



รายงานแผนงานวิจัย

การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัด

ผู้เสพยาเสพติดประสาท

DEVELOPMENT OF HERBAL EXTRACT FOR TREATMENT OF
CNS STIMULANT ADDICTS

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ และคณะ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2551

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน

จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งบประมาณ ปี 2546-2549

ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย แหล่งทุนไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ภาวะนอนไม่หลับ วิตกกังวล เป็นภาวะทางจิตเวชที่พบบ่อยในผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท และเป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ที่ยังขาดยาบำบัดรักษาที่ชัดเจน ปลอดภัย สามารถใช้ได้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทจึงมักต้องการทางเลือกอื่นนอกจากยา เพื่อบรรเทาภาวะอาการเหล่านั้น ทั้งนี้ รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการอ้างอิงสรรพคุณด้านสงบระงับและคลายกังวล ซึ่งเชื่อว่าช่วยให้ผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทนอนหลับพักผ่อนได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์สมุนไพรส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลทางวิชาการที่ชัดเจน และหากมิได้มีการบูรณาการศึกษาวิจัยรองรับแล้ว อาจเป็นผลเสียต่อผู้บริโภค อีกทั้งทำให้สูญเสียโอกาสในการพัฒนางานวิจัยสมุนไพรให้เกิดองค์ความรู้ที่ประยุกต์ใช้จริงได้ แผนงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการค้นหาและพัฒนาสารสกัดสมุนไพรไทย เพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท บนพื้นฐานความรู้ด้านประสาทวิทยาศาสตร์และเภสัชศาสตร์ เริ่มจากการคัดกรองสมุนไพรไทย 52 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีนจนเหลือสมุนไพรเพียง 3 ชนิดคือ ใบน้อยหน่า ลำต้นและใบไ้ไก่เตี้ย และใบกะทกรก จึงนำมาทดสอบเบื้องต้นในสัตว์ทดลองโดยฉีดเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักรขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่า สารสกัดใบน้อยหน่าทำให้หนูเสียชีวิตเกือบทั้งหมด สำหรับสารสกัดลำต้นและใบไ้ไก่เตี้ยไม่มีผลต่อแบบจำลองพฤติกรรมซึมเศร้าอย่างชัดเจน ขณะที่สารสกัดใบกะทกรกในชั้นเอทธานอลและในชั้นไดคลอโรมีเทนซึ่งสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนอย่างจำเพาะนั้น เมื่อฉีดเข้าช่องท้องหรือป้อนเข้าปากหนูถีบจักรในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่า สามารถลดพฤติกรรมหดหู่นิ่งและมีฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้าได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่สำคัญยังสามารถลดพฤติกรรมแสวงหาแอมเฟตามีนในหนูขาวได้เกือบสมบูรณ์ โดยขนาดดังกล่าวไม่พบความเป็นพิษ และไม่มีผลกระทบต่อการเรียนรู้ ความจำ หรือการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับขนาดความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรที่ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงสนับสนุนว่า สารสกัดกะทกรกมีความปลอดภัย อีกทั้งไม่พบผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบหลอดเลือด แต่พบผลต่อหัวใจโดยเพิ่มแรงบีบของหัวใจห้องบนเมื่อศึกษาในรูปแบบจำลองของอวัยวะที่แยกจากร่างกาย ข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดกะทกรกในการพัฒนาต่อเป็นเภสัชภัณฑ์เพื่อบำบัดอาการของผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท จึงได้พัฒนาการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เพื่อบ่งชี้องค์ประกอบสำคัญทางเคมีและชีวภาพ ตลอดจนประเมินความคงตัวของสารสกัดภายใต้สภาวะเร่ง ผลการศึกษาพบสารสำคัญทางเคมี 2 ชนิดคือ chrysoeriol, acacetin อีกทั้งพบสารสำคัญทางชีวภาพซึ่งคาดว่าเป็น ฟลาโวนอยด์ luteolin ส่วนฟลาโวนอยด์ vitexin แม้ว่าจะพบเช่นเดียวกับพืชอื่นในสกุลกะทกรก แต่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน สารสกัดกะทกรกมีความคงตัวดี แต่อาจสลายตัวได้เร็วขึ้นเมื่อสัมผัสแสง การพัฒนาผลิตภัณฑ์จึงต้องคำนึงถึงวิธีการป้องกันแสงด้วย สำหรับการพัฒนายาเตรียม

ต้นแบบ ได้ศึกษาสูตรตำรับยาเม็ดและพบว่า การเกาะตัวของผงยา และการดกอัดได้เป็นเม็ดยาที่ดีนั้นต้องการสารช่วยคือ แป้งที่ผ่านการก่อก้อนบางส่วน (partially pre-gelatinized starch) ร่วมกับไฮดรอกซีโพรพิลเซลลูโลส โดยสามารถบรรจุสารสกัด 50 มก.ในเม็ดยาขนาด 250 มก. อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาจากชุดโครงการวิจัยนี้ ยังต้องการข้อมูลพิษวิทยาที่ชัดเจน โดยเฉพาะการศึกษาระยะยาว ข้อมูลการพัฒนายาเตรียมโดยเฉพาะการยืนยันความคงตัว จึงจะชี้ชัดอย่างแน่นอนได้ว่าพืชไทยกะทกรกเป็นสมุนไพรที่มีคุณค่าบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท โดยต้องนำไปศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลเบื้องต้นและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์กะทกรกต่ออาสาสมัคร และต่อผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

EXECUTIVE SUMMARY

Insomnia and anxiety are common psychological symptoms in CNS stimulant addicts, causing negative impacts on their quality of life. Currently, effective and safe long-term medical treatment of these symptoms is still needed. Therefore, the addicts often seek alternative therapy, including herbal medicine with claims of sedative and anxiolytic effects, to induce rest. However, most herbal medicines are short of substantial proof of their efficacy and safety. The deficiency of scientific support not only places the consumers at risk, but also reflects the loss of opportunity in obtaining evidence-based knowledge of Thai herbal medicine. This research program was thus set forth to screen and develop Thai herbal extracts for treatment of CNS stimulant addicts based on neurological and pharmaceutical sciences. Fifty-two Thai herbal samples were selected and screened for their inhibitory activity on neurotransmitter receptors which are involved in the mechanism of stimulant action of amphetamine. Finally, three plant samples, i.e. *Annona squamosa* leaves, *Canavalia rosea* aerial parts and *Passiflora foetida* leaves, were chosen for further study. Preliminary *in vivo* testing by intraperitoneal injection of *A. squamosa* extracts, at 50 mg/kg, resulted in the death of nearly all mice tested. The extracts of *C. rosea* aerial parts produced no clear-cut results in the depression behavior model, whereas the ethanolic and dichloromethane extracts of *P. foetida* leaves, which specifically inhibited dopamine receptor binding, could significantly decreased depression behavior in mice when given intraperitoneally or orally at 50 mg/kg. In addition, they almost completely inhibited amphetamine-seeking behavior in rats. At the dosage tested, no toxicity or effect on learning, memory and motion of the animals was observed, compared to the acute toxicity dose of 2,000 mg/kg in rats. These evidences supported the safety of *P. foetida* extracts. No side effects on pulmonary, intestinal and vascular systems were detected, but a positive inotropic effect on atrial systolic pressure was noted in the isolated organ model. These data indicated the potential of *P. foetida* extracts to be developed as pharmaceuticals for the treatment of CNS stimulant addicts. An HPLC analysis method was developed to identify their active constituents and evaluate the stability of these extracts under accelerated conditions. Chrysoeriol and acacetin were two of the chemical constituents

identified, as well as another biologically active compound, tentatively identified as the flavonoid luteolin. Another flavonoid, vitexin, which was also found in other *Passiflora* plants, did not inhibit dopamine receptor binding. *P. foetida* extract was quite stable but might degrade faster when exposed to light, and, thus, should be considered when developed into products. Preliminary study on tablet formulation indicated that better binding and compressibility of the drug powder could be achieved through the use of partially pre-gelatinized starch, together with hydroxypropylcellulose, producing 250-mg tablets of 50 mg *P. foetida* extract per tablet. However, the data from this research program still need clear-cut toxicological data, especially from long-term study, and product development data, focusing on confirming the stability, in order to encourage the use of *P. foetida* as a treatment for psychological symptoms of addicts. Clinical research in volunteers and CNS stimulant addicts to evaluate basic effectiveness and safety of *P. foetida* products should be conducted.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้บริหารแผนงานวิจัยและคณะผู้วิจัยในแผนงานวิจัย “การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท” ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549 ขอขอบคุณคุณอาจารย์ บุคลากร ผู้ช่วยวิจัย นิสิตบัณฑิตศึกษา ในหน่วยต้นสังกัดคือคณะเภสัชศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อครุภัณฑ์ และอนุญาตให้ใช้สถานที่และสาธารณูปโภคทั้งในและนอกเวลาราชการ โดยไม่คิดค่าใช้จ่ายแต่อย่างใด ทำให้แผนงานวิจัยนี้ลุล่วงได้ตามเป้าหมาย ได้แนวทางพัฒนาสารสกัดสมุนไพรสำหรับการวิจัยทางพรีคลินิกและการวิจัยทางคลินิก ก่อนที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยให้มีมาตรฐานระดับสากล

แผนงานวิจัย: การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

DEVELOPMENT OF HERBAL EXTRACT FOR TREATMENT OF CNS
STIMULANT ADDICTS

คณะผู้บริหารแผนงานวิจัย

1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ผศ.ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ
2. ที่ปรึกษางานวิจัย รศ.ดร. บุญยงค์ ตันตติสริยะ
3. ผู้ประสานงานวิจัย รศ.ดร. ชิติมา เฟิงสุภาพ
4. ผู้วางแผนวิจัย ผศ.ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ
รศ.ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์
ผศ.ดร. นนทิมา วรธนะภูติ
ผศ.ดร. วัชรวิ ลิมปนสิทธิกุล
ผศ.ดร. บุญศรี องค์กรพิพัฒนกุล
รศ.ดร. รุทธ์ สุทธิศรี
รศ.ดร. ชิติมา เฟิงสุภาพ
ผศ.ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล
5. เลขานุการแผนงานวิจัย รศ.ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์

แผนงานวิจัยประกอบด้วย 7 โครงการวิจัย ดังนี้

| ชื่อโครงการ | หัวหน้าโครงการ |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท | รศ.ดร. รุทธ์ สุทธิศรี ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ | รศ.ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. การศึกษาฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลอง | ผศ.ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 4. การศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสมองของสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง | ผศ.ดร. นนทิมา วรธนะภูติ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 5. การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง | ผศ.ดร. วัชรวิ ลิมปนสิทธิกุล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

| ชื่อโครงการ | หัวหน้าโครงการ |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 6. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของ สารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาทใน สัตว์ทดลอง | ผศ.ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 7. การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัด สมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาท | ผศ.ดร. บุญศรี องค์กรพัฒนกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2546-2549 จำนวนเงิน 14,495,500 บาท (สิบสี่ล้านสี่แสนเก้าหมื่นห้าพันห้าร้อยบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 4 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2545

ความสำคัญและที่มาของปัญหาของแผนงานวิจัย

องค์การอนามัยโลกได้ตระหนักถึงปัญหาสารเสพติดที่แพร่ระบาดไปทั่วโลก โดยมุ่งเป้าหมายไปในด้านการลด หรือกำจัดการแพร่ระบาดของการใช้สารเสพติดอย่างเร่งด่วน และบัญญัติคำนิยามของอาการเสพติดว่า เป็นอาการที่ผู้เสพต้องพึ่งสารเสพติดอยู่เป็นประจำ เพื่อให้ดำรงสมภาวะการทำงานของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องให้อยู่ในสภาพเหมือนกับสภาวะที่ได้รับสารเสพติด นอกจากนี้ยังต้องเพิ่มปริมาณการเสพขึ้นเรื่อยๆ ยากที่จะหยุดเสพยาสารนั้นได้เพราะต้องเผชิญกับอาการถอนยาที่ทรมาณอย่างรุนแรง เนื่องจากสารเสพติดไปรบกวนหรือทำลายระบบ สรีระต่างๆ ของร่างกายและสภาพจิตใจ ทำให้ต้องหันกลับไปเสพต่อเพื่อหลีกเลี่ยงการเผชิญกับอาการดังกล่าว สำหรับประเทศไทยนอกจากต้องประสบกับภาวะวิกฤตเศรษฐกิจแล้วยังต้องเผชิญกับปัญหาการแพร่ระบาดของสารเสพติดที่นับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด รายงานสถานการณ์การแพร่ระบาดยาเสพติด พบว่า ยาบ้ามีกลุ่มผู้เสพเป็นจำนวนมากที่สุด กระจายทุกพื้นที่ทั่วประเทศ และเป็นที่น่าวิตกคือ การแพร่ระบาดในกลุ่มวัยรุ่น ซึ่งเป็นกำลังสำคัญของประเทศ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ความต้องการยาบ้าภายในประเทศยังคงมีมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยาเสพติดประเภทอื่น เนื่องจากสามารถผลิตยาบ้าได้อย่างครบวงจรภายในประเทศและมีปริมาณการผลิตสูง หรือมีปริมาณแหล่งผลิตเป็นจำนวนมาก ทั้งในประเทศและประเทศเพื่อนบ้าน การผลิตจากหัวเชื้อ ยาบ้าหรือเมทแอมเฟตามีนยังคงใช้อีพีดีรินเป็นสารตั้งต้น โดยอีพีดีริน 1 กิโลกรัมสามารถผลิตเป็นหัวเชื้อยาบ้าได้ประมาณ 1 กิโลกรัม

ดังนั้น ปัญหาการติดสารเสพติดของเยาวชนและผู้ที่อยู่ในวัยเริ่มทำงาน โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นประสาท เป็นปัญหาเร่งด่วนซึ่งรัฐบาลทุกสมัยให้ความสนใจ และได้พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยมาตรการป้องกันและปราบปราม ตลอดจนด้วยการเพิ่มบทลงโทษแก่ผู้กระทำผิดที่ผลิตหรือจำหน่ายสารเสพติดนั้นๆ อย่างไรก็ตาม กลวิธีข้างต้นเป็นเพียงการแก้ไข

ปัญหาเพื่อลดโอกาสการเสพยา แต่ยังมีได้คำนึงถึงการแก้ไขที่ตัวผู้เสพยาซึ่งอาจแสดงอาการ คลุ้มคลั่งขณะที่เสพยาแล้วจนเกิดอันตรายต่อชีวิตและทรัพย์สินของตนเองและของผู้อื่น หรือยังมีได้เป็นกลวิธีที่ช่วยสนับสนุนให้ผู้เสพยาที่มีความตั้งใจจะเลิกเสพยากระตุ้นประสาท สามารถเลิกได้สำเร็จมากขึ้น ทั้งนี้ มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ทำให้เชื่อได้ว่า การได้รับสารกระตุ้นประสาทจะรบกวน หรือทำลายการทำงานของเนื้อเยื่อประสาท ตลอดจนสมดุลของสารสื่อประสาทต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากได้รับเป็นเวลานาน การรักษาบุคคลเหล่านี้ด้วยวิธีจิตบำบัดจึงอาจไม่เพียงพอ และมีความจำเป็นที่ต้องใช้วิธีการรักษาด้วยยาควบคู่ด้วย ปัจจุบันยาที่ใช้บำบัดผู้เสพยาติดสารกระตุ้นประสาทมักอยู่ในกลุ่มยากล่อมประสาท และเป็นยาที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยด้านประสาทวิทยาศาสตร์ในระดับโมเลกุลได้มีความก้าวหน้าอย่างมาก มีการค้นพบตัวรับของสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก ตลอดจนความเข้าใจเรื่องผลของสารเสพยาติดต่อการทำงานของสารสื่อประสาทและตัวรับ รวมถึงผลของสารดังกล่าวที่มีต่อการควบคุมการหลั่ง และการขจัดสารสื่อประสาทเริ่มมีความชัดเจนมากขึ้น บริษัทฯ ต่างประเทศ จึงได้นำความรู้ความเข้าใจเหล่านี้มาช่วยในการพัฒนายาใหม่ที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการค้นหายา และการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้อย่างเป็นระบบ ก่อนจะนำสารที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นนั้นไปศึกษาเพื่อยืนยันผลในสัตว์ทดลองที่เป็นแบบโรค หรือสัตว์ทดลองที่แสดงภาวะอาการที่ต้องการบำบัด รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษของสารที่อาจเป็นยาใหม่ และการพัฒนายาเตรียมต้นแบบเพื่อการศึกษากายวิภาคต่อไป

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก อีกทั้งมีภูมิปัญญาท้องถิ่นในเรื่องการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค การใช้สมุนไพรในการบำบัดผู้ติดสารเสพยาติดเป็นแนวทางหนึ่งที่กลุ่มบุคคลและสถาบันต่างๆ ได้ใช้เพื่อช่วยเหลือผู้ติดสารเสพยาติดมาโดยตลอด นอกจากนี้ ข้อมูลสมุนไพรในตำรายาพื้นบ้านยังบ่งถึงสรรพคุณของสมุนไพรจำนวนมากไม่น้อยที่อาจออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง การศึกษาสมุนไพรที่มีการใช้ หรือมีการอ้างอิงในตำรายาพื้นบ้านด้วยกระบวนการวิทยาศาสตร์ที่สัมพันธ์กับกลไกการทำงานตามธรรมชาติของสารสื่อประสาทและตัวรับ จะช่วยให้การใช้สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทมีความชัดเจนเหมาะสมและปลอดภัยยิ่งขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาดังกล่าวยังเป็นการสร้างองค์ความรู้และทักษะต่างๆ ซึ่งเอื้อต่อการพัฒนา และวิจัยยาใหม่ อันเป็นสิ่งที่ขาดแคลนอยู่มากสำหรับอุตสาหกรรมยาในประเทศ แผนงานวิจัยชุดนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำพาประเทศไปสู่ความสามารถในการพึ่งตนเอง ในขอบเขตการบำบัดโรค หรือภาวะอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง และเพื่อให้สอดคล้องกับสารเสพยาติดหลักที่เป็นปัญหาเร่งด่วนของประเทศ คณะผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาสมุนไพรที่เชื่อว่ามีศักยภาพในการต้านฤทธิ์กระตุ้นประสาทของสารกลุ่มแอมเฟตามีน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาท โดยเฉพาะแอมเฟตามีน
2. เพื่อพัฒนาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เภสัชวิทยา พิษวิทยา และวิธีวิเคราะห์เพื่อประเมินคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพรที่จำเป็นต่อการเข้าถึงบริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ มาใช้ในกระบวนการวิจัยและพัฒนาสารสกัดสมุนไพร
4. เพื่อศึกษาดำรับยาเตรียมต้นแบบและความคงตัวเบื้องต้นของสารสกัดและยาเตรียมเพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1 การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท

1. คัดเลือกสมุนไพรที่อาจมีสรรพคุณเกี่ยวข้องกับออกฤทธิ์ต่อสมอง พิจารณาจากการใช้ในตำรายาพื้นบ้าน หรือรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บรวบรวมสมุนไพรดังกล่าว นำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (โดยโครงการที่ 2)
3. สกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรที่ได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยประสานงานกับโครงการที่ 2 ในการทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้
4. พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด (chemical หรือ biological marker)

โครงการย่อยที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรใน

ห้องปฏิบัติการ

1. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดสมุนไพร สิ่งสกัด สารบริสุทธิ์ที่ได้รับจากโครงการที่ 1 ด้วยเทคนิค radioligand receptor binding assay โดยอาศัยหลักการแย่งการจับกับตัวรับที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารเสพติด โดยเฉพาะแอมเฟตามีน เพื่อนำมาเป็นข้อมูลสำหรับการทำ bioactivity-guided fractionation
2. ส่งข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบให้โครงการที่ 1 เพื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่ขั้วต่างกันและสกัดสารบริสุทธิ์ จัดลำดับความสำคัญของสมุนไพรก่อนนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองในโครงการที่ 3

โครงการย่อยที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลอง

1. ยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดใบน้อยหน่า ลำต้นและใบไถ่เตี้ย และใบกะทกรกที่ได้ผ่านการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับมาแล้วจากโครงการที่ 2 นำมาทดสอบเชิงพฤติกรรมในหนูถีบจักรเพื่อวัดการเคลื่อนไหว (locomotor activity) วัดความสิ้นหวัง

(open-space swimming test) วัดความวิตกกังวล (elevated plus maze) วัดความจำ (Y maze และ Morris water maze)

2. ทดสอบผลของสารสกัดกะทกรกต่อการติดสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลองด้วยโมเดลเชิงพฤติกรรมการติดยาในหนูขาว (intravenous self-administration of amphetamine)
3. ส่งข้อมูลของสารสกัดกะทกรกซึ่งมีศักยภาพสูงในการต้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทไปศึกษาด้านพิษวิทยา เกษัชวิทยาทั่วไป การซึมผ่านทางเดินอาหารและผ่านเข้าสู่สมอง เพื่อจะได้พัฒนาเป็นตำรับยาเตรียมต้นแบบต่อไป

โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรรอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

1. สร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการดูดซึมและ/หรือ วิธีการที่สารสกัดจะสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางเดินอาหาร นำมาทดสอบการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารของสารสกัดสมุนไพรรอบใน fraction ต่าง ๆ โดยใช้แบบจำลองที่สร้างขึ้น
2. สร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดสมุนไพรรอบใน fraction ต่าง ๆ เพื่อหา fraction ที่มีฤทธิ์ที่ต้องการซึ่งสามารถซึมผ่านเข้าสู่สมองได้เร็ว สำหรับเป็นข้อมูลในการตั้งสูตรตำรับที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้
3. ศึกษาโอกาสในการรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein ของสารสกัดสมุนไพรรอบใน fraction ต่าง ๆ เพื่อหา fraction ที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนา และเพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดค่าเตือนในการใช้สารสกัดสมุนไพรรอบร่วมกับสารหรือยาที่เป็นยับยั้งแรงของ P-glycoprotein ต่อไป

โครงการย่อยที่ 5 การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรรอบด้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง

1. ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสมุนไพรรอบที่คัดเลือกแล้วว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากโครงการที่ 3
2. ทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในสัตว์ทดลองของสารสกัดจากสมุนไพรรอบดังกล่าว

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของสารสกัดสมุนไพรรอบด้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง

ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของสารสกัดสมุนไพรรอบที่คัดเลือกจากโครงการที่ 3 ว่าจะมีผลต่อระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบหลอดเลือดและหัวใจ และระบบขับถ่ายของสัตว์ทดลอง เพื่อหาฤทธิ์อื่น ๆ ที่อาจเป็นประโยชน์หรือโทษ และอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงขึ้นได้

โครงการย่อยที่ 7 การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรรอบด้านสารกระตุ้นประสาท

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้ในการศึกษาปริมาณและความคงตัวขององค์ประกอบในสารสกัดสมุนไพรรอบ

2. พัฒนารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมสำหรับสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดสมุนไพรที่พิสูจน์แล้วว่าออกฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท
3. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดและยาเตรียม

ผลการวิจัย/ข้อค้นพบ

โครงการย่อยที่ 1 การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อดำเนินฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 ตัวรับเซโรโทนิน 1 ตัวรับเซโรโทนิน 2 และตัวรับแอลฟา 1 ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลของสมุนไพรจำนวน 52 ชนิด พบว่าสารสกัดใบน้อยหน้า (*Annona squamosa* วงศ์ Annonaceae) ใบกะทกรก (*Passiflora foetida* วงศ์ Passifloraceae) และลำต้นและใบไก่เตี้ย (*Canavalia rosea* วงศ์ Leguminosae) แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนได้มากกว่า 50% ส่วนสารสกัดจากรากระย่อมและผลมะตูมยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ได้มากกว่า 50% โดยสารสกัดรากระย่อมยังสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 ได้อีกเช่นกัน
2. สิ่งสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนของใบน้อยหน้า ใบกะทกรก และลำต้นและใบไก่เตี้ยมีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุด
3. สิ่งสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนของใบน้อยหน้ามีองค์ประกอบทางเคมีเป็น β -sitosterol glucoside ของผสมของ sterol glycoside หลายชนิด สารกลุ่ม alkaloid ชื่อ lanuginosine และสารกลุ่ม acetogenin แต่พบว่าสารสกัดนี้มีความเป็นพิษสูงเกินไปต่อสัตว์ทดลอง
4. สิ่งสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนของใบกะทกรกมีองค์ประกอบเป็น β -sitosterol glycoside ผสมอยู่กับ stigmasterol glycoside, สารกลุ่ม flavonoid หลายชนิด ได้แก่ acacetin และ chrysoeriol
5. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นและใบไก่เตี้ย ทำให้สกัดแยกได้สารชนิดใหม่ในกลุ่ม guanidine alkaloid 1 ชนิด ชื่อ canarosine รวมทั้งสาร β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosterol glucoside, อนุพันธ์ของ cyclitol ชื่อ *epi*-inositol 6-O-methyl ether และ flavonoid glycoside ชื่อ rutin

โครงการย่อยที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการ

1. ผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพร 52 ชนิดต่อการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 ตัวรับเซโรโทนิน 2 และตัวรับแอลฟา 1 ด้วยเทคนิค radioligand receptor binding ได้คัดกรองเฉพาะสมุนไพรที่มีผลยับยั้งการจับตัวรับโดปามีน 1 ได้ 3 ชนิดคือ สารสกัดใบน้อยหน้า ใบกะทกรก ลำต้นและใบไก่เตี้ย

2. สารบริสุทธิ์จากใบน้อยหน่าที่อาจนำมาเป็น chemical marker ได้แก่ lanuginosine, β -sitosterol glucoside และ acetogenin แต่พบความเป็นพิษสูงมากในสัตว์ทดลอง จึงไม่ได้ศึกษาต่อไป
3. สารบริสุทธิ์ในใบกะทกรกที่ได้จากการทำ bioactivity-guided fractionation ที่อาจนำมาเป็น chemical marker คือ chrysoeriol และ acacetin สารที่อาจนำมาเป็น biological marker คือ PF4 เนื่องจากที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้เท่ากับ 51.5% อยู่ในระหว่างการศึกษาศูตรโครงสร้างจากโครงการที่ 1
4. สารบริสุทธิ์จากลำต้นและใบไก่อเดี่ยวที่อาจนำมาเป็น chemical marker ได้แก่ β -sitosterol glucoside, epi-inositol-6-O-methyl ether, rutin สำหรับสารบริสุทธิ์ที่อาจนำมาเป็น biological marker คือ canarosine เนื่องจากสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.4 ไมโครโมลาร์
5. ได้ตั้งข้อสังเกตว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนจากใบน้อยหน่า ใบกะทกรก ลำต้น และใบไก่อเดี่ยว มี β -sitosterol เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเสมอ ถึงแม้ฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 มีเพียงเล็กน้อยประมาณ 10% แต่อาจเป็นไปได้ว่าสเดียรอยด์จากพืชเหล่านี้ อาจช่วยเสริมฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพรที่ศึกษา หรืออาจช่วยนำส่งยาเข้าสู่เซลล์คล้ายคลึงกับ liposome ในงานวิจัยระบบนำส่งยา

โครงการย่อยที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลอง

1. ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองโดยฉีดเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าทำให้หนูเสียชีวิตเกือบทั้งหมด สำหรับสารสกัดลำต้นและใบไก่อเดี่ยวไม่มีผลต่อแบบจำลองพฤติกรรมซึมเศร้าอย่างชัดเจน
2. สารสกัดใบกะทกรกในชั้นเอทานอลและในชั้นไดคลอโรมีเทนสามารถลดพฤติกรรมหดหู่อันหวังและมีฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้าได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยขนาดดังกล่าวไม่พบความเป็นพิษ และไม่มีผลกระทบต่อการเรียนรู้ ความจำ การเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร
3. ทดสอบสิ่งสกัดย่อยกะทกรก (PF002-1, PF002-2, PF002-3, PF002-4, PF002-5, PF002-6, PF002-7, PF003-1, PF003-2, PF003-3, PF003-4 และ PF003-5) ต่อพฤติกรรมวิตกกังวล พบว่า PF003-1 ยังคงมีฤทธิ์คลายกังวลได้อย่างชัดเจนจากการให้ยาแบบ acute และ subacute ในขณะที่สิ่งสกัดย่อยกะทกรกที่เหลือไม่มีฤทธิ์คลายกังวล
4. ทดสอบสารสกัด PF003 ต่อพฤติกรรมการติดแอมเฟตามีนในหนูขาว พบว่าขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องพบว่าลดพฤติกรรม self-administration ของแอมเฟตามีนของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดพฤติกรรมแสวงหาหาได้

เกือบสมบูรณ์ ซึ่งอาจนำมาบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทในช่วงกำลังเสพยาโดย
 ออกฤทธิ์ผ่านทางศูนย์ควบคุมความพึงพอใจ (reward center) ของแอมเฟตามีน
โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสมองของสารสกัด
 จากสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

1. สามารถสร้างแบบจำลองสำหรับการศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารจากเซลล์
 เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้
2. เมื่อทดสอบสารสกัดสมุนไพรบาง fraction กับแบบจำลองในข้อ 1 ไม่พบการซึมผ่าน
 เซลล์ เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรละลายน้ำได้น้อยจนเกิดข้อจำกัดด้วยการละลายใน
 การดูดซึม (solubility-limited absorption)
3. สามารถสร้างแบบจำลองเบื้องต้นสำหรับการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพรเข้าสู่สมอง
 ได้จาก co-culture ของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดและ astrocyte ที่แยกจากสมองของ
 หนูขาว
4. สารสกัดจากสมุนไพรบาง fraction ที่นำมาทดสอบมีผลรบกวนการทำงานของ P-
 glycoprotein เมื่อทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 และ LLC-MDR1 โดยทำ
 ให้มีการสะสมของ rhodamine 123 ซึ่งเป็นซับสเตรตของ P-glycoprotein ในเซลล์
 เพิ่มขึ้น

โครงการย่อยที่ 5 การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทใน
 สัตว์ทดลอง

1. สิ่งสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนของใบกะทกรก มีความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันในหนูถีบ
 จักรสายพันธุ์ Albino ที่ขนาด 2,000 mg/kg body weight แต่ไม่พบพิษที่ความเข้มข้น
 5-300 mg/kg body weight ซึ่งเมื่อเทียบกับขนาดที่ให้ผลในการลดภาวะสั้นหว่งที่ใช้
 ในหนู คือ 50 mg/kg body weight อาจกล่าวได้ว่าสิ่งสกัดนี้ปลอดภัยต่อการเกิดพิษ
 แบบเฉียบพลัน
2. ส่วนการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังไม่สามารถทำให้เสร็จสมบูรณ์ได้เนื่องจากต้องใช้สิ่งสกัด
 ในปริมาณที่สูงมาก และมีปัญหาเรื่องการละลายตัวของสิ่งสกัดคือไม่ละลายในตัวทำ
 ละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้เพื่อให้ยาทางปาก การให้ยาโดยการฉีดทุกวันจนครบ 90 วัน
 ไม่เหมาะสมที่จะทำการทดสอบ ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสม

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้น
 ประสาทในสัตว์ทดลอง

1. ทดสอบสารสกัดกะทกรกในชั้นไดคลอโรมีเทน 6 fractions ได้แก่ PF 002-1, PF
 002-5, PF 002-7, PF 003-1, PF 003-2 และ PF003 (mix 3-4-5) ที่ความเข้มข้น
 101 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ละลายได้ พบว่าสารสกัดทุก fraction ไม่มี
 คุณสมบัติในการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม หลอดเลือด และลำไส้

เล็กส่วนไอเสีย ในขณะ PF003-2 พบว่ามีคุณสมบัติเป็น inotropic agents สามารถเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนได้

