



การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาสุข
ไสยาสน์ และการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SUK SAI-
YAD HERBAL REMEDY EXTRACTS AND QUALITY CONTROL BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

สุวิมล สุ่มลตรี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคไลน์เอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาสุข
ไสยาสน์ และการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SUK SAI-
YAD HERBAL REMEDY EXTRACTS AND QUALITY CONTROL BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY
(Ph.D. (Science of Pharmaceutical Products))
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาสุข
ไสยาสน์ และการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

ของ

สุวิมล สุมลตรี

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตตา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (รองศาสตราจารย์ ดร.วพพรรณ สิทธิถาวร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา ฉัตรวีระสกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาสุขไสยาสน์ และการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี
ผู้วิจัย	สุวิมล สุมลตรี
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามิ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตำรับยาสุขไสยาสน์ รวมถึงการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และสารแคนนาบินไดออลในตำรับยาสุขไสยาสน์ ซึ่งมีส่วนผสมของใบกัญชา โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ พบว่า ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.005 ถึง 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีค่า $R > 0.9999$ โดยสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลมีและแคนนาบินไดออลมีขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 0.9706 และ 0.3973 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณในการวิเคราะห์ 0.1 ไมโครกรัม ผลการทดสอบความแม่นยำ ในช่วง 98.98 % ถึง 103.72 % มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ในวันเดียวกัน (intra-day) อยู่ในช่วง 0.59 % ถึง 2.09 % และต่างวัน อยู่ในช่วง 1.09 % ถึง 2.06 % และไม่พบการรบกวนขององค์ประกอบอื่น ๆ ในตำรับยา การสกัดสารตำรับยาสุขไสยาสน์ จากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 7 แหล่ง ให้ร้อยละผลผลิต (%yield) อยู่ในช่วง 3.12% ถึง 33.89% การวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและแคนนาบินไดออลในตำรับยาสุขไสยาสน์ 30 กรัม ซึ่งประกอบด้วยใบกัญชา 4.61 กรัม (15.38%) ตรวจพบปริมาณแคนนาบินไดออล ในใบกัญชา ช่วง 0.00002 ถึง 0.01541% และปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในใบกัญชา ช่วง 0.00231 ถึง 0.14218% ซึ่งไม่เกิน 0.2% ตามที่กฎหมายกำหนด เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดตำรับยาสุขไสยาสน์ ด้วยวิธี Ellman's method พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาสุขไสยาสน์ด้วยวิธี DPPH scavenging assay ในชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและชั้นตัวทำละลายเอทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 153.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และ 16.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ การศึกษาจับกันระหว่างโมเลกุลของสารสำคัญในตำรับยาสุขไสยาสน์กับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (PDB: 7E3H) โดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina พบว่าสารที่มีการยึดจับกับโปรตีนได้ดีที่สุด คือ piperine และ dehydropipermonaline ซึ่งสอดคล้องกับกฎของ Lipinski's rule of five และสามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ มีพลังงานการยึดจับที่ดีที่สุด -10.5 กิโลแคลอรี/โมล รองลงมาคือ Δ^9 -THC และ piperdardine ค่าพลังงานการยึดจับที่ -10.3 กิโลแคลอรี/โมล และ N-trans-coumaroyltyramine ค่าพลังงานการยึดจับที่ -10.2 กิโลแคลอรี/โมล เกิด Pi-Pi Stacked ระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนในตำแหน่ง TRP 86A, TRP 286A และ TYR 341A ซึ่งเกิดตำแหน่งเดียวกับยา Donepezil ที่ให้ค่าพลังงานการยึดจับที่ -11.7 kcal/mol ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ ที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมอง ดังนั้น สารสำคัญในตำรับยาสุขไสยาสน์จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

คำสำคัญ : โรคอัลไซเมอร์, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, โมเลกุลลาร์ต็อกกิ่ง, ตำรับยาสุขไสยาสน์, การควบคุมคุณภาพ, เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

Title	ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SUK SAI-YAD HERBAL REMEDY EXTRACTS AND QUALITY CONTROL BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY
Author	SUWIMON SUMONTRI
Degree	DOCTOR OF PHILOSOPHY
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Weerasak Samee , Ph.D.
Co Advisor	Associate Professor Dr. Sarin Tadtong , Ph.D.

This study aims to investigate the acetylcholinesterase inhibitory activity and antioxidant effects of the Suksaiyad herbal remedy, as well as develop methods for analyzing delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD) in the Suksaiyad remedy, that includes cannabis leaves, using liquid chromatography-mass spectrometry techniques. The method development results showed a linear concentration range of 0.005–20 $\mu\text{g/ml}$ with $R > 0.9999$. The limit of quantitation (LOQ) for Δ^9 -THC and CBD was 0.9706 and 0.3973 ng/ml, respectively, using an injection volume of 0.1 μl . The accuracy of the instrument and method, reported as average % recovery, ranged from 98.98% to 103.72%. The precision, reported as % RSD, ranged from 0.59% to 2.09% for intra-day and from 1.09% to 2.06% for inter-day. No interference from other components in the Suksaiyad remedy was found. The extraction of the Suksaiyad remedy from seven sources yielded crude extract amounts ranging from 3.12% to 33.89%. Analysis of Δ^9 -THC and CBD content in 30 grams of crude extract containing 4.61 grams (15.38%) of cannabis leaves showed CBD content ranging from 0.00002% to 0.01541% and Δ^9 -THC content ranging from 0.00231% to 0.14218%, which does not exceed the legal limit of 0.2%. The acetylcholinesterase inhibitory activity of the Suksaiyad remedy dichloromethane extract, tested using Ellman's method, showed an IC_{50} value of 1.34 mg/ml. The antioxidant activity, tested using the DPPH scavenging assay, showed that the dichloromethane and ethanol extracts had antioxidant effects, with IC_{50} values of 153.93 $\mu\text{g/ml}$ and 16.76 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The molecular docking study of the interactions between key compounds in the Suksaiyad formula and acetylcholinesterase enzyme (PDB: 7E3H) using AutoDock Vina software indicated that piperine and dehydropipernonaline, which follows Lipinski's rule of five and crosses the blood-brain barrier, had the best binding energy at -10.5 kcal/mol. This was followed by Δ^9 -THC and piperdardine with binding energies of -10.3 kcal/mol, and N-trans-coumaroyltyramine with a binding energy of -10.2 kcal/mol. These compounds showed Pi-Pi stacking interactions with amino acids at positions TRP 86A, TRP 286A, and TYR 341A, similar to the binding site of Donepezil, a drug used to treat Alzheimer's disease, which had a binding energy of -11.7 kcal/mol. Therefore, the key compounds in the Suksaiyad formula have potential for development as drugs for treating Alzheimer's disease.

Keyword : Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase inhibitory, Antioxidant activity, Molecular docking, Suksaiyad remedy, Quality control, LC-MS/MS

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสะดวกตากรุณาช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดี ยิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่อง จากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามิ และรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ได้ให้ความ ความสะดวกตากรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษ และการทำงานปริญญานิพนธ์นี้ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา

รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ จิตตสุโก รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา ฉัตรวิระสกุล ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะต่าง ๆ เพิ่มเติมแก่ผู้วิจัย ทำให้ ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และกรรมการบริหารหลักสูตรสาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่าง ๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ เพื่อนร่วมงาน ที่บัณฑิตวิทยาลัยสำหรับข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ใน งานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงความช่วยเหลือและกำลังใจให้กับผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ รวมถึงบุคคลอีกหลายท่าน ที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนให้ ความรู้เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

สุวิมล สุมลตรี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฐ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา.....	3
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย	5
สมมติฐานของงานวิจัย.....	5
บทที่ 2.....	6
ทบทวนวรรณกรรม	6
2.1 ภาวะสมองเสื่อม (dementia)	6
2.2 ชนิดของโรคอัลไซเมอร์.....	6
2.3 ระบาดวิทยาของภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์.....	7
2.4 สาเหตุและพยาธิวิทยาของโรคอัลไซเมอร์	8
2.5 การรักษาโรคอัลไซเมอร์.....	10

2.6 เอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE).....	11
2.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method.....	12
2.8 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	13
2.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay.....	14
2.10 เทคนิคโมเลกุลาร์ดocking (Molecular docking).....	15
2.11 การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร	15
2.12 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	16
2.13 ยาสมุนไพร.....	17
2.14 องค์ประกอบสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพร.....	18
บทที่ 3.....	36
วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
1. อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	36
2. สารเคมีที่ใช้.....	37
3. การเตรียมสมุนไพร	38
3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการแช่สกัดด้วย dichloromethane	38
3.2 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมักด้วย 95% ethanol	38
4. วิธีการทดลอง	39
5. การวิเคราะห์หาปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในสารสกัดตำรับยาสมุนไพร.....	43
6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase	43
7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay	45
8. การทำโมเลกุลาร์ดocking (Molecular docking)	46
บทที่ 4.....	48
ผลการวิจัย	48

4.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC และ CBD ด้วยเทคนิค LC-MS-MS	48
4.2 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability)	51
4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	54
4.4 ผลการคัดเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัด Δ^9 -THC และ CBD โดยใช้พารามิเตอร์การ ละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter, HSP)	62
4.5 ประสิทธิภาพของไดคลอโรมีเทนในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับยา ศุขไสยาสน์	66
4.6 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบ (Crude extract) ของตำรับยาศุขไสยาสน์	68
4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในสารสกัดหยาบตำรับยาศุขไสยาสน์	69
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase	71
4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	72
4.10 ผลการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารสำคัญในตำรับยาศุขไสยาสน์ด้วยเทคนิค โมเลกุลาร์ดอกกิง	73
บทที่ 5	103
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	103
บรรณานุกรม	109
ประวัติผู้เขียน	126

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 องค์ประกอบสารสำคัญในตำรับยาสุขไสยาสน์.....	18
ตาราง 2 แสดงข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาสุขไสยาสน์.....	31
ตาราง 3 เกณฑ์ที่ยอมรับ system suitability.....	40
ตาราง 4 เกณฑ์ที่ยอมรับ %recovery ตาม AOAC 2012.....	42
ตาราง 5 เกณฑ์ที่ยอมรับ %RSD ตาม AOAC 2012.....	43
ตาราง 6 ขั้นตอนการปิเปตสารลงใน 96 well plate ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay.....	46
ตาราง 7 Precursor และ fragment ions รวมถึง MS parameters ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Δ^9 -THC and CBD ด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	50
ตาราง 8 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability).....	51
ตาราง 9 ผลการทดสอบ linearity และ range ของ CBD.....	55
ตาราง 10 ผลการทดสอบ linearity และ range ของ Δ^9 -THC.....	56
ตาราง 11 คำนวณ LOD และ LOQ ของ CBD จากสมการเส้นตรง.....	57
ตาราง 12 คำนวณ LOD และ LOQ ของ Δ^9 -THC จากสมการเส้นตรง.....	58
ตาราง 13 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ CBD.....	59
ตาราง 14 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC.....	61
ตาราง 15 แสดงผลการคำนวณค่า Radius (Ra) ระหว่างค่า HSP ของ Δ^9 -THC และ CBD.....	65
ตาราง 16 ประสิทธิภาพของไดคลอโรมีเทน ในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับยา สุข ไสยาสน์.....	68
ตาราง 17 แสดงน้ำหนักสารสกัดหยาบและร้อยละผลผลิต (%yield) ในการสกัดผงยาสุขไสยาสน์ ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน.....	69

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ในสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml	69
ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD ในสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml	70
ตาราง 20 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารมาตรฐาน galantamine สารสกัดจากตำรับยาคุชไสยาสน์	71
ตาราง 21 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดที่ใช้โคคลอโรมีเทนและเอทานอลในการสกัด	72
ตาราง 22 แสดงค่าพลังงานการยึดจับ (Binding Energy) (ในหน่วย kcal/mol) ระหว่างโปรตีน กับลิแกนด์และสมุนไพรรองลิแกนด์	75
ตาราง 23 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	83
ตาราง 24 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มอัลคาลอยด์	85
ตาราง 25 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์	86
ตาราง 26 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเทอร์ปีน	88
ตาราง 27 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มลิแกน	93
ตาราง 28 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มสเตียรอยด์.....	93
ตาราง 29 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟีนอลิก	94
ตาราง 30 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์	95
ตาราง 31 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์.....	96
ตาราง 32 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตน	97
ตาราง 33 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่ม Fat hydrocarbon	98
ตาราง 34 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันอัลโดคิโตน.....	98
ตาราง 35 คุณสมบัติทางกายภาพของสารฟังก์ชันเอสเทอร์	99
ตาราง 36 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มกรดไขมัน.....	100
ตาราง 37 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์	101
ตาราง 38 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์.....	102

ตาราง 39 แสดงรูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย

..... 114



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะเซทิลโคลีน	8
ภาพประกอบ 2 กระบวนการสังเคราะห์ acetylcholine	9
ภาพประกอบ 3 การจับของ acetylcholine ที่บริเวณ active site ของ acetylcholinesterase ...	11
ภาพประกอบ 4 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง acetylcholinesterase	12
ภาพประกอบ 5 วิธี DPPH Scavenging Assay	14
ภาพประกอบ 6 คัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ ตำรับยาสุขไสยาสน์.....	18
ภาพประกอบ 7 Mass fragmentation spectra ของ Δ^9 -THC ใน ESI positive mode.	49
ภาพประกอบ 8 Mass fragmentation spectra ของ CBD ใน ESI positive mode.	49
ภาพประกอบ 9 Proposed fragments ของ Δ^9 -THC และ CBD ใน ESI positive mode.....	50
ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารสกัดตำรับสุขไสยาสน์ ที่ spike สารมาตรฐาน CBD และ Δ^9 -THC	54
ภาพประกอบ 11 การคำนวณค่า Hansen Solubility Parameters ของ Δ^9 -THC	63
ภาพประกอบ 12 การคำนวณค่า Hansen Solubility Parameters ของ CBD.....	64
ภาพประกอบ 13 LC-MS/MS chromatograms ของการสกัดครั้งที่ 1, 2 และ 3 ของ (a-c) ตำรับสุขไสยาสน์ (d-f) ภาพขยายโครมาโทแกรม และ (g-i) ภาพขยายโครมาโทแกรมของสารสกัดที่พบ CBD ปริมาณสูง	67
ภาพประกอบ 14 แสดงลิแกนด์ E20 (donepezil).....	73
ภาพประกอบ 15 การจับและพันธะระหว่าง β -selinene และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของสมมูล	110
ภาพประกอบ 16 การจับและพันธะระหว่าง dithymoquinone และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของเทียบด้า.....	110

ภาพประกอบ 17 การจับและพันธะระหว่าง dehydrocostus lactone และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของโกลูกระดุก.....	111
ภาพประกอบ 18 การจับและพันธะระหว่าง mokko lactone และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของโกลูกระดุก	111
ภาพประกอบ 19 การจับและพันธะระหว่าง cynaropicrin และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของโกลูกระดุก.....	111
ภาพประกอบ 20 การจับและพันธะระหว่าง α -Copaene และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของลูกันท์	112
ภาพประกอบ 21 การจับและพันธะระหว่าง mesuaferone B และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของขุนาค.....	112
ภาพประกอบ 22 การจับและพันธะระหว่าง piperine และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของดีปี้และพริกไทย	112
ภาพประกอบ 23 การจับและพันธะระหว่าง dehydropipernonaline และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของดีปี้และพริกไทย	113
ภาพประกอบ 24 การจับและพันธะระหว่าง β -sesquiphellandrene และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของชิงแห้ง.....	113
ภาพประกอบ 25 การจับและพันธะระหว่าง cannflavin B และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของกัญชา	113

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ตำรายาศาสตร์ไสยาศน์ มีข้อบ่งใช้ในการบรรเทาอาการนอนไม่หลับ เป็นตำรายาอยู่ในคัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ และปัจจุบันได้รับการรับรองให้เป็นรายการยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ประกอบด้วย การบูร 1 ส่วน ใบสะเดา 2 ส่วน หัสคุณเทศ 3 ส่วน สมุลแว้ง 4 ส่วน เทียนดำ 5 ส่วน โกฐกระดูก 6 ส่วน ลูกจันทน์ 7 ส่วน ดอกบุนนาค 8 ส่วน พริกไทย 9 ส่วน ชিংแห้ง 10 ส่วน ดีปลี 11 ส่วน ใบกัญชา 12 ส่วน ("ราชกิจจานุเบกษา," 2565, 18 กุมภาพันธ์) ตามประกาศราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 30 ง ลงวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2564 ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC) สารแคนนาบิไดออล (Cannabidiol, CBD) หรือสารประกอบอื่นในกัญชง (Hemp) และตรวจวิเคราะห์ตำรายาที่มีกัญชงปรุงผสมอยู่ พ.ศ. 2564 กำหนดให้มีการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Δ^9 -THC, CBD หรือสารประกอบอื่นในกัญชง (Hemp) โดยใช้เครื่องมือหรือวิธีทดสอบที่มีความเหมาะสมว่าถูกต้องแม่นยำ เชื่อถือได้ ซึ่งตรวจโดยใช้เครื่องมือใช้หลักการโครมาโตกราฟี ("ราชกิจจานุเบกษา," 2564, 8 กุมภาพันธ์) มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดใบกัญชามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase, AChE) โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 30 $\mu\text{g/ml}$ (Erukainure, Matsabisa, Salau, และ Islam, 2020) ซึ่งตำรับนี้มีกัญชา 12 ใน 78 ส่วน หรือร้อยละ 15.38 จึงเป็นตัวยาหลักรองลงมา คือ พริกไทย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.46 $\mu\text{g/ml}$ (Tappayuthpijarn, Sattaponpan, Sakpakdeecharoen, และ Ittharat, 2012) ดีปลี IC_{50} เท่ากับ 51.60 $\mu\text{g/ml}$ (Tappayuthpijarn และคนอื่น ๆ, 2012) และชিংแห้ง IC_{50} มากกว่า 300 $\mu\text{g/ml}$ (Tappayuthpijarn และคนอื่น ๆ, 2012) สารสกัดจากลูกจันทน์ และชিংแห้งที่เป็นส่วนประกอบของตำรายาศาสตร์ไสยาศน์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ $48.2 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ (S, R, Phornchirasilp, Temsiririrkkul, และ N, 2015) และ $52.5 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$ (S และคนอื่น ๆ, 2015) ตามลำดับ

เอนไซม์ AChE มีหน้าที่ในการทำลาย acetylcholine ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปที่บริเวณรอยต่อประสาท (synaptic gap) ของระบบประสาท การที่ร่างกายขาด acetylcholine อาจทำให้เกิดอาการหรือโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ เช่น โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (myasthenia gravis) โรคต้อกระจก (glaucoma) โรคสมองเสื่อมจากลิวี่ บอดี้ (lewy body

dementia) และ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นต้น (ตริทิพย์ รัตนวรชัย, 2564) ในปัจจุบันมียาในกลุ่ม acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) ที่สามารถยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ AChE เช่น donepezil, rivastigmine และ galantamine เป็นต้น (ตริทิพย์ รัตนวรชัย, 2564) จากการศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสาร Δ^9 -THC และ CBD ที่พบในกัญชา กับเอนไซม์ AChE เปรียบเทียบกับยา Donepezil พบว่า จากผลโมเลกุลาร์ดอกกิง มีค่า binding affinity สาร Δ^9 -THC เท่ากับ -9.3 Kcal/mol, สาร CBD เท่ากับ -7.5 Kcal/mol และยา Donepezil เท่ากับ -8.3 Kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งการศึกษานี้ พบว่าสาร Δ^9 -THC และ CBD ที่พบในกัญชามีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ในอนาคต (Furqan และคนอื่น ๆ, 2020)

ปัจจุบันตำรับยาสมุนไพร ยังไม่มีการพัฒนาวิธีการสกัดสาร การวิเคราะห์เพื่อควบคุมปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD โดยใช้เครื่องมือหรือวิธีทดสอบที่มีความเหมาะสมว่าถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS-MS) ในสารสกัดจากตำรับยาสมุนไพร นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังสนใจศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ AChE ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาสมุนไพร เพื่อเป็นแนวทางในการนำตำรับยาสมุนไพร มาป้องกันรักษาโรคอัลไซเมอร์

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE จากสารสกัดตำรับยาสมุนไพร
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดตำรับยาสมุนไพร
3. เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดและการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี
4. เพื่อศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพรกับเอนไซม์ AChE ด้วยเทคนิค molecular docking

ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา

1. การสกัดตำรับยาสมุนไพร

ตัวแปรต้น: วิธีการสกัดสาร

ตัวแปรตาม: ปริมาณ $\Delta 9$ -THC และ CBD

ตัวแปรควบคุม: ปริมาณผงยาสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด

ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE

ตัวแปรต้น: ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาสมุนไพร

ตัวแปรตาม: ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ AChE (%inhibition) ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

ตัวแปรควบคุม: ความเข้มข้นของ TRIS/HCl buffer

pH ของ TRIS/HCl

ความเข้มข้นของเอนไซม์ AChE

ความเข้มข้นของ DTNB

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตัวแปรต้น: ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาสมุนไพร

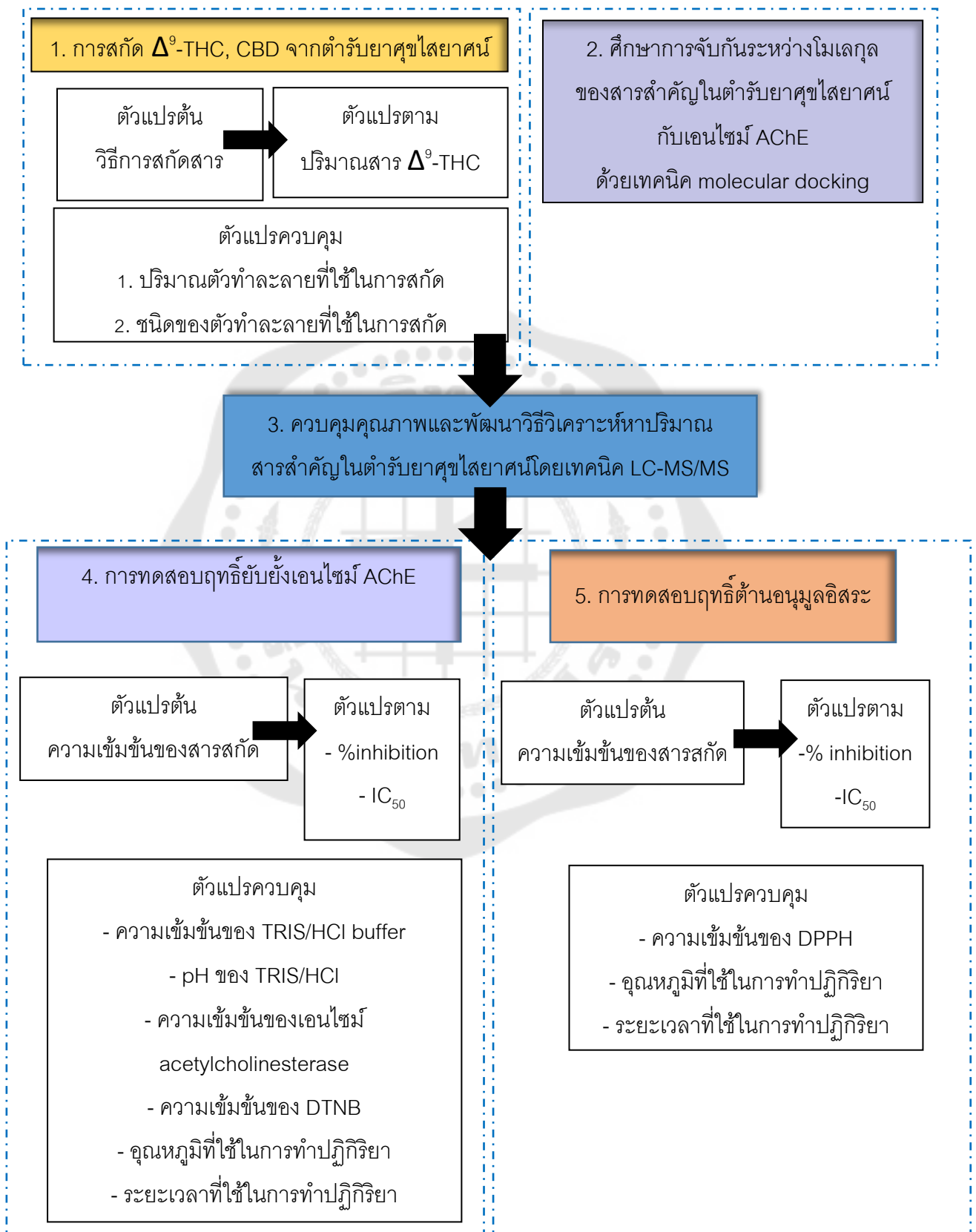
ตัวแปรตาม: % radical scavenging

ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาสมุนไพร

ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

ตัวแปรควบคุม: ความเข้มข้นของ DPPH อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในตำรับยาสมุนไพรไทย การควบคุมคุณภาพตำรับยาสมุนไพรไทย ตาม The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2012 ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของพืชสมุนไพรจากแหล่งต่างๆ รวมทั้ง และศึกษาการจับกันระหว่างสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพรไทย กับเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยเทคนิค molecular docking

สมมติฐานของงานวิจัย

1. สารสกัดตำรับยาสมุนไพรไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรไทยได้ถูกต้อง แม่นยำ ตามเกณฑ์มาตรฐานของ The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2012



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ภาวะสมองเสื่อม (dementia)

จากข้อมูลประชากรของประเทศไทย พ.ศ. 2564 จำนวนประชากรในประเทศไทยอยู่ที่ 66,171,439 ล้านคน เป็นผู้มีอายุ 60 ปีขึ้นไป 7,432,385 คน หรือ คิดเป็นร้อยละ 11.23 ของประชากรทั้งหมด แสดงถึง ประเทศไทยก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุแล้ว (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2564) ปัจจุบันโรคที่มีสาเหตุจากการเสื่อมของร่างกายมีอุบัติการณ์ที่มากขึ้น เนื่องจากช่วงชีวิตของประชากรมีความยืนยาว ผู้สูงอายุจึงมีจำนวนมากขึ้นด้วย ทำให้โรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของร่างกาย มีโอกาสพบมากขึ้น ได้แก่ โรคหลอดเลือด โรคกระดูก โรคไขข้อ โรคเนื้องอก รวมทั้งโรคสมองเสื่อม ซึ่งมีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อกล่าวถึงโรคสมองเสื่อม หรือ dementia

ภาวะสมองเสื่อม (dementia) เป็นคำโดยรวมสำหรับกลุ่มอาการเฉพาะของภาวะสมองเสื่อมที่มักจะพบปัญหาเรื่องความจำ การใช้ภาษา การแก้ปัญหา และทักษะการคิดอื่น ๆ ภาวะสมองเสื่อมมีหลายชนิด โดยแบ่งตามสาเหตุของการเกิด ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) โรคสมองเสื่อมจากลิวบอดี (Lew body dementia) โรคสมองส่วนหน้าเสื่อม (frontotemporal dementia) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) สำหรับโรคอัลไซเมอร์จัดเป็นอาการสมองเสื่อมที่พบมากที่สุด โดยคิดเป็น 50-75% ของการเกิดสมองเสื่อมทั้งหมด (วิณา จิรัจฉริยากุล และคนอื่น ๆ, 2561) พบว่าชนิดของโรคสมองเสื่อมที่พบมากที่สุด คือ โรคอัลไซเมอร์ สาเหตุของโรคส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมแต่ส่วนใหญ่ เป็นการเสื่อมของสมองตามอายุขัย หรือจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมทำให้มีการตายของเซลล์ประสาท cholinergic ในบริเวณสมองส่วนหน้า (basal forebrain) ซึ่งส่ง axon มาที่ cerebral cortex และ hippocampus ทำให้การทำงานของเซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus ที่เกี่ยวข้องกับความจำลดลง (มณี ภิญญพรพาณิชย์, กนกพร ภิญญพรพาณิชย์, และ อธิวัฒน์ สุนทรพันธ์, 2563)

2.2 ชนิดของโรคอัลไซเมอร์

2.2.1 ชนิดที่มีอาการเมื่ออายุมาก (late onset) (มณี ภิญญพรพาณิชย์ และคนอื่น ๆ, 2563)พบได้ประมาณร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ เกิดอาการเมื่ออายุมากกว่า 65 ปี สาเหตุของโรคนี้เกิดจากปัจจัยหลายอย่างร่วมกันทั้งพันธุกรรม วิถีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ยังไม่มียืนยันเฉพาะที่เป็นสาเหตุของโรคโดยตรง แต่พบยีนที่สร้างโปรตีน อะโปไลโปโปรตีน 4

(apolipoprotein E ϵ 4 หรือ APOE ϵ 4 gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 19 เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์มากขึ้น การมียีนนี้หนึ่งตำแหน่งจะเพิ่มความเสี่ยง 2-3 เท่า และถ้ามียีนนี้สองตำแหน่งจะเพิ่มความเสี่ยงสูงถึง 8-12 เท่า อย่างไรก็ตามบางคนที่มีอาการของโรคอัลไซเมอร์แต่ตรวจไม่พบยีนนี้ก็มี

