



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม

โดย ผศ.ดร. วิณา หุกุลการ และคณะ

กันยายน 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม
Neuroprotective Activity of *Citrus* fruit

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ.ดร. วิภา นุกูลการ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ผศ.ดร. วรพรรณ กิจผาติ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ผศ.ดร. สริน ทัดทอง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคลากรที่ให้การสนับสนุนและให้การอนุเคราะห์ในการ
วิจัยครั้งนี้ดังต่อไปนี้

1. หน่วยวิจัยกลาง ภาควิชาเกษตรอินทรีย์ ภาควิชาสัตววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
และสาขาวิชาเกษตรเคมีและเกษตรชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อำนวยความสะดวกด้านการใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่บุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือ
ด้านต่างๆ
2. ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ในการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
สารบัญ	iii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญรูป	v
สารบัญคำย่อ	vi
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
Executive summary	3
วัตถุประสงค์	4
บทที่ 1 บทนำ	5
ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	5
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และระเบียบวิธีวิจัย	16
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี	16
ระเบียบวิธีวิจัย	17
1. การเตรียมสัสมและสัสมโอสสำหรับการวิจัย	17
2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic)	17
3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid content)	18
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	18
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH scavenging activity	18
4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid (A β)	19
4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ β -secretase	21
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส	22
4.5 การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นของแขนงประสาท	24
บทที่ 3 ผลการวิจัยฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม	
1. % yield จากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด	30
2. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu	31
3. ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay	33
4. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay	34
5. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธี Ellman's method	37
6. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าซีคีเทส	38
7. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์	40
8. ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นของแขนงประสาท	41
บทที่ 4 สรุปผลการดำเนินการวิจัย	45
เอกสารอ้างอิง	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในวิธี DPPH	19
2 ปริมาณสารที่ต้องไปเปดลงใน 96-well black plate เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์	21
3 องค์ประกอบของแต่ละ well ในการทดลอง microplate assay	24
4 %yield ของส่วนน้ำคั้นและสารสกัดส่วนกากของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด	31
5 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด	32
6 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	34
7 % ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 mg/ml	35
8 IC ₅₀ ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐาน	36
9 % ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธี Ellman's method ของสารตัวอย่าง	38
10 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าซีดีเทสของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	39
11 ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	40
12 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดส้มชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 1 ng/mL และ 10 µg/mL ตามลำดับ	42
13 % yield ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทส และฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	43

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะของ amyloid plaques และเซลล์ประสาทที่มี neurofibrillary tangles (NFT)	7
2 การเกาะกลุ่มกันของ β -amyloid จนเกิดเป็น amyloid plaques	8
3 กลไกการกระตุ้นการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ β -amyloid	9
4 กลไกการสะสมของกลุ่มเส้นใยประสาท (neurofibrillary tangle, NFT) อันเนื่องมาจากโปรตีน tau ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปทำให้ microtubule ผิดปกติแยกออกจากกัน	9
5 การเกิดปฏิกริยาระหว่าง DPPH และอนุมูลอิสระ	18
6 กราฟมาตรฐาน Gallic acid	31
7 กราฟมาตรฐาน Quercetin	33
8 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดเข้มข้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL และ 10 μ g/mL ตามลำดับ	41

สารบัญคำย่อ

α	Alpha
β	Beta
$\geq$	มากกว่าหรือเท่ากับ
α	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
ซม.	เซนติเมตร
ATCI	Acetylthiocholine iodide
APP	Amyloid precursor protein
DTNB	5-thio-2-nitrobenzoic acid
GAE	Gallic acid equivalent
$\text{H}\cdot$	อนุมูลไฮโดรเจน
IC_{50}	inhibitory concentration at 50 %
mg	มิลลิกรัม
mM	มิลลิโมลาร์
M	โมลาร์
NFTs	Neurofibrillary tangles
$^1\text{O}_2$	singlet oxygen
$\text{ROO}\cdot$	อนุมูลเพอรอกซิล
ROS	reactive oxygen species
w/v	weight by volume

โครงการ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม

Neuroprotective Activity of *Citrus* fruit

บทคัดย่อ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชตระกูลส้มจำนวน 6 ชนิดที่ปลูกในประเทศไทยได้แก่ ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง และ ส้มซ่า โดยใช้ส่วนของน้ำคั้น ซึ่งนำไปทำให้แห้งโดยวิธีการ Freeze dry และส่วนของสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากที่เหลือจากการคั้นน้ำ แล้วนำสารสกัดทั้งสองส่วนไปทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าส่วนน้ำคั้นและสารสกัดส่วนกากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.71-5.38 mg GAE/g extract และ 4.35 -6.98 mg GAE/g extract ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.00 – 1.06 mg QE/g extract และ 1.41 – 2.55 mg QE/g extract ตามลำดับ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่าส่วนน้ำคั้นมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2.26–4.54 mg/ml ขณะที่สารสกัดส่วนกากมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2.97-4.67 mg/ml โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน คือ Trolox และ Vitamin C มีค่าเท่ากับ 0.0100 ± 0.0005 และ 0.0125 ± 0.0009 mg/ml ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส โดยการหาค่า %inhibition ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ด้วยวิธี Ellman's พบว่าส่วนน้ำคั้นมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสอยู่ในช่วง 10.98 – 15.24% ในขณะที่สารสกัดส่วนกากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส อยู่ในช่วง 8.37 -21.85% โดยสารมาตรฐาน คือ Galantamine มีค่า %inhibition ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/ml เท่ากับ 89.18% ผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งในส่วนคั้นและสารสกัดส่วนกากของส้มทั้ง 6 ชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน เช่นเดียวกับผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสซึ่งให้ฤทธิ์ที่ไม่สูงนัก โดยส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสมากที่สุด รองลงมาคือส้มซ่า ส่วนผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะไมลอยด์ของส่วนน้ำคั้นและส่วนกากของพืชตระกูลส้ม พบว่าต่ำกว่าผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสและต่ำกว่าสารมาตรฐาน curcumin อย่างไรก็ดีตาม สารสกัดส้มทุกชนิดทั้งความเข้มข้นที่ 1 ng/mL และ 10 μ g/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทพี-19 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมได้ และมีแนวโน้มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังนั้น สารสกัดส้มทั้งหมดจึงไม่นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทต่อ

Abstract

The purpose of this project was to evaluate the biological activities of six citrus fruits from Thailand: *Citrus maxima* Merr., *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. aurantifolia*, *C. reticulata* Blanco., *C. sinensis* Osb., *C. aurantium* var. *aurantium*. The juice samples and methanolic extracts from tissues after squeezing and freeze dried were used. Total phenolic and total flavonoid were evaluated. The total phenolic content of the juice samples were between 4.35 - 6.98 mg GAE/g extract while those from the tissue extracts were between 3.71 - 5.38 mg GAE/g extract. The total flavonoid content of the juice samples were between 0.00 – 1.06 mg QE/g extract whereas those from the tissue extracts were 1.41 – 2.55 mg QE/g extract. The antioxidant activity was determined by DPPH assay. The juice samples had IC₅₀ values between 2.26 - 4.54 mg/ml and the tissue extracts had IC₅₀ values between 2.97 – 4.67 mg/ml. The IC₅₀ of Trolox and vitamin C, reference standard, were 0.0100 ± 0.0005 and 0.0125 ± 0.0009 mg/ml, respectively. The anticholinesterase activity represented as % inhibition was determined by Ellman's method at the concentration of 0.5 mg/ml. The inhibitory activity of the juices samples and the tissue extracts were 10.98 - 15.24% and 8.37 - 21.85%, respectively. Galantamine, reference standard, had % inhibition of 89.18% at the concentration of 0.05 mg/ml. The data revealed that both juice samples and tissue extracts from six citrus fruits exhibited low antioxidant and anticholinesterase activity. Similarly, the β -secretase inhibition and anti-amyloid aggregation effect of six citrus fruits showed the low potency. The biological effects on P19-derived neurons of citrus fruit at a serial of dilutions in a microplate were identified and quantified. The result indicated that at low and high dose (1 ng/mL and 10 μ g/mL) not promoted cell viability of cultured neurons and tend to be cytotoxic to the cell. Therefore, further evaluation of neuritogenic and neuroprotective activity did not proceed.

Executive Summary

ในการศึกษาได้ทำการจัดหาตัวอย่างพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ได้แก่ ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง และส้มซ่า นำมาเตรียมเป็นน้ำคั้นและสารสกัด เมทานอลส่วนกาก พบว่าพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดให้ %yield ของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 2.19-5.69 % โดยส้มเซ้งมีค่า %yield มากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ มะนาว ส้มโอทับทิมสยาม และ ส้มซ่า ตามลำดับ สารสกัดส่วนกากมีค่า %yield อยู่ในช่วง 0.79-4.85% โดยส้มเซ้งมีค่า %yield มากที่สุด รองลงมาคือ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม และส้มซ่า ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 3.71-5.38 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มซ่ามีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเซ้ง ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน และส้มโอขาวใหญ่ ตามลำดับ และสารสกัดส่วนกากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.35-6.98 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มเขียวหวาน มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมา คือ ส้มเซ้ง มะนาว ส้มโอขาวใหญ่ ส้มซ่า และส้มโอทับทิมสยาม ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดเมทานอลของส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนน้ำคั้น ซึ่งเหมือนกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.41 – 2.55 mg QE/g extract โดยสารสกัดจากส้มโอทับทิมสยามมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด 2.55 mg QE/g extract รองลงมาคือส้มเซ้ง มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่และส้มซ่า ตามลำดับ และส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 0.00 – 1.06 mg QE/g extract และเมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า ส่วนน้ำคั้นของส้มโอทับทิมสยาม และสารสกัดส่วนกากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด แต่ทั้งนี้หากเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่า ส่วนน้ำคั้นที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ ส่วนน้ำคั้นของส้มโอขาวใหญ่ และสารสกัดส่วนกากที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ สารสกัดจากส้มเขียวหวาน แต่จากการสังเกตพบว่า ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดนั้นมีค่าใกล้เคียงกันและมีฤทธิ์ค่อนข้างน้อย เช่นเดียวกับผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสโดย ส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสมากที่สุด รองลงมาคือส้มซ่า ส่วนผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะไมลอยด์ของส่วนน้ำคั้นและส่วนกากของพืชตระกูลส้มพบว่าต่ำกว่าผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสและต่ำกว่าสารมาตรฐาน curcumin อย่างไรก็ตาม สารสกัดส้มทุกชนิดทั้งความเข้มข้นที่ 1 ng/mL และ 10 μ g/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมได้ และมีแนวโน้มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังนั้นสารสกัดส้มทั้งหมดจึงไม่ได้นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นการออกของแขนงประสาทต่อ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลการปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม โดยจะคัดเลือกตัวแทนผลไม้ตระกูลส้มกลุ่มย่อยต่างๆ ได้แก่ กลุ่มส้มเกลี้ยง กลุ่มส้มเปลือกกล่อน กลุ่มส้มโอ และกลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปนี้ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ acetylcholinesterase และ β -secretase ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid และ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทและเพิ่มการออกแขนงประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยง P19
2. เพื่อเป็นข้อมูลเชิงวิชาการสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในแง่การส่งเสริมผู้บริโภค เพิ่มมูลค่าผลไม้ และนำไปต่อยอดในผลิตภัณฑ์ต่อไป

บทที่ 1 บทนำ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันภาวะสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ จากสถิติพบว่ามีประชากรโลกป่วยเป็นโรคสมองเสื่อมประมาณ 50 ล้านคน และคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้น 4 เท่าในอีก 50 ปีข้างหน้าหากยังไม่มีมาตรการที่เหมาะสม สำหรับในประเทศไทย ทางกระทรวงสาธารณสุขเผยว่าในปี 2558 มีผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 600,000 คน และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 1.1 ล้านคน ในปี 2573 ผู้ป่วยจะมีความผิดปกติในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และการจดจำ มีการเสื่อมของสมอง ส่งผลให้บุคลิกภาพ อารมณ์และพฤติกรรมเปลี่ยน ผู้ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเอง ไม่สามารถแยกถูกผิด มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสียไป ความจำเสื่อม และในระยะท้ายของโรคจะสูญเสียความจำทั้งหมด โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่มีความซับซ้อน สาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์มีหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น การเกาะกลุ่มสะสมรวมตัวของโปรตีนเบต้าแอมิลอยด์ (amyloid- β peptide, A β) ภายนอกเซลล์ประสาท การสะสมของกลุ่มเส้นใยประสาท (neurofibrillary tangle, NFT) อันเนื่องมาจากโปรตีน tau ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปทำให้เซลล์ประสาทในสมองไม่สามารถทำงานสื่อสารประสาทได้ การอักเสบและการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากอนุมูลอิสระทำให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาท และการลดลงของปริมาณสารสื่อประสาท acetylcholine (ACh) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ที่ทำหน้าที่ย่อย ACh ทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ นอกจากจะหาสารที่มีฤทธิ์เพิ่มปริมาณของสารสื่อประสาท ACh โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE แล้ว การหาสารที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (Neuroprotective effect) โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -secretase เพื่อลดการสร้าง β -amyloid และยับยั้งการรวมตัวของ β -amyloid จนเกิดเป็น amyloid plaques ภายนอกเซลล์ประสาท ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการงอกและเพิ่มแขนงของเซลล์ประสาท (Neurite outgrowth) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ ที่อาจจะสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้

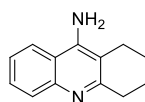
จากข้อมูลดังกล่าวทำให้โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายในการสร้างองค์ความรู้เพื่อสนับสนุนการบริโภคผลไม้ไทย โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสร้างหลักฐานทางวิทยาศาสตร์จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะสมองเสื่อมของผลไม้ในตระกูล *Citrus* โดยเฉพาะส้มและส้มโอ ซึ่งจัดว่าเป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากมาย เช่น วิตามินซี เบต้าแคโรทีน สารกลุ่ม flavonoids coumarins และ polyphenols ซึ่งน่าจะมีศักยภาพในการช่วยปกป้องเซลล์ประสาท ชะลอการเกิดภาวะสมองเสื่อมได้ ทั้งส้มและส้มโอจัดเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวาง และมีการปลูกกระจายทั่วภูมิภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในด้านการส่งออก ซึ่งทางโครงการจะทำการเก็บตัวอย่างส้มและส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ นำมาทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะสมองเสื่อม ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และเอนไซม์ β -secretase ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทและช่วยใน

การรอกและเพิ่มจำนวนของแขนงของเซลล์ประสาท รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของส้มและส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ โดยผลสัมฤทธิ์ที่ได้ทางผู้วิจัยคาดหวังว่าจะได้องค์ความรู้ที่สำคัญของการศึกษาฤทธิ์ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาท เพื่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการวิจัย และเป็นการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทย

