

นิพนธ์ต้นฉบับ

ศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรสของผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูก
ในประเทศไทยเนตรนภา อุ่นทิ⁽¹⁾, ฉัตรภา หัตถโกศล^{(1)*}

วันที่ได้รับต้นฉบับ: 18 มีนาคม 2564

บทคัดย่อ

วันที่ตอบรับการตีพิมพ์: 14 กรกฎาคม 2564

* ผู้รับผิดชอบบทความ

(1) ภาควิชาโภชนวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดหนึ่งที่มีผลต่อความจำ ความคิด พฤติกรรม และอารมณ์ โดยพบความชุกเพิ่มสูงขึ้นในวัยสูงอายุ ปัจจุบันทั่วโลกมีผู้ป่วยด้วยโรคนี้ประมาณ 50 ล้านคน การบริโภคอาหารที่อุดมไปด้วยวิตามิน แร่ธาตุ และสารพฤกษเคมีสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรสที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกได้ในประเทศไทยเป็นผลไม้ที่มีพลังงานต่ำ โยอาหารสูง อีกทั้งอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ มีวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ สารกลุ่มฟีนอลิก และอัลคาลอยด์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรสในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทย ทั้ง 10 ชนิด ผลการศึกษา พบว่า มะขามป้อม มะเ็นมา มะเกี๋ยง และมะยม สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรสได้ระดับสูงสุด โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 89 ถึง 91 และพบว่ามะขามป้อมมีปริมาณฟีนอลิกรวม และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ ORAC สูงที่สุด ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทย มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์

คำสำคัญ: โรคอัลไซเมอร์, การยับยั้งเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรส, ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูก
ในประเทศไทย

Original Article

Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Berries Cultivars in Thailand

Netnapa Ounti⁽¹⁾, Chatrapa Hudthagosol^{(1)*}

Received Date: March 18, 2021

Accepted Date: July 14, 2021

** Corresponding author*

(1) Department of Nutrition,

Faculty of Public Health,

Mahidol University

Abstract

Alzheimer's disease is a brain disorder affecting memory, thinking skills, behaviors and emotions, the most prevalent form of dementia with an increasing tendency among elderly people. Globally, over 50 million people present the disease. Consuming foods rich in vitamins, minerals and phytochemicals in plants can reduce acetylcholinesterase, which is a major cause of Alzheimer's disease. Berries constitute fruits that can be found locally in all parts of Thailand comprising a rich source of various phytochemicals including flavonoids, carotenoid phenolics and alkaloids. The purpose of this study was to determine the acetylcholinesterase inhibitory activities of ten Thai berries. The results showed that ma-kham pom, ma-mao, ma-kiang, and ma-yom with 3 mg/ml extract exhibited the highest anti-acetylcholinesterase activities ranging from 89 to 91% inhibition. In addition, Ma-kham-pom exhibited the highest quantity of Total phenolic content (TPC) and antioxidant activities as being detected by Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. The results of this study revealed that berries cultivars in Thailand provided efficacy in antioxidant activities, inhibiting acetylcholinesterase leading to the development of dietary supplements to prevent and treat Alzheimer's disease.

Keywords: *Alzheimer's Disease, Acetylcholinesterase Inhibition, Berries Cultivars in Thailand*