2.2.2 ชนิดที่มีอาการเมื่ออายุน้อย (early onset) (มณี ภิญญพรพาณิชย์ และคนอื่น ๆ, 2563) พบได้ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ เริ่มเกิดอาการเมื่ออายุประมาณ 30-60 ปี ชนิดนี้มักถ่ายทอดทางพันธุกรรม (familial Alzheimer's disease; FAD) พบว่าลูกที่เกิดจากพ่อหรือแม่ที่เป็นพาหะของยีนที่กลายพันธุ์บนบนโครโมโซมคู่ที่ 1, 14 หรือ 21 และมีอาการของโรคอัลไซเมอร์ มีโอกาสที่ลูกจะมีอาการของโรคอัลไซเมอร์ตอนอายุน้อยถึง 50:50 การกลายพันธุ์ของยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 1, 14 และ 21 ทำให้เกิดโปรตีนผิดปกติต่างกัน

2.3 ระบาดวิทยาของภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์

ภาวะสมองเสื่อมเป็นภาวะที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2564 ทั่วโลก มีผู้ป่วยสมองเสื่อม 55 ล้านคน และคาดว่าจะปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้ป่วยสมองเสื่อม เพิ่มขึ้นจำนวน 40% เป็น 78 ล้านคน และ ในปี พ.ศ. 2593 จำนวน 139 ล้านคน

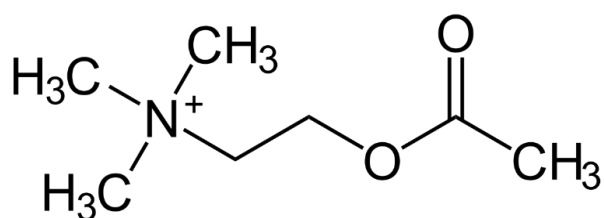
สำหรับประเทศไทย โครงสร้างอายุของประชากรไทยมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน ประเทศไทยได้กลายเป็นสังคมสูงวัยมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 คือมีสัดส่วนประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไป สูงถึงร้อยละ 10 ของประชากรที่ 63 ล้าน ในขณะที่ปี พ.ศ. 2503 ประเทศไทยมีประชากร 60 ล้านคน แต่มีผู้สูงอายุเพียง 1 ล้านคน แสดงให้เห็นว่าประชากรสูงอายุเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่เร็วมาก คือ สูงกว่าร้อยละ 4 ต่อปี ในปี พ.ศ. 2564 จำนวนประชากรในประเทศไทยอยู่ที่ 66,171,439 ล้านคน เป็นผู้มีอายุ 60 ปีขึ้นไป 7,432,385 คน หรือ คิดเป็นร้อยละ 11.23 ของประชากรทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุแล้ว และจะเป็นสังคมผู้สูงอายุระดับสุดยอดเมื่อมีสัดส่วนประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไป สูงถึงร้อยละ 25 ในปี พ.ศ. 2574 การที่ไทยมีสัดส่วนของผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นเพราะอัตราการเกิดที่ลดลง และอายุของคนไทยยืนยาวขึ้น จากสถิติและการคาดการณ์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปัญหาโรคอัลไซเมอร์เป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลก จึงต้องมีการค้นคว้าหาการรักษาเพื่อให้ผู้ป่วยอยู่อย่างมีคุณภาพชีวิตที่ดีต่อไป (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และรัตนปณณท์, 2550)

2.4 สาเหตุและพยาธิวิทยาของโรคอัลไซเมอร์

สมองเป็นอวัยวะที่สำคัญในการประมวลผลความรู้สึกและตอบสนองต่อสิ่งต่าง ๆ ภายในสมอง ประกอบด้วย เซลล์ประสาท (neuron) มากกว่าแสนล้าน (10^{11}) เซลล์ซึ่งทำหน้าที่ในการรับและประมวลผลข้อมูลทั้งหลายรวมถึงจัดส่งคำสั่งไปยังอวัยวะเป้าหมายต่าง ๆ นอกจากนี้ในสมองยังประกอบด้วยเซลล์ชนิดอื่นด้วยคือ เซลล์นิวโรเกลีย (neuroglia cells) ทำหน้าที่ช่วยเหลือเกื้อหนุนการทำงานของเซลล์ประสาท และปกป้องตลอดจนนำส่งสารจำเป็นต่าง ๆ ให้แก่เซลล์ประสาท การติดต่อสื่อสารระหว่างสมองและอวัยวะอื่นสามารถทำได้โดยผ่านทางระบบประสาท ระบบเลือด น้ำไขสันหลัง มีความสำคัญต่อการทำงานของสมอง น้ำไขสันหลัง ที่อยู่ในโพรงช่องว่างของสมองจะช่วยรักษาสภาพความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารเคมีภายใน เพื่อให้สมองอยู่ในภาวะที่ทำงานเป็นปกติได้ตลอดเวลา ทั้งนี้สมองมีคุณสมบัติพิเศษ เรียกว่า พลาสติกซิตี (plasticity) เป็นกระบวนการที่สมองสามารถปรับตัวตอบสนองทดแทนการเปลี่ยนแปลงได้ระยะยาว สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามสิ่งเร้าทั้งภายในและภายนอก ทำให้เกิดการเรียนรู้และแก้ไขกลับคืนจากความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ เซลล์ประสาทในสมองมีระบบการทำงานสื่อสารอย่างดี วิธีหนึ่งที่จำเพาะ คือ การสื่อสารผ่านสารเคมี โดยสารสื่อประสาท (neurotransmitters) และสารปรับประสาท (neuromodulators) จะปล่อยออกมาบริเวณที่เรียกว่า จุดประสานประสาท (synapse) ทำให้เกิดการส่งผ่านข้อมูลไปยังเป้าหมาย สารสื่อประสาทและสารปรับประสาทนี้ ทำให้ร่างกายเกิดความสามารถที่จะปรับเปลี่ยนได้ตามสถานการณ์ ตอบสนองต่อเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นปรับตัวอยู่ในสภาวะสมดุลในการดำเนินชีวิต (ตรีทิพย์ รัตนารชัย, 2564)

2.4.1 สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine; ACh)

2.4.1.1 โครงสร้างทางเคมี

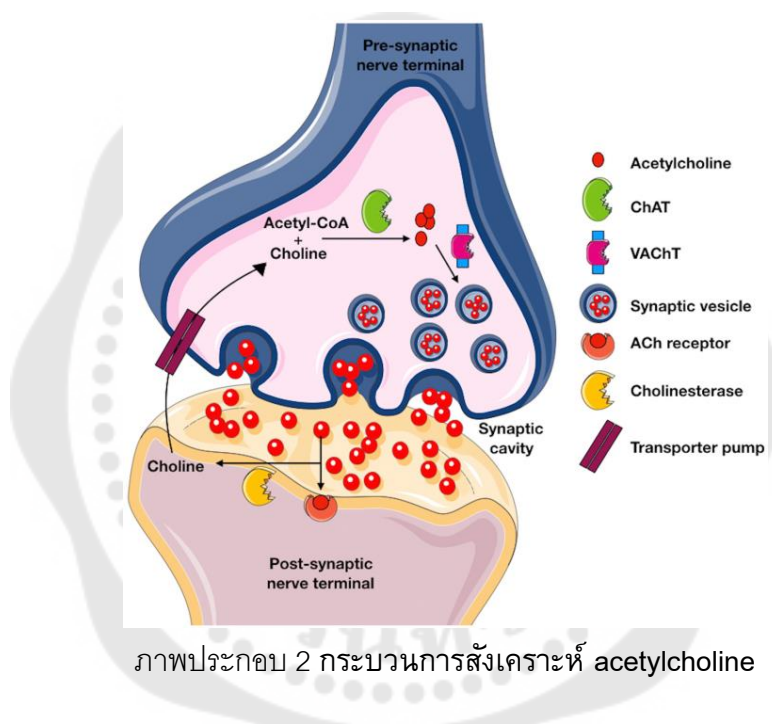


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะเซทิลโคลีน

ที่มา : (Wikipedia, 2024)

2.4.1.2 บทบาทการทำงาน (จินติตา จิตติวัฒน์, 2564)

อะเซทิลโคลีนถูกสร้างที่แอกโซพลาซึม (axoplasm) โดยมีสารตั้งต้นในการสร้างคือ โคลีน (choline) และอะเซทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl coenzyme A) โดยอาศัยเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานสเฟอเรส (choline acetyltransferase) ในการสร้างได้เป็นอะเซทิลโคลีนและโคเอนไซม์เอ ซึ่งอะเซทิลโคลีนจะถูกนำมาเก็บในถุงบรรจุสารสื่อประสาทผ่านโปรตีนนำพา เรียกว่า (vesicular acetylcholine transporter; VAcHT) ที่ปลายประสาท ส่วนโคเอนไซม์เอนั้นถูกนำกลับเข้าสู่ไมโทคอนเดรียเพื่อทำปฏิกิริยากับกรดไพรูวิกในกระบวนการสร้างอะเซทิลโคเอนไซม์เออีกครั้งหนึ่ง



ที่มา : Pritam และคณะ (2022)

ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคอัลไซเมอร์ สาเหตุของโรคส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม แต่ส่วนใหญ่เป็นการเสื่อมของสมองตามอายุขัย เกิดจากการตายของเซลล์ประสาทจากการสะสมของแอมิลอยด์บีต้า ($A\beta$) นอกเซลล์ประสาทและโปรตีนเทา (tau protein) ในเซลล์ประสาท เกิดปัญหาขัดขวางการส่งต่อสัญญาณประสาท และเซลล์ประสาทตายทำให้ผู้ป่วยจดจำสิ่งใหม่ไม่ได้ และลืมสิ่งที่เคยจำแล้ว ลักษณะกายภาพของสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจะมีการฝ่อของเนื้อสมองทั่ว ๆ ไป มีน้ำหนักสมองน้อย โดยคนปกติมีน้ำหนักสมอง 100-200 กรัม รอยหยัก (gyrus) ของเปลือกสมองฝ่อดูแคบลงและตื้น ร่องสมอง

(sulcus) กว้างขึ้น ร่วมกับมีโพรงสมอง (ventricle) ขยายขนาดขึ้น รวมทั้งพบแอมิลลอยด์บีต้าพลาแก (A β plaque) และนิวโรไฟบริลลารี แทงเกิล (NFTs) ที่เปลือกสมอง และมีการเสื่อมของเส้นเลือด

2.5 การรักษาโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันมียาเพียง 2 กลุ่ม ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้แก้ปัญหาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ ได้แก่ กลุ่มยาออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำลายอะเซทิลโคลีน (Cholinesterase inhibitors, ChEIs) และ ยามะแมนทีน (memantine) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (NMDA receptor antagonist) (มณี วิทยุพรพาณิชย์ และคนอื่น ๆ, 2563)

2.5.1 กลุ่มยาออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำลายอะเซทิลโคลีน (Cholinesterase inhibitors)

ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้ที่มีใช้ในเวชปฏิบัติมี 3 ชนิด ได้แก่ donepezil, rivastigmine และ galantamine ซึ่งยากกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการจับและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่ทำลายอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ที่จุดประสานประสาท (synapses) ส่งผลให้บริเวณจุดประสานประสาทมีปริมาณอะเซทิลโคลีนเพิ่มสูงขึ้น แล้วทำให้ความจำดีขึ้น เซลล์ประสาทที่นิวเคลียส เบซัลลิส (nucleus basalis) ที่สมองส่วนหน้า (forebrain) จะหลั่งสารส่งผ่านประสาทอะเซทิลโคลีน ไปยังเปลือกสมอง (cortex) นิวเคลียสนี้จะถูกกระตุ้นเมื่อมีสิ่งเร้าใหม่ อะเซทิลโคลีนจึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับสติและความจำ อะเซทิลโคลีนถูกทำลายโดยเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่จุดประสานประสาทของเซลล์ชนิดโคลิเนอร์จิก (cholinergic neuron) ดังนั้นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสจะทำให้มีปริมาณอะเซทิลโคลีนที่จุดประสานประสาทมากขึ้นและจับกับตัวรับ (receptor) ได้มากขึ้น ส่งผลให้ภาวะสมองเสื่อมดีขึ้น

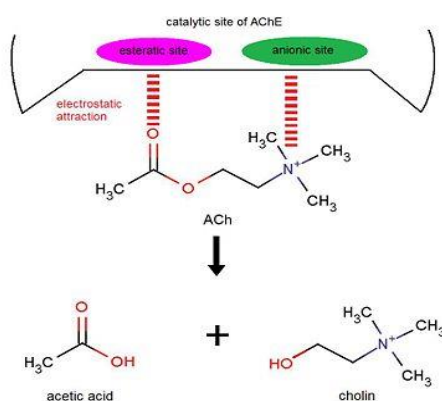
2.5.2 ยามะแมนทีน (memantine) ออกฤทธิ์ต้านตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (NMDA receptor antagonist) ซึ่งออกฤทธิ์ผ่าน 2 กลไก คือ 1. ปรับระบบการนำสารส่งผ่านประสาทกลูตาเมต (glutamate) หากระบบที่มีสารส่งผ่านประสาทกลูตาเมตผิดปกติ จะทำให้ไม่สามารถสร้างความจำใหม่ ๆ ได้ เมื่อมีการตายของเซลล์ประสาทที่บรรจุสารส่งผ่านประสาทกลูตาเมตจะเกิดการรั่วของสารส่งผ่านประสาทชนิดนี้ออกมาภายนอกเซลล์ประสาท ซึ่งกลูตาเมตที่อยู่นอกเซลล์จะกระจายมายังบริเวณจุดประสานประสาทแล้วจับกับตัวรับที่อยู่เซลล์ประสาทหลังจุดประสานประสาท (post-synaptic neuron) ตัวรับสัญญาณประสาทชนิดนี้ชื่อ เอนเอ็มดีเอ (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) การจับนี้จะทำให้มีแคลเซียมไหลเข้าไปยังเซลล์ประสาทหลังจุดประสานประสาททำให้เกิดเป็นสัญญาณรบกวนทางไฟฟ้าขึ้น (noise) แต่สัญญาณรบกวนทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นนี้มีความแรงไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดศักยะงาน (action potential) ดังนั้นสัญญาณนี้

จึงไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการนำไฟฟ้าระหว่างเซลล์ประสาทที่อยู่ในระบบการสร้างความสำเร็จ ยา memantine ออกฤทธิ์เป็นตัวต้าน (antagonist) ที่ตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (NMDA receptor) ดังนั้นจึงลดการเกิดสัญญาณรบกวนทางไฟฟ้าที่เกิดจากการกระตุ้นโดยกลูตาเมตที่รั่วออกมาภายนอกเซลล์ประสาท ในขณะที่ยอมให้เกิดการนำไฟฟ้าระหว่างเซลล์ประสาทได้ตามปกติ 2. กระตุ้นระบบการนำสารส่งผ่านประสาทโดปามีน (dopamine) สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการนำสารส่งผ่านประสาทโดปามีน ซึ่งอาจช่วยบรรเทาปัญหาการเคลื่อนไหวหรืออาการแข็งเกร็ง

การรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้มีการศึกษามากมายทั้งในผู้ป่วยและสัตว์ทดลอง โดยพบว่ายังไม่มียาใดที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จำเป็นต้องมีการพัฒนายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาให้มากขึ้น ปัจจุบันพบความนิยมการศึกษาใช้สารกลุ่มที่สกัดจากพืชเพื่อนำมาใช้รักษา รวมทั้งลดอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์เป็นจำนวนมาก เนื่องจากสารกลุ่มดังกล่าวมีความปลอดภัยกว่ายาเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งได้มีการวิจัยเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งสารออกฤทธิ์หลักของสารสกัดจากพืชเหล่านี้ จึงเหมาะกับการนำมาใช้สำหรับโรคที่มีความเสื่อมของสมองโดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์

2.6 เอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE)

เอนไซม์ AChE มีหน้าที่ในการสลาย acetylcholine ด้วยกระบวนการ hydrolysis โดย acetylcholine จะจับกับ AChE ที่ตำแหน่ง esteric site หรือ serine hydroxyl group ซึ่งอยู่ที่ active site ของ AChE และ catalytic anionic site จากนั้นจึงสลาย acetylcholine ด้วยกระบวนการ hydrolysis ได้เป็น choline และ acetate (Xie, Yang, Chen, และ Xiao, 2014)

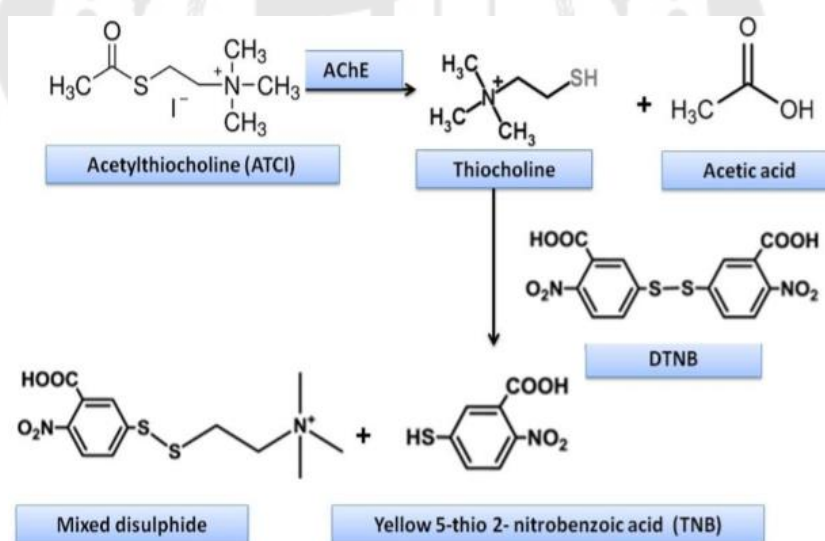


ภาพประกอบ 3 การจับของ acetylcholine ที่บริเวณ active site ของ acetylcholinesterase

ที่มา : (Proteopedia, 2024)

2.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ AChE ที่นิยมที่สุดมีหลักการอ้างอิงตาม Ellman's method อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างเอนไซม์ AChE กับ acetylthiocholine iodide (ACTI) ที่เป็นสารตั้งต้น จะถูกย่อยให้กลายเป็น thiocholine และ acetic acid จากนั้น thiocholine จะทำปฏิกิริยากับ DTNB เกิดเป็นสารสีเหลือง ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 405 nm จึงทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณออกมาเป็นร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ โดยวิธีนี้มีข้อเสีย เช่น อาจมีการรบกวนของสารประกอบบางชนิดได้ ทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน หรือมีข้อจำกัดในการทดสอบยาแก้พิษ organophosphorus กลุ่ม oxime เพราะในยาแก้พิษดังกล่าวจะเกิดปฏิกิริยา spitting กับ DTNB หรือเรียกว่า oximolysis หรืออาจจะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis กับ ACTI ได้ ซึ่งจะทำให้ผลการทดสอบเป็น false positive reaction ขึ้น (Ferreira, Proença, Serralheiro, และ Araújo, 2006) (Sakurada, Ikegaya, Ohta, Akutsu, และ Takatori, 2006) (Šinko, Čalić, Bosak, และ Kovarik, 2007) (Balkis, Tran, Lee, และ Ng, 2015)



ภาพประกอบ 4 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง acetylcholinesterase

โดยใช้หลักการ Ellman's method

ที่มา : Mohammed Saleem Ali-Shtayeh และคณะ (2014)

2.8 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระเป็นกระบวนการที่ประกอบด้วย physiological reactions มากมาย สิ่งมีชีวิตจะกระทำกับโมเลกุลเหล่านี้เพื่อให้การทำงานเป็นปกติ อนุมูลอิสระจะถูกจับโดยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี วิตามินซี carotenoids flavonoids และเอนไซม์ เช่น peroxide dismutase (SOD), glutathione peroxide ซึ่งจะเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบที่มีความเสถียรมากขึ้น ในกรณีที่มีการเสียสมดุล อาจพบว่าการผลิตอนุมูลอิสระมากเกินไปทั้ง ROS และ RNS ทำให้เกิด oxidative stress โดยแบ่งออกได้เป็นแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยเฉพาะแบบเรื้อรังนำไปสู่การเกิดโรคหลายชนิดรวมทั้งโรคอัลไซเมอร์ มีการสูญเสียการทำงานของเซลล์ประสาท และการตายของเซลล์ประสาท โดยมีการศึกษา ดังนี้ (Pongnimitprasert, 2020)

1. oxidative stress จะทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ที่แข็งแรง oxidative stress เป็นผลจากการเมตาบอลิซึมที่ปกติ ซึ่งมักจะเพิ่มหรือขยายโดยการกระทำกับสารพิษในสิ่งแวดล้อม การติดเชื้อ ขบวนการเผาผลาญในการทานอาหาร ภาวะดังกล่าวจะทำให้ผลพลอยได้ที่เกิดจากการสะสมจะไปทำลายโมเลกุล โดยเฉพาะต่อเนื้อเยื่อสมอง (Pongnimitprasert, 2020)

2. $A\beta$ protein โดยสามารถผลิต ROS ภายในเซลล์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยาของโมเลกุลออกซิเจนกับไอออนโลหะ (Cu, Zn, Fe) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกหลายขั้นตอน โลหะจะเกิดปฏิกิริยา redox จุดเริ่มต้นของอิเล็กตรอนที่เป็นสาเหตุให้เกิดรีดักชันในสถานะออกซิเดชันของไอออนโลหะ จากอะตอมของกำมะถันใน methionine 35 (Met35) ของ $A\beta$ นอกจากนี้ ไอออนของโลหะในเนื้อเยื่อ เช่น Fe และ Cu ยังมีบทบาทในการผลิต ROS ได้แก่ ปฏิกิริยาการผลิต hydroxyl radicals โดยนำอิเล็กตรอนออกจากไอออนของโลหะ ส่วนปฏิกิริยาต่อมานั้น ไอออนของโลหะถูกปล่อยออกมาโดยเกี่ยวข้องกับ O_2 สำหรับปฏิกิริยาสุดท้ายจะเป็น Haber-Weiss reactions (Pongnimitprasert, 2020)

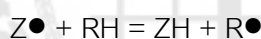
3. การสร้าง $A\beta$:metal complex อาจส่งเสริมให้เกิดการรวมตัวกันของ amyloid เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์อีก สาเหตุคือ $A\beta$ ชักนำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย อันเนื่องจากการผลิต ROS มากผิดปกติ เมื่อกระบวนการเหล่านี้เสียสมดุลจะส่งผลให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถทำงานได้อย่างถูกต้อง ทำให้อ่อนแอ นำไปสู่การทำลายประสาทในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Pongnimitprasert, 2020)

จากที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปจนเกิด oxidative stress มีผลต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งเป็นสารที่ ช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิด ROS อาจส่งผลลดการเกิด oxidative stress ได้ (Pongnimitprasert, 2020)

2.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

อนุมูลอิสระ DPPH (2,"2" -diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระชนิดไนโตรเจน ที่มีความคงตัวค่อนข้างสูง ดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 515-520 นาโนเมตร เมื่อนำไปเตรียมเป็นสารละลายเมทานอลหรือเอทานอล ให้สารละลายที่มีสีม่วงเข้ม เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนจากสารต้านออกซิเดชัน จะเกิดเป็นสารในรูปปรีดิวิตซ์ คือ protonated DPPH ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้น ทำให้เห็นสารละลายมีสีจางลง สามารถวัดค่าการ ดูดกลืน แสงที่เปลี่ยนไป ด้วย เครื่อง UV spectrophotometer (Patchima Sithisarn, Nantateerapong, Rojsanga, และ Sithisarn, 2016) (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ รัตนาปนนท์, 2550)

ปฏิกิริยาดังกล่าวอาจแทนสมการได้ดังนี้



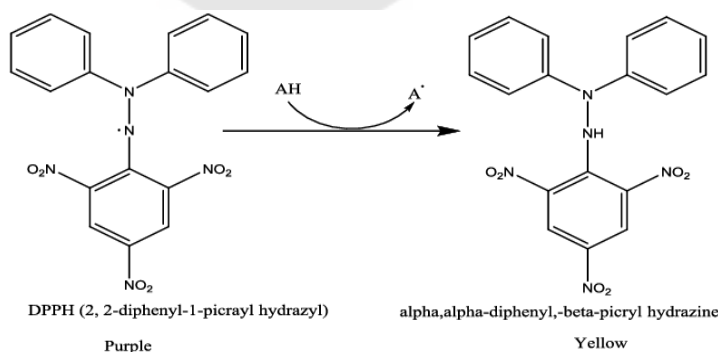
โดย

$Z\bullet$ คือ อนุมูล DPPH

RH คือ ตัวรีดิวซ์ หรือ สารต้านออกซิเดชัน

ZH คือ DPPH ในรูปปรีดิวิตซ์

$R\bullet$ คือ อนุมูลอิสระจากตัวรีดิวซ์หรือสารต้านออกซิเดชัน



ภาพประกอบ 5 วิธี DPPH Scavenging Assay

ที่มา : Salim Najm Aldain Saber และคณะ (2019)

2.10 เทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิง (Molecular docking)

การใช้เทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิงมีวัตถุประสงค์หลักในการทำนายการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารกับโปรตีนที่สนใจศึกษา โดยจะได้ผลเป็นผลข้อมูลกับจับ binding affinity ที่แสดงถึงความชอบของสารดังกล่าวกับเอนไซม์ชนิดนั้น และยังสามารถทำนายลักษณะการวางตัวของโมเลกุลที่สนใจ (orientation หรือ pose) พร้อมอันตรกิริยา (interaction) ของสารนั้นขณะที่จับอยู่กับเอนไซม์ เทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิงมีบทบาทสำคัญในการช่วยลดระยะเวลาของการพัฒนายาจากสารธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ไปสู่การทดลองในสัตว์ทดลอง เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถช่วยคัดกรอง (screening) สารที่น่าสนใจได้ (พจนพร ไกรดิษฐ์, 2560)

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ดอกกิง พบว่า สาร piperine ที่พบได้ในพริกไทยและดีปลี จับกับเอนไซม์ AChE ที่มีรหัส 4EY6.pdb เกิดอันตรกิริยา Hydrophobic Interactions กับกรดอะมิโน HIS 447A, TRP 286A และเกิดอันตรกิริยา Hydrogen Bonds กับกรดอะมิโน SER 203A โดยมีค่าพลังงานเท่ากับ -10.5 Kcal/mol รวมทั้งศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ AChE ของสาร piperine ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ $76.60 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{g/ml}$ และได้ศึกษาการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y พบว่าสาร piperine มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้มากถึง 85% ซึ่งบ่งบอกว่าสารนี้ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากความเสียหายที่เกิดจากการทำลายของ $A\beta$ -induced neuronal อย่างมีนัยสำคัญ (Abdul Manap และคณะ, 2019)

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ดอกกิง พบว่า สาร Δ^9 -THC ที่พบในกัญชา จับกับเอนไซม์ AChE ที่มีรหัส 4PQE.pdb เกิดอันตรกิริยา π - π stacking กับกรดอะมิโน TRP 286 และเกิดอันตรกิริยา Van der Waals กับกรดอะมิโน TYR 337, TYR124, ASP74, HIS287, LEU289, SER293, ARG296 และ PHE295 โดยมีค่าพลังงานเท่ากับ -9.3 Kcal/mol เปรียบเทียบกับยา Donepezil มีค่าพลังงานเท่ากับ -8.3 Kcal/mol โดยเกิดอันตรกิริยา π - π stacking กับกรดอะมิโน TRP 286 และเกิดอันตรกิริยา Van der Waals กับกรดอะมิโน HIS 287, TYR72, LEU76, TYR124, PHE297, PHE338, PHE295 และ VAL294 (Furqan และคณะ, 2020)

2.11 การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร

การควบคุมคุณภาพของสมุนไพร เป็นการประเมินคุณค่ายาจากสมุนไพรว่ามีถูกต้องตามต้องการและมีคุณภาพสม่ำเสมอ อีกทั้งเป็นตัวกำหนดราคาของยาจากสมุนไพรนั้น ๆ ด้วย ประกอบด้วยการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพร ตรวจหาคุณค่าภายในทั้งชนิดและปริมาณ

องค์ประกอบสำคัญที่มีอยู่ในยาจากสมุนไพรนั้น ๆ ตามมาตรฐานของยาจากสมุนไพรแต่ละชนิด ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2551)

2.7.1 ชื่อสมุนไพร วัตถุดิบที่จะนำมาใช้จะต้องกำหนดเป็นชื่อวิทยาศาสตร์โดยทั่วไปนิยมใช้ชื่อเป็นภาษาละติน นอกจากนี้ยังต้องบอกชื่อผู้ค้นพบด้วย

2.7.2 ส่วนที่ใช้ บ่งบอกว่าส่วนของพืชที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบเป็นส่วน ใบ ดอก ราก ผล เหง้า หรือ ทั้งต้น

