การประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ

Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Essential Oil and Crude Extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd Cultivated in Samutprakan Province

สุธีรา ญานะโส

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี

อรัญญา จุติวิบูลย์สุข

ภูริต ธนะรังสฤษฏ์

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2559

ชื่อเรื่อง การประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ

ผู้วิจัย สุธีรา ญานะโส

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี

อรัญญา จุติวิบูลย์สุข

ภูริต ธนะรังสฤษฏ์

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2561

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 39 หน้า

คำสำคัญ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส, สารสกัดหยาบจากข่า, น้ำมันหอมระเหยจากข่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรไทยสำหรับป้องกันและฟื้นฟูโรคอัลไซเมอร์ โดยการประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ น้ำมันหอมระเหยได้จากการสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำจากเหง้าข่าสด ในขณะที่สารสกัดหยาบได้จากการสกัดลำต้นเทียมและเหง้าข่าแห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ด้วยชุดสกัด Soxhlet เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman’s method โดยใช้ donepezil HCl เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารจากลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้จึงมีความน่าสนใจในการนำไปวิจัยเพิ่มเติมเพื่อประเมินฤทธิ์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในอนาคต

Research Title	Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Essential Oil and Crude Extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd Cultivated in Samutprakan Province
Researchers	Suthira Yanaso Noppawat Pengkumsri Aranya Jutiviboonsuk Phurit Thanarangsarit
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2018
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	39 pages
Keywords	Acetylcholinesterase, Essential oil of *Alpinia galanga* (L.) Willd, Crude extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

The objective of this research is to improve the potential of Thai herb for prevention and rehabilitation of Alzheimer's disease. Essential oil and crude extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd cultivated in Samutprakan province was subjected to determine acetylcholinesterase inhibitory activity using modified Ellman's method. The essential oil was extracted from fresh galangal rhizomes by hydrodistillation, whereas the crude extracts of dried galangal pseudostem and rhizome were obtained from Soxhlet extraction using hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol as solvents. Donepezil HCl was used as the reference compound. The results showed that the dichloromethane extract from galangal pseudostems and the essential oil from galangal rhizomes exhibited great inhibitory effect against acetylcholinesterase with IC_{50} values of 0.16 and 0.28 mg/mL, respectively. Consequently, both of the extracts are interesting for further investigation in other testing activities against Alzheimer's disease. These findings may lead to the development of beneficial herbal products for Alzheimer's patients in the future.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ เริ่มต้นจากการผลักดันของ ผศ.ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ต้องการให้เกิดงานวิจัยที่เป็นประโยชน์ต่อสังคม จึงคัดสรรพืชสมุนไพรที่นิยมปลูกในพื้นที่สมุทรปราการ นั่นก็คือ ข่ามาเป็นพืชหลักในการวิจัย ประกอบกับทางคณะวิจัยได้สนใจพัฒนาพืชสมุนไพรให้มีศักยภาพในด้านการป้องกันและฟื้นฟูโรคอัลไซเมอร์ จึงได้นำสมุนไพรข่าที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการมาวิจัยเพื่อการพัฒนา โดยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะสามารถเพิ่มคุณค่าในการบริโภคข่าและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของข่าได้ งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ไม่มากก็น้อยต่อทั้งวงการวิชาการและต่อสังคม อย่างไรก็ตาม หากมีข้อผิดพลาดประการใดเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ ทางผู้วิจัยขอน้อมรับทุกประการและขออภัยมา ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ไม่อาจสำเร็จลุล่วงได้ หากขาดความร่วมมือร่วมใจจากทีมสนับสนุนงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คุณวิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ คุณนภัสนันท์ นราสินวิวัฒน์ คุณชัยวิชิต รัตนมะณี และคุณมยุรี จานแสน ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติผู้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย ประจำปีการศึกษา 2559 นี้ ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้จนสามารถทำให้คณะผู้วิจัยนำมาใช้สร้างสรรค์งานอันเกิดประโยชน์ สุดท้ายขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวที่ช่วยให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ฆ
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูปภาพ		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	สมมติฐานการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	9
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	10
	การจัดหาและเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร	10
	การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด	10
	การสกัดสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่าแห้ง	10
	การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	11
	การประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากเหง้าและลำต้นเทียมข่า	14
บทที่ 4	ผลการวิจัย	17
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม		35
ภาคผนวก		
-	ประวัติย่อผู้วิจัย	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของตัวทำละลายผสมชนิดที่ 1-11 (ร้อยละโดยปริมาตร) ซึ่งใช้ในการเตรียมและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	12
2	น้ำยาทดสอบอัลคาลอยด์ชนิดต่างๆ และผลการทดสอบ	15
3	ร้อยละผลผลิตของวัตถุดิบข่าจากการอบแห้ง	17
4	ร้อยละผลผลิตของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด	17
5	ร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ	18
6	ผลการละลายของสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่าในตัวทำละลายต่างๆ	19
7	ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของ donepezil HCl ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมที่ 1-11	20
8	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ความเข้มข้นต่างๆ	22
9	ความหมายของรหัสที่ใช้ในการทดลองเพื่อประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดข่า	24
10	ผลการประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดเหง้าและลำต้นเทียมข่า	32

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการสร้างและสลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน	3
2	กลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์จากการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	4
3	ทฤษฎีการรักษาโรคอัลไซเมอร์โดยการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	4
4	หลักการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman's method	13
5	กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของ donepezil HCl น้ำมันหอมระเหย และสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน	23
6	ผลการทดลองตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Molisch’s test	24
7	ผลการทดลองตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Fehling’s test	25
8	ผลการทดลองตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี ninhydrin	25
9	ผลการทดลองตรวจหาสารอัลคาลอยด์ในสารสกัดข่า	26
10	ผลการทดลองตรวจหาสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยวิธี ferric chloride test	27
11	ผลการทดลองตรวจหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนด้วยการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (Shinoda’s test)	28
12	การตรวจหากลุ่มสารฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล ฟลาวาโนนด้วยการทดสอบของพิว (Pew’s test)	29
13	ผลการตรวจหาสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยการทดสอบความเป็นกรดด่าง (acid-base test)	30
14	ผลการตรวจหาสารกลุ่มแทนนินโดยการทดสอบด้วยเจลาติน (gelatin test)	31

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นทั้งในและต่างประเทศ จากการคาดการณ์ของสำนักงาน**สาธารณสุขรายงานว่าจำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทยจะเพิ่มจาก 600,000 คน เป็น** 1,117,000 คน ในระยะเวลา 15 ปี ซึ่งคิดจากปี พ.ศ. 2558 ถึง 2573 นับได้ว่าเป็นอีกโรคที่มีผลกระทบในวงกว้างต่อประเทศชาติ ทั้งทางครอบครัว สังคม และเศรษฐกิจ ซึ่ง **นายแพทย์สุวรรณชัย วัฒนายิ่งเจริญชัย** รองปลัดกระทรวงสาธารณสุข ได้แถลงการณ์ผ่านสื่อว่าโรคอัลไซเมอร์เป็นอีกหนึ่งปัญหาของประเทศที่ต้องทำการแก้ไขอย่างเร่งด่วน

การรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันเป็นการรักษาเพื่อลดความบกพร่องทางด้านพฤติกรรม ความจำ และการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วยเท่านั้น ยังไม่มีการรักษาใดที่มีผลยับยั้งหรือหยุดการทำลายเซลล์ประสาทในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ได้ (Alzheimer’s Association, 2017) การใช้ยาเพื่อลดและชะลอการเกิดพยาธิสภาพของโรคเป็นเพียงการบำบัดเพื่อปรับความสมดุลของสารสื่อประสาทในสมองทุกชนิดที่เชื่อมโยงและก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคเท่านั้น การเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์นั้นมีสาเหตุมาจากการลดลงของสารอะเซทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทหลักในระบบความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับความจำ การคิด และการเรียนรู้ (Anand และคณะ, 2014) สาเหตุของการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสก่อให้เกิดสารโคลีนและอะซิเตต ซึ่งการลดลงของสารอะเซทิลโคลีนอย่างต่อเนื่องจะก่อให้เกิดการทำลายเซลล์สมองและการสั่งการของสมองเสื่อมลงเรื่อยๆ ส่งผลทำให้ความสามารถของบุคคลลดลง มีความบกพร่องด้านความจำ การเรียนรู้ และมีพฤติกรรมและบุคลิกภาพเปลี่ยนไปจนส่งผลกระทบต่อกิจกรรมในชีวิตประจำวัน ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ จะสามารถป้องกันและฟื้นฟูภาวะของโรคอัลไซเมอร์ได้ (Huang และ Mucke, 2012)

“ข่า” เป็นสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีการปลูกมากในจังหวัดสมุทรปราการ ในปี พ.ศ. 2558 กรมส่งเสริมการเกษตร จังหวัดสมุทรปราการ ได้ส่งเสริมการปลูกข่าข้างบ่อเลี้ยงปลาเพื่อเพิ่มรายได้แก่เกษตรกร โดยสามารถทำร่วมกับการขุดบ่อเลี้ยงปลา เพื่อใช้พื้นที่ให้เกิดประโยชน์และง่ายต่อการดูแลรักษาที่ไม่ต้องให้น้ำข่าบ่อย เพราะข่าสามารถเจริญเติบโตจากน้ำในบ่อเลี้ยงปลาได้ดี อีกทั้งการปลูกข่ายังไม่มีการใช้สารเคมีที่จะส่งผลกระทบต่อระบบการเลี้ยงปลาเพื่อเป็นอาชีพอีกด้วย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการวิจัยเชิงประยุกต์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของข่าซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ดีในจังหวัดสมุทรปราการในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยมุ่งหวังว่าสารสกัดจากข่าจะมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาต่อไปในอนาคตเพื่อป้องกันและฟื้นฟูภาวะสมองเสื่อมจากโรคอัลไซเมอร์ด้วยองค์ความรู้ทางเภสัชกรรม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีน-เอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่า
2. เพื่อศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดหยาบจากข่าที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

สมมติฐานการวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้แตกต่างกัน
2. กลุ่มสารพฤกษเคมีในสารสกัดข่าที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิล-โคลีนเอสเทอเรสได้ จะมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพโรคอัลไซเมอร์ตามรายงานการวิจัยก่อนหน้าได้

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีน-เอสเทอเรสในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยสารสกัดจากข่าที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ สารสกัดที่นำมาประเมินฤทธิ์ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่า และสารสกัดหยาบจากเหง้าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล รวมทั้งการประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีในสารสกัดข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อวัตถุประสงค์ในการสร้างแนวทางในการพัฒนาสารสกัดข่าต่อไป

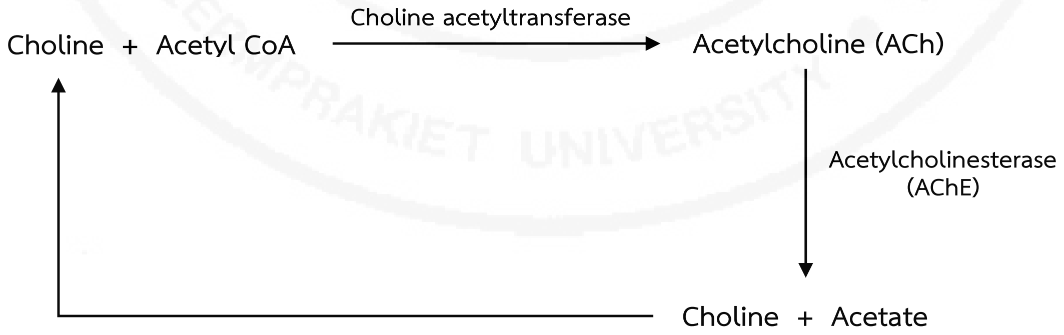
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ส่วนของสารสกัดข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
2. ได้แนวทางการพัฒนาสารสกัดข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิล-โคลีนเอสเทอเรสในการป้องกันและฟื้นฟูโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

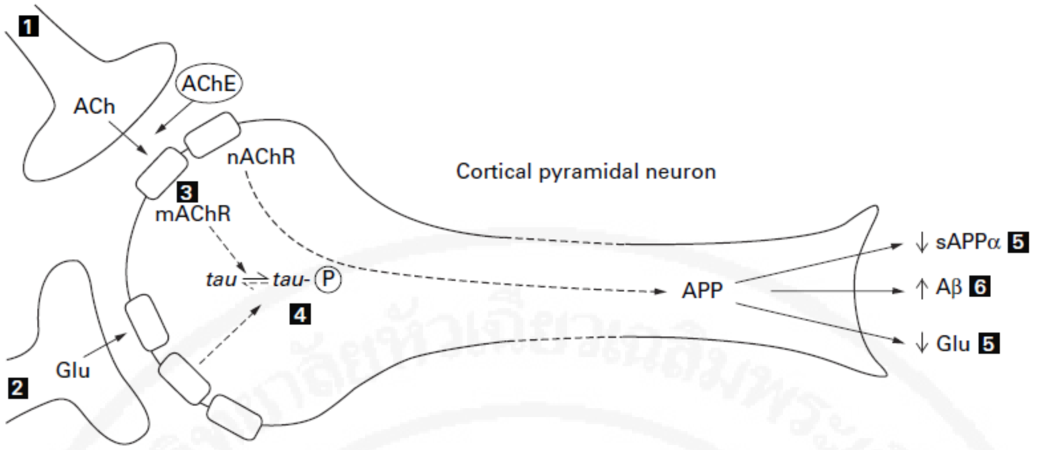
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคอัลไซเมอร์

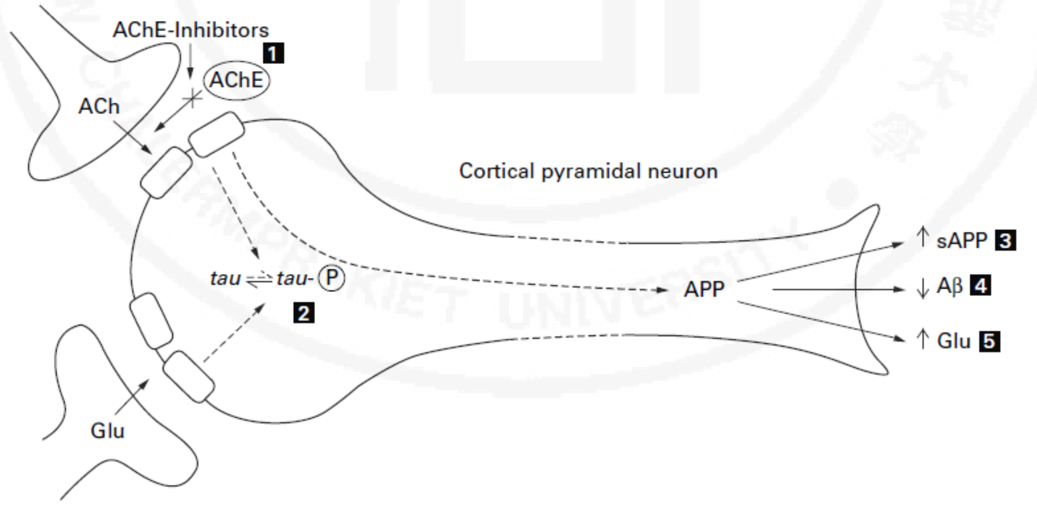
โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของระบบประสาทและเป็นหนึ่งในภาวะสมองเสื่อมที่เกิดขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส การเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์เกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน กระบวนการสร้างและสลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนที่ลดลงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส (Anand และ Singh, 2013) กระบวนการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลเอสเทอเรสที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์แสดงในภาพที่ 2 ซึ่งกระบวนการทางเคมีและชีวภาพที่เกิดขึ้นส่งผลให้ความจำและประสิทธิภาพการใช้ชีวิตลดลงเนื่องจากสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนที่ลดลง นำไปสู่แนวทางการป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์โดยมุ่งเป้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ดังแสดงในภาพที่ 3 **อายุเป็นหนึ่งปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งร้อยละ 50-60 ของภาวะสมองเสื่อมเกิดขึ้นในผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี (**Francis และคณะ, 1999**) จากอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่าจำนวนผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในประเทศไทยมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และคาดว่าอาจมีจำนวนมากถึง 1,117,000 คน ภายในปี พ.ศ.2573 (สำนักสารนิเทศ กระทรวงสาธารณสุข, 2559)**



ภาพที่ 1 กลไกการสร้างและสลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์จากการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (ที่มา: Francis และคณะ, 1999) (1) ปลดปล่อยสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (ACh) จากคอร์ติซอล; (2) ปลดปล่อยกรดกลูตามิก (Glu); (3) ลดการจับกันระหว่าง muscarinic M_1 กับ ACh muscarinic receptor (mAChR); (4) เพิ่มการกระตุ้นโปรตีน tau ด้วยกระบวนการเติมฟอสเฟต; (5) ลดการหลั่ง Amyloid precursor protein (sAPPα) และกรดกลูตามิก (Glu) และ (6) เพิ่มการสร้างอะไมลอยด์เบต้า (Aβ)



ภาพที่ 3 ทฤษฎีการรักษาโรคอัลไซเมอร์โดยการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (ที่มา: Francis และคณะ, 1999) (1) ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส; (2) ลดการกระตุ้นโปรตีน tau ด้วยกระบวนการเติมฟอสเฟต; (3) การหลั่ง Amyloid precursor protein (sAPPα) กลับคืนมาปกติ; (4) ลดการสร้างอะไมลอยด์เบต้า (Aβ) และ (5) ปริมาณกรดกลูตามิก (Glu) กลับคืนมาปกติ

“ข่า” สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ข่า หรือ *Alpinia galanga* (L.) Willd เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข่า (สมพร ภูติยานันต์, 2551) ประกอบด้วย

1. เหง้า/ลำต้นใต้ดิน ข่ามีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า เหง้า (rhizome) แตกออกเป็นแง่งแผ่ไปกับพื้นดิน แต่ละแง่งจะมีรากแขนงขนาดใหญ่ไม่กี่เส้นแทงลึกลงใต้ดิน

2. ใบและกาบใบ คือส่วนที่อยู่เหนือดิน มักเข้าใจและเรียกเป็นลำต้น แต่ความจริงเป็นก้านใบและใบที่แตกออกจากเหง้าใต้ดินเรียงซ้อนเป็นวง ซ้อนทับกันแน่น เรียกว่า ลำต้นเทียม มีความสูงประมาณ 1-2 เมตร ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ใบมีลักษณะภาพไข่ ยาวรี ปลายใบแหลม มีสีเขียวเข้ม เป็นมัน และออกสลับข้างกัน

3. ดอก ดอกข่าเป็นแบบช่อ แทงออกที่ปลายยอด ก้านช่อดอกยาวตรง ช่อดอกประกอบด้วยดอก 10-30 ดอก ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของต้น และสายพันธุ์ ดอกมีขนาดเล็กคล้ายดอกกล้วยไม้ ประกอบด้วยกลีบดอกสีขาว ขาวนวล หรือขาวอมชมพู ช่อดอกที่แทงขึ้นใหม่จะมีกาบ (spathe) สีเขียวอ่อนหุ้มอยู่ แต่เมื่อดอกบานกาบนี้จะหลุดไป

4. ผล ผลของข่ามีภาพร่างกลมรี เปลือกแข็ง ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีแดงส้ม ภายในมีเมล็ดสีดำ 1 ดอก จะติดเพียง 1 ผล ผลมีรสขม เผ็ดร้อน

องค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่หลากหลายของข่า พบว่าเหง้าข่ามีสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์และกรดฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น galangoisoflavonoid, methyleugenol, 1’-acetoxyeugenol acetate, acetoxychavicol acetate, hydroxychavicol acetate เป็นต้น ซึ่งชนิดและปริมาณของสารเหล่านี้ จะแตกต่างตามสายพันธุ์และแหล่งที่มาของข่า (Kaushik และคณะ, 2011) สำหรับในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่า มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าประกอบไปด้วยสารสำคัญมากกว่า 21 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม monoterpenoids และ sesquiterpenoids (Abdullah และคณะ, 2015) จึงทำให้ข่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ไล่แมลง ลดการบีบตัวของลำไส้ ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ลดการอักเสบ รวมถึงฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์สมองเสื่อมด้วย (Chitra และ Thoppil, 2008)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและคลินิกของข่า ได้แก่

1. ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากข่าในเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (Mahae และ Chaiseri, 2009)

2. ลดการบีบตัวของลำไส้

ข่ามีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ขับน้ำดี ขับลม ช่วยย่อยอาหาร ลดอาการแน่นจุกเสียดเนื่องจากแผลในกระเพาะอาหาร และยังมีฤทธิ์ต้านอักเสบอีกด้วย (สมพร ภูติยานันต์, 2551)

3. ฤทธิ์ไล่ยุง

มีการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่า 2,000 ppm เพื่อไล่ยุง พบว่าสามารถไล่ยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสารพฤกษเคมีที่เป็นสารออกฤทธิ์เพื่อไล่ยุง และพบมากในเหง้าข่า คือ 1,8-cineol (Abdullah และคณะ, 2015)

4. ฤทธิ์ไล่แมลง

จากการทดสอบน้ำมันหอมระเหยข่ากับ *Lasioderma serricorne* (F.) หรือมอดยาสูบ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากข่าเป็นพิษต่อมอดยาสูบ โดยมีค่า LD_{50} เป็น 12.2 ไมโครกรัม/ตัว ซึ่งสารพฤกษเคมีที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีกลั่น พบ eucalyptol (ร้อยละ 22.63), (1*S*)-(1)-β-pinene (ร้อยละ 14.36), 1*R*-α-pinene (ร้อยละ 10.89), α-terpineol (ร้อยละ 8.59), L(-)-borneol (ร้อยละ 8.41), (-)-camphor (ร้อยละ 4.21) และ camphene (ร้อยละ 4.14) (Wu และคณะ, 2014)

5. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งแยกได้จากเหง้าข่า คือ acetoxychavicol acetate, hydroxychavicol acetate และ *p*-coumaryl alcohol-γ-*O*-methyl ether มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ลดการหลั่งของ cytokines และ interleukin-1 ซึ่งสร้างจาก T-cells จึงลดการอักเสบได้ (Kaushik และคณะ, 2011)

6. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

มีการทดสอบสารสกัดข่าในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดข่าทำให้ normal cell lines, p53-inactive fibroblasts, normal epithelial cells, tumour mammary cells และ lung adenocarcinoma cell lines สามารถเกิด apoptosis ได้ (Muangnoi และคณะ, 2007)

ข่าต่อการป้องกันโรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์นั้น แม้ยังไม่มีการระบุกลไกการเกิดโรคที่แน่ชัด แต่มีทฤษฎีและพยาธิสภาพเชิงประจักษ์ทางวิชาการว่ามีสาเหตุมาจากการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน การเกิดอะไมลอยด์เบต้าไฟบริล การเพิ่มขึ้นของโปรตีน tau การเกิดความเครียดออกซิเดชัน และการเกิดการอักเสบในสมอง (Kurz และ Perneczky, 2011) ซึ่งในปัจจุบันการรักษาโรคอัลไซเมอร์เป็นการรักษาโดยการใช้ยากลุ่มที่เพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทในสมอง เช่น อะเซทิลโคลีน โดยยาจะไปทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส จึงลดการทำลายอะเซทิลโคลีน ส่งผลให้เกิดการลดความบกพร่องทางด้านพฤติกรรม ความจำ และการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วยได้ (Korabecnya และคณะ, 2015) สำหรับการทดสอบสารสกัดข่าในด้านการรักษาและป้องกันโรคอัลไซเมอร์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 83.9 (Chaiyana และ Okonogi, 2012) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบในหนูไมซ์ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคอัลไซเมอร์ด้วย Aβ_{25-35} พบว่าเมื่อให้สารสกัดข่าจากคลอโรฟอร์มแก่สัตว์ทดลอง สามารถช่วยฟื้นฟูความจำ โดยผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ทำให้ปริมาณของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้นได้ (Singh และคณะ, 2011) แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของการใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารลดน้อยลง เนื่องจากคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษมาก (Torkelson และคณะ, 1976) ทำให้สารสกัดข่าจากคลอโรฟอร์มไม่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการป้องกันและฟื้นฟูผู้ป่วยอัลไซเมอร์ สำหรับงานวิจัยนี้ น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบของข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จึงถูกนำมาประเมินเพื่อหาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาสารสกัดข่าเพื่อป้องกันและฟื้นฟูโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

สารพฤกษเคมีในสมุนไพรอื่นๆ ที่มีรายงานวิจัยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยสารสำคัญจากธรรมชาติเพื่อใช้ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโคลีนเอสเทอเรส และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอะไมลอยด์เบต้าไฟบริลที่น่าสนใจ ดังนี้

Quercetin เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอล พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลเบอร์รี่ หอมหัวใหญ่ ชาเขียวหรือชาดำ และกระชาย เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Awasthi และคณะ, 2016) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสทั้งอะเซทิลและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส (Khan และคณะ, 2009) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอะไมลอยด์เบต้าไฟบริลอีกด้วย (Ansari และ Khodagholi, 2013; Szwajgier, 2014)

Kaempferol เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอลอีกชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในพืชชนิดเดียวกับสาร quercetin มีรายงานว่า kaempferol เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Balkis และคณะ, 2015) และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอะไมลอยด์เบต้าไฟบริลได้ดี โดยผลการยับยั้งสัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นที่ใช้ (Szwajgier, 2014)

Resveratrol เป็นสารกลุ่ม stilbenes พบได้ในเปลือกองุ่นแดง เปลือกผลไม้ และถั่วต่างๆ resveratrol มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์บำรุงระบบหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และการยับยั้งการสร้างอะไมลอยด์เบต้าไฟบริล (Ansari และ Khodagholi, 2013)

Ferulic acid เป็นสารกลุ่ม hydroxycinnamic acids พบได้ในข้าวและพืชตระกูลหญ้า ซึ่ง ferulic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง มีรายงานการนำไปใช้ป้องกันการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดแข็งตัว เป็นต้น (Vladimir-Knežević และคณะ, 2014; Bhornchai และคณะ, 2015) นอกจากนี้ ferulic acid สามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้อีกด้วย (Vladimir-Knežević และคณะ, 2014)

Caffeic acid เป็นสารกลุ่ม hydroxycinnamic acids เช่นเดียวกันกับ ferulic acid พบได้ในกาแฟ รางจืด และพืชตระกูลเบอร์รี่ สาร caffeic acid มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่สูง (Magnani และคณะ, 2014; Vladimir-Knežević และคณะ, 2014)

Anthocyanidins เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วย cyanidin, peonidin, malvidin, delphinidin และ pelargonidin เป็นสารที่พบได้มากในพืชที่มีสีแดงจนถึงม่วง เช่น ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน กะหล่ำม่วง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นต้น สาร anthocyanidins แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสทั้งอะเซทิลและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรสที่ดี (Szwajgier, 2014; Balkis และคณะ, 2015)

กรอบแนวคิดในการวิจัย

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การจัดหาและเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

วัตถุดิบสมุนไพรสำหรับการวิจัย คือ ข่าหยวก อายุการเก็บประมาณ 8 เดือน ที่มีแหล่งปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ โดยใช้ส่วนเหง้าและลำต้นเทียมเพื่อการศึกษาวิจัย เตรียมโดยล้างทำความสะอาด ลดขนาดด้วยการหั่น จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป จากนั้นคำนวณหาร้อยละผลผลิตของวัตถุดิบข่าหลังจากทำการอบแห้ง โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักข่าแห้ง}}{\text{น้ำหนักข่าสด}} \times 100$$

3.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด

การสกัดน้ำมันหอมระเหยในงานวิจัยนี้ เป็นการสกัดโดยนำเหง้าข่าสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและหั่นเพื่อลดขนาดแล้ว มากลั่นด้วยไอน้ำโดยใช้เครื่อง clevenger apparatus เป็นเวลา 29.5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำมันข่าที่แยกชั้นออกจากน้ำ แล้วเติม anhydrous sodium sulfate เพื่อกำจัดน้ำที่อาจปนมากับน้ำมันข่าออก และนำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละผลผลิตของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่ได้}}{\text{น้ำหนักเหง้าข่าสดที่ใช้สกัด}} \times 100$$

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่าแห้ง

นำวัตถุดิบสมุนไพรที่ผ่านการอบแห้งและบด จากข้อ 3.1 ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล โดยการสกัดแบบเรียงลำดับตามคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์จากน้อยไปมาก ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดละ 12 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง Soxhlet extractor จากนั้นนำสารสกัดในภาพแบบสารละลายแต่ละชนิดไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนจะนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer และนำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบของแต่ละตัวทำละลาย โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนักข่าอบแห้งที่ใช้สกัด}} \times 100$$

3.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

3.4.1 การทดสอบการละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายต่างๆ

ทดสอบการละลายของสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่าที่ผ่านการสกัดจากการทดลองในหัวข้อ 3.3 เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรในน้ำ และ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรในน้ำ โดยชั่งสารสกัดเริ่มต้นปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร หากตัวทำละลายใดสามารถละลายสารสกัดจนได้สารละลายใส จึงทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้สารสกัดปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การทดสอบผลของตัวทำละลายต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากตัวทำละลายอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ นำไปสู่การแปลผลการทดลองที่ผิดพลาด จึงต้องมีการทดสอบผลของตัวทำละลายต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรในน้ำ และ DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวทำละลาย แสดงดังตารางที่ 1 โดยเตรียม donepezil HCl ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส donepezil HCl และตัวทำละลายจะมีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า

