การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากน้ำมันถั่วดาวอินคา

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY AND ANTI-OXIDANT ACTIVITY OF SACHA INCHI OIL

ธนพล นิมิตธีรภาพ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
2564

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากน้ำมันถั่วดาวอินคา

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY AND ANTI-OXIDANT ACTIVITY OF SACHA INCHI OIL

ธนพล นิมิตธีรภาพ

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
2564

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากน้ำมันถั่วดาวอินคา

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY AND ANTI-OXIDANT ACTIVITY OF SACHA INCHI OIL

ธนพล นิมิตธีรภาพ

การค้นคว้าอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
2564

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ

.....ประธานกรรมการ
(ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัควรรธน์ สิทธิประภาพร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปั้นดี)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากการได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัครวรรธน์ สิทธิประภาพร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง อีกทั้ง ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์ ประธารกรรมการ และรองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปั้นดี กรรมการ ที่เสียสละเวลามาให้ข้อคิดเห็น เพื่อปรับปรุงแก้ไขการค้นคว้าอิสระนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ นางสาวกิติยา หย่างถาวร ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำ เกี่ยวกับวิธีการ ทำการทดลองของการค้นคว้าอิสระนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ทั้งเจ้าหน้าที่ และเพื่อนนักศึกษาทุกท่าน ที่เป็นส่วนหนึ่งในการทำให้ผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าอิสระนี้ได้ อย่างราบรื่น

ธนพล นิมิตธีรภาพ

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากน้ำมันถั่วดาวอินคา

ชื่อผู้เขียน ธนพล นิมิตธีรภาพ

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัครวรรธน์ สิทธิประภาพร

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ของน้ำมันถั่วดาวอินคา การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก (Positive Control) โดยฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส ใช้ยากาแลนตามีน (Galantamine) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารควบคุมเชิงบวก ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันถั่วดาวอินคาไม่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay (IC50 >100 µg/mL และ EC50 >100 µg/mL ตามลำดับ) ส่วนสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive Control) ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) คือ สาร Galantamine มีค่า IC50 เท่ากับ 0.17 ± 0.02 µg/mL และในขณะที่สารมาตรฐานเชิงบวกของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ได้แก่ สาร BHT (Butylated hydroxytoluene) มีค่า EC50 เท่ากับ 20.16 ± 1.80 µg/mL

คำสำคัญ: ถั่วดาวอินคา, เอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส , ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, DPPH

Independent Study Title Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Anti-Oxidant Activity of Sacha Inchi Oil

Author Thanaphon Nimittherapharp

Degree Master of Science (Anti-Aging and Regenerative Science)

Advisor Asst. Prof. Phakkharawat Sittiprapaporn, Ph. D.

ABSTRACT

This study was a laboratory study. To study the activity of inhibiting the enzyme acetylcholinesterase and Antioxidant activity by DPPH Scavenging Assay of Sacha Inchi Oil. The bioactivity test was repeated 3 times and the results were averaged and tested for statistical differences compared to the positive control by the activity against the enzyme acetylcholinesterase take galantamine and antioxidant activity by using BHT (Butylated hydroxytoluene) as a positive control agent. The results of the study found that Sacha Inchi Oil had no activity against acetylcholinesterase and antioxidant activity by DPPH Scavenging Assay (IC50 >100 µg/mL and EC50 >100 µg/mL, respectively) The positive control standard of the acetylcholine esterase anti-enzymatic test Acetylcholinesterase was Galantamine with an IC50 of 0.17 ± 0.02 µg/mL, while the positive standard of the DPPH Scavenging Assay was BHT (Butylated hydroxytoluene) with an EC50 of 20.16 ± 1.80. µg/mL

Keywords: Sacha Inchi Oil, Acetylcholinesterase, Antioxidant, DPPH

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ (3)

บทคัดย่อภาษาไทย (4)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (5)

สารบัญตาราง (8)

สารบัญภาพ (9)

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ภูมิหลัง ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 สมมติฐานงานวิจัย 2

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย 3

1.5 ขอบเขตการวิจัย 3

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น 4

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 โรคอัลไซเมอร์ 6

2.2 กรดไขมันโอเมก้า 3 11

2.3 ถั่วดาวอินคา 14

2.4 ถั่วดาวอินคาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
3 วิธีดำเนินการวิจัย	**20**
3.1 วิธีดำเนินงาน	20
3.2 ตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์	20
3.3 ขั้นตอนการทดลอง	21
3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	23
4 ผลการศึกษา	**24**
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส	24
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay	25
5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**26**
5.1 สรุปผลการทดลอง	26
5.2 อภิปรายผล	27
5.3 ข้อเสนอแนะ	29
รายการอ้างอิง	**30**
ประวัติผู้เขียน	**40**

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 ระยะของโรคอัลไซเมอร์ 9

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วดาวอินคา 15

4.1 สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และแปลผลการทดลอง 24

4.2 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส ของน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร Galantamine 25

4.3 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ของน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร BHT 25

5.1 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ของน้ำมันถั่วดาวอินคา 26

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
2.1 กลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์	7
2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3	11
2.3 ถั่วดาวอินคาทั้งเปลือก และถั่วดาวอินคากะเทาะเปลือกออก	14
5.1 ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย	28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นภาวะสมองเสื่อม (Dementia) ที่พบได้บ่อยที่สุด โดยอาการของโรคอัลไซเมอร์อาจเริ่มจากการสูญเสียความจำเล็กน้อย ไปจนกระทั่งส่งผลร้ายแรงต่อความสามารถในกิจกรรมในการดำเนินชีวิตประจำวันของผู้ป่วย คือ การสูญเสียความสามารถในการดำเนินชีวิตและความสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมรอบตัวได้ (Lines, 2019; ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม และธีรภัทร นวลน้อย, 2554)

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุของประเทศไทยหนึ่งในเจ็ดอันดับแรก โดยพบว่าการเกิดโรคดังกล่าวสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้น จากข้อมูลปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 600,000 คน โดยเป็นจำนวนผู้ป่วยใหม่ 100,000 รายต่อปี และคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีจำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เพิ่มสูงถึง 1,177,000 คน ในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปี ขึ้นไป จะมีสัดส่วนการเป็นโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 5-8% และเมื่อมีอายุ 80 ปี จะมีสัดส่วนการเป็นโรคอัลไซเมอร์สูงถึง 50% (มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุ, 2563)

การรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและสมองเป็นประจำ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (กรมสุขภาพจิต, 2564) จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันมีพืชหลายชนิด ถูกนำมาศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ โดยพบว่าพืชตระกูลถั่ว (legumes) และธัญพืชเต็มเมล็ดที่ไม่ผ่านการขัดสี (whole grains) (Yusufov et al., 2016) กรดไขมันโอเมก้า 3 ยังมีประโยชน์ในด้านการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุ เนื่องจาก DHA และ EPA ซึ่งเป็นโอเมก้า 3 ที่สำคัญ มีส่วนช่วยในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ (Cremonini et al., 2019; วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, 2557)

ถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis*) หรือ sacha inchi เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดจากทวีปอเมริกาใต้ อยู่ในวงศ์ Euphorbiacese และปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมในประเทศไทย จะเห็นได้จากมีการปลูกถั่วดาวอินคาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการสูง ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่สูง แต่ต้นทุนในการดูแลต่ำ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดปี (รักชนก ภูวพัฒน์, 2559)

นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับถั่วดาวอินคาออกมาจำหน่ายจำนวนมาก โดยถั่วดาวอินคาได้รับการขนานนามว่า “โอเมก้าบนดิน” เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญ และมีสารออกฤทธิ์คือ โอเมก้า โดยเฉพาะโอเมก้า 3, 6 และ 9 (วรรณทนา พันพา และคณะ, 2563)

จากคุณค่าทางโภชนาการของถั่วดาวอินคา และอีกทั้งยังเป็นพืชที่กำลังได้รับความนิยมในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันถั่วดาวอินคาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำน้ำมันถั่วดาวอินคามาต่อยอดในการพัฒนาเป็นอาหารเสริม ยา หรือผลิตภัณฑ์ทางเลือกสำหรับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์หรือผู้สูงอายุได้ในอนาคต และยังเป็นทางเลือกให้กับกลุ่มผู้ป่วยที่รับประทานอาหารประเภทมังสวิรัติหรือกลุ่มวีแก้นที่ต้องการหลีกเลี่ยงผลิตภัณฑ์จากสัตว์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสของน้ำมันถั่วดาวอินคา