2. สารสกัดจากกะทกรกที่นำมาทดสอบ 6 fractions มีความสามารถที่จะยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ถูกกระตุ้นได้ โดยที่มีความแตกต่างกันในเรื่องของความแรง ความจำเพาะต่อตัวรับ และชนิดของอวัยวะที่ศึกษา
3. PF002-5 และ PF002-7 เท่านั้นที่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-HT โดยที่การออกฤทธิ์ของ PF002-5 มีความจำเพาะ (selectivity) อย่างมาก ในการยับยั้งผลของ 5-HT และไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย α_1 -adrenergic และ dopaminergic agonists
4. PF003-1 and PF003-2 ไม่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่กระตุ้นด้วย 5-HT, dopamine และมีผลยับยั้ง α_1 agonist ประมาณ 20%
5. สารสกัดกะทกรกทุก fractions มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อ ACh histamine และ serotonin ไม่เกินกว่า 30% และไม่มี ความแตกต่างในด้านความจำเพาะ (selectivity) ต่อตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด
6. สารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆ มีผลยับยั้งการหดตัวได้น้อยต่อลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย histamine และโดยทั่วไปแล้วความจำเพาะ (selectivity) ของสารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆ (ยกเว้น PF002-1 และ PF003-1) ในการยับยั้งการทำงานของตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้ PF002-1 และ PF003-1 มีผลยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนไอเสียที่ถูกกระตุ้นด้วย BaCl_2 และ ACh ได้ดี
7. PF002-1, PF002-5 และ PF003-1 ไม่มีผลต่อการทำงานของหัวใจ ในขณะที่ PF002-7, PF003-2 และ PF003-(3-5) มีฤทธิ์ในการกดแรงบีบตัวและ อัตราการเต้นในช่วงนาที่แรก ซึ่งต่อมาอีก 10 -15 นาที ผลของ PF003-2 จะกลับเป็นการกระตุ้นการบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย และผลกลับเข้าสู่ภาวะปกติในหัวใจห้องบนขวา ซึ่งแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่เพิ่มขึ้นถูกยับยั้งได้ด้วย propranolol และ ketanserin แสดงว่าสารสกัดน่าจะออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นที่ β -adrenoceptor และ serotonin receptor ส่วนผลที่กดอัตราการเต้นของหัวใจของ PF003-(3-5) จะคงอยู่ตลอด 15 นาทีที่บันทึกผล แสดงว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลต่อการควบคุมการเต้นของหัวใจ (pacemaker activity)

โครงการย่อยที่ 7 การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาท

1. ได้สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดกะทกรกด้วยวิธี HPLC ที่บ่งบอกตำแหน่งกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งคาดว่าเป็นสารสำคัญทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. การเปรียบเทียบ HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรก สารฟลาโวนอยด์อ้างอิง และสารที่ตกผลึกได้จากโครงการย่อยที่ 1 ซึ่งรวมข้อมูลการวิเคราะห์โครงสร้างทาง

เคมีบางส่วน ทำให้ระบุพืชที่เป็นฟลาโวนอยด์ acacetin, chrysoeriol และพืชที่คาดว่า เป็น vitexin, luteolin และ apigenin ในสารสกัดกะทกรกได้

3. การสกัดใหม่ แม้จากแหล่งวัตถุดิบเดียวกัน อาจให้องค์ประกอบของกลุ่มฟลาโวนอยด์ ต่างกัน ที่พบชัดเจนคือ ปริมาณของฟลาโวนอยด์ที่คาดว่า เป็น vitexin และ luteolin
4. ผลการศึกษา HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรกเมื่อเก็บรักษาในสภาวะเร่ง ที่มีการสัมผัสแสงอุลตราไวโอเล็ตต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบการลดลงของ พื้นที่ใต้โครมาโตแกรมของพืชทั้งหมด และพบการลดลงของความสามารถในการ ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนของสารสกัดกะทกรกที่เก็บในสภาวะสัมผัสแสง ขณะที่ในสภาวะไม่สัมผัสแสง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโครมาโตแกรมของสารสกัด กะทกรกที่เก็บรักษาที่ 30 - 34 °C เมื่อเทียบกับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C
5. การพัฒนาเตรียมต้นแบบในรูปยาน้ำทำได้จำกัด เนื่องจากการละลายที่ต่ำของสาร สกัดกะทกรกในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำ หรือตัวทำละลายเช่น โพลี เอทิลีนไกลคอล 400 เมื่อใช้สารแขวนตะกอนช่วยเช่น เกลือโซเดียมของคาร์บอกซี เมทิลเซลลูโลส ก็สามารถเตรียมความเข้มข้นได้เพียง 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขณะเดียวกัน การพัฒนาเตรียมในรูปแบบยาเม็ด จะได้ปริมาณสารสกัด 50 มิลลิกรัม/เม็ดยา 250 มิลลิกรัม

ข้อเสนอแนะ/การนำไปใช้ประโยชน์

โครงการย่อยที่ 1 การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท

1. การพัฒนาสมุนไพรกะทกรกเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท น่าจะใช้ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็น chemical marker สำหรับการหามาตรฐานของสมุนไพร ชนิดนี้
2. แอลคาลอยด์ canarosine ซึ่งสกัดแยกได้จากลำต้นและใบไม้เดี่ยวสามารถยับยั้งไม่ให้ สารมาตรฐานเข้าไปจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นสารที่น่าจะได้นำไปวิจัยต่ออย่างละเอียด เพื่อพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ต่อไป

โครงการย่อยที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรใน

ห้องปฏิบัติการ

1. ได้สารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาท สามารถนำไปศึกษาต่อ ในสัตว์ทดลอง และยังได้สารสำคัญในสมุนไพรดังกล่าวเพื่อใช้เป็น chemical marker หรือ biological marker สำหรับควบคุมคุณภาพของสารสกัดมาตรฐานหรือติดตาม ฤทธิ์ทางชีวภาพของใบกะทกรก หรือ ลำต้นและใบไม้เดี่ยว
2. ได้ระบบปฏิบัติการสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดสมุนไพร โดยใช้สารรังสีในเทคนิค radioligand receptor binding ถึงแม้จะมีความไวสูงแต่ก็มี ข้อจำกัดด้านความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติการและมีกาการรังสี จึงมีข้อเสนอแนะให้ใช้

เทคนิคชนิดอื่น เช่นการใช้สารเรืองแสงกับโปรตีนที่จำเพาะ (immunofluorescence) ถึงแม้ว่าจะตอบคำถามไม่ได้โดยตรงและยังมีความไวน้อยกว่าการใช้สารรังสี แต่มีความปลอดภัยมากกว่า ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ราคาถูกกว่า จึงเป็นที่นิยม

โครงการย่อยที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลอง

1. ได้สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาท
2. ได้ข้อมูลสำหรับการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทขึ้น Clinical trials ในสถานบำบัดผู้ติดยาเสพติด
3. ได้ระบบวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้คุณภาพสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นขั้นตอนมาตรฐานส่วนหนึ่งในการวิจัยและพัฒนาจากสมุนไพรระดับอุตสาหกรรมของประเทศ

โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสมองของสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

1. สามารถนำแบบจำลองของเซลล์เพาะเลี้ยงที่สร้างขึ้นไปใช้ทดสอบการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการทดสอบเบื้องต้นของการซึมผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดสมุนไพรได้ในกรณีที่สารสกัดสมุนไพรมีความบริสุทธิ์สูงและมี chemical หรือ biological marker ที่ชัดเจน
2. ส่วนประกอบในสารสกัดสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีผลในการรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein ซึ่งอาจทำให้เกิดอันตรกิริยากับยาหรือสารอื่น ๆ ที่เป็นซับสเตรตของ P-glycoprotein ได้ อาจเป็นไปได้ที่การรบกวนนี้เกิดจากสารที่มีฤทธิ์ทางการรักษาที่ต้องการ ในการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรต่อไป จึงควรแยก fraction ของสารสกัดสมุนไพรให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

โครงการย่อยที่ 5 การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง

สิ่งสกัดใบกะทกรกในชั้นไดคลอโรมีเทนมีความปลอดภัยต่อการเกิดพิษแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญอย่างหนึ่งในการพิจารณาเพื่อพัฒนาสิ่งสกัดต่อไป แต่ยังเป็นข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ ยังต้องอาศัยข้อมูลความเป็นพิษในระยะกึ่งเรื้อรังและพิษเรื้อรังด้วย

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง

สารสกัดกะทกรกในชั้นไดคลอโรมีเทนแต่ละ fraction มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยตรงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจ ทั้งนี้ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับความไวของอวัยวะที่นำมาทดสอบ ชนิดของสารกระตุ้นการหดตัว และสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด ซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่นอกเหนือไปจากระบบประสาทส่วนกลางเหล่านี้เป็นข้อมูลที่ชี้ถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเพื่อใช้บำบัดโรคต่าง ๆ ตลอดจนผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ของสารสกัดกะทกรก

โครงการย่อยที่ 7 การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาท

การพัฒนาเภสัชภัณฑ์จากสารสกัดสมุนไพรมีความซับซ้อนในด้านการวิเคราะห์ และการควบคุมมาตรฐานของสารสกัดซึ่งเป็นวัตถุประสงค์มากกว่าการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์เพียง 1 -2 ชนิด วิธีการวิเคราะห์ที่สามารถเชื่อมโยงชนิดและปริมาณขององค์ประกอบในสารสกัดกับประสิทธิภาพ (potency) จึงมีความสำคัญมากต่อการพัฒนาเภสัชภัณฑ์จากสมุนไพรให้สำเร็จ นอกจากนี้ การเชื่อมโยงดังกล่าวอาจต้องการแนวทางการศึกษามากกว่าวิธีการทดสอบในหลอดทดลองซึ่งโครงการนี้ใช้อยู่คือ การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับที่เกี่ยวข้อง ด้วยเหตุเพราะองค์ประกอบบางชนิดอาจถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายให้ออกฤทธิ์ขณะที่องค์ประกอบอื่นบางชนิดแม้ให้ผลดีจากการทดสอบในหลอดทดลอง อาจไม่ใช่สารหลักในการออกฤทธิ์เพราะไม่สามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อหรือถูกเมแทบอลิซึมในร่างกาย ดังนั้น การได้ภาพข้อมูลที่ชัดเจนต้องอาศัยการแยกศึกษาสารองค์ประกอบที่คาดว่าจะมีความสำคัญ แล้วจึงประมวลผลเพื่อประยุกต์ให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงใช้ในการประเมินและควบคุมคุณภาพของสารสกัดตลอดจนยาเตรียม อย่างไรก็ตาม โครงการนี้ ได้ช่วยยืนยันว่าสารสกัดกะทกรกเป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่มีหลักฐานแสดงผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและให้แนวทางการพัฒนาต้นแบบยาเม็ดเพื่อการประเมินทางคลินิกต่อไป

โครงการวิจัยที่ 1

การสกัดแยกสารจากสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท
Isolation of biologically active constituents against CNS stimulants
from Thai medicinal plants

กุมภาพันธ์ 2551

รองศาสตราจารย์ ดร. รุทธ์ สุตติศรี
(Associate Professor Dr. Rutt Suttisri)
หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. วิชชดา ธนกิจเจริญวัฒน์
(Dr. Witchuda Thanakijcharoenpath)
ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวดวงเพ็ญ ปัทมดิลก นิสิตบัณฑิตศึกษา หลักสูตรดุขฎิบัณฑิต สาขาเภสัชเวท ที่ได้มีส่วนร่วมและดำเนินการวิจัยอันเป็นส่วนหนึ่งของงานวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสนับสนุนแผนงานวิจัยนี้

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาให้มีมาตรฐานระดับสากล โดยการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งได้รับความสนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549

บทคัดย่อภาษาไทย

ตัวอย่างสมุนไพร 51 อย่างจากพืช 50 ชนิดถูกเลือกมาทดสอบเบื้องต้นในการต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกอ้างอิงจากการใช้ในยาพื้นบ้านของไทย จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์คลายเครียด ด้านชัก สงบระงับ หรือรายงานความสามารถในการจับกับตัวรับสารสื่อประสาทต่างๆ ของพืชนั้น รวมทั้งบางชนิดได้จากการสุ่มเลือก ตัวอย่างเหล่านี้ถูกทดสอบฤทธิ์ต้านการจับกับตัวรับ dopamine 1, แอลฟา 1 และ 5-HT₂ สารสกัดหยาบ ethanol ของใบน้อยหน้า ใบกะทกรก และลำต้นและใบไถ่เดี่ยวแสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 ได้ไม่น้อยกว่า 50% ในขณะที่สารสกัดจากรากระย้อมยับยั้งการจับกับตัวรับทั้งแอลฟา 1 และ 5-HT₂ ได้มากกว่า 50% และสารสกัด ethanol ของผลมะตูมสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ได้เช่นกัน

เลือกศึกษาพืช 3 ชนิดคือ น้อยหน้า กะทกรก และไถ่เดี่ยว การสกัดด้วยการ partition สารสกัดหยาบ ethanol ของพืชเหล่านี้ทำให้แยกย่อยออกได้เป็นสิ่งสกัด hexane, สิ่งสกัด dichloromethane, สิ่งสกัด butanol และ สิ่งสกัด aqueous พบว่าสิ่งสกัด dichloromethane ของพืชทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับได้ดีที่สุด เมื่อนำสิ่งสกัด dichloromethane ของใบน้อยหน้ามาศึกษาทางพิษวิทยาพบว่ามีองค์ประกอบเป็น β -sitosterol glucoside, ของผสมของ sterol glycoside หลายชนิด, สารกลุ่ม dioxoaporphine alkaloid ชนิดหนึ่ง คือสาร lanuginosine และสารกลุ่ม acetogenin ซึ่งยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน อย่างไรก็ตาม เมื่อภายหลังพบว่าสารสกัดจากพืชนี้มีความเป็นพิษสูงเกินไปต่อสัตว์ทดลอง จึงไม่ได้ดำเนินการต่อไป

สิ่งสกัด dichloromethane ของใบกะทกรกมีองค์ประกอบเป็นของผสมของ β -sitosterol glycoside กับ stigmasterol glycoside ร่วมด้วยสารกลุ่ม flavonoid อีกหลายชนิด รวมทั้ง acacetin และ chrysoeriol สาร flavonoid เหล่านี้น่าจะมีประโยชน์ในฐานะของ chemical marker สำหรับศึกษาพืชนี้ต่อไป

การสกัดแยกและพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารที่พบในส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) ของไถ่เดี่ยวทำให้ได้สารชนิดใหม่ 1 ชนิดในกลุ่ม guanidine alkaloid ซึ่งให้ชื่อว่า canarosine และสารที่รู้จักกันอยู่แล้วอีก 5 ชนิด คือ β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosterol glucoside, *epi*-inositol 6-O-methyl ether ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร cyclitol และ rutin ซึ่งเป็น flavonoid glycoside ชนิดหนึ่ง สาร canarosine สามารถยับยั้งไม่ให้สารมาตรฐานเข้าไปจับกับตัวรับ dopamine 1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ และดังนั้นจึงเป็นสารที่น่าจะได้นำไปวิจัยต่ออย่างละเอียด

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Fifty-one plant samples from 50 plant species were selected to be screened for their activity against CNS stimulants. The criteria for selection were based on their uses in traditional Thai medicine, their reported anxiolytic, anticonvulsant, sedative or receptor-binding activity, whereas a few of them were randomly selected. These samples were assayed for their inhibitory activity against dopamine 1, alpha 1 and 5-HT₂ receptor binding. The ethanol extracts of *Annona squamosa* leaves, *Passiflora foetida* leaves and *Canavalia rosea* aerial parts caused more than 50% inhibition of dopamine 1 receptors, while that of *Rauvolfia serpentina* roots was able to inhibit, at more than 50%, both alpha 1 and 5-HT₂ receptors, and the ethanol extract of *Aegle marmelos* fruit was similarly active against alpha 1 receptors.

Three plants, i.e. *A. squamosa*, *P. foetida* and *C. rosea*, were selected for further study. Partition of the ethanol extract of these plants yielded hexane extract, dichloromethane extract, butanol extract and aqueous extract. The dichloromethane extracts of all three plants were found to be the most active in the receptor binding assay. Phytochemical investigation of the dichloromethane extract of *A. squamosa* leaves showed the presence of β -sitosterol glucoside, mixture of sterol glycosides, lanuginosine, which is a dioxoaporphine alkaloid, and an unknown acetogenin. However, no further work was done on this plant after its extract was found to be too toxic in animal testing.

The dichloromethane extract of *P. foetida* leaves contained mixture of β -sitosterol glycoside and stigmasterol glycoside, together with several flavonoids, including acacetin and chrysoeriol. These flavonoids could be useful chemical markers for further study of this plant.

Isolation and structural elucidation of compounds from *C. rosea* aerial parts yielded a new guanidine alkaloid named canarosine, and five known compounds including β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosterol glucoside, *epi*-inositol 6-*O*-methyl ether, which is a cyclitol derivative, and rutin, which is a flavonoid glycoside. Canarosine was able to significantly inhibit the binding of standard compound to dopamine 1 receptors, and, therefore, should be further studied.

สารบัญ

| | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ | 1-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 1-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 1-iv |
| สารบัญ | 1-v |
| สารบัญตาราง | 1-vi |
| สารบัญแผนภูมิ | 1-vii |
| คำย่อที่ใช้ | 1-viii |
| บทนำ | 1-1 |
| 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 1-1 |
| 2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย | 1-2 |
| 3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 1-3 |
| 4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย | 1-3 |
| 4.1 การศึกษาข้อมูล และคัดเลือกสมุนไพร | 1-3 |
| 4.2 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร | 1-6 |
| 4.3 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ | 1-8 |
| 4.4 การเตรียมสิ่งสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์และสกัดแยกสารสำคัญ | 1-9 |
| 4.5 การสกัดแยก และพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่บริสุทธิ์จากพืชสมุนไพร | 1-10 |
| 5. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล | 1-10 |
| 5.1 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบน้อยหน้า | 1-10 |
| 5.2 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบกะทกรก | 1-12 |
| 5.3 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบและลำต้นไก่อเดี่ยว | 1-15 |
| 6. สรุปผลการทดลอง | 1-23 |
| 7. เอกสารอ้างอิง | 1-24 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 | รายชื่อพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่นำมาเตรียมเป็นสารสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น | 1-6 |
| 1.2 | ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร lanuginosine (ใน CDCl_3 , ที่ 300 MHz) | 1-11 |
| 1.3 | ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (ที่ 300 MHz) และ $^{13}\text{C NMR}$ (ที่ 75 MHz) ของสาร chrysoeriol (ใน $\text{DMSO-}d_6$) | 1-13 |
| 1.4 | ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (ที่ 300 MHz) และ $^{13}\text{C NMR}$ (ที่ 75 MHz) ของสาร acacetin (ใน $\text{DMSO-}d_6$) | 1-14 |
| 1.5 | ข้อมูล $^{13}\text{C NMR}$ ของสาร β -sitosterol กับ stigmasterol (ใน CDCl_3 , ที่ 75 MHz) | 1-16 |
| 1.6 | ข้อมูล $^{13}\text{C NMR}$ ของสาร β -sitosterol glucoside (ใน $\text{DMSO-}d_6$, ที่ 75 MHz) | 1-17 |
| 1.7 | ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (ที่ 300 MHz) และ $^{13}\text{C NMR}$ (ที่ 75 MHz) ของสาร <i>epi</i> -inositol 6- <i>O</i> -methyl ether (ใน $\text{DMSO-}d_6$) | 1-19 |
| 1.8 | ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (300 MHz) และ $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz) ของสาร rutin (ใน $\text{DMSO-}d_6$) | 1-20 |
| 1.9 | ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz) และ HMBC ของสาร canarosine (ใน CD_3OD) | 1-22 |

สารบัญแผนภูมิ

| แผนภูมิที่ | | หน้า |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 | ขั้นตอนการ partition เพื่อเตรียมสิ่งสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์และสกัด แยกสารสำคัญ | 1-9 |

คำย่อที่ใช้

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>br</i> | Broad (for NMR spectra) |
| BuOH | Butanol |
| °C | degree Celsius |
| CDCl ₃ | Deuterated chloroform |
| CH ₂ Cl ₂ | Dichloromethane |
| cm ⁻¹ | Reciprocal centimeter (for wave number) |
| ¹³ C-NMR | Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance |
| COSY | Correlation spectroscopy |
| δ | Chemical shift (in ppm) |
| <i>d</i> | Doublet (for NMR spectra) |
| <i>dd</i> | Doublet of doublets (for NMR spectra) |
| <i>ddd</i> | Doublet of doublets of doublets (for NMR spectra) |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | Deuterated dimethylsulfoxide |
| Glc | Glucose |
| HMBC | Proton-detected Heteronuclear Multiple Bond Coherence |
| ¹ H-NMR | Proton Nuclear Magnetic Resonance |
| Hz | Hertz |
| IC ₅₀ | Median inhibitory concentration |
| <i>J</i> | Coupling constant |
| <i>m</i> | Multiplet (for NMR spectra) |
| μg | Microgram |
| MHz | Megahertz |
| ml | Milliliter |
| <i>m/z</i> | Mass-to-charge ratio |
| ppm | Part per million |
| Rha | Rhamnose |
| <i>s</i> | Singlet (for NMR spectra) |
| <i>t</i> | Triplet (for NMR spectra) |

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาการติดสารเสพติด โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นประสาท เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออย่างกว้างขวางต่อสภาพเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทยในปัจจุบัน ผู้ที่เสพสารเหล่านี้เป็นเวลานานๆ จะเกิดผลเสียหลายต่อร่างกายได้ในหลายๆแง่ รวมทั้งสารกระตุ้นประสาทยังสามารถเข้าไปรบกวนหรือทำลายการทำงานของเนื้อเยื่อประสาท ตลอดจนสมดุลของสารสื่อประสาทต่างๆ ทำให้ในการรักษา จำเป็นต้องใช้ยาควบคู่ไปกับการใช้จิตบำบัด ซึ่งยาที่ใช้มีมักอยู่ในกลุ่มยากล่อมประสาทที่ได้จากการสังเคราะห์ และเป็นยาที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น ล่าสุดกำลังมีการศึกษาว่าด้านการเสพติดซึ่งพัฒนามาจากสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ชื่อ ibogaine ซึ่งสกัดได้จากรากของพืชชนิดหนึ่งซึ่งพบในทวีปแอฟริกาคือ *Tabernanthe iboga* (วงศ์ Apocynaceae) และอาจใช้รักษาการเสพติดได้ทั้งในกรณีของการติดเหล้า บุหรี่ อนุพันธ์ของฝิ่น และสารกระตุ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด โดยคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับผลของสารนี้ต่อสารสื่อประสาทในสมอง (Popik et al, 1995; Mash et al, 1998; Glick and Maisonneuve, 1998)

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก อีกทั้งมีภูมิปัญญาท้องถิ่นในเรื่องการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค โดยสรรพคุณของสมุนไพรจำนวนมากไม่น้อยที่มีระบุไว้ในตำรายาพื้นบ้านอาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งอาจเป็นผลให้สามารถใช้สมุนไพรเหล่านี้ในการบำบัดผู้ติดสารเสพติดได้ ฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางที่เด่นๆได้แก่ ฤทธิ์คลายเครียด (anxiolytic) ด้านชัก (anticonvulsant) และสงบระงับ (sedative) ก็ได้มีการศึกษาในพืชสมุนไพรทั้งที่พบในประเทศไทยและต่างประเทศหลายชนิด รวมทั้งสารบริสุทธิ์บางชนิดที่พบได้ในสมุนไพรทั่วไปอีกด้วย ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางบ้างแล้ว ได้แก่

สมุนไพรไทยที่มีรายงานว่ามียุทธิตายเครียด คือ กะทกรกฝรั่ง (*Passiflora edulis*) (Petry et al, 2001), บัวบก (*Centella asiatica*) (Bradwejn et al, 2000), พุทราจีน (*Zizyphus jujuba*) (Peng et al, 2000), ปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia*) (Ang and Cheang, 1999), ขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) (Thongsaard et al, 1996), สะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) (Jaiswal, Bhattacharya and Acharya, 1994), น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta*) (Lanhers et al, 1990) ส่วนพืชสกุลที่พบในประเทศไทยและมีรายงานฤทธิ์นี้ ได้แก่ สกุล *Rubus* (Nogueira et al, 1998) และ *Jatropha* (Okuyama et al, 1996) สารเคมีในพืชที่พบได้ทั่วไปและมีรายงานว่ามียุทธินี้ คือ สารในกลุ่ม flavonoid ได้แก่ chrysin และ apigenin (Viola et al, 1995; Paladini et al, 1999) หรือสารกลุ่ม phenylpropanoid ได้แก่ honokiol ซึ่งพบในพืชสกุล *Magnolia* หลายชนิด (Kuribara et al, 1999)

สมุนไพรไทยที่เคยมีรายงานฤทธิ์ด้านชัก คือ ก้ามปู (*Albizia lebbek*), ชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*), ทองกวาว (*Butea monosperma*) (Kasture, Chopde and Deshmukh, 2000), กานพลู (*Eugenia caryophyllata*) (Pourgholami *et al*, 1999), ว่านน้ำ (*Acorus gramineus*) (Liao *et al*, 1998), ผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidum*) (Simon and Singh, 1986), มะมุ่นดง (*Elaeocarpus ganitrus*) (Dasgupta, Agarwal and Basu, 1984) และ หม่อน (*Morus alba*) (Yamatake, Shibata and Nagai, 1976) ในขณะที่ยังมีพืชบางสกุลที่พบในประเทศไทยและเคยมีรายงานว่ามียุทธินี้ ได้แก่ สกุล *Cyperus* (Bum *et al*, 2001), *Annona* (Gonzalez-Trujano *et al*, 2001), *Magnolia* (Bastidas-Ramirez *et al*, 1998), *Viscum* (Amabeoku, Leng and Syce, 1998), *Artemisia* (de Lima, Morato and Takahashi, 1993), *Piper* (Abila, Richens and Davies, 1993), *Maytenus* (Oliveira *et al*, 1991), *Salvia* (Akbar, Tariq and Nisa, 1985), *Ipomoea* (Gonzalez-Ramirez *et al*, 1985), *Cnestis* (Declume, Assamoi and Akre, 1984) และ *Canscora* (Dikshit, Tewari and Dixit, 1972) สารในพืชมีพบได้บ่อยและมีรายงานว่ามียุทธินี้ ได้แก่ สารกลุ่ม monoterpenoid คือ linalool (Elisabetsky, Marschner and Souza, 1995; Re *et al*, 2000) และ flavonoid คือ chrysin (Medina *et al*, 1990)

ส่วนสมุนไพรไทยที่มีรายงานฤทธิ์สงบระงับ คือ หม่อน (Yamatake, Shibata and Nagai, 1976), ปิงขาว (*Clerodendron colebrookianum*) (Gupta, Mazumder and Das, 1998), ทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) (Hasrat *et al*, 1997), ยอ (*Morinda citrifolia*) (Younos *et al*, 1990), ว่านน้ำ (*Acorus calamus*) (Panchal *et al*, 1989) และ พุทราจีน (Shibata and Fukushima, 1975) และสกุลที่เคยมีรายงานฤทธิ์ ได้แก่ สกุล *Cyperus* (Rakotonirina *et al*, 2001), *Albizia* (Kang *et al*, 2000), *Rauvolfia* (Madawala *et al*, 1994) และ *Lobelia* (Subarnas *et al*, 1993)

จึงเห็นได้ว่า ถ้าหากได้มีการนำข้อมูลงานวิจัยที่มีกระบวนการทางวิทยาศาสตร์รองรับ มา ร่วมกับการคัดเลือกโดยอ้างอิงจากตำรายาพื้นบ้าน ก็น่าจะช่วยให้เราสามารถไขประโยชน์จากพืช สมุนไพรในท้องถิ่นสำหรับแก้ปัญหาเร่งด่วนจากการเสพยาออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทเหล่านี้ได้อย่างเป็น ระบบมากยิ่งขึ้น ทั้งยังเป็นการส่งเสริมการพึ่งตนเอง โดยพัฒนาญาใหม่ผ่านกระบวนการวิจัยที่ครบ วงจร รวมทั้งเป็นการสร้างองค์ความรู้และทักษะอันจะเอื้อต่อการพัฒนาและวิจัยยาใหม่ต่อไปใน อนาคต

2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

ความพยายามในการพัฒนา ibogaine ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นสาร ด้านการเสพติด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรที่นอกจากใช้รักษาโรคโดยทั่วไปแล้ว ยัง สามารถใช้แก้ปัญหาเร่งด่วนทางสังคมได้เช่นกัน สมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นดังกล่าวได้ ย่อม ต้องมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสมองหรือระบบสารสื่อประสาท การทบทวน

เอกสารที่เกี่ยวข้องชี้ให้เห็นว่ามีสมุนไพรมากมายที่สามารถส่งผลกระทบต่อร่างกายในแง่ดี โดยอาจแสดงผลในลักษณะของการเป็นยาที่ช่วยต้านชัก (anticonvulsant หรือ antiepileptic) คลายเครียด (anxiolytic) หรือสงบระงับ (sedative) ซึ่งในปัจจุบันก็มีสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกนำไปพัฒนาไปใช้เป็นยากันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบยุโรป ได้แก่ kava (*Piper methysticum*) สำหรับคลายเครียด (Pittler and Ernst, 2000), St John's wort (*Hypericum perforatum*) สำหรับต้านอาการซึมเศร้า (Di Carlo et al, 2001) หรือ valerian (*Valeriana officinalis*) สำหรับช่วยให้นอนหลับ (Ernst, 1999) เป็นต้น

จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง จะเห็นได้ว่ายังมีสมุนไพรอีกมากมายทั้งที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศซึ่งแสดงฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งพืชสมุนไพรที่มีการกล่าวถึงไว้ตามตำรายาพื้นบ้าน ว่าใช้สำหรับรักษาอาการที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบดังกล่าว ซึ่งน่าจะได้มีการรวบรวมความรู้ทั้งในเชิงของภูมิปัญญาท้องถิ่นและตามหลักวิทยาศาสตร์ที่มีข้อพิสูจน์แน่ชัดมาประยุกต์เข้าด้วยกัน เพื่อสังเคราะห์เป็นข้อมูลสำหรับเลือกหาพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางอันอาจใช้ด้านฤทธิ์ของสารกระตุ้นได้ เมื่อคัดเลือกสมุนไพรที่จะนำมาวิจัยแล้ว การสกัดควบคู่ไปกับการตรวจสอบฤทธิ์ อันเป็นไปตามหลักการ bioactivity-guided fractionation จะช่วยให้สามารถตรวจสอบหาสารหรือสิ่งสกัดที่ออกฤทธิ์ได้อย่างถูกต้องแน่นอนยิ่งขึ้น

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดสมุนไพร และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท โดยดำเนินการสกัดควบคู่ไปกับการตรวจสอบฤทธิ์ของสารในหลอดทดลอง (bioactivity-guided fractionation)
2. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท

4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การศึกษาข้อมูล และคัดเลือกสมุนไพร

ในการคัดเลือกสมุนไพรจำนวน 50 ชนิดเพื่อนำมาทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาข้อมูล และกำหนดหลักการในการคัดเลือกพืชสมุนไพร ดังนี้

4.1.1 คัดเลือกโดยอ้างอิงข้อมูลการใช้ในตำรายาพื้นบ้านของไทย โดยแหล่งข้อมูลหลักคือ ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม (กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2541) ร่วมกับการสอบถามข้อมูลจากแพทย์พื้นบ้าน เลือกสมุนไพรที่มีสรรพคุณซึ่งอาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ของพืชนั้นต่อระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่

สมุนไพรที่มีฤทธิ์แก้ร้อนไม่หลับ เลือกศึกษาดอกขี้เหล็ก (*Cassia siamea* วงศ์ Leguminosae) กับ รากพุดอง (*Azima sarmentosa* วงศ์ Salvadoraceae)

สมุนไพรแก้ปวดคลั่ง เลือกศึกษาผลยี่ห่วย (*Cuminum cyminum* วงศ์ Umbelliferae), เถากระทิงหมาบ้า (*Dregea volubilis* วงศ์ Asclepiadaceae) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa* วงศ์ Zingiberaceae)

สมุนไพรที่ใช้ระงับประสาท เลือกศึกษาใบหม่อน (*Morus alba* วงศ์ Moraceae), รากระย่อม (*Rauvolfia serpentina* วงศ์ Apocynaceae) และแก่นสน (*Pinus sp.* วงศ์ Pinaceae)

สมุนไพรที่ใช้แก้กระสับกระส่าย เลือกศึกษาเนื้อไม้จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* วงศ์ Myristicaceae) กับ ว่านมหากาฬ (*Gynura pseudochina* var. *hispida* วงศ์ Compositae)

