รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์

Chemical investigation and biological activities of *Sesbania grandiflora* for the treatments of Alzheimer's disease

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ดร.อนันต์ อธิพรชัย

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ดร.วรางคณา จุ้งลก

ผศ.ดร.สุวรรณา เสมศรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256106A1080013

สัญญาเลขที่ 86/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์

Chemical investigation and biological activities of *Sesbania grandiflora* for the treatments of Alzheimer's disease

อ.ดร.อนันต์ อธิพรชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร.วรางคณา จุ้งลก

สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

ผศ.ดร.สุวรรณา เสมศรี

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

พฤษภาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ 256106A1080013 เลขที่สัญญา 86/2561

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแค (*Sesbania grandiflora*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) สำหรับช่วยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ เมื่อนำส่วนที่รับประทานได้และนิยมรับประทานคือส่วนดอกและยอดอ่อน มาทำการสกัดด้วยวิธีการแช่หมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้วคือเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่ายอดอ่อนแค (Shoot) มีร้อยละผลผลิตรวมสูงที่สุดเท่ากับ 85.31% รองลงมาคือกลีบดอก (82.14%), ฐานรองดอก (76.12%) และเกสร (72.32%) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดที่ได้พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดนั้นเป็นสารสกัดหยาบที่มาจากส่วนของดอก สารประกอบฟีนอลิกที่พบในส่วนสกัดหยาบของดอกและยอดอ่อนแคนั้นเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางถึงสูง นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ คือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสของส่วนสกัดที่ได้ พบว่า ส่วนสกัดหยาบของแคสามารถช่วยในการบรรเทาพยาธิวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งภาวะการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายสารสื่อประสาทนั่นคือเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ได้เป็นอย่างดี รวมทั้งส่วนสกัดหยาบของแคทุกส่วนสกัดนั้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย ดังนั้นการบริโภคแคอาจจะช่วยบรรเทาและป้องกันโรคอัลไซเมอร์ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและพบมากในผู้สูงอายุได้

Abstract

Phytochemical and biological activities for the treatment of Alzheimer's disease of *Sesbania grandiflora*, a member of the Leguminosae family were studied. Edible parts of this plant including flower and shoot were successfully extracted with hexane, ethyl acetate and methanol, respectively. The shoot extracts showed the highest of extraction yield percentage (85.31%), followed the petal (82.14%), sepal (76.12%) and stamen (72.32%) extracts. The total penolic content of the extracts were evaluated and it was found that the flower extracts showed the highest total penolic contents. In addition, all extracts were evaluated with antioxidant, anti-inflammatory and antiacetylcholinesterase activities together with cytotoxicity. The extracts from *S. grandiflora* showed strong inhibitory activities for the treatment of Alzheimer's disease. Moreover, these extracts showed no cytotoxicity with the normal cells. Therefore, the edible parts of *S. grandiflora* may have dietary and medicinal applications for the treatment of Alzheimer's disease.

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ (Introduction)	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	6
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)	**7**
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	7
2.2 การเก็บตัวอย่าง (Plant materials)	7
2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบแค (Preparation of *S. grandiflora* extracts)	7
2.4 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)	8
2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging	9
2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS radical scavenging	9
2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory activity)	10
2.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Anti-acetylcholinesterase activity)	10
2.9 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cyctoxic activity)	11
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)	**12**
3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบแค	12
3.2 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content, TPC)	13
3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)	32
3.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory activity)	19
3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Anti-acetylcholinesterase activity)	22
3.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cyctoxic activity)	26
4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)	**28**
ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้	29
บรรณานุกรม	30
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	33
ภาคผนวก : ประวัติคณะผู้วิจัย	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	น้ำหนัก ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากแค	12

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1-1	ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของแค (*Sesbania grandiflora* L.)	2
1-2	องค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากแค (*S. grandiflora* L. Roots)	5
2-1	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของแค (*S. grandiflora* extracts)	8
3-1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Calibration curve for standard gallic acid)	13
3-2	ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากแค (Total phenolic content of extracts)	14
3-3	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค	15
3-4	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค	15
3-5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค	16
3-6	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค	16
3-7	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค	17
3-8	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค	17
3-9	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค	18
3-10	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค	18
3-11	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	19
3-12	ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค	20
3-13	ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค	20
3-14	ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค	21
3-15	ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค	21
3-16	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านการอักเสบ	22
3-17	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค	23
3-18	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค	23
3-19	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค	24
3-20	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค	24
3-21	ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์	25
3-22	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค	26
3-23	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค	26
3-24	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค	27
3-25	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค	27

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปีที่ผ่านมากระทรวงสาธารณสุขได้รายงานว่าประเทศไทยกำลังจะก้าวเข้าสู่การเป็นสังคมผู้สูงอายุ (Aged Society) ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีประชากรทั้งหมดประมาณ 64.5 ล้านคน เป็นผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้น จำนวน 9.4 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 14.5 ของประชากร โดยเพิ่มขึ้นปีละประมาณ 5 แสนคน และคาดว่าภายในปี พ.ศ. 2568 ประเทศไทยจะก้าวเข้าสู่การเป็นสังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ โดยจะมีประชากรประมาณ 14.4 ล้านคนหรือเพิ่มขึ้นเกินร้อยละ 20 ของประชากรทั้งหมด กล่าวคือจะมีผู้สูงอายุ 1 คน ในประชากรทุกๆ 5 คนนั่นเอง จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะส่งผลถึงการที่เราต้องเตรียมพร้อมกับภาวะต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาวะทุพโภชนาการและโรคต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุ โดยโรคที่พบมากในผู้สูงอายุได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้อเข่าเสื่อม โรคกระดูกพรุน และโรคสมองและระบบประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวกับภาวะสมองเสื่อมหรือที่เรียกว่า “โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease)” โรคนี้จะพบมากในผู้สูงอายุ และไม่มียาที่จะสามารถรักษาได้หายขาด เป็นเพียงแค่การชะลออาการไม่ให้เป็นมากขึ้น อีกทั้งยาที่ใช้ในรักษานั้นยังคงมีราคาแพง ทำให้ในปัจจุบันนี้มีนักวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาหาตัวยาใหม่ๆ ที่ใช้ในการรักษาภาวะสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์กันมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นปัจจุบันนี้ประชาชนยังหันมาสนใจดูแลสุขภาพร่างกายกันมากขึ้น โดยการใช้ยาสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคหรือการบริโภคสมุนไพรเพื่อเป็นอาหาร และการใช้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มาจากธรรมชาติมีมากขึ้น ก็อาจเป็นเพราะว่าผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาตินั้นไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และส่งผลข้างเคียงต่อสุขภาพน้อยมากนั่นเอง[1,2]

ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิอากาศเขตร้อนใกล้กับเส้นศูนย์สูตร ทำให้มีพืชพรรณทางธรรมชาติมากมายหลากหลายชนิด พืชพรรณทางธรรมชาติเหล่านี้ล้วนแฝงความน่าสนใจ เพราะสิ่งที่ซ่อนอยู่ภายในพืชพรรณทางธรรมชาติเหล่านี้เรียกว่า “สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Products)” ที่มีคุณสมบัติที่น่าอัศจรรย์เป็นอย่างมาก สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นสารที่เกิดและพบตามธรรมชาติ มีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอย่างมาก เป็นสารประกอบทางเคมีที่มีความบริสุทธิ์ อาจจะมีฤทธิ์หรือไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพก็ได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สารเหล่านี้ประกอบด้วย กรดอะมิโน (amino acids) กรดไขมัน (fatty acids) นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) และน้ำตาล (sugar) เป็นต้น สารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิมักจะเป็นสารตั้งต้น (building blocks/precursors) ในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิต่อไป และอีกประเภทเรียกว่า เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) พบในสิ่งมีชีวิตบางจำพวกเท่านั้นและไม่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้นๆ และอาจเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการป้องกันตัวเองจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อาทิ สารปฏิชีวนะ สารหอมระเหย หรือสารที่มีฤทธิ์ทางยา[3] ดังนั้นความหลากหลายทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรของประเทศไทยจึงมีความสำคัญและเป็นข้อได้เปรียบอย่างยิ่งของประเทศต่อการพัฒนาด้านการวิจัยให้เกิดการประยุกต์และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาทิ ยารักษาโรค อาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอาง หรือแม้แต่การนำไปใช้ในทางการเกษตร เพื่อเป็นสารกำจัดศัตรูพืช หรือลดการปนเปื้อนจากสารเคมีในกระบวนการเพาะปลูกขั้นต่างๆ ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพได้มาตรฐาน โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ ดังนั้นการค้นหาพืชสมุนไพร และสารที่เป็นองค์ประกอบจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ นั้น จะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรที่เป็นทรัพยากรของประเทศ และยังสามารถพัฒนาพืชสมุนไพร และสารที่ค้นพบดังกล่าวนั้นเพื่อนำไปสู่การเป็นยารักษาโรค หรือเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอางได้อีกด้วย ผลดังกล่าวที่ได้จะช่วยให้สุขภาพของประชากรมีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นและเศรษฐกิจในประเทศมีความมั่นคงมากขึ้นอีกด้วย รวมทั้งเพื่อรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อ

สุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังที่จะเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้อเข่าเสื่อม โรคกระดูกพรุน และโรคสมองและระบบประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวกับภาวะสมองเสื่อมหรือที่เรียกว่า “โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease)” เป็นต้น

พืชผัก สมุนไพรของไทยนั้นมีมากมายหลากหลายชนิดที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหาร และช่วยในการรักษาโรคได้ด้วย โดยเฉพาะพืชผักที่ใช้รักษาอาการปวดศีรษะ ไมเกรน รักษาอาการหวัด แก้ไข้ตัวร้อน ก็คือพืชผักที่มีชื่อว่า **“แค”** มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ***Sesbania grandiflora* L.** และชื่อสามัญที่เรียกกันทั่วๆ ไปว่า **Butterfly tree** จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง แตกกิ่งก้านสาขามากไม่เป็นระเบียบ มีความสูงประมาณ 3-10 เมตร เนื้อไม้อ่อน ที่เปลือกต้นเป็นสีน้ำตาลปนเทา เปลือกหนาและมีรอยขรุขระ แตกเป็นสะเก็ด สามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น เป็นต้นไม้ที่โตเร็ว สามารถปลูกได้ทุกที่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับ มีใบย่อยขนาดเล็กรูปขอบขนาน ปลายใบมนกว้าง ขอบใบและแผ่นใบเรียบ ใบสีเขียว กว้างประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะคล้ายดอกถั่ว ออกดอกเป็นช่อบริเวณซอกใบ 2-3 ดอก ดอกมีกลิ่นหอม ดอกเป็นสีขาวหรือสีแดง มีก้านเกสรตัวผู้สีขาวอยู่ 60 อัน กลีบเลี้ยงเป็นรูประฆังหรือรูปถ้วย ผลมีลักษณะเป็นฝักกลมยาว มีความยาวประมาณ 8-15 เซนติเมตร ผสมเกสรโดยนก ส่วนของฝักเมื่อแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก และมีเมล็ดอยู่ด้านใน ฝักแคมีสีเขียวอ่อน สามารถรับประทานเป็นอาหารได้ เมล็ดของแคนั้นมีลักษณะเหมือนลิ่ม เป็นเมล็ดกลมแป้น สีน้ำตาล โดยสรรพคุณของแค ตามตำราแพทย์แผนไทยนั้นพบว่า ใบแค จะช่วยแก้ไข้หวัดและถอนพิษไข้ แก้ไข้เปลี่ยนฤดู ตลอดจนช่วยดับพิษ และถอนพิษ ในส่วนของเปลือกต้นแค จะช่วยในการคุมธาตุ แก้บิดมูกเลือด ตลอดจนช่วยชะล้างบาดแผล และช่วยในการสมานแผลทั้งภายในและภายนอก ให้รสฝาด และส่วนของดอกแค ช่วยแก้อาการไข้เปลี่ยนฤดู ให้รสหวานเย็น และใช้เป็นยาแก้อาการปวดศีรษะข้างเดียวหรือ "ไมเกรน" ได้ดีมาก โดยวิธีการที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ของ แค ตามภูมิปัญญาชาวบ้านนั้น ก็คือการนำส่วนต่างๆ ของแคมาทำเป็นอาหารรับประทานนั่นเอง โดยส่วนที่นิยมรับประทานก็คือ ยอดอ่อนและดอก โดยนำมา ลวกจิ้มกับน้ำพริกกะปิ ต้มจืดกับซี่โครงหมู ผัดกุ้งสด แกงส้ม หรือแกงเหลือง เป็นต้น[4-6] จากประโยชน์ดังกล่าวของ “แค” (*Sesbania grandiflora* L.) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแค สำหรับช่วยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและพบมากในผู้สูงอายุ และเพื่อนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ งานวิจัยนี้ยังเป็นการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ผัก ผลไม้ และสมุนไพรไทยเพื่อเป็นประโยชน์ในด้านอาหารเสริมสุขภาพ หรือแม้กระทั่งการค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อ สุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังทั้งหลายที่มีผลต่อสุขภาพของผู้สูงอายุ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ส่วนต่างๆ ของ แค ในตำรายาไทยเพื่อบำบัดการรักษาโรคซึ่งเป็นภูมิปัญญาไทยที่สำคัญต่อการพัฒนาประเทศในยุคของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) อีกด้วย

รูปที่ 1-1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของแค (*Sesbania grandiflora* L.)[5,6]

