รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากยอบ้านเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์

Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Crude Extracts from Yo-ban (*Morinda citrifolia* L.) for Alzheimer's Disease Prevention

โดย

1. อาจารย์ ดร.ภรภัทร สำอางค์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดามรัศมน สุรางกูร คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์ ศรีโสภา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

2562

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2561 เรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากยอบ้านเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ทำให้งานวิจัยสำเร็จเป็นไปตามวัตถุประสงค์ในระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี และขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย สนับสนุนการใช้อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อาจารย์ ดร.ภรภัทร สำอางค์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
คำอธิบาย สัญลักษณ์ และอักษรย่อ	ช
1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
1.7 สถานที่ใช้ดำเนินการทดลอง	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**6**
2.1 ยอบ้าน (Yo-ban)	6
2..2 ประโยชน์ของยอบ้าน Morinda citrifolia	7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.)	8
2.4 โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease)	15
2.5 Cholinesterase enzyme (ChE)	17
2.6 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	17
2.6.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)	17
2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	18
2.7 สารประกอบฟีนอลิก	22
3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
	3.1.2 อุปกรณ์	24
	3.1.3 สารเคมี	25
	3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	25
	3.2.1 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรยอบ้าน	25
	3.2.2 การเตรียมตัวอย่างยอบ้านก่อนการสกัด	26
	3.2.3 การสกัดยอบ้านด้วยวิธีการสกัดเย็น (maceration) โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ	26
	3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยอบ้าน ส่วนใบ ลำต้น ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ เชิงคุณภาพ วิเคราะห์เบื้องต้นโดยวิธี TLC (Thin layechromatography) ทำการทดสอบตามวิธีของ Ash, Priest and Collins (1994)	28
	3.4 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮอกกานี ต่อการยับยั้งดีพีพีเอชอนุมูล (DPPH radical scavenging assay) ตามวิธีของ Yen และ Hsieh (1997)	29
	3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน BHT และวิตามินซี	29
	3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ลำต้น และ ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ	30
	3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound content)	31
	3.6 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (Modified Ellman'coloric method)	31
	3.7 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ((Modified Ellman'coloric method)	31
	3.8 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียน manuscript และรูปเล่มรายงานวิจัย	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการทดลอง**	**33**
	4.1 ผลการสกัดยอบ้าน (*Morinda citrifolia*) ด้วยวิธีการหมัก (Maceration)	33
	4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical (DPPH) เชิงคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC	34
	4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay	35
	4.4 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound content)	46
	4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method	50
	4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method	52
5	**สรุป อภิปรายผล และวิจารย์ผลการทดลอง**	**54**
	5.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกันต่อผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบ	54
	5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฟอกจากสี DPPH ด้วยวิธี TLC	54
	5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging	54
	5.4 การทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)	55
	5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman' method	55
6	**ข้อเสนอแนะ**	**57**
เอกสารอ้างอิง		**58**
ภาคผนวก ก		**63**
ภาคผนวก ข		**64**
ภาคผนวก ค		**66**
ประวัติผู้ทำวิจัย		**70**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงชนิดของโรคสมองเสื่อมและลักษณะเฉพาะ	15
4.1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล เอทานอลและน้ำ (40:60) และน้ำ	33
4.2	ร้อยละของสารสกัดหยาบยอบ้านต่อน้ำหนักพืชแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน	34
4.3	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารมาตรฐานวิตามินซีกับ BHT	36
4.4	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ ลำต้น และราก	38
4.5	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) ของสารสกัดเอทานอลและน้ำ (40:60) จากส่วนใบ ลำต้น และราก	41
4.6	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารสกัดน้ำ ส่วนใบ ลำต้น และราก	43
4.7	ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจาก ส่วนใบ ลำต้น และราก ยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน	46
4.8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความยาวคลื่น 765 nm	46
4.9	ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดส่วนใบ ลำต้น ราก ยอบ้านด้วยตัวทำลายต่างกัน	48
4.10	ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของ tacrine และสารสกัดรากของยอบ้าน	49
4.11	ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของ tacrine และสารสกัดรากของยอบ้าน	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ต้นยอ	6
2.2	ใบและผลยอ	6
2.3	โครงสร้างสารประกอบที่แยกได้จากผลของ *Morinda citrifolia*: **(1)** 2,6-di-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl-β-D-glucopyranose; **(2)** rutin; **(3)** asperulosidic acid	8
2.4	โครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากส่วนใบของ *Morinda citrifolia*	9
2.5	โครงสร้างของ citrifolinoside A **(1)**	10
2.6	โครงสร้างของสาร citrifolinin A **(1)**, citrifolinoside **(2)** และสาร citrifolinin A-1 **(3)**	11
2.7	สารกลุ่ม Anthraquinones และ Iridoids จากผลของ *M. Citrifolia*	11
2.8	โครงสร้างของ 6α-hydroxyadoxoside **(1)** 6β,7β -epoxy-8-*epi*-splendoside **(2)** americanin A **(3)** และ narcissoside **(4)**	12
2.9	โครงสร้างของ Citrifoside **(1)** และ 1, 5, 15-Trimethylmorindol **(2)**	13
2.10	โครงสร้างของ Scopoletin	13
2.11	โครงสร้างสารกลุ่ม Antraquinones ชนิดใหม่ (สาร **1** และ **2**)	15
2.13	สารต้านออกซิเดชัน	19
2.14	สารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ	20
2.15	สารต้านออกซิเดชันธรรมชาติและสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์	20
2.16	สูตรโครงสร้างของ DPPH	21
2.17	DPPH assay	21
2.18	กราฟของการทดสอบ DPPH	22
2.19	ตัวอย่างโครงสร้างเคมีพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก	22
3.1	ลักษณะยอบ้าน ส่วนราก ลำต้น และใบก่อนทำการสกัดเย็น	26
3.2	การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยเอทานอลโดยวิธีการสกัดเย็น	27
3.3	การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยเอทานอลต่อน้ำโดยวิธีการสกัดเย็น	27
3.4	การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยน้ำโดยวิธีการสกัดเย็น	28
4.1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ	34
4.2	TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเอทานอล สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH	35
4.3	TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเอทานอลต่อน้ำ สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบน้ำ สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH	35
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของ BHT	36
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของ ascorbic acid	37
4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วยเอทานอล	40
4.8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยเอทานอล	40
4.9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากรากยอบ้านด้วยเอทานอล	40
4.10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วย 40%เอทานอลต่อน้ำ	42
4.11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดลำต้นยอบ้านด้วยเอทานอลต่อน้ำ (40:60)	42
4.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดรากยอบ้านด้วยเอทานอลต่อน้ำ (40:60)	43
4.13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วยน้ำ	44
4.14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยน้ำ	34
4.15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากรากยอบ้านด้วยน้ำ	45
4.16	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)	47
4.17	แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดส่วนใบ ลำต้น ราก ยอบ้านด้วยตัวทำลายต่างกัน	50
4.18	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของ tacrine (positive control) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)	51
4.19	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน 9 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)	51
4.20	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของ tacrine (positive control) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.21	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน 9 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)	53
ข-1	ต้นยอบ้าน	64
ข-2	ลักษณะพืชจากส่วนใบ ลำต้น และรากที่บดอย่างหยาบ	64
ข-3	สารละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ จากส่วนใบ ลำต้น และราก จากยอบ้าน	65
ค-1	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader: รุ่น SPECTRO star Nano บริษัท BMG LABTECH)	66
ค-2	เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer: รุ่น Lambda 25 บริษัท Perkin Elmer)	66
ค-3	เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (Rotary evaporator: รุ่น Rotavapor ® R-300 บริษัท Buchi)	67
ค-4	เครื่องเขย่าสาร (Orbital Shaker / Analog Shaker: รุ่น Unimax 2020 บริษัท Heidolph Instruments)	67
ค-5	เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น New Classic MS บริษัท Mettler-Toledo)	68
ค-6	เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer Mixer Uzusio:รุ่น VTX-3000L บริษัท LMS)	68
ค-7	เครื่องบดพืชตัวอย่าง	69
ค-8	เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette: รุ่น Research plus บริษัท Eppendorf)	69

คำอธิบาย สัญลักษณ์ และอักษรย่อ

g	=	หน่วยกรัม
mg	=	หน่วยมิลลิกรัม
mL	=	หน่วยมิลลิลิตร
µL	=	หน่วยไมโครลิตร
mM	=	หน่วยมิลลิโมลาร์
%	=	เปอร์เซ็นต์
$^{\circ}C$	=	องศาเซลเซียส
λ_{max}	=	ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด
nm	=	นาโนเมตร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disorders) เป็นโรคที่เกิดจากการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้สมองส่วนที่ถูกทำลายทำงานไม่ได้ ปริมาตรของสมองจะค่อย ๆ ฝ่อเล็กลง รักษาไม่หายขาดได้แต่ชะลออาการเอาไว้ โรคในกลุ่มนี้ที่รู้จักกันดี ได้แก่ อัลไซเมอร์และพาร์กินสัน (Thummavot et al., 2014) สำหรับคนที่เป็นอัลไซเมอร์มักจะมีการดำเนินของโรคเร็ว ผู้ป่วยจะมีชีวิตได้ไม่เกิน 5 ปี ผลการศึกษาของสถาบันวิจัยกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีผู้สูงอายุเป็นโรคสมองเสื่อมประมาณ 2.1 ล้านคน ในจำนวนนี้เป็นผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ถึง 1 ล้านกว่าคน จากการศึกษาพบว่า พยาธิสภาพที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์คือ การเกิด amyloid plaques และ neurofibrillary tangles ในเนื้อสมอง ซึ่งเกิดจากการสะสมของ amyloid-beta (Aβ) ที่เป็นองค์ประกอบหลัก amyloid plaques ที่เกิดขึ้นนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Su et al., 2016) สาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่มี 2 สมมุติฐานหลักของการเกิดโรคคือ (1) แบบ non cholinergic ที่เป็นสมมุติฐานที่เกี่ยวข้องกับการเกิด amyloid ที่เป็นผลจากการหลั่งฮอร์โมนและทำให้เกิดการหลั่งอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) เกิด oxidative stress ทำลาย lipid และ protein โดยเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามร่างกายมีระบบควบคุมและป้องกันอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายเซลล์ แต่เนื่องจากอายุมากขึ้น ความเครียด และวิถีชีวิตในปัจจุบันทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดน้อยลง ไม่เพียงพอต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในแต่ละวันได้ (Selkoe, 1991) ส่วนสมมุติฐาน (2) แบบ cholinergic นั้นเกี่ยวข้องกับระดับของ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความจำ ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบว่า มีการลดลงของสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในสมองส่วน hippocampus ทำให้ความจำได้ลดลง เนื่องจากมีปริมาณของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ทำหน้าที่ในการสลาย acetylcholine เพิ่มมากขึ้น โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้พบว่ามี 2 ชนิด คือ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase โดยมีรายงานวิจัยที่พบว่า acetylcholinesterase เพิ่มขึ้น 10 – 15 % และ butyrylcholinesterase เพิ่มขึ้น 40 – 90 % ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Tarawneh and Holtzman, 2012)

ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ทำให้มีสารสื่อประสาท acetylcholine อยู่ในระบบประสาทนานขึ้น ทำให้ความจำของผู้ป่วยดีขึ้นและความรุนแรงของโรคลดน้อยลง เช่น ยาในกลุ่ม anti-cholinesterase ได้แก่ Rivastigmine (Exelon) และ Galantamine (Razadyne) ซึ่งเป็นยาที่ให้ผลการรักษาดี ออกฤทธิ์ช่วยเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในสมอง ประสิทธิภาพของยานี้ที่ผ่านมาพบว่าช่วยให้อาการหลงลืมของผู้ป่วยรวมทั้งความผิดปกติทั้งทางด้านอารมณ์และการนึกคิดดีขึ้น (Doraiswamy, et al., 2002; Tarawneh and Holtzman, 2012) แต่

อย่างไรก็ตาม ยาดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพกับผู้ป่วยที่แสดงอาการเริ่มต้นของโรคอัลไซเมอร์เท่านั้น เมื่อถึงระยะที่โรคมีความรุนแรง ยานี้จะไม่สามารถบรรเทาอาการได้ นอกจากนี้ยังมีอาการข้างเคียง เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วง (Roseiro et al., 2012). ทำให้หลายประเทศทั่วโลกจึงหันมาสนใจการใช้พืชสมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคอัลไซเมอร์กันมากขึ้น

ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) เป็นไม้พุ่มหรือไม้ขนาดเล็กอยู่ในวงศ์ Rubiaceae จัดเป็นสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่คนไทยทุกภูมิภาครู้จักกันดี มีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณ ดังนี้ ส่วนใบยอ จะมีวิตามินเอสูง ช่วยบำรุงสายตา สามารถปรุงเป็นอาหาร ใช้รองกะทงห่อหมก และช่วยแก้ท้องร่วง ลดไข้ เป็นต้น ผลยอ แก้คลื่นไส้อาเจียน และขับลม ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอ ช่วยลดความดันและป้องกันภูมิแพ้ได้ ส่วนรากยอ มาต้มหรือดองเหล้ารับประทานเป็นยาช่วยรักษาวัณโรค แก้โรคเบาหวาน ป้องกันมะเร็ง รวมถึงนำมาใช้ย้อมสีผ้า (สุดารัตน์ หอมหวล, 2010; วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม,2542) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของยอบ้าน เช่น สารสกัดหยาบเมทานอลส่วนของผลยอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Su et al., 2005) โดยทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) และ ONOO- (Peroxynitrites) assays และ Praveen et al. (2007) พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตส่วนของผลยอแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์ดีกว่าสารสกัดเอทานอล นอกจากนี้ Yang et al. (2011) พบสารสกัดน้ำจากผลแก่ยอบ้านมีความสมารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าผลอ่อน และผลสุก แต่สารสกัดน้ำส่วนใบยอแก่และใบยออ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมไม่ต่างกัน กลุ่มสารสำคัญที่พบส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มอิริดอยด์ (iridoid glucoside) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาทางเคมีเกี่ยวกับผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholine esterase รวมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากทุกส่วน (ใบ ลำต้น และราก) ของยอบ้านมาก่อน ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านจากส่วนรากในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล พบว่า สารสกัดชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายตัวอื่น

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดน้ำ 40%เอทานอลและน้ำ และเอทานอลจากส่วนใบ ลำต้น และรากยอบ้าน ซึ่งพบว่ายังไม่เคยมีรายงานการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดจากส่วนใบ ลำต้น และรากมาก่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกส่วนของยอบ้าน และตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์สำหรับพัฒนาต่อยอดให้เป็นผลิตภัณฑ์ทางยาหรืออาหารเสริมสำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดจาก ใบ ลำต้น และราก ของยอบ้าน

2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดยอบ้าน

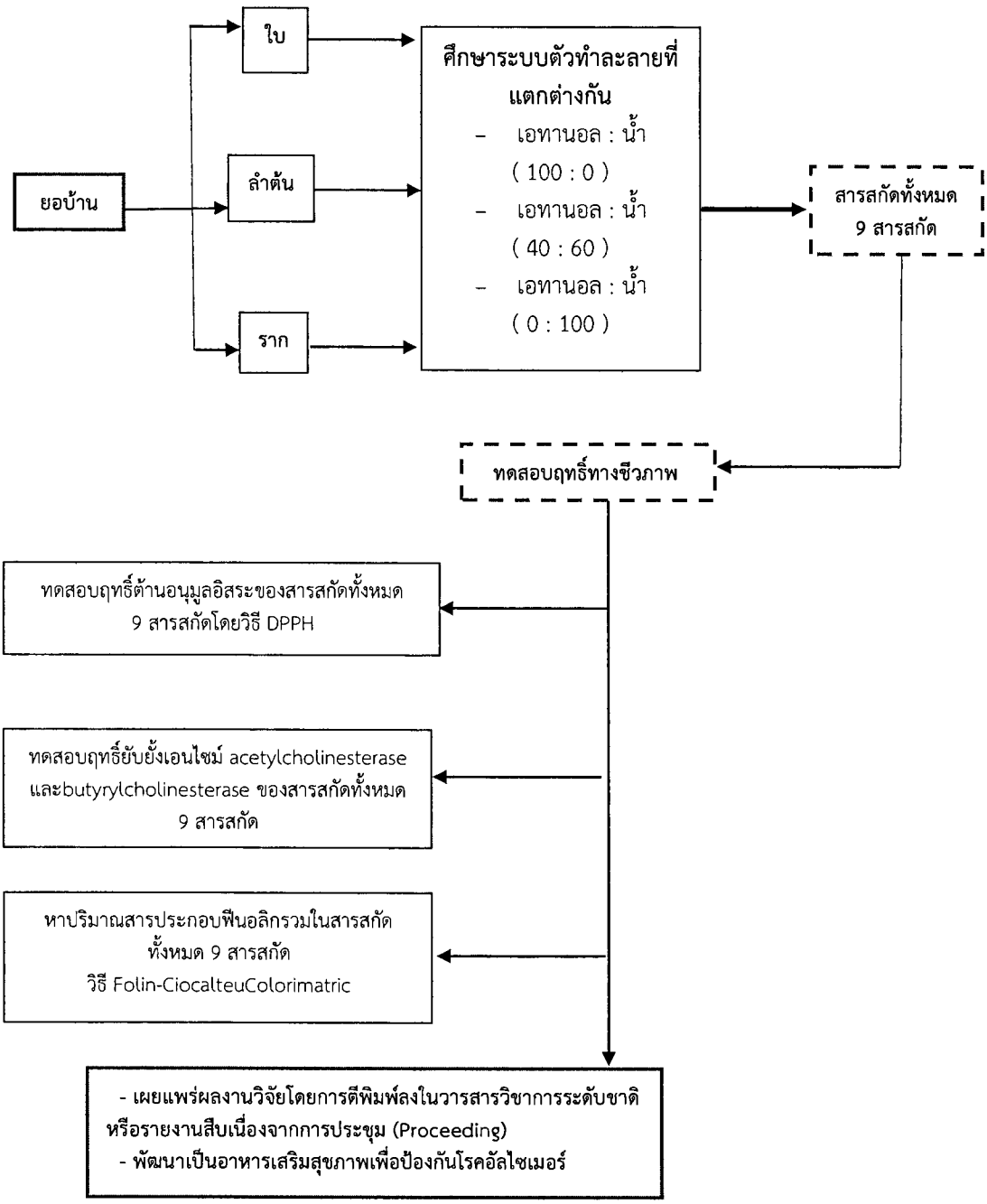
3. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาระบบตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำที่ใช้สกัดยอบ้านในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ (100:0, 40:60, 0:100) หลังจากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พร้อมทั้งหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เพื่อดูประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย



จากกรอบแนวความคิดของการวิจัยดังกล่าว จะได้ข้อมูลสำคัญในการศึกษาต่อยอดหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญต่อไป ทำให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนประโยชน์ของยอบ้าน เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรไทยและพัฒนาเศรษฐกิจ รวมทั้งเป็นประโยชน์ในวงการแพทย์เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมหรือยาป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติในสมองซึ่งมักเกิดกับผู้สูงอายุ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รับองค์ความรู้ในการเลือกส่วนของยอบ้าน ตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัด ฤทธิ์อัลไซเมอร์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานสำหรับพัฒนาศึกษาแนวทางป้องกันโรคอัลไซเมอร์ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งทางเลือกของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1.6 สถานที่ใช้ดำเนินการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) ตำบลพลายชุมพล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

2. ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

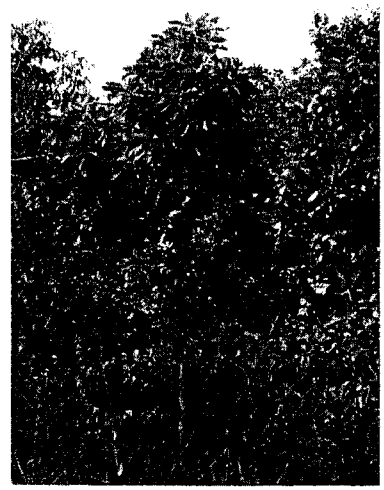
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยอบ้าน (Yo-ban)

ชื่อ	ยอบ้าน
ชื่อท้องถิ่น	ยอ (ภาคกลางและทั่วไปในทุกภาค), มะตาเสือ(เหนือ), แยใหญ่(กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), ต่างประเทศเรียก:Noni (จากฮาวาย), nono (ตาฮิติ), Indian Mulberry (ในอินเดีย)
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Morinda citrifolia* L.
ชื่อพ้อง	*Morinda tomentosa* B. Heyne ex Roth
วงศ์	Rubiaceae

ลักษณะพืช

ยอเป็นไม้พุ่มในวงศ์ Rubiaceae จัดเป็นพืชในวงศ์เข็ม (Rubiaceae) สกุลยอ (*Morinda*) กระจายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความสูงได้ประมาณ 5-15 เมตร **เปลือกต้นและเนื้อไม้** เป็นสีเทาหรือสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลเหลือง แตกเป็นร่องลึกยาวหรือแตกเป็นสะเก็ดสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก **ภาพที่ 2.1**

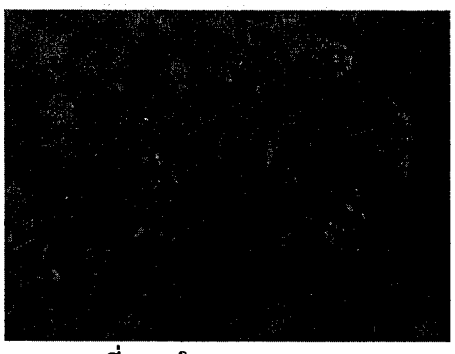


ภาพที่ 2.1 ต้นยอ
ที่มา: (ธนาธิป รักศิลป์, 2553)

ใบยอ เป็นใบเดี่ยวออกเรียงตัวแบบตรงข้ามสลับกับตั้งฉาก ลักษณะของใบเป็นรูปรีหรือรูปไข่กลับ ปลายใบมนหรือแหลม โคนใบแหลมหรือเบี้ยว ส่วนขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ใบมีขนาดกว้าง

ประมาณ 4-7 เซนติเมตร และยาวประมาณ 8-17 เซนติเมตร หลังใบเป็นสีเขียวมัน ส่วนท้องใบมีสีอ่อน

ผลยอ ผลเป็นผลรวมรูปร่างค่อนข้างกลม ผลอ่อนเป็นสีเขียว เนื้อในผลอ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ และเป็นสีขาว ส่วนผลแก่เป็นสีดำ ภายในผลมีเมล็ดมาก เมล็ดเป็นสีน้ำตาล โดยมีเมล็ดแบน 1 เมล็ดต่อหนึ่งผลย่อย **ภาพที่ 2.2**



ภาพที่ 2.2 ใบและผลยอ
ที่มา: (ธนาธิป รักศิลป์, 2553)

2.2 ประโยชน์ของยอบ้าน *Morinda citrifolia*

สรรพคุณทางยาของยอ

ส่วนราก

ภูมิปัญญาชาวบ้านจะนำมาต้มหรือดองเหล้ารับประทานเป็นยา ใช้รักษาวัณโรคแก้โรคเบาหวาน ป้องกันโรคมะเร็ง โดยมีองค์ประกอบทางเคมีและกลุ่มสาร Anthraquinones เช่น Morindone, Morenone, Nordamnacenthal, Rubiadin และอนุพันธ์ Rubiadin 1-methylether เป็นต้น นอกจากนี้ส่วนของเปลือกรากยังใช้ในการย้อมสีผ้าอีกด้วย

ส่วนใบ

ใบยอจะมีวิตามินเอปริมาณสูง มีคุณสมบัติช่วยบำรุงสายตา ใช้บรรเทาอาการท้องร่วง แก้ไข้ แก้จุกเสียด ชาวฟิลิปปินส์จะใช้ใบยอสดในการรักษาแผลเปื่อย และข้ออักเสบ ในขณะที่ชาวอินเดียใช้เป็นยาสมานแผล และรับประทานเป็นยาบำรุงกำลัง ภูมิปัญญาชาวบ้านจะคั้นน้ำทาแก้โรคเก๊าท์ปวดตามข้อเล็กๆของนิ้วมือ นิ้วเท้า หรือคั้นน้ำแล้วนำมาสระผมช่วยฆ่าเหา หรือนำใบอังไฟแล้วนำมาปิดที่หน้าอกหน้าท้อง เพื่อช่วยบรรเทาอาการไอ จุกเสียด ม้ามโต แก้ไข้ องค์ประกอบทางเคมีและกลุ่มสารสำคัญส่วนใหญ่ที่พบ เช่น Asperuloside, β-sitosterol, ursolic acid, และ β – carotene เป็นต้น นอกจากนี้ใบยอใช้สำหรับปรุงอาหาร ลวกกินกับน้ำพริก ใช้รองกระทงห่อหมก

ส่วนผล

ผลยอจะมีรสเผ็ดร้อน ผลอ่อนช่วยบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียน ผลสุกงอมใช้เป็นยาขับระดูสตรี ช่วยขับลมในลำไส้ และในปัจจุบันมีการนำลูกยอมาคั้นเป็นน้ำลูกยอ ใช้สำหรับดื่มเป็น

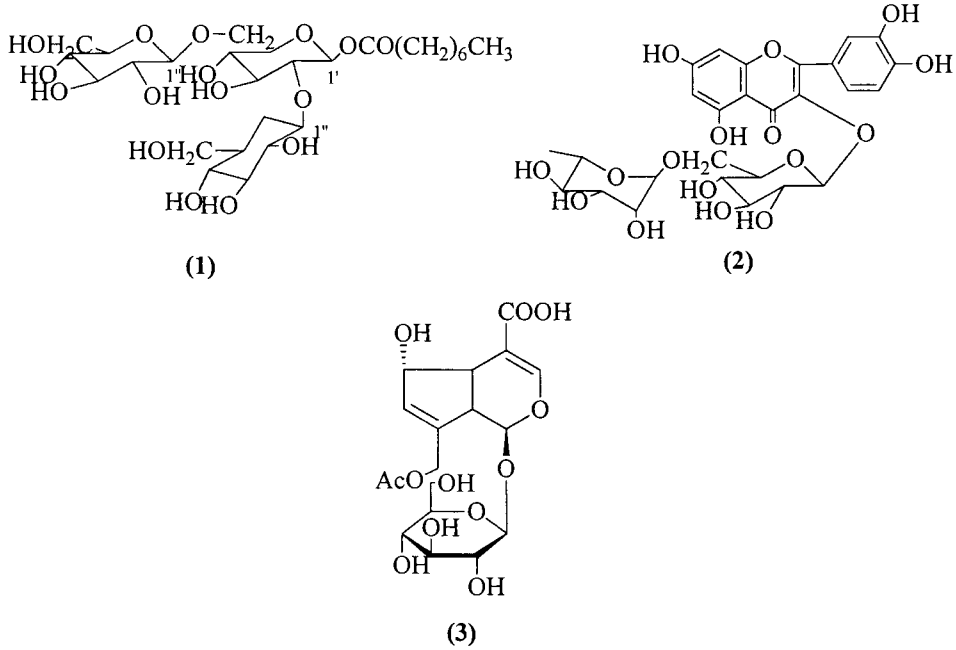
ยาลดความดัน ป้องกันโรคภูมิแพ้ ส่วนผลยอดิบจะเผาผสมเกลือเล็กน้อย อมแก้เหงือกบวม กลุ่มสารที่สำคัญที่พบในผลยอ ได้แก่ สารในกลุ่มมอนอเทอร์ปีน (monoterpenes) นอกจากนี้ยังพบสารหอมระเหยจำพวก carboxylic acid, octanoic acid, hexanoic acid และ decanoic acid เป็นต้น

ส่วนเปลือกและเนื้อไม้

นำมาต้มรับประทาน แก้ไข้ แก้ไข้มาลาเรีย แก่นไม้จะมีรสขมร้อน นำมาต้มหรือดองสุรา ช่วยขับเลือด บำรุงเลือด ขับน้ำคาวปลา แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ ขับผายลม ป้องกันบาดทะยักปากมดลูก ชาวมาเลเซียจะต้มดื่มแก้ไข้จับสั่น ซึ่งมีกลุ่มสารสำคัญเป็นสารในกลุ่ม anthraquinones ได้แก่ alizarin, ruberythric acid และ rubiadin เป็นต้น (สุดารัตน์ หอมหวล, 2010; ยอ, 2011: ออนไลน์)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.)

