

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส ของสารสกัดและส่วนสกัดย่อยจากใบตองแตก

ANTIOXIDANT AND ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITIES OF CRUDE AND FRACTIONATED EXTRACTS FROM TONG TAEK (*BALIOSPERMUM SOLANIFOLIUM*) LEAVES

คงเดช สวาสดีพันธ์¹ ตามรัศมีน สุรางกูร² อนุชิต ภาณุมาลวิวัฒน์³ และ กรภัทร ลำอ่างค์^{4*}
Kongdech Savasun¹ Damratsamon Surangkul² Anuchit Phanumartwath³
and Pornpat Sam-ang^{4*}

¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

³วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⁴สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

¹Chemistry Program, School of Science University of Phayao

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University

³College of Public Health Science, Chulalongkorn University

⁴Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

* corresponding author e-mail: pornpat335@gmail.com

(Received: 1 April 2020 ; Revised: 19 April 2020; Accepted: 21 April 2020)

บทคัดย่อ

ตองแตก (*Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh) เป็นสมุนไพรท้องถิ่นจัดอยู่ในวงศ์ยางพารา (Euphorbiaceae) ที่มีความสำคัญทางการแพทย์พื้นบ้านสำหรับการรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคบางชนิด จากการรายงานความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ยังมีการศึกษาเป็นจำนวนน้อย นอกจากนั้นฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสยังไม่มีเคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-ไดฟีนิล-1-พิดริลไฮดราซิล (DPPH) พร้อมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสจากสารสกัดหยาบใบตองแตกที่ถูกสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเขียวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.48±0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดมีค่า เท่ากับ 117.82 ± 2.32 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อกรัมสารสกัด สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส พบว่า สารสกัดหยาบ เอลิอะซีเตดมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุด เท่ากับ 62.47 ± 1.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ สูงสุดถูกนำมาแยกออกเป็นส่วนสกัดย่อยหรือสารกึ่งบริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบเมทานอลทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (BSM_1 – BSM_4) ถูกนำไป ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ส่วนสกัดย่อย BSM_2 และ BSM_4 ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.75 ± 0.02 และ 1.89 ± 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 72.99 ± 0.04 และ 59.43 ± 0.02 มิลลิกรัมสมมูลของ กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สำหรับส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ เอลิอะซีเตดทั้งหมด 5 ส่วน สกัดย่อย ($BSEA_1$ – $BSEA_5$) ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส พบว่า ส่วนสกัดย่อย $BSEA_3$ และ $BSEA_5$ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสได้ดีกว่าส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ที่แยกได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.19 ± 0.03 และ 1.20 ± 0.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถนำมาใช้ เป็นฐานข้อมูลต่อยอดสำหรับการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์จากใบตองแตก เพื่อพัฒนาเป็น ยารักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดใหม่ต่อไป

คำสำคัญ: ใบตองแตก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส

Abstract

Tong taek (*Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh) is a local herb in a family of Euphorbiaceae that is important to traditional medicine for treatment or relief of some illnesses. A few reports of the correlation between its antioxidant activity and total phenolic contents were reported. Moreover, the study of anti-acetylcholinesterase (AChE) activity has not been reported previously. Therefore, the objective of this research is to study the antioxidant activity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, analyze the total phenolic contents, and investigate the AChE inhibitory activity from Tong taek leaves extracts prepared by a maceration method using an increasing polarity of solvents including hexane, ethyl acetate and methanol, respectively. The crude methanolic extract showed the highest antioxidant activity with an IC_{50} value of 0.48 ± 0.02 mg/mL and total phenolic contents with a value of 117.82 ± 2.32 mg GAE/g crude extract. For the AChE inhibitory activity testing,