2.7.3 ปริมาณของสารสกัด (Extractive values) ช่วยควบคุมคุณภาพของเครื่องยาแต่ละรุ่นผลิตได้ โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่ทราบชนิดของสารสำคัญ ค่าปริมาณของสารสกัดที่เป็นข้อกำหนดในเภสัชตำรับ เช่น alcohol-soluble extractive value

2.7.4 ปริมาณของสารสำคัญ หรือ สารบ่งชี้ (markers) คุณภาพยาสมุนไพร เป็นตัวบ่งบอกฤทธิ์ทางชีวภาพของเครื่องยาสมุนไพร หรือเป็นสารประกอบทางเคมีที่พบในเครื่องยาแต่ยังไม่มีการพิสูจน์ฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งอาจจะเป็นสารหลักหรือสารรองก็ได้ แต่เป็นสารที่รู้สูตรโครงสร้างทางเคมีแล้ว วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของเครื่องยาสมุนไพร ที่นิยมใช้คือ วิธีทางโครมาโทกราฟี และวิธีทางสเปกโทรสโกปี เป็นต้น

2.12 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

เป็นการทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น มีความน่าเชื่อถือ โดยมีความแม่นยำ และความเที่ยงเพียงพอ (United States Pharmacopeial, 2014)

พารามิเตอร์ (parameter) ที่เกี่ยวกับสมรรถนะของการวิเคราะห์

1. ความแม่นยำ (Precision) หมายถึง ความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบจากการทำซ้ำหลายๆ ครั้ง การหาความแม่นยำทำได้โดยการฉีดสารมาตรฐานซ้ำกันอย่าง 6 ครั้ง หรือทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ที่ความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ หลังจากนั้นหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) หรือการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD)

ซึ่งมักจะบอกเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient of variation, CV)

2. ความถูกต้องหรือความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง การวัดความใกล้เคียงระหว่างค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์ทดสอบกับค่ามาตรฐานหรือค่าจริง (true value) วิธีการหาความถูกต้องมีหลายวิธี เช่น

- การใช้สารอ้างอิงมาตรฐาน (standard reference material) ผลวิเคราะห์ที่ได้ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนด

- การเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณที่แน่นอนลงในตัวอย่างที่รู้ค่า (spiked sample) ดำเนินการแยกสกัดสารตัวอย่างแล้ววิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือและหา % recovery

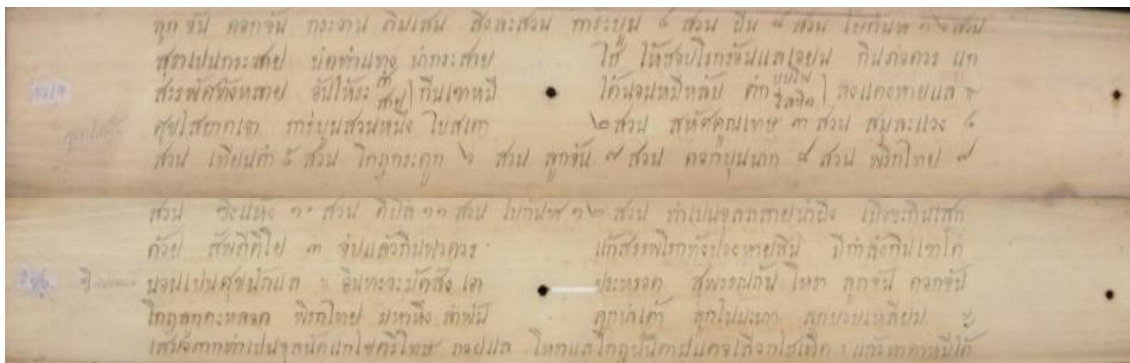
3. ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารเป้าหมายในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยมีค่าความแม่นยำ และเที่ยงที่ยอมรับได้ โดยทั่วไปค่า LOQ จะมีค่าเท่ากับ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือ S/N เป็น 10 ค่า LOQ จะทดสอบโดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่มีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียงกับค่า LOQ ที่คำนวณได้

4. ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ค่าที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้น และ response แสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีนั้นเป็นส่วนโดยตรงกับปริมาณที่มีอยู่จริง การหาค่าความเป็นเส้นตรงทำได้โดยฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นระหว่าง 50-150% ของช่วงใช้งานอย่างน้อย 3 ค่า คำนวณ correlation coefficient วิธีวิเคราะห์ที่ดีควรมีค่า correlation coefficient ไม่น้อยกว่า 0.995 การแสดงค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ควรระบุค่า range ควบคู่ไปด้วย เพื่อให้ทราบวิธีวิเคราะห์นี้ใช้ได้ผลดีในช่วงความเข้มข้นระดับใด

5. ความจำเพาะ (Selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวัดสารเป้าหมายได้อย่างถูกต้องและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างที่มีสารประกอบอื่น ๆ

2.13 ยาสุขไสยาสน์

ตำรับยานี้อยู่ในคัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ (กองคัมภรครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านไทย, กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, และ กระทรวงสาธารณสุข, 2564) และเป็นตำรับยาแผนไทยของชาติ ("ราชกิจจานุเบกษา," 2559, 12 มกราคม) ตำรายาประกอบด้วยเครื่องยา 12 ชนิด ได้แก่ การบูร 1 ส่วน ใบสะเดา 2 ส่วน หัสศุณเทศ 3 ส่วน สมุลแว้ง 4 ส่วน เทียนดำ 5 ส่วน โกฐกระดุก 6 ส่วน ลูกจันทน์ 7 ส่วน ดอกบุนนาค 8 ส่วน พริกไทย 9 ส่วน ขิงแห้ง 10 ส่วน ดีปลี 11 ส่วน ใบกัญชา 12 ส่วน ตำรับนี้ มีกัญชา 12 ใน 78 ส่วน หรือร้อยละ 15.38 จึงเป็นตำรายาหลัก (กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร, 2566)



ภาพประกอบ 6 คัมภีร์ธาตุพระนารายณ์ ตำรับยาสุขไสยาสน์

ที่มา : (กองคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านไทย, 2564)

2.14 องค์ประกอบสารสำคัญในตำรับยาสุขไสยาสน์

ตาราง 1 องค์ประกอบสารสำคัญในตำรับยาสุขไสยาสน์

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
1	สะเดา (ใบ)	<i>Azadirachta indica</i> A.Juss.	กลุ่ม Terpenoid - O-chloroacetylcarbamoylefumagillol - betulin - ginsenoside - caryophyllene oxide - 10-deacetylbaicatin III - 3-acetyl-11-keto-β-boswellic acid กลุ่ม Saponin - soyaosaponin I กลุ่ม Alkaloid - ecgonine กลุ่ม Flavonoid - scutellarin - epicatechin - icariin	(Raissa, Safitri, Beltran, และ Aulanni'am, 2019)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- lupeol - rutin	
2	หัสคุณเทศ (ราก)	<i>Kleinhovia hospita</i> L.	ไม่พบการรายงาน	-
3	สมุลแว้ง (เปลือกต้น)	<i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch.-Ham.) Sweet	กลุ่ม Aldehyde - hexanal - tetradecanal - <i>E</i> -2-hexyl cinnamaldehyde - limonene aldehyde - <i>Z</i> -cinnamaldehyde กลุ่ม Alcohol - 1-Hexanol - α -amyl cinnamyl alcohol กลุ่ม Terpinene - 1,8-cineole - α -pinene - linalool - α -terpinene - α -thujene - c-terpinene - <i>p</i> -cymene - (<i>Z</i>)-b-ocimene - (<i>E</i>)-nerolidol - (<i>E</i>)-b-ocimene - camphene - <i>cis</i> -piperitol - endo-fenchol (α -fenchol) - geraniol	(Kumar, Kumari, และ Mishra, 2019)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- geranyl acetate - germacrene-D - limonene - nerol - neryl acetate - myrcene - sabinene - spathulenol - terpinen-4-ol - terpinolene - <i>trans</i>-b-terpineol - <i>trans</i>-piperitol - β-caryophyllene - β-elemene - β-pinene - β-selinene - δ-cadinol - δ-guaiane (α-bulnesene) - α-cadinol - α-humulene - α-panasinsene - α-phellandrene - α-selinene - α-terpineol - 13-epi-manoyl oxide - 3Z-cembrene A - 7-epi-α-selinene	

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- Borneol - Camphor - <i>E</i>-β-ocimene - epi-α-cadinol - guaial - isoborneol - myrcene - phytol - pinene - sabinene - sclareolide - terpinen-4-ol - <i>Z, E</i>-geranyl linalool - α-humulene - α-<i>trans</i>-bergamotene - α-zingiberene - γ-terpineol - δ-3-carene - <i>p</i>-mentha-2,4 (8)-diene	
4	เทียนดำ (เมลิ็ด)	<i>Nigella sativa</i> L.	กลุ่มน้ำมันหอมระเหย - thymoquinone - thymohydroquinone - thymol - (R) -(-)-α-Phellandrene - α-Pinene - β-Pinene	(Dalli และคน อื่น ๆ, 2022)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- <i>p</i>-Cymene - carvacrol - dithymoquinone กลุ่ม phenolic และ flavonoid - gallic acid - ferulic acid - vanillic acid - <i>p</i>-coumaric acid - chlorogenic acid - catechin - quercetin - apigenin - rutin - nigelflavonoside B กลุ่ม Fatty Acids - linoleic acid (55.6%) - oleic acid (23.4%) - palmitic acid (12.5%) - stearic acid - lauric acid - myristic acid - linolenic acid - eicosadienoic acid	
5	โกฐกระดูก (ราก)	<i>Aucklandia lappa</i> (Decne.) Decne.	กลุ่ม sesquiterpene lactones - costunolide - dihydrocostunolide - 12-methoxydihydrocostunolide - dihydrocostus lactone	(Liu, Li, Wang, Zhang, และ Liu, 2021)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- dehydrocostus lactone - α-hydroxydehydrocostus lactone - β-hydroxydehydrocostus lactone - mokko lactone - cynaropicrin	
6	จันทน์เทศ (ผล)	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	- bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- - bicyclo[3.1.0]hex-4-methylene-1-(1-methylethyl)- - 1,3-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- - γ-terpinene - cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- - cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cis- - 3-cyclohexene, 1-ol-4-methyl-1-(1-methyl ethyl)-(R)- - α-terpineol - anethole - 1,3-benzodioxole, 5-(1-propenyl)-safrole - thymol - α-Copaene - eugenol - methyl eugenol - caryophyllene	(Al-Qahtani และคนอื่น ๆ, 2022)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- <i>trans</i>-isoeugenol - benzene1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)- - naphthalene, 1,2,3,5,6a-hexahydro-4-7-dimethyl-1-(1-methyl ethyl) -(1S-cis)- - 1,3-benzodioxole,4-methoxy-6-(2-propenyl)- - benzene1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)- (or) Elemicin - phenol,2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)- - isoelemicin - tetradecanoic acid	
7	บุนนาค (ดอก)	<i>Mesua ferrea</i> L.	- mesuaferrone A - mesuaferrone B - mesuaferrol - mesuanic acid - α - amyrin - β - amyrin - β- sitosterol	(Nadpara, Vaghela, และ Patel, 2012)
8	พริกไทย (ผล)	<i>Piper nigrum</i> L	- piperanine - piperine - piperdardine - piperettine I - piperettine II - piperettine III - piperettine IV	(Luca, Minceva, Gertsch, และ Skalicka-Woźniak,

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- dehydropipernonaline	2021)
			- pipernonaline	
			- piperolein B	
			- piperundecalidine	
			- piperchabamide B	
			- piperchabamide C	
			- futoamide	
			- pipercallosine	
			- retrofractamide B	
			- pipgulzarin	
			- guineensine	
			- piperflaviflorine	
			- dehydrobrachystamide B	
			- brachystamide B	
			- pellitorine	
			- N-isobutyl-2,4-dodecadienamide	
			- N-isobutyl-2,4,10-hexadecatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4,10,12-octadecatetraenamide	
			- N-isobutyl-2,4,12-octadecatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4,14-eicosatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4-eicosadienamide	
			- N-isobutyl-2,4-octadecadienamide	
			- neopellitorine B	
			- 1-(piperidinyl)-2,8-tetradecadien-1-one	

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- 1-(piperidiny)-2-tetradecen-1-one - 1-(piperidiny)-2,4,12-octadecatrien-1-one - 1-(piperidiny)-2-hexadecen-1-one - 1-(piperidiny)-2,4-octadecadien-1-one - 1-(piperidiny)-2,4-eicosadien-1-one - piperylene - brachyamide A - piperolactam C - piperlongumine	
9	ขิงแห้ง (เหง้า)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	กลุ่ม Terpene - α-terpinene - α-terpineol - 4-terpineol - terpinolene - c-terpinolene กลุ่ม Alcohol - cineole - β-Eudesmol - nerol - <i>trans</i>-nerolidol - 4-isopropylbenzyl alcohol - 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol - 3,7-dimethyloct-6-en-1-yn-3-ol - 3-methylhexan-2-ol - <i>cis</i>-piperitol	(Nishidono และคนอื่น ๆ, 2018)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- borneol - elemol - กลุ่ม Aldoketone - butanal - germacrone - 2,6-dimethylhept-5-enal - 2-heptanone - กลุ่ม ester - neryl acetate - methyl 11-(cyclopent-2-enyl)undecanoate - geranyl propionate - endo-bornyl acetate - sec-butyl acetate - กลุ่ม Fat hydrocarbon - allo-aromadendrene - β-sesquiphellandrene - α-cedrene - β-tujene - cadina-5,8-diene - (E)-2,7-dimethyloct-3-en-5-yne	
10	ดีป्ली (ผล)	<i>Piper retrofractum</i> Vahl	- piperanine - piperine - piperdardine - piperettine I - piperettine II - piperettine III - piperettine IV	(Luca, Gawet-ben, และคนอื่น ๆ, 2021)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- dehydropipernonaline	
			- pipernonaline	
			- piperolein B	
			- piperundecalidine	
			- piperchabamide B	
			- piperchabamide C	
			- futoamide	
			- pipercallosine	
			- retrofractamide B	
			- pipgulzarin	
			- guineensine	
			- piperflaviflorine	
			- dehydrobrachystamide B	
			- brachystamide B	
			- pellitorine	
			- N-isobutyl-2,4-dodecadienamide	
			- N-isobutyl-2,4,10-hexadecatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4,10,12-octadecatetraenamide	
			- N-isobutyl-2,4,12-octadecatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4,14-eicosatrienamide	
			- N-isobutyl-2,4-eicosadienamide	
			- N-isobutyl-2,4-octadecadienamide	
			- Neopellitorine B	
			- 1-(piperidinyl)-2,8-tetradecadien-1-one	

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- 1-(piperidiny)-2-tetradecen-1-one - 1-(piperidiny)-2,4,12-octadecatrien-1-one - 1-(piperidiny)-2-hexadecen-1-one - 1-(piperidiny)-2,4-eicosadien-1-one - piperylene - brachyamide A - piperolactam C - piperlongumine - piperlonguminine - piperolein A - neopeollitorine B - piperolein B -piperundecalidine - guineensine - N-isobutyl-2,4,12-octadecatrienamide	
11	กัญชา (ใบ)	<i>Cannabis sativa</i> L	- CBG cannabigerol-type - cannabigerovarinic Acid (CBGVA) - 6,7-epoxy-Cannabigerol - 6,7-epoxy-Cannabigerolic Acid - cannabigerol (CBG) - CBD (cannabidiol)-type - cannabidiorcine (CBDO) - cannabidivarin (CBDV) - cannabidivarinic Acid (CBDVA) - Nor-cannabidiol	(Radwan, Chandra, Gul, และ Elsohly, 2021)

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- Nor-cannabidiolic Acid - cannabidiol (CBD) - cannabidiolic Acid (CBDA) Δ^9-THC tetrahydrocannabinol-type - tetrahydrocannabivarin (THCV) - delta-9-Tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) - nor-delta-9-tetrahydrocannabinol - nor-tetrahydrocannabinolic acid - delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) - tetrahydrocannabinolic acid (THCA) - CBC cannabichromene-type - cannabichromeorcin (CBCO) - cannabichromevarin (CBCV) - cannabichromevarinic Acid (CBCVA) - nor-cannabichromene - nor-cannabichromenic Acid - cannabichromene (CBC) - cannabichromenic Acid (CBCA)	
			Flavonoids	
			- cannflavin A - cannflavin B - cannflavin C	
			Lignans	
			- <i>N-trans</i>-coumaroyltyramine - <i>N-trans</i>-feruloyltyramine - <i>N-trans</i>-caffeoyltyramine	

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสำคัญ	อ้างอิง
			- cannabisin D - grossamide - Stilbenoids - denbinobin - canniprene 1 - cannithrene 2 - cannabistilbene I - dihydroresveratrol - cannabispiran - cannabispirenone - cannabispiradienone - cannabispiranol - Alkaloids - hordenine	
12	การบูร		Camphor	

ตาราง 2 แสดงข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาสมุนไพร

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วิธีการสกัด	วิธีการวิเคราะห์	ข้อมูลรายงาน (IC ₅₀)	อ้างอิง
1	<i>Azadirachta indica</i> A.Juss.	ไม่พบการรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์	acetylcholinesterase		
2	<i>Kleinhovia hospita</i> L.	ไม่พบการรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์	acetylcholinesterase		

ลำดับ	ชื่อ วิทยาศาสตร์	วิธีการสกัด	วิธีการวิเคราะห์	ข้อมูลรายงาน (IC ₅₀)	อ้างอิง
3	<i>Cinnamomum bejolghota</i> (Buch.-Ham.) Sweet			IC ₅₀ = 5.2±0.0 μg/ml (DPPH)	(S และ คนอื่น ๆ, 2015)
4	<i>Nigella sativa</i> L.			IC ₅₀ = >200 μg/ml (DPPH)	(S และ คนอื่น ๆ, 2015)
5	<i>Aucklandia lappa</i> (Decne.) Decne.	ไม่พบการรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase			
6	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	ethyl acetate		trimyristin และ 5,7- diacetyl chrysin high neuroprotecti vity (Omidpanah และคนอื่น ๆ, 2022) IC ₅₀ = 48.2 ± 1.5 μg/ml (DPPH) (S	(Omidpa nah และ คนอื่น ๆ, 2022; S และคน อื่น ๆ, 2015)

ลำดับ	ชื่อ วิทยาศาสตร์	วิธีการสกัด	วิธีการวิเคราะห์	ข้อมูลรายงาน (IC ₅₀)	อ้างอิง
					และคนอื่น ๆ, 2015)
7	<i>Mesua ferrea</i> L.	methanol		IC ₅₀ = 94.26±5.93 μg/ml (DPPH)	(Chaitha da, Supapan , Rodthuk, และ Chainaro ng, 2018)
8	<i>Piper nigrum</i> L.	Methanol ^[33]	LC- HRMS/MS ^[33]	IC ₅₀ = 25.46 μg/ml (AchEI) (Tappayuthpij arn และคนอื่น ๆ, 2012) IC ₅₀ = >200 μg/ml (DPPH) (S และคนอื่น ๆ, 2015)	(Tappay uthpijarn และคน อื่น ๆ, 2012) (S และ คนอื่น ๆ, 2015) (Luca, Gawet- beben,

ลำดับ	ชื่อ วิทยาศาสตร์	วิธีการสกัด	วิธีการวิเคราะห์	ข้อมูลรายงาน (IC ₅₀)	อ้างอิง
					และคน อื่น ๆ, 2021)
9	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe			IC ₅₀ = >300 μg/ml (AchEI) (Tappayuthpij arn และคนอื่น ๆ, 2012) IC ₅₀ = 52.5 ± 3.3 μg/ml (DPPH)	(S และ คนอื่น ๆ, 2015; Tappayu thpijarn และคน อื่น ๆ, 2012) (Tappay uthpijarn และคน อื่น ๆ, 2012)
10	<i>Piper retrofractum</i> Vahl	Methanol ^[33]	LC-HRMS/MS ^[33]	IC ₅₀ = 51.60 μg/ml (AchEI) IC ₅₀ = >200 μg/ml (DPPH) (S และคนอื่น ๆ,	(Tappay uthpijarn และคน อื่น ๆ, 2012) (S และ

ลำดับ	ชื่อ วิทยาศาสตร์	วิธีการสกัด	วิธีการวิเคราะห์	ข้อมูลรายงาน (IC ₅₀)	อ้างอิง
				2015)	คนอื่น ๆ, 2015)
11	<i>Cannabis sativa</i> L.			IC ₅₀ = 30 μg/ml (AchEI) สกัด ด้วย Dichoro methane	(Erukain ure และ คนอื่น ๆ, 2020)
12	Camphor		RT-PCR	1. เพิ่มการ แสดงออก ของยีน <i>Bcl-2</i> ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การยับยั้ง กระบวนการ ตายของเซลล์ แบบ apoptosis 2. เพิ่มเอนไซม์ ต้านอนุมูล อิสระ เช่น GPX (Glutathione preoxidase) และเอนไซม์ CAT	(Valibeik และคน อื่น ๆ, 2021)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. คอมพิวเตอร์ที่มี RAM 16 GB เป็นต้นไป
2. โปรแกรมที่เกี่ยวข้อง
 - 2.1 โปรแกรม AutodockTools 1.5.6
 - 2.2 โปรแกรม Swiss-PDBViewer
 - 2.3 โปรแกรม BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019
3. Ligand: โครงสร้างสามมิติของสารสำคัญจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ
4. pipette aid (SCILOGEX levo plus)
5. beaker ขนาด 25, 50, 100, 250 และ 1000 ml (Pyrex®, USA)
6. blender
7. calibration dropper
8. centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 ml
9. cylinder ขนาด 5 และ 500 ml
10. dispensing spoon
11. erlenmeyer flask (Pyrex®, USA)
12. liquid chromatography (LC-MS)
13. hot air oven (Contherm Scientific Ltd., New Zealand)
14. incubator (MEMMERT, Germany)
15. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
16. micropipette ขนาด 20 – 200 µl และขนาด 100 – 1000 µl (GILSON, France)
17. multichannel micropipette ขนาด 20 - 200 µl (CORNING, Poland)
18. 96-well microplate (Sterilin, UK)
19. microplate reader (Spectramax, USA)
20. parafilm (BERMIS, Germany)
21. pH meter (METTLER TOLEDO, USA)
22. rotary evaporator (BUCHI rotavapor R-114, Switzerland)

23. syringe filter ขนาด 0.45 m (Fortune Sciencetific, Thailand)
24. ultrasonic sonicator bath (POWERSONIC 410, Korea)
25. vacuum pump (SPARMAX, Taiwan)
26. volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 ml (Witeg Diffigo, Germany)
27. volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 ml
28. vortex mixer (Scientific industries, inc.)
29. เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
30. เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toled, USA)
31. เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Mettler Toled, USA)
32. ชุดกรอง buchner funnel filtration

2. สารเคมีที่ใช้

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
2. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich, USA)
3. 95% ethanol
4. acetonitrile (Merck, Germany)
5. acetylcholine iodide (ACTI) (Sigma-Aldrich, USA)
6. bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
7. methanol (Merck, Germany)
8. orthophosphoric acid (LabScan, Thailand)
9. Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)
10. สารมาตรฐาน ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)
11. สารมาตรฐาน galantamine (Sigma-Aldrich, USA)
12. สารมาตรฐาน Δ^9 -THC (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)
13. สารมาตรฐาน CBD (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)
14. ตัวอย่างสมุนไพร
 - 14.1 ใบสะเดา (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
 - 14.2 หัสศุณเทศ (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
 - 14.3 สมุลแว้ง (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
 - 14.4 เทียนดำ (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)

- 14.5 โกฐกระดุก (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.6 ลูกจันทน์ (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.7 ดอกบุนนาค (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.8 พริกไทย (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.9 ขิงแห้ง (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.10 ดีปลี (ร้านธรรมานุรักษ์ยาไทย จังหวัดราชบุรี)
- 14.11 ใบกัญชา (วิสาหกิจชุมชนสมุนไพรอแกนิกอำเภอเลิงนกทา จังหวัดยโสธร)

3. การเตรียมสมุนไพร

นำสมุนไพรจำนวน ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 4 ชั่วโมง และนำมาบดหยาบ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลอง A ทำการสกัดด้วยวิธี sonication 15 นาที และสกัดด้วยวิธี maceration แห่สกัดด้วย dichloromethane เป็นระยะเวลา 7 วัน

การทดลอง B ทำการสกัดด้วยวิธี sonication 15 นาที และสกัดด้วยวิธี maceration แห่สกัดด้วย 95% ethanol เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการแช่สกัดด้วย dichloromethane

3.1.1 ชั่งสมุนไพรหนักอย่างละ 20 กรัม

3.1.2 แช่สกัดด้วย dichloromethane 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน ทำการคนบ่อย ๆ ในระหว่างการแช่สกัด

3.1.3 นำส่วนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator)

3.1.4 ชั่งน้ำหนักสารสกัดเพื่อคำนวณ % yield และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมักด้วย 95% ethanol

3.2.1 กากสมุนไพรที่ได้จากวิธีการแช่สกัดด้วย dichloromethane นำมาแช่สกัดด้วย 95% ethanol 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน ทำการคนบ่อย ๆ ในระหว่างการหมัก

3.2.2 เมื่อครบเวลา กรองผ่านกรวยกรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman filter paper

No.1

3.2.3 นำส่วนที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก (ethanol) เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator)

3.2.4 เมื่อได้สารละลายเข้มข้น ให้ถ่ายใส่ถ้วยระเหย (evaporating dish) ที่ได้ชั่งน้ำหนัก

3.2.5 นำถ้วยระเหยไปชั่งหาน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดเพื่อคำนวณ % yield และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD (stock solution) ที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$

1) เตรียม 200 $\mu\text{g/ml}$ standard ดังนี้

1.1) ชั่งสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD น้ำหนัก 20 mg

1.2) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol 100 ml

2) เตรียม 2 $\mu\text{g/ml}$ โดยการปิเปตสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol 100 ml

4.2 การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

เป็นการทดสอบว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้ มีความสามารถในการแยก (resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอ สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.6 $\mu\text{g/ml}$ โดยปิเปต stock solution มา 3 ml และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 10 ml

2) การวิเคราะห์สภาวะด้วยเครื่อง Liquid chromatography ดังนี้

- column : Phenomenex Luna C18, (100 x 2 mm, 3 μm)

- MS interface : ESI

- Heating gas flow : 10 L/min

- Heat Block temperature 400 $^{\circ}\text{C}$

- DL temperature 250 $^{\circ}\text{C}$

- mobile phase : เป็นระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด

(A) 0.01% formic in 20 mM ammonium formate

(B) acetonitrile

- injection volume: 0.1 μ l

โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง

3) ทำการวิเคราะห์ตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

3.3.1 resolution (R) คือ การแยกสารสองตัวในของผสม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

3.3.2 tailing factor (T) เป็นการวัดความสมมาตรของพีค

3.3.3 number of theoretical plate (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของ column

3.3.4 relative standard deviation (%RSD) คือ ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เป็นการวัดความแม่นยำของระบบโดยนำ peak area, peak height และ retention time ที่วัดได้ มาคำนวณตามสมการ ดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

ตาราง 3 เกณฑ์ที่ยอมรับ system suitability

system suitability parameters	เกณฑ์ที่ยอมรับ
resolution	>2.0
tailing factor	≤ 2.0
number of theoretical plate	>2000
relative standard deviation	$\leq 1.0\%$

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

4.3.1 Specificity (ความจำเพาะของวิธีทดสอบ)

เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจวิเคราะห์ได้เจาะจงสำหรับสารที่เราต้องการศึกษา โดยปราศจากสารรบกวนจากสารอื่น ๆ มีวิธีการทดลอง ดังนี้

1) นำสารสกัดตำรับยาสมุนไพร มาทำการ spike โดยการเติมสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณ และ ความเข้มข้น บรรจุใน LC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2) เปรียบเทียบว่า peak ของสารมาตรฐาน และ peak ของสารที่เราต้องการวิเคราะห์ตรงกันหรือไม่

4.3.2 linearity and range

1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ โดยปิเปต stock solution มา 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ตามลำดับ และ ปรับปริมาตรด้วย mobile phase 10 ml

2) บรรจุใน LC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3) สร้าง calibration curve จาก peak area และหาสมการเส้นตรงกับ correlation coefficient (r)

4.3.3 limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

มีวิธีการทดลองดังนี้

1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD มาเจือจางด้วย methanol และ mobile phase ให้ได้ความเข้มข้น ตามที่คำนวณได้จากสมการของ LOD และ LOQ

2) บรรจุใน LC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS

3) แทนค่า peak area ที่ได้ ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อตรวจสอบว่าสามารถตรวจพบ peak ที่ความเข้มข้นของ LOD หรือไม่ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารที่ความเข้มข้นของ LOQ ได้อย่างถูกต้อง และ แม่นยำหรือไม่ โดยดูจาก %recovery และ %RSD

4.3.4 Accuracy

1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 $\mu\text{g/ml}$ โดยปิเปต stock solution มา 2, 3 และ 4 ml ตามลำดับ และ ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 10 ml

