของบอระเพ็ดพบว่า สาร *N*-trans-feruloyltyramine โดยแยกได้จากส่วนของเถาบอระเพ็ดสกัดด้วยน้ำให้ฤทธิ์ช่วยการต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (NO) โดยกระตุ้นทำให้มีการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ในเยื่อช่องท้อง (Yokozawa, Wang, Chen, & Hattori, 2000) มีการทดสอบโดยการทำให้หนูเกิดการบวมน้ำด้วย Carrageenan โดยให้หนูกินสารสกัดเถาบอระเพ็ดจากการสกัดด้วยเมทานอล 50% พบว่าช่วยยับยั้งการเกิดการบวมน้ำของหนูได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Higashino, Suzuki, Tanaka, & Pootakham, 1992) สารสกัดหยาบบอระเพ็ดถูกสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเทียบเท่ากับ Butylhydroxytoluene (BHT) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และวิตามินซี (Zulkhairi et al., 2009) มีการศึกษาการต้านสารสื่อประสาท Acetylcholinesterase (AChE) ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุของภาวะสมองเสื่อมพบว่า สารกลุ่มอัลคาลอยด์ ได้แก่ 4,13-dihydroxy-2,8,9-Trimethoxydibenzo, Quinolizinium, *N*-formylannonaine, Magnoflorine, Dihydrodiscretamine, Columbamine, *N*-formylnormuciferine และ *N*-trans-feruloyltyramine สามารถยับยั้ง AChE มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 48.1 μ M (Yusoff, Hamid, & Houghton,

2014) พบการศึกษาความเป็นพิษในสารสกัดบอระเพ็ดที่ถูกสกัดด้วยน้ำที่พบว่า บอระเพ็ดมีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ MCF-7, HeLa, Caov-3 และ HepG2 (Zulkhairi et al., 2008) การศึกษาความเป็นพิษของบอระเพ็ดที่สกัดด้วยน้ำ เมทานอลและคลอโรฟอร์มโดยทดสอบในหนูขาว Swiss พบว่ามีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็ง MCF-7, MDA-MB-231, HeLa และ 3T3 หยุดการเจริญเติบโตได้ (Ibahim et al., 2011) สาร Adenosine, Uridine, Salsolinol, Higenamine และ Tyramine ที่แยกได้จากเถาบอระเพ็ดมีการทดสอบในหนู โดยพบว่า Adenosine, Salsolinol และ Higenamine สามารถช่วยทำให้ความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจลดลงได้ (Praman, Mulvany, Williams, Andersen, & Jansakul, 2013) นอกจากนี้ยังพบสาร Furanoditerpenoids ที่แยกออกมาจากสารสกัดเถาบอระเพ็ดที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล โดย Borapetosides A และ Borapetosides C สามารถทำให้น้ำตาลในเลือดของหนูลดลงได้ทั้งในหนูปกติและหนูที่ถูกทำให้เกิดเบาหวานด้วย Streptozotocin (STZ) (Lam, Ruan, Hsieh, Su, & Lee, 2012)

2.5 พริกไทย

พริกไทย ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper nigrum* L. วงศ์ Piperaceae ส่วนที่ใช้คือ เมล็ด รสร้อนเผ็ด สรรพคุณ แก้ลมอัมพฤกษ์ ลมมุตมาต ลมถันในท้อง แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ บำรุงธาตุ แก้เสมหะเพื่อง (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 67) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากเมล็ดพริกไทยโดยทำการสกัดกับเอทิลอะซิเตทและเอทานอลนั้น ให้สารสำคัญ ได้แก่ β -Caryophylline, Limonene, β -pinene, Sabinene และ Piperine ซึ่งเป็น สาร ประกอบ หลัก ใน Oleoresins .ในการศึกษาฤทธิ์ของพริกไทยพบว่า น้ำมันหอมระเหยและ Oleoresins ให้ฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีโดยทำการเทียบกับสาร Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) ซึ่งเป็น สารมาตรฐาน ที่ใช้ในการทดสอบ (Kapoor et al., 2009) เมล็ดพริกไทยที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลและสารบริสุทธิ์ Piperine มีฤทธิ์ที่สามารถต้านการอักเสบได้ โดยไปยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ (NO) จาก Macrophage ของหนูที่ทำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.52 ± 0.68 และ 11.48 ± 1.58 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้ฤทธิ์ที่ ดีกว่า Indomethacin เป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ (ยา Indomethacin IC_{50} เท่ากับ 20.32 ± 3.28 $\mu\text{g/mL}$) (อินทขัย สักดิ์ภักดีเจริญ, สุนิตา มากชูชิต, และอรุณพร อิฐรัตน์, 2557) สารสกัดจากเฮกเซนและเอทานอลของพริกไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการบวมในอุ้งเท้าหนูโดยถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมด้วย Carrageenan (Tasleem, Azhar, Ali, Perveen, & Mahmood, 2014) พบการศึกษาฤทธิ์ของสาร Piperine ที่แยกได้จากพริกไทยพบว่า สามารถระงับอาการปวดจากบิตเกร็งของช่องท้องหนูได้เมื่อ

ถูกทำให้มีอาการบิดเกร็งด้วย Acetic Acid และทดสอบฤทธิ์ระงับการปวดด้วยวิธี Tail Flick Assay โดยนิตสาร Piperine และสารมาตรฐานมอร์ฟีน แล้วนำทางหนูวางบนแผ่นความร้อน จับเวลาการยกหางหนีของหนู พบว่าสาร Piperine สามารถบรรเทาความเจ็บปวดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Bukhari, Alhumayyd, Mahesar, & Gilani, 2013) นอกจากนี้การศึกษานี้การศึกษานี้ Piperine จากพริกไทย พบว่า มีผลต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำในหนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ ICR โดยใช้ Morris Water Maze ในการทดสอบประเมินผลการเรียนรู้และความจำ หลังจากให้สาร Piperine พบว่าสามารถลด escape latency (ระยะเวลาที่หนูสามารถว่ายน้ำออกจากอุโมงค์เพื่อมาเกาะที่ platform) ของหนูขาวเล็กได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม (Chaiwiang, Pongpattanawut, Khorana, Thanoi, & Teaktong, 2016)

2.6 ตะโกนา

ตะโกนา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros rhodcalyx* Kurz. วงศ์ Ebenaceae ส่วนที่ใช้คือเปลือกต้น รสฝาดติดขม สรรพคุณ บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนัด ขับระดูขาว ขับปัสสาวะ แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด เป็นยาอายุวัฒนะ (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 25) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า ตะโกนามีสารสำคัญ ได้แก่ Lupeol, β -sitosterol, Stigmasterol, Diospyrin และ Betulinaldehyde พบการศึกษาฤทธิ์ของสาร Diospyrin และ Betulinaldehyde ที่แยกได้จากตะโกนา พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และเชื้อวัณโรคในหลอดทดลองได้ (Thitaree, n.d.) สารสกัดหยาบของตะโกนามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ทำให้จำนวนของเซลล์มะเร็งไม่มีการเพิ่มขึ้นได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 10-100 $\mu\text{g/mL}$ (สุพัตรา ขวดีตพงษ์, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์, รัตนา ปานเรียนแสน, และวิชัย เชิดชีวิตศาสตร์, 2555) มีฤทธิ์ในยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 100-1,000 $\mu\text{g/mL}$ (ชุตินา ชัยสนธิ และคณะ, 2555) ยังมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW-620 โดยพบว่าสารสกัดตะโกนาที่สกัดได้จากเปลือกต้นให้ฤทธิ์ที่ดีสามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 29.7 $\mu\text{g/mL}$ (จิรภัทร เจริญคุปต์, 2552) นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับสมรรถภาพทางเพศในหนู โดยทำการให้สารสกัดตะโกนา ที่ความเข้มข้น 200 mg/kg พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดตะโกนานั้นมีพฤติกรรมในการเกี่ยวพาราฮี และระดับ Testosterone สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (วิมลดา ดีแท้, 2547)

2.7 ข่อย

ข่อย ชื่อวิทยาศาสตร์ *Streblus asper* Lour. วงศ์ Moraceae ส่วนที่ใช้คือเมล็ด รสเฝื่อน ร้อน สรรพคุณตามตำรายาไทยเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุเจริญอาหาร ขับผายลม แก้ท้องอืดเพื่อ (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป., น. 16-17) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า ข่อยมีสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นจำนวนมาก ได้แก่ Strophanolloside, Asperoside, Strebloside, Kamloside, Indroside, Cannodimemoside, Strophalloside, Glucokamloside, 16-O-acetyl glucogitomethoside, Glucogitodimethoside และ Glucostrebloside (Rastogi, Kulshreshtha, & Rawat, 2006) ในใบมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Ibrahim, Mat, Lim, & Ahmad, 2013) นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากใบยังพบสารต่าง ๆ ได้แก่ Phytol, α -farnesene, *trans*-farnesyl acetate, Caryophyllene และ *trans*- α -farnesene (Phutdhawong et al., 2004) มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบข่อยพบว่า ใบข่อยที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุของฟันผุ (Wongkham et al., 2001) สารสกัดจากเปลือกต้นที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลมีผลต่อความดันโลหิต มีฤทธิ์กระตุ้นหัวใจในกบ การหดเกร็งกล้ามเนื้อในกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้กระต่าย และในมดลูกของหนูตะเภา (Rastogi, Kulshreshtha, & Rawat, 2006) สารกลุ่มลิกแนน (Lignans) ที่สกัดได้จากราก ได้แก่ (7'R,8'S,7''R,8''S)-erythro-strebluslignan G, Magnolol, Isomagnolol และ Isolariciresinol (Li et al., 2013) สารสกัดที่สกัดได้จากเปลือกลำต้น ได้แก่ Magnolol และ 9- β -xylopyranosyl-isolariciresinol สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ HepG 2.2.15 (Li et al., 2012) พบการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในใบข่อยทำการสกัดด้วยเอทานอล พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูและสามารถยับยั้งเอ็นไซม์ Cyclooxygenase (COX)-2 และ Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) ในเซลล์ RAW 264.7 ได้โดยถูกทำให้เกิดการอักเสบด้วย Lipopolysaccharides (LPS) (Bungorn, Jintana, Nawarat, & Doosadee, 2009) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบข่อย พบว่าสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Intracellular Reactive Oxygen Species; ROS) ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SK-N-SH Human Neuroblastoma Cells โดยทำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Kanathip, Tarinee, Veerapol, & Jintana, 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานพบว่า α -amyrin acetate ที่แยกได้จากสารสกัดข่อยและสารสกัดจากเปลือกต้นข่อยที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์สามารถทำให้หนูที่ถูกทำให้เกิดเบาหวานด้วย Streptozotocin (STZ) มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลงได้ (Karan, Mondal, Mishra, Pal, & Rout, 2013) ยังมีการศึกษาฤทธิ์เกี่ยวกับความจำบกพร่อง