it was found that the crude ethyl acetate extract displayed the highest anti-AChE activity with an IC_{50} value of 62.47 ± 1.47 $\mu\text{g/mL}$ at the concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$. Then, the crude extracts exhibiting highest biological activities were further separated as fractions or semi-pure compounds by column chromatography to give four fractions (BSM_1 – BSM_4) from the crude methanolic extract which were tested for the antioxidant activity. The fraction BSM_2 and BSM_4 showed the relatively good antioxidant activity with IC_{50} values of 1.75 ± 0.02 and 1.89 ± 0.02 mg/mL , respectively. Their total phenolic contents are 72.99 ± 0.04 and 59.43 ± 0.02 mg GAE/g crude extract, respectively. Five fractions ($BSEA_1$ – $BSEA_5$) separated from the crude ethyl acetate extract were evaluated on the anti-AChE activity. It was found that both $BSEA_3$ and $BSEA_5$ fractions displayed their anti-AChE activity higher than other fractions with IC_{50} values of 1.19 ± 0.03 and 1.20 ± 0.07 mg/mL , respectively. These results can be used as further information supported for the isolation of bioactive compounds from *B. Solanifolium* leaves to be developed as a novel drug candidate for treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: Tong taek leaves, Antioxidant activity, Acetylcholinesterase inhibition activity

บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาประชากรผู้สูงอายุมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากเทคโนโลยีทางการแพทย์ที่ทันสมัยทำให้คนทุวัยมีอายุยืนขึ้นประกอบกับอัตราการเกิดลดลงส่งผลให้สัดส่วนประชากรผู้สูงอายุต่อจำนวนประชากรทั้งหมดสูงขึ้น (มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย, 2561) ดังนั้นปัญหาสุขภาพกลุ่มผู้สูงอายุจึงเป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากเป็นวัยที่อวัยวะในร่างกายเริ่มเสื่อมถอยลงเกิดโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น โรคที่พบบ่อย ได้แก่ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน มะเร็ง (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2557) รวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะสมองเสื่อม ซึ่งเป็นโรคที่เซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อสมองถูกทำลายส่งผลให้ การทำงานของสมองลดน้อยลงหรือทำงานไม่ได้ โรคในกลุ่มนี้ ได้แก่ อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และ พาร์กินสัน (Parkinson's disease) (ประเสริฐ, 2556) โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์นั้นเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 40–70 (สิรินทร, 2552)

โรคอัลไซเมอร์เกิดจากการฝ่อตัวของเนื้อเยื่อสมอง ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำงานของสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ ความจำและการเรียนรู้ถูกทำลาย จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์ พบว่า เป็นความผิดปกติของโปรตีนและ

การสะสมของแอมิลอยด์ เบต้า (Amyloid-beta: A β) ในเนื้อสมองปริมาณมากจนมีลักษณะ เรียกว่า แอมิลอยด์พลาแก (Amyloid plaques) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Holmes et al., 2008; Su & Zhang, 2016) สาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด แต่มี 2 สมมติฐานหลักของการเกิดโรค คือ 1) แบบ Non cholinergic เป็นสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับการเกิดแอมิลอยด์พลาแก ส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะเครียดกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินกว่าที่ร่างกายจะควบคุมได้จนอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อไขมันและโปรตีน โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Sun et al., 2010) และยังมีรายงาน พบว่า ภาวะเครียดจะทำให้ปริมาณการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase: AChE) เพิ่มขึ้น มีผลทำให้สารสื่อประสาทอะซีติลโคลีน (Acetylcholine) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ลดลง ทำให้จดจำได้น้อยลง (Melo et al., 2003) และ 2) แบบ Cholinergic เป็นสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารสื่อประสาทอะซีติล โคลีน (Acetylcholine: ACh) ที่ทำหน้าที่ควบคุมความจำลดลง โดยปริมาณสารสื่อประสาทนี้จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส และเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase: BChE) ในช่วงระยะเริ่มต้นของโรคอะซีติลโคลีนเอสเตอเรสจะเป็นเอนไซม์หลักในการสลายอะซีติลโคลีน แต่เมื่อเข้าสู่ระยะปลาย ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์สมองและเซลล์ประสาทถูกทำลายเพิ่มขึ้น เอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรสจะมีบทบาทในการสลายอะซีติลโคลีนมากขึ้น (Giacobini, 2002; Kitphati et al., 2011) ปัจจุบันตัวยาที่ใช้บรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ Galantamine Donepezil Rivastigmine และ Racrine เป็นยาในกลุ่มที่ใช้สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase) เพื่อป้องกันการสลายตัวของอะซีติลโคลีน ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความจำการรู้คิดดีขึ้น (Doraiswamy et al., 2002; Tan et al., 2014) แต่ยาในกลุ่มดังกล่าวจะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง และให้ผลในกลุ่มผู้ป่วยระยะแรกเท่านั้นไม่สามารถใช้กับผู้ป่วยในระยะรุนแรงได้ (Roseiro et al., 2012)