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer' disease) เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดหนึ่งที่พบมากประมาณร้อยละ 60-80 ส่วนใหญ่พบในวัยสูงอายุตั้งแต่ 60 ปี ขึ้นไป ปัจจุบันทั่วโลกมีผู้ป่วยด้วยโรคนี้ประมาณ 50 ล้านคน และคาดว่าจะอีก 40 ปีข้างหน้าจะมีผู้ป่วยเพิ่มอีกเป็น 3 เท่า (World Alzheimer Report, 2015) สำหรับในประเทศไทย พบความชุกร้อยละ 3-5 โดยพบมากขึ้นตามอายุซึ่งอาจพบสูงถึงร้อยละ 30 ในผู้สูงอายุที่อายุมากกว่า 85 ปี จากรายงานในปี พ.ศ. 2558 พบผู้ป่วยด้วยโรคนี้ประมาณ 6 แสนคน เป็นผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 100,000 รายต่อปี และคาดว่าจะในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้สูงอายุป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 1 ล้านคน (สุพัฒน์ หลังยาหน่าย, 2560) จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มีประวัติคนในครอบครัวเป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีโอกาสเป็นโรคนี้มากกว่าคนทั่วไป ส่วนใหญ่สาเหตุการเกิดโรคอัลไซเมอร์มาจากการสูญเสียเซลล์ประสาทจำนวนมาก รวมถึงเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญต่อความจำคือสารอะซีทิลโคลีน (Acetylcholine, Ach) เมื่อระดับ Ach ในสมองลดลง จึงส่งผลต่อความจำ ความคิด พฤติกรรม และอารมณ์ พบว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีระดับของสารอะซีทิลโคลีนลดลงอย่างมาก ปริมาณสารอะซีทิลโคลีนนี้ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยอะซีทิลโคลีน จึงทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ดังนั้นเป้าหมายสำคัญของการรักษาโรคอัลไซเมอร์คือการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (ก้องเกียรติ ภูณัทกันทรารกร, 2561) ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่พบในผักและผลไม้ โดยเฉพาะในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่สามารถชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาท ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอัล

ไซเมอร์ (Letenneur et al., 2007; Robert et al., 2010; Hyesung et al., 2020)

ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกได้ในประเทศไทย เช่น มะขามป้อม ตะขบ ลูกหว้า มะยม มะเฒ่า ลูกหม่อน เชอร์รี่ไทย โทงเทงฝรั่ง และมะเกี๋ยง เป็นผลไม้ที่สามารถพบได้ตามท้องถื่นทั่วทุกภาค เจริญเติบโตได้เองตามธรรมชาติ แต่การบริโภคยังไม่แพร่หลาย ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของผลไม้เหล่านี้ พบว่าเป็นผลไม้ที่มีพลังงานต่ำ ใยอาหารสูง อีกทั้งอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ มีวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระหลากหลายชนิด เช่น วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) และสารพฤกษเคมี เช่น แทนนิน (Tannin) ลิกแนน (Lignans) เทอปีน (Terpenes) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolics compounds) และอัลคาลอยด์ (Alkaloids) (Dhale & Mogle, 2011; Radojkovi et al., 2012; Duangporn & Siripong, 2009) สารเหล่านี้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ (Radojkovi et al., 2012; Kregel & Zhang, 2007) ช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ประสาท ป้องกันสมองขาดเลือด (Kaewkaen et al., 2012) และยับยั้งอะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Moniruzzaman et al., 2011) จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสมบัติทางเคมีของผลไม้เบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยที่มีศักยภาพในการป้องกันหรือยับยั้งสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ยังมีค่อนข้างจำกัด จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทย

จำนวน 10 ชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองทาง
ห้องปฏิบัติการ (Laboratory research)

1. การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างในรูปผงแห้งของผลไม้
ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกได้ในประเทศไทย จำนวน 10 ชนิด
ได้แก่ มะขามป้อม มะยม มะเฒ่า มะเกี๋ยง เซอร์ไทย ลูก
หม่อน โทงเทงฝรั่ง ตะขบ ลูกหว้า และมะม่วงหาวมะนาว
โห่ นำมาล้างและทำความสะอาด จากนั้นนำไปทำแห้ง
แบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และบดให้ละเอียดโดย
ใช้โกร่งบดสาร นำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช
บรรจุในถุงพลาสติกลามิเนตด้วยอลูมิเนียม ฟลอยด์ปิด
ผนึกแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
จนกว่าจะนำไปใช้ การสกัดสารสำคัญของผลไม้ทำได้โดย
นำตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน
ระหว่างตัวอย่างแห้งและน้ำกลั่นเท่ากับ 1:15, Solid/
Liquid ratio นำไปเขย่าต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศา
เซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่าแบบเป็น
วงจรร (Orbital shaker) แล้วจึงนำไปกรองด้วยกระดาษ
กรองเบอร์ 1 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,800 rpm
เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนเหลวใส (Supernatant) บรรจุ
ในขวดสีชา และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
เพื่อนำไปวิเคราะห์ศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล
โคลีนเอสเทอเรส โดยดัดแปลงวิธีการจาก Li และคณะ
(2009) และวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic
content) ตามวิธีของ Ainsworth et al. (2007)
ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ORAC (Oxygen
radical absorbance capacity) ตามวิธีของ Ou et al.
(2001) และวิธี Ferric ion reducing antioxidant power
(FRAP) ตามวิธีของ Benzie & Strain (1996)