2) บรรจุใน LC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น จำนวน vial ละ 2 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3) แทนค่า peak area ที่ได้ ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และ นำไปคำนวณหา %recovery จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{recovery} = \frac{\text{ปริมาณที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณที่มีอยู่จริง}} \times 100\%$$

ตาราง 4 เกณฑ์ที่ยอมรับ %recovery ตาม AOAC 2012

concentration	recovery
100 %	98-101 %
10 %	95-102 %
1 %	92-105 %
0.1 %	90-108 %
0.01 %	85-110 %
10 µg/g (ppm)	80-115 %
1 µg/g (ppm)	75-120 %
10 µg/kg (ppb)	70-125 %

4.3.5 Precision

มีวิธีการทดสอบดังนี้

1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6 และ 0.8 µg/ml โดยปิเปต stock solution มา 2, 3 และ 4 ml ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 10 ml

2) บรรจุใน LC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในวันเดียวกัน (Inter-day precision) และ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในวันที่แตกต่างกันอย่างน้อย 3 วัน (intra-day precision)

3) แทนค่า peak area ที่ได้ ไปแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และนำไปคำนวณหา %RSD

ตาราง 5 เกณฑ์ที่ยอมรับ %RSD ตาม AOAC 2012

concentration	repeatability	reproducibility
100 %	1 %	2 %
10 %	1.5 %	3 %
1 %	2 %	4 %
0.1 %	3 %	6 %
0.01 %	4 %	8 %
10 $\mu\text{g/g}$ (ppm)	6 %	11 %
1 $\mu\text{g/g}$ (ppm)	8 %	16 %
10 $\mu\text{g/kg}$ (ppb)	15 %	32 %

5. การวิเคราะห์หาปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในสารสกัดตำรับยาสมุนไพร

5.1 นำสารสกัด มาทำการเจือจางด้วย methanol และ mobile phase ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงของ calibration curve

5.2 บรรจุใน LC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง

5.3 แทนค่า peak area ที่ได้ ไปแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบปริมาณของสาร Δ^9 -THC และ CBD ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี ทั้งนี้ตำรับยา authentic ไม่ได้ใส่การบูรในสูตรตำรับ เนื่องจากเป็นสารที่ระเหยง่าย ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase

6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ

- 1) 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8)
 - ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for injection
- 2) สารละลายเอนไซม์ AChE ความเข้มข้น 0.2 units/ml
 - ชั่งเอนไซม์ AChE 0.073 mg (1 unit = 0.0073 mg)

- ละลายและปรับปริมาตรด้วย 0.1% BSA ใน 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8)
จนครบ 5 ml ได้ความเข้มข้น 2 unit/ml

- บีบสารละลายมา 1 ml ปรับปริมาตรด้วย 0.1% BSA ใน 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8) จนครบ 10 ml ได้ความเข้มข้น 0.2 unit/ml

3) 1.5 mM acetylcholine iodide (ACTI)

- ชั่ง ACTI 0.01084 g ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml

- ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8)

4) 3 mM DTNB

- ชั่ง DTNB 0.0594525 g ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml

- ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8)

5) galantamine ความเข้มข้น 1 mg/ml (positive control)

- ชั่งสารมาตรฐาน galantamine 0.001 g ลงใน microcentrifuge tube

- ละลายด้วย 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8) 1 ml

6) สารสกัดตำรับยาสมุนไพร (sample)

- ชั่งสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 0.004 g ใส่ใน microcentrifuge tube

- ละลายด้วย 50 mM TRIS/HCl buffer (pH 8) 1 ml

- เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/ml (stock)

6.2 ทำกราฟมาตรฐานระหว่าง สารละลายมาตรฐาน galantamine ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 $\mu\text{g/ml}$ (final conc.) กับ %inhibition

6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ของสารตัวอย่าง

- เติมเอนไซม์ AChE ความเข้มข้น 0.2 unit/ml ที่ทำละลายด้วย 0.1 % BSA ใน 50 mM TRIS/HCL buffer (pH 8) ปริมาตร 25 μl

- เติมตัวอย่างที่ละลายใน 50 mM TRIS/HCL buffer (pH 8) ปริมาตร 25 μl

- Incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที

- เติม 1.5 mM ATCI ปริมาตร 25 μl

- เติม 3 mM ของ DTNB ใน 50 mM TRIS/HCL buffer (pH 8) ปริมาตร 125 μl

- Incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที

6.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

6.5 ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันทั้งหมด 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ

6.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหา %inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank control}}} \right) \right] \times 100$$

โดยที่ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบที่ทำปฏิกิริยา
 $A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา
 A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ substrate
 $A_{\text{blank control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ substrate ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

6.7 คำนวณค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ (calibration curve) ของ %inhibition ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

7.1 สารสกัดหยาบของตำรับยาสมุนไพร

- 7.1.1 ชั่งสารสกัดตำรับยาสมุนไพร 0.001 g ใส่ใน microcentrifuge tube
- 7.1.2 ละลายด้วย methanol จนได้ปริมาตร 1 ml
- 7.1.3 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ (stock)

7.2 เตรียมสารละลาย positive control (Ascorbic acid) ความเข้มข้น 1 mg/ml

- 7.2.1 ชั่ง Ascorbic acid 1 mg ใน volumetric flask ขนาด 1 ml
- 7.2.2 ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนได้ปริมาตร 1 ml

7.3 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.6 mM

- 7.3.1 ชั่ง DPPH 0.00236 g ใน volumetric flask ขนาด 10 ml
- 7.3.2 ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนได้ปริมาตร 10 ml

7.4 ทำ system suitability โดยใช้สารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ (final conc.) เติมสารลงใน 96-wells microplate ตามลำดับ แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ %inhibition และหาค่า correlation coefficient (r^2) ของสมการเส้นตรง

7.5 ปิเปตสารลงใน 96 well plate ดังตาราง

ตาราง 6 ขั้นตอนการป้อนสารลงใน 96 well plate ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

	DPPH solution (μl)	Methanol (μl)	Sample (μl)	Ascorbic acid (μl)
Sample	100	-	100	-
Blank sample	-	100	100	-
Negative control	100	100	-	-
Positive control	100	-	-	1100

7.6 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

7.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 515 nm

7.8 ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ

7.9 คำนวณหา % radical scavenging และคำนวณหา IC₅₀ โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ (Calibration curve) ของ % radical scavenging ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

8. การทำโมเลกุลาร์ด็อกกิง (Molecular docking)

1. สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

1.1 ทบทวนงานวิจัยเกี่ยวกับสารสำคัญในสมุนไพรมะขาม

1.2 ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ molecular docking ของสารสำคัญ

ในสมุนไพรมะขามกับเอนไซม์ AChE

2. ติดตั้งโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการทำ molecular docking

2.1 ศึกษาวิธีใช้โปรแกรมที่เกี่ยวข้อง

3. ดำเนินการทำ molecular docking ดังนี้

3.1 การเตรียมโครงสร้างสารสำคัญของสมุนไพรมะขามที่จะใช้ในการทดลอง (Ligand)

3.1.1 ดาวน์โหลดลิแกนด์ที่ต้องการจาก PubChem โดยเลือกนามสกุล

ไฟล์เป็น .sdf

3.1.2 หากโครงสร้างไม่สามารถดาวน์โหลดได้ต้องวาดโครงสร้างสามมิติของลิแกนด์ด้วย โปรแกรม ChemDraw Ultra 12.0 และ Chem3D pro 12.0

3.2 การเตรียมโปรตีนที่เป็นเป้าหมาย AChE

3.2.1 ดาวน์โหลดโครงสร้างจากเว็บไซต์ RCSB Protein data bank โดยเลือกนามสกุลไฟล์เป็น .pdb

3.3 ดำเนินการทำ molecular docking โดยใช้โปรแกรม AutodockTools 1.5.6

3.3.1 เปิดโปรแกรมและเปิดไฟล์ AChE พร้อมกับลิแกนด์

3.3.2 แปลงนามสกุลไฟล์ให้เป็น .pdbqt

3.3.3 เลือก Grid box ให้ครอบคลุมส่วนของ binding site

4. วิเคราะห์ผลการทำ molecular docking โดยมีหลักการในการวิเคราะห์ได้แก่

4.1 เปรียบเทียบ Binding affinity ของ AChE และลิแกนด์แต่ละตัว

4.2 เปรียบเทียบพันธะที่เกิดขึ้นระหว่าง AChE และลิแกนด์แต่ละตัว

4.3 เปรียบเทียบตำแหน่งของ AChE และลิแกนด์แต่ละตัว

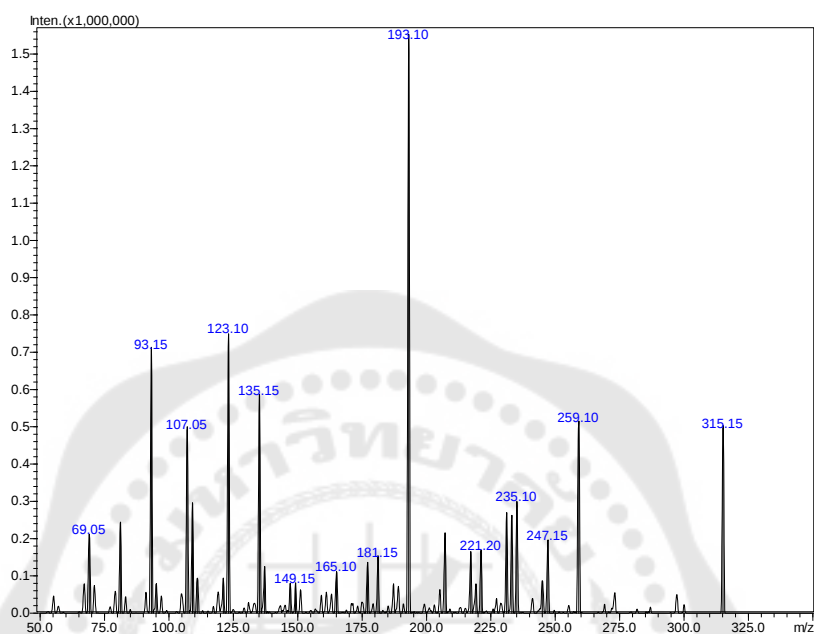
บทที่ 4

ผลการวิจัย

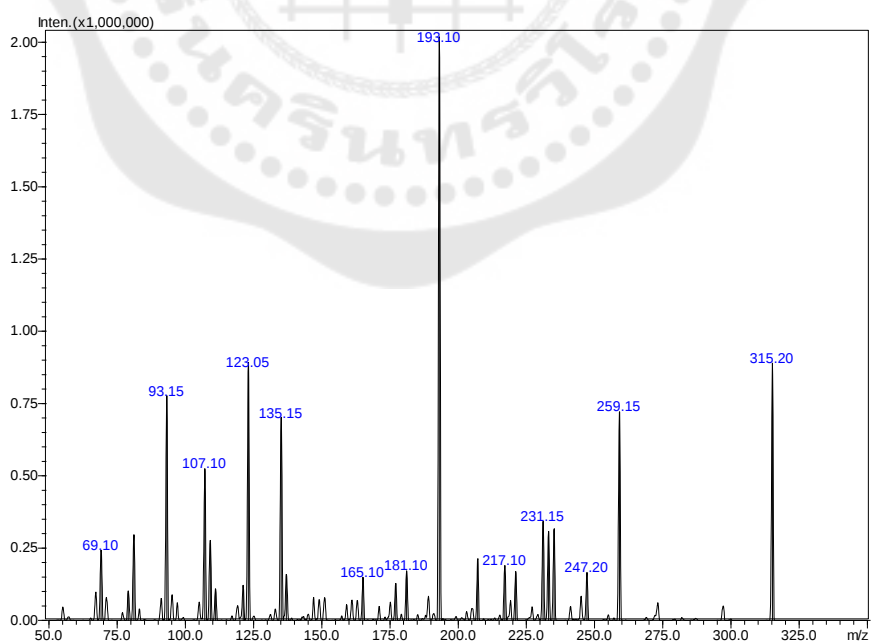
4.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC และ CBD ด้วยเทคนิค LC-MS-MS

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) วิธี mass spectrometry สามารถตรวจวัดไอออนของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกัน แต่ Δ^9 -THC และ CBD มีมวลโมเลกุลเท่ากัน ในการวิเคราะห์นี้ได้เลือก interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ชนิด electrospray ionization (ESI) ไอออนที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย selected reaction monitoring (SRM) หรือ multiple reaction monitoring (MRM) mode ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมา (fragment ion, transition ion) จากไอออนตั้งต้น (parent ion) ตัวใด ตัวหนึ่ง SRM หรือ MRM สามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลเท่ากันได้ ไอออนของสารตั้งต้นที่เลือกสำหรับ Δ^9 -THC และ CBD โดยทั่วไปจะสอดคล้องกับไอออนของโมเลกุลโปรตอน ($[M+H]^+$) ที่สร้างขึ้นในแหล่งกำเนิดอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน (ESI) การกระจายตัวของสารตั้งต้นเหล่านี้ในเซลล์ที่ชนกันของแมสสเปกโตรมิเตอร์ส่งผลให้เกิดการสร้างคุณลักษณะไอออนของผลิตภัณฑ์เฉพาะของสารวิเคราะห์แต่ละตัว Δ^9 -THC และ CBD มีน้ำหนักโมเลกุล 314.45 กรัมต่อโมล และแสดงสารตั้งต้นที่คล้ายกันในการเปลี่ยนไอออนของผลิตภัณฑ์ (m/z 315 > 123, 193 และ 259) ดังแสดงภาพประกอบ 7 และ 8 การเทคนิค MRM ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม สำหรับการหาปริมาณของ Δ^9 -THC และ CBD เพื่อให้เกิดการแสดงผลการรบกวนน้อยที่สุดจากสัญญาณรบกวนพื้นหลังและส่วนประกอบเมทริกซ์ ในขณะเดียวกันก็เพิ่มอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนให้สูงสุดสำหรับการวิเคราะห์เป้าหมาย ข้อมูล MRM ที่เลือกสำหรับการวิเคราะห์ Δ^9 -THC และ CBD พร้อมด้วยสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ไอออนที่สอดคล้องกัน สรุปไว้ในตาราง 7 นอกจากนี้ยังกำหนดด้วยว่าไอออนปริมาณ ซึ่งให้สัญญาณที่สูงกว่า สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลง m/z 315 > 193 สำหรับ ทั้ง Δ^9 -THC และ CBD ด้วยการตรวจสอบการ transition ผ่าน MRM จำเพาะเหล่านี้ ระบบ UHPLC-MS/MS สามารถเลือกตรวจจับและกำหนดปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในเมทริกซ์ตัวอย่างที่ซับซ้อนซึ่งมีความไวและความแม่นยำสูง นอกจากนี้ การใช้ MRM ยังช่วยให้สามารถวิเคราะห์สารวิเคราะห์หลายตัวพร้อมกันได้ในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว ทำให้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์

ปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ที่มีองค์ประกอบในสารตัวอย่างที่มีความซับซ้อนของตำรับยา
สมุนไพร



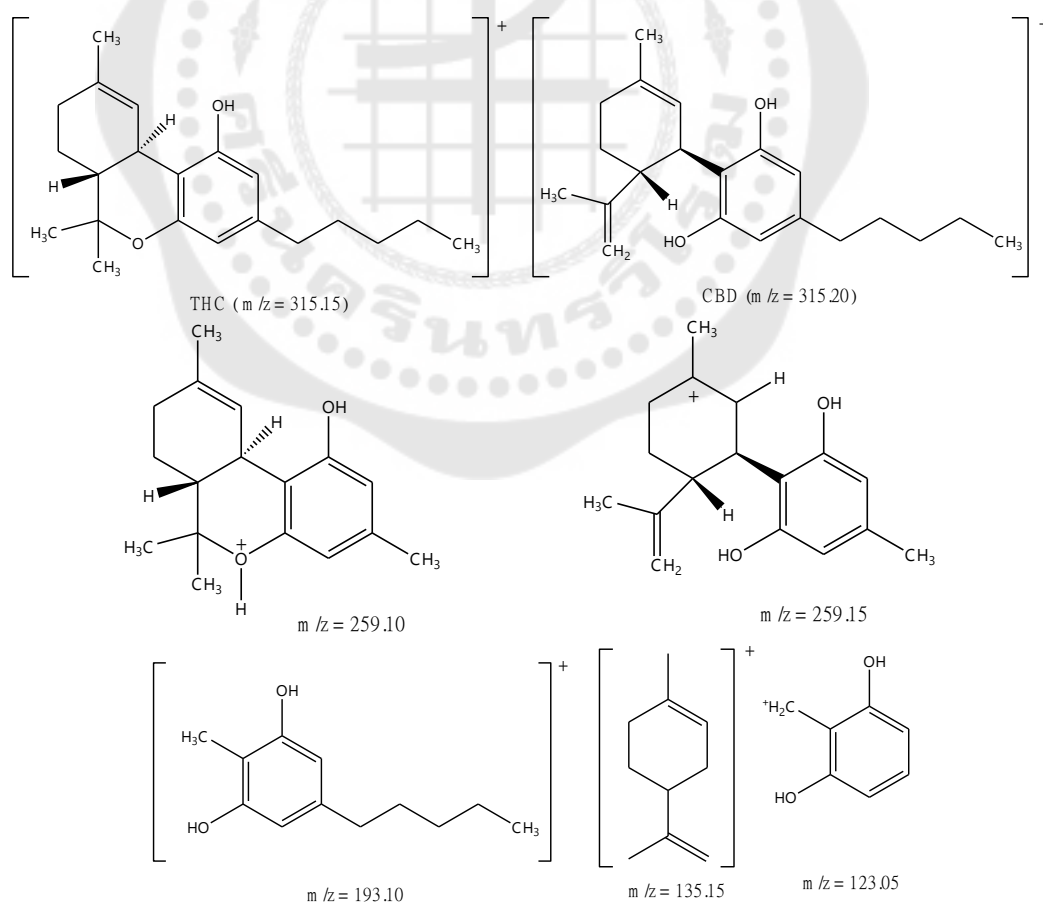
ภาพประกอบ 7 Mass fragmentation spectra ของ Δ^9 -THC ใน ESI positive mode.



ภาพประกอบ 8 Mass fragmentation spectra ของ CBD ใน ESI positive mode.

ตาราง 7 Precursor และ fragment ions รวมถึง MS parameters ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Δ^9 -THC and CBD ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Analyte	m/z	Dwell time msec	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
Δ^9 -THC	315.15>193.10	100	-13.7	-24.4	-18.1
	315.15>135.15	100	-13.7	-33.7	-10.8
CBD	315.20>193.10	100	-13.7	-21.1	-36.9
	315.20>123.05	100	-32.6	-21.5	-12.3
Tadalafil	390.10>268.10	100	-36.9	-16.6	-16.6
	390.10>135.10	100	-18.1	-21.0	-12.3



ภาพประกอบ 9 Proposed fragments ของ Δ^9 -THC และ CBD ใน ESI positive mode.

4.2 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability)

ความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (System suitability) ในการคัดเลือกความเหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC Guideline 2012 ได้แก่ theoretical plate (N) > 2000, tailing factor (T) < 2, resolution > 2, %RSD ของ retention time ≤ 2 และ %RSD ของ peak area ≤ 2 จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วยเทคนิค LC-MS-MS วิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ผลที่ได้คือ ค่า retention time เฉลี่ยของ Δ^9 -THC เท่ากับ 6.26 นาที และ CBD เท่ากับ 4.71 นาที มี %RSD ≤ 2 ค่าประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ (Theoretical Plate) ของ Δ^9 -THC ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 54165 และ CBD ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 56709 ซึ่งถือว่าผ่านการยอมรับ คือ มีค่ามากกว่า 2000 ค่าความสมมาตรของพีค (tailing factor) ของ Δ^9 -THC ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.266 และ แคนนาบิไดออล CBD ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.159 ถือว่าผ่านการยอมรับ คือ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าระบบดังกล่าวมีความเหมาะสมของเครื่องมือและวิธีในการวิเคราะห์

ตาราง 8 ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

Parameter	Criteria	CBD	Δ^9 -THC	IS
Average of Area	-	3,573,002	3,811,796	85,271
Average of Retention time	-	4.71	6.26	1.37
%RSD of Area	≤ 2	1.87	1.70	1.54
%RSD of Retention time	≤ 2	0.04	0.16	0.90
Average of Resolution	> 2	8.075	8.075	> 2
Average of Tailing factor	< 2	1.159	1.266	1.713
Average of Theoretical plate (N)	> 2000	56,709	54,165	7,378

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Δ^9 -THC และ CBD โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ ดังนี้

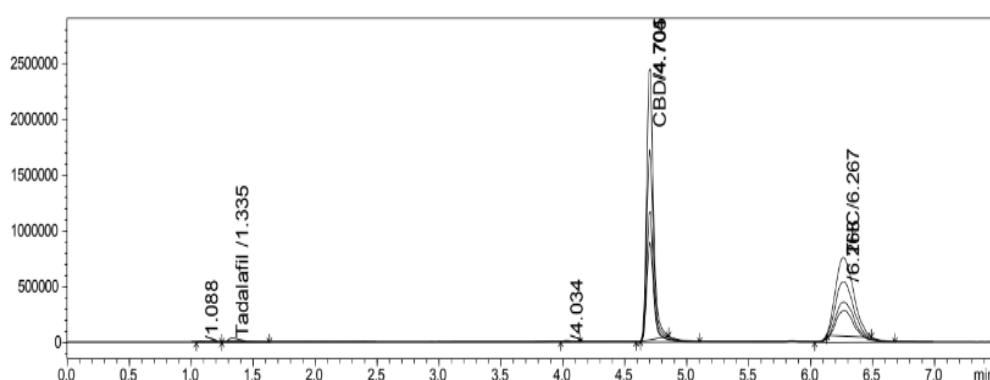
Analytical technique	LC-MS/MS
Target drug test	Δ^9 -THC and CBD
Internal Standard	Tadalafil
Linearity Range	5.025-20,099.000 ng/ml for CBD in Methanol 5.000-20,001.450 ng/ml for THC in Methanol
Curve Type	Linear
Equation Type	$Y = ax+b$ x = concentration of drug y = peak area ratio of drug/Internal standard a = slope of the calibration curve b = intercept of the calibration curve
Weighting Factor	$1/C^2$
Column	Phenomenex Luna C18, (100 x 2 mm, 3 μ m)
Detector	MS/MS - CBD; precursor ions at m/z 315.2000 product ions at m/z = 193.1000 (target), 135.1500 (reference ion) - Δ^9 -THC; precursor ions at m/z 315.1500 product ions at m/z = 193.1000 (target), 123.0500 (reference ion) - Tadalafil; precursor ions at m/z 390.1000 product ions at m/z = 268.1000 (target), 135.1000 (reference ion)
MS interface	ESI
Heating gas flow	10 L/min
Heat Block temperature	400 $^{\circ}$ C
DL temperature	250 $^{\circ}$ C

	Compound	m/z	Dwell time	Q1	CE	Q3
MRM	CBD	315.20>193.10	100.0	-13.7	-21.1	-36.9
		315.20>135.15	100.0	-32.6	-21.5	-12.3
	Δ ⁹ -THC	315.15>193.10	100.0	-13.7	-24.4	-18.1
		315.15>123.05	100.0	-13.7	-33.7	-10.8
	Tadalafil	390.10>268.10	100.0	-36.9	-16.6	-16.6
		390.10>135.10	100.0	-18.1	-21.0	-12.3
Calibration curve levels						
7						
Quantitative Method						
Internal standard						
Column oven temperature						
40 °C						
Autosampler temperature						
15°C						
Run time / injection						
7.6 min						
Retention time						
Around 4.7 min for CBD						
Around 6.2 min for Δ ⁹ -THC						
Around 1.3 min for tadalafil						
Mobile phase						
0.01% formic in 20mM ammonium formate and ACN in the ratio 20 : 80 (v/v)						
	Time (min)	Flow (ml/min)	Conc. (pump B : organic solvent)			
Gradient elution	1.00	0.3	60			
	1.50	0.3	80			
	4.00	0.4	80			
	4.50	0.4	60			
	7.00	0.4	60			
	7.60	0.3	60			
Volume/ injection	0.1 µl					

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.3.1 การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

จากภาพประกอบ 10 เมื่อทำการวิเคราะห์โดยการ spike ด้วยสารมาตรฐาน CBD และ สารมาตรฐาน Δ^9 -THC พบว่า retention time เท่ากับ 4.7 และ 6.2 นาที ตามลำดับ โดยไม่เกิดการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตัวอย่าง



ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารสกัดตำรับสุขไสยาสน์ ที่ spike สารมาตรฐาน CBD และ Δ^9 -THC

4.3.2 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้การวิเคราะห์ (linearity and range)

4.3.2.1 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ CBD

จากตาราง 9 เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน CBD ในตัวทำละลาย methanol ช่วงความเข้มข้น 0.005 – 20 µg/ml และ นำค่าเฉลี่ยของ peak area และ ค่าความเข้มข้นมาสร้างเป็น calibration curve พบว่า calibration curve เส้นที่ 1 2 และ 3 มีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9999 และคำนวณเป็นค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC 2012 ที่กำหนดให้มีค่า r มากกว่า 0.995

ตาราง 9 ผลการทดสอบ linearity และ range ของ CBD

No.	Conc. (ng/ml)	Area ratio	Equation	R
1	4.907	0.1660	$Y = (0.0344)X + (0.0106)$	0.9999
	10.441	0.3500		
	51.921	1.8031		
	206.759	7.1042		
	995.916	34.0451		
	4,871.711	165.3495		
	9,951.101	346.1949		
	19,531.220	670.3549		
2	5.019	0.1707	$Y = (0.0344)X + (0.0024)$	0.9999
	10.041	0.3435		
	50.421	1.7604		
	211.248	7.2585		
	1,025.557	35.0584		
	4,933.247	167.4381		
	9,906.541	344.6447		
	19,286.910	662.1022		
3	5.011	0.1704	$Y = (0.0344)X + (0.0056)$	0.9999
	10.014	0.3474		
	52.114	1.7629		
	209.350	7.0494		
	990.320	33.9525		
	4,949.551	170.6450		
	9,702.949	325.6573		
	19,932.22	678.7065		

4.3.2.2 ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC

จากตาราง 10 เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Δ^9 -THC ในตัวทำละลาย methanol ช่วงความเข้มข้น 0.005 - 20 $\mu\text{g/ml}$ และนำค่าเฉลี่ยของ peak area และ ค่าความเข้มข้นมาสร้างเป็น calibration curve พบว่า calibration curve เส้นที่ 1 2 และ 3 มีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9999 และคำนวณเป็นค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC 2012 ที่กำหนดให้มีค่า r มากกว่า 0.995

ตาราง 10 ผลการทดสอบ linearity และ range ของ Δ^9 -THC

No.	Conc. (ng/ml)	Area ratio	Equation	R
1	4.928	0.1826	$Y=(0.0376)X+0.0052$	0.9999
	10.167	0.3732		
	52.924	2.0128		
	202.928	7.6362		
	992.092	36.3954		
	4930.607	183.2756		
	9512.653	362.4382		
	19913.340	747.0939		
2	5.121	0.1907	$Y=(0.0378)X+(0.0033)$	0.9999
	9.537	0.3501		
	48.809	1.8718		
	209.23	7.8734		
	1030.85	38.5932		
	5045.58	187.5492		
	9490.319	364.0876		
	20224.040	762.9371		
3	4.812	0.1792	$Y=(0.0372)X+(0.0233)$	0.9999
	10.68	0.4058		
	51.607	1.9119		
	205.529	7.5794		

981.915	36.8683
5002.575	188.8879
9168.114	336.9922
20225.05	753.5360

4.3.3 ผลการคำนวณขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ในการวิเคราะห์ Δ^9 -THC และ CBD

คำนวณค่า LOD จากสูตร $LOD = 3.3SD \text{ of } Y\text{-intercept}/\text{mean of slope}$ และ $LOQ = 10SD \text{ of } Y\text{-intercept}/\text{mean of slope}$ ดังแสดงในตาราง 11 และ 12 คำนวณค่า LOD และ LOQ ของ CBD ได้เท่ากับ 0.3973 ng/ml และ 1.2039 ng/ml ตามลำดับ และ คำนวณค่า LOD และ LOQ ของ Δ^9 -THC ได้เท่ากับ 0.9706 ng/ml และ 2.9412 ng/ml ตามลำดับ

ตาราง 11 คำนวณ LOD และ LOQ ของ CBD จากสมการเส้นตรง

Equation	Y - intercept	Slope	LOD	LOQ
$Y = (0.0344)X + (0.0106)$	0.0106	0.0344		
$Y = (0.0344)X + (0.0024)$	0.0024	0.0344		
$Y = (0.0340)X + (0.0067)$	0.0067	0.0340	0.3973	1.2039
			ng/ml	ng/ml
Mean		0.00343		
SD	0.004126			

ตาราง 12 คำนวณ LOD และ LOQ ของ Δ^9 -THC จากสมการเส้นตรง

Equation	Y - intercept	Slope	LOD	LOQ
$Y = (0.0376)X + (0.0052)$	0.0052	0.0376		
$Y = (0.0378)X + (0.0033)$	0.0033	0.0378		
$Y = (0.0372)X + (0.0233)$	0.0233	0.0372	0.9706	2.9412
			ng/ml	ng/ml
Mean		0.0375		
SD	0.011039			