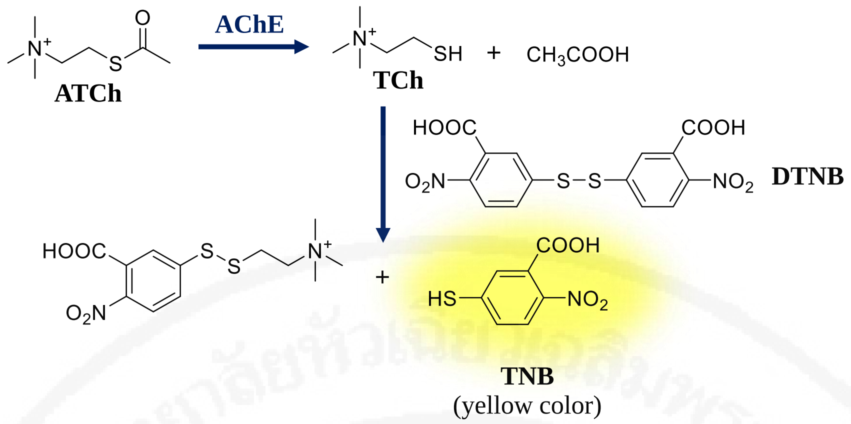
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในงานวิจัยนี้ จะทำการศึกษาด้วยวิธี modified Ellman's assay ซึ่งทำการวัดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาจากกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่มีสีเหลืองโดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี โดยกำหนดค่าความยาวคลื่นในการวัดความเข้มสีของปฏิกิริยาที่ 405 นาโนเมตร สีเหลืองของผลิตภัณฑ์จะจางลงเมื่อตัวอย่างทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ดี (Dingova และคณะ, 2014) ซึ่งรายละเอียดของการทดสอบจะแสดงไว้ในหัวข้อ 3.4.3 ต่อไป สำหรับสถิติในการทดลองนี้ วิเคราะห์โดยใช้ ANOVA test ร่วมกับ LDS host hoc analysis ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS statistics V17.0 program

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของตัวทำละลายผสมชนิดที่ 1-11 (ร้อยละโดยปริมาตร) ซึ่งใช้ในการเตรียมและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

ชนิดตัวทำละลายผสม	ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารสกัด (ร้อยละโดยปริมาตร)			ความเข้มข้นของตัวทำละลายในปฏิกิริยาทดสอบ (ร้อยละโดยปริมาตร)		
	DMSO	Tween 20	น้ำ	DMSO	Tween 20	น้ำ
1	0	0	100	0	0	10
2	100	0	0	10	0	0
3	0	20	80	0	2	8
4	1	20	79	0.1	2	7.9
5	2	20	78	0.2	2	7.8
6	5	20	75	0.5	2	7.5
7	8	20	72	0.8	2	7.2
8	10	20	70	1	2	7
9	20	20	60	2	2	6
10	50	20	30	5	2	3
11	80	20	0	8	2	0

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่า

ผู้วิจัยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ได้จากการสกัดในหัวข้อ 3.2 และ 3.3 โดยใช้ modified Ellman's method ซึ่งมีหลักการแสดงไว้ดังภาพที่ 4 ในการทดลอง การทำปฏิกิริยาเริ่มจากเอนไซม์อะเซทิล-โคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase: AChE) ไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น คือ อะเซทิลไทโอโคลีน (acetylthiocholine: ATCh) ได้สารมัธยันตร์ คือ ไทโอโคลีน (thiocholine: TCh) จากนั้นสารมัธยันตร์จะเกิดปฏิกิริยาต่อกับสาร 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) เกิดผลิตภัณฑ์ชื่อ 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้ได้ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ความเข้มของการดูดกลืน (the intensity of the absorption) แปรผันตรงกับปริมาณของผลิตภัณฑ์สีเหลืองที่เกิดขึ้น หากเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE จะส่งผลให้ปริมาณของ TCh ลดลง ส่งผลให้ความเข้มของการดูดกลืนลดลงตามไปด้วย (Ellman และคณะ, 1961; Mertens และคณะ, 2016)



ภาพที่ 4 หลักการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman's method

ในงานวิจัยนี้ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman's method ทดลองโดยใช้ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well microplates) การทดลองเริ่มจากการใส่สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงในหลุม จากนั้นเติม ATCh ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ตามด้วย bovine serum albumin ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตรในตัวทำละลาย Tris(hydroxymethyl) aminomethane ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม DTNB ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ก่อนนำปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร จากนั้นเติมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากปลาไหลไฟฟ้า (*Electrophorus electricus*) ความเข้มข้น 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงในหลุม ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยารวม คือ 250 ไมโครลิตร ขั้นตอนสุดท้ายนำปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ (negative control) จะใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารตัวอย่างแทนการใช้สารตัวอย่าง ในขณะที่กลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control) จะใช้ donepezil HCl ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแทนการใช้สารตัวอย่าง โดยการทดลองของกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมแบบลบ และกลุ่มควบคุมแบบบวก จะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยก่อนนำมาใช้คำนวณร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\%\text{AChE inhibition} = \frac{(A\text{-}B) - (C\text{-}D)}{(A\text{-}B)} \times 100$$

เมื่อ %AChE inhibition คือ ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

A คือ ค่าการดูดกลืนของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์แต่ไม่มีสารตัวอย่าง

B คือ ค่าการดูดกลืนของปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์และไม่มีสารตัวอย่าง

C คือ ค่าการดูดกลืนของปฏิกิริยาที่มีทั้งเอนไซม์และสารตัวอย่าง

D คือ ค่าการดูดกลืนของปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์แต่มีสารตัวอย่าง

3.5 การประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากเหง้าและลำต้นเทียมข่า

เตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบจากสารสกัดทั้งส่วนเหง้าและส่วนลำต้นเทียมที่ได้จากการสกัดตามหัวข้อ 3.3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรในเอทานอล จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาทดสอบเพื่อประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีดังต่อไปนี้

3.5.1 การตรวจหาคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลรีดิวซ์

3.5.1.1 การตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Molisch’s test

นำสารละลายตัวอย่างของสารสกัดข่า 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย α-naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร จำนวน 3 หยด เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม (ค่อยๆ เติมโดยเทลงด้านข้างหลอดทดลอง) กรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาณ 1 มิลลิลิตร สังเกตสีบริเวณรอยต่อของสารละลาย หากพบสีม่วงแดงแสดงว่ามีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต

3.5.1.2 การตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Fehling’s test

นำสารละลายตัวอย่างของสารสกัดข่า 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Fehling ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำนาน 5 นาที สังเกตสีของสารละลาย หากพบตะกอนส้มแดงแสดงว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์

3.5.2 การตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี ninhydrin

นำสารละลายตัวอย่างของสารสกัดข่า 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย ninhydrin ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปต้มบนอ่างอังไอน้ำนาน 5 นาที สังเกตสีของสารละลาย หากเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน-ม่วงแสดงว่ามีโปรตีน

3.5.3 การตรวจหาสารพฤกษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์

นำสารละลายตัวอย่างของสารสกัดข่า 2 หยด มาเติมน้ำยาทดสอบอัลคาลอยด์ชนิดต่างๆ (ทำการทดลองบนกระจกใส) จำนวน 1 หยด และสังเกตลักษณะของสารละลาย หากพบตะกอนที่เกิดขึ้นดังแสดงตามตารางที่ 2 แสดงว่ามีอัลคาลอยด์

ตารางที่ 2 น้ำยาทดสอบอัลคาลอยด์ชนิดต่างๆ และผลการทดสอบ

น้ำยาทดสอบ	**ผลการทดสอบ**
Dragendorff's	ตะกอนส้ม
Hager's	ตะกอนเหลือง
Mayer's	ตะกอนขาว
Wager's	ตะกอนน้ำตาลแดง
Tannic acid	ตะกอนขาว

3.5.4 การตรวจหาสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

3.5.4.1 การตรวจหาสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยน้ำยาเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride test)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร จำนวน 3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หากพบการเปลี่ยนแปลงของสีโดยพบหรือไม่พบตะกอนเป็นสีน้ำเงิน น้ำเงินคล้ำ น้ำเงินม่วง เขียว เขียวน้ำตาล แสดงว่ามีสารกลุ่มโพลีฟีนอล

3.5.4.2 การตรวจหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนด้วยการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (Shinoda's test)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเติมผงแมกนีเซียม 0.05 กรัม จากนั้นหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 โดยปริมาตร จำนวน 5 หยด หากสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง แสดงว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรน

3.5.4.3 การตรวจหาสารกลุ่มฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ ฟลาวาโนน และฟลาโวนอลด้วยการทดสอบของพิว (Pew's test)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเติมผงสังกะสี 0.25 กรัม จากนั้นหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล จำนวน 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงหยดกรดไฮโดร-คลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 โดยปริมาตร จำนวน 5 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากพบสีแดงเข้ม แสดงว่ามีสารประกอบฟลาวาโนนอลและฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ แต่หากพบสีแดงจางๆ แสดงว่ามีสารประกอบฟลาวาโนนและฟลาโวนอล

3.5.4.4 การตรวจหาสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยการทดสอบความเป็นกรดด่าง (acid-base test)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 1 หยด จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย 10% แอมโมเนียทีละหยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อเติมกรด และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อเติมด่าง แสดงว่ามีสารกลุ่มแอนโทไซยานิน

3.5.4.5 การตรวจหาสารกลุ่มแทนนินโดยการทดสอบด้วยเจลาติน (gelatin test)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร สังเกตหากพบตะกอน แสดงว่ามีสารกลุ่มแทนนิน

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การจัดหาและเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

ร้อยละผลผลิตของวัตถุดิบข่าหลังจากทำการอบแห้ง แสดงไว้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ร้อยละผลผลิตของวัตถุดิบข่าจากการอบแห้ง

วัตถุดิบ	น้ำหนักสด (กิโลกรัม)	น้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม)	ร้อยละผลผลิต
เหง้าข่า			
ครั้งที่ 1	8.9	0.7	7.9
ครั้งที่ 2	9.4	1.0	10.6
ครั้งที่ 3	14.3	1.4	9.8
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	10.9±3.0	1.0±0.4	9.2±1.4
ลำต้นเทียมข่า			
ครั้งที่ 1	4.7	0.4	8.5
ครั้งที่ 2	5.4	0.8	14.8
ครั้งที่ 3	11.5	1.1	9.6
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	7.2±3.7	0.8±0.4	11.1±3.4