สมุนไพรซึ่งใช้เป็นยาถอนพิษเบื่อเมา หรือมีสรรพคุณว่าเมื่อรับประทานแล้ว จะทำให้ไม่เมาสุรา ผู้วิจัยได้เลือกศึกษารางจืด (*Thunbergia laurifolia* วงศ์ Thunbergiaceae), โลดทะนงแดง (*Trigonostemon reidioides* วงศ์ Euphorbiaceae) และมะรุม (*Moringa oleifera* วงศ์ Moringaceae)

4.1.2 คัดเลือกโดยอ้างอิงรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ ฤทธิ์คลายเครียด (anxiolytic) ด้านชัก (anticonvulsant) และสงบระงับ (sedative)

สมุนไพรไทยที่มีรายงานว่ามียุทธศาสตร์คลายเครียด เลือกศึกษาบัวบก (*Centella asiatica* วงศ์ Umbelliferae) (Bradwejn et al., 2000), รากปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* วงศ์ Simaroubaceae) (Ang and Cheang, 1999), ขี้เหล็ก (*C. siamea*) (Thongsaard et al., 1996), น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* วงศ์ Euphorbiaceae) (Lanhers et al., 1990), ใบก้ามปู (*Albizia lebeck* วงศ์ Leguminosae) (Une et al., 2001) และเปลือกต้นโพธิ์ (*Ficus religiosa* วงศ์ Moraceae) (Ratnasooriya and Dharmasiri, 1999a)

พืชสกุลที่พบในประเทศไทยและเคยมีรายงานฤทธิ์คลายเครียดมีอยู่หลายชนิด ซึ่งเมื่อพิจารณาโดยอาศัยหลักความสัมพันธ์ในเชิงเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) จึงมีความเป็นไปได้ว่า พืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันนี้อาจมีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้คล้ายคลึงกัน พืชสกุลเหล่านี้ได้แก่ สกุล *Jatropha* (Okuyama et al., 1996) ผู้วิจัยเลือกศึกษาสบู่แดง (*Jatropha gossypifolia* วงศ์ Euphorbiaceae), สกุล *Passiflora* (Dhawan et al., 2001) เลือกศึกษากระทกรก (*Passiflora foetida* วงศ์ Passifloraceae) และสกุล *Croton* (Lazarini et al., 2000) ได้เลือกศึกษาเปล้าใหญ่ (*Croton roxburghii* วงศ์ Euphorbiaceae)

สารในพืชที่พบได้ทั่วไปและมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์คลายเครียดคือ สารในกลุ่ม flavonoid ได้แก่ chrysin และ apigenin (Viola et al, 1995; Paladini et al, 1999) ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาพืช 2 ชนิดที่เคยมีรายงานว่ามียุทธศาสตร์ apigenin เป็นองค์ประกอบ คือ ผลฝรั่ง (*Psidium guajava* วงศ์

Myrtaceae) (Miean and Mohamed, 2001) กับ กระเพรา (*Ocimum sanctum* วงศ์ Labiatae) (Kelm et al., 2000)

สมุนไพรไทยที่เคยมีรายงานฤทธิ์ด้านชัก ผู้วิจัยเลือกศึกษาชบา (*Hibiscus rosa-sinensis* วงศ์ Malvaceae), ทองกวาว (*Butea monosperma* วงศ์ Leguminosae) (Kasture, Chopde and Deshmukh, 2000), กานพลู (*Eugenia caryophyllata* วงศ์ Myrtaceae) (Pourgholami et al., 1999), ว่านน้ำ (*Acorus gramineus* วงศ์ Araceae) (Liao et al., 1998), ผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidum* วงศ์ Umbelliferae) (Simon and Singh, 1986) และ หม่อน (*Morus alba* วงศ์ Moraceae) (Yamatake, Shibata and Nagai, 1976)

พืชสกุลที่พบในประเทศไทยและเคยมีรายงานว่ามียูเรียด้านชัก ได้แก่ สกุล *Annona* (Gonzalez-Trujano et al., 2001) ผู้วิจัยเลือกศึกษาน้อยหน่า (*Annona squamosa* วงศ์ Annonaceae), สกุล *Piper* (Abila, Richens and Davies, 1993) เลือกศึกษาพลู (*Piper betel* วงศ์ Piperaceae) และสกุล *Ipomoea* (Gonzalez-Ramirez et al., 1985) เลือกศึกษาผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* วงศ์ Convolvulaceae)

สารเคมีในพืชที่พบได้บ่อยและมีรายงานว่ามียูเรียด้านชัก ได้แก่ สารกลุ่ม monoterpenoid คือ linalool (Elisabetsky, Marschner and Souza, 1995; Re et al., 2000) ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกศึกษาพืช 3 ชนิดที่เคยมีรายงานว่ามียูเรียด้านชัก linalool เป็นองค์ประกอบ คือ แมงลัก (*Ocimum canum* วงศ์ Labiatae) (Weaver et al., 1991), โหระพา (*Ocimum basilicum* วงศ์ Labiatae) (Nacar and Tansi, 2000) และลูกผักชี (*Coriandrum sativum* วงศ์ Umbelliferae) (Kerrola and Kallio, 1993)

สมุนไพรไทยที่เคยมีรายงานฤทธิ์สงบระงับ ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาหม่อน (Yamatake, Shibata and Nagai, 1976), ยอ (*Morinda citrifolia* วงศ์ Rubiaceae) (Younos et al., 1990) และ ว่านน้ำ (Panchal et al., 1989) ในขณะที่พืชสกุลที่เคยมีรายงานฤทธิ์นี้ ได้แก่ สกุล *Erythrina* (Ratnasooriya and Dharmasiri, 1999b) ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาทองหลางไบมน (*Erythrina suberosa* วงศ์ Leguminosae)

สมุนไพรที่เคยมีรายงานฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางนอกเหนือจาก 3 อย่างดังกล่าว ก็ได้ถูกเลือกมาศึกษาด้วย คือ เมล็ดจันทน์เทศ (Sonavane et al., 2002) และ หมาก (*Areca catechu* วงศ์ Palmaceae) (Boucher and Mannan, 2002) รวมทั้งสมุนไพรไทยในสกุลเดียวกับที่เคยมีรายงานฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ สกุล *Plumbago* (Bopaiah and Pradhan, 2001) โดยเลือกศึกษาเจดมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* วงศ์ Plumbaginaceae)

4.1.3 คัดเลือกสมุนไพร หรือพืชในสกุลเดียวกับสมุนไพรดังกล่าว ที่เคยมีรายงานถึงความสามารถของสิ่งสกัดจากพืชเหล่านี้ในการจับกับตัวรับสารสื่อประสาทต่างๆ ได้แก่ สมอพิเภก (*Terminalia bellerica* วงศ์ Combretaceae) (Misra, 1998), ดาวเรือง (*Tagetes minuta* วงศ์ Compositae) (Garg and Mehta, 1998; Perillo et al., 1999), หญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* วงศ์ Cyperaceae) (Ha et al., 2002) และกระท่อม (*Mitragyna speciosa* วงศ์ Rubiaceae)

(Takayama et al., 2002) รวมทั้งพืชในสกุลเดียวกับที่มีรายงานฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ สกุล *Mitragyna* เลือกศึกษากระท่อมโคก (*Mitragyna hirsute*), สกุล *Vitex* (Meier et al., 2000) เลือกศึกษาคนทีสอ (*Vitex trifolia* วงศ์ Verbenaceae) และสกุล *Schefflera* (Zhu and Li, 1999) เลือกศึกษาหนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha* วงศ์ Araliaceae)

4.1.4 คัดเลือกสมุนไพรแบบสุ่ม โดยพืชที่ถูกเลือกโดยวิธีนี้มี 5 ชนิด คือ มะตูม (*Aegle marmelos* วงศ์ Rutaceae), ไก่เตี้ย (*Canavalia rosea* วงศ์ Leguminosae), ผักแขยง (*Limnophila aromatica* วงศ์ Scrophulariaceae) ผักแครด (*Synedrella nodiflora* วงศ์ Compositae) และ ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* วงศ์ Capparidaceae)

4.2 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรไทยทั้งหมด 50 ชนิด จำนวน 51 ตัวอย่าง ได้ถูกจัดหามาจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือแหล่งอื่นๆในต่างจังหวัด รวมทั้งจัดซื้อจากที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดและร้านจำหน่ายเครื่องยาแผนโบราณ เพื่อนำมาเตรียมเป็นสิ่งสกัดสำหรับทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท รายชื่อสมุนไพรทั้งหมด มีดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 รายชื่อพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่นำมาเตรียมเป็นสารสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น

| ชื่อพืช | ส่วนที่ใช้ | รหัส | สถานที่เก็บ / จัดซื้อ | เวลาที่เก็บ / จัดซื้อ |
|-------------------------------------------|------------|--------|-----------------------|-----------------------|
| ขี้เหล็ก (<i>Cassia siamea</i>) | ดอก+ใบอ่อน | CS001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| ยี่หระ (<i>Cuminum cyminum</i>) | ผล | CC001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| จันทน์เทศ (<i>Myristica fragrans</i>) | เมล็ด | MF001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| จันทน์เทศ (<i>Myristica fragrans</i>) | ลำต้น | MFS001 | เภสัช จุฬาลงกรณ์ | เม.ย. 46 |
| หม่อน (<i>Morus alba</i>) | ใบ | MA001 | นครนายก | ม.ค. 46 |
| ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i>) | เหง้า | CL001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| เจตมูลเพลิงแดง (<i>Plumbago indica</i>) | ราก | PI001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| แมงลัก (<i>Ocimum canum</i>) | ใบ | OC001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| โหระพา (<i>Ocimum basilicum</i>) | ใบ | OB001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| ผักชี (<i>Coriandrum sativum</i>) | ผล | COS001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| สมอพิเภก (<i>Terminalia bellerica</i>) | ผล | TB001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| บัวบก (<i>Centella asiatica</i>) | ใบ | CA001 | นครปฐม | ม.ค. 46 |
| หมาก (<i>Areca catechu</i>) | เมล็ด | ARC001 | สระบุรี | ต.ค. 45 |
| หญ้าแห้วหมู (<i>Cyperus rotundus</i>) | เหง้า | CYR001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |

| ชื่อพืช | ส่วนที่ใช้ | รหัส | สถานที่เก็บ /จัดซื้อ | เวลาที่เก็บ /จัดซื้อ |
|-----------------------------------------------------------|------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i>) | ผล | PG001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| กะเพรา (<i>Ocimum sanctum</i>) | ใบ | OS001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| ยอ (<i>Morinda citrifolia</i>) | ราก | MC001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| น้ำนมราชสีห์ (<i>Euphorbia hirta</i>) | ทั้งต้น | EH001 | นครนายก | ม.ค. 46 |
| ปลาไหลเผือก (<i>Eurycoma longifolia</i>) | ราก | EL001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| โพธิ์ (<i>Ficus religiosa</i>) | เปลือกต้น | FR001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| กระท่อม (<i>Mitragyna speciosa</i>) | ใบ | MS001 | พังงา | ก.พ. 46 |
| กานพลู (<i>Eugenia caryophyllata</i>) | ดอกตูม | EC001 | ร้านย่านเยาวราช | ม.ค. 46 |
| ผักชีฝรั่ง (<i>Eryngium foetidum</i>) | ใบ | EF001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| กะทกรก (<i>Passiflora foetida</i>) | ใบ | PF001 | นครนายก | ม.ค. 46 |
| เปล้าใหญ่ (<i>Croton roxburghii</i>) | ใบ | CRR001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| ทองหลางใบมน (<i>Erythrina suberosa</i>) | ใบ | ES001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| กระท่อมโคก (<i>Mitragyna hirsuta</i>) | ใบ | MH001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| หนุমানประสานกาย (<i>Schefflera leucantha</i>) | ใบ | SL001 | เกสซ์ จุฬาย | เม.ย. 46 |
| พลู (<i>Piper betel</i>) | ใบ | PB001 | ปากคลองตลาด | ม.ค. 46 |
| น้อยหน่า (<i>Annona squamosa</i>) | ใบ | ANS001 | ระยอง | ม.ค. 46 |
| ผักบุ้งทะเล (<i>Ipomoea pes-caprae</i>) | ใบ | IP001 | ระยอง | ม.ค. 46 |
| มะรุม (<i>Moringa oleifera</i>) | ราก | MO001 | ระยอง | ม.ค. 46 |
| ระย่อม (<i>Rauvolfia serpentina</i>) | ราก | RS001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| พุดดอ (<i>Azima sarmentosa</i>) | ราก | AZS001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| สน (<i>Pinus sp.</i>) | แก่น | P001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| กระทิงหมาบ้า (<i>Dregea volubilis</i>) | เถา | DV001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| ว่านมหากาฬ (<i>Gynura pseudochina var. hispida</i>) | เหง้า | GP001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| ว่านน้ำ (<i>Acorus calamus</i>) | เหง้า | ACC001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |
| โลดทะนงแดง (<i>Trigonostemon reidioides</i>) | ราก | TR001 | เวชพงศ์อิสด | เม.ย. 46 |

| ชื่อพืช | ส่วนที่ใช้ | รหัส | สถานที่เก็บ /จัดซื้อ | เวลาที่เก็บ /จัดซื้อ |
|------------------------------------------|------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| ก้ามปู (<i>Albizia lebbek</i>) | ใบ | AL001 | นครปฐม | เม.ย. 46 |
| รางจืด (<i>Thunbergia laurifolia</i>) | ใบ | TL001 | เกสซ์ จุฬาย | เม.ย. 46 |
| สบู่แดง (<i>Jatropha gossypifolia</i>) | ใบ | JS001 | เกสซ์ จุฬาย | เม.ย. 46 |
| ชบา (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>) | ดอก | HR001 | นครปฐม | มี.ค. 46 |
| ทองกวาว (<i>Butea monosperma</i>) | ดอก | BM001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| ดาวเรือง (<i>Tagetes minuta</i>) | ดอก | TM001 | ปากคลองตลาด | มี.ค. 46 |
| คนที่स (<i>Vitex trifolia</i>) | ใบ | VT001 | เกสซ์ จุฬาย | มี.ค. 46 |
| มะตูม (<i>Aegle marmelos</i>) | ผล | AM001 | เวชพงศ์โฮสเทล | เม.ย. 46 |
| ไ้ไก่เตี้ย (<i>Canavalia rosea</i>) | ทั้งต้น | CAR001 | ระยอง | ม.ค. 46 |
| ผักแขยง (<i>Limnophila aromatica</i>) | ทั้งต้น | LA001 | ตลาดราชวัตร | มี.ค. 46 |
| ผักแครด (<i>Synedrella nodiflora</i>) | ทั้งต้น | SN001 | เกสซ์ จุฬาย | ม.ค. 46 |
| ผักเสี้ยนผี (<i>Cleome viscosa</i>) | ทั้งต้น | CV001 | ระยอง | ม.ค. 46 |

4.3 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์

สมุนไพรตัวอย่างในปริมาณพอสมควรถูกนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ก่อนที่จะนำไปแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol โดยทำซ้ำ 2-3 ครั้งจนได้สิ่งสกัดในครั้งสุดท้ายที่เจือจาง นำสิ่งสกัดที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกัน แล้วระเหยให้เข้มข้นขึ้นภายใต้การลดความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิ 40-45°C จนได้เป็นสิ่งสกัดหยาบ ethanol (ethanol extract, F001) ซึ่งถูกนำไประเหยแห้งสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการทดสอบฤทธิ์ (โดยโครงการวิจัยที่ 2) พบว่าสิ่งสกัดหยาบ ethanol ของสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 (dopamine 1 receptor) ไม่น้อยกว่า 50% มี 3 ชนิด คือ สารสกัดใบน้อยหน้า (ANS001), สารสกัดใบและลำต้นไ้ไก่เตี้ย (CAR001) และ สารสกัดใบกะทกรก (PF001)

สิ่งสกัดหยาบสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 (α_1 receptor) ไม่น้อยกว่า 50% มี 2 ชนิด คือ สารสกัดรากระยอง (RS001) และ สารสกัดผลมะตูม (AM001)

สิ่งสกัดหยาบสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับ 5-HT₂ (5-HT₂ receptor) ไม่น้อยกว่า 50% มี 1 ชนิด คือ สารสกัดรากระยอง (RS001)

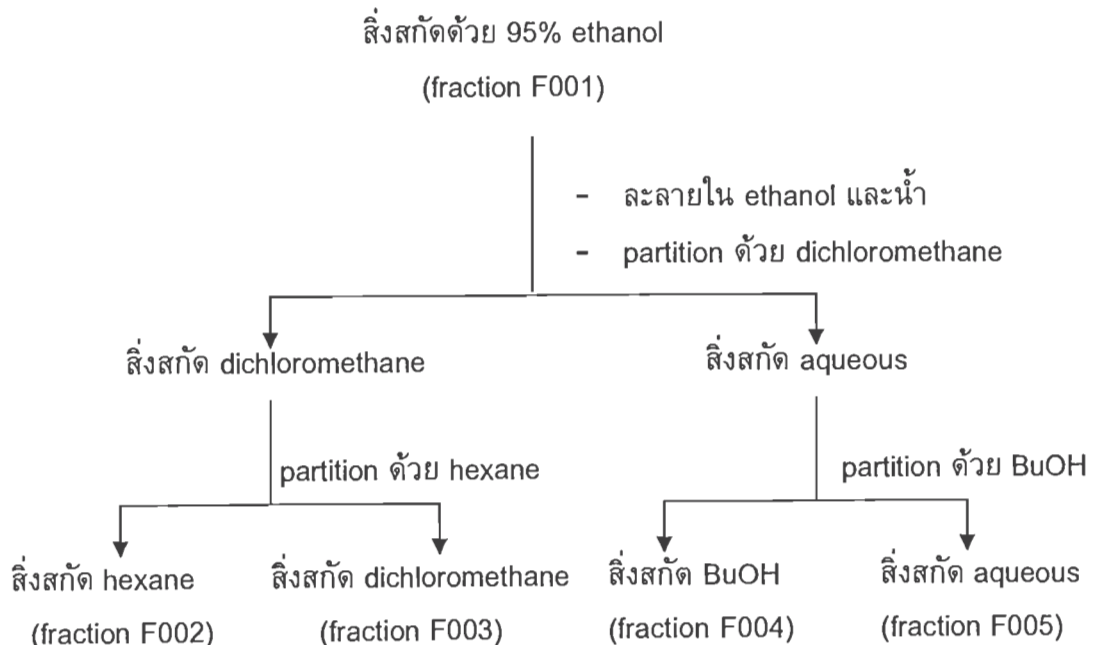
แต่เนื่องจากรากระยองเป็นสมุนไพรซึ่งทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ลดความดัน และกล่อมประสาท ทั้งยังมีการวิจัยแล้วอย่างกว้างขวาง (เพียวี เหมือนวงษ์ญาติ, 2537) ทางโครงการจึงตัดสินใจเลือกสมุนไพรโดยเน้นการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 เป็นหลัก นั่นคือ เลือก

ศึกษาสารสกัดใบน้อยหน่า (ANS001) สารสกัดใบและลำต้นไก่อเคี้ยว (CAR001) และ สารสกัดใบกะทกรก (PF001) โดยละเอียดต่อไป

4.4 การเตรียมสิ่งสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์และสกัดแยกสารสำคัญ

สิ่งสกัดหยาบ ethanol ของใบน้อยหน่า ใบกะทกรก และใบกับลำต้นไก่อเคี้ยว ถูกนำมาสกัดแยกต่อไปด้วยวิธี partition โดยการเติมน้ำลงไปบางส่วนเพื่อเพิ่มความเป็นขี้ แล้วจึง partition กับตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) ได้เป็นสิ่งสกัด dichloromethane ซึ่งเมื่อนำมา partition ต่อด้วยตัวทำละลายที่มีความขี้้นน้อยกว่า คือ hexane ทำให้ได้เป็นสิ่งสกัดส่วนที่มีความขี้้นต่ำสุด คือ สิ่งสกัด hexane (hexane extract, F002) กับส่วนซึ่งมีขี้้นมากกว่า คือ สิ่งสกัด dichloromethane (CH_2Cl_2 extract, F003) ในทำนองเดียวกัน สารสกัดส่วนที่เหลือจากการ partition ด้วย dichloromethane ถูกนำมา partition ต่อด้วยตัวทำละลายที่ขี้้นสูงขึ้น แต่ไม่ผสมเข้ากับน้ำ คือ ตัวทำละลาย butanol (BuOH) ทำให้ได้สิ่งสกัด butanol (BuOH extract, F004) และส่วนที่เหลือซึ่งมีขี้้นสูงสุดเป็นสิ่งสกัด aqueous (aqueous extract, F005) ขั้นตอนการสกัดเป็นดังแสดงในแผนภูมิที่ 1.1 สิ่งสกัดทั้ง 5 ชนิดถูกนำมาระเหยแห้ง และแบ่งบางส่วนไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ก่อนที่จะเลือกสิ่งสกัดที่มีฤทธิ์น่าสนใจไปทำการสกัดเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

แผนภูมิที่ 1.1 ขั้นตอนการ partition เพื่อเตรียมสิ่งสกัดสำหรับทดสอบฤทธิ์และสกัดแยกสารสำคัญ



4.5 การสกัดแยก และพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่บริสุทธิ์จากพืชสมุนไพร

จากข้อมูลด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆกัน ของสมุนไพรที่เลือกแล้ว ทั้ง 3 ชนิด พิจารณาเลือกสิ่งสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดที่สุดมาสกัดแยก เพื่อทำการศึกษารวบรวมองค์ประกอบทางเคมี โดยขั้นตอนนี้ใช้เทคนิคทาง chromatography หลายๆ แบบร่วมกัน ได้แก่ adsorption chromatography ด้วย silica gel ใน open column, size exclusion chromatography ด้วย Sephadex LH-20 และ flash column chromatography สารบริสุทธิ์ที่ถูกสกัดแยกได้ถูกนำมาหาค่าคงที่ทางกายภาพ ได้แก่ ค่าจุดหลอมเหลว specific optical rotation รวมทั้งพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ ultraviolet, infrared, mass spectroscopy และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy ทั้งแบบ one- และ two-dimensional เพื่อใช้ข้อมูลดังกล่าวสำหรับควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเหล่านี้ ในลักษณะของ biological marker หรือเป็นข้อมูลเพื่อการปรับปรุงสูตรโครงสร้างของสารให้มีฤทธิ์ดีขึ้นได้ต่อไปในอนาคต

5. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

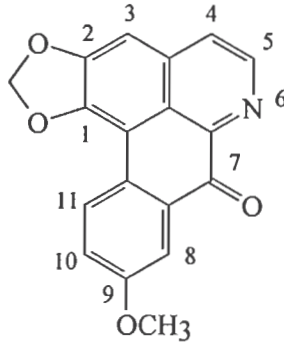
5.1 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบน้อยหน่า (*Annona squamosa* วงศ์ Annonaceae)

ผู้วิจัยได้เลือกสิ่งสกัด CH_2Cl_2 จากใบน้อยหน่า (fraction ANS003) ปริมาณ 12 กรัมมาสกัดแยกด้วย silica gel column chromatography ด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น เริ่มจาก hexane-ethyl acetate-methanol ในอัตราส่วน 1:0:0 ไปเป็น 0:1:0 จนถึง 0:0:1 ได้เป็น fraction ใหญ่ๆ 14 fractions (ANS3F1 - ANS3F14)

เมื่อนำ fraction จากใบน้อยหน่าเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 พบว่า fraction ANS3F11 มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 ได้ดีที่สุด โดยมีค่ายับยั้งการจับกับตัวรับที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ เท่ากับ $89.2 \pm 0.9\%$ จาก fraction นี้สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด คือ β -sitosterol glucoside (Kojima et al., 1990) และก่อนที่จะทำการระเหย fraction นี้จนแห้ง พบว่ามีตะกอนของสารตกแยกออกมา ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย NMR spectroscopy พบว่าสารดังกล่าวยังไม่บริสุทธิ์ แต่เป็นของผสมของสารกลุ่ม sterol glycoside

นำ fraction นี้มาแยกด้วยวิธี silica gel column chromatography โดยใช้ CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วน 40:1 ไปจนถึง 0:1 เป็นตัวชะ สามารถแยกได้ fraction ย่อยๆ ทั้งหมด 70 fractions เมื่อนำ fraction ที่ 9-11 (น้ำหนักรวม 1.25 กรัม) ไปแยกด้วยวิธี gel filtration โดยผ่าน Sephadex LH20 ซึ่งชะด้วย chloroform-methanol ในอัตราส่วน 2:1 สามารถแยกได้สาร AS3F11c (น้ำหนัก 7 มิลลิกรัม) พิจารณาจากข้อมูล NMR ของสาร (ตารางที่ 1.2) พบว่าเป็นสารในกลุ่ม dioxoaporphine alkaloid ชื่อ lanuginosine ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานการพบในพืชสกุลเดียวกับน้อยหน่า รวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Annonaceae มาก่อนแล้ว และมีรายงานว่ามีการจับ

กันของ platelet (Pyo, Yun-Choi and Hong, 2003) รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนต่อเอ็นไซม์ aspartic protease ที่หลั่งออกมาโดยเชื้อ *Candida albicans* (Zhang et al., 2002)



Lanuginosine

ตารางที่ 1.2 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร lanuginosine (ใน CDCl_3 , ที่ 300 MHz)

| ตำแหน่ง | δ_{H} (ppm) |
|------------------------|------------------------------|
| 3 | 7.09 (s) |
| 4 | 7.73 (d, $J = 5.1$ Hz) |
| 5 | 8.85 (d, $J = 5.1$ Hz) |
| 8 | 7.97 (d, $J = 2.7$ Hz) |
| 10 | 7.24 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz) |
| 11 | 8.48 (d, $J = 9.0$ Hz) |
| OCH_3 | 3.96 (s) |
| OCH_2O | 6.32 (s) |

ส่วน fraction ที่ 12-17 (น้ำหนักรวม 529 มิลลิกรัม) เมื่อนำไปแยกด้วย silica gel column ซึ่งชะด้วย CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วน 20:1 ไปจนถึง 0:1 ได้สิ่งสกัดแยกย่อยลงอีกเป็น 36 fraction โดยที่จาก fraction ที่ 20-26 สามารถแยกสาร AS3F11b ได้ในลักษณะของตะกอนสีขาวหนัก 46.5 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาราวๆ จาก NMR spectrum พบว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่ม acetogenin ซึ่งจะต้องศึกษาโดยละเอียดต่อไป

หลังจากนั้น ได้จัดส่งสารที่แยกได้ที่มีปริมาณมากพอสมควร คือ สาร AS3F11a และ AS3F11b ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับสารสื่อประสาท และได้เก็บใบน้อยหน่ามาเพิ่มเติม (น้ำหนักแห้ง 4.8 กิโลกรัม) เพื่อเตรียมสารสกัดสำหรับใช้กับสัตว์ทดลอง รวมทั้งเพื่อสกัดแยกสาร

เพิ่มมากขึ้น แต่ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชนี้พบว่าเป็นพิษค่อนข้างสูง จึงไม่ได้ดำเนินการต่อไป

5.2 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบกะทกรก (*Passiflora foetida* วงศ์ Passifloraceae)

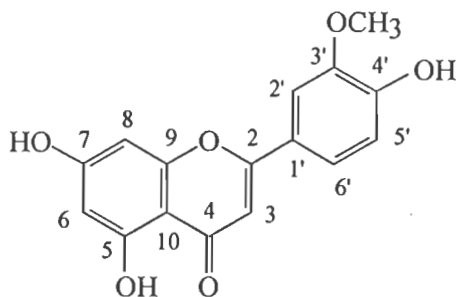
เมื่อนำ fraction ต่างๆ จากการ partition สิ่งสกัดหยาบ ethanol ของใบกะทกรกไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 พบว่า สิ่งสกัด CH_2Cl_2 (PF003) มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงได้นำ fraction นี้หนัก 27 กรัม มาแยกต่อด้วย silica gel column โดยใช้ CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวชะ ได้เป็น fraction ย่อย 5 fraction (PF003-1 ถึง PF003-5)

นอกจากนี้ ยังได้นำสิ่งสกัด hexane (PF002) ของใบกะทกรก หนัก 30 กรัม มาแยกต่อด้วย silica gel column โดยชะด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น เริ่มจาก hexane- CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วน 1:0:0 ไปเป็น 0:1:0 จนถึง 0:0:1 ได้เป็น fraction ย่อยจำนวน 7 fraction (PF002-1 ถึง PF002-7)

เมื่อทดสอบฤทธิ์แล้วพบว่า fraction PF003-1 ของกะทกรก มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 ได้ดีที่สุด มีค่ายับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ เท่ากับ $82.6 \pm 0.7\%$ โดยมี fraction PF002-7 และ fraction PF003-2 มีฤทธิ์รองลงมา จึงนำ fraction PF003-1 (น้ำหนัก 1.79 กรัม) มาแยกต่อด้วย silica gel column โดยชะด้วย CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วน 49:1 ได้เป็น 3 fraction หลัก คือ PF003-6 ถึง PF003-8 เมื่อนำ Fraction PF003-7 ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดมาแยกต่อด้วย Sephadex LH20 column โดยใช้ตัวทำละลายเป็น chloroform-methanol อัตราส่วน 2:1 สามารถแยกออกได้เป็นอีก 3 fraction ย่อย คือ PF003-9 ถึง PF003-11

สำหรับ fraction PF003-9 เมื่อถูกนำไปแยกต่อ ด้วยวิธี silica gel column chromatography ซึ่งมี hexane-ethyl acetate ในอัตราส่วน 2:1 เป็นตัวชะ ทำให้สามารถแยก fraction นี้ย่อยลงไปอีก เป็น 3 fraction คือ PF003-12 ถึง PF003-14 เมื่อนำ fraction PF003-13 มาตกผลึกซ้ำ สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ซึ่งให้รหัสเป็น PF4 น้ำหนัก 7.11 มิลลิกรัม และต้องนำไปศึกษาสูตรโครงสร้างต่อไป

ส่วน fraction PF003-2 (หนัก 1.05 กรัม) ได้ถูกนำมาแยกด้วย Sephadex LH20 column โดยใช้ chloroform-methanol อัตราส่วน 2:1 เป็นตัวชะ ได้เป็น 4 fraction ย่อย (PF003-15 ถึง PF003-18) เมื่อนำ fraction PF003-16 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกซ้ำ ได้เป็นสาร PF2 หนัก 11.1 มิลลิกรัม วิเคราะห์ด้วย NMR spectroscopy (ตารางที่ 1.3) พบว่าสารนี้คือ สารในกลุ่ม flavonoid ชื่อ chrysoeriol (Harborne and Mabry, 1982)



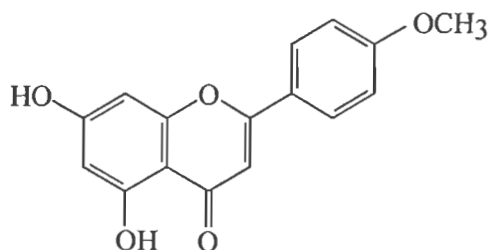
Chrysoeriol

ตารางที่ 1.3 ข้อมูล ^1H NMR (ที่ 300 MHz) และ ^{13}C NMR (ที่ 75 MHz) ของสาร chrysoeriol (ใน $\text{DMSO-}d_6$)

| ตำแหน่ง | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 2 | - | 163.5 |
| 3 | 6.89 (s) | 103.2 |
| 4 | - | 181.6 |
| 5 | - | 157.2 |
| 6 | 6.19 (s) | 98.8 |
| 7 | - | 164.0 |
| 8 | 6.50 (s) | 94.1 |
| 9 | - | 161.3 |
| 10 | - | 103.7 |
| 1' | - | 120.3 |
| 2' | 7.55 (br s) | 110.2 |
| 3' | - | 150.6 |
| 4' | - | 147.9 |
| 5' | 6.92 (d, $J = 7.2$ Hz) | 115.8 |
| 6' | 7.55 (d, $J = 7.2$ Hz) | 121.5 |
| 3'-OCH ₃ | 3.88 (s) | 56.1 |

ส่วน fraction PF003-17 เมื่อนำมาแยกต่อด้วย silica gel column โดยใช้ ethyl acetate-methanol ในอัตราส่วน 4:1 เป็นตัวชะ สามารถแยกย่อยลงอีกได้เป็น 3 fraction คือ fraction PF003-19 ถึง PF003-21 นำ fraction PF003-20 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกซ้ำ ได้สาร PF3