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาทางเคมีในแง่ต่างๆ อาทิ การศึกษาการสกัด การแยก การทำให้สารบริสุทธิ์ และการวิเคราะห์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งพยาธิวิทยาต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสจากส่วนที่กินได้ของแค (*Sesbania grandiflora*) คือส่วนยอดอ่อนและส่วนดอก อีกทั้งเพื่อนำความรู้ที่ได้ไปแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์กับผู้สนใจทั่วไปทั้งภาครัฐและเอกชนหรืออุตสาหกรรม เพื่อนำไปประยุกต์และปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และสร้างองค์ความรู้ด้านการทางานวิจัยให้แก่นิสิต รวมทั้งผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตคณาจารย์ในวารสารระดับนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการศึกษาทางเคมีต่างๆ โดยทำการสกัดส่วนที่กินได้ของแค (*S. grandiflora* L.) คือยอดอ่อน (Shoots) และดอก (Flowers) และศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยการแยก (Separation) การทำให้บริสุทธิ์ (Purification) และการพิสูจน์ยืนยันโครงสร้าง (Identification) ด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structure-Activity Relationship) ด้วย
2. ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งพยาธิวิทยาต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ เอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์บางชนิดที่แยกได้จากส่วนที่กินได้ของแค (*S. grandiflora* L.) คือยอดอ่อนและส่วนดอก

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ปัจจุบันนี้พืชผัก ผลไม้ และสมุนไพรหลากหลายชนิดกำลังได้รับความสนใจอย่างมากในการศึกษาเพื่อประโยชน์ต่อการค้นพบสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในเครื่องสำอาง ส่วนประกอบของเครื่องสำอาง หรือแม้กระทั่งผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพและยาชนิดใหม่รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อ สุขภาพและภาวะทุพโภชนาการ ที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังทั้งหลายด้วย ประเทศไทยนั้นมีพืชผัก ผลไม้ และสมุนไพรที่ใช้รับประทานและใช้เป็นยารักษาโรคเป็นจำนวนมาก หนึ่งในพืชผัก ผลไม้ และสมุนไพรที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหาร และช่วยในการรักษาโรคได้ด้วย โดยเฉพาะพืชผักที่ใช้รักษาอาการปวดศีรษะ ไมเกรน รักษาอาการหวัด แก้ไข้ตัวร้อน ก็คือพืชผักที่มีชื่อว่า แค มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sesbania grandiflora* จากรายงานทางเภสัชวิทยาของแคนั้นพบว่า สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากแคมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง ยับยั้งเชื้อไวรัส HIV และมีฤทธิ์ป้องกันตับได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาการแยก การสกัด และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแค (*S. grandiflora*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) และนำองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังของผู้สูงอายุ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดสมอง โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง และโรคมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวกับภาวะสมองเสื่อมหรือที่เรียกว่า “โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease)”เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรที่

เป็นทรัพยากรของประเทศ และยังสามารถพัฒนาพืชสมุนไพร และสารที่ค้นพบดังกล่าวนั้นเพื่อนำไปสู่การเป็นยารักษาโรค หรือเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอางได้อีกด้วย ผลดังกล่าวที่ได้จะช่วยให้สุขภาพของประชากรมีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น และเศรษฐกิจในประเทศมีความมั่นคงมากขึ้นอีกด้วย

จากรายงานต่างๆ ที่ผ่านมาพบว่ามีรายงานทางวิทยาศาสตร์น้อยมากที่ทำการศึกษาการแยก การสกัด และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแค (*S. grandiflora*) โดยเฉพาะส่วนที่ทานได้ของแค คือยอดอ่อน และส่วนดอก ดังเช่นการทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้องต่อไปนี้

ในปี 1982[7], 2012[8] และ 2013[9] Fojas et al., Bahera et al. และ Raji et al. ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของส่วนสกัดหยาบจากใบ (Leaves) และเปลือก (Bark) ของแค *(S. grandiflora)* พบสารทุติยภูมิ 4 ชนิดคือ Flavonoids, Tannin, Steroids และ Saponin

ในปี 2010[10] และ 2013[11] Laladhas et al. และ Gupta et al. ได้รายงานการศึกษาผลของโปรตีนที่สกัดได้จากดอกแคและผลของสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ จากเปลือกต้นของแคต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและโปรตีนต่อเซลล์มะเร็งนั้น พบว่าโปรตีน SF2 ที่เตรียมได้มาจากดอกแคโดยการตกตะกอนด้วย 40-70% ammonium sulphate แสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดี โดยการออกฤทธิ์ต่อ caspases 3, 8 และ 9 รวมทั้งยังออกฤทธิ์ต่อ poly (ADP-ribose) polymerase และ cytochrome C อีกด้วย โดยผลของโปรตีนดังกล่าวแสดงการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis อีกด้วย

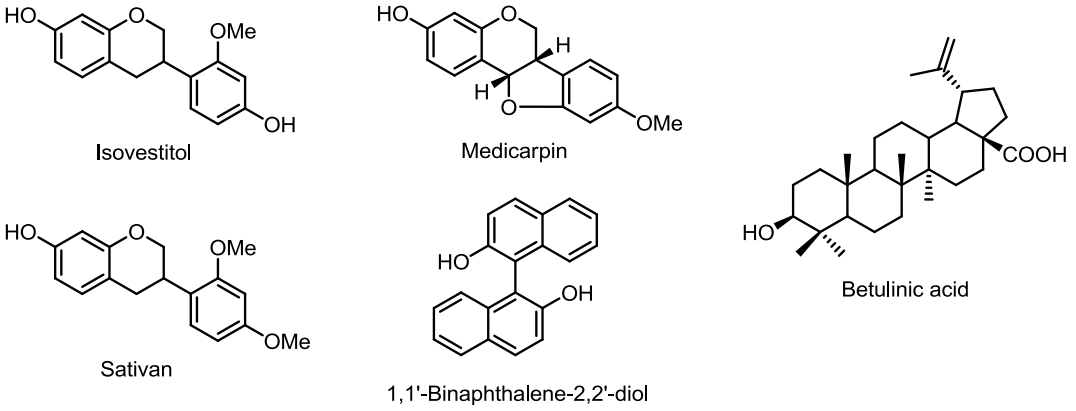
ในปี 2012[12] Sutradhar et al. ได้รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอาการแพ้และการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดหยาบ 80% เมทานอล จากส่วนต่างๆ ของแคในหนูทดลองพบว่า ส่วนสกัดจากใบของแคมีฤทธิ์ต้านการแพ้ และอาการเจ็บปวดในหนูได้ดีมากและดีเทียบเท่ากับยาแก้ปวดมาตรฐาน Diclofenac อีกด้วย

ในปี 2012[13] และ 2014[14] Munde-Wagh et al. และ Padmalochana et al. ได้รายงานการศึกษาการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* และ *Candida* sp. ของส่วนสกัดหยาบจากดอก (Flower) และใบ (Leaves) ของแค *(S. grandiflora)* พบว่าส่วนสกัดหยาบจากดอกและใบของแคสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเทียบเท่ากับยามาตรฐาน Penicillin, Ampicillin และ Ciprofoxacin อีกด้วย

ในปี 2014[15,16] Siddhuraju et al. และ Zarena et al. ได้รายงานการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากดอกและใบของแค พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกและใบของแคมีปริมาณสารประกอบ polyphenols ที่สูงและสารดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต่างๆ ได้เป็นอย่างดี

ในปี 2014[17] และ 2016[18] Karumari et al. และ Rajagopal et al. ได้รายงานการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากดอกและใบแคต่อการทดสอบฤทธิ์ฆ่าหนอนพยาธิ *Pheretima posthuma* และ *Ascaridia galli* พบว่าสารสกัดดังกล่าวออกฤทธิ์ในการฆ่าหนอนพยาธิได้ดีเทียบเท่ากับยามาตรฐาน Albendazole อีกด้วย

นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องของแค *(S. grandiflora)* พบว่ามีรายงานการศึกษาการแยก การสกัดสาร และการหาองค์ประกอบทางเคมีเพียง 2 ฉบับจากส่วนราก (Roots) เท่านั้นคือในปี 2012 Hasan et al.[19] รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากของแค พบสาร 4 สารคือ isovestitol, medicarpin, sativan และ betulinic acid นอกจากนี้ยังพบว่าสารทั้ง 4 สารมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค (Antituberculosis) สายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50-100 μg/mL และในปี 2012 Osman et al.[20] ได้รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากของแคเช่นกัน พบว่าสามารถแยกได้สารชนิดใหม่ 1 สารคือ 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol รวมทั้งสารที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วอีก 2 สารคือ isovestitol และ sativan โดยพบ isovestitol เป็นองค์ประกอบหลัก โดยโครงสร้างที่แยกได้ทำการพิสูจน์และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 1-2 องค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากแค *(S. grandiflora* L. Roots)

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแค (*S. grandiflora*) โดยพบว่าส่วนสกัดหยาบและองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของแคแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียละเชื้อรา และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาและวิจัยของส่วนสกัดหยาบและองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของแคต่อการออกฤทธิ์การยับยั้งพยาธิวิทยาต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์การทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส ดังนั้นงานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาทางเคมีและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งพยาธิวิทยาต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์การทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ เอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส จากส่วนที่กินได้ของแค (*Sesbania grandiflora*) คือยอดอ่อนและดอก ซึ่งงานวิจัยนี้จะเป็นการยกระดับและพัฒนาพืชผักผลไม้ และสมุนไพรไทยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นพบสารที่มีประโยชน์ในด้านอาหารเสริมสุขภาพ หรือแม้กระทั้งการค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อ สุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังทั้งหลายที่มีผลต่อสุขภาพของผู้สูงอายุ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ส่วนต่างๆ ของแค ในตำรายาไทย เพื่อบำบัดการรักษาโรคซึ่งเป็นภูมิปัญญาไทยที่สำคัญต่อการพัฒนาประเทศในยุคของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) อีกด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสารออกฤทธิ์จากพืช ผัก สมุนไพรของไทยคือ แค (*S. grandiflora*) ต่อการยับยั้งพยาธิวิทยาต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นการค้นพบตัวยาชนิดใหม่ๆ จากพืช ผัก สมุนไพรของไทยในการนำมาใช้การรักษาผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์หรือโรคที่เกี่ยวข้องได้
2. สามารถยกระดับพืช ผัก และสมุนไพรของประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น
3. ข้อมูลและคุณสมบัติต่างๆ ทางเคมีของแค (*S. grandiflora*) นั้นจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนักวิจัย ที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับแค หรือพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) และสกุล (Genus) เดียวกัน และยังสามารถที่จะสร้างนิสิต นักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย และครูวิทยาศาสตร์ให้เพียงพอต่อความต้องการของประเทศ เพื่อรองรับการพัฒนาประเทศอย่างมั่นคงและนำพาประเทศไทยเข้าสู่ระบบเศรษฐกิจ ฐานความรู้แบบสร้างสรรค์และนวัตกรรมใหม่ พัฒนาสายงานการวิจัยเพื่อให้นักวิจัยมีระบบความก้าวหน้าในวิชาชีพ รวมทั้งพัฒนาแหล่งงานด้านการวิจัยเพื่อรองรับบุคลากรการวิจัยทั้งในภาครัฐและเอกชน แล้วเป็นเพื่อนำความรู้ต่างๆ ที่ได้ไปจากงานวิจัยนี้ ไปยกระดับพืชสมุนไพรของประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น
4. สามารถนำไปสู่การตีพิมพ์งานวิจัย ในวารสารที่ยอมรับ หรือจดทะเบียนสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือนำไปใช้ในการเรียนการสอนในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยได้อีกด้วย ทั้งนี้เพื่อปกป้องพืช ผัก และสมุนไพรของประเทศไทย ให้อยู่กับคนไทยและคนไทยได้ใช้ประโยชน์สูงที่สุด
5. หน่วยงานที่จะนาผลการวิจัยดังกล่าวนี้ไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านเคมี ชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยาต่อไป

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ประสานงานกับหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งในภาครัฐและเอกชน เพื่อการนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ หรือต่อยอดโครงการวิจัย หรือเพื่อนำมาปรับปรุงและพัฒนาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดต่อกลุ่มเป้าหมาย และเพื่อประโยชน์สูงสุดต่อยกระดับพืช ผัก สมุนไพรของประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งเพื่อปกป้องพืช ผัก และสมุนไพรของประเทศไทย ให้อยู่กับคนไทยและคนไทยได้ใช้ประโยชน์สูงที่สุด หรือการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับนานาชาติ หรือตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับชาติ/นานาชาติ

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)
2. เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
4. กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
5. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
6. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทสโกปี (NMR spectroscopy)
7. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2, 3 และ 4 เซนติเมตร
8. ชุดเครื่องแก้วพื้นฐาน เช่น บิกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตรวง หลอดทดลอง เป็นต้น
9. ซิลิกาเจล 60 (ขนาด 0.063-0.200 mm; 1.07734.9025; MERCK)
10. ซิลิกาเจล 60 (ขนาด <0.063 mm; 1.07729.9025; MERCK)
11. หลอดแสง UV สำหรับ TLC
12. ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น Hexane, Dichloromethane, Chloroform, Ethyl acetate, Acetone, Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxide, น้ำกรอง และน้ำกลั่น
13. ตัวทำละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR spectroscopy ได้แก่ $CDCl_3$ และ CD_3OD
14. เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*)
15. เอนไซม์บิวทิลริวโคลีนเอสเทอเรส (Butyrylcholinesterase from equine serum)
16. อะซิทิลไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide, ATCI)
17. บิวทิลริวไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Butyrylthiocholine iodide, BuTCI)
18. 5,5′-ไดไทโอบิส-(2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) [5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]
19. กาแลนทามีน (Galanthamine), เคอร์ซิติน (Quercetin)
20. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer, pH 8.0)