ทองแดง เป็นสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh อยู่ในวงศ์ Euphriaceae พบได้ทั่วไปใน ไทย เนปาล พม่า และอินเดีย (Anonymous, 1988) หลายส่วนของพืชนี้ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร เช่น ส่วนราก ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ ยาขับปัสสาวะ ยาแก้ไอ และยาชูกำลัง ส่วนใบใช้ในการรักษาโรคหอบหืดและหลอดลมอักเสบ จากรายงานวิจัยที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสกัดน้ำจากรากทองแดง มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Lymphocytic leukaemia P-388) (Ogura et al., 1978) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Desai et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลจากใบและรากทองแดงออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* แต่ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งกับเชื้อรา *Candida albicans* (Mali et al., 2006)

ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสจากสารสกัดหยาบใบตองแตกที่สกัดเย็นด้วยตัวทำละลายแบบเรียงชั้น และทำการแยกสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์สูงสุดออกเป็นส่วนสกัดย่อย (Fractions) เนื่องจากยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์ไม่มากนัก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป อีกทั้งเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับบรรเทาโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

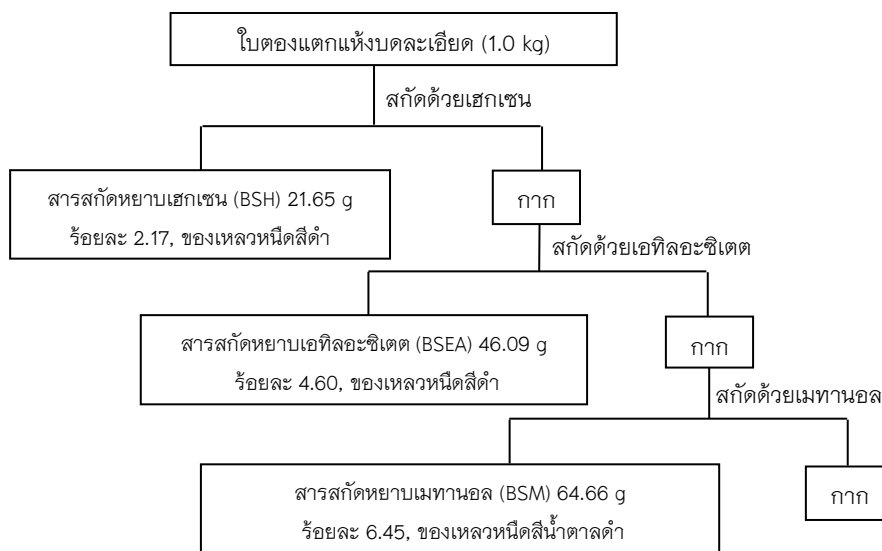
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Ascorbic acid (Merck) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich) Gallic acid (Sigma-Aldrich) Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich) Sodium carbonate (Na_2CO_3) 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich) 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride (Tris-HCl) (Sigma-Aldrich) Phosphate buffer Taurine (Sigma-Aldrich) Acetylcholinesterase (Sigma-Aldrich) Acetylthiocholine iodide (Sigma-Aldrich) Hexane (RCI Labscan) Ethyl acetate (RCI Labscan) Methanol (RCI Labscan) Methanol AR grade (Merck) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) AR grade (Merck)

2. การเตรียมตัวอย่างใบตองแตก

เก็บใบตองแตก (ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2558 จากพื้นที่อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา) จากนั้นทำการตรวจสอบและระบุเอกลักษณ์ของพืช โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา อินทพคุณ มีเลข Voucher Specimen PSRU 1012 เก็บรักษาไว้ ณ ห้องเก็บรวบรวมพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

3. การสกัดใบตองแตกโดยการสกัดเย็น (Maceration) ด้วยตัวทำละลายแบบเรียงชั้นที่อุณหภูมิห้อง