4.3.4 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

4.3.4.1 Accuracy และ Precision ของ CBD

เนื่องจากการวิเคราะห์ CBD ใช้ mass spectrometer เป็น detector ซึ่งมีความจำเพาะต่อ CBD โดยไม่มีการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับยาสมุนไพร จึงทำการทดสอบหาค่า accuracy และ precision โดยใช้สารละลายมาตรฐานของ CBD ในตัวทำละลาย methanol ในการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ng/ml ความเข้มข้นละ 3 vials ได้ค่า %recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97.78 % - 100.15 % มี %RSD ของ intra-day precision อยู่ในช่วง 1.51 % - 1.92 % และมี %RSD ของ inter-day precision อยู่ในช่วง 1.52 % - 1.67 % ดังแสดงในตาราง 13 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2565 ระบุว่า หลังจากวันที่ 9 มิถุนายน 2565 ส่วนประกอบของกัญชา ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ได้แก่ เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบที่ ไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย สารสกัดที่มีสาร Δ^9 -THC เป็นส่วนประกอบ ต้องไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก กากหรือเศษที่เหลือจากการสกัดกัญชาและต้องมีสาร Δ^9 -THC ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก การศึกษาครั้งนี้ได้เทียบเคียงปริมาณ CBD เท่ากับข้อกำหนดของ Δ^9 -THC คือ ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC 2012 ทำให้วิธีวิเคราะห์ CBD ที่จะได้มาตรฐานควรมี %recovery อยู่ในช่วง 90-108% และ %RSD ไม่เกิน 3% ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC 2012

ตาราง 13 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ CBD

Conc. ng/ml)	Day	Actual Concentration (ng/ml)	Mean	SD	Precision (%RSD)	%Recovery
10.05	1	9.8783	10.0647	0.1665	1.65	100.15
		10.1170				
		10.1987				
	2	9.8413	10.0006	0.1604	1.60	99.51
		10.1620				
		9.9991				
	3	10.0643	10.0094	0.1920	1.92	99.60
		9.7959				
		10.1679				
	Inter-day (n = 9)		10.0249	0.1532	1.52	99.75
100.50	1	98.0565	100.0048	1.9729	1.97	99.51
		102.0014				
		99.9564				
	2	99.2547	99.9167	1.8511	1.85	99.42
		102.0078				
		98.4876				
	3	101.0561	99.1704	1.7667	1.78	98.68
		98.9018				
		97.5534				
	Inter-day (n = 9)		99.6973	1.6626	1.67	99.20
1005.00			978.7921	17.7839	1.79	99.23
			986.8304			
			1012.8169			
			995.3158			

Conc. ng/ml)	Day	Actual Concentration (ng/ml)	Mean	SD	Precision (%RSD)	%Recovery
		969.2720		14.7668	1.51	97.78
		970.2331				
		974.0197				
		966.8168	978.7607	14.8917	1.52	97.83
		995.4457				
	Inter-day (n = 9)		983.2825	15.4971	1.58	98.28

4.3.4.2 Accuracy และ Precision ของ Δ^9 -THC

เนื่องจากการวิเคราะห์ Δ^9 -THC ใช้ mass spectrometer เป็น detector ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Δ^9 -THC โดยไม่มีการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับยาสมุนไพร จึงทำการทดสอบหาค่า accuracy และ precision โดยใช้สารละลายมาตรฐานของ Δ^9 -THC ในตัวทำละลาย methanol ในการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ng/ml ความเข้มข้นละ 3 vials ได้ค่า % recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 98.98 % - 103.72 % มี %RSD ของ intra-day precision อยู่ในช่วง 0.59 % - 2.09 % และมี %RSD ของ inter-day precision อยู่ในช่วง 1.09 % - 2.06 % ดังแสดงในตาราง 14 ตาม พรบ. ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2565 ระบุว่า หลังจากวันที่ 9 มิถุนายน 2565 ส่วนประกอบของกัญชา ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ได้แก่ เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบที่ไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย สารสกัดที่มีสาร Δ^9 -THC เป็นส่วนประกอบ ต้องไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก กากหรือเศษที่เหลือจากการสกัดกัญชาและต้องมีสาร Δ^9 -THC ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC 2012 ทำให้วิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC ที่จะได้มาตรฐานควรมี %recovery อยู่ในช่วง 90-108% และ %RSD ไม่เกิน 3% ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC 2012

ตาราง 14 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC

Conc. ng/ml)	Day	Actual Concentration (ng/ml)	Mean	SD	Precision (%RSD)	%Recovery
10.05	1	10.1320	10.1421	0.1352	1.33	100.92
		10.0122				
		10.2821				
	2	10.1542	10.2383	0.1947	1.90	101.87
		10.0997				
		10.4609				
	3	10.6191	10.4239	0.2183	2.09	103.72
		10.4643				
		10.1882				
	Inter-day (n = 9)		10.2681	0.2033	1.09	102.17
100.50	1	102.1738	102.0912	1.4503	1.42	101.58
		103.4984				
		100.6014				
	2	102.8864	103.2858	1.7348	1.69	102.77
		105.1855				
		101.7855				
	3	98.3688	99.4764	1.0434	1.05	98.98
		99.6195				
		100.4409				
	Inter-day (n = 9)		101.6178	2.0970	2.06	101.11
1005.00	1	977.9779	991.5235	13.2324	1.33	99.10
		992.1740				
		1004.4187				
		1014.9431				

Conc. ng/ml)	Day	Actual Concentration (ng/ml)	Mean	SD	Precision (%RSD)	%Recovery
	2	1005.1488		5.9643	0.59	100.76
		1004.1490				
		992.8511				
	3	1006.3056	997.883	7.3365	0.74	99.74
		994.5082				
	Inter-day (n = 9)		999.1640	10.8829	1.09	99.87

4.4 ผลการคัดเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัด Δ^9 -THC และ CBD โดยใช้ พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter, HSP)

พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter, HSP) เป็นวิธีคัดเลือกตัวทำละลายจากพารามิเตอร์การละลายแบบ 3 มิติ ได้แก่ ค่าการละลายของแรงลอนดอน (London dispersion force, δ_d) ค่าการละลายของแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (dipolar intermolecular force, δ_p) และค่าพลังงานของพันธะไฮโดรเจน (energy from hydrogen bonding, δ_{hb}) คำนวณจากสมการ 3 สมการ ได้แก่

$$\delta_d = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 17.3231) MPa^{1/2} \quad (1)$$

$$\delta_p = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.3548) MPa^{1/2} \quad (2)$$

$$\delta_{hb} = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.9793) MPa^{1/2} \quad (3)$$

โดย i คือลำดับกลุ่มย่อยประเภท First Order ที่มีอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของตัวถูกละลาย

N คือจำนวนกลุ่มย่อยประเภท First Order ที่ซ้ำกันที่มีอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของตัวถูกละลาย

C คือค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท First Order ที่มีอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของตัวถูกละลาย

M คือจำนวนกลุ่มย่อยประเภท Second Order ที่ซ้ำกันที่มีอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของตัวถูกละลาย

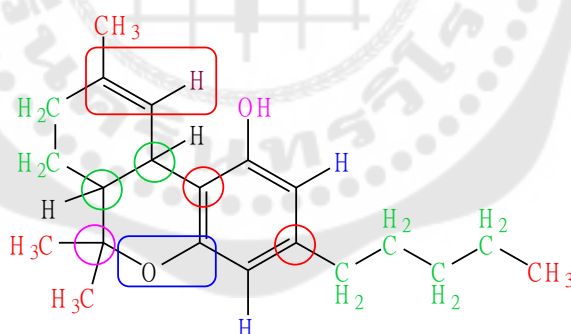
D คือค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท Second Order ที่มีอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของตัวถูกละลาย

W จะมีค่าเท่ากับ 1 เมื่อมี กลุ่มย่อยประเภท Second Order และเท่ากับ 0 เมื่อไม่มีกลุ่มย่อยประเภท Second Order

ตัวทำละลายที่มีค่า HSP ใกล้เคียงกับ CBD และ Δ^9 -THC จะได้รับการคัดเลือกเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัด CBD และ Δ^9 -THC จากตำรับยาสมุนไพรไทย ซึ่งการคำนวณความใกล้เคียงของค่า HSP เป็นการคำนวณหาค่า radius (Ra) ดังสมการ

$$R_a^2 = 4 (\delta_{di} - \delta_{dj})^2 + (\delta_{pi} - \delta_{pj})^2 + (\delta_{hi} - \delta_{hj})^2 \quad (4)$$

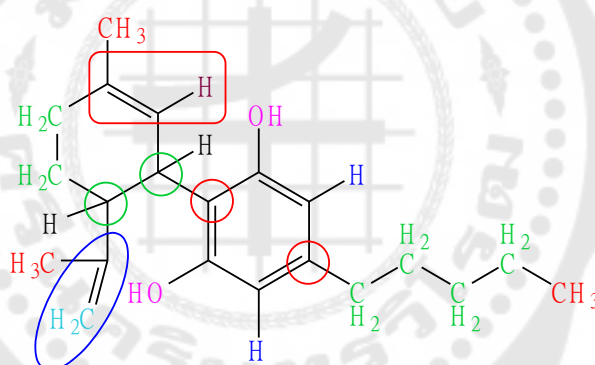
โดย i คือค่า HPS ของตัวถูกละลาย และ j คือค่า HSP ของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่มีค่า Ra น้อยที่สุดจะละลายตัวถูกละลายได้ดีที่สุด ผลการคำนวณค่า HSP ของ CBD และ Δ^9 -THC ดังแสดงในภาพที่ 11 และ 12



ภาพประกอบ 11 การคำนวณค่า Hansen Solubility Parameters ของ Δ^9 -THC

Group	Ni	Ci			(NiCi)p	(NiCi)d	(NiCi)hb
1 st -order		δ_d	δ_p	δ_h			
-CH ₃	4	-0.9714	-1.6448	-0.7813	-3.8856	-6.5792	-3.1252
-CH ₂	6	-0.0269	-0.3045	-0.4117	-0.1614	-1.8270	-2.4702
AC	2	0.8496	0.6187	0.0084	1.6992	1.2374	0.0168

ACH	2	0.1105	-0.5303	-0.4305	0.2210	-1.0606	-0.8610
ACOH	1	0.5288	1.101	6.958	0.5288	1.1010	6.9580
>C<	1	1.2686	2.0838	0.0866	1.2686	2.0838	0.0866
-CH<	2	0.645	0.6491	-0.2018	1.2900	1.2982	-0.4036
-CH=C<	1	0.5372	-0.9024	-1.8872	0.5372	-0.9024	-1.8872
2 nd -order	Mj						
AC-O-C	1	0.2568	0.8153	0.6092	0.2568	0.8153	0.6092
$\Sigma NiCi + \Sigma MjCi$					1.7546	-3.8335	-1.0766
Constant (C)					17.3231	7.3548	7.9793
$\Sigma NiCi + \Sigma MjCi + C$					19.0777	3.5213	6.9027



ภาพประกอบ 12 การคำนวณค่า Hansen Solubility Parameters ของ CBD

Group	Ni	Ci			(NiCi)p	(NiCi)d	(NiCi)hb
1 st -order		δ_d	δ_p	δ_h			
-CH ₃	3	-0.9714	-1.6448	-0.7813	-3.8856	-6.5792	-3.1252
-CH ₂	6	-0.0269	-0.3045	-0.4117	-0.1614	-1.8270	-2.4702
AC	2	0.8496	0.6187	0.0084	1.6992	1.2374	0.0168
ACH	2	0.1105	-0.5303	-0.4305	0.2210	-1.0606	-0.8610
ACOH	2	0.5288	1.101	6.958	1.0576	2.2020	13.9160
CH ₂ =C<	1	-0.4829	-0.7794	-0.826	-0.4829	-0.7794	-0.8260
-CH<	2	0.645	0.6491	-0.2018	1.2900	1.2982	-0.4036

-CH=C<	1	0.5372	-0.9024	-1.8872	0.5372	-0.9024	-1.8872
$\Sigma NiCi$		1.2465	-4.7662	5.1409			
Constant (C)		17.3231	7.3548	7.9793			
$\Sigma NiCi + C$		18.5696	2.5886	13.1202			

ค่า HSP ที่คำนวณได้จะให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับคุณลักษณะความสามารถในการละลายของ Δ^9 -THC และ CBD ค่าการละลายของแรงลอนดอน แสดงถึงความสามารถของสารประกอบในการทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ในขณะที่ค่าการละลายของแรงดึงดูดระหว่างขั้วบ่งชี้ถึงปฏิกิริยาระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้ว และแรงพันธะไฮโดรเจนสะท้อนถึงความสามารถของสารประกอบในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย การเปรียบเทียบค่า HSP ของ Δ^9 -THC และ CBD กับตัวทำละลายสามารถทำนายพฤติกรรมของการละลายได้ในระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ตัวทำละลายที่มีค่า HSP ใกล้เคียงกับค่า HSP ของ cannabinoids คาดว่าจะแสดงความสามารถในการละลายได้ดี ดังที่แสดงในตาราง 15 ค่า HSP ของไดคลอโรมีเทนใกล้เคียงกับค่า HSP ของ Δ^9 -THC ($R_a = 3.38$) และ CBD ($R_a = 7.98$) ดังนั้นจึงเลือกไดคลอโรมีเทนในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับสุขไสยาสน์

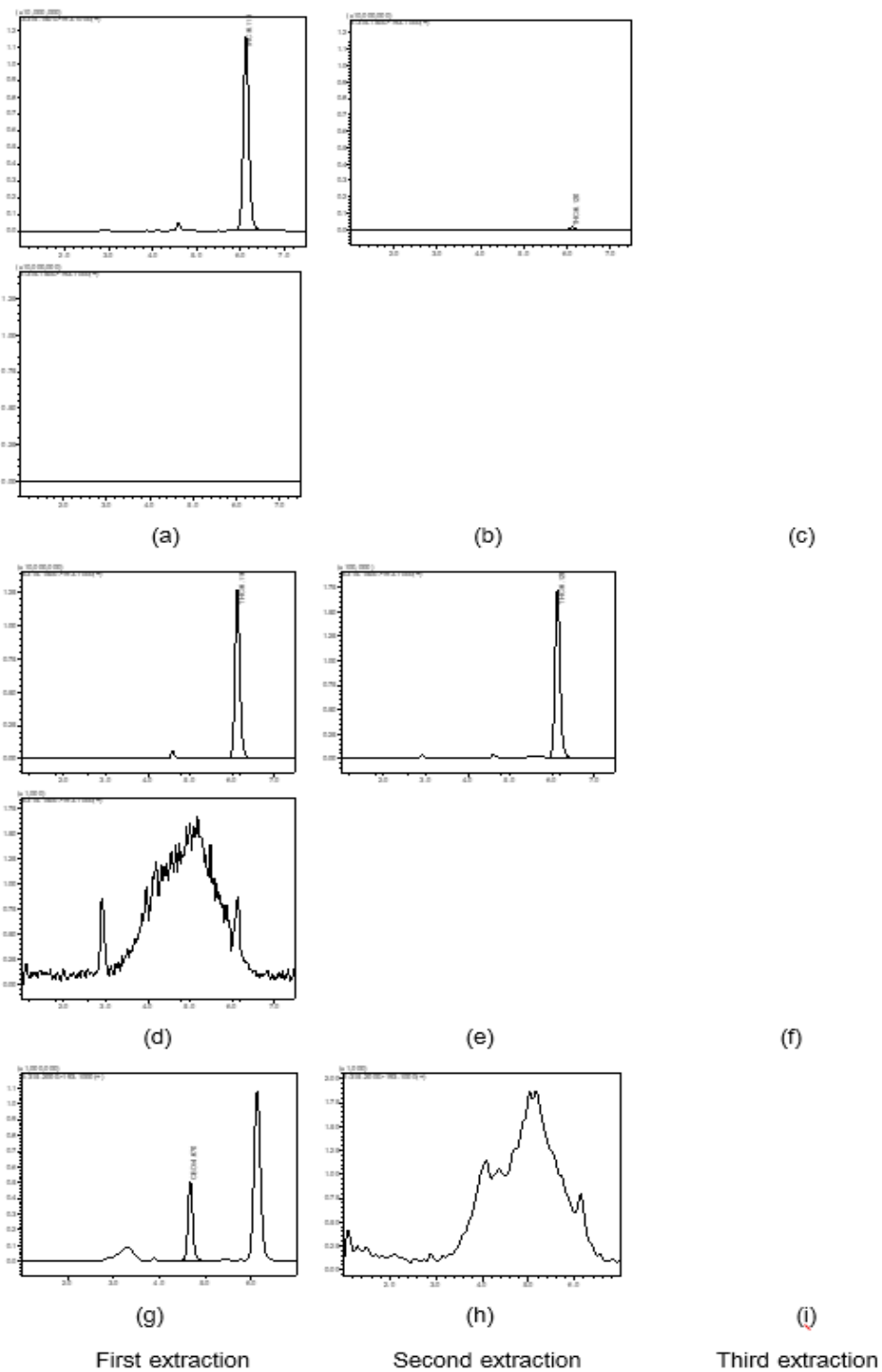
ตาราง 15 แสดงผลการคำนวณค่า Radius (R_a) ระหว่างค่า HSP ของ Δ^9 -THC และ CBD กับ HSP ของตัวทำละลาย

Name	Hansen Solubility Parameters			Ra	
Solute	δ_d	δ_p	δ_h	THC	CBD
THC	19.08	3.52	6.90		
CBD	18.57	2.59	13.12		
Solvent					
Dichloromethane	18.2	6.3	6.1	3.38	7.98
Toluene	18	1.4	2	5.76	11.24
Ethyl Acetate	15.8	5.3	7.2	6.80	8.55
Cyclohexane	16.8	0	0.2	8.84	13.64
Diethyl Ether	14.5	2.9	4.6	9.46	11.79

Acetone	15.5	10.4	7	9.93	11.67
1-Butanol	16	5.7	15.8	11.04	6.58
Hexane	14.9	0	0	11.40	15.25
2-Propanol	15.8	6.1	16.4	11.82	7.33
1-Propanol	16	6.8	17.4	12.60	7.90
Ethanol	15.8	8.8	19.4	15.07	10.43
Acetonitrile	15.3	18	6.1	16.35	18.15
Methanol	14.7	12.3	22.3	19.77	15.44
Ethylene Glycol	17	11	26	20.93	15.70
Water	15.5	16	42.3	38.21	32.70

4.5 ประสิทธิภาพของไดคลอโรมีเทนในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับยา ศุขไสยาสน์

ประสิทธิภาพการสกัดคือเปอร์เซ็นต์ของตัวถูกละลายที่เคลื่อนที่จากเฟสหนึ่งไปอีกเฟสหนึ่ง จากภาพประกอบ 13 และตาราง 16 พบว่าการใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายสามารถสกัด Δ^9 -THC และ CBD ได้มากกว่า 99.9% ในการสกัดครั้งที่สอง สกัดได้เกือบสมบูรณ์ในการสกัดครั้งที่สาม สิ่งนี้เน้นย้ำถึงความเหมาะสมของการใช้พารามิเตอร์ความสามารถในการละลายของ Hansen ในการเลือกไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย



ภาพประกอบ 13 LC-MS/MS chromatograms ของการสกัดครั้งที่ 1, 2 และ 3 ของ (a-c) ตำรับสุขไสยาสน์ (d-f) ภาพขยายโครมาโทแกรม และ (g-i) ภาพขยายโครมาโทแกรมของสารสกัดที่พบ CBD ปริมาณสูง

ตาราง 16 ประสิทธิภาพของไดคลอโรมีเทน ในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับยา
ศุขไสยาสน์

Number of extraction	Extraction efficiency of dichloromethane on an extraction of Δ^9 -THC (%)									
	Authen tic	Brand A	Brand B	Brand C	Brand D	Brand E	Brand F	Mean	SD	% RSD
1	84.67	93.53	88.15	80.30	83.26	80.45	83.28	84.81	4.68	2.72
2	99.93	99.93	99.91	100.00	99.91	99.92	99.94	99.93	0.03	0.03
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00

Number of extraction	Extraction efficiency of dichloromethane on an extraction of CBD (%)									
	Authen tic	Brand A	Brand B	Brand C	Brand D	Brand E	Brand F	Mean	SD	% RSD
1	89.80	92.14	89.08	94.27	82.94	84.91	81.51	87.81	4.79	4.41
2	99.96	99.96	99.98	100.00	99.98	99.92	99.93	99.96	0.03	0.03
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00

4.6 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบ (Crude extract) ของตำรับยาศุขไสยาสน์

จากการศึกษาการสกัดผงยาศุขไสยาสน์ ที่เตรียมขึ้นมาเอง 1 ตัวอย่าง และซื้อจาก
ท้องตลาด 6 ยี่ห้อตัวอย่างละ 30 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 300
มิลลิลิตร สกัดโดยแช่ผงยาเป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract)
ร้อยละผลผลิต (%yield) อยู่ในช่วงร้อยละ 3.12 – 33.89 ดังตาราง 17 มี 3 ยี่ห้อได้แก่ A, B และ D
ที่มีร้อยละผลผลิตใกล้เคียงกับตำรับที่เตรียมขึ้นมาเอง (ร้อยละ 16.38) ส่วนยี่ห้อ C (ร้อยละ
33.89) ได้ร้อยละผลผลิตเป็นสองเท่าของตำรับที่เตรียมขึ้นมาเอง สำหรับยี่ห้อ E และ F มีร้อยละ
ผลผลิตน้อยกว่า 6% ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะเป็นตำรับยาเดียวกัน แต่ถ้าวัตถุดิบที่
นำมาใช้ในการผลิตของแต่ละบริษัทที่แตกต่างกัน ก็ส่งผลต่อร้อยละผลผลิตในการสกัดที่แตกต่างกันได้

ตาราง 17 แสดงน้ำหนักสารสกัดหยาบและร้อยละผลผลิต (%yield) ในการสกัดผงยาสูบไซยาซีน ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ตำรับยาสูบไซยาซีน	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g) Mean $\pm$ SD	ร้อยละผลผลิต เทียบกับน้ำหนักแห้ง Mean $\pm$ SD
Brand A	30	5.07 $\pm$ 0.15	16.89 $\pm$ 0.50
Brand B	30	4.71 $\pm$ 0.18	15.70 $\pm$ 0.60
Brand C	30	10.17 $\pm$ 0.38	33.89 $\pm$ 1.27
Brand D	30	3.86 $\pm$ 0.11	12.86 $\pm$ 0.37
Brand E	30	0.91 $\pm$ 0.14	3.12 $\pm$ 0.48
Brand F	30	1.73 $\pm$ 0.12	5.78 $\pm$ 0.40
Authentic	30	4.92 $\pm$ 0.11	16.38 $\pm$ 0.37

4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในสารสกัดหยาบตำรับยาสูบไซยาซีน

การวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ในสารสกัดหยาบของตำรับยาสูบไซยาซีนน้ำหนัก 30 กรัม ที่มีใบกัญชาเป็นองค์ประกอบ 4.61 กรัม (15.38%) ตรวจพบปริมาณ Δ^9 -THC ในใบกัญชา ในช่วง 0.00231 – 0.14218% ซึ่งไม่เกิน 0.2% ตามที่กฎหมายกำหนด ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ในสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml

ตำรับยา สูบไซยาซีน	น้ำหนัก สารสกัด (g) Mean $\pm$ SD	ความเข้มข้น Δ^9 -THC ในสารสกัด (ng/ml) Mean $\pm$ SD	ปริมาณ Δ^9 -THC (mg) ในผงยา 30 g Mean $\pm$ SD	ร้อยละ Δ^9 -THC ในผงยา 30 g	ร้อยละ Δ^9 -THC ในใบกัญชา 4.61 g
Brand A	5.07 $\pm$ 0.15	12941.36 $\pm$ 387.88	6.56 $\pm$ 0.20	0.02187	0.14218
Brand B	4.71 $\pm$ 0.18	5904.82 $\pm$ 247.97	2.78 $\pm$ 0.12	0.00927	0.06028

ตำรับยา ศุขไสยาสน์	น้ำหนัก สารสกัด (g) Mean ± SD	ความเข้มข้น Δ^9 -THC ในสารสกัด (ng/ml) Mean ± SD	ปริมาณ Δ^9 -THC (mg) ในผงยา 30 g Mean ± SD	ร้อยละ Δ^9 -THC ในผงยา 30 g	ร้อยละ Δ^9 -THC ในใบกัญชา 4.61 g
Brand C	10.17 ± 0.38	108.54 ± 10.71	0.11 ± 0.01	0.00036	0.00231
Brand D	3.86 ± 0.11	3260.20 ± 129.07	1.22 ± 0.05	0.00407	0.02649
Brand E	0.91 ± 0.14	6295.47 ± 441.04	0.59 ± 0.04	0.00195	0.01271
Brand F	1.73 ± 0.12	10462.97 ± 698.66	1.82 ± 0.12	0.00607	0.03947
Authentic	4.92 ± 0.11	8521.71 ± 216.89	4.19 ± 0.01	0.01397	0.09084

การวิเคราะห์ปริมาณ CBD ในสารสกัดหยาบของตำรับยาศุขไสยาสน์น้ำหนัก 30 กรัมที่มี
ใบกัญชาเป็นองค์ประกอบ 4.61 กรัม (15.38%) ตรวจพบปริมาณ CBD ในใบกัญชา ในช่วง
0.00002 – 0.01541% ดังแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD ในสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml

ตำรับยา ศุขไสยาสน์	น้ำหนัก สารสกัด (g) Mean ± SD	ความเข้มข้น CBD ในสารสกัด (ng/ml) Mean ± SD	ปริมาณ CBD (ug) ในผงยา 30 g Mean ± SD	ร้อยละ CBD ในผงยา 30 g	ร้อยละ CBD ในใบกัญชา 4.61 g
Brand A	5.07 ± 0.15	1245.50 ± 3109.15	631.34 ± 55.11	0.00210	0.01368
Brand B	4.71 ± 0.18	1509.68 ± 108.10	711.06 ± 50.92	0.00237	0.01541
Brand C	10.17 ± 0.38	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.07	0.00000	0.00002
Brand D	3.86 ± 0.11	1619.38 ± 67.76	607.13 ± 25.20	0.00202	0.01316
Brand E	0.91 ± 0.14	167.09 ± 8.13	15.56 ± 0.72	0.00005	0.00034
Brand F	1.73 ± 0.12	1084.84 ± 59.38	188.82 ± 10.43	0.00063	0.00409
Authentic	4.92 ± 0.11	19.97 ± 0.60	9.82 ± 0.29	0.00003	0.00021

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE พบว่าสารมาตรฐาน galantamine ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE สูง และใช้เป็น positive control เมื่อทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน galantamine เท่ากับ $1\mu\text{g/ml}$ พบว่ามี %inhibition เท่ากับ 78.33 ± 2.48

เมื่อทำการทดสอบสารสกัดตำรับยาสมุนไพรชันไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นในช่วง 0.47 ถึง 2.5 mg/ml พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.34 mg/ml

ตาราง 20 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารมาตรฐาน galantamine สารสกัดจากตำรับยาสมุนไพรชันไดคลอโรมีเทน

Sample	Conc.	%Inhibition			mean $\pm$ SD
		n1	n2	n3	
Galantamine	1 $\mu\text{g/ml}$	81.18	76.74	77.05	78.33 ± 2.48
สารสกัด สมุนไพรชันไดคลอโรมีเทน	0.47 mg/ml	35.31	22.26	13.014	23.53 ± 11.20
	0.63 mg/ml	40.66	19.79	0	20.15 ± 20.33
	0.94 mg/ml	52.04	36.85	10.82	33.24 ± 20.85
	1.25 mg/ml	57.47	54.91	30.27	47.55 ± 15.02
	1.88 mg/ml	66.60	60.49	63.29	63.46 ± 3.06
	2.50 mg/ml	79.07	76.51	74.93	76.84 ± 2.09
Control		0	0	0	0.00 ± 0.00
IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรชันไดคลอโรมีเทน = 1.34 ± 0.35 mg/ml					

หมายเหตุ:

*สารสกัดสมุนไพรชันไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 0.47, 0.63 และ 1.88 mg/ml มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase แตกต่างกับ Galantamine $1\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value=0.014, 0.038 และ 0.002 ตามลำดับ)

*สารสกัดขุไซยาสน์ (ไดคลอโรมีเทน) ที่ความเข้มข้น 0.94, 1.25, 2.5 mg/ml มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ไม่แตกต่างกับ Galantamine 1 $\mu\text{g/ml}$ (p-value= 0.065, 0.072, 0.470 ตามลำดับ)