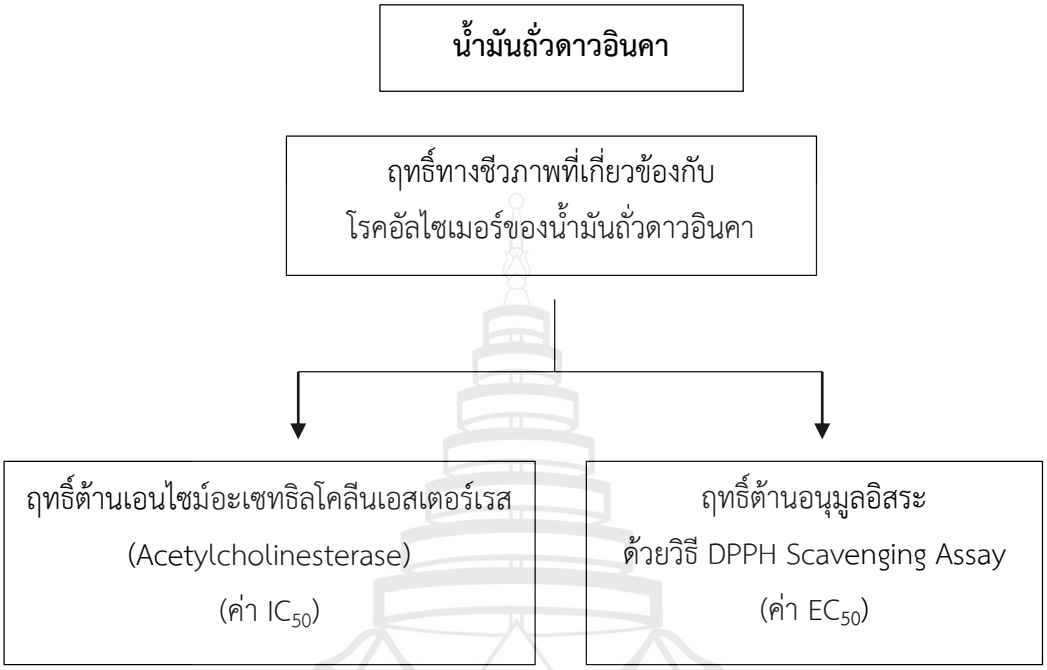
1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของน้ำมันถั่วดาวอินคา

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

1.3.1 น้ำมันถั่วดาวอินคามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยน้ำมันถั่วดาวอินคา มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างหรือน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) คือ Galantamine

1.3.2 น้ำมันถั่วดาวอินคามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay โดยน้ำมันถั่วดาวอินคา มีค่า EC_{50} ไม่แตกต่างหรือน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) คือ Butylated hydroxytoluene (BHT)

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.5 ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้ ผู้วิจัยจะทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ของน้ำมันถั่วดาวอินคา

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ของน้ำมันถั่วดาวอินคา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของแต่ละการทดสอบ โดยฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสใช้ยา กาแลนตามีน (Galantamine) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารควบคุมเชิงบวก

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้ ผู้วิจัยจะใช้น้ำมันถั่วดาวอินคา ที่สกัดด้วยวิธีบีบเย็น ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยในระหว่างการศึกษาน้ำมันถั่วดาวอินคา จะถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และเก็บให้พ้นจากแสง

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.7.1 น้ำมันถั่วดาวอินคา (Sachi Inchi Oil)

หมายถึง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis* L.) ด้วยวิธีบีบเย็น (Cold pressed)

1.7.2 เอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase, AChE)

หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายของสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ที่ synaptic cleft เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ choline และ acetic acid โดยหากสามารถยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (AChE) จะเป็นประโยชน์ทางคลินิกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสจะทำให้ สารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) มีระดับที่สูงขึ้น

1.7.3 โอเมก้า 3 (Omega 3)

หมายถึง กรดไขมัน (fatty acid) ชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีตำแหน่งพันธะคู่ (Double bond) หลายพันธะ (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) และมีพันธะคู่หนึ่ง อยู่ที่ตำแหน่งเฉพาะ คือ **ω**-3 โดยนับจากด้านปลายที่มีหมู่เมทิล (CH3-) ของกรดไขมัน

กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ กรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (**α**-linolenic acid, ALA) กรดไอโคซาเพนตาอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA) กรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (Docosahesaenoic acid, DHA)

1.7.4 โอเมก้า 6 (Omega 6)

หมายถึง กรดไขมัน (Fatty acid) ชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีตำแหน่งพันธะคู่ (Double bond) หลายพันธะ (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) และมีพันธะคู่หนึ่ง อยู่ที่ตำแหน่งเฉพาะ คือ **ω**-6 โดยนับจากด้านปลายที่มีหมู่เมทิล (CH3-) ของกรดไขมัน

กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ได้แก่ กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) กรดอะราชิโดนิก (Arachidonic acid)

1.7.5 โอเมก้า 9 (Omega 9)

หมายถึง กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid, MUFA) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นมาเองได้จากการดึงกรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 มาใช้ จึงไม่ได้ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกรดไขมันจำเป็น (Essential fatter acid) แต่ก็ถือว่าเป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกายกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 9 ได้แก่ กรดโอเลอิก (Oleic acid)

1.7.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มนุษย์สร้างขึ้นหรือสารจากธรรมชาติที่อาจป้องกันหรือชะลอความเสียหายของเซลล์บางชนิด พบว่าอาหารที่มีผักและผลไม้สูง ซึ่งเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี พบว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินซีและอี ซีลีเนียม และแคโรทีนอยด์ เช่น เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน ลูทีน และซีแซนทีน

1.7.7 สารมาตรฐานเชิงบวก (Positive Control)

โดยงานวิจัยนี้สารควบคุมเชิงบวกของการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส ใช้ยา Galantamine เป็นสารควบคุมเชิงบวก โดยแต่ละครั้งของการทดสอบ Galantamine ต้องมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.3-1 µg/mL ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ใช้สาร BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารควบคุมเชิงบวก โดยแต่ละครั้งของการทดสอบ BHT ต้องมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 10-20 µg/mL

1.7.8 ค่า IC_{50}

ค่า IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่า % enzyme activity ลดลงครึ่งหนึ่งจากค่าสูงสุด ถ้าค่า IC_{50} น้อยแสดงว่าสารมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสได้ดี

1.7.9 ค่า EC_{50}

ค่า EC_{50} (Half maximal effective concentration) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่มีผลต่อการลดจำนวนของอนุมูลอิสระลงไปครึ่งหนึ่งจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น ถ้าค่า EC_{50} น้อยแสดงว่าสารมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี

บทที่ 2

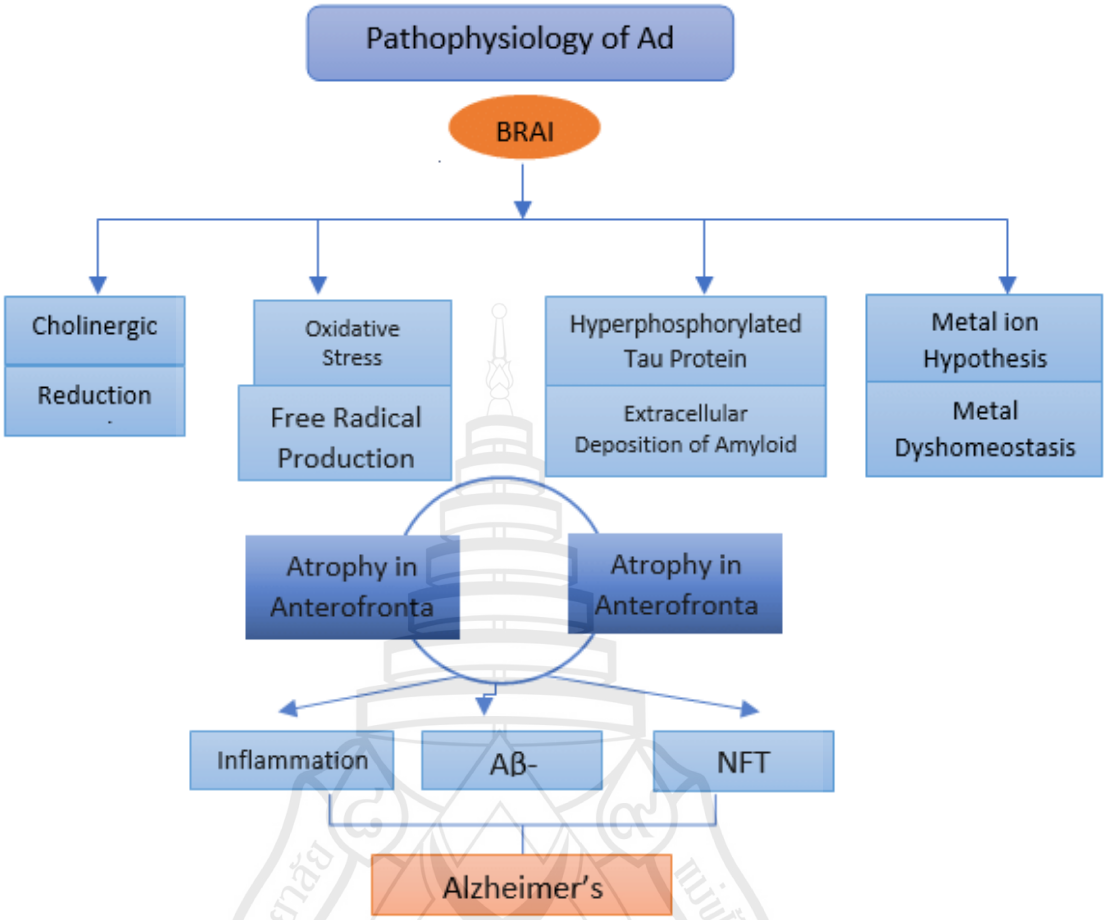
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทบทวนวรรณกรรมจากเอกสาร บทความ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยได้เรียบเรียงเนื้อหาครอบคลุมหัวข้อดังต่อไปนี้