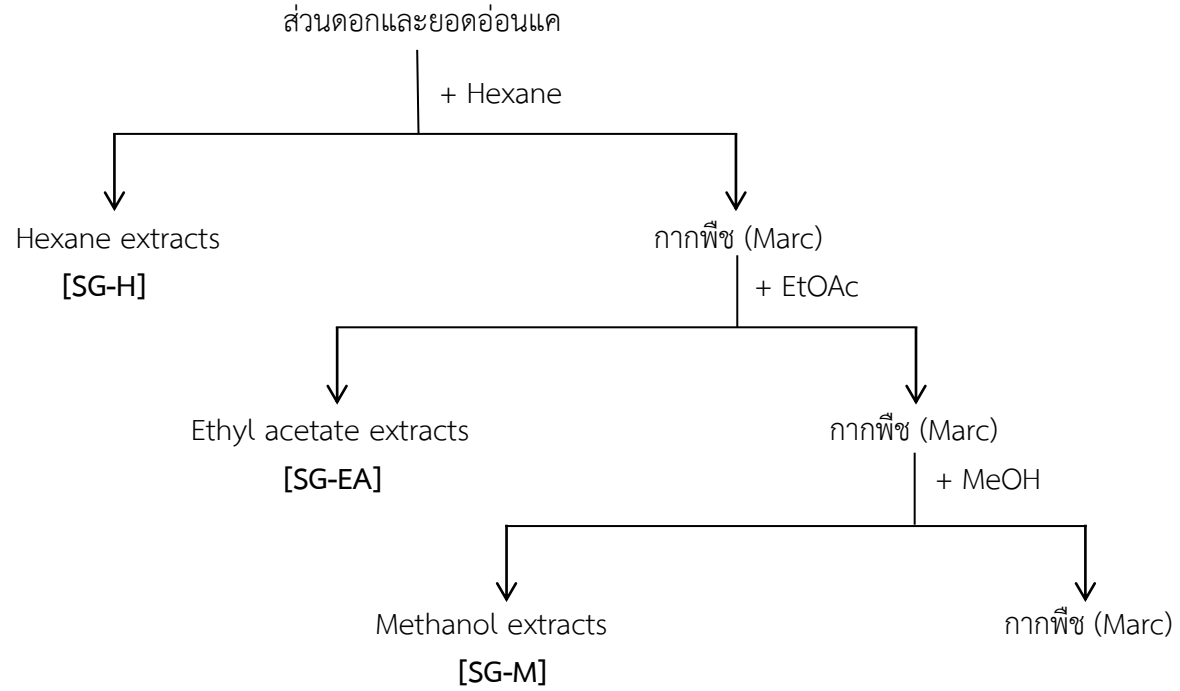
2.2 การเก็บตัวอย่าง (Plant materials)

ตัวอย่างแค (*Sesbania grandiflora* L.) ที่ใช้ในงานวิจัยได้เก้บมาจากอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 โดยพืชดังกล่าวได้ทำการยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์และเก็บตัวอย่างพืชไว้ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบแค (Preparation of *S. grandiflora* extracts)

นำส่วนยอดอ่อนแคสด (Shoot) ปริมาณ 1.0 กิโลกรัม และส่วนดอกแคสด (Flowers) ปริมาณ 2.0 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาดและผึ่งลมให้หมาด จากนั้นทำการแยกส่วนดอกออกเป็นส่วนต่างๆ คือกลีบดอก (Petal) ฐานรองดอก (Sepal) และเกสร (Stamen) และนำส่วนต่างๆ ของแคข้างต้นทั้ง 4 ส่วนผึ่งลมต่อให้แห้ง และนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า นำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นน้ำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยทำการสกัดเรียงลำดับตามความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน คือเริ่มต้นสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

(Hexane), เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) ตามลำดับ (ทำการแช่หมักซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane extract), เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extract) และเมทานอล (Methanol extract) ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง เก็บส่วนสกัดหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาทำการทดลองและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 2-1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของแค (*S. grandiflora* extracts)

2.4 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic Skerget และ Knez (2007)[21] ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิก รวมจะทำปฏิกิริยารวมกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวม เกิดเป็นtungsten และ molybdenum ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE.g^{-1} dried extract)

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, และ Mendez (2002)[22] โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\%\text{DPPH radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีการทดสอบ
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, และ Mendez (2002)[22] โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ก่อนทำการทดสอบจะทำการเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ โดยการนำสารละลาย 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K_2SO_4) ความเข้มข้น 2.45 mM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลืน 734 nm เท่ากับ 0.800 ± 0.05 การทดสอบทำโดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เจือจางเรียบร้อยแล้วดังข้างต้นปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% ABTS radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\%\text{ABTS radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่มีการทดสอบ
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่มีสารทดสอบ

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบนี้จะเป็นการทดสอบการยับยั้งปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO)[23] ซึ่งเป็นสารสื่อกลางของกระบวนการการอักเสบของสิ่งมีชีวิต ทำได้โดยนำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5X105 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM ที่มี 4 มิลลิโมลาร์ L-glutamine 25 มิลลิโมลาร์ D-glucose และ 1 มิลลิโมลาร์ sodium pyruvate (Gibco/Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700xg นาน 5 นาที จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณ ร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว และใช้สาร Apigenin เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

2.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Anti-acetylcholinesterase activity)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Ellman, Courtney, Andres และ Featherstone (1961)[24] โดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคอัลไซม์เมอร์ (Alzheimer's disease) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะเกิดกระบวนการย่อยสารสื่อประสาท อะเซทิลโคลีน (Acetylcholine) ให้เป็นโคลีน (Choline) และกรดอะซิติก (Acetic acid) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเป็นการทำลายสารสื่อประสาทให้ลดลงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส นั้นจะใช้กาแลนทามีน (Galantamine) เป็นสารมาตรฐาน และใช้อะเซทิลไทโอโคลีน ไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide, ATCI) เป็นซับสเตรต แล้วอาศัยกระบวนการเกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับ 5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-thio-2-nitrobenzoate anion ที่ดูดกลืนแสงสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร การทดสอบทำได้โดยผสมสารละลายมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer, pH 8.0) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้น 8.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/mL) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง 5.0 มิลลิโมลาร์ ATCI กับ 5.0 มิลลิโมลาร์ DTNB ที่มี 0.1% bovine serum albumin (BSA) ผสมอยู่ อัตราส่วน 3 ต่อ 1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง EPOCH 2 microplate reader (BioTek, America) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Cholinesterase inhibition) จากสูตร [(A-B)/A]×100 เมื่อA คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

2.9 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cyctoxic activity)

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นจะทดสอบกับเซลล์ปกติคือเซลล์ไตของลิง (Vero Cells) ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)[25] โดย MTT เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์ การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ไตของลิง (Vero Cells) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5X105 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารมาตราฐานหรือสารตัวอย่าง (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มีสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและละลายผลึก formazan ด้วยสารละลาย DMSO จำนวน 500 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Versamax, Molecuar Devices, สหรัฐอเมริกา) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ % การมีชีวิตรอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ/ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม) X 100

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบแค

เมื่อนำส่วนยอดอ่อนแคสดและส่วนดอกแคสด ล้างทำความสะอาดและผึ่งลมให้หมาด จากนั้นทำการแยกส่วนดอกออกเป็นส่วนต่างๆ คือกลีบดอก (Petal), ฐานรองดอก (Sepal), และเกสร (Stamen) และนำส่วนต่างๆ ของแคข้างต้นทั้ง 4 ส่วนผึ่งลมต่อให้แห้ง และนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าจากนั้นน้ำมาสกัดด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้ว โดยเริ่มจากขั้วต่ำไปขั้วสูงคือตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าได้สารสกัดหยาบของแคทั้งหมด 12 สารสกัด ซึ่งน้ำหนัก ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากแคทั้ง 12 สารสกัดแสดงดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 น้ำหนัก ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากแค

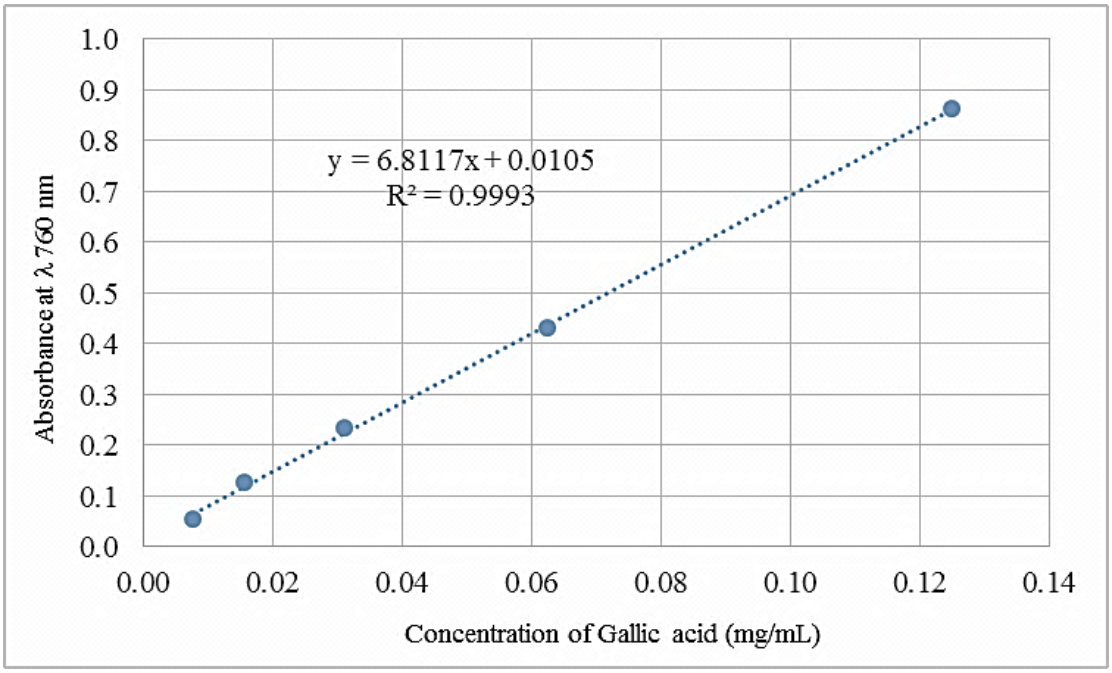
ส่วนสกัดหยาบ	รหัสสาร	น้ำหนัก[a]	ร้อยละผลผลิต[b]	ลักษณะทางกายภาพ
กลีบดอก (Petal)				
Hexane extract	SG(PT)-H	3.90	2.79	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Ethyl acetate extract	SG(PT)-EA	15.86	11.33	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
Methanol extract	SG(PT)-M	95.24	68.02	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
เกสร (Stamen)				
Hexane extract	SG(SM)-H	1.02	1.70	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Ethyl acetate extract	SG(SM)-EA	4.68	7.80	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
Methanol extract	SG(SM)-M	39.57	65.95	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
ฐานรองดอก (Sepal)				
Hexane extract	SG(SP)-H	1.52	3.04	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Ethyl acetate extract	SG(SP)-EA	4.34	8.68	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
Methanol extract	SG(SP)-M	32.20	64.40	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
ยอดอ่อน (Shoot)				
Hexane extract	SG(SH)-H	4.65	2.66	ของแข็งสีเขียวอ่อน
Ethyl acetate extract	SG(SH)-EA	18.81	10.75	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Methanol extract	SG(SH)-M	125.83	71.90	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

[a] น้ำหนักสารสกัดที่ได้มีหน่วยเป็นกรัม (g); [b] ร้อยละผลผลิต (%) = (น้ำหนักสารสกัดที่ได้/น้ำหนักพืชตัวอย่างแห้งที่ใช้)×100

จากผลการสกัดสารจากส่วนที่รับประทานได้ของแค (*S. grandiflora*) ดังตารางที่ 3-1 นั้นพบว่ายอดอ่อนแค (Shoot) มีร้อยละผลผลิตรวมสูงที่สุดเท่ากับ 85.31% รองลงมาคือกลีบดอก (Petal; 82.14%), ฐานรองดอก (Sepal; 76.12%) และเกสร (Stamen; 72.32%) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาตามความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดพบว่าตัวทำละลายเมทานอลของทุกส่วนสกัดมีร้อยละผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาคือเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสารทุติยภูมิจากส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้นจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงสูงมีปริมาณมากกว่าสารทุติยภูมิที่มีขั้วน้อย

3.2 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content, TPC)

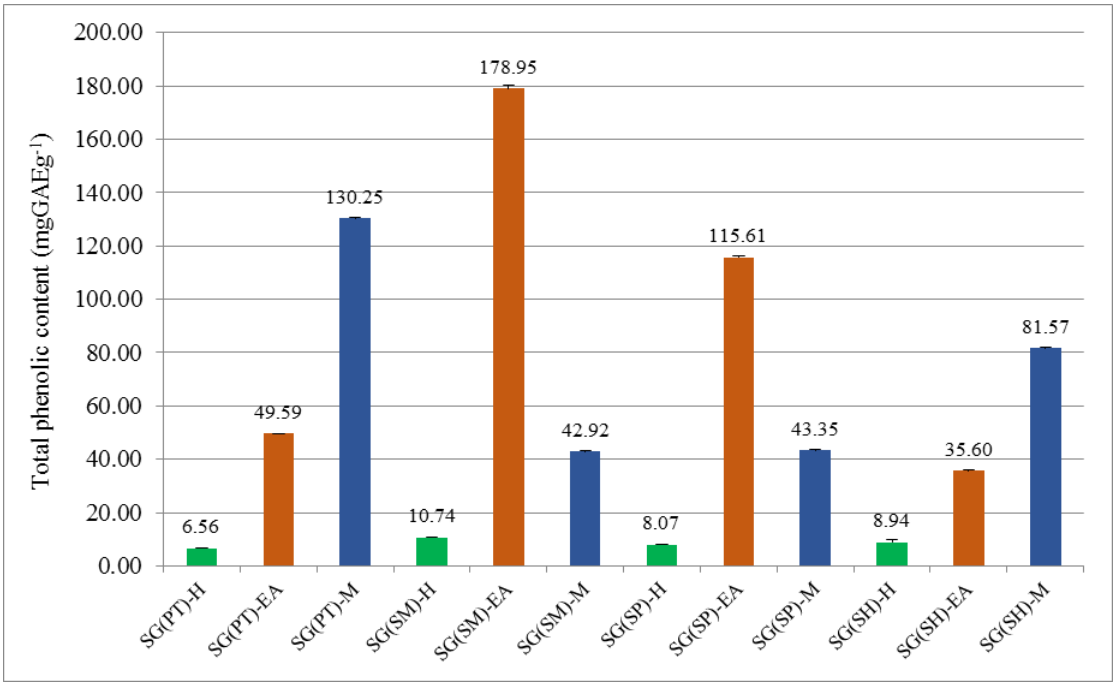
เมื่อทำการสกัดสารสกัดหยาบของแคได้ทั้งหมด 12 สารสกัดแล้วนั้น ในขั้นตอนถัดไปจะเป็นการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (Chemical constituents) โดยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดโรคต่างๆ ที่ดีนั้นก็คือสารประกอบในกลุ่มที่เรียกว่าสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบของแคทั้ง 12 สารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยวิธีการดังกล่าวนี้มีหลักการ คือสารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกเกิดเป็น tungsten และ molybdenum ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก คือ $y = 6.8117x + 0.0105$ ($R^2 = 0.9993$) ดังรูปที่ 3-1 และปริมาณฟีนอลิกรวมของแคทั้ง 12 สารสกัดแสดงดังรูปที่ 3-2 โดยรายงานผลการทดลองในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้ง 1 กรัม ($mgGAE.g^{-1}$)