พบว่าสารสกัดใบข่อยสามารถต้านการเรียนรู้และความจำบกพร่องในหนูได้ โดยถูกทำให้ความจำบกพร่องด้วย Scopolamine (Rakwarinn, Jintana, Prapawadee, & Tarinee, 2010) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่า สารสกัดเมทานอลของเปลือกต้นข่อยสามารถลดขนาดของก้อนเนื้อเอื้อง Ehrlich Ascites Carcinoma ในหนู Swiss Albino ได้ (Kumar et al., 2013) และนอกจากนี้ สาร (+)-strebloside โดยสกัดจากเปลือกต้นข่อยให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-22 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-2312 และเซลล์มะเร็งรังไข่ OVCAR3 ในหนู NCr nu/nu Mice ได้ (Ren et al., 2017)

2.8 โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุดซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อม โดยสามารถเกิดได้จากความเสื่อมในการทำงานของสมองหรือโครงสร้างของเนื้อเยื่อของสมองที่ผิดปกติไปซึ่งมักจะพบได้มากในผู้สูงอายุ โดยสาเหตุที่การทำงานของสมองเสื่อมลงนั้นเกิดจากโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า เบต้า อะไมลอยด์ (Amyloid-Beta) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อมีการไปจับกับเซลล์สมองจะส่งผลให้เซลล์สมองเสื่อมและฝ่อลง (Marchesi, 2012) รวมถึงการที่สารอะซีทิลโคลีน (Acetylcholine) ลดลงทำให้เกิดความเสียหายในการสื่อสารระหว่างเซลล์สมอง โดยทำให้สมองของผู้ป่วยมีความบกพร่องทั้งด้านความทรงจำและการเรียนรู้ เช่น การใช้ภาษา ทักษะที่ใช้ในการดำรงชีวิตประจำวัน การรับรู้ถึงสิ่งแวดล้อม การตัดสินใจวางแผน โดยความผิดปกติที่เกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวัน รวมถึงสังคมและอาชีพ (Nieoullon, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าการอักเสบ มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เมื่อมีการสะสม $A\beta$ เป็นจำนวนมากในสมองก็จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นผลให้เกิดการอักเสบไปทำลายเซลล์ประสาท และยังเกิดได้จากภาวะความผิดปกติของเมตาบอลิซึม เช่น Mitochondrial Dysfunction จะเกิดอนุมูลอิสระขึ้นเป็นจำนวนมากและอย่างรวดเร็วในโรคอัลไซเมอร์ Oxidative Stress จะไปส่งเสริมการเกิด $A\beta$ และทำให้เกิดการทำลายของเซลล์มากยิ่งขึ้น (Dong-gyu, 2010)

2.8.1 Amyloid-Beta ในโรคอัลไซเมอร์

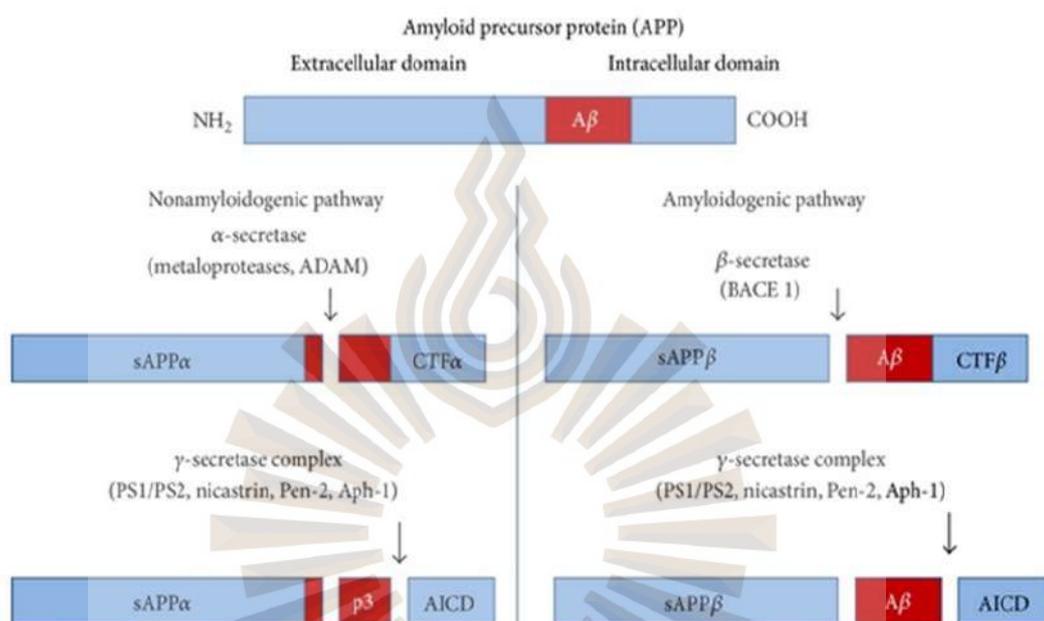
โรคอัลไซเมอร์มีสาเหตุสำคัญมาจากความผิดปกติในการสะสมของโปรตีนที่ชื่อว่า Amyloid-Beta ($A\beta$) ตกตะกอนภายในเนื้อสมอง ซึ่งเป็นพิษและเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์สมองเสื่อมลงและตายไป การสะสมของ $A\beta$ ที่มากขึ้นจะจับตัวเป็นกลุ่มเรียกว่า Amyloid Plaque

เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ประสาท ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) และคอร์เทกซ์ (Cortex) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความทรงจำ และการรับรู้ (Huang, & Mucke, 2012) ผู้ป่วยอัลไซเมอร์ส่วนใหญ่เกิดจากชนิด Sporadic Alzheimer ที่มีสาเหตุการเกิดโรคไม่สัมพันธ์กับ Genetic Mutations ทั้งนี้มีส่วนน้อยที่ผู้ป่วยเป็นอัลไซเมอร์ชนิดที่มาจาก Inherited Genetic Mutation โดยเฉพาะการ Mutation ของ APP และ Presenilins ที่พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง $A\beta$ และทำให้เกิดการสูญเสียความทรงจำ ใน Transgenic Mouse Model ของ โรคอัลไซเมอร์ (Buchhave et al., 2012) พบการสะสมของ $A\beta$ อย่างผิดปกติได้ในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ทั้ง 2 ชนิด จึงกล่าวได้ว่า $A\beta$ เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มียาหรือวิธีการใดที่จะป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ ดังนั้นการลดการสร้าง $A\beta$ ด้วยวิธีต่าง ๆ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้ได้

2.8.2 กลไกการเกิด Amyloid-Beta

$A\beta$ เป็น โปริตีนขนาดเล็กไม่ละลายน้ำที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 40 หรือ 42 ตัว โดยโพรตีนเหล่านี้เกิดจากการเมทาบอลิซึมที่ผิดปกติของโพรตีน Amyloid Precursor Protein (APP) ซึ่งเป็นโพรตีนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การดำรงชีวิต และช่วยในการซ่อมแซมเซลล์ประสาท การตัด โพรตีนต้นกำเนิดอะไมลอยด์ (APP) แบ่งได้เป็นสองเส้นทางที่เป็นอิสระต่อกัน ได้แก่ เส้นทางที่ก่อให้เกิดการสะสมเบต้า อะไมลอยด์ (Amyloidogenic Pathway) และเส้นทางที่ไม่ทำให้เกิดการสร้างเบต้า อะไมลอยด์ (Non-amyloidogenic Pathway) ดังรูปที่ 2.1 โดยเส้นทางที่ก่อให้เกิดการสะสมของอะไมลอยด์จะอาศัยการทำงานด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ β -secretase (β -site APP-cleaving enzyme 1 หรือ BACE-1) และ γ -secretase โดย β -secretase เข้าตัด APP ที่ตำแหน่ง β secretase site ข้างปลาย N-terminal ในบริเวณ Intracellular และ เอนไซม์ γ -secretase เข้าตัด APP บริเวณส่วนที่อยู่ใน Transmembrane ตำแหน่ง C-terminal ทำให้ได้ $A\beta$ ความยาวที่แตกต่างกัน โดยที่ส่วนใหญ่จะมีความยาว 40-42 Amino Acid เรียกว่า $A\beta$ 40 หรือ $A\beta$ 42 หลังจากนั้น $A\beta$ ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำจะเกาะกลุ่มกัน (Aggregation) เรียกว่า เบต้าอะไมลอยด์ โอลิโกเมอร์ ($A\beta$ oligomer) และเมื่อหลาย ๆ $A\beta$ oligomer มารวมกันจะกลายเป็น Amyloid Plaques ในที่สุดซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท การสะสมของเบต้า อะไมลอยด์ผ่านเส้นทางนี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ ส่วนเส้นทางที่ไม่ทำให้เกิดการสร้างเบต้าอะไมลอยด์จะอาศัยการทำงานของ α -secretase จะตัดสาย APP ที่ตำแหน่งใน $A\beta$ ทำให้เกิด sAPP α ที่ละลายน้ำได้และหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ ซึ่งกระบวนการนี้ไม่ทำให้เกิดการสร้าง