4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH scavenging assay ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.78 ถึง 25 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า IC_{50} ของ Ascorbic acid มีค่าเท่ากับ $6.46 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทำการทดสอบสารสกัดจากตำรับยาขุไซยาสน์ชันไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้นในช่วง 12.5 -800 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า สารสกัดตำรับยาขุไซยาสน์ Brand A, B, C, D, E, F และ Authentic มีค่า IC_{50} เท่ากับ $158.07 \pm 52.38 \mu\text{g/ml}$, $194.61 \pm 58.43 \mu\text{g/ml}$, $183.95 \pm 64.85 \mu\text{g/ml}$, $234.86 \pm 61.06 \mu\text{g/ml}$, $223.21 \pm 62.57 \mu\text{g/ml}$, $225.82 \pm 60.81 \mu\text{g/ml}$ และ $153.93 \pm 40.87 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid อีกทั้งตำรับยาขุไซยาสน์ชันตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นในช่วง 12.5 -800 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า สารสกัดตำรับยาขุไซยาสน์ Brand A, B, C, D, E, F และ Authentic มีค่า IC_{50} เท่ากับ $98.20 \pm 49.52 \mu\text{g/ml}$, $16.76 \pm 9.98 \mu\text{g/ml}$, $64.15 \pm 4.62 \mu\text{g/ml}$, $36.10 \pm 25.81 \mu\text{g/ml}$, $82.12 \pm 35.27 \mu\text{g/ml}$, $107.43 \pm 58.15 \mu\text{g/ml}$ และ $27.40 \pm 15.15 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ตาราง 21 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดที่ใช้ไดคลอโรมีเทนและเอทานอลในการสกัด

ตัวอย่าง	ชันตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน	ชันตัวทำละลายเอทานอล
	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$
Brand A	158.07 ± 52.38	98.20 ± 49.52
Brand B	194.61 ± 58.43	16.76 ± 9.98
Brand C	183.95 ± 64.85	64.15 ± 4.62
Brand D	234.86 ± 61.06	36.10 ± 25.81
Brand E	223.21 ± 62.57	82.12 ± 35.27
Brand F	225.82 ± 60.81	107.43 ± 58.15
Authentic	153.93 ± 40.87	27.40 ± 15.15
Ascorbic acid	6.46 ± 2.09	

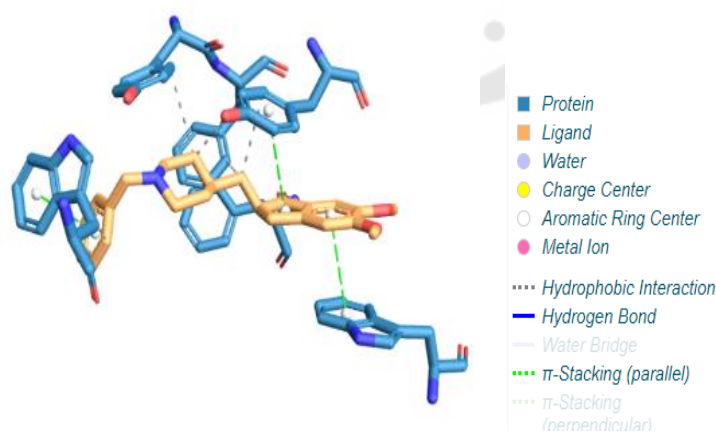
หมายเหตุ: การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แตกต่างจากการสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยใช้สถิติ t-Test

4.10 ผลการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพรไทยด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิง

4.10.1 การเตรียมโครงสร้างข้อมูล

ดาวน์โหลดไฟล์โครงสร้างของเอนไซม์ AChE และโครงสร้างสารสำคัญจากสมุนไพรรในตำรับยาสมุนไพรไทยได้แก่ สะเดา 8 รายการ สมุลแว้ง 55 รายการ เทียนดำ 23 รายการ โกฐกระดูก 5 รายการ ผลจันทร์ 11 รายการ ดอกบุนนาค 6 รายการ พริกไทย, ดีปลี 17 รายการ ขิงแห้ง 27 รายการ และกัญชา 28 รายการ ทั้งสิ้น จำนวน 180 รายการ มาแปลงไฟล์ข้อมูลจากไฟล์นามสกุล .sdf เป็นไฟล์นามสกุล .pdb ด้วยโปรแกรม Discovery Studio Visualizer

ในการศึกษาโมเลกุลาร์ดอกกิง จะใช้โปรแกรม Autodock 4.2 เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโมเลกุลาร์ดอกกิงของเอนไซม์ AChE การศึกษานี้ใช้โปรตีนเป้าหมายรหัส 7E3H.pdb ใช้โครงสร้างยา Donepezil เป็นสารควบคุม จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ยา Donepezil เกิดอันตรกิริยา Hydrophobic Interactions กับกรดอะมิโน TRP 86A TYR 337A PHE 338A TYR 341A เกิดอันตรกิริยา Hydrogen Bonds กับกรดอะมิโน PHE 295 A และเกิด π -Stacking กับกรดอะมิโน TRP 86A TRP 286A TYR 341A ตามภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 แสดงลิแกนด์ E20 (donepezil)

ที่มา: Melissa F Adasme และคณะ (2021)

เมื่อได้ตำแหน่งของยา Donepezil ในเอนไซม์ AChE ให้ทำการลบลิแกนด์ เพื่อให้โครงสร้างของเอนไซม์ AChE ปราศจากโครงสร้างของยา โดยนำลิแกนด์เป้าหมาย จำนวน 170 รายการ จำลองโครงสร้างในการจับกันกับเอนไซม์ AChE จากผลการทดลองได้เติมอะตอมไฮโดรเจนให้กับโครงสร้าง เพื่อให้โครงสร้างสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนเป้าหมาย นอกจากนี้โครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าวจะไม่มีอะตอมอิสระ และโมเลกุลของน้ำเพื่อให้ได้โครงสร้างที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ต่อไป

4.10.2 การทำโมเลกุลาร์ดอกกิง

ทำการกำหนดแผนที่กริด (Grid Box) เพื่อให้ครอบคลุมโปรตีนเป้าหมาย กำหนดให้แกน $x = -40.919$, $y = 35.841$, $z = -29.382$ ขนาดของ Grid ที่ใช้วิเคราะห์ คือ $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$ จำนวนรอบในการทำโมเลกุลาร์ดอกกิงเท่ากับ 50 รอบ เนื่องจากหากเพิ่มจำนวนรอบค่าพลังงานที่ได้ไม่แตกต่างกัน และการเพิ่มจำนวนรอบอาจส่งผลกระทบต่อระยะเวลาที่ใช้ในการคำนวณมากขึ้น ทำการบันทึกค่าศูนย์กลางที่ได้เพื่อกำหนดขอบเขตบริเวณที่ตัวยับยั้งจับกับโปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะ และให้ค่าความถูกต้องของพลังงานที่ใช้ในการจับกันมากยิ่งขึ้น

4.10.3 การวิเคราะห์รูปแบบการจับกันระหว่างลิแกนด์กับโปรตีนเป้าหมาย

ใช้โปรแกรม Discovery Studio Visualizer วิเคราะห์รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย

4.10.4 การศึกษารูปแบบการจับกันของเอนไซม์ AChE กับสารสำคัญ

4.10.4.1 รูปแบบการจับกันของเอนไซม์ AChE กับสารสำคัญของสมุนไพรที่สนใจ เรียงลำดับค่าพลังงานที่ต่ำสุด -11 ถึง -8 เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ AChE พร้อมทั้งแสดงการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย

ผลการศึกษาพบการเกิดอันตรกิริยา Hydrogen Bonds กับกรดอะมิโน PHE 295 A ข อ ง donepezil, catechin, quercetin, cynaropicrin, mesuaferone A, mesuaferone B, pipercollosine, piperlongumine, CBDVA, CBDA, cannflavin C, cannabisin D แ ล ะ denbinobin ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Ahmad และคนอื่น ๆ, 2024) และ (Jamal, Khan, Alharbi, Ahmad, และ Yadav, 2023)

ผลการศึกษาพบการเกิดอันตรกิริยา Pi-Pi Stacked กับกรดอะมิโน TRP 86A, TRP 286A แ ล ะ TYR 341A ที่ ข อ ง donepezil, galantamine, rivastigmine, epicatechin, chlorogenic acid, catechin, quercetin, apigenin, mesuaferone A, mesuaferone B, piperanine, piperine, piperdadin, dehydropipernonaline, pipernonaline, piperolein B,

piperundecalidine, pipercollosine, piperolactam C, CBGVA, CBG, CBDVA, CBD, THCV, Δ^9 -THC, THCA, CBC, cannflavin A, *N-trans*-coumaroyltyramine, *N-trans*-feruloyltyramine, *N-trans*-caffeoyltyramine, cannabisin D, denbinobin, cannabistilbene I, dihydroresveratrol และ cannabispiran ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Ahmad และคนอื่น ๆ, 2024) และ (Jamal และคนอื่น ๆ, 2023)

4.10.4.2 การทำโมเลกุลาร์ดอกกิงเป็นการศึกษาการออกแบบโมเลกุลสาร โดยคำนึงถึงรูปแบบการยึดจับระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ โดยพิจารณาจากค่าพลังงานในการยึดจับ (Binding Energy) ถ้าพลังงานยึดจับมีค่าเป็นลบแสดงว่าการยึดจับกันระหว่าง 2 โมเลกุลสามารถจับกันได้ดี ซึ่งสารสำคัญของสมุนไพรไทยทั้งหมด 170 ชนิด สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ AChE ได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 22

ตาราง 22 แสดงค่าพลังงานการยึดจับ (Binding Energy) (ในหน่วย kcal/mol) ระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์และสมุนไพรของลิแกนด์

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
1	-	Donepezil	-11.7
2	-	Galantamine	-9.6
3	-	Rivastigmine	-8.2
4	สะเดา	betulin	-8.5
		caryophyllene oxide	-10.0
		3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid	-8.6
		ecgonine	-5.4
		epicatechin	-10.0
		lupeol	-9.0
5	สมุลแว้ง	hexanal	-4.4
		tetradecanal	-6.2
		limonene aldehyde	-7.2
		Z-cinnamaldehyde	-7.3

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		1-Hexanol	-4.4
		α -amyl cinnamyl alcohol	-7.7
		1,8-cineole	-6.9
		α -pinene	-6.7
		linalool	-6.2
		α -terpinene	-7.1
		α -thujene	-6.8
		<i>p</i> -cymene	-7.1
		(E)- β -ocimene	-6.6
		camphene	-6.6
		<i>cis</i> -piperitol	-6.8
		endo-fenchol (α - fenchol)	-5.7
		geraniol	-6.7
		geranyl acetate	-7.2
		germacrene-D	-8.6
		limonene	-6.9
		nerol	-6.3
		neryl acetate	-7.3
		myrcene	-6.5
		spathulenol	-8.1
		terpinen-4-ol	-6.8
		terpinolene	-7.2
		β -caryophyllene	-8.5
		β -elemene	-8.5
		β -pinene	-6.7

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		β -selinene	-9.5
		δ -cadinol	-8.7
		δ -guaiene	-8.3
		(α -bulnesene)	
		α -cadinol	-8.6
		α -humulene	-8.5
		α -panasinsene	-8.6
		α -phellandrene	-6.9
		α -selinene	-9.5
		α -terpineol	-6.9
		13-epi-manoyl oxide	-8.5
		7-epi- α -selinene	-9.2
		Borneol	-6.4
		Camphor	-6.8
		<i>E</i> - β -ocimene	-5.4
		epi- α -cadinol	-8.8
		guaiol	-9.2
		isoborneol	-6.4
		phytol	-7.0
		pinene	-5.8
		sabinene	-6.7
		sclareolide	-9.3
		α -trans-bergamotene	-8.5
		α -zingiberene	-8.9
		α -fenchol	-6.7
		γ -terpineol	-7.0

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		δ -3-carene	-6.8
6	เทียนดำ	thymoquinone	-7.4
		thymohydroquinone	-7.2
		thymol	-7.1
		α -Pinene	-6.7
		β -Pinene	-6.7
		<i>p</i> -Cymene	-7.1
		carvacrol	-7.1
		dithymoquinone	-10.2
		gallic acid	-6.5
		ferulic acid	-7.5
		vanillic acid	-6.5
		<i>p</i> -coumaric acid	-7.3
		chlorogenic acid	-10.0
		catechin	-9.3
		quercetin	-9.4
		apigenin	-10.1
		linoleic acid	-7.5
		oleic acid	-6.7
		palmitic acid	-6.4
		stearic acid	-6.8
		lauric acid	-6.4
		myristic acid	-5.8
		linolenic acid	-7.1
7	โกฐกระดูก	costunolide	-9.0
		dihydrocostunolide	-9.3
		dehydrocostus lactone	-9.5

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		mokko lactone	-9.5
		cynaropicrin	-9.5
8	ผลจันทร์	γ -terpinene	-7.0
		α -terpineol	-6.9
		anethole	-6.8
		thymol	-7.2
		α -Copaene	-8.7
		eugenol	-7.0
		methyl eugenol	-7.1
		caryophyllene	-8.5
		<i>trans</i> -isoeugenol	-6.9
		isoelemicin	-7.3
		tetradecanoic acid	-6.4
9	ดอกบุนนาค	mesuaferone A	-11.4
		mesuaferone B	-11.5
		mesuanic acid	-9.2
		α - amyrin	-9.2
		β - amyrin	-9.8
		β - sitosterol	-10.2
10	พริกไทยและดีปลี่	piperanine	-9.8
		piperine	-10.5
		piperdardine	-10.3
		dehydropipernonaline	-10.5
		pipernonaline	-9.7
		piperolein B	-9.0
		piperundecalidine	-9.8
		piperchabamide C	-7.1

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		pipercallosine	-9.3
		retrofractamide B	-7.5
		guineensine	-7.2
		brachystamide B	-6.6
		pellitorine	-7.5
		neopellitorine B	-8.1
		brachyamide A	-6.7
		piperolactam C	-9.1
		piperlongumine	-9.4
11	ขิงแห้ง	α -terpinene	-7.1
		α -terpineol	-6.9
		4-terpineol	-6.8
		terpinolene	-7.2
		cineole	-6.9
		β -Eudesmol	-9.8
		nerol	-6.2
		<i>trans</i> -nerolidol	-7.8
		4-isopropylbenzyl	-6.7
		alcohol	
		3,7-dimethylocta-1,6-	-6.3
		dien-3-ol	
		3,7-dimethyloct-6-en-	-3.9
		1-yn-3-ol	
		3-methylhexan-2-ol	-5.1
		<i>cis</i> -piperitol	-6.8
		borneol	-6.4
		elemol	-8.5

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		butanal	-3.8
		germacrone	-7.6
		2,6-dimethylhept-5- enal	-6.0
		2-heptanone	-5.0
		neryl acetate	-6.9
		geranyl propionate	-7.4
		endo-bornyl acetate	-7.5
		sec-butyl acetate	-4.8
		allo-aromadendrene	-8.7
		β -sesquiphellandrene	-8.8
		α -cedrene	-8.7
		β -thujene	-6.7
12	กัญชา	cannabigerovarinic Acid (CBGVA)	-9.8
		cannabigerol (CBG)	-9.0
		cannabidivarin (CBDV)	-8.7
		cannabidivarinic acid (CBDVA)	-8.5
		cannabidiol (CBD)	-8.9
		cannabidiolic Acid (CBDA)	-9.2
		tetrahydrocannabivarin (THCV)	-9.7
		delta-9- tetrahydrocannabivarin ic acid (THCVA)	-9.8

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		delta-9- tetrahydrocannabinol (THC)	-10.3
		tetrahydrocannabinolic acid (THCA)	-9.9
		cannabichromevarin (CBCV)	-9.9
		cannabichromevarinic acid (CBCVA)	-9.8
		cannabichromene (CBC)	-9.6
		cannabichromenic Acid (CBCA)	-9.7
		cannflavin A	-11.2
		cannflavin B	-11.3
		cannflavin C	-10.3
		<i>N-trans</i> - coumaroyltyramine	-10.2
		<i>N-trans</i> - feruloyltyramine	-9.5
		<i>N-trans</i> - caffeoyltyramine	-10.1
		cannabisin D	-9.7
		denbinobin	-9.5
		cannabistilbene I	-10.1
		dihydroresveratrol	-9.2
		cannabispiran	-8.9

ลำดับ	ชื่อสมุนไพร	สารสำคัญ/ ยาแผนปัจจุบัน	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)
		cannabispirenone	-9.2
		cannabispiradienone	-9.2
		hordenine	-6.5

4.10.4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เป็นการประเมินคุณสมบัติทางเคมีและความเหมาะสมของสารในการพัฒนายา โดยใช้โปรแกรม SwissADME ของ Molecular Modelling Group of the Swiss Institute of Bioinformatics โดยแยกตามกลุ่มสารดังนี้

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ พบว่า สาร epicatechin, lupeol, cannflavin A, cannflavin B, cannflavin C, catechin, quercetin และ apigenin ผ่านเกณฑ์การประเมินน้ำหนักโมเลกุล ยกเว้นสาร mesuaferone A และ mesuaferone B อีกทั้งค่าจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ผ่านเกณฑ์จำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (HBA) และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (HBD) สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 ยกเว้นที่มีค่ามากกว่า 140 ของสาร mesuaferone A และ mesuaferone B สำหรับเกณฑ์ของ Lipinski's violation มีเพียง mesuaferone A และ mesuaferone B ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ดังกล่าว ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า มีเพียงสาร lupeol ที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 23

ตาราง 23 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
สะเดา	epicatechin	290.27	6	5	110.38	Yes	No
	lupeol	426.70	1	1	20.20	Yes	Yes

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
บุญนาค	mesuaferone	542.49	10	6	173.98	No	No
	A						
	mesuaferone	540.47	10	6	177.89	No	No
B							
	mesuanic acid	-	-	-	-	-	-
กัญชา	cannflavin A	436.50	6	3	100.13	Yes	No
	cannflavin B	368.38	6	3	100.13	Yes	No
	cannflavin C	436.50	6	3	100.13	Yes	No
เทียนดำ	catechin	290.27	6	5	110.38	Yes	No
	quercetin	302.24	7	5	131.36	Yes	No
	apigenin	270.24	5	3	90.90	Yes	No

สารกลุ่มอัลคาลอยด์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 165.23 - 411.28 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าว ค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มอัลคาลอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 เกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มอัลคาลอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า มีเพียงสาร ecgonine ที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 24

ตาราง 24 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มอัลคาลอยด์

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มอัลคาลอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H- bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
สะเดา	ecgonine	185.22	4	2	60.77	Yes	No
กัญชา	hordenine	165.23	2	1	23.47	Yes	Yes
พริกไทย/ ดีปลี่	piperanine	287.35	3	0	38.77	Yes	Yes
	piperine	285.34	3	0	38.77	Yes	Yes
	piperdardine	313.39	3	0	38.77	Yes	Yes
	dehydropipernonaline	339.43	3	0	38.77	Yes	Yes
	pipernonaline	341.44	3	0	38.77	Yes	Yes
	piperolein B	343.46	3	0	38.77	Yes	Yes
	piperundecalidine	367.48	3	0	38.77	Yes	Yes
	piperchabamide C	395.25	4	0	38.77	Yes	Yes
	pipercallosine	329.43	3	1	47.56	Yes	Yes
	retrofractamide B	355.47	3	1	47.56	Yes	Yes
	guineensine	383.25	4	1	47.56	Yes	Yes
	brachystamide B	411.28	4	1	47.56	Yes	Yes
	pellitorine	223.35	1	1	29.10	Yes	Yes
	neopellitorine B	235.37	1	0	20.31	Yes	Yes
	brachyamide A	381.23	4	0	38.77	Yes	Yes
	piperolactam C	309.32	4	1	60.55	Yes	Yes

สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล อยู่ในช่วง 286.41 - 358.47 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวน ผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10

และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าว ค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 เกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า สาร cannabigerovarinic acid, cannabigerol, cannabidiolic acid, tetrahydrocannabinolic acid, cannabichromene และ cannabichromenic acid ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 25

ตาราง 25 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มแคนนา บินอยด์	Molecular weight	Num. H-bond accepto rs	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
กัญชา	cannabigerovarinic acid (CBGVA)	332.43	4	3	77.76	Yes	No
	cannabigerol (CBG)	316.48	2	2	40.46	Yes	No
	cannabidivarin (CBDV)	286.41	2	2	40.46	Yes	Yes
	cannabidivarinic acid (CBDVA)	330.42	4	2	66.76	Yes	Yes
	cannabidiol (CBD)	314.46	2	2	40.46	Yes	Yes
	cannabidiolic acid (CBDA)	358.47	4	3	77.76	Yes	No
	delta-9-Tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA)	330.42	4	2	66.76	Yes	Yes

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มแคนนา บินอยด์	Molecular weight	Num. H-bond accepto rs	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
	delta-9- tetrahydrocanna binol (THC)	314.46	2	1	29.46	Yes	Yes
	tetrahydrocanna binolic acid (THCA)	358.47	4	2	66.76	Yes	No
	cannabichrome varin (CBCV)	286.41	2	1	29.46	Yes	Yes
	cannabichrome varinic acid (CBCVA)	330.42	4	2	66.76	Yes	Yes
	cannabichromene (CBC)	314.46	2	1	29.46	Yes	No
	cannabichromenic acid (CBCA)	358.47	4	2	66.76	Yes	No

สารกลุ่มเทอร์ปีน พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 134.22 – 426.39 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารในกลุ่มเทอร์ปีนผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าว ค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มเทอร์ปีนผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 เกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มเทอร์ปีนผ่านเกณฑ์การประเมิน ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า สาร caryophyllene, γ -terpinene, germacrene-D, β -caryophyllene, β -elemene, β -selinene, δ -guaiene, α -humulene, α -panasinsene,

α -selinene, 7-epi- α -selinene, α -trans-bergamotene และ α -zingiberene ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 26

ตาราง 26 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเทอร์ปีน

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม เทอร์ปีน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ขิงแห้ง	α - terpinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	α - terpineol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	4-terpineol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	terpinolene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	borneol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	nerol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	cis- piperitol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
ผลจันทร์	α - Copaene	204.35	0	0	0.00	Yes	Yes
	anethole	148.20	1	0	9.23	Yes	Yes
	caryophyll ene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	γ - terpinene	136.23	0	0	0.00	Yes	No
	isoelemicin	208.25	3	0	27.69	Yes	Yes
	tetradecan oic acid	228.37	2	1	37.30	Yes	Yes
	thymol	150.22	1	1	20.23	Yes	Yes
	α -	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม เทอร์ปีน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
terpineol							
บุญนา	α - amyrrin	426.39	1	1	20.23	Yes	Yes
	β - amyrrin	426.39	1	1	20.23	Yes	Yes
	β -	414.39	1	1	20.23	Yes	Yes
sitosterol							
เทียนดำ	thymoquinone	164.20	2	0	34.14	Yes	Yes
	thymohydroquinone	166.22	2	2	40.46	Yes	Yes
	thymol	150.22	1	1	20.23	Yes	Yes
	α -Pinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	β -Pinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	p-Cymene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	carvacrol	150.22	1	1	20.23	Yes	Yes
	dithymoquinone	328.40	4	0	68.28	Yes	Yes
	none						
สมุนไพร	1,8-cineole	154.25	1	0	9.23	Yes	Yes
	α -pinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	linalool	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	α -	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	terpinene						
	α -thujene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	p-cymene	134.22	0	0	0.00	Yes	Yes
	camphene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	cis-	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	piperitol						

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม เทอร์ปีน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
endo-fenchol		154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
geraniol		154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
geranyl acetate		196.29	2	0	26.30	Yes	Yes
germacren e-D		204.35	0	0	0.00	Yes	No
limonene		136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
nerol		154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
neryl acetate		196.29	2	0	26.30	Yes	Yes
myrcene		136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
spathuleno l		220.35	1	1	20.23	Yes	Yes
terpinen-4-ol		154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
terpinolene		136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
β -caryophyllene		204.35	0	0	0.00	Yes	No
β -elemene		204.35	0	0	0.00	Yes	No
β -pinene		136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
β -selinene		204.35	0	0	0.00	Yes	No
δ -cadinol		222.20	1	1	20.23	Yes	Yes
δ -guaiene		204.19	0	0	0.00	Yes	No

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม เทอร์ปีน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
	α -cadinol	222.37	1	1	20.23	Yes	Yes
	α -humulene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	α -panasinse ne	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	α -phellandre ne	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	α -selinene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	α -terpineol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	13-epi- manoyl oxide	290.26	1	0	9.23	Yes	Yes
	7-epi- α - selinene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	borneol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	camphor	152.23	1	0	17.07	Yes	Yes
	E- β - ocimene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	epi- α - cadinol	222.37	1	1	20.23	Yes	Yes
	guaiol	222.37	1	1	20.23	Yes	Yes
	isoborneol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม เทอร์ปีน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
	phytol	296.31	1	1	20.23	Yes	Yes
	pinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	sabinene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes
	sclareolide	250.38	2	0	26.30	Yes	Yes
	α -trans- bergamotene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	α - zingiberene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	γ -terpineol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	δ -3- carene	136.23	0	-	0.00	Yes	Yes

สารกลุ่มลิกลีแนน พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 283.32 – 624.25 g/mol ซึ่งสาร cannabisin D ไม่ผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือ ต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งมีเพียงสาร cannabisin D ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ HBD การประเมินค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) และเกณฑ์ของ Lipinski's violation ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า สาร *N-trans-feruloyltyramine* และ *N-trans-caffeoyltyramine* ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 27

ตาราง 27 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มลิแกน

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มลิแกน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H- bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
กัญชา	<i>N-trans-</i> coumaroyltyramine	283.32	3	3	69.56	Yes	Yes
	<i>N-trans-</i> feruloyltyramine	313.35	4	3	78.79	Yes	No
	<i>N-trans-</i> caffeoyltyramine	299.32	4	4	89.79	Yes	No
	cannabisin D	624.25	10	7	160.74	No	Yes

สารกลุ่มสติลบินอยด์พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 230.26 - 312.40 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารกลุ่มสติลบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าว ค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มสติลบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 เกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มสติลบินอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ทุกสารสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 28

ตาราง 28 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มสติลบินอยด์

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มสติลบินอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
กัญชา	denbinobin	284.26	5	1	72.83	Yes	Yes
	cannabistilbene I	312.40	3	2	49.69	Yes	Yes

dihydroresveratrol	230.26	3	3	60.69	Yes	Yes
cannabispiran	246.30	3	1	46.53	Yes	Yes
cannabispirenone	244.29	3	1	46.53	Yes	Yes
cannabispiradienone	244.29	3	1	46.53	Yes	Yes

สารกลุ่มฟีนอลิก พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 164.16 - 354.31g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลิกผ่านเกณฑ์การประเมินค่า HBA ส่วนค่า HBD และค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มฟีนอลิกไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มฟีนอลิกผ่านเกณฑ์การประเมิน ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ มีเพียงสาร vanillic acid และ chlorogenic acid ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 29

ตาราง 29 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟีนอลิก

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มฟีนอลิก	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
เทียนดำ	gallic acid	170.12	5	4	97.99	Yes	No
	ferulic acid	194.18	4	2	66.76	Yes	Yes
	vanillic acid	168.15	4	2	66.76	Yes	No
	<i>p</i> -coumaric acid	164.16	3	2	57.53	Yes	Yes
	chlorogenic acid	354.31	9	6	164.75	Yes	No

สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 220.35 - 512.35 g/mol มีเพียงสาร 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid ไม่ผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond

Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าว ค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 เกณฑ์ของ Lipinski's violation มีเพียงสาร 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid ไม่ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสารสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 30

ตาราง 30 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์

ชื่อสมุนไพร	สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
สะเดา	betulin	442.38	2	2	40.46	Yes	Yes
	caryophyllene oxide	220.35	1	0	12.53	Yes	Yes
	3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid	512.35	5	1	80.67	No	Yes

สารหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 102.17 - 222.37 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ซึ่งสาร *trans*-nerolidol ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินค่า HBA สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสารสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 31

ตาราง 31 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์

ชื่อ สมุนไพร	สารหมู่ฟังก์ชัน แอลกอฮอล์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ขิงแห้ง	cineole	154.25	1	0	9.23	Yes	Yes
	β -Eudesmol	222.37	1	1	20.23	Yes	Yes
	<i>trans</i> -nerolidol	222.37	11	1	20.23	Yes	Yes
	4-isopropylbenzyl alcohol	150.22	1	1	20.23	Yes	Yes
	3,7-dimethylocta- 1,6-dien-3-ol	154.25	1	1	20.23	Yes	Yes
	3,7-dimethyloct-6- en-1-yn-3-ol	152.23	1	1	20.23	Yes	Yes
	3-methylhexan- 2-ol	116.20	1	1	20.23	Yes	Yes
	elemol	222.37	1	1	20.23	Yes	Yes
	1-Hexanol	102.17	1	1	20.23	Yes	Yes
	α -amyl cinnamyl alcohol	204.31	1	1	20.23	Yes	Yes

สารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตน พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 230.30 - 346.37 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD

น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตนผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิว
 ขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์
 ของ Lipinski's violation สารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตนผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติ
 ทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า มีเพียงสาร cynaropicrin ที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดง
 ตามตาราง 32