รูปที่ 3-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Calibration curve for standard gallic acid)

จากผลการทดลองดังรูปที่ 3-2 พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของเกสร [SG(SM)-EA] มีปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 178.95 ± 1.11 $mgGAE.g^{-1}$ รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของกลีบดอก [SG(PT)-M; 130.25 ± 0.41 $mgGAE.g^{-1}$] และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของฐานรองดอก[SG(SP)-M; 115.61 ± 0.82 $mgGAE.g^{-1}$] ตามลำดับ โดยพบอีกว่าส่วนสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค (Shoot) ทั้ง 3 สารสกัด [SG(SH)-H, SG(SH)-EA และ SG(SH)-M] นั้นมีปริมาณปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยและน้อยกว่าส่วนสกัดหยาบจากส่วนของดอก (Flowers) อีกด้วย และยังพบว่าทั้งส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของทุกส่วนจากแคซึ่งเป็นส่วนสกัดหยาบที่มีขั้วน้อยที่สุดนั้นแสดงปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด

จากผลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกที่พบในส่วนสกัดหยาบของดอกและยอดอ่อนแคนั้นเป็นสารประกอบฟีฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางถึงสูง จากผลการทดลองข้างต้นนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดดังกล่าวที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงเป็นสารสกัดที่มาจากส่วนของดอกแค (Flowers) ที่ใช้รับประทานเป็นอาหารทั้งสิ้น โดยเฉพาะส่วนของกลีบดอก (Petal) ที่นิยมนำมาบริโภคมากที่สุด ก็พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลซึ่งเป็นส่วนสกัดหยาบที่มีขั้วมากที่สุดแสดงปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูง ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบและยืนยันได้ว่าการบริโภคดอกแค (*S. grandiflora* flowers) นั้นผู้บริโภคจะได้รับสาระสำคัญคือสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ รักษาและบรรเทาอาการของโรคต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นกับร่างกายของเรา รวมทั้งยังเป็นสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการในด้านต่างๆ อีกด้วย

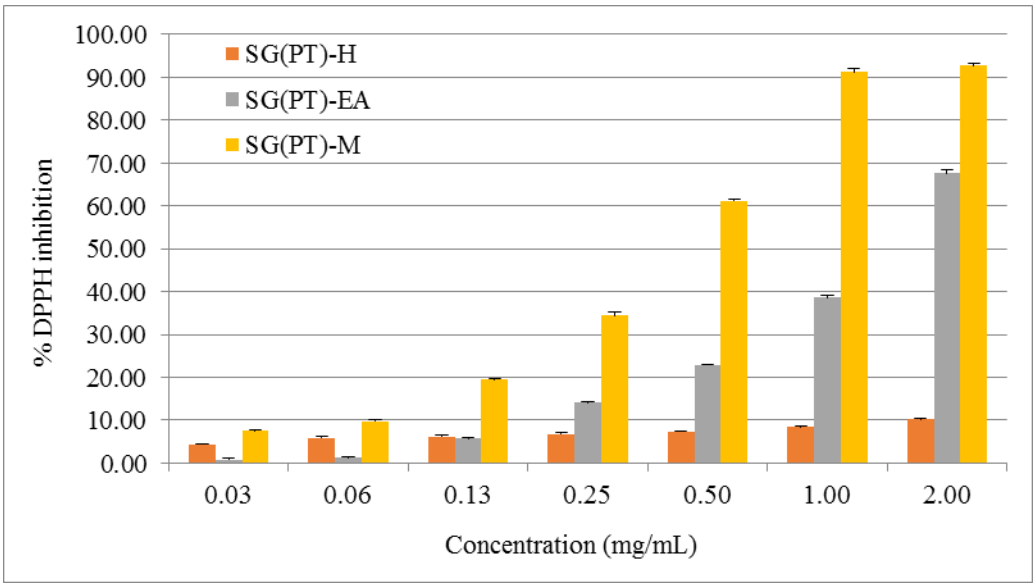


รูปที่ 3-2 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากแค (Total phenolic content of extracts)

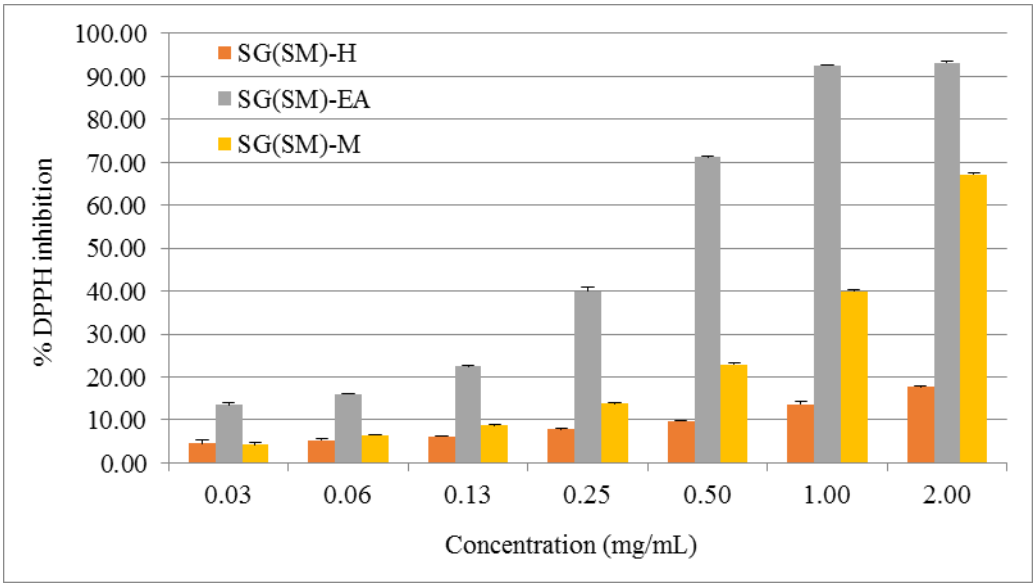
3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

อนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา และจะเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะเจาะจง ในร่างกายของคนเราสามารถเกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน โดยเมื่อร่างกายเกิดสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยมลภาวะต่างๆ เช่น ความเครียด มลพิษทางอากาศ ควันบุหรี่ หรือแม้กระทั่งแสงยูวี แต่ร่างกายมีกลไกที่กำจัดอนุมูลอิสระหรือสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ในกรณีที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนไม่สามารถกำจัดได้ทัน อนุมูลอิสระเหล่านี้ก็จะทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา เช่นการอักเสบต่างๆ โรคเบาหวาน มะเร็ง โรคหัวใจ และภาวะการอักเสบของระบบประสาทหรือภาวะสมองเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ เป็นต้น ดังนั้นถ้ากำจัดอนุมูลอิสระส่วนเกินนี้ได้ก็จะสามารถควบคุมและป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ ในปัจจุบันมีรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าอาหาร พืชผัก ผลไม้ และสมุนไพรนั้นมีสารทุติยภูมิที่ช่วยในการควบคุม ป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี สารกลุ่มนี้คือสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ โดยใช้ Phenolic hydroxyl groups (–OH) ในการเกิดปฏิกิริยา

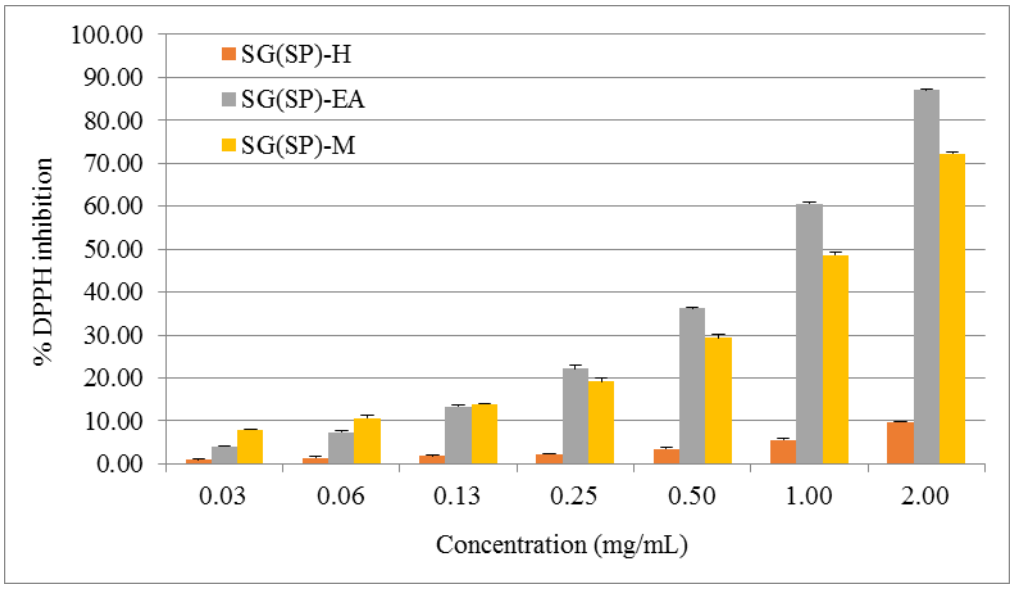
ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากแคทั้ง 12 สารสกัดกับอนุมูลอิสระ 2 ชนิดคือ DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) และ ABTS$^{•+}$ (2,2′-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline6-sulphonic acid) จากการทดลองพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากแคทั้งหมด 12 สารสกัดแสดงดังรูปที่ 3-3 ถึงรูปที่ 3-6 สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และรูปที่ 3-7 ถึงรูปที่ 3-10 สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS



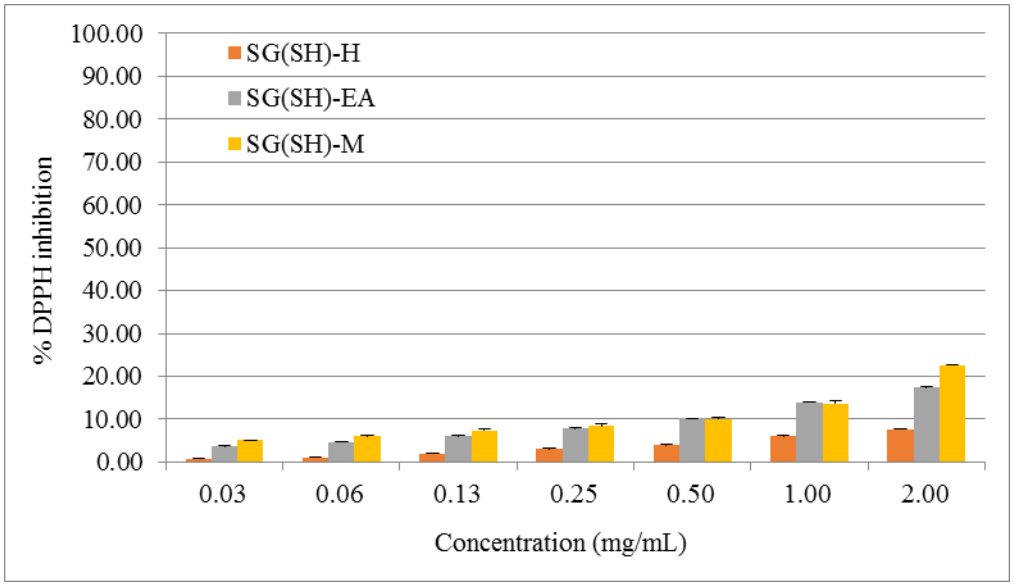
รูปที่ 3-3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค



รูปที่ 3-4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค



รูปที่ 3-5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค

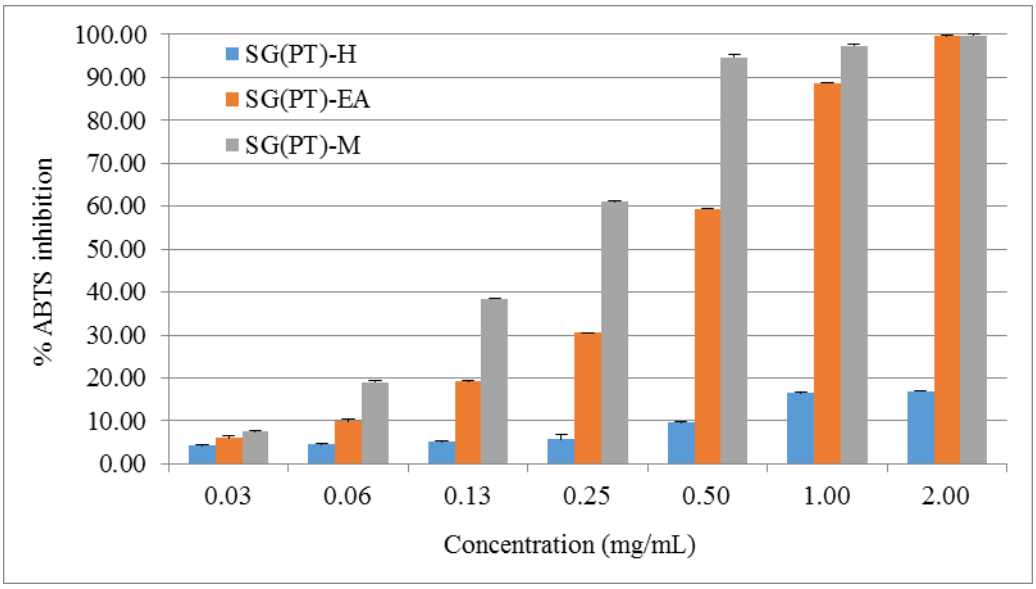


รูปที่ 3-6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค

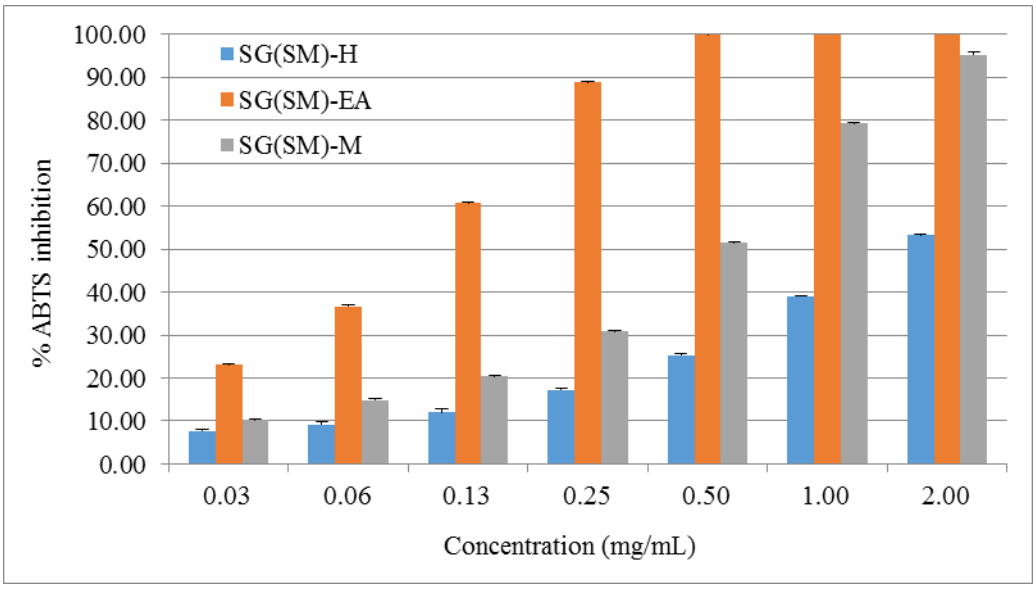
จากผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ดังรูปที่ 3-3 ถึงรูปที่ 3-6 พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของเกสร [SG(SM)-EA] แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 93.19 ± 0.27% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของกลีบดอก [SG(PT)-M; 92.69 ± 0.65%] และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของฐานรองดอก [SG(SP)-M; 86.98 ± 0.17%] ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารทดสอบเท่ากับ 2.0 mg/mL โดยพบอีกว่าส่วนสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค (Shoot) ทั้ง 3 สารสกัด [SG(SH)-H, SG(SH)-EA และ SG(SH)-M] นั้นมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อย (22.55 ± 0.09 ถึง 7.66 ± 0.10%) และน้อยกว่าส่วนสกัดหยาบจากส่วนของดอก (Flowers) อีกด้วย

นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของทุกส่วนจากแค ซึ่งเป็นส่วนสกัดหยาบที่มีขั้วน้อยที่สุดนั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยที่สุด

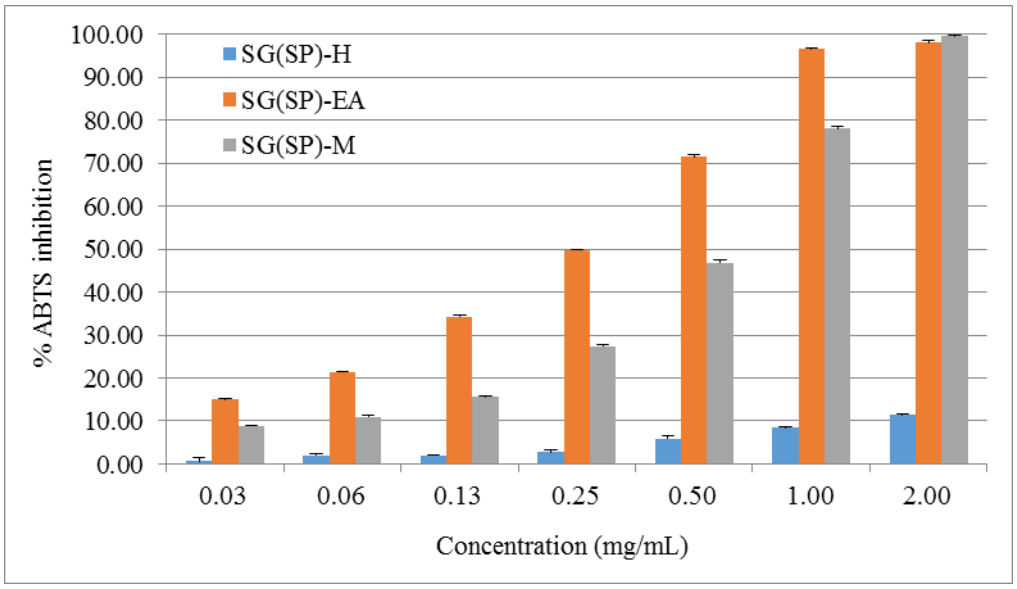
จากผลดังกล่าวข้างต้นนี้พบว่าสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากแค นั่นคือส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีนั้นก็จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงเช่นกัน จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้นคือสารทุติยภูมิที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกนั่นเอง และเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางถึงสูง



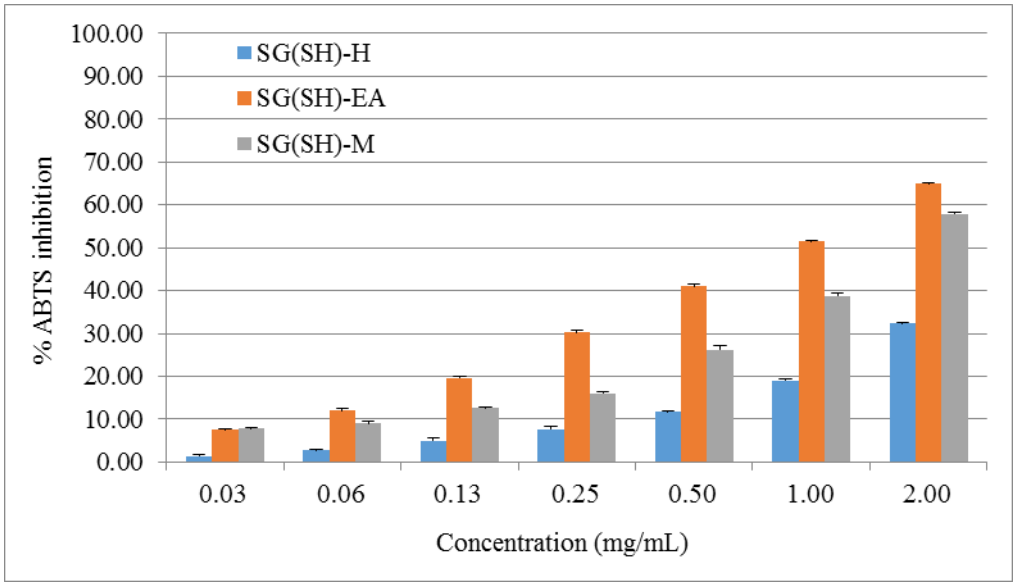
รูปที่ 3-7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค



รูปที่ 3-8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค



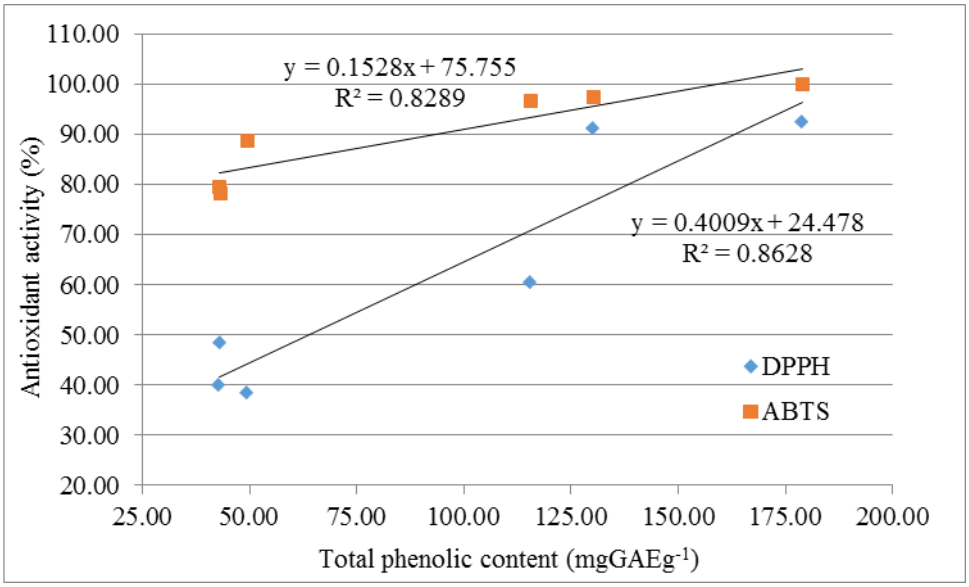
รูปที่ 3-9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค



รูปที่ 3-10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค

จากผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ดังรูปที่ 3-7 ถึงรูปที่ 3-10 พบว่าผลทั้งหมดนั้นสอดคล้องกับการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กล่าวคือส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของเกสร [SG(SM)-EA] แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 100.13 ± 0.22% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของกลีบดอก [SG(PT)-M; 99.79 ± 0.40%] และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของฐานรองดอก [SG(SP)-M; 98.10 ± 0.39%] ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารทดสอบเท่ากับ 2.0 mg/mL และส่วนสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค (Shoot) ทั้ง 3 สารสกัด [SG(SH)-H, SG(SH)-EA และ SG(SH)-M] นั้นมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS น้อย (57.87 ± 0.29 ถึง 32.39 ± 0.16%) และน้อยกว่าส่วนสกัดหยาบจากส่วนของดอก (Flowers) เช่นเดียวกัน

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้น มีผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ของสารสกัดหยาบจากแค กล่าวคือ ส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีนั้นก็จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงเช่นกัน โดยผลดังกล่าวนั้นยืนยันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังรูปที่ 3-11 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8628 และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8289 ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีนั้นมีค่า R^2 เข้าใกล้ 1.0000 แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากแคนั้นแปลผันโดยตรงหรือขึ้นอยู่กับปริมาณฟีนอลิกรวมนั่นเอง จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้สรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้นคือสารทุติยภูมิที่เป็น “สารประกอบฟีนอลิก” นั่นเอง และสารฟีนอลิกดังกล่าวยังเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางถึงสูงอีกด้วย

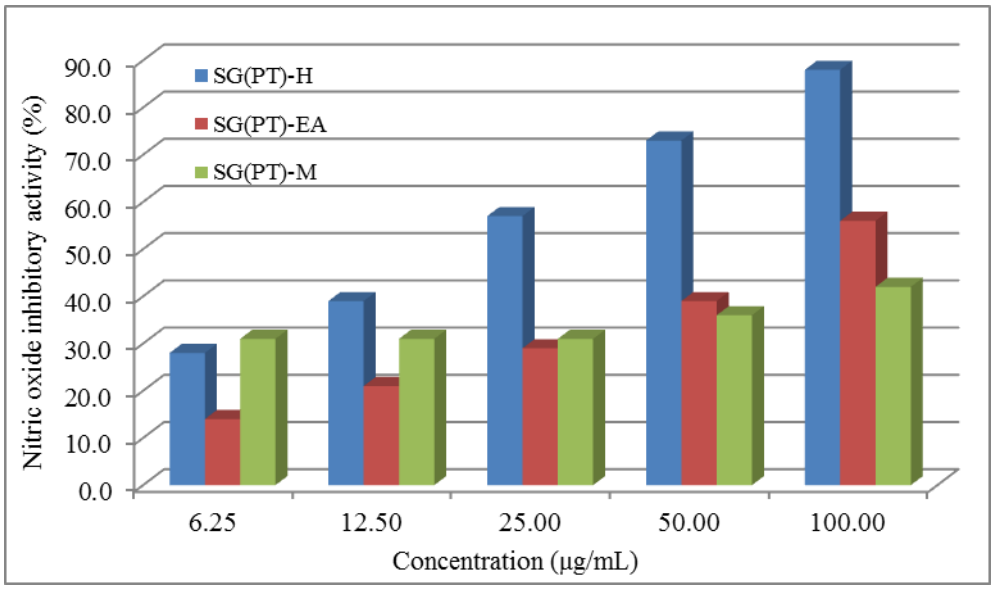


รูปที่ 3-11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

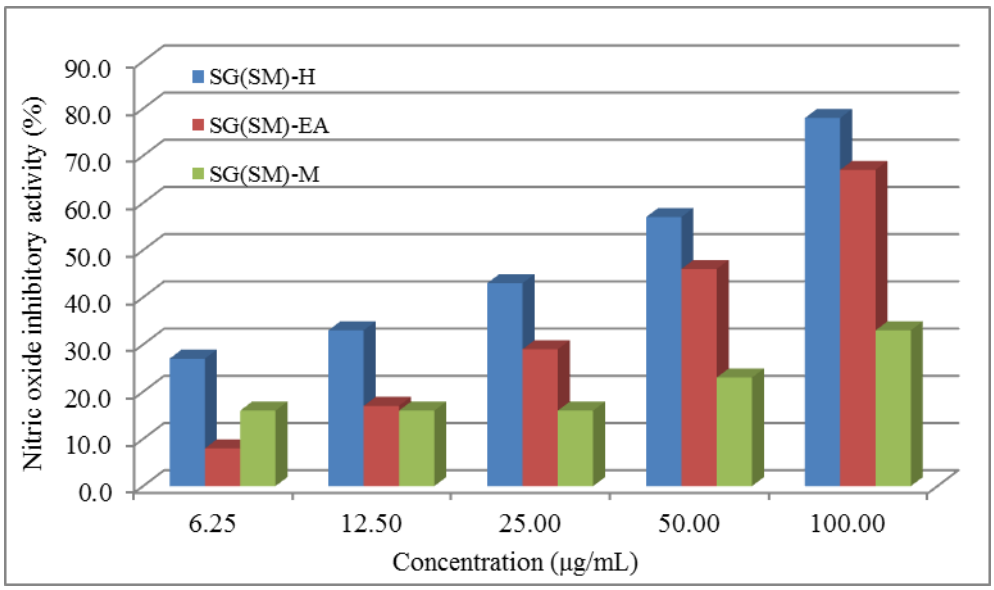
3.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory activity)