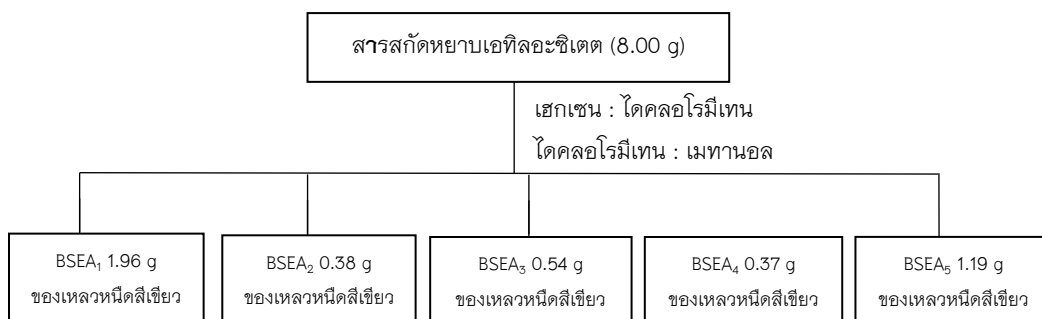
นำใบตองแตกมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการบดให้ละเอียด (1.0 kg) จากนั้นนำมาสกัดด้วยเฮกเซนในภาชนะปิดโดยวิธีการสกัดเย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน พร้อมกวนเป็นครั้งคราว ทำการกรองสารละลายออกโดยใช้กรวยกรองที่บรรจุสำลี และนำกากเดิมมาสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนใหม่อีกจนกระทั่งได้สารสกัดใสไม่มีสี หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จากนั้นนำกากเดิมมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตตและเมทานอล เช่นเดิม ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 ทำการเก็บสารสกัดหยาบแต่ละตัวทำละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดเย็นของใบตองตากแห้งด้วยตัวทำละลายแบบเรียงซ้ำ

4. การแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต

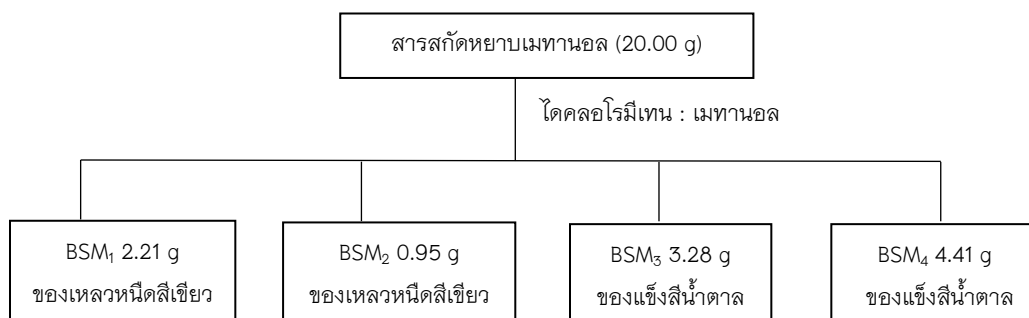
จากผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุด จึงนำสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 8.00 g มาทำการแยกเป็นส่วนสกัดย่อยโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ทำการชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ตามลำดับ ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนสกัดย่อย (BSEA₁–BSEA₅) ดังภาพที่ 2 จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส



ภาพที่ 2 การแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของใบตองตากแห้งโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

5. การแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอล

สารสกัดหยาบเมทานอล พบว่า มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดหยาบเมทานอล 20.00 g มาทำการแยกออกเป็นส่วนสกัดย่อยโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ทำการชะด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ได้กลุ่มสารออกมาทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (BSM₁–BSM₄) ดังภาพที่ 3 จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 3 การแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบตองแตกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Inta et al. (2019) โดยใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ละลายในเมทานอล) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 mg/mL ละลายใน DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (μL) เดิมสารละลาย DPPH 0.3 มิลลิโมลาร์ (mM) ในเมทานอล ปริมาตร 200 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) จากสมการดังนี้

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

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารทดสอบที่ผสมกับ DPPH

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวทำละลายที่ผสมกับ DPPH

คำนวณหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50) โดยหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents) โดยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric ทำการทดสอบตามวิธีที่ดัดแปลงของ Damsud et al. (2017) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 500 μL กับ 10 %v/v Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (mL) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7.5% สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 mL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Gallic acid equivalents, mg GAE/g crude extract)

8. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสของสารตัวอย่าง ตามวิธีดัดแปลงของ Ellman et al. (1961) เริ่มจากเตรียมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ความเข้มข้น 0.3 ยูนิต และ DTNB ที่ความเข้มข้น 3 mM ละลายใน 20 mM ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) pH 7.5 และ 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) pH 7.4 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน Tacrine ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/mL}$ และสารตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 100–2000 $\mu\text{g/mL}$ ละลายใน 0.5% DMSO ปริมาตร 25 μL เติมลงในสารละลายเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 1 mM ของอะซิติลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) ละลายใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 25 μL ตามด้วย DTNB 125 μL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ และส่วนสกัดย่อยเมทานอลจากใบตองแตก

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบตองแตกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ พบว่า สารสกัดหยาบแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดหยาบเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 ± 0.02 mg/mL ($p < 0.05$) และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 117.82 ± 2.32 mg GAE/g crude extract ส่วนสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระรองลงมา ตามลำดับ จากนั้นสารสกัดหยาบเมทานอล ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดถูกเลือกนำมาแยกออกเป็นส่วนๆ โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (BSM₁–BSM₄) และนำ 4 ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า ส่วนสกัดย่อย BSM₂ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} เท่ากับ 1.75 ± 0.02 mg/mL) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (72.99 ± 0.04 mg GAE/g crude extract) ได้ดีใกล้เคียงกับส่วนสกัดย่อย BSM₄ โดยมี IC_{50} เท่ากับ 1.89 ± 0.02 mg/mL และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 59.43 ± 0.02 mg GAE/g crude extract ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย BSM₃ และ BSM₁ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และส่วนสกัดย่อยเมทานอลจากใบตองแตก

สารตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
	IC_{50} (mg/mL)	(mg GAE/g crude extract)
สารสกัดหยาบเฮกเซน	ND	$58.74 \pm 1.19^{a,b}$
สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต	6.50 ± 0.79^e	70.66 ± 0.15^c
สารสกัดหยาบเมทานอล	0.48 ± 0.02^b	117.82 ± 2.32^e
ส่วนสกัดย่อย BSM ₁	ND	59.40 ± 0.12^b
ส่วนสกัดย่อย BSM ₂	1.75 ± 0.02^c	72.99 ± 0.04^d
ส่วนสกัดย่อย BSM ₃	4.07 ± 0.02^d	57.23 ± 0.04^a

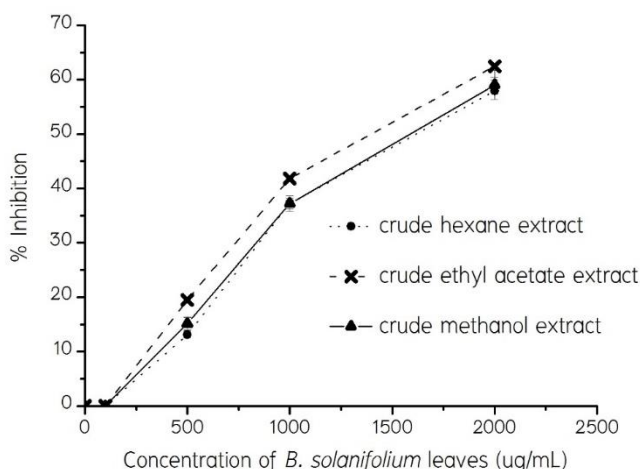
ตารางที่ 1 (ต่อ)

สารตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
	IC ₅₀ (mg/mL)	(mg GAE/g crude extract)
ส่วนสกัดย่อย BSM ₄	1.89±0.02 ^c	59.43±0.02 ^b
วิตามินซี (positive control)	0.04±0.01 ^a	–

หมายเหตุ ND (Not determine) คือ ไม่สามารถระบุได้ เนื่องจากความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าร้อยละ 50 และอักษร a-e ในแนวนั่ง คือ ลำดับการจัดกลุ่มความแตกต่างแบบค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต (Fractions) จากใบตองแตก