4.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด

ร้อยละผลผลิตของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่า แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร้อยละผลผลิตของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าสด

การทดลอง	ผลการทดลอง
น้ำหนักเหง้าข่าสดเริ่มต้น (กรัม)	1630
น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (กรัม)	2.30
ร้อยละผลผลิต	0.14

4.3 การสกัดสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่า

ร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโร-มีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ

สารสกัดข่า	น้ำหนักข่าอบแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต
เหง้า			
เฮกเซน	1431	89.29	6.24
ไดคลอโรมีเทน		14.14	0.99
เอทิลอะซิเตต		14.70	1.03
เอทานอล		58.62	4.10
ลำต้นเทียม			
เฮกเซน	1161.5	20.76	1.79
ไดคลอโรมีเทน		11.72	1.01
เอทิลอะซิเตต		8.51	0.73
เอทานอล		9.61	0.83

4.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

4.4.1 การทดสอบการละลายของสารสกัดข่าในตัวทำละลายต่างๆ

การทดสอบการละลายของสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่า โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรในน้ำ (50% เมทานอล) และ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 20 (20% Tween 20) โดยปริมาตรในน้ำ เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ผลการทดสอบการละลายโดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดข่า 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า 20% Tween 20 สามารถละลายสารสกัดทุกชนิดที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ DMSO สามารถละลายสารสกัดทุกชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ผลการละลายของสารสกัดหยาบจากลำต้นเทียมและเหง้าข่า ในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	สารสกัดข่าส่วนเหง้า				สารสกัดข่าส่วนลำต้นเทียม			
		เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตต	เอทานอล	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตต	เอทานอล
น้ำ	1	X	X	X	O	X	X	X	O
50% เมทานอล	1	X	X	X	/	O	X	X	/
เมทานอล	1	X	/	/	/	O	/	/	/
20% Tween 20	1	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	/	/	/	/	/	/	/	/
	10	O	O	/	/	O	O	/	/
DMSO	1	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	/	/	/	/	/	/	/	/
	10	/	/	/	/	/	/	/	/

หมายเหตุ: X = ไม่ละลาย, O = ละลายบางส่วน, / = ละลายทั้งหมด

4.4.2 การทดสอบผลของตัวทำละลายต่อการทำงานของเอนไซม์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในงานวิจัยนี้โดยวิธี modified Ellman's test เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้มแสงในช่วงรังสียูวี ดังนั้นสารละลายที่ใช้ในการวัดต้องเป็นสารละลายใส จากผลการทดลองละลายสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดทุกชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนได้สารละลายใสคือ DMSO แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ถึง 10 โดยปริมาตร แสดงผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิล-โคลีนเอสเทอเรส (Obregon และคณะ, 2005) ดังนั้นการใช้ DMSO จึงเป็นไปอย่างจำกัด ผู้วิจัยจึงสนใจนำสารลดแรงตึงผิวกลุ่มที่ไม่มีประจุมาช่วยเพิ่มการละลาย โดยเลือกใช้ Tween 20 ซึ่งเป็นสารที่ใช้โดยทั่วไปในการตั้งตำรับเภสัชภัณฑ์ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานผลของ Tween 20 ต่อการทำงานของเอนไซม์ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพื่อหาข้อสรุปของการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ตัวทำละลายผสมชนิดที่ 1-11 โดยใช้ donepezil HCl ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นยากลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิล-โคลีนเอสเทอเรสโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ แสดงดังตารางที่ 7 พบว่าการใช้ตัวทำละลายผสมชนิดที่ 3

(Tween 20 : น้ำ = 2:8) แสดงผลการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) กับการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และเมื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเมื่อต้องการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย พบว่ามีเพียงตัวทำละลายผสมชนิดที่ 4 (DMSO : Tween 20 : น้ำ = 0.1:2:7.9) เท่านั้นที่ให้ผลร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) กับตัวทำละลายชนิดที่ 3 (Tween 20 : น้ำ = 2:8)

ตารางที่ 7 ผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของ donepezil HCl ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมที่ 1-11

ชนิดตัวทำละลายผสม	ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ (ร้อยละโดยปริมาตร)			ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
	DMSO	Tween 20	น้ำ	
1	0	0	10	98.0
2	10	0	0	73.7
3	0	2	8	96.8
4	0.1	2	7.9	94.8
5	0.2	2	7.8	93.0
6	0.5	2	7.5	91.3
7	0.8	2	7.2	92.6
8	1	2	7	92.3
9	2	2	6	89.2
10	5	2	3	80.6
11	8	2	0	65.5

4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่า

ผู้วิจัยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman's method ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ โดยใช้ donepezil HCl ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน จากผลการทดลองหัวข้อ 4.2.2 ผู้วิจัยเลือกใช้ตัวทำละลายผสมชนิดที่ 3 (Tween 20 : น้ำ = 2:8) ผลร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 8 พบว่าเมื่อใช้สารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบการยับยั้งการ

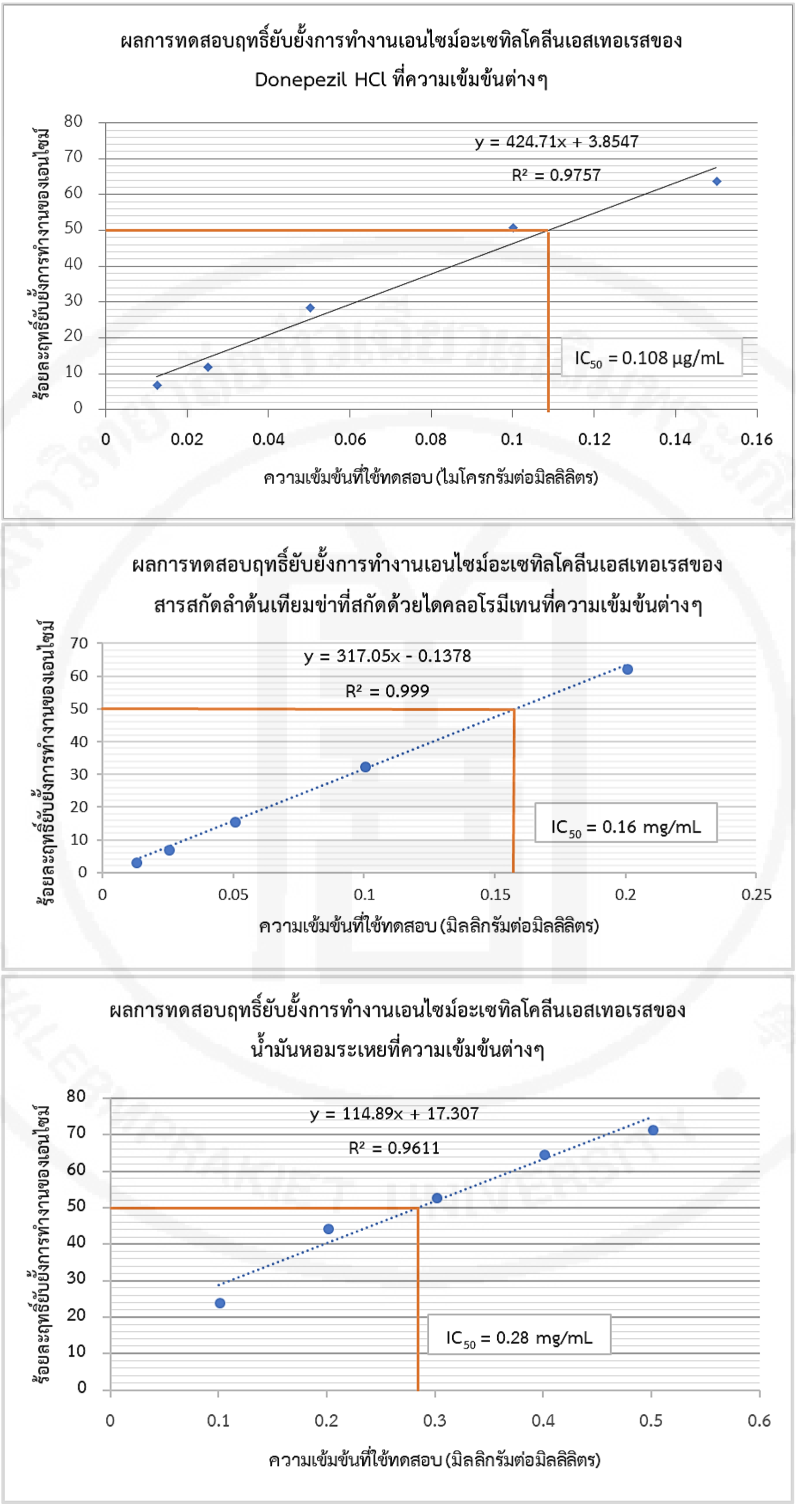
ทำงานของเอนไซม์ น้ำมันหอมระเหยของสารสกัดข่าแสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 71.7 ในขณะที่การทดสอบสารสกัดจากลำต้นเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้ เนื่องจากสีของสารสกัดรบกวนการอ่านค่าดูดกลืนแสง ผู้วิจัยจึงลดความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวเหลือ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สีของสารสกัดลดลง จึงรบกวนการแปลผลลดลง เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พบว่าสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนให้ผลการยับยั้งสูงที่สุด คือ ร้อยละ 64.6 ในขณะที่สารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตให้ผลการยับยั้งรองลงมา คือ ร้อยละ 54.0

จากนั้นผู้วิจัยจึงทดลองหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยทดลองเฉพาะสารสกัดข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5 พบว่า donepezil HCl ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากข่า และสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.28 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดข่า	**ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส**		
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	0.5	**0.2**	**0.01**
น้ำมันหอมระเหย	71.7	-	-
เหง้า			
เฮกเซน	1.6	-	-
ไดคลอโรมีเทน	10.7	-	-
เอทิลอะซิเตต	12.7	-	-
เอทานอล	0.6	-	-
ลำต้นเทียม			
เฮกเซน	X	24.8	-
ไดคลอโรมีเทน	X	64.6	-
เอทิลอะซิเตต	X	54.0	-
เอทานอล	20.9	-	-
สารมาตรฐาน (donepezil HCl)	-	-	95.7

