



องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสมุนไพรไทย

Chemical Constituents and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thai Medicinal Herbs

คงเดช สวาสดีพันธ์¹ สิริวัฒน์ บุญชัยศรี² ตามรัศมน สุรางกูร³ อัญชนา ปรีชาวรพันธ์⁴
และ ภรภัทร ลำอ่างค์^{4*}

¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

³ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

⁴สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000

Kongdech Savaspun¹, Siriwat Boonchaisri², Damratsamon Surangkul³,
Anchana Preechaworapun⁴ and Pornpat Sam-ang^{4*}

¹Division of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Phayao, 56000

²Division of Biology, School of Science, University of Phayao, Phayao, 56000

³Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

⁴Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000

*Corresponding author: pornpat.s@psru.ac.th

Received: 10 August 2023/ Revised: 3 October 2023/ Accepted: 10 October 2023

บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์ จัดเป็นโรคความเสื่อมของระบบประสาท ในปัจจุบันแนวทางการรักษาของโรคอัลไซเมอร์คือ การเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนในสมองโดยใช้ยาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมุนไพรไทยทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ ใบเหลียง ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบบัวบก ใบมะรุม ใบมะกอก ใบมันปู และใบหมุย ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี/แมสสเปกโตรเมทรี เนื่องจากมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์นี้ค่อนข้างน้อย พบว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุดด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 181 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ผลการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมของสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์เปรียบเทียบกับสารสกัดใบมันปูและสารสกัดใบเหลียงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลางและน้อย พบสารประกอบฟลาโวนอยด์ (isorhamnetin-3-O-

glucoside, 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulphate และ apigenin 7-sulfate), สารประกอบฟีนอลิก (4-O-methylgallic acid) และสารประกอบ phosphatidylcholine ที่คาดว่าเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จากผลวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์สามารถนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมทางการแพทย์ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ต่อไปได้

คำสำคัญ: สมุนไพรไทย มะม่วงหิมพานต์ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี/แมสสเปกโตรเมทรี

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is classified as a neurodegenerative disease. Currently, the treatment for AD involves increasing acetylcholine (ACh), which is a neurotransmitter, through the use of drugs known as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. The objective of this research is to investigate the anti-acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of ethanolic extracts of seven Thai medicinal herbs: *Gnetum gnemon*, *Anacardium occidentale*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera*, *Spondias pinnata*, *Glochidion littorale* and *Micromelum minutum*, as there are a few reports on this study and to determine the main chemical components of the bioactive crude ethanolic extracts using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). The result showed that the crude extract from leaves of *Anacardium occidentale* displayed the highest anti-AChE activity, with an IC_{50} value of 181 $\mu\text{g/ml}$. The LC-MS/MS analysis showed the chemical constituents of *Anacardium occidentale* leaves extract compared to those of *Glochidion littorale* and *Gnetum gnemon* leaves extracts which showed medium and low anti-AChE activities, respectively. From the result, it was found that the bioactive components from *Anacardium occidentale* leaves contains flavonoid compounds (isorhamnetin-3-O-glucoside, 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulfate, and apigenin 7-sulfate), phenolic compound (4-O-methylgallic acid) and phosphatidylcholine which are expected to inhibit AChE. This research suggested that the ethanolic extract of *Anacardium occidentale* leaves has the potential to be further developed as a medicinal supplement for the prevention of Alzheimer's disease.

