

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส
(Acetylcholinesterase หรือ AChE) ด้วยเทคนิค Acetylcholinesterase assay

ตัวอย่างสารสมุนไพร

1. KS
2. Minoza
3. Kerra
4. Vitalplus
5. BOVA
6. Vetchakorn NO.6
7. Psylaza
8. Sangvichai

วิธีการทดลอง

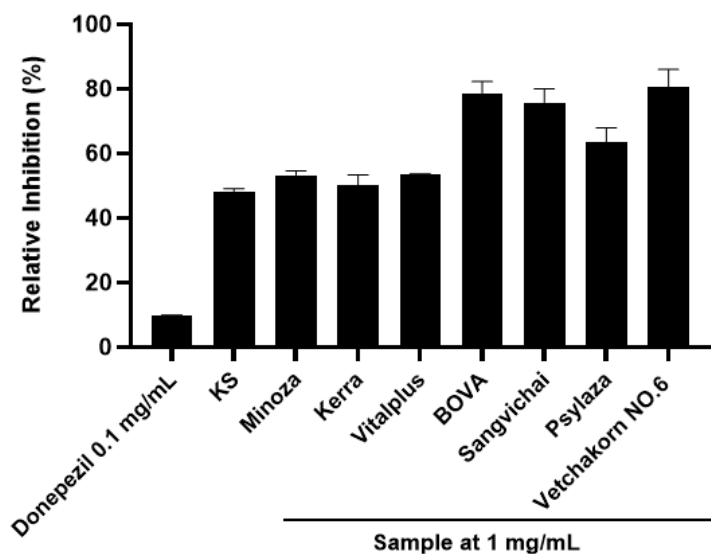
การทดสอบความสามารถของสารทดสอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) โดยใช้ชุดทดสอบ Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase assay kit (A12217) ซึ่งในการทดสอบนั้นจะใช้สารทดสอบสมุนไพรทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ KS, Minoza, Kerra, Vitalplus, BOVA, Vetchakorn NO.6, Psylaza และ Sangvichai ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL เทียบกับยามาตรฐาน Donepezil ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ซึ่งเป็นกลุ่มยารักษาโรคทางระบบประสาทหรือโรคอัลไซเมอร์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ AChE ที่ความเข้มข้น 0.1 U/mL ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Acetylcholine (Ach) Substrate ที่ความเข้มข้น 30 μ M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 96-well transparent plate และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Detector ซึ่งประกอบด้วย Horseradish peroxidase (HRP) ความเข้มข้น 1 U/mL เอนไซม์ Choline oxidase (ChO) ความเข้มข้น 0.1 U/mL และ Amplex Red reagent ความเข้มข้น 100 μ M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) เติม 1X Reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แทนสารทดสอบ และกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Positive control) เติม 1X Reaction buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารทดสอบและเอนไซม์ AChE โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นทำการวัดจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 571 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และคำนวณค่า IC_{50} โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากความชันของกราฟ โดยใช้สมการ

$$\% \text{ Relative Inhibition} = \frac{[(\text{AChE positive} - \text{AChE negative}) - (\text{AChE sample} - \text{AChE negative})]}{[(\text{AChE positive} - \text{AChE negative})]}$$

โดยกำหนดให้ Negative control : ไม่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ AChE กราฟมีความชันน้อย
Positive control : มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ AChE กราฟมีความชันมาก

ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารทดสอบสมุนไพรทั้งหมด 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เทียบกับยามาตรฐาน Donepezil ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL พบว่า สมุนไพร Vetchakorn NO.6 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งมีการยับยั้งอยู่ที่ 80.671 ± 5.355 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสารสมุนไพร BOVA และ Sanschivai โดยมีการยับยั้งอยู่ที่ 78.743 ± 3.582 และ 75.774 ± 4.285 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สมุนไพร Psylaza, Vitalplus, Minoza, และ Kerra มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระดับปานกลาง โดยมีการยับยั้งอยู่ที่ 63.653 ± 4.285 , 53.375 ± 0.311 , 53.253 ± 0.135 และ 50.002 ± 3.390 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารทดสอบสมุนไพร KS มีประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่ำหรือน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการยับยั้งอยู่ที่ 48.323 ± 0.680 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งของยามาตรฐาน Donepezil ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ดังรูปที่ 1 และตารางที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE หลังทำการทดสอบกับสารทดสอบ KS, Minoza, Kerra, Vitalplus, BOVA, Vetchakorn NO.6, Psylaza และ Sangvichai ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เปรียบเทียบกับยา Donepezil ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL

ตารางที่ 1 ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE หลังทำการทดสอบกับสมุนไพร KS, Minoza, Kerra, Vitalplus, BOVA, Vetchakorn NO.6, Psylaza และ

Sangvichai ตามลำดับ

Sample	Relative Inhibition % (Mean $\pm$ SD)
KS	48.323 $\pm$ 0.680
Minoza	53.253 $\pm$ 0.135
Kerra	50.002 $\pm$ 3.390
Vitalplus	53.375 $\pm$ 0.311
BOVA	78.743 $\pm$ 3.582
Vetchakorn NO.6	80.671 $\pm$ 5.355
Psylaza	63.653 $\pm$ 4.285
Sangvichai	75.774 $\pm$ 4.285

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ของสารทดสอบสมุนไพรทั้งหมด 8 สามารถจัดลำดับของสารสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้ดีที่สุดไปอย่างน้อยที่สุด คือ Vetchakon No.6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์สูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเท่ากับ $80.671 \pm 5.355\%$ รองลงมาคือ BOVA, Sanschivai, Psylaza, Vitalplus, Minoza, Kerra และ KS ซึ่งจากผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปพัฒนาไปเป็นยาสำหรับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ต่อไปได้