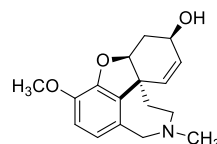
บททวนเอกสารเชิงสังเคราะห์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคสมองเสื่อม (neurodegenerative disease) ซึ่งเป็นหนึ่งในเจ็ดอันดับแรกของโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุในประเทศไทย โดยพบว่าผู้สูงอายุหญิงมีสัดส่วนการเป็นโรคมกกว่าชายเล็กน้อย ผู้ป่วยจะมีอาการหลงลืมเป็นอาการนำ และเมื่อมีการเสื่อมหรือตายของเซลล์สมองเพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้บุคลิกภาพ อารมณ์และพฤติกรรมเปลี่ยนไป ไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเอง ไม่สามารถแยกถูกผิด มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสียไป ในระยะท้ายของโรคจะสูญเสียความจำทั้งหมด จะค่อยๆ แ่ลงจนถึงอาการสุดท้าย คือช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ และเสียชีวิตไปเพราะอาการแทรกซ้อนที่เกิดขึ้น จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคสมองเสื่อมดังกล่าวมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งทางสังคมและเศรษฐกิจ ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก อย่างไรก็ตาม โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่มีความซับซ้อนมาก ซึ่งสาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์มีหลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ตัวอย่างเช่น การสะสมรวมตัวของโปรตีนเบต้าแอมิลอยด์ (amyloid- β peptide, A β) ภายนอกเซลล์ประสาท การสะสมของกลุ่มเส้นใยประสาท (neurofibrillary tangle, NFT) อันเนื่องมาจากโปรตีน tau ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปทำให้เซลล์ประสาทในสมองไม่สามารถทำงานสื่อสารประสาทได้ การอักเสบและการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากอนุมูลอิสระทำให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาท และการลดลงของปริมาณสารสื่อประสาท acetylcholine (ACh) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ที่ทำหน้าที่ย่อย ACh ทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด เป็นต้น

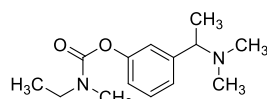
สมมุติฐานเกี่ยวกับการสูญเสียความจำเนื่องจากการทำลายของ cholinergic neuron เรียกว่า “cholinergic hypothesis” (Querfurth *et al*, 2010) ซึ่งนำไปสู่แนวทางการรักษาโดยการให้ยาที่มีผลเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท ACh ในสมองของผู้ป่วยโดย acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ส่วนใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ส่งผลทำให้มีสารสื่อประสาท ACh ในสมองเพิ่มมากขึ้น ทำให้ช่วยฟื้นฟูความจำที่บกพร่องได้ ตัวอย่างยาได้แก่ tacrine, donepezil, rivastigmine และ galanthamine (Lau *et al*, 2008)



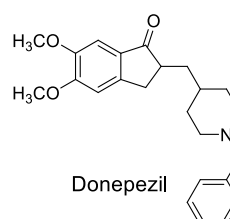
Tacrine



Galantamine



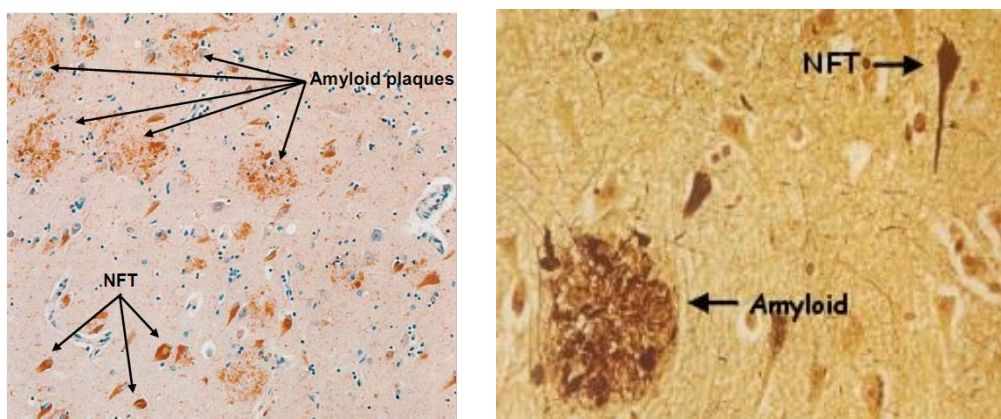
Rivastigmine



Donepezil

แม้ว่ายาในกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ดีในการช่วยฟื้นฟูความจำ ช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลง แต่พบว่าโรคยังคงดำเนินต่อไปไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ที่สำคัญยาดังกล่าวยังมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย หัวใจเต้นช้าลง นอกจากนี้ tacrine ยังมีรายงานความเป็นพิษต่อดับด้วย

นอกเหนือจาก cholinergic hypothesis สมมติฐาน amyloid (amyloid hypothesis) กล่าวว่า การสะสมของ amyloid- β peptide ($A\beta$) เป็นอีกสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดย $A\beta$ เกิดจากกระบวนการย่อย amyloid precursor protein (APP) ที่ผิดปกติ APP จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ β -secretase (β -site APP cleaving enzyme, BACE-1) และเกิดการตัด APP ส่วนที่เหลือด้วย γ -secretase ทำให้เกิด $A\beta$ ที่เป็นพิษ ซึ่งประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 40 ตัว ($A\beta_{1-40}$) และ/หรือ 42 ตัว ($A\beta_{1-42}$) (Hooper, 2005) การรวมตัวกันของ $A\beta$ ดังกล่าวส่งผลให้มี β -amyloid เพิ่มขึ้น และเกิดการก่อตัวจากรูปแบบ monomer ไปเป็น oligomer, protofibrils และสุดท้ายเกิดเป็น amyloid plaques ซึ่งจับตัวกันแน่นอยู่นอกเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus และ neocortex (Ohnishi *et al*, 2004) (รูปที่ 1 และ 2) โดยพบว่าการสะสมของ β -amyloid หรือ amyloid plaques ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาทโดยการปลดปล่อยอนุมูลอิสระ H_2O_2 ออกมา ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ต่อ mitochondria ทำให้กระบวนการควบคุมสมดุลของ Ca^{2+} ภายใน mitochondria กระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ superoxide anion (O_2^-) hydrogen peroxide (H_2O_2) และอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ nitric oxide (NO) และ nitrogen dioxide (NO_2) ซึ่งการสร้างอนุมูลอิสระ NO ออกมามากเกินสมดุล จะทำให้เกิดการปฏิกิริยากับ superoxide anion เกิดเป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) ซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้เร็วกว่า จึงมีความเป็นพิษสูงและมีฤทธิ์ทำลายสารชีวโมเลกุลอื่นได้มากกว่า (รูปที่ 3) จึงมีผลก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาทได้รุนแรงขึ้น นอกจากนี้ mitochondria APP ยังสะสมใน protein import channel ของ mitochondria การเกิดการสะสม $A\beta$ ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่ง cytochrome C oxidase subunit proteins ทำให้เกิดความบกพร่องของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทอีกด้วย

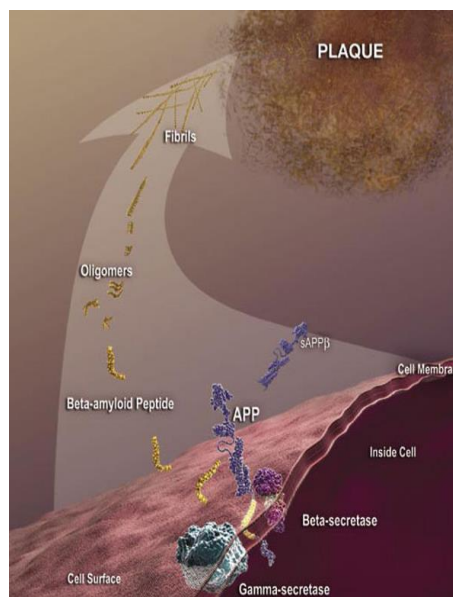


รูปที่ 1 ลักษณะของ amyloid plaques และเซลล์ประสาทที่มี neurofibrillary tangles (NFT)

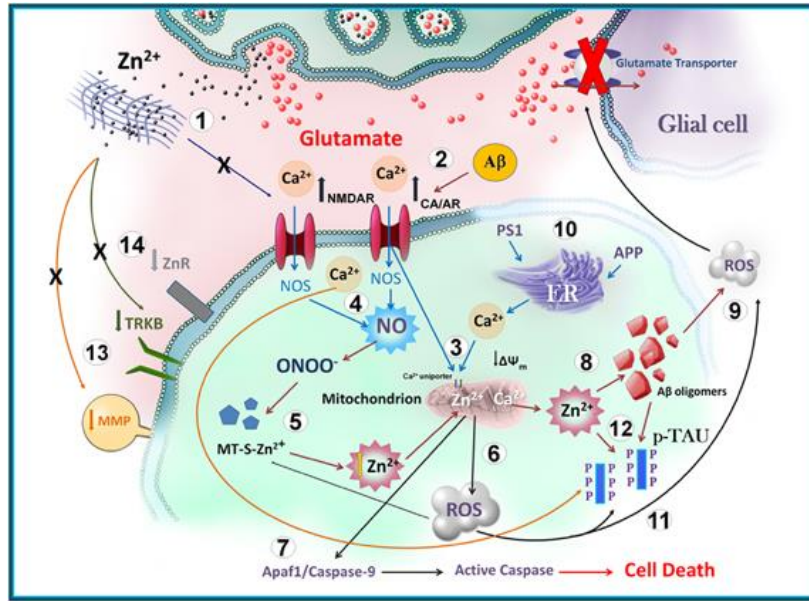
(รูปจาก <https://gbiomed.kuleuven.be>)

ตามสมมติฐานโปรตีนเทา (tau hypothesis) กล่าวว่าโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylated tau) จะจับคู่กับโปรตีนเทาสายอื่นเกิดเป็น neurofibrillary tangles สะสมภายในตัวเซลล์ประสาท (Goedert *et al*, 1991) มีผลทำให้ลดความเสถียรของ microtubule เป็นผลทำให้เกิดการรบกวนการนำส่งกระแสประสาทที่ synapse กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดความผิดปกติในการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด (รูปที่ 1 และ 4)

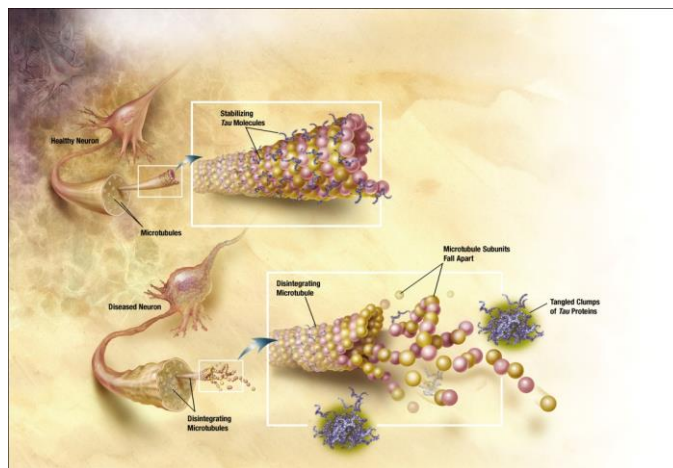
นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ได้แก่ metal ions และอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species, RNS) พบว่า ในผู้สูงอายุระบบการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant defense system) ในร่างกายเสื่อมประสิทธิภาพลง จึงทำให้อนุมูลอิสระสะสมในร่างกายมากขึ้น เป็นผลให้เซลล์ถูกทำลายเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เกิดการทำลายไขมัน โปรตีนและดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ที่ควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารภายในเซลล์ ส่งผลให้เป็นตัวเร่งในการทำลายเซลล์สมองให้ตายเร็วขึ้นและเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคอีกหลายชนิด เช่น โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน โรคเมเร็ง โรคที่เกิดจากการเสื่อมตามอายุ และโดยเฉพาะโรคทางระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อประสาท (เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคฮันติงตัน และโรคพาร์กินสัน)



รูปที่ 2 การเกาะกลุ่มกันของ β -amyloid จนเกิดเป็น amyloid plaques
(รูปจาก www.nia.nih.gov)



รูปที่ 3 กลไกการกระตุ้นการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ β -amyloid
(รูปจาก Cell Death and Disease (2011) 2, e176; doi:10.1038/cddis.2011.57)



รูปที่ 4 กลไกการสะสมของกลุ่มเส้นใยประสาท (neurofibrillary tangle, NFT) อันเนื่องมาจาก
โปรตีน tau ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปทำให้ microtubule ผิดปกติแยกออกจากกัน
(รูปจาก <http://en.wikipedia.org>)

เนื่องจากความซับซ้อนของสาเหตุในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ แนวทางการรักษาอัลไซเมอร์โดยการเพิ่มปริมาณของสารสื่อประสาท ACh ที่ synapse เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการชะลอการดำเนินไปของโรค นักวิจัยจึงได้พยายามคิดค้นหาแนวทางใหม่ในการพัฒนายาเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น การยับยั้งเอนไซม์ β -secretase เพื่อลดการสร้าง β -amyloid และยับยั้งการรวมตัวของ β -amyloid จนเกิดเป็น amyloid plaques นอกเซลล์ประสาท การกำจัดหรือการยับยั้งการสังเคราะห์อนุภาคลิขระ นอกจากนี้การกระตุ้นให้เกิดการงอกและเพิ่มแขนงของเซลล์ประสาท (Neurite outgrowth) เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการ

พัฒนาการปกป้องเซลล์ประสาท (Neuroprotective effect) ทำให้เซลล์ประสาทมีแขนงประสาทเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทสามารถเกิด synapse ได้มากขึ้น การส่งสัญญาณประสาทก็จะเกิดได้ดีขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าว สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงถูกนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ยับยั้งเอนไซม์ β -secretase ลดการสะสมของ β -amyloid ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน และการกระตุ้นให้เกิดการงอกและเพิ่มแขนงของเซลล์ประสาท ซึ่งคาดว่าจะสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนมากจะพบได้ตามธรรมชาติ ได้แก่ พืช ผัก ผลไม้ โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอล วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และวิตามินเอ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนต์ (antioxidant) ที่สำคัญ ซึ่งพืชดังกล่าวนี้ โดยส่วนใหญ่ มักมีสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นสารสำคัญหลักที่ออกฤทธิ์ เช่น flavonoids stilbenoids และ curcuminoids เป็นต้น

พืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้ม (Citrus fruits) หมายถึงพืชในสกุล *Citrus* รวมถึงพืชอื่นๆ ที่ใกล้เคียงในวงศ์ Rutaceae มีถิ่นกำเนิดในเขตติดต่อระหว่างพื้นที่ของประเทศจีนตอนใต้อินเดีย และคาบสมุทรมลายู ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย พืชตระกูลส้มนับว่าเป็นแหล่งที่มีสารประกอบทางชีวภาพที่สำคัญต่อร่างกายที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามิน A, C และ E, แร่ธาตุ, phenolic compounds, coumarins, limonoids, carotenoids และ pectins เป็นต้น ซึ่งหากจะแบ่งตามลักษณะความสำคัญทางพืชสวนแล้ว สามารถแบ่งได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มส้มเกลี้ยง เช่น ส้มเกลี้ยง ส้มเซ้ง กลุ่มส้มเปลือกกล่อน เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน กลุ่มส้มโอ ซึ่งพันธุ์ส้มโอที่นิยมปลูกในไทยได้แก่ ขาวน้ำผึ้ง ขาวแตงกวา ทองดี ขาวหอม ขาวใหญ่ ขาวพวง ขาวแป้น ทำข่อย ทับทิม หอมหาดใหญ่ และกลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด เช่น ส้มมีโอ

1. ชนิดและพันธุ์พืชในตระกูลส้ม

สามารถจัดแบ่งตามลักษณะความสำคัญทางพืชสวนได้เป็น 4 กลุ่ม (กาญจน์ จันทร์ลอย, 2015) ดังนี้

1.1 กลุ่มส้มเกลี้ยง (The Orange) แบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

1.1.1 Sweet orange เป็นกลุ่มที่ปลูกมากที่สุดในโลก เช่น ส้มเกลี้ยง ส้มเซ้ง เป็นต้น

1.1.1.1 ส้มเซ้ง (*Citrus sinensis* Osb.) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ ทรงพุ่มขนาดเล็ก มีดอกสีขาวครีม ผลกลมเว้าบริเวณขั้วเล็กน้อย ก้านผลเป็นวงคล้ายมีตราติด ผิวขรุขระมีต่อมน้ำมันทั่วผล เนื้อในสีเหลือง เปลือกหนาสีเขียวเข้มเมื่ออ่อน พอสุกเป็นสีเขียวอ่อนอมเหลือง (นิดดา หงส์วิวัฒน์, 2550)

1.1.2 Sour or bitter oranges หรือ Seville orange เช่น ส้มซ่า เป็นต้น

1.1.2.1 ส้มซ่า (*Citrus aurantium* var. *aurantium*) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางมีหนามยาวตามลำต้น ใบและก้านใบเป็นใบประกอบแบบลดรูปเหลือใบย่อยใบเดียวใบหนาเป็นมันมีต่อมน้ำมันอยู่ทั่วไปก้านใบมีปีก มีดอกสีขาวกลิ่นหอม ผลกลมขนาดใกล้เคียงกับผลมะนาว เปลือกหนาเปลือกนอกเป็นสีเขียวอมน้ำตาลเปลือกมีผิวเป็นปุ่ม เนื้อในคล้ายส้มโอรสเปรี้ยวอมหวาน

1.2 กลุ่มส้มเปลือกกล่อน (The Mandarins) เป็นกลุ่มที่ปลูกมากที่สุดในทวีปเอเชีย เช่น ส้มเขียวหวาน เป็นต้น

1.2.1 ส้มเขียวหวาน (*Citrus tangerina*, *Citrus reticulata* Blanco.) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ ลำต้นขนาดเล็กถึงปานกลาง มีดอกสีขาวออกดอกมากในเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ ใบจะตั้งขึ้นเป็นใบสีเขียวเข้มเมื่อนำใบมาขยี้แล้วดมจะมีกลิ่นหอม ผลแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแดง เปลือก ร่อนน่าย ชานมีลักษณะนิ่ม ให้น้ำส้มในปริมาณมาก กลิ่นหอมและรสชาติหวานอมเปรี้ยว

1.3 กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต (The Pummelos and Grapefruits) ส้มโอมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูง 5-15 เมตร กิ่งก้านสาขาที่แตกจะห้อยเป็นทรงพุ่ม ดอกเกิดบริเวณซอกใบลักษณะเป็นช่อจัดเป็นชนิดดอกเดี่ยวแต่ละช่อมีดอกจำนวน 10-20 ดอก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-7 ซม. ใบมีรูปร่างเป็นโล่ ปลายสุดของใบเป็นรอยเว้าเล็กน้อย ส่วนของฐานใบมนจัดเป็นใบขนาดใหญ่กว้างประมาณ 2-12 ซม. ยาวประมาณ 5-20 ซม. ผลมีรูปร่างกลมหรือเป็นผลแบบสาหลี่ มีขนาดปานกลางถึงใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-30 ซม. หากแบ่งตามเนื้อสีสามารถแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.3.1 กลุ่มที่มีเนื้อสีขาวหรือไม่มีสี เช่น ขาวแป้น ขาวน้ำผึ้ง ขาวพวง ขาวแตงกวา ขาวใหญ่ (*Citrus maxima* Merr.) เป็นต้น

1.3.2 กลุ่มที่มีเนื้อสีแดงหรือเนื้อสีชมพู เช่น ทองดี ท่าข่อย ทับทิมสยาม *Citrus maxima* (Burm.) Merr.) เป็นต้น

1.4 กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด (The Common Acid Members) พบว่ามีรสเปรี้ยวแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

1.4.1 The Citrons ลักษณะที่สำคัญ คือ อดอกมีสีม่วงดำมอยู่ เช่น ส้มมือ ส้มมะละกอ เป็นต้น

1.4.2 The Lemons เช่น มะนาวฝรั่ง เป็นต้น

1.4.3 The Limes เช่น มะนาว เป็นต้น

มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle., *Citrus aurantifolia*) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ ลำต้นเป็นไม้พุ่มเตี้ยสูงเต็มที่ 5 เมตร ดอกสีขาวอมเหลืองมีดอกผลตลอดทั้งปี ใบยาวเรียวเล็กน้อยคล้ายใบส้ม มักมีใบดก ผลโดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 -4.5 ซม. ในช่วงหน้าแล้งจะออกผลน้อย และมีน้ำน้อย ก้านมีหนามเล็กน้อย



ส้มเขียว



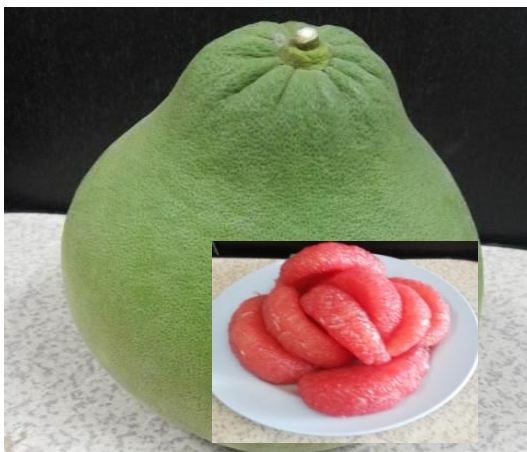
ส้มซ่า



ส้มเขียวหวาน



ส้มโอขาวใหญ่



ส้มโอทับทิมสยาม



มะนาว

สำหรับพืชตระกูลส้มจัดเป็นกลุ่มพืชที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยปกป้องเซลล์ประสาท ซึ่งอาจจะช่วยชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ สารสำคัญที่มีในพืชตระกูลนี้ เช่น วิตามินซี เบต้าแคโรทีน สารกลุ่ม flavonoids, coumarins และ polyphenols เป็นต้น สารกลุ่ม flavonoids เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลักเป็น phenylbenzo- γ -pyrones และมีสูตรโมเลกุลคือ C_{15} (C_6 - C_3 - C_6) ซึ่งประกอบไปด้วย phenyl ring A และ B จับกับ pyrone ring C flavonoids ที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่เป็นชนิด flavanone, flavone และ flavonol โดยกลุ่ม flavanone เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด ตัวอย่างเช่น hesperidin เป็นสารกลุ่ม flavanone ที่พบมากในเปลือกพืชตระกูลส้ม เช่น *Citrus aurantium* (bitter orange), *Citrus sinensis* (sweet orange) และ *Citrus unshiu* (Satsuma mandarin) เป็นต้น (Crozier *et al*, 2009) โดยมีการรายงานการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ, ช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress และลดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง neuroblastoma SH-SY5Y จากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วย rotenone ได้ดี (Tamilselvam *et al*, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Hwang และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการลดการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12 จากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วย H_2O_2 ในสารกลุ่ม citrus flavanones ได้แก่ hesperidin, hesperetin และ neohesperidin ซึ่งเป็นกลุ่มสารหลักที่พบมากในพืชตระกูลส้ม, ส้มจีน, มะนาว และส้มโอ พบว่าสามารถลด activities ของเอนไซม์ glutathione peroxidase และ glutathione reductase ได้ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่มีผลทำให้เกิดอัตราการตายของเซลล์ประสาท และยังช่วยในการลดความเสียหายของ DNA ที่เกิดจากการเกิดออกซิเดชันอีกด้วย

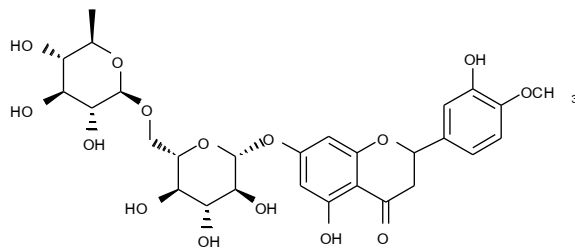
Naringenin เป็นสารกลุ่ม flavanones ที่พบมากใน *Citrus junos* และเป็น aglycone ของ naringin มีรายงานวิจัยว่ามีฤทธิ์ลดการเกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12 จากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วย β -amyloid และสามารถเพิ่มความจำของหนูทดลองที่อยู่ในภาวะสูญเสียความจำได้ (amnesia) (Heo *et al*, 2004a) นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดการลดลงของปริมาณสารสื่อประสาท acetylcholine (ACh) ส่งผลให้ลดความเสี่ยงของการเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้ (Heo *et al*, 2004b)

Nobiletin เป็นสารกลุ่ม flavones ที่พบมากในเปลือกพืชตระกูลส้ม มีรายงานการวิจัยว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของเซลล์ประสาทโดยการลดการเกิด nitric oxide (NO) จาก microglial cells และยับยั้ง proinflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor และ interleukin- 1β เป็นต้น (Cui *et al*, 2010) นอกจากนี้ Nobiletin ยังสามารถช่วยในการเพิ่มการงอกของเซลล์ประสาท โดยการเป็น signaling molecule ในการเพิ่ม phosphorylation ของ cAMP-response element-binding protein (CREB) ในสมองส่วน hippocampus ส่งผลให้นำไปสู่การเพิ่มความจำได้ (Nagase *et al*, 2007 และ Nakajima *et al*, 2007) และยังสามารถลดการเกิดการเกาะกลุ่มของ β -amyloid ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองได้อีกด้วย (Onozuka *et al*, 2008)

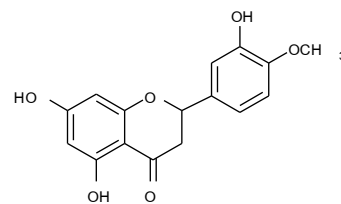
จากการศึกษาวิจัยของ Nakajima และคณะ (2013) พบว่า Nobiletin ในปริมาณ 10 mg/kg ช่วยลดการเกิด oxidative stress และลดการเกิด tau phosphorylation ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลอง

senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การเพิ่มการเรียนรู้และความจำในโรคอัลไซเมอร์ต่อไปได้

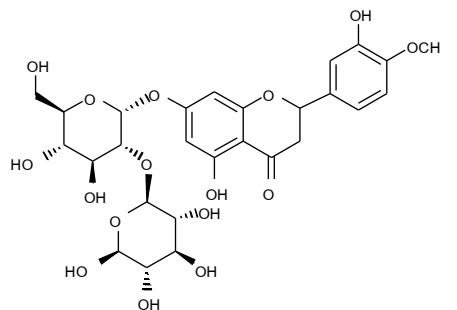
Coumarins เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่พบในพืชตระกูลส้ม โดยมีโครงสร้างหลักคือ benzo- α -pyrone หรือ α -chromone ซึ่งมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ประสาทและปกป้องเซลล์ประสาท เช่น auraptene เป็นสารกลุ่ม citrus coumarin สามารถช่วยลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองที่อยู่ในภาวะสมองขาดเลือดได้ (transient global ischemia mouse) (Okuyama *et al*, 2013) และจากรายงานการวิจัยของ Epifano และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของ prenyloxycoumarins จากผักที่รับประทานได้ พบว่า 7-isopentenylxycoumarin และ auraptene ในช่วงความเข้มข้น 1-10 μ M มีฤทธิ์ช่วยลดความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยง mixed neurons/astrocytes cortical cells จากการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วย N-Methyl-D-aspartate (NMDA)



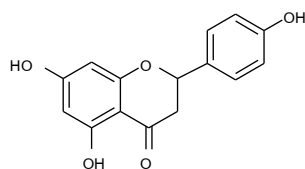
Hesperidin



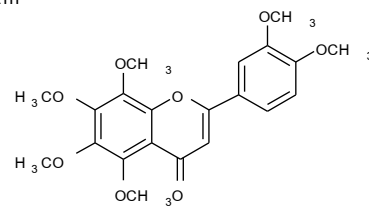
Hesperitin



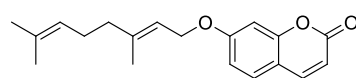
Neohesperitin



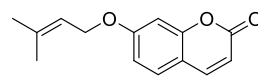
Naringenin



Naringenin



Auraptene



7-Isopentenylxycoumarin

การศึกษาเพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำส้มโอขาว ส้มเซ้ง และส้มเขียวหวาน พบว่าส้มเซ้งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน และส้มโอขาว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 23.07 ± 1.01 , 21.20 ± 1.56 และ 16.08 ± 0.65 mg/100 ml extract ตามลำดับ โดยใช้ m-cresol เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน (Kumar *et al*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำส้มโอขาวและน้ำส้มโอแดง พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำส้มโอขาวสูงกว่าน้ำส้มโอแดง คือ 909.52 ± 8.25 และ 769.05 ± 10.91 mg GAE/L ตามลำดับ และพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (โดยวิธี DPPH) น้ำส้มโอแดงสูงกว่าน้ำส้มโอขาว มีค่าเท่ากับ $11,380.78 \pm 43.12$ และ $11,058.39 \pm 27.37$ mmol trolox equivalent/L extract ตามลำดับ โดยไม่ระบุความเข้มข้นที่ศึกษา และมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสของน้ำส้มโอขาวและน้ำส้มโอแดง พบว่าทั้งน้ำส้มโอขาวและน้ำส้มโอแดงมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส มีค่า % inhibition อยู่ระหว่าง 75.71 - 79.74% ตามลำดับ โดยไม่ระบุความเข้มข้นที่ศึกษา โดยใช้ eserine เป็นสารมาตรฐานมีค่า % inhibition ที่ไม่ระบุความเข้มข้นเช่นกันเท่ากับ 86.89% (Abirami *et al*, 2014) การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (โดยวิธี DPPH) ของน้ำส้มเซ้งและน้ำมะนาว พบว่า มีค่า % inhibition ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เท่ากับ $84.81 \pm 1.99\%$ และ $80.05 \pm 1.90\%$ ตามลำดับ โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานมีค่า % inhibition ที่ความเข้มข้นเดียวกันเท่ากับ $96.36 \pm 1.78\%$ (Rauf *et al*, 2014) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (โดยวิธี DPPH) ของน้ำมะนาวที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 µg/ml มีค่า % inhibition เท่ากับ $2.85 \pm 0.20\%$ และ $6.25 \pm 0.06\%$ ในขณะที่น้ำส้มเขียวหวานมีค่า % inhibition เท่ากับ $17.80 \pm 0.60\%$ และ $26.45 \pm 0.15\%$ ตามลำดับ (Oikeh *et al*, 2016) การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ในน้ำส้มเซ้งและน้ำมะนาวพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.30 ± 0.13 และ 12.47 ± 0.45 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มเซ้งและน้ำมะนาวคือ 12.41 ± 0.07 และ 9.01 ± 0.09 mg GAE/g extract ตามลำดับ (Guimarães *et al*, 2010)

