



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในใบและผลมะตูมและ
ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์

STUDY OF ACTIVITIES FOR RADICAL SCAVENGING AND ACETYLCHOLINESTERASE
INHIBITOR IN AEGLE MARMELOS LEAVES AND FRUITS AND THE EXPRESSION OF
GENE RELATED TO ACTIVE SUBSTANCES

ภิญญาภัทร ธัญญสิน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคไลน์เอสเตอเรสในใบและผลมะตูมและ
ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

STUDY OF ACTIVITIES FOR RADICAL SCAVENGING AND ACETYLCHOLINESTERASE
INHIBITOR IN *AEGLE MARMELOS* LEAVES AND FRUITS AND THE EXPRESSION OF
GENE RELATED TO ACTIVE SUBSTANCES



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในใบและผลมะตูมและ
ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์
ของ
ภิญญาภัทร ธัญญ์สิน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ สิทธีการ)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ปองทิพย์ สิทธีสาร)
	 กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในใบและผลมะตูมและระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์
ผู้วิจัย	ภิญญาภัทร ธัญญ์สิน
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดจากใบมะตูมสามช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) และสารสกัดจากผลมะตูมสามลักษณะ (มะตูมน้ำ มะตูมไข่ และมะตูมบ้าน) และศึกษาระดับการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทสซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ในใบมะตูมด้วยวิธี semiquantitative polymerase chain reaction นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในผลมะตูมโดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้ high performance thin layer chromatography (HPTLC) ผลการศึกษาในใบ พบ acyclic monoterpenes ในยอด ไม่พบในใบอ่อนและใบโตเต็มที่ แต่จะพบ sesquiterpenes แทน สารสกัดจากยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($IC_{50} = 417.32 \mu\text{g/ml}$) ในขณะที่สารสกัดจากใบโตเต็มที่มฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด ($IC_{50} = 475.39 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น 1/4 เท่าของสารกัลลันตามีน และระดับการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทสเพิ่มขึ้นเมื่อใบเจริญขึ้น การศึกษาในผลพบว่า ผลมะตูมไข่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($IC_{50} = 377.74 \mu\text{g/ml}$) ปริมาณสารมาร์มีโลซินและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสไม่สัมพันธ์กัน กล่าวคือผลมะตูมน้ำมีปริมาณสารมาร์มีโลซินมากที่สุด (1.01 mg/100 mg of spray dried) ในขณะที่ผลมะตูมบ้านมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด ($IC_{50} = 124.71 \mu\text{g/ml}$) ดังนั้นใบมะตูมและผลมะตูมน่าจะนำมาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เช่น เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะสมองเสื่อม

คำสำคัญ : มะตูม ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ยีนลิโมนีนซินเทส

The study investigated the activities against DPPH radical and acetylcholinesterase (AChE) using colorimetric method in leaf at various ages (shoots, young leaves and mature leaves) and various types of fruit (matoomnim, matomkhai and matoomban) of *Aegle marmelos* (known as matoom, Family Rutaceae). The terpenoid profile as well as the expression level of limonene synthase gene (*lim*) in the leaves were determined. Finally, marmelosin content was estimated in the fruits using high performance thin layer chromatography. The results demonstrated that acyclic monoterpenes were found only in shoots, whereas sesquiterpenes were found when the leaves developed. Among the leaves, the shoots ($IC_{50}=417.32 \mu\text{g/ml}$) exhibited the highest radical scavenging activity, whereas the mature leaves ($IC_{50}=475.39 \mu\text{g/ml}$) exhibited the highest activity against AChE. The expression level of *lim* increased during shoots developed to mature leaves. Among the fruits, matoomkhai ($IC_{50}=377.74 \mu\text{g/ml}$) exhibited the highest radical scavenging activity, whereas matoomban ($IC_{50}=124.71 \mu\text{g/ml}$) exhibited the highest activity against AChE. In addition, marmelosin content was highest in matoomnim. The *A. marmelos* leaves and fruits are regarded as a potential food supplement to delay or prevent AD.

Keyword : Aegle marmelos radical scavenging acetylcholinesterase inhibitor limonene synthase gene

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่องจากอาจารย์ที่ปรึกษาและคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร ที่ได้ให้ความเมตตากรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการทำปริญญานิพนธ์นี้ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี รองศาสตราจารย์ ดร. ปองทิพย์ สิทธิสาร รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลภ วีชะรังสรรค์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูติมา วีรินชพงศ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะต่างๆ เพิ่มเติมแก่ผู้วิจัย ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและกรรมการบริหารหลักสูตรสาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาท ความรู้ต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (เลขที่ 082/2563) ที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนให้ ความรู้เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ภิญญาภัทร ธัญญ์สิน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
3. สมมติฐานวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
5. ขอบเขตของงานวิจัย	4
6. กรอบแนวคิด	5
7. นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
8. นิยามเชิงปฏิบัติการ	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม.....	7
1. ลักษณะทั่วไปของมะตูม.....	7
2. การเกิดโรคอัลไซเมอร์	12
3. การต้านอนุมูลอิสระ.....	13
4. การต้านอนุมูลอิสระอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	15
5. หลักการวิเคราะห์ด้วย GC.....	20

6. หลักการวิเคราะห์ด้วย HPTLC.....	20
7. กระบวนการชีวสังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยในพืช.....	20
8. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วย PCR.....	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	25
1. รูปแบบการวิจัย	25
2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	25
2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้าน เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส การวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซิน และการ วิเคราะห์องค์ประกอบในใบ	25
2.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	27
3. พืชที่ใช้ในการศึกษา.....	28
4. การเตรียมสารสกัด	29
5. ขั้นตอนการวิจัย	30
5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาองค์ประกอบใบเบื้องต้น.....	30
5.2 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader).....	32
5.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดย เทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)	32
5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีนในใบมะตูมบ้าน.....	33
5.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูม	35
5.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดย เทคนิค HPTLC.....	35
5.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)	36

5.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader).....	37
5.9 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	37
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	41
1. ผลการศึกษาในใบ	41
1.1 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ด้วย high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)	41
1.2 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ด้วย gas chromatography (GC)	42
1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	44
1.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader).....	45
1.5 ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในใบมะตูมบ้านโดยวิธี semiquantitative polymerase chain reaction (semiquantitative PCR)	48
2. ผลการศึกษาในผล	51
2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	51
2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader).....	53
2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผล	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	58
1. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล	58
1.1 การศึกษาในใบ	58
2. ข้อเสนอแนะ	63
ภาคผนวก ก	64
บรรณานุกรม	71
ประวัติผู้เขียน.....	78

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในใบและผลมะตูม.....	9
ตาราง 2 แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะตูม.....	11
ตาราง 3 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา ข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	14
ตาราง 4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ limonene.....	18
ตาราง 5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ monoterpenes.....	19
ตาราง 6 แสดงส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการศึกษาแสดงออกของยีน.....	40
ตาราง 7 แสดงองค์ประกอบที่พบในใบสามช่วงการเจริญเติบโต.....	43
ตาราง 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูมสามช่วงการเจริญเติบโต.....	45
ตาราง 9 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ limonene.....	47
ตาราง 10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบด้วยเมทานอลสามช่วงการเจริญเติบโต.....	47
ตาราง 11 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ limonene.....	48
ตาราง 12 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ocimene.....	48
ตาราง 13 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนของแสง 260 nm ต่อ 280 nm ของ RNA ที่สกัดได้จากใบสามช่วงการเจริญเติบโต.....	50
ตาราง 14 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ RNA.....	50
ตาราง 15 ระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับ housekeeping gene ในใบมะตูม.....	51
ตาราง 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมสามลักษณะ.....	52
ตาราง 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมสามลักษณะ.....	54
ตาราง 18 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่มีไลซีนแต่ละความเข้มข้น.....	56

ตาราง 19 ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูม	56
ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน quercetin (positive control)	65
ตาราง 21 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ยอด)	65
ตาราง 22 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ใบอ่อน)	65
ตาราง 23 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ใบโตเต็มที่)	66
ตาราง 24 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกาแล็กแทน (positive control)	66
ตาราง 25 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ยอด)	67
ตาราง 26 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ใบอ่อน)	67
ตาราง 27 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ใบโตเต็มที่)	67
ตาราง 28 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมน้ำ	68
ตาราง 29 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมไข่	68
ตาราง 30 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมบ้าน	68
ตาราง 31 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมน้ำ	69
ตาราง 32 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมไข่	69
ตาราง 33 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมบ้าน	69
ตาราง 34 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน	70

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด	5
ภาพประกอบ 2 แสดงผลมะตูมบ้าน (A) ผลมะตูมไข่ (B)	8
ภาพประกอบ 3 แสดงผลมะตูมน้ำแห้ง (A) ผลมะตูมไข่แห้ง (B) ผลมะตูมบ้านแห้ง (C)	8
ภาพประกอบ 4 แสดงสูตรโครงสร้าง limonene	10
ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างสารมาร์มีโลซิน	10
ภาพประกอบ 6 แสดงสูตรโครงสร้างสารเออีจีลิน	11
ภาพประกอบ 7 แสดงพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์	12
ภาพประกอบ 8 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH	15
ภาพประกอบ 9 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Marston	16
ภาพประกอบ 10 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ellman	16
ภาพประกอบ 11 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มต่างๆ	18
ภาพประกอบ 12 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีน	23
ภาพประกอบ 13 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน	23
ภาพประกอบ 14 แสดงส่วนประกอบของใบมะตูม	28
ภาพประกอบ 15 แสดงผลมะตูมไข่ (A) ผลมะตูมบ้าน (B)	29
ภาพประกอบ 16 แสดงผลมะตูมน้ำแห้ง (A) มะตูมไข่แห้ง (B) มะตูมบ้านแห้ง (C)	29
ภาพประกอบ 17 โครมาโตแกรมแสดงสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในสารสกัดใบ (A: UV 254 และ B: 366 ตามลำดับ)	42
ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมแสดงสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในสารสกัดใบ	42

ภาพประกอบ 19 โครมาโตแกรมแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะตูม	44
ภาพประกอบ 20 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดใบด้วยเฮกเซน...	46
ภาพประกอบ 21 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพของ RNA.....	49
ภาพประกอบ 22 ระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase และ housekeeping gene .	50
ภาพประกอบ 23 ระดับการแสดงออกของยีนในใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต	51
ภาพประกอบ 24 โครมาโตแกรมแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูม	52
ภาพประกอบ 25 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดผลมะตูม	53
ภาพประกอบ 26 โครมาโตแกรมของผลมะตูมทั้งสามลักษณะ	55
ภาพประกอบ 27 โครมาโตแกรมแสดงสารสกัดผลมะตูมนี้่ม มะตูมไข่และมะตูมบ้าน เมื่อสแกนด้วยความยาวคลื่น 310 nm.....	55
ภาพประกอบ 28 แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน	56
ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ของปริมาณมาร์มีโลซินและค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดผลมะตูม	57

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาความสำคัญของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบันประเทศไทยมีแนวโน้มมีผู้สูงอายุซึ่งมีความเสี่ยงจากการเป็นโรคอัลไซเมอร์เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปี พบว่าเป็นโรคอัลไซเมอร์อยู่ประมาณร้อยละ 11.1 ผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 80 ปี พบว่ามีความเสี่ยงของโรคเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 41.1 และจำนวนประชากรที่มากขึ้น มีช่วงชีวิตที่ยาวขึ้น ทำให้จำนวนผู้ป่วยสูงอายุที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มีแนวโน้มที่สูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2548 มีการสำรวจจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มีประมาณ 229,000 ราย และคาดการณ์ว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 450,000 รายในปี พ.ศ. 2568 (โครงการการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ, 2554) นอกจากนี้ในสหรัฐอเมริการายงานผู้ป่วยอัลไซเมอร์เพิ่มจำนวนสูงขึ้น ในปัจจุบันพบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 4 ล้านราย และในปี พ.ศ. 2568 จะมีผู้ป่วยถึง 10 ล้านราย รวมไปถึงมีการประมาณการค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นมูลค่าถึง 38,000 ดอลลาร์สหรัฐ ต่อผู้ป่วย 1 รายในการรักษา 1 ปี (Sloane et al., 2002)

ปัจจุบันมีแนวทางการรักษาโรคอัลไซเมอร์แบ่งออกเป็น การใช้ยาและไม่ใช้ยา ซึ่งเป็นการรักษาที่ควบคู่กันไป การรักษาด้วยยาเป็นการรักษาเพียงการชะลออาการสมองเสื่อม และพบว่าการรักษาด้วยยากาแลนตามีน (galantamine) เป็นทางเลือกที่คุ้มค่าจากการประเมินต้นทุนอรรถประโยชน์ของยาในกลุ่ม acetylcholine esterase inhibitors (โครงการการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ, 2556) อย่างไรก็ตาม ยาไม่ได้รักษาโรคให้หายขาด เนื่องจากมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเพียงอย่างเดียว แต่ด้วยพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น cholinergic hypothesis, oxidative stress, amyloid cascade hypothesis เป็นต้น (Guimarães, Serafini, & Quintans-Júnior, 2014; Kulshreshtha & Piplani, 2016; Awanish Kumar & Kumar, 2018; A. Kumar, Singh, & Ekavali, 2015; Mohamed, Shakeri, & Rao, 2016) รวมทั้งผลของยายังทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคอัลไซเมอร์โดยใช้สมุนไพรหลายชนิด เช่น เปะก๊วย บัวบก พรมมิ เป็นต้น ซึ่งมีความสามารถลดการทำลายสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนในสมอง (Akhondzadeh & Abbasi, 2006; Singhal, Bangar, & Naithani, 2012)

มะตูม (*Aegle marmelos*, Family Rutaceae) เป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ผู้วิจัยประเมินว่ามีศักยภาพในการชะลอการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ด้วยเหตุผลดังนี้

1. จากการศึกษาใน *Caenorhabditis elegans* พบว่าสารสกัดจากผลมะตูมสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนอะไมลอยด์ เบต้า และป้องกันการเกิด oxidative stress ได้ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ amyloid cascade hypothesis (วรพรรณ สิทธิถาวร, รุ่งเพชร แก้วเกษ, & อมรทัศน์ สดใส, 2559)

2. ใบมะตูมประกอบด้วยสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนหลายชนิด เช่น limonene ocimene pinene เป็นต้น มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดี คือ มีโมเลกุลขนาดเล็ก โมเลกุลมีความชอบไขมัน จึงคาดว่าจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของระบบประสาทได้ดี (Guimarães et al., 2014; Herman & Herman, 2015) โดยเข้าจับกับบริเวณ hydrophobic pocket ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Dos Santos, Gomes, Pinto, Camara, & Paes, 2018) อาจส่งผลต่อการเกิดความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

3. พบสารมีโลซินในผลมะตูม ซึ่งสารชนิดนี้มีอีกชื่อหนึ่งว่า imperatorin ช่วยป้องกันการสูญเสียความจำในหนูที่ถูกกระตุ้นโดย scopolamine เพื่อทำให้ความจำบกพร่องจากการลดปริมาณ acetylcholine ในสมอง และป้องกันการเกิด oxidative stress (Budzynska et al., 2015) สารชนิดนี้ยังสามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ดี ดังนั้นจึงสามารถออกฤทธิ์ในสมองได้ และมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Dhankhar, Ruhil, Balhara, Dhankhar, & Chhillar, 2011; Nirupama, Padmasri, Ramesh, & Vasanthi, 2012; Tun & Kang, 2017)

อะเซทิลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทในสมอง มีหน้าที่เกี่ยวกับความจำ ความคิด และพฤติกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินชีวิต การสร้างสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนที่ลดลง ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทได้ เช่น การเกิดโรคสมองเสื่อม หรือโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เกิดได้หลายกลไกร่วมกัน กล่าวคือ การสะสมของโปรตีนอะไมลอยด์ เบต้า จำนวนมากในบริเวณ synapse ของเซลล์ประสาทในสมอง ส่งผลทำให้เกิด oxidative stress และเกิดการทำลายเซลล์ประสาท ทำให้การผลิตสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนลดลง (Kulshreshtha & Piplani, 2016; Awanish Kumar & Kumar, 2018; A. Kumar et al., 2015; Mohamed et al., 2016) การยับยั้งการทำลายของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และยับยั้งการเกิด oxidative stress สามารถชะลอการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในใบและผลมะตูม ซึ่งการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ประเมินจากความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ

การประเมินฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ประเมินจากความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *limonene synthase* ซึ่งเป็นยีนหลักในการสังเคราะห์ cyclic monoterpenes ในใบมะตูมช่วงการเจริญเติบโตต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์เทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการผลิตสารสำคัญในมะตูม

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อนและใบโตเต็มที่) และสารสกัดจากผลมะตูม نیم ผลมะตูมไข่ และผลมะตูมบ้าน โดยวัดการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากดีพีพีเอส
2. เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดจากใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อนและใบโตเต็มที่) และสารสกัดจากผลมะตูม نیم ผลมะตูมไข่ และผลมะตูมบ้าน
3. เพื่อประเมินระดับการแสดงออกของยีน *limonene synthase (lim)* ในใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) โดยเทคนิค *semiquantitative polymerase chain reaction*
4. เพื่อศึกษาทางพิษเคมี (TLC, GC) และวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินด้วยเทคนิค *high performance thin layer chromatography*

3. สมมติฐานวิจัย

1. ชนิดสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์สัมพันธ์กับช่วงการเจริญเติบโตของใบมะตูมบ้าน
2. ช่วงการเจริญเติบโตของใบมะตูมบ้าน (ยอด ใบอ่อน ใบโตเต็มที่) สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส
3. ช่วงการเจริญเติบโตของใบมะตูมบ้านสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *limonene synthase*
4. ลักษณะของผลมะตูม (มะตูม نیم มะตูมไข่ มะตูมบ้าน) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสแตกต่างกัน
5. ปริมาณสารมาร์มีโลซินมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยและผู้สนใจ โดยผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีน *lim* ในใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในสารสกัดจากผลมะตูม 3 ลักษณะ (มะตูมน้ำ มะตูมไข่ และมะตูมบ้าน) และใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต นำไปสู่การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสต่อไป

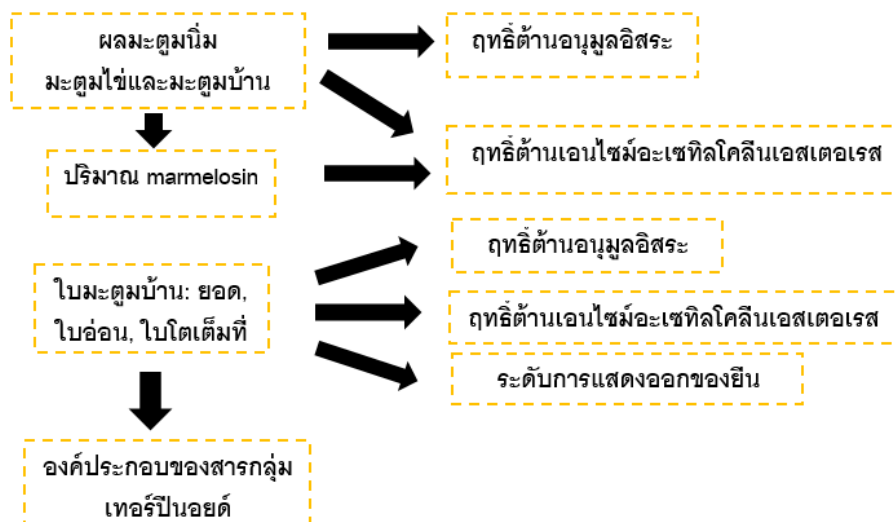
5. ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองที่มุ่งเน้นการศึกษาดังนี้