2. ศักยภาพภาพในการยับยั้งเอนไซม์ อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง
เอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ดัดแปลงจากวิธีของ
Jung et al. (2009) โดยเตรียมจาก 5-20 g *Electrophorus
electricus* AChE (1,000 units/ mg), thiocholine
(0.08 mM acetylthiocholine (ATCh), 5,5'-dithiobis
(2-nitro benzoic acid) (DTNB, 0.8 mM) และสารสกัด
ตัวอย่าง (3 mg/mL) ลงใน 96-well plate วัดค่าการ
ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm โดยใช้เครื่อง
Microplate reader (Synerg HT, Bio-Tex Instruments,
Vermont, USA.) คำนวณผลการทดลองจากสมการ
ด้านล่าง

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [1 - ((B-b)/(A-a))]$$

โดย A คือ ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาควบคุม (ไม่
มีสารสกัดตัวอย่าง)

a คือ ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่มี
เอนไซม์

B คือ ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์
กับสารสกัดตัวอย่าง

b คือ ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับสารสกัด
ตัวอย่างที่ไม่มีเอนไซม์

3. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin Ciocalteu method

ปิเปตสารสกัดตัวอย่างผสมกับสาร 10% Folin-
Ciocalteu agent ตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5%
โซเดียมคาร์บอเนต พักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา
2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
765 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Synerg
HT, Bio-Tex Instruments, Vermont, USA.) ใช้
สารละลายแกลลิกแอซิดเป็นสารละลายมาตรฐาน
รายงานผลเป็นมิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมของน้ำหนัก
แห้ง (mg GAE/g dry weight)

4. วิธีการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มี 2 วิธี

4.1 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP (acetate buffer, TPTZ และ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy HT, Bio-Tex Instruments, Vermont, USA) ใช้สารละลายโทรลล็อกซ์ความเข้มข้น 6.25 ถึง 400 ไมโครโมลาร์เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานผลเป็นหน่วยไมโครโมลโทรลล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ($\mu\text{mol TE/g dry weight}$)

4.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ผสมกับ Fluorescein 150 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 15 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นหยอด AAPH 25 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่นแสงตกกระทบ 485 และความยาวคลื่นแสงที่ต้องการวัด 528 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Synergy HT, Bio-Tex Instruments, Vermont, USA) ใช้สารละลายโทรลล็อกซ์ความเข้มข้น 6.25 ถึง 100 ไมโครโมลาร์เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณผลการทดลองจากความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟโดยการสลายตัวของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (AUC) รายงานผลเป็นหน่วยไมโครโมลโทรลล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ($\mu\text{mol TE/g dry weight}$)