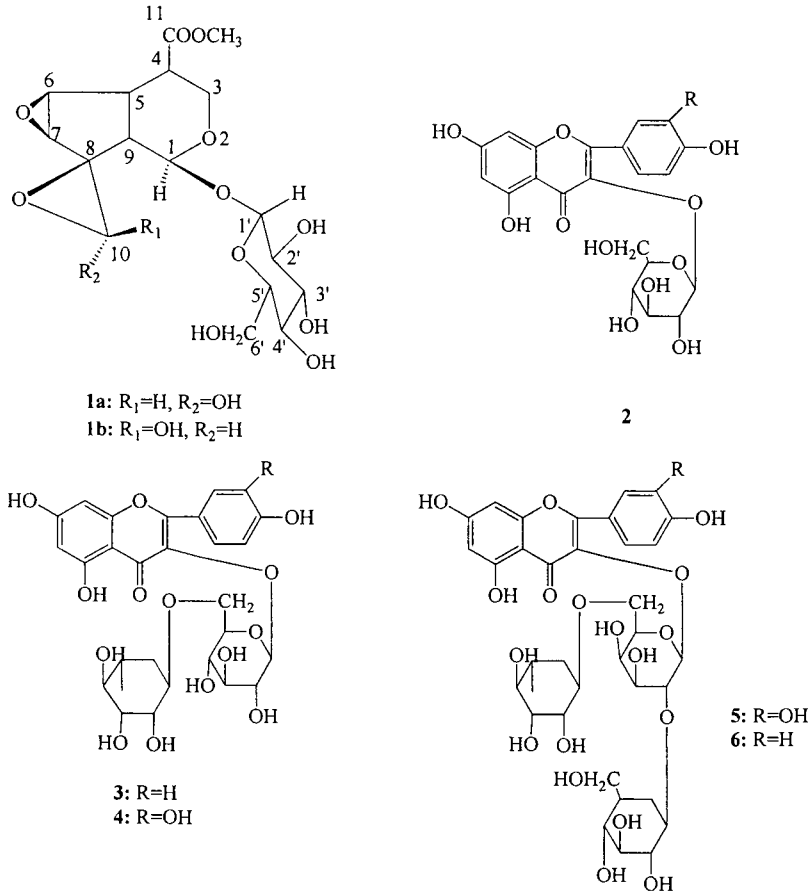
Wang et al. (1999). ได้แยกสารสกัดชั้นเอทานอลจากผลของ (*Morinda citrifolia* (Noni)) พบสารประกอบชนิดใหม่กลุ่ม **trisaccharide fatty acid ester** 1 ชนิด คือ 2,6-di-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl-β-D-glucopyranose **(1)** นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม **glycosides** ที่มีรายงานไว้อีก 2 ชนิด คือ rutin **(2)** และ asperulosidic acid **(3) ดังภาพที่ 2.3**



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสารประกอบที่แยกได้จากผลของ *Morinda citrifolia*: **(1)** 2,6-di-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-1-*O*-octanoyl-β-D-glucopyranose; **(2)** rutin; **(3)** asperulosidic acid

Sang et al. (2001) ทำการศึกษาและแยกสารประกอบจากใบของ *Morinda citrifolia* โดยสกัดด้วยบิวทานอล (*n*-butanol) จากนั้นนำสารสกัดไปแยกทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทก

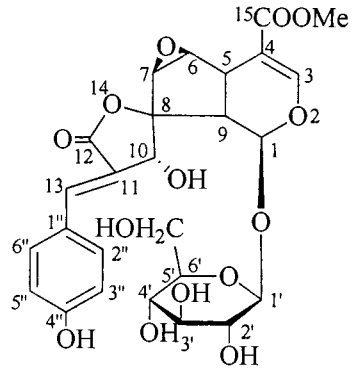
ราฟี ได้สารประกอบใหม่ในกลุ่ม **iridoid glucoside** 1 ชนิด คือ Citrifolinin B **(1)** และสารที่รายงานมาก่อนแล้ว 5 ชนิดในกลุ่ม **flavonol glycosides** ได้แก่ Quercetin-3-*O*-β-D-glucopyranoside **(2)**, Kaempferol-3-*O*-R-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopyrano side **(3)**, Quercetin-3-*O*-R-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-β-D-glucopy ranoside **(4)**, Quer cetin-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-[R-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-]-β-D-galacopy ranoside **(5)** และ Kaempferol-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1-2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1-6)]-β-D-galacopyranoside **(6) ดังภาพที่ 2.4** จากนั้นนำสารประกอบทั้งหมดที่แยกได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging ที่ความเข้มข้น 30 μM พบว่าสารประกอบ **2** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากส่วนใบของ *Morinda citrifolia*

Sang et al. (2001). ทำการศึกษาและแยกสารบริสุทธิ์ส่วนใบของต้นยอ (*Morinda citrifolia* L.) โดยสกัดด้วยเอทานอลจากนั้นนำสารสกัดไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทร

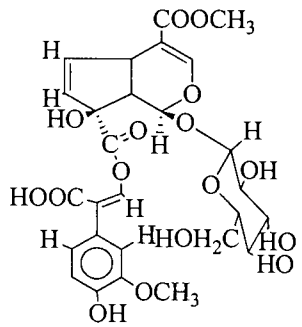
กราฟีได้สารกลุ่ม **Iridoid** 1 ชนิด ได้แก่ citrifolinoside A **(1) ดังภาพที่ 2.5** จากนั้นนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น activating protein-1 (AP-1) ที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนัง พบว่าสาร citrifolinoside A **(1)** เป็นตัวอย่างกลุ่ม Iridoid ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง UVB จึงทำให้ AP-1 ถูกระงับการกระตุ้นที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนังถูกยับยั้งลง ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 29.0 μM



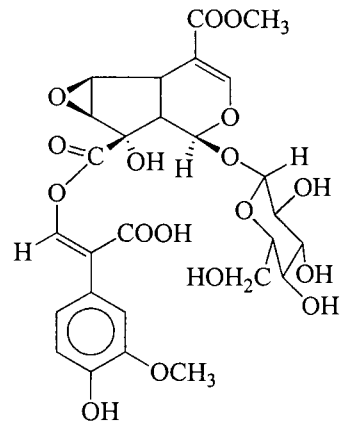
1

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ citrifolinoside A **(1)**

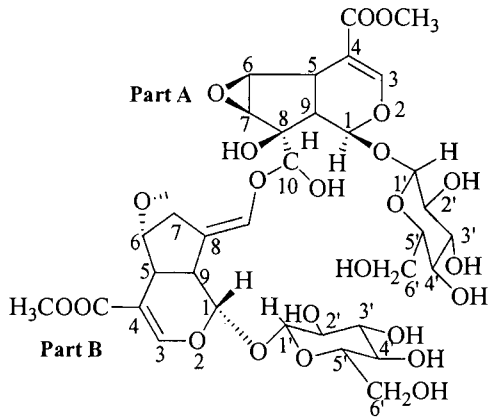
Sang et al. (2003). พบสาร citrifolinin A-1 **(3)** ซึ่งเป็นสารกลุ่ม **Iridoids** ชนิดใหม่ และสารที่มีรายงานไว้อีก 2 ชนิดคือ citrifolinin A **(1)**, citrifolinoside **(2)** ที่แยกได้จากสารสกัดส่วนใบยอ (*Morinda citrifolia* L.) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล **ดังภาพที่ 2.6** จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง UVB ที่ไปกระตุ้น AP-1 ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนังด้วยสารสกัดที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าสารที่ **1** และ **2** มีฤทธิ์ต้านรังสี UVB ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 69.6 และ 29.0 μM ทำให้การกระตุ้น AP-1 ลดลง ส่วนสารใหม่ **3** ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง UVB



1



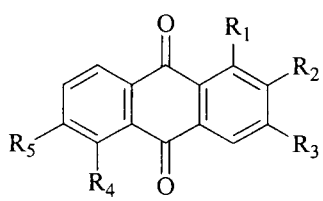
2



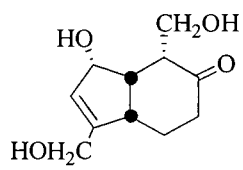
3

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของสาร citrifolinin A **(1)**, citrifolinoside **(2)** และสาร citrifolinin A-1 **(3)**

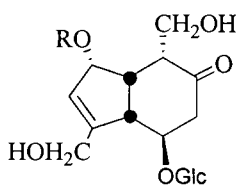
Kamiya et al. (2005) แยกสารจากส่วนผลของ *Morinda citrifolia* ด้วยตัวทำละลายเมทานอลได้สารใหม่ 2 ชนิด เป็นสารใหม่ในกลุ่ม **anthraquinones** 1 ชนิด คือ 5,15-dimethylmorindol **(1)** และสารที่มีรายงานมาอีก 5 ชนิด ได้แก่ สาร alizarin-1-methylether **(2)**, anthragallol-1,3-dimethylether **(3)**, anthragallol-2-methylether **(4)**, 6-hydroxy-anthragallol-1,3-dimethylether **(5)** และ morindone-5-methylether **(6)** และสารใหม่ในกลุ่ม **iridoid** 1 ชนิด คือ morindacin **(7)** และสารที่มีรายงานอีก 2 ชนิด ได้แก่ asuperlosidic acid (8) และ deacetylasperulosidic acid **(9) ดังภาพที่ 2.7**



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	OH	CH_2OCH_3	H	OCH_3	OH
2	OCH_3	OH	H	H	H
3	OCH_3	OH	OCH_3	H	H
4	OH	OCH_3	OH	H	H
5	OCH_3	OH	OCH_3	H	OH
6	OH	CH_3	H	OCH_3	OH



7

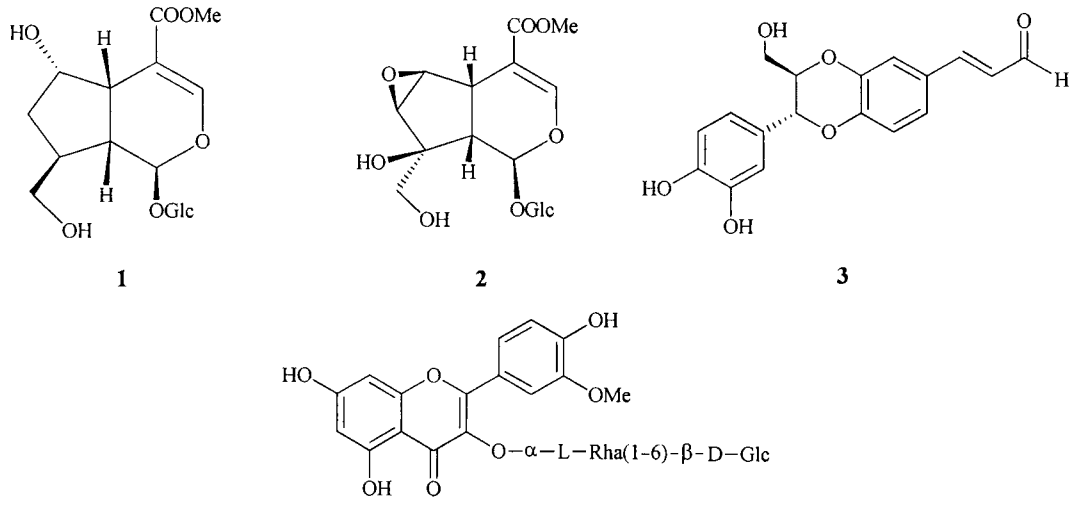


8 R=$COCH_3$
9 R=H

ภาพที่ 2.7 สารกลุ่ม Anthraquinones และ Iridoids จากผลของ *M. Citrifolia*

Su et al. (2005) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีส่วนผลของ *Morinda citrifolia* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) และ $ONOO^-$

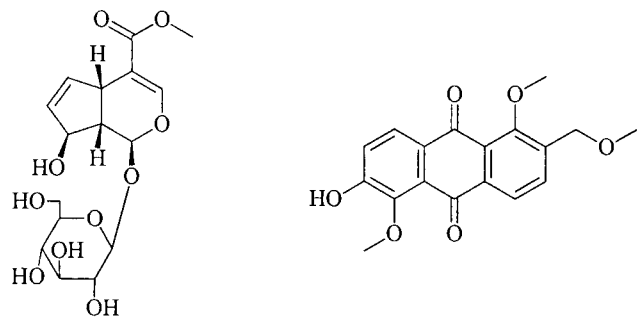
(Peroxynitrites) ได้สาร iridoid glucosides ชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ 6α-hydroxyadoxoside **(1)** และ 6β,7β-epoxy-8-*epi*-splendoside **(2)** และสารที่มีรายงานไว้ก่อนหน้าอีก 17 ชนิด ได้แก่ americanin A **(3)**, narcissoside **(4)**, asperuloside, asperulosidic acid, borreriagenin, citrifo linin B epimer a, citrifolinin B epimer b, cytidine, deacetylasperuloside, dehydromethoxy gaertneroside, *epi*-dihydrocornin, D-glucose, D-mannitol, methyl α-D-fructofuranoside, methyl β-D-fructofuranoside, nicotifloroside และ β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyrano side ซึ่งสารทั้งหมดนี้แยกได้จากสารสกัดหยาบเมทานอล จากนั้นได้ทำสารทั้งหมดมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สาร americanin A **(3)** มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.9 μM และสามารถต้านอนุมูล $ONOO^-$ ได้เท่ากับสารมาตรฐาน penicillinamine ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.3 μM ตามลำดับ **ดังภาพที่ 2.8**



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของ 6α-hydroxyadoxoside **(1)** 6β,7β-epoxy-8-*epi*-splendoside **(2)** americanin A **(3)** และ narcissoside **(4)**

Ramamoorthy et al. (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดเอทานอล และสารสกัดเอทิลอะซิเตต โดยสกัดด้วยวิธี Soxhlet และ ultrasonic จากนั้นนำมาทำให้แห้งโดยอบที่สูญญากาศ (vacuum oven) และแบบ spray dryer ตามลำดับ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตต แบบ spray dryer มีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟลาโวนอยด์ มากกว่าสารสกัดเอทานอล มีค่าเท่ากับ 26 mg antioxidant/mg DPPH และ 12.3 mg catechin/g of extract ตามลำดับ แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตท แบบ vacuum oven จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 30 mg tannic acid/g of extract

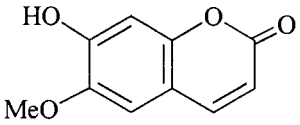
Takashima et al. (2007) แยกสารสกัดชั้น EtOAC จากส่วนใบของ *Morinda citrifolia* ได้สารทั้งหมด 26 ชนิดเป็นสารที่มีการรายงานแล้ว 24 ชนิด และสารชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้แก่สารกลุ่ม **Iridoid glycoside** (Citrofoside **(1)**) และสารกลุ่ม **anthraquinones** (1,5,15-trimethylmorindol **(2)**) **ดังภาพที่ 2.9** โดยสาร **2** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat cells) แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทำให้เซลล์มะเร็งตาย ในทางตรงกันข้ามสาร **1** ไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์และความเป็นพิษกับเซลล์



1 **2**

ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของ Citrifoside **(1)** และ 1, 5, 15-Trimethylmorindol **(2)**

Hisham et al. (2010). ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารไม่มีขั้ว (non-polar) จากส่วนผลของ *Morinda citrifolia* ทำการสกัดผลยอด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดมาสกัดแบบแบ่งส่วนด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ได้สารบริสุทธิ์ scopoletin ซึ่งเป็นสารกลุ่มคูมาริน **ดังภาพที่ 2.10** สารนี้สามารถนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของสารไม่มีขั้วสำหรับผลยอได้



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ Scopoletin

Mahattanadul, et al. (2011) พบสารสกัดน้ำของลูกยอดิบและสาร scopoletin ในลูกยอสามารถยับยั้งการอับเสบของหลอดอาหารและแผลในกระเพาะอาหารในหนูได้ใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน ranitidine และ lansoprazole ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

Yang et al. (2011) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซีของพืชยอบ้าน *Morinda citrifolia* L. โดยทำการทดสอบทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ได้แก่

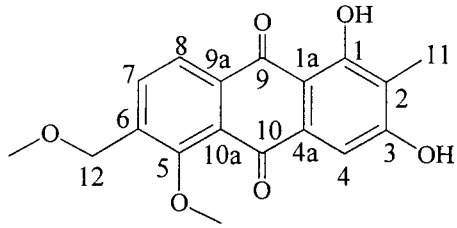
ผลอ่อน ผลแก่ ผลสุก ใบอ่อน ใบแก่ และใบที่ร่วงจากต้น ส่วนผลยอนำมาสกัดด้วยน้ำโดยคั้นน้ำสดจากผลได้สารสกัด ส่วนใบยอสกัดด้วยน้ำร้อน 90 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที และนำสารสกัดทั้งหมดมาวิเคราะห์ ORAC assay, ABTS assay, DPPH assay, หาปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซี พบว่าผลยอแก่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณกรดวิตามินซีมากกว่าผลอ่อนและผลสุกโดยมีค่า ORAC assay เท่ากับ 1882 ± 230 mol Trolox/100g วิธี ABTS assay เท่ากับ 199.5 ± 8.2 mg VCEAC/100g วิธี DPPH assay เท่ากับ 188 ± 8.5 mg VCEAC /100g ปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 284.8 ± 25.9 mgGAE /100g และปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 224.3 ± 23 mg/100g นอกจากนี้ยังศึกษาใบยอบ้าน พบว่าใบยอแก่และใบยอที่ร่วงจากต้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลรวมไม่แตกต่างกันแต่สูงกว่าใบอ่อน

Krishnaiah et al. (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดเมทานอลจากส่วนผลยอบ้าน *Morinda citrifolia* L. แยกด้วยเครื่องแยกเมมเบรน Batch mode ใช้ Polyethersulphone (PES) เป็นตัวกรองทำที่อุณหภูมิในช่วง 30-70 ^{0}C ความดันอยู่ที่ 0.5-1.5 บาร์ ถูกแบ่งออกเป็น 2 ตัวอย่าง ของเหลวที่ผ่านรูของเยื่อกรอง PES เรียกว่าเพอมิเอต (permeate) และส่วนที่ไม่ถูกกรองผ่านเยื่อเรียกว่ารีเทนเทต (retentate) พบว่าการแยกสารสกัดเมทานอลด้วยวิธี retentate เป็นวิธีที่เหมาะสมมีฤทธิ์สูง ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity เท่ากับ 55.60% ปริมาณฟีนอลรวมได้เท่ากับ 43.18 mg GAE/10g ของตัวอย่าง จากการทดลองทราบว่าสารฟีนอลตัวอย่างมีอิทธิพลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH เพราะปริมาณฟีนอลเป็นไปในทางเดียวกันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

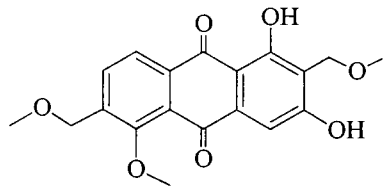
Krishnaiah et al. (2015). ศึกษาสารสกัดยอ *Morinda citrifolia* โดยคั้นน้ำออกนำเนื้อยอตากแดด 2 วัน แล้วอบที่ 60 ^{0}C 1 วัน บดระเอียดเก็บไว้ที่ 40 ^{0}C นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและระเหยตัวด้วยวิธี spray drying โดยใช้แป้งมันฝรั่ง 2%โดยน้ำหนัก ห่อหุ้มเคลือบผิวสารสกัด ซึ่งปริมาณสารสกัดต่อปริมาณแป้งมันฝรั่งในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน คือ (1:1, 1:2 และ 1:4) ทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ 90, 100, 110, 120, 130 และ 140 ^{0}C จากการทดลองทราบว่าอัตราส่วนที่ 1:1 อุณหภูมิ 120 ^{0}C ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 70.74% และมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดเช่นกันเท่ากับ 54.575 mgGAE/100g powder

Wang et al. (2016). ทำการศึกษาและแยกสารประกอบจากเปลือกและลำต้นของ *Morinda citrifolia* โดยสกัดด้วย 80% EtOH จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาแบ่งส่วนการละลายด้วยน้ำและ EtOAc และนำสารสกัด EtOAc มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารชนิดใหม่กลุ่ม **Antraquinones** 2 ชนิด คือ 1,3-dihydroxy-5-methoxy-6-methoxymethyl-2-methyl-9,10-anthraquinone **(1)** และ 1,3-dihydroxy-5-methoxy-2,6-bismethoxy

methyl-9,10-anthraquinone **(2) ดังภาพที่ 2.11** และสารที่มีรายงานมาแล้วประกอบด้วยอนุพันธ์ **Antraquinones** 10 ชนิด อนุพันธ์ของ **coumarin** 3 ชนิด และ 6-gingerol จากนั้นนำสารชนิดใหม่ 2 ชนิดมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส (Antiviral)และเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) พบว่า สาร **1** และ **2** มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส H1N1 ได้เล็กน้อย โดยมีค่า IC_{50} 66.1 and 10.5 μM ตามลำดับ นอกจากนี้สาร **2** ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส H3N2 ที่ค่า IC_{50} 11.5 μM และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย*Staphylococcus aureus* โดยมีค่า MIC 11.5 μM



1



2

ภาพที่ 2.11 โครงสร้างสารกลุ่ม Antraquinones ชนิดใหม่ (สาร **1** และ **2**)

2.4 โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease)

สมองเป็นส่วนสำคัญของร่างกายที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โรคสมองเสื่อมเป็นกลุ่มอาการซึ่งเกิดขึ้นจากการทำงานของสมองที่เสื่อมลง มีการสูญเสียความจำ ซึ่งมีสาเหตุมาจากโรค หรือสภาวะต่าง ๆ ที่ทำลายเซลล์ประสาท (Alzheimer's Association, 2009) เมื่อเซลล์ประสาทถูกทำลาย จึงส่งผลต่อการพูด การฟัง การเขียน ความสามารถในการจดจำหรือแยกแยะสิ่งของต่าง ๆ ซึ่งการลดลงของความสามารถในการจดจำนี้จะรบกวนกระบวนการใช้ชีวิตประจำวัน โรคสมองเสื่อมชนิดต่างกัน **(ตาราง 2.1)** จะมีรูปแบบของอาการที่แสดงออกที่แตกต่างกัน รวมทั้งมีความผิดปกติที่เนื้อสมองแตกต่างกันด้วย แต่ก็พบว่าบางครั้งมีลักษณะอาการที่คาบเกี่ยวกัน ชนิดของโรคสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยที่สุดคืออัลไซเมอร์ ซึ่งพบได้กว่า 70%

ตาราง 2.1 แสดงชนิดของโรคสมองเสื่อมและลักษณะเฉพาะ

ชนิดของโรคสมองเสื่อม	ลักษณะ
อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)	เป็นชนิดที่พบมากที่สุดของโรคสมองเสื่อม พยาธิสภาพที่สำคัญคือ amyloid plaques และ neurofibrillary tangles
โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease)	เกิดจากเซลล์สมองไม่สามารถสร้างสารโดปามีนได้อย่างเพียงพอ โดปามีนเป็นสารเคมีในสมอง ทำหน้าที่ควบคุมระบบ

	การเคลื่อนไหวของร่างกาย ผู้ป่วยจะมีอาการสั่น เกร็ง และเคลื่อนไหวช้า ลักษณะที่สำคัญคือมี Lewy bodies ซึ่งเกิดจากการสะสมของโปรตีน α-synuclein ภายในเซลล์ประสาท

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดหนึ่งซึ่งพบได้บ่อยที่สุด เกิดจากการเสื่อมหรือตายของเซลล์ประสาท (neurodegenerative disease) ในส่วนที่ควบคุมการเรียนรู้และ ในคนปกติจะมีเซลล์ประสาทประมาณ 30–100 พันล้านเซลล์ ($1x10^{11}$) ซึ่งมีการยืดยาวไปติดต่อ (synapses) กับเซลล์อื่นกว่า $1x10^{14}$ ตำแหน่ง ข้อมูลต่าง ๆ จะส่งผ่านสารสื่อประสาท (neurotransmitter) เป็นสัญญาณวงจรไฟฟ้าในสมอง ทำให้เกิดความจำ การคิด และทักษะต่าง ๆ (Alzheimer's Association, 2009) แต่สำหรับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ จำนวนเซลล์ประสาทและ synapses จะลดลงจากการสูญเสียเซลล์ประสาท การส่งผ่านสัญญาณล้มเหลว ทำให้มีอาการสูญเสียความจำ หลงลืม สูญเสียความสามารถทางด้านภาษา ความสามารถในการทรงตัว และการเคลื่อนไหว อารมณ์แปรปรวน หงุดหงิด ซึ่งมักเกิดกับผู้สูงอายุและเป็นแล้วไม่สามารถรักษาให้หาย ซึ่งโรคอัลไซเมอร์ไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อผู้เป็นโรคเท่านั้น แต่ยังส่งผลถึงบุคคลในครอบครัว ผู้ดูแล เศรษฐกิจและสังคม ดังนั้นโรคอัลไซเมอร์จึงเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ

สาเหตุหรือสมมติฐานการเกิดโรค ยังไม่ทราบแน่ชัดสมมติฐานการเกิดโรคที่สำคัญสามารถแบ่งได้เป็น 2 สมมติฐาน ได้แก่

Amyloid cascade hypothesis

เชื่อว่าการสะสมของ Aβ เป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ การสะสมของ Aβ เป็นสาเหตุให้เกิด neurofibrillary tangles การตายของเซลล์ประสาท และเป็นผลให้เกิดความจำเสื่อมตามมา เนื่องจากพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มีการสะสมของ Aβ เป็น amyloid plaques (Pimplikar, 2009) มีบทบาททำให้เซลล์ประสาทตาย และทำให้สมองเสื่อม (Selkoe, 1991) เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเทา (Rapoport, et al., 2002) โดยการทำลายสมดุลแคลเซียมในเซลล์ประสาททำให้มีการสะสมแคลเซียมในเซลล์จำนวน

Cholinergic hypothesis

เชื่อว่าโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการสังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิดอะซิติลโคลีน (Acetylcholine: AChE) ลดลง (Kitphati , et al., 2011) โดยการลดลงของอะซิติลโคลีนนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ อะซิติลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่ง ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณกระแสประสาท เมื่อมีการสังเคราะห์ลดลงทำให้การส่งกระแสประสาทผิดปกติและช้า ซึ่งหลายๆงานวิจัยได้มีการศึกษาสารที่ช่วยเพิ่มระดับอะซิติลโคลีนในสมอง รวมทั้งสารที่ยับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase (Acetylcholinesterase inhibitor) เพื่อยับยั้งการย่อยอะซิติลโคลีนอีกด้วย อย่างไรก็ตามการลดลง

ของอะซิติลโคลีน ไม่เพียงแต่พบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เท่านั้น แต่ยังพบในผู้ป่วยโรค neurodegenerative อื่น ๆ ด้วย

2.5 Cholinesterase enzyme (ChE)

เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสมีหน้าที่ในการสลายสาร Acetylcholine ให้เป็น โคลีนและอะซิเตท ซึ่งสารตัวนี้เป็นตัวกลางในการส่งกระแสประสาท (nerveimpulses) ของ pregamglionic automatic fibers, postganglionic parasympathetic fibers และ postganglionic sympathetic fibers บางชนิด ซึ่งเส้นประสาทเหล่านี้จะส่งกระแสประสาทไปยังหัวใจ ม่านตา ต่อมน้ำลาย กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก กระเพาะปัสสาวะ bronchial glands, sweat glands รวมทั้งอวัยวะ และเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย นอกจากนั้น acetylcholine ยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการส่งกระแสประสาทที่ neuromuscular junction และที่ synapse ต่าง ๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) โดยทั่วไป ในร่างกายของคนจะพบเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสนี้ 2 ประเภทด้วยกันคือ

1. True-cholinesterase enzymes (acetylcholinesterase) เป็นเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงในการสลายสารacetylcholine มาก สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ประสาท และ neuromuscular junctions เอนไซม์นี้ถูกสร้างขึ้นมาพร้อม ๆ กับการสร้างเม็ดเลือดแดง