1. การประเมินเบื้องต้นในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (limonene ocimene pinene) และสารสกัดจากใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) โดยเทคนิค high performance thin layer chromatography
2. การประเมินเบื้องต้นในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารมาร์มีโลซิน (marmelosin) สารเอจี้ลีน (aegeline) และสารสกัดจากผลมะตูม 3 ลักษณะ (ผลมะตูมน้ำ ผลมะตูมไข่ และผลมะตูมบ้าน) โดยเทคนิค high performance thin layer chromatography
3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อนและใบโตเต็มที่) และสารสกัดจากผลมะตูมน้ำ ผลมะตูมไข่ และผลมะตูมบ้าน โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)
4. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารลิโมนีน สารสกัดจากใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อนและใบโตเต็มที่) สารมาร์มีโลซิน สารสกัดจากผลมะตูมน้ำ ผลมะตูมไข่ และผลมะตูมบ้าน โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)
5. ระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase (*lim*) ในใบมะตูมบ้าน 3 ช่วงการเจริญเติบโต (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) โดยเทคนิค semiquantitative polymerase chain reaction
6. วิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในผลมะตูมทั้งสามลักษณะ โดยเทคนิค high performance thin layer chromatography

7. วิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในใบมะตูมบ้านโดยใช้ Gas chromatography โดยการจ้างวิเคราะห์

6. กรอบแนวคิด



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด

7. นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ยอด หมายถึง ใบที่มีสีน้ำตาลแดง อยู่บริเวณลำดับที่ 1-3 จากยอดใบ
2. ใบอ่อน หมายถึง ใบที่มีสีเขียวปานกลาง อยู่บริเวณลำดับที่ 4-6 จากยอดใบ
3. ใบโตเต็มที่ หมายถึง ใบที่มีสีเขียวเข้ม อยู่บริเวณลำดับที่ 7-8 จากยอดใบ
4. มะตูมไข่ หมายถึง ผลมะตูมที่มีลักษณะผลรูปไข่ที่ค่อนข้างรียาว เปลือกผลนิ่ม
5. มะตูมบ้าน หมายถึง ผลมะตูมที่มีลักษณะผลรูปไข่ กลมกว่ามะตูมบ้าน มีขนาดเล็ก เปลือกผลบาง
6. มะตูมบ้าน หมายถึง ผลมะตูมที่มีลักษณะผลรูปไข่ที่ค่อนข้างรียาว เปลือกผลแข็ง

8. นิยามเชิงปฏิบัติการ

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง ผลการคำนวณจากสมการ

%Inhibition = (Absorbance of control – Absorbance of sample) x 100/Absorbance of control

IC₅₀ = (50-c)/m โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง y = mx+c (m=ความชัน c=จุดตัดแกน y)

2. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส หมายถึง ผลการคำนวณจากสมการ

%Inhibition = (Absorbance of control – Absorbance of sample) x 100 /Absorbance of control

$IC_{50} = (50-c)/m$ โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง $y = mx+c$ (m =ความชัน c =จุดตัดแกน y)



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษางานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอหัวข้อการทบทวนวรรณกรรม ดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไปของมะตูม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในมะตูม

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2. การเกิดโรคอัลไซเมอร์

3. การต้านอนุมูลอิสระ

4. การต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

5. หลักการวิเคราะห์ด้วย GC

6. หลักการวิเคราะห์ด้วย HPTLC

7. กระบวนการชีวสังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยในพืช

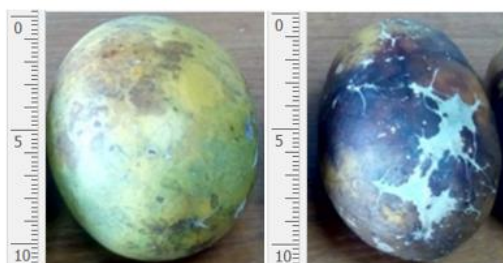
8. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วย semiquantitative polymerase chain reaction

1. ลักษณะทั่วไปของมะตูม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะตูม (*Aegle marmelos*, วงศ์ Rutaceae) เป็นไม้พุ่มเมืองที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย พบได้ในประเทศต่างๆ เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย มะตูมเป็นพืชที่เป็นแหล่งอาหารและ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ในส่วนของใบและผลเป็นหลัก ลำต้นสูงประมาณ 18 เมตร เปลือกลำต้นสีเทาเรียบมีร่องตื้น เนื้อไม้แข็ง มีสีขาวแกมเหลือง ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปไข่ ผลมีเปลือกแข็งเรียบ มีเมล็ดจำนวนมาก (Pati & Muthukumar, 2013) มะตูมที่พบในประเทศไทย มี 3 ลักษณะ คือ มะตูมนิม (ภาพประกอบ 3) มีลักษณะคล้ายมะตูมบ้าน แต่เปลือกผลค่อนข้างนิ่ม มะตูมนิมไม่ได้ใช้เป็นอาหาร แต่ใช้ในยาแผนไทยหลายตำรับ และเป็นองค์ประกอบสำคัญในตำรับยาอายุวัฒนะ มะตูมอีกลักษณะหนึ่ง เรียกว่ามะตูมไข่ มีผลรูปไข่ (ภาพประกอบ 2-3) แต่กลมกว่ามะตูมบ้าน มีขนาดเล็ก เปลือกผลบาง และลักษณะสุดท้าย คือ มะตูมทั่วไปหรือมะตูมบ้าน (ภาพประกอบ 2-3) มีผลรูปไข่ที่ค่อนข้างรียาว มีเปลือกแข็งมาก มะตูมลักษณะนี้ทำได้

ง่าย และผลอ่อนนำมาใช้เป็นอาหาร เช่น ทำน้ำมะตูม มะตูมเชื่อม (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2546)



A

B

ภาพประกอบ 2 แสดงผลมะตูมบ้าน (A) ผลมะตูมไข่ (B)



A

B

C

ภาพประกอบ 3 แสดงผลมะตูม نیمแห้ง (A) ผลมะตูมไข่แห้ง (B) ผลมะตูมบ้านแห้ง (C)

องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในมะตูม

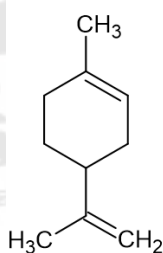
มีหลายการศึกษาที่พบสารสำคัญมีอยู่ในส่วนของผล ใบ เปลือก ราก และดอกของมะตูม เป็นสารจำพวก alkaloids coumarins terpenoids เป็นต้น (ตาราง 1) (Choudhary, Saxena, Kumar, Kumar, & Pratap, 2017; Verma, Padalia, & Chauhan, 2014) องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มโมโนเทอร์ปีน ซึ่งพบมากในใบ เช่น limonene พบร้อยละ 31-90.3 β -ocimene พบร้อยละ 0.7-7.9 α -pinene พบน้อยกว่าร้อยละ 0.05 ถึงร้อยละ 7.5 เป็นต้น (Verma et al., 2014) เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โมเลกุลมีความชอบไขมัน (lipophilic) มีความเป็นพิษต่ำ มีสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดี (Wojtunik-Kulesza et al., 2017)

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในใบและผลมะตูม

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	ส่วนของพืชที่พบ
แอลคาลอยด์	aegeline	ใบและผล
	marmelide	ใบและผล
	dictamine	ผล
คูมาริน	marmelosin	ผล
	marmasin	ผล
	psoralin	ผล
เทอร์ปีนอยด์	limonene	ใบ
	ocimene	ใบ
	pinene	ใบ
	β -phellandrene	ใบ
	β -ocimene	ใบ
	germacrene B	ใบ
	β -elemene	ใบ
	caryophyllene	ใบ
	γ -elemene	ใบ
	α -humulene	ใบ
	germacrene D	ใบ
	β -farnesene	ใบ
	allo-aromadenedrene	ใบ
	γ -cuprenene	ใบ
	carvone	ใบ
	α -muuolene	ใบ
	α -terpieol	ใบ
	p-cymene	ใบ

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Choudhary et al., 2017; Manandhar, Paudel, Sharma, & Karki, 2018; Mohamed et al., 2016; Verma et al., 2014)

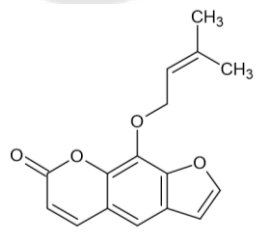
Limonene (ภาพประกอบ 4) มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 136.23 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ เป็นของเหลว ไม่มีสี มีกลิ่นเลมอน ระเหยง่าย ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในแอลกอฮอล์ มีจุดวาบไฟ (flash point) เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส จุดเดือดเท่ากับ 176 องศาเซลเซียส (National Center for Biotechnology Information, 2004)



ภาพประกอบ 4 แสดงสูตรโครงสร้าง limonene

ที่มา: (National Center for Biotechnology Information, 2004)

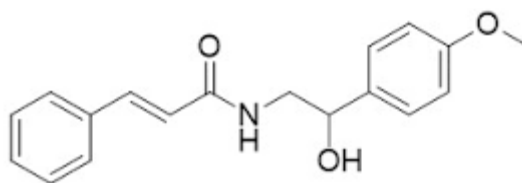
Marmelosin (ภาพประกอบ 5) หรือ imperatorin มีสูตรโมเลกุล $C_{16}H_{14}O_4$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 270.28 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ เป็นของแข็ง ละลายน้ำได้น้อย ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 102 องศาเซลเซียส (National Center for Biotechnology Information, 2005)



ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างสารมาร์มีโลซิน

ที่มา: (National Center for Biotechnology Information, 2005)

Aegeline (ภาพประกอบ 6) มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{19}NO_3$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 297.3 g/mol มีสมบัติทางเคมีกายภาพ เป็นของแข็ง (National Center for Biotechnology Information, 2007)



ภาพประกอบ 6 แสดงสูตรโครงสร้างสารเอจี้ลีน

ที่มา: (National Center for Biotechnology Information, 2007)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

มีหลายการศึกษาพบว่า มะตูมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น เพิ่มระดับอินซูลิน ลดระดับไขมัน ด้านอนุมูลอิสระ ด้านจุลชีพ ด้านภาวะสมองเสื่อม (ตาราง 2) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำผลมะตูมใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ทำเป็นน้ำมะตูม พุดdingมะตูม และยังสามารถใช้รักษาภาวะท้องเสียเรื้อรัง โรคบิด และโรคกระเพาะอาหาร ส่วนใบมะตูมยังช่วยรักษาแท้งคุกคามในผู้หญิง (Choudhary et al., 2017; Manandhar et al., 2018; Pati & Muthukumar, 2013)

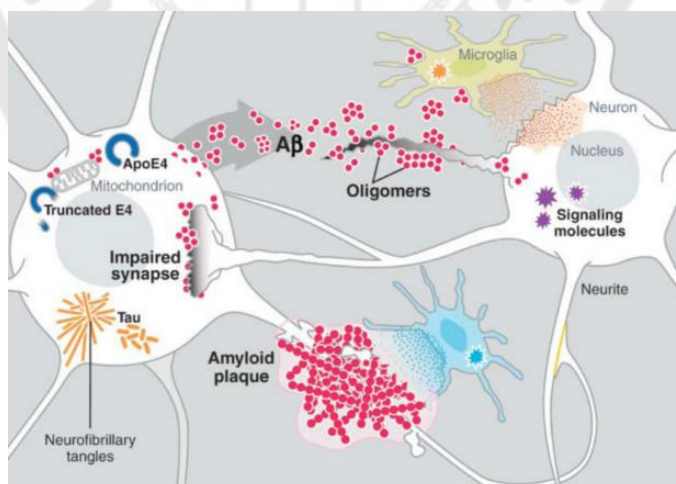
ตาราง 2 แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะตูม

ส่วนของมะตูม	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
ลำต้นและเปลือก	เพิ่มระดับอินซูลิน
เมล็ด	ด้านเบาหวานและลดระดับไขมัน
ใบ	ด้านอนุมูลอิสระ ด้านจุลชีพ ด้านภาวะสมองเสื่อม ด้านภาวะซึมเศร้า ด้านภาวะวิตกกังวล ด้านการอักเสบ
ผล	ด้านแบคทีเรีย ด้านปรสิต ด้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Choudhary et al., 2017; Manandhar et al., 2018; Pati & Muthukumar, 2013)

2. การเกิดโรคอัลไซเมอร์

การเกิดอัลไซเมอร์ เกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ oxidative stress, neuronal death, synaptic loss, TAU protein และ amyloid beta (Kulshreshtha & Piplani, 2016; Awanish Kumar & Kumar, 2018; A. Kumar et al., 2015; Mohamed et al., 2016) พยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เริ่มต้นจากเซลล์ประสาท ผลิต amyloid beta สะสมจำนวนมากที่บริเวณ synapse หรือระบบการกำจัด amyloid beta บกพร่อง เมื่อ amyloid beta เกิดการสะสมจำนวนมาก เป็นผลทำให้เกิด oxidative stress เกิดการอักเสบของเซลล์ประสาท ทำให้เซลล์ประสาททำงานผิดปกติหรือถูกทำลาย ส่งผลทำให้มีการสร้างสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนลดลง ทำให้การทำงานของระบบประสาทในส่วนความจำ ความคิด และพฤติกรรมบกพร่อง นำไปสู่การเกิดโรคอัลไซเมอร์ ดังภาพประกอบ 7 (Roberson & Mucke, 2006) ซึ่งการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน จะใช้ยาเพื่อช่วยชะลอการดำเนินของโรค โดยยาหลักที่ใช้คือ ยาในกลุ่ม centrally acting cholinesterase inhibitors (ChEIs) เพื่อเพิ่มระดับ acetylcholine ในสมอง ร่วมกับการดูแลให้ผู้ป่วยได้รับสารอาหารครบถ้วน เพื่อป้องกันโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ ด้วย นอกจากนี้มีการนำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสมอง ป้องกันการเสื่อมของระบบการเรียนรู้ เช่น แปะก๊วย บัวบก พรมมิ ผ่านกลไกลดการทำลายสารสื่อประสาทในสมอง (Akhondzadeh & Abbasi, 2006; Singhal, Bangar, & Naithani, 2012)



ภาพประกอบ 7 แสดงพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคอัลไซเมอร์

ที่มา: (Roberson & Mucke, 2006)

3. การต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว อย่างน้อย 1 ตัวที่โคจรรอบนอกสุด ทำให้มีความเสถียรต่ำและไวต่อปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยากับโมเลกุลใกล้เคียง ทำให้เกิดการเสียอิเล็กตรอนและเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ในร่างกายจะมีการขนถ่ายอิเล็กตรอนเพื่อเผาผลาญสารอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะจับออกซิเจนรอบๆ เกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (Nimse & Pal, 2015) เช่น กลุ่มอนุมูลอิสระ Reactive oxygen species (ROS) Reactive nitrogen species (RNS) เป็นต้น

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลของสารอื่นที่อยู่รอบๆ ของสารนั้นโดยที่โมเลกุลใกล้เคียง จะเกิดการเสียอิเล็กตรอนและเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Nimse & Pal, 2015) ซึ่งการเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากในร่างกายมีผลทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กลไกการเกิดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 กลไกหลักๆ ได้แก่ hydrogen atom transfer (HAT) และ electron transfer (ET) ซึ่งแต่ละวิธีการทดสอบฤทธิ์ มีข้อดี ข้อจำกัด แตกต่างกัน ดังตาราง 3 (A.V.Badarinath et al., 2010; Shalaby, 2013)

1. กลไก HAT คือ การส่งผ่านโปรตอนให้กับสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระจะดึงโปรตอนของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สารอนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น และเกิดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีที่ผ่านกลไก HAT นี้ ส่วนใหญ่ใช้วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดหรือพลาสมา ทำให้เกิดการเรืองแสง fluorescence ของสารทดสอบ เช่น วิธี oxygen radical antioxidant capacity (ORAC), total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) เป็นต้น

2. กลไก ET คือ การส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับสารอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยกลไกนี้เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบ ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนแปลง เช่น วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging เป็นต้น

ตาราง 3 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา ข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการทดสอบ	กลไกการเกิดปฏิกิริยา	ข้อดี	ข้อจำกัด
ORAC	HAT	วัดสารต้านอนุมูลอิสระในเลือด	ใช้ fluorometer
TRAP	HAT	วัดสารต้านอนุมูลอิสระในเลือด	ซับซ้อน ใช้เวลานาน
FRAB	ET	เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาสั้น	ไม่สามารถวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลุ่ม SH
DPPH	ET	เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ง่าย ใช้เวลาสั้น ในการศึกษาสารสกัดจากพืช สามารถหา potency ได้ และไม่จำเป็นต้องแยกสารก่อนทำการทดสอบ	ไม่สามารถวัดสารต้านอนุมูลอิสระในเลือดได้

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Shalaby, 2013)

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay

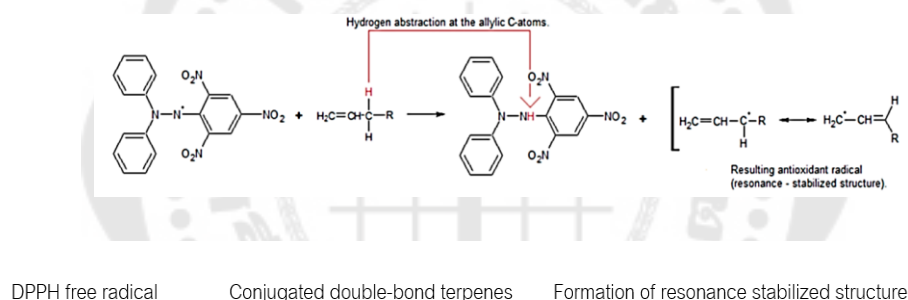
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระของไนโตรเจน ซึ่งมีความคงตัวมาก สามารถละลายได้ในเมทานอล หรือเอทานอล ให้เป็นสารละลายสีม่วง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการที่ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงจางลง หรือเกิดเป็นสารละลายสีเหลือง สามารถวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบโดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเทคนิค UV spectrophotometry (Shalaby, 2013)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay ของสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนและการศึกษาในมะตูม

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการสกัดใบมะตูมด้วยทำละลายที่แตกต่างกัน ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวทำละลายอื่นๆ โดยสารสกัดด้วย ethyl acetate มีค่า $IC_{50} = 3.84 \mu\text{g/ml}$ ตามด้วย สารสกัดด้วยน้ำ มีค่า $IC_{50} = 7.17 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดด้วยเมทานอล มีค่า

$IC_{50} = 15.73 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีค่า $IC_{50} = 15.93 \mu\text{g/ml}$ และสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ มีค่า $IC_{50} = 58.9 \mu\text{g/ml}$ (Asaduzzaman et al., 2014)

นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร limonene เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox พบว่า ค่า % inhibition ของ สารมาตรฐาน trolox ประมาณ 45% และ ค่า % inhibition ของสาร limonene ประมาณ 20% ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ (Shah & Mehta, 2018) และโครงสร้างของโมโนเทอร์ปีนที่แตกต่างกัน มีผลทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่าโครงสร้างโมโนเทอร์ปีนที่มีพันธะเดี่ยวยวสลับพันธะคู่ (conjugated double bond) ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Wojtunik, Ciesla, & Waksmundzka-Hajnos, 2014) และกลไกการต้านอนุมูลอิสระของโมโนเทอร์ปีน พบว่าโมโนเทอร์ปีนให้อิเล็กตรอนแก่ DPPH ส่งผลให้ DPPH เสถียรและหยุดปลดปล่อยอนุมูลอิสระ ส่วนโมโนเทอร์ปีนจะเกิดการเรโซแนนซ์เพื่อให้โมเลกุลเสถียร ดังภาพประกอบ 8 (Wojtunik et al., 2014)



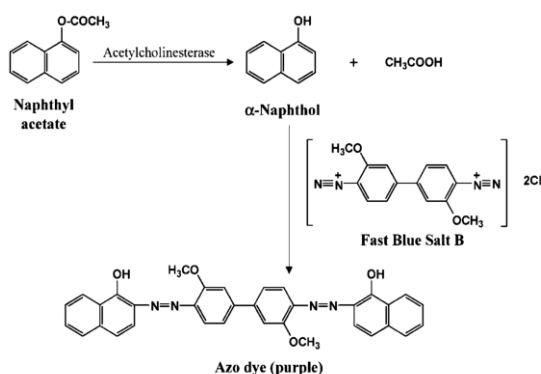
ภาพประกอบ 8 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ที่มา: (Wojtunik et al., 2014)