หมายเหตุ: X = ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้, - = ไม่ได้ทำการทดลอง



ภาพที่ 5 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของ donepezil HCl น้ำมันหอมระเหย และสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50

4.5 ผลการประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดข่า

ผู้วิจัยได้ตั้งรหัสเพื่อเป็นตัวแทนสารสกัดต่างๆ เพื่อประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดข่า แสดงดังตารางที่ 9

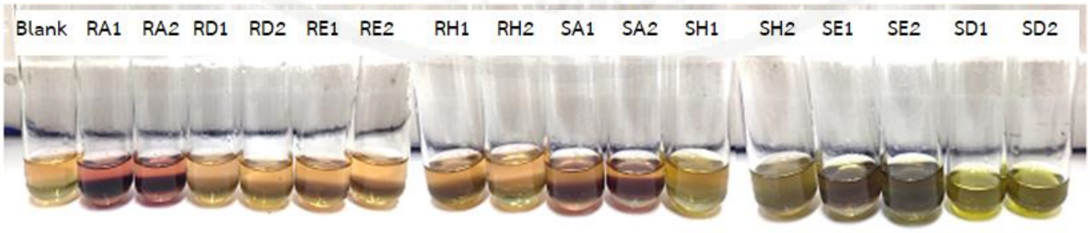
ตารางที่ 9 ความหมายของรหัสที่ใช้ในการทดลองเพื่อประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดข่า

รหัส	**ความหมาย**
R	สารสกัดจากเหง้าข่า
S	สารสกัดจากลำต้นเทียมข่า
A	สารสกัดจากการสกัดด้วยเอทานอล
E	สารสกัดจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต
D	สารสกัดจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน
H	สารสกัดจากการสกัดด้วยเฮกเซน
1	การทดลองครั้งที่ 1
2	การทดลองครั้งที่ 2
Blank	50% DMSO ในเอทานอล

4.5.1 การตรวจหาคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลรีดิวซ์

4.5.1.1 การตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Molisch’s test

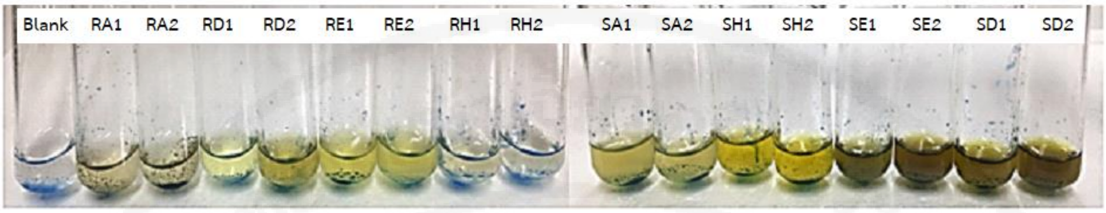
จากการทดลอง ตรวจพบคาร์โบไฮเดรตของสารสกัดจากเหง้าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยเอทานอล (RA1, RA2, SA1 และ SA2) ซึ่งแสดงสีม่วงแดง ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผลการทดลองตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Molisch’s test โดยรหัสต่างๆ มีความหมายตามตารางที่ 9

4.5.1.2 การตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Fehling's test

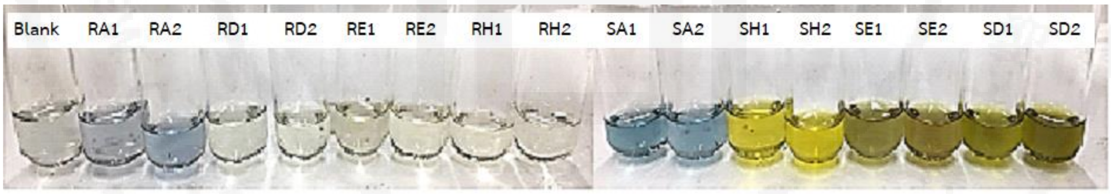
จากการทดลอง ไม่พบตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าตรวจไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการทดลองตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Fehling's test โดยรหัสต่างๆ มีความหมายตามตารางที่ 9

4.5.2 การตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี ninhydrin

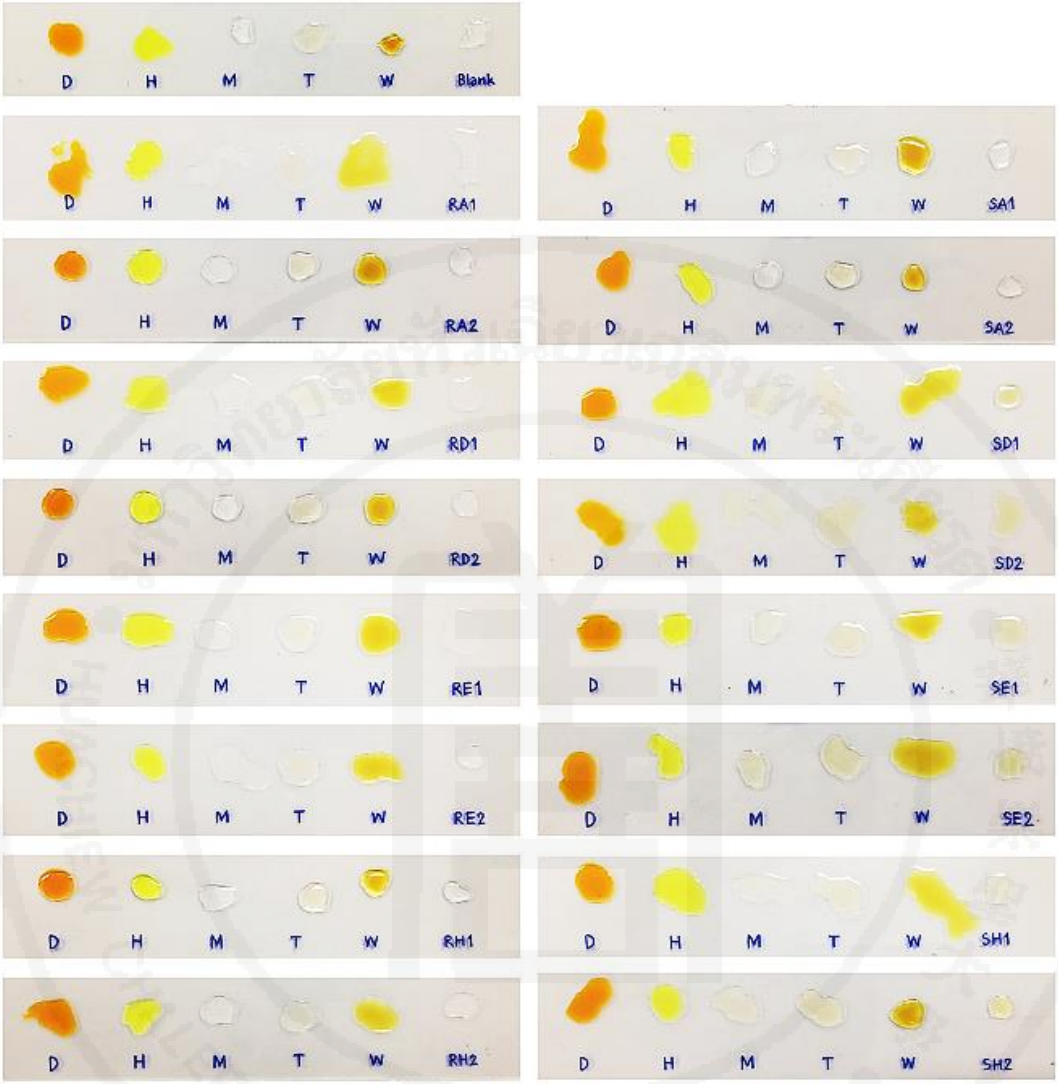
จากการทดลอง ตรวจพบโปรตีนของสารสกัดจากเหง้าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยเอทานอล (RA1, RA2, SA1 และ SA2) ซึ่งแสดงสีน้ำเงิน-ม่วง ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ผลการทดลองตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี ninhydrin
โดยรหัสต่างๆ มีความหมายตามตารางที่ 9

4.5.3 การตรวจหาสารพฤกษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์

จากการตรวจหาสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสารสกัดข่าด้วยน้ำยาทดสอบอัลคาลอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ Dragendorff's (D), Hager's (H), Mayer's (M), Wager's (W) และ Tannic acid (T) ตรวจไม่พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสารสกัดข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลการทดลองตรวจหาสารอัลคาลอยด์ในสารสกัดข่าด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's (D), Hager's (H), Mayer's (M), Tannic acid (T) และ Wager's (W) โดยรหัสต่างๆ มีความหมายตามตารางที่ 9

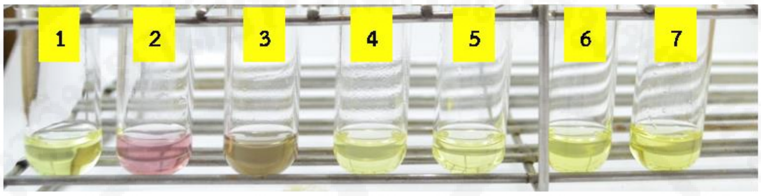
4.5.4 การตรวจหาสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

4.5.4.1 การตรวจหาสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยน้ำยาเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride test)

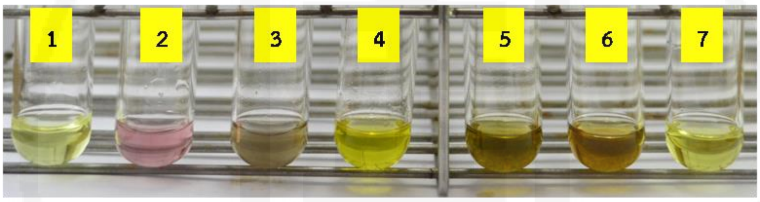
การตรวจสอบสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยวิธี ferric chloride test เป็นการทำปฏิกิริยาของธาตุเหล็กประจุ 3+ กับหมู่ฟีนอลเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นตะกอนและไม่เป็นตะกอนสีน้ำเงิน น้ำเงินคล้ำ น้ำเงินม่วง เขียว เขียวน้ำตาล (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555) ผลการตรวจหาสารกลุ่มโพลีฟีนอลในสารสกัดข่า แสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งตรวจไม่พบสารกลุ่มโพลีฟีนอลในสารสกัด