ตาราง 32 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตน

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่มเซส ควิเทอร์พีน แลคโตน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H- bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
โกฐ	costunolide	232.32	2	0	26.30	Yes	Yes
กระตุก	dihydrocostunolide	234.33	2	0	26.30	Yes	Yes
	dehydrocostus		2	0	26.30	Yes	Yes
	lactone	230.30					
	mokko lactone	232.32	2	0	26.30	Yes	Yes
	cynaropicrin	346.37	6	2	93.06	Yes	No

สารกลุ่ม Fat hydrocarbon พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนัก
 โมเลกุลอยู่ในช่วง 136.23 - 204.35 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับ
 จำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือ
 เท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD
 น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารกลุ่ม Fat hydrocarbon ผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว
 Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์
 ของ Lipinski's violation สารกลุ่ม Fat hydrocarbon ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติ
 ทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า มีเพียงสาร α -cedrene ที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดง
 ตามตาราง 33

ตาราง 33 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่ม Fat hydrocarbon

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม Fat hydrocarbon	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H- bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ขิงแห้ง	allo-aromadendrene	204.35	0	0	0.00	Yes	Yes
	β - sesquiphellandrene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	α -cedrene	204.35	0	0	0.00	Yes	No
	β -tujene	136.23	0	0	0.00	Yes	Yes

สารหมู่ฟังก์ชันอัลโดคิโตน พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 72.11 - 218.33 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารหมู่ฟังก์ชันอัลโดคิโตนผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารหมู่ฟังก์ชันอัลโดคิโตนผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสารสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 34

ตาราง 34 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันอัลโดคิโตน

ชื่อ สมุนไพร	สารหมู่ ฟังก์ชันอัล โดคิโตน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ขิงแห้ง	butanal	72.11	1	0	17.07	Yes	Yes
	germacrone	218.33	1	0	17.07	Yes	Yes
	2,6-	140.22	1	0	17.07	Yes	Yes

ชื่อ สมุนไพร	สารหมู่ ฟังก์ชันอัล โดคิโตน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
	dimethylhept- 5-enal						
	2-heptanone	114.19	1	0	17.07	Yes	Yes

สารหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล อยู่ในช่วง 116.16 - 210.31g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวน ผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 5 สารหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสาร สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 35

ตาราง 35 คุณสมบัติทางกายภาพของสารฟังก์ชันเอสเทอร์

ชื่อ สมุนไพร	สารหมู่ ฟังก์ชันเอส เทอร์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ขิงแห้ง	neryl acetate	196.29	2	0	26.30	Yes	Yes
	geranyl propionate	210.31	2	0	26.30	Yes	Yes
	endo-bornyl acetate	196.29	2	0	26.30	Yes	Yes
	sec-butyl acetate	116.16	2	0	26.30	Yes	Yes

สารกลุ่มกรดไขมัน พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200.32 - 280.45 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารกลุ่มกรดไขมันผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มกรดไขมัน ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า สาร oleic acid และ stearic acid ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 36

ตาราง 36 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มกรดไขมัน

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม กรดไขมัน	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
เทียนดำ	linoleic acid	280.45	2	1	37.30	Yes	Yes
	oleic acid	282.46	2	1	37.30	Yes	No
	palmitic acid	256.42	2	1	37.30	Yes	Yes
	stearic acid	284.48	2	1	37.30	Yes	No
	lauric acid	200.32	2	1	37.30	Yes	Yes
	myristic acid	228.37	2	1	37.30	Yes	Yes
	linolenic acid	278.43	2	1	37.30	Yes	Yes

สารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์ พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100.16 - 212.37 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์ผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological

Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์ผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์สามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 37

ตาราง 37 คุณสมบัติทางกายภาพของสารหมู่ฟังก์ชันแอลดีไฮด์

ชื่อ สมุนไพร	สารหมู่ ฟังก์ชันแอลดี ไฮด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
สมุลแว้ง	hexanal	100.16	1	0	17.07	Yes	Yes
	tetradecanal	212.37	1	0	17.07	Yes	Yes
	limonene aldehyde	166.26	1	0	17.07	Yes	Yes
	Z- cinnamaldehy de	147.17	2	1	32.59	Yes	Yes

สารกลุ่มฟีนอล พบว่า การทำนายคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 164.20 - 178.23 g/mol ซึ่งผ่านเกณฑ์ในการประเมินน้ำหนักโมเลกุล สำหรับจำนวนผู้รับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Acceptor, HBA) ต้องมีค่า HBA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และจำนวนผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond Donor, HBD) คือต้องมีค่า HBD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สารกลุ่มฟีนอลผ่านเกณฑ์การประเมิน สำหรับค่าพื้นที่ผิวขั้ว Topological Polar Surface Area (TPSA) โดยมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 140 และเกณฑ์ของ Lipinski's violation สารกลุ่มฟีนอลผ่านเกณฑ์ ส่วนการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ พบว่า ทุกสารกลุ่มฟีนอลสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้ ดังแสดงตามตาราง 38

ตาราง 38 คุณสมบัติทางกายภาพของสารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์

ชื่อ สมุนไพร	สารกลุ่ม ฟีนิล โพรพา นอยด์	Molecular weight	Num. H-bond acceptors	Num. H-bond donors	TPSA	Lipinski	BBB
ผลจันทร์	eugenol	164.20	2	1	29.46	Yes	Yes
	methyl eugenol	178.23	2	0	18.46	Yes	Yes
	<i>trans</i> - isoeugenol	164.20	2	1	29.46	Yes	Yes

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Δ^9 -THC และ CBD ใช้วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์สารที่มีโคโมฟอร์น้อยได้ดีกว่าเครื่องมือ HPLC-UV โดยทำการตรวจวัดไอออนของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุที่แตกต่างกันได้ ในการวิเคราะห์นี้ได้เลือก interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน ชนิด ESI ไอออนที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย SRM mode หรือ MRM mode ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมาจาก ไอออนตั้งต้น ตัวใดตัวหนึ่ง ซึ่ง SRM หรือ MRM สามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลเท่ากันได้ เทคนิค MRM ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสม สำหรับการหาปริมาณของ Δ^9 -THC และ CBD เพื่อให้เกิดการแสดงผลการรบกวนน้อยที่สุด และสามารถวิเคราะห์สารวิเคราะห์หลายตัวพร้อมกันได้ ในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว ทำให้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์ ปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ที่มีองค์ประกอบในสารตัวอย่างที่มีความซับซ้อนของตำรับยาสมุนไพร

สำหรับสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ของ LC-MS/MS เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในงานวิจัยนี้ เมื่อทำการทดสอบ system suitability พบว่า ทุกหัวข้อที่ทำการทดสอบ ประกอบด้วย resolution, tailing factor, column efficiency และ % RSD มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ แสดงให้เห็นว่า สถานะที่ใช้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ มีความสามารถในการแยก (resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตำรับยาสมุนไพร

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ในหัวข้อ ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (specificity) เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน CBD และ Δ^9 -THC พบว่า peak มี retention time เท่ากับ 4.7 และ 6.2 นาที ตามลำดับ และไม่พบการรบกวนการวิเคราะห์จากสารอื่น ๆ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ในหัวข้อความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (linearity and range) พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน CBD อยู่ระหว่างช่วง 0.005 ถึง 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999, 0.9999 และ 0.9999 และช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน Δ^9 -THC อยู่ระหว่างช่วง 0.005 ถึง 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999, 0.9999 และ 0.9999 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 0.995 จึงถือว่าผ่านเกณฑ์ ในหัวข้อขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

(LOQ) พบว่า สารมาตรฐาน CBD มี LOD เท่ากับ 0.3973 ng/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่พบ peak ของ CBD และมี LOQ เท่ากับ 1.2039 ng/ml สำหรับสารมาตรฐาน Δ^9 -THC มี LOD เท่ากับ 0.9706 ng/ml และมี LOQ เท่ากับ 2.9412 ng/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณ CBD ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ ทวนซ้ำได้

ในหัวข้อการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน CBD ได้ค่า %recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97.78 % - 100.15 % มี %RSD ของ intra-day precision อยู่ในช่วง 1.51 % - 1.92 % และมี %RSD ของ inter-day precision อยู่ในช่วง 1.52 % - 1.67 % และวิเคราะห์ Δ^9 -THC ใช้ mass spectrometer เป็น detector ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Δ^9 -THC โดยไม่มีการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับยา สุขไสยาสน์ การทดสอบในหัวข้อ accuracy และ precision ได้ค่า %recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 98.98 % - 103.72 % มี %RSD ของ intra-day precision อยู่ในช่วง 0.59 % - 2.09 % และมี %RSD ของ inter-day precision อยู่ในช่วง 1.09 % - 2.06 % ซึ่งตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2565 ระบุว่า หลังจากวันที่ 9 มิถุนายน 2565 ส่วนประกอบของกัญชาที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ได้แก่ เบลิอก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบที่ ไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย สารสกัดที่มีสาร Δ^9 -THC เป็นส่วนประกอบ ต้องไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก กากหรือเศษที่เหลือจากการสกัดกัญชาและต้องมีสาร Δ^9 -THC ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก การศึกษาครั้งนี้ได้เทียบเคียงปริมาณ CBD เท่ากับข้อกำหนดของ Δ^9 -THC คือ ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC 2012 ทำให้วิธีวิเคราะห์ CBD และ Δ^9 -THC ที่จะได้มาตรฐานควรมี %recovery อยู่ในช่วง 90-108% และ %RSD ไม่เกิน 3% ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC2012

ในหัวข้อการคัดเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัด Δ^9 -THC และ CBD โดยใช้พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (HSP) เป็นวิธีคัดเลือกตัวทำละลายจากพารามิเตอร์การละลายแบบ 3 มิติ ได้แก่ ค่าการละลายของแรงลอนดอน (London dispersion force, δ_d) ค่าการละลายของแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (dipolar intermolecular force, δ_p) และค่าพลังงานของพันธะไฮโดรเจน (energy from hydrogen bonding, δ_{hb}) การเปรียบเทียบค่า HSP ของ Δ^9 -THC และ CBD กับตัวทำละลายสามารถทำนายพฤติกรรมการละลายได้ในระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ตัวทำละลายที่มีค่า HSP ใกล้เคียงกับค่า HSP ของ cannabinoids คาดว่าจะแสดงความสามารถในการละลายได้ดี ค่า HSP ของไดคลอโรมีเทนใกล้เคียงกับค่า HSP ของ Δ^9 -THC

(Ra = 3.38) และ CBD (Ra = 7.98) ดังนั้นจึงเลือกไดคลอโรมีเทนในการสกัด Δ^9 -THC และ CBD จากตำรับยาสมุนไพร

ในหัวข้อการเตรียมสารสกัดหยาบ (Crude extract) ของตำรับยาสมุนไพร โดยสกัดแช่ผงยาเป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) ร้อยละผลผลิต (%yield) อยู่ในช่วงร้อยละ 3.12 – 33.89 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะเป็นตำรับยาเดียวกัน แต่ถ้าวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตของแต่ละบริษัทที่แตกต่างกัน ก็ส่งผลต่อร้อยละผลผลิตในการสกัดที่แตกต่างกันได้

ในหัวข้อการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC และ CBD ในสารสกัดหยาบตำรับยาสมุนไพร ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณ CBD ในสารสกัดหยาบของตำรับยาสมุนไพรน้ำหนัก 30 กรัมที่มีใบกัญชาเป็นองค์ประกอบ 4.61 กรัม (15.38%) ตรวจพบปริมาณ CBD ในใบกัญชา ในช่วง 0.00002 – 0.01541% และการวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ในสารสกัดหยาบของตำรับยาสมุนไพรน้ำหนัก 30 กรัมที่มีใบกัญชาเป็นองค์ประกอบ 4.61 กรัม (15.38%) ตรวจพบปริมาณ Δ^9 -THC ในใบกัญชา ในช่วง 0.00231 – 0.14218% ซึ่งไม่เกิน 0.2% ตามที่กฎหมายกำหนด

ในหัวข้อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE พบว่าสารมาตรฐาน galantamine ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE สูง และใช้เป็น positive control เมื่อทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน galantamine เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามี %inhibition เท่ากับ 78.33 ± 2.48 เมื่อทำการทดสอบสารสกัดตำรับยาสมุนไพร ชันไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นในช่วง 0.47 ถึง 2.5 mg/ml พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.34 ± 0.35 mg/ml ซึ่งในตำรับยาสมุนไพรที่มีกัญชาเป็นส่วนประกอบมากที่สุดในตำรับส่วนใหญ่ จะเป็นสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ รองลงมา เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบในพริกไทยและดีปลี ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารที่มีขั้วน้อย ประกอบกับการพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Hydrogen-Bond Donors ที่มีค่าค่อนข้างน้อย จึงสามารถผ่าน Blood-Brain-Barrier ดังนั้นจึงได้เลือกการสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน นอกจากนี้มีการศึกษาในหนูทดลอง พบว่า synthetic cannabinoid ชนิดหนึ่งสามารถลดการสะสมของแอมิลอยด์ในสมองของหนูทดลองที่เป็นอัลไซเมอร์ได้ นอกจากนี้สารเคมีดังกล่าวยังสามารถป้องกันการเกิดความผิดปกติด้านความจำของหนูทดลองได้อีกด้วย (มณี ภิญญพรพาณิชย์ และคนอื่น ๆ, 2563) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาตำรับยาสมุนไพร เพื่อประเมินฤทธิ์กดประสาทในหนูทดลอง โดยแบ่งหนูเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.6, 3, 30 และ 60 mg/kg ของน้ำหนักตัว และมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร (negative

controls) ผลการศึกษาพบว่า ยาสมุนไพรสามารถเพิ่มระยะเวลานอนหลับในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยาสมุนไพรยังมีประสิทธิภาพต่อตัวรับกาบา (GABA receptors) และตัวรับแคนนาบินอยด์ CB1 (cannabinoid CB1 receptors) อย่างมีนัยสำคัญ (Damjuti และคนอื่น ๆ, 2024)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาสมุนไพรโดยใช้ DPPH scavenging assay เมื่อคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ฤทธิ์ในการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 เท่ากับ $6.46 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดตำรับยาสมุนไพรด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 และ 800 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า สารสกัดตำรับยาสมุนไพร Brand A, Brand B, Brand C, Brand D, Brand E, Brand F และ Authentic มีค่า IC_{50} เท่ากับ $158.07 \pm 52.38 \mu\text{g/ml}$, $194.61 \pm 58.43 \mu\text{g/ml}$, $183.95 \pm 64.85 \mu\text{g/ml}$, $234.86 \pm 61.06 \mu\text{g/ml}$, $223.21 \pm 62.57 \mu\text{g/ml}$, $225.82 \pm 60.81 \mu\text{g/ml}$ และ $153.93 \pm 40.87 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid เมื่อทำการเปรียบเทียบแหล่งที่มาของตำรับยาสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดพบว่าสารสกัดตำรับยาสมุนไพรของ Brand B, Authentic และ Brand D มีอัตราในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า Brand C และ Brand E ซึ่ง Brand C และ Brand E มีฤทธิ์สูงกว่า Brand A และ Brand F ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าชั้นตัวทำละลายที่เป็นเอทานอลมีส่วนไปช่วยปฏิกิริยาโดยการให้อิเล็กตรอนกับ DPPH มากที่สุด จึงแสดงความเข้มของสีที่ลดลงมากกว่าชั้นตัวทำละลายชนิดอื่นโดยอ้างถึงงานวิจัยก่อนหน้านี้ให้ความเห็นว่าการทดลองสำหรับวิธีการใช้ DPPH assay จะสำเร็จได้โดยการใช้ระบบตัวทำละลายที่เป็นเมทานอล เอทานอล อะซิโตนในน้ำ และเบนซีนได้ดีตามลำดับ (Kedare และ Singh, 2011) หรือความเป็นไปได้ประการถัดมาคือองค์ประกอบในตำรับยาที่มีพริกไทยเป็นส่วนประกอบของตำรับยาสมุนไพร พบว่า สาร piperine ในพริกไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถผ่าน blood-brain barrier กล่าวได้ว่าพริกไทยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ สอดคล้องกับการศึกษาการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y พบว่าสาร piperine มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้มากถึง 85% ซึ่งบ่งบอกว่าสารนี้ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากความเสียหายที่เกิดจากการทำลายของ $\text{A}\beta$ อย่างมีนัยสำคัญ (Abdul Manap และคณะ, 2019) รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสาร *N-trans-coumaroyltyramine* ที่พบในพืช *Celtis africana* อยู่ในวงศ์ Cannabaceae มีค่า IC_{50} เท่ากับ

33.2 μM และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE มีค่า IC_{50} เท่ากับ 34.5 $\mu\text{g/ml}$ (Al-Taweel และคณะ, 2012) การเกิดอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เช่น การสะสมของแอมิลอยด์ (amyloid β) ส่งผลให้เกิดการสร้าง ROS นำไปสู่การเสื่อมของประสาทโดยการทำลายโครงสร้าง DNA การเปลี่ยนแปลงโปรตีนหรือเอนไซม์ รวมทั้งไขมันเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโปรตีนที่ผิดปกติไป ผลที่เกิดจาก Oxidative stress มากเกินไปอาจทำให้สูญเสียการทำงานของเซลล์ การตายของเซลล์และความเสื่อมในผู้ป่วยที่เป็นอัลไซเมอร์ (Pongnimitprasert, 2020) และเมื่อพิจารณาถึงกลุ่มสารฟีนอลิกในตำรายาสมุนไพรซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรเดี่ยว ได้แก่ ใบสะเดาสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำ มีค่า EC_{50} เฉลี่ยเท่ากับ $34.01 \pm 9.77 \mu\text{g/ml}$ (Pongtip Sithisarn และ Gritsanapan, 2005) ใบกัญชาที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่า IC_{50} เฉลี่ยเท่ากับ $5.63 \pm 0.05 \text{ mg trolox/g plant material}$ (Stasiłowicz-Krzemień, Sip, Szulc, และ Cielecka-Piontek, 2023) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กลุ่มสารฟีนอลิกที่พบในใบสะเดาและใบกัญชา มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีคุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และจากการศึกษาโดยการให้สาร CBD ควบคู่กับสาร THC สามารถลดการเกิดการอักเสบภายในสมองและกระตุ้นการซ่อมแซมของระบบประสาทได้ (มณี ภิญโญพรพาณิชย์ และคนอื่น ๆ, 2563) และจากการรายงานสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบในพริกไทย พบว่า ในชั้นตัวทำละลายน้ำ เมทานอล และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ค่า IC_{50} เท่ากับ $28.15 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$, $53.07 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ และ $61.69 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Nahak, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาผลของพิเพอริน (piperine) ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์สำคัญในผลของพริกไทยดำต่อความจำและภาวะ neurodegeneration ในหนูทดลองโดยให้น้ำหนักตัวผู้เต็มวัยเพศผู้พันธุ์สตาร์กินพิเพอรินทางปากที่ระดับยาต่าง ๆ ตั้งแต่ 5, 10 และ 20 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลาก่อน 2 สัปดาห์ และหลัง 1 สัปดาห์จากการฉีด ethylcholine aziridinium ion (AF64A) เข้าโพรงสมองด้านข้าง ผลการศึกษาพบว่า พิเพอรินในทุกระดับยา ช่วยซ่อมแซมภาวะความจำเสื่อมและภาวะ neurodegeneration ในบริเวณฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีนัยสำคัญ กลไกดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการลดระดับ ของ lipid peroxidation และเอนไซม์ AChE (Chonpathompikunlert, Wattanathorn, และ Muchimapura, 2010)

ดังนั้นตำรายาสมุนไพรจึงสามารถช่วยลดการเกิดอัลไซเมอร์ได้ด้วยกลไกการยับยั้งการทำงานของ AChE และต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิง เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของเอนไซม์ AChE การศึกษาให้โปรตีนเป้าหมาย ที่มีรหัส 7E3H.pdb ยา Donepezil เกิดอันตรกิริยา Hydrophobic Interactions กับกรดอะมิโน TRP 86A TYR 337A PHE 338A TYR 341A การเกิดอันตรกิริยา Hydrogen Bonds กับกรดอะมิโน PHE 295 A และการเกิด π -Stacking พบกรดอะมิโน TRP 86A TRP 286A TYR 341A มีความสำคัญต่อตัวยับยั้งเอนไซม์ AChE

จากการศึกษาดังกล่าว พบว่าสาร piperine, piperdardine, dehydropipernonaline, Δ^9 -THC และ *N-trans*-coumaroyltyramine สามารถเกิดอันตรกิริยาและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ ซึ่งใกล้เคียงกับยา Donepezil (ค่าพลังงานเท่ากับ -11.7 Kcal/mol) โดยอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ เกิด Pi-Pi Stacked ระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโน ในตำแหน่ง TRP 86A, TRP 286A TYR 341A และ PHE 295A ซึ่งลักษณะโครงสร้างของสารทั้ง 5 ชนิด มีความจำเพาะโดยมีการวางตัวซ้อนทับกับยา Donepezil เพียงบางส่วนเท่านั้น ทั้งนี้การพัฒนายาในอนาคตสารทั้ง 5 ชนิด สามารถเป็น lead compound โดยปรับปรุงสังเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง PHE 295A เพื่อพัฒนาสูตรโครงสร้างให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE เทียบเท่าหรือสูงกว่ายา Donepezil และสามารถใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

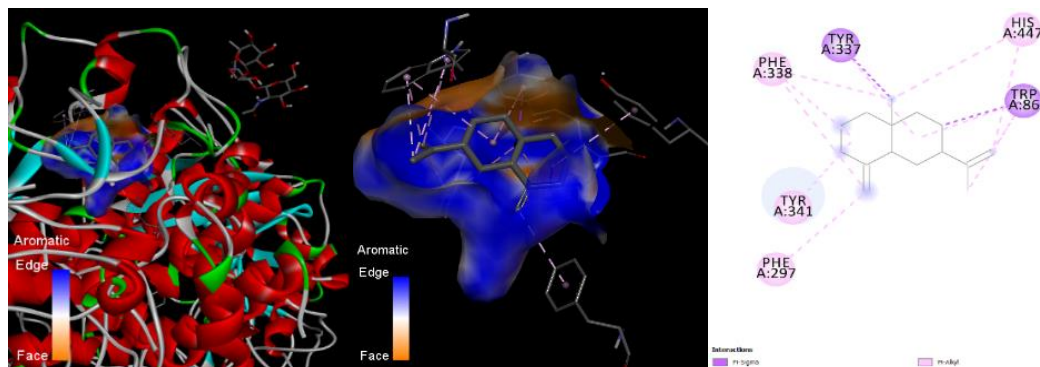
ข้อเสนอแนะ

1. ในอนาคตควรมีการกำหนดมาตรฐานตำรับยาสมุนไพร โดยใช้ปริมาณของ Δ^9 -THC และ CBD
2. สารสำคัญที่อยู่ในตำรับยาสมุนไพรที่น่าสนใจที่จะพัฒนาเป็นเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เช่น piperine, dehydropipernonaline, piperdardine Δ^9 -THC และ *N-trans*-coumaroyltyramine ควรมีการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทต่อไป

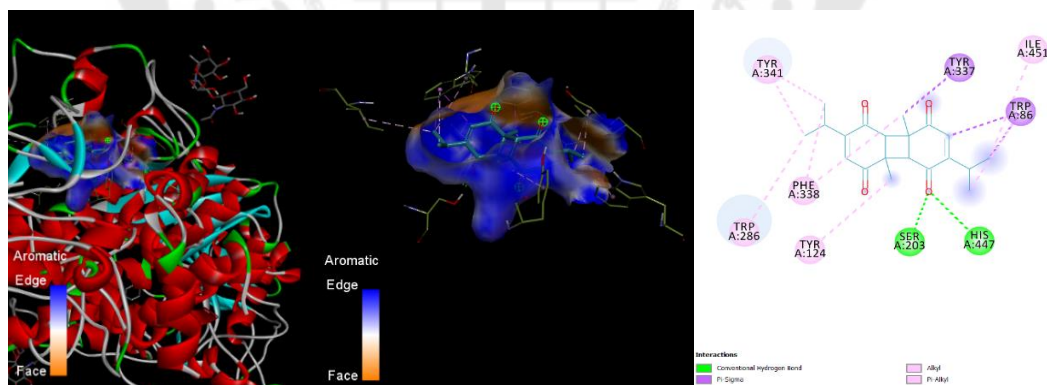
บรรณานุกรม



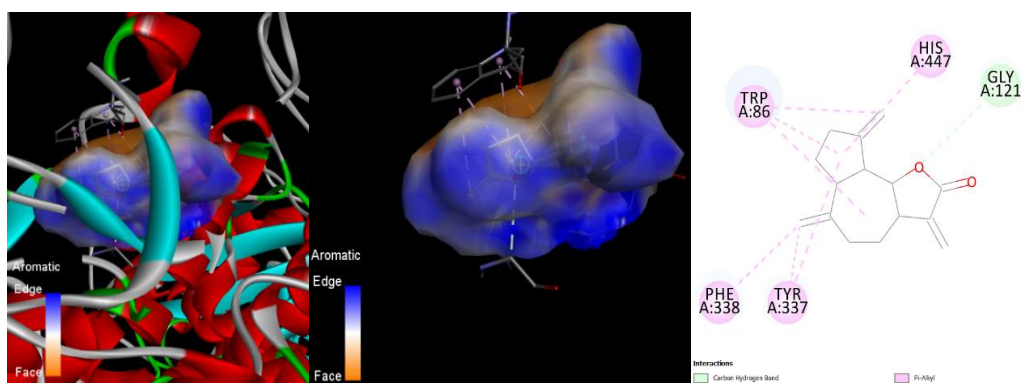
ภาคผนวก



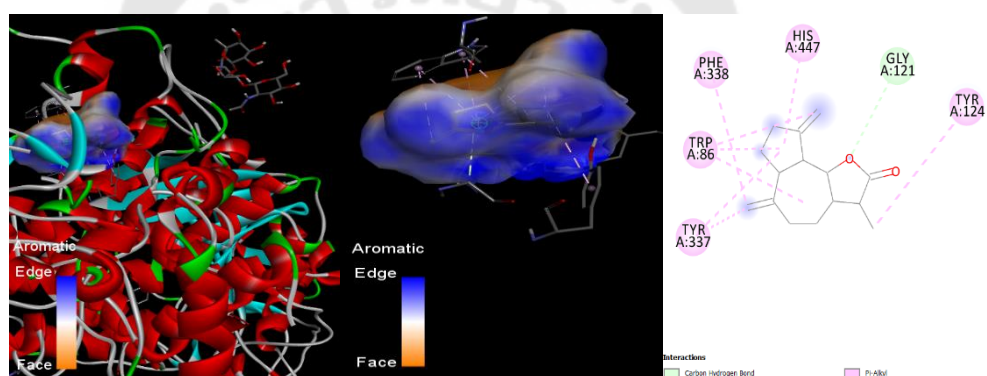
ภาพประกอบ 15 การจับและพันธะระหว่าง β -selinene และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของสมุนไพร



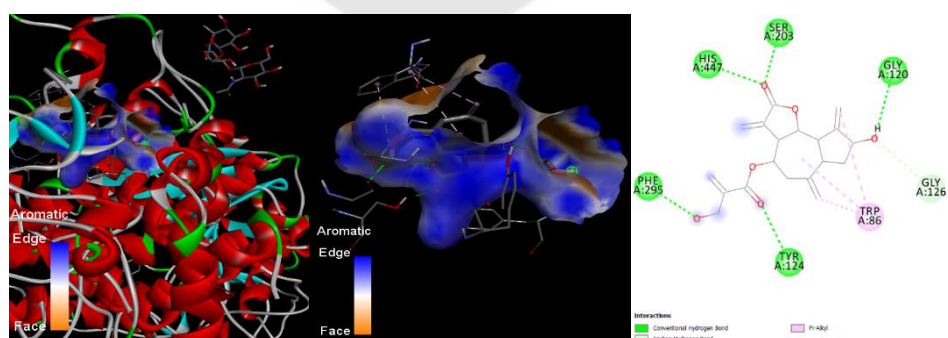
ภาพประกอบ 16 การจับและพันธะระหว่าง dithymoquinone และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของเทียนดำ



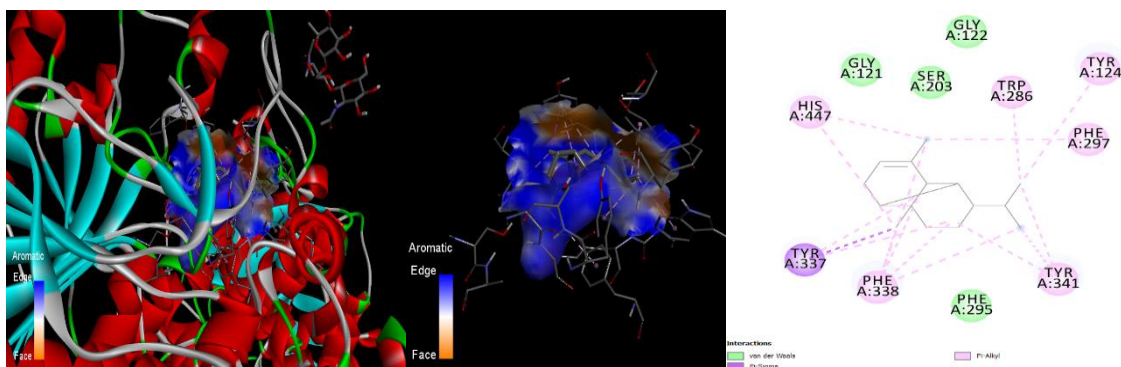
ภาพประกอบ 17 การจับและพันธะระหว่าง dehydrocostus lactone และ 7E3H
ที่มี binding energy ต่ำสุดของโกลูกระดุก