(น้ำหนัก 4.1 มิลลิกรัม) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoid เช่นเดียวกับสาร PF2 โดยสารนี้คือ acacetin (Harborne and Mabry, 1982) ซึ่งมีข้อมูล NMR ดังแสดงในตารางที่ 1.4



Acacetin

ตารางที่ 1.4 ข้อมูล ^1H NMR (ที่ 300 MHz) และ ^{13}C NMR (ที่ 75 MHz) ของสาร acacetin (ใน $\text{DMSO-}d_6$)

| ตำแหน่ง | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 2 | - | 164.0 |
| 3 | 6.76 (s) | 102.9 |
| 4 | - | 181.5 |
| 5 | - | 161.0 |
| 6 | 6.18 (s) | 98.9 |
| 7 | - | 164.1 |
| 8 | 6.47 (s) | 94.0 |
| 9 | - | 157.5 |
| 10 | - | 104.0 |
| 1' | - | 121.0 |
| 2', 6' | 7.91 (d, $J = 7.7$ Hz) | 128.4 |
| 3', 5' | 6.91 (d, $J = 7.7$ Hz) | 116.0 |
| 4' | - | 161.3 |
| 4'-OCH ₃ | 5.73 (s) | 55.0 |

นอกจากนี้ ได้ทำการดกผลึกซ้ำ fraction PF003-3 ได้เป็นสาร PF1 ซึ่งเมื่อศึกษาด้วย NMR spectroscopy พบว่าเป็นของผสมของ β -sitosterol glycoside กับ stigmasterol glycoside (Kojima et al., 1990)

5.3 การสกัดแยกสารสำคัญจากสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ของใบและลำต้นโกโก้ (Canavalia rosea วงศ์ Leguminosae)

ในเบื้องต้น ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับตัวรับ dopamine 1 ของสิ่งสกัดที่ได้จากการ partition สิ่งสกัดหยาบ ethanol ของลำต้นและใบโกโก้แสดงให้เห็นว่า สิ่งสกัด CH_2Cl_2 มีฤทธิ์ดีที่สุด เมื่อนำลำต้นและใบโกโก้ น้ำหนักแห้ง 940 กรัมมาบดละเอียด แล้วแช่ในตัวทำละลาย ethanol ปริมาตร 4 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมสิ่งสกัดที่ได้จากการแช่สกัดทุกครั้งมาระเหยแห้ง ได้เป็นสิ่งสกัด ethanolหนัก 133 กรัม จากนั้นจึงละลายกลับลงในตัวทำละลาย 70% ethanol แล้ว partition ด้วย CH_2Cl_2 ปริมาตร 4 ลิตรอีก 3 ครั้ง ได้เป็นสิ่งสกัด CH_2Cl_2 ซึ่งถูกนำไป partition ต่อด้วย hexane (3 ครั้งๆละ 4 ลิตร) ได้สิ่งสกัด hexane (CAR002) 23 กรัมกับสิ่งสกัด CH_2Cl_2 (CAR003) 6 กรัม สารสกัดแอลกอฮอล์ส่วนที่เหลือหลังจาก partition ด้วย CH_2Cl_2 ไปแล้ว เมื่อนำมา partition กับ butanol (3 ครั้งๆละ 4 ลิตร) ได้เป็นสิ่งสกัด butanol (CAR004) 20 กรัม

นำสิ่งสกัด hexane มาแยกด้วย silica gel column ขนาด 10×10 ซม. โดยใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane-ethyl acetate อัตราส่วนตั้งแต่ 1:0 ถึง 0:1 ตามด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate-methanol ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:0 ถึง 0:1 ได้เป็น fraction ย่อย 8 fraction (A1-A8). จาก fraction A8 ได้สาร CAR1 ปริมาณ 7 มิลลิกรัม ตกผลึกออกมาเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน

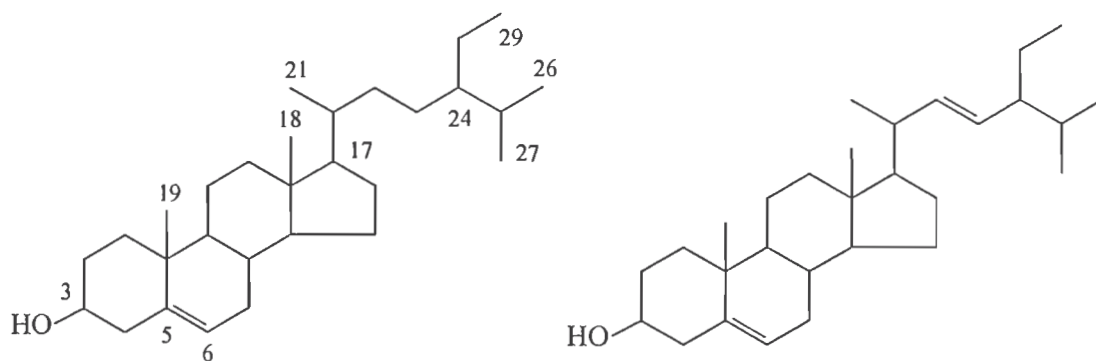
ส่วน fraction A6 เมื่อทิ้งค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร CAR3 ปริมาณ 90 มิลลิกรัม ตกตะกอนแยกออกมา

เมื่อนำ fraction A4 ไปแยกต่อด้วย silica gel column ขนาด 2.5×20 ซม. โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane-ethyl acetate อัตราส่วนตั้งแต่ 9:1 ถึง 0:1 เป็นตัวชะ สามารถแยกได้ผลึกรูปเข็มของสาร CAR2 ปริมาณ 41 มิลลิกรัม

สิ่งสกัด CH_2Cl_2 (CAR003) เมื่อนำมาแยกด้วยวิธี silica gel column chromatography ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 -methanol ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:0 ถึง 0:1 ได้เป็น 4 fraction ย่อย (B1-B4) เมื่อนำ fraction B4 มาทำให้สะอาดขึ้นด้วยการตกผลึกซ้ำในตัวทำละลายผสมของ CH_2Cl_2 -methanol อัตราส่วน 2:1 ได้เป็นผลึกของสารบริสุทธิ์ CAR4 ปริมาณ 16 มิลลิกรัม

สิ่งสกัด butanol เมื่อทิ้งไว้ระยะหนึ่ง พบว่ามีสาร CAR5 ปริมาณ 2.1 กรัม ตกตะกอนแยกออกมาในลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง

สาร CAR2 เมื่อนำมาศึกษาข้อมูลทาง NMR พบว่าเป็นของผสมของสารในกลุ่ม steroid 2 ชนิดซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช คือ สาร β -sitosterol กับ stigmasterol ในอัตราส่วน 2:1 (Wright et al., 1978) ดังข้อมูล ^{13}C NMR ที่แสดงในตารางที่ 1.5

 β -Sitosterol

Stigmasterol

ตารางที่ 1.5 ข้อมูล ^{13}C NMR ของสาร β -sitosterol กับ stigmasterol (ใน CDCl_3 , ที่ 75 MHz)

| ตำแหน่ง | β -Sitosterol | Stigmasterol |
|---------|---------------------|--------------|
| 1 | 37.3 | 37.3 |
| 2 | 31.8 | 31.8 |
| 3 | 71.8 | 71.8 |
| 4 | 42.4 | 42.4 |
| 5 | 140.6 | 140.6 |
| 6 | 121.6 | 121.6 |
| 7 | 32.0 | 32.0 |
| 8 | 32.0 | 32.0 |
| 9 | 50.2 | 50.2 |
| 10 | 36.6 | 36.6 |
| 11 | 21.2 | 21.2 |
| 12 | 39.9 | 39.8 |
| 13 | 42.4 | 42.4 |
| 14 | 56.8 | 56.9 |
| 15 | 24.4 | 24.4 |
| 16 | 28.4 | 29.0 |
| 17 | 56.0 | 56.1 |
| 18 | 12.0 | 12.1 |
| 19 | 19.5 | 19.5 |
| 20 | 36.2 | 40.6 |

| ตำแหน่ง | β -Sitosterol | Stigmasterol |
|---------|---------------------|--------------|
| 21 | 18.9 | 21.2 |
| 22 | 34.0 | 138.2 |
| 23 | 26.2 | 129.1 |
| 24 | 45.9 | 51.3 |
| 25 | 29.3 | 32.0 |
| 26 | 20.0 | 21.3 |
| 27 | 19.2 | 19.2 |
| 28 | 23.2 | 25.5 |
| 29 | 12.0 | 12.1 |

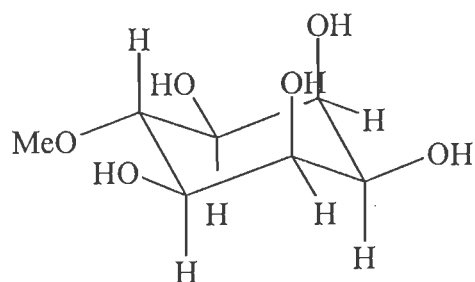
สาร CAR3 เมื่อศึกษาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy พบว่า คือ สาร β -sitosterol glucoside (Kojima et al., 1990) ซึ่งมีข้อมูล ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 1.6

ตารางที่ 1.6 ข้อมูล ^{13}C NMR ของสาร β -sitosterol glucoside (ใน $\text{DMSO}-d_6$, ที่ 75 MHz)

| ตำแหน่ง | δ_{C} (ppm) |
|---------|---------------------------|
| 1 | 36.9 |
| 2 | 29.4 |
| 3 | 76.7 |
| 4 | 38.4 |
| 5 | 140.3 |
| 6 | 121.1 |
| 7 | 31.5 |
| 8 | 31.5 |
| 9 | 49.7 |
| 10 | 36.3 |
| 11 | 20.7 |
| 12 | 39.0 |
| 13 | 41.9 |
| 14 | 56.2 |
| 15 | 24.0 |
| 16 | 27.9 |

| ตำแหน่ง | δ_c (ppm) |
|---------|------------------|
| 17 | 55.5 |
| 18 | 11.8 |
| 19 | 19.2 |
| 20 | 35.6 |
| 21 | 18.8 |
| 22 | 33.5 |
| 23 | 25.6 |
| 24 | 45.2 |
| 25 | 28.8 |
| 26 | 19.8 |
| 27 | 19.1 |
| 28 | 22.8 |
| 29 | 11.9 |
| 1' | 100.7 |
| 2' | 73.5 |
| 3' | 76.9 |
| 4' | 70.1 |
| 5' | 76.8 |
| 6' | 61.2 |

สาร CAR4 ซึ่งแยกได้จากสิ่งสกัด CAR003 มีลักษณะเป็นผลึกใส ไม่มีสี จากการพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย ^1H NMR และ ^{13}C -NMR spectroscopy (ตารางที่ 1.7) ทำให้ทราบว่าสารนี้เป็นอนุพันธ์ของ cyclitol ชนิดหนึ่งคือ *epi*-inositol 6-O-methyl ether

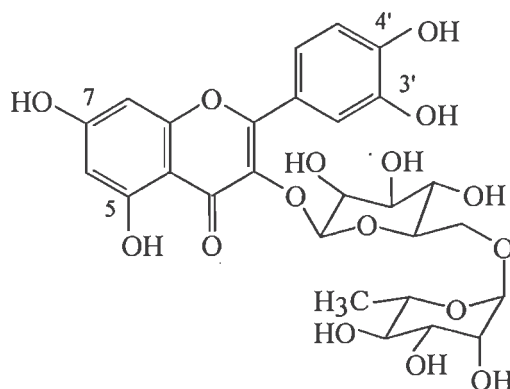


Epi-inositol 6-O-methyl ether

ตารางที่ 1.7 ข้อมูล ^1H NMR (ที่ 300 MHz) และ ^{13}C NMR (ที่ 75 MHz) ของสาร *epi*-inositol 6-O-methyl ether (ใน $\text{DMSO-}d_6$)

| ตำแหน่ง | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 3.32 (<i>ddd</i> , $J = 9.3, 4.9, 2.6$ Hz) | 72.5 |
| 2 | 3.43 (<i>ddd</i> , $J = 6.6, 5.8, 2.6$ Hz) | 71.0 |
| 3 | 3.62 (<i>ddd</i> , $J = 6.6, 3.4, 2.6$ Hz) | 72.1 |
| 4 | 3.62 (<i>ddd</i> , $J = 6.6, 3.4, 2.6$ Hz) | 72.7 |
| 5 | 3.50 (<i>ddd</i> , $J = 9.3, 6.6, 2.6$ Hz) | 70.2 |
| 6 | 2.99 (<i>t</i> , $J = 9.3$ Hz) | 83.9 |
| 1-OH | 4.48 (<i>d</i> , $J = 4.9$ Hz) | - |
| 2-OH | 4.30 (<i>d</i> , $J = 5.8$ Hz) | - |
| 3-OH | 4.69 (<i>d</i> , $J = 3.4$ Hz) | - |
| 4-OH | 4.60 (<i>d</i> , $J = 3.4$ Hz) | - |
| 5-OH | 4.43 (<i>d</i> , $J = 6.4$ Hz) | - |
| 6-OCH ₃ | 3.43 (<i>s</i>) | 59.8 |

สำหรับสารสีเหลืองที่ตกตะกอนแยกออกมาจากสิ่งสกัด butanol (fraction CAR004) นั้น เมื่อนำไปตรวจสอบด้วย NMR spectroscopy พบว่าเป็นสารในกลุ่ม flavonoid glycoside คือ สาร rutin (หรือ quercetin 3-rutinoside) (De Britto et al., 1995) ซึ่งมีข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 1.8



Rutin

ตารางที่ 1.8 ข้อมูล ^1H NMR (300 MHz) และ ^{13}C NMR (75 MHz) ของสาร rutin (ใน DMSO- d_6)

| ตำแหน่ง | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) |
|---------|---------------------------------|---------------------------|
| 2 | | 156.1 |
| 3 | | 133.0 |
| 4 | | 177.0 |
| 5 | | 160.9 |
| 6 | 6.18 (<i>br s</i>) | 98.5 |
| 7 | | 163.8 |
| 8 | 6.37 (<i>br s</i>) | 93.4 |
| 9 | | 156.3 |
| 10 | | 103.7 |
| 1' | | 120.9 |
| 2' | 7.51 (<i>br s</i>) | 115.0 |
| 3' | | 144.4 |
| 4' | | 148.1 |
| 5' | 6.83 (<i>d</i> , $J = 8.0$ Hz) | 116.0 |
| 6' | 7.53 (<i>d</i> , $J = 8.0$ Hz) | 121.3 |
| Glc-1 | 5.32 (<i>d</i> , $J = 6.7$ Hz) | 101.0 |
| Glc-2 | 3.06-3.71 | 73.9 |
| Glc-3 | 3.06-3.71 | 76.3 |
| Glc-4 | 3.06-3.71 | 70.4 |
| Glc-5 | 3.06-3.71 | 75.8 |
| Glc-6 | 3.06-3.71 | 66.9 |
| Rha-1 | 4.37 (<i>br s</i>) | 100.5 |
| Rha-2 | 3.06-3.71 | 70.2 |
| Rha-3 | 3.06-3.71 | 69.9 |
| Rha-4 | 3.06-3.71 | 71.7 |
| Rha-5 | 3.06-3.71 | 68.1 |
| Rha-6 | 0.97 (<i>d</i> , $J = 5.1$ Hz) | 17.7 |

สาร CAR1 ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องมือ high resolution mass spectroscopy พบ $[\text{M} + \text{H}]^+$ peak ที่ m/z 375.2409 เทียบได้ว่า

สารนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}N_4O_3$ และเมื่อศึกษาด้วย infrared spectroscopy พบว่ามี absorption band หลักที่ 1657 cm^{-1} สอดคล้องกับสัญญาณใน ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 1.9) ที่ 157.5 ppm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในโครงสร้างของสาร CAR1 นี้มีหมู่ guanidine อยู่ด้วย (Delle Monache et al., 1999) เมื่อพิจารณา ^1H NMR spectrum (ตารางที่ 1.9) ของสารนี้จะเห็นได้ว่าในโครงสร้างสารมีส่วนที่เป็นหน่วย isoprene อยู่ด้วย ดูได้จากสัญญาณ doublet ที่ $1.72\text{ (3H, d, } J = 0.5\text{ Hz, H-9)}$ กับ $1.76\text{ ppm (3H, d, } J = 0.5\text{ Hz, H-10)}$ ของหมู่ methyl สองหมู่ซึ่งเกาะอยู่บนอะตอมคาร์บอนเดียวกัน, สัญญาณของโปรตอนของพันธะคู่ที่ $5.15\text{ ppm (1H, m, H-7)}$ และสัญญาณโปรตอนของหมู่ methylene ที่ $3.94\text{ ppm (2H, d, } J = 6.5\text{ Hz, H-6)}$ ซึ่งการที่สัญญาณอันหลังนี้ปรากฏที่ตำแหน่ง downfield ชี้ให้เห็นว่าหมู่นี้น่าจะอยู่ใกล้กับ heteroatom

ในขณะเดียวกัน กลุ่มสัญญาณอีกชุดหนึ่งใน ^1H NMR ชี้ให้เห็นว่าในโครงสร้างของสาร CAR1 นี้มีหมู่ ferulic amide อยู่ สัญญาณเหล่านี้ได้แก่ สัญญาณของโปรตอนบน aromatic ring ที่ $7.10\text{ (1H, d, } J = 1.8\text{ Hz, H-2')}$, $6.78\text{ (1H, d, } J = 7.8\text{ Hz, H-5')}$ และ $7.01\text{ ppm (1H, dd, } J = 7.8, 1.8\text{ Hz, H-6')}$ สัญญาณของโปรตอนพันธะคู่ซึ่งอยู่ในตำแหน่ง trans กันถัดจากหมู่ amide ออกมาที่ $7.43\text{ (1H, d, } J = 15.6\text{ Hz, H-7')}$ กับ $6.40\text{ ppm (1H, d, } J = 15.6\text{ Hz, H-8')}$ รวมทั้งสัญญาณ singlet ของหมู่ methoxy ที่ $3.86\text{ ppm (3H, s, 3'-OCH}_3)$

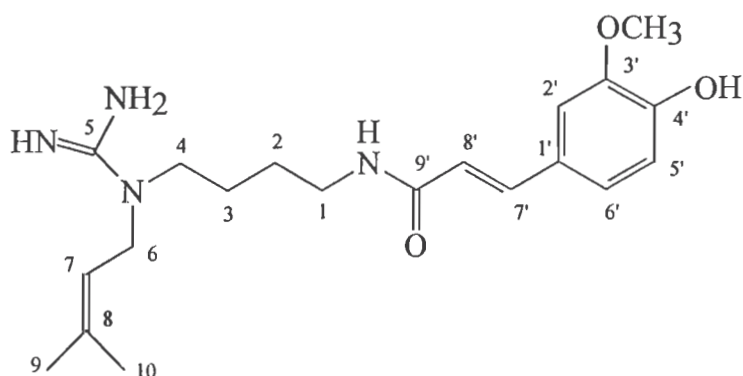
ใน $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum สามารถสังเกตเห็นความเชื่อมโยงกันของสัญญาณโปรตอนระหว่าง 1.57 ถึง 3.34 ppm ซึ่งเป็นของหมู่ methylene ที่ต่อกันอยู่ 4 หมู่ (C_1-C_4) และถูกขนาบอยู่ด้วยอะตอมไนโตรเจนทั้ง 2 ด้าน โดยด้านหนึ่งคือไนโตรเจนของหมู่ ferulic amide ความเชื่อมต่อกันของสัญญาณโปรตอนของหมู่ isoprene คือจาก H-7 ของพันธะคู่ ไปยัง H-6 ซึ่งเป็นหมู่ methylene และหมู่ methyl ทั้ง H-9 และ H-10 ก็ยืนยันได้ด้วย COSY spectrum เช่นกัน

สัญญาณคาร์บอน 20 สัญญาณที่ปรากฏใน ^{13}C NMR spectrum แบ่งได้เป็นของ methyl carbon 3 สัญญาณ, methylene carbon 5 สัญญาณ, methine carbon 6 สัญญาณ และ quaternary carbon 6 สัญญาณ โดยตำแหน่งที่ downfield ที่สุดที่ 169.2 ppm เป็นสัญญาณของ amide carbonyl ($C-9'$) ในขณะที่สัญญาณของ imine carbon ซึ่งปรากฏที่ 157.5 ppm (C-5) นั้นจัดเป็นสิ่งที่ยืนยันถึงการมีหมู่ guanidine อยู่ในโครงสร้าง (Lonsti et al., 1998) สัญญาณของ $C-2'$ ที่ 111.5 ppm กับของ $C-5'$ ที่ 116.4 ppm แสดงให้เห็นว่าหมู่ methoxy อยู่ที่ตำแหน่ง $C-3'$ ของวงแหวน aromatic (Roitman and James, 1985)

HMBC spectrum ยืนยันว่ามีหมู่ ferulyl อยู่ในโครงสร้างโดยแสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงกันระหว่างสัญญาณของ H-2' และหมู่ methoxy กับสัญญาณของ $C-3'$ นอกจากนี้ HMBC spectrum ยังเผยให้เห็นถึงการที่หมู่ isoprene ต่ออยู่กับอะตอมไนโตรเจนหนึ่งของ guanidine ซึ่งเกาะอยู่ที่ปลายหนึ่งของสาย C_1-C_4 methylene โดยพิจารณาได้จาก cross-peak ระหว่างสัญญาณของ H-4 ที่ 3.33 ppm (2H, m) กับสัญญาณคาร์บอนของ $C-5$ และ $C-6$ รวมทั้งระหว่างสัญญาณของ H-6 กับ

สัญญาณคาร์บอนของ C-4 และ C-5 ในทำนองเดียวกัน ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ H-1 ที่ 3.34 ppm (2H, t, $J = 6.3$ Hz) กับสัญญาณของ C-2, C-3 และ C-9' และระหว่างสัญญาณของ H-2 ที่ 1.57 ppm (2H, quintet, $J = 6.3$ Hz) กับสัญญาณของ C-1, C-3 และ C-4 ที่เห็นได้ใน HMBC spectrum ก็ช่วยยืนยันการที่หมู่ ferulic amide ต่อเชื่อมอยู่กับสาย C₁-C₄ ได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลทั้งหมดนี้ จึงแสดงว่าสาร CAR1 เป็นสารในกลุ่ม guanidine alkaloid ชนิดใหม่ ให้ชื่อว่าสาร canarosine

สารในกลุ่ม guanidine alkaloid นี้มีรายงานการพบเป็นองค์ประกอบในพืชอยู่ไม่มากนัก แต่ก็นับว่าเป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ สำหรับสาร canarosine นี้ เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งไม่ให้สารมาตรฐานเข้าจับกับตัวรับได้ถึง 91% คิดเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการจับได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 39.4 ± 5.8 ไมโครโมลาร์ จึงนับว่าน่าสนใจที่จะนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาภาวะผิดปกติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของตัวรับ dopamine ต่อไป



Canarosine

ตารางที่ 1.9 ข้อมูล ^1H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz) และ HMBC ของสาร canarosine (ใน CD_3OD)

| ตำแหน่ง | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm) | HMBC (H \rightarrow C) |
|---------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 39.5 | 3.34 (t, $J = 6.3$ Hz) | C-2, C-3, C-9' |
| 2 | 28.0 | 1.57 (quintet, $J = 6.3$ Hz) | C-1, C-3, C-4 |
| 3 | 25.4 | 1.65 (m) | C-2, C-4 |
| 4 | 49.0 | 3.33 (m) | C-2, C-3, C-5, C-6 |
| 5 | 157.5 | | |
| 6 | 47.5 | 3.94 (d, $J = 6.5$ Hz) | C-4, C-5, C-7, C-8 |

| ตำแหน่ง | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) | HMBC (H \rightarrow C) |
|---------------------|------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 7 | 118.6 | 5.15 (m) | C-9, C-10 |
| 8 | 139.3 | | |
| 9 | 18.1 | 1.72 (d, $J = 0.5$ Hz) | C-7, C-8, C-10 |
| 10 | 25.9 | 1.76 (d, $J = 0.5$ Hz) | C-7, C-8, C-9 |
| 1' | 127.9 | | |
| 2' | 111.5 | 7.10 (d, $J = 1.8$ Hz) | C-3', C-4', C-6', C-7' |
| 3' | 149.1 | | |
| 4' | 149.9 | | |
| 5' | 116.4 | 6.78 (d, $J = 7.8$ Hz) | C-1', C-3', C-4' |
| 6' | 123.1 | 7.01 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz) | C-2', C-4', C-7' |
| 7' | 142.1 | 7.43 (d, $J = 15.6$ Hz) | C-1', C-2', C-6', C-8', C-9' |
| 8' | 118.3 | 6.40 (d, $J = 15.6$ Hz) | C-1', C-9' |
| 9' | 169.2 | | |
| 3'-OCH ₃ | 56.4 | 3.86 (s) | C-3' |

6. สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสมุนไพรจำนวน 50 ชนิดเพื่อนำมาทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท โดยอ้างอิงจากการใช้ในตำรายาพื้นบ้านของไทย จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชที่มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง หรือรายงานความสามารถของสิ่งสกัดจากพืชนั้นหรือพืชในสกุลเดียวกันในการจับกับตัวรับสารสื่อประสาทต่างๆ รวมทั้งจากการสุ่มเลือก พบว่าสิ่งสกัดหยาบ ethanol ของสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับ dopamine 1 ไม่น้อยกว่า 50% มี 3 ชนิด คือ สารสกัดใบน้อยหน้า สารสกัดใบและลำต้นไก่อติ้ว และ สารสกัดใบกะทกรก ในขณะที่สารสกัดจากรากระย้อมยับยั้งการจับกับตัวรับทั้งแอลฟา 1 และ 5-HT₂ มากกว่า 50% และสารสกัดผลมะตูมสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 มากกว่า 50%

เมื่อเลือกสารสกัดใบน้อยหน้า สารสกัดใบกะทกรก และสารสกัดใบและลำต้นไก่อติ้วมาศึกษาต่อโดยละเอียด พบว่าในสิ่งสกัดใบน้อยหน้าส่วนที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในนั้นคือ สิ่งสกัด dichloromethane ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบเป็นสาร β -sitosterol glucoside กับของผสมของสารกลุ่ม sterol glycoside, สาร lanuginosine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม dioxoaporphine alkaloid และสารในกลุ่ม acetogenin ซึ่งยัง

ไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน แต่ภายหลังพบว่าสารสกัดจากพืชนี้พบว่ามีความเป็นพิษค่อนข้างสูง จึงไม่ได้ดำเนินการต่อไป

ในทำนองเดียวกัน สิ่งสกัด dichloromethane ของใบกะทกรกเป็นสิ่งสกัดส่วนที่แสดงฤทธิ์ดีที่สุดของพืชชนิดนี้ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดพบว่ามีส่วนผสมของ β -sitosterol glycoside กับ stigmasterol glycoside กับสารกลุ่ม flavonoid หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สาร acacetin กับ chrysoeriol ซึ่งอาจใช้เป็น marker ในการศึกษาต่อไปได้ ทางโครงการวิจัยได้ทำการสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดใบกะทกรกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับโครงการอื่นในชุดโครงการได้ศึกษาโดยละเอียดต่อไป

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบและลำต้นใกล้เคียงแสดงให้เห็นว่า พืชชนิดนี้มีสารสำคัญในส่วนดังกล่าวเป็นสารผสมระหว่าง β -sitosterol กับ stigmasterol, สาร β -sitosterol glucoside, อนุพันธ์ของ cyclitol คือสาร *epi*-inositol 6-O-methyl ether, สาร flavonoid glycoside คือ rutin และสาร canarosine ซึ่งเป็นสารใหม่ในกลุ่ม guanidine alkaloid โดยสารนี้มีฤทธิ์น่าสนใจสามารถยับยั้งการที่สารมาตรฐานจะเข้าจับกับตัวรับ dopamine 1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ น่าจะได้มีการศึกษาหาแนวทางพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางยาต่อไป

7. เอกสารอ้างอิง

- กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. 2541. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร.
 เพียวร์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่ พิมพ์ครั้งที่ 2. เมดิคัล มีเดีย, กรุงเทพมหานคร.
- Abila, B., Richens, A., and Davies, J.A. 1993. Anticonvulsant effects of extracts of the west African black pepper, *Piper guineense*. J. Ethnopharmacol. 39: 113-117.
- Akbar, A., Tariq, M., and Nisa, M. 1985. Pharmacological studies on *Salvia haematodes* Wall. Acta Trop. 42: 371-374.
- Amabeoku, G.J., Leng, M.J., and Syce, J.A. 1998. Antimicrobial and anticonvulsant activities of *Viscum capense*. J. Ethnopharmacol. 61: 237-241.
- Ang, H.H. and Cheang, H.S. 1999. Studies on the anxiolytic activity of *Eurycoma longifolia* Jack roots in mice. Jpn. J. Pharmacol. 79: 497-500.
- Bastidas-Ramirez, B.E., Navarro-Ruiz, N., Quezada-Arellano, J.D., Ruiz-Madrigal, B., Villanueva-Michel, M.T., and Garzon, P. 1998. Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L. in the rat. J. Ethnopharmacol. 61: 143-152.
- Bopaiah C.P. and Pradhan N. 2001. Central nervous system stimulatory action from the root extract of *Plumbago zeylanica* in rats. Phytother. Res. 15: 153-156.

- Boucher, B.J. and Mannan, N. 2002. Metabolic effects of the consumption of *Areca catechu*. *Addict. Biol.* 7: 103-110.
- Bradwejn, J., Zhou, Y., Koszycki, D., and Shlik, J. 2000. A double-blind, placebo-controlled study on the effects of Gotu Kola (*Centella asiatica*) on acoustic startle response in healthy subjects. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20: 680-684.
- Bum, E.N., Schmutz, M., Meyer, C., Rakotonirina, A., Bopelet, M., Portet, C., Jeker, A., Rakotonirina, S.V., Olpe, H.R., and Herrling, P. 2001. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). *J. Ethnopharmacol.* 76: 145-150.
- Dasgupta, A., Agarwal, S.S., and Basu, D.K. 1984. Anticonvulsant activity of the mixed fatty acids of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. (Rudraksh). *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 28: 245-246.
- De Britto, J., Manickam, V.S., Gopalakrishnan, S., Ushioda, T., and Tanaka, N. 1995. Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-O- α -L-rhamnosides by ^1H -NMR spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* 43: 338-339.
- Declume, C., Assamoi, A., and Akre, T.B. 1984. Anticonvulsant activity of *Cnestis ferruginea* DC., Connaraceae. *Ann. Pharm. Fr.* 42: 35-41.
- de Lima, T.C., Morato, G.S., and Takahashi, R.N. 1993. Evaluation of the central properties of *Artemisia veriflorum*. *Planta Med.* 59: 326-329.
- Delle Monache, G., Volpe, A.R., Delle Monache, F., Vitali, A., Botta, B., Espinal, R., De Bonnevaux, S.C., De Luca, C., Botta, M., Corelli, F., and Carmignani, M. 1999. Further hypotensive metabolites from *Verbesina caracasana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 3249-3254.
- Dhawan K, Kumar S, and Sharma A. 2001. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linnaeus. *Chem. Pharm. Bull.* 78: 165-170.
- Di Carlo, G., Borrelli, F., Izzo, A.A., and Ernst, E. 2001. St Johns' wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 292-297.
- Dikshit, S.K., Tewari, P.V., and Dixit, S.P. 1972. Anticonvulsant activity of *Canscora decussata* Roem. & Sch. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 16: 81-83.
- Elisabetsky, E., Marschner, J., and Souza, D.O. 1995. Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 20: 461-465.
- Ernst, E. Herbal medications for common ailments in the elderly. 1999. *Drugs Aging* 15: 423-428.