4. การต้านอนุมูลอิสระของเซทิลโคลิโนเอสเตอเรส

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซทิลโคลิโนเอสเตอเรสโดยวิธี Marston

ปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซทิลโคลิโนเอสเตอเรส เริ่มต้นจาก naphthyl acetate ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเซทิลโคลิโนเอสเตอเรส ได้ผลิตภัณฑ์คือ α -naphthol จากนั้นใช้สารละลาย fast blue salt B เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน azo dye ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วง (ภาพประกอบ 9) (Marston, Kissling, & Hostettmann, 2002) ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซทิลโคลิโนเอสเตอเรสจะเกิดการเปลี่ยนเป็นสารสีขาวบนแผ่น TLC ที่ให้สีม่วง

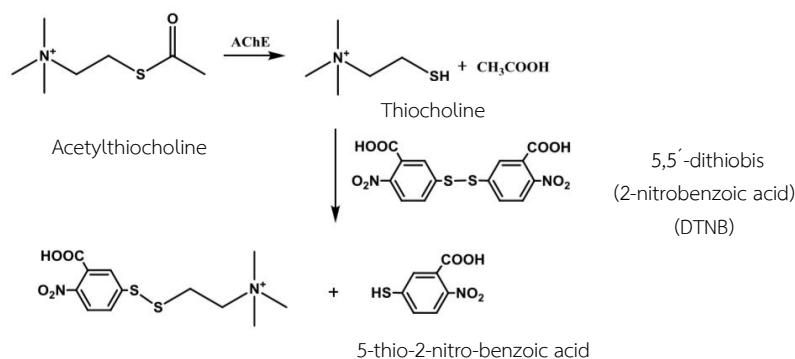


ภาพประกอบ 9 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี Marston

ที่มา: (Marston et al., 2002)

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธีของ Ellman

ปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เริ่มต้นจาก acetylthiocholine ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ได้ผลิตภัณฑ์คือ thiocholine จากนั้นใช้สารละลาย 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DNTB) เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดสาร 5-thio-2 nitro-benzoic acid ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง (ภาพประกอบ 10) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน thio-2-nitro-benzoic acid ลดลง ทำให้สารละลายสีเหลืองจางลง (Ali-shtayeh, Jamous, Abuzaitoun, & Qasem, 2014)



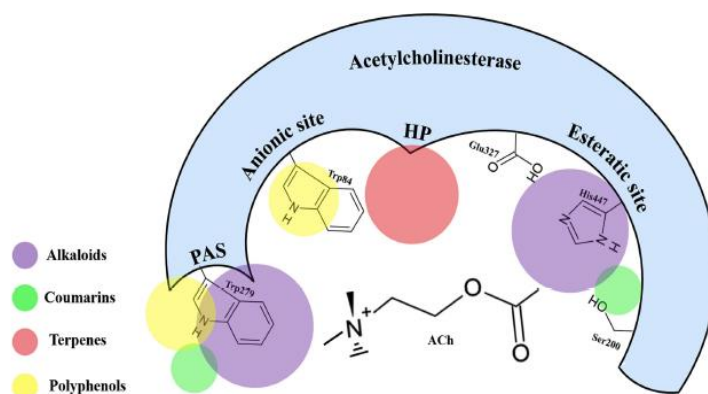
ภาพประกอบ 10 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี Ellman

ที่มา: (Ali-shtayeh et al., 2014)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในมะตูมและสารสำคัญที่พบในมะตูม

มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในใบมะตูมด้วยตัวทำละลายต่างๆ มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-200 µg/ml โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสตั้งแต่ 23.68 – 47.58 % ซึ่งมากกว่าสารสกัดอื่นๆ เช่น สารสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ตั้งแต่ 17.71 – 40.13 % สารสกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ตั้งแต่ 16.20 – 35.78 % สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ตั้งแต่ 13.48 – 29.87 % และสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ มีฤทธิ์ตั้งแต่ 8.75 – 20.37 % อย่างไรก็ตามยังมีฤทธิ์น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ donepezil ซึ่งเป็นสารมาตรฐานควบคุมผลบวก (positive control) มีฤทธิ์ตั้งแต่ 92.76 – 98.58 %

เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส มีตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) 2 ส่วน คือ esteratic site และ anionic site อะเซทิลโคลีนจะจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์โดย quaternary amine จะจับที่ anionic site และ หมู่ carbonyl จะจับที่กรดอะมิโน serine ที่ esteratic site มีรายงานว่าสารพฤษเคมีที่พบในพืช ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยจับที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ ดังนี้ แอลคาลอยด์จับที่ esteratic site และ ส่วนปลายของ anionic site (peripheral anionic site , PAS) เนื่องจากแอลคาลอยด์ เช่น กาลันตามีนสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับทั้งสองส่วนจึงจัดว่าเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ของเอนไซม์ซึ่งจะแย่งสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ ในขณะที่สารประกอบโพลีฟีนอลจับที่ anionic site และคูมารินจับที่กรดอะมิโน serine ที่ esteratic site และที่ PAS ซึ่งการจับกับเอนไซม์ไม่จำเพาะเท่าแอลคาลอยด์ จึงไม่จัดว่าเป็น competitive inhibitor ส่วนเทอร์ปีนจับที่ hydrophobic pocket (HP) ซึ่งไม่ใช่ active site ของเอนไซม์ แต่สามารถรบกวนการทำงานในส่วน anionic site ของเอนไซม์ (Dos Santos et al., 2018) ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงกลไกการต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารกลุ่มต่างๆ

ที่มา: (Dos Santos et al., 2018)

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า limonene และโมโนเทอร์ปีนอื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Aazza, Lyoussi, & Miguel, 2011) แตกต่างกัน โดยที่ limonene มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสน้อยกว่าสารมาตรฐานน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ และสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ บางชนิด เช่น *T. vulgaris*, *C. semperirens* เป็นต้น (ตาราง 4) และตาราง 5 แสดงให้เห็นว่า ocimene มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มากกว่าสารมาตรฐานน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ เช่น α -pinene, α -phellandrene, menthone เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานกาแลนตามีน ซึ่งเป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) (Wojtunik-Kulesza et al., 2017)

ตาราง 4 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของ limonene

พืชหรือสารมาตรฐาน	AChE Inhibitory activity IC ₅₀ (mg/ml)
<i>T. vulgaris</i>	0.2169±0.0115
<i>C. semperirens</i>	0.2837±0.0115
limonene	0.5863±0.0115
thymol	0.2124±0.0115
carvacrol	0.0917±0.0115

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Aazza et al., 2011)

ตาราง 5 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของโมโนเทอร์ปีน

Compounds	AChE Inhibitory activity (%) $\pm$ SD 3.5 mM
galantamine (0.1 mM)	46.62 $\pm$ 1.91
α -pinene	11.30 $\pm$ 0.48
α -phellandrene	8.04 $\pm$ 0.27
menthone	43.49 $\pm$ 1.76
ocimene	62.50 $\pm$ 2.66

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Wojtunik-Kulesza et al., 2017)

นอกจากนี้มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารมามีโลซิน ซึ่งเป็น coumarin ที่พบมากในมะตูม โดยผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส พบว่ามีค่า % inhibition ที่ความเข้มข้น 50 μ M เท่ากับ 10.2 $\pm$ 1.8 โดยมีสารมาตรฐาน galantamine hydrobromide เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.5 $\pm$ 0.5 และ % inhibition ที่ความเข้มข้น 50 μ M เท่ากับ 95.4 $\pm$ 0.2 (Granica et al., 2013) นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในพืชอื่นๆ เช่น *Satureja thymbra* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Lamiaceae โดยศึกษาส่วนของใบที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.1 $\pm$ 0.45 μ g/ml และฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส IC₅₀ เท่ากับ 928 $\pm$ 3.4 μ g/ml (Öztürk, 2012) *Cordia gillettii* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Boraginaceae โดยนำใบมากลั่นด้วยไอน้ำจนได้น้ำมันหอมระเหย 23 ชนิด เช่น phytol (20.4%), palmitic acid (15.2%), (E)-2-hexenal (9.6%), nonaocsane (9.2%) เป็นต้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 75 $\pm$ 0.8 μ g/ml และฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส IC₅₀ เท่ากับ 105.6 $\pm$ 2.8 μ g/ml (Bonesi et al., 2011) *Toona ciliate* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Meliaceae โดยศึกษาส่วนของใบและเปลือกที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.7 $\pm$ 0.35 μ g/ml (ใบ) IC₅₀ เท่ากับ 16.87 $\pm$ 0.19 μ g/ml (เปลือก) และฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส IC₅₀ เท่ากับ 77.49 $\pm$ 2.70 μ g/ml (ใบ) IC₅₀ เท่ากับ 41.80 $\pm$ 2.98 μ g/ml (เปลือก) (Samaradivakara, Samarasekera, Handunnetti, & Weerasena, 2016)

5. หลักการวิเคราะห์ด้วย GC

การวิเคราะห์ปริมาณสาร เริ่มต้นจากก๊าซ ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่และสารถูกฉีดเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งทำให้อยู่ในสภาพเป็นไอ สารจะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์โดยก๊าซเฉื่อยซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ เช่น ไนโตรเจน ฮีเลียม เป็นต้น โดยอัตราเร็วการเคลื่อนที่ของสาร ขึ้นอยู่กับการละลายในเฟสอยู่กับที่ หรือสัมประสิทธิ์การกระจายของสาร เทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ใช้การเปรียบเทียบค่า retention time ของสารที่สนใจกับสารมาตรฐานที่ทราบค่า retention time ในสภาวะการทดสอบเดียวกัน ทำให้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้ ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารทดสอบ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยวัดจากวัดค่า ความสูงของพีค หรือวัดพื้นที่ทั้งหมดของพีค เช่น สร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นต่างๆ ที่แน่นอนของสารมาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้พีคสารทดสอบ มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารจากกราฟมาตรฐาน ประโยชน์การใช้ FID detector คือใช้วิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ทุกชนิดที่เกิดการแตกตัว (ionization) (Eiceman, Hill, & Davani, 1994)

6. หลักการวิเคราะห์ด้วย HPTLC

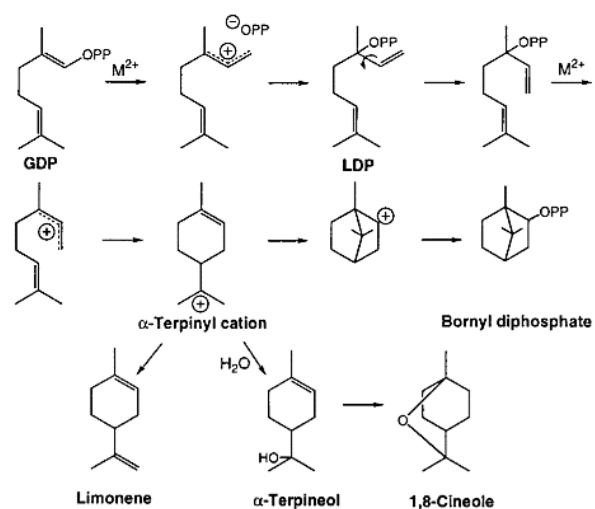
การวิเคราะห์สารโดยใช้ HPTLC เป็นเทคนิคที่พัฒนาเครื่องมือจาก TLC โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารบนชั้นของตัวดูดซับซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็ก 3-5 μm ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารดีขึ้น และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น มีความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำ (reproducibility) การประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยการเปรียบเทียบค่า retention factor ของสารทดสอบกับสารมาตรฐานที่ทราบค่า retention factor ในสภาวะการทดสอบเดียวกัน ทำให้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทดสอบได้โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารทดสอบ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยวัดจากวัดพื้นที่ใต้พีคแต่ละบริเวณซึ่งจะเป็นสัดส่วนความเข้มข้นและปริมาณสารที่มีในบริเวณนั้น (Jain, Parashar, Nema, & Narsinghani, 2014)

7. กระบวนการชีวสังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยในพืช

กระบวนการชีวสังเคราะห์โมโนเทอร์ปีนเกิดจากการรวมกันระหว่าง isopentenyl diphosphate (IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์คือ geranyl diphosphate ซึ่งเป็น จุดเริ่มต้นของสารประกอบโมโนเทอร์ปีนหลายชนิด การเกิดโมโนเทอร์ปีนมีโครงสร้างเป็นวง (cyclic monoterpene) เกิดจากการทำงานของ monoterpene synthase

ควบคุมให้เกิดโครงสร้างที่เป็นวงผ่าน terpinyl cation เอนไซม์ monoterpene synthase โดยเฉพาะ limonene synthase (EC4.2.3.16) เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างสาร limonene ซึ่งเป็นสารที่จะเปลี่ยนเป็น cyclic monoterpene อีกหลายชนิด เช่น isopiperitenol, carveol, carvone (Bohlmann, Meyer-Gauen, & Croteau, 1998) (ภาพประกอบ 12) รายงานการศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์โมโนเทอร์ปีนในใบมะตูมด้วยวิธี RNA sequencing พบว่ามี RNA ที่แสดงออกในใบมะตูมโดยแสดงเป็นรหัสของเอนไซม์ที่แสดงด้วยสีฟ้า ส่วน RNA ที่ไม่พบว่าแสดงออกในใบมะตูมจะแสดงโดยไม่มีสี (Kaushik & Kumar, 2018) ยังไม่มีการศึกษากระบวนการชีวสังเคราะห์เซสควิเทอร์ปีน (sesquiterpene) ในมะตูม กระบวนการสังเคราะห์เซสควิเทอร์ปีนในพืชเกิดจากการเติม IPP เข้าไปใน geranyl diphosphate ได้เป็น farnesyl diphosphate ซึ่งสามารถเกิดสารที่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น germacrene C และ alpha humulene เป็นต้น (ภาพประกอบ 13) (Bohlmann et al., 1998)

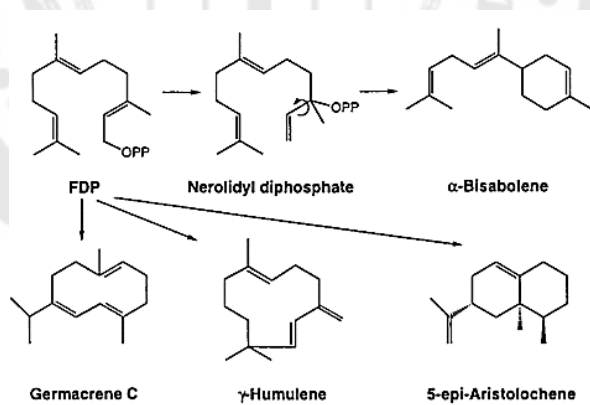




ภาพประกอบ 12 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีน

(GDP= geranyl diphosphate, LDP= linalyl diphosphate)

ที่มา:(Bohlmann et al., 1998)



ภาพประกอบ 13 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน

(FDP= farnesyl diphosphate)

ที่มา: (Bohlmann et al., 1998)

8. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วย PCR

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน เริ่มต้นด้วยการสกัด mRNA จากพืช โดยหลักการทำให้เซลล์แตก ซึ่งจะทำให้มี mRNA และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น DNA โปรตีน จากนั้นแยกเอาเฉพาะ mRNA ออก โดยการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณ mRNA สังเคราะห์ cDNA โดยการเปลี่ยนจาก mRNA เป็นโมเลกุล DNA สายคู่ จากนั้นเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยส่วนประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์ DNA ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ องค์ประกอบดังกล่าวจะผสมกันในหลอดทดลอง โดยอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องจำนวน 15-25 รอบ อย่างไรก็ตามจำนวนรอบที่เหมาะสมสามารถคำนวณจากในช่วง log phase ของ PCR (Arya et al., 2005) และแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ขั้นตอน denaturation ซึ่งทำให้ DNA สายคู่ แยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน annealing โดยลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับ DNA ต้นแบบตรงตำแหน่งเบสคู่สม
3. ขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนเพิ่มความยาวของสาย DNA จากการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพรเมอร์โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส โดยใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส

การแสดงออกเอนไซม์ limonene synthase มีผลต่อการสร้างโมโนเทอร์ปีนและการสร้างน้ำมันหอมระเหยส่วนต่างๆของพืชแตกต่างกัน หากเอนไซม์มีการแสดงออกมาก ทำให้มีผลต่อการสร้างลิโมนีนและน้ำมันหอมระเหยมากขึ้น ในทางตรงกันข้าม หากมีการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ ทำให้การสร้างน้ำมันหอมระเหยลดลง รวมไปถึงการสร้างลิโมนีนลดลงด้วย (Tsuro & Asada, 2013) นอกจากนี้มีการศึกษาช่วงการเจริญเติบโตของพืชที่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ limonene synthase โดยพบว่า ในพืช *Satsuma mandarin* มีการแสดงออกของเอนไซม์ในช่วงแรกของเจริญเติบโตของพืชในส่วนของเปลือกผล (Shimada, Endo, Fujii, & Omura, 2005)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

การวิจัยแบบเชิงทดลอง โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของใบมะตูมสามช่วงการเจริญเติบโต (ยอด, ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) และผลมะตูมสามลักษณะ (มะตูมน้ำ, มะตูมไข่ และมะตูมบ้าน) ทำการประเมินฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)-direct bioautography กล่าวคือทำการวิเคราะห์บนแผ่น high performance thin layer chromatography (HPTLC) โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้อนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสใช้เอนไซม์จาก electric eel และศึกษาตามวิธีของ Marston สำหรับการศึกษาเพื่อประเมินค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ใช้วิธี UV spectrophotometry (microplate reader) โดยประเมินค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจาก DPPH ได้ร้อยละ 50 และประเมินค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านฤทธิ์เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจาก electric eel ได้ร้อยละ 50 ตามวิธีของ Ellman และศึกษาระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ในใบมะตูมด้วยวิธี semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในผลมะตูมโดยวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน โดยใช้ HPTLC ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบในใบมะตูมด้วย gas chromatography ใช้วิธีส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยรังสิต

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส การวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซิน และการวิเคราะห์องค์ประกอบในใบ

วัสดุและอุปกรณ์

Analytical Balance (Sartorius CPA225D, Germany)

Eppendorf tube (Eppendorf, Germany)

Freezer (Intercool, Thailand)

Glassware class A

Gas Chromatography with FID (Perkin Elmer, USA)

Gas Chromatography with MS (Agilent Technologies, USA)

HPTLC with densitometer (CAMAG, Switzerland)

HPTLC Silica gel 60G F254 (Merck, Germany)

Micropipette (Mettler Toledo, USA)

Microplate reader (BioTek, USA)

Refrigerator (Panasonic, Japan)

Spray dry (Buchi mini spray dryer B-290, Germany)

UV/Vis Biophotometer (Eppendorf Biophotometer Plus, England)

สารมาตรฐานและสารเคมีอื่น ๆ

(+)- α -Pinene (Sigma-Aldrich, USA)

(R)-(+)-Limonene (Sigma-Aldrich, USA)

1-Naphthyl acetate (Sigma-Aldrich, USA)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Merck, Germany)

5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich, USA)

Acetylthiocholine iodide (ATCI) (Sigma-Aldrich, USA)

AChE (type VI-S) from the electric gel *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich, USA)

Aegelin (Shanghai Huirui Chemical Technology, China)

Anisaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)

Bovine Serum Albumin lyophilized powder (Sigma-Aldrich, USA)

Chloroform AR grade (CARLO ERBA, France)

Disodium hydrogen phosphate (CARLO ERBA, France)

Ethanol AR grade (CARLO ERBA, France)

Fast Blue B Salt Dye content (Sigma-Aldrich, USA)

Galantamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, USA)

Glacial acetic acid AR grade (CARLO ERBA, France)

Hexane AR grade (CARLO ERBA, France)

Marmelosin (AKTIN, China)

Methanol AR grade (CARLO ERBA, France)

Ocimene mixture of isomers (Sigma-Aldrich, USA)

Quercetin (Sigma-Aldrich, USA)

Sodium dihydrogen phosphate (CARLO ERBA, France)

Sulfuric acid (CARLO ERBA, France)

Toluene AR grade (CARLO ERBA, France)

2.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

วัสดุและอุปกรณ์

Agarose gel electrophoresis apparatus (MUPID-exU, Japan)

Autoclave (Tomy SX300, Japan)

Biophotometer plus (Eppendorf, Germany)

ImageQuant™ LAS 4000 (GE Health care, Sweden)

Microcentrifuge tube (Eppendorf, Germany)

Micropipette (Socorex, Switzerland)

Mortar and pestle

PCR thermal cycler (Biometra, England)

Refrigerated centrifuge (Hettich universal 32R refrigeration centrifuge model 1610-01, Germany)

Primer 18sRNA

18 S: sense 5' CCT-TCG-GGA-TCG-GAG-TAA-TG-3'

18 S: antisense 5' AGC-CCC-CAA-CCT-TCG-TCC-TT-3'

Primer *lims*

LimS1: 5'-CCT-GGT-TCT-CCA-GAG-GTT-TTC-AA-3'

LimA1: 5'-GGT-GCT-TCA-AAG-CAT-AAT-TGA-TG-3'

สารเคมี

100 bp DNA ladder marker (Invitrogen®, USA)

100 bp DNA Ladder RTU (GeneDireX, USA)

10x Solution UltraPure™ TAE Buffer (Invitrogen, USA)

AccuStart™ II GelTrack PCR SuperMix (2X) (Quanta biosciences, USA)

Agarose (Invitrogen®, USA)

Ultra PURE™ distill water (Invitrogen®, USA)

GelStar[®] nucleic acid gel stain (Lonza[®], USA)

Liquid nitrogen (Linde industrial gas)

Loading buffer (Takara[®], Japan)

Onestep RT-PCR kit (Qiagen[®], Germany)

Primer (Operon[®], Germany)

qScript[™] XLT cDNA Supermix (Quanta biosciences)

RNAeasy[®] mini kit (QIAGEN Gmbtt, Germany)

Taq PCR core kit 250 unit (Qiagen[®], Germany)

Trizol (Invitrogen, USA)

3. พืชที่ใช้ในการศึกษา

พืชที่ใช้ในการศึกษา

ใบมะตูม *Aegle marmelos* (ยอด ใบอ่อน และใบโตเต็มที่) (ภาพประกอบ 14) เก็บวันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ. 2562 จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จังหวัดนครนายก

ยอด หมายถึง ใบที่มีสีน้ำตาลแดง อยู่บริเวณลำดับที่ 1-3 จากยอดใบ

ใบอ่อน หมายถึง ใบที่มีสีเขียวปานกลาง อยู่บริเวณลำดับที่ 4-6 จากยอดใบ

ใบโตเต็มที่ หมายถึง ใบที่มีสีเขียวเข้ม อยู่บริเวณลำดับที่ 7-8 จากยอดใบยอด

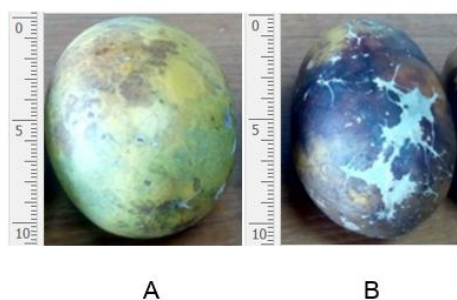


ภาพประกอบ 14 แสดงส่วนประกอบของใบมะตูม

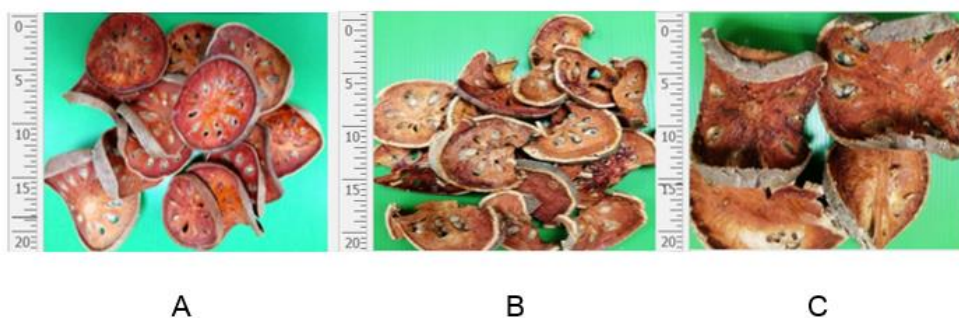
ผลมะตูม (ภาพประกอบ 15-16)

ผลมะตูมน้ำ และผลมะตูมบ้าน ชื่อจากวนเกษตร อ.สนามชัยเขต จังหวัด ฉะเชิงเทรา เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2562

ผลมะตูมไข่ จาก บริษัทเรืองไทยเภสัช จังหวัด บุรีรัมย์ เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2562



ภาพประกอบ 15 แสดงผลมะตูมไข่ (A) ผลมะตูมบ้าน (B)



ภาพประกอบ 16 แสดงผลมะตูมน้ำแห้ง (A) มะตูมไข่แห้ง (B) มะตูมบ้านแห้ง (C)

4. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดจากใบมะตูม

อบใบสดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า สกัดด้วยเฮกเซน และสกัดด้วยเมทานอล (อัตราส่วน สมุนไพร 1 g ในเฮกเซนหรือเมทานอล ปริมาตร 10 ml) เขย่าด้วย rotary shaker นาน 12 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายโดยไม่ใช้ความร้อน เก็บสารสกัดไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และป้องกันแสง

สารสกัดจากผลมะตูม

ล้างผลมะตูมให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วบดเป็นผง ต้มผงสมุนไพร (300 g ในน้ำปริมาตร 2 L) ให้เดือดประมาณ 5 นาที รอให้เย็น แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปทำให้แห้งโดยวิธีฉีดพ่นลมร้อนด้วย spray dry โดยมีสภาวะในการทำแห้ง คือ อุณหภูมิขาเข้า (inlet temperature) เท่ากับ 155 องศาเซลเซียส อุณหภูมิขาออก (outlet temperature) เท่ากับ 122 องศาเซลเซียส Feed rate เท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อหน้าที่ Spray flow เท่ากับ 473 ลิตรต่อชั่วโมง Air flow rate เท่ากับ 35 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

5. ขั้นตอนการวิจัย

5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาคู่ประกอบใบเบื้องต้น

การเตรียมสารละลายสารสกัด

สารละลายตัวอย่างใบมะตูม จากสารสกัดด้วยเฮกเซน ละลายด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml

สารละลายตัวอย่างผลมะตูม 3 ลักษณะ จากการทำให้เป็นผงแห้ง (spray dried) ละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml

การเตรียมสารมาตรฐานและน้ำยาพ่น

สารละลาย quercetin ความเข้มข้น 1 mg/ml: ชั่ง quercetin 5 mg ละลายใน methanol ปริมาตร 1 ml และปิเปตสารละลายดังกล่าวมา ปริมาตร 200 μ l ผสมกับ methanol ปริมาตร 800 μ l

สารละลาย limonene: ปิเปต limonene ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ ethanol ปริมาตร 150 μ l

สารละลาย ocimene: ปิเปต ocimene ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ ethanol ปริมาตร 150 μ l

สารละลาย pinene: ปิเปต pinene ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ ethanol ปริมาตร 150 μ l

สารละลาย mameosin ความเข้มข้น 1 mg/ml: ชั่ง mameosin 5 mg ละลายใน methanol ปริมาตร 1 ml และปิเปตสารละลายดังกล่าวมา ปริมาตร 200 μ l ผสมกับ methanol ปริมาตร 800 μ l

สารละลาย aegelin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml: ชั่ง aegelin 5 mg ละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 ml และปิเปตสารละลายดังกล่าวมา ปริมาตร 200 μ l ผสมกับ DMSO ปริมาตร 800 μ l ปิเปต aegelin ปริมาตร 20 μ l ผสมกับ DMSO ปริมาตร 20 μ l

สารละลาย galantamine hydrobromide 10 mg/ml: ละลาย galantamine hydrobromide 2 mg ใน water type I ปริมาตร 200 μ l

สารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid: ปิเปต anisaldehyde ปริมาตร 500 μ l ตวง glacial acetic acid ปริมาตร 10 ml methanol ปริมาตร 85 ml และ sulfuric acid ปริมาตร 5 ml ตามลำดับ และเขย่าเข้าๆ

การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Mobile phase สำหรับการวิเคราะห์โมโนเทอร์ปีนในใบมะตูม (hexane: ethyl acetate, 9:1): ตวง hexane ปริมาตร 180 ml ผสมกับ ethyl acetate ปริมาตร 20 ml

Mobile phase สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากผลมะตูม (toluene: ethyl acetate: methanol: glacial acetic acid, 40:10:1.25:1): ตวง toluene ปริมาตร 120 ml ethyl acetate ปริมาตร 30 ml methanol ปริมาตร 3.75 ml และ glacial acetic acid ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน

สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.25 mM: ชั่ง DPPH 0.01 g ละลายใน methanol ปริมาตร 100 ml

การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

สารละลาย 0.05 M tris-HCl pH 7.8: ชั่ง Tris 3.0285 g ละลายใน water type I ปริมาตร 300 ml ปรับ pH ให้เป็น 7.8 ด้วย 37% HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วย water type I

สารละลาย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 ที่มี BSA 1%: ชั่ง BSA 0.3 g ละลายใน สารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.8 ปริมาตร 300 ml

สารละลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ความเข้มข้น 6.66 U/ml: ละลาย เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส 2000 U ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.8 ที่มี BSA 1% ปริมาตร 300 ml

สารละลาย naphthyl acetate: ชั่ง naphthyl acetate 0.5 g ละลายใน ปริมาตร ethanol 200 ml

สารละลาย fast blue salt: ชั่ง fast blue salt 2 g ละลายใน water type I ปริมาตร 800 ml

สารละลายผสม naphthyl acetate และ fast blue salt: ตวงสารละลาย fast blue salt ปริมาตร 40 ml ผสมกับ naphthyl acetate ปริมาตร 160 ml

5.2 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

สารละลายตัวอย่างใบมะตูม: ชั่งสารสกัดใบจากเฮกเซน 0.02 g ละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 ml และ sonicate 15 นาที เจือจางด้วย methanol เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1.95 15.63 125 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ (ยอด) ความเข้มข้น 15.63 125 1000 และ 8000 $\mu\text{g/ml}$ (ใบอ่อน) ความเข้มข้น 125 1000 8000 และ 20000 $\mu\text{g/ml}$ (ใบโตเต็มที่)

สารละลายตัวอย่างผลมะตูม 3 ลักษณะ: ชั่งสารสกัดผลจากการทำให้แห้ง 0.02 g ละลายด้วย water type I ปริมาตร 1 ml และ sonicate 15 นาที เจือจางด้วย water type I เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 62.5 125 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ (มะตูมนิ่มและไข่) สำหรับมะตูมบ้าน ความเข้มข้น 125 250 500 และ 750 $\mu\text{g/ml}$

สารมาตรฐาน quercetin: ชั่ง quercetin 10 mg ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 20 ml และเจือจางด้วย DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 3.125 6.25 12.5 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$

สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM: ชั่ง DPPH 0.00414 g ละลายด้วย methanol ปริมาตร 100 ml

5.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาฤทธิ์ด้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเตอเรส โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

สารละลายตัวอย่างใบมะตูม: ชั่งสารสกัดใบจากเมทานอล 0.02 g ละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 ml และ sonicate 15 นาที เจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 9.77 39.06 625 และ 750 $\mu\text{g/ml}$ และชั่งสารสกัดใบจากเฮกเซน 0.02 g ละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 ml และ sonicate 15 นาที เจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 39.06 78.125 156.25 312.5 625 และ 1250 $\mu\text{g/ml}$

สารละลายตัวอย่างผลมะตูม: ชั่งสารสกัดผลจากการทำให้แห้ง 100 mg ละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 ml จากนั้น sonicate 15 นาที เจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 9.77 19.53 39.06 78.13 และ 156.25 $\mu\text{g/ml}$

สารมาตรฐาน galantamine hydrobromide: ละลาย galantamine hydrobromide 2 mg ด้วย water type I ปริมาตร 1 ml และเจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1.95 3.91 7.81 15.63 31.13 62.5 125 และ 250 $\mu\text{g/ml}$

สารละลาย limonene: ปิเปต limonene และเจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 312.5 1250 1800 และ 3600 $\mu\text{g/ml}$

สารละลาย ocimene: ปิเปต ocimene และเจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 156.5 312.5 625 และ 1250 $\mu\text{g/ml}$

สารละลาย mamelosin: ปิเปตสารมาตรฐาน mamelosin และเจือจางด้วย 0.05 M tris-HCl pH 7.8 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 39.06 78.13 156.50 312.50 625 และ 1250 $\mu\text{g/ml}$

สารละลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ความเข้มข้น 0.27 U/ml: ปิเปตสารละลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส 6.66 U/ml ปริมาตร 810 μl เจือจางด้วยสารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.8 ปริมาตร 19.19 ml

สารละลาย acetylthiocholine iodide (ACTI) ความเข้มข้น 75 mM: ชั่ง ACTI 0.2168 g ละลายด้วย water type I ปริมาตร 10 ml

สารละลาย dithiobisnitrobenzoic acid (DNTB) ความเข้มข้น 10 mM: ชั่ง DNTB 0.039635 g ละลายด้วย sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 ml

สารละลาย 1 M sodium dihydrogen phosphate: ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 g ละลายด้วย water type I ปริมาตร 80 ml และปรับปริมาตรด้วย water type I ให้ครบ 100 ml

สารละลาย 1 M disodium hydrogen phosphate: ชั่ง Na_2HPO_4 14.2 g ละลายด้วย water type I ปริมาตร 80 ml และปรับปริมาตรด้วย water type I ให้ครบ 100 ml

สารละลาย 1 M sodium phosphate buffer pH 7.0: ปิเปต 1 M sodium dihydrogen phosphate ปริมาตร 5.77 ml และปิเปต 1 M disodium hydrogen phosphate ปริมาตร 4.23 ml และปรับปริมาตรด้วย water type I ให้ครบ 100 ml

สารละลาย 1 M sodium phosphate buffer pH 8.0: ปิเปต 1 M sodium dihydrogen phosphate ปริมาตร 0.68 ml และ ปิเปต 1 M disodium hydrogen phosphate ปริมาตร 9.32 ml และปรับปริมาตรด้วย water type I ให้ครบ 100 ml

5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีนในใบมะตูมบ้าน

การวิเคราะห์บนแผ่น HPTLC

1. ฉีดสารละลายมาตรฐาน limonene, pinene และ ocimene ปริมาตร 5 μl สารละลายใบมะตูม ปริมาตร 10 μl ลงบนแผ่น HPTLC silica gel 60G F254 โดยใช้เครื่อง automatic TLC sampler

2. ทำการ develop ด้วย automatic developing chamber โดยใช้ mobile phase คือ hexane: ethyl acetate (9:1)

3. พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid

4. บันทึกผลเป็นรูปภาพโดยใช้เครื่อง HPTLC visualizer

การวิเคราะห์ปริมาณ limonene และองค์ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีนในใบมะตูมบ้าน โดยเทคนิค Gas Chromatography (GC) (วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยรังสิต)

1. สกัด limonene ตามวิธีของ Hara et al., 1999 โดยใช้ใบมะตูมบ้าน 1 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร หมักไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน
2. แบ่งมา 1 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ limonene ด้วย gas chromatography โดยเปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของ limonene
3. สภาพะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ limonene เป็นดังนี้
 GC with Flame Ionization Detector
 Column: PE-WAX ยาว 60 m เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน (inner diameter, i.d.) 0.32 mm หนา 0.25 μm
 Carrier Gas: Helium อัตราการไหล (flow rate) 2 ml/min
 Injection temperature: 190°C
 Oven temperature: 90 °C 4 min, increase to 220 °C (rate 10°C /min) hold 3 min
 Detector temperature: 220 °C
 Injection volume: 1 μl Split ratio: 1:20
4. สภาพะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในใบมะตูมบ้าน ดังนี้
 GC EI/CI MSD with Triple-Axis Detector
 Column: Mega 5 MS (ยาว 30 m เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน (inner diameter, i.d.) 0.25 mm หนา 0.25 μm
 Inlet: 190°C Oven: 60°C for 4 min, 10°C/min to 220 and hold 3 min
 Aux heaters: 230°C
 Carrier gas: Helium อัตราการไหล (flow rate) 1.0 ml/min, constant flow
 Average velocity: 36.623 cm/sec. Split: 1:20
 Scan: 50-700 amu, scans/sec. = 2.28
 MS Source: 230°C
 MS Quadrupole: 150°C EI: 70 eV

5.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานมาร์มีโลซิน 1 mg/ml ในเมทานอล
2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยละลายผงแห้งของผลมะตูม 100 mg ด้วยเมทานอล 1 ml จากนั้น sonicate นาน 15 นาที
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานมาร์มีโลซิน 1 mg/ml ปริมาตร 2 4 8 16 และ 32 μ l ตามลำดับ บนแผ่น HPTLC silica gel 60G F254 เพื่อให้ได้สารมาตรฐาน ปริมาณ 2 4 8 16 และ 32 μ g โดยใช้เครื่อง automatic TLC sampler
4. ฉีดสารละลายตัวอย่างผลมะตูม ปริมาตร 20 μ l บนแผ่น HPTLC silica gel 60G F254 โดยใช้เครื่อง automatic TLC sampler
5. ทำการ develop ด้วย automatic developing chamber โดยใช้ mobile phase คือ toluene: ethyl acetate: glacial acetic acid (7:3:0.1) ที่ อุณหภูมิ $25^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งสารเคลื่อนที่ไปได้ 8.5 cm
6. เป่าแผ่น HPTLC silica gel ให้แห้ง และวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง HPTLC densitometer โดยใช้ absorbance reflectance mode: 310 nm
7. สร้าง calibration curve แสดงความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารมาร์มีโลซิน และคำนวณปริมาณสารมาร์มีโลซิน ในสารละลายผลโดยใช้ calibration curve นี้

5.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเทคนิค HPTLC

การเตรียมสารสกัดใบมะตูมสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น HPTLC ดังนี้

1. ฉีดสารละลายมาตรฐาน limonene pinene และ ocimene ปริมาตร 5 μ l สารละลายใบมะตูมบด ปริมาตร 10 μ l ลงบนแผ่น HPTLC silica gel 60G F254 โดยใช้เครื่อง automatic TLC sampler
2. ทำการ develop ด้วย automatic developing chamber โดยใช้ mobile phase คือ hexane: ethyl acetate (9:1)
3. บันทึกผลเป็นรูปภาพโดยใช้เครื่อง HPTLC visualizer

การเตรียมสารสกัดผลมะตูม สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส บนแผ่น HPTLC ดังนี้

1. ฉีดสารละลายมาตรฐานกาลันตามีน ปริมาตร 2 μl สารละลายผลมะตูม ปริมาตร 10 μl สารละลายมาตรฐาน aegelin และสารละลายมาตรฐาน mamelosin ปริมาตร 2 μl ลงในแผ่น HTLC silica gel 60G F254 โดยใช้เครื่อง automatic TLC sampler
2. ทำการ develop ด้วย automatic developing chamber โดยใช้ mobile phase คือ toluene: ethyl acetate: methanol: glacial acetic acid (40:10:1.25:1)
3. บันทึกผลเป็นรูปภาพโดยใช้เครื่อง HPTLC visualizer