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน IC_{50} (โดยวิธี DPPH) ในกากส้มพบว่ากากส้มเขียวหวานมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด รองลงมาคือ ส้มเซ้ง มะนาว และส้มซ่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.2, 2.8, 3.8, 3.9 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ส้มเซ้งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดรองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มซ่า มีค่า 232.5, 197.4, 144.9, 122.0 mg GAE/g extract (Ghasemi *et al*, 2009)

จากข้อมูลดังกล่าวเห็นได้ว่าพืชตระกูลส้มมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพในการปกป้องระบบประสาท ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง จะเป็นข้อมูลทางวิชาการที่จะช่วยส่งเสริมการบริโภคผลไม้ตระกูลส้มภายในประเทศ เป็นการเพิ่มมูลค่าเพื่อการส่งออกและยังเป็นการพัฒนาเศรษฐกิจอีกด้วย

บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือและเครื่องแก้ว

- 1.1 Round bottom flask
- 1.2 Glass condenser
- 1.3 Magnetic bar and stirrer
- 1.4 Support stand with flask clamp
- 1.5 TLC silica gel 60 F254 Merck, German
- 1.6 TLC developing chambers, Camac
- 1.7 Glass chromatography column
- 1.8 Rotary evaporator, BÜCHI
- 1.9 UV-2600 UV-Vis spectrophotometer, Bara Scientific
- 1.10 Nicolet 6700 FT-IR, Thermo Scientific
- 1.11 96-well plate, nunc
- 1.12 Ultrasonic bath, Branson
- 1.13 Infinite M200 Microplate reader, Tecan
- 1.14 Freeze dryer, FreeZone, LABCONCO
- 1.15 Hot air Oven, Venticell
- 1.16 Linomat 5, Camag
- 1.17 pH Meter (Model RL 150)

2. พืชตัวอย่างและสารเคมี

- 2.1 พืชตระกูลส้ม 6 ชนิด (ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มเซ้ง และส้มซ่า)
- 2.2 Gallic acid, Merck, Germany
- 2.3 Folin-Ciocalteu reagent, Merck KGaA (Germany)
- 2.4 Methanol (lab grade)
- 2.5 Methanol (analytical reagent), Fisher Scientific
- 2.6 Methanol, Honeywell, USA
- 2.7 Ethanol (analytical reagent), Lab Scan
- 2.8 Sodium carbonate จาก UNILAB (Abbott Road, Seven Hills, Australia)
- 2.9 Trolox, Sigma

- 2.10 Ascorbic acid (VitaminC) BioXtra, $\geq 99\%$, crystalline, Sigma (ST. Louis, Missouri, USA)
- 2.11 N,N-dimethylformamide (DMF) (analytical grade), Carlo erba
- 2.12 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), Sigma
- 2.13 Acetylcholinesterase type VI-s, 425.94 units/mg solid, 687 U/mg protein, Sigma
- 2.14 Acetylthiocholine iodide (ATCI), Sigma
- 2.15 5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Sigma
- 2.16 Acetic acid, glacial 100%, E Merck
- 2.17 Sulfuric acid 96.2%, J.T. Baker
- 2.18 Silica gel G₆₀ 0.063 mm-0.2 mm for column, E Merck
- 2.19 Silica gel G₆₀ 0.040 mm-0.063 mm for column, E Merck
- 2.20 TLC aluminium sheets 20×20 cm. silica gel 60 F₂₅₄, E Merck
- 2.21 Sodium hydroxide, CARLO ERBA reagents
- 2.22 Sulfuric acid (H₂SO₄), 98% analytical grade, Merck
- 2.23 Acetone (analytical reagent) Fisher Scientific
- 2.24 Dimethyl sulfoxide-*d*₆, Merck, Germany
- 2.25 Tris-Hydrochloride molecular (biological grade) Promega, USA
- 2.26 Alpha minimal essential medium (α -MEM)
- 2.27 Newborn calf serum (NCS) , Gibco, USA
- 2.28 Fetal bovine serum (FBS) , Gibco, USA
- 2.29 Dimethylsulfoxide (DMSO), Sigma, USA

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสั้มและสั้มโอสำหรับการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างผลไม้ตระกูลสั้ม โดยจะคัดเลือกตัวแทนผลไม้ตระกูลสั้มกลุ่มย่อยต่างๆ ได้แก่ กลุ่มสั้มเกลี้ยง (คัดเลือกตัวแทนจากกลุ่มย่อย กลุ่มละ 1 ชนิด ได้แก่ กลุ่มสั้มที่มีรสหวาน เช่น สั้มเซ้ง และ กลุ่มสั้มที่มีรสเปรี้ยว เช่น สั้มซ่า) กลุ่มสั้มเปลือกอ่อน (เช่น สั้มเขียวหวาน) กลุ่มสั้มโอ (คัดเลือกตัวแทน 2 กลุ่ม ได้แก่ สั้มโอที่ไม่มีสี และสั้มโอที่มีสีแดง) และกลุ่มสั้มที่มีรสเปรี้ยวจัด (เช่น มะนาว) ทำการปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักเนื้อ จากนั้นนำไปคั้นน้ำและทำให้แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้เป็นผงแห้ง และเตรียมสารสกัดส่วนเมทานอลโดยหมักเนื้อผลด้วยเมทานอล แล้วนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง ภายใต้การควบคุมความดัน เช่น Rotary evaporator ได้เป็นสารสกัดส่วนเมทานอล นำผงแห้งและสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหา %yield และนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี folin-ciocalteu มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 10% Folin Cicocateu's phenol reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1 M sodium carbonate 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันใน 96 well plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm คำนวณหาปริมาณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid content)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้วิธี colorimetric มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

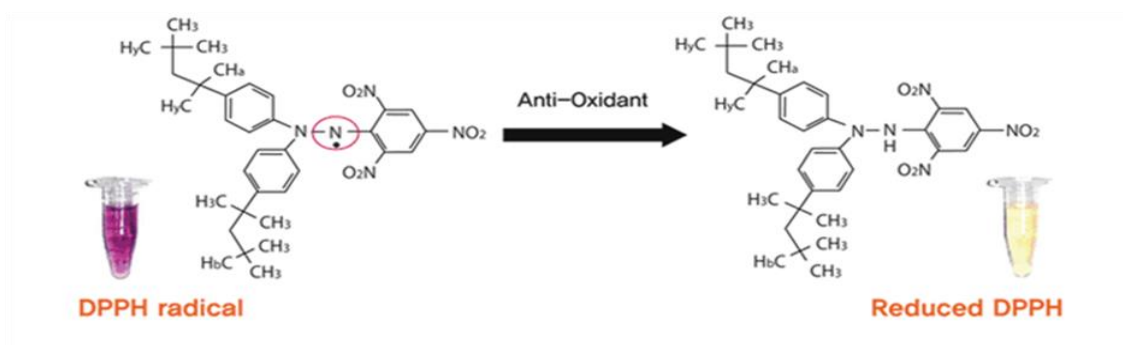
ทำการละลายตัวอย่างด้วยน้ำหรือเมทานอลในสัดส่วนที่เหมาะสม ส่วนสารละลายมาตรฐาน catechin เตรียมที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 100 ppm ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร NaNO_2 เข้มข้น 5% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้แล้วเติมสารละลาย AlCl_3 เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้แล้วเติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 4% 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ catechin โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำการทดสอบสารสกัดผลไม้ตระกูลส้ม โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ให้ผลบวกในแต่ละการทดลอง

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH scavenging activity

DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) อนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ เป็นอนุมูลไฮโดรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ซึ่งการวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำได้โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) โดยวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป สารละลายของ $\text{DPPH}^\bullet$ มีสีม่วงเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH และอนุมูลอิสระ

4.1.1 วิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมสารละลาย DPPH ใน methanol (methanolic DPPH radical) ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml และเตรียมสารตัวอย่างโดยละลายใน methanol

4.1.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยที่แต่ละความเข้มข้นมี 3 well แต่ละ well ประกอบด้วยสารตามตารางที่ 1 โดยปริมาตรสุดท้ายของทุก well เป็น 200 μ l (แต่ละความเข้มข้นทำ triplicate) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหา % inhibition และค่า IC_{50}

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในวิธี DPPH

Parameters	ส่วนประกอบในแต่ละ well
A (Test sample)	- สารตัวอย่างใน methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 100 μ l - Methanolic DPPH radical 100 μ l
B (Blank of sample)	- สารตัวอย่างใน methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 100 μ l - Methanol 100 μ l
C (Control)	- Methanolic DPPH radical 100 μ l - Methanol 100 μ l

4.1.3 การหาค่า % inhibition

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง ด้วยสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{C - (A - B)}{C} \right] \times 100$$

4.1.4 การหาค่า IC_{50}

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, และ 12.5 μ g/ml คำนวณหาค่า percent inhibition ที่แต่ละความเข้มข้น และหาค่า IC_{50} โดยการวาดกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง กับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิม แล้วนำข้อมูลที่ได้อ่านค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยแสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid ($A\beta$)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid ($A\beta$) ใช้วิธี thioflavin T (ThT) fluorescence ซึ่งเป็นวิธีการประเมินการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ oligomers ในเบื้องต้น โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของการเรืองแสง fluorescence ของ ThT ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น fluorophore ที่มีโครงสร้างหลักเป็นวง benzothiazole ใน

สภาพปกติ ThT จะไม่มีการเรืองแสงเมื่ออยู่ในรูปอิสระ แต่เมื่อโมเลกุลของ ThT เข้าไปจับบริเวณ binding sites ของ A β fibrils จะเกิด hyperchromic shift ของ ThT จาก excitation ที่ λ 385 นาโนเมตร และ emission ที่ λ 445 นาโนเมตร ไปที่ excitation เท่ากับ λ 440 นาโนเมตร และ emission เท่ากับ λ 482 นาโนเมตร และมีการเรืองแสง fluorescence ของ ThT ในที่สุด

4.2.1 วิธีการเตรียม stock solution

Sample stock solution: เตรียมสารละลายของ sample ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1000 μ M

Standard solution for positive control: เตรียมสารละลาย curcumin ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1000 μ M

ThT stock solution: เตรียม ThT ใน Tris buffer ให้ได้ความเข้มข้น 5 μ M (เตรียมแล้วใช้ทันที)

A β_{1-40} stock solution: เตรียม A β_{1-40} ในสารละลาย 10 mM NaOH ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mg/mL และเจือจางต่อด้วย Tris buffer ให้ได้ความเข้มข้น 25 μ M

4.2.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์

1. ปิเปต stock solution ของสารแต่ละตัวเติมลงใน 96-well plate ดังนี้

samples: sample stock solution 1 μ L + A β_{1-40} stock solution 9 μ L

solvent blank: DMSO 1 μ L + Tris buffer 9 μ L

control: DMSO 1 μ L + A β_{1-40} stock solution 9 μ M

2. incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เติม ThT stock solution 200 μ L

4. วัดการเรืองแสงโดยกระตุ้นและวัดการปลดปล่อยคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 446 และ 500 nm ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ของสารแต่ละตัวจะทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดย curcumin เป็น positive control เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวอย่าง หาค่าเฉลี่ย intensity ของตัวอย่าง นำไปคำนวณ % inhibition ของสารแต่ละตัว ดังสมการ

$$\% \text{Inhibition} = \frac{100 - (I_{\text{sample}} - I_{\text{blank}})}{I_{\text{control}} - I_{\text{blank}}} \times 100$$

I_{sample} คือ ค่าเฉลี่ย fluorescence Intensity ของ samples

I_{blank} คือ ค่าเฉลี่ย fluorescence Intensity ของ solvent blank

I_{control} คือ ค่าเฉลี่ย fluorescence Intensity ของ control

4.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ β -secretase

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ β -secretase ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี fluorescence resonance energy transfer (FRET) ซึ่งเมื่อกระตุ้นสายโปรตีนอะไมลอยด์ที่เอนไซม์ β -secretase ตัดด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 380 นาโนเมตร และวัดค่าการปลดปล่อยคลื่นแสงที่ 510 นาโนเมตร โดยใช้ BACE1 substrate inhibitor IV เป็น positive control

4.3.1 วิธีการเตรียมสารละลาย

Sample working solution : เตรียมสารละลายตัวอย่างในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 5000 μ M และเจือจางต่อด้วย 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) ให้ได้ความเข้มข้น 50 μ M

β -secretase enzyme working solution: เตรียมสารละลาย β -secretase enzyme ใน 50 mM Tris buffer (pH 7.5) และ 10% glycerol ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 unit/ μ L และเจือจางต่อด้วย 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 unit/ μ L

Standard solution for positive control: เตรียมสารละลาย β -secretase substrate IV inhibitor ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1250 μ M และเจือจางต่อด้วย 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) ให้ได้ความเข้มข้น 25 μ M

β -secretase substrate IV working solution: เตรียม β -secretase substrate IV ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 1250 μ M และเจือจางด้วย 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) ให้ได้ความเข้มข้น 125 μ M