และสะสมของ $A\beta$ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้อาจลดการสร้างและสะสม $A\beta$ ที่มีความเป็นพิษในเซลล์ได้ จึงน่าจะเป็นแนวทางในการลดการสูญเสียเซลล์ประสาทและความทรงจำของผู้ป่วยได้ (Masters et al., 2015; Paul, Rogelio, & Laura, 2014; Wang, Gu, Masters, & Wang, 2017)



รูปที่ 2.1 กระบวนการเมตาบอลิซึมของ โปรตีนต้นกำเนิดอะไมลอยด์ (APP) ผ่านทางสองเส้นทาง Nonamyloidogenic pathway และ Amyloidogenic pathway

ที่มา: Paul et al., 2014

2.9 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายและสามารถได้รับจากปัจจัยภายนอก เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย การอักเสบต่าง ๆ เช่น การอักเสบของข้อ การได้รับรังสี การได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี ยาฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนกับอาหารที่บริโภค คาร์บอนบุหรี่ คาร์บอนจากการเผาไหม้ เขม่า มลพิษทางอากาศต่าง ๆ เป็นต้น อนุมูลอิสระ (Free Radicals) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีการจับคู่อย่างน้อยหนึ่งตัวหรืออิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired Electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล ทำให้ไม่เกิดความเสถียรในตัวเอง แล้วอนุมูลอิสระจะไปดึงเอาอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลข้างเคียงมาจับคู่เพื่อที่จะทำให้ตัวเองนั้นเกิดความสมดุล

และทำให้อะตอมที่ถูกดึงเอาอิเล็กตรอนไปนั้นก็จะเกิดความไม่สมดุลและทำปฏิกิริยาแบบนี้ต่อไปเรื่อย ๆ ซึ่งปฏิกิริยาถูกโซ่นี้จะดำเนินต่อไปเรื่อย ๆ และจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลา ในสภาวะปกติของร่างกายจะมีกระบวนการควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้เพื่อไม่ให้มีมากเกินไป โดยจะอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านการออกซิเดชัน (Antioxidants) หลายชนิด ทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไทโอน (Glutathione, GSH), เอนไซม์ Glutathione Peroxidase หรือได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี หรือเบต้าแคโรทีน เป็นต้น หากกระบวนการควบคุมเหล่านี้ต่ำลงหรือเสียไป หรือมีภาวะที่ทำให้สารอนุมูลอิสระสูงขึ้นมากในร่างกาย จะทำให้สมดุลเสียไป ก็จะเกิดการทำลายเป็นอันตรายต่อชีวโมเลกุล เรียกว่าเกิด ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (Oxidative Stress) โดยสามารถทำลายส่วนประกอบของเซลล์ได้ เช่น ลิพิด (Lipid) โปรตีน (Protein) เอนไซม์ (Enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (Cell Membrane) คอลลาเจน (Collagen) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของ DNA และนำไปก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคชรา (Aging) โรคมะเร็ง (Cancer) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's Disease) โรคข้ออักเสบ (Arthritis) เป็นต้น (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993)

อนุมูลอิสระแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species; ROS) โดย ROS ส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นในการขนส่งอิเล็กตรอนใน Mitochondria, Peroxisomes, Endoplasmic Reticulum (ER) และในเยื่อหุ้มนิวเคลียส โดยเกิดในกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบใช้ออกซิเจน ตัวอย่างเช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide Anion Radical, $O_2^{\cdot-}$) ไฮดรอกซิล (hydroxyl Radical, $\cdot OH$) เปอร์ออกซิล (Peroxyl Radical, ROO^{\cdot}) และไฮโดรเปอร์ออกซิล (Hydroperoxyl Radical, HOO_2^{\cdot}) เป็นต้น และกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species; RNS) ในการผลิต RNS สามารถผลิตได้จากการกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน L-arginine โดยจะมีเอนไซม์เข้ามาเร่งการเกิดปฏิกิริยาเรียกกระบวนการนี้ว่า Nitric Oxide Synthases (NOS) โดยทำการเปลี่ยน L-arginine ให้เป็น L-citrulline และ NO^{\cdot} อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนตัวอย่างเช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide Radical, NO^{\cdot}) และไนโตรเจนไดออกไซด์ (Nitrogen Dioxide Radical, NO_2^{\cdot} , NO^{\cdot}) (Aruoma, Kaur, & Halliwell, 1991)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เป็นสารที่จะมาขยับยั้งหรือช่วยชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ที่เป็นปฏิกิริยาทางเคมีในการผลิตอนุมูลอิสระในร่างกายมาเป็นตัวช่วยเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามกลไก

การยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (Preventive Antioxidant) ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Scavenging Antioxidant) และทำให้ถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (Chain Breaking Antioxidant) (Aruoma, Kaur, & Halliwell, 1991) สารต้านอนุมูลอิสระนั้นร่างกายสามารถผลิตได้เองเพื่อป้องกันการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารหรือเอนไซม์ที่ร่างกายได้มีการสร้างขึ้น เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide Dismutase) คตาเลส (Catalase) กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase) เป็นต้น และเกิดจากภายนอกที่ร่างกายได้จากการกินอาหาร ได้แก่ วิตามินซีจากผลไม้รสเปรี้ยว วิตามินอีจากถั่ว ธัญพืชต่าง ๆ วิตามินเอจากผักผลไม้สีส้มเหลือง เช่น ฟักทอง มะละกอ ลูทีน (Lutein) จากผักใบเขียว และสารอื่น ๆ ที่ได้จากพืช เช่น โพลีฟีนอล (Polyphenols) ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) เบต้าแคโรทีน (β -Carotene) คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นต้น สามารถพบสารเหล่านี้ได้จากพืช ผัก และผลไม้ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติหรืออาจพบได้ในสาหร่ายและยีสต์เช่น สารแอสตาแซนธิน (Halliwell, 1999)

2.9.1 อนุมูลอิสระกับ Amyloid-Beta

Oxidative Stress เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของโรคอัลไซเมอร์ โดยการสะสมของ $A\beta$ อาจนำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาทผ่านทาง Oxidative Stress เช่น การทำลาย DNA และโปรตีน อันเนื่องมาจากมีออกซิเดชันมากเกินไป ซึ่งเป็นผลจากการเสียสมดุลระหว่าง ROS และสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้เป็นผลจากคุณสมบัติการออกซิไดซ์ของ $A\beta$ ซึ่งจะผลิต Hydrogen Peroxide (H_2O_2) และชักนำให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระ (Wojtunik-Kulesza, Oniszczyka, Oniszczyk, & Waksmundzka-Hajnos, 2016)

$A\beta$ เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยสามารถผลิต ROS ภายในเซลล์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยาของโมเลกุลออกซิเจนกับไอออนโลหะ (Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{3+}) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหลายขั้นตอน โลหะจะเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์โดยเอนไซม์ เช่น Ceruloplasmin, Cytochrome C Oxidase และ Amine Oxidases จะแสดงบทบาทหลัก จุดเริ่มต้นของอิเล็กตรอนที่เป็นสาเหตุให้เกิดรีดักชันในสถานะออกซิเดชันของไอออนโลหะก็จะเป็น Peptide เอง จากอะตอมของกำมะถันใน Methionine 35 (Met35) ของ $A\beta$ (Cheignon et al., 2018) สาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์อีกสาเหตุ คือ $A\beta$ ชักนำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย อันเนื่องจากการผลิต ROS มากผิดปกติ เช่น Superoxide Anion, Hydroxyl Radical และ Hydrogen Peroxide โดย

ที่กระบวนการ Fission และ Fusion เป็นสิ่งจำเป็นใน Mitochondrial Dynamics ในการรักษาสมดุลภายในเซลล์ เมื่อกระบวนการเหล่านี้เสียสมดุลจะส่งผลให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถทำงานได้อย่างถูกต้อง ทำให้อ่อนแอต่อภาวะ Oxidative Stress นำไปสู่การทำลายเซลล์ประสาท นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า ROS ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลงปฏิสัมพันธ์ของ A β ในไมโทคอนเดรีย อีออนของโลหะ (Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{3+}) จะทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทโดยผ่านทางรีดักชันทำให้ได้ H_2O_2 ก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาท ซึ่งจะ ไปเร่งให้เกิดการรวมกันของ A β (Guglielmotto, Giliberto, Tamagno, & Tabaton, 2010; Glau, An, & Hulme, 2018)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะและสมุนไพรรในตำรับ 6 ชนิด คือ ข่อย ตะโกนา ทั้งก่อน บอระเพ็ด พริกไทย และแห้วหมู โดยสกัดสารจากตำรับยาอายุวัฒนะและสมุนไพรรเดียว โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอล 95% จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เอามาวิเคราะห์หาปริมาณของสารฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay และหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Assay แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH และ ABTS Assays และทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดที่ได้จากตำรับยาอายุวัฒนะโดยวิธี Thioflavin T Assay

3.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ ได้แก่ Hot Air Oven (Memmert, Germany), Beaker, Water Bath BEC THAI, WNB45, Erlenmeyer Flask, Thai 96 Well Plate (Nunc, Denmark), Analytical Balance (4 ตำแหน่ง Satorius, Germany), Round Bottom Flask, Cylinder (Schott Duran, Germany), Rotary Evaporator (Buchi, Switzerland), Micro Pipette (Gilson, France), Microplate Reader (Bio-TEK, USA)

สารเคมี ได้แก่ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS), 2,2-Diphenyl-Picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA) Absolute Ethanol, Folin-Ciocalteu, (Merck, Germany), α -tocopherol, Butylated Hydroxytoluene (BHT), Gallic Acid, Quercetin (Sigma, USA), Aluminum Chloride, Sodium Acetate, Sodium Carbonate (Ajax Finechem, Thai)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดและการสกัดแยกสาร

นำสมุนไพรรทั้ง 6 ชนิด คือ ข่อย ตะโกนา ทั้งก่อน บอระเพ็ด พริกไทย และแห้วหมู นำมาล้างให้สะอาดและสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นก็ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วมาบดด้วย

เครื่องบดไฟฟ้าจะได้ผงสมุนไพรบดหยาบ สกัดสารด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยนำผงบดหยาบสมุนไพรใส่ไว้ในขวดหรือโถแก้วเติม 95% เอทานอล ด้วยอัตราส่วนของตำรับยาอายุวัฒนะ 1000 g ต่อตัวทำละลาย 3 L และสมุนไพรเดี่ยว 6 ชนิด ชนิดละ 250 g ต่อตัวทำละลาย 850 ml ทำการแช่เป็นเวลาทุกวันและเก็บสารสกัดทุก 3 วันเป็นเวลา 3 ครั้ง จากนั้นเอามากรองแล้วบีบเอาสารสกัดสมุนไพร นำเอาสารสกัดสมุนไพรที่ได้ไปกรองเอาเศษสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.2.1 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) เป็นวิธีการที่ใช้อย่างกว้างขวางอีกวิธีการหนึ่งในการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ราคาไม่แพง และยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความเสถียรสูงสามารถใช้ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่ชอบน้ำและชอบไขมัน ซึ่งวิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่ง DPPH นั้นเป็นอนุมูลอิสระที่ให้สีม่วงในเอทานอล โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในเวลาที่กำหนดจะทำให้สีม่วงนั้นค่อย ๆ จางลงกลายเป็นสีเหลือง (ดังรูปที่ 3.1) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของ DPPH โดยผลการทดสอบจะรายงานเป็นค่า IC_{50} หมายถึง ความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ลดลงได้ 50% ของสารสกัดสมุนไพร จากนั้นทำการสร้างกราฟแล้วคำนวณหาค่า IC_{50} เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรกับสารมาตรฐาน (Kopjar, Piližota, Hribar, & Simčič, 2009)

การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย DPPH โดยเตรียมอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 2 mM โดยมีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจาง DPPH ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.03 nm แล้วทำการเตรียมสารมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene (BHT) และ α -tocopherol ในความเข้มข้นที่ 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.7813, 0.3906, 0.1953, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122, 0.0061 และ 0.0031 mg/mL ตามลำดับ โดยตำรับและสมุนไพรใช้ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งละลายด้วยเอทานอล (ดังตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

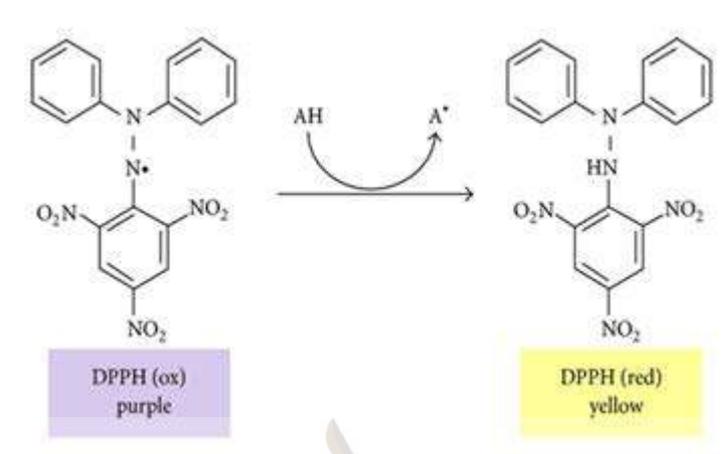
	Control (μL)	Positive Control (μL)	Sample Blank (μL)	Sample (μL)	Positive Control Blank (μL)
สารสกัด สมุนไพร	-	-	100	100	-
BHT, α -tocopherol	-	100	-	-	100
DPPH	100	100	-	100	-
Absolute Ethanol	100	-	100	-	100

แล้วนำมาบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใช้ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย Microplate Reader แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟคำนวณระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ 50% ของสารสกัด ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยการคำนวณมีดังนี้ (สมการที่ 3.1)

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{ctr}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{ctr}}] \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.1})$$

โดย A_{ctr} = Absorbance of control - Absorbance of control blank

A_{sample} = Absorbance of sample - Absorbance of sample blank



รูปที่ 3.1 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ที่มา: Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, & Borges, 2013

3.2.2.2 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) หรือ ABTS Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS Radical Cation Decolorization Assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) Radical) เป็นสารตั้งเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยจะทำการเจือจาง ABTS ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS ที่ถูกเจือจางแล้วไปทดสอบกับสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลจะทำให้สีจางลง (ดังสมการที่ 3.2) ทำการคำนวณจากสีที่จางลงของ ABTS เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดที่นำมาทดสอบ โดยจะใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบเพื่อทำการเปรียบเทียบ ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี จึงทำให้ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้อย่างรวดเร็วและทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง แต่มีข้อเสียคือ ABTS ไม่ได้เป็นสารที่สามารถพบได้ในร่างกายและจำเป็นต้องไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระขึ้นมาได้ (Javanmardi, Stushnoff, Locke, & Vivaco, 2003)



การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS Assay โดยนำสารตัวอย่าง 10 μl ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ผสมกับ ABTS Reagent (ผสม 7 mM ABTS กับ 140 mM Potassium Persulfate ในอัตราส่วน 1:1 เก็บในที่มืด 12-16 ชั่วโมง) ปริมาณ 190 μl แล้วบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 734 nm การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ มีดังนี้ (สมการที่ 3.3)

$$\% \text{Decolorization} = [(A_{\text{ctr}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{ctr}}] \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.3})$$

โดยที่ A_{ctr} = Absorbance of control - Absorbance of control blank

A_{sample} = Absorbance of sample - Absorbance of sample blank

สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ระหว่าง Percent Inhibition และความเข้มข้นของ Trolox (0.002-0.25 mg/mL) แล้วนำค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ Trolox equivalent จากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน Trolox ดังนี้ (สมการที่ 3.4)

$$\text{Trolox equivalent (mg/mg)} = [(\text{Sample decolorization (\%)-b)/a}] / \text{Sample concentration (mg/mL)} \quad (\text{สมการที่ 3.4})$$

ผลที่ได้จากการคำนวณแสดงเป็นค่าของ Trolox ในหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่ากับ มิลลิกรัมของสารสกัด (mg Trolox/mg extract) จากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric Assay

วิธีที่ใช้ในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด โดยจะอาศัยปฏิกิริยาการเกิดระหว่าง Aluminium Chloride (AlCl_3) ไปจับกับกับหมู่คีโตนและไฮดรอกซิลของสารฟลาโวนอยด์ จนทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองในสภาวะกรด โดยการศึกษานี้ใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐานใช้ความเข้มข้นที่ 5-50 $\mu\text{g/ml}$ และเตรียมสารสกัดตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 2 mg/mL จากนั้นดูดสารตัวอย่าง 200 μl ทำการเติมสารละลาย 10% AlCl_3 40 μl ปลิวตามด้วย 95% เอทานอล 600 μl และสารละลาย 1M Sodium Acetate 40 μl ทำการผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 40 นาที จะได้สารสีเหลืองจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate Reader ที่ 415 nm แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม โดยเทียบกับ

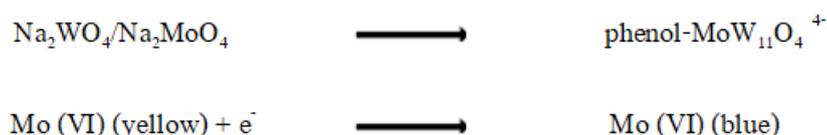
Quercetin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ทำการรายงานผลในหน่วย mgE ของ Quercetin ต่อ g ของสารสกัดหยาบ (mg Quercetin Equivalent (QE)/g of Crude Extract) โดยปริมาตรของสารที่ใช้ทดสอบ (ดังตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric Assay

	Positive Control (μL)	Positive Control Blank (μL)	Sample (μL)	Sample Blank (μL)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	200	200
Quercetin	200	-	-	-
10% AlCl_3	40	40	40	-
95% Ethanol	600	800	600	680
1M Sodium Acetate	40	40	40	-

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay

วิธี Folin-Ciocalteu เป็นการวัดปริมาณฟีนอลิกรวม โดยจะมีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะทำการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลืองให้เป็นสีน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดจากไอออน Mo(VI) ที่มีสีเหลืองนั้น เมื่อได้รับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ดังสมการต่อไปนี้ (สมการที่ 3.5)



การศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกครั้งนี้โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic Acid) เป็นสารมาตรฐาน ทำการเตรียมความเข้มข้นที่ 70-110 $\mu\text{g/mL}$ และเตรียมสารสกัด

สมุนไพรที่ความเข้มข้น 2 mg/mL จากนั้นดูดสารสกัดจำนวน 100 μ l แล้วเติม 200 μ l ของสารละลาย Folin-Ciocalteu 10% v/v ทำการผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ทำการเติมสารละลาย 0.7 Sodium Carbonate (Na_2CO_3) 800 μ l บ่มที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วย Microplate Reader ทำการคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมเปรียบเทียบกับ Gallic Acid ที่เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในหน่วย mgE ของ Gallic Acid ต่อ g ของสารสกัดหยาบ (mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g of Crude Extract) ปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ (ดังตารางที่ 3.3)

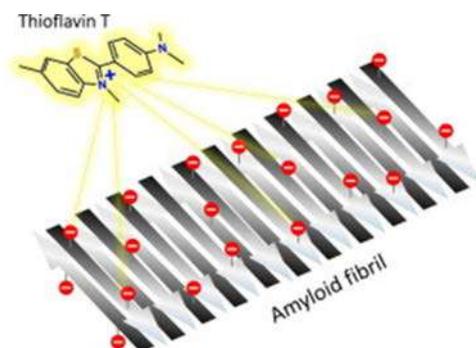
ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay

	Positive Control (μ L)	Positive Control Blank (μ L)	Sample (μ L)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	100
Gallic Acid	100	-	-
95% เอทานอล	-	100	-
Folin-Ciocalteu	200	200	200
0.1 M Na_2CO_3	800	800	800

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thioflavin

T Assay

Thioflavin T เป็นสีข้อมเรืองแสง (Fluorescent) ซึ่งจะจับกับอะไมลอยด์บนพื้นผิว เมื่อมีการเกาะกลุ่มกัน (Aggregation) ของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์จะทำให้เพิ่มการเรืองแสงมากขึ้น (ดังรูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 แสดงการเรืองแสงของ Thioflavin T เมื่อจับกับอะไมลอยด์บนพื้นผิว

ที่มา: Elad, Hodaya, Raz, & Hanna, 2020

การเจือจางสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของตำรับยาด้วยสารละลาย DMSO ให้ได้ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ Curcumin เป็น Positive Control และ DMSO เป็น Negative Control ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thioflavin T assay โดยใช้ Curcumin ในครั้งนี้เลือกใช้การติดตาม Aggregation State ของ $\text{A}\beta_{42}$ ทำการเตรียม 25 μM ของ $\text{A}\beta_{42}$ ละลายใน 50 mM ของ Phosphate Buffer pH 7.4 ปริมาตร 9 ไมโครลิตรต่อหลอด หลังจากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรและตำรับยาปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มเติม 3 μM Thioflavin T ที่ละลายอยู่ใน 100 mM Glyciline Guffer (pH 8.5) 190 μl บ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ Excitation 440 และ Emission 485 ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition Rate) การเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ (สมการที่ 3.6)

$$[1 - (S - B / C - B)] \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.6})$$

S= ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T บ่มด้วย $\text{A}\beta_{42}$ และ ตัวอย่าง

C= ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T บ่มด้วย $\text{A}\beta_{42}$ และ DMSO

B= ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T solution

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดสารตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเหว้าหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

ตำรับยาอายุวัฒนะ 1000 กรัม สมุนไพรเดี่ยวในตำรับ 6 ชนิด คือ หัวเหว้าหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา ชนิดละ 250 กรัม โดยสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมักใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปกรองและระเหยแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้เท่ากับ 46.07, 16.40, 20.41, 17.80, 6.91, 24.63 และ 6.64 กรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 4.61, 6.56, 8.16, 7.12, 2.76, 9.85 และ 2.66 ตามลำดับ

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเหว้าหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมนั้นเพื่อบ่งบอกว่าสารสกัดที่ได้ นำมาทดสอบนั้นมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด สารประกอบฟีนอลิกสามารถพบได้ทั่วไปในพืช ผัก และผลไม้ เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกนั้นมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะกับวงเบนซีน สามารถแบ่งสารประกอบฟีนอลิกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดฟีนอลิก เช่น Gallic Acid กลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มสตีลบิน และกลุ่มลิกแนน ซึ่งพืชที่ให้สารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดแสดงถึงความสัมพันธ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเหว้าหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) กรดแกลลิก (Gallic Acid, GAE) พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และหัวเหว้าหมู โดยที่

ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

สมุนไพร	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	786.67
หัวเห้วหมู	653.33
เมล็ดพริกไทย	861.67
เมล็ดข่อย	142.62
เถาบระเพ็ด	309.29
เปลือกทังถ่อน	261.67
เปลือกตะโกนา	277.14

4.3 ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดของตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา โดยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และเปลือกทังถ่อน โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 185.44, 154.94 และ 138.90 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห็ดห่มู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

สมุนไพร	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	154.94
หัวเห็ดห่มู	121.29
เมล็ดพริกไทย	185.44
เมล็ดข่อย	41.73
เถาบอระเพ็ด	81.98
เปลือกทังถ่อน	138.90
เปลือกตะโกนา	37.33

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า หัวเห็ดห่มูมีสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แทนนิน แอลคาลอยด์ เทอร์ปีนอยด์ โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 45.04 ± 1.85 , 36.85 ± 1.96 และ 23.09 ± 1.70 mg GAE/g Ext. ที่ทำการสกัดด้วย 50% เอทานอล 95% เอทานอล และน้ำตามลำดับ ซึ่งสารสกัดเห็ดห่มูที่ถูกสกัดด้วย 50% เอทานอล ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด (พัชรประทุมแย้ม, กริยาภา หลายรุ่งเรือง, ปิยะนุช ทิมกร, สุจิตา โอภาณี, และสรรวิจิตร, 2566) เมล็ดพริกไทยมีสารฟีนอลิกและสาร Piperine ซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์ โดยการศึกษาพบว่าสารสกัดพริกไทยที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 42.83 ± 2.53 mg GAE/g Ext. (ชานนท์ นัยจิตร และอนุรักษ์ เชื้อมั่ง, 2559) บอระเพ็ดมีสารสำคัญ เช่น Alkaloids, Diterpenes, Triterpenes และ Glycosides มีการศึกษาพบว่าบอระเพ็ดที่นำมาสกัดด้วย 95%เอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 56.33 mg GAE/g Extract (Vathsana, 2018) ทังถ่อน มีสารกลุ่ม Saponins, Terpenes, Alkaloids และ Triterpenoid Glycoside ที่แยกได้จากเปลือกต้นทังถ่อน (Barbosa, 2014) มีรายงานการศึกษาพบว่า เปลือกต้นทังถ่อนที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมรวมเท่ากับ 3.980 ± 0.006 mg GAE/g Ext. และฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 2.651 ± 0.077 mg QE/g ext. (Sivakrishnan, Kavitha, & Kottai, 2013) เปลือกต้นตะโกนามีสารกลุ่ม Triterpenes, Steroids และน้ำตาล ข่อยเป็นพืชที่อุดมไปด้วยสารประเภทไกลโคไซด์ นอกจากนี้ใบยังประกอบไปด้วยสาร Triterpenoid Saponin และ Polyphenolic Compounds (Chaturvedi, 2010) สำหรับเปลือกต้นตะโกนาและเมล็ดข่อยยังไม่พบรายงานการศึกษาการหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม แต่มีรายงานการศึกษาพบว่าในใบข่อยที่สกัดด้วย 70% เอทานอล มีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

เท่ากับ 302.85 ± 0.03 mg GAE/g Ext. and 22.70 ± 0.02 mg QE/g Ext. (Nor, Ishak, Vuanghao, & Ruzita, 2013)

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และหัวเห็ดห่ม โดยมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 mg GAE/g Ext. ตามลำดับ และสารสกัดที่ให้ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และเปลือกทังถ่อน โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 185.44, 154.94 และ 138.90 mg QE/g Ext. จากผลการทดลองดังกล่าว เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่ามีความสอดคล้องกันแต่อาจให้ค่าที่แตกต่างกัน เนื่องจากตัวทำละลายที่นำมาสกัดนั้นมีความแตกต่างกัน โดยสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงเบนซีนและมีหมู่แทนที่เป็นไฮดรอกซิล ทำให้มีความเป็นขั้วสูงจึงสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล และ เอทิลอะซิเตท เป็นต้น ทำให้สารสกัดที่ได้เมื่อนำมาหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จึงแตกต่างกัน ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกนั้นบ่งบอกได้ว่าเมื่อพืชชนิดใดก็ตามที่ให้ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดก็จะแสดงว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห็ดห่ม เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

ในการวิเคราะห์ความสามารถของการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ 2 วิธี คือ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เนื่องจากเป็นวิธีที่นิยมสามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และยังเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างมีความเสถียร โดยผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห็ดห่ม เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล สารมาตรฐาน BHT และ α -tocopherol ที่ละลายด้วยเอทานอล พบว่ามีค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) (ดังตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC₅₀)

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (mg/mL)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	0.8600±0.0567
หัวเห่หัวหมู	0.1867±0.0087
เมล็ดพริกไทย	0.8548±0.1934
เมล็ดข่อย	5.5956±1.2342
เถาบอระเพ็ด	0.6262±0.0276
เปลือกทังถ่อน	0.5502±0.0124
เปลือกตะโกนา	1.7865±0.0007
BHT	0.6741±0.0784
α-tocopherol	0.0386±0.0094

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด คือ หัวเห่หัวหมู รองลงมาเปลือกทังถ่อน เถาบอระเพ็ด เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ เปลือกตะโกนา และเมล็ดข่อย

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห่หัวหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อน และเปลือกตะโกนา

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห่หัวหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทังถ่อนและเปลือกตะโกนา ที่สกัดด้วย 95 % เอทานอล พบว่ามีค่า %Inhibition at a concentration of 1.0 mg/mL (ดังตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 แสดง %Inhibition at a concentration of 1.0 mg/ml

สมุนไพร	% Inhibition at a concentration of 1.0 mg/mL	Trolox equivalent (mg/mg)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	49.6±8.4	0.132±0.022
เปลือกทังถ่อน	50.9±0.8	0.135±0.002
หัวเห่หัวหมู	48.0±0.3	0.127±0.001
เปลือกตะโกนา	29.1±0.8	0.077±0.002

ตารางที่ 4.4 แสดง %Inhibition at a concentration of 1.0 mg/ml (ต่อ)

สมุนไพร	% Inhibition at a concentration of 1.0 mg/mL	Trolox equivalent (mg/mg)
เถาบอระเพ็ด	9.2±1.2	0.024±0.003
เมล็ดข่อย	6.0±0.4	0.015±0.001
เมล็ดพริกไทย	26.0±0.8	0.069±0.002

Each value represents the mean ± SD of three determinations.