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ดังนี้

1. จุ่มแผ่น HPTLC silica gel ที่เตรียมไว้ในสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.25 mM โดยใช้เวลาน้อยที่สุด
2. บันทึกผลเป็นรูปภาพโดยใช้เครื่อง HPTLC visualizer
3. ผลบวก บนแผ่น HPTLC โดยเปลี่ยนสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นแถบสีเหลือง จนถึงสีขาว

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ดังนี้

1. จุ่มแผ่น HPTLC silica gel ที่เตรียมไว้ ลงในสารละลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ความเข้มข้น 6.66 U/ml ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.8 ที่มี BSA 1% โดยใช้เวลาน้อยที่สุด
2. เป่าแผ่น HPTLC silica gel ให้แห้ง
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
4. เป่าแผ่น HPTLC silica gel ให้แห้ง
5. จุ่มแผ่น HPTLC silica gel ลงในสารละลายผสม naphthyl acetate และ fast blue salt นาน 3 นาที
6. เป่าแผ่น HPTLC silica gel ให้แห้ง
7. บันทึกผลเป็นรูปภาพโดยใช้เครื่อง HPTLC visualizer
8. ผลบวก บนแผ่น HPTLC โดยการเปลี่ยนสีของของแถบเป็นสีขาว

5.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH โดยเทคนิค UV

spectrophotometry (microplate reader)

โดยทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้สถิติ one way ANOVA ในโปรแกรม SPSS version 21 และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD))

1. หยอดสารละลายสารมาตรฐาน quercetin สารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเฮกเซน และสารสกัดผลมะตูมด้วยน้ำ ปริมาตร 20 μ l ลงใน 96 well plate
2. หยอดสารละลาย 0.1 mM DPPH ปริมาตร 75 μ l ปิดด้วย aluminum foil เขย่าเบาๆ โดยใช้ shaker อุณหภูมิห้อง 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm

5.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

โดยทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้สถิติ one way ANOVA ในโปรแกรม SPSS version 21 และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD))

1. หยอดสารละลายสารมาตรฐานกัลกันตามีน สารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเมทานอล สารสกัดผลมะตูมด้วยน้ำ สารละลาย limonene สารละลาย ocimene และสารละลายสารมาร์มีโลซิน ปริมาตร 20 μ l ลงใน 96 well plate
2. หยอดสารละลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีน ความเข้มข้น 0.27 U/ml ปริมาตร 20 μ l ปิดด้วย aluminum foil เขย่าเบาๆ โดยใช้ shaker ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
3. หยอดสารละลาย sodium phosphate pH 8.0 ปริมาตร 150 μ l ลงใน 96 well plate ปิดด้วย aluminum foil เขย่าเบาๆ โดยใช้ shaker ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. หยอดสารละลาย 10 mM DNTB ปริมาตร 50 μ l ปิดด้วย aluminum foil เขย่าเบาๆ โดยใช้ shaker ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. หยอดสารละลาย 75 mM ACTI ปริมาตร 20 μ l ปิดด้วย aluminum foil เขย่าเบาๆ โดยใช้ shaker ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm

5.9 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

การเตรียม agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์คุณภาพ RNA หรือการแสดงออกของยีน

1. ละลาย agarose ด้วย 1x Solution UltraPure™ TAE Buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1% (สำหรับวิเคราะห์ RNA) และ 1.5% (สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีน)
 2. ให้ความร้อนจนสารละลายเดือด
 3. รอให้เป็นลง และเทลงชุดอุปกรณ์สำหรับ electrophoresis
- ขั้นตอนการสกัด RNA จากใบมะตูม โดยใช้ RNeasy Mini kit ดังนี้**
1. บดใบมะตูมให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

2. ใส่ผงของไบมะตูมลงในโถงและเติม trizol ปริมาตร 1 ml
3. ปิดฝาของผสมใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 ml
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
5. ดูดเอาเฉพาะสารละลายใสด้านบน (supernatant) ใส่ใน eppendorf tube
6. เติม chloroform ปริมาตร 200 μ l
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
8. ดูดเอาเฉพาะสารละลายใสด้านบน (supernatant) ใส่ใน eppendorf tube
9. เติม 70% ethanol ปริมาตร 200 μ l ลงในสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากันเบาๆ
10. ดูดสารละลายที่ได้ลงใน eppendorf tube ใหม่ และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที
11. เติม buffer RW1 ปริมาตร 700 μ l ลงใน RNeasy spin column
12. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว มากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที
13. ทิ้งของเหลวส่วนที่อยู่นอกคอลัมน์
14. ทำซ้ำข้อ 11. ถึง 13. จำนวน 2 รอบ
15. ใส่ RNeasy spin column ใน eppendorf tube อันใหม่
16. เติม RNase-free water ปริมาตร 50 μ l ลงใน spin column
17. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 รอบต่อนาที เพื่อ elute RNA
18. วิเคราะห์คุณภาพ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง Biophotometer plus

สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ qScript™ XLT cDNA SuperMix ดังนี้

1. เปิด qScript™ XLT cDNA SuperMix (5X) ปริมาตร 4 μ L จำนวน 3 หลอด
2. เติม RNA template ปริมาตร 1.5 μ l (ยกด) 5 μ l (ไบอ่อน) และ 1.5 μ l (ไบโตเต็มที) (RNA ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไม่เท่ากัน เพื่อปรับให้ปริมาณ RNA ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงใช้ RNA ในปริมาณที่ต่างกัน)
3. เติม RNase/DNase-free water จนครบ 20 μ L
4. ผสมกันเบาๆโดยใช้เครื่อง vortex

5. ปั่นเหวี่ยง และเก็บส่วนล่าง

6. ปั่นที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

6.1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

6.2 อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.3 อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

6.4 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ Accustart™ II GelTrack™ PCR

SuperMix (2X) (ตาราง 6)

1. ปิเปิด AccuStart II GelTrack PCR SuperMix (2X) ปริมาตร 12.5 μ L

2. ปิเปิด Forward primer ความเข้มข้น 100 μ M ปริมาตร 1 μ L

3. ปิเปิด Reverse primer ความเข้มข้น 100 μ M ปริมาตร 1 μ L

4. ปิเปิด DNA Template ปริมาตร 5-10 μ L

5. เติมนuclease-free water จนครบ 25 μ L

6. ตั้งค่าโปรแกรมการทำ PCR เป็นดังนี้

6.1 initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

6.2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

6.3 annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

6.4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

6.5 final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. ทำซ้ำ ข้อ 6 จำนวน 25-35 รอบ เพื่อหาจำนวนรอบที่เหมาะสมที่สามารถแยก

ความแตกต่างของความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรส

8. เมื่อได้จำนวนรอบที่เหมาะสม จึงทำ PCR อีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอของยีนที่สนใจเทียบกับ housekeeping gene (ใช้ 18S ribosomal RNA gene เป็น housekeeping gene)

9. วิเคราะห์ความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสโดยเครื่อง ImageQuant™ LAS 4000 (GE Health care, Sweden)

ตาราง 6 แสดงส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการศึกษาแสดงออกของยีน

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)	ยกด	ยกด	ไบออน	ไบออน	ไบโต เต็มที	ไบโต เต็มที
AccuStart II	12.5	/	/	/	/	/	/
GelTrack PCR							
SuperMix(2X)							
18S 0.5F	1	/	-	/	-	/	-
18S 0.5R	1	/	-	/	-	/	-
LimS1	1	-	/	-	/	-	/
LimA1	1	-	/	-	/	-	/
cDNA (1:10)	1	/	/	/	/	/	/
Nuclease-free water	9.5	/	/	/	/	/	/

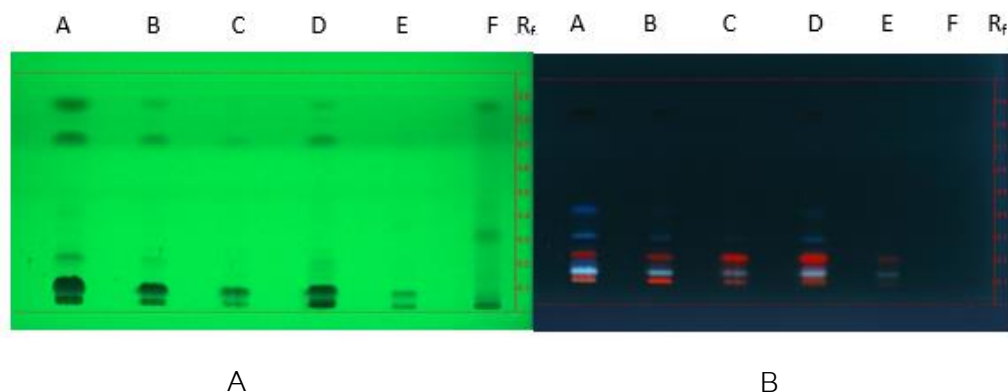
บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

1. ผลการศึกษาในใบ

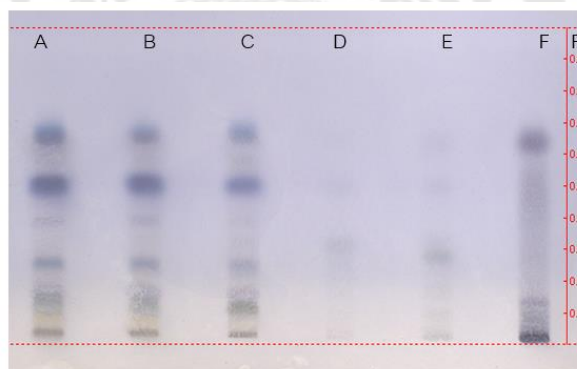
1.1 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ด้วย high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

การทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์เบื้องต้น เพื่อประเมินว่าในสารสกัดของใบมะตูมทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต ที่สกัดด้วยเฮกเซน มีสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์เป็นองค์ประกอบหรือไม่ โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (mobile phase) คือ hexane: ethyl acetate (9:1) โดยสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์จะให้สีม่วงเมื่อย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid ผลการศึกษาจากการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm (ภาพประกอบ 17 A, lane: A-C) พบว่าในยอด มีแถบสีเข้มหลายตำแหน่ง ซึ่งคาดว่าน่าจะมีองค์ประกอบของสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV ที่ 254 nm มากกว่าใบอ่อนและใบโตเต็มที่ ส่วนแถบสารมาตรฐาน (limonene, pinene และ ocimene) (ภาพประกอบ 17 A, lane: D-F) พบแถบสารสีเข้ม หลายตำแหน่ง ทั้งสามสารมาตรฐาน อาจเกิดจากความไม่บริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน ความไม่คงตัวของสารระหว่างการเตรียมสารจนถึงขั้นตอนการวิเคราะห์บนแผ่น HPTLC รวมทั้งเทคนิคการเตรียมสารด้วย ส่วนการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 366 nm (ภาพประกอบ 17 B, lane: A-C) พบว่าในยอด ปรากฏแถบเรืองแสงสีที่แตกต่างกันและมีตำแหน่งที่แตกต่างจากผลการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm ส่วนแถบสารมาตรฐาน (limonene, pinene และ ocimene) (ภาพประกอบ 17 B, lane: D-F) พบแถบเรืองแสงสีที่แตกต่างกันใน limonene และ pinene หลายตำแหน่ง แต่ไม่พบใน ocimene เมื่อนำแผ่น HPTLC มาพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid จะเห็นว่าสารสกัดจากใบมะตูมทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต อาจจะมีสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ที่เหมือนกันเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากให้สีม่วงเช่นเดียวกับ limonene pinene และ ocimene (ภาพประกอบ 18) แต่ยังสรุปไม่ได้ว่ามีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบในใบ เนื่องจากระยะทางที่สารในสารสกัดเคลื่อนที่ (R_f) อาจไม่มีตำแหน่งที่ตรงกับสารมาตรฐาน (limonene ocimene และ pinene)



ภาพประกอบ 17 โครมาโตแกรมแสดงสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในสารสกัดใบ (A: UV 254 และ B: 366 ตามลำดับ)

ยอด (A) ใบอ่อน (B) ใบโตเต็มที่ (C) limonene (D) pinene (E) และ ocimene (F)



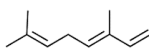
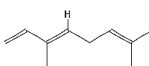
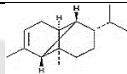
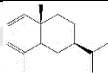
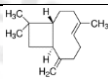
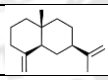
ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมแสดงสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในสารสกัดใบ

ยอด (A) ใบอ่อน (B) ใบโตเต็มที่ (C) limonene (D) pinene (E) และ ocimene (F)

1.2 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ด้วย gas chromatography (GC)

องค์ประกอบที่พบเฉพาะในยอด ได้แก่ trans- β -ocimene, β -ocimene ซึ่งเป็น acyclic monoterpene และ (+)- β -selinene ซึ่งเป็น sesquiterpene เมื่อใบเจริญเป็นใบอ่อนและใบโตเต็มที่ ไม่พบ acyclic monoterpene แต่พบ cyclic monoterpene แทน องค์ประกอบที่พบเฉพาะในใบอ่อน ได้แก่ (-)- β -elemene, (+)- δ -cadinene และ β -cis caryophyllene องค์ประกอบที่พบเฉพาะในใบโตเต็มที่ ได้แก่ α -copaene, aromadenedrene, selina-3,7(11)-diene และ γ -muuolene และองค์ประกอบที่พบในใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต ได้แก่ caryophyllene, humulene, d-germacrene และ bicyclogermacrene (ตาราง 7)

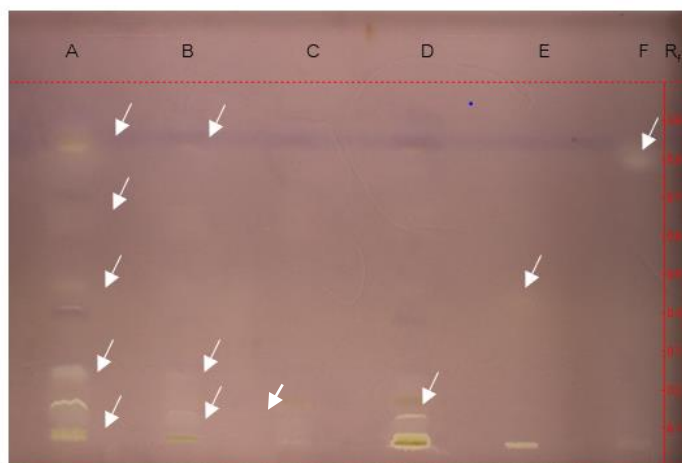
ตาราง 7 แสดงองค์ประกอบที่พบในใบสามช่วงการเจริญเติบโต

Retention time (min)	Quality	สารที่พบ	โครงสร้าง	ช่วงการเจริญเติบโต		
				ยอด	ใบอ่อน	ใบโตเต็มที่
8.931	95	Trans- β -ocimene		/		
9.143	98	β -ocimene		/		
14.503	98	α -Copaene				/
14.671	91	(-)- β -Elemene			/	
15.169	99	Caryophyllene		/	/	/
15.382	90	β -cis Caryophyllene			/	
15.645	97	Humulene		/	/	/
15.989	98	D-germacrene		/	/	/
16.099	95	(+)- β -selinene		/		
16.107	97	Aromadenedrene				/
16.143	93	Bicyclogermacrene		/	/	/
16.158	95	(+)- δ -cadinene			/	
16.480	91	Selina-3,7(11)-diene				/
17.190	98	γ -Muuolene				/

1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยเทคนิค HPTLC

ผลการทดสอบในสารสกัดใบสามช่วงการเจริญเติบโต โดยผลบวกคือการเปลี่ยนสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองจนถึงสีขาว ในยออดเห็นแถบที่ DPPH เปลี่ยนเป็นสีขาวหลายตำแหน่ง ในใบอ่อนเห็นแถบสีขาว และใบโตเต็มที่ได้เห็นแถบที่ DPPH เปลี่ยนเป็นสีขาวจางๆ นอกจากนี้เห็นแถบสีขาวในสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (limonene: $R_f = 0.18$, pinene: $R_f = 0.45$ และ ocimene: $R_f = 0.80$) ด้วย (ภาพประกอบ 19) แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดใบมีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (limonene pinene และ ocimene) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ยังสรุปไม่ได้ว่ามีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบในใบ



ภาพประกอบ 19 โครมาโตแกรมแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะตูม

ยออด (A) ใบอ่อน (B) ใบโตเต็มที่ได้ (C) limonene (D) pinene (E) และ ocimene (F)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบด้วยเฮกเซนสามช่วงการเจริญเติบโต โดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.000) สารมาตรฐาน quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.88 μ g/ml (RSD 6.95%) (ตาราง 10) ยอด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.42 mg/ml (RSD 3.55%) ใบอ่อน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.18 mg/ml (RSD 3.81%) และใบโตเต็มที่ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.20 mg/ml (RSD 6.71%) (ตาราง 8)

ตาราง 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูมสามช่วงการเจริญเติบโต

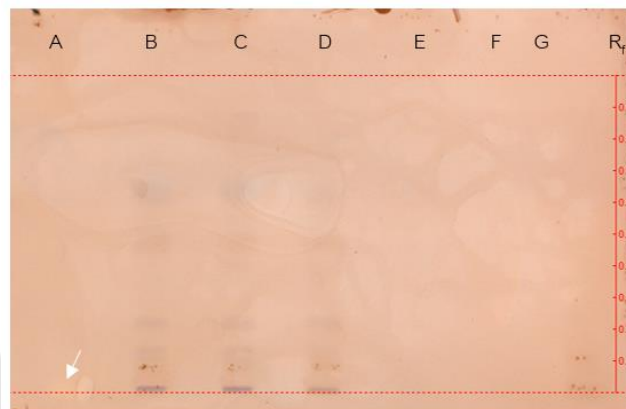
ช่วงการเจริญเติบโต	IC_{50} (mg/ml) (%RSD) N=3	ANOVA test (between group)	Post Hoc test (within group)
ยอด	0.42 (3.55)	P value =0.000	เทียบใบอ่อน P value =0.000
ใบอ่อน	4.18 (3.81)		เทียบใบโตเต็มที่ P value =0.000
ใบโตเต็มที่	11.20 (6.71)		เทียบยอด P value =0.000
quercetin	8.88 μ g/ml (6.95)		

1.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเทคนิค HPTLC

ผลการทดสอบในสารสกัดใบด้วยเฮกเซนสามช่วงการเจริญเติบโต โดยใช้สารมาตรฐาน กาลันตามีน เป็นสารมาตรฐานควบคุมผลบวก (positive control) โดยผลบวก คือ การเปลี่ยนสีของแถบเป็นสีขาว พบว่าสารมาตรฐานกาลันตามีน ไม่เคลื่อนที่ในระบบ mobile phase นี้ทำให้เห็นผลบวกที่ baseline และพบแถบสีเข้มในสารสกัดใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต แต่ไม่พบผลบวก นอกจากนี้สารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (limonene pinene และ ocimene) ไม่พบผลบวกเช่นกัน (ภาพประกอบ 20) อย่างไรก็ตามเป็นการวิเคราะห์เบื้องต้น อาจมีความไวต่ำในการตรวจวัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสน้อย เห็นได้จากสารมาตรฐาน กาลันตามีน ยังให้เห็นผลบวกเป็นแถบสีขาวไม่ชัดเจน นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารทดสอบและ detector อาจมีผลต่อการตรวจไม่พบสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสน้อย ดังนั้น

จึงสรุปไม่ได้ว่าสารสกัดไปด้วยเฮกเซนมีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสหรือไม่ ต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นเพิ่มเติม โดยการศึกษาที่ทดสอบเพิ่มโดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)