- Garg, S.N. and Mehta, V.K. 1998. Acyclic monoterpenes from the essential oil of *Tagetes minuta* flowers. *Phytochemistry* 48: 395-396.
- Glick, S.D. and Maisonneuve, I.S. 1998. Mechanisms of antiaddictive actions of ibogaine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844214-844226.
- Gonzalez-Ramirez, D., Hernandez, R.M., Bolado, C., and Garcia-Delgado, J. 1985. Possible anticonvulsant activity of the root of *Ipomoea stans*. *Salud. Publica Mex.* 27: 485-491.
- Gonzalez-Trujano, M.E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo-Portugal, E., and Hong, E. 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta Med.* 67: 136-141.
- Gupta, M., Mazumder, U.K., and Das, S. 1998. Effect of leaf extract from *Clerodendron colebrookianum* on CNS function in mice. *Indian J. Exp. Biol.* 36: 171-174.
- Ha, J.H., Lee, K.Y., Choi, H.C., Cho, J., Kang, B.S., Lim, J.C., and Lee, D.U. 2002. Modulation of radioligand binding to the GABA(A)-benzodiazepine receptor complex by a new component from *Cyperus rotundus*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 128-130.
- Harborne, J.B. and Mabry, T.S. 1982. *The Flavonoids: Advances in Research*. University Press, Cambridge.
- Hasrat, J.A., De Bruyne, T., De Backer, J.P., Vauquelin, G., and Vlietinck, A.J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. 1997. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 1145-1149.
- Jaiswal, A.K., Bhattacharya, S.K., and Acharya, S.B. 1994. Anxiolytic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 32: 489-491.
- Kang, T.H., Jeong, S.J., Kim, N.Y., Higuchi, R., and Kim, Y.C. 2000. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz. *J. Ethnopharmacol.* 71: 321-323.
- Kasture, V.S., Chopde, C.T., and Deshmukh, V.K. 2000. Anticonvulsive activity of *Albizzia lebbeck*, *Hibiscus rosa sinensis* and *Butea monosperma* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 71: 65-75.
- Kasture, V.S., Kasture, S.B., and Pal, S.C. 1996. Anticonvulsant activity of *Albizzia lebbeck* leaves. *Indian J. Exp. Biol.* 34: 78-80.

- Kelm M.A., Nair M.G., Strasburg G.M., and DeWitt D.L. 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7: 7-13.
- Kerrola, K. and Kallio, H. 1993. Volatile compounds and odor characteristics of carbon dioxide extracts of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 41: 785-790.
- Kojima, H., Sato, N., Hatano, A., and Ogura, I. 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29: 2351-2355.
- Kuribara, H., Kishi, E., Hattori, N., Yuzurihara, M., and Maruyama, Y. 1999. Application of the elevated plus-maze test in mice for evaluation of the content of honokiol in water extracts of magnolia. *Phytother. Res.* 13: 593-596.
- Lanhers, M.C., Fleurentin, J., Cabalion, P., Rolland, A., Dorfman, P., Misslin, R., and Pelt, J.M. 1990. Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L.: sedative and anxiolytic properties. *J. Ethnopharmacol.* 29: 189-198.
- Lazarini C.A., Uema A.H., Brandao G.M., Guimaraes A.P., and Bernardi M.M. 2000. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. *Phytomedicine* 7: 477-481.
- Liao, J.F., Huang, S.Y., Jan, Y.M., Yu, L.L., and Chen, C.F. 1998. Central inhibitory effects of water extract of *Acori graminei* rhizoma in mice. *J. Ethnopharmacol.* 61: 185-193.
- Lonsti, D., Martin, M.T., Litaudon, M., Svenet, T., Pais, M. 1998. Fontaineine, a new alkaloid from *Fontainea pancheri*. *J. Nat. Prod.* 61: 953-954.
- Madawala, P.G., Arambewela, L.S., Premakumara, G.A., and Ratnasooria, W.D. 1994. Studies on the sedative activity of crude extract of root bark of *Rauvolfia canescens* on rats. *J. Ethnopharmacol.* 42: 63-65.
- Mash, D.C., Kovera, C.A., Buck, B.E., Norenberg, M.D., Shapshak, P., Hearn, W.L., and Sanchez-Ramos, J. 1998. Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844274-844292.
- Medina, J.H., Paladini, A.C., Wolfman, C., Levi-de-Stein, M., Calvo, D., Diaz, L.E., and Pena, C. 1990. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2227-2231.
- Meier, B., Berger, D., Hoberg, E., Sticher, O., and Schaffner, W. 2000. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro. *Phytomedicine* 7: 373-381.

- Miean K.H. and Mohamed S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3106-3112.
- Misra, R. 1998. Modern drug development from traditional medicinal plants using radioligand receptor-binding assays. *Med. Res. Rev.* 18: 383-402.
- Nacar, S. and Tansi, S. 2000. Chemical components of different basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown in Mediterranean regions in Turkey. *Israel J. Plant Sci.* 48: 109-112.
- Nogueira, E., Rosa, G.J., Haraguchi, M., and Vassilieff, V.S. 1998. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* 61: 111-117.
- Okuyama, E., Okamoto, Y., Yamazaki, M., and Satake, M. 1996. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillata*). *Chem. Pharm. Bull.* 44: 333-336.
- Oliveira, M.G., Monteiro, M.G., Macaubas, C., Barbosa, V.P., and Carlini, E.A. 1991. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 34: 29-41.
- Paladini, A.C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C., and Medina, J.H. 1999. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 519-526.
- Panchal, G.M., Venkatakrisna-Bhatt, H., Doctor, R.B., and Vajpayee, S. 1989. Pharmacology of *Acorus calamus* L. *Indian J. Exp. Biol.* 27: 561-567.
- Peng, W.H., Hsieh, M.T., Lee, Y.S., Lin, Y.C., and Liao, J. 2000. Anxiolytic effect of seed of *Zizyphus jujuba* in mouse models of anxiety. *J. Ethnopharmacol.* 72: 435-441.
- Perillo, M.A., Garcia, D.A., Marin, R.H., and Zygodlo, J.A. 1999. Tagetone modulates the coupling of flunitrazepam and GABA binding sites at GABAA receptor from chick brain membranes. *Mol. Membr. Biol.* 16: 189-194.
- Petry, R.D., Reginatto, F., de Paris, F., Gosmann, G., Salgueiro, J.B., Quevedo, J., Kapczinski, F., Ortega, G.G., and Schenkel, E.P. 2001. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytother. Res.* 15: 162-164.
- Pittler, M.H. and Ernst, E. 2000. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20: 84-89.

- Popik, P., Layer, R.T., Fossom, L.H., Benveniste, M., Geter-Douglass, B., Witkin, J.M., and Skolnick, P. 1995. NMDA antagonist properties of the putative antiaddictive drug, ibogaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 753-760.
- Pourgholami, M.H., Kamalinejad, M., Javadi, M., Majzoob, S., and Sayyah, M. 1999. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *J. Ethnopharmacol.* 64: 167-171.
- Pyo, M.K., Yun-Choi, H.S., and Hong, Y.J. 2003. Antiplatelet activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *Magnolia obovata*. *Planta Med.* 69: 267-269.
- Rakotonirina, V.S., Bum, E.N., Rakotonirina, A., and Bopelet, M. 2001. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia*, 72: 22-29.
- Ratnasooriya, W.D. and Dharmasiri, M.G. 1999a. Effects of an aqueous extract of trunk bark of *Ficus religiosa* on fertility of rats. *Med. Sci. Res.* 27: 349-353.
- Ratnasooriya, W.D. and Dharmasiri, M.G. 1999b. Aqueous extract of Sri Lankan *Erythrina indica* leaves has sedative but not analgesic activity. *Fitoterapia* 70: 311-313.
- Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., Scarpantonio, A., Rinaldi, L., and Mosca, E. 2000. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol. Res.* 42: 177-182.
- Roitman, J.N. and James, L.F. 1985. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonols methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry* 24: 835-848.
- Shibata, M. and Fukushima, M. 1975. Acute toxicity and sedative action of zizyphus seeds. *Yakugaku Zasshi* 95: 465-469.
- Simon, O.R. and Singh, N. 1986. Demonstration of anticonvulsant properties of an aqueous extract of Spirit Weed (*Eryngium foetidum* L.). *West Indian Med. J.* 35: 121-125.
- Sonavane, G.S., Sarveiya, V.P., Kasture, V.S., and Kasture, S.B. 2002. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 239-244.
- Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Boust, D., Misslin, R., and Mortier, F. 1997. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* 57: 11-20.
- Subarnas, A., Tadano, T., Oshima, Y., Kisara, K., and Ohizumi, Y. 1993. Pharmacological properties of beta-amyrin palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 545-550.

- Takayama, H., Ishikawa, H., Kurihara, M., Kitajima, M., Aimi, N., Ponglux, D., Koyama, F., Matsumoto, K., Moriyama, T., Yamamoto, L.T., Watanabe, K., Murayama, T., and Horie, S. 2002. Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. *J. Med. Chem.* 45: 1949-1956.
- Thongsaard, W., Deachapunya, C., Pongsakorn, S., Boyd, E.A., Bennett, G.W., and Marsden, C.A. 1996. Barakol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53: 753-758.
- Une, H.D., Sarveiya, V.P., Pal, S.C., Kasture V.S., and Kasture S.B. 2001. Nootropic and anxiolytic activity of saponins of *Albizia lebbek* leaves. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69: 439-444.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi-de-Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J.H., and Paladini, A.C. 1995. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta. Med.* 61: 213-216.
- Weaver, D.K., Dunkel, F.V., Ntezurubanza, L., Jackson, L.L. and Stock, D.T. 1991. The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against post-harvest damage by certain stored product coleoptera. *J. Stored Prod. Res.* 27: 213-220.
- Wright, J.L.C., McInnes, A.G., Shimizu, S., Smith, D.G., and Walter, J.A. 1978. Identification of C-24 epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.* 56: 1898-1903.
- Yamatake, Y., Shibata, M., and Nagai, M. 1976. Pharmacological studies on root bark of mulberry tree (*Morus alba* L.). *Jpn. J. Pharmacol.* 26: 461-469.
- Younos, C., Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M.C., Misslin, R., and Mortier, F. 1990. Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.* 56: 430-434.
- Zhang, Z., ElSohly, H.N., Jacob, M.R., Pasco, D.S., Walker, L.A., and Clark, A.M. 2002. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. *J. Nat. Prod.* 65: 856-859.
- Zhu, M. and Li, R.C. 1999. Receptor binding activities of *Schefflera* triterpenoids and oligosaccharides. *Planta Med.* 65: 99-103.

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 2

การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรร
ในห้องปฏิบัติการ

In vitro screening of herbal extracts for anti-CNS stimulant activity

รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน เมขสุริเยนทร์
(Associate Professor Dr. Duangdeun Meksuriyen)
หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ธิติมา เพ็งสุภาพ
(Associate Professor Dr. Thitima Pengsuparp)
ผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัย “การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท” โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549 เพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีมาตรฐานระดับสากล

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2547 ขอขอบคุณที่มคณะผู้วิจัยในแผนงานวิจัยนี้ คณาจารย์ บุคลากร ผู้ช่วยวิจัย นิสิตบัณฑิตศึกษาของภาควิชาชีวเคมี ที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนคณะเภสัชศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อครุภัณฑ์และอนุญาตให้ใช้สถานที่และสาธารณูปโภค ทั้งในและนอกเวลาราชการ โดยไม่คิดค่าใช้จ่ายแต่อย่างใด

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านแอมเฟตามีนของสมุนไพรมุข 52 ชนิดโดยใช้เทคนิค radioligand receptor binding สารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลของสมุนไพรมุขที่สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้มากกว่า 50% ได้แก่ใบกะทกรก ทั้งต้นไก่เตี้ย และใบน้อยหน้า นอกจากนี้สารสกัดใบน้อยหน้ายังยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ได้อีกด้วย สมุนไพรมุขที่สามารถยับยั้งการจับตัวรับแอลฟา 1 ได้แก่ผลมะตูม และรากระย่อม สำหรับรากระย่อมยังยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2 ได้อีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ลดความดันโลหิตและช่วยสงบระบบตามที่ได้เคยมีรายงานไว้ ด้วยวิธี bioactivity-guided fractionation พบว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุด จึงทำการสกัดแยกเอาสารบริสุทธิ์เพื่อนำมาเป็น chemical marker หรือ biomarker ในการกำหนดคุณภาพของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาท สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบกะทกรกได้แก่ chrysoeriol, acacetin และ PF4 โดยที่ PF4 สามารถฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเป็น biomarker ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาสูตรโครงสร้าง สารบริสุทธิ์จากทั้งต้นไก่เตี้ย ได้แก่ epi-inositol-6-O-methyl ether, rutin และ canarosine สำหรับ canarosine เป็น guanidine alkaloid สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 (IC_{50} เท่ากับ 39.4 ไมโครโมลาร์) จึงอาจนำมาเป็น biomarker ที่สำคัญในการติดตามฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดไก่เตี้ย สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบน้อยหน้าได้แก่ lanuginosine และ acetogenin แต่เนื่องจากพบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองสูงมากจึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อไป เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนของใบกะทกรก ทั้งต้นไก่เตี้ย และใบน้อยหน้า จะพบ β -sitosterol ด้วยเสมอ และยังพบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้บ้าง จึงมีความเป็นไปได้ว่าสเต็มเซลล์จากพืชนั้นอาจเข้ามามีบทบาทช่วยเสริมฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของสมุนไพรมุขที่ศึกษา จากผลของการวิจัยครั้งนี้สามารถคัดกรองสมุนไพรมุขที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลองต่อไป

Abstract

The aim of the present study was to assess fifty-two plant extracts for anti-amphetamine activity against receptors potentially involved in the amphetamine addiction using radioligand receptor binding assays. Crude ethanolic extracts showing the highest displacement of dopamine-1 receptor were those of *Passiflora foetida* leaves, *Canavalia rosea* aerial parts, and *Annona squamosa* leaves. The extract of *Annona squamosa* also showed the highest displacement of dopamine-2 receptor. Those showing the highest displacement of α 1-adrenoreceptor were *Aegle marmelos* fruits and *Rauvolfia serpentina* roots, of which the latter strongly inhibited the binding to dopamine-2, serotonin-1, and serotonin-2 receptors as well. The finding was consistent with the known antihypertensive and tranquilizing properties of *R. serpentina*. Bioassay-guided fractionation of the most active extracts by exhibiting more than 50% inhibition of dopamine-1 receptor were then performed and resulted in active isolates. Dichloromethane extract of *P. foetida* showed the presence of chrysoeriol, acacetin, and PF4. The pure isolate of PF4 may serve as a biomarker of *P. foetida* extract however, its structure is still investigated. The isolated compounds from *C. rosea* were found to be of epi-inositol-6-O-methyl ether, rutin, and canarosine. Canarosine, a guanidine alkaloid, showed potent activity against dopamine 1 receptor ($IC_{50} = 39.4 \mu M$) leading to be a strong candidate for a biomarker of *C. rosea* extract. Lanuginosine and an unknown acetogenin were isolated from the dichloromethane extract of *A. squamosa* however, no further study was performed due to its high toxicity. Noticeably, β -sitosterol, found in all dichloromethane extracts of *P. foetida*, *C. rosea*, and *A. squamosa*, exhibited weak activity against dopamine 1 receptor. The results suggested that those dichloromethane extracts produce the central nervous system (CNS) effects, at least in part, because of the presence of phytosterol. Our results provided an evidence to explain the CNS actions of Thai herbal extracts at the receptor level as well as some candidate psychotherapeutic agents to be further investigated in relevant animal models to support the development of alternative treatment for amphetamine addicts.

สารบัญ

| | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ | 2-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 2-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 2-iv |
| สารบัญ | 2-v |
| สารบัญตาราง | 2-vi |
| สารบัญรูป | 2-vii |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | 2-viii |
| บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 2-1 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 2-3 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 2-3 |
| ทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย | 2-3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2-4 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | |
| สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ | 2-5 |
| การเตรียมเซลล์เมมเบรนจากสมองหนูขาว | 2-5 |
| การเพาะเลี้ยง human D2 cloned cells | 2-5 |
| การเตรียมเซลล์เมมเบรนเพื่อทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 2 | 2-5 |
| การทดสอบการจับกับแอลฟา 1 | 2-5 |
| การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 1 | 2-6 |
| การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 2 | 2-6 |
| การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 | 2-6 |
| การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 | 2-7 |
| การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 2-7 |
| ผลการวิจัย | |
| ผลการทดสอบสารที่จำเพาะในการยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ | 2-8 |
| ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับเบื้องต้นของสารสกัดหยาบในชั้น เอทานอล | 2-8 |
| ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่างๆ | 2-12 |
| อภิปรายผลการวิจัย | 2-20 |
| สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป | 2-25 |
| เอกสารอ้างอิง | 2-26 |

สารบัญญัตินี้

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2-1 | การทดสอบสารที่จำเพาะในการยับยั้งการจับหรือสารมาตรฐานกับตัวรับ 5 ชนิด (n=3) | 2-8 |
| 2-2 | สมุนไพรมานำมาทดสอบ โดยฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับที่มากกว่า 50% จะถือว่าเป็นค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (n =3-5) | 2-8 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2-1 | ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร | 2-11 |
| 2-2 | การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดใบน้อยหน่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 2-14 |
| 2-3 | การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ของสารที่แยกได้จาก สารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทน | 2-15 |
| 2-4 | การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดใบกะทกรกที่ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 2-17 |
| 2-5 | การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดทั้งต้นไถ่เตี้ย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 2-18 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| $\alpha 1$ | Alpha 1 adrenergic receptor |
| ACC | <i>Acorus calamus</i> |
| AL | <i>Albizzia lebbbeck</i> |
| AM | <i>Aegle marmelos</i> |
| ANS | <i>Annona squamosa</i> |
| ARC | <i>Areca catechu</i> |
| CAR | <i>Canavalia rosea</i> |
| CH ₂ Cl ₂ | Dichloromethane |
| CL | <i>Curcuma longa</i> |
| CNS | Central nervous system |
| CO ₂ | Carbon dioxide |
| ConA | Concanavalin A |
| COX-2 | Cyclo-oxygenase 2 |
| CRR | <i>Croton roxburghii</i> |
| D ₁ | Dopamine 1 receptor |
| D ₂ | Dopamine 2 receptor |
| D ₃ | Dopamine 3 receptor |
| D ₄ | Dopamine 4 receptor |
| D ₅ | Dopamine 5 receptor |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DV | <i>Dregia volubilis</i> |
| ED ₅₀ | 50% effective dose |
| EF | <i>Eryngium foetidum</i> |
| EH | <i>Euphorbia hirta</i> |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid |
| [³ H] | Tritiated |
| HCl | Hydrochloric acid |
| 5-HT | Serotonin |
| 5-HT _{1A} | Serotonin 1A receptor |
| 5-HT _{2A} | Serotonin 2A receptor |
| IC ₅₀ | 50% inhibitory concentration |

| | |
|-------------------|------------------------------------------|
| i-NOS | Inducible nitric oxide synthase |
| IP | <i>Ipomoea pes-caprae</i> |
| JS | <i>Jatropha gossypifolia</i> |
| K _i | Inhibitory constant |
| LD ₅₀ | 50% lethal dose |
| MA | <i>Morus alba</i> |
| MC | <i>Morinda citrifolia</i> |
| MgCl ₂ | Magnesium chloride |
| mM | Milli-molar |
| MS | <i>Mitragyna speciosa</i> |
| NaCl | Sodium chloride |
| OB | <i>Ocimum basilicum</i> |
| OC | <i>Ocimum canum</i> |
| 8(OH)-DPAT | 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tertraline |
| OS | <i>Ocimum sanctum</i> |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PF | <i>Passiflora foetida</i> |
| RS | <i>Rauwolfia serpentina</i> |
| S.E.M. | Standard error of the mean |
| TB | <i>Terminalia bellerica</i> |
| TL | <i>Thunbergia laurifolia</i> |
| VT | <i>Vitex trifolia</i> |

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

อาการเสพติดตามศัพท์บัญญัติขององค์การอนามัยโลกกล่าวว่าเป็นอาการที่ผู้เสพต้องพึ่งสารเสพติดอยู่เป็นประจำ เพื่อให้ดำรงสภาวะการทำงานของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องให้อยู่ในสภาพเหมือนกับสภาวะที่ได้รับสารเสพติด นอกจากนี้ยังต้องเพิ่มปริมาณการเสพขึ้นเรื่อย ๆ ยากที่จะหยุดเสพสารนั้นได้เพราะต้องเผชิญกับอาการถอนยาที่ทรมาณอย่างรุนแรง เนื่องจากสารเสพติดไปรบกวนหรือทำลายระบบสรีระต่างๆ ของร่างกายรวมทั้งสภาพจิตใจ ทำให้ต้องหันกลับไปเสพต่อเพื่อหลีกเลี่ยงการเผชิญกับอาการดังกล่าว สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติดได้รายงานสถานการณ์การแพร่ระบาดของยาเสพติดพบว่า มีกลุ่มผู้เสพยาบ้าเป็นจำนวนมากที่สุดกระจายทุกพื้นที่ทั่วประเทศ และเป็นที่น่าวิตกคือการแพร่ระบาดในกลุ่มวัยรุ่นซึ่งเป็นกำลังสำคัญของประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ความต้องการยาบ้าภายในประเทศยังคงมีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารเสพติดประเภทอื่น เนื่องจากสามารถผลิตยาบ้าได้อย่างครบวงจรภายในประเทศและมีปริมาณการผลิตสูง หรือมีปริมาณแหล่งผลิตเป็นจำนวนมากทั้งในประเทศและประเทศเพื่อนบ้าน เพื่อให้สอดคล้องกับเจตนาของพระราชบัญญัติฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด พ.ศ. 2534 กระทรวงสาธารณสุขได้วางกลยุทธ์สำหรับการบำบัดรักษาผู้ติดยาเสพติดโดยวางขั้นตอนของการบำบัดดังนี้คือ (1) ขั้นตอนการก่อนการรักษา (2) ขั้นตอนพิษยา (3) ขั้นฟื้นฟูสมรรถภาพ (4) ขั้นติดตามหลังการรักษา ขั้นตอนของการถอนพิษแอมเฟตามีนนับเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาผู้ติดยาเสพติด (Dasananjali, 1999) มักใช้วิธีการรักษาตามอาการ เช่นลดอาการเพื่อคลั่งโดยให้ยาสงบระงับ ยาคลายกังวล (เช่น diazepam) ยาแก้ชัก ยาต้านอาการซึมเศร้าเช่น amineptine มาบำบัดอาการถอนยาในผู้เสพติดแอมเฟตามีนในประเทศ (Srisurapanont et al., 1999) หรือยาในกลุ่มแอมเฟตามีนแต่มีฤทธิ์น้อยกว่าให้กับผู้มาขอรับการบำบัดที่มีอาการอยากยา (White, 2000) บูรณาการของงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ร่วมกับด้านสังคมศาสตร์และมนุษยศาสตร์จึงมีความจำเป็นเร่งด่วน เพื่อช่วยกันป้องกันไม่เกิดปัญหาดังกล่าวหรือช่วยกันแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น งานวิจัยด้านประสาทวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันพบว่าสมองของผู้ที่เสพแอมเฟตามีนเป็นเวลานานจะมีการปรับเปลี่ยนสภาพอยู่ตลอดเวลา (Sevarino et al., 2000) ทำให้การบำบัดด้วยกรรมวิธีแบบเดิมมักไม่ได้ผล จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการบำบัดใหม่ๆ จนกว่าจะได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ของประเทศ สำหรับการพัฒนาระบบการบำบัดด้วยยาสำหรับผู้เสพติดแอมเฟตามีนของโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำความเข้าใจถึงองค์ความรู้ด้านประสาทวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกลไกการออกฤทธิ์ของแอมเฟตามีน มาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางทดสอบฤทธิ์ด้านแอมเฟตามีนของสารสกัดสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีศักยภาพในการบำบัดผู้เสพติด โดยเฉพาะกลุ่มผู้ใช้แอมเฟตามีนเป็นเวลานานที่อาจแสดงอาการประสาทหลอน เห็นภาพลวงตา หวาดระแวง คลุ้มคลั่ง เป็นบ้าอาจทำร้ายตนเองหรือผู้อื่นได้ เป็นอันตรายต่อสังคม

ปัจจุบันงานวิจัยของสารเสพติดด้านประสาทวิทยาศาสตร์ในระดับเซลล์และระดับชีววิทยาโมเลกุลมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสมองผู้เสพติดแอมเฟตามีนจะ

แตกต่างไปจากผู้ที่ไม่ได้ติดยา โดยการทำงานของสมองและพฤติกรรมที่แสดงออกหลังเสพแอมเฟตามีนนั้นตกอยู่ภายใต้อิทธิพลการทำงานของสารสื่อประสาทในเซลล์ประสาท เมื่อเสพแอมเฟตามีนเข้าไปในร่างกายจะรบกวนการทำงานของสารสื่อประสาทกลุ่ม monoamine (ได้แก่โดปามีน นอร์อิพิเนเฟริน เซโรโทนิน) โดยเฉพาะระบบประสาทโดปามีนในสมองบริเวณ mesolimbic reward pathway (Leshner and Koob, 1999) โดยไปกระตุ้นการหลั่งโดปามีนออกจากเซลล์ประสาทจำนวนมาก และไปจับกับตัวรับของมันส่งกระแสประสาทได้อย่างรวดเร็วในสมองบริเวณดังกล่าวเพื่อแสดงพฤติกรรมก้าวร้าว หรือเพิ่มอาการอยากยา ถ้าเสพแอมเฟตามีนเป็นเวลานานนอกเหนือจากผลต่อโดปามีนแล้ว ยังไปกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทเซโรโทนินด้วยและอาจทำลายเซลล์ประสาทเซโรโทนินอย่างถาวร ผู้เสพมักนอนไม่หลับ อารมณ์แปรปรวน ปัจจุบันวิธีการบำบัดผู้เสพติดด้วยยามักใช้ยาในกลุ่มต้านโดปามีนในการแย่งจับกับตัวรับโดปามีน (จำแนกได้ 5 ชนิดคือ D1, D2, D3, D4 และ D5 receptors) เช่นยาในกลุ่ม D1/D5 antagonist เพื่อลดอาการเคลิ้มฝัน กระวนกระวาย หรืออาการอยากยา นอกจากนี้ได้มีการนำยารักษาโรคพาร์คินสัน terguride ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม D2 partial agonist มาใช้บรรเทาอาการถอนยาแอมเฟตามีนอย่างเฉียบพลันในหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญ (Orsini et al., 2001) มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ยาด้านชัก vigabatrin พบว่าสามารถบรรเทาอาการอยากยาในสัตว์ทดลองได้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ไปเพิ่มสารสื่อประสาท GABA (gamma-aminobutyric acid) ซึ่งส่งต่อสัญญาณไปยังเซลล์ประสาทโดปามีนและยับยั้งการหลั่งโดปามีน สารในกลุ่มแอมเฟตามีนยังไปลดการทำงานของ dopamine transporter ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการลำเลียงโดปามีนเก็บกลับเข้าเซลล์ประสาทในสมองของหนูขาวบริเวณ striatum (Metzger et al., 2000) จึงได้มีการพัฒนาหาสารที่ไปแย่งสารกลุ่มแอมเฟตามีนในการจับกับโปรตีน transporter ทำให้แอมเฟตามีนไม่สามารถเข้าเซลล์ประสาทโดปามีนและออกฤทธิ์ได้ ตัวอย่างสารเหล่านี้ เช่น indatraline (Patilla et al., 2000) เมื่อแอมเฟตามีนถูกลำเลียงโดยอาศัยโปรตีน transporter เข้าในเซลล์ประสาทจะไปกระตุ้นการหลั่งโดปามีน จึงได้มีการพัฒนาหาสารที่จะไปยับยั้งการหลั่งของโดปามีนเช่น lobeline (Miller et al., 2001)

ในการค้นหาสมุนไพรเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาทและการค้นหา fraction หรือสารสำคัญออกฤทธิ์ จำเป็นที่จะต้องใช้ระบบการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ควบคุมไปกับการสกัดแยกสาร (bioactivity-guided fractionation) และใช้ในการเลือกสมุนไพรเพื่อนำไปพัฒนาต่อไปในโครงการอื่นที่อยู่ในชุดโครงการนี้ เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาทประเภทแอมเฟตามีนนั้นออกฤทธิ์ผ่านตัวรับจำเพาะบางชนิดในสมอง ซึ่งในปัจจุบันสามารถแยกตัวรับเหล่านี้ได้จากเนื้อเยื่อหรือจากการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบหาสารซึ่งจับกับตัวรับดังกล่าวในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นวิธีการที่ยอมรับในการวิจัยและพัฒนาหายาใหม่ในต่างประเทศ งานวิจัยเกี่ยวกับระบบการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต่อตัวรับในระบบประสาทส่วนกลางยังมีค่อนข้างน้อยในประเทศไทย อีกทั้งยังไม่ปรากฏรายงานการทดสอบสารสกัดสมุนไพรในลักษณะดังกล่าว โครงการวิจัยนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาศักยภาพของประเทศเพื่อนำไปสู่การพึ่งตนเองในด้านสาธารณสุข รวมทั้งส่งเสริมความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมยาภายในประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทของส่วนของสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากโครงการที่ 1 และนำมาเป็นตัวบ่งชี้ในการเลือกส่วนของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนนำไปสกัดหาสารบริสุทธิ์ (bioactivity-guided fractionation) หรือก่อนนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองในโครงการที่ 3
2. เพื่อช่วยในการวิเคราะห์หา biological marker ในการกำหนดคุณภาพของสารสกัดที่มีศักยภาพด้านสารกระตุ้นประสาท

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทดสอบความสามารถในการแย่งลิแกนด์จำเพาะในการจับกับตัวรับ (receptor binding assay) ชนิดต่างๆ เพื่อให้ครอบคลุมทุกรูปแบบที่เกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของแอมเฟตามีน (battery of testing) โดยใช้สารตัวอย่างหรือสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากโครงการวิจัยที่ 1 เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีน หลังจากนั้นวิเคราะห์เกณฑ์คัดเลือกส่วนของสารสกัดสมุนไพรเพื่อส่งไปยังโครงการวิจัยที่ 1 ทำการสกัดหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์หรือส่วนของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์มากที่สุด (bioactivity-guided fractionation) และคัดเลือกสารตัวอย่างหรือสารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทอย่างมีนัยสำคัญส่งไปยังโครงการวิจัยที่ 3 เพื่อยืนยันผลในสัตว์ทดลอง หรือส่งไปยังโครงการวิจัยที่ 4 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสารสกัดสมุนไพรที่ทดสอบนั้นมีศักยภาพที่จะถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและดูดซึมผ่านสมอง (blood brain barrier) ได้หรือไม่ หรือส่งไปยังโครงการวิจัยอื่นในชุดโครงการนี้

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การบำบัดรักษาผู้เสพติดแอมเฟตามีนในโครงการวิจัยนี้ จะมุ่งเน้นที่การบำบัดผู้ที่เสพติดแอมเฟตามีนเป็นเวลานานและเกิดอาการคลุ้มคลั่ง หรือแสดงอาการถอนยา โดยนำความเข้าใจในเรื่องกลไกของการเกิดอาการดังกล่าวในระดับเซลล์และระดับชีววิทยาโมเลกุล ตลอดจนคุณสมบัติของยาในการจับกับตัวรับจำเพาะที่อยู่บนเมมเบรนเพื่อส่งสัญญาณเข้าไปภายในเพื่อศึกษาการทำงานของเซลล์ (Mak et al., 1996) ข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกนำมาสร้างเป็นรูปแบบจำลองสำหรับการทดสอบฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นแอมเฟตามีนของสารสกัดสมุนไพร ดังเช่นที่เคยมีในรายงานวิจัยของการนำสมุนไพรจีนมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยใช้เทคนิคของ radioligand-receptor binding assay (Zhu et al., 1996) ปัจจุบันสารที่ได้จากสมุนไพรที่ได้รับการจดสิทธิบัตรและได้นำมาใช้ในการบำบัดผู้ป่วยที่เสพติดแอมเฟตามีนได้แก่ แอลคาลอยด์ ibogaine (ชื่อทางการค้า Endabuse) สกัดจากรากของต้น *Tabernaemontana iboga* โดยไปแย่งโดปามีนและเซโรโทนินในการจับกับตัวรับ (Seršen et al., 1997; Glick and Maisonneuve 1998; Szumlinski et al., 2000) ตลอดจนมีการพัฒนาอนุพันธ์ของ ibogaine เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Efang et al., 1998) แอลคาลอยด์ lobeline สกัดได้จากต้นยาสูบอินเดีย