1. โรคอัลไซเมอร์
2. กรดไขมันโอเมก้า 3
3. ถั่วดาวอินคา
4. ถั่วดาวอินคาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบได้มากที่สุด โดยอาการของโรคเริ่มจากการสูญเสียความจำเล็กน้อยและนำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการสนทนาและตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม โรคอัลไซเมอร์เกิดพยาธิสภาพสมองส่วนควบคุมความคิด ความจำ และภาษา ซึ่งอาจส่งผลร้ายแรงต่อความสามารถของผู้ป่วยในการทำกิจกรรมในชีวิตประจำวัน (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2021) ดังภาพที่ 2.1



ที่มา Gupta et al. (2020)

ภาพที่ 2.1 กลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์

2.1.1 กลไกการเกิด อาการดำเนินโรค และการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์

อาการแรกเริ่มที่สำคัญของผู้ป่วยอัลไซเมอร์คือการสูญเสียความจำระยะสั้น ซึ่งเป็นอาการที่ใกล้เคียงกับภาวะความจำเสื่อมตามธรรมชาติในผู้สูงอายุ แต่เมื่อเวลาผ่านไปผู้ป่วยร้อยละ 80-90 จะมีอาการทางพฤติกรรมหรือทางจิตเวชร่วมด้วย ซึ่งอาการทางพฤติกรรมนี่เองที่ทำให้การดูแลผู้ป่วยเป็นไปอย่างยากลำบากมากขึ้น โดยเฉพาะรายที่มีอาการก้าวร้าว อาการทั่วไปของโรคอัลไซเมอร์อาจแบ่งได้เป็นสามระยะ ได้แก่

2.1.1.1 ระยะแรก ผู้ป่วยจะมีความจำถดถอยจนตัวเองรู้สึกได้ ชอบถามซ้ำ พูดซ้ำๆ เรื่องเดิม สับสนทิศทาง เริ่มเครียด อารมณ์เสียง่ายและซึมเศร้า แต่ยังสื่อสารและทำกิจวัตรประจำวันได้ ระยะนี้เป็นระยะที่คนรอบข้างยังสามารถดูแลได้

2.1.1.2 ระยะกลาง ผู้ป่วยมีอาการชัดเจนขึ้น ความจำแย่ลงอีก เดินออกจากบ้านไปโดยไม่มีจุดหมาย พฤติกรรมเปลี่ยนไปมาก เช่น จากที่เป็นคนใจเย็นก็กลายเป็นหงุดหงิดฉุนเฉียว ก้าวร้าว พูดจาหยาบคาย หรือจากที่เป็นคนอารมณ์ร้อนก็กลับกลายเป็นเงียบขรึม และเมื่อเวลาผ่านไป ผู้ป่วยจะเริ่มมีปัญหาในการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น ชงกาแฟไม่ได้ ใช้รีโมททีวีหรือโทรศัพท์มือถือไม่ได้ คิดอะไรที่ไม่ถูกต้อง ไม่อยู่ในโลกของความจริง เช่น คิดว่าจะมีคนมาฆ่า มาขโมยของ คิดว่าคู่สมรสนอกใจ ซึ่งเหล่านี้ล้วนเป็นอาการที่ยากต่อการดูแลและเข้าสังคม

2.1.1.3 ระยะท้าย ผู้ป่วยอาการแย่ลง ตอบสนองต่อสิ่งรอบข้างน้อยลง สุขภาพทรุดโทรมลงคล้ายผู้ป่วยติดเตียง รับประทานได้น้อยลง การเคลื่อนไหวน้อยลงหรือไม่เคลื่อนไหวเลย ช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ สมองเสื่อมเป็นวงกว้าง ไม่พูดจา ภูมิคุ้มกันอ่อนแอ ซึ่งมักนำไปสู่การติดเชื้อและเสียชีวิตในที่สุด โดยระยะเวลาทั้งหมดตั้งแต่แรกวินิจฉัยจนเสียชีวิตเฉลี่ยประมาณ 8-10 ปี

อาการดำเนินโรคอัลไซเมอร์จะค่อยเป็นค่อยไป เริ่มจากระยะแรกจะเสียความจำระยะสั้น ขาดสมาธิ แต่อาการในระยะนี้จะวินิจฉัยได้ยากเนื่องจากเป็นอาการที่เกิดกับผู้สูงอายุส่วนใหญ่ ในระยะที่สองจะมีปัญหาในเรื่องวันเวลาและสถานที่ อาจเกิดการหลงทางกลับบ้านไม่ถูก ลืมชื่อญาติหรือผู้ดูแล เกิดภาวะหลงผิดจากความเป็นจริงหรือหวาดระแวง ประสาทหลอน นอนไม่หลับ ก้าวร้าว หงุดหงิด วิตกกังวล เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 ระยะของโรคอัลไซเมอร์

ระยะ	ผลกระทบต่อชีวิตประจำวัน	การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม	การเปลี่ยนแปลงของความจำ
เริ่มต้น (คะแนน MMSE ≥21)	หลงทางในสถานที่ที่คุ้นเคย ดำเนินกิจกรรมในชีวิตประจำวันได้ แต่เป็นไปอย่างยากลำบาก เช่น การจัดการเรื่องเงิน ลืมการนัดหมาย	มีความวิตกกังวลหรือความเครียด หลีกหนีการเข้าร่วมสังคม	สูญเสียความจำระยะสั้น ลืมสิ่งของ และหาสิ่งของเป็นไปอย่างยากลำบาก ไม่สามารถจำชื่อหรือสิ่งของได้เป็นบางครั้ง
ปานกลาง (คะแนน MMSE 10-20)	ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมในชีวิตประจำวันได้ เช่น การปรุงอาหาร หรือการดูแลตนเอง ต้องมีผู้ดูแล	เครียด หวาดระแวง มีปัญหาเรื่องการนอนหลับ มีปัญหาเกี่ยวกับอารมณ์ เช่น ไม่ได้ตามที่ตนต้องการ ก้าวร้าว เกิดภาวะหลงผิดจากความเป็นจริงหรือหวาดระแวง	ตอบโต้บทสนทนาเป็นไปอย่างยากลำบาก ไม่สามารถจำสมาชิกในบ้าน หรือผู้ดูแลได้
รุนแรง (คะแนน MMSE <10)	ไม่สามารถควบคุมการขับถ่ายทั้งอุจจาระและปัสสาวะ		สูญเสียการตัดสินใจ สูญเสียความสามารถในการพูด หรือความสามารถในการแก้ไขปัญหา

ที่มา Savva et al. (2009)

การวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์แพทย์จะทำการตรวจร่างกายร่วมกับการทำแบบประเมินการทำงานของสมอง เช่น แบบทดสอบ MMSE (Mini mental state examination) เพื่อยืนยันภาวะสมองเสื่อมถอยที่มีผลต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน สติปัญญา การตัดสินใจ และอารมณ์ของผู้ป่วย ซึ่งคะแนนสูงสุดของแบบทดสอบ MMSE คือ 30 คะแนน โดยระยะเริ่มต้น คะแนนอยู่ระหว่าง 21-30 ระยะปานกลาง คะแนนอยู่ระหว่าง 10-20 และระยะรุนแรง คะแนนน้อยกว่า 10 คะแนน

2.1.2 การรักษาโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาด สมองจะค่อย ๆ เสื่อมลงไปโดยไม่สามารถฟื้นคืนกลับมาได้ แต่การนำผู้ป่วยมาพบแพทย์ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นจะช่วยยืดระยะเวลาการดำเนินโรค เพิ่มคุณภาพชีวิตของทั้งผู้ป่วยและผู้ดูแล และป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ได้ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นเป้าหมายหลักของการรักษาโรคอัลไซเมอร์ สำหรับวิธีการดูแลรักษาผู้ป่วยมี 2 รูปแบบ คือ

2.1.2.1 การรักษาด้วยการใช้ยา โดยเป็นยาที่ช่วยควบคุมอาการต่าง ๆ ให้น้อยลงชั่วคราวแต่อาจไม่ช่วยในเรื่องของความจำมากนัก ยาดังกล่าวจะเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ที่มาทำลายสารสื่อประสาทอะเซทธิลโคลีน เพื่อเพิ่มหรือปรับระดับของสารอะเซทธิลโคลีนไม่ให้ลดลงมากจนเกินไป ผู้ป่วยจึงสามารถใช้ชีวิตได้ใกล้เคียงปกติ มีความสุขสดชื่นขึ้น ขณะเดียวกันผู้ดูแลก็ดูแลได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการทางพฤติกรรมที่ค่อนข้างรุนแรง เช่น ก้าวร้าวมาก แพทย์อาจพิจารณาให้ยาทางจิตเวชควบคู่กันไปด้วย

2.1.2.2 การรักษาโดยไม่ใช้ยา เป็นการดูแลสมองและสุขภาพโดยรวมของผู้ป่วย อาทิ

1. จัดให้ผู้ป่วยออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ มีการศึกษาพบว่าการออกกำลังกายแบบคาร์ดิโอ (cardio exercise) ที่เน้นการเสริมสร้างความแข็งแรงของหัวใจและปอด เช่น การเดิน วันละ 20 นาที 4 วันต่อสัปดาห์จะช่วยให้สมองสดชื่นและยืดระยะเวลาการดำเนินโรคได้