ภาพประกอบ 20 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดไปด้วยเฮกเซน

สารมาตรฐานกัลันตามีน (A) ยอด (B) ใบอ่อน (C) ใบโตเต็มที่ (D) limonene (E) pinene (F) และ ocimene (G)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดไปด้วยเฮกเซนของใบสามช่วงการเจริญเติบโต โดยใช้สารมาตรฐานกัลันตามีน เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) พบว่า ค่า %inhibition อยู่ระหว่าง 0.74-7.41% และค่าไม่เพิ่มตามความเข้มข้น นอกจากนี้ พบว่าการใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า 1.25 mg/ml ทำให้เกิดสารละลายขุ่น ไม่สามารถทดสอบได้และหาค่า IC_{50} ได้ (ตาราง 9) และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดไปด้วยเมทานอลของใบสามช่วงการเจริญเติบโต พบว่าฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของยอดต่างจากใบโตเต็มที่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารมาตรฐานกัลันตามีน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 mg/ml (RSD 1.63%) ยอด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.53 mg/ml (RSD 2.51%) ใบอ่อน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.50 mg/ml (RSD 2.93%) และใบโตเต็มที่ IC_{50} เท่ากับ 0.48 μ g/ml (RSD 5.52%) (ตาราง 10) และค่า %inhibition ของ สาร limonene และ ocimene เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (ตาราง 11-12) อย่างไรก็ตาม สารละลาย limonene ความ

เข้มข้นที่มากกว่า 3.6 mg/ml และ สารละลาย ocimene ความเข้มข้นที่มากกว่า 1.25 mg/ml ทำให้เกิดสารละลายขุ่น ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์และหาค่า IC_{50} ได้

ตาราง 9 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของใบด้วยเฮกเซน

ความเข้มข้น (μ g/ml)	%Inhibition (ยกด) (%RSD) (N=3)	%Inhibition (ใบอ่อน) (%RSD) (N=3)	%Inhibition (ใบโตเต็มที่) (%RSD) (N=3)
39.06	4.15 (0.84)	2.72 (6.20)	6.50 (4.99)
78.13	6.02 (0.52)	3.17 (3.30)	5.80 (0.69)
156.25	6.98 (0.50)	5.15 (0.45)	7.41 (0.61)
312.50	4.95 (0.75)	0.74 (0.55)	3.71 (2.73)
625	-4.30 (2.64)	-3.68 (4.77)	-1.02 (4.66)
1250	-38.98 (2.95)	-53.82 (0.98)	-44.04 (0.34)

ตาราง 10 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดใบด้วยเมทานอลสามช่วงการเจริญเติบโต

ช่วงการเจริญเติบโต	IC_{50} (mg/ml) (%RSD) N=3	ANOVA test (Between group)	Post Hoc test (within group)
ยกด	0.53 (2.51)	P value =0.02	เทียบใบอ่อน P value =0.091
ใบอ่อน	0.50 (2.93)		เทียบใบโตเต็มที่ P value =0.091
ใบโตเต็มที่	0.48 (5.52)		เทียบยกด P value =0.007
สารมาตรฐาน กาลันตามีน	0.11 (1.63)		

ตาราง 11 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ limonene

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	average %Inhibition ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
312.5	3.15 (1.58)	3.10 (1.72)	2.53 (1.62)	2.93 (11.77)
1250	6.06 (2.30)	6.98 (2.71)	5.72 (2.46)	6.25 (10.42)
1800	9.46 (2.75)	10.47 (2.61)	8.95 (2.17)	9.63 (8.04)
3600	25.25 (3.19)	27.37 (3.26)	22.80 (2.70)	25.14 (9.10)

ตาราง 12 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ocimene

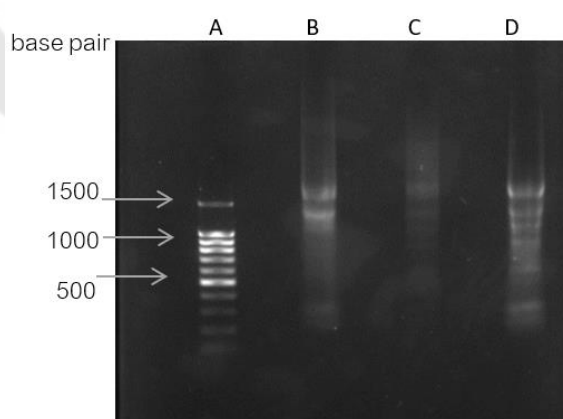
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	average %Inhibition ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
156.5	5.64 (1.53)	5.43 (1.38)	5.25 (1.54)	5.44 (3.59)
312.5	6.88 (2.17)	7.89 (0.31)	6.43 (3.78)	7.07 (10.58)
625	7.22 (5.67)	8.61 (2.15)	8.46 (3.09)	8.10 (9.42)
1250	13.08 (4.91)	12.23 (6.95)	10.28 (8.39)	11.86 (12.10)

1.5 ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในใบมะตูมบ้านโดยวิธี

semiquantitative polymerase chain reaction (semiquantitative PCR)

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase ซึ่งเป็นยีนที่พืชใช้ในการสังเคราะห์ cyclic monoterpene เริ่มจากการสกัด RNA จากใบมะตูมบ้านในช่วงการเจริญเติบโตต่าง ๆ ซึ่งผลการสกัดจะได้ RNA ของยีนทุกชนิดที่แสดงออกในช่วงเวลานั้น ๆ จากนั้นใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ที่จำเพาะกับยีนที่สนใจ ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ยีน limonene synthase มาทำปฏิกิริยา PCR ผลของปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่จำเพาะ จะเป็นการเพิ่มปริมาณยีน limonene synthase เท่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบปริมาณ RNA ของยีน limonene synthase ในใบมะตูมแต่ละช่วงการเจริญเติบโต ซึ่งถ้ามีปริมาณ RNA อยู่มาก จะได้ผลของปฏิกิริยา PCR ซึ่งแสดงเป็นแถบสว่าง ที่สว่างมาก ในขณะที่ถ้ามีปริมาณ RNA อยู่น้อย จะได้ผลของปฏิกิริยา PCR ซึ่งแสดงเป็นแถบสว่าง ที่สว่างน้อย การวัดความสว่างของแถบดีเอ็นเอ จะทำการวัดเปรียบเทียบกับยีนที่แสดงออกตลอดเวลา (housekeeping gene) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ 18s

ribosomal RNA (18s RNA) gene หนึ่ง ในการทำปฏิกิริยา PCR จะต้องทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ก่อน และใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการทำ PCR การวิเคราะห์คุณภาพ โดยวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสง อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ต่อ 280 nm ต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.1 จะแสดงว่า RNA ไม่มีโปรตีนปนเปื้อนหรือมีน้อยมาก จะเห็นว่า RNA ที่สกัดได้จากยอดและใบโตเต็มที่ไม่มีโปรตีนปนเปื้อน แต่ RNA ที่ได้จากใบอ่อนค่อนข้างมีโปรตีนปนมาในระหว่างกระบวนการสกัด ปริมาณ RNA คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของแสงที่ 260 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงของแสงที่ 260 nm มีค่าเท่ากับ 1 จะมีค่าเทียบเท่ากับ RNA 40 µg/ml (ตาราง 13-14) การวิเคราะห์คุณภาพ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพประกอบ 21) แสดงให้เห็นว่า RNA ที่ได้จากยอด มีปริมาณมาก และมีคุณภาพดี สังเกตได้จากเห็นแถบสว่างชัดและไม่มีแถบเป็นปื้น (smear) RNA จากใบอ่อนมีคุณภาพดีเช่นกัน แต่มีปริมาณน้อย และ RNA จากใบโตเต็มที่มีปริมาณมาก แต่มี RNA ที่เสียสภาพ (degrade) อยู่ด้วย โดยแสดงแถบที่เป็นปื้น (smear) นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ว่า RNA ที่สกัดได้ไม่มี DNA ปนอยู่ด้วย โดยการนำ RNA มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR โดยใช้ ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีน limonene synthase พบว่าไม่มีแถบสว่างเกิดขึ้น แสดงว่า RNA ที่สกัดได้ไม่มี DNA ปนอยู่ด้วย ในการศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนจะต้องหาจำนวนรอบที่เหมาะสม ที่ปรากฏแถบสว่างในช่วง log phase ของ PCR พบว่าช่วงที่เหมาะสม คือการทำ PCR จำนวน 33 รอบ ดังนั้น การวิเคราะห์การ แสดงออกของยีน จะวิเคราะห์ที่ผลของ PCR ในรอบที่ 33



ภาพประกอบ 21 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพของ RNA

เครื่องหมายน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight marker) (A) ยอด (B) ใบอ่อน (C) และใบโตเต็ม (D)

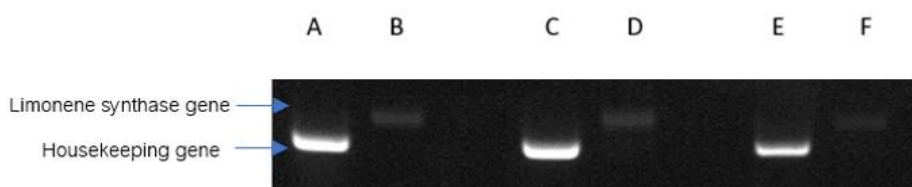
ตาราง 13 แสดงอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง 260 nm ต่อ 280 nm ของ RNA ที่สกัดได้จากใบสามช่วงการเจริญเติบโต

ช่วงการเจริญเติบโต	ค่าการดูดกลืนแสง 260 nm	ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง 260 nm ต่อ 280 nm
ยอด	0.810	0.420	1.93
ใบอ่อน	0.269	0.165	1.63
ใบโตเต็มที่	0.863	0.443	1.95

ตาราง 14 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ RNA

ช่วงการเจริญเติบโต	ค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้	ปริมาณ RNA ที่คำนวณได้ (µg)
ยอด	0.810	160
ใบอ่อน	0.269	53.8
ใบโตเต็มที่	0.863	172.6

ระดับการแสดงออกของยีนในใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต จากการทำ PCR จำนวน 33 รอบ แสดงในภาพประกอบ 22 จากการวัดความสว่างของแถบ DNA ด้วย Image Quant™ LAS 4000 mini และคำนวณความสว่างของแถบ DNA ของยีน limonene synthase เทียบกับความสว่างของแถบ DNA ของ housekeeping gene พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase เพิ่มขึ้นเมื่อใบเจริญเติบโตขึ้น (ภาพประกอบ 22) (ตาราง 15) และพบว่าระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase ต่ำกว่าระดับการแสดงของ housekeeping gene

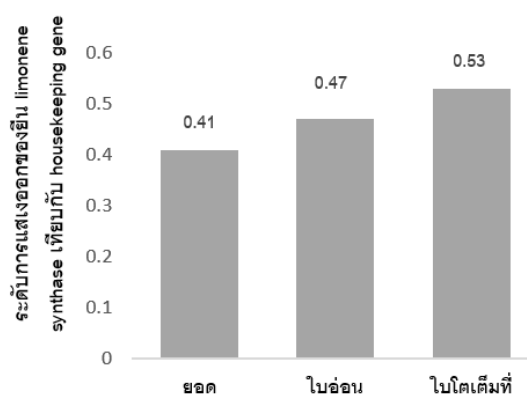


ภาพประกอบ 22 ระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase และ housekeeping gene

ยอด (A และ B) ใบอ่อน (C และ D) ใบโตเต็มที่ (E และ F)

ตาราง 15 ระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับ housekeeping gene ในใบมะตูม

ช่วงการเจริญเติบโต	ระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับ housekeeping gene
ยอด	0.41
ใบอ่อน	0.47
ใบโตเต็มที่	0.53



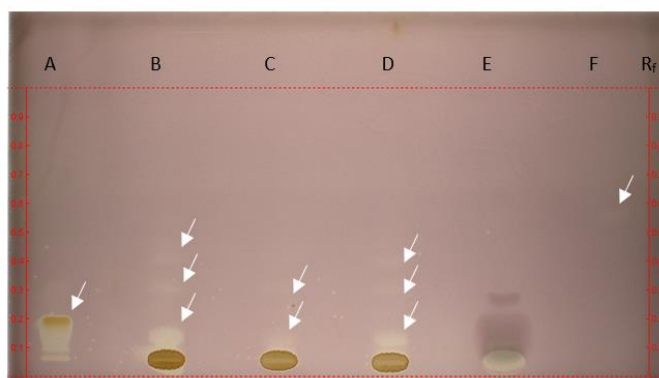
ภาพประกอบ 23 ระดับการแสดงออกของยีนในใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต

2. ผลการศึกษาในผล

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยเทคนิค HPTLC

ผลการทดสอบสารที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผลมะตูมสามลักษณะ โดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐานควบคุมผลบวก (positive control) โดยผลบวกคือการเปลี่ยนสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองจนถึงสีขาว พบผลบวกในสารมาตรฐาน quercetin และสารสกัดผลทั้งสามลักษณะ แสดงว่าในผลมีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารมาตรฐานมาร์มีโลซิน ให้ผลบวก (สีขาวจาง) ด้วย แต่ให้ผลลบในสารมาตรฐานเออีจีลิน (ภาพประกอบ 24)



ภาพประกอบ 24 โครมาโตแกรมแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูม

สารมาตรฐาน quercetin (A) สารสกัดผลมะตูมน้ำ (B) สารสกัดผลมะตูมไข่ (C) สารสกัดผลมะตูมบ้าน (D) สารมาตรฐานเอพิจีลิน (E) และ สารมาตรฐานมาร์มีโลซิน (F)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยเทคนิค UV spectrophotometry (microplate reader)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูมสามลักษณะโดยใช้สารมาตรฐาน quercetin เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) พบว่าพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมสามลักษณะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.001) สารมาตรฐาน quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.88 $\mu\text{g/ml}$ (RSD 6.95%) ผลมะตูมน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.40 mg/ml (RSD 9.10%) ผลมะตูมไข่ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.38 mg/ml (RSD 7.99%) และผลมะตูมบ้าน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.55 mg/ml (RSD 4.91%) (ตาราง 16)

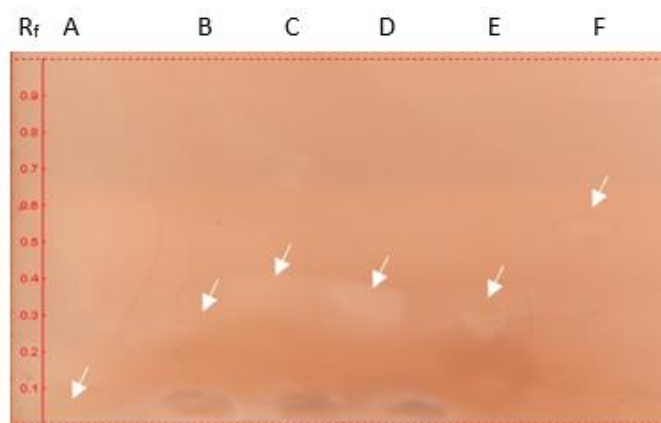
ตาราง 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมสามลักษณะ

ผลมะตูม	IC_{50} (mg/ml) (%RSD) N=3	ANOVA test (Between group)	Post Hoc test (within group)
น้ำ	0.40 (9.10)	P value =0.001	เทียบกับไข่ P value =0.456
ไข่	0.38 (7.99)		เทียบกับบ้าน P value =0.001
บ้าน	0.55 (4.91)		เทียบกับน้ำ P value =0.001
quercetin	8.88 (6.95)		

2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเทคนิค HPTLC

ผลการทดสอบในสารสกัดผลสามลักษณะ โดยใช้สารมาตรฐานกาลันตามีน เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) โดยผลบวก คือ การเปลี่ยนสีของแถบเป็นสีขาว พบว่าสารมาตรฐานกาลันตามีน เห็นผลบวกเป็นแถบสีขาวจางๆ และพบแถบสีขาวในสารสกัดผลทั้งสามลักษณะ รวมทั้งสารมาตรฐานเออีจีลีน และสารมาตรฐานมาร์มีโดซิน ด้วย (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดผลมะตูม

สารมาตรฐานกาลันตามีน (A) สารสกัดผลมะตูมน้ำ (B) สารสกัดผลมะตูมไข่ (C) สารสกัดผลมะตูมบ้าน (D) สารมาตรฐานเออีจีลีน (E) และ สารมาตรฐานมาร์มีโดซิน (F)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเทคนิค UV

spectrophotometry (microplate reader)

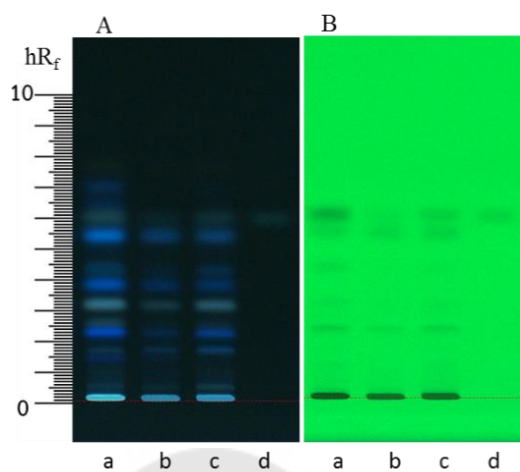
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดผลสามลักษณะ โดยใช้สารมาตรฐานกาลันตามีน เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) พบว่าฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของผลทั้งสามลักษณะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.125) สารมาตรฐานกาลันตามีน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 mg/ml (RSD 1.63%) มะตูมน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.13 mg/ml (RSD 3.09%) มะตูมไข่ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14 mg/ml (RSD 3.29%) และมะตูมบ้าน IC_{50} เท่ากับ 0.12 mg/ml (RSD 3.93%) (ตาราง 17) นอกจากนี้ยังทดสอบกับสารมาตรฐานมาร์มีโดซิน พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 917.97 μ g/ml (RSD 8.91%) (ตาราง 19)

ตาราง 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรสามชนิด

ผลมะตูม/ สารมาตรฐาน	IC ₅₀ (mg/ml) (%RSD) N=3	ANOVA test (Between group)	Post Hoc test (within group)
นิ่ม	0.13 (3.09)	P value =0.125	เทียบกับไข่ P value =1.000
ไข่	0.14 (3.29)		เทียบกับบ้าน P value =0.078
บ้าน	0.12 (3.93)		เทียบกับนิ่ม P value =0.078
สารมาตรฐาน	0.11 (1.63)		
กาลันตามีน	0.92 (8.91)		
สารมาตรฐาน มาร์มีโลซิน			

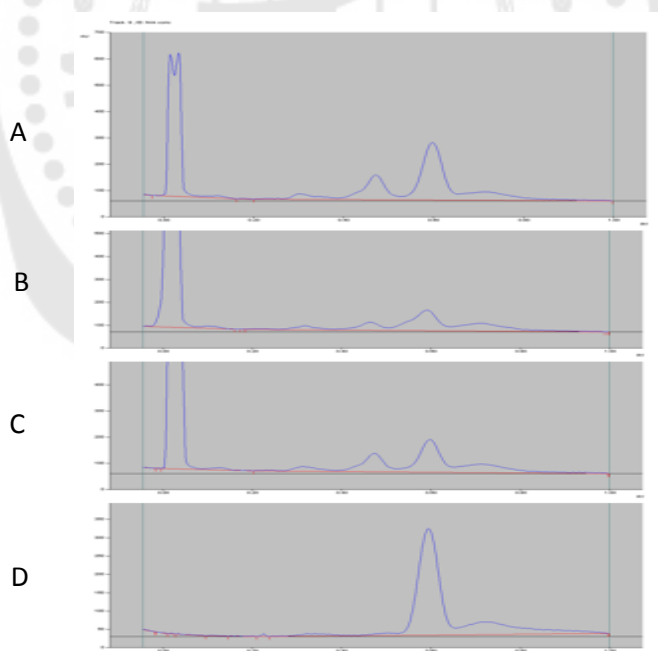
2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผล

โครมาโตแกรมของสารสกัดจากผลมะตูมทั้งสามลักษณะเมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 366 nm (ภาพประกอบ 26 A, lane a-c) พบว่าในผลมะตูมทั้งสามลักษณะมีแถบเรืองแสงตรงกันหลายตำแหน่ง ซึ่งคาดว่าน่าจะมีองค์ประกอบของสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV ที่ 366 nm ที่เหมือนกัน และเมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm (ภาพประกอบ 26 B, lane a-c) พบว่าผลมะตูมทั้งสามชนิดมีแถบเข้มที่ตรงกันหลายตำแหน่ง ซึ่งแสดงว่าผลมะตูมทั้งสามลักษณะมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกันมาก และพบว่าสารสกัดผลทั้งสามลักษณะมีแถบเรืองแสงในตำแหน่งตรงกันกับสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน ($R_f = 6.5$) (ภาพประกอบ 26) แสดงว่าผลมะตูมทั้งสามลักษณะมีสารมาร์มีโลซินเป็นองค์ประกอบ และผลโครมาโตแกรมของสารสกัดผลสามชนิดมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 310 nm (ภาพประกอบ 27) พบว่าสารมาร์มีโลซินในมะตูมทั้งสามลักษณะมีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน และไม่ซ้อนทับกับสารอื่น เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารมาร์มีโลซินในผลมะตูมโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน (ตาราง 18 และภาพประกอบ 27) พบว่าสารสกัดผลมะตูมนี้นี้มีปริมาณสารมาร์มีโลซินมากที่สุด (1012.11 $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ of spray dried extract) ตามด้วยมะตูมบ้าน (985.04 μg) และมะตูมนิ่ม (651 μg) (ตาราง 19) และพบว่าปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร (ภาพประกอบ 28)



ภาพประกอบ 26 โครมาโตแกรมของผลมะตูมทั้งสามลักษณะ

มะตูมน้ำ (a) มะตูมไข่ (b) มะตูมบ้าน (c) และสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน (d)
(UV 366 nm (A) and UV 254 nm (B))

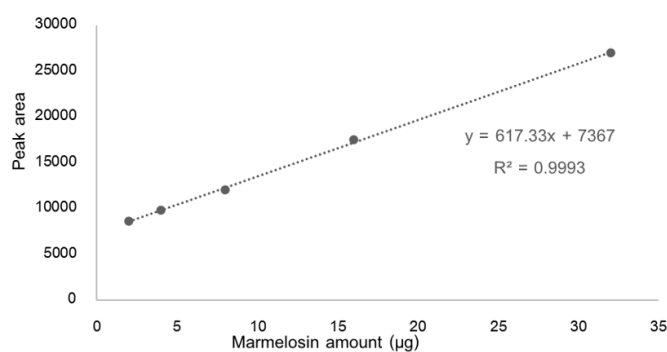


ภาพประกอบ 27 โครมาโตแกรมแสดงสารสกัดผลมะตูมน้ำ มะตูมไข่และมะตูมบ้าน เมื่อสแกน
ด้วยความยาวคลื่น 310 nm

มะตูมน้ำ (A) มะตูมไข่ (B) มะตูมบ้าน (C) และสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน (D)

ตาราง 18 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานมาร์มีโลซินแต่ละความเข้มข้น

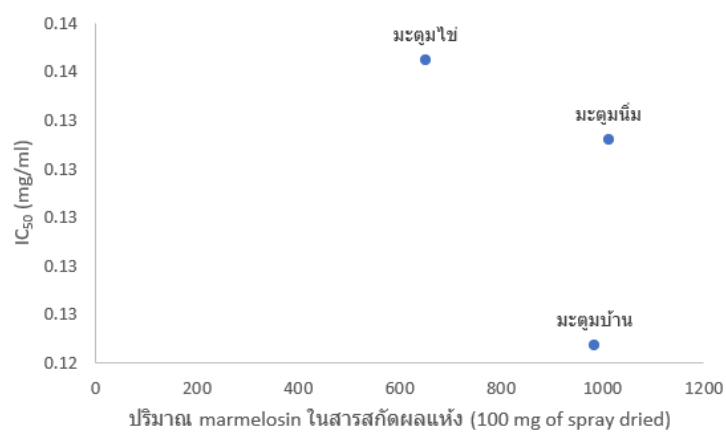
ปริมาณสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน (μg)	พื้นที่ใต้กราฟ (peak area)
2	8601.7
4	9836.3
8	12096.5
16	17558.1
32	27017.1



ภาพประกอบ 28 แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน

ตาราง 19 ปริมาณสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูม

ผลมะตูม	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak area)	ปริมาณสารมาร์มีโลซิน (μg)		
		In 20 μL	In 1000 μL	In 100 mg of spray dried extract
น้ำ	19863.24	20.24226756	1012.113378	1012.113378
ไข่	15404.7	13.02001834	651.0009168	651.0009168
บ้าน	19529	19.70084266	985.0421328	985.0421328



ภาพประกอบ 29 ความสัมพันธ์ของปริมาณมาร์มีโลซินและค่า IC₅₀ ของฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดผลมะตูม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

1.1 การศึกษาในใบ

สารสกัดจากใบมะตูมด้วยเฮกเซนทั้งสามช่วงการเจริญเติบโตมีสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ที่พบเหมือนกัน ได้แก่ caryophyllene, humulene, d-germacrene และ bicyclogermacrene องค์ประกอบที่พบเฉพาะในยอด ได้แก่ trans- β -ocimene, β -ocimene ซึ่งเป็น acyclic monoterpene และ (+)- β -selinene ซึ่งเป็น sesquiterpene เมื่อใบเจริญเป็นใบอ่อนและใบโตเต็มที่ ไม่พบ acyclic monoterpene แต่พบ sesquiterpene องค์ประกอบที่พบเฉพาะในใบอ่อน ได้แก่ (-)- β -elemene, (+)- δ -cadinene และ β -cis caryophyllene องค์ประกอบที่พบเฉพาะในใบโตเต็มที่ ได้แก่ α -copaene, aromadenedrene, selina-3,7(11)-diene และ γ -muuolene นอกจากนี้การศึกษานี้ตรวจไม่พบ limonene, ocimene และ pinene ซึ่งคาดว่าน่าจะมีอยู่ในใบมะตูมดังการศึกษาที่ได้พบทวนวรรณกรรมมา (Verma et al., 2014) อธิบายได้จากมีวิธีการเตรียมสารสกัดที่แตกต่างกัน โดยจากการทบทวนวรรณกรรมองค์ประกอบที่พบในใบมะตูมได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการกลั่น แต่ในการศึกษารั้งนี้ได้วิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดที่สกัดด้วยเฮกเซน ประกอบกับในขั้นตอนการระเหยเฮกเซนด้วยวิธี free evaporation อาจส่งผลให้สูญเสียโมโนเทอร์ปีนบางชนิดได้

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบด้วยเฮกเซน พบว่าการทดสอบฤทธิ์บนแผ่น high performance thin layer chromatography (HPTLC) แสดงผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วยเทคนิค UV spectrophotometry กล่าวคือยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ($IC_{50} = 417.32 \mu\text{g/ml}$, RSD = 3.55%) ตามด้วยใบอ่อน ($IC_{50} = 4.18 \text{ mg/ml}$, RSD = 3.81%) และใบโตเต็มที่ ($IC_{50} = 11.20 \text{ mg/ml}$, RSD = 6.71%) โดยที่ quercetin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ($IC_{50} = 8.88 \mu\text{g/ml}$, RSD = 6.95%) จากการสืบค้นข้อมูลมีรายงานว่าโครงสร้างที่มีพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่ (conjugated double bond) ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Wojtunik et al., 2014) ดังนั้น การที่ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าใบช่วงการเจริญเติบโตอื่น อาจเนื่องจากในยอดมี trans- β -ocimene, β -ocimene ในขณะที่ใบในช่วงการเจริญเติบโตอื่นมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น sesquiterpene ที่มีโครงสร้างไม่ได้มีลักษณะเป็นพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในใบ แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ และไม่ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารกลุ่มอื่น จึงไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่า trans- β -ocimene และ β -ocimene

เป็นองค์ประกอบสำคัญในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษารั้วนี้กับ รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH จากใบมะตูม (Asaduzzaman et al., 2014) (Choi et al., 2002) ซึ่งรายงานว่าใบมะตูม (ไม่ระบุช่วงการเจริญเติบโต) เมื่อทำการสกัดด้วย methanol และ แยกส่วนด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ petroleum ether fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction และ aqueous fraction พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงค่า IC_{50} ในช่วง 3.84-58.9 $\mu\text{g/ml}$ ค่าที่มีรายงานไว้แตกต่างจากการศึกษารั้วนี้ อาจเนื่องจาก ความเข้มข้นของสาร DPPH ตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร DPPH ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด รวมถึงสายพันธุ์ของพืชและ วิธีการสกัดสารในพืชแตกต่างกัน (Pyrzynska & Pekal, 2013)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบด้วยเฮกเซน โดยการทดสอบฤทธิ์บนแผ่น HPTLC ไม่พบผลบวก การทดสอบด้วยเทคนิค UV spectrophotometry พบว่าสารทดสอบที่ความเข้มข้นในช่วง 39.06-1250 $\mu\text{g/ml}$ แสดงค่า %inhibition อยู่ระหว่าง 0.74-7.41% และค่าไม่เพิ่มตามความเข้มข้น และพบว่าสารทดสอบความเข้มข้นที่มากกว่า 1.25 mg/ml ทำให้ระบบทดสอบชूनแม้ว่าได้เติมสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเทอร์ปีนอยด์ที่พบมากในใบมะตูมได้แก่ limonene และ ocimene (Verma et al., 2014) และมีรายงานว่าโมโนเทอร์ปีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Aazza et al., 2011) การศึกษานี้จึงทดสอบฤทธิ์ของ limonene และ ocimene และพบว่า %inhibition เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น โดย limonene ที่ความเข้มข้น 0.31-3.60 mg/ml แสดงค่า %inhibition ตั้งแต่ 2.93- 25.14% และ ocimene ที่ความเข้มข้น 0.16-1.25 mg/ml แสดง %inhibition ตั้งแต่ 5.44 -11.86% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย limonene มากกว่า 3.6 mg/ml และเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย ocimene มากกว่า 1.25 mg/ml ทำให้ระบบทดสอบชूनแม้ว่าได้เติมสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบด้วยเมทานอล โดยเทคนิค UV spectrophotometry กล่าวคือ ใบโตเต็มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดีที่สุด (IC₅₀ = 475.39 $\mu\text{g/ml}$, RSD = 5.52%) ตามด้วยใบอ่อน (IC₅₀ = 504.93 $\mu\text{g/ml}$, RSD = 2.93%) และยอด (IC₅₀ = 531.96 $\mu\text{g/ml}$, RSD = 2.51%) โดยที่กาลันตามีน ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (IC₅₀ = 114.61 $\mu\text{g/ml}$, RSD = 1.63%) เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน กาลันตามีนกับสารสกัดใบ พบว่า สารมาตรฐานกาลันตามีน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเป็น 4 เท่าของสารสกัดจากใบทั้งสามช่วงการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามไม่สามารถ

อธิบายได้ว่าองค์ประกอบใดในยодที่แตกต่างจากไบบังการเจริญเติบโตอื่นและส่งผลให้มีฤทธิ์ดีที่สุด เนื่องจากไม่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารในสารสกัดไปด้วยเมทานอล

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase พบว่า มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อใบเจริญขึ้น ยีนนี้ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสาร limonene ซึ่งเป็นสารที่จะเปลี่ยนเป็น cyclic monoterpene (Bohlmann, Meyer-Gauen, & Croteau, 1998) เนื่องจากยีนนี้ควบคุมการสังเคราะห์ cyclic monoterpene หลายชนิด และมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลยีน (National Center for Biotechnology Information, 2013) มากพอที่จะทำให้สามารถออกแบบ DNA primer มาทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วย PCR ได้ ประกอบกับมีรายงานว่า สารเทอร์ปีนอยด์ที่พบมากในใบมะตูมได้แก่ limonene และ ocimene (Verma et al., 2014) งานวิจัยนี้จึงศึกษาระดับการแสดงออกของยีน limonene synthase แต่ไม่ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ocimene synthase เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลยีนมีน้อย ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลมาใช้ออกแบบ DNA primer ได้

ผลการศึกษาคู่ประกอบของสารกลุ่มเทอร์ปีน พบว่าในยอดพบ acyclic monoterpene ได้แก่ trans- β -ocimene และ β -ocimene ซึ่งไม่พบในใบที่เจริญเติบโต และยีน limonene synthase แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อใบเจริญเติบโต เป็นไปได้ว่าเมื่อใบโตขึ้น geranyl diphosphate (GDP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโมโนเทอร์ปีนจะถูกเปลี่ยนเป็น cyclic monoterpene ได้ดี แต่ในยอด geranyl diphosphate จะถูกดึง phosphate ออกจากโมเลกุลด้วยเอนไซม์ ocimene synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม geranyl-diphosphate diphosphate-lyase (Swiss Institute of Bioinformatics, 2020) จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีนในมะตูม พบเพียงการทำ RNA sequencing (Kaushik & Kumar, 2018) ซึ่งเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นว่าจะสามารถพบ RNA ชนิดใดได้บ้างในมะตูม

จากการศึกษาในใบแสดงให้เห็นว่า ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและใบโตเต็มที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีกว่าใบอ่อน จึงเป็นส่วนที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น วิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบสำคัญที่พบในยอดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีและในใบโตเต็มที่ซึ่งฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดี เพื่อนำมาใช้พัฒนาเป็นสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์สำหรับป้องกันหรือชะลอการเกิดอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนได้ให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีนสำหรับการสังเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนและความสัมพันธ์กับสารที่พบในใบมะตูม ในยอด geranyl diphosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น limonene หรือ ocimene ขึ้นกับความสามารถของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในการดึงสารตั้งต้นมาใช้ ซึ่งหาก

ต้องการให้ยีสต์สะสม limonene มากอาจใช้วิธีเทคโนโลยีชีวภาพช่วยเพิ่มการทำงานของยีสต์ limonene synthase ในยีสต์

1.2 การศึกษาในผล

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูมบนแผ่น HPTLC พบว่าผลมะตูมทั้งสามลักษณะแสดงผลบวก โดยแสดงแถบที่เปลี่ยนจากสีม่วงของสารละลาย DPPH เป็นสีขาว การทดสอบด้วยเทคนิค UV spectrophotometry แสดงให้เห็นว่าผลมะตูมไซ้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($IC_{50} = 377.74 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 7.99\%$) ตามด้วยผลมะตูมนิ่ม ($IC_{50} = 397.81 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 9.10\%$) และผลมะตูมบ้าน ($IC_{50} = 546.02$, $RSD = 4.91\%$) โดยที่ quercetin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ($IC_{50} = 8.88 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 6.95\%$) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมจากการศึกษานี้ไม่ดีเท่าค่าที่มีรายงานไว้จากการศึกษาในประเทศอินเดีย (Vardhini, Sivaraj, Arumugam, Himanshu Ranjan, &, 2018) ซึ่งพบว่าสารสกัดผลที่สกัดด้วยน้ำมีค่า $IC_{50} = 183.58 \mu\text{g/ml}$ มีรายงานว่าความแตกต่างของสายพันธุ์พืช สภาวะการทดสอบด้วย DPPH (เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา) มีผลต่อค่า IC_{50} (Pyrzynska & Pekal, 2013) โดยการศึกษาในประเทศอินเดีย (Vardhini, Sivaraj, Arumugam, Himanshu Ranjan, &, 2018) ซึ่งมีข้อแตกต่างจากการศึกษานี้คือ ลักษณะหรือชนิดของผลที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ อาจมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ทำให้ค่า IC_{50} แตกต่างจากการศึกษานี้

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลบนแผ่น HPTLC พบว่าผลมะตูมทั้งสามลักษณะแสดงผลบวก โดยแสดงแถบสีขาว การทดสอบด้วยเทคนิค UV spectrophotometry แสดงให้เห็นว่าผลมะตูมบ้านมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($IC_{50} = 124.71 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 3.93\%$) ตามด้วยผลมะตูมนิ่ม ($IC_{50} = 133.20 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 3.09\%$) และผลมะตูมไซ้ ($IC_{50} = 136.45 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 3.29\%$) โดยที่สารมาตรฐาน กาลันตามีน ซึ่งเป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) ($IC_{50} = 114.61 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 1.63\%$) เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน กาลันตามีน กับสารสกัดผล พบว่าสารมาตรฐาน กาลันตามีน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็น 1.2 เท่าของสารสกัดจากผลทั้งสามลักษณะ และผลการทดสอบฤทธิ์ของสารละลายมาร์มีโลซิน มีค่า $IC_{50} = 917.97 \mu\text{g/ml}$ และ $RSD = 8.91\%$

ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาร์มีโลซิน จากสารสกัดมะตูมในผง spray dried 100 mg พบว่า ผลมะตูมนิ่มมีปริมาณมาร์มีโลซินมากที่สุด (1021.11 μg) คิดเป็น 1.6 เท่าของผลมะตูมไซ้ ตามด้วยผลมะตูมบ้าน (985.04 μg) คิดเป็น 1.5 เท่าของผลมะตูมไซ้ และผลมะตูมไซ้ (651.00

μg) และมีการศึกษาพบว่าปริมาณของมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูมด้วยเมทานอลเท่ากับ 270 μg/100 mg ของผลมะตูมแห้ง (Shailajan, Menon, & Hande, 2011) นอกจากนี้ปริมาณของสารมาร์มีโลซินในสารสกัดผลมะตูมด้วย Soxhlet เท่ากับ 500-650 μg/100 mg ของผลมะตูมแห้ง (Prashant B. Shinde & Laddha, 2014) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดมีผลต่อปริมาณสารมาร์มีโลซิน ในการศึกษาทำการ scatter plot เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และปริมาณสารมาพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน นอกจากนี้การศึกษานี้ยังทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน พบว่ามีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด ($IC_{50} = 917.97 \mu\text{g/ml}$, $RSD = 8.91\%$) และมีรายงานว่าสารมาร์มีโลซินที่สกัดจากพืชอื่น ๆ เช่น *Angelica dahurica*, (Kim et al., 2002) *Angelica archangelica*, *Geranium sylvaticum* (Sigurdsson & Gudbjarnason, 2007) เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส แต่ในผลมะตูมอาจกล่าวได้ว่าสารมาร์มีโลซิน ไม่ใช่สารออกฤทธิ์หลัก มีรายงานว่าในผลมะตูมมีสารหลายชนิด เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) (Rajan, Gokila, Jency, Brindha, & Sujatha, 2011; Tagad, Sahoo, & Annapure, 2018) สาร furanocoumarins เช่น สารมาร์มีโลซิน (G. Nirupama, G. Padmasri, R. Ramesh, & M. Vasanthi, 2012) และสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เป็นองค์ประกอบ การศึกษาของ Santos และคณะ (Dos Santos et al., 2018) รายงานว่าสารประกอบเหล่านี้สามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ โดยสารกลุ่มแอลคาลอยด์ซึ่งมีประจุบวก เข้าจับบริเวณ anionic ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล และสาร furanocoumarins เข้าจับบริเวณ peripheral anionic site ของเอนไซม์ และมีรายงานว่าสารกลุ่ม furocoumarin เช่น สารมาร์มีโลซิน, psoralen และ bergapten พบในผลมะตูม (P. B. Shinde & Laddha, 2015) ซึ่งสาร psoralen สกัดจากพืช *Psoralea corylifolia* (Somani et al., 2015) และสาร bergapten สกัดจากพืช *Heracleum crenatifolium* Boiss (Orhan, Tosun, & sener, 2008) มีรายงานว่ามียูทิตีต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ดังนั้นฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารเหล่านี้

นอกจากนี้ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเรียงลำดับจากมะตูมที่มีฤทธิ์ดีที่สุดถึงน้อยที่สุดคือ มะตูมไข่ มะตูมนิม และมะตูมบ้านตามลำดับ ในขณะที่การเรียงลำดับจากมะตูมที่

มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุดถึงน้อยที่สุดคือ มะตูมบ้าน มะตูมนิ่ม และมะตูมไข่ ตามลำดับ

