สารเซสควิเทอร์พีนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส จากเหง้าของว่านนางคำ

Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of a Sesquiterpenoid from *Curcuma aromatica* Rhizomes

วรพจน์ หริตกุล[1*] วาสนา ถาวร[2] และปาริชาติ สืบศักดิ์วงศ์[2]

[1]หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

Woraphot Haritakun[1*], Wasana Taworn[2] and Parichat Suebsakwong[2]

[1]Program of Chemical Technology, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University

บทคัดย่อ

อัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกิดจากภาวะสมองเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง ที่มีการสูญเสียความจำ มีอารมณ์ที่แปรปรวน บุคลิกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อโรคดำเนินไประยะยาวขึ้นจะมีการสูญเสียของระบบประสาท รวมทั้งการเพิกเฉยต่อสิ่งต่างๆ ตามมาด้วยการสูญเสียการทำงานต่างๆ ของร่างกาย และเสียชีวิตในที่สุด โรคนี้เป็นปัญหาทั่วโลก ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคนี้ให้หายขาดได้หรือป้องกันเซลล์ประสาทจากการเกิดโรคนี้ได้ ยาที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน พืชเป็นแหล่งสำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ เช่นยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เมื่อนำเหง้ามาสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ ได้สารประเภทเซสควิเทอร์พีนอยด์จำนวน 3 ชนิดคือ zederone, xanthorrhizol และ germacrone เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส พบว่า xanthorrhizol มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 22.00 ± 1.03 μM ส่วน zederone และ germacrone ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้ โดยที่ยามาตรฐานที่ใช้อ้างอิงคือ galanthamine มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 1.45 ± 0.04 μM

คำสำคัญ : ว่านนางคำ เซสควิเทอร์พีน ฤทธิ์ยับยั้งอะซีทิลโคลินเอสเทอเรส

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: phot247@hotmail.com

Abstract

Alzheimer's disease is a progressive neurogenerative disorder of the central nervous system. This disease is recognized by memory loss, emotional disturbance, personality changes and finally the total eradication of the nervous system. The body functions are lost, ultimately leading to death. This disease is a worldwide problem and no drug can effectively cure or have complete protection of neurons from this disease. Plants are promising sources of natural products with anti-Alzheimer activity, for example, acetylcholinesterase inhibitory activity. *Curcuma aromatica* Salib. (Zingiberaceae) is a plant in the Family Zingiberaceae. Extraction and isolation of the constituents led to the isolation of three sesquiterpenes, zederone, xanthorrhizol and germacrone. Anti-acetylcholinesterase evaluation of these three sesquiterpenes have been carried out and it was found that xanthorrhizol exhibited moderate inhibitory activity, with the IC50 value of 22.00 ± 1.03 μM. However, zederone and germacrone were inactive. The standard drug, galanthamine, showed IC_{50} value at 1.45 ± 0.04 μM.

Keywords : Curcuma aromatica, Sesquiterpenes, Acetylcholinesterase inhibition

บทนำ

อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่เกิดจากภาวะสมองเสื่อมที่รักษาไม่หาย อาการที่พบในระยะแรกคือการสูญเสียความจำ เมื่อโรคดำเนินไประยะหนึ่งผู้ป่วยจะมีอาการสับสน หงุดหงิดง่ายและก้าวร้าว อารมณ์แปรปรวน เสียความสามารถทางภาษา สูญเสียความทรงจำระยะยาว รวมทั้งการเพิกเฉยต่อสิ่งต่างๆ เนื่องจากผู้ป่วยเสียการรับความรู้สึก (Waldemar et al., 2007; Tabert et al., 2005) และต่อมาจะสูญเสียการทำงานต่างๆ ของร่างกาย และเสียชีวิตในที่สุด ประมาณการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2549 มีประชากรราว 26.6 ล้านคนทั่วโลกที่ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ และจะเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าในพ.ศ. 2593 (Brookmeyer et al., 2007) สาเหตุและการดำเนินโรคของโรคอัลไซเมอร์ยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนักในปัจจุบันนี้ งานวิจัยบ่งชี้ว่าโรคนี้มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างคล้ายคราบในสมองที่เรียกว่า plaque และ tangle (Tiraboschi et al., 2004) การรักษาในปัจจุบันช่วยเกี่ยวกับอาการของโรคเพียงเล็กน้อย แต่ยังไม่มีการรักษาที่ช่วยชะลอหรือหยุดการดำเนินโรคอย่างแท้จริง สาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ มีอยู่ 3 สมมติฐานหลัก สมมติฐานที่เก่าที่สุดซึ่งยาที่ใช้รักษาในปัจจุบันส่วนมากยึดเป็นพื้นฐานคือ cholinergic hypothesis ซึ่งเชื่อว่าโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการลดการสังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิด acetylcholine (Shen, 2004) ทำให้เกิดการอักเสบของสมองโดยทั่ว (Wenk, 2003) สมมติฐานที่สองคือ amyloid hypothesis ซึ่งเชื่อว่าการสะสมของ amyloid