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง และร้อน[26] กระบวนการอักเสบประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังเนื้อเยื่อที่ถูกรุกรานเพิ่มมากขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการอักเสบ[27] ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E2 (Prostaglandins E2) และไซโตไคน์ (Cytokine) เป็นต้น[28,29] เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกรานที่เข้ามาสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตามการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลาย เนื้อเยื่อต่างๆ และเกิดเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ตามมา เช่น โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (Septic shock) โรคเบาหวาน และโรคอักเสบต่างๆ รวมทั้งภาวะการอักเสบของ

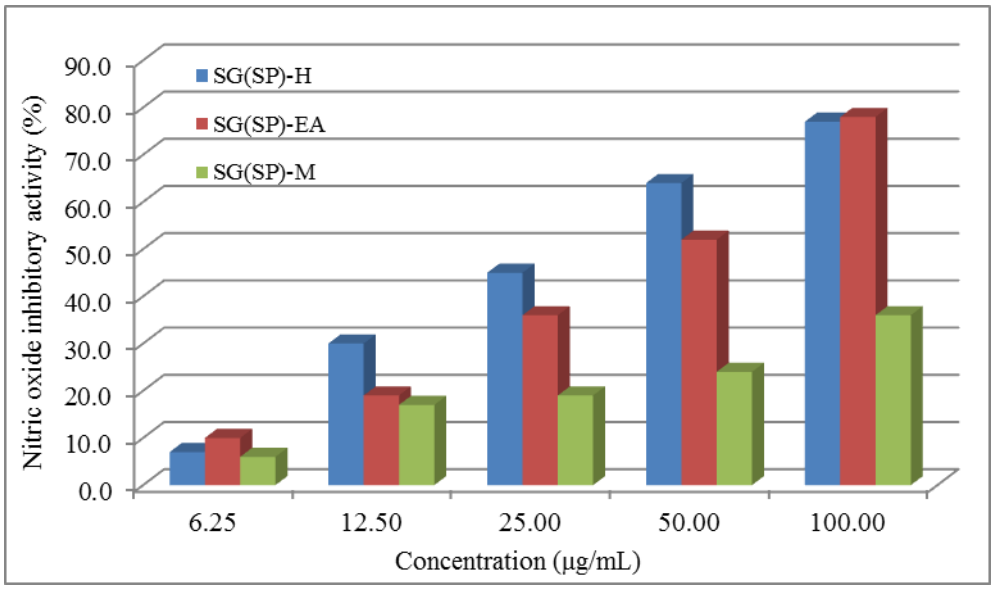
ระบบประสาทหรือภาวะสมองเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)[28,30,31] เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปนี้ จัดเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ซึ่งเป็นสารสื่อกลางของกระบวนการการอักเสบของสิ่งมีชีวิต ของสารสกัดหยาบจากแคทั้ง 12 สารสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดหยาบจากแคแสดงดังรูปที่ 3-12 ถึง รูปที่ 3-15



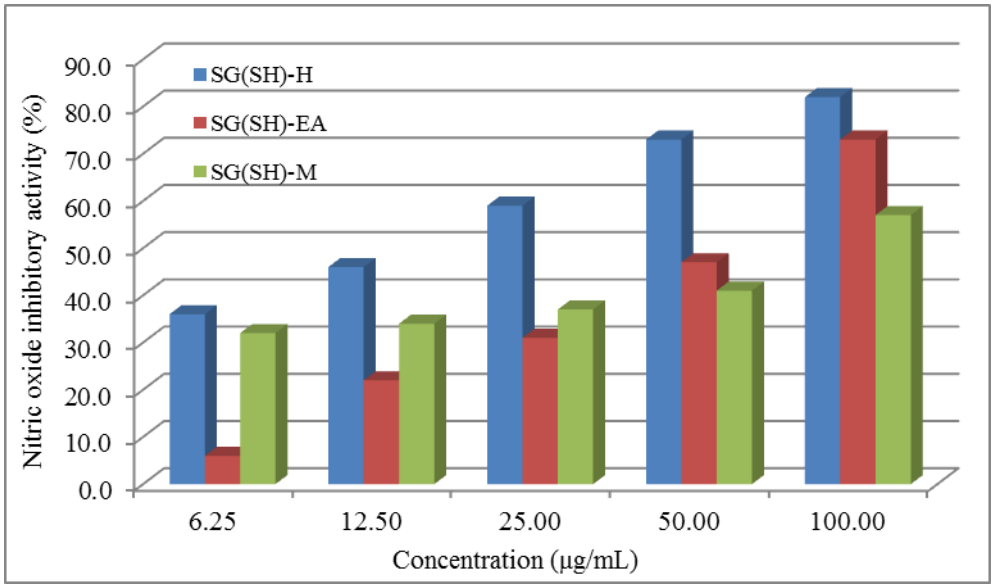
รูปที่ 3-12 ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค



รูปที่ 3-13 ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค



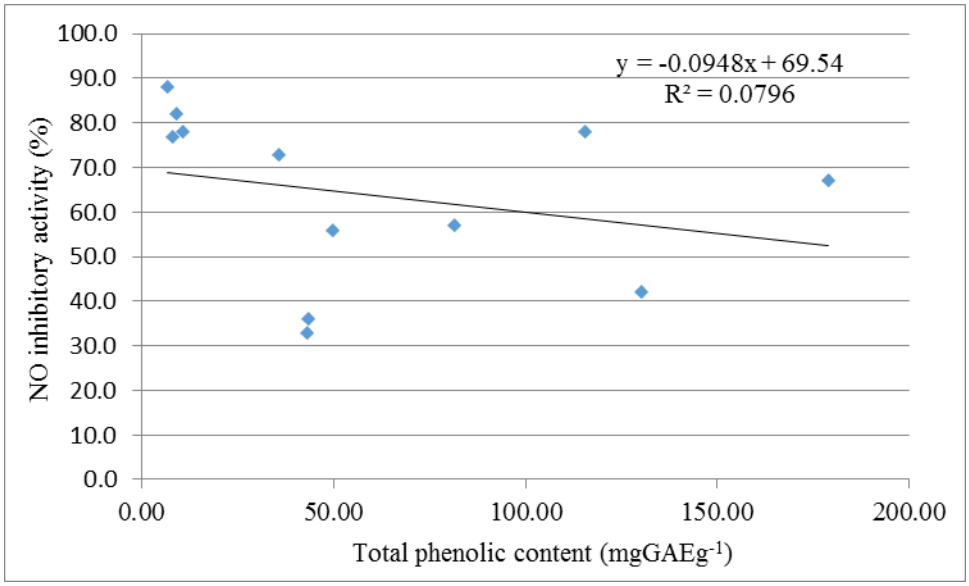
รูปที่ 3-14 ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค



รูปที่ 3-15 ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ดังรูปที่ 3-12 ถึงรูปที่ 3-15 พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของกลีบดอก [SG(PT)-H] แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 88.00 ± 3.21% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของยอดอ่อน [SG(SH)-H; 82.00 ± 8.12%], ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของเกสร [SG(SM)-H; 78.00 ± 8.78%] และส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของฐานรองดอก [SG(SP)-H; 77.00 ± 9.75%] ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารทดสอบเท่ากับ 0.1 mg/mL จากผลดังกล่าวข้างต้นจะพบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane extracts) ของส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้นฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี และดีกว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extracts) และเมทานอล (Methanol

extracts) อีกด้วย ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย (Non-polar compounds) ซึ่งตรงกันข้ามกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงขั้วสูง (Polar compounds) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ดังรูปที่ 3-16 กล่าวคือสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคนั้นซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย (Non-polar compounds) แล้วนั้นสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบดังกล่าวอาจจะไม่ใช้สารทุติยภูมิในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกอีกด้วย

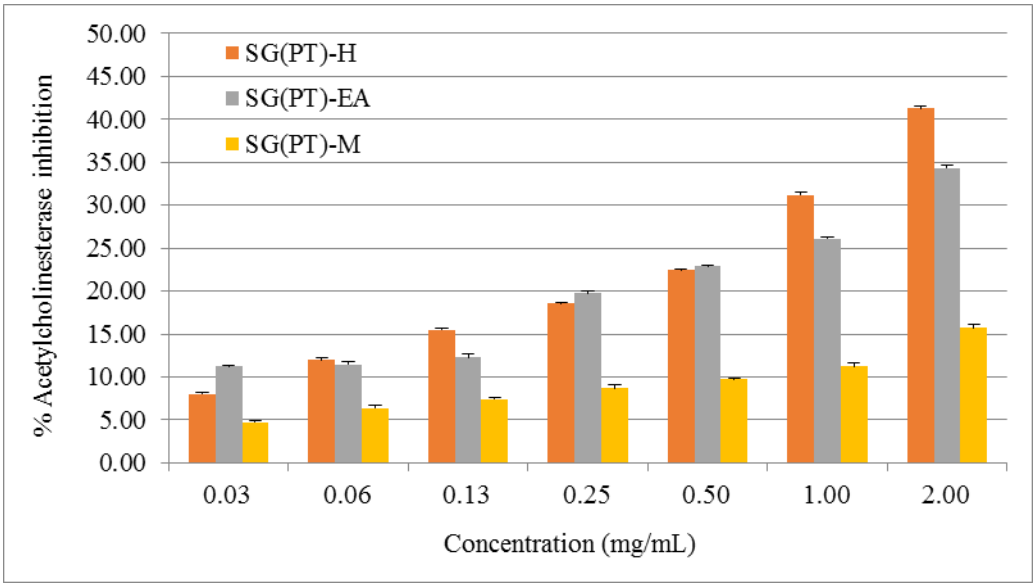


รูปที่ 3-16 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านการอักเสบ

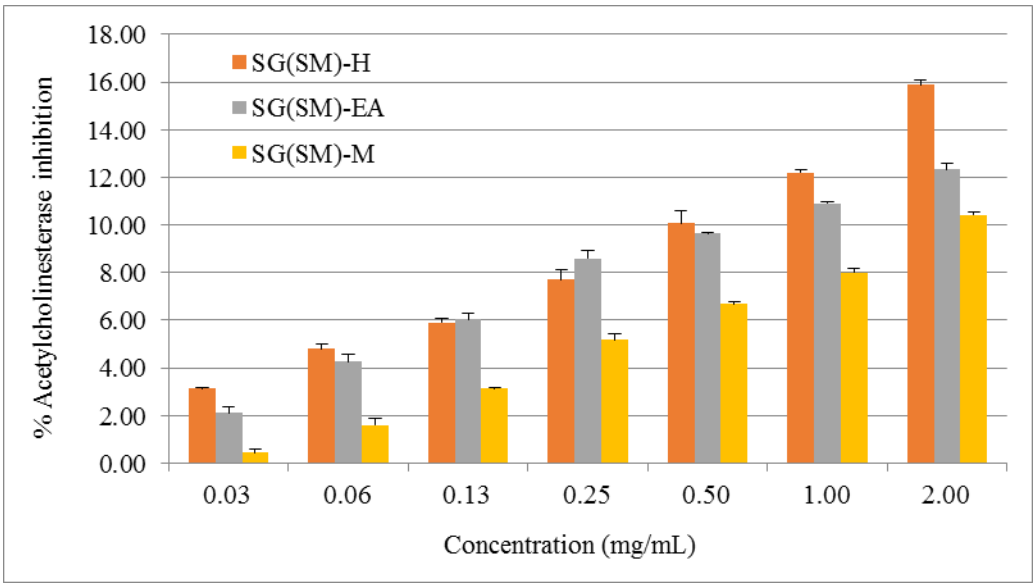
3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Anti-acetylcholinesterase activity)

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคในกลุ่มอาการสมองเสื่อม (Dementia syndrome) พบบ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ และจำนวนผู้ป่วยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากวิวัฒนาการทางการแพทย์ที่เจริญขึ้นทำให้คนมีอายุยืนมากขึ้น โรคอัลไซเมอร์เกิดจากความผิดปกติของการทำงานของระบบประสาท เนื่องจากเซลล์สมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจดจำข้อมูลต่างๆ ถูกทำลาย สำหรับสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์นั้น น่าจะเกิดจากหลายปัจจัย อาทิ การทำลายเซลล์สมองด้วยภาวะการเกิด Oxidative stress และ Lipid peroxidation การอักเสบของเซลล์ประสาท ภาวะขาดวิตามินบี 12 และโฟเลต รวมทั้งการลดลงหรือถูกทำลายของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine) โดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่าอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ดังนั้นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญของการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อการเพิ่มปริมาณของสารสื่อประสาท[32]

