ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ

Antioxidant activity and amyloid-beta aggregate formation inhibitory of Thai longevity tonic remedy

รัชฎากร ดาบสมเด็จ[1] นันทพงศ์ ขำทอง[2] และ วาลุกา พลายงาม[2*]

Ratchadakorn Dabsomdej[1], Nanthaphong Khamthong[2], and Waluga Plaingam[2*]

[1]นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

[2]อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

[1]Graduate student in Master of Science in Oriental Medicine Program, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

[2]Lecturer in Master of Science in Oriental Medicine Program, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

[*]Corresponding author, E-mail: waluga.p@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด คือ ข่อย ตะโกนา ทิ้งถ่อน บอระเพ็ด พริกไทย และแห้วหมู เป็นตำรับยาที่ถูกบรรจุไว้ในตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ มีสรรพคุณช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย แต่ยังขาดข้อมูลการวิจัยการกลไกออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาโดยมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาและสมุนไพรเดี่ยว 6 ชนิด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยา และหัวแห้วหมู โดยมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 mg GAE/g extract ตามลำดับ และจากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric assay เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยา และเปลือกทิ้งถ่อน โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 185.44, 154.94 และ 138.90 mg QE/g extract ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า หัวแห้วหมู เปลือกทิ้งถ่อน 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 และโดยวิธี 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%

คำสำคัญ: ตำรับยาอายุวัฒนะ โปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

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 remedy is included in the Thai National Traditional Medicine Repertory and is claimed to possess anti-aging properties. However, the 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 Colorimetric assay and the Aluminum Chloride Colorimetric assay, respectively. The results revealed that the three highest total phenolic contents were found in *P. nigrum*, the remedy extract, and *C. rotundus* with 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 extract) respectively. After that, we tested for the antioxidant activity using DPPH and ABTS methods. The IC_{50} 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 were 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 was tested for the inhibition of Aβ aggregation and exhibited 67.15% inhibition of Aβ42.

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

1. บทนำ

ภาวะสมองเสื่อม เป็นภาวะที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ซึ่งเกิดจากความเสื่อมหรือความผิดปกติของสมอง สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (vascular dementia) โรคพาร์กินสัน (Pakinson’s disease) และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) โดยพบว่าร้อยละ 60-70 มีสาเหตุมาจากโรคอัลไซเมอร์นับว่าเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุด องค์การอนามัยโลกคาดว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยกว่า 50 ล้านคน (World Health Organization, 2017) สำหรับประเทศไทย ในปี 2558 มีผู้ป่วยโรคอัลไซ-เมอร์ประมาณ 600,000 คน และคาดว่าในปี 2573 จำนวนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1,117,000 คน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต และโรคอัลไซเมอร์นั้นเป็นโรคที่มักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี (ศุภวุฒิ สายเชื้อ, 2562) สำหรับโรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่เกิดจากกความเสื่อมและการตายของเซลล์สมอง ทำให้การทำงานของสมองเสื่อมลง ซึ่งอาการสำคัญของผู้ป่วยโรคนี้จะค่อย ๆ สูญเสียความทรงจำและการเรียนรู้ ไม่สามารถทำงานหรือกิจวัตรประจำวันตามปกติได้ เมื่อเวลาผ่านไปอาการจะถดถอยไปเรื่อย ๆ เนื่องจากเซลล์สมองเสื่อมเพิ่มมากขึ้น มีการศึกษาพบว่า มีสารชนิดหนึ่งชื่อว่าเบต้าอะไมลอยด์ (amyloid beta, Aβ) โดยสารนี้เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สะสมในสมอง เมื่อมีเพิ่มมากขึ้นจะเกิดการเกาะตัวรวมกันเป็นอะไมลอยด์พลัค (amyloid plaques) (ก้องเกียรติ กูณฑ์กันทรากร, 2557) การรวมตัวกันที่ผิดปกติของ Aβ หรือการไม่สามารถกำจัด Aβ ออกไปได้อย่างเพียงพอ เป็นเหตุให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ตามมา เช่น การตอบสนองต่อการอักเสบเริ่มต้น (pro-inflammatory response) ความผิดปกติในการทำงานของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial dysfunction) อันตรายจากสารอนุมูลอิสระ (oxidative stress) จนนำไปสู่ภาวะเซลล์ตาย (apoptosis) เป็นต้น (Daniel, 2010)