beta เป็นสาเหตุหลักของโรคอัลไซเมอร์ (Hardy & Allsop, 1991; Mudher & Lovestone, 2002) สมมติฐานที่สามคือ tau hypothesis ซึ่งเชื่อว่าความผิดปกติของ tau protein เป็นการเริ่มต้นให้เกิดความผิดปกติในเซลล์ประสาท (Mudher & Lovestone, 2002) ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาด การรักษาที่มีในปัจจุบันเป็นการประคับประคองหรือบรรเทาเท่านั้น การรักษาในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือการรักษาด้วยยา การรักษาทางจิตสังคม และการให้การดูแลผู้ป่วย สำหรับกลุ่มยาที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ตัวอย่างได้แก่ tacrine ซึ่งปัจจุบันนี้ได้เลิกใช้แล้ว เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อตับ (Davis & Powchick, 1995) ได้มีการค้นพบ rivastigmine และ donepezil ทำให้เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ acetylcholine ในสมองเพื่อชดเชยกับการลดลงของ acetylcholine อันเนื่องจากการตายของเซลล์ประสาท (Stahl, 2000) ได้มีความสนใจสำรวจหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase กันอย่างมาก เช่น huperzine A เป็นสารที่แยกได้จากพืช Huperzia serrata (Wang et al., 2000) และอยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิค สารประเภทอัลคาลอยด์ ชื่อ galanthamine เป็นตัวอย่างของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ที่ได้มาจากพืช และพัฒนาจนใช้เป็นยาได้ (Marco-Contelles et al., 2006) นอกจากนี้ ยังได้มีความพยายามที่จะเตรียมแอนาลอกของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสสูงขึ้น เพื่อหาทางนำไปพัฒนาใช้เป็นยาต่อไป เช่นแอนาลอกของสารเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชัน *(Curcuma longa)* (Arunkhamkaew et al., 2013) สิ่งที่น่าสนใจคือ อาจจะมีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคอัลไซเมอร์ตามสมมติฐานข้างต้นได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ได้ก็อาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านอัลไซเมอร์ต่อไป

ว่านนางคำ (Curcuma aromatica Salisb.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุก เหง้ามีสีเหลือง มีกลิ่นหอม ใบมีรูปร่างคล้ายพืชในสกุล Curcuma โดยทั่วไป เช่นขมิ้นชัน แต่ท้องใบมีขน ดอกช่อเชิงลด มักมีดอกก่อนใบงอกจากเหง้า ใบประดับที่ปลายช่อมีสีชมพู ใบประดับที่รองรับดอกสีขาวแกมเขียวกลีบดอกสีขาวแกมชมพู ว่านนางคำมีสรรพคุณตามที่รายงานคือ หัวใช้ขับลมในลำไส้ แก้เม็ดผื่นคันแก้ฟกช้ำ แก้ปวดท้อง แก้ข้อเคล็ด แก้ขัดยอก แก้หนองใน ทาฝี แก้ต่อมทอนซิลและต่อมน้ำลายอักเสบ แก้ฟกช้ำบวม รากใช้ขับเสมหะ เป็นยาสมาน แก้หนองในเรื้อรัง ได้มีรายงานว่าสารจากว่านนางคำมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ลดไขมัน ฤทธิ์สมานแผล (Ahmed et al., 2008; Anggakusuma, 2009) ได้มีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีจากพืชชนิดนี้มากพอควร และได้มีการแยกสารออกมาหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เช่น borneol, 1,8-cineol, carvone, camphor, germacrone, limonene, curzerenone, xanthorrhizol (Guo et al., 1980; Catalan et al., 1989; Ahmed et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีสาร aromatic acid เช่น p-methoxycinnamic acid, p-coumaric acid, vanillic acid (Merh et al., 1986) สารพวกเคอร์คิวมินอยด์ ได้แก่ เคอร์คิวมิน, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin (Tonnesen et al., 1992) กลุ่มวิจัยของเราได้มีความสนใจสมุนไพรที่มีฤทธิ์