Keywords: Thai medicinal herbs, *Anacardium occidentale*, Acetylcholinesterase inhibition activity, Liquid chromatography- mass spectrometry/ mass spectrometry

บทนำ

โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disorders) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากเซลล์ประสาทในสมองถูกทำลาย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของสมองลดลง เป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดแต่สามารถชะลอความรุนแรงของอาการเอาไว้ได้ โรคอัลไซเมอร์จัดเป็นโรคในกลุ่มอาการสมองเสื่อม [1] การลดลงของอะซิติลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความจำเป็นหนึ่งในสมมุติฐานหลักที่สำคัญของสาเหตุการเกิดโรค การลดลงของสารสื่อประสาทชนิดอะซิติลโคลีนเป็นผลโดยตรงจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายอะซิติลโคลีน ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase: AChE) และเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase: BChE) พบว่าในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีปริมาณ



อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสในสัดส่วนที่สูงกว่าบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส [2] ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์ เป็นยาในกลุ่ม acetylcholinesterase/ cholinesterase inhibitors (ChE-Is) ได้แก่ donepezil (Aricept®), rivastigmine (Exelon®) และ galantamine (Razadyne®) [3] ถึงแม้ว่ายาดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการลดอาการหลงลืมของผู้ป่วยรวมถึงช่วยลดความผิดปกติทางด้านอารมณ์ของผู้ป่วย แต่จะมีประสิทธิภาพเฉพาะผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในระยะเริ่มต้นเท่านั้นไม่มีผลต่อการรักษาในระยะที่โรคมีความรุนแรง อีกทั้งยังมีอาการข้างเคียงเล็กน้อย เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วง [4] ดังนั้นการศึกษาหาสารที่มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีกว่าและไม่มีผลข้างเคียงยังเป็นสิ่งที่จำเป็นอยู่ในปัจจุบัน

สมุนไพรไทยหลายชนิดมีสรรพคุณและประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น ใบมะกอก อุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุ มีสรรพคุณแก้ร้อนใน แก้อาเจียน แก่ท้องอืด บำบัดโรคพาร์กินสัน [5, 6] ใบมะขาม มีประโยชน์ทำให้อ่อนเพลีย ช่วยห้ามเลือด ขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ [7 - 9] ยอดอ่อน ใบมะม่วงหิมพานต์ มีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความแก่ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ [10] ยอดมันปูอ่อน มีเบต้าแคโรทีนและวิตามิน A ในปริมาณที่สูง ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [11] ใบหมุย ออกฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดคอเลสเตอรอล [12] ใบเหลียง ประกอบด้วย โปรตีน ธาตุเหล็ก และวิตามินอี นอกจากนี้ยังมีเบต้าแคโรทีน ช่วยบำรุงสายตา ป้องกันโรคหัวใจ ช่วยป้องกันโรคภูมิแพ้ [13] ใบบัวบกช่วยแก้ร้อนใน ลดความดันโลหิต [14]

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าสมุนไพรไทยแต่ละชนิดนั้นมีองค์ประกอบและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ ใบเหลียง ใบบัวบก ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบมะขาม ใบมะกอก ใบมันปู และใบหมุย และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงที่สุด ปานกลาง และน้อยที่สุด โดยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี/แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS) เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อีกทั้งการศึกษานี้ยังเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชสมุนไพรกลุ่มนี้จากทางหนึ่งด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพร ได้แก่ ใบเหลียง ใบบัวบก ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบมะขาม ใบมะกอก ใบมันปู และใบหมุย (ซื้อจากตลาดได้อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก) ซึ่งเป็นเขตพื้นที่บริการของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 ดำเนินการตรวจสอบและระบุเอกลักษณ์ของพืช โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชนนพคุณ เลข Voucher Specimen PSRU 1143 (ใบเหลียง), PSRU 1144 (ใบมะม่วงหิมพานต์), PSRU 1145 (ใบมะขาม), PSRU 1146 (ใบมะกอก), PSRU 1147 (ใบมันปู) และ PSRU 1148 (ใบหมุย) เก็บรักษาไว้ ณ ห้องเก็บรวบรวมพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

2. การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรและสารสกัด

นำตัวอย่างสมุนไพร ได้แก่ ใบเหลียง ใบบัวบก ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบมะขาม ใบมะกอก ใบมันปู และใบหมุย มาล้างให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการบดหยาบ ชั่งใส่ในภาชนะที่ปิดสนิทชนิดละ 100 กรัม แล้วเติมเอทานอลปริมาณ 500 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นครั้งคราว จากนั้นกรองสารละลายออกด้วยกรวยกรองที่บรรจุสำลี และนำกากเดิมมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลใหม่อีกจนกระทั่งได้สารสกัดใสไม่มีสี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลาย

ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดเอทานอล (ethanol extract) ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ศึกษาฤทธิ์ใน 96-well plate ด้วยเทคนิค Modified Ellman assay โดยเติมสารละลาย 20 mM tacrine (ยาที่ใช้ในปัจจุบัน, positive control) ที่ความเข้มข้น (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 5 µg/ml) หรือ สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น (5, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml) 25 µl ร่วมกับ 0.3 unit อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส 25 µl บ่มโดยเครื่อง incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 1 mM acetylthiocholine iodide 25 µl และ 3 mM DTNB 125 µl แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 412 nm เพื่อคำนวณร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) [15] ทำการทดลอง 3 ซ้ำของสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ออกฤทธิ์โดยเทคนิค LC-MS/MS

นำสารสกัดเอทานอลที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสสูงสุด ออกฤทธิ์ปานกลาง และออกฤทธิ์ต่ำที่สุด แยกด้วยลิควิดโครมาโทกราฟีโดยดัดแปลงจากวิธีของ Boonchaisri et al. [16] การวิเคราะห์เริ่มจากฉีดสารสกัดปริมาตร 10 µl ให้ไหลผ่านคอลัมน์ Luna C18 100 A°, ขนาด 4.6×150 mm, อนุภาคขนาด 5 µm ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ (สารละลาย A) และ 0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตนไตริล (สารละลาย B) ปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์ของสารละลาย B 5-95% เวลาเซตตัวอย่าง 30 นาที ทำการสแกนมวลของสารประกอบตั้งแต่ m/z 100 - 1,000 amu จากนั้นทำให้สารประกอบแตกตัวด้วยพลังงาน (collision energies) 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 40 V หลังจากนั้นวิเคราะห์มวลของสารประกอบด้วยโปรแกรม Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software (version B.06.00, © Agilent Technologies, Inc. 2013)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าข้อมูลทีวิเคราะห์แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least -Significant Different (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ

ผลการวิจัย

ผลการสกัดใบแห้งจากสมุนไพรไทย 7 ชนิด ได้แก่ ใบเหลียง ใบบัวบก ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบมะรุม ใบมะกอก ใบมันปู และใบหมุย ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารสกัดเอทานอลแต่ละชนิดมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดและมีร้อยละผลผลิตของสารสกัดต่อน้ำหนักใบแห้ง ดังตารางที่ 1

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารมาตรฐาน tacrine ที่ความเข้มข้น 0.01-5 µg/ml และสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5-1000 µg/ml พบว่าสารมาตรฐาน tacrine และ สารสกัด 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใบมะกอก สารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ สารสกัดใบมะรุม สารสกัดใบมันปู และสารสกัดใบหมุย มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด ส่วนสารสกัดใบบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 500 µg/ml และ 1000 µg/ml ขณะที่สารสกัดใบเหลียงไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ทุกค่าความเข้มข้นของสารสกัด นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml สารสกัดใบมะกอกและสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์มีค่าร้อยละการ



ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักและร้อยละผลผลิตของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพร 7 ชนิด

ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต
ใบเหลียง	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	100.04	18.70	18.70
ใบบัวบก	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ	100.03	30.23	30.23
ใบมะม่วงหิมพานต์	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง	100.04	24.79	24.79
ใบมะรุม	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	100.06	32.16	32.16
ใบมะกอก	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง	100.03	19.61	19.61
ใบมันปู	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง	100.02	12.51	12.51
ใบหมุย	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	100.02	14.18	14.18

ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเท่ากับ 73.82 และ 73.65 ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน tacrine แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า เมื่อทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดใบมะกอกและสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ มีค่าเท่ากับ 227 และ 181 $\mu g/ml$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tacrine มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.020 $\mu g/ml$ ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารมาตรฐาน tacrine

สารมาตรฐาน	ร้อยละของการยับยั้ง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.)						IC_{50} ($\mu g/ml$)
	0.01 $\mu g/ml$	0.05 $\mu g/ml$	0.1 $\mu g/ml$	0.5 $\mu g/ml$	1 $\mu g/ml$	5 $\mu g/ml$	
tacrine	25.15 $\pm$ 0.91	56.71 $\pm$ 0.68	66.69 $\pm$ 0.24	77.50 $\pm$ 0.13	78.87 $\pm$ 0.13	80.32 $\pm$ 0.14	0.020

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพร 7 ชนิด

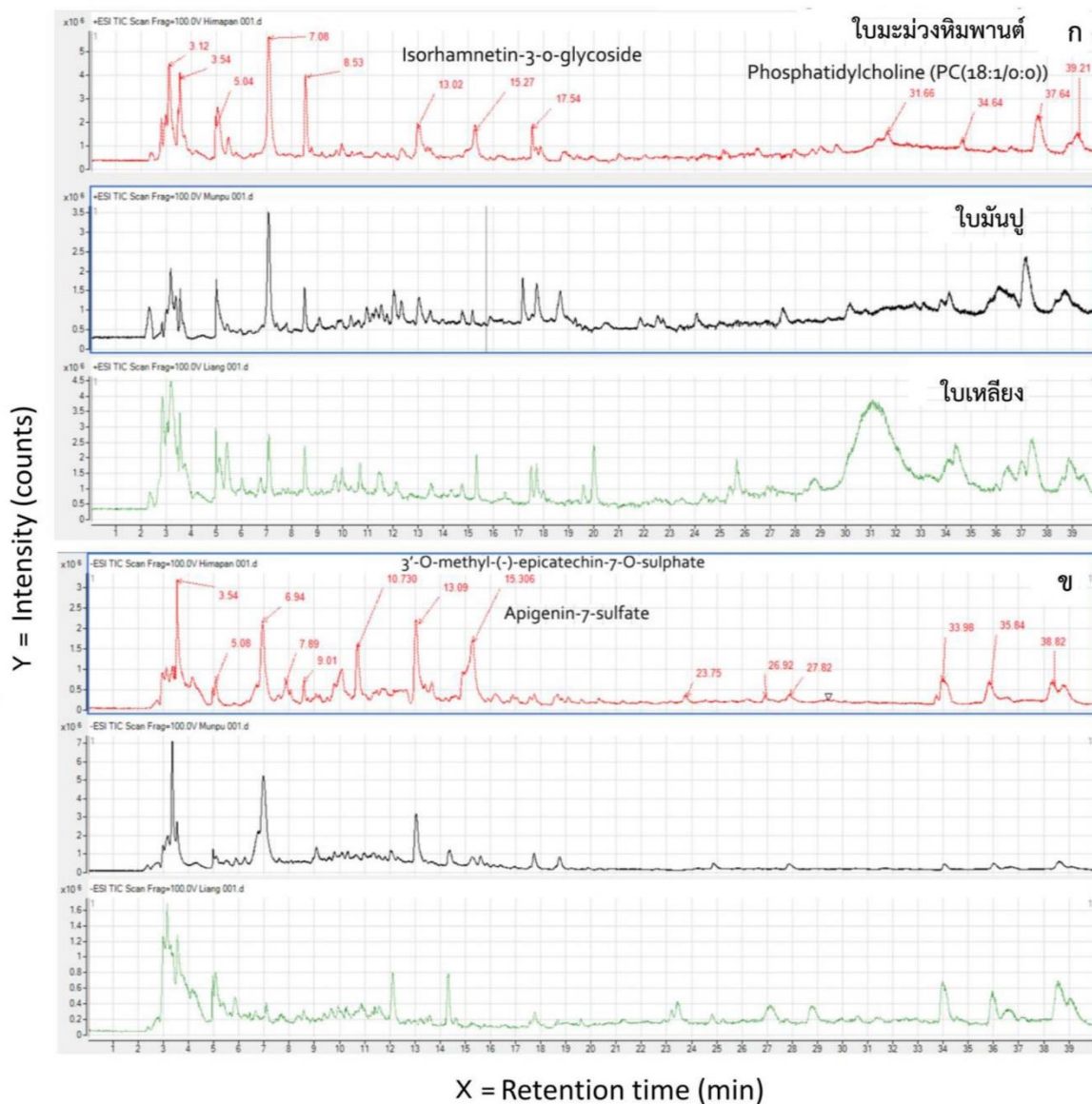