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ มีเพียงแต่ชะลออาการของโรคไม่ให้รุนแรงมากขึ้น และรักษาตามอาการเพื่อให้สมองทำงานได้นานที่สุด การรักษาอัลไซเมอร์นั้นมีทั้งการรักษาแบบที่ไม่ใช้ยา (non-pharmacological) เช่น ฝึกกระตุ้นประสาทสัมผัสด้วยการบีบ จับ นวด การจดสมุดบันทึกชีวิตประจำวัน เป็นต้น (สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์, 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 (ศิรินทร์ ฉันศิริกาญจน, 2560) ทำให้ปัจจุบันพยายามที่จะศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมุนไพรในการรักษาโรคนี้ เนื่องจากสมุนไพรไม่มีผลข้างเคียงหรือมีน้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาว่า ผลของสารสกัดที่ได้จากตำรับยาอายุวัฒนะต่อการต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่จะทำลายสารอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของความเสื่อมของเซลล์ประสาท

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะ

2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะ

2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะ

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ hot air oven (Memmert, Germany), water bath (BEC THAI, WNB45), 96-well plate (Nunc, Denmark), analytical balance (4 ตำแหน่ง Sartorius, Germany), beaker, Erlenmeyer flask, round bottom flask, cylinder (Schott Duran, Germany), rotary evaporator (Buchi, Switzerland), micropipette (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 reagent (Merck, Germany), α-tocopherol, butylated hydroxytoluene (BHT), gallic acid, quercetin (Sigma, USA), aluminum chloride, sodium acetate, sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสมุนไพรและการสกัดแยกสาร

นำสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด คือ ข่อย ตะโกนา ทิ้งถ่อน บอระเพ็ด พริกไทย และแห้วหมู มาล้างทำความสะอาดแล้วสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปอบให้แห้งอุณหภูมิ 50-60 °C และนำมาบดหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้าได้ผงสมุนไพรบดหยาบ สกัดสารด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยนำผงบดหยาบสมุนไพรใส่ไว้ในขวดรูปชมพู่หรือโถแล้วเติม 95% เอทานอล อัตราส่วนตำรับยาอายุวัฒนะ 1000 g ต่อตัวทำละลาย 3 L และสมุนไพรเดี่ยว 6 ชนิด ชนิดละ 250 g ต่อตัวทำละลาย 850 mL ทำการเขย่าเป็นเวลาทุกวันและเก็บสารสกัดทุก 3 วันเป็นเวลา 3 ครั้ง จากนั้นนำมากรองแล้วบีบเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ไปทำการกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกให้หมดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดแล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)

การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ด้วย DPPH โดยเตรียมอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 2 mM ด้วยตัวทำละลายเอทานอลแล้วทำการเจือจางอนุมูลอิสระ DPPH ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7±0.03 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) และ α-tocopherol ที่ความเข้มข้น 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 ซึ่งละลายในเอทานอล แล้วนำมาบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่ายับยั้งการต้านอนุมูลอิสระและสร้างกราฟระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของตัวอย่าง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) โดยการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical มีดังนี้

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

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

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

3.2.3 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) หรือ ABTS assay

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 นาโนเมตร การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ มีดังนี้

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

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) นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ trolox equivalent จากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน trolox ดังนี้

Trolox equivalent (mg/mg) = [(Sample decolorization (%)-b)/a]/ Sample concentration (mg/mL)

ผลที่ได้จากการคำนวณแสดงเป็นค่าของ trolox ในหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่าต่อมิลลิกรัมของสารสกัด (mg trolox/mg extract) จากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric assay

การศึกษาครั้งนี้ใช้ quercetin เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-50 µg/mL และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 mg/mL ดูดสารตัวอย่างจำนวน 200 µL เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ จำนวน 40 µL ตามด้วย 95% เอทานอล จำนวน 600 µL และสารละลาย 1M sodium acetate จำนวน 40 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟลาโว-นอยด์รวม (TFC) เทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ quercetin ต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mg of quercetin qquivalent (QE)/g of extract)

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocateu assay

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 70-110 µg/mL เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 mg/mL ดูดสารตัวอย่างจำนวน 100 µL เติมสารละลาย

10% v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 40 µL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 0.7 M sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 800 µL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโน-เมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) เทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mg of gallic acid equivalent (GAE)/g of extract)

3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี Thioflavin T assay

ทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของตำรับยาด้วยสารละลาย DMSO ให้ได้ 100 µg/mL ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ curcumin เป็น positive control และ DMSO เป็น negative control ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี thioflavin T assay โดยใช้ curcumin ในครั้งนี้เลือกใช้การติดตาม aggregation state ของ Aβ42 ทำการเตรียม 25 µM ของ Aβ42 ละลายใน 50 mM ของ phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 9 µL ต่อหลุม หลังจากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรและตำรับยาปริมาตร 1 µL ต่อหลุม นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มเติม 3 µM thioflavin T ที่ละลายอยู่ใน 100 mM glyciline buffer (pH 8.5) 190 µL บ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ excitation 440 และ emission 485 ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (inhibition rate) การเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (inhibition rate)} = [1 - (S-B/C-B)] \times 100$$