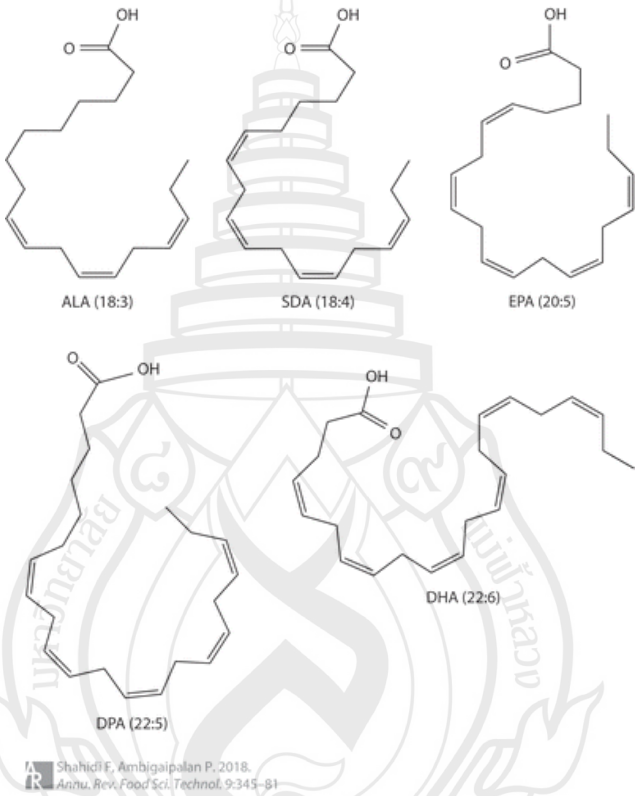
2. มีกิจกรรมให้ผู้ป่วยได้ออกไปนอกบ้านเป็นระยะ ๆ เพื่อพบปะผู้คน พูดคุยกับเพื่อนฝูง ญาติพี่น้องคนอื่น ๆ นอกเหนือจากสมาชิกในบ้าน

3. ดูแลให้ผู้ป่วยได้นอนหลับอย่างมีคุณภาพตามสุขลักษณะการนอน เช่น ไม่ดื่มสารคาเฟอีนในช่วงเย็นหรือก่อนนอน ไม่ออกกำลังกายใกล้กับเวลานอน เข้านอนและตื่นนอนตรงเวลา ปรับความสว่างในห้องนอนให้มืดพอดี เพราะหากวงจรการนอนไม่ดีจะส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย ความดันโลหิต น้ำหนัก และรวมถึงความจำด้วย

4. ดื่มน้ำให้พอเพียง เพื่อป้องกันภาวะเลือดหนืดหรือเลือดข้นซึ่งทำให้เลือดไหลเวียนไม่สะดวก สมองไม่สดชื่น หากไม่มีข้อห้าม เช่น มีโรคหัวใจหรือโรคไต ควรดื่มน้ำวันละ 2 ลิตรเป็นอย่างน้อย

2.2 กรดไขมันโอเมก้า 3

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ได้แก่ กรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (ALA; 18:3 **ω**-3), กรดสเตียริโดนิก (SDA; 18:4 **ω**-3), กรดไอโคซาเพนทาอีโนอิก (EPA; 20:5 **ω**-3) , กรดโดโคซาเพนทาอีโนอิก (DPA; 22:5 **ω**-3) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA; 22:6 **ω**-3)



หมายเหตุ กรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (ALA), กรดสเตียริโดนิก (SDA), กรดไอโคซาเพนทาอีโนอิก (EPA), กรดโดโคซาเพนทาอีโนอิก (DPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA)

ที่มา Shahidi and Ambigaipalan (2018)

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3

แหล่งที่สำคัญที่สุดของกรดโอเมก้า 3 คือ ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช และปลา โดยที่ปลาเป็นแหล่งหลักของ EPA และ DHA สำหรับมนุษย์ (Mori, 2017) เนื่องจากอาหารของปลาหลายชนิดเป็นสาหร่ายที่อุดมไปด้วย EPA และ DHA และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่กินสาหร่าย เช่น ปลาหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล (Fialkow, 2016; Monroig et al., 2013) สาหร่ายขนาดเล็กมีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนขั้นต้นและเป็นแหล่งหลักของพวกมันในน้ำทะเล สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลยังเป็นแหล่งที่สำคัญและเป็นแหล่งพื้นฐานของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 เนื่องจากความสามารถในการสังเคราะห์บางส่วนของพวกมัน เช่น หอยนางรม *Crassostrea gigas* สามารถผลิต EPA และ DHA โดยการบริโภคสาหร่ายขนาดเล็กที่ไม่มีทั้งสองอย่าง (Monroig et al., 2013) อาหารทะเลมีกรดโอเมก้า 3 ที่มีคุณค่ามากมาย อย่างไรก็ตาม การบริโภคบ่อยครั้งทำให้ร่างกายมนุษย์ได้รับผลกระทบจากพิษต่อระบบประสาทของเมทิลเมอร์คิวรี ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางของทารกในครรภ์ (Puri et al., 2016) ดังนั้นจึงแนะนำให้เลือกแหล่งอื่นของกรดไขมันเหล่านี้และรวมไว้ในอาหารที่สมดุล (Cholewski et al., 2018) เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช

จากการศึกษา Meta-analysis พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างการบริโภคอาหารกับระดับ DHA ในพลาสมากับความจำในผู้ใหญ่ (Yurko-Mauro et al., 2015) ความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างการบริโภค DHA กับความเสี่ยงของภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์ จากการศึกษาเชิงสังเกต (Zhang et al., 2016) การศึกษาหลังชันสูตรพลิกศพรายงานว่า สมองของผู้ที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มี DHA น้อยกว่าผู้ที่ไม่มีโรค (Soderberg et al., 1991; Cunnane et al., 2012; de Wilde et al., 2017) และมีงานวิจัยที่มีการเชื่อมโยงระหว่างระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ในเลือดต่ำกับภาวะสมองเสื่อม (Conquer et al., 2000; Heude et al., 2003; Tully et al., 2003) ปริมาณ phosphatidylcholine DHA ในพลาสมาที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่ลดลง 47% ของการเกิดภาวะสมองเสื่อมจากทุกสาเหตุและลดความเสี่ยงต่อโรคอัลไซเมอร์ 39% (Schaefer et al., 2006) Sinn et al. (2012) รายงานว่า EPA และ DHA (1.8 กรัม/วัน เป็นเวลา 6 เดือน) ช่วยลดอาการซึมเศร้าและภาวะความจำเสื่อมในผู้ใหญ่ อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับยาหลอก การเสริมด้วย DHA 1.7 กรัม และ EPA 0.6 กรัม ทุกวันเป็นเวลา 6 เดือนไม่ส่งผลต่อคะแนนการตรวจสภาพจิตในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่ได้รับการรักษาด้วยตัวยับยั้ง acetylcholine esterase (Freund-Levi et al., 2006) อย่างไรก็ตาม กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการการวัดคะแนนการประเมินโรคอัลไซเมอร์ และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ในพลาสมา (Eriksdotter et al., 2015) นี่แสดงให้เห็นว่าผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของการประเมินสุขภาพความรู้ความเข้าใจ นอกจากนี้ การวิเคราะห์กลุ่มย่อยยังแสดงให้เห็นประโยชน์ของกรดไขมัน

ไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ในกลุ่มที่ความรู้ความเข้าใจลดลงเล็กน้อยที่การตรวจวัดพื้นฐาน (Freund-Levi et al., 2006) การศึกษา Meta-analysis จำนวน 6 งานวิจัยที่ศึกษาด้วยวิธี RCTs ที่มีระยะเวลา 3-40 เดือน และใช้ EPA และ DHA 0.14 ถึง 1.8 กรัมต่อวัน ระบุอัตราที่ช้าลงของภาวะสมองเสื่อมในผู้ที่ได้รับกรดไขมันโอเมก้า 3 (Burckhardt et al., 2016) ในขณะที่การทบทวนอย่างเป็นระบบได้ข้อสรุปว่า ผลที่เป็นประโยชน์มากที่สุดของการเสริม EPA และ DHA ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์สามารถคาดหวังได้ในระยะแรกของโรค (Canhada et al., 2018) การค้นพบนี้ทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าผู้ที่มีภาวะความจำเสื่อมในระยะเริ่มต้น ที่มีความรู้ความเข้าใจลดลงจะเป็นกลุ่มเป้าหมายที่ดีสำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 อย่างไรก็ตาม อาจเป็นประโยชน์มากกว่าที่จะเริ่มต้นโดยการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ก่อนที่จะเกิดภาวะความจำเสื่อม (Coley et al., 2018) ในบริบทนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 ในผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี ส่งผลดีต่อความสมบูรณ์ของเนื้อสมอง (Witte et al., 2014) ดังนั้นการใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-3 อาจมีศักยภาพในการรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ

ALA มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ป้องกันระบบประสาท และช่วยกล่อมประสาท (Baker et al., 2016; Blondeau et al., 2015) นอกจากนี้การบริโภค ALA ที่เพิ่มขึ้นอาจสร้างการป้องกันโรคหัวใจในระดับปานกลางโดยการลดคอเลสเตอรอลรวมและ LDL (เทียบกับกรดไขมันอิ่มตัว) รักษาการทำงานของเยื่อบุผนังหลอดเลือดผ่านฤทธิ์ต้านลิ่มเลือดและต้านการอักเสบ (Sokoła-Wysoczańska et al., 2018; Bork et al., 2019)

2.3 ถั่วดาวอินคา

ถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis*) หรือ sacha inchi เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดจากทวีปอเมริกาใต้ อยู่ในวงศ์ Euphorbiacese และปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมในประเทศไทย จะเห็นได้จากมีการปลูกถั่วดาวอินคาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการสูง ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่สูง แต่ต้นทุนในการดูแลต่ำ เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดปี (รักชนก ภูวพัฒน์, 2559)

ที่มา Wang et al. (2018)

ภาพที่ 2.3 ถั่วดาวอินคาทั้งเปลือก และถั่วดาวอินคากะเทาะเปลือกออก

ถั่วดาวอินคาปัจจุบันมีการใช้เมล็ดพืชเป็นหลักในการผลิตน้ำมัน นอกจากนี้เมล็ดและใบที่ต้มหรือคั่วแล้วยังสามารถรับประทานได้ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าถั่วอินคามีสารประกอบที่ส่งเสริมสุขภาพหลายอย่าง เช่น สารประกอบฟีนอล โทโคฟีรอล และไฟโตสเตอรอล เมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตั้งแต่ 64.6 ถึง 80 มก. เทียบเท่ากรดแกลลิก/100 กรัมต่อเมล็ด ซึ่งสูงกว่าในอัลมอนด์และแมคคาเดเมีย สาร β-sitosterol เป็นไฟโตสเตอรอลที่มีมากที่สุด (45.2–50.8 mg/100 g เมล็ด) ที่พบในเมล็ด ตามด้วย stigmasterol และ campesterol ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ถั่วดาวอินคาไม่ได้เป็นแหล่งที่ดีของแคโรทีนอยด์ เนื่องจากมีแคโรทีนอยด์รวมในปริมาณต่ำ (0.07–0.09 มก. ของแคโรทีนเทียบเท่าใน 100 กรัมต่อเมล็ด) แต่ที่น่าสนใจคือ น้ำมันจากเมล็ดสกัดเย็นเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีสุขภาพดีเนื่องจาก

มีระดับกรดไขมันจำเป็นสูง รวมทั้งกรดไขมันโอเมก้า-3 และกรดไขมันโอเมก้า-6 ซึ่งวัดได้ที่ประมาณ 47–51% และ 34–37% ตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำมันถั่วดาวอินคายังมีปริมาณกรดไขมันโอเมก้า-6 สูงที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันมะกอก ถั่วเหลือง ข้าวโพด และดอก น้ำมันถั่วดาวอินคาได้รับการพิสูจน์แล้วว่า มีความปลอดภัย และยังสามารถเพิ่ม HDL ในมนุษย์ได้ ดังนั้นน้ำมันถั่วดาวอินคาซึ่งขณะนี้มีวางจำหน่ายทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเป็นน้ำมันที่บริโภคได้ แสดงให้เห็นถึงมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สูง ด้วยสภาพอากาศเขตร้อนที่เกือบจะเหมือนกัน ถั่วดาวอินคาจึงถูกนำเข้ามาเพื่อปลูกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากการผลิตน้ำมันแล้ว เมล็ดถั่วดาวอินคายังสามารถคั่วเล็กน้อยและเสิร์ฟพร้อมกับเกลือเป็นอาหารว่าง เช่น ถั่วลิสงเค็ม ในขณะที่ใบแห้งสามารถทำเป็นชาได้ มีความต้องการเพิ่มขึ้นในประเทศไทยสำหรับเมล็ดคั่วและชาถั่วดาวอินคา (Srichamnong et al., 2018)

2.4 ถั่วดาวอินคาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วดาวอินคา

การทดสอบ	วิธีการสกัด	ผลการศึกษา	แหล่งอ้างอิง
ORAC assay	สารสกัดจากเมทานอล และไดคลอโรมีเทน	เมล็ดจาก 16 สายพันธุ์มีความหลากหลายในความสามารถในการไฮโดรฟิลิก ไลโปฟิลิก และสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด ซึ่งอยู่ในช่วง 4.3–7.3, 1.0–2.8 และ 6.5–9.8μmol เทียบเท่าโทรลอกซ์/กรัม เมล็ดตามลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ชอบน้ำและไลโปฟิลิกมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกและแคโรทีนอยด์ทั้งหมดตามลำดับ ปริมาณโทโคฟีรอล α-, β-, γ-, δ- และโทโคฟีรอลทั้งหมดมีอิทธิพลน้อยที่สุดต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ lipophilic	Chirinos et al. (2013)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

การทดสอบ	วิธีการสกัด	ผลการศึกษา	แหล่งอ้างอิง
DPPH assay	เมล็ดดิบหรืออบด้วยความร้อน	เมล็ดดิบและเมล็ดแปรรูปแปรผันตามค่า DPPH โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ค่า DPPH ของเมล็ดดิบ ต้มแบบเปิด ต้มแรงดัน ต้มสุญญากาศ คั่วที่อุณหภูมิต่ำ คั่วที่อุณหภูมิสูง และเมล็ดคั่วน้ำผึ้งเท่ากับ 2.4, 2.2, 2.4, 2.6, 1.9, 2.2 และ 2.1mmol TE/100g ตามลำดับ	Sterbova et al. (2017)
ABTS, FRAP, and ORAC assays	สารสกัดเมทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19/1, v/v/v), อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19/1, v/v/v), เอทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19 /1, v/v/v), เอทานอล/อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (40/40/10 /1, v/v/v/v), เอทานอล/เมทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (40/40/10/1, v/v/v/v)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบ ABTS, FRAP และ ORAC (34.1–93.9, 45.0–114.0 และ 92.5–192.6 μmol TE/g ตามลำดับ) แปรผันในสารสกัดจากเปลือกโดยใช้ตัวทำละลายการสกัดที่แตกต่างกัน อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก และเอธานอล/อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติกให้ค่า ABTS, FRAP และ ORAC สูงสุดตามลำดับ แทนนินควบแน่น กรดฟีนอลิกอิสระและจับแทนนินที่ย่อยสลายได้ ฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอยด์ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเปลือกเมล็ด	Chirinos et al. (2016)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

การทดสอบ	วิธีการสกัด	ผลการศึกษา	แหล่งอ้างอิง
TAC and DPPH assays	สารสกัดน้ำ, เมทานอล, เอทานอล, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน	TAC และ DPPH ของสารสกัดจากใบอยู่ในช่วง 59.31 ถึง 97.76 เทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก/กรัมและ 62.8–88.3% ตามลำดับ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และสารประกอบฟีนอลิก (ฟลาโวนอยด์) เป็นตัวแทนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบ	Nascimento et al. (2013)
ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้รับการทดสอบในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์และแผ่นแยกผิวหนังมนุษย์	น้ำมันบริสุทธิ์พิเศษที่มีจำหน่ายในท้องตลาด	น้ำมันไม่เป็นพิษต่อ keratinocytes หรือ explants ของมนุษย์ และไม่ใช่สารฆ่าเชื้อแบคทีเรียสำหรับ Staphylococcus aureus การเกาะติดของน้ำมันของ S. aureus กับ keratinocytes (ผลเชิงป้องกัน) และกำจัด S. aureus ออกจาก keratinocytes และ explants ของผิวหนังมนุษย์ (ผลการรักษา)	Gonzalez-Aspajo et al. (2015)
ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหนูที่มีเนื้องอก	น้ำมันจากเมล็ด	ให้อาหารที่มีน้ำมันถั่วดาวอินคาในหนู (ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม/กิโลกรัม ทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์) พบว่าลดมวลเนื้องอกและการแพร่กระจายของเนื้องอก Walker 256 Cells ex vivo และการแสดงออกของ COX-2 ในเนื้อเยื่อเนื้องอก Walker 256	Gonzalez-Aspajo et al. (2015)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

การทดสอบ	วิธีการสกัด	ผลการศึกษา	แหล่งอ้างอิง
		อาหารที่มีน้ำมันเพิ่ม lipoperoxidation ในเนื้อเยื่อเนื้องอก อาหารที่มีน้ำมันช่วยลดภาวะไขมันในเลือดสูง, ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ, การลดน้ำหนักของร่างกาย, ระดับไซโตไคน์อักเสบในพลาสมา [ปัจจัยการตายของเนื้องอก-α (TNF-α)] และ interleukin IL-6 ของหนูที่มีเนื้องอก Walker 256	
ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ได้รับการทดสอบในเซลล์ปกติ 2 เซลล์ (3T3, CHO) และ 2 เซลล์เนื้องอก (HeLa, A549) โดยการทดสอบ MTT	สารสกัดน้ำ เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม เฮกเซน	สารสกัดจากใบยับยั้งเซลล์มะเร็ง HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ A549 (เซลล์เนื้องอกจากเนื้อเยื่อปอด) Terpenoids, saponins และ flavonoids เป็นตัวแทนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใบที่มีฤทธิ์ต้านการงอกขยายของเซลล์มะเร็งบางชนิด สารสกัดเมทานอลมีผลต้านโพลิเฟอเรชั่นสูงสุด สารสกัดจากใบทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (ระยะต้นและปลาย)	Nascimento et al. (2013)
Antidyslipidemic activity ทดสอบในคน	น้ำมันจากเมล็ด	ผู้ป่วย 24 รายที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง ได้รับน้ำมันถั่วดาวอินคา 5 หรือ 10 มล. เป็นเวลา 4 เดือน ปริมาณน้ำมันที่บริโภคเข้าไปลดคอเลสเตอรอลรวมและ	Garmendia et al. (2011)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