สารสกัด	ร้อยละของการยับยั้ง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.)					IC_{50} ($\mu g/ml$)
	5 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$	100 $\mu g/ml$	500 $\mu g/ml$	1000 $\mu g/ml$	
ใบมันปู	2.71 $\pm$ 6.25 ^b	7.37 $\pm$ 5.60 ^c	6.30 $\pm$ 3.75 ^b	34.85 $\pm$ 8.59 ^d	48.58 $\pm$ 4.78 ^b	ND
ใบบัวบก	ND*	ND*	ND*	2.30 $\pm$ 3.15 ^d	22.65 $\pm$ 13.75 ^c	ND
ใบเหลียง	1.02 $\pm$ 2.37 ^b	1.12 $\pm$ 1.95 ^c	1.49 $\pm$ 2.06 ^b	0.24 $\pm$ 0.42 ^d	1.07 $\pm$ 1.23 ^d	ND
ใบหมุย	0.75 $\pm$ 1.72 ^b	5.13 $\pm$ 6.94 ^c	2.10 $\pm$ 2.67 ^b	13.65 $\pm$ 7.13 ^c	36.23 $\pm$ 1.69 ^c	ND
ใบมะรุม	0.80 $\pm$ 1.85 ^b	2.51 $\pm$ 4.34 ^c	1.24 $\pm$ 1.13 ^b	5.74 $\pm$ 7.37 ^{cd}	25.17 $\pm$ 9.02 ^c	ND
ใบมะกอก	2.38 $\pm$ 1.05 ^{ab}	36.05 $\pm$ 11.40 ^b	46.15 $\pm$ 10.50 ^a	55.57 $\pm$ 9.94 ^a	73.82 $\pm$ 3.31 ^a	227 ^b
ใบมะม่วงหิมพานต์	6.34 $\pm$ 3.29 ^a	52.64 $\pm$ 9.87 ^a	46.14 $\pm$ 10.18 ^a	52.24 $\pm$ 4.21 ^a	73.65 $\pm$ 2.67 ^a	181 ^a