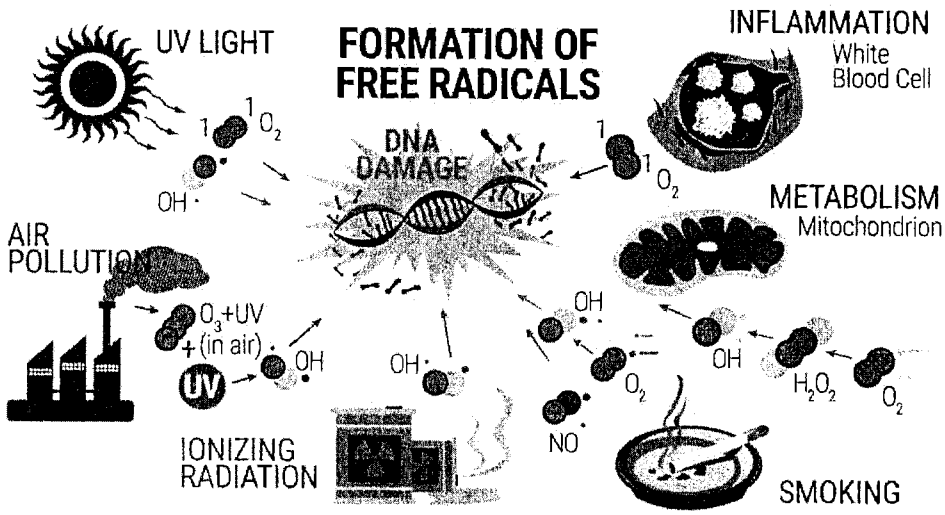
2. Pseudocholinesterase enzymes (butyrylcholinesterase) เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ตับ จะพบตามบริเวณ peripheral nervous systems, plasma ตับและในอวัยวะอื่น ๆ มีความเฉพาะเจาะจงในการสลายสาร acetylcholine น้อยกว่า true cholinesterase enzyme (Savelev et al., 2004)

2.6 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือไอออน ซึ่งมีอิเล็กตรอนเดี่ยวในวงนอกสุด (unpaired valence electron) อนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก ลบ หรือเป็นศูนย์ก็ได้ เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบ ๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการสันดาปกระบวนการทางเคมีในสิ่งมีชีวิต ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสามารถควบคุมหลายกระบวนการ เช่น ควบคุมการบีบตัวของหลอดเลือด ซึ่งควบคุมความดันโลหิตอีกต่อหนึ่ง นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังมีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิซึมตัวกลางของสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด เกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิลน้อย โดยร่างกายจะมี

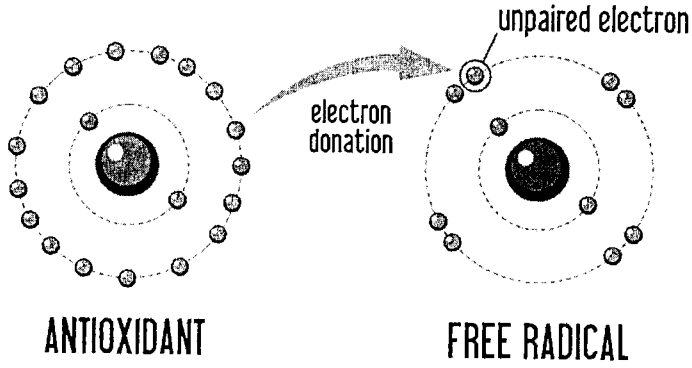
ระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีไขมันประกอบสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูง ๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จากไอเสียรถยนต์ มากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลง ก็จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป เป็นสาเหตุของโรคภัย เช่น โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2559) ดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 การสร้างอนุมูลอิสระ
ที่มา : https://www.thaipng.com/png-oc5pvg

2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆ ได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ อาทิ ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล

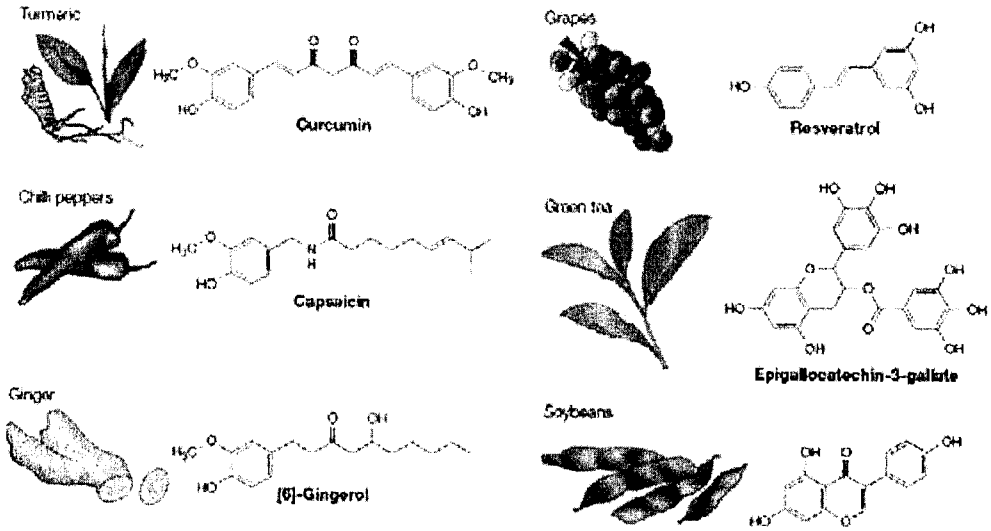


ภาพที่ 2.13 สารต้านออกซิเดชัน
ที่มา : https://www.kellersformula.com/what-are-antioxidants

แม้ว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสิ่งสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต หากแต่ก็ยังเกิดโทษเช่นกัน ดังนั้นพืชและสัตว์จึงรักษาสมดุลด้วยระบบที่ซับซ้อนของปฏิกิริยา โดยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลูตาไธโอน วิตามินซี และวิตามินอี เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase; SOD) ที่เป็นตัวทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเผาผลาญภายในเซลล์ รวมถึงเพอรอกซิเดสต่าง ๆ ระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำเกินไปหรือเอนไซม์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันมากเกินไป ก็มีผลให้เกิดภาวะออกซิเดชันที่มากเกินไป (oxidative stress) นำมาซึ่งการทำลายหรือสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้ จะทำให้เกิดโรคในมนุษย์หลายโรค เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่าง ๆ มะเร็ง รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง เป็นต้น (อธิป สกุลเผือก, 2559) สารต้านอนุมูลอิสระในทางเภสัชวิทยาสามารถรักษาภาวะโรคหลอดเลือดในสมองและโรค neurodegenerative disease ได้ และยังนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ช่วยในการรักษาสุขภาพและป้องกันโรคอย่างโรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดโรคหัวใจ รวมไปถึงโรคกลัวความสูง

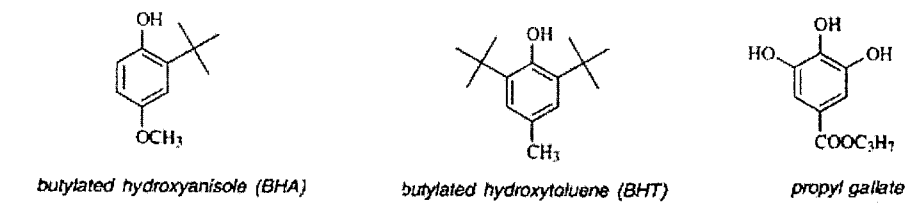
นอกจากนี้ยังมีสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ได้แก่ สารเคมีจากพืช เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ชา เป็นต้น **ดังภาพที่ 2.14** สามารถใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) โดยจะมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกเป็นส่วนใหญ่ พบในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้ายข้าวและงา) ผล (ได้แก่ องุ่น ส้ม และ พริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ชาและเครื่องเทศต่าง ๆ) และส่วนอื่น ๆ (ได้แก่มันเทศและหัวหอม) ตัวอย่างสารกลุ่มฟีนอลิก เช่น flavonoids ประกอบด้วย flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavonones และ

chalcones) และอนุพันธ์ของ cinnamic acid ได้แก่ caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และอื่น ๆ ซึ่งพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชแต่จะมีปริมาณที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2.14 สารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ
ที่มา : https://www.kellersformula.com/what-are-antioxidants

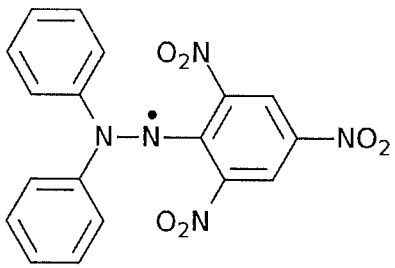
และยังมีสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), TBHQ (tertiary butyl hydro quinone) หรือ EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) เป็นต้น



ภาพที่ 2.15 สารต้านออกซิเดชันธรรมชาติและสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์
ที่มา : https://www.kellersformula.com/what-are-antioxidants

ปัจจุบันนี้สารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหลายชนิด เช่น ใส่เป็นสารกันบูดในอาหาร และเครื่องสำอาง เป็นต้น (วรพร ศีลศร, 2554) สำหรับวิธีการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว โดยวิธีที่นิยมใช้ได้แก่

DPPH assay หรือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanolหรือเอทานอล ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm **ภาพที่ 2.16**



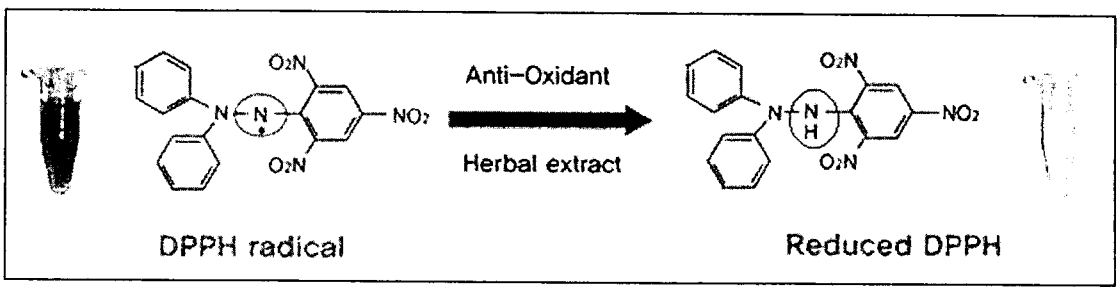
ภาพที่ 2.16 สูตรโครงสร้างของ DPPH

โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\bullet}$) ได้ดังสมการ

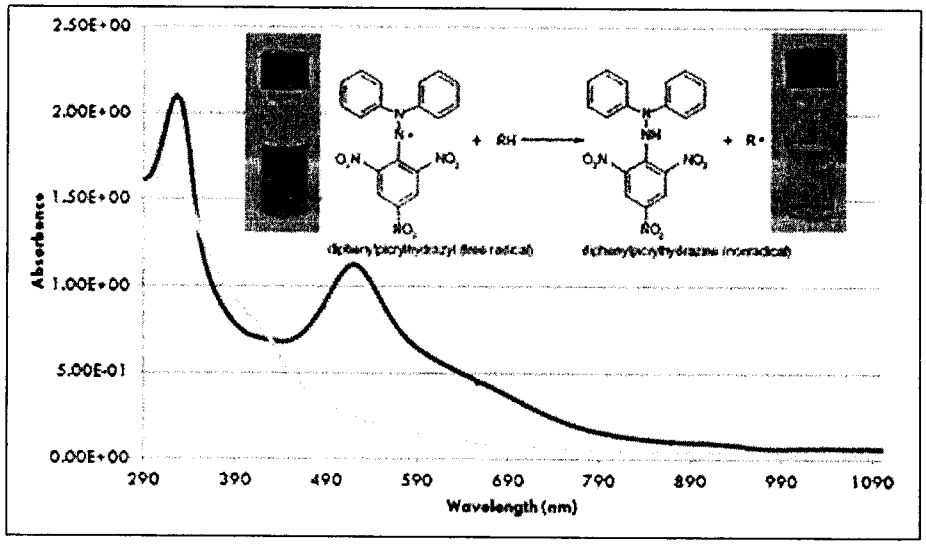
$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

จากสมการอธิบายได้ว่า เมื่อ DPPH ซึ่งมีอิเล็กตรอนเดี่ยว 1 ตัว มีความสามารถในการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอนติออกซิแดนท์ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH ได้ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวส์กลายเป็น DPPH-H เกิดการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลืองเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เหลืออยู่ 50% **ภาพที่ 2.17** และ **ภาพที่ 2.18**



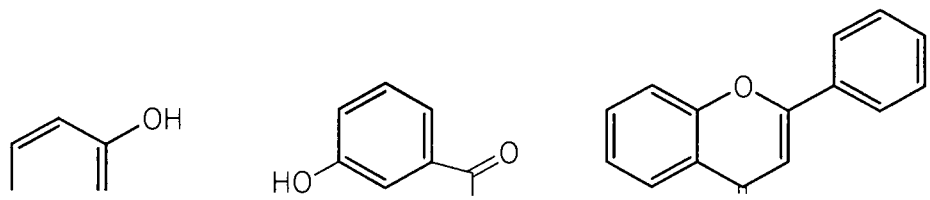
ภาพที่ 2.17 DPPH assay



ภาพที่ 2.18 กราฟของการทดสอบ DPPH

2.7 สารประกอบฟีนอลิก (พัชรพร แซ่หยาง, 2559 และ Krishnaiah et al. 2015)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) มีลักษณะและสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันไป แต่มีโครงสร้างเคมีพื้นฐานประกอบด้วยวงอะโรมาติก (aromatic ring) อาจมีจำนวนหนึ่งวงหรือมากกว่าและหมู่ไฮดรกซิล (hydroxyl group; OH) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ หรือมากกว่านั้น ซึ่งอาจจะอยู่ในรูป –OH อิสระ หรือจับกับสารอื่นในรูปของอีเทอร์ เอสเทอร์ หรือไกลโคไซด์ จึงจัดเป็นอนุพันธ์ของฟีนอล และเรียกรวมๆว่า “สารประกอบฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอลิก” หรือ “สารโพลีฟีนอล” **ดังภาพที่ 2.19** มีคุณสมบัติละลายน้ำได้เล็กน้อยและสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ พบได้ทั่วไปในพืชหลากหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง และชา เป็นสารมีสีตั้งแต่สีเหลือง สีแดง สีม่วง หรือสีม่วง นอกจากให้สีสันแก่พืชแล้ว สารประกอบฟีนอกลิกบางชนิดในพืชยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ป้องกันโรคมะเร็ง ลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด และตัวต้านออกซิเดชัน เป็นต้น



Phenols Phenolic acids phenylbenzo-γ-pyrone

ภาพที่ 2.19 ตัวอย่างโครงสร้างเคมีพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพราะเมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการ delocalize ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาอื่นต่อไปหรือที่เรียกว่าการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังสมการ

$$\text{Flavonoid-OH} + R^{\cdot} \longrightarrow \text{Flavonoid-O}^{\cdot} + RH$$

โดยที่ Flavonoid-OH = สารฟลาโวนอยด์

$R^{\cdot}$ = อนุมูลอิสระในร่างกาย

Flavonoid-$O^{\cdot}$ = อนุมูลฟีนอกซิล

นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิก สามารถทำหน้าที่ช่วยให้วิตามินอี คืนสภาพ (vitamin-E regeneration) โดยไปรีดิวซ์อนุมูล α-tocopheryl หรืออนุมูลในรูปอื่นๆของวิตามินอี ให้กลับไปเป็นโทโคเฟอรอล ที่สามารถทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์ได้ดังเดิม

$$\alpha\text{-tocopheryl-OH} + R^{\cdot} \longrightarrow \alpha\text{-tocopheryl-O}^{\cdot} + RH$$

$$\alpha\text{-tocopheryl-O}^{\cdot} + \text{Flavonoid-OH} \longrightarrow \alpha\text{-tocopheryl-OH} + \text{Flavonoid-O}^{\cdot}$$

จากการสืบค้นงานวิจัยทำให้ทราบว่าต้นยอบ้าน *Morinda citrifolia* นั้นมีความน่าสนใจทั้งชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพ และยังมีรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ลำต้น และราก เนื่องจากยังไม่มีรายงานผลการเปรียบเทียบของพืชจากทั้งสามส่วนนี้มาก่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกส่วนของยอบ้าน อีกทั้งยังเป็นองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสุขภาพหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) บริษัท BUCHI (Thailand) รุ่น Rotavaporc® R-300
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader) บริษัท BMG LABTECH รุ่น SPECTRO star Nano
3. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler-Toledo New Classic MS
4. เครื่องบดพืชตัวอย่าง
5. เครื่องให้ความร้อนแบบเตาหลุม
6. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette) บริษัท Eppendorf รุ่น Research plus
7. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยน้ำ (water-steam distillator)
8. ชุดสกัดด้วยตัวทำละลาย (Soxhlet extractor)

3.1.2 อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Beaker)
2. กรวยสกัด (Separatory funnel) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. กรวยกรอง (Filter funnel)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
5. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
6. ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (vial)
7. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
8. หลอดหยด (Dropper)
9. แท่งแก้ว (Stirring rod)
10. ช้อนตักสาร (Spatula)
11. แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
12. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
13. สำลี
14. จานหลุม (96-well plate)

15. Microcentrifuge tube 1.5 ml

3.1.3 สารเคมี

1. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH) บริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน ประเทศไทย

2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. Butylated hydroxyl toluene (BHT), $C_{15}H_{24}O$ บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. Sodium Sulfate Anhydrous, Na_2SO_4 บริษัท Merck ประเทศ เยอรมนี

5. วิตามินซี (Ascorbic acid) บริษัท Merck ประเทศ เยอรมนี

6. เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}) บริษัท อาร์ซีไอ แล็บแสกน ประเทศไทย

7. น้ำ DI (Deionized water)

8. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) บริษัท ทีทีเค ซายแอนซ์

9. แผ่นเพลต TLC plate silica gel 60 F_{254} (Thin layer chromatography)

10. อะซิติลโคลีน ไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

11. อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

12. บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส butyrylcholinesterase บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

13. DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

14. ทาคริน (Tacrine) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

15. ทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer pH 7.5)

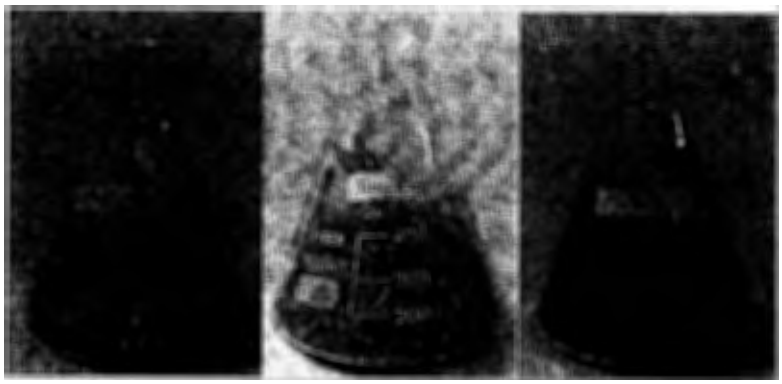
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรยอบ้าน

เก็บตัวอย่างแห้งตามวิธีของก่องกานดาและวรดลต์ (2559) ปี 2560 ณ ตำบล หนองแม่แตง อำเภอไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชร ดำเนินการตรวจสอบเอกลักษณ์และระบุชนิดของพืชอัดแห้งโดย ผศ.ดร.กาญจนา ธนนพคุณ มีเลข Voucher specimen QBG. NO. 105894 และเก็บรักษาตัวอย่างพืชอัดแห้งไว้ ณ ห้องเก็บรวบรวมพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และหอพรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างยอบ้านก่อนการสกัด

นำตัวอย่างราก ลำต้น และใบยอบ้านจากตำบลหนองแม่แตง อำเภอไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชร ปี พ.ศ.2560 มาตากแห้งที่อุณหภูมิห้องในบริเวณที่อากาศถ่ายเทสะดวกเพื่อป้องกันสารสำคัญสลายตัว จากนั้นบดพืชด้วยเครื่องบดอย่างหยาบ

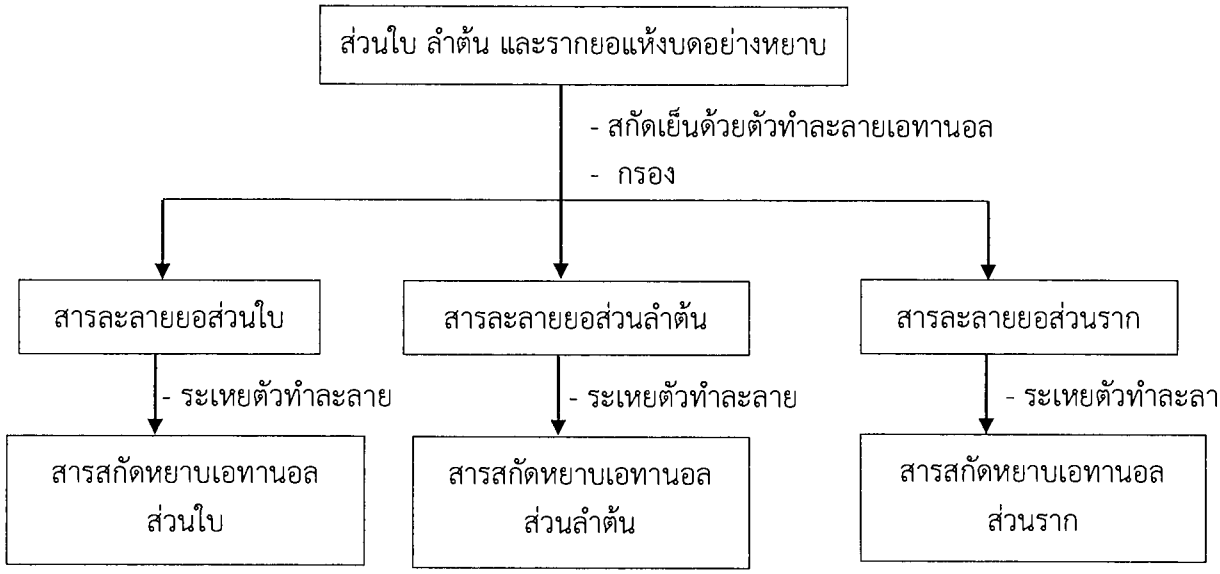


ภาพที่ 3.1 ลักษณะยอบ้าน ส่วนราก ลำต้น และใบก่อนทำการสกัดเย็น

3.2.3 การสกัดยอบ้านด้วยวิธีการสกัดเย็น (maceration) โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ

ตัวทำละลายเอทานอล

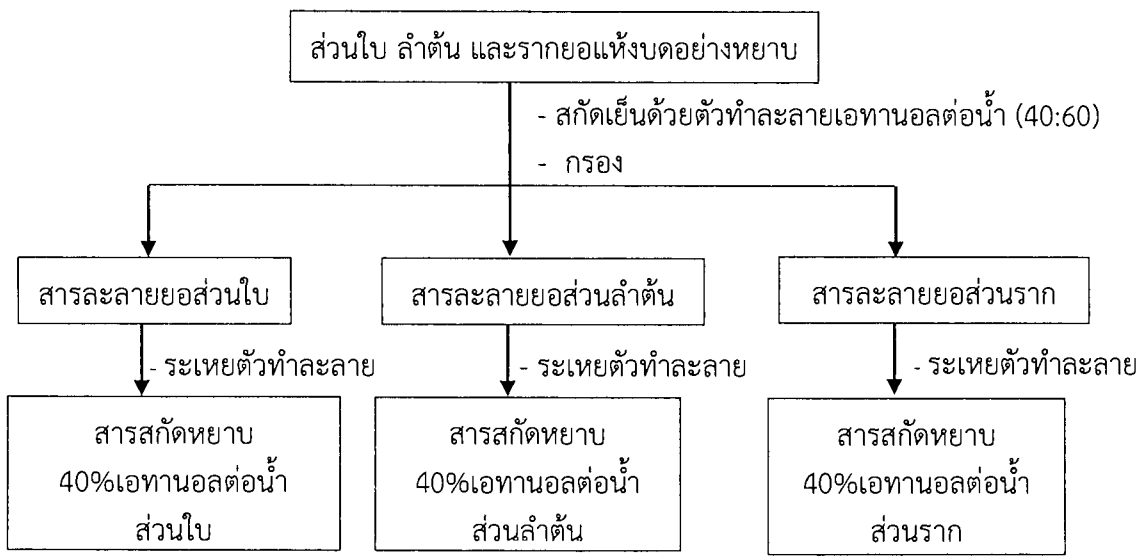
นำยอบ้านแห้งบดละเอียด ส่วนใบ 23.65 g ลำต้น 46.22 g และราก 30.07 g ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมตัวทำละลายเอทานอลจนท่วมพืชแล้วปิดปากภาชนะให้สนิททิ้งที่ไว้อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งกวนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วนำกากเดิมมาสกัดซ้ำโดยแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลใหม่อีกครั้ง จนกระทั่งสารสกัดใสไม่มีสี นำสารละลายเอทานอลของแต่ละส่วนสกัดยอบ้านมาระเหยด้วยเครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (Rotary reduced pressure evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเอทานอลส่วนใบ (ร้อยละ 7.32 โดยน้ำหนัก) ส่วนลำต้น (ร้อยละ 3.92 โดยน้ำหนัก) และส่วนราก (ร้อยละ 4.76 โดยน้ำหนัก) **ดังภาพที่ 3.2** เก็บสารสกัดหยาบทั้งหมดในขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และbutyrylcholinesterase



ภาพที่ 3.2 การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยเอทานอลโดยวิธีการสกัดเย็น

ตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำ (40:60)

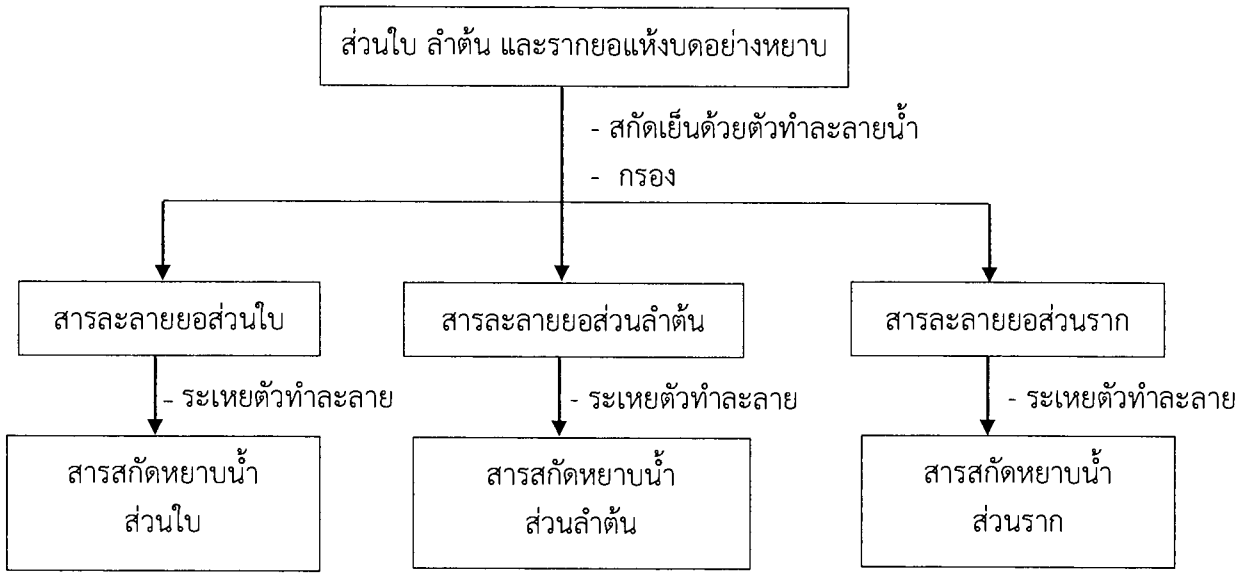
นำยอบ้านแห้งบดละเอียด ส่วนใบ 25.60 g ลำต้น 30.73 g และราก 30.05 g ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมตัวทำละลายเอทานอลต่อน้ำจนท่วมพืช ทำตามวิธีการสกัดด้วยตัวทำลายเอทานอล จะได้สารสกัดหยาบเอทานอลต่อน้ำ ส่วนใบ (ร้อยละ 10.63 โดยน้ำหนัก) ส่วนลำต้น (ร้อยละ 3.25 โดยน้ำหนัก) และส่วนราก (ร้อยละ 7.69 โดยน้ำหนัก) **ดังภาพที่ 3.3** เก็บสารสกัดหยาบทั้งหมดในขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และbutyrylcholinesterase



ภาพที่ 3.3 การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยเอทานอลต่อน้ำโดยวิธีการสกัดเย็น

ตัวทำละลายน้ำ

นำยอบ้านแห้งบดละเอียด ส่วนใบ 25.65 g ลำต้น 30.94 g และราก 30.03 g ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมตัวทำละลายน้ำจนท่วมพืช ทำตามวิธีการสกัดด้วยตัวทำลายเอทานอล จะได้สารสกัดหยาบน้ำ ส่วนใบ (ร้อยละ 10.92 โดยน้ำหนัก) ส่วนลำต้น (ร้อยละ 3.78 โดยน้ำหนัก) และส่วนราก (ร้อยละ 6.26 โดยน้ำหนัก) **ดังภาพที่ 3.4** เก็บสารสกัดหยาบทั้งหมดในขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase



ภาพที่ 3.4 การสกัดยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และรากด้วยน้ำโดยวิธีการสกัดเย็น