การทดสอบ	วิธีการสกัด	ผลการศึกษา	แหล่งอ้างอิง
Antidyslipidemic activity ในหนู	น้ำมันจากเมล็ด	กรดไขมันที่ไม่เป็นเอสเทอร์ริฟายด์ ในขณะที่เพิ่มขึ้นและ HDL ปริมาณน้ำมัน (10 มล.) เพิ่มระดับอินซูลินหนู Holtzman เพศผู้ได้รับน้ำมันที่ 0.5 มล./กก. ของน้ำหนักตัวหนูเป็นเวลา 60 วัน อาหารที่มีน้ำมันช่วยปรับปรุงการทำงานของตับโดยการลดระดับคอเลสเตอรอลไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่ม HDL ของหนู	Garmendia et al. (2011)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีดำเนินงาน

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้ รูปแบบการศึกษาเป็นการศึกษาเชิงห้องปฏิบัติการ (Laboratory study) โดยผู้วิจัยนำตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay โดยนำผลการศึกษาที่ได้จะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง โดยนำมาหาค่าเฉลี่ย และในส่วนของฤทธิ์ทางชีวภาพจะนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติกับสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control)

3.2 ตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

3.2.1 ตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้ ศึกษาในตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา แบบบีบเย็น 100% โดยเก็บรักษาตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคาที่อุณหภูมิห้อง และเก็บให้พ้นจากแสงตลอดศึกษา

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.2.2.2 Absolute Ethanol, AR grad

3.2.2.3 Butylated hydroxytoluene (BHT)

3.2.2.4 Acetylcholine Iodide (ACTI)

3.2.2.5 5, 5’-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid, DTNB)

3.2.2.6 Galantamine

3.2.2.7 AChE (from electric eel, type VI-S lyophilized powder)

3.2.2.8 น้ำกลั่น

3.2.2.9 น้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water)

3.2.3 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.3.1 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร

3.2.3.2 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร

3.2.3.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 5,000 ไมโครลิตร

3.2.3.4 เครื่องดูดจ่ายสารหลายตำแหน่งชนิด 8 ตำแหน่ง (Multichannel pipette)

3.2.3.5 เครื่อง Microplate Reader (BioTek™)

3.2.3.6 เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.3.7 เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 5 ตำแหน่ง

3.2.3.8 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

3.2.3.9 96-well plate

3.2.3.10 แผ่นอะลูมิเนียมห่ออาหาร

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

3.3.1 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) ทดสอบตามวิธีของ Senavong et al. (2014)

3.3.1.1 เติมสาร DTNB ความเข้มข้น 3 mM ปริมาตร 125 µL ลงใน 96-well plate

3.3.1.2 เติมสาร ACTI ความเข้มข้น 15 mM ปริมาตร 25 µL

3.3.1.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 50 µL

3.3.1.4 เติมตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา ปริมาตร 25 µL

3.3.1.5 เติมเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (AChE) ปริมาตร 25 µL

3.3.1.6 อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยวัดแบบ Mode Kinetic ทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลานาน 2 นาที ด้วยเครื่อง Microplate Reader

3.3.1.7 คำนวณ % Inhibition ด้วยสูตรดังนี้

% Inhibition = 100% - % enzyme activity

3.3.1.8 นำค่า % Inhibition ของแต่ละความเข้มข้น มาคำนวณหาค่า IC_{50}

3.3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันถั่วดาวอินคา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPPH Scavenging Assay ตามวิธีของ Phuaklee et al. (2019)

3.3.2.1 เตรียมสารละลาย DPPH ละลายใน Absolute Ethanol ที่ความเข้มข้น 6×10^{-5} mM (เก็บสารละลายในพ้นแสงด้วยการห่อฟอยล์)

3.3.2.2 เตรียมตัวอย่างน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร BHT ซึ่งเป็นสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive Control) โดยละลายใน Absolute Ethanol ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

3.3.2.3 เจือจางน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร BHT ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ 100, 50, 10 และ 1 mg/mL]

3.3.2.4 หยอดน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร BHT ในแต่ละระดับความเข้มข้นจากข้อ 3.3.2.3 ลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 100 µL

3.3.2.5 เติมสารละลาย DPPH ลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 100 µL

3.3.2.6 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที และเก็บให้พ้นแสงด้วยการห่อฟอยล์

3.3.2.7 นำ 96-well plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

3.3.2.8 คำนวณ % Inhibition ด้วยสูตรดังนี้

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

3.3.2.9 นำค่า % Inhibition ของแต่ละความเข้มข้น มาคำนวณหาค่า EC_{50}

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.4.1 ผลการศึกษาของฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (n=3) จากนั้นคำนวณเป็นค่า IC_{50} (ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส) หรือค่า EC_{50} (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) และนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.2 ผลการศึกษาของฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ นำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติกับสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control) โดยสารมาตรฐานเชิงบวกของฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ Galantamine และ Butylated hydroxytoluene (BHT) ตามลำดับ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้สถิติ t-test one sample และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ p-value < 0.05

3.4.3 ในกรณีที่ผลการศึกษาของฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} หรือ ค่า EC_{50} >100 µg/mL ตามลำดับ จะไม่สามาถนำมีวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติได้ เนื่องจากสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control) มีความแตกต่างของความเข้มข้นที่จะใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากเกินไป

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการวิจัยทางห้องปฏิบัติการ โดยได้นำน้ำมันถั่วดาวอินคาแบบบีบเย็นมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay โดยนำผลการศึกษาที่ได้ ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และนำมาหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 4.1 สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และแปลผลการทดลอง

สัญลักษณ์	ความหมาย
n	จำนวนตัวอย่าง
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)
IC_{50}	ความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่า % enzyme activity ลดลงครึ่งหนึ่งจากค่าสูงสุด
EC_{50}	ค่าความเข้มข้นของสารที่มีผลต่อการลดจำนวนของอนุมูลอิสระลงไปครึ่งหนึ่งจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) ทดสอบตามวิธีการของ Senavong et al. (2014)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส พบว่าสาร Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสดีกว่าน้ำมันถั่วดาวอินคา โดยจากผลการทดสอบพบว่า

น้ำมันถั่วดาวอินคา มีค่า IC_{50} >100 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control) คือ สาร Galantamine มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.17 ± 0.02 µg/mL

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสของน้ำมันถั่วดาวอินคา และ สาร Galantamine

ตัวอย่าง	IC_{50} (µg/mL)
น้ำมันถั่วดาวอินคา	>100
Galantamine (Positive Control)	0.17 ± 0.02

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, n = 3

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันถั่วดาวอินคา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPPH Scavenging Assay ตามวิธีของ Phuaklee et al. (2019)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay พบว่าสาร BHT มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดีกว่าน้ำมันถั่วดาวอินคา โดยจากผลการทดสอบพบว่าน้ำมันถั่วดาวอินคา มีค่า EC_{50} >100 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control) คือ สาร BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 20.16 ± 1.80 µg/mL

ตารางที่ 4.3 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ของน้ำมันถั่วดาวอินคา และสาร BHT

ตัวอย่าง	EC_{50} (µg/mL)
น้ำมันถั่วดาวอินคา	>100
BHT (Positive Control)	20.16 ± 1.80

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD, n = 3

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าอิสระครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ของน้ำมันถั่วดาวอินคา ที่ได้จากการบีบเย็น ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

จากการศึกษาพบว่า น้ำมันถั่วดาวอินคาที่ได้จากการบีบเย็น ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสและไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay (IC_{50} >100 µg/mL และ EC_{50} >100 µg/mL ตามลำดับ) ส่วนสารมาตรฐานเชิงบวก (Positive control) ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส (Acetylcholinesterase) คือ สาร Galantamine มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.17 ± 0.02 µg/mL และในขณะที่สารมาตรฐานเชิงบวกของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ได้แก่ สาร BHT (Butylated hydroxytoluene) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 20.16 ± 1.80 µg/mL

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ของน้ำมันถั่วดาวอินคา

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้าน AChE IC_{50} (µg/mL)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ EC_{50} (µg/mL)
น้ำมันถั่วดาวอินคา	>100	>100
Galantamine (Positive control)	0.17 ± 0.02	-
BHT (Positive control)	-	20.16 ± 1.80