หมายเหตุ: ND (not determine) คือ ไม่สามารถระบุได้เนื่องจากความเข้มข้นที่ทดสอบไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ถึงร้อยละ 50

ND* คือ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

อักษร a-d ในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันแบบค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่น ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในภาพรวมเพื่อหาสารพิษเคมีที่ส่งผลต่อฤทธิ์นี้ โดยนำสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ที่ออกฤทธิ์สูงที่สุด สารสกัดใบมันปูที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง และสารสกัดใบเหลียงมีฤทธิ์ต่ำที่สุด มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (LC-MS/MS) โดยทำการแยกภาวะไอออนบวก (positive mode) และภาวะที่เป็นลบ (negative mode) พบว่าในแต่ละโหมดจะให้โครมาโทแกรมที่แตกต่างกันดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในภาพรวมของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดที่ออกฤทธิ์แตกต่างกัน
ก) โครมาโทแกรมแบบไอออนบวก และ ข) โครมาโทแกรมแบบไอออนลบ

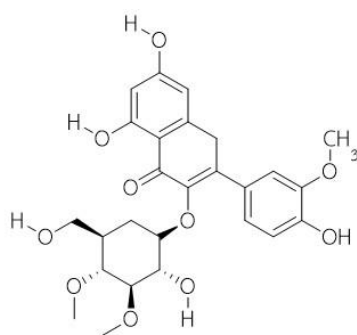
เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์เป็นหลักในการอ้างอิงเนื่องจากสารสกัดสมุนไพรชนิดนี้มีค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุด พบว่าสารพิษเคมีที่ปรากฏเฉพาะโครมาโทแกรมไอออนบวกของสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์แต่ไม่ปรากฏในสารสกัดใบมันปูและสารสกัดใบเหลียงมีจำนวน 2 พิษ



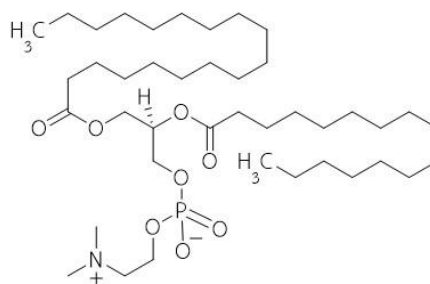
ที่เวลา 15.276 นาที และ 31.664 นาที ในขณะที่โครมาโทแกรมแบบไอออนลบองค์ประกอบทางเคมีที่พบเฉพาะสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ปรากฏทั้งหมด 2 พีค ที่เวลา 10.698 นาที และ 15.306 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ไอออนหลักที่เป็น อัดลักษณะของแต่ละพีคออกเป็นส่วน ๆ (fragmentation) เพื่อหาโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของสารที่คาดว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสด้วยเทคนิค MS/MS พบว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ที่ออกฤทธิ์ประกอบด้วยสาร isorhamnetin-3-O-glucoside, phosphatidyl choline (18:1/0:0), 4-O-methylgallic acid, 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulphate และ apigenin 7-sulfate ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 2

ตารางที่ 4 คุณลักษณะของสารพฤษเคมีเด่นจากสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ในโครมาโทแกรมไอออนบวกและไอออนลบ

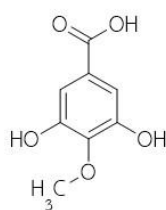
สาร	Retention time (min)	m/z [M+H] ⁺	สูตรโมเลกุล	Identification	กลุ่มสารพฤษเคมีหลัก
1	15.276	351.0699	unidentified	-	-
2	15.276	479.1165	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	isorhamnetin-3-O- glucoside	Flavoniod
3	31.664	522.3532	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	phosphatidylcholine (18:1/0:0)	Phospholipid
4	10.730	183.0187	C ₈ H ₈ O ₅	4-O-methylgallic acid	Phenolic acid
5	10.730	367.0459	C ₁₆ H ₁₆ O ₈ S	3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulphate	Flavoniod
6	15.306	349.0365	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	apigenin 7-sulfate	Flavoniod



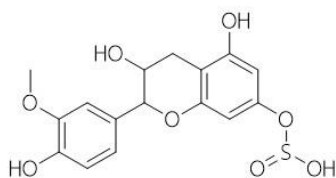
isorhamnetin-3-O-glycoside



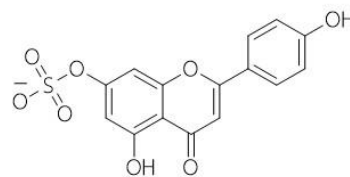
phosphatidylcholine (PC(18:1/0:0))