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยอบ้าน ส่วนใบ ลำต้น ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ เชิงคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นโดยวิธี TLC (Thin layer chromatography) ทำการทดสอบตามวิธีของ Ash, Priest and Collins (1994)

เป็นการตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อดูว่าสารสกัดหยาบยอบ้านทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือไม่ สังเกตได้จากการฟอกจากสีของสารละลาย DPPH ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

1. เตรียมสารละลาย 0.2% DPPH ในเมทานอล
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน (ascorbic acid) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL ในเมทานอล
3. นำสารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดหยาบเอทานอลต่อน้ำ และสารสกัดหยาบน้ำ ส่วนใบ ลำต้น และราก ละลายด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL ในเมทานอล

4. จุดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานบนแผ่น TLC จากนั้นนำ TLC chromatogram ที่ได้ป้ายด้วยสารละลาย DPPH ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏการฟอกจากสีของ DPPH ทำให้สีม่วงของสารละลาย DPPH หายไปเป็นจุดสีเหลืองเกิดขึ้น

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยอบ้าน ส่วนใบ ลำต้น ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ เชิงปริมาณวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay ทำการทดสอบตามวิธีของ Yen และ Hsieh (1997)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging โดยใช้ BHT และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารละลาย DPPH เป็นสารละลายสีม่วง มีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวส์กลายเป็น DPPH-H เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงกลายเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรมีค่าลดลง

3.4.1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน BHT และวิตามินซี

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 10 ความเข้มข้น ได้ 2.00, 1.00, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.00780 และ 0.00390 mg/mL ตามลำดับ ในเมทานอล

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 μL ลงในช่องของ microplate ความเข้มข้นละ 3 ช่อง

3. เติมสารละลาย DPPH 0.3 mM ในเมทานอล (ชั่งสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ประมาณ 5.9 mg ละลายในเมทานอล 50 mL) ปริมาตร 200 μL ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

4. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลายแบงก์ (blank solution)

6. คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล (% radical scavenging) จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ radical scavenging} = (1-(A_{sample}/A_{control})*100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารทดสอบที่ผสมกับ DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวทำละลายที่ผสมกับ DPPH

7. ทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ % radical scavenging พร้อมทั้งคำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50%)

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ลำต้น และ ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ

1. นำสารสกัดที่แสดงผลการทดสอบเชิงคุณภาพเบื้องต้นว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 20.0, 10.0, 5.00, 2.50, 1.25 และ 0.625 mg/mL ในเอทานอล

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 μL ลงในช่องของ microplate ความเข้มข้นละ 3 ช่อง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH 200 μL ลงไปพร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลายแบงก์ (blank solution)

5. คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล (% radical scavenging) จากสูตรคำนวณดังหัวข้อ **3.4.1(6)**

6. ทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging พร้อมทั้งคำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50%)

3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเอทานอล สารสกัดเอทานอลต่อน้ำ และสารสกัดน้ำของยอบ้านส่วนใบ ลำต้น และราก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ทำการทดสอบตามวิธีของ Singleton และ Rossi (1965) ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Calibration curve) ของสารละลายกรดแกลลิก

1. เตรียมสารละลายแกลลิกเข้มข้น 500 μg/mL (stock solution) ปริมาตร 10 mL โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำสารละลายเจือจาง (dilute a solution) ให้มีความเข้มข้น 400, 300, 200, 100, 50 และ 25 μg/mL ปริมาตร 2 mL

2. ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 mL ใส่ในขวด vial เติม Folin-Cioculteu reagent (10% v/v) ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% w/v) 4 mL ผสมให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4. นำค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ลำต้น และ ราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ

1. นำสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 500 µL ใส่ในขวด vial เติม Folin- Cioculteu reagent (10% v/v) ปริมาตร 2.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% w/v) 2 mL ผสมให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4. นำค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) และคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 g (Gallic acid equivalents, mgGAE/g dried extract)

3.6 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (Modified Ellman'coloric method)

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method เป็นการศึกษาใน 96-well plate โดยเริ่มจากเติมสารละลาย 20 mM tacrine (ยาที่ใช้ในปัจจุบัน, positive control) หรือ สารสกัดยอบ้าน ที่ความเข้มข้มต่าง ๆ (0- 2,500 µg/ml) 25 µl ร่วมกับ 0.3 unit acetylcholinesterase 25 µl ทำการบ่มโดยเครื่อง incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 1 mM acetylthiocholine iodide 25 µl และ 3 mM DTNB 125 µl ทำการบ่มโดยเครื่อง incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 412 nm เพื่อคำนวณค่า %inhibition (Ellman et al., 1961)

3.7 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase (Modified Ellman'coloric method)

เป็นการศึกษาใน 96-well plate โดยเริ่มจากเติมสารละลาย 20 mM tacrine (ยาที่ใช้ในปัจจุบัน, positive control) หรือ สารสกัดยอบ้าน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-2,000 µg/ml) 25 µl ร่วมกับ 0.3 unit butyrylcholinesterase 25 µl ทำการบ่มโดยเครื่อง incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 2 mM S-butyrylthiocholine iodide 25 µl และ 3 mM DTNB

125 µl ทำการบ่มโดยเครื่อง incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 412 nm เพื่อคำนวณค่า %inhibition (Ellman et al., 1961)

3.8 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียน manuscript และรูปเล่มรายงานผลการวิจัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดยอบ้าน (*Morinda citrifolia*) ด้วยวิธีการหมัก (Maceration)

ทำการสกัดยอบ้าน (*Morinda citrifolia*) แห้งบดละเอียด จากส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนราก ที่เก็บจาก อ.ไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชรด้วยเอทานอล เอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 40:60 และน้ำ โดยวิธีการหมัก (Maceration) จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extracts) ของยอบ้านจากทุกส่วนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ทั้งหมด 9 ชนิด โดยมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง**ดังตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.1** จากนั้นสารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยวิธี TLC และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดีที่สุด และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และbutyrylcholinesterase

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล เอทานอลและน้ำ และน้ำ

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ส่วนของพืช	ลักษณะทางกายภาพ
สารสกัดเอทานอล	ใบ ลำต้น ราก	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม
สารสกัดเอทานอลและน้ำ อัตราส่วน (40:60)	ใบ ลำต้น ราก	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
สารสกัดน้ำ	ใบ ลำต้น ราก	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของสารสกัดหยาบยอบ้านต่อน้ำหนักพืชแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน

ตัวทำละลายที่ใช้สารสกัด	น้ำหนักของพืชแห้ง (กรัม)			น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)			ร้อยละของผลผลิต		
	ใบ	ลำต้น	ราก	ใบ	ลำต้น	ราก	ใบ	ลำต้น	ราก
สารสกัดเอทานอล	23.65	46.22	30.07	1.73	1.81	1.43	7.32	3.92	4.76
สารสกัดเอทานอลและน้ำ (40:60)	25.60	30.73	30.05	2.72	1.00	2.31	10.63	3.25	7.69
สารสกัดน้ำ	25.65	30.94	30.03	2.80	1.17	1.88	10.92	3.78	6.26

สารสกัดหยาบเอทานอล

สารสกัดหยาบเอทานอลและน้ำ

สารสกัดหยาบน้ำ

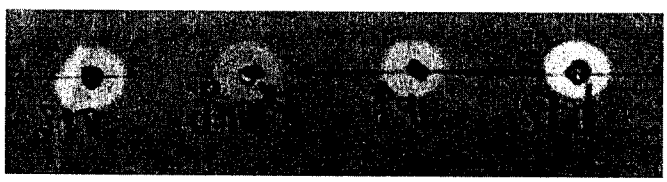
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical (DPPH) เชิงคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC

จากการทำ TLC ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเบื้องต้น เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ คือวิตามินซี พบว่า TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบยอบ้าน ส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนรากในเอทานอล เอทานอลและน้ำ และน้ำ เมื่อสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH เกิดการฟอกจางสีม่วงบนแผ่น TLC กลายเป็นสีเหลือง เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานแสดงว่าสารสกัดหยาบดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH **ดังภาพที่ 4.2 -4.4**

ภาพที่ 4.2 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเอทานอล สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH

ภาพที่ 4.3 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบเอทานอลต่อน้ำ สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH



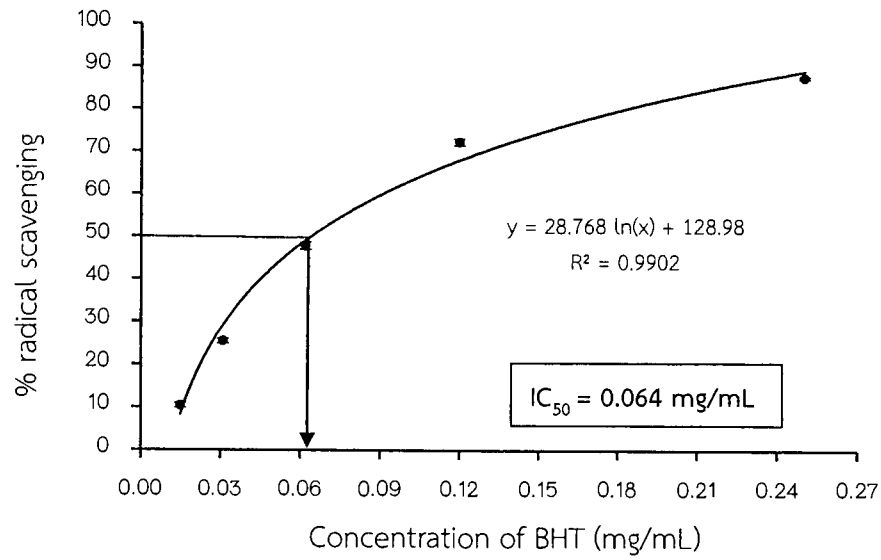
ภาพที่ 4.4 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบน้ำ สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

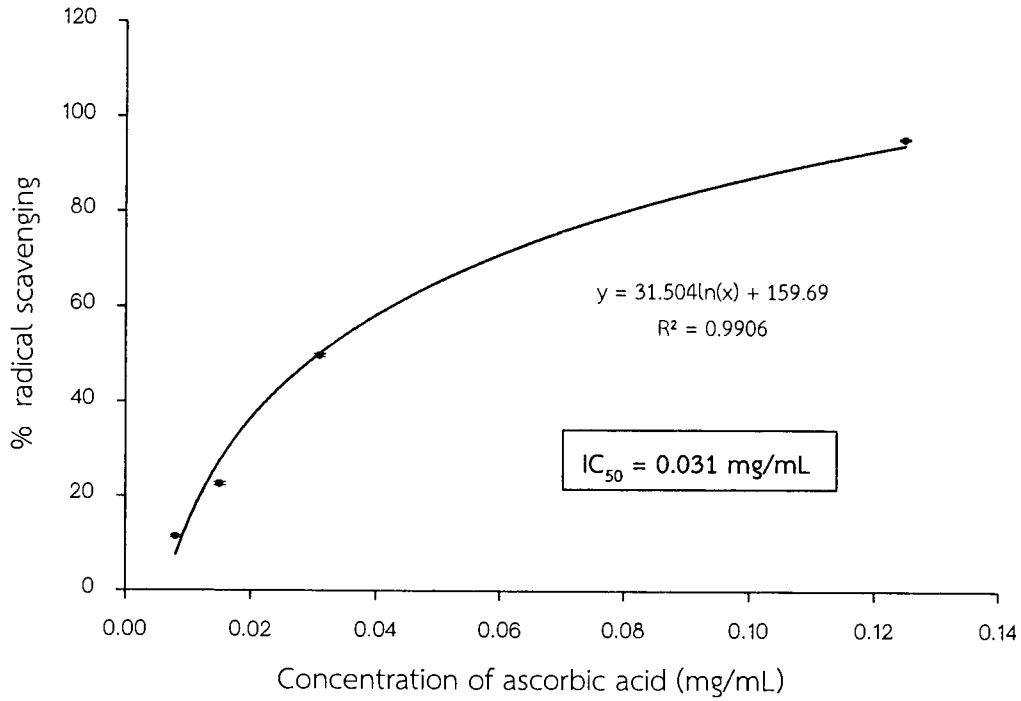
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ตามวิธีของ Yen และ Hsieh (1997) โดยใช้ BHT และ วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวส์กลายเป็น DPPH-H เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงกลายเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรมีค่าลดลง ได้ผลการทดลองเป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) **ดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.5-4.6**

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารมาตรฐานวิตามินซีกับ BHT

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mg/mL)	% radical scavenging			radical scavenging เฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
BHT	0.250	87.56	87.27	87.82	87.5	±0.28
	0.125	71.84	71.71	73.10	72.21	±0.77
	0.062	47.34	47.07	48.72	47.71	±0.89
	0.031	24.96	25.27	26.00	25.41	±0.54
	0.016	9.86	10.33	10.96	10.39	±0.55
	0.008	2.21	1.48	2.26	1.98	±0.44
	0.004	-	-	-	-	-
วิตามินซี	0.250	95.58	95.53	95.53	95.55	±0.03
	0.125	95.62	95.44	95.31	95.46	±0.16
	0.062	92.31	93.97	93.92	93.40	±0.94
	0.031	50.27	49.69	49.69	49.88	±0.34
	0.016	22.25	22.74	22.83	22.61	±0.31
	0.008	11.71	11.17	11.48	11.45	±0.27
	0.004	3.31	3.35	3.35	3.34	±0.27



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของ BHT



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของ ascorbic acid

ตัวอย่าง การคำนวณค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT

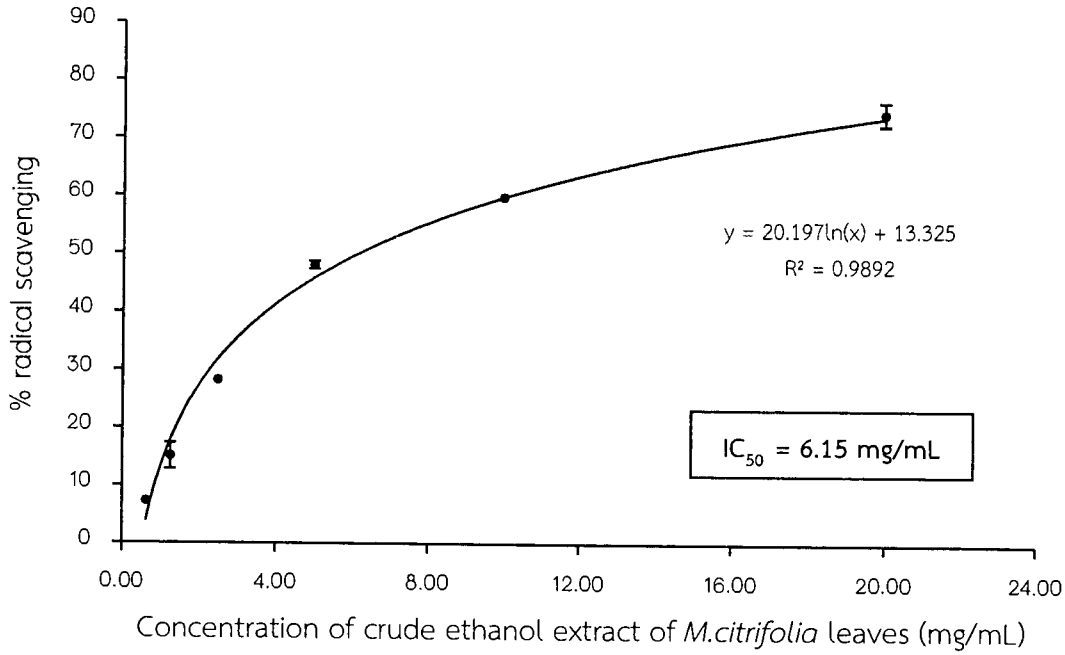
จากสมการ	$y = 28.768 \ln(x) + 128.98$
แทนค่า Y เท่ากับ 50 จะได้	$50 = 28.768 \ln(x) + 128.98$
จะได้	$x = 0.064$

เพราะฉะนั้นค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT มีค่าเท่ากับ 0.064 mg/mL

หลังจากนั้นทำการทดสอบปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนใบ ลำต้น และราก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40%เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ ได้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ **ดังตารางที่ 4.4-4.6** และ**ภาพที่ 4.6-4.15**

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ ลำต้น และราก

สารสกัดเอทานอล	ความเข้มข้น (mg/mL)	% radical scavenging			% radical scavenging เฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ใบ	20	74.47	72.43	76.54	74.48	±2.06
	10	59.98	61.18	61.21	60.79	±0.70
	5	50.65	46.83	46.66	48.05	±2.26
	2.5	27.91	26.95	27.88	27.58	±0.55
	1.25	16.74	13.51	16.04	15.43	±1.70
	0.625	5.72	6.89	9.19	7.27	±1.77
ลำต้น	20	64.36	64.25	63.08	63.89	±0.71
	10	56.53	56.98	56.70	56.74	±0.23
	5	47.88	49.16	49.89	48.98	±1.02
	2.5	39.67	41.72	40.27	40.55	±1.06
	1.25	31.01	32.71	32.02	31.91	±0.85
	0.625	7.03	6.02	8.75	7.26	±1.38
ราก	20	74.99	75.73	74.80	75.17	±0.49
	10	60.79	61.30	60.44	60.85	±0.43
	5	44.29	44.55	44.55	44.46	±0.15
	2.5	31.66	31.60	31.56	31.60	±0.05
	1.25	17.60	16.88	17.02	17.17	±0.38
	0.625	8.99	9.72	9.20	9.30	±0.38

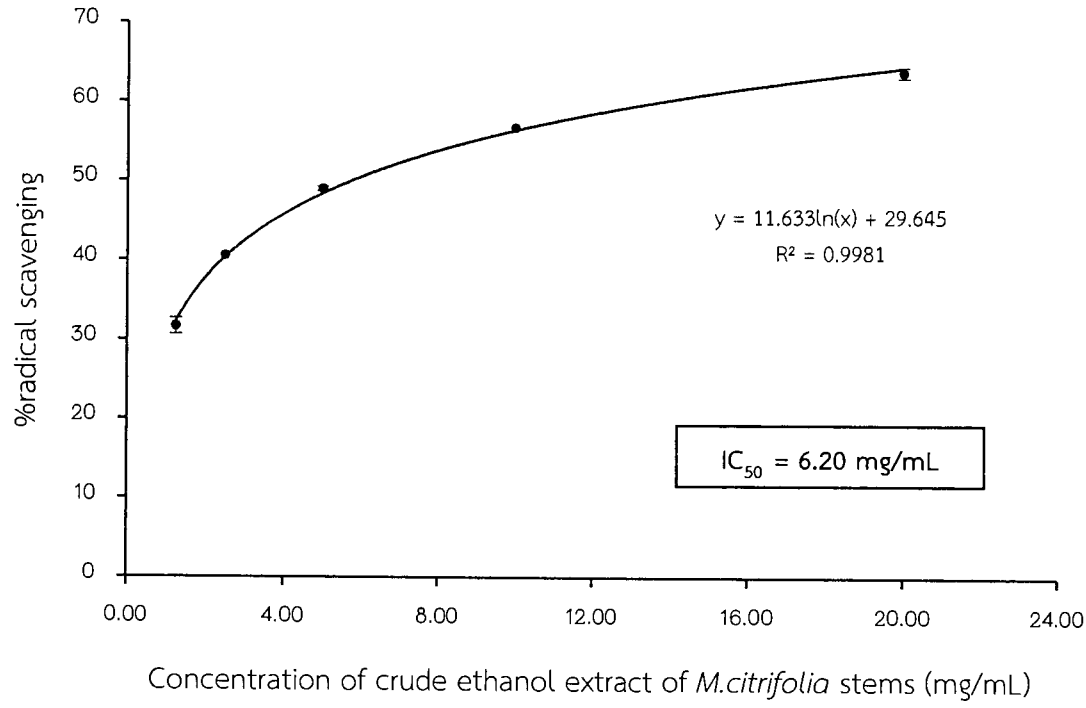


ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วยเอทานอล

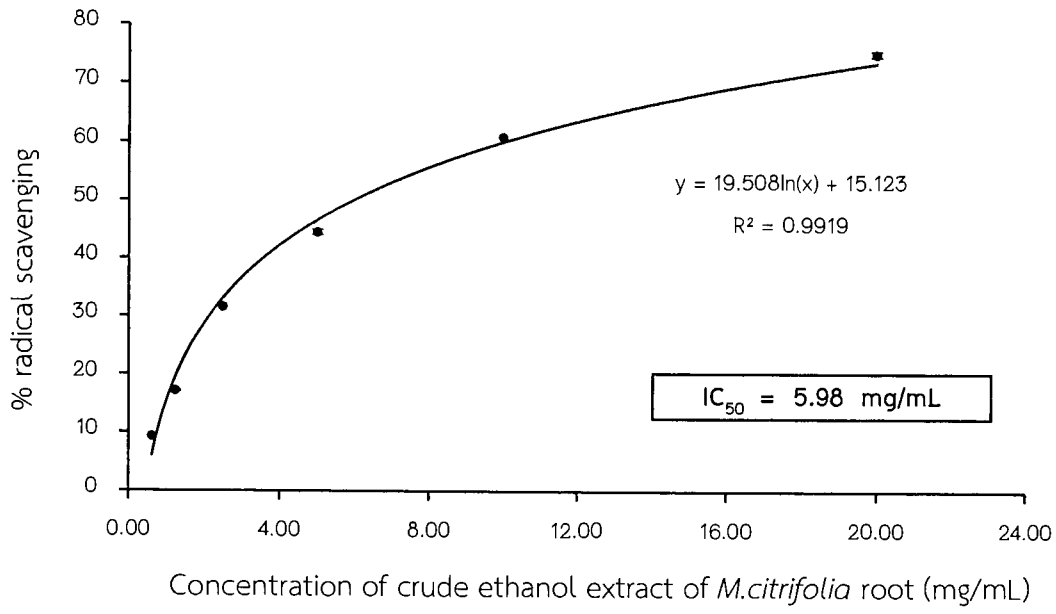
ตัวอย่าง การคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดใบยอบ้านด้วยเอทานอล

จากสมการ	$y = 20.197\ln(x) + 13.325$
แทนค่า Y เท่ากับ 50 จะได้	$50 = 20.197\ln(x) + 13.325$
จะได้	$x = 6.15$

เพราะฉะนั้นค่า IC_{50} ของสารสกัดใบยอบ้านด้วยเอทานอลมีค่าเท่ากับ 6.15 mg/mL



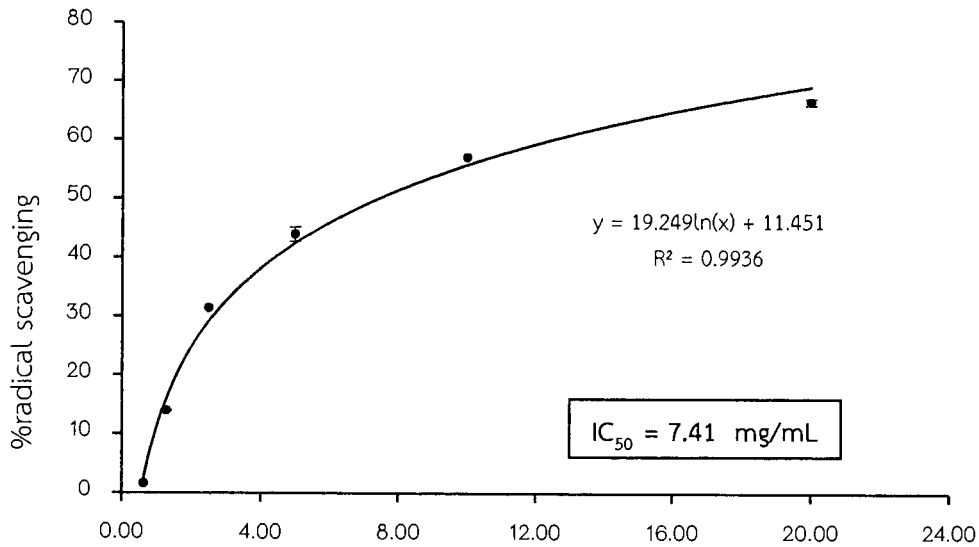
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยเอทานอล



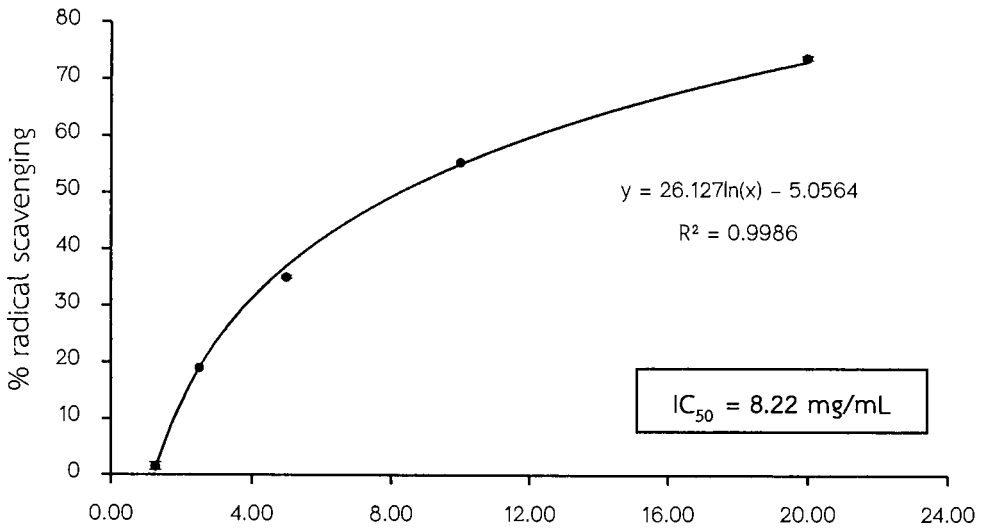
ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากรากยอบ้านด้วยเอทานอล

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) ของสารสกัดเอทานอลและน้ำ (40:60) จากส่วนใบ ลำต้น และราก

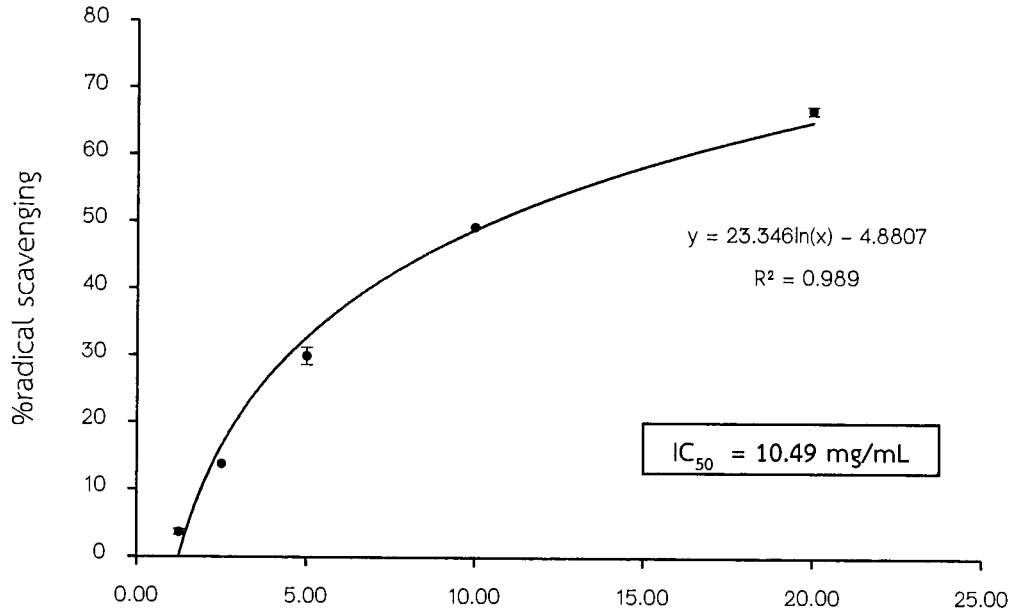
สารสกัด 40% เอทานอลต่อน้ำ	ความเข้มข้น (mg/mL)	% radical scavenging			% radical scavengin เฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ใบ	20	66.09	66.43	67.18	66.57	±0.56
	10	57.03	55.91	58.37	57.10	±1.23
	5	43.89	44.11	43.89	43.96	±0.12
	2.5	31.72	31.58	30.97	31.42	±0.40
	1.25	13.61	13.82	14.33	13.92	±0.37
	0.625	1.57	2.05	1.14	1.58	±0.45
ลำต้น	20	73.43	74.13	74.10	73.89	±0.39
	10	55.61	55.13	55.51	55.42	±0.25
	5	35.87	34.77	34.64	35.09	±0.67
	2.5	26.00	15.56	15.59	19.05	±6.02
	1.25	1.98	1.21	1.37	1.52	±0.41
	0.625	-	-	-	-	-
ราก	20	66.10	67.38	66.92	66.80	±0.65
	10	50.42	47.86	49.60	49.29	±1.30
	5	29.47	30.06	30.29	29.94	±0.42
	2.5	12.46	15.42	13.48	13.79	±1.51
	1.25	3.52	3.24	4.18	3.64	±0.49
	0.625	-	-	-	-	-