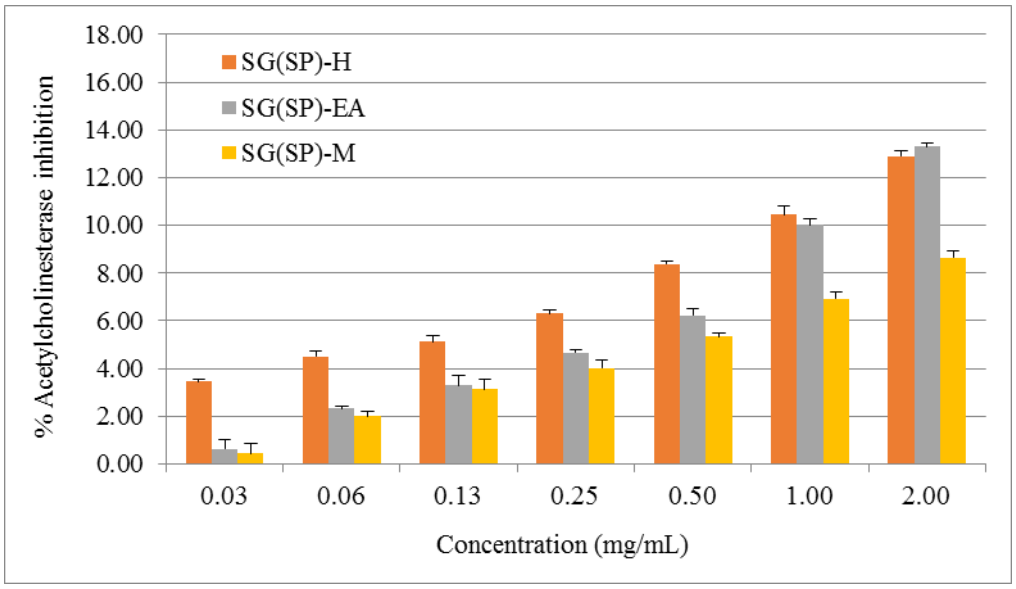
ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญของการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ของสารสกัดหยาบจากแคทั้ง 12 สารสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบจากแคแสดงดังรูปที่ 3-17 ถึง รูปที่ 3-20



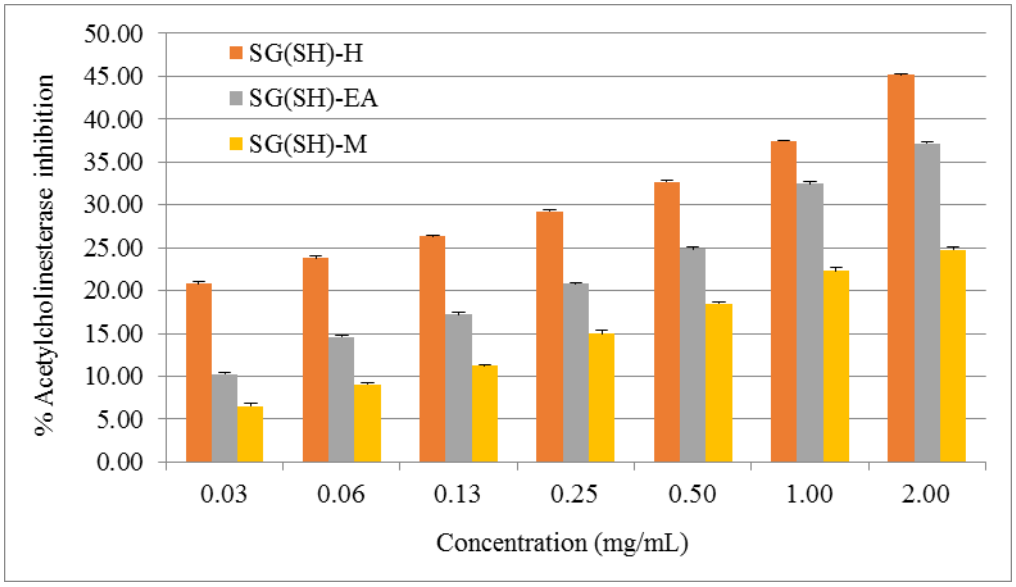
รูปที่ 3-17 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค



รูปที่ 3-18 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค



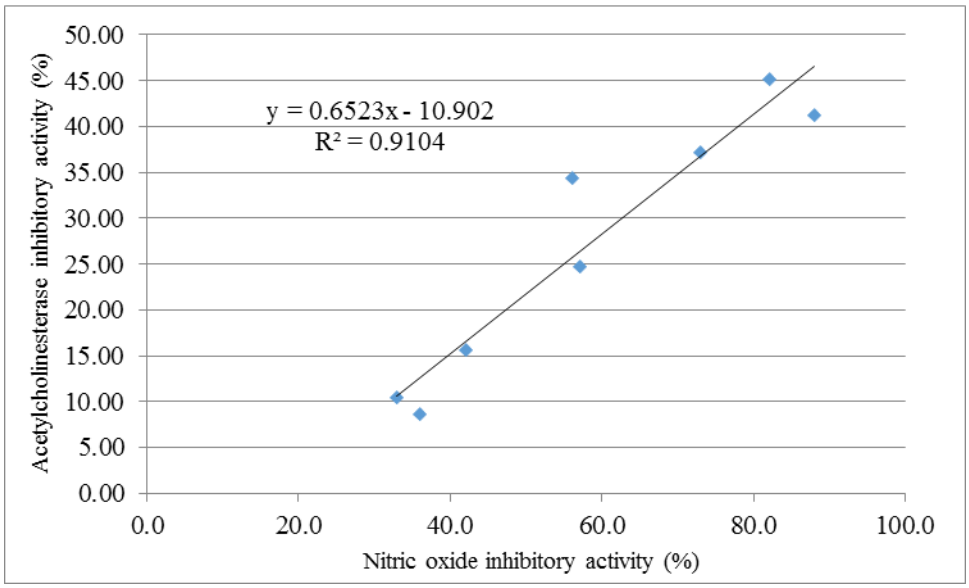
รูปที่ 3-19 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค



รูปที่ 3-20 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ดังรูปที่ 3-17 ถึงรูปที่ 3-20 พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของยอดอ่อนแค [SG(SH)-H] แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 45.15 ± 0.14% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซนของกลีบดอกแค [SG(PT)-H; 41.25 ± 0.32%], ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของยอดอ่อนแค [SG(SH)-EA; 37.18 ± 0.14%] และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของกลีบดอกแค [SG(PT)-EA; 34.32 ± 0.37%] ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นสารทดสอบเท่ากับ 2.0 mg/mL จากผลดังกล่าวข้างต้นจะพบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane extracts) และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิล-อะซิเตท (Ethyl acetate extracts) ของส่วนที่นิยมรับประทานเป็นอาหารของแคนั่นก็คือกลีบดอก (Petal)

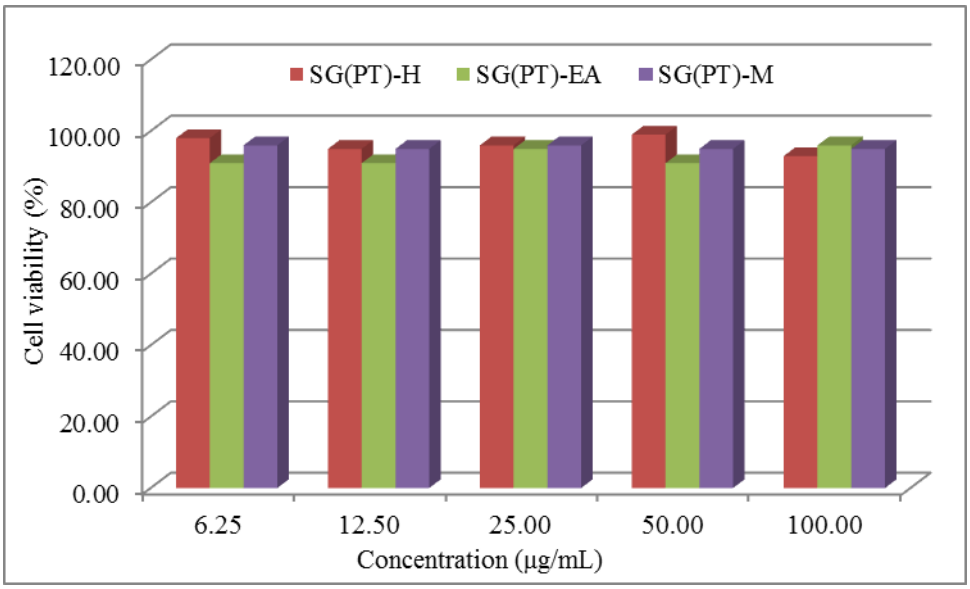
และยอดอ่อน (Shoot) นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีและดีกว่าส่วนสกัดหยาบจากเกสร (Stamen) และฐานรองดอก (Sepal) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่นิยมนำมารับประทาน ผลการทดลองดังกล่าวนี้เป็นการยืนยันภูมิปัญญาของคนไทยต่อการบริโภคแค (*S. grandiflora*) ในการประกอบอาหารกล่าวคือเวลาจะประกอบอาหารในส่วนของดอกแคนั้น จะมีการนำส่วนของเกสรออกเสียก่อน และไม่นิยมรับประทานส่วนฐานรองดอก รวมทั้งส่วนของยอดอ่อนก็นิยมนำมารับประทานเป็นผักแกล้มน้ำพริกอีกด้วย นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ได้นั้นพบว่า สารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่มีขั้วน้อยถึงขั้วปานกลางซึ่งคล้ายหรือสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคที่พบว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารที่มีขั้วน้อย (Non-polar compounds) อีกทั้งสรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสดังกล่าวอาจจะไม่ใช้สารทุติยภูมิในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกเช่นเดียวกับฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์อีกด้วย และจากที่กล่าวมาข้างต้นนั้นกระบวนการการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายโดยเฉพาะการผลิต การหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปจะเป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งในการเกิดภาวะสมองเสื่อมหรือเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดี ก็จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสดีเช่นกัน ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ดังรูปที่ 21



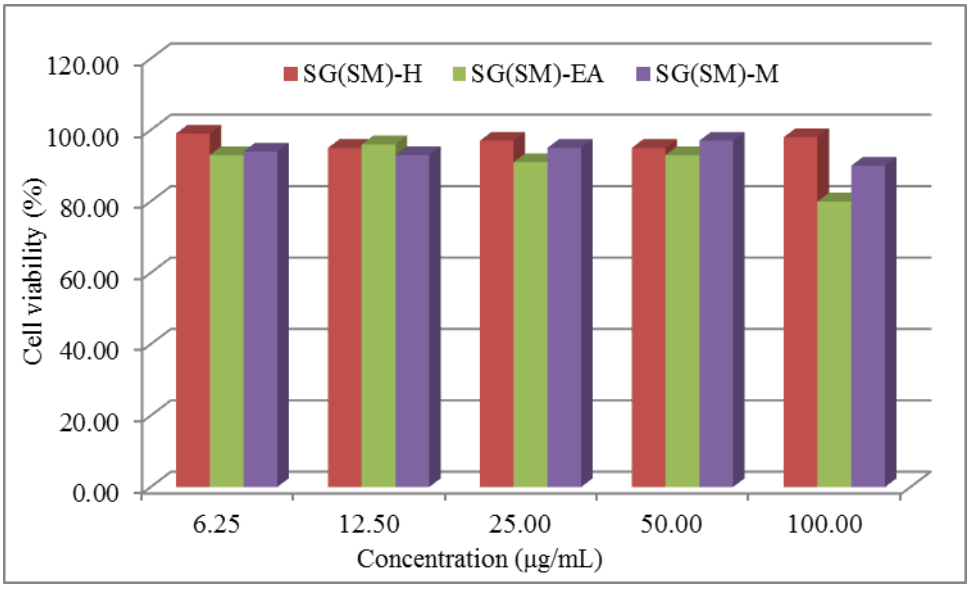
รูปที่ 3-21 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์

3.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cyctoxic activity)

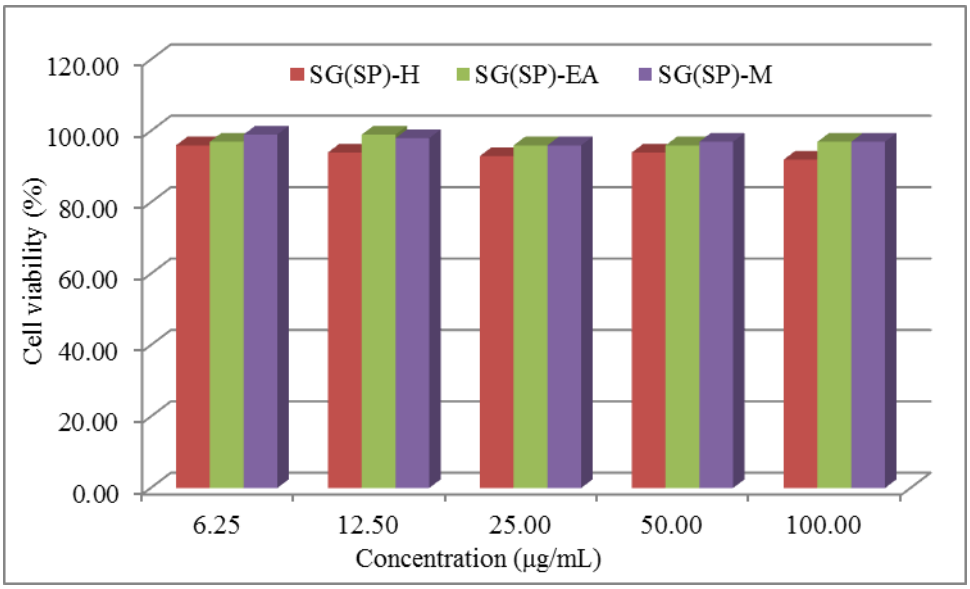
จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้นั้นเป็นการศึกษาและพัฒนาพืชผัก สมุนไพรของไทยที่นิยมรับประทานและประกอบอาหารอยู่เป็นประจำนั้น ให้รับประทานเป็นอาหารพร้อมกับเป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการบริโภคพืชผัก สมุนไพร ดังกล่าวเป็นประจำ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นพิษของพืชผัก สมุนไพรนั้นด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากแคทั้ง 12 สารสกัด โดยการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์นี้จะทดสอบกับเซลล์ปกติคือเซลล์ไตของลิง (Vero Cells) ด้วยวิธี MTT ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบจากแคแสดงดังรูปที่ 3-22 ถึง รูปที่ 3-25