ผลการวิจัย

จากการนำผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด มาวิเคราะห์สมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรส พบว่ามะขามป้อม มะเมาะ มะเกี๋ย และมะยม สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสได้ระดับสูงที่สุด (ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 89 ถึง 91) ขณะที่เชอร์รี่ไทย ตะขบ ลูกหว้า โทงเทงฝรั่ง และมะม่วงหาวมะนาวโห่ สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสได้สูง (ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 61-74) ส่วนค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงปานกลาง ได้แก่ ลูกหม่อนสามารถยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสได้ปานกลาง (ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 56) (ตารางที่ 1) และผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่เพาะปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด มีค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสแตกต่างกัน จากนั้นนำผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่เพาะปลูกในประเทศไทย มาวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า มะขามป้อมมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือเท่ากับ $284.86 \pm 5.87 \text{ mg GAE/g}$ ตามด้วย เชอร์รี่ไทย ($138.82 \pm 2.00 \text{ mg GAE/g}$) ตะขบ ($58.93 \pm 1.03 \text{ mg GAE/g}$) ลูกหม่อน ($26.11 \pm 0.33 \text{ mg GAE/g}$) มะเมาะ ($14.38 \pm 0.09 \text{ mg GAE/g}$) มะเกี๋ย ($7.90 \pm 0.09 \text{ mg GAE/g}$) มะม่วงหาวมะนาวโห่ ($6.86 \pm 0.02 \text{ mg GAE/g}$) มะยม ($6.63 \pm 0.22 \text{ mg GAE/g}$) ลูกหว้า ($5.24 \pm 0.07 \text{ mg GAE/g}$) และโทงเทงฝรั่ง ($0.19 \pm 0.01 \text{ mg GAE/g}$) ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่ามะขามป้อมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ $3732.21 \pm 46.49 \mu\text{mol TE/g}$ ตามด้วย เชอร์รี่ไทย ($1829.09 \pm 61.92 \mu\text{mol TE/g}$) ตะขบ ($214.90 \pm 7.84 \mu\text{mol TE/g}$) ลูกหว้า ($200.97 \pm 6.34 \mu\text{mol TE/g}$) มะเมาะ ($138.49 \pm 0.98 \mu\text{mol TE/g}$) ลูกหม่อน ($131.81 \pm 0.35 \mu\text{mol TE/g}$) มะเกี๋ย ($70.91 \pm 0.65 \mu\text{mol TE/g}$) มะม่วงหาวมะนาวโห่ ($61.76 \pm 0.39 \mu\text{mol TE/g}$) มะยม ($44.76 \pm 2.66 \mu\text{mol TE/g}$) และโทงเทงฝรั่ง ($8.34 \mu\text{mol TE/g}$) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความสามารถในการ

ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC พบว่ามะขามป้อมพบว่า มะขามป้อมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเช่นเดียวกับวิธี FRAP คือ มีค่าเท่ากับ $33457.73 \pm 51.71 \mu\text{mol TE/g}$ ตามด้วย เชอร์รี่ไทย ($2646.48 \pm 114.48 \mu\text{mol TE/g}$) ลูกหว้า ($1262.75 \pm 14.47 \mu\text{mol TE/g}$) มะยม ($475.61 \pm 0.01 \mu\text{mol TE/g}$) มะเฒ่า ($452.16 \pm 0.73 \mu\text{mol TE/g}$) ตะขบ ($470.71 \pm 7.03 \mu\text{mol TE/g}$) ลูกหม่อน ($383.68 \pm 1.63 \mu\text{mol TE/g}$) มะเกี๋ยง ($307.42 \pm 2.99 \mu\text{mol TE/g}$) มะม่วงหาวมะนาวโห่ ($285.98 \pm 1.04 \mu\text{mol TE/g}$) และโทงเทงฝรั่ง ($57.81 \pm 0.42 \mu\text{mol TE/g}$) ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 2)

บทสรุปและอภิปรายผล

สารอะซีทิลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อระบบประสาท ถ้าปริมาณสารชนิดนี้ลดลงหรือไม่เพียงพอจะส่งผลต่อการเกิดภาวะสมองเสื่อมมีปัญหาในการสื่อสาร ความสามารถในการจำ และใช้เหตุผลลดลง เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ ปริมาณสารอะซีทิลโคลีนส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า อะซีทิล-โคลีนเอสเทอเรส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายสารอะซีทิลโคลีน การยับยั้งเอนไซม์ที่ชนิดนี้สามารถป้องกันการสูญเสียความจำ เพิ่มระดับของสารอะซีทิลโคลีนในสมอง และอาจเป็นปัจจัยในการลดการเกิด amyloid precursor protein ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ อีกทั้งยังช่วยป้องกันอนุมูลอิสระ และการตายของเซลล์ประสาท (ก้องเกียรติ ภูณทัตกันทรกร, 2561) จากผลการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะขามป้อม มะยม มะเฒ่า มะเกี๋ยง เชอร์รี่ไทย ลูกหม่อน โทงเทงฝรั่ง ตะขบ ลูกหว้า และมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และนำไปสกัดสารสำคัญด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มะขามป้อม มะเฒ่า มะเกี๋ยง และมะยม สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิล

โคลีนเอสเทอเรสได้ระดับสูงที่สุด จากหลักฐานงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ซึ่งแยกได้จากพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบคือกลุ่มสารอัลคาลอยด์ (Barbosa-Filho et al., 2006) และสารสำคัญที่พบในผลมะยม คือ สารในกลุ่มอัลคาลอยด์เช่นกัน (Duangporn & Siripong, 2009) ทั้งนี้ยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น Tacrine, Donepezil และ Rivastigmine และสาร Galanthamine, Huperzine A และ Physostigmine ที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ สำหรับเชอร์รี่ไทย ตะขบ ลูกหว้า โทงเทงฝรั่ง และมะม่วงหาวมะนาวโห่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสได้สูง และลูกหม่อนสามารถยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ปานกลาง ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยเป็นแหล่งของสารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส

ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ ORAC พบว่ามะขามป้อมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ เช่น โชคเบอร์รี่ (Chokeberry) ราสเบอร์รี่ (Raspberries) แบล็กเบอร์รี่ (Blackberries) และอาซาอิเบอร์รี่ (Acai berry) $44.97\text{--}1,027 \mu\text{mol TE/g}$ (Wang & Lin, 2000) และผลการวิจัยครั้งนี้ยังพบอีกว่าผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่เพาะปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด มีศักยภาพยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ปริมาณฟีนอลิกรวม ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ทั้งนี้สายพันธุ์ และลักษณะพื้นที่การเพาะปลูก สภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต หรือลักษณะความผันแปรทางพันธุกรรมของผลไม้ อาจส่งผลต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลไม้ เช่น วิตามิน หรือสารสำคัญต่างๆ (Liu et al., 2008;

Wei & Shiow, 2001) นอกจากนี้ผลการวิจัยพบว่าผลไม้ที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมในระดับต่ำ แต่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง อาจเป็นไปได้ว่ามีสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นๆ ที่เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ นอกเหนือจากสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ได้ตรวจสอบในการศึกษาครั้งนี้ เช่น วิตามินซี และเบต้าแคโรทีน (Almeida et al., 2011)

ต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นกัน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะใช้ผลการศึกษานี้ไปวิเคราะห์ตรวจแยกชนิดของสารบริสุทธิ์ที่บ่งชี้ถึงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อช่วยฟื้นฟูการทำงานของสมอง ป้องกันการสูญเสียความจำ อีกทั้งยังสามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันและรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์

ข้อเสนอแนะในการนำผลงานวิจัยไปใช้

จากการศึกษามะยม มะขามป้อม มะเมี และมะเกี๋ยงที่ใช้วิธีการสกัดสารสำคัญด้วยน้ำกลั่น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ระดับสูงที่สุด และมะขามป้อมมีค่าความสามารถในการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยและผู้วิจัยเลขที่สัญญา MSD60I0013 ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และบริษัท ศูนย์พยาบาลพิเศษกรุงเทพ จำกัดที่สนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ก้องเกียรติ กุณฑกันทรารกร. (2561). ภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์. **ธรรมศาสตร์เวชสาร**, 18(3), 442-468.
- สุพัฒน์ หลัยานหาย, ประภาพร จันทรเอียด, & จินดาพร ฐิพัฒน์วณิช. (2560).ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทยบางชนิดในวงศ์ Asteraceae และ Cucurbitaceae. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.**, 33(1), 35-45.
- Ainsworth, E. A, & Gillespie, K. M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, 2, 875-877.
- Almeida, M. M. B., De Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., Do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G.A., et al. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, 44, 2155-2159.
- Alzheimer's Disease International. (2015). **World alzheimer report 2015**. London: Alzheimer's Disease International.
- Barbosa-Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. F., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., et al. (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista brasileira de farmacognosia**, 16, 258-285.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Journal of Biochemistry and Analytical Studies**, 239, 70-76.
- Dhale, D. A., & Mogle, U. P. (2011). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Phyllanthus emblica* (L.). **Journal of Scientific Research and Reports**, 1, 138-142.
- Duangporn, P., & Siripong, P. (2009). Effect of auxin and cytokinin on phyllanthusol A production by callus cultures of *Phyllanthus acidus* skeels. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, 5, 258-263.
- Hyesung, H., Young, J. K., & Youngjae, S. (2020). Assessment of physicochemical quality, antioxidant content and activity, and inhibition of cholinesterase between unripe and ripe blueberry fruit. **Foods**, 9, 690.
- Jung, H. A., Min, B. S., Yokozawa, T., Lee, J. H., Kim, Y. S., & Choi, J. S. (2009). Anti-alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 32, 1433-1438.