จากการทดลองพบว่าตำรับยาและสมุนไพรเดี่ยวมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดสมุนไพรที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือ เปลือกกิ่งถ่อน รองลงมา ตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห้วหมู เปลือกตะโกนา เมล็ดพริกไทย เถาบอระเพ็ด และเมล็ดข่อย รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า หัวเห้วหมูที่ถูกสกัดด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยสารสกัดเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด สารสกัดเอทานอล 1 กรัม ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 1.137 ± 0.001 mg AAC/g Sample รองลงมาคือ น้ำ เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เท่ากับ 1.087 ± 0.004 , 1.036 ± 0.013 และ 1.032 ± 0.020 mg AAC/g Sample ตามลำดับ และทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดหัวเห้วหมูที่สกัดด้วยเอทานอล 1 กรัม ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบกับกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 11.039 ± 0.111 mg AAC/g Sample ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา คือ น้ำ เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เท่ากับ 7.783 ± 0.222 , 3.957 ± 0.184 และ 2.986 ± 0.310 mg AAC/g Sample ตามลำดับ (หทัยขวัญ บุญผดุง, 2559) พริกไทยที่สกัดด้วยอะซิโตน เอทานอล 95% และน้ำ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดพริกไทยที่สกัดด้วยน้ำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $32.56 \mu\text{g/mL}$ รองลงมา คือ สารสกัด 95% เอทานอล และอะซิโตน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 61.20 , $>100 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (นิวัติ แก้วประดับ และนิธิกาญจน์ ชันติวรพงศ์, 2543) มีรายงานการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบอระเพ็ดที่สกัดโดยวิธี Soxhlex ด้วยเมทานอล ทำทดสอบโดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.21 mg/mL (Fatimatul, Nurfarahin, Farawahida, Anwar, & Deny, 2016) และพบการศึกษาของสารสกัดจากเปลือกกิ่งถ่อน เปลือกต้นตะโกนา และเมล็ดข่อย ที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเปลือกกิ่งถ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $2.9 \mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือ เปลือกต้นตะโกนา และเมล็ดข่อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 48.4 , $>120 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (ยุทธนา พงษ์พิริยะ และคณะ, 2552) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยา

อายุวัฒนะและสมุนไพรเดี่ยว 6 ชนิด ที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ทดสอบด้วยวิธี DPPHพบว่า สารสกัดจากเปลือกทังถ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดของตำรับอายุวัฒนะ หัวหมู พริกไทย เปลือกตะโกนา บอระเพ็ด และเมล็ดข่อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.34, 187.62, 235.91, 1,111.39, 1,285.09, 1,324.25, 8,603.57 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (สิริเพ็ญ เลื่อนเชย และสิริรัตน์ เดียงกุล, 2551) และมีรายงานการศึกษาของตำรับยาอายุวัฒนะที่ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด คือ หัวหมู พริกไทย เปลือกตะโกนา เปลือกทังถ่อน บอระเพ็ด และเปลือกต้นข่อย พบว่าสารสกัดของตำรับยาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0323 ± 0.0008 , 0.0159 ± 0.0004 mg/mL และ 10.013 ± 0.810 mgTE/g Ext. ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าการสกัดด้วย 50% เอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0556 ± 0.0015 , 0.0213 ± 0.0006 mg/mL และ 4.734 ± 0.975 mgTE/g Ext. ตามลำดับ (Ampa & Ladachart, 2022)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีสารสกัดสมุนไพรที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คือ หัวหัวหมู รองลงมาเปลือกทังถ่อน เถาบอระเพ็ด เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ เปลือกตะโกนา และเมล็ดข่อย และเมื่อนำสารสกัดสมุนไพรมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือ เปลือกทังถ่อน รองลงมาตำรับยาอายุวัฒนะ หัวหัวหมู เปลือกตะโกนา เมล็ดพริกไทย เถาบอระเพ็ด และเมล็ดข่อย จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีความสอดคล้องกันแต่อาจมีความแตกต่างกันในตัวอย่างที่นำมาสกัดและวิธีการสกัดสาร นอกจากนี้ตำรับยาอายุวัฒนะในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้มีส่วนของเปลือกต้นข่อยในตำรับโดยผลการทดสอบให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าตำรับยาอายุวัฒนะที่ประกอบด้วยเมล็ดข่อยของผู้วิจัย อาจเนื่องจากในเปลือกของต้นข่อยมีสารสำคัญในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมล็ดข่อย เมื่อนำผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองในการหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมพบว่า สมุนไพรที่มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ไม่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ อาจเนื่องจากสมุนไพรที่มีสารประกอบในกลุ่มอื่น ๆ ที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ตำรับยาอายุวัฒนะและสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกโดยสารกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในพืช ผัก และผลไม้ และจัดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระได้เพื่อสร้างความเสถียรแก่โครงสร้าง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ

ยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ที่ดีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการช่วยต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถไปลดการทำลายเซลล์ประสาทจากสารอนุมูลอิสระที่ก่อการอักเสบในร่างกายที่ส่งผลต่อระบบสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะสมองเสื่อม

4.6 ผลทดสอบฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thioflavin T Assay ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

จากการวิจัยพบว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95 % เอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ของตำรับยามีฤทธิ์ในการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ 42 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.15 % ซึ่งมากกว่า 60 % แต่ไม่ถึง 80 % จากผลการทดสอบจึงอาจกล่าวได้ว่ามีฤทธิ์ที่ดี จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษา Curcumin เป็นสารกลุ่ม Curcuminoid พบได้ในพืชวงศ์ขิง เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลมีสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่ดี โดยทดสอบฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของ Curcumin ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า Curcumin มีฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.81 μM ซึ่ง Curcumin มีฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ได้ดีกว่ายาไอบรูโฝเฟนและยานาพรอกเซนที่ใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า (Fusheng et al., 2005) มีรายงานการศึกษาการศึกษาฤทธิ์ของตำรับกิลีบัวแดง มีสรรพคุณช่วยบำรุงสมองช่วยในการนอนหลับ และผ่อนคลาย ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด คือ กิลีบัวหลวงสีแดง พริกไทยดำ และบัวบก โดยทดสอบฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ด้วยวิธี Thioflavin T Assay พบว่าตำรับกิลีบัวแดงที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g/mL}$ สามารถต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งประมาณ 68% และ Curcumin ที่เป็นสารมาตรฐานมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มากกว่า 80% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.90 ± 0.06 และ 0.62 ± 0.06 mg/mL . ตามลำดับ สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากพิษของเบต้าอะไมลอยด์ 42 และมีผลการปกป้องเซลล์จากภาวะ Oxidative Stress ที่เป็นกระบวนการที่สำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของภาวะสมองเสื่อม (Chantha et al., 2020) มีรายงานการศึกษาสารสกัดพรมมิ พบว่าสามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ และให้ผลใกล้เคียงกับยาอะริเซพและสมุนไพรแป๊ะก๊วย โดยการนำสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์มีความจำที่ลดลง ($p < 0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรแล้วปรากฏว่าสัตว์ทดลองมีการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงปกติ (อรรระวี คงสมบัติ, สุทธิสา ถาน้อย และ เสมอ ถาน้อย, 2554)

สารสกัดแป๊ะก๊วยนิยมนำมาทำเป็นอาหารเสริมในการบำรุงสมอง ป้องกันความผิดปกติของระบบประสาทรวมถึงโรคอัลไซเมอร์ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ด้วยวิธี Thioflavin T Assay ของ EGb761 ซึ่งเป็นสารสกัดจากใบแป๊ะก๊วย พบว่า EGb761 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ $82 \pm 6\%$ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดี (Yuan et al., 2002)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาศาสตร์สกัดบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอล โดยบัวบกมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เช่น Triterpenoids, Asiatic Acid และ Asiaticoside ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี พบว่าสารสกัดบัวบกสามารถปกป้องเซลล์ PC21 และ IMR32 จากการผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) ที่เกิดจากโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดบัวบกยังช่วยขจัดการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระที่เกิดจากโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระบบประสาทได้อีกด้วย (Chien-Li, Wen-Hao, Chun-Jen, & Tzu-Ming, 2016) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นสามารถต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์หลักของ $A\beta$ คือการเหนี่ยวนำอนุมูลอิสระออกซิเจนส่วนเกิน รวมถึงซูเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และออกซิเจนซิงเกิลต์ การเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์นี้ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าการรวมกันของการเหนี่ยวนำ ROS ที่เกิดจาก $A\beta$ และการไหลเข้าของ Ca^{2+} ที่มากเกินไปทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์ประสาทและอะพอพโทซิสของเซลล์ จึงมีการศึกษามากมายเกี่ยวกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอีและสมุนไพรรักษาแป๊ะก๊วย เพื่อปกป้องเซลล์ประสาทจาก ROS ที่เกิดจาก $A\beta$ การศึกษาวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระและการกระตุ้นระบบป้องกันการเกิดออกซิเดชันสามารถระงับความเป็นพิษต่อระบบประสาทของ $A\beta$ ได้ ดังนั้นสารที่สามารถลดความเครียดจากออกซิเดชันอาจช่วยให้อาการรักษาความเป็นพิษต่อระบบประสาทที่เกิดจาก $A\beta$ และอาจนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