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส ของสารสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane extract) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Crude ethyl acetate extract) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Crude methanol extract) พบว่า ที่ความเข้มข้น 2000 µg/mL สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมีร้อยละการยับยั้ง เท่ากับ 62.47 ± 1.47 ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเมทานอลที่มีร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 59.04 ± 2.68 และ 57.92 ± 0.95 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0–2000 µg/mL จะเห็นว่ามีความร้อยละการยับยั้งไม่แตกต่างกันมากนัก ดังภาพที่ 4 เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (IC₅₀ = 1.34 ± 0.03 mg/mL) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ได้สูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเมทานอล (IC₅₀ = 1.54 ± 0.08 และ 1.52 ± 0.20 mg/mL) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากนั้นทำการแยกสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุดออกเป็นส่วนสกัดย่อย โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด 5 ส่วนสกัดย่อย (ส่วนสกัดย่อย BSEA₁–BSEA₅) แล้วนำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส พบว่า ส่วนสกัดย่อย BSEA₃ และ BSEA₅ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.19 ± 0.03 และ 1.20 ± 0.07 mg/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ ส่วนสกัดย่อย BSEA₂ และ BSEA₄ ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.34 ± 0.03 และ 1.33 ± 0.05 mg/mL ตามลำดับ และส่วนสกัดย่อย BSEA₁ ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์น้อยที่สุดด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.48 ± 0.08 mg/mL ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 4 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส (% inhibition) ของสารสกัดหยาบใบตองแตกด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0–2000 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบตองแตก

สารตัวอย่าง	IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส (mg/mL)
ส่วนสกัดย่อย BSEA ₁	1.48 ± 0.08^d
ส่วนสกัดย่อย BSEA ₂	1.34 ± 0.03^c
ส่วนสกัดย่อย BSEA ₃	1.19 ± 0.03^b
ส่วนสกัดย่อย BSEA ₄	1.33 ± 0.05^c
ส่วนสกัดย่อย BSEA ₅	1.20 ± 0.07^b
Tarcrine (positive control)	$4.4 \times 10^{-5} \pm 0.002^a$

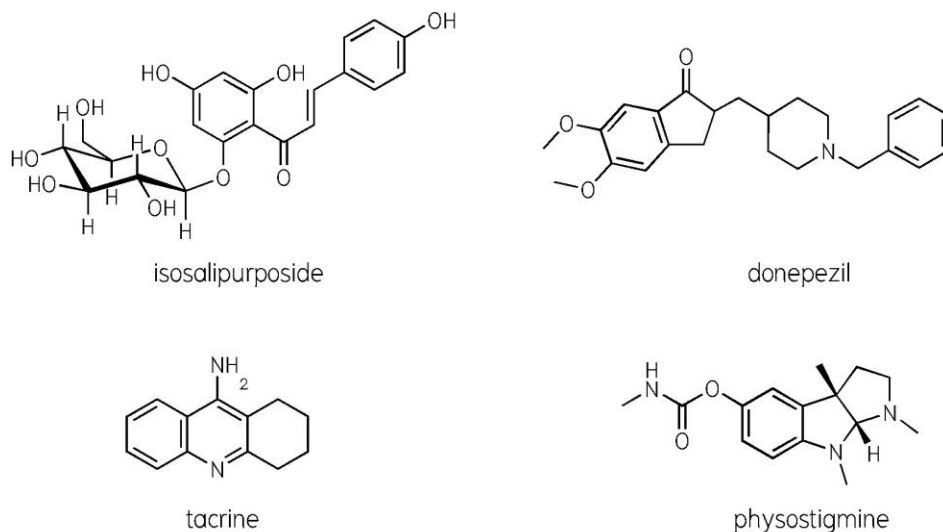
หมายเหตุ อักษร a-d ในแนวนั่ง คือ ลำดับการจัดกลุ่มความแตกต่างแบบค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดโรคภัยต่างๆ ได้ง่าย เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคตับแข็ง เป็นต้น (Halliwell, 1994) ด้วยเหตุนี้สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยชะลอหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตองแตกโดยวิธี DPPH เนื่องจากเป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์

มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (สีม่วง) เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กทรอนิกส์กับ DPPH จะเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง จากการศึกษา พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอล มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 ± 0.02 mg/mL และ 117.82 ± 2.32 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Desai et al. (2008) ที่กล่าวว่า สมุนไพรที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีส่วนใหญ่จะมีสารประกอบฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก โดยทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรขึ้นส่งผลให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับโมเลกุลอื่นได้อีก (Andarwulan et al., 2010) ดังนั้นสารสกัดหยาบเมทานอลแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ถูกเลือกมาแยกออกเป็น ส่วนสกัดย่อยโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (BSM₁–BSM₄) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ส่วนสกัดย่อย BSM₂ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} เท่ากับ 1.75 ± 0.02 mg/mL) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (72.99 ± 0.04 mg GAE/g crude extract) ได้ดีใกล้เคียงกับส่วนสกัดย่อย BSM₄ โดยมี IC_{50} เท่ากับ 1.89 ± 0.02 mg/mL และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 59.43 ± 0.02 mg GAE/g crude extract แต่การออกฤทธิ์นั้นน้อยกว่า สารสกัดหยาบเมทานอล อันเนื่องมาจากกลุ่มสาระสำคัญจากใบตองแตกเป็นสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นองค์ประกอบหลัก (Mali et al., 2008) โดยสารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากและละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดี ตามกฎการละลาย (Like dissolves like) ส่งผลให้สารสกัดหยาบเมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่า (ภาเกล้า และชญาณิศ, 2558) แต่ในขณะเดียวกัน เมื่อทำการแยกออกเป็น ส่วนสกัดย่อย พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกลับน้อยกว่าสารสกัดหยาบเมทานอล อันเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบบางส่วนช่วยเสริมฤทธิ์กันทำให้ ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Synergistic effect) จากนั้นทำการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดหยาบใบตองแตก ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสลาย อะซีติลโคลีน ช่วยบรรเทาอาการของโรคสมองเสื่อมอันมีผลกระทบมาจากความเครียด พบว่า สารสกัดหยาบทั้งหมดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ แต่สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 2000 µg/mL มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสได้ดีกว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนและเมทานอล โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งและค่า IC_{50} เท่ากับ 62.47 ± 1.47 µg/mL และ 1.33 ± 0.03 mg/mL ตามลำดับ จึงถูกเลือกมาทำการแยกออกเป็น ส่วนๆ ได้ทั้งหมด 5 ส่วนสกัดย่อย (BSEA₁– BSEA₅) พบว่า ส่วนสกัดย่อย BSEA₃ และ BSEA₅ มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสได้มากกว่าส่วนสกัดย่อย BSEA₁ BSEA₂ และ BSEA₄ จะเห็นว่าการที่ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและส่วนสกัดย่อยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส

ได้ดั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ามีกลุ่มสาระสำคัญเป็นสารจำพวกแอลคาลอยด์หรือฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีขั้วสูงแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นองค์ประกอบหลัก (Ghribia et al., 2014; Vitaya et al., 2017) ประกอบกับยาที่ใช้รักษาหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์ทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น Tacrine Donepezil และ Rivastigmine และยาที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น Galanthamine Huperzine A และ Physostigmine ล้วนเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ทั้งสิ้น (Doraiswamy et al., 2002; Tan et al., 2014) ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากพืชและยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์