ต้าน อัลไซเมอร์ โดยได้ตรวจสอบฤทธิ์สารสกัดของสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส และได้พบว่าสารสกัดเฮกเซนของว่านนางคำมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ได้อย่างอ่อนๆ จึงได้ตัดสินใจแยกสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรชนิดนี้เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดแยกสารจากพืชที่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง; อินฟราเรดสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Perkin-Elmer รุ่น FT-IR 400 ประเทศสหรัฐอเมริกา, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ ยี่ห้อ Bruker รุ่น AVANCE 400 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, อิเล็กโทรสเปรย์ไอออนไนเซชันแมสสเปกโทรมิเตอร์ ยี่ห้อ Thermo Finnigan รุ่น LC-Q ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ Tecan รุ่น Sunrise Basic ประเทศออสเตรีย, เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ Precisa รุ่น XR 125SM ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง; ตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซิลิกาเจล ชนิดหยาบ (ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 มิลลิเมตร) และชนิดละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ยี่ห้อ Merck, โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) (ซิลิกาเจล 60 F254) ยี่ห้อ Merck, acetylcholinesterase จาก Electrophorus electricus ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, 0.1% bovine serum albumin (BSA) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, acetylthiocholine iodide (ATCI) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศอังกฤษ, methanol (HPLC grade) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี, galanthamine hydrobromide จาก Lycoris sp. ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศฝรั่งเศส, sodium phosphate dibasic dihydrate (Na2HPO4.2H2O) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, sodium dihydrogen orthophosphate (NaH2PO4.2H2O) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย

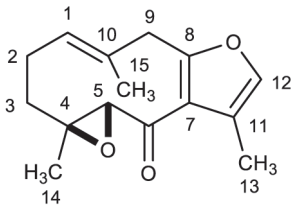
2. การสกัดเหง้าว่านนางคำ

นำเหง้าว่านนางคำสด (3.0 กิโลกรัม) มาบดโดยใช้เครื่องบด นำส่วนที่บดได้มาบรรจุในconical flask ขนาด 4 ลิตร จำนวน 2 ใบ สกัดด้วยเมทานอล 4 ครั้งๆ ละ 750 มิลลิลิตรในแต่ละฟลาสค์ โดยนำมาอังบนเครื่องอังไอน้ำ เพื่อช่วยให้การสกัดสารมีประสิทธิภาพมากขึ้น นำสารละลายที่สกัดได้มารวมกันและกรอง ระเหยตัว ทำละลายส่วนใหญ่ออกไปแล้วเติมน้ำลงไป 600 มิลลิลิตร ทำการสกัดสารละลายที่ได้ด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และนอร์มัลบิวทานอล ตามลำดับ โดยแต่ละตัวทำละลายใช้การสกัด 3

ครั้งๆ ละ 450 มิลลิลิตร นำแต่ละการสกัดมารวมกันแล้วระเหยตัวทำละลายออกไป ได้สารสกัด (extract) เฮกเซน (7.62 กรัม) สารสกัดไดคลอโรมีเทน (4.28 กรัม) และสารสกัดบิวทานอล (12.60 กรัม)

3. การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดเฮกเซน

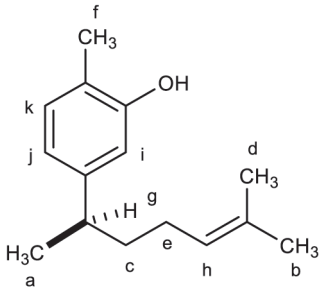
นำสารสกัดเฮกเซนส่วนใหญ่ (ปริมาณ 7.50 กรัม) ซึ่งเป็นสารสกัดชนิดเดียวที่ให้ผลการทดสอบในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสและให้ฤทธิ์อย่างอ่อนมาแยกสารที่เป็นองค์ประกอบให้บริสุทธิ์ สารสกัดนี้ เมื่อตั้งทิ้งไว้ พบว่ามีผลึกตกลงมา จึงทำการกรองแบบสุญญากาศแล้วล้างผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผลึกหนัก 560 มิลลิกรัม เมื่อตรวจสอบโดย TLC พบว่ายังไม่บริสุทธิ์ จึงนำมาแยกใหม่ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ตัวชะเป็น เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม เริ่มจาก เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 10:1 โดยปริมาตร และเพิ่มปริมาณคลอโรฟอร์มเรื่อยๆ จนได้ fraction ที่มีสารหลักออกมา (เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 10:3) แล้วตกผลึกสารที่แยกได้ด้วย ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หนัก 166 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 153-154 oC มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีตรงกับ zederone (1) (Shibuya et al., 1987)



1

Zederone (1) : IR νmax 2930, 1661, 1520, 1399, 1368, 1230, 1136, 1018, 927, 806 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ1.25 (ddd, *J* = 12.8, 10.3, 3.8 Hz, 1H, H-3α), 1.31 (s, 3H, CH3-14), 1.57 (s, 3H, CH_3-15), 2.08 (s, 3H, CH_3-13), 2.17 (br d, *J* = 13.2 Hz, 1H, H-2α), 2.26 (ddd, *J* = 12.8, 6.8, 3.2 Hz, 1H, H-3β), 2.48 (dddd, *J* = 13.6, 13.2, 11.9, 3.2 Hz, 1H, H-2β), 3.65 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, H-9α), 3.72 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, H-9β), 3.78 (s, 1H, H-5), 5.46 (dd, *J* = 11.8, 3.6 Hz, 1H, H-1); ESIMS *m/z* 247 $[M+H]^+$.

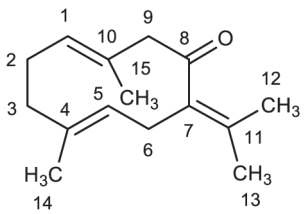
นำของเหลวที่กรองได้ (filtrate) มาระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดซึ่งแยกผลึกออกไปแล้ว 7.02 กรัม นำไปแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้ระบบตัวทำละลายทำนองเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ได้ fraction รวม 10 fraction นำ fraction ที่ 4 มาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด ได้น้ำมันเหลวใสสีเหลืองอ่อนมาก 144 มิลลิกรัม มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีตรงกับ xanthorrhizol (2)



2

Xanthorrhizol (2) : IR νmax 3400, 2910, 2895, 2805, 1601, 1570, 1500, 1445, 1405, 1230, 1152, 1100, 970, 910, 845, 800 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH3 (a)), 1.52 (s, 3H, CH_3 (b)), 1.56 (partially overlapping signal, 2H, CH_2 (c)), 1.67 (s, 3H, CH_3 (d)), 1.85 (m, 2H, CH_2 (e)), 2.20 (s, 3H, CH_3 (f)), 2.60 (septet, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH (g)), 5.08 (m, 1H, CH (h)), 6.59 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH (i)), 6.67 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, ArH (j)), 7.00 (d, *J* = 7.6 Hz, ArH (k)); ESIMS *m/z* 219 $[M+H]^+$.

นำ fraction ช่วงท้ายๆ มาตรวจสอบ TLC พบว่ามีสารที่น่าสนใจอยู่ 1 ชนิด ทำการแยกโดยคอลัมน์ โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด ใช้ระบบตัวชะเป็น เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ทำการแยกซ้ำจนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์ 6 มิลลิกรัม มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีตรงกับ germacrone (3)



3

Germacrone (3) : IR νmax 2920, 2830, 1670, 1448, 1380, 1270, 1160, 1105, 1040, 970, 880, 845, 800, 732 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ1.41 (s, 3H, CH_3-14), 1.60 (s, 3H, CH_3-15), 1.69 (s, 3H, CH_3-13), 1.77 (s, 3H, CH_3-12), 2.05 (m, 2H, H-2α, H-3α), 2.13 (m, 1H, H-3β), 2.35 (m, 1H, H-2β), 2.82 (br d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-6α), 2.91 (br d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-6β), 2.92 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-9α), 3.38 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-9β), 4.68 (br d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5), 4.95 (br d, *J* = 11.6 Hz, 1H, H-1); ESIMS *m/z* 219 $[M+H]^+$.