Lobelia inflata นั้นสามารถแย่งแอมเฟตามีนในการจับกับ dopamine transporter ที่ใช้ในการเก็บกลับโดปามีนเข้าเซลล์ประสาท (Miller et al., 2001) ใบและดอกอ่อนของสมุนไพรชื่อเหล็ก *Cassia siamea* ซึ่งในตำรายาพื้นบ้านของไทยระบุว่าใช้แก้อาการนอนไม่หลับพบว่ามีส่วนสำคัญในกลุ่ม chromone คือ barakol สามารถลดการหลั่งโดปามีนออกจากแผ่นเนื้อเยื่อสมองหนูขาวบริเวณ striatum หลังจากถูกกระตุ้นด้วยโปเดสเซียม (Thongsaard et al., 1997)

การทดสอบฤทธิ์ด้านการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีนในโครงการวิจัยนี้ จะมุ่งที่จะทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรแต่ละ fraction ในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 รวมทั้งตัวรับเซโรโทนินชนิด 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} และตัวรับนอร์อีพิเนฟริน α_1 receptor โดยใช้เทคนิค radioligand receptor binding assay ทำการวิเคราะห์ข้อมูลว่าสารสกัดใดมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์มากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดที่มีผลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 เพื่อให้ข้อมูลไปยังโครงการวิจัยที่ 1 เพื่อทำการสกัดหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์หรือ fraction ที่มีฤทธิ์มากที่สุด และเพื่อนำไปใช้หา fingerprint chromatogram สำหรับควบคุมคุณภาพของสารสกัดที่จะใช้ทดสอบในโครงการอื่นต่อไป และประสานงานกับโครงการวิจัยที่ 3 เพื่อนำไปศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปพัฒนาสารสกัดสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับบำบัดอาการเสพติดแอมเฟตามีนขณะมีอาการคลุ้มคลั่ง หรืออาการถอนยา
2. ได้ข้อมูลเพื่อนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ในระดับเซลล์หรือชีววิทยาโมเลกุล
3. จัดตั้งห้องปฏิบัติการหรือหน่วยทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารเสพติด เพื่อบริการนักวิจัยทั้งภาครัฐ และภาคเอกชน

วิธีดำเนินการวิจัย

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดสมุนไพรสำหรับทดสอบฤทธิ์ต่อการจับกับตัวรับ (ได้รับจากโครงการที่ 1) นำมาละลายในตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลาย DMSO 0.5%

การเตรียมเซลล์เมมเบรนจากสมองหนูขาว

นำสมองหนูขาวบริเวณ striatum ที่เก็บแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส ใส่ในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) บั่นด้วยความเร็ว 600 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนที่เป็นน้ำใส บั่นที่ 18,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ pellet ที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) บั่นที่ 18,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง นำ pellet ที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์เย็นที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 120 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ บั่นที่ 18,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส pellet ที่ได้ครั้งสุดท้ายวัดหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

การเพาะเลี้ยง human D2 cloned cells

เลี้ยง human D2 cloned-cells (A9L cell line hD2 subclone #18, ATCC CRL-10225) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% fetal bovine serum และ 0.5% penicillin-streptomycin โดยบ่มใน CO₂ incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ต่อจากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 2 ครั้ง ทำการขูดเซลล์ให้หลุดในบัฟเฟอร์โดยใช้ cell scraper แล้วนำไปบั่นด้วยความเร็วที่ 3000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ pellets ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

การเตรียมเซลล์เมมเบรนเพื่อทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 2

นำ human D2 cloned-cells ที่เก็บแช่แข็งไว้ในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) นำมาบดให้ละเอียดด้วย tissue homogenizer จากนั้นบั่นด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ pellet ที่ได้ทำซ้ำเช่นนี้อีก 1 ครั้ง นำ pellet ที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) วัดหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford แล้วแบ่งเก็บในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

การทดสอบการจับกับแอลฟา 1 (alpha-1 adrenergic receptor)

นำสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากโครงการที่ 1 ละลายใน DMSO จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ [³H]-prazosin ในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) และเซลล์

เมมเบรนจากสมองหนูขาวบริเวณ cortex บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C (ที่ได้แช่ใน 0.3% polyethyleneimine นาน 1 ชั่วโมงมาก่อนหน้านี้แล้ว) ด้วยอุปกรณ์ Millipore®1225 Sampling Manifold ล้างกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์เย็นครั้งละ 3 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษกรองวัดค่า radioactivity ที่ค้างบนเมมเบรนโดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter การทดสอบการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ของสารสกัดสมองไพรไธใช้ phentolamine เป็นสารสำหรับ nonspecific binding และใช้ prazosin เป็นสารมาตรฐาน

การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 1 (D₁ receptor binding assay)

นำสารสกัดสมองไพรไธที่ได้จากโครงการที่ 1 ละลายใน DMSO จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ [³H]-SCH23390 ในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) และเซลล์เมมเบรนจากสมองหนูขาวบริเวณ striatum ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/B (ที่ได้แช่ใน 0.3% polyethyleneimine นาน 1 ชั่วโมง ก่อนหน้านี้แล้ว) ด้วยอุปกรณ์ Millipore®1225 Sampling Manifold ล้างกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์เย็นดังกล่าวครั้งละ 3 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษกรองวัดค่า radioactivity ที่ค้างบนเมมเบรนโดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ของสารสกัดสมองไพรไธใช้ butaclamol เป็นสารสำหรับ nonspecific binding และใช้ SCH23390 เป็นสารมาตรฐาน

การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 2 (D₂ receptor binding assay)

นำสารสกัดสมองไพรไธที่ได้จากโครงการที่ 1 ละลายใน DMSO จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ [³H]-raclopride ในบัฟเฟอร์เย็น 120 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ และเซลล์เมมเบรนที่เตรียมจากเซลล์ human D₂-cloned บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/B (ที่ได้แช่ใน 0.3% polyethyleneimine นาน 1 ชั่วโมง ก่อนหน้านี้แล้ว) ด้วยอุปกรณ์ Millipore®1225 Sampling Manifold ล้างกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ครั้งละ 3 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษกรองวัดค่า radioactivity ที่ค้างบนเมมเบรนโดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter การทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ของสารสกัดสมองไพรไธใช้ butaclamol เป็นสารสำหรับ nonspecific binding และใช้ raclopride เป็นสารมาตรฐาน

การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 (serotonin-1 หรือ 5-HT₁ receptor)

นำสารสกัดสมองไพรไธที่ได้จากโครงการที่ 1 ละลายใน DMSO จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ [³H]-8(OH)-DPAT ในบัฟเฟอร์เย็น 120 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ และเซลล์เมมเบรนจากสมองหนูขาวบริเวณ cortex บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C (ที่ได้แช่ใน 0.3% polyethyleneimine นาน 1 ชั่วโมงมาก่อน

หน้านี้แล้ว) ด้วยอุปกรณ์ Millipore®1225 Sampling Manifold ล้างกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ครั้งละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษกรองวัดค่า radioactivity ที่ค้างบนเมมเบรนโดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 ของสารสกัดสมองไพร์นี้ใช้ 5-HT เป็นสารสำหรับ nonspecific binding และใช้ 8(OH)-DPAT เป็นสารมาตรฐาน

การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 (serotonin-2 หรือ 5-HT₂ receptor)

นำสารสกัดสมองไพร์ที่ได้จากโครงการที่ 1 ละลายใน DMSO จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ [³H]-ketanserin ในบัฟเฟอร์เย็น 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) และเซลล์เมมเบรนจากสมองหนูขาวบริเวณ frontal cortex บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C (ที่ได้แช่ใน 0.3% polyethyleneimine นาน 1 ชั่วโมงมาก่อนหน้านี้แล้ว) ด้วยอุปกรณ์ Millipore®1225 Sampling Manifold ล้างกระดาษกรองด้วยบัฟเฟอร์เย็นดังกล่าวครั้งละ 3 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษกรองวัดค่า radioactivity ที่ค้างบนเมมเบรนโดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter การทดสอบการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 ของสารสกัดสมองไพร์นี้ใช้ ketanserin เป็นสารสำหรับ nonspecific binding และใช้ methysergide เป็นสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean±S.E.M วิเคราะห์ด้วยสถิติ Student's *t* test เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองสองกลุ่ม และใช้สถิติ one way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบผลการทดลองมากกว่าสองกลุ่ม ถ้าค่า *P* value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบสารที่จำเพาะในการยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่าง ๆ

เพื่อเป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีการทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จึงทำการทดสอบกับสารที่จำเพาะกับตัวรับชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (positive control) ก่อนที่จะนำมาศึกษากับสารสกัดสมุนไพร ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับได้ร้อยละ 50 (ค่า IC_{50}) รวมทั้งค่าคงที่ (K_i) แสดงในตารางที่ 2-1 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้เคยมีรายงานไว้ (Zhu et al., 1996a; Zhu et al., 1996b; Butterweck et al., 2002)

ตารางที่ 2-1 การทดสอบสารที่จำเพาะในการยับยั้งการจับหรือสารมาตรฐานกับตัวรับ 5 ชนิด (n=3-5)

| ตัวรับ | สารมาตรฐาน | IC_{50} (nM) | K_i (nM) |
|-------------|---------------|----------------|------------|
| แอลฟา 1 | prazosin | 4.2 | 0.6 |
| โดปามีน 1 | SCH-23390 | 3.4 | 1.3 |
| โดปามีน 2 | raclopride | 4.8 | 5.6 |
| เซโรโทนิน 1 | 8(OH)-DPAT | 1.0 | 1.3 |
| เซโรโทนิน 2 | methylsergide | 11.3 | 4.4 |

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับเบื้องต้นของสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอล

สารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลจากโครงการวิจัยที่ 1 จำนวน 52 ชนิด นำมาละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา-1 ตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 และ ตัวรับเซโรโทนิน 2 สมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สามารถการยับยั้งการจับกับตัวรับเหล่านี้ได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงไว้ในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 สมุนไพรที่นำมาทดสอบ โดยฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับที่มากกว่า 50% จะถือว่าเป็นค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (n =3-5)

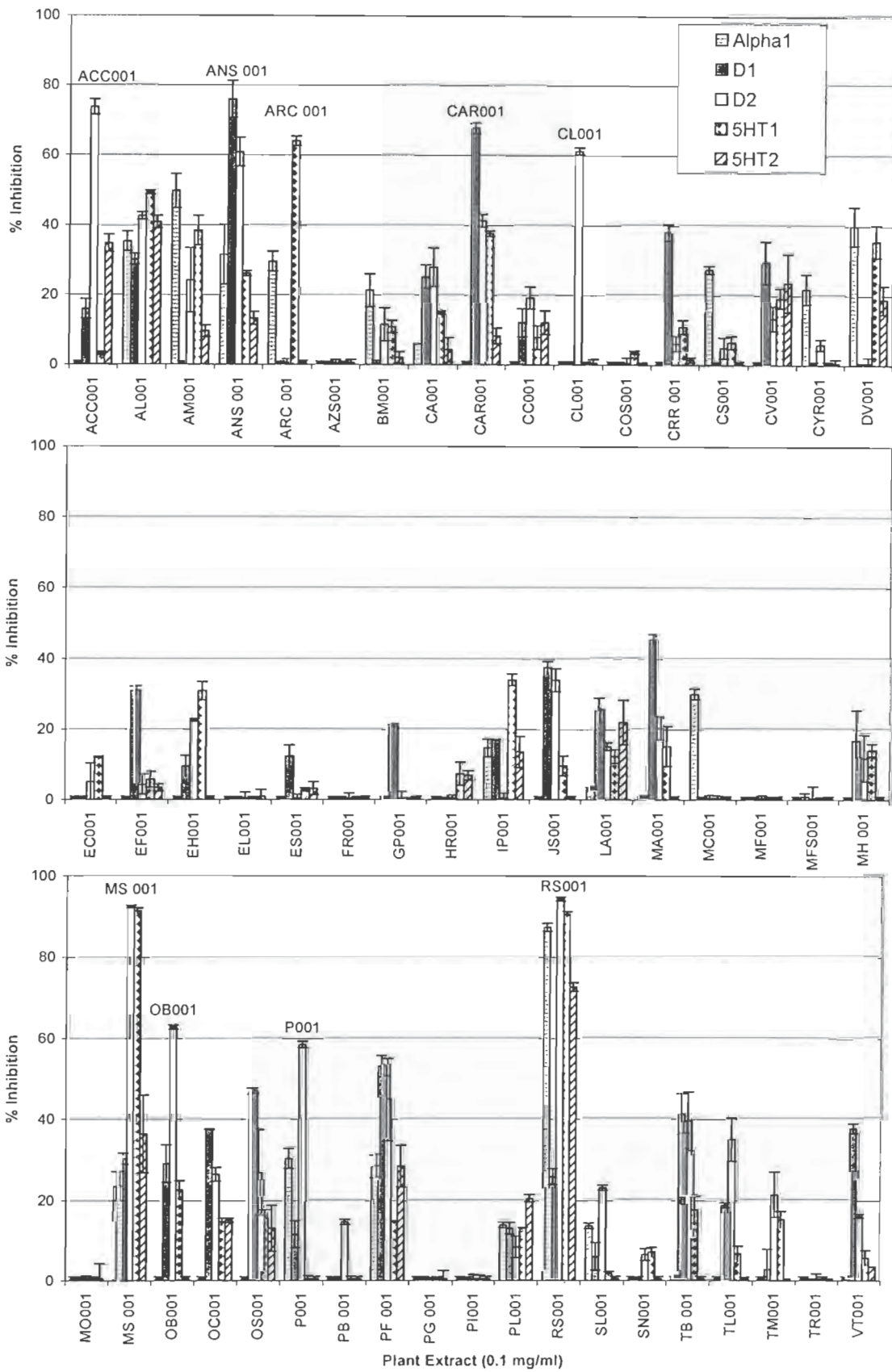
| ลำดับ | ชื่อพืช | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ส่วนที่ใช้ | รหัส | > 50 % inhibition |
|-------|----------|------------------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | ว่านน้ำ | <i>Acorus calamus</i> | เหง้า | ACC001 | D2 |
| 2 | ก้ามปู | <i>Albizia lebbek</i> | ใบ | AL001 | |
| 3 | มะตูม | <i>Aegle marmelos</i> | ผล | AM001 | α -1 |
| 4 | น้อยหน่า | <i>Annona squamosa</i> | ใบ | ANS001 | D1, D2 |
| 5 | หมาก | <i>Areca catechu</i> | เมล็ด | ARC001 | 5-HT1 |

| ลำดับ | ชื่อพืช | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ส่วนที่ใช้ | รหัส | > 50 % inhibition |
|-------|--------------|-------------------------------------------|------------|--------|----------------------|
| 6 | พุงดอ | <i>Azima sarmentosa</i> | ราก | AZS001 | |
| 7 | ทองกวาว | <i>Butea monosperma</i> | ดอก | BM001 | |
| 8 | บัวบก | <i>Centella asiatica</i> | ใบ | CA001 | |
| 9 | ไก่เดี๋ย | <i>Canavalia rosea</i> | ทั้งต้น | CAR001 | D1 |
| 10 | ยี่หระ | <i>Cuminum cyminum</i> | ผล | CC001 | |
| 11 | ขมิ้นชัน | <i>Curcuma longa</i> | เหง้า | CL001 | D2 |
| 12 | ผักชี | <i>Coriandrum sativum</i> | ผล | COS001 | |
| 13 | เปล้าใหญ่ | <i>Croton roxburghii</i> | ใบ | CRR001 | |
| 14 | ซีเหล็ก | <i>Cassia siamea</i> | ดอก+ใบอ่อน | CS001 | |
| 15 | ผักเสี้ยนผี | <i>Cleome viscosa</i> | ทั้งต้น | CV001 | |
| 16 | หญ้าแห้วหมู | <i>Cyperus rotundus</i> | เหง้า | CYR001 | |
| 17 | กระทิงหมาบ้า | <i>Dregia volubilis</i> | เถา | DV001 | |
| 18 | กานพลู | <i>Eugenia caryophyllata</i> | ดอกตูม | EC001 | |
| 19 | ผักชีฝรั่ง | <i>Eryngium foetidum</i> | ใบ | EF001 | |
| 20 | น้ำนมราชสีห์ | <i>Euphorbia hirta</i> | ทั้งต้น | EH001 | |
| 21 | ปลาไหลเผือก | <i>Eurycoma longifolia</i> | ราก | EL001 | |
| 22 | ทองหลางใบมน | <i>Erythrina suberosa</i> | ใบ | ES001 | |
| 23 | โพธิ์ | <i>Ficus religiosa</i> | เปลือกต้น | FR001 | |
| 24 | ว่านมหากาฬ | <i>Gynura pseudochina var hispida</i> | เหง้า | GP001 | |
| 25 | ชบา | <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> | ดอก | HR001 | |
| 26 | ผักบุ้งทะเล | <i>Ipomoea pes-caprae</i> | ใบ | IP001 | |
| 27 | สบู่แดง | <i>Jatropha gossypifolia</i> | ใบ | JS001 | |
| 28 | ผักขวย | <i>Limnophila aromatica</i> | ทั้งต้น | LA001 | |
| 29 | หม่อน | <i>Morus alba</i> | ใบ | MA001 | |
| 30 | ยอ | <i>Morinda citrifolia</i> | ราก | MC001 | |
| 31 | จันทน์เทศ | <i>Myristica fragrans</i> | เมล็ด | MF001 | |
| 32 | จันทน์เทศ | <i>Myristica fragrans</i> | ลำต้น | MFS001 | |
| 33 | กระท่อมโคก | <i>Mitragyna hirsute</i> | ใบ | MH001 | |
| 34 | มะรุม | <i>Moringa oleifera</i> | ราก | MO001 | |
| 35 | กระท่อม | <i>Mitragyna speciosa</i> | ใบ | MS001 | D2, 5-HT1 |
| 36 | โหระพา | <i>Ocimum basilicum</i> | ใบ | OB001 | D2 |

| ลำดับ | ชื่อพืช | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ส่วนที่ใช้ | รหัส | > 50 % inhibition |
|-------|-----------------|---------------------------------|------------|-------|----------------------------------|
| 37 | แมงลัก | <i>Ocimum canum</i> | ใบ | OC001 | |
| 38 | กะเพรา | <i>Ocimum sanctum</i> | ใบ | OS001 | |
| 39 | สน | <i>Pinus sp.</i> | แก่น | P001 | D2 |
| 40 | พลู | <i>Piper betel</i> | ใบ | PB001 | |
| 41 | กะทกรก | <i>Passiflora foetida</i> | ใบ | PF001 | D1 |
| 42 | ฝรั่ง | <i>Psidium guajava</i> | ผล | PG001 | |
| 43 | เจตมูลเพลิงแดง | <i>Plumbago indica</i> | ราก | PI001 | |
| 44 | ถั่วผี | <i>Phaseolus lathyroides</i> | ทั้งต้น | PL001 | |
| 45 | ระย่อม | <i>Rauvolfia serpentina</i> | ราก | RS001 | α -1, D2, 5-HT1, 5-HT2 |
| 46 | หนุมานประสานกาย | <i>Schefflera leucantha</i> | ใบ | SL001 | |
| 47 | ผักแครด | <i>Synedrella nodiflora</i> | ผักแครด | SN001 | |
| 48 | สมอพิเภก | <i>Terminalia bellerica</i> | ผล | TB001 | |
| 49 | รางจืด | <i>Thunbergia laurifolia</i> | ใบ | TL001 | |
| 50 | ดาวเรือง | <i>Tagetes minuta</i> | ดอก | TM001 | |
| 51 | โลดทะนงแดง | <i>Trigonostemon reidioides</i> | กิ่ง | TR001 | |
| 52 | คนทีสอ | <i>Vitex trifolia</i> | ใบ | VT001 | |

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอล สารสกัดหยาบของสมุนไพรในชั้นเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า ผลยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 2 ชนิด คือ ผลมะตูม (AM001) และ รากระย่อม (RS001) สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ระหว่าง 30-50% มีจำนวน 6 ชนิด คือ ใบก้ามปู (AL001) ใบน้อยหน่า (ANS001) เมล็ดหมาก (ARC001) เถากระทูหม่าบ้า (DV001) รากยอ (MC001) และ แก่นสน (P001) (รูปที่ 2-1)

2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล สารสกัดหยาบของสมุนไพรในชั้นเอทานอลที่ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 3 ชนิด คือ ใบน้อยหน่า (ANS001) ทั้งต้นไก่อี้ (CAR001) และใบกะทกรก (PF001) สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ระหว่าง 30-50% มีจำนวน 10 ชนิด คือ ใบก้ามปู (AL001) ใบเป้งใหญ่ (CRR001) ใบผักชีฝรั่ง (EF001) ใบสบู่แดง (JS001) ใบหม่อน (MA001) ใบกระท่อม (MS001) ใบแมงลัก (OC001) ใบกะเพรา (OS001) ผลสมอพิเภก (TB001) และ ใบคนทีสอ (VT001) (รูปที่ 2-1)



รูปที่ 2-1

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดสมุนไพร

2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล
 สารสกัดหยาบของสมุนไพรในชั้นเอทานอลที่ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 7 ชนิด คือ เหง้าว่านน้ำ (ACC001) ใบน้อยหน่า (ANS001) เหง้าขมิ้นชัน (CL001) ใบกระท่อม (MS001) ใบโหระพา (OB001) แก่นสน (P001) และรากระย่อม (RS001) สำหรับสารสกัดหยาบของสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ระหว่าง 30-50% มีจำนวน 6 ชนิด คือ ใบก้ามปู (AL001) ทั้งต้นไก่อี้ (CAR001) ใบสบู่แดง (JS001) ใบกะทกรก (PF001) ผลสมอพิเภก (TB001) และใบรางจืด (TL001) (รูปที่ 2-1)

2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล
 สารสกัดหยาบของสมุนไพรในชั้นเอทานอลที่ยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 3 ชนิด คือ เมล็ดหมาก (ARC001) ใบกระท่อม (MS001) และรากระย่อม (RS001) สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 ระหว่าง 30-50% มีจำนวน 6 ชนิด คือ ใบก้ามปู (AL001) ผลมะตูม (AM001) ทั้งต้นไก่อี้ (CAR001) เถากระทิงหมาบ้า (DV001) ทั้งต้นน้ำนมราชสีห์ (EH001) และใบผักบุงทะเล (IP001) (รูปที่ 2-1)

2.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล
 สารสกัดหยาบของสมุนไพรในชั้นเอทานอลที่ยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 1 ชนิด คือ รากระย่อม (RS001) สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 2 ระหว่าง 30-50% มีจำนวน 3 ชนิด คือ เหง้าว่านน้ำ (ACC001) ใบก้ามปู (AL001) และ แก่นสน (P001) (รูปที่ 2-1)

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Bioactivity-guided fractionation)

จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลที่ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ประมาณหรือมากกว่า 50% มีจำนวน 3 ชนิด คือ ใบน้อยหน่า (ANS001) ทั้งต้นไก่อี้ (CAR001) และใบกะทกรก (PF001) จึงประสานงานกับโครงการที่ 1 เพื่อดำเนินการสกัดแยกโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน คือ hexane (ใช้รหัสตามหลังชื่อย่อวิทยาศาสตร์ 002 ตัวอย่างเช่นสารสกัดกะทกรกชั้นเฮกเซนจะย่อด้วย PF002) dichloromethane (CH₂Cl₂ รหัส 003) และ butanol (รหัส 004) ด้วยหลักการที่ว่าแอมเฟตามีนรวมทั้งยาหรือสารออกฤทธิ์ด้านแอมเฟตามีน ในเบื้องต้นศึกษาผ่านทางตัวรับโดปามีน 1 ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสำคัญกับฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 เป็นลำดับแรก สารสกัดในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล ที่โครงการที่ 1 ได้แยกและส่งมาให้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับพบว่า สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด โครงการที่ 1 จึงได้ทำการแยกสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อให้ได้สารสกัดที่บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีทาง

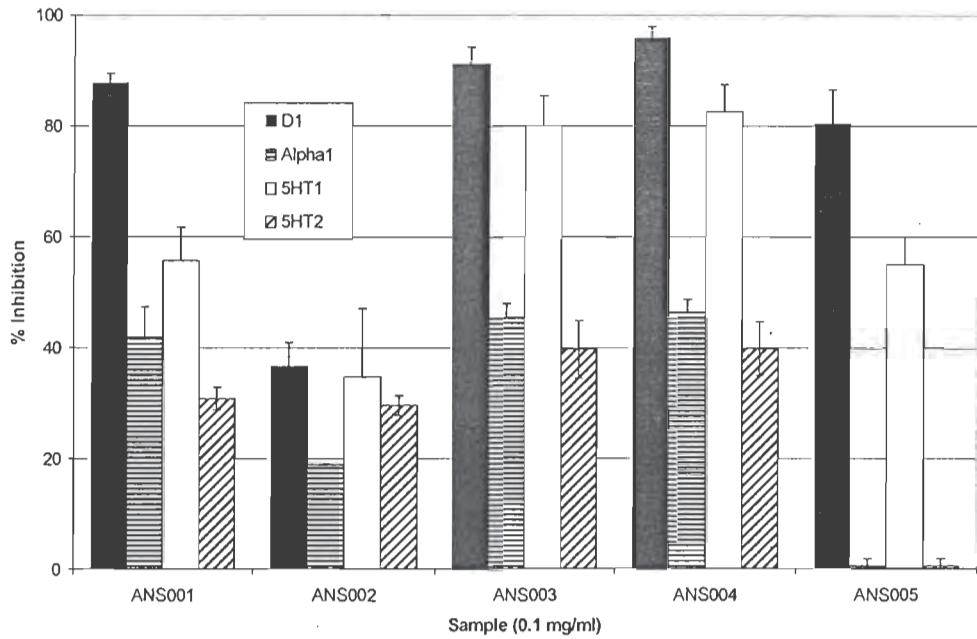
โครมาโทกราฟี จากนั้นนำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2

3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดใบน้อยหน่าในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

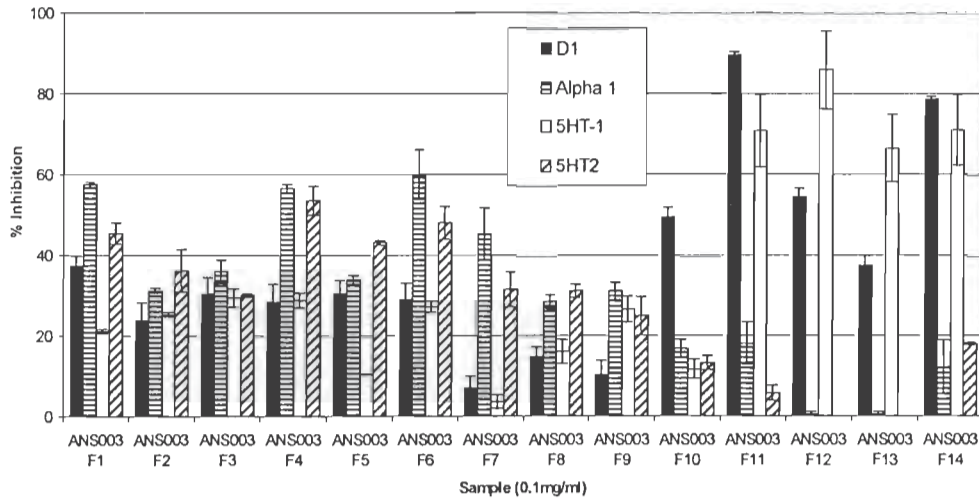
เนื่องจากสารสกัดใบน้อยหน่าในชั้นไดคลอโรมีเทน (ANS 003) ออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนได้ดีที่สุด (รูปที่ 2-2 ก) จึงทำการแยกสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนต่อไปด้วยวิธีโครมาโทกราฟีได้สารตัวอย่างทั้งสิ้น 14 fractions จึงนำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าในชั้นไดคลอโรมีเทน fraction ANS3F11 มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ถึง $89.2 \pm 0.9\%$ (รูปที่ 2-2 ข) และยังมีผลยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 แต่แทบไม่มีผลต่อตัวรับเซโรโทนิน 2 และตัวรับแอลฟา 1 เลย

จากการที่ fraction ANS3F11 มีผลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงส่งให้โครงการที่ 1 ทำการแยกสารบริสุทธิ์ได้ β -sitosterol glucoside (Kojima et al., 1990) และ lanuginosine (7 มิลลิกรัม) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม dioxoaporphine alkaloid นอกจากนี้ยังได้ตะกอนของ ANS3F11a และ ANS3F11b โดยเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์พบว่า ANS3F11a ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 (รูปที่ 2-3) แต่ตะกอนขาว ANS3F11b ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ถึง 18% (รูปที่ 2-3) เมื่อโครงการที่ 1 วิเคราะห์โครงสร้างจาก NMR spectrum พบว่าเป็นสารในกลุ่ม acetogenin อย่างไรก็ตามเมื่อโครงการที่ 3 นำสารสกัดใบน้อยหน่าในชั้นไดคลอโรมีเทนไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองพบความเป็นพิษค่อนข้างสูงมาก อีกทั้งมีรายงานอาการข้างเคียงคล้ายพาร์กินสันของพืชสกุล *Annona* (Capros-Lefebvre et al., 1999) จึงไม่ได้ให้ลำดับความสำคัญที่จะศึกษาต่อไป

ก

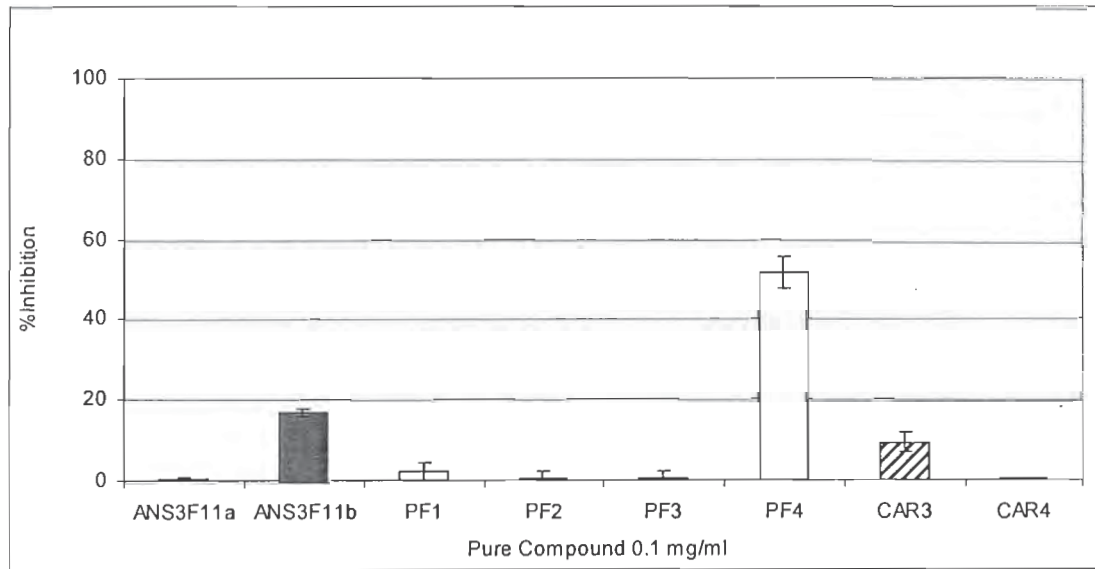


ข



รูปที่ 2-2

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดใบน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ในตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน คือในชั้นเอทานอล (ANS001) ในชั้นเฮกเซน (ANS002) ในชั้นไดคลอโรมีเทน (ANS003) ในชั้นบิวทานอล (ANS004) และในชั้นน้ำ (ANS005) (ข) สารสกัดใบน้อยหน่าในชั้นไดคลอโรมีเทนนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธี column chromatography ได้ 14 fraction และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ



รูปที่ 2-3

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ของสารที่แยกได้จากสารสกัดในชั้น ไดคลอโรมีเทนของใบน้อยหน่า (ANS3F11a, ANS3F11b) ใบกะทกรก (PF1-PF4) และทั้งต้นไก่อเดี้ย (CAR3-CAR4)

3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดใบกะทกรกในตัวอย่างละลายชนิดต่าง ๆ