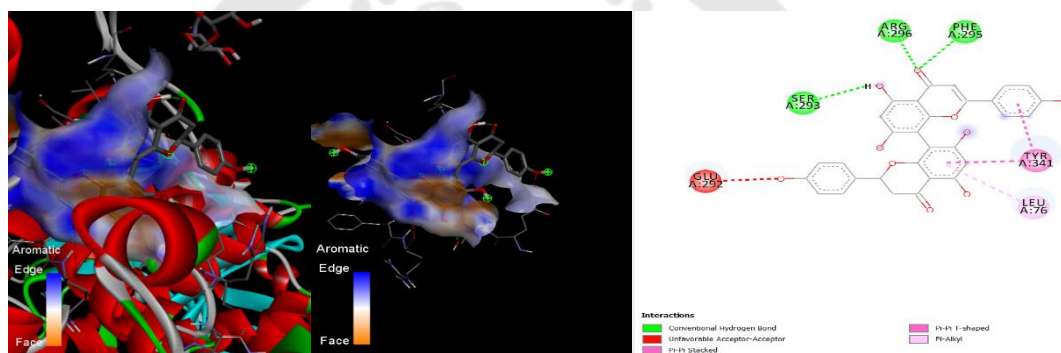
ภาพประกอบ 18 การจับและพันธะระหว่าง mokko lactone และ 7E3H
ที่มี binding energy ต่ำสุดของโกลูกระดุก



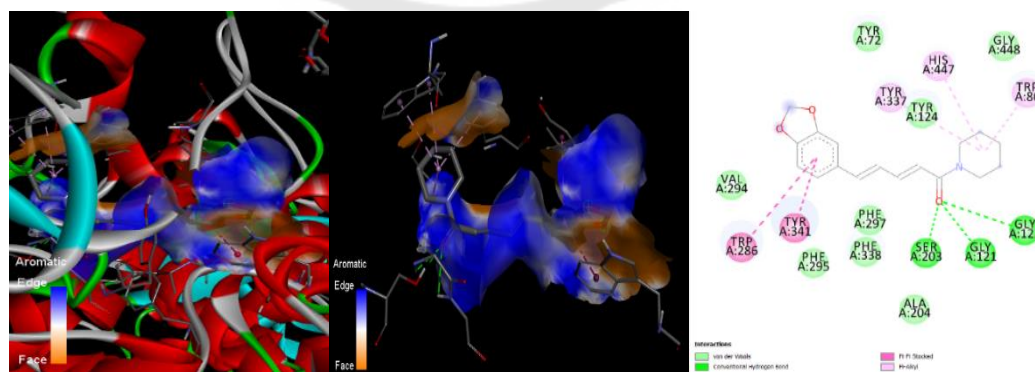
ภาพประกอบ 19 การจับและพันธะระหว่าง cynaropicrin และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุด
ของโกลูกระดุก



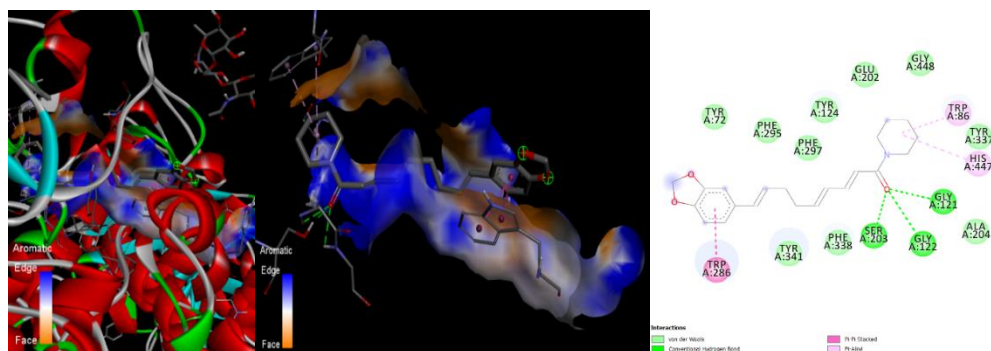
ภาพประกอบ 20 การจับและพันธะระหว่าง α -Copaene และ 7E3H
ที่มี binding energy ต่ำสุดของลูกจันทน์



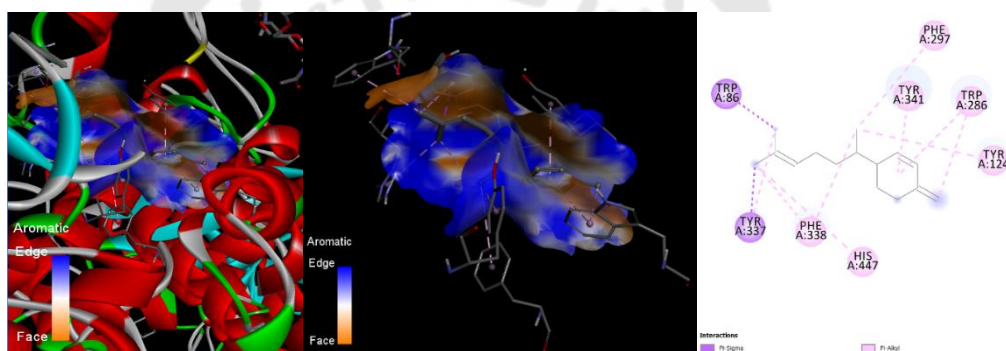
ภาพประกอบ 21 การจับและพันธะระหว่าง mesuaferone B และ 7E3H
ที่มี binding energy ต่ำสุดของบุนนาค



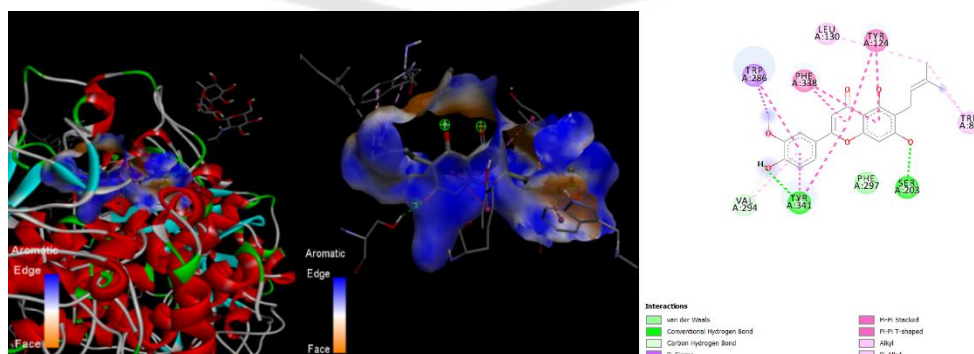
ภาพประกอบ 22 การจับและพันธะระหว่าง piperine และ 7E3H
ที่มี binding energy ต่ำสุดของดีปลีและพริกไทย



ภาพประกอบ 23 การจับและพันธะระหว่าง dehydropipernonaline และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของดีป्लीและพริกไทย



ภาพประกอบ 24 การจับและพันธะระหว่าง β -sesquiphellandrene และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของขิงแห้ง



ภาพประกอบ 25 การจับและพันธะระหว่าง cannflavin B และ 7E3H ที่มี binding energy ต่ำสุดของกัญชา

ตาราง 39 แสดงรูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
	Donepezil	-11.7	PHE A:295		TYR A:341 HIS A:447 TRP A:86	TRP A:286	PHE A:338 TYR A:337			
	Galantamine	-9.6	GLU A:202	GLY A:448 ASN A:87	TYR A:86 TYR A:124	TYR A:337 PHE A:338				
	Rivastigmine	-8.2	HIS A:447 SER A:203		TYR A:337 PHE A:338 TYR A:341	TRP A:86				
	betulin	-8.5					ALA A:397 ARG A:393 HIS A:381 TYR A:382			
สะเดา	caryophyllene oxide	-10.0	TYR A:124				HIS A:447 TRP A:86 PHE A:338 TYR A:337			
	3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid	-8.6				TRP A:286	TYR A:341 PHE A:297			
	epicatechin	-10.0	ARG A:296		PHE A:338 TRP A:286					
	lupeol	-9.0	TRP A:532				LEU A:540 PRO A:537 LEU A:536 HIS A:405 PRO			

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
							A:338 HIS A:447 TRP A:86 TYR A:341 PHE A:338 TYR A:337 TRP A:86 HIS A:447			
	α -humulene	-8.5								
	α -panasinsene	-8.6				TRP A:86	PHE A:297 TYR A:124 HIS A:447 TYR A:341 TYR A:337 PHE A:338			
	α -selinene	-9.5				TYR A:337	PHE A:297 TYR A:124 PHE A:338 TYR A:341 HIS A:447 TRP A:86			
	13-epi-manoyl oxide	-8.5				TYR A:341	LEU A:289 TRP A:286 TYR A:124 PHE A:297 PHE A:338 VAL A:294			
	7-epi- α -selinene	-9.2				TYR A:337	PHE A:297 TYR A:124 PHE			

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
							A:338			
							TYR A:341			
							HIS A:447			
							TRP A:86			
	epi- α -cadinol	-8.8				TYR A:341	HIS A:447			
							PHE A:295			
							PHE A:297			
							PHE A:338			
							TRP A:286			
							TYR A:124			
	guaiol	-9.2				TRP A:286	TYR A:72			
							PHE A:297			
							TYR A:341			
	sclareolide	-9.3	TYR A:133			TRP A:86	HIS A:447			
							TYR A:337			
							TYR A:341			
							PHE A:338			
	α -trans-bergamotene	-8.5					PHE A:297			
							HIS A:447			
							TYR A:124			
							TYR A:341			
							PHE A:338			
							TYR A:337			
							TRP A:286			
							TRP A:86			
	α -zingiberene	-8.9				TYR A:337	VAL A:294			
							TRP A:286			
							PHE TYR A:341			
							A:338 HIS A:447			
							TRP A:86			

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
ผลจันทน์	mokko lactone	-9.5		GLY A:121				TYR A:337 HIS A:447 PHE A:338 TRP A:86 TYR A:337 TYR A:124		
								TRP A:86		
	cynaropicrin	-9.5	GLY A:120 SER A:203 HIS A:447 PHE A:295 TYR A:124	GLY A:126						
ดอกนูนนาค	α -Copaene	-8.7				TYR A:337	HIS A:447 PHE A:338 TYR A:341 PHE A:297 TYR A:124 TRP A:286			
	caryophyllene	-8.5						HIS A:447 TRP A:86 PHE A:338 TYR A:341 TYR A:337		
ดอกนูนนาค	mesualferone A	-11.4	ARG A:296 PHE A:295		TYR A:341		LEU A:76			
	mesualferone B	-11.5	ARG A:296 PHE A:295 SER A:293		TYR A:341		LEU A:76		GLU A:292 (Unfavorable Acceptor-Acceptor)	
	mesuanic acid	-9.2	SER A:125 TYR A:133	GLY A:121		TYR A:337	TYR A:124 TYR A:341			

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
พริกไทย และ ดีปลี	α - amylin	-9.2					PHE A:338 HIS A:381 TYR A:382 ALA A:397 ARG A:393			
	β - amylin	-9.8				TRP A:286	TYR A:341 VAL A:294 PHE A:297			
	β - sitosterol	-10.2				TRP A:286 TYR A:341	PHE A:297 VAL A:294 PHE A:338 TYR A:337	TRP A:86	TYR A:124 (Unfavorable Bump)	
	piperanine	-9.8	TYR A:124	HIS A:447	TRP A:86 TYR A:337		TRP A:286			
	piperine	-10.5	SER A:203 GLY A:121 GLY A:122		TRP A:286 TYR A:341		TYR A:337 HIS A:447 TRP A:86			
	piperdardine	-10.3			TRP A:86	TRP A:286	TYR A:341			
	dehydropipernonaline	-10.5	SER A:203 GLY A:121 GLY A:122		TRP A:286		TRP A:86 HIS A:447			
	pipemonaline	-9.7			TRP A:286		TRP A:86 HIS A:447			
	piperolein B	-9.0			TRP A:286		TRP A:86			
	piperundecalidine	-9.8	SER A:203 GLY A:121 GLY A:122		TRP A:286		TRP A:86 HIS A:447			
	pipercallosine	-9.3	SER A:125 PHE A:295		TRP A:86	TRP A:286				

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal /mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Convention al Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfav orable	Pi-Cation
กัญชา	α -cedrene	-8.7					TYR A:341 PHE A:297			
						TYR A:337 PHE A:338	TRP A:86 HIS A:447 TYR A:124 PHE A:297 TYR A:341			
	cannabiger ovarinic Acid (CBGVA)	-9.8	SER A:293		TYR A:341	TRP A:286 TRP A:86	PHE A:338 HIS A:447			
	cannabigerol (CBG)	-9.0	ASP A:74		TYR A:337 TYR A:341		TYR A:124 HIS A:447 PHE A:297 TRP A:86 TYR A:72 TRP A:286	PHE A:338		
	cannabidi varin (CBDV)	-8.7			PHE A:338	TYR A:341	TRP A:286 TYR A:124 TRP A:86 HIS A:447			
	cannabidiva rinic acid (CBDVA)	-8.5	ARG A:296 PHE A:295 TYR A:341		TRP A:286		PHE A:338 LEU A:76			
	cannabidiol (CBD)	-8.9			TYR A:341 PHE A:338	TRP A:86	TRP A:286 TYR A:124 HIS A:447			
	cannabidiolic Acid (CBDA)	-9.2	ARG A:296 PHE A:295			TRP A:286 TYR A:337	TYR A:72 LEU A:76 TYR A:341 PHE A:338			
	tetrahydro cannabivar in (THCV)	-9.7			TYR A:341	TRP A:286	LEU A:289 TYR A:337		ARG A:296 (Unfav	

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
							PHE A:338	Unfavorable		
							TYR A:72	Donor		
								- Donor		
								)		
	delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (THCVA)	-9.8	TYR A:124 ASP A:74 TYR A:341				TYR A:72 TRP A:286 PHE A:297 PHE A:338 VAL A:294 HIS A:447 TYR A:337			
	delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)	-10.3			TYR A:341	TRP A:286 TYR A:337	LEU A:289 TYR A:72 HIS A:447 PHE A:338			
	tetrahydrocannabinolic acid (THCA)	-9.9	ARG A:296		TRP A:286 TYR A:341		LEU A:289 TYR A:72 PHE A:338 TYR A:337			
	cannabinichromevarin (CBCV)	-9.9	HIS A:447				LEU A:130 TRP A:86 PHE A:338 TYR A:337 TYR A:341 VAL A:294 TRP A:286			
	cannabinichromevarin acid	-9.8	TYR A:124	VAL A:294		TRP A:86 TYR	HIS A:447 TYR A:341 PHE	PHE A:295 (Unfavorable)		

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
	(CBCVA)					A:337 TRP A:286	A:338 TYR A:72		Unfavorable Donor - Donor)	
	cannabichromene (CBC)	-9.6			TYR A:337 TRP A:86	TYR A:341	PHE A:338 PHE A:297 TYR A:124 TRP A:286 VAL A:294			
	cannabichromenic acid (CBCA)	-9.7	TYR A:124 ARG A:296	VAL A:294		TRP A:86 TYR A:337 TRP A:286	HIS A:447 TYR A:341 PHE A:338			
	cannflavin A	-11.2	TYR A:124 SER A:293		TYR A:341 TRP A:286	TYR A:337	HIS A:447 PHE A:338 PHE A:297 PHE A:295			
	cannflavin B	-11.3	TYR A:341 SER A:203	VAL A:294	PHE A:338 TYR A:124	TRP A:286	LEU A:130 TRP A:86			
	cannflavin C	-10.3	ARG A:296 PHE A:295 THR A:75			TYR A:341	LEU A:76 TYR A:337 HIS A:447 TRP A:86			
	<i>N-trans</i> -coumaroyl tyramine	-10.2	TYR A:341	VAL A:294	TRP A:86 TRP A:286					
	<i>N-trans</i> -feruloyltyramine	-9.5			TRP A:86 TRP A:286 TYR A:341					

สมุนไพร	สารสำคัญ	ค่าพลังงาน (Kcal/mol)	รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย							
			Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Donor Hydrogen Bond	Unfavorable	Pi-Cation
	<i>N-trans</i> -caffeoyltyramine	-10.1	SER A:293 ARG A:296		TRP A:86 TYR A:337					HIS A:447
	cannabisin D	-9.7	PHE A:295	SER A:293	TYR A:337 TYR A:341 TRP A:286					
	denbinobin	-9.5	TYR A:124 PHE A:295	TYR A:72	TYR A:341	TRP A:286				
	cannabis tilbene I	-10.1	TYR A:124		TRP A:86 TYR A:337		TRP A:286 TYR A:341 VAL A:294			
	dihydroresveratrol	-9.2	HIS A:447		TYR A:341 TYR A:337 TRP A:86					
	cannabispiran	-8.9			TRP A:86	TYR A:337				
	cannabispiranone	-9.2			PHE A:338 TYR A:124	TRP A:86 TYR A:341	TYR A:337			
	cannabispiranone	-9.2	TYR A:133 SER A:203		TYR A:124	TRP A:86	TYR A:337			

ประวัติผู้เขียน



AOAC INTERNATIONAL Guidelines for Validation of Botanical Identification Methods.

(2012). *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 95(1), 268-272.

Acetylcholine. (2024). สืบค้นจาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholine>

ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 120 C.F.R. (2546, 31 ธันวาคม).

ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 133 C.F.R. (2559, 12 มกราคม).

ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 138 C.F.R. (2564, 8 กุมภาพันธ์).

ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 139 C.F.R. (2565, 18 กุมภาพันธ์).

Abdul Manap, A. S., Wei Tan, A. C., Leong, W. H., Yin Chia, A. Y., Vijayabalan, S., Arya, A., . . . Madhavan, P. (2019). Synergistic Effects of Curcumin and Piperine as Potent Acetylcholine and Amyloidogenic Inhibitors With Significant Neuroprotective Activity in SH-SY5Y Cells via Computational Molecular Modeling and in vitro Assay. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11.

Ahmad, V., Alotibi, I., Alghamdi, A. A., Ahmad, A., Jamal, Q. M. S., & Srivastava, S. (2024). Computational Approaches to Evaluate the Acetylcholinesterase Binding Interaction with Taxifolin for the Management of Alzheimer's Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(3), 674.

Al-Qahtani, W. H., Dinakarkumar, Y., Arokiyaraj, S., Saravanakumar, V., Rajabathar, J. R., Arjun, K., . . . Nelson Appaturi, J. (2022). Phyto-chemical and biological activity of *Myristica fragrans*, an ayurvedic medicinal plant in Southern India and its ingredient analysis. *Saudi journal of biological sciences*, 29(5), 3815-3821.

Balkis, A., Tran, K., Lee, Y. Z., & Ng, K. (2015). Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. *Journal of agricultural science (Toronto)*, 7(9).

Chaithada, P., Supapan, J., Rodthuk, P., & Chainarong, S. (2018). Total flavonoids, total phenolic content and antioxidant activity from fruits, leaves, twigs and flowers of *Mesua ferrea* L. *Walailak journal of science and technology*, 15(4), 295-304.

Chonpathompikunlert, P., Wattanathorn, J., & Muchimapura, S. (2010). Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and

- cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 798-802.
- Dalli, M., Bekkouch, O., Azizi, S.-E., Azghar, A., Gseyra, N., & Kim, B. (2022). *Nigella sativa* L. Phytochemistry and pharmacological activities: A review (2019–2021). *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 12(1), 20.
- Damjuti, W., Thitikornpong, W., Saengow, S., Thanusuwannasak, T., Fuangfoo, T., & Boonruab, J. (2024). The interaction of Suk-Saiyasna remedy with GABAA and CB1 receptor-targeting drugs: Enhancing hypnotic and sedative effects in in vivo models. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 15(1).
- Erukainure, O. L., Matsabisa, M. G., Salau, V. F., & Islam, M. S. (2020). Tetrahydrocannabinol-Rich Extracts From Cannabis Sativa L. Improve Glucose Consumption and Modulate Metabolic Complications Linked to Neurodegenerative Diseases in Isolated Rat Brains. *Frontiers in pharmacology*, 11, 592981-592981.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araújo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 31-37. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106002091>
- Furqan, T., Batool, S., Habib, R., Shah, M., Kalasz, H., Darvas, F., . . . Nurulain, S. M. (2020). Cannabis constituents and acetylcholinesterase interaction: Molecular docking, in vitro studies and association with CNR1 RS806368 and ACHE RS17228602. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 10(5), 758.
- Iqbal, D., Rehman, M. T., Alajmi, M. F., Alsaweed, M., Jamal, Q. M. S., Alasiry, S. M., . . . Albadrani, H. M. (2023). Multitargeted Virtual Screening and Molecular Simulation of Natural Product-like Compounds against GSK3 β , NMDA-Receptor, and BACE-1 for the Management of Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(4), 622.

- Jamal, Q. M. S., Khan, M. I., Alharbi, A. H., Ahmad, V., & Yadav, B. S. (2023). Identification of Natural Compounds of the Apple as Inhibitors against Cholinesterase for the Treatment of Alzheimer's Disease: An In Silico Molecular Docking Simulation and ADMET Study. *Nutrients*, 15(7), 1579.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Kumar, S., Kumari, R., & Mishra, S. (2019). Pharmacological properties and their medicinal uses of Cinnamomum: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71.
- Liu, X.-n., Li, H.-m., Wang, S.-p., Zhang, J.-z., & Liu, D.-l. (2021). Sesquiterpene lactones of Aucklandia lappa: Pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, and structure–activity relationship. *Chinese Herbal Medicines*, 13(2), 167-176. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638421000241>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118-126.
- Luca, S. V., Gawel-bęben, K., Strzpek-gomółka, M., Czech, K., Trifan, A., Zengin, G., . . . Skalicka-woźniak, K. (2021). Insights into the phytochemical and multifunctional biological profile of spices from the genus piper. *Antioxidants*, 10(10), 1642.
- Luca, S. V., Minceva, M., Gertsch, J., & Skalicka-Woźniak, K. (2021). LC-HRMS/MS-based phytochemical profiling of Piper spices: Global association of piperamides with endocannabinoid system modulation. *Food research international*, 141, 110123-110123.
- Nadpara, N. P., Vaghela, J. P., & Patel, P. B. (2012). Phytochemistry and Pharmacology of Mesua ferrea Linn.-A Review. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(6), 291.
- Nahak, G. (2011). Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum. retrieved form

- <https://www.semanticscholar.org/paper/Phytochemical-Evaluation-and-Antioxidant-activity-Nahak/e5efa84a203e7827fa5823b835e25b52db78b5c9>
- Nishidono, Y., Saifudin, A., Nishizawa, M., Fujita, T., Nakamoto, M., & Tanaka, K. (2018). Identification of the Chemical Constituents in Ginger (*Zingiber officinale*) Responsible for Thermogenesis. *Natural product communications*, 13(7), 869-873.
- Omidpanah, S., Vahedi-Mazdabadi, Y., Manayi, A., Rastegari, A., Hariri, R., Mortazavi-Ardestani, E., . . . Saeedi, M. (2022). Phytochemical investigation and anticholinesterase activity of ethyl acetate fraction of *Myristica fragrans* Houtt. seeds. *Natural Product Research*, 36(2), 610-616. Retrieved form <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1788555>
- Pongnimitprasert, N. (2020).อนุมูลอิสระและโรคอัลไซเมอร์ Free Radicals and Alzheimer's Disease.
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & Elsohly, M. A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2774.
- Raissa, R., Safitri, A., Beltran, M. A. G., & Aulanni'am, A. (2019). Phytoconstituents Investigation on the Ethanolic Extract of *Azadirachta indica* var. Indonesian and Philippines. *Journal of Physics: Conference Series*, 1374(1), 012018. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1374/1/012018>
- S, K., R, K., Phornchirasilp, S., Tamsiririkkul, R., & N, S. (2015). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of a Thai traditional formula, Rid-si-duang-ma-ha-kan, for hemorrhoid treatment.
- Sakurada, K., Ikegaya, H., Ohta, H., Akutsu, T., & Takatori, T. (2006). Hydrolysis of an acetylthiocholine by pralidoxime iodide (2-PAM). *Toxicology Letters*, 166(3), 255-260. Retrieved form <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427406011635>
- Šinko, G., Čalić, M., Bosak, A., & Kovarik, Z. (2007). Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical*

- Biochemistry*, 370(2), 223-227. Retrieved from
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326970700471X>
- Sithisarn, P., & Gritsanapan, W. (2005). Free Radical Scavenging Activity and Total Flavonoid Content of Siamese Neem Tree Leaf Aqueous Extract from Different Locations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32.
- Sithisarn, P., Nantateerapong, P., Rojsanga, P., & Sithisarn, P. (2016). Screening for Antibacterial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Oroxylum indicum* Fruit Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), 446-446.
- Sobhy, S., Al-Askar, A. A., Bakhet, E. K., Elsharkawy, M. M., Arishi, A. A., Behiry, S. I., & Abdelkhalek, A. (2023). Phytochemical Characterization and Antifungal Efficacy of Camphor (*Cinnamomum camphora* L.) Extract against Phytopathogenic Fungi. *Separations*, 10(3), 189.
- Stasiłowicz-Krzemień, A., Sip, S., Szulc, P., & Cielecka-Piontek, J. (2023). Determining Antioxidant Activity of Cannabis Leaves Extracts from Different Varieties—Unveiling Nature's Treasure Trove. *Antioxidants*, 12(7), 1390.
- Tappayuthpijarn, P., Sattaponpan, C., Sakpakdeecharoen, I., & Ittharat, A. (2012). Cholinesterase Inhibitory and Antioxidant Activities of Thai Traditional Remedies Potentially Used for Alzheimer's Disease. *Thai Journal of East Asian Studies*.
- United States Pharmacopeial, C. (2014). *The United States Pharmacopeia : USP 37 : the National Formulary : NF 32 : by authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc*: Rockville, Md. : United States Pharmacopeial Convention.
- Valibeik, A., Naderi, N., Amini, A., Tavakoli Dastjerd, N., Rahimi Monfared, S., Jafaripour, L., . . . Ahmadvand, H. (2021). Effect of camphor on biochemical factors and gene expression of antioxidant enzymes, inflammatory and apoptotic factors against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Renal Inj Prev*, 10(3), e21-e21.

Xie, Y., Yang, W., Chen, X., & Xiao, J. (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship. *Food Funct*, 5(10), 2582-2589.

กองคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านไทย, กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, & กระทรวงสาธารณสุข. (2564). *ชุดตำราภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย ฉบับอนุรักษ์ ตำรับยาแผนไทยของชาติที่มีตัวยา 'กัญชา'*. กรุงเทพฯ บริษัท สามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพ) จำกัด.

กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร. (2566). บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2566. retrieved from <https://herbal.fda.moph.go.th/media.php?id=553111484570411008&name=nloe-hd3-03.pdf>

จิณิตตา จิตติวัฒน์. (2564). *สารสื่อประสาทและการประยุกต์*. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. (2564). *ชีวเคมีของสมองเชิงบูรณาการ : เมแทบอลิซึมของสมองและการประสานประสาท = Integrated brain biochemistry : brain metabolism and synapse*. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2551). *วิเคราะห์ - วิจัย คุณภาพเครื่องยาไทย*. กรุงเทพฯ คอนเซ็ปท์.

พจนพร ไกรดิษฐ์. (2560). *เซลล์และชีววิทยาโมเลกุล : ฉบับรวบรัดพร้อมเทคนิคปฏิบัติการ*. สงขลา : ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, & รัตนปณณห์, น. (2550). DPPH assay การวิเคราะห์การเป็นสารต้านออกซิเดชัน. สืบค้นจาก

<https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3200/dpph-assay>

มณี ภิญญพรพาณิชย์, กนกพร ภิญญพรพาณิชย์, & อธิวัฒน์ สุนทรพันธ์. (2563). *โรคอัลไซเมอร์ : การดูแลแบบองค์รวมและประเด็นทางกฎหมาย = Alzheimer's disease : holistic care and legal issues*. เชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีณา จิรัจฉริยากุล, อ้อมบุญ วลิสุต, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, วีณา นุกูลการ, ปองทิพย์ สิทธิสาร, ณัฐินี อนันตโชค, . . . โลมะรัตน์, ป. (2561). *สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ*. กรุงเทพฯ โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. (2564). จำนวนประชากรจากการทะเบียน จำแนกตามอายุ เพศ ภาค และจังหวัด พ.ศ. 2564. สืบค้นจาก

<http://statbbi.nso.go.th/staticreport/page/sector/th/01.aspx>