โดยที่ S = ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T บ่มด้วย Aβ42 และ ตัวอย่าง

C = ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T บ่มด้วย Aβ42 และ DMSO

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ Th-T solution

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ตำรับยาอายุวัฒนะ 1000 g สมุนไพรเดี่ยวในตำรับ 6 ชนิด คือ หัวแห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทิ้งถ่อนและเปลือกตะโกนา ชนิดละ 250 g ทำการสกัดโดยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล แล้วนำไปกรองและระเหยด้วยตัวทำละลายออกจนแห้ง ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 46.07, 16.40, 20.41, 17.80, 6.91, 24.63 และ 6.64 g ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 4.61, 6.56, 8.16, 7.12, 2.76, 9.85 และ 2.66 ตามลำดับ

4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และหัวแห้วหมู โดยมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 mg GAE/g extract ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1

4.2 ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และเปลือกทิ้งถ่อน โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ เท่ากับ 185.44, 154.94 และ138.90 mg QE/g extract ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสมุนไพร

สมุนไพร	ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	786.67	154.94
หัวแห้วหมู	653.33	121.29
เมล็ดพริกไทย	861.67	185.44
เมล็ดข่อย	142.62	41.73
เถาบอระเพ็ด	309.29	81.98
เปลือกทิ้งถ่อน	261.67	138.90
เปลือกตะโกนา	277.14	37.33

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวแห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทิ้งถ่อนและเปลือกตะโกนาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล สารมาตรฐาน BHT และ α-tocopherol ที่ละลายด้วยเอทานอล พบว่ามีค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50})

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

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าตำรับยาและสมุนไพรในตำรับมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากตำรับอายุวัฒนะและสมุนไพรในตำรับมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยพบว่าสารสกัดของตำรับยาที่สกัดด้วย 50% เอทานอล ทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0323±0.0008, 0.0159±0.0004 และ 10.013±0.810 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าการสกัดด้วย 50% เอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดที่สกัดด้วย 95% เอทานอล (Ampa & Ladachart, 2022)

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ หัวแห้วหมู เมล็ดพริกไทย เมล็ดข่อย เถาบอระเพ็ด เปลือกทิ้งถ่อนและเปลือกตะโกนา ที่สกัดด้วย 95% เอทานอล พบว่ามีค่า %Inhibition at a concentration of 1.0 mg/mL ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 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
เปลือกทิ้งถ่อน	50.9±0.8	0.135±0.002
หัวแห้วหมู	48.0±0.3	0.127±0.001
เปลือกตะโกนา	29.1±0.8	0.077±0.002
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 โดยกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระคือการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ABTS ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2S_2O_8$ ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้มีความใกล้เคียงกับอนุมูลอิสระในร่างกายเนื่องจากมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา การทดลองนี้จึงเป็นตัวแทนในการจำลองการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของตำรับยาอายุวัฒนะ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากตำรับอายุวัฒนะและสมุนไพรในตำรับมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารสกัดจากเปลือกทิ้งถ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดของตำรับอายุวัฒนะ แห้วหมู พริกไทย เปลือกตะโกนา บอระเพ็ด และเมล็ดข่อย เนื่องจากตำรับยาอายุวัฒนะและสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก โดยสารกลุ่มนี้จะพบมากในพืช ผัก และผลไม้ และจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเพื่อสร้างความเสถียรแก่โครงสร้างได้ (สิริเพ็ญ เลื่อนเชย และสิริรัตน์ เตียงกูล, 2551) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการช่วยต้านอนุมูลอิสระลดการทำลายเซลล์ประสาทจากสารอนุมูลอิสระที่ก่อการอักเสบในร่างกายส่งผลต่อระบบสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะสมองเสื่อม