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสของสารสกัดและสารบริสุทธิ์โดยใช้ acetylthiocholine เป็น substrate โดยการใช้วิธีการของ Ellman et al. (1961) ที่ได้มีการปรับเปลี่ยนบางประการ วิธีการโดยย่อมีดังนี้ ใช้ 96-well plate เติมสารละลาย ปริมาณ 140 ไมโครลิตรของ sodium phosphate buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) เติมสารละลายเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (0.2 units/มิลลิลิตรใน sodium phosphate buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) และเติมสารที่ต้องการทดสอบ ซึ่งละลายใน 80% เมทานอล (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายผสมปริมาณ 20 ไมโครลิตร ของ 5 มิลลิโมลาร์ 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ใน sodium phosphate buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) ซึ่งมี 0.1% bovine serum albumin (BSA) และ 5 มิลลิโมลาร์ acetylthiocholine iodide (ATCI) ใน 10 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer, pH 8.0 (5:1) ตรวจสอบการเกิดไฮโดรไลซิสของ acetylthiocholine ได้โดยติดตามการเกิดสีเหลืองของแอนไอออน 5-thio-2-nitrobenzoate ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง DTNB กับ thiocholines ซึ่งถูก catalyzed โดยเอนไซม์ โดยวัดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วัด absorbance หลังจากการ incubation ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นคำนวณร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสได้จากสูตร โดยใช้ galanthamine เป็นยาอ้างอิงมาตรฐาน แต่ละการทดลองให้ทำซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับการหาค่า IC50 ของสาร xanthorrhizol (2) ทำการเตรียมความเข้มข้นที่ 0.0015625-0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางจากความเข้มข้นแรก (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ทำการทดสอบหาร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสในแต่ละความเข้มข้น ดังวิธีการของ Ellman et al. (1961) ที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ผลทางสถิติ Microsoft Excel 2010 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสกับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อแสดงร้อยละ (percentage) ของข้อมูล ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ส่วนสาร zederone (1) และ germacrone (3) ไม่ได้หาค่า IC50 เนื่องจาก inactive ในการทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

$$\text{Acetylcholinesterase inhibition (\%)} = [(A-B)-(C-D)]/(A-B) \times 100$$

เมื่อ A คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เติมเอนไซม์แต่ไม่เติมสารตัวอย่าง
B คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมเอนไซม์และสารตัวอย่าง
C คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เติมเอนไซม์และสารตัวอย่าง
D คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เติมสารตัวอย่างแต่ไม่เติมเอนไซม์

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การยับยั้งอะซีทิลโคลินเอสเทอเรสของสาร 1-3

สาร	IC_{50} (μM)[a]
Zederone (1)	Inactive[b]
Xanthorrhizol (2)	22.00 ± 1.03
Germacrone (3)	Inactive[b]

[a]Galanthamine เป็นยามาตรฐาน มีค่า IC50 เท่ากับ 1.45 ± 0.04 ไมโครโมลาร์

[b]Inactive ในการทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ได้ตรวจสอบหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ พบว่าเมื่อนำว่านนางคำสดมาสกัดด้วยเมทานอล ระเหยเมทานอลส่วนใหญ่ออกไปแล้วเติมน้ำ สกัดสารละลายที่ได้ด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และนอร์มัลบิวทานอล ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายให้แห้งแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอะซีทิลโคลินเอสเทอเรส จากการทดสอบพบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์อย่างอ่อน ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทน และนอร์มัลบิวทานอลไม่มีฤทธิ์ จึงแยกสารออกจากสารสกัดเฮกเซน ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด จากการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ทำให้ทราบว่าสารทั้ง 3 ชนิดคือ zederone (1), xanthorrhizol (2) และ germacrone (3) ซึ่งเป็นสารเซสควิเทอร์พีน เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรส (ตารางที่ 1) พบว่าสาร 2 มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง โดยมีค่า IC50 อยู่ที่ 22.00 ± 1.03 μM ส่วนสาร 1 และ 3 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้ โดยที่ยามาตรฐานที่ใช้อ้างอิงคือ galanthamine มีค่า IC50 อยู่ที่ 1.45 ± 0.04 μM จึงถือว่า xanthorrhizol ยังมีฤทธิ์ไม่สูงพอที่นำไปพัฒนาเป็นยายับยั้งอะซีทิลโคลินเอสเทอเรสโดยตรง แต่อาจนำไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้แอนาลอกที่มีฤทธิ์สูงกว่านี้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สารเซสควิเทอร์พีนจากว่านนางคำ คือ xanthorrhizol (2) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลินเอสเทอเรสปานกลาง ส่วนสาร 1 และ 3 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้ ยามาตรฐานที่ใช้อ้างอิงคือ galanthamine มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้สูง