สรุปผลการวิจัย

จากพืชสมุนไพรใบตองแตกที่นำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอล และส่วนสกัดย่อย BSM₂ และ BSM₄ ที่ถูกแยกจากสารสกัดหยาบเมทานอลนั้น ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด นอกจากนี้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต ส่วนสกัดย่อย BSEA₃ และ BSEA₅ ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรสได้ดี ซึ่งจะเป็นส่วนช่วยในการเพิ่มสารสื่อประสาทอะซีติลโคลีนในเซลล์ประสาท Cholinergic จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อยจากใบตองแตกที่แยกได้นี้ มีความน่าสนใจในการนำมาทำการแยกเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป สำหรับนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการป้องกันหรือบรรเทาอาการของผู้ป่วยที่ทุกข์ทรมานจากโรคอัลไซเมอร์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สำหรับงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ ภายใต้โครงการสนับสนุนทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ (วท.) ประจำปี 2559 และขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- ประเสริฐ อัลลันตชัย. (2556). **ปัญหาสุขภาพที่พบบ่อยในผู้สูงอายุและการป้องกัน**. กรุงเทพฯ: ยูเนี่ยน ศรีเอชเอ็น.
- ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และชญาณิศา สุพา. (2558). **ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร**. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 (น. 627–635). กำแพงเพชร: มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.
- มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย (มส.ผส.). (2561). **รายงานสถานการณ์ผู้สูงอายุไทย พ.ศ. 2561**. นครปฐม: พรินเตอร์.
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการส่งเสริมสุขภาพ (สสส.). (2557). **คู่มือการอบรมการดูแลสุขภาพผู้สูงอายุ 18 ชั่วโมง**. สระบุรี: โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 2 กระทรวงสาธารณสุข.
- สิรินทร ฉันทศิริกาญจน. (2552). **คู่มือยิวดอายุสมอง**. กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดดูเคชั่น.
- 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.
- Anonymous. (1988). **The Wealth of India: A dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products**. Raw materials, Vol A. Publication and Information Directorate, New Delhi: India.
- Biju, J., Sulaiman, C.T., Sadashiva, C.T., Satheesh, G. & Reddy, V.R.K. (2013). In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition of *Baliospermum montanum*, *Humboldtia brunonis* Wall. var. *raktapushpa* and *Pittosporum viridulum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(12), 63–65.
- Damsud, T., Chanwun, T., Srimek, N. & Songsaneng, S. (2017). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of young Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) extract. *KKU Science Journal*, 45(3), 543–550.
- Desai, P.V., Wadekar, R.R., Kedar, G.H. & Patil, K.S. (2008). Free radical scavenging activity of aqueous extract of roots of *Baliospermum montanum* Muell-Arg. *International Journal of Green Pharmacy*, 2, 31–33.

- Doraiswamy, P.M., Leon, J., Cummings, J.L., Marin, D. & Neumann, P.J. (2002). Prevalence and impact of medical comorbidity in Alzheimer's disease. **The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, **57**, 173–177.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, **7**, 88–95.
- Giacobini, E. (2002). Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease. **Journal of neural transmission. Supplementum**, **62**, 181–187.
- Halliwell, B. (1989). **Free radicals in biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 543.
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V. & Bayer, A. (2008). Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. **The Lancet**, **372**, 216–223.
- Inta, T., Saelee, A., Sam-ang, P., Srisayam, M., Phalee, W. & Chodnakarin, A. (2019). Inhibition *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity of crude extract from rested celosin (*Celosia cristata*). **PSRU Journal of Science and Technology**, **4**(2), 34–42.
- Kitphati, W., Wattanakamolkul, K., Lomarat, P., Phanthong, P., Anantachoke, N., Nukoolkarn, V. & Bunyapraphatsara, N. (2011). Anticholinesterase activity of constituents of essential oils from Thai medicinal plants. **Journal of Physiological and Biomedical Sciences**, **24**, 58–67.
- Mali, R.G., Mahajan, S.G. & Mehta, A.A. (2006). Antimicrobial activity of *Baliospermum montanum* Muell–Arg leaves. **Planta Indica**, **2**, 13–14.
- Mali, R.G. & Wadekar, R.R. (2008). *In vitro* Anthelmintic activity of *Baliospermum montanum* Muell.Arg roots. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **70**, 131–133.
- Melo, J.B., Agostinho, P. & Oliveira, C.R. (2003). Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. **Journal of Neuroscience Research**, **45**, 117–127.
- Ogura, M., Koike, K., Cordell, G.A. & Farnsworth, N.R. (1978). Potential anticancer agents VIII. Constituents of *Baliospermum montanum* (Euphorbiaceae). **Planta Medica**, **33**, 128–143.
- 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.
- Su, F., Bai, F. & Zhang, Z. (2016). Inflammatory cytokines and Alzheimer's disease: A review from the perspective of genetic polymorphisms. **Neuroscience Bulletin**, **32**, 469–480.
- Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A. & Sun, G.Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, **41**, 375–383.
- Tan, P.P., Yuan, H.H., Zhu, X., Cui, Y.Y., Li, H., Feng, X.M., Qiu, Y., Chen, H.Z. & Zhou, W. (2014). Activation of muscarinic receptors protects against retinal neurons damage and optic nerve degeneration *in vitro* and *in vivo* models. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, **20**(3), 227–236.

Vittaya, L., Khongsai, S., UI-ENG, J. & Leesakul, N. (2017). Phytochemical screening, phenolic content and free radical scavenging activity of *Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh stem and leaf extracts. **Thai Journal of Botany**, 1, 97–105.