เหง้าข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 10 ก.) ในขณะที่พบตะกอนสีน้ำตาลในสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ภาพที่ 10 ข.) ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (หลอดที่ 5) และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (หลอดที่ 6) พบตะกอนสีเขียวน้ำตาลอ่อนในสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยเอทานอล (หลอดที่ 7) แสดงว่ามีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

ก. สารสกัดเหง้าข่า



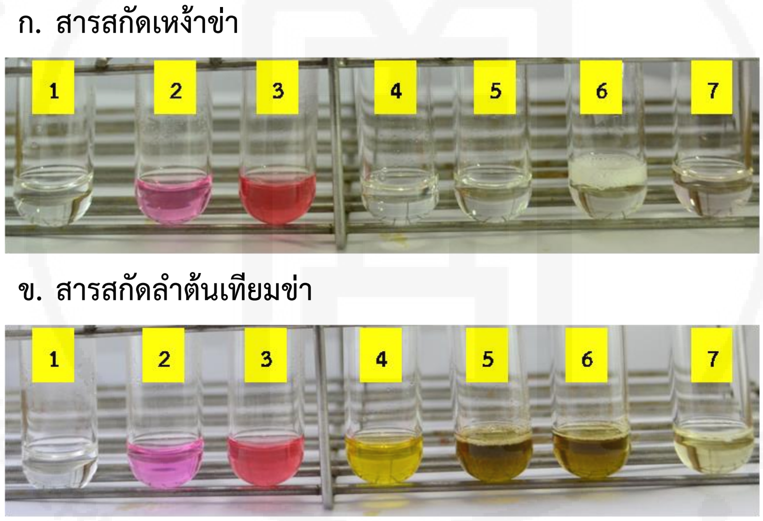
ข. สารสกัดลำต้นเทียมข่า



ภาพที่ 10 ผลการทดลองตรวจหาสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยวิธี ferric chloride test ในสารสกัดเหง้าข่า (ก.) และสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ข.) โดยหลอดที่ 1 คือปฏิกิริยาควบคุม, หลอดที่ 2 และ3 คือปฏิกิริยาให้ผลบวก, หลอดที่ 4 คือสารที่สกัดด้วยเฮกเซน, หลอดที่ 5 คือสารที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน, หลอดที่ 6 คือสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และหลอดที่ 7 คือสารที่สกัดด้วยเอทานอล

4.5.4.2 การตรวจหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนด้วยการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (Shinoda’s test)

การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนด้วยวิธี Shinoda’s test เป็นการทำปฏิกิริยาของโครงสร้างสารหลักเป็นฟลาโวน (flavone backbone) โดยทั่วไปมีสีเหลืองกับโลหะแม็กนีเซียมที่มีการเติมกรดไฮโดรคลอริก เกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin skeleton) ซึ่งเป็นสารที่มีสีส้มหรือแดง (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555) ผลการทดลอง คือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดเป็นสีส้มหรือแดง แสดงว่าตรวจไม่พบกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนในสารสกัดจากเหง้าข่าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ แสดงดังภาพที่ 11

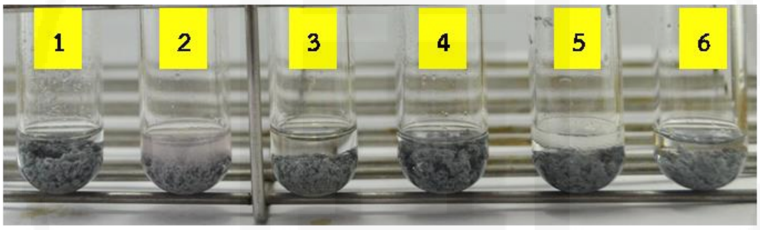


ภาพที่ 11 ผลการทดลองตรวจหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แกมมาเบนโซไพโรนด้วยการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (Shinoda’s test) ในสารสกัดเหง้าข่า (ก.) และสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ข.) โดยหลอดที่ 1 คือ ปฏิกิริยาควบคุม, หลอดที่ 2 และ 3 คือปฏิกิริยาให้ผลบวก, หลอดที่ 4 คือสารที่สกัดด้วยเฮกเซน, หลอดที่ 5 คือสารที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน, หลอดที่ 6 คือสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และหลอดที่ 7 คือสารที่สกัดด้วยเอทานอล

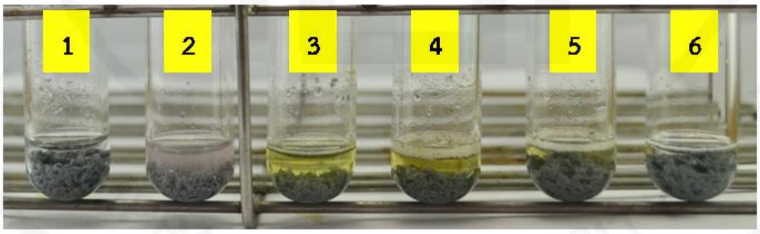
4.5.4.3 การตรวจหากลุ่มสารฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล ฟลาวาโนน ด้วยการทดสอบของพิว (Pew’s test)

การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ ฟลาวาโนน และฟลาโวนอล ด้วยวิธี Pew’s test เป็นการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ในสภาวะที่มีกรดโดยมีสังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) โดยจะมีสีแดงเข้มหากมีสารประกอบฟลาวาโนนอลและฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ ในขณะที่การเกิดสีแดงจางๆ จะเกิดจากสารประกอบฟลาวาโนนและฟลาโวนอล (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555) ผลการทดลอง คือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดเป็นสีแดง แสดงว่าตรวจไม่พบกลุ่มสารฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ ฟลาวาโนน และฟลาโวนอล ในสารสกัดจากเหง้าข่าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ แสดงดังภาพที่ 12

ก. สารสกัดเหง้าข่า



ข. สารสกัดลำต้นเทียมข่า

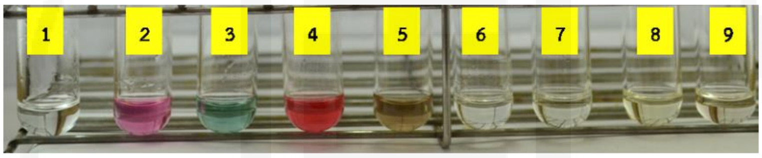


ภาพที่ 12 การตรวจหากลุ่มสารฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล ฟลาวาโนนด้วยการทดสอบของพิว (Pew’s test) ของสารสกัดเหง้าข่า (ก.) และสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ข.) โดยหลอดที่ 1 คือปฏิกิริยาควบคุม, หลอดที่ 2 คือปฏิกิริยาให้ผลบวก, หลอดที่ 3 คือสารที่สกัดด้วยเฮกเซน, หลอดที่ 4 คือสารที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน, หลอดที่ 5 คือสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และหลอดที่ 6 คือสารที่สกัดด้วยเอทานอล

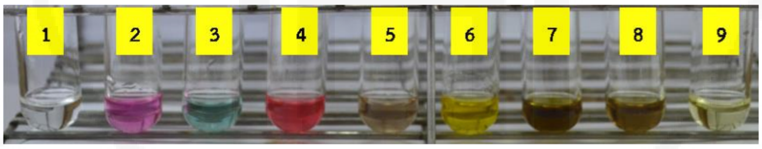
4.5.4.4 การตรวจหาสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยการทดสอบความเป็นกรดด่าง (acid-base test)

การตรวจสอบสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี acid-base test เป็นการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างสารตามค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยโครงสร้างในสภาวะที่เป็นกรดเรียกว่า flavylium cation จะมีสีแดง ส่วนโครงสร้างในสภาวะที่เป็นด่าง เรียกว่า quinoidal base จะมีสีน้ำเงิน (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555) ผลการทดลองเมื่อเติมกรดหรือด่างพบว่า สารสกัดจากเหง้าข่าและลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ ไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อเติมกรด และไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อเติมด่าง แสดงว่าไม่พบสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 13

ก. สารสกัดเหง้าข่า



ข. สารสกัดลำต้นเทียมข่า

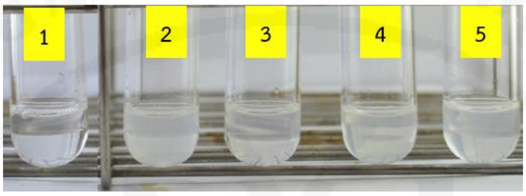


ภาพที่ 13 ผลการตรวจหาสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยการทดสอบความเป็นกรดด่าง (acid-base test) ของสารสกัดเหง้าข่า (ก.) และสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ข.) โดยหลอดที่ 1 คือปฏิกิริยาควบคุม, หลอดที่ 2 และ 4 คือปฏิกิริยาให้ผลบวกกับกรด, หลอดที่ 3 และ 5 คือปฏิกิริยาให้ผลบวกกับด่าง, หลอดที่ 6 คือสารสกัดเฮกเซน, หลอดที่ 7 คือสารสกัดไดคลอโรมีเทน, หลอดที่ 8 คือสารสกัดเอทิลอะซิเตต และหลอดที่ 9 คือสารสกัดเอทานอล โดยหลอดที่ 6-9 คือปฏิกิริยาเมื่อทดสอบในกรดหรือในด่าง

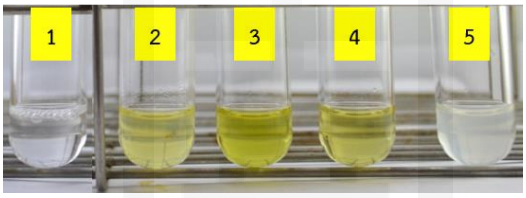
4.5.4.5 การตรวจหาสารกลุ่มแทนนินโดยการทดสอบด้วยเจลาติน (gelatin test)

การตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินด้วยวิธี gelatin test เป็นการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนของเจลาตินด้วยแทนนิน (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555) จากการทดลองไม่พบตะกอนของเจลาติน แสดงว่าตรวจไม่พบสารกลุ่มแทนนินในสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในงานวิจัยนี้ แสดงดังภาพที่ 14

ก. สารสกัดเหง้าข่า



ข. สารสกัดลำต้นเทียมข่า



ภาพที่ 14 ผลการตรวจหาสารกลุ่มแทนนินโดยการทดสอบด้วยเจลาติน (gelatin test) ของสารสกัดเหง้าข่า (ก.) และสารสกัดลำต้นเทียมข่า (ข.) โดย หลอดที่ 1 คือปฏิกิริยาควบคุม, หลอดที่ 2 คือสารสกัดเฮกเซน, หลอดที่ 3 คือสารสกัดไดคลอโรมีเทน, หลอดที่ 4 คือสารสกัดเอทิลอะซิเตต และหลอดที่ 5 คือสารสกัดเอทานอล

จากผลการทดลองเพื่อประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดข่า โดยตรวจหาสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน สารกลุ่มอัลคาลอยด์และสารกลุ่มฟีนอกลิก สามารถสรุปผลการประเมินดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดเหง้าและลำต้นเทียมข่า

สารสกัดข่า	**ผลการประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมี**				
	คาร์โบไฮเดรต	**น้ำตาลรีดิวซ์**	**โปรตีน**	**อัลคาลอยด์**	**ฟีนอกลิก**
เหง้า					
เฮกเซน	X	X	X	X	X
ไดคลอโรมีเทน	X	X	X	X	X
เอทิลอะซิเตต	X	X	X	X	X
เอทานอล	O	X	O	X	X
ลำต้นเทียม					
เฮกเซน	X	X	X	X	X
ไดคลอโรมีเทน	X	X	X	X	O
เอทิลอะซิเตต	X	X	X	X	O
เอทานอล	O	X	O	X	O

หมายเหตุ: O = ตรวจพบ, X = ตรวจไม่พบ

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากข่าพร้อมประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากข่า โดยข่าที่ใช้ในการทดลองนี้มีแหล่งปลูกที่จังหวัดสมุทรปราการ อายุประมาณ 8 เดือน ส่วนที่ใช้ในการทดสอบ คือ เหง้าและลำต้นเทียม ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ใช้เหง้าข่าสดในการสกัด ให้ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.14 ในขณะที่การสกัดหยาบได้ใช้เหง้าข่าและลำต้นเทียมที่ผ่านการอบแห้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล โดยการสกัดแบบเรียงลำดับตามคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์จากน้อยไปมาก ให้ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.73-6.24 โดยได้ร้อยละผลผลิตจากส่วนเหง้าข่ามากกว่าส่วนของลำต้นเทียม เมื่อนำสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากข่าไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย modified Ellman's method โดยใช้ donepezil HCl เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดลำต้นเทียมข่าที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารมาตรฐาน donepezil HCl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Chaiyana และ Okonogi, 2012) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากข่าความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 83.9 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากข่าในการทดลองนี้ สาเหตุของความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งปลูกข่า อายุการเก็บข่า วิธีการสกัด ระยะเวลาการสกัด แต่อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากทั้งงานวิจัยก่อนหน้าและงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยข่าในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีเช่นเดียวกัน

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ มาประเมินกลุ่มสารพฤกษเคมี พบคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในสารสกัดเหง้าข่าที่สกัดด้วยเอทานอล และพบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดจากลำต้นเทียมที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตต ซึ่งเป็นสารสกัดส่วนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดี ทำให้สารสกัดจากลำต้นเทียมที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตตมีความน่าสนใจในการนำไปวิจัยต่อยอดต่อไป

จากการวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากข่า สารสกัดจากลำต้นเทียมที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดี มีความน่าสนใจในการทำวิจัยเพื่อประเมินฤทธิ์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาและป้องกันอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างอะไมลอยเบต้าโปรตีน ซึ่งสามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการรักษาและป้องกันอัลไซเมอร์ได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

ชลธิดา เทพหินลัพ. (2555). *เทคนิคการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน*. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

สธ.เผยไทยมีผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ 6 แสนคน เร่งคัดกรองและจัดระบบดูแล. (21 กันยายน 2559). *ข่าวเพื่อสื่อมวลชน สำนักสารนิเทศ กระทรวงสาธารณสุข*. สืบค้นจาก http://pr.moph.go.th/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=86580.

สมพร ภูติยานันต์. (2551). สมุนไพรใกล้ตัวเล่มที่ 13 ว่าด้วยสมุนไพรแต่งสี กลิ่น รส. พิมพ์ครั้งที่ 3 เชียงใหม่: เอราวัณการพิมพ์.

Alzheimer’s Association. (2017). 2017 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s & Dementia*, *13*(4), 325-373.

Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, *76*, 27-50.

Anand, P., & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease. *Archives of Pharmacal Research*, *36*(4), 375-399.

Ansari, N., & Khodagholi, F. (2013). Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer’s disease: molecular mechanism aspect. *Current Neuropharmacology*, *11*(4), 414-429.

Abdullah, F., Subramanian, P., Ibrahim, H., Abdul Malek, S. N., Lee, G. S., & Hong, S. L. (2015). Chemical composition, antifeedant, repellent, and toxicity activities of the rhizomes of galangal, *Alpinia galanga* against Asian subterranean termites, *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Insect Science*, *15*(1), 1-7.

Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2016). Alzheimer’s disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with *in silico* approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the Neurological Sciences*, *361*, 256-271.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Balkis, A., Tran, K., Lee, Y. Z., Balkis, K. N., & Ng, K. (2015). Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor. *Journal of Agricultural Science*, *7*(9), 26-35.

Bhornchai, H., Bhalang, S., Ratchada T. & Kamol, L. (2015) Profile of phenolic compounds and antioxidant capacity in waxy corn at different maturation stages. *Khon Kaen Agriculture Journal*, *43*, 311-316.

Chaiyana, W., & Okonogi, S. (2012). Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, *19*(8), 836-839.

Chitra, M., & Thoppil, J. E. (2008). A pharmacognostical report on the rhizome of *Alpinia galanga* Linn. (Willd). *Ancient Science of Life*, *27*(4), 9-21.

Dingova, D., Leroy, J., Check, A., Garaj, V., Krejci, E., & Hrabovska, A. (2014). Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Analytical Biochemistry*, *462*, 67-75.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*(2), 88-95.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *66*(2), 137-147.

Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, *148*(6), 1204-1222.

Kaushik, D., Yadav, J., Kaushik, P., Sacher, D., & Rani, R. (2011). Current pharmacological and phytochemical studies of the plant *Alpinia galanga*. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, *9*(10), 1061-1065.

Korabecnya, J., Zemeka, F., Soukupb, O., & Spilovskaa, K. (2014). Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: Current state and future perspectives. In Atta-ur-Rahman, & M. I. Choudhary (Eds.), *Drug design and discovery in Alzheimer's disease* (pp. 3-39). Amsterdam: Elsevier.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Khan, M. T. H., Orhan, I., Şenol, F. S., Kartal, M., Şener, B., Dvorská, M., . . . & Šlapetová, T. (2009). Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, *181*(3), 383-389.

Kurz, A., & Perneczky, R. (2011). Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(2), 373-379.

Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2014). Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, *6*(10), 3203-3210.

Mahae, N., & Chaiseri, S. (2009). Antioxidant activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galanga* (L.) Sw. *Kasetsart Journal: Natural Science*, *43*, 358-369.

Mertens, M. D., Bierwisch, A., Li, T., Gütschow, M., Thiermann, H., Wille, T., & Elsinghorst, P. W. (2016). A novel fluorogenic probe for the investigation of free thiols: Application to kinetic measurements of acetylcholinesterase activity. *Toxicology Letters*, *244*, 161-166.

Muangnoi, P., Lu, M., Lee, J., Thepouyporn, A., Mirzayans, R., Le, X. C., . . . & Changbumrung, S. (2007). Cytotoxicity, apoptosis and DNA damage induced by *Alpinia galanga* rhizome extract. *Planta Medica*, *73*(8), 748-754.

Obregon, A. D. C., Schetinger, M. R. C., Correa, M. M., Morsch, V. M., Silva, J. E. P. d., Martins, M. A. P., . . . Zanatta, N. (2005). Effects *per se* of organic solvents in the cerebral acetylcholinesterase of rats. *Neurochemical Research*, *30*(3), 379-384.

Singh, J. H., Alagarsamy, V., Diwan, P. V., Kumar, S. S., Nisha, J. C., & Reddy, Y. N. (2011). Neuroprotective effect of *Alpinia galanga* (L.) fractions on Aβ (25–35) induced amnesia in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *138*(1), 85-91.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Szwajgier, D. (2014). Anticholinesterase activities of selected polyphenols – a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *64*(1), 59-64.

Torkelson, T. R., Oyen, F., & Rowe, V. K. (1976). The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals. *The American Industrial Hygiene Association Journal*, *37*(12), 697-705.

Wu, Y., Wang, Y., Li, Z., Wang, C., Wei, J., Li, X., . . . & Deng, Z. (2014). Composition of the essential oil from *Alpinia galanga* rhizomes and its bioactivity on *Lasioderma serricorne*. *Bulletin of Insectology*, *67*(2), 247-254.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D., & Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, *19*(1), 767-782.

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ภญ.สุธีรา ญาณะโส
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	ภ.ม. (เภสัชเคมีและเภสัชพฤษเคมี หลักสูตรนานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ดร.ภก.นพวัฒน์ เพ็งคำศรี
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
	วท.ด. (เภสัชศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ผศ.ดร.ภญ.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยมหิดล
	ปร.ด. (เภสัชเคมีและเภสัชพฤษเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	ภก.ภูริต ธนะรังสฤษฏ์
ประวัติการศึกษา	ภ.บ. (บริบาลเภสัชกรรม) มหาวิทยาลัยนเรศวร
	วท.ม. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ) มหาวิทยาลัยนเรศวร
สถานที่ติดต่อ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1215 หรือ 1494