References

Ahmed, S., Ansari, S. H., Ali, M., Bhatt, D., & Ansari, F. (2008). Phytochemical and biological investigations on Curcuma aromatica. Pharmacog. Rev. 2, 151-156.

Anggakusuma, Yanti., Lee, M., & Hwang, J.-K. (2009). Estrogenic activity of xanthorrhizol isolated from Curcuma xanthorrhiza Roxb. Biol. Pharm. Bull. 32, 1892-1897.

Arunkhamkaew, S., Athipornchai, A., Apiratikul, N., Suksamrarn, A., & Ajavakom, V. (2013). Novel tetrahydrocurcuminoid dihydropyrimidinone analogue as potent acetylcholinesterase inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 2880-2882.

Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, M. H. (2007). Forcasting the global burden of Alzheimer's disease. Alzheimer's and Dementia 3, 186-191.

Catalan, C. A. N., Bardon, A., Retamar, J. A., Gros, E. G., Verghese, J., & Joy, M. T. (1989). Flav. Fragr. J. 4, 25-30.

Davis, K. L., & Powchick, P. (1995). Tacrine. Lancet 345, 625-630.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J., & Feather-Stone R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

Guo, Y. T., Chu, X. K., Chen, Y. R., Wu, X. Y., Chen, G., & Lu, X. R. (1980). Studies on constituents of wenezhu (Curcuma aromatica Salivb.). Yao Hsueh Hsueh Pao, 15, 251-252.

Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol. Sci. 12, 383-388.

Marco-Contelles, J., Carreiras, M. C., Rodríguez, C., Villarroya, M., & García, A. G. (2006). Synthesis and pharmacology of galantamine. Chem. Rev. 106, 116-133.

Merh, P. S., Daniel, M., & Sabnit, S. D. (1986). Chemistry and taxonomy of some members of the Zingiberales. Curr. Sci. 55, 835-839.

Mudher, A., & Lovestone, S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? Trends Neurosci. 25, 22-26.

Shen, Z. X. (2004). Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. Med. Hypotheses 63, 308-321.

Shibuya, H., Hamamoto, Y., Cai, Y., & Kitakawa, I. (1987). A reinvestigation of the structure of zederone, furano-germacrane-type sesquiterpene from zedoary. Chem. Pharm. Bull. 35, 924-927.

Stahl, S. M. (2000). The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2: illustrating their mechanisms of action. J. Clin. Psychiatry 61, 813-814.

Tabert, M. H., Liu, X., Doty, R. L., Serby, M., Zamora, D., Pelton, G. H., Marder, K., Albers, M. W., Stern, Y., & Devanand, D. P. (2005). A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 58, 155-160.

Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. Neurology 62, 1984-1989.

Tonnesen, H. H., Karlsen, J., Grislingaas, A. L., Balakrishnan, V. N., Ayyappan, P., & Verghese, V. (1992). Studies on curcumin and curcuminoids. XXI. Variation in the contents on curcuminoids in Curcuma longa L. and Curcuma aromatica Salisb. From India during one season. Z. Lebensm-Unters. Forsch. 194, 570-572.

Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., et al. (2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. Eur. J. Neurol.14, e1-26.

Wang, L. M., Han, Y. F., & Tang, X. C. (2000). Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. Eur. J. Pharmacol. 398, 65-70.

Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. J. Clin. Psychiatry 64 Suppl. 7-10.

คณะผู้เขียน

อาจารย์วรพจน์ หริตกุล

อาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

e-mail : phot247@hotmail.com

นางสาววาสนา ถาวร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

e-mail : plaphaii781@gmail.com

นางสาวปาริชาติ สืบศักดิ์วงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

e-mail : ziaj-parichat@hotmail.com