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วย 40%เอทานอลต่อน้ำ



ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดลำต้นยอบ้านด้วยเอทานอลต่อน้ำ (40:60)

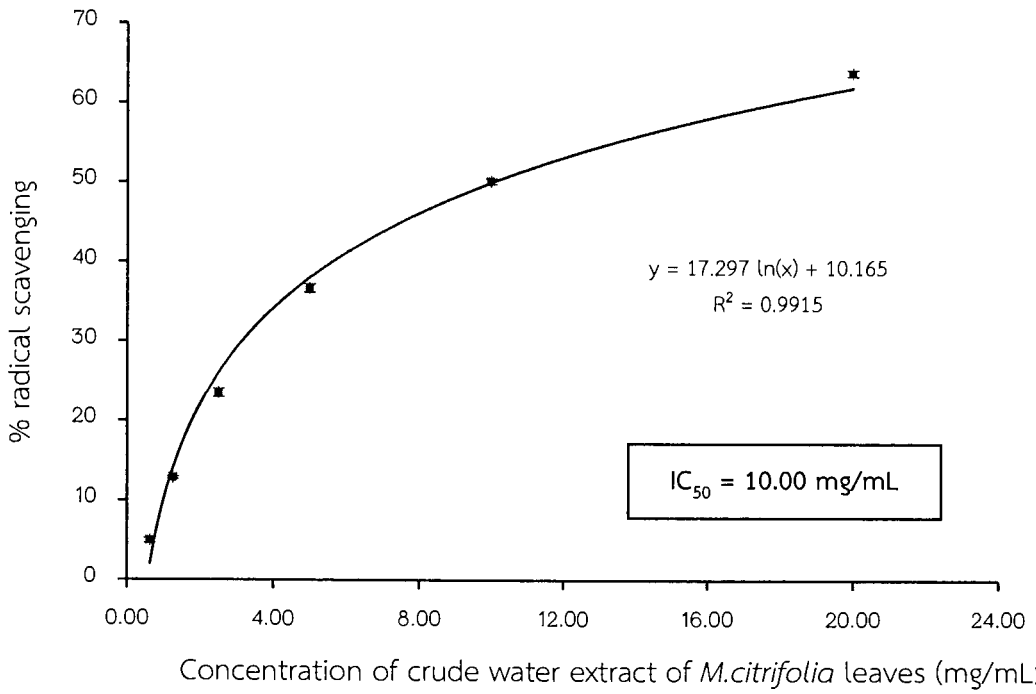


ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดรากยอบ้านด้วยเอทานอลต่อน้ำ (40:60)

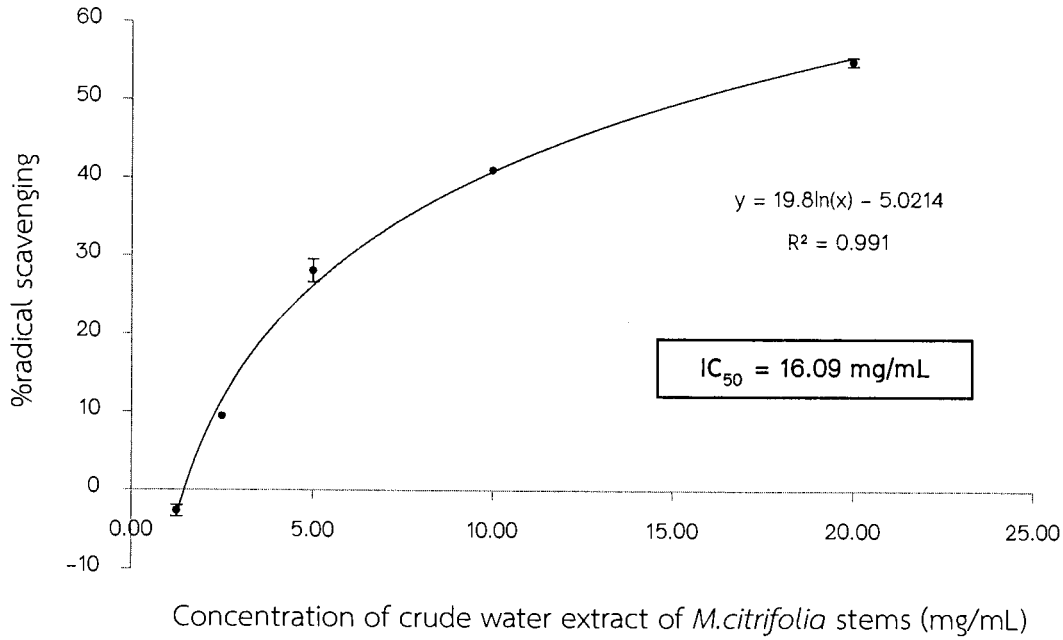
ตารางที่ 4.6 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของสารสกัดน้ำ ส่วนใบ ลำต้น และราก

สารสกัดน้ำ	ความเข้มข้น (mg/mL)	% radical scavenging			% radical scavenging เฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ใบ	20	64.08	64.13	63.36	63.86	±0.43
	10	50.56	49.95	49.97	50.16	±0.35
	5	36.56	36.26	37.34	36.72	±0.55
	2.5	23.53	24.04	22.96	23.51	±0.54
	1.25	12.94	12.65	12.89	12.83	±0.16
	0.625	4.64	5.07	5.21	4.97	±0.30

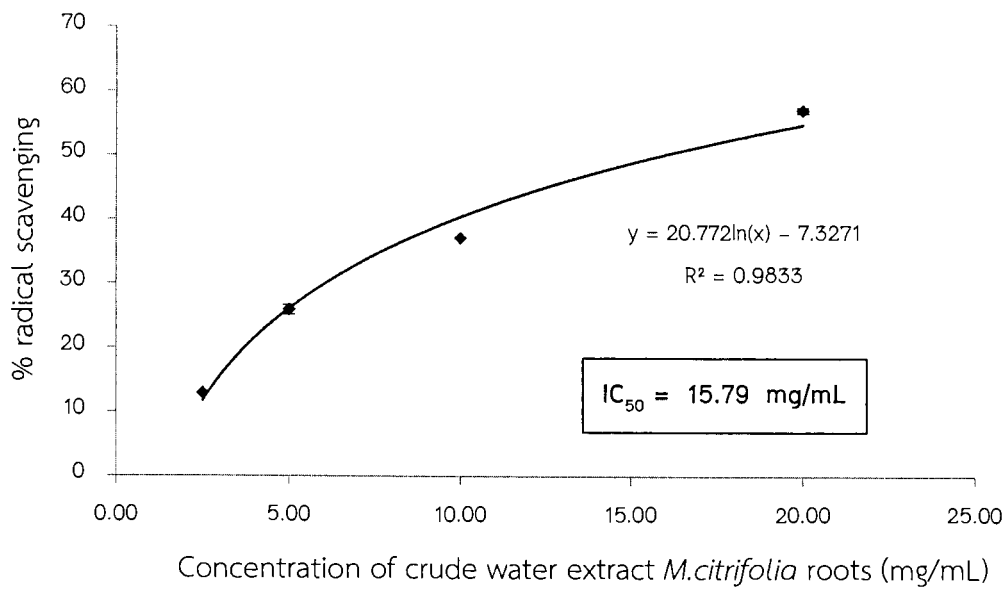
ลำต้น	20	55.45	55.19	54.36	55.00	±0.57
	10	39.46	41.30	42.39	41.05	±1.48
	5	28.60	27.31	28.47	28.13	±0.72
	2.5	8.77	9.52	10.09	9.46	±0.66
	1.25	-	-	-	-	-
	0.625	-	-	-	-	-
ราก	20	57.56	57.23	56.72	57.17	±0.42
	10	38.03	36.59	36.96	37.19	±0.75
	5	26.32	25.60	25.83	25.92	±0.37
	2.5	14.01	12.50	12.29	12.93	±0.94
	1.25	-	-	-	-	-
	0.625	-	-	-	-	-



ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบยอบ้านด้วยน้ำ



ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยน้ำ



ภาพที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดจากรากยอบ้านด้วยน้ำ

จากข้อมูล**ตารางที่ 4.4-4.6** พบว่าสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนรากด้วยตัวทำละลายเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดเอทานอลต่อน้ำ (40:60) และสารสกัดน้ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.15 6.20 และ 5.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ BHT และวิตามินซี ซึ่งมีค่า IC_{50} 0.064 และ 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ **ดังตารางที่ 4.7**

ตารางที่ 4.7 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจาก ส่วนใบ ลำต้น และรากยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน

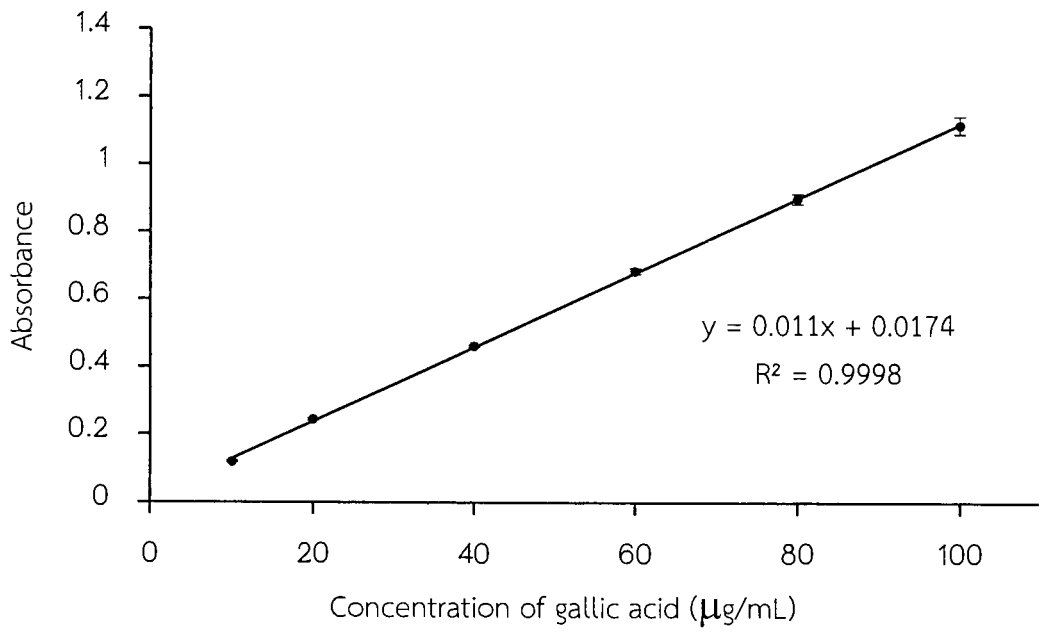
ส่วนของยอบ้าน	ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; IC_{50} (mg/mL)		
	สารสกัดเอทานอล	สารสกัดเอทานอลต่อน้ำ	สารสกัดน้ำ
ใบ	6.15	7.41	10.00
ลำต้น	6.20	8.22	15.26
ราก	5.98	10.49	15.79

4.4 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound content)

ค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิก (gallic acid) ที่เป็นสารมาตรฐาน เข้มข้น 500, 400, 300, 200, 100, 50 และ 25 μg/mL **ดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.16**

ตารางที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความยาวคลื่น 765 nm

ความเข้มข้น (μg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
100	1.1405	1.0953	1.1179	0.026
80	0.9123	0.8868	0.8996	0.015
60	0.6922	0.6781	0.6852	0.008
40	0.4650	0.4591	0.4621	0.003
20	0.2407	0.2468	0.2438	0.004
10	0.1168	0.1209	0.1189	0.002



ภาพที่ 4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก มีสมการเส้นตรง คือ y = 0.011x + 0.0174 และมีค่า R^2 = 0.9998 สามารถนำมาคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนใบ ลำต้น ราก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ เอทานอล เอทานอลต่อน้ำ (40:60) และน้ำ ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม (mgGAE/g dried weight) ดังผลการทดลอง**ตารางที่ 4.9** และ**ภาพที่ 4.17**

ตารางที่ 4.9 ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดส่วนใบ ลำต้น ราก ยอบ้านด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ส่วนของพืช	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เอทานอล	ใบ	5.3	0.7722	0.7566	0.7283
	ลำต้น	5.1	0.2920	0.2913	0.2961
	ราก	5.4	0.8079	0.8109	0.8084
เอทานอลและน้ำ (40:60)	ใบ	5.3	0.7478	0.7523	0.7441
	ลำต้น	5.7	0.4249	0.4146	0.4217
	ราก	5.6	0.4553	0.4619	0.4584
น้ำ	ใบ	5.3	0.7995	0.8012	0.7966
	ลำต้น	5.4	0.4780	0.4805	0.4826
	ราก	5.4	0.4380	0.4433	0.4366

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดรากยอบ้าน

คำนวณจากสมการของกราฟมาตรฐาน (gallic acid) y = 0.011x + 0.0174 แทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง เช่น การคำนวณปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดเอทานอลส่วนราก

จากสมการ $y = 0.011x + 0.0174$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสง

X = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

แทนค่า y จะได้ $0.8079 = 0.011x + 0.0174$

จะได้ $x = 71.86$ μg/mL

เปลี่ยน μg/mL เป็น mg/mL $x = 0.072$ mg/mL

หมายความว่า ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร มีสารสกัดหยาบ 5.4 มิลลิกรัม แสดงว่าตัวอย่างนี้มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.072 mgGAE/Crude extract 5.4 mg หรือ เท่ากับ 0.072 mgGAE/dry plant 0.114 กรัม

การคำนวณปริมาณฟีนอลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง

ชั่งตัวอย่างพืชแห้งส่วนราก 30.07 กรัม ได้สารสกัดหยาบเอทานอล 1.43 กรัม คิดเป็นร้อยละ 4.76 ∴ หมายความว่า สารสกัดหยาบเอทานอล 4.76 กรัม ต่อน้ำหนักพืชแห้ง 100 กรัม ถ้าสารหยาบเอทานอล 0.0054 กรัมต่อน้ำหนักพืชแห้ง (100×0.0054)/4.76 = 0.114 กรัม

คำนวณเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม

น้ำหนักพืชแห้ง 0.114 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.072 กรัม

ถ้าน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ (0.072×1)/0.114

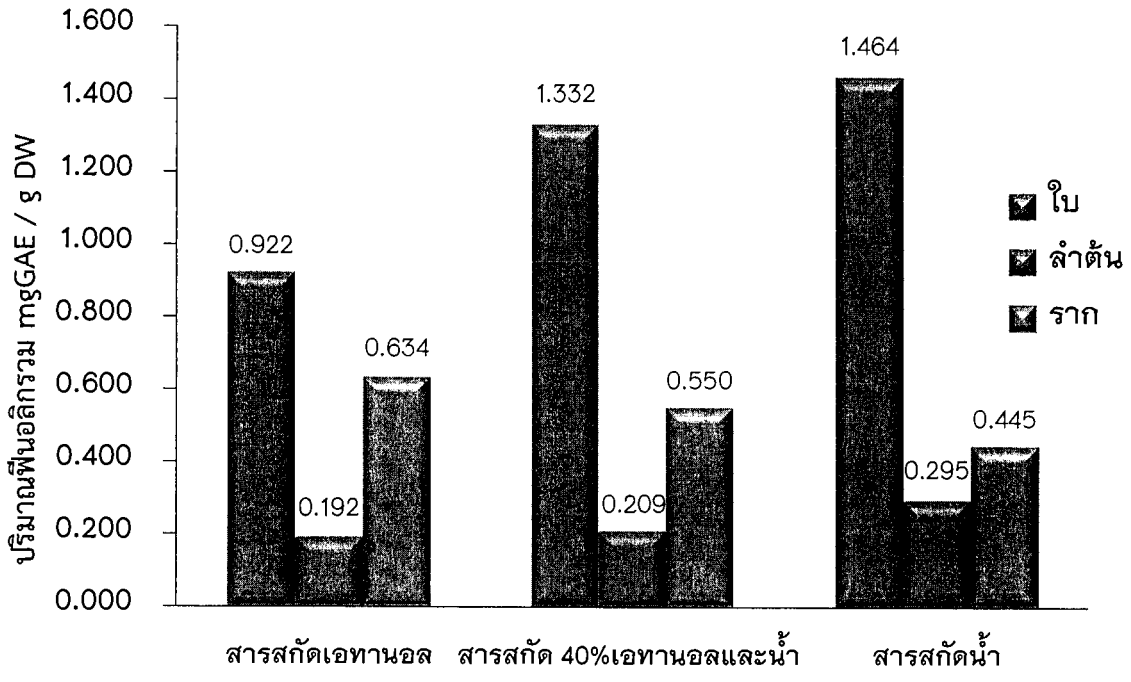
= 0.632 mgGAE/g DW

แสดงว่า สารสกัดรากมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.64 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อพืชแห้ง 1 กรัม

จากนั้นนำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยก็จะได้ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากยอบ้านส่วนราก ส่วนใบ และลำต้น ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

ตารางที่ 4.9 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบยอบ้านส่วนราก ส่วนใบ และลำต้น ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ส่วนของพืช	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณฟีนอลิกรวม mgGAE /g DW			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย±SD
เอทานอล	ใบ	5.3	0.947	0.927	0.891	0.922±0.025
	ลำต้น	5.1	0.192	0.191	0.195	0.192±0.002
	ราก	5.4	0.633	0.635	0.633	0.634±0.001
เอทานอลและน้ำ (40:60)	ใบ	5.3	1.331	1.339	1.324	1.332±0.007
	ลำต้น	5.7	0.211	0.206	0.210	0.209±0.002
	ราก	5.6	0.546	0.555	0.550	0.550±0.003
น้ำ	ใบ	5.3	1.464	1.468	1.459	1.464±0.004
	ลำต้น	5.4	0.293	0.295	0.296	0.295±0.001
	ราก	5.4	0.443	0.449	0.442	0.445±0.003



ภาพที่ 4.17 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดส่วนใบ ลำต้น ราก ยอบ้านด้วยตัวทำลายต่างกัน

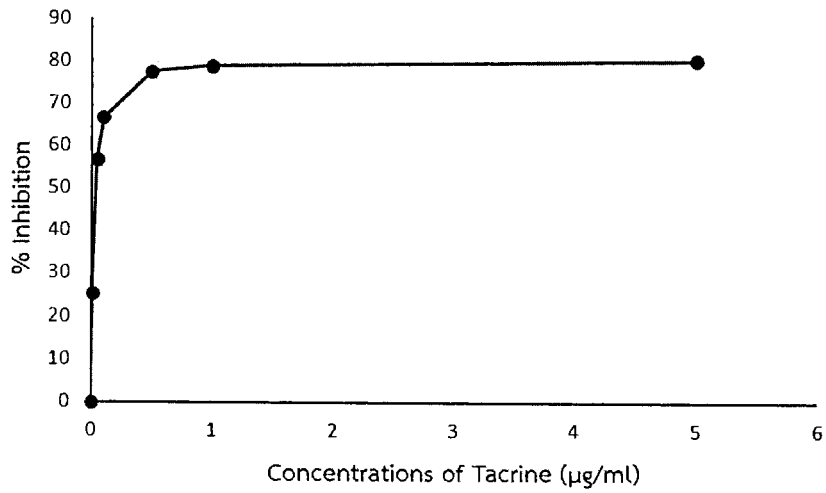
จากผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ส่วนราก และส่วนลำต้น พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (0.922-1.464 mgGAE.g^{-1} DW) รองลงมาได้แก่ สารสกัดส่วนราก (0.445-0.634 mgGAE.g^{-1} DW) และสารสกัดส่วนลำต้น (0.192-0.255 mgGAE.g^{-1} DW) ตามลำดับ

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method

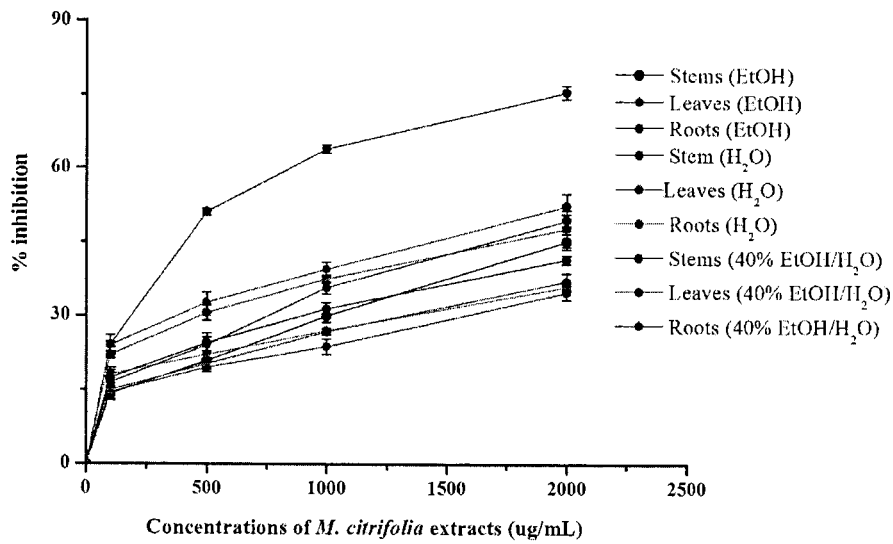
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของ tacrine (0.01-5 µg/mL) และสารสกัดยอบ้านทั้ง 9 ตัวอย่าง (100-2,000 µg/mL) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยค่า %inhibition ของ tacrine คือ 25.15±0.91, 56.71±0.68, 66.69±0.24, 77.50±0.13, 78.87±0.13 และ 80.32±0.14 ตามลำดับ **ดังภาพที่ 4.18** และที่ความเข้มข้นสูงสุด 2,000 µg/mL ของสารสกัดรากยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีค่า %inhibition เท่ากับ 75.66% **ดังภาพที่ 4.19** ซึ่งใกล้เคียงกับ tacrine แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบจากค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดรากยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ tacrine พบว่ามีค่า IC_{50} 454±33.0 µg/ml และ 0.044±0.002 µg/mL ตามลำดับ **ตารางที่ 4.10**

ตารางที่ 4.10 ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของ tacrine และสารสกัดรากของยอบ้าน

สาร	IC_{50}
Tacrine	0.044±0.002 µg/ml
Morinda citrifolia L. root extract	454±33.0 µg/ml



ภาพที่ 4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของ tacrine (positive control) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)



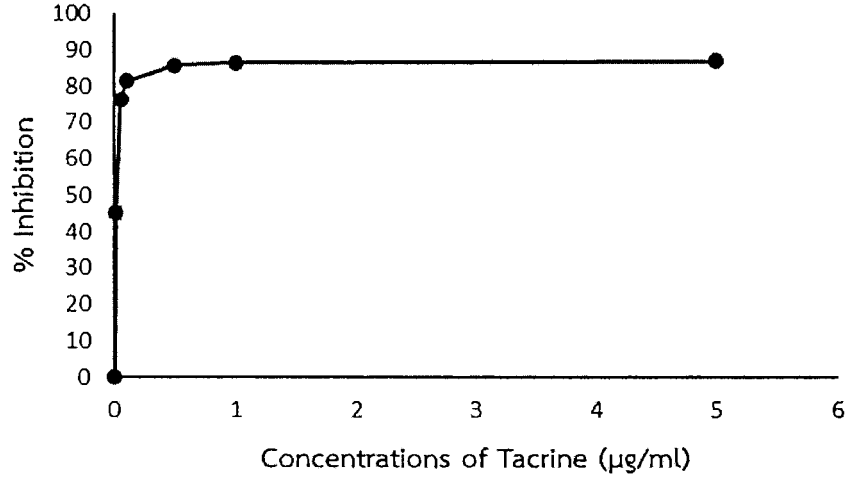
ภาพที่ 4.19 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน 9 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method

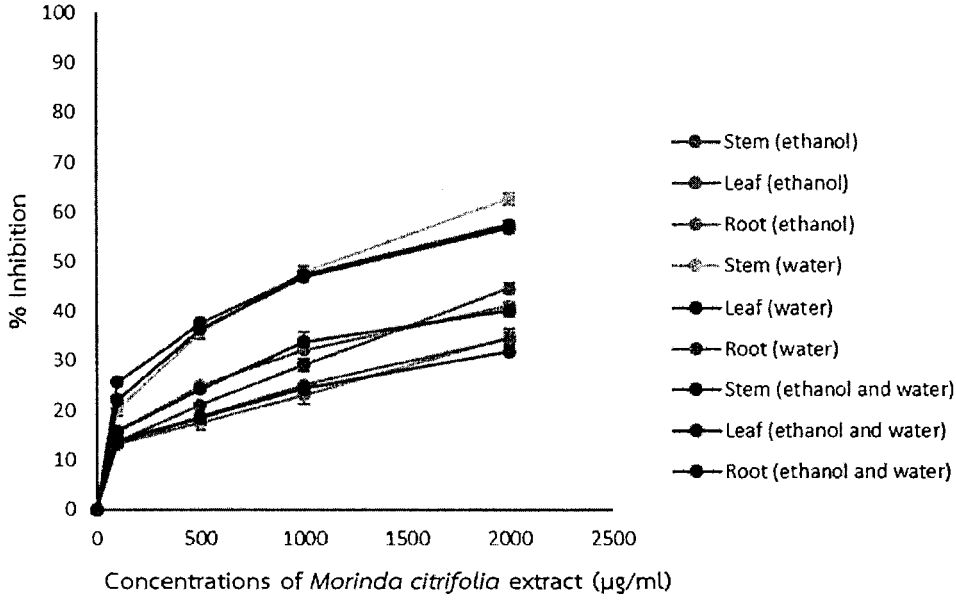
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของ tacrine (0.01-5 µg/mL) และ สารสกัดยอบ้านทั้ง 9 ตัวอย่าง (100-2,000 µg/mL) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยค่า %inhibition ของ tacrine คือ 45.18±1.71, 76.35±0.44, 81.38±0.10, 85.76±0.21, 86.42±0.18 และ 87.00±0.13 ตามลำดับ **ภาพที่ 4.20** และสารสกัดรากยอบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ที่ดีที่สุดมีสามตัวอย่าง นั่นก็คือ สารสกัดต้นยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับน้ำโดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 2,000 µg/ml มีค่า %inhibition เท่ากับ 62.69, 57.52 และ 56.84 ตามลำดับ **ภาพที่ 4.21** เมื่อคำนวณเป็นค่า IC_{50} ของสารสกัดต้นยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับน้ำ และ tacrine พบว่ามีค่า IC_{50} 1,150 µg/mL, 1,250 µg/mL, 1,300 µg/mL และ 0.02 µg/mL ตามลำดับ **ตารางที่ 4.11**

ตารางที่ 4.11 ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของ tacrine และสารสกัดรากของยอบ้าน

สาร	IC_{50}
Tacrine	0.02 µg/mL
Morinda citrifolia L. stem extract (water)	1,150 µg/mL
Morinda citrifolia L. leaf extract (water)	1,250 µg/mL
Morinda citrifolia L. leaf extract (ethanol+water)	1,300 µg/mL



ภาพที่ 4.20 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของ tacrine (positive control) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)



ภาพที่ 4.21 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้าน 9 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Mean±SEM)

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดสารจาก ส่วนใบ ลำต้น และราก ของยอบ้าน ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 40%เอทานอลและน้ำ และน้ำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบทั้งหมด ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase โดยสรุปและอภิปรายผล ดังนี้

5.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกันต่อผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบ

จากการสกัดยอบ้านจากส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนราก ด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน 3 ชนิดตามความมีขั้วของตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอล 40%เอทานอลและน้ำ และน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวดำ ให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 7.32 10.63 และ 10.92 ตามลำดับเมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งรองลงมา สารสกัดจากส่วนราก มีลักษณะของเหลวหนืดสีน้ำตาล (ร้อยละ 4.76 7.69 และ 6.26) และสารสกัดส่วนลำต้น มีลักษณะของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม (ร้อยละ 3.92 3.25 และ3.78) ทั้งนี้อาจเนื่องจากใบมีปริมาณคลอโรฟิลล์อยู่มากซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของสารสกัดหยาบและคลอโรฟิลล์จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วจึงทำให้สารสกัดจากส่วนใบมีปริมาณผลที่ได้สูงกว่าส่วนรากและส่วนลำต้น และพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจะมีปริมาณน้อยกว่าสารสกัดหยาบ 40% เอทานอลและน้ำ และน้ำ แสดงว่าปริมาณสารสกัดจะเพิ่มขึ้นตามสภาพขั้วที่สูงขึ้นของตัวทำละลาย