4-O-methylgallic acid



3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulphate



apigenin 7-sulfate

ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารที่คาดว่าออกฤทธิ์ในสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการสกัดใบแห้งจาก เหลียง บัวบก มะม่วงหิมพานต์ มะรุม มะกอก มันปู และหมุย ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดใบมะรุมให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 32.16 รองลงมา ได้แก่ สารสกัดใบบัวบกร้อยละ 30.23, สารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ร้อยละ 24.79, สารสกัดใบมะกอกร้อยละ 19.61, สารสกัดใบเหลียงร้อยละ 18.70, สารสกัดใบหมุยร้อยละ 14.18 และสารสกัดใบมันปูร้อยละ 12.51 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง พบว่าสมุนไพรมะรุมแต่ละชนิดมีปริมาณสารสกัดที่แตกต่างกันเนื่องจากสมุนไพรมะรุมต่างชนิดกันมีความสามารถในการสร้างสารประกอบทุติยภูมิทั้งชนิดและปริมาณที่ต่างกัน โดยมีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบของมะรุมส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid), คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a), โพลีฟีนอล (polyphenol), และไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) เป็นองค์ประกอบหลัก [17] ใบมันปูที่รายงานมีสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ เมทิลกาเลต (methyl gallate) และ กรดกาเลลิก (gallic acid) เป็นองค์ประกอบ [18] ส่วนใบหมุยมีสารคูมารินเป็นองค์ประกอบหลัก [19] จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรมะรุม 7 ชนิด พบว่าสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 181 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าสารพิษเคมีของสารสกัดใบมะม่วงหิมพานต์ที่คาดว่าส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ตี้นั้น คือ สารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ อันประกอบด้วย isorhamnetin-3-O-glucoside, 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-sulphate และ apigenin 7-sulfate ส่วน 4-O-methylgallic acid เป็นกรดฟีนอลิกซึ่งในเชิงโครงสร้างจัดว่ามีความใกล้ชิดกับกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ โดยโครงสร้างทางเคมีของกรดฟีนอลิกมีวงฟีนอลเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มจัดเป็นสารทุติยภูมิในพืชที่มาจากวิถีชีวสังเคราะห์เดียวกัน (shikimate pathway) [20] สอดคล้องกับความเห็นของ Olenikov et al. [21] ที่สรุปแนวคิดจากงานวิจัยพบว่ากลุ่มสารฟลาโวนอยด์ทุกชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เนื่องจากโครงสร้างหลักของสารประกอบกลุ่มนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสอันเป็นสาเหตุทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ขณะที่สารประกอบ phosphatidylcholine (18:1/0:0) เป็นสารประเภทไขมันเพียงชนิดเดียวที่คาดว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแต่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ เนื่องจาก phosphatidylcholine และ สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนล้วนมีองค์ประกอบหลักคือ choline เช่นเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบทั้งสองชนิดเกิดการแข่งขันในการจับกับแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสส่งผลให้เป็นหนึ่งในสารที่ทำให้ใบมะม่วงหิมพานต์แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ขณะที่สารสกัดจากใบมันปูออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสรองลงมา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 227 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดจากใบเหลียงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสต่ำที่สุด เนื่องจากกลุ่มสารสำคัญที่มีรายงานส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ [22] จากการสืบค้นพบการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดเอทานอลจากใบมะม่วงหิมพานต์ ทำให้มั่นใจได้ว่าสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์มีศักยภาพต่อการพัฒนาเป็นอาหารเสริมทางการแพทย์ที่มีผลต่อการบำบัดป้องกันโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต และเป็นข้อมูลสำหรับการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับสรรพคุณทางยาที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายให้แก่ เกษตรกร ผู้ผลิต รวมถึงผู้บริโภคพืชผัก สมุนไพร และสามารถต่อยอดแนวคิดการนำไปสกัดหรือต่อยอดนวัตกรรมการผลิตสารสกัดสมุนไพรเพื่อใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2565 (RDI-2-65-43), ทุนอุดหนุนจากงบประมาณรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี



คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ ในการทำวิจัยให้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Thummayot S, Tocharus C, Pinkaew D, Viwatpinyo K, Sringarm K, Tocharus J. Neuroprotective effect of purple rice extract and its constituent against amyloid beta-induced neuronal cell death in SK-N-SH cells. *NeuroToxicology* 2014;45:149-58.
2. Savasapun K, Surangkul D, Phanumartwiwath A, Sam-ang P. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of crude and fractionated extracts from tong taek (*Baliospermum Solanifolium*) leaves. *PSRU J Sci Tech* 2020;5(1):107-22.
3. Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2021;190:108352-66.
4. Roseiro LB, Rauter AP, Serralheiro MLM. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr Aging* 2012;1:99-111.
5. Das J, Mannan A, Rahman M, Dinar MAM, Uddin ME, Khan I, et al. Chloroform and ethanol extract of *Spondias Pinnata* and its different pharmacological activity like-antioxidant, cytotoxic, antibacterial potential and phytochemical screening through *in vitro* method. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2011;2(4):1805-12.
6. Jain P, Rufaka Hossain K, Rashid Mishu T, Mahmud Reza H. Antioxidant and antibacterial activities of *Spondias pinnata* Kurz. leaves. *European J Med Plants* 2013;4(2):183-95.
7. Adisakwattana S, Chanathong B. Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15(7):803-8.
8. Jabamalai raj A, Gopalakrishnan VK, Alagar Yadav DS, Dorairaj S. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* (Lam.) root extract. *J Pharm Res* 2011;4(5):1426-7.
9. Oluduro AO. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South-Western Nigeria. *Malays J Microbiol* 2012;8:59-67.
10. Ukwenya V, Ashaolu J, Adeyemi D, Akinola O, Caxton-Martins E. Antihyperglycemic activities of methanolic leaf extract of *Anacardium occidentale* (Linn.) on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Cell Anim Biol* 2012;6:207-12.
11. Panpipat W, Suttirak W, Chaijan M. Free radical scavenging activity and reducing capacity of five Southern Thai indigenous vegetable extracts. *Walailak J Sci & Tech* 2011;7(1):51-60.
12. Zohora F, Hasan C, Ahsan M. Chemical constituents, cytotoxic activities and traditional uses of *Micromelum minutum* (Rutaceae): a review. *Pharm Pharmacol Int J* 2019;7(5):229-36.
13. Yakoh K, Weschasat T, Suwannachote P. Phenolic compound of 10 indigenous vegetables from Surat Thani province. *J Thai Trad Alt Med* 2018;16(2):185-94.



14. Siddiqui BS, Aslam H, Ali ST, Khan S, Begum S. Chemical constituents of *Centella asiatica*. J Asian Nat Prod Res 2007;9(4):407-14.
15. Sam-ang P, Surangkul D, Savasapun K, Phanumartwiwath A. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Morinda citrifolia* L. extracts. Agr Nat Resour 2020;54(2):173-9.
16. Boonchaisri S, Rochfort S, Stevenson T, Dias DA. LC-MS untargeted metabolomics assesses the delayed response of glufosinate treatment of transgenic glufosinate resistant (GR) buffalo grasses (*Stenotaphrum secundatum* L.). Metabolomics 2021;17(3):28-44.
17. Ragasa C, Medecilo M, Shen c-c. Chemical Constituents of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. Der Pharma Chemica 2015;7(7):395-9.
18. Anantachoke N, Kitphati W, Mangmool S, Bunyapraphatsara N. Polyphenolic compounds and antioxidant activities of the leaves of *Glochidion hypoleucum*. Nat Prod Commun 2015;10(3):479-82.
19. Ito C, Otsuka T, Ruangrunsi N, Furukawa H. Chemical constituents of *Micromelum minutum* Isolation and structural elucidation of new coumarins. Chem Pharm Bull 2000;48(3):334-8.
20. Shah A, Smith DL. Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. Agronomy 2020;10(8):1209-34.
21. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Akobirshoeva A, Zilfikarov IN, Vennos C. Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-acetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparation. Int J Mol Sci 2017;18(8):1685-701.
22. Le TH, Van Do TN, Nguyen HX, Dang PH, Nguyen NT, Nguyen MTT. A new phenylheptanoid from the leaves of *Gnetum gnemon* L. Nat Prod Res 2021;35(21):3999-4004.