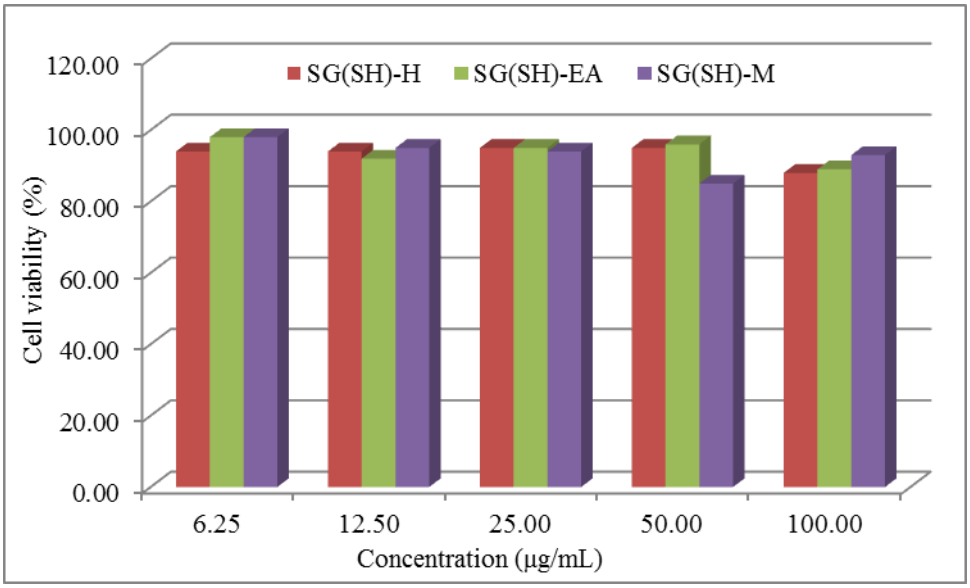
รูปที่ 3-22 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกลีบดอกแค



รูปที่ 3-23 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเกสรดอกแค



รูปที่ 3-24 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากฐานรองดอกแค



รูปที่ 3-25 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค

จากผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแค ดังรูปที่ 3-22 ถึงรูปที่ 3-25 เมื่อนำส่วนสกัดหยาบทุกส่วนสกัดหยาบจากแคทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบเท่ากับ 100.0 µg/mL พบว่าส่วนสกัดหยาบทุกส่วนสกัดหยาบไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ โดยมีร้อยละของความมีชีวิตรอดของเซลล์ทดสอบเท่ากับ 80.0–100.0% จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าถ้าบริโภคแคไม่ว่าจะเป็นส่วนดอกหรือยอดอ่อนก็ไม่แสดงความเป็นพิษต่อผู้บริโภคนั่นเอง

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

“แค (*Sesbania grandiflora*)” เป็นพืชที่นิยมนำมาประกอบอาหารจัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) ที่พบมากในประเทศไทยและมีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทางด้านเภสัชวิทยาและตามตำราแพทย์แผนไทย โดยใช้ส่วนต่างๆ ของแคในการรักษาอาการปวดศีรษะ ไมเกรน รักษาอาการหวัด แก้ไข้ตัวร้อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแค สำหรับช่วยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและพบมากในผู้สูงอายุ และเพื่อนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยเมื่อนำส่วนที่รับประทานได้และนิยมรับประทานคือส่วนดอกและยอดอ่อน มาทำการสกัดด้วยวิธีการแช่หมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้วคือเริ่มต้นจากทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วคือเฮกเซน และตามด้วยเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ พบว่ายอดอ่อนแค (Shoot) มีร้อยละผลผลิตรวมสูงที่สุดเท่ากับ 85.31% รองลงมาคือกลีบดอก (Petal; 82.14%), ฐานรองดอก (Sepal; 76.12%) และเกสร (Stamen; 72.32%) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาตามความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดพบว่าตัวทำละลายเมทานอลของทุกส่วนสกัดมีร้อยละผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาคือเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสารทุติยภูมิจากส่วนที่รับประทานได้ของแคนั้นจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงสูงมีปริมาณมากกว่าสารทุติยภูมิที่มีขั้วน้อย

จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่มีรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี จากการทดลองพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดนั้นเป็นสารสกัดที่มาจากส่วนของดอก และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในส่วนสกัดหยาบของดอกและยอดอ่อนแคนั้นเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางถึงสูง อีกทั้งได้นำสารสกัดหยาบทั้งหมดที่ได้ไปการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory activity) ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Antiacetylcholinesterase activity) และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของเกสร [SG(SM)-EA] แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของกลีบดอก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทของฐานรองดอก ตามลำดับ โดยพบอีกว่าส่วนสกัดหยาบจากยอดอ่อนแค (Shoot) ทั้ง 3 สารสกัด [SG(SH)-H, SG(SH)-EA และ SG(SH)-M] นั้นมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระน้อย และน้อยกว่าส่วนสกัดหยาบจากส่วนของดอก (Flowers) อีกด้วย มากไปกว่านั้นผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane extracts) ของส่วนที่รับประทานได้ของแคไม่ว่าจะเป็นยอดอ่อนหรือดอกนั้นแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี และดีกว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extracts) และเมทานอล (Methanol extracts) ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย (Non-polar compounds) ซึ่งตรงกันข้ามกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงขั้วสูง (Polar compounds) ในทำนองเดียวกัน ผลการทดลองในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสพบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane extracts) และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extracts) ของส่วนที่นิยมรับประทานเป็นอาหารของแคนั่นก็คือกลีบดอก (Petal) และยอดอ่อน (Shoot) นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีและดีกว่าส่วนสกัดหยาบจากเกสร (Stamen) และฐานรองดอก (Sepal) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่นิยมนำมารับประทาน

ผลการทดลองดังกล่าวนี้เป็นการยืนยันภูมิปัญญาของคนไทยต่อการบริโภคแค (*S. grandiflora*) ในการประกอบอาหาร กล่าวคือเวลาจะประกอบอาหารในส่วนของดอกแคนั้น จะมีการนำส่วนของเกสรออกเสียก่อน และไม่นิยมรับประทานส่วนฐานรองดอก รวมทั้งส่วนของยอดอ่อนก็นิยมนำมารับประทานเป็นผักแกล้มน้ำพริกอีกด้วย นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ได้นั้นพบว่า สารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่มีขั้วน้อยถึงขั้วปานกลางซึ่งคล้ายหรือสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบจากส่วนที่รับประทานได้ของดอกแคที่พบว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารที่มีขั้วน้อย

จากผลการวิจัยที่ได้พบว่า “แค” สามารถช่วยในการบรรเทาพยาธิวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งภาวะการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายสารสื่อประสาทนั่นคือเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส รวมทั้งส่วนสกัดหยาบของแคทุกส่วนสกัดนั้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย ดังนั้นการบริโภค “แค” อาจจะช่วยบรรเทาและป้องกันโรคอัลไซเมอร์ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและพบมากในผู้สูงอายุได้

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยดังกล่าวนี้ที่เสร็จล่าช้าเกินกว่ากำหนดเวลามีปัจจัยอยู่หลายประการแต่ประการที่สำคัญคือสารเคมีสำคัญที่ใช้ทดสอบโรคอัลไซเมอร์คือเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสนั้นต้องนำเข้าจากต่างประเทศเพียงอย่างเดียว และการนำเข้าแต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลา 3 ถึง 6 เดือนเป็นอย่างน้อย อีกทั้งการพิสูจน์ยืนยันโครงสร้างต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงหลายชนิดบางชนิดไม่มีในหน่วยงานจึงต้องส่งไปวิเคราะห์หน่วยงานภายนอกจึงทำให้เกิดความล่าช้าในงานวิจัยดังกล่าว

บรรณานุกรม

1. Santos-Neto, L.L., Toledo, M.A.V., Medeiros-Souza, P., Souza, G.A. (2006). The use of herbal medicine in Alzheimer's disease – A systematic review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4), 441–445.
2. Sebastian, R., Brown, T.L. (2016). Alzheimer's disease prevention and treatment using herbal agents. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 2(4), 1–4.
3. Anulika, N.P., Ignatius, E.O., Raymond, E.S., Osasere, O.-I., Abiola, A.H. (2016). The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 4(8), 1–8.
4. Smitinan, T. 2014. *Thai plant names* (botanical names-vernacular names). Bangkok, Thailand: Royal Forest Department, 511–512.
5. Wagh, V.D., Wagh, K.V., Tandale, Y.N., Salve, S.A. (2009). Phytochemical, pharmacological and phytopharmaceutics aspects of *Sesbania grandiflora* (Hadga): A review. *Journal of Pharmacy Research*, 2(5), 889–892.
6. http://mdu16.rtarf.mi.th/www_new/images/work/2/14.Agasta.pdf
7. Fojas, F.R., Barrientos, C.M., Capal, T.V., Cruzada, S.F., Sison, F.M., Co, Y.C., Chua, N.G., Gavina, T.L. (1982). Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Philippine Journal of Sciences*, 111, 157–181.
8. Bahera, M., Karki, R., Shekar, C. (2012). Preliminary phytochemical analysis of leaf and bark methanolic extract of *Sesbania grandiflora*. *The Journal of Phytopharmacology*, 1(2), 10–20.
9. Raji, A.F., Alphonse, N.R. (2013). Phytochemical study on *Sesbania grandiflora*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(2), 196–201.
10. Laladhas, K.P., Cheriyan, V.T., Puliappadamba, V.T., Bava, S.V., Unnithan, R.G., Vijayammal, P.L., Anto, R.J. (2010). A novel protein fraction from *Sesbania grandiflora* shows potential anticancer and chemopreventive efficacy in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 636–646.
11. Gupta, R., Dumore, N., Danao, K., Motiwala, M. (2013). Biological screening for cytotoxic potential of *Sesbania grandiflora* bark extract against human ovary epithelial teratocarcinoma using PA-1 cell lines, brine shrimp lethality bioassay and *Aillum cepa* root model. *Journal of Natural Products Plant Resource*, 3(5), 18–25.

12. Sutradhar, K.B., Choudhury, N.F. (2012). Analgesic and CNS depressant activity of the crude extract of *Sesbania grandiflora*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(3), 56–61.
13. Munde-Wagh, K.B., Wagh, V.D., Toshniwal, S.S., Sonawane, B.R. (2012). Phytochemical, antimicrobial evaluation and determination of total phenolic and flavonoid contents of *Sesbania grandiflora* flower extract. *International Journal of Phamacy and Phamaceutical Sciences*, 4(4), 229–232.
14. Padmalochana, K., Dhana Rajan, M.S. (2014). Antimicrobial activity of aqueous, ethanol and acetone extracts of *Sesbania grandiflora* leaves and its phytochemical characterization. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 5(12), 957–962.
15. Siddhuraju, P., Abirami, A., Nagarani, G., Sangeethapriya, M. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content of aqueous acetone and ethanol extract of edible parts of *Moringa oleifera* and *Sesbania grandiflora*. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8(9), 1090–1098.
16. Zarena, A.S., Gopal, S., Vineeth, R. (2014). Antioxidant, antibacterial, and cytoprotective activity of Agathi leaf protein. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1–8.
17. Karumari, R.J., Sumathi, S., Vijayalakshmi, K., Balasubramanian, S.E. (2014). Anthelmintic efficacy of *Sesbania grandiflora* leaves and *Solanum torvum* fruits against the nematode parasite *Ascaridia galli*. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(5), 326–333.
18. Rajagopal, P.L., Premaletha, K., Sreejith, K.R. (2016). Anthelmintic activity of the flowers of *Sesbania grandiflora* Pers. *Journal of Innovations in Applied Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 8–11.
19. Hasan, N., Osman, H., Mohamad, S., Chong, W.K., Awang, K., Mohd Zahariluddin, A.S. (2012). The chemical components of *Sesbania grandiflora* root and their antituberculosis activity. *Pharmaceuticals*, 5, 882–889.
20. Osman, H., Hasan, N., Chong, W.K., Awang, K., Manshoor, N. (2012). Isolation and characterization of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol, a new biaryl natural product from *Sesbania grandiflora* root. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 8, 253–256.
21. Majhenic, L.; Skerget, M.; Knez, Z. **(**2007**)**. Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104(3), 1258–1268.
22. Braca, A.; Sortino, C.; Politi, M.; Morelli, I.; Mendez, J. **(**2002**)**. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethanopharmacology,* 79, 379–381.

23. Joo, T., Sowndhararajan, K., Hong, S., Lee, J., Park, S.-Y., Kim, S., Jhoo, J.-W. (2014). Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cell by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 427–435.
24. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
25. Bhatt, D.R., Zaveri, M.N. (2016). In-vitro cytotoxicity study of some indigenous medicinal plants on Vero cell line. *International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*, 4(2), 307–309.
26. Mequanint, W., Makonnen, E., Urga, K. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiifolium* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 32–36.
27. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N. (2007). Robbins Basic Pathology (8th ed.). United States of America, Elsevier Saunders.
28. Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E. (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease. *Respiratory Research*, 1, 67–72.
29. Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H., Park, Y.K. (2009). Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response via blocking of NF-kB signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 313–319.
30. Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1, 1397–1406.
31. Guzik, T.J., Korbut, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469–487.
32. Ranjan, N., Kumari, M. (2017). Acetylcholinesterase inhibition by medicinal plants: A review. *Annals of Plant Sciences*, 6.6, 1640–1644.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)

1. Anan Athipornchai*, Kamonrat Srilaslao, Suwanna Semsri, *and* Warangkana Chunglok. Potential acetylcholinesterase inhibitory activity from *Sesbania grandiflora* flowers (Manuscript in preparation).
2. การผลิตบัณฑิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 1 คน คือนางสาวกมลรัตน์ สีลาดเลา
3. ได้กระบวนการสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์จากแค (*Sesbania grandiflora*) ในการยับยั้งพยาธิวิทยาในป้องกันโรคอัลไซเมอร์