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฟอกจากสี DPPH ด้วยวิธี TLC

พบว่าสารสกัดหยาบทั้งส่วนใบ ราก และลำต้น ในตัวทำละลายทุกชนิดสามารถฟอกจากสี DPPH ได้ แสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้งส่วนใบ ราก และลำต้นของยอบ้าน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.15 5.98 และ 6.20 ตามลำดับ สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลาย 40% เอทานอลและน้ำ (IC_{50} เท่ากับ 7.41 10.49 และ 8.22 ตามลำดับ) และน้ำ (IC_{50} เท่ากับ 10.00 15.79 และ 15.26 ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ภาเกล้าและชญานิศา (2558) ที่รายงานว่าสารสกัดจากสมุนไพรเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัด 40%เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากชนิดสารสำคัญของยอบ้านที่มีรายงานไว้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อนุพันธ์ของคูมาริน (coumarins) และ อิริดอย์ส (iridoids) เป็นต้น (Kamiya et al., 2005; Wang et al., 2016) โดยสารประกอบกลุ่มดังกล่าวนี้สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากและยังสามารถละลายเอทานอลได้ดี ตามกฎการละลาย

(like dissolves like) จึงส่งผลให้สารสกัดเอทานอลของยอบ้านออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดในตัวทำละลายอื่น ๆ ในส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำหรือสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมาก บางส่วนอาจจะเป็นเกลือหรือสารประกอบมีขั้วมากรวมไปถึงสารจำพวกน้ำตาลออกมาผสมกันอยู่ และโดยส่วนมากสารประกอบจำพวกนี้จะไม่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นั่นหมายความว่า สารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมากเช่นสารสกัดน้ำ หรือ 40% เอทานอล ย่อมน่าจะมีเกลือหรือสารประกอบมีขั้วมากรวมไปถึงสารจำพวกน้ำตาลผสมอยู่ ส่งผลให้ฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารสกัดลดลงเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น

5.4 การทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)

พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (0.922-1.464 mgGAE.g^{-1} DW) รองลงมาได้แก่ สารสกัดส่วนราก (0.445-0.634 mgGAE.g^{-1} DW) และสารสกัดส่วนลำต้น (0.106-0.215 mgGAE.g^{-1} DW) ตามลำดับ เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด โดยทำหน้าที่ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น (Andarwulan et al., 2010, Sowndhararajan & Kang, 2013) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดส่วนใบด้วยตัวทำละลายทั้งสามมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนใบจะให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าส่วนอื่น ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนใบจะมีสารกลุ่มฟีนอล เช่น แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ในปริมาณที่เยอะกว่าส่วนราก และลำต้น รวมทั้งการสกัดด้วยตำทำละลายที่มีสภาพขั้วที่สูงขึ้น จึงมีโอกาสสกัดเอาสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วมากออกมา ส่งผลให้พบปริมาณฟีนอลิกรวมในใบเพิ่มขึ้นส่วนในกรณีของรากและลำต้นปริมาณฟีนอลิกรวม สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วที่สูงขึ้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านด้วย Ellman's method

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ของสารสกัดยอบ้านโดยวิธี Ellman (Ellman et al., 1961) Acetylthiocholine iodide, S-Butyrylthiocholine iodide (สารตั้งต้น) และ DTNB โดยวัดการทำงานของเอนไซม์จากปฏิกิริยาการเกิดสีเหลืองของ thiocholine ที่ทำปฏิกิริยากับ dithiobisnitro benzoate ion พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ของสารสกัดรากของยอบ้านทั้ง 9 ตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดรากยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ดีที่สุด ซึ่งที่ความเข้มข้นสูงสุด 2,000 µg/mL **ภาพที่ 4.19** มีค่า %inhibition เท่ากับ 75.66% ซึ่งใกล้เคียงกับ tacrine **ภาพที่ 4.18** แต่เมื่อเปรียบเทียบจากค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดรากของยอบ้านและ tacrine พบว่ามีค่า IC_{50} 480 µg/mL และ 0.2 µg/mL ตามลำดับ **ตารางที่ 4.10** สำหรับสารสกัดรากยอบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase

ที่ดีที่สุดมีสามตัวอย่าง นั่นก็คือ สารสกัดต้นยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับน้ำโดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 2,000 µg/mL มีค่า %inhibition เท่ากับ 62.69 57.52 และ 56.84 ตามลำดับ **ภาพที่ 4.21** เมื่อคำนวณเป็นค่า IC_{50} ของสารสกัดต้นยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบยอบ้านที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับน้ำ และ tacrine พบว่ามีค่า IC_{50} 1,150 µg/mL 1,250 µg/mL 1,300 µg/mL และ 0.02 µg/mL ตามลำดับ **ตารางที่ 4.11** แต่อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่าสารสกัดรากของยอบ้านนั้นมีค่า IC_{50} ที่มากกว่า tacrine แต่อาจจะมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่ารวมทั้งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดยอบ้านมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ บำรุงสมอง รวมถึงยังมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาท (Torres et al., 2017) โดยในสารสกัดยอบ้านพบสาร phenolic compounds หลายชนิดที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ป้องกันโรคความเสื่อมของระบบประสาท ยกตัวอย่างเช่น rosmainic acid, anthraquinones, aucubin และ scopoletin (Wang and Su, 2001) ในกลุ่ม organic acids เช่น caproic และ caprylic acids (Dittmar, 1993) และในกลุ่ม alkaloids เช่น xeronine (Heinicke, 1985) ซึ่งจากการศึกษาสาร scopoletin และ anthraquinones พบว่าสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase (Mogana , Jin and Wiart , 2013; Jung et al., 2016) และพบว่า rosmainic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรวมกลุ่มกันของ Aβ รวมถึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (Williams et al., 2011) ดังนั้นนอกจากฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase สารสกัดรากยอบ้านอาจจะมีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระป้องกันภาวะ oxidative stress ได้ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 6
ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับระบบตัวทำละลายเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากยอบ้านทั้งส่วนใบ ลำต้น และราก และฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และbutyrylcholineesterase

ในงานวิจัยต่อไปควรทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี เพื่อหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase แล้วทำการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ทางยาหรืออาหารเสริมสุขภาพที่มีผลต่อการบำบัดป้องกันโรคอัลไซเมอร์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต และวรดลต์ แจ่มจำรูญ. (2559). **คู่มือจำแนกพรรณไม้**. กรุงเทพฯ: สวนพฤกษศาสตร์ ป่าไม้สำนักวิจัย การอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช.

ธนาธิป รักศิลป์. (2553). **องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากยอทาม *Morinda pandurifolia* Kuntze และยอป่า *Morinda coreia* Ham.** วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎี บัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรพร แซ่หยาง. (2559). **หาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกดาวเรืองสด.** ปัญหาพิเศษหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(สาขาวิชาเคมี). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2559). **Free radical / อนุมูลอิสระ**, 15 เมษายน 2562. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2254/free-radical.

ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และชญานิศา สุพา. (2558). **ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร.** ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2.* สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภักกำแพงเพชร.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2545). แอนติออกซิแดนท์: สารป้องกันโรคและเสริมสุขภาพ. **วารสารมหาวิทยาลัย มหาสารคาม**, *21*(1): 57-62.

ยอ (2011). เข้าถึงได้จาก https://laongdin.wordpress.com/2011/09/29/ %E0%B8% A2% E0%B8%AD/. (วันที่ค้นข้อมูล 20 พฤษภาคม2561).

วรพร ศีลศร ชัยศักดิ์ จันศรีนิยม และ มยุรี กัลยาวัฒนกุล. (2554). **การเตรียมสารสกัดมาตรฐานกล้วยไม้หวายม่วงแดงเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง.** สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

วราลักษณ์ ชาวดง สุภาภรณ์ เกิดสันเทียะ และธวัชชัย กุดนอก. (2558**). การศึกษาวิธีการสกัดและคุณลักษณะของอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติ.** วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาคุรุศาสตรบัณฑิต. (โปรแกรมวิชาเคมี). คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.

วันดี กฤษณพันธ์ อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ และ นันทวัน บุณยะประภัศร. (2536). **เภสัชวินิจฉัย:ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1.** ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542). **พจนานุกรมสมุนไพรไทย** (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ: รวมสาส์น.

วิมลมาศ โพธิ์รัศมี. (2555). **การวิเคราะห์หมึกสีดำจากปากกาลูกลื่นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟีและการวิเคราะห์ภาพ.** การค้นคว้าอิสระหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขานิติวิทยาศาสตร์). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุดารัตน์ หอมหวล. (2010). **ยอ** - ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaicrudedrug.com/main.php? action =viewpage&pid=111. (วันที่ค้นข้อมูล 20 พฤษภาคม 2561).

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2557). **เคมีพืชสมุนไพรท้องถิ่น.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

อรุโณทัย จันทร์ทารามิตร. (2556). **วิธีการสกัดพืชสมุนไพร**. เข้าถึงได้จาก: http://mamseafu. blogspot.com/2013/09/blog-post_9117.html. (วันที่ค้นข้อมูล: 17 มิถุนายน 2561).

อธิป สกุลเผือก. (2559). **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B. & Wijaya, N. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. **Food chemistry,** *121*(4): 1231-1235.

Ash, C., F.G. Priest and M.D. Collins. (1994). Paenibacillus gen. nov. and Paenibacillus polymyxa comb. nov. in Validation of the publication of new names and new combinations previously Effectively Published Outside the IJSB. **Int. J. Syst. Bacteriol**, *44*: 852.

Hisham, D. M. N., Lip, J. M., Zaidi, J. A. & Normah, A. (2010). Main non-polar chemical constituent from *Morinda citrifolia* fruits. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc,** *38*(1): 97–102.

Hisham, D. M. N., Lip, J. M., Zaidi, J. A. & Normah, A. (2010). Main non-polar chemical constituent from *Morinda citrifolia* fruits. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc**, *38*(1): 97–102. **J. Eng. Sci. Tech**, *2*(1): 70-80.

Jain, R. (2018). **What is the principle of UV-visible spectroscopy?**. Available: https://www.quora.com/What-is-the-principle-of-UV-visible-spectroscopy. (Access date: 21 June 2018).

Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M. & Satake, T. (2005). New Anthraquinone and Iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Chem. Pharm. Bull,** *53*(12): 343-345.

Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M. & Satake, T. (2005). New Anthraquinone and Iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Chem. Pharm. Bull**, *53*(12): 343-345.

Krishnaiah, D., Bono, A., NithyaNandam, R. & Zahari, F. Wahida. (2015). Effect of potato starch on the antioxidant Properties of *Morinda Citrifolia* spray dried micro particles. **MOJ Food Process Technol**, *1*(1): 1-4.

Krishnaiah, D., Bona, A., Sarbatly, R. & Anisuzzaman, S. M. (2015). Antioxidant activity and total phenolic content of an isolated *Morinda citrifolia* L. methanolic extract from Poly-ethersulphone (PES) membrane separator. **J. King Saud Univ., Eng. Sci**, *27*: 63– 67.

Learning, L. (2015). **Spektrofotometri - SlideShare.** https://www.slideshare.net/Trykhyputry/spektrofotometri-44587530. (Access date: 21 June 2018).

Mahattanadul, S., Ridtitid, W., Nima, S., Phdoongsombat, N., Ratanasuwon, P. & Kasiwong, S. (2011). Effects of *Morindia citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **J. Ethnopharmacol**, *134*: 243-250.

Praveen, K. R. & Awang, B. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. **J. Eng. Sci. Tech.**, *2*(1): 70-80.

Ramamoorthy, P. K. & Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. **J. Eng. Sci. Tech.**, *2*(1): 70-80.

Roberts, J., Power, A., Chapman, J., Chandra, S. & Cozzolino, D. (2018). The Use of UV-Vis Spectroscopy in Bioprocess and Fermentation Monitoring. **Fermentation**, *4*(18): 1-8.

Roseiro, L.B., Rauter, A.P., Serralheiro, M.L.M. 2012. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. **Nutrition and Aging**. 1: 99-111.

Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R. E., Badmaev, V., Ghai, G., Rosen, R. T. & Ho, C. (2001). Flavonol Glycosides and Novel Iridoid Glycoside from the Leaves of *Morinda citrifolia*. **J. Agric. Food. Chem**, *49*(9): 4478–4481.

Sang, S., He, K., Liu, G., Zhu, N., Cheng, X., Wang, M., Zheng, Q., Dong, Z., Ghai, G., Rosen, R. T. & Ho, C. (2001). A New Unusual Iridoid with Inhibition of Activator Protein-1 (AP-1) from the Leaves of *Morinda citrifolia* L. **Org. let**, *3*(9): 1307-1309.

Sang, S., Liu, G., He, K., Zhu, N., Dong, Z., Zheng, Q., Rosena, R. T. & Hoa, C. (2003). New Unusual Iridoids from the Leaves of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Show Inhibitory Effect on Ultraviolet B-Induced Transcriptional Activator Protein-1 (AP-1) Activity. **Bioorg. Med. Chem**, *11*(12): 2499-2502.

Selkoe, D. J. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron.** 6: 487-498.

Sowndhararajan, K. & Kang, S. C. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. **Saudi Journal of Biological Sciences**, *20*(4): 319-325.

Su, B., Pawlus, A. D., Jung, H., Keller, W. J., McLaughlin, J. L. & Kinghorn, A. D. (2005). Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. **J. Nat. Prod**, *68*(4): 592–595.

Su, Fan., Bai, F., Zhang, Z. (2016). Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. **Neurosci Bull.** 32(5): 469-480.

Takashima, J., Ikeda, Y., Komiyama, K., Hayashi, M., Kishida, A. & Ohsaki, A. (2007). New Constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. **Chem. Pharm. Bull.** *55*(2): 343-345.

Tsai., T.H., Tsai, P.J. & Ho, S.C. (2005). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Several Commonly Species. **J. Food Sci**, *70*(1): 93 – 97.

Thummayot, S., Tocharus, C., Pinkaew, D., Viwatpinyo, K., Sringarm, K., Tocharus, J. (2014). Neuroprotective effect of purple rice extract and its constituent against amyloid beta-induced neuronal cell death in SK-N-SH cells. **Neurotoxicology.** 45: 149-158.

Wang, J., Qin, X., Chen, Z., Ju, Z., He, W., Tan, Y., Zhou, X., Tu, Z., Lu, F. & Liu, Y. (2016). Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochem. Lett**, *15*: 13-15.

Wang, M., Kikuzaki, H., Csiszar, K., Boyd, C.D., Maunakea, A., Fong, S.F.T., Ghai, G., Rosen, R. T., Nakatani, N. & Ho, C. (1999). Novel Trisaccharide Fatty Acid Ester Identified from the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **J. Agric. Food Chem**, *47*: 4880-4882.

Yang, J., Gadi, R. & Thomson, T. (2011). Antioxidant capacity, total phenols, and ascorbic acid content of noni (*Morinda citrifolia*) fruits and leaves at various stages of maturity. **Micronesica,** *41*(2): 167–176.

Yen, G. C. & Hsieh, G. L. (1997). Antioxidant effects on dopamine and related compounds. **Biosci Biotechnol Biochem**, *61*(10): 1646-1649.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การคำนวณร้อยละผลผลิต (% yield)

1. ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิตสารสกัดเอทานอลส่วนใบ

$$\text{จากสูตร ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักพืชแห้ง (กรัม)}} \times 100\%$$

แทนค่าสูตร

น้ำหนักแห้งของใบ = 30.00 กรัม

น้ำหนักสารสกัดเอทานอลส่วนใบที่ได้ เท่ากับ = 2.87 กรัม

$$\text{แทนค่า ร้อยละผลผลิต} = \frac{2.87}{30.00} \times 100$$

ร้อยละผลผลิต = 9.57

สารสกัดหยาบส่วนใบด้วยเอทานอลมีร้อยละของผลผลิต เท่ากับ 9.57

ภาคผนวก ข

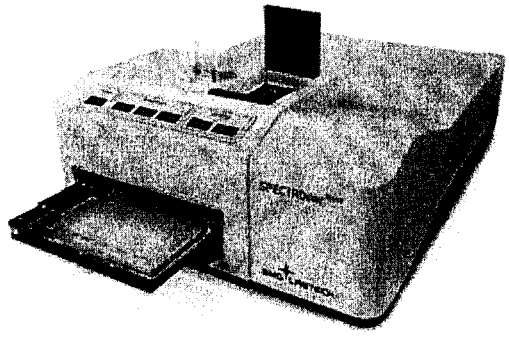
ภาพ ข-1 ต้นยอบ้าน

ภาพ ข-2 ลักษณะพืชจากส่วนใบ ลำต้น และรากที่บดอย่างหยาบ

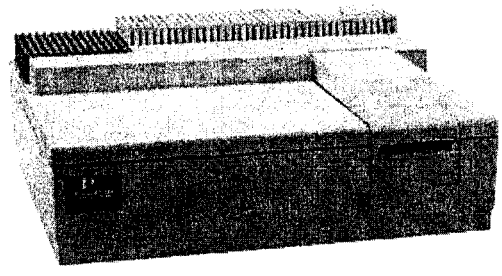
ภาพ ข-3 สารละลายเอทานอล เอทานอลต่อน้ำ(40:60) และน้ำ จากส่วนใบ ลำต้น และราก จากยอบ้าน

ภาคผนวก ค

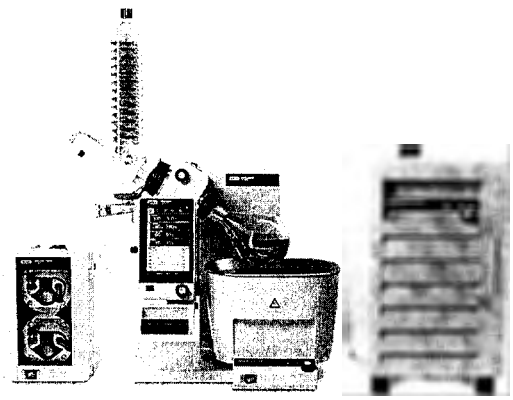
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง



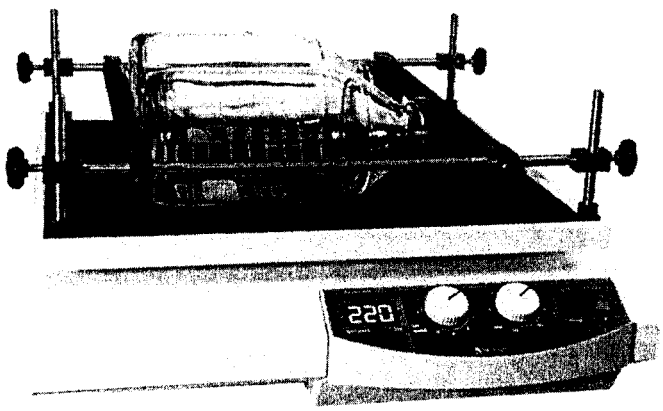
ภาพ ค-1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader: รุ่น SPECTRO star Nano บริษัท BMG LABTECH)



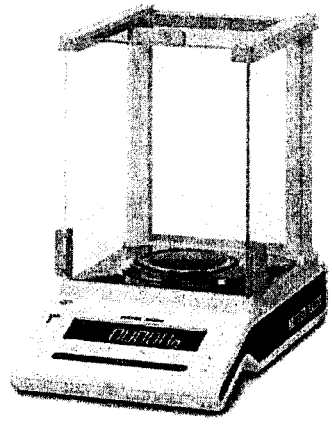
ภาพ ค-2 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer: รุ่น Lambda 25 บริษัทPerkin Elmer)



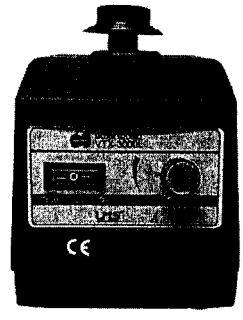
ภาพ ค-3 เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (Rotary evaporator: รุ่น Rotavapor® R-300 บริษัท Buchi)



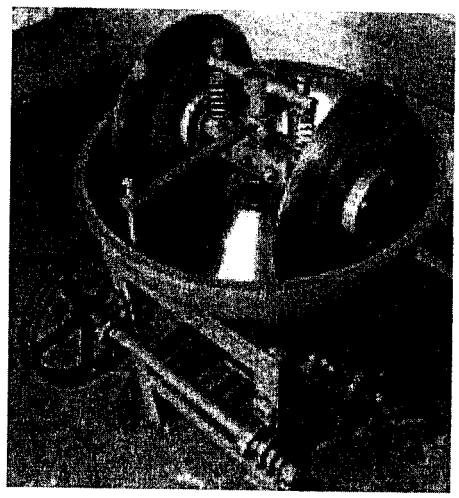
ภาพ ค-4 เครื่องเขย่าสาร (Orbital Shaker / Analog Shaker: รุ่น Unimax 2020 บริษัท Heidolph Instruments)



ภาพ ค-5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น New Classic MS บริษัท Mettler-Toledo)



ภาพ ค-6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer Mixer Uzusio: รุ่น VTX-3000L บริษัท LMS)



ภาพ ค-7 เครื่องบดพืชตัวอย่าง

ภาพ ค-8 เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette: รุ่น Research plus บริษัท Eppe

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวภรภัทร สำอางค์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Pornpat Sam-ang

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3-6407-00575048

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ ดร.
   ตำแหน่งบริหาร -
   ตำแหน่งทางวิชาการ -
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 20 ชั่วโมง/สัปดาห์

4. **หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ**
   สาขาวิชาเคมี
   คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
   มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว)
   ต.พลายชุมพล อ.เมือง จ. พิษณุโลก
   โทรศัพท์ 091-1451942
   E-mail pornpat335@gmail.com

5. **ประวัติการศึกษา**

คุณวุฒิ	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา
วท.บ (เคมี)	2548	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วท.ม. (เคมีอินทรีย์)	2552	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วท.ด. (เคมีอินทรีย์)	2559	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   - เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (การสกัดและแยกสารออกฤทธิ์)
   - การสังเคราะห์สารอินทรีย์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากสารสกัดยอบ้านเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ (ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2561 แหล่งทุนสนับสนุน มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม)

2. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดใบมะฮอกกานี *(Swietenia Macrophylla)* ต่อการกำจัดเพลี้ยไฟมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก (ทุนวิจัยภายนอก โครงการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนรากฐาน ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยนเรศวร)

7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

บทความวิชาการ

Kongkathip, N.; **Sam-ang, P.**; Kongkathip, B.; Pankaew, Y.; Tanasombat, M.; Udomkusonsri, P. (2009). Development of Patchouli Extraction with Quality Control and Isolation of Active Compounds with Antibacterial Activity. Kasetsart Journal., 43(3), 519-525.

Sam-ang, P.; Raksasorn, D.; Sukwattanasinitt, M.; Rashatasakhon, P. (2014). A nitroaromatic fluorescence sensor from a novel tripyrenyl truxene. RSC Adv., 4, 58077–58082.

Sam-ang, P., Silpcharu, K., Sukwattanasinitt, M., Rashatasakhon, P. (2019). Hydrophilic truxene derivatives as a fluorescent off-on sensor for copper (II) ion and phosphate species. *Journal of fluorescence*, 10895-10903.

อาริสา แซ่ลี, ธีนิดา อินตา**, ภรภัทร สำอางค์**, มนตรา ศรีษะแย้ม, วราภรณ์ ผาลี และ อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์. (2561). ผลของสารสกัดหยาบจากลาต้นของสาบแร้งสาบกาที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และการต้านอนุมูลอิสระ. *Agricultural Sciences Journal*, *49*(3), 289-293.

ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Pornpat Sam-ang, Boonsong Kongkathip, Yupa Mongkolsook, Maliwan Tanasombat, Patcharee Sunthornanch and Ngampong Kongkathip. (2007). Antibacterial Activity of Patchouli (*Pogostemon cablin*). PERCH-CIC Congress V, May 6-9, 2007, Thailand.

Pornpat Sam-ang, Mongkol Sukwattanasinitt and Paitoon Rashatasakhon. (2013). New Fluorescent Sensor for Nitroaromatic Compounds. Sokendai Asian Winter School "Frontiers in Photo-Molecular Science", January 14-17, 2013, Okazaki, Japan.

Pornpat Sam-ang, Mongkol Sukwattanasinitt and Paitoon Rashatasakhon. (2014). New Truxene Derivative as Fluorescent Sensor for Nitroaromatic Compounds. The 9th Mathematics and Physical Science Graduate Conference (MPSGC), January 8-10, 2014, Kuala Lumpur, Malaysia.

Pornpat Sam-ang, Mongkol Sukwattanasinitt and Paitoon Rashatasakhon. (2015). New Tripyrenyl Truxene as Fluorescent Sensor for Nitroaromatic Compounds. JSPS-DST Asian Academic Seminar and School 2015 Spectroscopy, Theoretical Chemistry and Chemistry of Materials, March 6-10, 2015, Kolkata, India.

Pornpat Sam-ang, Mongkol Sukwattanasinitt and Paitoon Rashatasakhon. (2015). New Tripyrenyl Truxene as Fluorescent Sensor for Nitroaromatic Compounds. The 5th Junior International Conference on Cutting-edge Organic Chemistry in Asia (5th Junior ICCEOCA), October 30th-November 1st 2015, Taipei, Taiwan.

Pornpat Sam-ang, Mongkol Sukwattanasinitt and Paitoon Rashatasakhon. (2016). A new truxene derivative as highly selective turn-on fluorescent sensor for hydrogen phosphate. Green Convergence on Chemical Frontiers, February 2-3, 2017, Centra Government Complex Hotel & Convention Centre Chaeng Wattana, Bangkok, Thailand.

Kamonwan Srisawad, Apinun limmongkon, **Pornpat Sam-ang** and Damratsamon Surangkul. (2018). In vitro cholinesterase inhibitory activities of *Morinda citrifolia* L. extracts. The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology (BMB 2018), June 20-22, 2018, Rayong Resort, Rayong, Thailand.

ประชุมวิชาการ และ Proceedings

Pornpat Sam-ang, Boonsong Kongkathip, Yupa Mongkolsook , Patcharee Sunthornanch and Ngampong Kongkathip. (2006). Extraction, Isolation and Antibacterial Activity Testing of Patchouli (*Pogostemon cablin*). 32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32), October 10-12, 2006, Thailand.

Pornpat Sam-ang, Boonsong Kongkathip, Pareeya Udomkusonsri, Yupa Mongkolsook, Maliwan Tanasombat and Ngampong Kongkathip. (2008). Development of Patchouli Oil and Crude Extract from Patchouli (*Pogostemon cablin*) with Antibacterial Activity. The 46th Kasetsart University Annual Conference, January 29-31, February 1, 2008, Thailand.

ดามรัศมน สุรางกูร กมลวรรณ ศรีสวัสดิ์ ประกรณ์ เลิศสุวรรณไพศาล อรุณลักษณ์ โชตินาคริินทร์ และ**ภรภัทร สำอางค์**. (2561). การศึกษาสารสกัดรากยอบ้านต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส. การประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 4 23 มีนาคม 2561. หน้า 383-388.

วรดา แซ่ลี มนตรา ศรีษะแย้ม วราภรณ์ ผาลี **ภรภัทร สำอางค์** ทิพย์วรินทร์ ริมลาดวน และอรุณลักษณ์ โชตินาคริินทร์. (2561). ผลของสารสกัดหยาบจากลูกใต้ใบต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus.* การประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 4. 23 มีนาคม 2561. หน้า 331-338.

จิรายุธ นาเสริฐ จีราพัสฐ์ สีแจ่ม จันทกานต์ นุชสุข กุลวดี ปิ่นวัฒนะ และ**ภรภัทร สำอางค์.** (2561). การศึกษาผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้าน. การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 18 และลำปางวิจัย ครั้งที่ 4. 20 กรกฎาคม 2561. หน้า 929-938.

อาริสา แซ่ลี ธีนิดา อินตา **ภรภัทร สำอางค์** มนตรา ศรีษะแย้ม วราภรณ์ ผาลี และอรุณลักษณ์ โชตินาคริินทร์. (2561). ผลของสารสกัดหยาบจกาลำต้นของสาบแร้งสาบกาที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และการต้านอนุมูลอิสระ. การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 15.