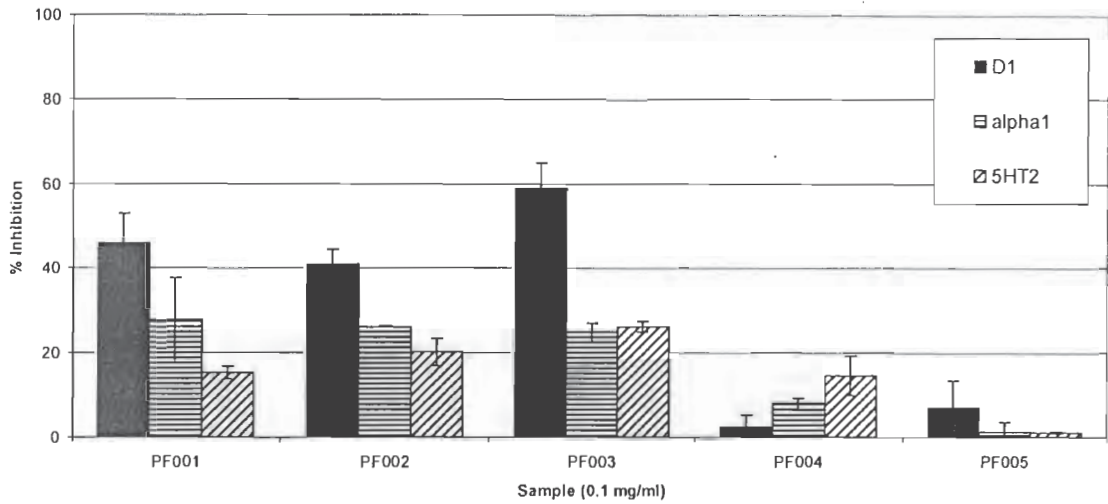
สารสกัดใบกะทกรกในชั้นเฮกเซน (PF002) และชั้นไดคลอโรมีเทน (PF003) ออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดี (รูปที่ 2-4 ก) จึงได้ทำการแยกสารสกัดในชั้นเฮกเซนและในชั้นไดคลอโรมีเทนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีได้สารสกัดทั้งสิ้น 7 และ 5 fractions ตามลำดับ และนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับทั้ง 4 ชนิด (รูปที่ 2-4 ข) พบว่า fraction PF003-1 มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ถึง $82.6 \pm 0.7\%$ และมีผลยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ตัวรับเซโรโทนิน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2 ด้วย สำหรับ fraction PF003-2 แสดงความจำเพาะในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 1 แต่แทบไม่มีผลต่อการจับกับตัวรับแอลฟา 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2 เลย

จากการที่ fraction PF003-1 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจึงทำการสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์คือ PF4 (7.11 มิลลิกรัม) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 เท่ากับ $51.5 \pm 2.4\%$ (รูปที่ 2-3) ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาศูตโรโครงสร้างจากโครงการที่ 1 ที่นำมาสู่ข้อมูลสำคัญในการเป็น biomarker ของสารสกัดใบกะทกรกในชั้นไดคลอโรมีเทนต่อไป สำหรับสารที่แยกได้จาก fraction PF003-2 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 รองลงมาคือ chrysoeriol (PF2) และ acacetin (PF3) สำหรับสารที่แยกได้จาก fraction PF003-3 คือ สารผสมระหว่าง β -sitosterol glycoside กับ stigmasterol glycoside (PF1) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 น้อยกว่า 10% (รูปที่ 2-3)

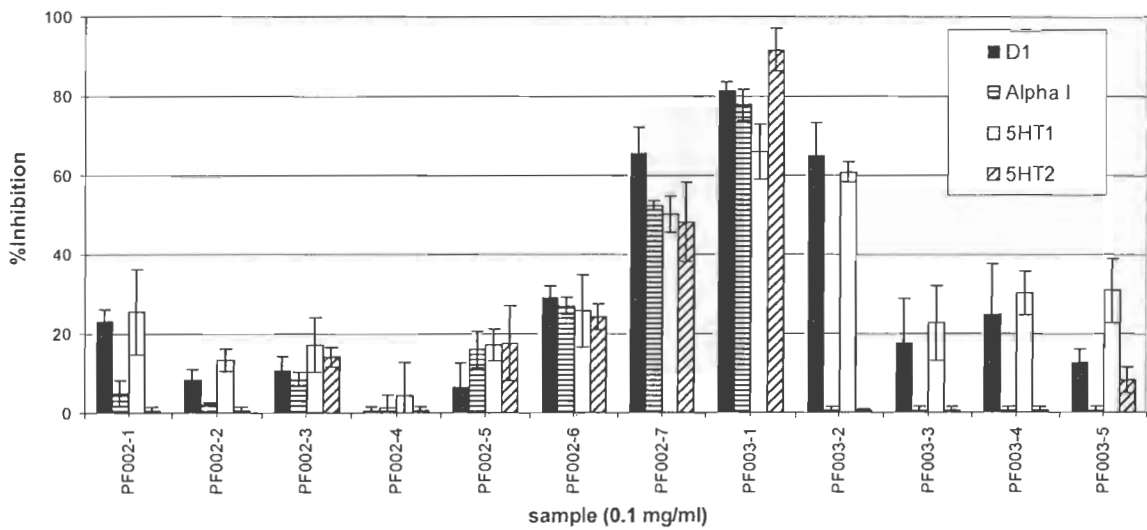
3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของสารสกัดทั้งต้นไก่เตี้ยในตัวอย่างละลายชนิดต่าง ๆ

สารสกัดทั้งต้นไก่เตี้ยในชั้นไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับทั้ง 4 ชนิดพบที่ฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุดในที่ fraction CAR003-3 โดยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ถึง $49.9 \pm 5.2\%$ (รูปที่ 2-5 ข) สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากชั้นไดคลอโรมีเทน (CAR003) พบว่าเป็นอนุพันธ์ของ cyclitol คือ *epi*-inositol-6-O-methyl ether (CAR4 จำนวน 16 มิลลิกรัม) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้น้อยกว่า 10% (รูปที่ 2-3) นอกจากนี้ยังได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนของ CAR1 เป็นสารในกลุ่ม guanidine alkaloid ชนิดใหม่ให้ชื่อสารว่า canarosine (จำนวน 7 มิลลิกรัม) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ถึง 91% โดยค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 39.4 ± 5.8 ไมโครโมลาร์ ซึ่งอาจจะนำไปเป็น biomarker ในการติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพต่อระบบประสาทเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ของสารสกัดไก่เตี้ย

ก



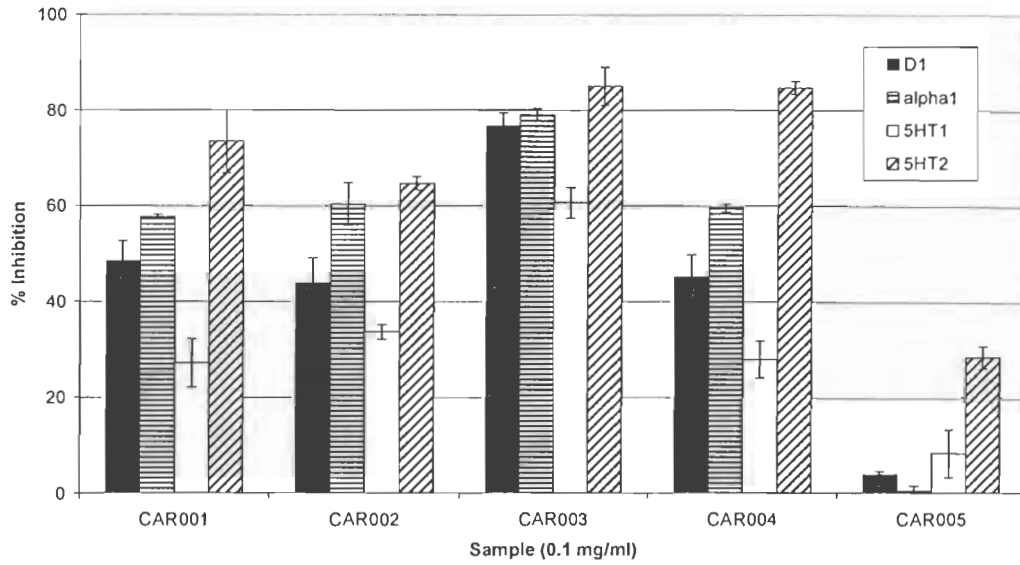
ข



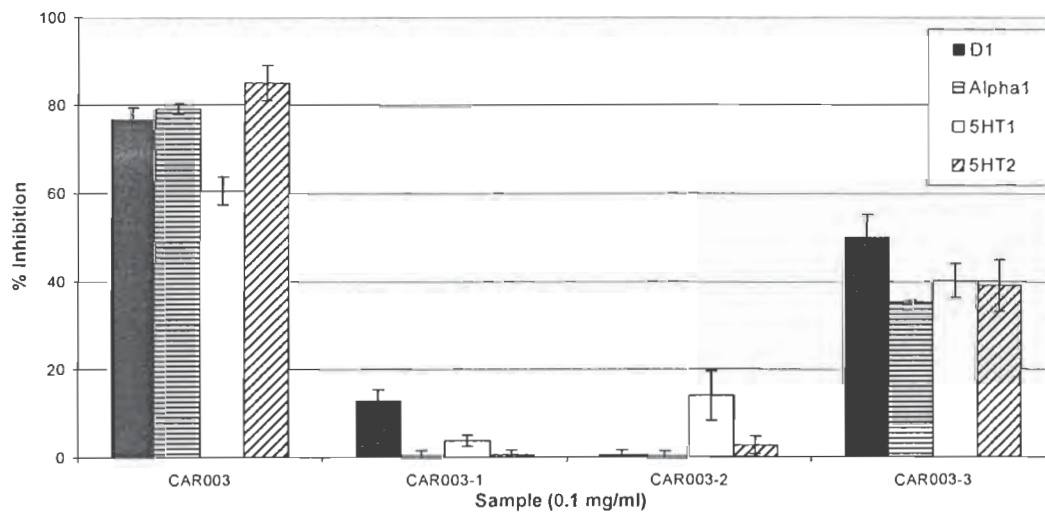
รูปที่ 2-4

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดใบกะทกรกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือในชั้นเอทานอล (PF001) ในชั้นเฮกเซน (PF002) ในชั้นไดคลอโรมีเทน (PF003) ในชั้นบิวทานอล (PF004) และในชั้นน้ำ (PF005) (ข) สารสกัดใบกะทกรกในชั้นเฮกเซนและชั้นไดคลอโรมีเทนนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธี column chromatography ได้ 7 และ 5 fractions ตามลำดับและนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ

ก



ข



รูปที่ 2-5

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆของสารสกัดทั้งต้นไก่เตี้ยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือในชั้นเอทานอล (CAR001) ในชั้นเฮกเซน (CAR002) ในชั้นไดคลอโรมีเทน (CAR003) ในชั้นบิวทานอล (CAR004) และในชั้นน้ำ (CAR005) (ข) สารสกัดทั้งต้นไก่เตี้ยในชั้นไดคลอโรมีเทนนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธี column chromatography ได้ 3 fractions และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดในชั้นเฮกเซน (CAR002) คือ β -sitosterol glucoside (CAR3) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ประมาณ 10% (รูปที่ 2-3) สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากชั้นบิวทานอล (CAR004) พบว่าเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ rutin (หรือ quercetin 3-rutinoside)

อภิปรายผลการวิจัย

กลไกการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์แอมเฟตามีนส่วนใหญ่ผ่านทางระบบประสาท monoamine เป็นหลัก (Gudelsky and Yamamoto 2007) โดยลำเลียงแอมเฟตามีนเข้าเซลล์ประสาทดังกล่าวผ่านทางโปรตีน monoamine transporter และเข้าสู่ vesicle ที่เป็นแหล่งเก็บสะสมสารสื่อประสาทก่อนหลั่งออกนอกเซลล์และไปจับกับตัวรับของมัน และจากข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของยาหรือสมุนไพรที่นำมาบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทส่วนใหญ่สัมพันธ์กับสารสื่อประสาทในกลุ่ม monoamine กับตัวรับเช่นตัวรับโดปามีน ตัวรับเซโรโทนิน และตัวรับแอลฟา ตัวอย่างเช่นกลไกการออกฤทธิ์ของ lobeline ที่สกัดได้จากต้นยาสูบอินเดีย *Lobelia inflata* (Miller, 2001; Dwoskin and Crooks 2002) หรือแอลคาลอยด์ ibogaine (ชื่อทางการค้า Endabuse) สกัดจากรากของต้น *Tabernaemontana iboga* (Sershen, 1997; Glick, 1998; Szumlanski, 2000) ดังนั้นเพื่อคัดกรองสมุนไพรที่มีผลต่อสารกระตุ้นประสาทจึงทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค radioligand-receptor binding assay (Zhu, 1996; Muramatsu et al., 2005) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบระย้อมในชั้นเอทธานอล (RS001) แสดงผลยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 ตัวรับเซโรโทนิน 2 ได้มากกว่า 50% ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ทราบกันดีว่าระย้อมเป็นสมุนไพรที่ช่วยลดความดันโลหิต และช่วยสงบระงับ (tranquilizer) เนื่องจากมีสารสำคัญจำพวกแอลคาลอยด์ reserpine, deserpidine และ rescinnamine (Fabricant and Farnsworth 2001) ออกฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตที่เป็นผลผ่านทางตัวรับแอลฟา 1 (Dolphin et al., 1976) และช่วยสงบระงับผ่านทางตัวรับเซโรโทนิน

ผลของสารสกัดหยาบของใบกระท่อมในชั้นเอทธานอล (MS001) ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับเซโรโทนิน 1 ได้มากกว่า 50% ส่วนสารสกัดหยาบของผลมะตูมในชั้นเอทธานอล (AM001) สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับแอลฟา 1 ได้มากกว่า 50% โดยสารสกัดของสมุนไพรสองชนิดนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์แก้ปวด (Matsumoto et al., 1996; Shankarananth et al., 2007) โดยฤทธิ์แก้ปวดของใบกระท่อมส่วนใหญ่มาจากสารสำคัญ mitragynine ที่ออกฤทธิ์ผ่านทางระบบประสาทเซโรโทนินและระบบประสาทนอร์อิพิเนฟรินที่ทำงานลดลง (Matsumoto et al., 1996)

สารสกัดหยาบในชั้นเอทธานอลของเหง้าว่านน้ำ (ACC001) เหง้าขมิ้นชัน (CL001) และแก่นสน (P001) ในงานวิจัยนี้สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ได้มากกว่า 50% จากที่เคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางพบว่าสารสกัดรากว่านน้ำขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูถีบจักร สามารถลดพฤติกรรมก้าวร้าวแต่ไม่สามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้า (Vohora et al., 1990) การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดเหง้าขมิ้นชันต่อระบบประสาทส่วนกลางมีมากมาย (Bishnoi et al., 2008; Xia et al., 2007; Xu et al., 2007) รวมทั้งรายงานถึงสารสำคัญ curcumin ในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยป้อนเข้าทางปากหนูถีบจักร สามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้าได้โดยผ่านทางตัวรับเซโรโทนิน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2 (Wang et al., 2008) นอกจากนี้ยังช่วยลดพฤติกรรมสิ้นหวังในหนูที่ถูกทำให้เครียดเรื้อรังผ่านการแสดงออกของยีนตัวรับเซโรโทนิน 1 เอ และ brain-derived neurotrophic factor ในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสลดลง โดยศึกษาเปรียบเทียบ

กับยาด้านอาการซึมเศร้า imipramine ขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมที่ฉีดเข้าทางช่องท้อง (Xia et al., 2006; Xu et al., 2007) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบเหง้าขมิ้นชันในชั้นเอทธานอลมีผลต่อตัวรับเซโรโทนิน 1 และตัวรับเซโรโทนิน 2 น้อยกว่า 10% (CL001 ในรูปที่ 2-1)

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าผลของสารสกัดจากใบโหระพาในชั้นเอทธานอล (OB001) สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ได้มากกว่า 50% ขณะที่สารสกัดหยาบใบแมงลัก (OC001) และสารสกัดหยาบใบกะเพรา (OS001) ในชั้นเอทธานอลยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ได้เพียง 10-30% แต่สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ถึง 30-50% เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีรายงานพบว่า สารสกัดรากโหระพาในชั้นเมทานอลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนูถีบจักรเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่าทำให้หนูว่ายน้ำได้นานขึ้นและยังช่วยลดความเครียดได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า desipramine (Maity et al., 2000) สารสกัดใบกะเพราในชั้นเอทธานอลช่วยผ่อนคลายความเครียดในหนูขาวที่ถูกทำให้เครียดโดยตรึงให้อยู่กับที่ (immobilized stress) นั้นยังว่ายน้ำได้เป็นอย่างดีภายใต้การควบคุมของระบบประสาทโดปามีน เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า imipramine (Sakina et al., 1990) และยังช่วยลดความเครียดในหนูขาวที่ได้ยินเสียงขนาด 100 เดซิเบลนาน 4 ชั่วโมงติดต่อกันนาน 15 วัน โดยทำให้สารสื่อประสาทโดปามีน เซโรโทนิน นอร์อิพิเนฟริน และอิพิเนฟรินในสมองกลับเข้าสู่ระดับปกติ (Ravindran et al., 2005) เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชสกุล *Ocimum* เช่นโหระพา แมงลัก และกะเพรา มีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Martins et al., 1999) เช่น eugenol ที่พบในใบกะเพราสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Prakash and Gupta, 2005) ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ให้กับผลิตภัณฑ์อาหารเครื่องเทศ (Ringman et al., 2005) หรือผลิตภัณฑ์สปาเพื่อช่วยผ่อนคลายความเครียดให้กับผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

อย่างไรก็ตามจากข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของแอมเฟตามีนไปกระตุ้นการหลั่งโดปามีนออกจากเซลล์ประสาทและไปจับกับตัวรับโดปามีน 1 เป็นลำดับแรกในสมองบริเวณ mesolimbic reward pathway รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของยาหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นำมาบำบัดผู้เสพติดแอมเฟตามีน เช่น lobeline (Miller et al., 2001) และ ibogaine (Glick and Maisonneuve, 1998; Sershen et al., 1997; Szumlinski et al., 2000) ส่วนใหญ่เริ่มจากการศึกษาผ่านทางระบบประสาทโดปามีน โครงการวิจัยนี้จึงนำมาเป็นหลักการคัดกรองสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านแอมเฟตามีน และให้ความสำคัญต่อตัวรับโดปามีน 1 เป็นลำดับแรก ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทธานอลของใบน้อยหน้า ใบกะทกรก และทั้งต้นไก่อเดี้ย สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้มากกว่า 50% จึงนำสารสกัดหยาบเหล่านี้มาดำเนินการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายมีขั้วแตกต่างกันตั้งแต่เฮกเซน ไตคลอโรมีเทน บิวทานอลเพื่อนำมาทำ bioactivity-guided fractionation สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับได้ดีส่วนใหญ่จะอยู่ในชั้นไตคลอโรมีเทน ซึ่งต้องทำการสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น chemical marker หรือ biomarker ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดหรือติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดใบน้อยหน้าในชั้นไตคลอโรมีเทนแยกได้สารบริสุทธิ์ lanuginosine และ β -sitosterol glucoside สำหรับนำมาใช้เป็น chemical marker นอกจากนี้ยังได้สารกลุ่ม acetogenin เมื่อนำมาทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งการจับ

กับตัวรับโดปามีน 1 ได้ 18% ที่อาจใช้เป็น biomarker จากรายงานฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของพืชสกุล *Annona* โดยสารสกัดในชั้นเฮกเซนของใบ *Annona cherimolia* ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูถีบจักร ทำให้เกิดพฤติกรรมคล้ายกังวลที่สัมพันธ์กับตัวรับ GABA/benzodiazepine โดยศึกษาเปรียบเทียบกับยากล่อมประสาท diazepam ขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยขนาดความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดชั้นเฮกเซนจะมากกว่า 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ขนาดความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดชั้นเมทานอล (LD_{50}) เท่ากับ 13.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยแสดงอาการกล้ามเนื้อกระตุกก่อนตายอย่างรวดเร็ว (López-Rubalcava et al., 2006) รวมทั้งข้อมูลทางระบาดวิทยาที่พบอาการคล้ายพาร์กินสันในประชาชนหมู่เกาะ French West Indies ที่ชอบบริโภคและผลของ *Annona muricata* และ *Annona squamosa* (Capros-Lefebvre et al., 1999) โดยอาการคล้ายพาร์กินสันอาจมาจากสารสำคัญกลุ่ม acetogenin เช่น annonacin ในสารสกัดชั้นน้ำของใบ *A. muricata* สามารถผ่าน blood-brain barrier เข้าไปทำลายเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองบริเวณ basal ganglia ของหนูขาว (Lannuzel et al., 2006) ดังนั้นแผนงานวิจัยจึงไม่จัดลำดับความสำคัญที่จะศึกษาสารสกัดใบน้อยหน้าต่อไป

จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของพืชสกุล *Passiflora* พบว่าสารสกัด *P. incarnata* ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ที่พบในประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์ 2544) พบฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Carlini, 2003) ฤทธิ์คลายกังวลในหนูถีบจักร (Dhawan et al., 2001a) และฤทธิ์ต้านชักผ่านทางระบบประสาท GABA และ opioid ในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดในชั้นแอลกอฮอล์ของใบ ดอก ผล *P. incarnata* เข้าทางช่องท้อง (ค่า ED_{50} เท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ diazepam 0.5–1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Nassiri-Asl et al., 2007) นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ tri-substituted benzoflavone สกัดได้จาก *P. incarnata* เมื่อนำมาป้อนเข้าปากหนูถีบจักรในขนาด 10-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าลดอาการถอนยาในหนูที่ติดยา diazepam ที่ได้รับในขนาด 10-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นาน 21 วันติดต่อกัน (Dhawan et al., 2003) ฟลาโวนอยด์ชนิดนี้ยังช่วยลดอาการถอนยาในหนูติดเอทานอลโดยได้รับในขนาด 2 กรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง นาน 6 วันติดต่อกัน (Dhawan et al., 2002) ทั้งนี้ยังมีรายงานถึงสมุนไพรรูปปั้นเนียนจากกะทกรกฝรั่ง (*P. edulis*) ที่ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลเลยเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในสกุลเดียวกันคือ *P. incarnata* (Dhawan et al., 2001b) จากรายงานดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของพืชสกุล *Passiflora* บางชนิดจากผลการศึกษาของสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลของใบกะทกรก (*P. passiflora*) ที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้มากกว่า 50% จึงทำสกัดแยกด้วยตัวทำละลายมีขั้วแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดใบกะทกรกในชั้นไดคลอโรมีเทนเมื่อนำมาทำ bioactivity-guided fractionation ได้สารบริสุทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์คือ chrysoeriol (Mishra et al., 2003; Khan and Gilani, 2006) และ acacetin นอกจากนี้ยังได้สารบริสุทธิ์ที่อยู่ในระหว่างการศึกษาศูตรโครงสร้างจากโครงการที่ 1 คือ PF4 ซึ่งที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงค่าการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 เท่ากับ $51.5 \pm 2.4\%$ (รูปที่ 2-3) ซึ่งอาจใช้เป็น biomarker ที่สำคัญในการติดตามฤทธิ์ด้านแอมเฟตามีนของสารสกัดใบกะทกรก สำหรับรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์ chrysoeriol พบว่า

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Mishra et al., 2003) เป็นสารต้านการอักเสบภายในเซลล์ macrophage โดยไปยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของโปรตีน AP-1 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *i-NOS* (inducible nitric oxide synthase) ทำให้การสังเคราะห์ nitric oxide ลดลง (Choi et al., 2005) เช่นเดียวกันได้มีรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของฟลาโวนอยด์ acacetin ภายในเซลล์ macrophage โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *i-NOS* และยีน COX-2 (cyclooxygenase-2) (Pan et al., 2006) ซึ่งอาจนำมาช่วยลดการอักเสบของเซลล์ประสาทที่ได้รับแอมเฟตามีนได้ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ของ chrysoeriol (PF2) และ acacetin (PF3) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่ามีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ PF4 (รูปที่ 2-3) ดังนั้นฟลาโวนอยด์สองชนิดนี้จึงใช้ได้เพียง chemical marker ในสารสกัดใบกะทกรก

เท่าที่มีรายงานฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของพืชสกุลถั่ว *Canavalia* วงศ์ Leguminosae ได้แก่ lectin ซึ่งเป็น glycoprotein สกัดได้จากเมล็ด *C. brasiliensis* เมื่อให้เข้าสมองหนูถีบจักรโดยตรงในขนาด 1-10 ไมโครกรัม พบว่าสามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้าในหนูถีบจักรที่ศึกษาด้วยวิธี forced swimming โดยผ่านทางระบบประสาทโดปามีน (ตัวรับโดปามีน 2) เซโรโทนิน (ตัวรับเซโรโทนิน 1เอ และตัวรับเซโรโทนิน 2) และนอร์อิพิเนฟริน (ตัวรับแอลฟา 2) ทั้งนี้ไม่มีผลกระทบต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่ locomotor (Barauna et al., 2006) โปรตีน lectin นี้ยังสกัดได้จากเมล็ด *C. maritima* (อีกชื่อหนึ่งของกะทกรก *Canavalia rosea*) และจากเมล็ดถั่วพราง *C. gladiata* (Bezerra et al., 2007) ในขณะที่โปรตีน concanavalin A (ConA) สกัดได้จากเมล็ดถั่วแขก *C. ensiformes* นั้นกลับเป็นพิษต่อระบบประสาทโดยทำให้หนูขาวช็อกและตายภายใน 15 นาทีหลังจากได้รับสารในขนาด 2-3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้าทางหลอดเลือดดำ (Carlini et al., 1984) ซึ่งต้องระวังในเรื่องการปนเปื้อนของโปรตีน ConA ในสารสกัดของพืชสกุล *Canavalia* จากผลการศึกษาในรายงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลของทั้งต้นไก่เดื้อออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้มากกว่า 50% จึงทำสกัดแยกด้วยตัวทำละลายมีขั้วแตกต่างกัน พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดทั้งต้นไก่เดื้อในชั้นไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 จากน้อยไปมาก คือ *epi-inositol-6-O-methyl ether* (CAR4 รูปที่ 2-3) และ canarosine ($IC_{50} = 39.4 \pm 5.8$ ไมโครโมลาร์) สารทั้งสองชนิดอาจนำมาใช้เป็น biomarker ร่วมกันสำหรับติดตามฤทธิ์ต่อระบบประสาทของสารสกัดไก่เดื้อ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดทั้งต้นไก่เดื้อในชั้นบิวทานอลพบว่าเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์คือ rutin ซึ่งเคยมีรายงานว่า เป็นสารสำคัญต่อการออกฤทธิ์ด้านอาการซึมเศร้าของสมุนไพร St. John's wort (*Hypericum perforatum*) (Nöldner and Schötz, 2002) โดยที่ rutin สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่าง ๆ คือตัวรับแอลฟา 2 เอ ($K_i = 9.340 \pm 4.370$ ไมโครโมลาร์) และตัวรับแอลฟา 2บี ($K_i = 9.637 \pm 3.633$ ไมโครโมลาร์) (Butterweck et al., 2002) เมื่อให้ rutin ขนาด 50-150 นาโนโมลาร์เข้าสมองหนูขาวโดยตรง สามารถลดอาการชักในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย pentylenetetrazole ได้ (Nassiri-Asl et al., 2008) ฟลาโวนอยด์ quercetin และ rutin (หรือ quercetin 3-rutinoside) ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้องหนูขาวพบว่า สามารถไปเพิ่มความจำให้กับหนูขาวที่ถูกทำให้ขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (cerebral ischemia) (Pu et al., 2007)

เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดใบน้อยหน่าและทั้งต้นโกโก้จะพบสารบริสุทธิ์ β -sitosterol glucoside ด้วยเสมอ จากผลการทดสอบที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ประมาณ 10% (CAR3 ในรูปที่ 2-3) ในขณะที่สารสกัดใบกะทกรกพบสารผสมระหว่าง β -sitosterol glycoside กับ stigmasterol glycoside ซึ่งที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 น้อยกว่า 10% (PF1 ในรูปที่ 2-3) จากการทบทวนเอกสารพบว่า β -sitosterol ในขนาด 10-30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้หนูถีบจักรคลายกังวลไปได้ และเมื่อเพิ่มขนาดสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่าหนูสงบลง (Aquirre-Hernandez et al., 2007) β -sitosterol รวมทั้ง β -sitosterol glucoside ในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถระงับปวดในหนูถีบจักรได้ (Villasenor et al., 2002) นอกจากนี้ stigmasterol สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับ muscarinic (IC_{50} เท่ากับ 8.52 ไมโครโมลาร์) (Aquirre-Hernandez et al., 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชนั้นอาจนำมาใช้เป็น biomarker เสริมสำหรับการติดตามฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดใบน้อยหน่า ใบกะทกรก และทั้งต้นโกโก้ นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่า β -sitosterol ทำหน้าที่เป็นระบบนำส่งสารสำคัญที่ช่วยในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (Nakamura et al., 2002) คล้ายคลึงระบบนำส่งของ liposome จากกรอบแนวคิดของหลักการที่ว่า "สมุนไพรรชนิดหนึ่งอาจมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้มากกว่าหนึ่งชนิด โดยสารสำคัญเหล่านี้อาจเสริมฤทธิ์ร่วมกันแบบ additive หรือแบบ synergistic ก็เป็นไปได้"

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากสารสกัดสมุนไพร 52 ชนิดนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ตัวรับโดปามีน 2 ตัวรับเซโรโทนิน 1 ตัวรับเซโรโทนิน 2 และตัวรับแอลฟา 1 ในสมองหนูขาวด้วยเทคนิค radioligand receptor binding ได้คัดกรองมาเพียง 3 ชนิดคือ สารสกัดใบน้อยหน้า ใบกะทกรก และทั้งต้นไถ่เตี้ย บนหลักเกณฑ์ที่ว่าสารสกัดเหล่านี้ในขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้มากกว่า 50% จากนั้นนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายมีขั้วแตกต่างกันและทำ bioactivity-guided fractionation พบว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้ดีที่สุดจึงสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อนำมาเป็น chemical marker หรือ biomarker สำหรับควบคุมคุณภาพหรือติดตามฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัด สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบกะทกรกได้แก่ ฟลาโวนอยด์ chrysoeriol, acacetin และ PF4 โดย PF4 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ได้เท่ากับ $51.5 \pm 2.4\%$ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเป็น biomarker ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาสูตรโครงสร้าง สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากทั้งต้นไถ่เตี้ยได้แก่ β -sitosterol glucoside, epi-inositol-6-O-methyl ether, rutin และ canarosine โดย canarosine สามารถยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.4 ± 5.8 ไมโครโมลาร์ ซึ่งอาจนำมาเป็น biomarker ของสารสกัดไถ่เตี้ย สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบน้อยหน้า lanuginosine, β -sitosterol glucoside และ acetogenin แต่พบความเป็นพิษสูงมากในสัตว์ทดลอง จากข้อมูลดังกล่าว นำมาเรียงลำดับความสำคัญของสมุนไพรในการศึกษาของแผนงานวิจัยจากมากไปน้อยเป็นดังนี้คือ ใบกะทกรก ทั้งต้นไถ่เตี้ย และใบน้อยหน้าไว้ท้ายสุด ส่งไปยังโครงการย่อยอื่นในแผนงานวิจัยเพื่อศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสมอง การศึกษาฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไป การประเมินความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง และการพัฒนายาเตรียมต้นแบบ

การทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารเสพติดด้วยเทคนิค radioligand receptor binding ซึ่งต้องใช้สารรังสีถึงแม้จะมีความไวสูงก็ตามแต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติการสารรังสี การดำเนินการห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายในเรื่องความปลอดภัยในการใช้สารรังสี จึงไม่เหมาะกับการให้บริการแก่นักวิจัยทั้งภาครัฐ ภาคเอกชนได้อีกต่อไป จึงมีข้อเสนอแนะให้ใช้เทคนิคอื่นเช่น เทคนิคพันธุวิศวกรรมสอดแทรกยีนตัวรับของมนุษย์เข้าในเซลล์ที่เหมาะสม และติดตามตัวรับบนผิวเซลล์ด้วยสารเรืองแสงที่จำเพาะในเทคนิค immunofluorescence ถึงแม้ว่าจะตอบคำถามไม่ได้โดยตรง อีกทั้งมีความไวน้อยกว่าการใช้สารรังสี แต่มีความปลอดภัยกว่า ราคาถูกกว่า และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Soto-Hernández, M., Martínez, A.L., Moreno, J., and González-Trujano, M.E. 2007. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. mexicana. *Planta Med.* 73(11): 1148-1155.
- Barauna, S.C., Kaster, M.P., Heckert, B.T., do Nascimento, K.S., Rossi, F.M., Teixeira, E.H., Cavada, B.S., Rodrigues, A.L., and Leal, R.B. 2006. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85(1): 160-169.
- Bezerra, G.A., Oliveira, T.M., Moreno, F.B., de Souza, E.P., da Rocha, B.A., Benevides, R.G., Delatorre, P., de Azevedo, W.F.Jr., and Cavada, B.S. 2007. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: new insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. *J. Struct. Biol.* 160(2):168-176.
- Bishnoi, M., Chopra, K., and Kulkarni, S.K. 2008. Protective effect of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88(4): 511-522.
- Butterweck, V., Nahrstedt, A., Evans, J., Hufeisen, S., Rauser, L., Savage, J., Popadak, B., Ernsberger, P., and Roth, B.L. 2002. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology (Berl)*. 162(2): 193-202.
- Capros-Lefebvre, D., and Elbaz, A. 1999. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Lancet* 354: 281-286.
- Carlini, E.A. 2003. Plants and the central nervous system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75(3): 501-512.
- Carlini, C.R., Gomes, C., Guimarães, J.A., Markus, R.P., Sato, H., and Trolin, G. 1984. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. 54(3): 161-166.
- Choi, D.Y., Lee, J.Y., Kim, M.R., Woo, E.R., Kim, Y.G., and Kang, K.W. 2005. Chrysoeriol potently inhibits the induction of nitric oxide synthase by blocking AP-1 activation. *J. Biomed. Sci.* 12(6): 949-959.