ดังนั้นจากผลการทดลองของงานวิจัยตำรับยาอายุวัฒนะ พบว่าตำรับยาอายุวัฒนะมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดใน 3 อันดับแรก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่กล่าวมา จึงอาจกล่าวได้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้พัฒนาเพื่อเป็นยารักษาต้านการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ที่ป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ในอนาคตได้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และหัวเห็ดห่ม โดยมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และเปลือกทังถ่อน โดยมีปริมาณสารประกอบประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 185.44, 159.94 และ 138.90 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด คือ หัวเห็ดห่ม รองลงมาเปลือกทังถ่อน เถาบระเพ็ด เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ เปลือกตะโกนา และเมล็ดข่อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1867 ± 0.0087 , 0.5502 ± 0.0124 , 0.6262 ± 0.0276 , 0.8600 ± 0.0567 , 0.8548 ± 0.1934 , 1.7865 ± 0.0007 และ 5.5956 ± 1.2342 mg/mL ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือ เปลือกทังถ่อน รองลงมาตำรับยาอายุวัฒนะ หัวเห็ดห่ม เปลือกตะโกนา เมล็ดพริกไทย เถาบระเพ็ด และเมล็ดข่อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นของ 1 mg/mL เท่ากับ 50.9 ± 0.8 , 49.6 ± 8.4 , 48.0 ± 0.3 , 29.1 ± 0.8 , 26.0 ± 0.8 , 9.2 ± 1.2 และ 6.0 ± 0.4 ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95 % เอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ 42 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.15 % ซึ่งมากกว่า 60 % และยังไม่พบงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่วิจัยตำรับยาอายุวัฒนะที่ผู้วิจัยทำจึงถือเป็นการรายงานฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะเป็นครั้งแรก และจากผลวิจัยสรุปได้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปลดการเกิดเสื่อมของเซลล์สมองในโรคอัลไซเมอร์ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุของภาวะสมองเสื่อม โดยผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะซึ่งให้ผลว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี อาจนำไปศึกษาต่อด้วยวิธีการอื่น ๆ ของกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ เพื่อพัฒนาไปเป็นตำรับยาที่จะสามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะสมองเสื่อมในอนาคตได้



บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. (2562). *รายการตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ ฉบับเฉลิมพระเกียรติ*. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.
- กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. (ม.ป.ป.). *ตำราการแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม*. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.
- ก้องเกียรติ ภูมัทธ์กันทรากร. (2557). แนวทางใหม่ในการประเมินและวินิจฉัยภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 14(1), 93-101.
- กุลนันท์ จงนิมิตไพบูลย์. (2557). *ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาอายุวัฒนะต่อเซลล์แมคโครฟาจของหนู* (Master's thesis). สืบค้นจาก <https://cuir.car.chula.ac.th/handle/>
- จิรภัทร เจริญคุปต์. (2552). *ความเป็นพิษของสมุนไพรไทยในกลุ่มยาอายุวัฒนะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW-620* (Master's thesis). สืบค้นจาก <https://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/>
- ชานนท์ นัยจิตร, และอนุรักษ์ เชื้อมั่ง. (2559). การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบรวมฟีนอล และนิโคตินของสมุนไพรไทย 15 ชนิด. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 24(2), 351-361.
- ชุติมา ชัยสนธิ, จันทรวงศ์ ศรีสมทรัพย์, รัตนา ปานเรียนแสน, และวิชัย เชิดชูวิชาศาสตร์. (2555). *ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของสมุนไพรในกลุ่มยาอายุวัฒนะ*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิวัติ แก้วประดับ, และนิติกาญจน์ ชันดีวรงค์. (2543). *รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย*. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พัชรี ประทุมเยี่ยม, กริยาภา หลายรุ่งเรือง, ปิยะนุช ทิมคร, สุจิตา โอภาณี และสรรใจ แสงวิเชียร. (2566). *การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตำรับยาปลูกฟ้าชุด*. *วารสารหมอยาไทยวิจัย*, 9(1), 13-27.
- ยุทธนา พงษ์พิริยะเดชะ, พัชรินทร์ นวลศรีทอง, และนฤมล ศิรินทราเวช. (2552). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสมุนไพรไทยกลุ่มบำรุงกำลังและอายุวัฒนะ*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิมลลา ดีแท้ (2547). *ผลของสารสกัดหยาบโคไมรู้อิม (Elephantopus scaber Linn.) และตะโกนา (Diospyros rhodcalyx Kurz.) ต่อสมรรถภาพทางเพศในหนูขาวเพศผู้* (Master's thesis). สืบค้นจาก <http://cmuir.cmu.ac.th/bitstream/6653943832/>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- ศิริพันธ์ ฉันทศิริกาญจน. (2560). *ความรู้เรื่อง สมอเสื่อ สำหรับประชาชน*. กรุงเทพฯ: โรงพยาบาลรามารชิบดี.
- ศุภาวุฒิ สายเชื้อ. (2562). *โรคอัลไซเมอร์*. สืบค้นจาก <https://www.prachachat.net/>
- สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์, (2557). *แนวทางเวชปฏิบัติ ภาวะสมองเสื่อม Clinical practice guidelines: Demetia*. นนทบุรี: สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์.
- สิริเพ็ญ เลื่อนเชย, และสิริรัตน์ เตียงกุล. (2551). *การศึกษากฎวิธีด้านออกซิเดชันของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะของไทย*. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุพัตรา ชวลิตพงษ์, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์, รัตนา ปานเรียนแสน, และวิชัย เชิดชูวิทยาศาสตร์. (2555). *การศึกษาความเป็นพิษของพืชสมุนไพรไทยในกลุ่มยาอายุวัฒนะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- หทัยขวัญ บุญผดุง. (2559). *ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบหัวหมู (Master's thesis)*. สืบค้นจาก <https://postgrads.mfu.ac.th/academic>
- อรรณี วงศ์สมบัติ, สุทิสรา ถาน้อย, และเสมอ ถาน้อย. (2554). *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- อินทัช ศักดิ์ศักดิ์เจริญ, สุนิตา มากชูชิต, และอรุณพร อธิรัตน์. (2557). *การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรผสม*. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 14(1), 7-11.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(1), 7915-7922.
- Ampa, K., & Ladachart, T. (2022). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Longevity Remedy from National Thai Traditional Medicine Scripture (Formulary Special Edition). *Tropical Journal of Natural Product Research*, 6(6), 868-871.
- Anand, D., Sathish, M., & Dhivya, L. S. (2018). *In Vitro* α -amylase and A-glucosidase inhibitor activities of *Albizia procera* stem bark. *Asian Journal of Pharmaceutical & Clinical Research*, 11(9), 344-347.
- Aruoma, O. I., Kaur, H., & Halliwell, B. (1991). Oxygen free radicals and human diseases. *Journal of the Royal Society of Health*, 111(5), 172-177.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Barbosa, A. D. (2014). Pharmacologically active saponins from the genus *Albizia* (Fabaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 32-36.
- Buchhave, P., Minthon, L., Zetterberg, H., Wallin, Å. K., Blennow, K., & Hansson, O. (2012). Cerebrospinal fluid levels of β -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Archives of general psychiatry*, 69(1), 98-106.
- Bukhari, I. A., Alhumayyd, M.S., Mahesar, A.L., & Gilani, A.H. (2013). The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. *Journal of Physiology & Pharmacology*, 64(6), 789-794.
- Bungorn, S., Jintana, J., Nawarat, W., & Doosadee, H. (2009). Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 566-570.
- Chaiwiang, N., Pongpattanawut, S., Khorana, N., Thanoi, S., & Teaktong, T. (2016). Role of piperine in cognitive behavior and the level of nicotinic receptors (nAChRs) in mouse brain. *Thai Journal of Pharmacology*, 38(2), 5-16.
- Chantha, C., Pornthip, W., Kusawadee, P., Yaowared, C., Supawadee, D., Orawan, M., ... Chantana, B. (2020). Multitarget Activities of KleeB Bua Daeng, a Thai Traditional Herbal Formula, Against Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(5), 79. doi: 10.3390/ph13050079
- Chaturvedi, S. K. (2010). A new sponin from the leaves of *Streblus asper*. *Asian J Chem*, 22(1), 5779-5780.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14(1), 450-464.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Chien-Li, C., Wen-Hao, T., Chun-Jen, C., & Tzu-Ming, P. (2016). *Centella asiatica* extract protects against amyloid β_{1-40} -induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 362-369.
- Choudhary, M. I., Ismail, M., Ali, Z., Shaari, K., & Lajis, N. H. (2010). Alkaloidal constituents of *Tinospora crispa*. *Natural Product Communications*, 5(1), 1747–1750.
- Chung, S. Y. (2011). *Studies on the constituents of the dry stem of Tinospora crispa (Lour.) Merr* (Unpublished Master's thesis). China Medical University, China.
- Daneil, P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J Med*, 77(1), 32-42.
- Dong-gyu J. (2010). Evidence that γ -secretase mediates oxidative-stress induced β -secretase expression in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 31(6), 917-925.
- Elad, A., Hodaya, G., Raz, J., & Hanna, R. (2020). Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation—The prominent role of electrostatic interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 573(1), 87-95. doi: 10.1016/j.jcis.2020.03.075.
- Fatimatul, A. S., Nurfarahin, F., Farawahida, R., Anwar, I., & Deny, S. D. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of *Tinospora crispa* (putarwali) stems methanolic extract. *Journal Teknologi*, 78(11), 35-40.
- Fukuda, N., Yonemitsu, M., & Kimura, T. (1983). Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. I. *N-trans*- and *N-cis*-feruloyl tyramine, and a new phenolic glucoside, tinotuberide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31(1), 156–161. doi:10.1248/cpb.31.156
- Fukuda, N., Yonemitsu, M., & Kimura, T. (1986). Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee, III: new diterpenoids, borapetoside B and borapetol B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 2868–2872. doi:10.1248/cpb.34.2868
- Fusheng, Y., Giselle, P. L., Aynun, N. B., Oliver, J. U., Mychica, R. S., Surendra, S. A., . . . Gregory, M. C. (2005). Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5892-5901. doi: 10.1074/jbc.M404751200