Srisawad, K., limmongkon, A., **Sam-ang, P.** and Surangkul, D. (2018). Effect of *Morinda citrifolia* L. root ethanolic extract on SK-N-SH neuroblastoma cells induced by H_2O_2. Proceedings of the 44th Congress on Science and

Technology of Thailand (STT 44), Bangkok, Thailand, 29-31 October 2018. pp.114-118.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย)** นางสาวดามรัศมน สุรางกูร
   ชื่อ – สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Damratsamon Surangkul

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3-6599-00019-19-8

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อ** ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
   มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
   โทรศัพท์ (055) 964639 โทรสาร 055-261197
   E-mail:damratsamon@gmail.com

5. **ประวัติการศึกษา**

พ.ศ 2549	วท.ด. (พันธุวิศวกรรม)
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	
พ.ศ. 2541	วท.ม. (ชีวเคมี)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
พ.ศ. 2537	วท.บ. (ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   - Molecular Cancer: Neurodegenerative disease

7. **ประสบการณ์วิจัย**

   7.1 (หัวหน้าโครงการ)

   1. การผลิตโปรตีน Interlukin-13 (IL-13) และ beta-amyloid (ทุนนักวิจัยหน้าใหม่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปี 2550)

   2. การผลิตและศึกษาผลของรีคอมบิเนนท์ Interlukin-13 / beta-amyloid fusion protein ต่อเซลล์ microglia-like human THP-1(งบประมาณแผ่นดิน 2551 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

3. ผลของ recombinant IL-13 และ IL-13/ beta-amyloid fusion protein ต่อการสร้าง cytotoxic factor ในเซลล์ microglia-like THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย beta-amyloid (งบประมาณแผ่นดิน 2552 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

4. บทบาทของยาฆ่าแมลงไซเปอร์มีทรินต่อการเกิดพิษใน เซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH (งบประมาณแผ่นดิน 2552 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

5. ผลของ IL-13 ในการการต่อต้านการตายแบบอะพอมโตซิสของเซลล์สายพันธ์เซลล์ประสาทโดปามีน (ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553)

6. การศึกษาผลของสารสกัดถั่วลิสงงอกต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับพาราควอท (งบประมาณแผ่นดิน 2556 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

7.ผลของโซเดียมบิวทีเรทต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (2558,โรงพยาบาลกรุงเทพภูเก็ต)

8. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดถั่วลิสงงอก(งบประมาณแผ่นดิน 2559 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

7.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ

Kanchanat Ternchoocheep, Damrassamon Surangkul, Sukhgij Ysothonsreekul. The recovery and protective effects of asiatic acid on differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells cytotoxic-induced by cholesterol. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2017;7(5):416-420. (Scopus) (เงินรายได้, มหาวิทยาลัยนเรศวร 2558)

Apinun Limmongkon, Prachya Janhom,Ampika Amthong, Muenfan Kawpanuk, Patcharaporn Nopprang, Jirarat Poohadsuan, Suwaree Saijeen, Damratsamon Surangkul, Metawee Srikummool, Tantip Boonsong. Antioxidant activity, total phenolic, and resveratrol content in five cultivars of peanut sprouts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2017;7(4):332-338. (Scopus) (งบประมาณแผ่นดิน 2558, มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Lertkaeo P, Limmongkon A, Srikummool M, Boonsong T, Supanpaiboon W, Surangkul D. Antioxidative and neuroprotective activities of peanut sprout extracts against oxidative stress in SK-N-SH cells. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2017;7(1):64-69. (Scopus) (งบประมาณแผ่นดิน 2558,มหาวิทยาลัยนเรศวร)Thepmalee, C., Sanguansermsri, P.,

Suwanankhon ,N., Chamnanpood ,C., Chamnanpood ,P., Pongcharoen,S., Niumsap ,R.P., Surangkul,D., Sanguansermsri,D., (2013). Changes in the NS1 gene of avian influenza viruses isolated in Thailand affect expression of type I interferon in primary chicken embryonic fibroblast cells. Indian J. Virol. (งบประมาณแผ่นดิน 2556,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

นำเสนอในงานประชุม Proceeding

ปิยะ ประจำวงศ์,อภินันท์ ลิ้มมงคล,ดามรัศมน สุรางกูร. ผลของสารสกัดถั่วลิสงงอกต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับพาราควอท. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27,2556,พิษณุโลก,ประเทศไทย (งบประมาณแผ่นดิน 2556 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

วิวัฒน์ สนมฉ่ำ,จงรักษ์ อรรถรัฐ ,ดามรัศมน สุรางกูร. การผลิตอินเตอร์ลิวคิน-13 รีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ SK-N-SH. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27,2556,พิษณุโลก,ประเทศไทย (งบประมาณแผ่นดิน 2552 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

เมธวี ศรีคำมูล, ดามรัศมน สุรางกูร และ จารุภัค แสนสมชัย. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากว่านค้างคาวดำ และ บัวบก. นเรศวรวิจัยครั้งที่ 10, 2557,พิษณุโลก ,22-23 กรกฎาคม, พิษณุโลก, ประเทศไทย (งบประมาณแผ่นดิน 2555 , มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Siriporn Pakwan, Wajathip Bulanawichit, Apinun Limmongkon, Damratsamon Surangkul, Metawee Srikummool,and Tantip Boonsong. Inhibitory Effects of Peanut Sprout Extract on Mouse 3T3-L1 Adipocytes Differentiation. Rumkhamhaeng University International Research Conference (RUIRC2015). September 2-3, 2015. (งบประมาณแผ่นดิน 2558 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Jirarat Poohadsuan, Apinun Limmongkon, Damratsamon Surangkul, Metawee Srikummool.2016. Oral presentation in title "Antioxidant activities of protein extracts from peanut sprout Kalasin 2 cultivar"The 38 th National Graduate Research conference:graduate research towards bglobalization,Phitsanulok, Febuary 19-20:pp.456-464,Thailand. (งบประมาณแผ่นดิน 2558 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Juthamas Yosudjai, Pranee Lertkaeo, Apinun Limmongkon, Metawee Srikummool, Tantip Boonsong, Damratsamon Surangkul Poster

presentation in title "Antioxidative and neuroprotective activities of peanut sprout extract (Kalasin 2)" The 5Th International Biochemistry and molecular biology conference.26-27 May 2016, Songkha, Thailand. (งบประมาณแผ่นดิน 2558 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Titinat pokawattana, Siam Popluechai, Metawee Srikummool, Damratsamon Surangkul,Kongkiat Kespechara ,and Art Hiranyakas. Poster presentation in title "The expression analysis of P53 affected by sodium butyrate treatment on HCT116 stem cells using qPCR " The 5Th International Biochemistry and biology conference.26-27 May 2016, Songkha, Thailand. (2558, โรงพยาบาลกรุงเทพภูเก็ต)

นำเสนอในงานประชุม Abstract

Attarat, J. and Surangkul, D. Mushroom Proteins and Antioxidant Activity in Local Area of Phitsanulok and Trang Provinces. นเรศวรวิจัยครั้งที่ 7. พิษณุโลก ,2555 (เงินรายได้ 2553 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

ดามรัศมน สุรางกูร, การโคลนและการแสดงออกของอินเตร์ลูคิน-13 ในเซลล์ SK-N-SH, นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 7, 2555 (งบประมาณแผ่นดิน 2551 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร)

Juthathip Tethiwat , Metawee Srikummool, Nongluk Saikachain, Damratsamon Surangkul Poster presentation in title "Effect of butyrate on human colon cancer butyrate resistance cells (HCT116-BR) " The 5Th International Biochemistry and molecular biology conference.26-27 May 2016, Songkha, Thailand. (2558,โรงพยาบาลกรุงเทพภูเก็ต)

Chinnawat Phothirat, Metawee Srikummool, Chakkraphong Khonthun, ____ Damratsamon Surangkul. Poster presentation in title "Effect of butyrate on α-synuclein expression in colon cancer butyrate resistance cells " The 5Th International Biochemistry and molecular biology conference.26-27 May 2016, Songkha, Thailand. (2558,โรงพยาบาลกรุงเทพภูเก็ต)

Jirarat Poohadsuan, Apinun Limmongkon, Damratsamon Surangkul, Tantip Boonsong, Metawee Srikummool. Poster presentation in title "Peanut sprout extract of kalasin 2 cultivar increases human dermal papilla cell viability " The 5Th International Biochemistry and molecular biology conference.26-27 May 2016, Songkha, Thailand. (2558,โรงพยาบาลกรุงเทพภูเก็ต)

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดถั่วลิสงงอก (งบประมาณแผ่นดิน 2559 ,มหาวิทยาลัยนเรศวร) หัวหน้าโครงการวิจัย อยู่ในช่วยขยายเวลาเริ่ม 1 ต.ค 2558 -30 ก.ย 2560

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอนงค์ ศรีโสภา
   ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Anong Srisopa
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 4 6501 00004 587
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสารและ
   E-mail

   คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
   ตำบลพลายชุมพลอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
   โทรศัพท์/โทรสาร 055-267000 ต่อ 4207
   E-mail: anongsrisopa@psru.ac.th
5. ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

PhD (Chemistry)	จาก University of East Anglia, UK	พ.ศ. 2554
วท.ม. (เคมี)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พ.ศ. 2542
วท.บ. (เคมี)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พ.ศ. 2539

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
   - เคมีวิเคราะห์/เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมี
   - เคมีสิ่งแวดล้อม
   - เคมีพอลิเมอร์/การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์
   - การตรวจวิเคราะห์คุณภาพอาหารเครื่องดื่มและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม
   - วิทยาศาสตร์ศึกษา
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   ประสบการณ์ด้านงานบริหาร

พ.ศ. 2547 – 2549	ประธานสาขาวิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ ฯ
พ.ศ. 2548 – 2549	ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ฯ
พ.ศ. 2555 – 2560	คณะกรรมการประจำคณะวิทยาศาสตร์ ฯ
พ.ศ. 2556 – 2560	รองผู้อำนวยการ สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ

พ.ศ. 2556 – 2560 คณะกรรมการประจำสำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ

พ.ศ. 2560 – ปัจจุบัน คณะกรรมการประจำคณะวิทยาศาสตร์ ฯ

ประสบการณ์ด้านงานวิจัย

ปี (ระยะเวลา)	ตำแหน่ง	เรื่อง (แหล่งทุน)
2559	ร่วมโครงการ	**การสร้างชุดต้นแบบสำหรับทดสอบการกำจัดสารหนูโดยใช้ไดอะทอไมต์ที่ผ่านการปรับปรุงด้วยสารละลายเหล็กเป็นตัวดูดซับ** (แผ่นดิน 59)
2558	ร่วมโครงการ	การใช้ความหลากหลายของไลเคนเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการประเมินผลกระทบมลพิษทางอากาศในเขตอำเภอเมืองพิษณุโลก (แผ่นดิน 58)
2557	หัวหน้าโครงการ	คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของสารสกัดดอกดาวเรืองที่ผ่านการสกัดโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (แผ่นดิน 57)
2557	ร่วมโครงการ	คุณภาพอากาศภายในอาคารที่พักอาศัยในเขตชุมชนเมือง จ.พิษณุโลก- (แผ่นดิน 57)
2556	หัวหน้าโครงการ	การหาปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมทในดินแปลงนาข้าวโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (แผ่นดิน 56)
2555	หัวหน้าโครงการ	สารสกัดดอกดาวเรืองจากภูมิปัญญาท้องถิ่นสู่นวัตกรรมผลิตภัณฑ์ลดริ้วรอย (สกอ. 2555)
2555	หัวหน้าโครงการ	**การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดและหาปริมาณกรดไซรินจิกจากดอกดาวเรืองเพื่อใช้เป็นสารลดริ้วรอยในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว** (งบกองทุน มหาวิทยาลัยฯ)
2555	หัวหน้าโครงการ	การพัฒนาการเรียนการสอนวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ที่เน้นผู้เรียนเป็นสำคัญโดยใช้หลักการทางไมโครสเกล (คณะวิทยาศาสตร์ฯ)
2545	หัวหน้าโครงการ	The Investigation of Physical and Chemical Environment on Punpee Community. (โครงการพวส.)
2544	หัวหน้าโครงการ	Determination of Organophosphorus Insecticide Residues in Vegetables, Fruits, and Flowers from PhitsanulokProvince by High Performance Liquid Chromatography. (โครงการพวส.)

ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการฝึกปฏิบัติในสาขาที่เชี่ยวชาญ

ปีพ.ศ.	หัวข้อ	สถานที่
2552	Polymer characterization	Cranfield university, UK
2545	Science Research (HPLC)	University of Technology, Sydney, AUSTRALIA
2545	Science Research (Soil analysis)	University of Newcastle, AUSTRALIA

วารสารเผยแพร่ระดับนานาชาติ

Anong Srisopa, *Preparation of monodisperse porous poly (glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) microspheres and their application as stationary phase for superheated water HPLC, Talanta,* 147, 358-363, **2016**.

Prakorn Lertsuwanpisal, Pitak Yoomee and **Anong Srisopa,** *Microscale Titration for the Determination of Chloride and the Implementation in Science Classes*, Proceedings, 2nd International Conference on Innovation in Education, **2015**.

Anong Srisopa, A. M. Imroz Ali and Andrew G. Mayes, *Understanding and preventing the formation of deformed polymer particles during synthesis by a seeded polymerization method*, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 49 (9), 2070–2080, **2011**.

การนำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ

Sudaporn Phrommuen, Patcharaporn Saeyang and **Anong Srisopa**, Microplate quantification of phenolic content from marigold extract obtained by microwave assisted extraction, The Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON), 2016, Bangkok, THAILAND.

Prakorn Lertsuwanpisal, Pitak Yoomee and **Anong Srisopa**, Microscale Titration for the Determination of Chloride and the Implementation in Science Classes, 2nd International Conference on Innovation in Education, 2015, Mahidol University, THAILAND.

Anong Srisopa A. M. Imroz Ali and Andrew G. Mayes,*Controllable small micron-size porous polymer particles,* 2nd International Conference on Multifunctional, Hybrid &Nanomaterials , 2011, Strasbourg, FRANCE.

Anong Srisopa and Andrew G. Mayes, *Green chromatography; elimination of organic solvent usage in the mobile phase by operating at elevated temperature,* Chemistry research colloquium, 2010, Norwich, UK.

Anong Srisopa and Andrew G. Mayes, *Preparation of monodisperse porous polymer particles as stationary phases for high temperature chromatography,* Analytical research forum, 2009, RSC, Kent, UK.

Anong Srisopa and SaisuneeLiawruangrath, *Determination of Methyl Parathion Residues in Plant Materials and Commercial Formulations by Flow Injection Analysis*, The 9th International Conference on Flow Analysis, 2003, Geelong, AUSTRALIA.

Anong Srisopa and SaisuneeLiawruangrath,*Determination of Organophosphate Pesticide by Flow Injection Analysis*, The 4th Princess ChulabhornInternation Science Congress, 1999, Bangkok, THAILAND.

In vitro cholinesterase inhibitory activities of *Morinda citrifolia* L. extracts

Kamonwan Srisawad[1], Apinun limmongkon[1], Pornpat samang[2] and Damratsamon Surangkul [1,*]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok 65000, Thailand

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phisanulok 65000, Thailand

*e-mail: damratsamon@gmail.com

Abstract:

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the people having age more than 65. Cholinergic deficit has been implicated in the pathogenesis of AD. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) are the promising strategies in the development of drug for disease. *Morinda citrifolia* L. (Noni) has been used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-virus, antioxidation, and neuroprotection. Thus, this study aims to investigate the in *vitro* cholinesterase inhibitory activities of Noni. The crude extracts from leaf, stem, and root were extracted by ethanol, water, or hydro-alcohol (40% ethanol) (9 samples) and were assessed for AChE inhibitory activities by the Ellman's method. The result showed that effect of root ethanolic extracts possessed more AChE inhibitory activity than the others with the half maximal inhibitory concentration (IC50) values of 480 μg/ml and Tacrine was used as positive control had IC50 0.2 μg/ml.

In vitro cholinesterase inhibitory activities of *Morinda citrifolia* L. extracts

Kamonwan Srisawad[1], Apinun limmongkon[1], Pornpat samang[2] and Damratsamon Surangkul[1,*]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Noresuan University*
[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University*
**Corresponding author: damratsamons@nu.ac.th*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the people having age more than 65. Cholinergic deficit has been implicated in the pathogenesis of AD. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) are the promising strategies in the development of drug for disease. *Morinda citrifolia* L. (noni) has been used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-virus, antioxidation, and neuroprotection. Thus, this study aims to investigate the in *vitro* cholinesterase inhibitory activities of noni. The crude extracts from leaf, stem, and root were extracted by ethanol, water, or hydro-alcohol (40% ethanol) (9 samples) and were assessed for AChE inhibitory activities by the Ellman's method. The result showed that effect of root ethanolic extract possessed more AChE inhibitory activity than the others with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 480 µg/ml and Tacrine was used as positive control had IC_{50} 0.2 µg/ml.

Keywords : Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, *Morinda citrifolia* L. (noni)

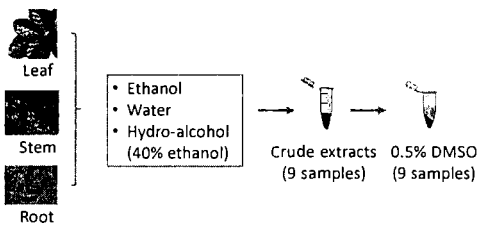
Introduction

Nowadays around the world including Thailand is entering aging society, the elderly population is likely to increase. The following is the disease in the elderly such as Alzheimer's disease (AD). AD is the most common form of dementia. Cholinergic deficit has been implicated in the pathogenesis of AD. Deficiency of acetylcholine (ACh) found in patients influence on fundamental role in memory. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) are the promising strategies in the development of drug for disease. Currently, most of the drugs available for treatment of AD are ChE inhibitor such as Galantamine, Donepezil, Rivastigmine and Tacrine. However, they have been reported about numerous side effects. In this study focus on *Morinda citrifolia* L. or noni has been used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-virus, antioxidation, and neuroprotection. **Thus, this study aims to investigate the *in vitro* cholinesterase inhibitory activities of noni.**

Methods

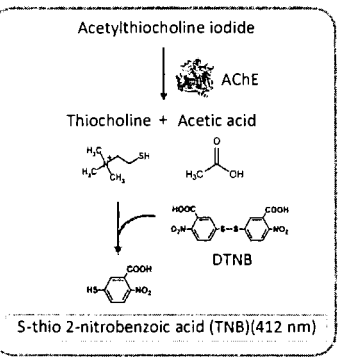
Morinda citrifolia L. extract preparation

We got crude extracts 9 samples from Dr. Pornpat Samang Faculty of Science and Technology Pibulsongkram Rajabhat University. Crude extracts are divided into leaf, stem and root will extract in ethanol, water and hydro-alcohol then we bring to dissolve by 0.5% DMSO.



Acetylcholinesterase inhibition: Ellman's Assay

This method estimates the activity of AChE using by acetylthiocholine iodide as substrate and DTNB. The enzymatic activity was measured by the yellow color compound product by thiocholine when reacts with DTNB.



100-2,000 µg/ml *Morinda citrifolia* L. extract + 0.3u AChE
37 °c, 15 min
1 mM Acetylthiocholine iodide
3 mM DTNB
37 °c, 30 min
Absorbance was measured at 412 nm

$$\%\text{inhibition} = \frac{(O.D.control) - (O.D.sample)}{O.D.control} \times 100$$

Results

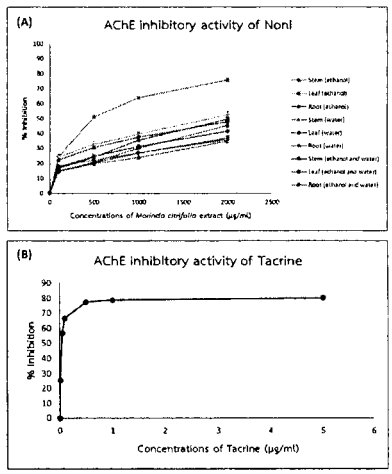


Figure 1 AChE inhibitory activity of noni (A) and Tacrine (B) at different concentrations. Data are given as mean±SEM (n = 3)

Table 1 IC_{50} values obtained in AChE inhibitory assays

Sample	IC_{50} (µg/ml)
Tacrine	0.2
Morinda citrifolia L. (Root ethanolic extract)	480

Discussion and Conclusion

The present study indicated that all extracts have ability to AChE inhibitory activity and root ethanolic extract possessed more AChE inhibitory activity than the others. At 2,000 µg/ml %inhibition of root ethanolic extract values of 75.66% that similar value of Tacrine (80.32%). But root ethanolic extract exhibited the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 480 µg/ml more than Tacrine was used as positive control had IC_{50} 0.2 µg/ml.

Although root ethanolic extract possessed IC_{50} more than Tacrine but may less side effects, as well as previous research found noni has been used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-virus, antioxidation, and neuroprotection. [1] Noni contain phytochemical compound is phenolic compound such as scopoletin and anthraquinones [2] that have been reported about antioxidant and anti-ChE activity. [3,4] Therefore, we concluded noni have ability to AChE inhibitory activity and root ethanolic extract possessed more AChE inhibitory activity than the others.

References

[1] Jung HA., Ali MY., Jung HJ., Jeong HO., Chung HY., Choi JS. (2016) Inhibitory activities of major anthraquinones and other constituents from Cassia obtusifolia against β-secretase and cholinesterases. **Journal of Ethnopharmacology**, 191, 152-160.

[2] Mogana R., Jin KT., Wiart C. (2013) Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1, 1-7.

[3] Torres MA., Magalhães ID., Oliveira RM., Sá JC., Rocha AL., Silva AL. (2017) One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. **Phytotherapy research**. 31, 971–979.

[4] Wang MY., Su C. (2001) Cancer preventive effect of Morinda citrifolia (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, 952, 161–168.

Acknowledgement

This research was supported by research and development institute pibulsongkram rajabhat university phitsanulok (grant number RDI-2-61-03) and the Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University.

GNRU

รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ (Proceedings)

นำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ

เครือข่ายบัณฑิตศึกษา
มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 18
และลำปางวิจัย ครั้งที่ 4

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

บูรณาการงานวิจัย สู่การพัฒนาท้องถิ่นที่ยั่งยืน

ณ อาคารโอฬาร โรจน์หิรัญ
มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง | 20 กรกฎาคม 2561

		หน้า
เปรียบเทียบวิธีการย่อยเพื่อหาปริมาณ Cd, Fe, Pb และ Zn ในตัวอย่างชาสมุนไพรด้วยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตเมทรี	อนงค์ ศรีโสภา	892
การติดตามปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชั่นโดยการใช้ข้อมูลหลายช่วงคลื่นจากภาพถ่ายดาวเทียม บริเวณอ่าวไทยตอนบนของประเทศไทย : ผลการศึกษาเบื้องต้น	ศราวุธ เตียงกูล	901
การศึกษาสเตียรอยด์ที่ปลอมปนในยาแผนโบราณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง	สุภัทรา สายกระสุน	915
การศึกษาผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้าน	ภรภัทร สำอางค์	929
ความชุกและปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับภาวะไขมันในเลือดสูงของผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มารับยาโรงพยาบาลสมเด็จพระญาณสังวร จังหวัดเชียงราย	จิราภรณ์ แสงสุวรรณ์	939
ประสิทธิผลของโปรแกรมการฝึกอบรมความปลอดภัยในการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกร หมู่1 บ้านท่าข้าม ตำบลท่าข้าม อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	วัทน์สิริ แต้มดี	952
ผลของสารสกัดหยาบจากใบชาเมี่ยงต่อการลดแอมโมเนีย ในน้ำสำหรับการเลี้ยงปลาสวยงาม	นพวรรณ ตันชูชีพ	966
การหาปริมาณกรดแกลลิคในพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคสแควว-เวฟ โวลแทมเมตรี	อัญชนา ปรีชาวรพันธ์	981
รายงานเบื้องต้น: ผลของโปรแกรมทันตสุขศึกษาในการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการดูแลสุขภาพช่องปากที่ดีในนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนชุมชนบ้านสบเปา อำเภอพญาเม็งราย จังหวัดเชียงราย	ตรีรัตษ์ชญากร แก้วปัญญา	990
การถอดบทเรียนการมีส่วนร่วมของชุมชนบ้านทองทิพย์ หมู่ที่ 10 ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงรายต่อโครงการชุมชนจัดการสุขภาพโรคเรื้อรัง	เยาวภา ตระหง่าน	1009
พฤติกรรมการป้องกันและควบคุมโรคฉี่หนู ของประชาชน อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย	เมวิญา สระทองพร	1032
สถานการณ์พฤติกรรมการดื่มแอลกอฮอล์และโรคซึมเศร้าของชาวบ้านบ้านสบเปา ต.แม่เปา อ.พญาเม็งราย จ.เชียงราย	ฐิติมา ยาสมุทร	1044

การศึกษาผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้าน

An Investigation of the Effects of Extracting Solvents on Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of the Crude Extracts from *Morinda citrifolia* Stems

จิรายุธ นาเสริฐ[1] จีราพัสฐ์ สีแจ่ม[2] จันทกานต์ นุชสุข[3] กุลวดี ปิ่นวัฒนะ[1] และภรภัทร สำอางค์[1*]

Jirayus Nasert[1], Jirapast Sichaem[2] Chanthakan Nuchsuk and Pornpat Sam-ang[1*]

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

[3]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอยุธยา

[*]Corresponding author. E-mail: pornpat335@gmail.com

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของลำต้นยอบ้านที่สกัดเย็นด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ เอทานอล เอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 40:60 และสารสกัดน้ำ จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือสารสกัด 40% เอทานอลต่อน้ำ และสารสกัดน้ำ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.22 และ 15.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ BHT และวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีค่า IC_{50} 0.064 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าสารสกัดเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ 12.87±0.08 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกสารสกัดของลำต้นยอบ้านที่มีประสิทธิภาพโดยมีปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เป็นเครื่องสำอางบำรุงผิวหรืออาหารเสริมอย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคตได้ ทั้งนี้สำหรับการระบุองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ของสารสกัดอาจต้องทำการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีต่อไป

คำสำคัญ: ยอบ้าน ตัวทำละลาย ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม

Abstract

Air-dried stems of *Morinda citrifolia* were extracted by maceration using different solvents including ethanol, 40% ethanol/water and water. All crude extracts were further studied for antioxidant activity and analyzed total phenolic contents (TPC). The results showed that the crude ethanol extract displayed highly antioxidant activity with IC_{50} value of 5.75 mg/mL which were more than crude 40% ethanol/water and water extracts with IC_{50} values of 8.22 and 15.22 mg/mL, respectively in comparison to BHT (IC_{50} 0.064 mg/mL) and vitamin C (IC_{50} 0.033 mg/mL) as standard compounds. For total phenolic contents (TPC) of the crude ethanol extract, it showed the most TPC with a value of 12.87±0.08 mgGAE/g

crude extract. The finding of this study indicated that the crude ethanol extract of *Morinda citrifolia* showed the highest activity and great potential for cosmetic and food Supplement applications. However, the identification of active compounds of the crude extract could be further confirmed by purification and elucidation.