4.5 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์

จากการวิจัยพบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ของตำรับยามีฤทธิ์ในการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ 42 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.15% ซึ่งมากกว่า 60% แต่ไม่ถึง 80% จากผลการทดสอบจึงอาจกล่าวได้ว่ามีฤทธิ์ที่ดี จากงานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาสมุนไพรสารสกัดพรมมิสามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากโปรตีนเบต้า-อะไมลอยด์และให้ผลใกล้เคียงกับยาอะริเซพและสมุนไพรแป๊ะก๊วย โดยการนำสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโปรตีนเบต้าอะไม-ลอยด์มีความจำที่ลดลง ($p<0.05$) และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรแล้วปรากฏว่าสัตว์ทดลองมีการเพิ่มการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงปกติ (อรระวี คงสมบัติ, สุทิสา ถาน้อย และ เสมอ ถาน้อย, 2554) นอกจากนี้ (Chantha et al., 2020) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของตำรับกลีบบัวแดงที่ประกอบด้วยสมุนไพร กลีบบัวหลวงสีแดง พริกไทยดำ และบัวบก การทดสอบยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ด้วยวิธี thioflavin T assay พบว่าตำรับกลีบบัวแดงสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของ

โปรตีนเบต้าอะไมลอย ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากพิษของเบต้าอะไมลอยด์ 42 และมีผลการปกป้องเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่เป็นกระบวนการที่สำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของภาวะสมองเสื่อม

5. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะ พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และหัวแห้วหมู โดยมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 861.67, 786.67 และ 653.33 mg GAE/g extract ตามลำดับ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 3 อันดับแรก คือ เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ และเปลือกทิ้งถ่อน โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 185.44, 154.94 และ 138.90 mg QE/g extract ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด คือ หัวแห้วหมู รองลงมาเปลือกทิ้งถ่อน เถาบอระเพ็ด เมล็ดพริกไทย ตำรับยาอายุวัฒนะ เปลือกตะโกนา และเมล็ดข่อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1867±0.0087, 0.5502±0.0124, 0.6262±0.0276, 0.8548±0.1934, 0.86±0.0567, 1.7865±0.0007 และ 5.5956±1.2342 mg/mL ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด คือ เปลือกทิ้งถ่อน รองลงมาตำรับยาอายุวัฒนะ หัวแห้วหมู เปลือกตะโกนา เมล็ดพริกไทย เถาบอระเพ็ด 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 µg/mL มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ 42 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 67.15% ซึ่งมากกว่า 60% และยังไม่พบงานวิจัยก่อนหน้าที่วิจัยตำรับยาอายุวัฒนะที่ผู้วิจัยทำจึงถือเป็นการรายงานฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะเป็นครั้งแรก และจากผลวิจัยสรุปได้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปลดการเกิดเสื่อมของเซลล์สมองในโรคอัลไซเมอร์ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุของภาวะสมองเสื่อม โดยผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ ข้อเสนอแนะคือ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ของตำรับยาอายุวัฒนะอาจนำไปศึกษาต่อด้วยวิธีการอื่น ๆ ของกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ เพื่อพัฒนาไปเป็นตำรับยาที่จะสามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะสมองเสื่อมในอนาคตได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากอาจารย์ผู้สอนวิชาการแพทย์แผนไทย กลุ่มวิชาด้านคลินิก หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก และงบประมาณสนับสนุนจากวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการของวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้ หน่วยงานที่ให้ทุนวิจัย ผู้ที่เกี่ยวข้อง หรือผู้ที่ให้ความช่วยเหลือทุกท่าน

7. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. (2562). *รายการตำรับยาแผนไทยแห่งชาติ ฉบับเฉลิมพระเกียรติ*. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.

ก้องเกียรติ กูณฑ์กันทรากร. (2557). แนวทางใหม่ในการประเมินและวินิจฉัยภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์. *ธรรมศาสตร์เวชสาร, 14*(1), 93-101.

ศิรินทร์ ฉันศิริกาญจน. (2560). *ความรู้เรื่อง สมองเสื่อม สำหรับประชาชน*. กรุงเทพฯ: โรงพยาบาลรามาธิบดี.

ศุภวุฒิ สายเชื้อ. (2562). *โรคอัลไซเมอร์*. เข้าถึงเมื่อ 20 สิงหาคม 2563 จาก https://www.prachachat.net/

สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์, (2557). *แนวทางเวชปฏิบัติ ภาวะสมองเสื่อม Clinical practice guidelines: Demetia*. นนทบุรี: สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์.

สิริเพ็ญ เลื่อนเชย, และสิริรัตน์ เตียงกูล. (2551). *การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะของไทย*. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล.

อรระวี คงสมบัติ, สุทิสา ถาน้อย, และเสมอ ถาน้อย. (2554). *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการบกพร่องความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

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.

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*, *13*(5), 79.

Daneil, P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine, 77*(1), 32-42.

Thompson, R., Heath, H. (2013). *Dementia: commitment to the care of people with dementia in hospital settings*. London: Royal College of Nursing.

World Health Oeganization. (2017). *Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025*. Switzerland: World Health Organization.