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Glau, V. V., An, S. S., & Hulme, J. P. (2018). Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease. *Journal of Neurological Sciences*, 395(1), 62-70.
doi: 10.1016/j.jns.2018.09.033.
- Guglielmotto, M., Giliberto, L., Tamagno, E., & Tabaton, M. (2010). Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci*, 2(2), 1-8. doi: 10.3389/neuro.24.003.2010.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defense mechanism: From the beginning to the end. *Society for Free Radical Biology and Medicine*, 31(1), 261-272.
- Higashino, H., Suzuki, A., Tanaka, Y., & Pootakham, K. (1992). Inhibitory effects of Siamese *Tinospora crispa* extracts on the carrageenin-induced foot pad edema in rats (the 1st report). *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 100(1), 339-344.
- Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(1), 1204-1222.
- Ibahim, M., I'zzah, W. N. W., Narimah, A., Asyikin, N. Z., Shafinas, S.-N. S., & Froemming, G. (2011). Anti-proliferative and antioxidant effects of *Tinospora crispa* (Batawali). *Biomedical Research-India*, 22(1), 57-62.
- Ibrahim, N. M., Mat, I., Lim, V., & Ahmad, R. (2013). Antioxidant activity and phenolic content of *Streblus asper* leaves from various drying methods. *Antioxidants (Basel)*, 2(3), 155-166.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. & Vivaco, J.M., 2003, Antioxidant activity and total phenolic content of *Iranian Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547-550.
- Kanathip, S., Tarinee, A., Veerapol, K., & Jintana, S. (2015). Protective effects of *Streblus asper* leaf extract on H₂O₂-induced ROS in SK-N-SH Cells and MPTP-induced Parkinson's disease-like symptoms in C57BL/6 mouse. *Evidence-Based Complementary and Alternative*, 2015(1), 1-6.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kapoor, I. P. S., Bandana, S., Gurdip, S., Carola, S. D. H., Lampasona, M. P. D., & Catalan, C. A. N. (2009). Chemistry and *In Vitro* antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 57(12), 2358-5364.
- Karan, S. K., Mondal, A., Mishra, S.K., Pal, D., & Rout, K. K. (2013). Antidiabetic effect of *Streblus asper* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical biology*, 51(1), 369-375.
- Kilani, S., Sghaier, M. B., Limem, I., Bouhlel, I., Boubaker, J., Bhouiri, W., . . . Ghedira, L. C. (2008). *In vitro* evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. *Bioresource Technology*, 99(1), 9004-9008.
- Kongkathip, N., Dhumma, U. P., Kongkathip, B., Chawanoraset, K., Sangchomkaeo, P., & Hatthakitpanichakul, S. (2002). Study on cardiac contractility of cycloeucaleanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1), 95–99. doi:10.1016/S0378-8741(02)00210-6
- Kopjar, M., Piližota, V., Hribar, J., & Simčič, M. (2009). Total phenol content and antioxidant activity of water solutions of plant extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 1-7.
- Kumar, R. B., Kar, B., Dolai, N., Karmakar, I., Haldar, S., Bhattacharya, S., & Haldar, P. K. (2013). Antitumor activity and antioxidant role of *Streblus asper* bark against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 10(3), 197-202.
- Lam, S. H., Ruan, C. T., Hsieh, P. H., Su, M. J., & Lee, S. S. (2012). Hypoglycemic diterpenoids from *Tinospora crispa*. *Journal of natural products*, 75(1), 153–159. doi:10.1021/np200692v
- Li, J., Huang, Y., Guan, X. L., Li J., Deng, S. P., Wu Q., . . . Yang, R. Y. (2012). Anti-hepatitis B virus constituents from the stem bark of *Streblus asper*. *Phytochemistry*, 82(1), 100-109. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.06.023

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Li, J., Meng, A. P., Guan, X. L., Li, J., Wu, Q., Deng, S. P., . . . Yang, R. Y. (2013). Anti-hepatitis B virus lignans from the root of *Streblus asper*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(7), 2238-2244.
- Lin, Y. H. (2009). *Studies on the chemical constituents of Tinospora crispa and synthesis of the analogous of penta-o-galloyl-d-glucopyranose* (Unpublished Master's thesis). China Medical University, China.
- Marchesi, V. T. (2012). Alzheimer's disease 2012: the great amyloid gamble. *The American Journal of Pathology*, 180(1), 1762-1767.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15056. doi: 10.1038/nrdp.2015.56
- Melek, F. R., Miyase, T., Ghaly, N. S., & Nabil, M. (2007). Triterpenoid saponins with *N*-acetyl sugar from the bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry*, 68(9), 1261-1266.
- Nieoullon, A. (2010). Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: further comments on their mechanisms of action and therapeutic consequences. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*, 8(1), 123-131.
- Nor, M. I., Ishak, M., Vuanghao, L., & Ruzita, A. (2013). Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Streblus asper* Leaves from Various Drying Methods. *Antioxidants (Basel)*, 2(3), 156-166.
- Parekh, J., & Chanda, S. (2006). *In vitro* antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiatae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). *African Journal of Biomedical Research*, 9(1), 89-93.
- Pattarapan, P., Kingkan, B., Nawong, B., Prapaporn, C., Somsak, P., Chatchai, W., & Supinya, T. (2015). Anti-HIV-1 integrase activity and molecular docking of compounds from *Albizia procera* bark. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1861-1866.
- Paul, C. M., Rogelio, L., & Laura, C. B. (2014). Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(1), 3.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Phutdhawong, W., Donchai, A., Korth, J., Pyne, S.G., Picha, P., Ngamkham, J., & Buddhasukh, D. (2004). The components and anticancer activity of the volatile oil from *Streblus asper*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(1), 445-447.
- Praman, S., Mulvany, M. J., Williams, D. E., Andersen, R. J., & Jansakul, C. (2012). Hypotensive and cardio-chronotropic constituents of *Tinospora crispa* and mechanisms of action on the cardiovascular system in anesthetized rats. *Journal of ethnopharmacology*, 140(1), 166–178. doi:10.1016/j.jep.2012.01.006
- Praman, S., Mulvany, M. J., Williams, D. E., Andersen, R. J., & Jansakul, C. (2013). Crude extract and purified components isolated from the stems of *Tinospora crispa* exhibit positive inotropic effects on the isolated left atrium of rats. *Journal of ethnopharmacology*, 149(1), 123–132.
- Rakwarinn, W., Jintana, S., Prapawadee, P., & Tarinee, A. (2010). Effects of *Streblus asper* leaves extract on scopolamine-induced learning deficits in male rats. *Srinagarind Medical Journal*, 25(1), 246-249.
- Rastogi, S., Kulshreshtha, D. K., & Rawat, A. K. (2006). *Streblus asper* Lour. (Shakhotaka): A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1), 217-222. doi:10.1093/ecam/nel018
- Ren, Y., Chen, W. L., Lantvit, D. D., Sass, E. J., Shriwas, P., Ninh, T. N., . . . Kinghorn, A. D. (2017). Cardiac glycoside constituents of *Streblus asper* with potential antineoplastic activity. *Journal of natural products*, 80(3), 648-658.
- Sivakrishnan, S., Kavitha, J., & Kottai, M. (2013). Antioxidant protenital, total phenolic and flavonoids content of aerial parts of ethanolic extract of *Albizia procera* (Family: Mimosoideae). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), 108-110.
- Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S. N., Perveen, S., & Mahmood, Z. A. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 461-468.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, M. E., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Research International*, 2013(1), 1-11. doi: 10.1155/2013/251754.
- Thitaree, T. (n.d.). *Bioactive compounds from Diospyros ehretioides fruits* (Unpublished Doctoral dissertation). Chiang Mai University, Chiang Mai.
- Thompson, R., Heath, H. (2013). *Dementia: commitment to the care of people with dementia in hospital settings*. London: Royal college of nursing.
- Uddin, S. J., Mondal, K., Shilpi, J.A., & Rahman, M. T. (2006). Antidiarrhoeal activity of *Cyperus rotundus*. *Fitoterapia*, 77(1), 134-136.
- Umi, K. Y., & Noor, H. (1995). Flavone O-glycosides from *Tinospora crispa*. *Fitoterapia*, 66(1), 280.
- Vathsana, P. (2018). *Effect of Tinospora cordifolia crude extract supplementation on production performance immunity levels carcass characteristics and meat quality in thai native Chicken (Pradu hangdum)* (Unpublished Master' s thesis). Maejo University, Chiangmai.
- Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L., & Wang, Y.-J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13(10), 612.
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyka, A., Oniszczyk, T., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78(1), 39-49.
- Wongkham, S., Laupattarakasaem, P., Pienthaweechai, K., Areejitranusorn, P., Wongkham, C., & Techanitiswad, T. (2001). Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. *Phytotherapy Research*, 15(1), 119-121. doi: 10.1002/ptr.705
- World Health Organization. (2017). *Global action plan on the public health response to dementia 2017 – 2025*. Switzerland: World Health Organization.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Yokozawa, T., Wang, T. S., Chen, C. P., & Hattori, M. (2000). Inhibition of nitric oxide release by an aqueous extract of *Tinospora tuberculata*. *Phytotherapy research*, 14(1), 51–53.
- Yuan, L., Julie, V. S., Vijaykumar, P., Adam, B., Kenneth, J. C., Justin, P. B., . . . Peter, B. (2002). Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Biological Sciences*, 99(19), 12197-12202.
doi: 10.1073/pnas.182425199
- Yusoff, M., Hamid, H., & Houghton, P. (2014). Anticholinesterase inhibitory activity of quaternary alkaloids from *Tinospora crispa*. *Molecules*, 19(1), 1201–1211.
- Zulkhairi, A. J, Abdah, M. A., Kamal, N. H., Nursakinah, I., Moklas, M. A., Hasnah, B., . . . Shahidan, M. M. (2008). Biological properties of *Tinospora crispa* (akar patawali) and its antiproliferative activities on selected human cancer cell lines. *Malaysian Journal of Nutrition*, 14(2), 173-187.
- Zulkhairi, A., Hasnah, B., Sakinah, I., Nur, A. I., Zamree, M. S., & Mohd, S. A. (2009). Nutritional composition, antioxidant ability and flavonoid content of *Tinospora crispa* stem. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 3(1), 88–94.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	รัชฎากร ดาบสมเด็จ
วัน เดือน ปีเกิด	3 ตุลาคม 2538
สถานที่เกิด	จังหวัดสกลนคร ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผน ตะวันออก, 2561
ที่อยู่ปัจจุบัน	สกลนคร