Keywords: *Morinda citrifolia*, solvents, antioxidant, total phenolic contents

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร เนื่องจากมีอิเล็กตรอนเดี่ยว 1 ตัว อยู่แถบเวเลนซ์ (valence shell) โดยปกติสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต DNA และ RNA เป็นต้น จะเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งสารชีวโมเลกุลเหล่านั้นจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ทำให้โมเลกุลเสถียร แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไป 1 ตัว ส่งผลให้โมเลกุลเหล่านั้นขาดอิเล็กตรอนและเกิดความไม่เสถียร จึงต้องไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาอย่างต่อเนื่องจนเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ทำให้ร่างกายสูญเสียสมดุล อย่างไรตาม ธรรมชาติของร่างกายจะมีระบบต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้เอง ทำหน้าที่ ควบคุมและช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายเซลล์ภายในร่างกาย แต่ถ้าร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินที่ระบบต้านออกซิเดชันจะจัดการได้จนทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จะก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพอันนำไปสู่ภาวะการเกิดพยาธิสภาพของโรคบางโรคขึ้น เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคความอัลไซเมอร์ (Alzheimer) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ จึงมีบทบาทสำคัญต่อร่างกายที่จะดักจับอนุมูลอิสระ ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ ซึ่งแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบในพืช ผัก และผลไม้หลายชนิด โดยจะมีกลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ สารฟีนอลิก (phenolic compounds) เบต้า-แคโรทีน (beta-carotenes) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) วิตามินซี (vitamin C) และแอนโทไซยานิน (anthocyanins) รวมทั้งพบว่ายังเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เช่น สารสกัดจากแปะก๊วย เมล็ดองุ่น และชา เป็นต้น (ไมตรี สุทธจิตต์, 2541)

ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งในที่คนไทยทุกภูมิภาครู้จักกันดี มีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณ ดังนี้ ใบยอ ใช้แก้ท้องร่วง ลดไข้ ผลยอ แก้คลื่นไส้อาเจียน และขับลม ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอช่วยลดความดันได้อีกด้วย สำหรับยอบ้านมีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลส่วนของผลและน้ำลูกยอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yang et al., 2010; Su et al., 2005) โดยทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radirals) และ ONOO- (Peroxynitrites) อีกทั้งยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (antimicrobial) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Sang et al., 2003; Takashima et al., 2007) นอกจากนี้สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากยอบ้านยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ (ดามรัศมน และคณะ, 2561) โดยกลุ่มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อนุพันธ์ของคูมาริน (coumarins) และ อิริดอยส์ (iridoids) เป็นต้น สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นยอบ้าน ทั้งนี้คาดว่าองค์ความรู้ที่ได้รับสามารถเป็นประโยชน์ในการสนับสนุนให้ช่วยกันอนุรักษ์และส่งเสริมการปลูกยอบ้านและพัฒนาต่อยอดนำไปสู่ด้านการแพทย์ รวมทั้งผลการทดลองที่ได้อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhdrazyl radical scavenging assay (DPPH assay) และหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมทั้งหมดของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรยอบ้าน

เก็บตัวอย่างพืชแห้ง ตามวิธีของก่องกานดาและวรดลต์ (2559) ปี 2560 ณ ตำบลหนองแม่แตง อำเภอไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชร ดำเนินการตรวจสอบเอกลักษณ์และระบุชนิดพืชอัดแห้ง โดย ผศ.ดร.กาญจนา ธนนพคุณ มีเลข voucher specimen QBG. No. 105894 และเก็บรักษาตัวอย่างพืชอัดแห้งไว้ ณ ห้องเก็บรวบรวมพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และหอพรรณไม้ สวนพฤษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

การเตรียมตัวอย่างยอบ้านก่อนการสกัด

นำตัวอย่างลำต้นยอบ้านจากตำบลหนองแม่แตง อำเภอไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชร ปี พ.ศ.2560 มาตากแห้งที่อุณหภูมิห้องในบริเวณที่อากาศถ่ายเทสะดวกเพื่อป้องกันสารสำคัญสลายตัว จากนั้นบดด้วยเครื่องบดอย่างหยาบ

การเตรียมสารสกัดจากยอบ้านด้วยวิธีการสกัดเย็น (maceration)

ชั่งส่วนลำต้นยอบ้านแห้งบดอย่างหยาบ นำมาสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ เอทานอล เอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 40:60 และน้ำ แช่พืชตัวอย่างด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งกวนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำกากมาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิมจนกระทั่งสารสกัดใสไม่มีสี นำแต่ละสารสกัดที่กรองได้ทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน (rotary reduced pressure evaporator) จนได้สารสกัดหยาบเอทานอล สารสกัดหยาบ 40% เอทานอลและน้ำ และสารสกัดหยาบน้ำ มีร้อยละของสารสกัดหยาบ (% of yield) เท่ากับ 3.91, 3.25 และ 3.78% ตามลำดับ เก็บสารสกัดหยาบทั้งหมดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกรวมต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ทดสอบตามวิธีของ Yen และ Hsieh (1997) เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 20.0 mg/mL จากนั้นเจือจางลงให้มีความเข้มข้น 10.0, 5.00, 2.50, 1.25 และ 0.625 mg/mL ในเมทานอล เติมสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 μL ลงในช่องของไมโครเวลเพลท (microwell plate) จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 mM DPPH ปริมาตร 200 μL ลงไปแล้ว เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยมีเมทานอลเป็นสารละลายแบงค์ (blank solution) ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนจากสารสกัดเป็นสารมาตรฐาน BHT และ วิตามินซี (ascorbic acid) เข้มข้น 1-0.1 mg/mL คำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) จากสมการคำนวณ ดังนี้

% radical scavenging = (1-(A_{sample}/$A_{control}$)*100

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารทดสอบที่ผสมกับ DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวทำละลายที่ผสมกับ DPPH

หมายเหตุ แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

ทำการทดสอบตามวิธีของ Folin และ Ciocalteu (1927) เติมสารสกัดหยาบแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 500 µL ผสมกับ Folin- Cioculteu reagent (10% v/v) ปริมาตร 2.5 mL ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% w/v) 2 mL เขย่าตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง 90 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกเข้มข้น 400, 300, 200, 100, 50 และ 25 µg/mL มีสมการเส้นตรง คือ y = 0.0189x + 0.3271 และมีค่า R^2 = 0.9965 และคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 g (mgGAE/g dried weight)

ผลการวิจัย

ผลการสกัดลำต้นยอบ้านโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลเหลือง และมีร้อยละของสารสกัดต่อน้ำหนักลำต้นแห้งใกล้เคียงกัน **(ตาราง 1)**

ตาราง 1 ร้อยละของน้ำหนักลำต้นแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ตัวทำละลาย	น้ำหนักพืชแห้ง (กรัม)	น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
เอทานอล	46.22	1.81	3.91
เอทานอลต่อน้ำ (40:60)	30.73	1.00	3.25
น้ำ	30.94	1.17	3.78

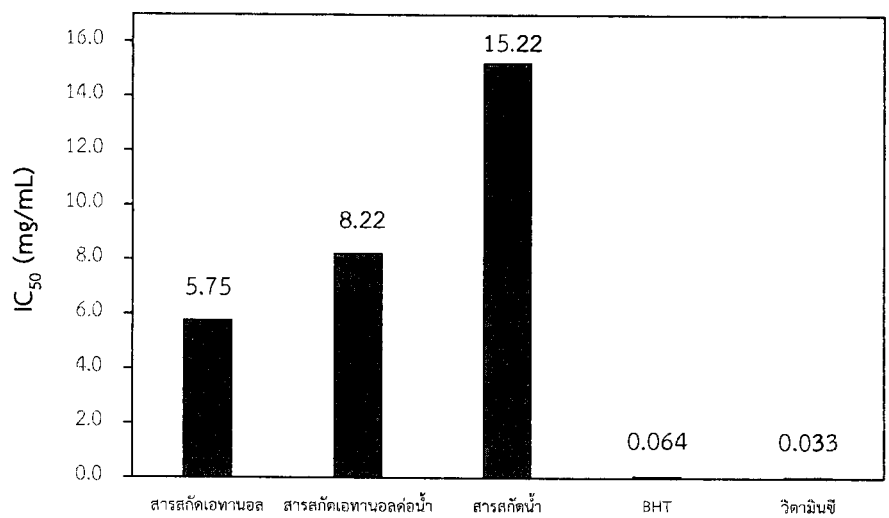
เมื่อนำสารสกัดเอทานอล 40% เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวัดปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ใช้สารปริมาณน้อย ง่าย และสะดวกต่อการวิเคราะห์ (Mishra et al., 2012) พบว่าสารสกัดเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัด 40% เอทานอลต่อน้ำ และสารสกัดน้ำ โดยมีค่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.75 8.22 และ 15.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานได้แก่ BHT และวิตามินซี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.064 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ **(ตารางที่ 2-3 ภาพที่ 1)** จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดลำต้นยอบ้านด้วยเอทานอล 40%เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก **(ภาพที่ 2)** พบว่าสารสกัดเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด มีค่าเท่ากับ 12.87 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด ส่วนสารสกัด 40%เอทานอลต่อน้ำ และสารสกัดน้ำ มีค่าเท่ากับ 10.90 และ 6.30 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ **(ตารางที่ 3)**

ตารางที่ 2 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยตัวทำละลายต่างๆ

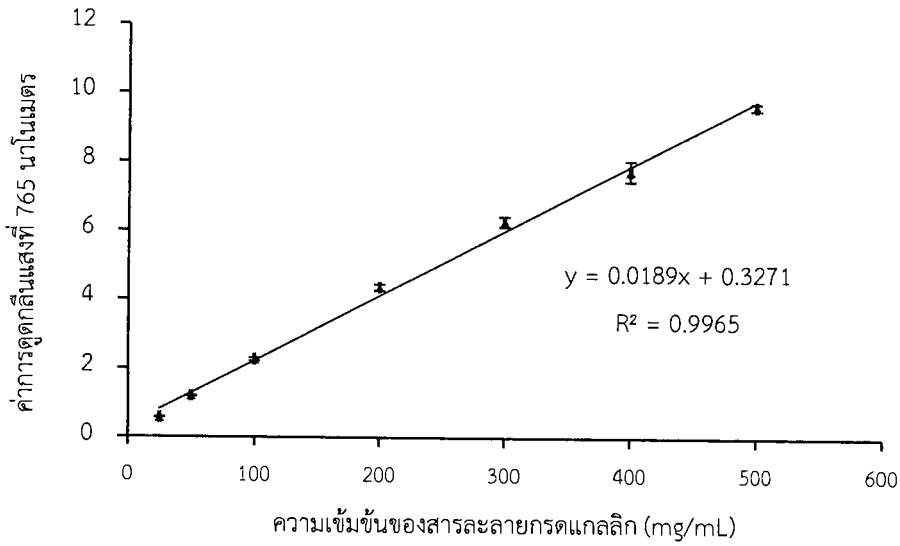
ตัวทำละลาย	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging)				
	20 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5mg/mL	1.25 mg/mL
เอทานอล	63.89±0.71	56.74±0.23	48.98±1.02	40.55±1.06	31.91±0.85
เอทานอลต่อน้ำ (40:60)	73.89±0.39	55.42±0.25	35.09±0.67	19.05±0.02	1.52±0.41
น้ำ	55.00±0.57	41.05±1.48	28.13±0.72	9.46±0.72	2.61±0.34

ตาราง 3 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบลำต้นยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ตัวอย่าง	ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (mg GAE/g crude extract)	ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; IC_{50} (mg/mL)
สารสกัดเอทานอล	12.87±0.08	5.75
สารสกัดเอทานอลต่อน้ำ (40:60)	10.90±0.11	8.22
สารสกัดน้ำ	6.30±0.01	15.22
BHT	-	0.064
Vitamin C	-	0.033



ภาพ 1 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันเทียบกับสารมาตรฐาน



ภาพ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก (mg/mL)

สรุปและอภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน ได้แก่ เอทานอล 40% เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ พบว่าสารสกัดเอทานอลสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ภาเกล้าและชญานิศา (2558) ที่รายงานว่าสารสกัดจากสมุนไพรเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัด 40%เอทานอลต่อน้ำ และน้ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากชนิดสารสำคัญของยอบ้านที่มีรายงานไว้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อนุพันธ์ของคูมาริน (coumarins) และ อิริดอยส์ (iridoids) เป็นต้น (Kamiya et al., 2005; Wang et al., 2016) โดยสารประกอบกลุ่มดังกล่าวนี้ สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากและยังสามารถละลายเอทานอลได้ดี ตามกฎการละลาย (like dissolves like) จึงส่งผลให้สารสกัดเอทานอลของยอบ้านออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดในตัวทำละลายอื่นๆ ในส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำหรือสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมาก บางส่วนอาจจะเป็นเกลือหรือสารประกอบมีขั้วที่มีโครงสร้างเล็กออกมาผสมกันอยู่ และโดยส่วนมากเกลือหรือสารประกอบมีขั้วสูงที่มีโครงสร้างเล็กมักจะไม่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นั่นหมายความว่า สารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมากเช่นสารสกัดน้ำ หรือ 40% เอทานอล ย่อมน่าจะมีเกลือหรือสารประกอบมีขั้วสูงที่มีโครงสร้างเล็กผสมอยู่ ส่งผลให้ฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารสกัดลดลงเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น จากการศึกษาตัวทำละลายต่อปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้าน พบว่าสารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆ เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารสำคัญที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด โดยทำหน้าที่ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น (Andarwulan et al., 2010, Sowndhararajan & Kang, 2013) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดแสดงว่าตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับระบบตัวทำละลายเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากลำต้นยอบ้านดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามควรศึกษาความสามารถในต้านอนุมูลอิสระวิธีอื่นๆ เช่น วิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) และ ABTS radical cation decolorization assay เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์ทราบโครงสร้างต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนพัฒนาการวิจัยและบริหารจัดการงานวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2561 ที่ให้ทุนสนับสนุนทำวิจัย ศูนย์วิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต และวรดลต์ แจ่มจำรูญ. (2559). *คู่มือจำแนกพรรณไม้*. กรุงเทพฯ: สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช.

ดามรัศมน สุรางกูร กมลวรรณ ศรีสวัสดิ์ ประกรณ์ เลิศสุวรรรณไพศาล อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์ และภรภัทร สำอางค์. (2560). การศึกษาสารสกัดยอบ้านต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 3 "Thailand 4.0 นวัตกรรมและการวิจัยเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน"*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และชญานิศา สุพา. (2558). ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2.* สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภักกำแพงเพชร.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2545). แอนติออกซิแดนท์: สารป้องกันโรคและเสริมสุขภาพ. *วารสารมหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, *21*(1), 57-62.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B. & Wijaya, N. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. Food chemistry, *121*(4), 1231-1235.

Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M. & Satake, T. (2005). New Anthraquinone and Iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 53*(12), 343-345.

Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in protens. *Journal of Biological Chemistry, 73*, 627-650.

Sang, S., Liu, G., He, K., Zhu, N., Dong, Z., Zheng, Q., Rosena, R. T. & Hoa, C. (2003). New Unusual Iridoids from the Leaves of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Show Inhibitory Effect on Ultraviolet B-Induced Transcriptional Activator Protein-1 (AP-1) Activity. *Bioorganic_&_Medicinal Chemistry*, *11*(12), 2499-2502.

Sowndhararajan, K. & Kang, S. C. (2013). Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. Saudi Journal of Biological Sciences, *20*(4), 319-325.

Su, B., Pawlus, A. D., Jung, H., Keller, W. J., McLaughlin, J. L. & Kinghorn, A. D. (2005). Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. *Journal of Natural Products*, *68*(4), 592–595.

Takashima, J., Ikeda, Y., Komiyama, K., Hayashi, M., Kishida, A. & Ohsaki, A. (2007). New Constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *55*(2), 343-345.

Wang, J., Qin, X., Chen, Z., Ju, Z., He, W., Tan, Y., Zhou, X., Tu, Z., Lu, F. & Liu, Y. (2016). Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). *Phytochemistry Letters, 15,* 13-15.

Yang, J., Gadi, R., Paulino, R. &Thomson, T. (2010). Total phenolics, ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage. *Food Chemistry*, *122*, 627–632.

Yen, G.C. & Hsieh, G.L. (1997). Antioxidant effects on dopamine and related compounds. *biosci biotech biochem journal, 61*(10), 1646-1649.

B1_002_OF: EFFECT OF *Morinda citrifolia* L. ROOT ETHANOLIC EXTRACT ON SK-N-SH NEUROBLASTOMA CELLS INDUCED BY H_2O_2

Srisawad[1], Apinun limmongkon[1], Pornpat samang[2] and Damratsamon Surangkul[1,*]
[1]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok 65000, Thailand
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phisanulok 65000, Thailand
*e-mail: damratsamon@gmail.com

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the people having age more than 65. The risk factor of Alzheimer's including genetics alteration, aging and environments may also be important such as pollution, smoking and UV radiation that have been involved in oxidative stress leading to neuronal cell death by generation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2). Therefore, therapeutic strategies aimed at preventing ROS production for the treatment of AD. In this study focus on *Molinda citrifolia* L. or noni. Noni has been used in traditional medicine for anti-inflammation, anti-virus, antioxidation, and neuroprotection. Thus, this study aims to investigate neuroprotective effect of noni on SK-N-SH neuroblastoma cells induced by H_2O_2. The crude extracts from root were extracted by ethanol and were assessed for neuroprotective effect. Incubation of SK-N-SH cells pre-treated with various concentrations of noni root ethanolic extract for 24 h and then treated with 175 μM H_2O_2 for 3 h measured cell viability by MTT assay. The result showed that neuroprotective effect of noni root ethanolic extracts significantly promoted cell viability at concentrations of 125, 250 and 500 μg/ml. noni root ethanolic extract has neuroprotective effect against oxidative stress in SK-N-SH cells induced by H_2O_2, suggesting that noni root ethanolic extract is a highly promising agent in the prevention of Alzheimer's disease.

Introduction: Nowadays around the world including Thailand is entering aging society, the elderly population is likely to increase. The following is the disease in the elderly such as Alzheimer's disease (AD). AD is the most common form of dementia type of progressive neurodegenerative diseases in humans[1]. Pathology of Alzheimer's disease is amyloid plaques cause of amyloid precursor protein was cleaved by β-secretase and γ-secretase leading to beta amyloid aggregate extracellular neuron[2]. The main functions of tau are the stabilization of microtubules on neuron. When tau is abnormally hyperphosphorylated and form intracellular neurofibrillary tangles[3]. Cholinergic deficit has been implicated in the pathogenesis of AD. Deficiency of acetylcholine (ACh) found in patients influence on fundamental role in memory[4]. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) are the promising strategies in the development of drug for disease. Currently, most of the drugs available for treatment of AD are ChE inhibitor such as Galantamine, Donepezil, Rivastigmine and Tacrine. However, they have been reported about numerous side effects[5]. Even now, the cause of AD remains unclear; the risk factor of Alzheimer's including genetics alteration of several genes such as *APP*, *PSEN1* and *PSEN2* genes has been associated with AD. Aging is the risk factor as well and the last one is environments may also be important such as pollution, smoking, ionizing radiation and UV radiation. These have been involved in oxidative stress leading to neuronal cell death by generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2). In many cells, ROS caused DNA damage, oxidative of proteins, peroxidation of lipids, and thus induced apoptosis[6]. Therefore, therapeutic strategies aimed at preventing ROS production for the treatment of AD.

In recent years, nature has been a continuous source of pharmacologically active molecules and medicinal herbs[7]. In this study focus on *Molinda citrifolia* L. or noni. Noni uses traditionally for many diseases including diabetes, hypertension and their effects are anti-inframmatory, antioxidant and neuroprotective effect[8]. Phytochemical compounds have been

© The 44th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 44)

already identified in the noni plant, and the major micronutrients are phenolic compounds, organic acids and alkaloids[9,10]. The phenolic compounds, the most important reported are anthraquinones (damnacanthal, morindone, morindin, etc.), and also aucubin, asperuloside, and scopoletin. The main organic acids are caproic and caprylic acids, while the principal reported alkaloid is xeronine[11]. They have been reported about antioxidant. Antioxidants from nutritional sources can protect against the death of neuronal cells in AD[12]. Therefore, in the present study, we investigate the neuroprotective effect of noni root ethanolic extract on SK-N-SH neuroblastoma cells induced by H_2O_2.

Methodology:

Cell line and cell culture SK-N-SH human neuroblastoma cells was purchased from American Type Culture Collection (ATCC). They were maintained in minimum essential medium (MEM) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in 5% CO_2.

Noni root ethanolic extract preparation We got crude ethanolic extracts (cold extraction) from Dr. Pornpat Samang Faculty of Science and Technology Pibulsongkram Rajabhat University. Crude ethanolic extract dissolve by 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Cell viability assay An MTT reduction assay was used to assess the viability of the cells. The cells were seeded in 96-well plate at a density of 1×10^4 cells per well and incubated overnight at 37°C in 5% CO_2. The cells were pre-treated with various concentrations of Noni root ethanolic extract for 24 hours and then treated with 175 µM H_2O_2. A solution of 1 mg/ml MTT was added to each well and the cells were further incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO_2. The reaction with the MTT had produced purple MTT formazan crystals which dissolved in DMSO. The product was measured by a microplate reader at 540 nm. The percentage of cell viability was normalized to the control group (0.5% DMSO).

Statistical analysis Data are present as means ± standard error (SE). Statistical significance was determined by student's t-test. *p*-value < 0.05 were considered as statistically significant.

Results and Discussion:

Cytotoxicity of noni root ethanolic extract on SK-N-SH cells: SK-N-SH cells were treated with noni root ethanolic extract (31.25-2,000 µg/ml) for 24, 48, 72 hours and cell viability were assessed by MTT assay. As shown in Fig. 1, noni root ethanolic extract promoted cell viability at concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg/ml. But 1000 and 2000 µg/ml significantly induced neurotoxicity ($P < 0.05$) as compared with the control.

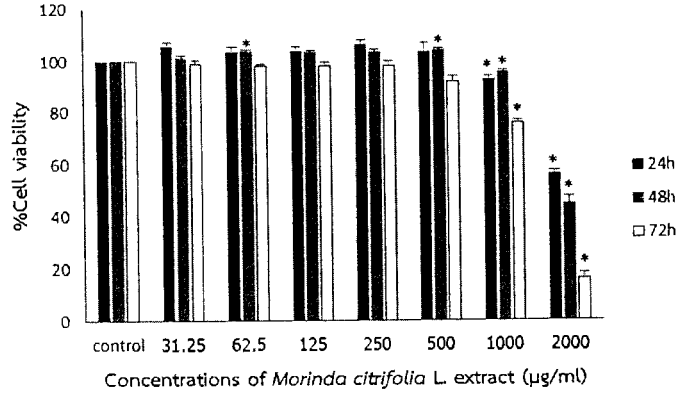


Figure 1. Cytotoxicity of noni root ethanolic extract on SK-N-SH cells.
K-N-SH cells were treated with noni root ethanolic extract at the concentrations of 31.25-2000 µg/ml. After 24, 48, 72 hours incubation, cytotoxicity was determined by MTT assay. Data were presented as mean ± standard error (SE; n=3). * $P < 0.05$ compared to control.

© The 44th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 44)

Cytotoxicity of H_2O_2 on SK-N-SH cells: SK-N-SH cells were treated to H_2O_2 (50-200 µM) for 3 hours and cell viability was assessed by MTT assay. As shown in Fig. 2, H_2O_2 decreased cell viability in a dose dependent manner. Exposure of 150 and 200 µM of H_2O_2 significantly reduced the survival ($P < 0.05$) as compared to control. The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) value was 175 µM.

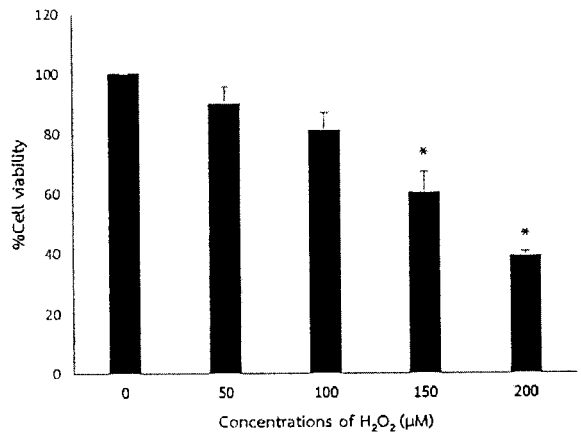


Figure 2. Cytotoxicity of H_2O_2 on SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were treated with H_2O_2 at the concentrations of 50-200 µM. After 3 hours incubation, cytotoxicity was determined by MTT assay. Data were presented as mean ± standard error (SE; n=3).
*$P < 0.05$ compared to control.

Effects of noni root ethanolic extract on SK-N-SH cells induced by H_2O_2: The neuroprotective effect of noni root ethanolic extract on SK-N-SH cells induced by 175 µM H_2O_2, the results showed that noni root ethanolic extract significantly promoted cell viability at concentrations of 125, 250 and 500 µg/ml ($P < 0.05$) as compared to 175 µM H_2O_2.

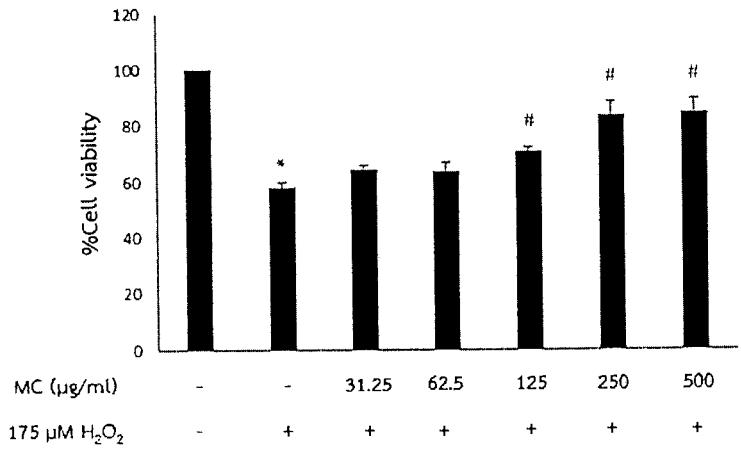


Figure 3. Effects of noni root ethanolic extract on SK-N-SH cells induced by H_2O_2. SK-N-SH cells were pre-treated noni root ethanolic extract at the concentrations of 31.25-500 µg/ml for 24 h and then treated with 175 µM H_2O_2. After 3 hours incubation, cytotoxicity was determined by MTT assay. Data were presented as mean ± standard error (SE; n=3).
*$P < 0.05$ compared to control.

© The 44th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 44)

Oxidative stress is a major cause of cellular injuries in a variety of human neurodegenerative diseases[13,14]. Numerous studies have demonstrated the neurotoxicity of H_2O_2 induced oxidative stress[15,16,17]. In this study, we investigated the protective effect of noni root ethanolic extract against H_2O_2-induced oxidative stress in SK-N-SH. Noni has been used in traditional medicine for anti-inflammation, antioxidation, and neuroprotection. Noni contain phytochemical compound is phenolic compounds, organic acids and alkaloids. The phenolic compounds, the most important reported are anthraquinones (damnacanthal, morindone, morindin, etc.), and also aucubin, asperuloside, and scopoletin. The main organic acids are caproic and caprylic acids, while the principal reported alkaloid is xeronine. They have been reported about antioxidant activity. Antioxidants from nutritional sources can protect against the death of neuronal cells in AD. Thus, it has been postulated that noni has antioxidant properties that can protect against oxidative stress-induced cell death. Moreover, noni juice may have a preventive effect against ischemic neuronal damage. Antioxidants such as edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a strong free radical scavenger, is known to have neuroprotective effects on ischemic stroke and is used for treatment of patients with acute brain infarction[18]. Noni fruit on scopolamine induced memory impairment is due to its antioxidant property and inhibition of acetylcholinesterase activity. Previous studies revealed presence of compounds like rutin and scopoletin in noni which are reported to inhibit acetylcholinesterase and antioxidant activity[19].

Conclusion: Although many reports indicate that noni fruits have a strongly neuroprotective effect but not known about noni root. Therefore, this study investigated neuroprotective effect of noni root in SK-N-SH cells induced oxidative stress by H_2O_2. We found that noni root ethanolic extract is involved in the protection against oxidative stress. This suggests noni root ethanolic extract may be helpful for the prevention of Alzheimer's disease.

Reference:

1. Thummayot S, Tocharus C, Pinkaew D, Viwatpinyo K, Sringarm K, Tocharus J. NeuroToxicology. 2014;45:149-158
2. Dorey E, Chang N, Liu QY, Yang Z, Zhang W. Neurosci Bull. 2014;30:317-30
3. Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Brain pathology. 1991;4:279-86
4. Terry AV, Buccafusco JJ. J Pharmacol Exp Ther. 2003;306:821-827
5. Roseiro LB, Rauter AP, Serralheiro MLM. Nutrition and Aging. 2012;1:99-111
6. Halliwell B, Aruoma OI. FEBS Lett. 1991;281:9-19
7. Sales JM, Resurreccion AV. Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;6:734-70
8. Torres MA, Magalhães ID, Oliveira RM, Sá JC, Rocha AL, Silva AL. Phytother Res. 2017;31: 971-979
9. Krishnaiah D, Nithyanandam R, Sarbatly R. Intech Open Access Publisher. 2012;1:127-151
10. Pawlus AD, Su BN, Keller WJ, Kinghorn AD. J Nat Prod, 2005;68:1720-1722
11. Heinicke RM. Bulletin of the National Tropical Botanical Garden. 1985;15:10-14
12. Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Brain Res Bull. 2012;87:144-53
13. Simonia NA, Coyle JT. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:83-106
14. Gorman AM, McGowan A, O'Neill C. J Neurol Sci. 1996;139:45-52
15. Lin YC, Huang YC, Chen SC, Liaw CC, Kuo SC, Huang LJ, Gean PW. Neurochem Res. 2009;34:923-930
16. Sattayasai J, Chaonapan P, Arkaravichie T, Soi-ampornkul R, Junnu S, Charoensilp P, Samer J, Jantaravinid J, Masaratana P, Suktitipat B, Manissorn J. PLoS ONE. 2013;8:1-13
17. Park HR, Lee H, Park H, Jeon JW, Cho WK, Ma JY. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2015;15:171-181
18. Harada S, Hamabe W, Kamiya K, Satake T, Yamamoto J, Tokuyama S. Biol. Pharm. Bull. 2009;32:405-409

19. Pachauri SD, Tota S, Khandelwal K, Verma PRP, Nath C, Hanif K, Shukla R, Saxena JK, Dwivedi AK. Journal of Ethnopharmacology. 2012;139:34-41

© The 44th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 44)