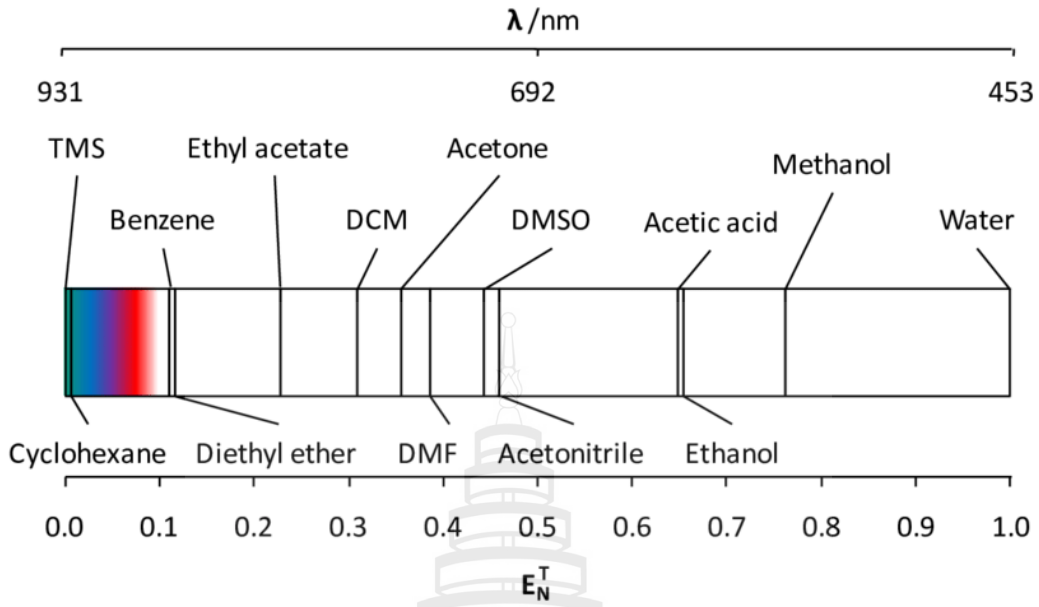
5.2 อภิปรายผล

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าน้ำมันถั่วดาวอินคาที่ได้จากการบีบเย็น ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์อะเซทธิลโคลีนเอสเตอร์เรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay อาจเป็นไปได้ว่า น้ำมันถั่วดาวอินคาที่นำมาศึกษา เป็นน้ำมันที่ได้จากการบีบเย็นแบบ commercial อาจไม่มีการควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบตั้งแต่แหล่งเพาะปลูก การควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบตาม Thai Herbal Pharmacopeia (THP) จึงทำให้น้ำมันที่ได้มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงเพียงพอในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากงานวิจัยของ Chirinos et al. (2016) พบว่าถั่วดาวอินคาที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19/1, v/v/v) , อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19/1, v/v/v), เอทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (80/19 /1, v/v/v), เมทานอล/อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (40/40/10/1, v/v/v/v), เอทานอล/อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (40/40/10 /1, v/v/v/v), เอทานอล/เมทานอล/น้ำ/กรดอะซิติก (40/40/10/1, v/v/v/v) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบ ABTS, FRAP และ ORAC (34.1–93.9, 45.0–114.0 และ 92.5–192.6 μmol TE/g ตามลำดับ) ซึ่งแปรผันตามการเลือกใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยการสกัดด้วย อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก และเอธานอล/อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติกให้ค่า ABTS, FRAP และ ORAC สูงสุดตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chirinos et al. (2013) ที่พบว่าสารสกัดจากเมทานอล และไดคลอโรมีเทนของเมล็ดจาก 16 สายพันธุ์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด ซึ่งอยู่ในช่วง 4.3–7.3, 1.0–2.8 และ 6.5–9.8μmol เทียบเท่าโทรลอกซ์/กรัม เมล็ดตามลำดับ

นอกจากนี้สารสกัดใบถั่วดาวอินคาด้วย น้ำ, เมทานอล, เอทานอล, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน มีค่า TAC และ DPPH ของสารสกัดจากใบอยู่ในช่วง 59.31 ถึง 97.76 เทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก/กรัม และ 62.8–88.3% ตามลำดับ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และสารประกอบฟีนอลิก (ฟลาโวนอยด์) เป็นตัวแทนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบ (Nascimento et al., 2013) สอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างสองพารามิเตอร์ของค่า TPC สูงซึ่งจะให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Johari & Khong, 2019)

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการสกัดแบบใช้สารทำละลาย (Solvent) ที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น อะซิโตน น้ำ เอทานอล เมทานอล อาจให้สารสกัดที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการผลิตด้วยวิธีบีบเย็น ที่ได้ผลผลิตเป็นสารกลุ่มเอสเทอร์ ซึ่งโมเลกุลมีขนาดใหญ่ และไม่มีขั้ว ดังภาพที่ 5.1



ที่มา Sherwood (2013)

ภาพที่ 5.1 ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย

ซึ่งในอนาคตจะมีการใช้ถั่วดาวอินคาเพื่อประโยชน์ทางสุขภาพ อาจเลือกใช้การสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากเอทานอล เป็น Universal solvent เพราะสามารถละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว อักทั้งมีความปลอดภัยในการใช้สกัดสำหรับการรับประทาน (Uttama et al., 2014)

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธีอื่น เช่น ABTS assay, NBT assay, FRAP assay เป็นต้น เพื่อดูฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันถั่วดาวอินคาในกลไกอื่น

5.3.2 ควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์บิวไทริลโคลีนเอสเตอเรส ควบคู่กับฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้สอดคล้องกับกลไกของยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์

5.3.3 ควรมีการเตรียมสารสกัดน้ำมันถั่วดาวอินคาเอง ตั้งแต่กระบวนการเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานตั้งแต่กระบวนการปลูก มีการควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบ และกระบวนการสกัด เพื่อให้ได้สารสกัดน้ำมันถั่วดาวอินคาที่มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง

5.3.4 ควรเลือกใช้สารทำละลาย (Solvent) เป็นตัวสกัดสารสำคัญจากถั่วดาวอินคา เช่น เอทานอล เป็นต้น

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

กรมสุขภาพจิต. (2564). *ปรับสมดุลสมอง ต้านซึมเศร้า ด้วยสารอาหารจำเป็นยุคโควิด*. https://dmh.go.th/news/view.asp?id=2441

เบญจมาศ คุชนี, อัจฉรา พรมลารักษ์, ชญาณ์พิมพ์ บุญชู, ธนาวุธ เขาดี, บุญญวัฒน์ บุญระดม, วณิชชกร สิงห์บรรณ, . . . ปวิตรา พูลบุตร. (2562). ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากผลมะเดื่ออุทุมพรด้วยเอทานอล. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 27*(5), 951-963.

มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุ. (2563). *ภาวะสมองเสื่อม*. https://thaitgri.org/?p=38965.

รักชนก ภูวพัฒน์. (2559). การศึกษาการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิจากใบอ่อน ใบเพสลาดและใบแก่ของถั่วดาวอินคาเพื่อรองรับการผลิตใบชาเพื่อชุมชน ของจังหวัด *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, *8*(2), 125-133.

ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม และธีรภัทร นวลน้อย. (2554). แนวทางใหม่ในการพัฒนาสารยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ, 6*(2), 157-173.

วรรณทนา พันพา, ปัณณปภณ ใจฉกรรณ์, ภูวดล เชื้อนาค, ตะวันวัฒน์ คำพะไม และวรรณพร คลังเพชร. (2563). องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกถั่วดาวอินคา (*Plukentia volubilis* L.) และการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยไซลาเนสทางการค้า. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*, *12*(23), 114-123.

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. (2557). *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การตอบสนองของการเกิดกระบวนการไบโอไฮโดรจีเนชั่นและการหมักย่อยในกระเพาะหมัก ต่อการเสริมน้ำมันที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 และกรดไขมันโอเมก้า 6 อยู่สูง ร่วมกับน้ำมันปลา*. http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/7543/1/Fulltext.pdf

Baker, E. J., Miles, E. A., Burdge, G. C., Yaqoob, P., & Calder, P. C. (2016). Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Progress in Lipid Research*, *64*, 30-35

Blesa, R., Toriyama, K., Ueda, K., Knox, S., & Grossberg, G. (2018). Strategies for continued successful treatment in patients with Alzheimer's disease: An overview of switching between pharmacological agents. *Current Alzheimer Research*, *15*(10), 964-974.

Blondeau, N., Lipsky, R. H., Bourourou, M., Duncan, M. W., Gorelick, P. B., & Marini, A. M. (2015). Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties—ready for use in the stroke clinic?. *BioMed Research International*, *2015*. 1-8. https://doi.org/10.1155/2015/519830.

Bork, C. S., Venoe, S. K., Lasota, A. N., Lundbye-Christensen, S., Tjoenneland, A., Overvad, K., . . . Schmidt, E. B. (2019). P3425 Alpha-linolenic acid may lower the rate of atherosclerotic cardiovascular disease in subjects with a low intake of marine n-3 fatty acids. *European Heart Journal*, *40*(Supplement_1). Article ehz745-0299.

Burckhardt, M., Herke, M., Wustmann, T., Watzke, S., Langer, G., & Fink, A. (2016). Omega‐3 fatty acids for the treatment of dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews, 4*(4), https://doi.org/10.1002/14651858.CD009002.pub3

Canhada, S., Castro, K., Perry, I. S., & Luft, V. C. (2018). Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutritional Neuroscience*, *21*(8), 529-538.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). *Alzheimer's Disease and related dementias*. https://www.cdc.gov/aging/aginginfo/alzheimers.htm#AlzheimersDisease?