4.3.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β -secretase

1. ไปเปิด working solution ของสารแต่ละตัวเติมลงใน 96-well black plate ซึ่งปริมาณสารที่ต้องไปเปิดลงใน 96-well black plate เพื่อทำการทดสอบดังตารางที่ 2
2. Incubate ในที่มีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดการเรืองแสงโดยกระตุ้นและวัดการปลดปล่อยคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 380 และ 510 นาโนเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ปริมาณสารที่ต้องไปเปิดลงใน 96-well black plate เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์

ปริมาณสาร (μ L)	Test compound	Positive control	Negative control	Substrate control	Control blank	Test compound blank
Sodium acetate buffer	30	30	30	80	80	80
Sample	20	-	-	-	-	20
BACE1 substrate IV inhibitor	-	20	-	-	-	-
Solvent (DMSO) ใน Sodium	-	-	20	-	20	-

acetate buffer						
BACE1 substrate IV	20	20	20	20	-	-
BACE enzyme	30	30	30	-	-	-

การทดสอบฤทธิ์ของสารแต่ละตัวจะทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดย BACE1 substrate IV inhibitor เป็น positive control เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวอย่างจะนำไปคำนวณ % inhibition ของสารแต่ละตัว ดังสมการ

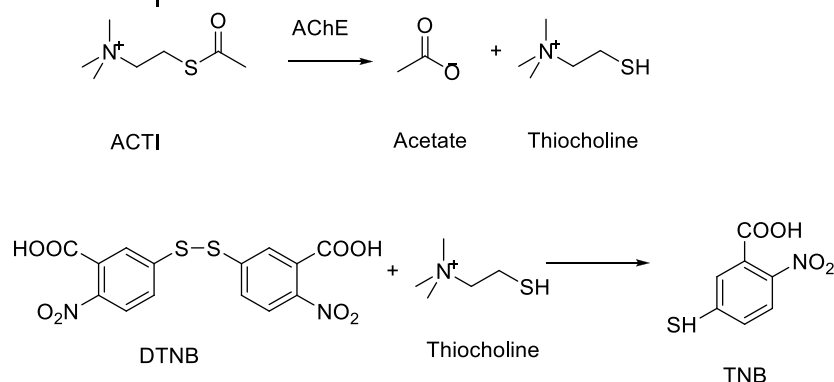
$$\% \text{Inhibition} = \frac{\text{RFUcontrol} - \text{RFUcompound}}{\text{RFUcontrol}} \times 100$$

RFU control คือ ค่า fluorescence intensity ของ negative control หักลบ blank

RFU compound คือ ค่า fluorescence intensity ของ sample หักลบ blank

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ใช้วิธี Ellman's method ในการทดสอบโดยวัด 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ที่เกิดจากปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจะทำการย่อยสาร acetylthiocholine iodide (ACTI) ได้เป็น acetate และ thiocholine ซึ่ง thiocholine ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับสารกอสส์ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) ได้เป็น 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งมีสีเหลือง

4.4.1 วิธีเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

- เตรียมสารสกัด โดยละลายใน 10% methanol ใน Buffer I ให้ได้ความเข้มข้น 5000 ug/ml
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 (Buffer I) ซึ่งปรับ pH โดย 1 M sodium hydroxide solution
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 ที่มี 0.1% Bovine serum albumin (BSA) (Buffer II)
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 ที่มี 0.1 M NaCl และ 0.02 M MgCl₂·2H₂O (Buffer III)
- เตรียม 10% methanol ใน Buffer I
- เตรียม ATCI ความเข้มข้น 15 mmol/L โดยละลายในน้ำกลั่น (deionized water)

- เตรียม DTNB ความเข้มข้น 3 mmol/L โดยละลายใน Buffer III
- เตรียมเอนไซม์ acetylcholinesterase ความเข้มข้น 0.22 units/ml ใน Buffer II (โดยเตรียมจาก stock solution 100 units/ml ใน Buffer I)

4.4.2 การหาค่า % inhibition

ในการทดสอบแต่ละครั้ง ประกอบด้วย 4 well (A, B, C และ D) ซึ่งแต่ละ well ประกอบด้วยสารต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยปริมาตรสุดท้ายของทุก well เป็น 250 μ l และทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ triplicate

- เติมน้ำลงใน 96-well plate ตามตารางที่ 1 โดยเติม ATCI, DTNB, Buffer II และ test sample จากนั้น incubate 5 นาทีที่ 25° C แล้ววัด absorbance ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
- เติมเอนไซม์ acetylcholinesterase จากนั้น incubate 20 นาทีที่ 25° C แล้ววัด absorbance อีกครั้ง
- บันทึกผลค่า absorbance เพื่อนำมาใช้คำนวณ
- วิเคราะห์และแปลผลข้อมูล โดยการคำนวณหา percent inhibition ด้วยสมการดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \right] \times 100$$

4.4.3 การหาค่า IC₅₀

นำสารสกัดที่มีค่า % inhibition มากกว่า 50 มาทำการทดสอบหาค่า IC₅₀ โดย

- เตรียมสารสกัด โดยละลายใน 10% methanol ใน Buffer ปรับให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ตามความเหมาะสม
- เตรียม galanthamine hydrobromide ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 (Buffer I) ซึ่งปรับ pH โดย 1 M sodium hydroxide solution
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 ที่มี 0.1% Bovine serum albumin (BSA) (Buffer II)
- เตรียม 50 mM Tris-HCl pH8 ที่มี 0.1 M NaCl และ 0.02 M MgCl₂·2H₂O (Buffer III)
- เตรียม 10% methanol ใน Buffer I
- เตรียม ATCI ความเข้มข้น 15 mmol/L โดยละลายในน้ำกลั่น (deionized water)
- เตรียม DTNB ความเข้มข้น 3 mmol/L โดยละลายใน Buffer III
- เตรียม acetylcholinesterase ความเข้มข้น 0.22 units/ml ใน Buffer II (โดยเตรียมจาก stock solution 100 units/ml ใน Buffer I)
- หาค่า % inhibition ของสารสกัดที่เข้มข้นต่างๆ จากนั้นทำการหาค่า IC₅₀ โดยการวาดกราฟระหว่าง percent inhibition กับความเข้มข้นของ test sample แล้วนำข้อมูลที่ได้ออกมาหาค่าเฉลี่ย

(mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยแสดงข้อมูลในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของแต่ละ well ในการทดลอง microplate assay

A (Control)	B (Blank)	C (Test of sample)	D (Blank of sample)
15 mM ATCI (ในน้ำกลั่น) จำนวน 25 μ l			
3 mM DTNB (ใน Buffer III) จำนวน 125 μ l			
Buffer II จำนวน 50 μ l			
Methanol จำนวน 25 μ l (10% Methanol ใน Buffer I)	Methanol จำนวน 50 μ l (10% Methanol ใน Buffer I)	-	Methanol จำนวน 25 μ l (10% Methanol ใน Buffer I)
-	-	Test sample จำนวน 25 μ l	Test sample จำนวน 25 μ l
Acetylcholinesterase จำนวน 25 μ l (0.22 U/ml)	-	Acetylcholinesterase จำนวน 25 μ l (0.22 U/ml)	-

เมื่อ A คือ Control (reagent + methanol + enzyme), B คือ Blank (reagent + methanol),
C คือ Test of sample (reagent + extract + enzyme), D คือ Blank of sample (reagent)

4.5 การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นของแขนงประสาท

งานวิจัยนี้จะนำเอาเซลล์ประสาทฟิสิบ์มาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยตัวอย่างทั้งหมดเตรียมโดยละลายสารสกัดส้มใน 100% DMSO ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL จากนั้นจึงทำการเตรียมตัวอย่างอีก 2 ความเข้มข้น คือ 200 μ g/mL และ 0.02 μ g/mL (20 ng/mL) โดยขั้นตอนนี้จะควบคุมให้มี DMSO เป็นตัวทำละลายอยู่ 10% ในน้ำปราศจากเชื้อ 2472189440

การเพาะเลี้ยงเซลล์ฟิสิบ์ (MacPherson *et al*, 1995)

- เซลล์ฟิสิบ์จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ sterile pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่มีฟิสิบ์เซลล์เจริญอยู่ออกจาก T-75 flask
2. เติม sterile Phosphate Buffer Saline solution (PBS) 2 mL เพื่อล้างเซลล์แล้วดูดทิ้ง
3. เติม 0.25%w/v trypsin ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีแล้วดูดทิ้งเพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว

4. เติม P19GM [α -minimal essential medium (α -MEM) + 7.5% Newborn calf serum (NBCS) + 2.5% Fetal bovine serum (FBS)] 2 mL จากนั้นใช้ปิเปตทำการปิเปตขึ้น -ลงสลับกัน (titrate) ประมาณ 50-60 ครั้งให้เซลล์กระจายตัว
5. นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemacytometer นับเฉพาะส่วนที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue คำนวณอัตราเซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มต้นให้มีความหนาแน่น 1×10^5 cell/mL ดูดเซลล์เก่าออกให้เหลือเซลล์เท่ากับปริมาณที่คำนวณได้ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ P19GM เข้าไปจนครบ 10 mL
6. นำไปเข้าตูบ่มเพาะที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 , ความชื้น 10% ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

การเหนี่ยวนำให้เซลล์ฟิสิบเก่าเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทฟิสิบเก่า (MacPherson *et al*, 1995, Parnas *et al*, 1995)

1. ใช้ sterile pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่มีฟิสิบเก่าเซลล์เจริญอยู่ออกจาก T-75 flask
2. เติม sterile PBS 2 mL เพื่อล้างเซลล์แล้วดูดทิ้ง
3. เติม 0.25% w/v trypsin ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วดูดทิ้งเพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว
4. เติม P19IM (α -MEM + 5% FBS) 2 mL แล้ว titrate ประมาณ 50 ครั้งให้เซลล์กระจายตัว
5. ใช้ sterile pipette ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงใน petridish แล้วเติม P19IM จนครบ 10 mL
6. เติม all *trans*-retinoic acid (RA) ลงไปใน petridish ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $0.5 \mu\text{M}$ จากนั้นจึงแกว่ง petridish ให้ RA กระจายจนทั่ว
7. นำไปเข้าตูบ่มเพาะที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 , ความชื้น 10% เป็นเวลา 5 วันเซลล์จะเกิดการรวมกลุ่มเป็น embryoid bodies (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน)
8. ใช้ sterile pipette ดูดเอา embryoid bodies ออกมาใส่ใน sterile centrifuge tube ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีให้ตกตะกอน จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือปริมาตร 2 mL แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1500 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที
9. เมื่อครบเวลา 5 นาที ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมดแล้วเติม α -MEM 2 mL นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1500 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เพื่อล้าง RA ให้หมด
10. นำ α -MEM ออก แล้วเติม P19SM (α -MEM + 10% FBS) 2 mL, titrate 50 ครั้ง
11. นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemacytometer นับเฉพาะส่วนที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue

12. ทำการ seed cell ลงใน Poly-L-Lysine pre-coated 96-well plate* ให้มีเซลล์เริ่มต้น 7×10^4 cell/mL ปริมาตรที่ใช้ในการ seed 150 μ L/well (กรณีที่ใช้ 6-well plate ปริมาตรในการ seed จะเป็น 2 mL/well)
หมายเหตุ: *เคลือบผิว plate ด้วย Poly-L-Lysine (MW > 300,000) ก่อนที่จะทำการ seed cell เพื่อให้เซลล์ประสาทยึดเกาะกับผิวของ plate ได้ดี โดยเติม Poly-L-Lysine ความเข้มข้น 50 μ g/mL ที่ละลายใน sterile PBS โดยใช้ปริมาตร 50 μ L/well สำหรับการ seed ลง 96-well plate และ 500 μ L/well กรณีที่ใช้ 6-well plate นำไปแช่ตู้เย็นที่ -20°C ใไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูดสารละลาย Poly-L-Lysine ออก ผึ่งให้แห้งใน BSC II ให้รังสี UV ออบฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที
13. นำไปเข้าตูบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าฟิลิปเก่าเซลล์เริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทจะสังเกตเห็นว่าเริ่มมีแขนงประสาทยื่นออกมา
14. ดูด P19SM ออกจาก plate จนหมด แล้วเติม P19SM + 10 μ M Ara-C ลงไป จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลาประมาณ 8 วันจะได้เซลล์ประสาทที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

การทดสอบอัตราการรอดชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Tadtong *et al*, 2013)

1. เตรียมสารละลายของสารสกัดส้ม ที่จะนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ความเข้มข้น คือ 200 μ g/mL และ 0.02 μ g/mL ตามวิธีที่กล่าวไว้ในวิธีการเตรียมตัวอย่างส้มที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อเป็น stock solution
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับทดสอบ (test sample) โดยการเจือจางจาก stock solution ในแต่ละความเข้มข้น ใน P19SM + 10 μ M Ara-C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5%v/v สารทดสอบจะมีความเข้มข้นลดลงจาก stock solution 20 เท่า คือ 10 μ g/mL และ 0.001 μ g/mL (1 ng/mL) ตามลำดับ
3. เตรียมสารละลายของตัวทำละลาย (DMSO) ใน P19SM + Ara-C ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.5%v/v เพื่อใช้เป็น solvent control
4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก 96-well plate แต่ละหลุมให้หมด
5. เติมสารทดสอบลงไปหลุมละ 150 μ L แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เมื่อครบเวลานำ plate ออกจากตูบ่มควบคุมอุณหภูมิ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก plate แต่ละหลุมให้หมด
7. เติมสารละลาย XTT ที่เตรียมขึ้นโดยเจือจาง XTT dye ใน α -MEM ร้อน (60°C) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และเติม phenazine methosulfate (PMS) ให้มีความเข้มข้น

สุดท้ายเป็น 25 μ M ลงไปในหลุม หลุมละ 50 μ L และเติมสารละลาย XTT ลงไปในหลุมที่ไม่ได้ทำการ seed P19 neuron ไว้ เพื่อใช้เป็น blank

8. นำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO₂ และความชื้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
9. เมื่อครบเวลานำมาเติม PBS ลงไปหลุมละ 100 μ L (ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 150 μ L ซึ่งประกอบด้วย XTT solution ใน PBS)
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm
11. นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง มาหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกับ control คือหลุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ จากสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

กำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของ control คิดเป็น 100% โดยให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท เมื่อทดสอบกับตัวทำละลายในความเข้มข้นที่ใช้เตรียมสารทดสอบ จะต้องแสดงอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบเกินกว่า $\pm 5\%$ จึงจะยอมรับว่าตัวทำละลายไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

12. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์
13. ทำการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทด้วยวิธี serum deprivation (Tadtong *et al*, 2013, Iacovitti *et al*, 1997)

1. เตรียมสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดซึ่งทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% (มากกว่ากลุ่มควบคุม) โดยการเจือจางด้วย 10%v/v DMSO เพื่อใช้เป็น stock solution สารสกัดชนิดใดที่ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% จะไม่นำมาทดสอบต่อ และทำการทดสอบสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 1 nM ร่วมด้วย เนื่องจาก Tangsaengvit, *et al*. ได้รายงานไว้ในปีค.ศ. 2013 ว่า quercetin ความเข้มข้น 1 nM สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่จำลองขึ้นด้วยวิธี serum deprivation ได้ (Tangsaengvit *et al*, 2013) จึงใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น 1 nM เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ในการทดลอง
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับทดสอบ (test sample) โดยการเจือจางจาก stock solution ใน α -MEM + Ara-C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5%v/v สารทดสอบจะมีความเข้มข้นลดลงจาก stock solution 20 เท่า

3. เตรียมสารละลายของตัวทำละลาย (DMSO) ใน P19 SM + Ara-C และ α -MEM + Ara-C ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.5%v/v เพื่อใช้เป็น solvent control
4. ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 96-well plate แต่ละหลุมให้หมด
5. เติมสารทดสอบลงไปหลุมละ 150 μ L แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เมื่อครบเวลานำ plate ออกมาจากตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ แล้วดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก plate แต่ละหลุม
7. เติมสารละลาย XTT ที่เตรียมขึ้นโดยเจือจาง XTT dye ใน α -MEM ร้อน (60°C) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และเติม PMS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 μ M ลงไปในหลุม หลุมละ 50 μ L และเติมสารละลาย XTT ลงไปในหลุมที่ไม่ได้ทำการ seed P19 neuron ไว้ เพื่อใช้เป็น blank
8. นำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO₂ และความชื้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
9. เมื่อครบเวลานำมาเติม PBS ลงไปหลุมละ 100 μ L (ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 150 μ L ซึ่งประกอบด้วย XTT solution ใน PBS)
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm
11. นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง มาหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกับ control คือหลุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ จากสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

กำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของ control คิดเป็น 100%

12. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์
13. ทำการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

การวิเคราะห์ข้อมูล: ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัมและไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อทดสอบกับตัวทำละลายในความเข้มข้นที่ใช้เตรียมสารทดสอบ จะต้องแสดงอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบเกินกว่า ± 5 % จึงจะยอมรับว่าตัวทำละลายไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท (Tadtong *et al*, 2007, Tadtong *et al*, 2013)

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาท (Tadtong *et al*, 2007)

1. นำเอาความเข้มข้นของสารสกัดส้มที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดซึ่งทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% มาทดสอบ (มากกว่ากลุ่มควบคุม) โดยการเจือจางด้วย 10%v/v DMSO เพื่อใช้เป็น stock solution สารสกัดส้มชนิดใดที่ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% จะไม่นำมาทดสอบต่อ และทำการทดสอบสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 1 nM ร่วมด้วย เนื่องจาก Tangsaengvit, *et al*. ได้รายงานไว้ในปีค.ศ. 2013 ว่า quercetin ความเข้มข้น 1 nM มีฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาท (Tangsaengvit *et al*, 2013) จึงใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น 1 nM เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ในการทดลอง
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับทดสอบ (test sample) โดยการเจือจางจาก stock solution ใน P19SM + Ara-C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5%v/v สารทดสอบจะมีความเข้มข้นลดลงจาก stock solution 20 เท่า
3. เตรียมสารละลายของตัวทำละลาย (DMSO) ใน P19 SM + Ara-C ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.5%v/v เพื่อใช้เป็น solvent control
4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 6-well plate แต่ละหลุมให้หมด
5. เติมสารทดสอบลงไปหลุมละ 2 mL แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เมื่อครบเวลานำ plate ออกมาจากตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ สังเกตลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยสังเกตการเพิ่มขึ้นของแขนงเซลล์ประสาท และ/หรือ ความยาวที่เพิ่มขึ้นของแขนงประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายงานจำนวนแขนงประสาท และค่าความยาวแขนงประสาท เฉลี่ยจากเซลล์ประสาท 30 เซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล: ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบความยาวแขนงประสาท และจำนวนแขนงประสาท กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3 ผลการวิจัยฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลไม้ตระกูลส้ม

1. % yield จากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด

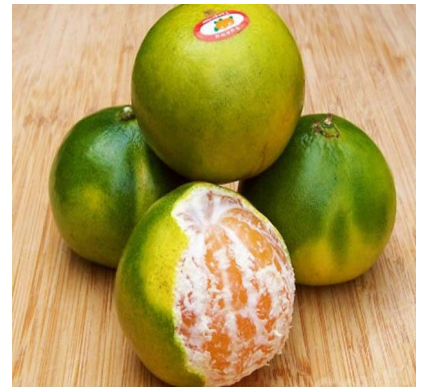
แบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนน้ำคั้น กับ สารสกัดส่วนกาก โดยทำการชั่งน้ำหนักส่วนน้ำคั้นหลังการทำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักสารสกัดส่วนกากที่สกัดได้จากเมทานอล นำมาคำนวณเทียบกับน้ำหนักทั้งหมดจากสูตร $\%yield = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักทั้งหมด}} \times 100$ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4



ส้มเขียว



ส้มซ่า



ส้มเขียวหวาน



ส้มโอขาวใหญ่



ส้มโอทับทิมสยาม



มะนาว

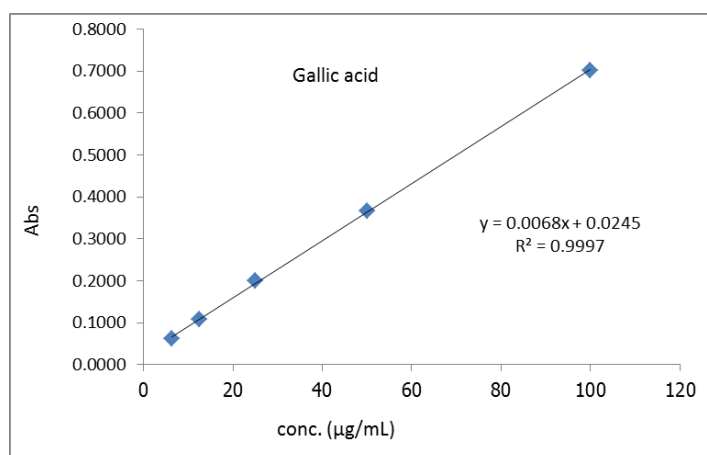
ตารางที่ 4 %yield ของส่วนน้ำคั้นและสารสกัดส่วนกากของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด

พืชตระกูลส้ม	% yield ส่วนน้ำคั้น	% yield สารสกัดส่วนกาก
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต		
ส้มโอขาวใหญ่	3.35	1.41
ส้มโอทับทิมสยาม	2.58	0.96
กลุ่มส้มเปลือกกล่อน		
ส้มเขียวหวาน	5.48	1.72
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด		
มะนาว	3.22	2.75
กลุ่มส้มเกลี้ยง		
ส้มเขียว	5.69	4.85
ส้มซ่า	2.19	0.79

จากตารางที่ 4 พบว่าพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดให้ % yield ของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 2.19-5.69 % โดยส้มเขียวมีค่า % yield มากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ มะนาว ส้มโอทับทิมสยาม และส้มซ่า ตามลำดับ สารสกัดส่วนกากมีค่า %yield อยู่ในช่วง 0.79-4.85% โดยส้มเขียวมีค่า % yield มากที่สุด รองลงมาคือ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม และส้มซ่า ตามลำดับ

2. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml ตามลำดับ นำมาทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น (รูปที่ 6) ได้สมการคือ $y = 0.0068x + 0.0105$



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐาน Gallic acid

เมื่อวัดค่าการดูดกลืน ที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารตัวอย่างจากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด คือ ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มเซ้ง และส้มซ่า ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid (รูปที่ 6) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid คือ $y = 0.0642x + 0.0105$ จะได้ค่าเป็นปริมาณ มิลลิกรัมเทียบเท่ากับ Gallic acid ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g extract) ได้ผลดังตารางที่ 5

จากการทดลองพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 3.71-5.38 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มซ่ามีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเซ้ง ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน และส้มโอขาวใหญ่ ตามลำดับ และสารสกัดส่วนกากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.35-6.98 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มเขียวหวาน มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมา คือ ส้มเซ้ง มะนาว ส้มโอขาวใหญ่ ส้มซ่า และส้มโอทับทิมสยาม ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด

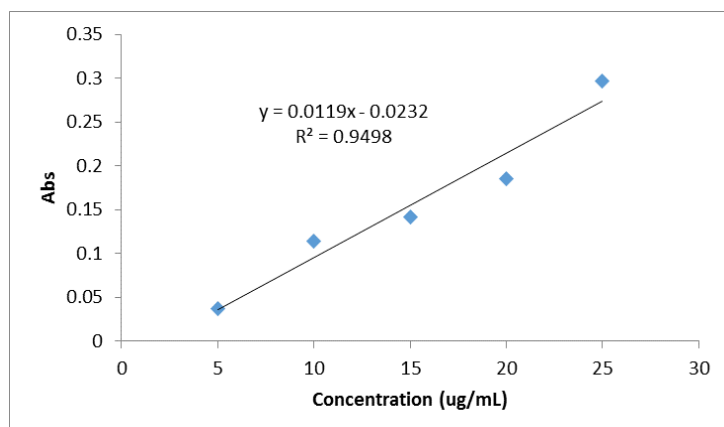
สารสกัดตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด(mg GAE/g extract) (Mean $\pm$ SD)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	3.71 $\pm$ 0.05
สารสกัดส่วนกาก	5.10 $\pm$ 0.05
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	5.00 $\pm$ 0.07
สารสกัดส่วนกาก	4.35 $\pm$ 0.16
กลุ่มส้มเปลือกกล่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	4.11 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	6.98 $\pm$ 0.09
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	4.15 $\pm$ 0.02
สารสกัดส่วนกาก	5.25 $\pm$ 0.04
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเซ้ง	
ส่วนน้ำคั้น	5.06 $\pm$ 0.13
สารสกัดส่วนกาก	5.61 $\pm$ 0.11

ส้มซ่า	
ส่วนน้ำคั้น	5.38 ± 0.12
สารสกัดส่วนกาก	4.72 ± 0.10

ซึ่งผลการทดลองที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้าพบว่าอาจมีความไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากการศึกษาของ Ghasemi K (2009) ได้ทำการศึกษหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในกากส้มเขียวหวาน, มะนาว และส้มซ่า พบว่ามีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 100-200 mg GAE/g extract ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพืชที่นำมาทดลองปลูกต่างสถานที่ ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวต่างกัน สภาพภูมิอากาศที่ปลูกต่างกัน วิธีการปลูกต่างกัน ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญที่ต้องการจะวิเคราะห์มีค่าไม่เท่ากัน

3. ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ดี เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์สามารถให้อิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวมากขึ้น จึงช่วยยับยั้ง หรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันได้จากการตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดที่ความยาวคลื่น 415 nm พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 0.0 – 2.55 mg QE/g extract (ตารางที่ 6) เทียบกับกราฟมาตรฐานของ quercetin (รูปที่ 7) จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากส่วนสารสกัดเมทานอลของส่วนกาก มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนน้ำคั้นของพืชตระกูลส้ม โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.41 – 2.55 mg QE/g extract โดยสารสกัดจากส้มโอทับทิมสยามมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด 2.55 mg QE/g extract รองลงมาคือส้มเขียว มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่และส้มซ่าตามลำดับ และส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 0.00 – 1.06 mg QE/g extract โดยสารสกัดจากส้มเขียวหวานมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด 1.06 mg QE/g extract รองลงมาคือส้มซ่าและมะนาวโดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 1.05 และ 1.00 mg QE/g extract ตามลำดับซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับส้มเขียวหวาน ส่วนส้มโอขาวใหญ่ไม่พบปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนน้ำคั้น



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐาน Quercetin

ตารางที่ 6 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	ND*
สารสกัดส่วนกาก	1.53 ± 14.23
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	0.85 ± 1.83
สารสกัดส่วนกาก	2.55 ± 34.03
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	1.06 ± 21.38
สารสกัดส่วนกาก	1.53 ± 26.50
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	1.00 ± 1.97
สารสกัดส่วนกาก	2.13 ± 36.82
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเขียว	
ส่วนน้ำคั้น	0.62 ± 24.63
สารสกัดส่วนกาก	2.43 ± 17.58
ส้มซ่า	
ส่วนน้ำคั้น	1.05 ± 10.05
สารสกัดส่วนกาก	1.41 ± 13.11

*Not detected

4.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ด้วยวิธี DPPH assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน สารตัวอย่างจากพืชตระกูลส้มที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ความยาวคลื่น 520 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ triplicate และนำไปคำนวณหา %ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดังแสดงในตารางที่ 7 หลังจากนั้นทำการหาค่า IC₅₀ โดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox และสารตัวอย่างจากพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ความยาวคลื่น 520 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ triplicate ดังแสดงในตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 พบว่าส่วนน้ำคั้นของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดมีค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอยู่ในช่วง 2.26-4.54 mg/ml โดยส้มโอทับทิมสยามแสดงฤทธิ์ต้านที่ดีที่สุด รองลงมาคือส้มโอขาวใหญ่ มะนาว ส้มเซ้ง ส้มซ่า และส้มเขียวหวาน ตามลำดับ และ สารสกัดส่วนกากมีค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอยู่ในช่วง 2.97 -4.36 mg/ml โดยส้มโอทับทิมสยามแสดงฤทธิ์ต้านดีที่สุด รองลงมาคือ มะนาวส้มโอขาวใหญ่ ส้มเซ้ง และส้มเขียวหวาน ตามลำดับ โดยมีค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox เท่ากับ 0.011 ± 0.48 mg/ml และ 0.013 ± 0.89 mg/ml ตามลำดับ

จากผลการวิจัย จะพบว่า สารสกัดส่วนกากของส้มซ่าไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากมีปัญหาในส่วนของ การเตรียมสารละลาย จากการไม่สามารถละลายให้ได้หมดด้วยเมทานอล 100% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่จะเตรียมสูงเกินไป จึงทำให้ไม่สามารถละลายให้ใสได้ และจากผลการทดลองจะพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด มีฤทธิ์น้อย ซึ่งก็มีแนวโน้มที่ไปในทางเดียวกับงานวิจัยที่มีในการศึกษาก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Ghasemi K (2009) ได้ทำการศึกษาหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย DPPH assay ในกากส้มพบว่า มีค่า IC_{50} ในกากส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง มะนาว และส้มซ่า มีค่า 2.2-3.9 mg/ml (48) ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่ได้ คือ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2-5 mg/ml และจากการศึกษาของ Oikeh EI (2016) พบว่าน้ำส้มเขียวหวานมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/ml คือ $17.80 \pm 0.60\%$ และ $26.45 \pm 0.15\%$ ในขณะที่น้ำมะนาว คือ $2.85 \pm 0.20\%$ และ $6.25 \pm 0.06\%$ พบว่ามีฤทธิ์ค่อนข้างน้อยและมีความใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้