จากการศึกษา แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผลมะตูมมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีมาก โดยมะตูมบ้านมีฤทธิ์ดีที่สุด และน่าจะนำมาพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เช่น เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยควรศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในผลมะตูมเพิ่มเติม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ หรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับป้องกันหรือชะลอการเกิดอัลไซเมอร์

ข้อสรุปจากงานวิจัยนี้พบว่า

1. สารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเฮกเซน ส่วนยอด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด
2. สารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเมทานอล ส่วนใบโตเต็มที่ มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด โดยมีฤทธิ์เป็น 1/4 เท่าของสารมาตรฐานกาลันตามีน
3. ระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อใบเจริญขึ้น และการสังเคราะห์สารกลุ่มเทอร์ปีนไม่สัมพันธ์กับสารที่พบในใบมะตูม
4. สารสกัดผลมะตูมไข่ด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด
5. สารสกัดผลมะตูมบ้านด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดีที่สุด โดยมีฤทธิ์เป็น 0.8 เท่าของสารมาตรฐานกาลันตามีน
6. สารสกัดผลมะตูมนิ่มด้วยน้ำ มีปริมาณสารมาร์มีโลซินมากที่สุด และพบว่าฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และปริมาณสารมาร์มีโลซิน ไม่สัมพันธ์กัน
7. สารสกัดผลมะตูมบ้านด้วยน้ำ และสารสกัดใบมะตูมบ้านด้วยเมทานอล ส่วนใบโตเต็มที่ มีองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสดี และน่าจะนำมาพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับป้องกันหรือชะลอการเกิดอัลไซเมอร์

2. ข้อเสนอแนะ

1. ควรวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเทอร์ปีนชนิดที่พบในใบ และศึกษาองค์ประกอบของสารกลุ่มอื่นๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณขององค์ประกอบที่พบในใบและผลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส
2. ควรวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารในสารสกัดเมทานอลของใบช่วงการเจริญเติบโตต่างๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ของชนิดและปริมาณองค์ประกอบที่พบในใบในช่วงการเจริญเติบโตต่างๆกับฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ภาคผนวก ก



ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน quercetin (positive control)

ความเข้มข้น (μg/ml)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ (μg/ml) (%RSD) N=3
3.125	33.89 (1.93)	38.41 (0.46)	36.52 (1.26)	8.88 (6.95)
6.25	46.78 (2.81)	45.87 (1.04)	44.00 (1.94)	
12.5	56.52 (1.03)	54.78 (2.15)	53.74 (1.72)	
25	65.99 (2.61)	65.48 (1.41)	63.83 (0.83)	
50	66.48 (0.95)	71.64 (0.99)	69.57 (2.62)	

ตาราง 21 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ยอด)

ความเข้มข้น(μg/ml)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ (mg/ml) N=3
1.95	27.08 (1.51)	26.45 (3.71)	22.98 (0.37)	0.42 (3.55)
15.63	27.78 (2.12)	34.55 (0.76)	32.40 (3.39)	
125	34.26 (1.61)	37.85 (3.32)	39.67 (1.26)	
1000	79.63 (2.20)	77.85 (7.86)	79.67 (2.44)	

ตาราง 22 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ใบอ่อน)

ความเข้มข้น(mg/ml)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ (mg/ml) N=3
0.156	10.25 (0.96)	16.20 (2.13)	14.88 (1.47)	4.18
0.125	11.74 (0.00)	18.35 (1.40)	17.69 (2.09)	(3.81)
1	24.46 (0.76)	32.23 (1.69)	32.89 (3.41)	
8	81.65 (4.68)	79.17 (4.76)	79.83 (2.84)	

ตาราง 23 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม (ใบโตเต็มที่)

ความเข้มข้น(mg/ml)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ (mg/ml) N=3
0.125	14.38 (2.97)	11.24 (3.11)	14.71 (1.54)	11.20
1	16.86 (0.34)	14.38 (2.97)	15.87 (1.48)	(6.71)
8	45.12 (1.04)	47.27 (4.83)	37.85 (3.32)	
20	78.02 (9.39)	79.50 (3.70)	73.88 (4.78)	

ตาราง 24 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารมาตรฐานกาลันตามีน (positive control)

ความเข้มข้น (µg/ml)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ (µg/ml) (%RSD) N=3
1.95	7.15 (1.87)	10.63 (0.48)	8.95 (1.38)	114.61 (1.63)
3.91	12.27 (1.22)	17.32 (2.78)	13.74 (1.88)	
7.81	16.80 (1.57)	24.13 (2.80)	19.41 (1.57)	
15.63	25.60 (1.28)	31.35 (0.31)	28.96 (1.39)	
31.13	36.47 (0.81)	39.18 (1.24)	37.13 (1.71)	
62.50	45.50 (1.31)	46.01 (1.56)	46.45 (1.05)	
125.00	52.49 (0.00)	50.98 (4.59)	51.36 (1.97)	
250.00	57.15 (0.65)	55.65 (2.52)	55.76 (1.15)	

ตาราง 25 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ยอด)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	8.69 (2.03)	7.86 (3.40)	9.61 (7.04)	531.96 (2.51)
39.06	12.45 (1.32)	12.09 (0.42)	11.55 (3.13)	
625	55.28 (8.13)	55.23 (7.18)	58.14 (0.86)	
750	67.00 (2.34)	72.10 (1.81)	64.87 (0.72)	

ตาราง 26 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ใบอ่อน)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	4.13 (4.60)	11.19 (6.97)	8.24 (7.45)	504.93 (2.93)
39.06	9.52 (2.80)	14.22 (1.34)	8.73 (2.55)	
625	63.48 (0.75)	65.07 (5.44)	63.00 (1.04)	
750	66.01 (0.69)	64.21 (2.25)	72.13 (0.78)	

ตาราง 27 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดใบด้วยเมทานอล (ใบโตเต็มที่)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	1.46 (4.15)	6.76 (6.90)	4.90 (3.72)	475.39 (5.52)
39.06	4.68 (1.52)	10.09 (1.35)	8.76 (1.42)	
625	67.19 (0.83)	70.89 (8.55)	72.97 (0.84)	
750	69.27 (0.76)	70.19 (5.05)	74.99 (0.75)	

ตาราง 28 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมส้ม

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) N=3
62.5	9.04 (1.44)	7.65 (1.49)	13.04 (3.30)	397.81 (9.10)
125	14.96 (1.62)	18.96 (0.37)	21.39 (2.99)	
250	32.00 (1.60)	41.39 (1.03)	30.09 (2.99)	
500	55.83 (3.80)	60.17 (2.00)	68.35 (1.90)	

ตาราง 29 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมไข่

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) N=3
62.5	10.96 (0.90)	17.39 (0.36)	15.13 (3.03)	377.74 (7.99)
125	21.57 (2.69)	22.78 (0.00)	25.04 (1.75)	
250	39.48 (1.72)	30.43 (1.15)	41.39 (1.03)	
500	62.61 (2.90)	60.52 (3.89)	66.09 (0.00)	

ตาราง 30 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมบ้าน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) N=3
125	15.30 (1.42)	13.39 (0.60)	24.87 (3.03)	546.02
250	27.83 (1.10)	22.96 (1.03)	28.17 (1.11)	(4.91)
500	49.04 (1.18)	48.52 (1.55)	46.96 (1.50)	
750	63.13 (2.95)	62.43 (2.78)	68.35 (0.95)	

ตาราง 31 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของผลมะตูมนี้

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	3.31 (1.68)	4.74 (2.44)	13.62 (2.52)	133.20 (3.09)
19.53	7.54 (1.74)	8.89 (3.15)	13.45 (1.82)	
39.06	17.39 (1.26)	14.78 (2.42)	15.80 (1.55)	
78.13	30.86 (3.23)	24.26 (3.37)	32.20 (1.42)	
156.50	55.35 (4.34)	61.82 (3.41)	59.85 (2.10)	

ตาราง 32 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของผลมะตูมไข่

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	5.85 (0.73)	15.85 (3.65)	7.52 (3.84)	136.45 (3.29)
19.53	8.80 (2.06)	13.26 (2.64)	12.60 (3.23)	
39.06	12.02 (3.28)	17.73 (4.76)	17.19 (4.04)	
78.13	27.10 (0.98)	31.69 (0.59)	30.31 (0.26)	
156.50	56.04 (13.42)	58.55 (3.25)	57.65 (2.68)	

ตาราง 33 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของผลมะตูมบ้าน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
9.77	7.58 (0.80)	6.54 (3.14)	8.12 (1.67)	124.71 (3.93)
19.53	10.32 (1.83)	12.80 (3.07)	9.85 (1.27)	
39.06	16.68 (0.86)	17.15 (2.72)	17.03 (1.41)	
78.13	36.61 (2.16)	33.66 (2.59)	34.47 (1.69)	
156.50	63.17 (8.74)	61.82 (3.41)	58.40 (7.64)	

ตาราง 34 แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารมาตรฐานมาร์มีโลซิน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	%Inhibition (%RSD)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (%RSD) N=3
39.06	4.65 (2.46)	5.56 (2.52)	5.15 (2.44)	917.97 (8.91)
78.13	7.55 (2.09)	9.36 (2.05)	8.32 (1.96)	
156.50	10.52 (3.11)	14.26 (2.04)	12.40 (2.50)	
312.50	20.74 (1.65)	25.77 (1.79)	23.27 (1.79)	
625	37.42 (2.79)	47.14 (3.68)	42.64 (2.98)	
1250	60.02 (0.91)	67.90 (1.36)	60.42 (1.14)	

บรรณานุกรม

- A.V.Badarinath, RAo, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & K.Gnanaprakash. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods:Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9), 7672-7690. doi:10.3390/molecules16097672
- Akhondzadeh, S., & Abbasi, S. H. (2006). Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 21(2), 113-118. doi:10.1177/153331750602100211
- Ali-shtayeh, M. s., Jamous, R., Abuzaitoun, S., & Qasem, I. (2014). In-vitro screening of acethylcholinestrerase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4, 381-400. doi:10.31989/ffhd.v4i9.149
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5(2), 209-219. doi:10.1586/14737159.5.2.209
- Asaduzzaman, M., Uddin, M. J., Kader, M. A., Alam, A. H., Rahman, A. A., Rashid, M., . . . Sadik, G. (2014). In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of Aegle marmelos leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, 14(1), 1-10. doi:10.1111/psyg.12031
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., & Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4126-4133. doi:10.1073/pnas.95.8.4126
- Bonesi, M., Okusa, P. N., Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Stévigny, C., . . . Menichini, F. (2011). Chemical Composition, Antioxidant Properties and Anti-cholinesterase Activity of *Cordia gillettii* (Boraginaceae) Leaves Essential Oil.

Natural Product Communications, 6(2), 1934578X1100600225.

doi:10.1177/1934578X1100600225

- Budzynska, B., Boguszewska-Czubara, A., Kruk-Slomka, M., Skalicka-Wozniak, K., Michalak, A., Musik, I., & Biala, G. (2015). Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. *Psychopharmacology*, 232(5), 931-942. doi:10.1007/s00213-014-3728-6
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., . . . Kim, S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163(6), 1161-1168. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00332-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00332-1)
- Choudhary, Y., Saxena, A., Kumar, Y., Kumar, S., & Pratap, V. (2017). Phytochemistry, Pharmacological and Traditional Uses of *Aegle marmelos*. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 5(5), 27-33.
- Dhankhar, S., Ruhil, S., Balhara, M., Dhankhar, S., & Chhillar, A. (2011). *Aegle marmelos* (Linn.) Correa: A potential source of Phytomedicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5.
- Dos Santos, T. C., Gomes, T. M., Pinto, B. A. S., Camara, A. L., & Paes, A. M. A. (2018). Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1192. doi:10.3389/fphar.2018.01192
- Eiceman, G. A., Hill, H. H., & Davani, B. (1994). Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 66(12), 621-633. doi:10.1021/ac00084a023
- Granica, S., Kiss, A. K., Jaronczyk, M., Maurin, J. K., Mazurek, A. P., & Czarnocki, Z. (2013). Synthesis of imperatorin analogs and their evaluation as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*, 346(11), 775-782. doi:10.1002/ardp.201300259
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(3), 243-265. doi:10.1517/13543776.2014.870154

- Herman, A., & Herman, A. P. (2015). Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 473-485. doi:10.1111/jphp.12334
- Jain, A., Parashar, A., Nema, R., & Narsinghani, T. (2014). High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical Tool for Chemical Analysis. *Current Research in Pharmaceutical Sciences*, 04, 8-14.
- Kaushik, P., & Kumar, S. (2018). Transcriptome Analysis of Bael (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) a Member of Family Rutaceae. *Forests*, 9(8), 450. doi:10.3390/f9080450
- Kim, D. K., Lim, J. P., Yang, J. H., Eom, D. O., Eun, J. S., & Leem, K. H. (2002). Acetylcholinesterase inhibitors from the roots of *Angelica dahurica*. *Arch Pharm Res*, 25(6), 856-859. doi:10.1007/bf02977004
- Kulshreshtha, A., & Piplani, P. (2016). Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 37(9), 1403-1435. doi:10.1007/s10072-016-2625-7
- Kumar, A., & Kumar, A. (2018). Alzheimer's Disease Therapy: Present and Future Molecules. In K. Roy (Ed.), *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease* (pp. 3-22). New York, NY: Springer New York.
- Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports* 67(2), 195-203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004
- Manandhar, B., Paudel, K. R., Sharma, B., & Karki, R. (2018). Phytochemical profile and pharmacological activity of *Aegle marmelos* Linn. *Journal of Integrative Medicine*, 16(3), 153-163. doi:10.1016/j.joim.2018.04.007
- Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 51-54. doi:10.1002/pca.623
- Mohamed, T., Shakeri, A., & Rao, P. P. (2016). Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 113, 258-272. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.049

- National Center for Biotechnology Information. (2004). Limonene. Retrieved from สืบค้นจาก <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene>
- National Center for Biotechnology Information. (2005). Imperatorin. Retrieved from สืบค้นจาก <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imperatorin>
- National Center for Biotechnology Information. (2007). Aegeline.
- National Center for Biotechnology Information. (2013). Genbank. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. doi:10.1039/c4ra13315c
- Nirupama, G. S., Padmasri, G., Ramesh, R. V., & Vasanthi, M. (2012). Comparative analysis of phytochemical constituents present in various parts of Aegle marmelos. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S774-S777. doi:[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60263-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60263-1)
- Orhan, I., Tosun, F., & sener, B. (2008). Coumarin, anthroquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(5-6), 366-370.
- Öztürk, M. (2012). Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (Satureja thymbra L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134(1), 48-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.054>
- Pati, R., & Muthukumar, M. (2013). Genetic Transformation of Bael (Aegle marmelos Corr.). 343-365. doi:10.1007/978-94-007-5500-0_14
- Pyrzynska, K., & Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288-4295.
- Roberson, E. D., & Mucke, L. (2006). 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*, 314(5800), 781-784. doi:10.1126/science.1132813
- Samaradivakara, S. P., Samarasekera, R., Handunnetti, S. M., & Weerasena, O. V. D. S. J. (2016). Cholinesterase, protease inhibitory and antioxidant capacities of Sri Lankan medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 83, 227-234. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.047>

- Shah, B. B., & Mehta, A. A. (2018). In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(6), 883-887.
doi:10.31024/ajpp.2018.4.6.25
- Shailajan, S., Menon, S., & Hande, H. (2011). Method validation of marmelosin from fruit pulp of *Aegle marmelos* (L.) correa using HPTLC technique. *J Pharm Res*, 4, 1353-1355.
- Shalaby, A. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 528-539.
doi:10.5897/AJPP2013.3474
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., & Omura, M. (2005). Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*, 105(4), 507-512. doi:10.1016/j.scienta.2005.02.009
- Shinde, P. B., & Laddha, K. S. (2014). Simultaneous Quantification of Furanocoumarins from *Aegle marmelos* Fruit Pulp Extract. *Journal of Chromatographic Science*, 53(4), 576-579. doi:10.1093/chromsci/bmu087
- Shinde, P. B., & Laddha, K. S. (2015). Simultaneous quantification of furanocoumarins from *Aegle marmelos* fruit pulp extract. *J Chromatogr Sci*, 53(4), 576-579.
doi:10.1093/chromsci/bmu087
- Sigurdsson, S., & Gudbjarnason, S. (2007). Inhibition of acetylcholinesterase by extracts and constituents from *Angelica archangelica* and *Geranium sylvaticum*. *Z Naturforsch C J Biosci*, 62(9-10), 689-693. doi:10.1515/znc-2007-9-1011
- Singhal, A., Bangar, O., & Naithani, V. (2012). Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *International journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(2), 84. doi:10.4103/2231-0738.95927
- Sloane, P. D., Zimmerman, S., Suchindran, C., Reed, P., Wang, L., Boustani, M., & Sudha, S. (2002). The Public Health Impact of Alzheimer's Disease, 2000–2050: Potential Implication of Treatment Advances. *Annual Review of Public Health*, 23(1), 213-231. doi:10.1146/annurev.publhealth.23.100901.140525
- Somani, G., Kulkarni, C., Shinde, P., Shelke, R., Laddha, K., & Sathaye, S. (2015). In vitro

- acetylcholinesterase inhibition by psoralen using molecular docking and enzymatic studies. *J Pharm Bioallied Sci*, 7(1), 32-36. doi:10.4103/0975-7406.148775
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2020). ENZYME class: 4.2.3. Retrieved from <https://enzyme.expasy.org/EC/4.2.3.->. <https://enzyme.expasy.org/EC/4.2.3.->
- Tsuro, M., & Asada, S. (2013). Differential expression of limonene synthase gene affects production and composition of essential oils in leaf and floret of transgenic lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel.). *Plant Biotechnology Reports*, 8(2), 193-201. doi:10.1007/s11816-013-0309-9
- Tun, T., & Kang, Y. S. (2017). Imperatorin is Transported through Blood-Brain Barrier by Carrier-Mediated Transporters. *Biomol Ther (Seoul)*, 25(4), 441-451. doi:10.4062/biomolther.2017.082
- Verma, R. S., Padalia, R. C., & Chauhan, A. (2014). Essential oil composition of *Aegle marmelos*(L.) Correa: chemotypic and seasonal variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1904-1913. doi:10.1002/jsfa.6510
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Targowska-Duda, K., Klimek, K., Ginalska, G., JóŹwiak, K., Waksmundzka-Hajnos, M., & CieŹla, L. (2017). Volatile terpenoids as potential drug leads in Alzheimer's disease. *Open Chemistry*, 15(1). doi:10.1515/chem-2017-0040
- Wojtunik, K. A., Ciesla, L. M., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2014). Model Studies on the Antioxidant Activity of Common Terpenoid Constituents of Essential Oils by Means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(37), 9088-9094. doi:10.1021/jf502857s
- โครงการการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ. (2554). การประเมินต้นทุนอรรถประโยชน์ของการใช้ยาในกลุ่ม Acetylcholinesterase inhibitors ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ระดับรุนแรง น้อยถึงปานกลาง Retrieved from สืบค้นจาก <http://www.hitap.net/research/17516>
- โครงการการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ. (2556). อัลไซเมอร์...มหันตภัยร้ายในบั้นปลายชีวิต. Retrieved from สืบค้นจาก <http://www.hitap.net/17313>
- ดวงจันทร์ เกียรติสุวรรณ. (2546). พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยา ตอน "มะตูม" Retrieved from สืบค้นจาก http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio46-47/46-

[470007.htm](#))

วรรณ สิทธิถาวร, รุ่งเพชร แก้วเกษ, & อมรทัศน์ สดใส. (2559). การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรใน
ตำรับตรีเฮอร์มาศ และศึกษาฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกัน (*immunomodulator activity*) และ
ฤทธิ์ต้าน *oxidative stress*. Retrieved from



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

ภิญญาภัทร ธัญญ์สิน

วัน เดือน ปี เกิด

26 กรกฎาคม 2531

สถานที่เกิด

สมุทรปราการ

วุฒิการศึกษา

พ.ศ. 2557 เกษตรศาสตรบัณฑิต สาขาบริหารเกษตรกรรม

จาก มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