- Kaewkaen, P., Tong-un, T., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Kaewrueng, W., & Wongcharoenwanakit, S. (2012). Mulberry fruit extract protects against memory impairment and hippocampal damage in animal model of vascular dementia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Kregel, K. C., & Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, 18-36.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J. G., & Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American Journal of Epidemiology*, 65, 1364-1371.
- Li, W., Hydamaka A. W., Lowry, L., & Beta, T. (2009). Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European Journal of Biology*, 4, 499-506.
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 219-228.
- Moniruzzaman, M., Asaduzzaman, M., Hossain, M. S., Sarker, J., Rahman, S. A., Rashid, M., et al. (2015). In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of *Phyllanthus acidus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 403.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Radojkovi, M. M., Zekovi, Z. P., Vidovi, S. S., Kočar, D. D., & Maškovi, P. Z. (2012). Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., Moraceae) extracts. *Hemijaska Industrija*, 66, 547-552.
- Robert, K., Marcelle, D. S., Tiffany, A. N., Wilhelmina, K., Melinda, R. V. T., Barbara, S. H., et al. (2010). Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3996-4000.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *American Chemical Society*, 48, 140-146.
- Zheng, W., & Wang, Y. S. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

ตารางที่ 1 ค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด

ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส
มะยม	<i>Phyllanthus acidus</i>	91.30±3.12
มะขามป้อม	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn	89.88±4.30
มะเมี	<i>Antidesma thwaitesianum</i> Muell. Arg.	83.73±0.90
มะเกี๋ยง	<i>Syzygium nervosum</i> var. <i>paniala</i> (Roxb.)	82.24±1.54
เชอร์รี่ไทย	<i>Malpighia Glabra</i> Linn	74.66±0.62
มะม่วงหาวมะนาวโห่	<i>Carissa carandas</i> Linn	74.22±1.43

ตารางที่ 1 ค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด (ต่อ)

ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ค่าการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส
ลูกหว้า	<i>Syzygium cumini</i>	67.70±1.63
ตะขบ	<i>Muntingia calabura</i> Linn	64.19± 0.73
โทงเทงฝรั่ง	<i>Physalis peruviana</i>	61.34±1.63
ลูกหม่อน	<i>Morus nigra</i> Linn	56.67±2.83

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด

ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ ที่ปลูกในประเทศไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณสาร ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g dry weight)	ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	
			FRAP (μmol TE/g dry weight)	ORAC (μmol TE/g dry weight)
มะขามป้อม	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn	284.86±5.87	3732.21±46.49	33457.73±51.71
เชอร์รี่ไทย	<i>Malpighia Glabra</i> Linn	138.82±2.00	1829.09±61.92	2646.48±114.48
ตะขบ	<i>Muntingia calabura</i> Linn	58.93±1.03	214.90±7.84	470.71±7.03
ลูกหม่อน	<i>Morus nigra</i> Linn	26.11±0.33	131.81±0.35	383.68±1.63
มะเมี	<i>Antidesma thwaiteaianum</i> Muell. Arg.	14.38±0.09	138.49±0.98	452.16±0.73
มะเกี๋ยง	<i>Syzygium nervosum</i> var. <i>paniala</i> (Roxb.)	7.90±0.09	70.91±0.65	307.42±2.99
มะม่วงหาวมะนาวโห่	<i>Carissa carandas</i> Linn	6.86±0.02	61.76±0.39	285.98±1.04
มะยม	<i>Phyllanthus acidus</i>	6.63±0.22	44.76±2.66	475.61±0.01
ลูกหว้า	<i>Syzygium cumini</i>	5.24±0.07	200.97±6.34	1262.75±14.47
โทงเทงฝรั่ง	<i>Physalis peruviana</i>	0.19±0.01	8.34±0.65	57.81±0.42