Chatgilialoglu, C., Ferreri, C., Melchiorre, M., Sansone, A., & Torreggiani, A. (2014). Lipid geometrical isomerism: From chemistry to biology and diagnostics. *Chemical Reviews*, *114*(1), 255-284.

Chirinos, R., Zorrilla, D., Aguilar-Galvez, A., Pedreschi, R., & Campos, D. (2016). Impact of roasting on fatty acids, tocopherols, phytosterols, and phenolic compounds present in Plukenetia huayllabambana seed. *Journal of Chemistry*, *2016*, 1-10. https://doi.org/10.1155/2016/6570935.

Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food chemistry*, *141*(3), 1732-1739.

Cholewski, M., Tomczykowa, M., & Tomczyk, M. (2018). A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids. *Nutrients*, *10*(11), 1662.

Coley, N., Raman, R., Donohue, M. C., Aisen, P. S., Vellas, B., & Andrieu, S. (2018). Defining the optimal target population for trials of polyunsaturated fatty acid supplementation using the erythrocyte omega-3 index: A step towards personalized prevention of cognitive decline?. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *22*(8), 982-988.

Conquer, J. A., Tierney, M. C., Zecevic, J., Bettger, W. J., & Fisher, R. H. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*, *35*(12), 1305-1312.

Cremonini, A. L., Caffa, I., Cea, M., Nencioni, A., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019). Nutrients in the Prevention of Alzheimer’s Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1-20. https://doi.org/10.1155/2019/9874159

Cunnane, S. C., Schneider, J. A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D. A., . . . Morris, M. C. (2012). Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *29*(3), 691-697.

de Wilde, M. C., Vellas, B., Girault, E., Yavuz, A. C., & Sijben, J. W. (2017). Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *3*(3), 416-431.

Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, *13*(7), 2421.

Eriksdotter, M., Vedin, I., Falahati, F., Freund-Levi, Y., Hjorth, E., Faxen-Irving, G., . . . & Palmblad, J. (2015). Plasma fatty acid profiles in relation to cognition and gender in Alzheimer's disease patients during oral omega-3 fatty acid supplementation: The omegad study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(3), 805-812.

Fialkow, J. (2016). Omega-3 fatty acid formulations in cardiovascular disease: dietary supplements are not substitutes for prescription products. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, *16*(4), 229-239.

Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxen-Irving, G., Garlind, A., . . . & Palmblad, J. (2006). **ω**-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: A randomized double-blind trial. *Archives of Neurology*, *63*(10), 1402-1408.

Garmendia, F., Pando, R., & Ronceros, G. (2011). Effect of Sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L) on the lipid profile of patients with hyperlipoproteinemia. *Revista Peruana De Medicina Experimental Salud Publica*, *28*(4), 628-632.

Gonzalez-Aspajo, G., Belkhelfa, H., Haddioui-Hbabi, L., Bourdy, G., & Deharo, E. (2015). Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, *171*, 330-334.

Gupta, K. R., Hiwase, C. P., Bhandekar, N. S., & Umekar, M. J. (2020). Therapeutic approaches in alzheimer's disease: β-amyloid peptide inhibitors. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *7*(3), 147–154. https://doi.org/10.18231/j.ijpp.2020.025

Heude, B., Ducimetière, P., & Berr, C. (2003). Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes The EVA Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(4), 803-808.

Johari, M. A., & Khong, H. Y. (2019). Total phenolic content and antioxidant and antibacterial activities of Pereskia bleo. *Advances in pharmacological sciences*, *2019*, 1-10. https://doi.org/10.1155/2019/7428593.

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *21*(6), 605-609.

Kumar, B., Smita, K., Sánchez, E., Stael, C., & Cumbal, L. (2016). Andean Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell biomass as new biosorbents for Pb2+ and Cu2+ ions. *Ecological Engineering*, *93*, 152-158.

Lines, L. (2019). Alzheimer's Disease and related dementias. In *APHA's 2019 Annual Meeting and Expo (Nov. 2-Nov. 6)*. American Public Health Association.

Monroig, Ó., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. (2013). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms. *Marine Drugs*, *11*(10), 3998-4018.

Mori, T. A. (2017). Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia*, *123*, 51-58.

Nascimento, A. K. L., Melo-Silveira, R. F., Dantas-Santos, N., Fernandes, J. M., Zucolotto, S. M., Rocha, H. A. O., . . . Scortecci, K. C. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1-10. https://doi.org/10.1155/2013/950272.

Phuaklee, P., Dechayont, B., Chunthorng-Orn, J., & Itharat, A. (2019). Antioxidant, anti-allergic and anti-inflammatory activities and total phenolic compounds of Tregaysornmas formula. *Thammasat Medical Journal*, *19*, S87-S93.

Puri, R., Mahajan, M., Sahajpal, N. S., Singh, H., Singh, H., & Jain, S. K. (2016). Self-nanoemulsifying drug delivery system of docosahexanoic acid: Development, in vitro, in vivo characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *42*(7), 1032-1041.

Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E., & Brayne, C. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *New England Journal of Medicine*, *360*(22), 2302-2309.

Schaefer, E. J., Bongard, V., Beiser, A. S., Lamon-Fava, S., Robins, S. J., Au, R., . . . & Wolf, P. A. (2006). Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: The Framingham Heart Study. *Archives of Neurology*, *63*(11), 1545-1550.

Senavong, P., Sattaponpan, C., Suk-um, S., & Itharat, A. (2014). Cholinesterase Inhibitory Activities of Apai-sa-le Recipe and Its Ingredients. *J Med Assoc Thai, 97*(8), 64-69.

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual review of food science and technology*, *9*, 345-381.

Sherwood, J. (2013). *Bio-based solvents for Organic Synthesis* (Doctoral dissertation), University of York

Silva, A. R., Moraes, B., & Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2020). Mediterranean diet: Lipids, inflammation, and malaria infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4489.

Sinn, N., Milte, C. M., Street, S. J., Buckley, J. D., Coates, A. M., Petkov, J., & Howe, P. R. (2012). Effects of n-3 fatty acids, EPA v. DHA, on depressive symptoms, quality of life, memory and executive function in older adults with mild cognitive impairment: A 6-month randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, *107*(11), 1682-1693.

Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids*, *26*(6), 421.

Sokoła-Wysoczańska, E., Wysoczański, T., Wagner, J., Czyż, K., Bodkowski, R., Lochyński, S., & Patkowska-Sokoła, B. (2018). Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders—A review. *Nutrients*, *10*(10), 1561.

Solfrizzi, V., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Capurso, C., Del Parigi, A., Capurso, S., . . . Panza, F. (2005). Dietary fatty acids intake: Possible role in cognitive decline and dementia. *Experimental Gerontology*, *40*(4), 257-270.

Solfrizzi, V., Panza, F., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Imbimbo, B. P., & Pilotto, A. (2011). Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: The current evidence. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *11*(5), 677-708.

Spence, J., Chintapenta, M., Kwon, H. I., & Blaszczyk, A. T. (2017). A brief review of three common supplements used in Alzheimer's disease. *The Consultant Pharmacist®*, *32*(7), 412-414.

Srichamnong, W., Ting, P., Pitchakarn, P., Nuchuchua, O., & Temviriyanukul, P. (2018). Safety assessment of *Plukenetia volubilis* (Inca peanut) seeds, leaves, and their products. *Food Science & Nutrition*, *6*(4), 962-969.

Štěrbová, L., Hlásná Čepková, P., Viehmannová, I., & Huansi, D. C. (2017). Effect of thermal processing on phenolic content, tocopherols and antioxidant activity of sacha inchi kernels. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(2), Article e12848.

Tully, A. M., Roche, H. M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., . . . Gibney, M. J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: A case–control study. *British Journal of Nutrition*, *89*(4), 483-489.

Uttama, S., Itharat, A., Rattarom, R., Makchuchit, S., Panthong, S., & Sakpakdeejaroen, I. (2014). Biological activities and chemical content of Sung Yod rice bran oil extracted by expression and soxhlet extraction methods. *Journal of the Medical Association of Thailand*, *97*, S125-32.

Wang, S., Zhu, F., & Kakuda, Y. (2018). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chemistry*, *265*, 316-328.

Witte, A. V., Kerti, L., Hermannstädter, H. M., Fiebach, J. B., Schreiber, S. J., Schuchardt, J. P., ... & Flöel, A. (2014). Long-chain omega-3 fatty acids improve brain function and structure in older adults. *Cerebral Cortex*, *24*(11), 3059-3068.

Yurko-Mauro, K., Alexander, D. D., & Van Elswyk, M. E. (2015). Docosahexaenoic acid and adult memory: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, *10*(3), Article e0120391.

Yusufov, M., Weyandt, L. L., & Piryatinsky, I. (2016). Alzheimer's disease and diet: A systematic review. *International Journal of Neuroscience*, *127*(2), 161-175.

Zhang, X. W., Hou, W. S., Li, M., & Tang, Z. Y. (2016). Omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline in the elderly: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Aging Clinical and Experimental Research*, *28*(1), 165-166.