ตารางที่ 7 % ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 mg/ml

สารตัวอย่าง 5 mg/ml	% ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (mean $\pm$ SD)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	75.96 ± 0.09
สารสกัดส่วนกาก	62.31 ± 0.24
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	87.06 ± 0.69
สารสกัดส่วนกาก	73.71 ± 0.22
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	54.45 ± 1.16
สารสกัดส่วนกาก	53.79 ± 0.14
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	72.55 ± 0.54
	69.43 ± 0.29

สารตัวอย่าง 5 mg/ml	% ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (mean $\pm$ SD)
สารสกัดส่วนกาก	
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเขียว	
ส่วนน้ำคั้น	72.17 $\pm$ 0.11
สารสกัดส่วนกาก	54.95 $\pm$ 0.43
ส้มซ่า	
ส่วนน้ำคั้น	60.49 $\pm$ 0.28
สารสกัดส่วนกาก	38.29 $\pm$ 0.54

ตารางที่ 8 IC₅₀ ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐาน

สารสกัดตัวอย่าง	IC ₅₀ ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (mg/ml) (mean $\pm$ SD)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	3.03 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	3.84 $\pm$ 0.01
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	2.26 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	2.97 $\pm$ 0.03
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	4.54 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	4.67 $\pm$ 0.01
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	3.23 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	3.28 $\pm$ 0.02
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเขียว	
ส่วนน้ำคั้น	3.34 $\pm$ 0.01
สารสกัดส่วนกาก	4.36 $\pm$ 0.01

สารสกัดตัวอย่าง	IC ₅₀ ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (mg/ml) (mean ± SD)
ส้มซ่า	3.63 ± 0.02
ส่วนน้ำคั้น	*NA
สารสกัดส่วนกาก	
Trolox	0.013 ± 0.89
Ascorbic acid	0.011 ± 0.48

หมายเหตุ : *NA = ไม่สามารถรายงานผลได้เนื่องจากสารตัวอย่างไม่ละลาย

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี Ellman's method

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีของ Ellman วัดค่าการดูดกลืนแสงสารสกัดพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ triplicate จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปคำนวณหา % ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ผลดังตารางที่ 9

จากตารางที่ 9 พบว่าส่วนน้ำคั้นของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอยู่ในช่วง 10.98-15.24% โดยส้มโอขาวใหญ่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน ส้มซ่า มะนาว ส้มเซ้ง และส้มโอทับทิมสยาม ตามลำดับ สารสกัดส่วนกากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอยู่ในช่วง 8.37-21.85% โดยส้มเขียวหวานแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มซ่า และส้มเซ้ง ตามลำดับ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าของ Abirami A (2014) และคณะอาจมีความไม่สอดคล้องกันโดย Abirami A และคณะได้ทำการศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนน้ำคั้นของส้มโอขาวและส้มโอแดง พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอยู่ระหว่าง 75.71-79.74% โดยมี eserine เป็น positive control ทั้งนี้ที่ไม่สอดคล้องอาจเนื่องมาจากงานวิจัยนี้ไม่ได้กล่าวถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถรู้ได้ว่าฤทธิ์ที่สูงเกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงด้วยหรือไม่

ตารางที่ 9 %ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสโดยวิธี Ellman's method ของสารตัวอย่าง

สารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml	% ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส (mean $\pm$ SD)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	15.24 $\pm$ 0.33
สารสกัดส่วนกาก	20.66 $\pm$ 0.90
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	10.98 $\pm$ 1.31
สารสกัดส่วนกาก	17.57 $\pm$ 0.58
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	13.88 $\pm$ 0.22
สารสกัดส่วนกาก	21.85 $\pm$ 1.42
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	13.39 $\pm$ 1.48
สารสกัดส่วนกาก	12.49 $\pm$ 1.73
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเขียว	
ส่วนน้ำคั้น	13.38 $\pm$ 0.20
สารสกัดส่วนกาก	8.37 $\pm$ 1.09
ส้มซ่า	
ส่วนน้ำคั้น	13.57 $\pm$ 1.40
สารสกัดส่วนกาก	11.21 $\pm$ 2.54
Galanthamine (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml)	89.18 $\pm$ 0.30

6. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าซีดีเทส

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าซีดีเทสของสารสกัดพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด พบว่าส่วนน้ำคั้นมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสอยู่ในช่วง 13.18 - 33.13% โดยพบว่าส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสมากที่สุด 33.13% รองลงมาคือ ส้มซ่า ส่วนส้มเขียวและส้มโอทับทิมสยามมีผลการยับยั้งใกล้เคียงกัน ตามด้วยมะนาวและส้มโอขาวใหญ่ตามลำดับ โดยส้มโอขาวใหญ่มีผลการยับยั้งเอนไซม์

เบต้าซีทีเอสน้อยที่สุด 13.18% ส่วนสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด มีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีทีเอส อยู่ในช่วง 9.86 - 32.44% โดยส้มเขียวหวานแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีทีเอสมากที่สุด 32.44% รองลงมาคือส้มโอทับทิมสยาม ส้มซ่า ส้มเซ้ง ส้มโอขาวใหญ่และมะนาวตามลำดับ โดยมะนาวผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีทีเอสน้อยที่สุด 9.86% (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์เบต้าซีทีเอสของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	13.18 ± 1.42
สารสกัดส่วนกาก	13.46 ± 1.46
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	21.19 ± 1.96
สารสกัดส่วนกาก	26.97 ± 1.13
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	33.13 ± 0.23
สารสกัดส่วนกาก	32.44 ± 2.33
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	19.07 ± 1.09
สารสกัดส่วนกาก	9.86 ± 1.96
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเซ้ง	
ส่วนน้ำคั้น	21.61 ± 1.17
สารสกัดส่วนกาก	15.80 ± 1.54
ส้มซ่า	
ส่วนน้ำคั้น	27.77 ± 1.93
สารสกัดส่วนกาก	18.73 ± 0.91
Inh IV	96.51 ± 1.33

7. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ ของสารสกัดพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด ทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเมทานอลมีผลใกล้เคียงกันโดยพบว่าส่วนน้ำคั้นมีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ ในช่วง 2.34 - 11.13% โดยพบว่าส้มโอทับทิมสยามมีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์มากที่สุด 11.13% รองลงมาคือส้มซ่า ส้มเซ้งและส้มโอขาวใหญ่ มะนาวและส้มเขียวหวานตามลำดับ โดยส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์น้อยที่สุด 2.34% ส่วนสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด มีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์อยู่ในช่วง 1.39 – 15.12% โดยส้มโอขาวใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์การเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ มากที่สุด 15.12% รองลงมาคือส้มซ่า ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเซ้ง ส้มเขียวหวานตามลำดับโดยส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์น้อยที่สุด 1.39% (ตารางที่ 11)

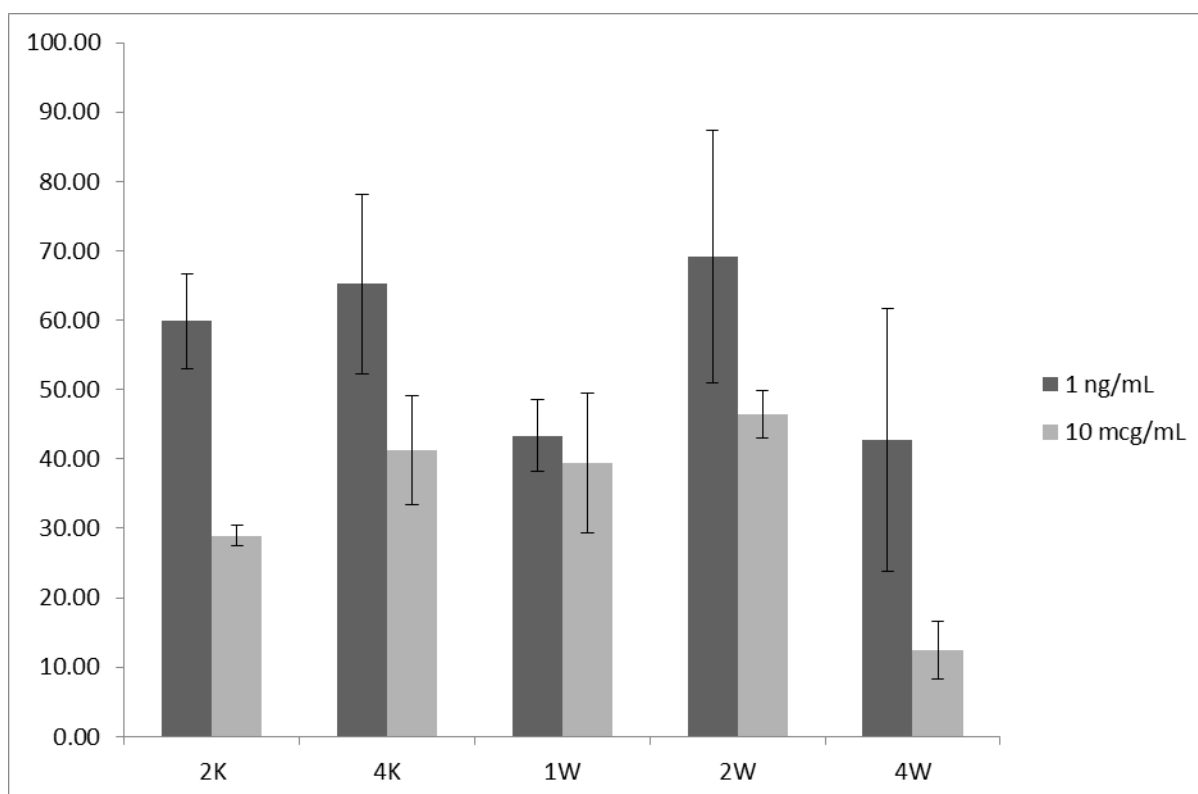
ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต	
ส้มโอขาวใหญ่	
ส่วนน้ำคั้น	5.82 ± 0.23
สารสกัดส่วนกาก	15.12 ± 0.91
ส้มโอทับทิมสยาม	
ส่วนน้ำคั้น	11.13 ± 0.84
สารสกัดส่วนกาก	7.13 ± 1.92
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน	
ส้มเขียวหวาน	
ส่วนน้ำคั้น	2.34 ± 1.84
สารสกัดส่วนกาก	1.39 ± 0.51
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด	
มะนาว	
ส่วนน้ำคั้น	5.36 ± 1.71
สารสกัดส่วนกาก	5.30 ± 0.61
กลุ่มส้มเกลี้ยง	
ส้มเซ้ง	
ส่วนน้ำคั้น	7.91 ± 1.72
สารสกัดส่วนกาก	3.89 ± 1.50

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml)
ส้มซ่า	9.48 ± 1.16
ส่วนน้ำคั้น	12.08 ± 0.25
สารสกัดส่วนกาก	
Curcumin	98.28 ± 0.50

8.ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นงอกของแขนงประสาท

ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพบว่า สารสกัดส้มทุกชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ สารสกัดส่วนกากของส้มโอทับทิมสยาม มะนาว และสารสกัดส่วนน้ำคั้นของส้มโอทับทิมสยาม ส้มโอขาวใหญ่และมะนาว ทั้งความเข้มข้นที่ 1 ng/mL และ 10 µg/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมได้ และมีแนวโน้มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 12 ดังนั้นจึงไม่นำสารสกัดส้มทั้ง 5 ชนิดนี้ มาทำการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทต่อ



รูปที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดส้มชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL และ 10 µg/mL ตามลำดับ ; 2K – สารสกัดกากส้มโอทับทิมสยาม, 4K – สารสกัดกากมะนาว, 1W – สารสกัดน้ำส้มขาวใหญ่, 2W – สารสกัดน้ำส้มโอทับทิมสยาม, 4W – สารสกัดน้ำมะนาว

ตารางที่ 12 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 ng/mL และ 10 µg/mL ตามลำดับ

สารสกัด (ความเข้มข้น µg/mL)	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท	SE
Control	100.00	0.00
Solvent control (0.5%DMSO)	100.24	1.39
สารสกัดจากส้มโอทับทิมสยาม (0.001 µg/mL)	59.89	6.83
สารสกัดจากส้มโอทับทิมสยาม (10 µg/mL)	28.98	1.40
สารสกัดจากมะนาว (0.001 µg/mL)	65.21	12.97
สารสกัดจากมะนาว (10 µg/mL)	41.22	7.84
สารสกัดน้ำส้มขาวใหญ่ (0.001 µg/mL)	43.33	5.15
สารสกัดน้ำส้มขาวใหญ่ (10 µg/mL)	39.42	10.12
สารสกัดน้ำส้มโอทับทิมสยาม (0.001 µg/mL)	69.14	18.25
สารสกัดน้ำส้มโอทับทิมสยาม (10 µg/mL)	46.45	3.45
สารสกัดน้ำมะนาว (0.001 µg/mL)	42.74	18.97
สารสกัดน้ำมะนาว (10 µg/mL)	12.43	4.18

ตารางที่ 13 % yield ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทส และฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	% yield	ปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมด mg GAE/g extract	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด mg QE/g extract	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ค่า IC ₅₀ (mg/ml)	ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส (ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml) % inhibition	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทส % inhibition (1 mg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ % inhibition (1 mg/ml)
กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต							
ส้มโอขาวใหญ่							
ส่วนน้ำคั้น	3.35	3.71 ± 0.05	ND*	3.03 ± 0.01	15.24 ± 0.33	13.18 ± 1.42	5.82 ± 0.23
สารสกัดส่วนกาก	1.41	5.10 ± 0.05	1.53 ± 14.23	3.84 ± 0.01	20.66 ± 0.90	13.46 ± 1.46	15.12 ± 0.91
ส้มโอทับทิมสยาม							
ส่วนน้ำคั้น	2.58	5.00 ± 0.07	0.85 ± 1.83	2.26 ± 0.01	10.98 ± 1.31	21.19 ± 1.96	11.13 ± 0.84
สารสกัดส่วนกาก	0.96	4.35 ± 0.16	2.55 ± 34.03	2.97 ± 0.03	17.57 ± 0.58	26.97 ± 1.13	7.13 ± 1.92
กลุ่มส้มเปลือกอ่อน							
ส้มเขียวหวาน							
ส่วนน้ำคั้น	5.48	4.11 ± 0.01	1.06 ± 21.38	4.54 ± 0.01	13.88 ± 0.22	33.13 ± 0.23	2.34 ± 1.84
สารสกัดส่วนกาก	1.72	6.98 ± 0.09	1.53 ± 26.50	4.67 ± 0.01	21.85 ± 1.42	32.44 ± 2.33	1.39 ± 0.51
กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด							
มะนาว							

สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม	% yield	ปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมด mg GAE/g extract	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด mg QE/g extract	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ค่า IC ₅₀ (mg/ml)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml) % inhibition	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ % inhibition (1 mg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์ % inhibition (1 mg/ml)
ส่วนน้ำคั้น	3.22	4.15 ± 0.02	1.00 ± 1.97	3.23 ± 0.01	13.39 ± 1.48	19.07 ± 1.09	5.36 ± 1.71
สารสกัดส่วนกาก	2.75	5.25 ± 0.04	2.13 ± 36.82	3.28 ± 0.02	12.49 ± 1.73	9.86 ± 1.96	5.30 ± 0.61
กลุ่มส้มเกลี้ยง							
ส้มเขียว							
ส่วนน้ำคั้น	5.69	5.06 ± 0.13	0.62 ± 24.63	3.34 ± 0.01	13.38 ± 0.20	21.61 ± 1.17	7.91 ± 1.72
สารสกัดส่วนกาก	4.85	5.61 ± 0.11	2.43 ± 17.58	4.36 ± 0.01	8.37 ± 1.09	15.80 ± 1.54	3.89 ± 1.50
ส้มซ่า							
ส่วนน้ำคั้น	2.19	5.38 ± 0.12	1.05 ± 10.05	3.63 ± 0.02	13.57 ± 1.40	27.77 ± 1.93	9.48 ± 1.16
สารสกัดส่วนกาก	0.79	4.72 ± 0.10	1.41 ± 13.11	ND*	11.21 ± 2.54	18.73 ± 0.91	12.08 ± 0.25
Trolox	-	-	-	0.0100 ± 0.0005	-	-	-
Vitamin C	-	-	-	0.0125 ± 0.0009	-	-	-
Inh IV	-	-	-	-	-	95.51 ± 1.33	-
Curcumin	-	-	-	-	-	-	98.28 ± 0.50

บทที่ 4 สรุปผลการดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาได้ทำการจัดหาตัวอย่างพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ได้แก่ ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง และส้มซ่า นำมาเตรียมเป็นน้ำคั้นและสารสกัด เมทานอลส่วนกาก พบว่าพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดให้ %yield ของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 2.19-5.69 % โดยส้มเซ้งมีค่า %yield มากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ มะนาว ส้มโอทับทิมสยาม และ ส้มซ่า ตามลำดับ สารสกัดส่วนกากมีค่า %yield อยู่ในช่วง 0.79-4.85% โดยส้มเซ้งมีค่า %yield มากที่สุด รองลงมาคือ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่ ส้มโอทับทิมสยาม และส้มซ่า ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 3.71-5.38 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มซ่ามีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ ส้มเซ้ง ส้มโอทับทิมสยาม มะนาว ส้มเขียวหวาน และส้มโอขาวใหญ่ ตามลำดับ และสารสกัดส่วนกากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.35-6.98 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มเขียวหวาน มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมา คือ ส้มเซ้ง มะนาว ส้มโอขาวใหญ่ ส้มซ่า และส้มโอทับทิมสยาม ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดเมทานอลของส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนน้ำคั้น ซึ่งเหมือนกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.41 – 2.55 mg QE/g extract โดยสารสกัดจากส้มโอทับทิมสยามมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด 2.55 mg QE/g extract รองลงมาคือส้มเซ้ง มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโอขาวใหญ่และส้มซ่า ตามลำดับ และส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 0.00 – 1.06 mg QE/g extract และเมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า ส่วนน้ำคั้นของส้มโอทับทิมสยาม และสารสกัดส่วนกากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด แต่ทั้งนี้หากเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่า ส่วนน้ำคั้นที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ ส่วนน้ำคั้นของส้มโอขาวใหญ่ และสารสกัดส่วนกากที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ สารสกัดจากส้มเขียวหวาน แต่จากการสังเกตพบว่า ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดนั้นมีค่าใกล้เคียงกันและมีฤทธิ์ค่อนข้างน้อย เช่นเดียวกับผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสโดย ส้มเขียวหวานมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสมากที่สุด รองลงมาคือส้มซ่า ส่วนผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะไมลอยด์ของส่วนน้ำคั้นและส่วนกากของพืชตระกูลส้มพบว่าต่ำกว่าผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีดีเทสและต่ำกว่าสารมาตรฐาน curcumin อย่างไรก็ตาม สารสกัดส้มทุกชนิดทั้งความเข้มข้นที่ 1 ng/mL และ 10 μ g/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมได้ และมีแนวโน้มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังนั้นสารสกัดส้มทั้งหมดจึงไม่ได้นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นการออกของแขนงประสาทต่อ

เอกสารอ้างอิง

- กาญจน์ จันท์ลอย, สามารถ เศรษฐวิทยา, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รวี เสฐฐภักดี. ความหลากหลายของสายพันธุ์พืชตระกูลส้ม [Online]. ศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อน สถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน, Available from: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04plant/kanchana/plant_00.html [Accessed 2015 Dec 20].
- พร้อมจิต ศรีลัมพ์ บรรณาธิการ. สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 4 กกายาอีสาน. 2542. มูลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- พร้อมจิต ศรีลัมพ์ บรรณาธิการ. สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 5 สมุนไพรพื้นบ้านอีสาน. 2546. มูลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- นิดดา หงส์วิวัฒน์, ทวีทอง หงส์วิวัฒน์. สัมผัส: คุณค่าอาหารและการกิน. กรุงเทพฯ: แสงแดด, 2550
- สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. ผักพื้นบ้านภาคอีสาน 302 หน้า.
- สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล กระทรวงศึกษาธิการ. ผลการประชุมสัมมนา เชิงปฏิบัติการผักพื้นบ้านอาหารธรรมชาติอีสาน ครั้งที่ 2. 177 หน้า
- Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P. 2014. In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. **Food Sci Hum Well.** 3 (1): 16-25.
- Aoki S, Matsui K, Tanaka K, Hong W, Kobayashi M. 2001. Lembehyne A, a Spongian Polyacetylene, Induces Neuronal Differentiation in Neuroblastoma Cell. **Biochem Biophys Res Com.** 289: 558-563.
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. 2000. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. **Br J Pharmacol.** 131:711-720.
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. 2000. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. **J Neurochem.** 74(6):2268-77.
- Benzie IFF, Szeto, YT. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **J Agri Food Chem.** 47:633-636
- Butterfield DA, Castegna A, Drake J. 2002. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. **Nutr Neurosci.** 5: 229-39.
- Deka A, Vita JA. 2011. Tea and cardiovascular disease. **Pharmacol Res.** 64: 136-145.
- Engelhart MJ, Ruitenberg A, Swieten JC. 2000. Dietary antioxidants and the risk of dementia. The Rotterdam study. **Neurobiol Aging.** 21: 203.

- Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD. 1999. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. **QJM**. 92:39-45.
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pak J Pharm Sci**. 22 (3): 277-81.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira IC. 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food Chem Toxicol**. 48 (1): 99-106.
- Harvey BS, Musgrave F, Ohlssonb, KS, FranssonbÅ, Smida, SD. 2011. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits amyloid- β evoked fibril formation and neuronal cell death in vitro. **Food Chem**. 129: 1729–1736.
- Honig LS, Tang MX, Albert S. 2003. Stroke and the risk of Alzheimer disease. **Arch Neurol**. 60: 1707-12.
- Iacovitti L, Stull ND, Johnston K. 1997. Melatonin rescue dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. **Brain Res**. 768:317-326.
- Jeandel C, Nicolas MB, Doboï F. 1989. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. **Gerontology**. 35: 275-82.
- Kumar R, Vijay S, Khan N. 2013. Comparative nutritional analysis and antioxidant activity of fruit juices of some *Citrus* spp. **Octa J Biosci**. (1): 1.
- MacPherson PA, and McBurney MW. 1995. P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. **Methods** 7:238-252.
- Musthafa M. E, Reshmi K, Vijayan GCG, Mustaq, AM, Nady B, Gilles JG. 2012. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's Disease. **Neurochem Res**. 37:1829–1842.
- Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. 2016. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrate. **Food Sci Nutr**. 4(1): 103-9.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A. 2004. Vitamin A exhibits potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects in vitro. **Experiment Neurol**. 189: 380-92.
- Paleologos M, Cumming RG, Lazarus R, Cohort. Study of vitamin C intake and cognitive impairment. **Am J Epidemiol**. 148: 45-50.
- Park SY, Kim DS. 2002. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. **J Nat Prod**. 65:1227–1231.
- Parnas D and Linial M. 1995. Cholinergic properties of neurons differentiated from embryonal carcinoma cell-line (P19), **Int. J. Dev. Neurosci**. 13:767-781.

- Pereira C, Santos MS, Oliveira C. 1999. Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by beta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants. **Neurobiol Dis.** 6:209-219.
- Pitchumoni SS, Doraiswamy PM. 1998. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's disease. **J Am Geriatr Soc.** 46: 1566-72.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J Agric Food Chem.** 48:3396-402.
- Rainha N, Lima E, Baptista J, Rodrigues C. 2011. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. **J. Med.Plant. Res.** 5:1930-1940.
- Rauf A, Uddin G, Ali J. 2014. Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of *Citrus sinensis*, *Citrus anrantifolia*, and *Citrus limonum*. **Org Med Chem Lett.** 4 (1): 1.
- Raymond Chuen-Chung C, Jianfei C, Man-Shan Y, Wang M. 2010. Neuroprotective effects of oxyresveratrol from fruit against neurodegeneration in Alzheimer's disease. Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's disease Kerala. **Transworld Research Network**, India, 155–168.
- Riviere S, Birlouez-Aragon L, Nourhashemi F. 1998. Low plasma vitamin C in Alzheimer patient despite an adequate diet. **Int J Geriatr Psychiatry.** 13: 749-54.
- Sema B E, Krystyna P, Seref G. 2000. Speciation of aluminum in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection. **Analytica Chimica Acta.** 411:81–89
- Sinclair AJ, Bayer AJ, Johnston J. 1998. Altered plasma antioxidant status in status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. **Int J Geriatr Psychiatry.** 13: 840-5.
- Sreejayan N, and Roa M.N.A. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. **J Pharm Pharmacol.** 49:105-107.
- Tadtong S, Kanlayavattanakul M, and Lourith N. 2013. Neuritogenic and neuroprotective Activities of fruit residues. **Nat. Prod. Commun.** 8(11): 1583-1586.
- Tadtong S, Meksuriyen D, Tanasupawat S, Isobe M, and Suwanborirux K. 2007. Geldanamycin Derivatives and Neuroprotective Effect on Cultured P19-derived Neurons. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 17(10): 2939-2943.
- Tangsaengvit N, Kitphati W, Tadtong S, Bunyaphrathatsara N, and Nukoolkarn V. 2013. Neurite outgrowth and neuroprotective effects of Quercetin from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. on cultured P19-derived neurons. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** Article ID 838051, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/838051>.

- Wang Y-J, Thomas P, Zhong J-H, Bi F-F, Kosaraju S, Pollard A, Fenech M, Zhou X-F. 2009. Consumption of grape seed extract prevents Amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's Disease mouse. **Neurotox Res.** 15:3–14.
- Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, Humala N, Teplow DB, Pasinetti GM. 2008. Grape-derived polyphenolics prevent A beta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci.** 28:6388–6392.
- Yallampalli S, Micci MA, Taglialatela G. 1998. Ascorbic acid prevents beta-amyloid-induced intracellular calcium increase and cell death in PC12 cells. **Neurosci Lett.** 251: 105-8.

Output

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ(outputs)	ผลสำเร็จ	กิจกรรมที่เสร็จสิ้น
6 เดือนที่ 1	1. เตรียมสารสกัดผลไม้ตระกูลส้ม 2. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4. ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase	1. ได้สารสกัดเมทานอล และน้ำคั้นผลไม้ตระกูลส้มกลุ่มต่างๆ 2. ได้ผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 3. ได้ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4. ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ผลฤทธิ์	100% 100% 100% 100%	1. ได้สารสกัดเมทานอล และน้ำคั้นผลไม้ตระกูลส้มกลุ่มต่างๆ 6 ชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง ส้มซ่า ส้มโอขาว ส้มโอทับทิมสยาม และมะนาว 2. ได้ผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ส่วนน้ำคั้นอยู่ในช่วง 3.71-5.38 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มซ่ามีค่ามากที่สุด และสารสกัดส่วนกากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.35-6.98 mg GAE/g extract โดยสารสกัดจากส้มเขียวหวาน มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด 3. ส่วนน้ำคั้นของส้มโอทับทิมสยาม และสารสกัดส่วนกากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด แต่ทั้งนี้หากเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 4. ส่วนน้ำคั้นที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ ส่วนน้ำคั้นของส้มโอขาวใหญ่ และสารสกัดส่วนกากที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสมากที่สุด คือ สารสกัดจากส้มเขียวหวาน แต่จากการสังเกตพบว่าฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส ของพืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดนั้นมีค่าใกล้เคียงกันและมีฤทธิ์ค่อนข้างน้อย
6 เดือนที่ 2	1. วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	1. ได้ผลปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	100%	1. ได้ผลปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนกากมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.41 – 2.55 mg QE/g extract สารสกัดจากส้มโอทับทิมสยามมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด 2.55 mg QE/g extract ส่วน

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ(outputs)	ผลสำเร็จ	กิจกรรมที่เสร็จสิ้น
	2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ β -secretase	2. ได้ผลฤทธิ์ต้านเอนไซม์ β -secretase	100%	น้ำคั้นอยู่ในช่วง 0.00 – 1.06 mg QE/g extract
	3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid	3. ได้ผลฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ β -amyloid	100%	2. สัมเชื้อหวานมีผลการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีตีเทสมากที่สุด รองลงมาคือส้มซ่า อย่างไรก็ตามผลการออกฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Inh IV
	4. ทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท	4. ได้ผลฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท		3. สารสกัดพืชตระกูลส้มทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเมทานอล มีผลใกล้เคียงกันโดยพบว่าส้มโอทับทิมสยามมีผลการยับยั้ง การเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์มากที่สุด ส่วนส้มเชื้อหวาน มีผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะไมลอยด์น้อยที่สุด
	5. ทดสอบฤทธิ์เพิ่มการงอกแขนงประสาท	5. ได้ผลฤทธิ์เพิ่มการงอกแขนงประสาท		4. สารสกัดส้มทุกชนิดทั้งความเข้มข้นที่ 1 ng/mL และ 10 μ g/mL ไม่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต มากกว่ากลุ่มควบคุมได้ และมีแนวโน้มแสดงความเป็นพิษต่อ เซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังนั้นสารสกัดส้ม ทั้งหมดจึงไม่ได้นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทต่อ