- Corbin, A.E., Meltzer, L.T., Ninteman, F.W., Wiley, J.N., Christoffersen, C.L., Wustrow, D.J., Wise, L.D., Pugsley, T.A., and Heffner, T.G. 2000. PD 158771, a potential antipsychotic agent with D2/D3 partial agonist and 5-HT1A agonist actions. II. Preclinical behavioral effects. *Neuropharmacology* 39: 1211-1221.
- Dasananjali, T. 1999. Substance abuse treatment implications derived from routine statistical reports. *Southeast Asian J.Trop.Med. Public Health* 30: 314-318.
- Dhawan, K., Dhawan, S., and Chhabra, S. 2003. Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(2): 215-222.
- Dhawan, K., Kumar, S., and Sharma, A. 2001a. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J. Ethnopharmacol.* 78(2-3): 165-170.
- Dhawan, K., Kumar, S., and Sharma, A. 2001b. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia.* 72(6): 698-702.
- Dhawan, K., Kumar, S., and Sharma, A. 2002. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *J. Ethnopharmacol.* 81(2): 239-244.
- Dolphin, A.C., JENNER, P. and Marsden, C.D. 1976. The relative importance of dopamine and noradrenaline receptor stimulation for the restoration of motor activity in reserpine or α -methyl-p-tyrosine pre-treated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 661-670.
- Dwoskin, L.P., and Crooks, P.A. 2002. A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse. *Biochem. Pharmacol.* 63(2): 89-98.
- Efange, S.M.N., Mash, D.C., Khare, A.B., and Ouyang, Q. 1998. Modified ibogaine fragments: Synthesis and preliminary pharmacological characterization of 3-ethyl-5-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydroazepino[4,5-b]benzothiophenes. *J. Med. Chem.* 41: 4486-4491.
- Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109(suppl 1): 69-75.
- Glick, S.D., and Maisonneuve, I.S. 1998. Mechanisms of antiaddictive actions of ibogaine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 844: 214-226.
- Gudelsky, G.A., and Yamamoto, B.K. 2007. Actions of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *In press.*
- Khan, A.U., and Gilani, A.H. 2006. Selective bronchodilatory effect of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) and its flavonoid, chrysoeriol. *Eur. J. Nutr.* 45(8): 463-469.

- Kojima, H., Sato, N., Hatano, A., and Ogura, I. 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29: 2351-2355.
- Lannuzel, A., Höglinger, G.U., Champy, P., Michel, P.P., Hirsch, E.C., and Ruberg, M. 2006. Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J. Neural Transm. Suppl.* (70):153-157.
- Leshner, A.I., and Koob, G.F. 1999. Drugs of abuse and the brain. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111: 99-108.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., and Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci.* 78(7): 730-737.
- Maity, T.K., Mandal, S.C., Saha, B.P., and Pal, M. 2000. Effect of *Ocimum sanctum* roots extract on swimming performance in mice. *Phytother. Res.* 14(2): 120-121.
- Mak, C.K., Avalos, M., Randall, P.K., Kwan, S.W., Abell, C.W., Neumeyer, J.L., Whisennand, R., and Wilcox, R.E. 1996. Improved models for pharmacological null experiments: calculation of drug efficacy at recombinant D1A dopamine receptors stably expressed in clonal cell lines. *Neuropharmacology* 35: 549-570.
- Martins, A.P., Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomi, F., Cañigueral, S., Casanova, J., da Cunha, A.P., and Adzet, T. 1999. Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*. *Planta Med.* 65(2): 187-189.
- Matsumoto, K., Mizowaki, M., Suchitra, T., Murakami, Y., Takayama, H., Sakai, S., Aimi, N., Watanabe, H. 1996. Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 317(1): 75-81.
- Metzger, R.R., Haughey, M., Wilkins, D.G., Gibb, J.W., Hanson, G.R., and Fleckenstein, A.E. 2000. Methamphetamine-induced rapid decrease in dopamine transporter function: role of dopamine and hyperthermia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 1077-1085.
- Millan, M.J., Gobert, A., Newman-Tancredi, A., Lejeune, F., Cussac, D., Rivet, J.M., Audinot, V., Dubuffet, T., and Lavielle, G. 2000. S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine D3 -Receptors: I. Receptorial, electrophysiological and neurochemical profile compared with GR218,231 and L741,626. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 1048-1062.

- Miller, D.K., Crooks, P.A., Teng, L., Witkin, J.M., Munzar, P., Goldberg, S.R., Acri, J.B., and Dvoskin, L.P. 2001. Lobeline inhibits the neurochemical and behavioral effects of amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 1023-1034.
- Mishra, B., Priyadarsini, K.I., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., and Mohan, H. 2003. Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg. Med. Chem.* 11(13): 2677-2685.
- Muramatsu, I., Tanaka, T., Suzuki, F., Li, Z., Hiraizumi-Hiraoka, Y., Anisuzzaman, A., Yamamoto, H., Horinouchi, T., and Morishima, S. 2005. Quantifying receptor properties: the tissue segment binding method – a powerful tool for the pharmacome analysis of native receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 98: 331–339.
- Nakamura, K., Maitani, Y., and Takayama, K. 2002. The enhancing effect of nasal absorption of FITC-dextran 4,400 by beta-sitosterol beta-D-glucoside in rabbits. *J. Control Release* 79(1-3): 147-155.
- Nassiri-Asl, M., Shariati-Rad, S., and Zamansoltani, F. 2007. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Complement Altern. Med.* 7: 26.
- Nassiri-Asl, M., Shariati-Rad, S., and Zamansoltani, F. 2008. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. In press.*
- Nöldner, M., and Schötz, K. 2002. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med.* 68(7): 577-580.
- Orsini, C., Koob, G.F., and Pulvirenti, L. 2001. Dopamine partial agonist reverses amphetamine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 789-792.
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J., and Ho, C.T. 2006. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochem. Pharmacol.* 72(10): 1293-303.
- Patilla, J.S., Dersch, C.M., Yu, H., Rice, K.C., and Rothman, R.B. 2000. Neurochemical neutralization of amphetamine-type stimulants in rat brain by the indatraline analog (-)-HY038. *Brain Res. Bull.* 53: 821-826.
- Prakash, P., and Gupta, N. 2005. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 49(2): 125-131.
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Egashira, N., Iwasaki, K., and Fujiwara, M. 2007. Neuroprotective effects of quercetin

- and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 104(4): 329-334.
- Ravindran, R., Rathinasamy, S.D., Samson, J., and Senthilvelan, M. 2005. Noise-stress-induced brain neurotransmitter changes and the effect of *Ocimum sanctum* (Linn) treatment in albino rats. *J. Pharmacol. Sci.* 98(4): 354-360.
- Ringman, J.M., Frautschy, S.A., Cole, G.M., Masterman, D.L., and Cummings, J.L. 2005. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2(2): 131-136.
- Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D.V., Rice, K.C., Carroll, F.I., and Partilla, J.S. 2001. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* 39: 32-41.
- Sakina, M.R., Dandiya, P.C., Hamdard, M.E., and Hameed, A. 1990. Preliminary psychopharmacological evaluation of *Ocimum sanctum* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* 28(2): 143-150.
- Sershen, H., Hashim, A., and Lajtha, A. 1997. Ibogaine and cocaine abuse: pharmacological interactions at dopamine and serotonin receptors. *Brain Research Bull.* 42: 161-168.
- Sevarino, K.A., Oliveto, A., and Kosten, T.R. 2000. Neurobiological adaptation to psychostimulants and opiates as a basis of treatment development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 909: 51-87.
- Shankarananth, V., Balakrishnan, N., Suresh, D., Sureshpandian, G., Edwin, E., and Sheeja, E. 2007. Analgesic activity of methanol extract of *Aegle marmelos* leaves. *Fitoterapia.* 78(3): 258-259.
- Srisurapanont, M., Jarusuraisin, N., and Jittiwutikan, J. 1999. Amphetamine withdrawal: II. A placebo-controlled, randomised, double-blind study of amineptine treatment. *Aust. N.Z. J. Psychiatry* 33: 94-98.
- Szumliński, K.K., Balogun, M.Y., Maisonneuve, I.M., and Glick, S.D. 2000. Interactions between iboga agents and methamphetamine sensitization: studies of locomotion and stereotypy in rats. *Psychopharmacology* 151: 234-241.
- Thongsaard, W., Pongsakorn, S., Sudsuang, R., Bennett, G.W., Kendall, D.A., and Marsden, C.A. 1997. Barakol, a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but not uptake in vitro. *European J. Pharmacol.* 319: 157-164.

- Villaseñor, I.M., Angelada, J., Canlas, A.P., and Echeгойen, D. 2002. Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside. *Phytother Res.* 16(5): 417-421.
- Vohora, S.B., Shah, S.A., and Dandiya, P.C. 1990. Central nervous system studies on an ethanol extract of *Acorus calamus* rhizomes. *J. Ethnopharmacol.* 28(1): 53-62.
- Wang, R., Xu, Y., Wu, H.L., Li, Y.B., Li, Y.H., Guo, J.B., and Li, X.J. 2008. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT(1) and 5-HT(2) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 578(1): 43-50.
- White, R. 2000. Dexamphetamine substitution in the treatment of amphetamine abuse: an initial investigation. *Addiction* 95: 229-238.
- Wilhelm, C.J., Johnson, R.A., Lysko, P.G., Eshleman, A.J., and Janowsky, A. 2004. Effects of methamphetamine and lobeline on vesicular monoamine and dopamine transporter-mediated dopamine release in a cotransfected model system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(3): 1142-1151.
- Xia, X., Pan, Y., Zhang, W.Y., Cheng, G., Kong, L.D. 2006. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neuroendocrine alterations in a rat chronic mild stress model. *Biol. Pharm. Bull.* 29(5): 938-944.
- Xia, X., Cheng, G., Pan, Y., Xia, Z.H., and Kong, L.D. 2007. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. *J. Ethnopharmacol.* 110(2): 356-363.
- Xu, Y., Ku, B., Cui, L., Li, X., Barish, P.A., Foster, T.C., and Ogle, W.O. 2007. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Res.* 1162: 9-18.
- Zhu, M., Bowery, N.G., Greengrass, P.M., and Philipson, J.D. 1996a. Application of radioligand receptor binding assays in the search for CNS active principles from Chinese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 54: 153-164.
- Zhu, M., Phillipson, J.D., Greengrass, P.M., and Bowery, N.G. 1996b. Chemical and biological investigation of the root bark of *Clerodendrum mandarinorum*. *Planta Med.* 62(5): 393-396.

โครงการวิจัยที่ 3

การศึกษาฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรมะนาวในสัตว์ทดลอง

Study of anti-CNS stimulant effects of herbal extracts in experimental animals

กุมภาพันธ์ 2551

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย อัญเชิญ

(Assistant Professor Dr. Surachai Unchern)

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย สุขเสวต

(Associate Professor Dr. Thongchai Sooksawate)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัสราภา ชัยกุล

(Assistant Professor Dr. Pasarapa Chaiyakul)

ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

แผนงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 – 2549

บทคัดย่อภาษาไทย

การทดสอบสมุนไพรไทยต่างๆ ด้วยแบบจำลองพฤติกรรมในสัตว์ทดลอง ซึ่งเน้นว่าสารสกัดจากกะทกรก (*Passiflora foetida*) โดยเฉพาะสารสกัดส่วน PF003 (ซึ่งเป็นส่วนที่สกัดได้ง่าย มีปริมาณสูง และมีองค์ประกอบที่ชัดเจนซึ่งทำให้ควบคุมคุณภาพได้อย่างแม่นยำ) มีศักยภาพหลายประการที่อาจนำไปใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทได้ ได้แก่ฤทธิ์ด้านซึมเศร้า คลายกังวล และลดการให้สารเสพติดกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีนแก่ตนเองอย่างชัดเจน โดยอาจมีกลไกหลักในการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบสารสื่อประสาท dopamine (DA) และ serotonin (5-HT) ในสมอง นอกจากนี้สารสกัดส่วน PF003 นี้ไม่มีผลกระทบต่ออาการเคลื่อนไหวและความจำ อย่างไรก็ตามข้อสรุปที่มีน้ำหนักชัดเจนต้องรอข้อมูลยืนยันทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาอีกหลายประเด็นเพื่อประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัย จึงจะชี้ชัดอย่างแน่นอนว่า *Passiflora foetida* เป็นสมุนไพรไทยที่มีคุณค่าต่อผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท และนำไปศึกษาทางคลินิกกับผู้ป่วยในวงกว้างต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Experimental testing of various Thai herbal medicine by animal behavioral models suggests that the extracts from *Passiflora foetida*, especially subfraction PF003 (convenient to extract in high quantity, contains chemical constituents that are feasible for accurate quality control) possesses various potential activities which are applicable to the treatment of psychostimulant addicts. These remarked activities include antidepressant and anxiolytic effects, and reduction of amphetamine self-administration, all of which may involve their actions on dopamine and serotonin neurotransmission in the brain. In addition, PF003 subfraction possesses nonsignificant effects on locomotor activity and memory function. However, the clearcut conclusion about its efficacy and safety warrants more supporting evidence from pharmacological and toxicological studies before advancing to further clinical studies in addict patients.

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ | 3-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 3-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 3-iv |
| สารบัญ | 3-v |
| สารบัญตาราง | 3-vi |
| สารบัญรูป | 3-vii |
| คำย่อที่ใช้ | 3-viii |
| บทนำ | 3-1 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 3-14 |
| ผลการวิจัย | 3-18 |
| อภิปรายและสรุปผลการวิจัย | 3-32 |
| บรรณานุกรม | 3-39 |

สารบัญญัตินำ

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | จำนวนยาเสพติดให้โทษของกลาง (ยอดคงคลัง 31 ตุลาคม 2547) เก็บรักษาไว้ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา | 3-2 |
| 2 | สถิติการจับกุมคดียาเสพติดทั่วประเทศ (พ.ศ. 2542-2546) | 3-2 |
| 3 | ผู้เข้ารับการรักษาการติดยาของประเทศไทย พ.ศ. 2545 (จำนวน 43,191 คน) | 3-2 |
| 4 | ความชอบของยาเสพติดกระตุ้นประสาทต่อ monoamine transporters | 3-6 |
| 5 | การบำบัดผู้ติดยาเสพติดตามีนและโคเคน | 3-8 |
| 6 | เป้าหมายการค้นหายาใหม่สำหรับรักษาผู้ติดยา | 3-8 |
| 7 | ผลของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรม การเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร | 3-21 |
| 8 | ผลของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมซิมเซร่า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร | 3-23 |
| 9 | ผลยับยั้งของ specific D ₁ และ 5-HT _{1A} receptor antagonist ต่อฤทธิ์ต้านซิมเซร่าของสารสกัด <i>Passiflora foetida</i> ในหนูถีบจักร | 3-25 |
| 10 | ผลของยาด้านซิมเซร่า Imipramine และ Specific D ₁ & 5-HT _{1A} receptor antagonists ต่อพฤติกรรม การเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร | 3-27 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | อิทธิพลโดยตรงและโดยอ้อมของสารเสพติดต่อการสื่อสัญญาณประสาท dopamine ในสมองส่วน mesolimbic | 3-5 |
| 2 | แผนภูมิแสดงการสื่อสัญญาณประสาทที่ซัยแนปส์ของ dopaminergic neuron | 3-6 |
| 3 | การเสพติดแอมเฟตามีนและตำแหน่งออกฤทธิ์ด้านที่เป็นไปได้ของสารสกัดสมุนไพรร | 3-11 |
| 4 | ผลของสารสกัดสมุนไพรร CAR และ PF fraction ต่างๆ ต่อพฤติกรรมความซัยเมคร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร | 3-19 |
| 5 | ผลของสารสกัดสมุนไพรร CAR และ PF ต่อแบบจำลองพฤติกรรมความจำแบบต่างๆ ในหนูถีบจักร | 3-20 |
| 6 | ผลของสารสกัดสมุนไพรร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมความซัยเมคร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร | 3-22 |
| 7 | Dose dependency ของผลสารสกัดสมุนไพรร PF001 และ PF003 ต่อพฤติกรรมความซัยเมคร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร | 3-23 |
| 8 | กลไกการออกฤทธิ์ด้านซัยเมคร้าที่น่าจะเป็นของสารสกัดสมุนไพรร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมความซัยเมคร้าในหนูถีบจักร | 3-26 |
| 9 | ผลของ Diazepam (DZ; 0.5, 1.0 mg/kg) และสารสกัด <i>Passiflora foetida</i> (50 mg/kg) ต่อแบบจำลองพฤติกรรมความวิตกกังวล (Elevated plus maze) ในหนูถีบจักร | 3-28 |
| 10 | ผลของสารสกัด <i>Passiflora foetida</i> ที่ให้ทางปากต่อ Open-space swimming test ในหนูถีบจักร | 3-30 |
| 11 | ผลของสารสกัด <i>Passiflora foetida</i> (PF003) ต่อพฤติกรรมการติดยา (d-amphetamine self-administration) ในหนูขาว | 3-31 |

คำย่อที่ใช้

| | |
|-------|-------------------------------------|
| 5-HT | 5-hydroxytryptamine; serotonin |
| ACh | Acetylcholine |
| AIDS | Acquired immune-deficiency syndrome |
| AS | <i>Annona squamosa</i> |
| CAR | <i>Canavalia rosea</i> |
| CNS | Central nervous system |
| COMT | Catechol-O-methyltransferase |
| DA | Dopamine |
| DLPFC | Dorsolateral prefrontal cortex |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DR | Dorsal raphe |
| ECT | Electroconvulsive therapy |
| GABA | γ -aminobutyric acid |
| h | Hour |
| HIV | Human immune-deficiency virus |
| HP | Hippocampus |
| IP | Intraperitoneal |
| LC | Locus coeruleus |
| MAO | Monoamine oxidase |
| NA | Noradrenaline |
| NAc | Nucleus accumbens |

| | |
|-------|-----------------------------------------|
| NE | Norepinephrine |
| NSS | 0.9% Normal saline solution |
| OCD | Obsessive-compulsive disorder |
| PD | Parkinson's disease |
| PF | Passiflora foetida |
| PFC | Prefrontal cortex |
| SERT | Serotonin transporter |
| SSRIs | Selective serotonin reuptake inhibitors |
| VTA | Ventral tegmental area |

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

การใช้ยาในทางที่ผิด (Drug abuse) และการติดยา (Drug addiction) เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทยซึ่งส่งผลเสียอย่างใหญ่หลวงต่อทั้งสุขภาพและเศรษฐกิจของประชาชาติ จากแนวโน้มที่ผ่านมาจะเห็นว่าสารเสพติดซึ่งเป็นปัญหามากที่สุดคือสารเสพติดกระตุ้นประสาทกลุ่มแอมเฟตามีน (ตารางที่ 1, 2, 3) โดยมีสาเหตุของการติดยาหลายประการ ได้แก่

1. ความอยากหรืออยากลองด้วยความคึกคะนอง
2. เพื่อนชวน หรือต้องการให้เป็นที่ยอมรับจากกลุ่มเพื่อน
3. มีความเชื่อในทางที่ผิด เช่น เชื่อว่ายาสเสพติดบางชนิดอาจช่วยให้สบายใจลืมความทุกข์ หรือช่วยให้ทำงานได้มาก
4. ขาดความระมัดระวังในการใช้ยา เพราะคุณสมบัติของยาบางชนิดอาจทำให้ผู้ใช้ยาเกิดการเสพติดได้โดยไม่รู้ตัว หากใช้ยาอย่างพร่ำเพรื่อ หรือใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานโดยขาดการแนะนำจากแพทย์หรือเภสัชกร
5. สภาพแวดล้อม ถิ่นที่อยู่อาศัยมีการค้ายาเสพติด หรือมีผู้ติดยาเสพติด
6. ถูกหลอกให้ใช้ยาเสพติดโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์
7. เพื่อหนีปัญหา เมื่อมีปัญหาและไม่สามารถแก้ปัญหาให้กับตัวเองได้

อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลที่ปรากฏจะเห็นว่าปัญหาหนักที่สุดของประเทศไทยคือการเสพยาเสพติดกระตุ้นประสาท โดยเฉพาะ แอมเฟตามีน (Amphetamines) หรือ "ยาบ้า" (เดิมเรียกว่า "ยาม้า" แต่ด้วยฤทธิ์ที่ทำให้ผู้เสพคลุ้มคลั่งคล้ายคนบ้า จึงเปลี่ยนชื่อเรียกเป็น "ยาบ้า") ในยาบ้าจะมีส่วนผสมของสารเคมีที่สำคัญ คือ Methamphetamine หรือ d-Amphetamine ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางทำให้ผู้เสพเกิดความตื่นตัว ตื่นเต้นตกใจง่าย หงุดหงิดสับสน กระวนกระวายใจ นอนไม่หลับ แต่เมื่อยาหมดฤทธิ์ผู้เสพจะรู้สึกอ่อนเพลียมาก เพราะสมองและร่างกายขาดการพักผ่อน ประสาทจะล้า ทำให้การตัดสินใจช้าและผิดพลาด จนเป็นเหตุให้เกิดอุบัติเหตุร้ายแรงได้ การเสพยาบ้าเป็นระยะเวลานานจะทำให้สมองเสื่อม มีอาการประสาทหลอน หวาดระแวง คลุ้มคลั่ง อาจทำร้ายตนเองและผู้อื่นได้ ดังที่เป็นข่าวอยู่เสมอ

ตารางที่ 1: จำนวนยาเสพติดให้โทษของกลาง (ยอดคงคลัง 31 ตุลาคม 2547) เก็บรักษาไว้ที่สำนักงาน
คณะกรรมการอาหารและยา*

| ชนิดยาเสพติด | ปริมาณ (กก.) |
|---------------|---------------------|
| เมทแอมเฟตามีน | 19,966.74 |
| แอมเฟตามีน | 0.92 |
| โคเคน | 30.77 |
| เคตามีน | 7.55 + 450 มล. |
| MDMA | 66.45 |
| อีเฟดรีน | 3.66 |
| เฮโรอีน | 1,482.09 |
| โคเดอีน | 653.66 + 24.76 ลิตร |
| เมทชาโดน | 3.16 |
| กัญชา | 126.71 |
| ฝิ่น | 1,102.52 |
| กระท่อม | 0.61 |

*ข้อมูลจากกลุ่มงานควบคุมของกลางวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการ
อาหารและยา

ตารางที่ 2: สถิติการจับกุมคดียาเสพติดทั่วประเทศ (พ.ศ. 2542-2546)*

| พ.ศ. | จำนวนคดีจำแนกตามชนิดยาเสพติด** | | | | | | | | |
|------|--------------------------------|---------|------------|-------|-----------|----------|---------|-------|---------|
| | เฮโรอีน | ยาบ้า | เอ็กซ์ตาซี | ฝิ่น | กัญชาแห้ง | สารระเหย | เคตามีน | โคเคน | โคเดอีน |
| 2542 | 7,872 | 154,028 | 183 | 3,022 | 22,720 | 17,004 | 75 | 17 | 146 |
| 2543 | 4,926 | 180,287 | 374 | 2,466 | 19,890 | 13,107 | 156 | 17 | 168 |
| 2544 | 3,477 | 167,997 | 381 | 2,289 | 20,496 | 10,649 | 187 | 25 | 166 |
| 2545 | 2,350 | 149,659 | 503 | 1,942 | 14,829 | 12,981 | 214 | 48 | 550 |
| 2546 | 1,270 | 52,936 | 468 | 1,826 | 11,344 | 12,837 | 230 | 66 | 196 |

*ข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด

**ข้อมูล พ.ศ. 2546 เป็นการจับกุมคดีระหว่าง มกราคม-พฤศจิกายน

ตารางที่ 3: ผู้เข้ารับการบำบัดรักษาการติดยาของประเทศไทย พ.ศ. 2545 (จำนวน 43,191 คน)*

| ยาเสพติดที่ใช้ใน 30 วัน ก่อนบำบัดรักษา | จำนวนผู้เข้ารับการบำบัด | |
|-------------------------------------------|-------------------------|-------|
| | คน | % |
| เฮโรอีน | 10,377 | 24.51 |
| สารระเหย | 860 | 2.03 |
| ยาบ้า | 21,165 | 49.99 |
| ฝิ่น | 3,930 | 9.28 |
| กัญชา | 682 | 1.61 |
| กระท่อม | 226 | 0.53 |
| โคเคน | 7 | 0.02 |
| เมทธาโดน | 316 | 0.75 |
| มอร์ฟิน | 17 | 0.04 |
| เอ็กซ์ตาซี | 36 | 0.09 |
| เคดามีน | 8 | 0.02 |

*ข้อมูลจากสำนักพัฒนาการป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติด (สพป.)

หมายเหตุ: ส่วนหนึ่งของผู้ผ่านการบำบัดรักษาหวนกลับไปเสพยาใหม่

สารกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีน (Amphetamines)

แอมเฟตามีนมีลักษณะเป็นผงผลึก สีขาว ไม่มีกลิ่น รสขม มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (จัดเป็นยาเสพติดและวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทตามพระราชบัญญัติวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท) ในกลุ่มผู้เกี่ยวข้องหรือเสพนิยมเรียกว่า ยาบ้า ยาฆ่า ยาขยัน ยาแก้ง่วง ยาโต้ป ยาเพิ่มพลัง ฯลฯ ผงแอมเฟตามีนเมื่อนำมาผลิตเป็นเม็ดยาแล้วจะมีลักษณะแตกต่างกันหลายอย่าง เช่น เม็ดกลมแบน รูปเหลี่ยม รูปหัวใจ หรืออาจเป็นแคปซูล มีสีต่างกัน เช่น สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีกระน้ำตาล แต่ที่พบส่วนมากจะเป็นสีขาว เม็ดกลมแบน มีสัญลักษณ์บนเม็ดยา เช่น รูปหัวม้า, LONDON, 99, รูปดาว ฯลฯ ในอดีตแพทย์ใช้แอมเฟตามีนรักษาผู้ป่วยที่มีอาการซึมเศร้า โรควงเหงาหาวนอน (narcolepsy) ใช้ลดความอ้วน แต่ปัจจุบันเลิกใช้แล้วเพราะพบว่าแอมเฟตามีนกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับความจำ ความคิด ควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย การออกฤทธิ์ของแอมเฟตามีนที่เกิดขึ้นกับร่างกายผู้เสพนั้น จะมีผลมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณยา ระยะเวลาของการใช้ยา สุขภาพร่างกาย ผู้เสพและเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวยามีมากน้อยเพียงใดเป็นสำคัญ

กลุ่มผู้ใช้หรือเสพแอมเฟตามีนส่วนใหญ่ ได้แก่ กลุ่มผู้ใช้แรงงาน การเสพกระทำได้หลายวิธี เช่น การกิน แล้วดื่มน้ำหรือสุราตาม การดองไว้ในเครื่องดื่มบำรุงกำลัง การผสมในกาแฟ หรือนำมาบดแล้วนำไปลนไฟสูดดม เป็นไอระเหย แอมเฟตามีนเป็นยาเสพติดอันตรายที่ก่อให้เกิดผลเสียร้ายแรงต่อตัวผู้เสพและสังคมเป็นอย่างมาก การควบคุมหรือมาตรการลงโทษทางกฎหมาย ซึ่งเดิมควบคุมและเอาผิด

เฉพาะผู้ผลิต ผู้ค้า ผู้จำหน่ายและครอบครองเท่านั้น แต่ปัจจุบันมีการแก้ไขกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท กำหนดให้สามารถเอาผิดและลงโทษผู้ที่เสพแอมเฟตามีนได้ตามกฎหมาย

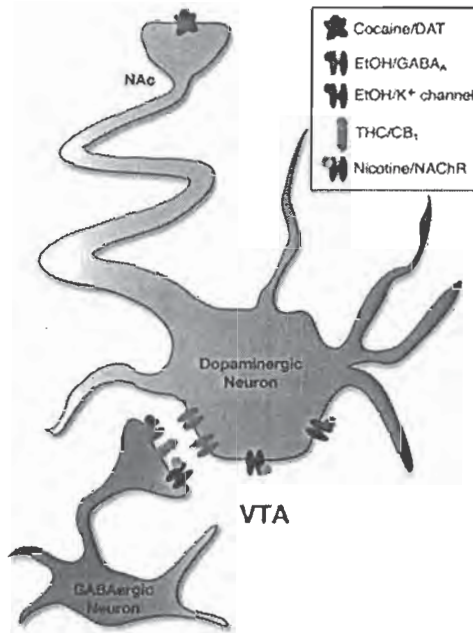
แอมเฟตามีนส่งผลกระทบต่อผู้เสพ ก่อให้เกิดอาการทั้งทางร่างกายและจิตใจ ดังต่อไปนี้

อาการทางกาย: ผู้เสพแอมเฟตามีนประมาณ 20-30 กรัมต่อวัน มีอาการเบื่ออาหาร พุดมาก ดิ้นเด่นง่าย มือสั่น คลื่นไส้ ความดันโลหิตสูง หัวใจเต้นเร็วและแรง ไม่รู้สึกง่วง เหงื่อออกมาก กลืนตัวแรง ปากและจมูกแห้ง หน้ามัน ทำงานได้นานเกินกว่าปกติ รูม่านตาเบิกกว้าง สับสนหรือจัด ท้องเสีย มีอารมณ์หงุดหงิด ฉุนเฉียวง่าย

อาการทางจิต: เนื่องจากแอมเฟตามีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและการเสพติดจะเพิ่มขนาดขึ้นเสมอ ซึ่งถ้าเสพติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้เกิดอาการทางจิต เป็นโรคหวาดระแวง วิดกกังวล มีอาการประสาทหลอน บางราย เพ้อ คลุ้มคลั่ง เห็นภาพหลอนต่างๆ นานา คล้ายคนบ้า และขณะที่เกิดอาการดังกล่าวอาจทำร้ายตนเองและผู้อื่นให้บาดเจ็บหรือเสียชีวิตได้ โดยก่ออาชญากรรม ปล้นจี้ จับตัวประกัน หรือก่ออุบัติเหตุทางรถยนต์ เป็นต้น และหากใช้แอมเฟตามีนปริมาณมาก จะทำให้ตัวซีดจนอาจเขียว มีไข้ขึ้น ใจสั่น ความดันโลหิตสูง หายใจไม่ออก มือสั่นมาก เดินโซเซ คลื่นไส้อาเจียน กล้ามเนื้อกระตุก ไม่สามารถควบคุมตนเองได้ อาจชัก หมดสติ หรือเสียชีวิตด้วยอาการของโรคหัวใจวาย หรือหลอดเลือดในสมองแตก นอกจากนี้ผู้เสพแอมเฟตามีนยังมีโอกาสเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคตับอักเสบ ไตไม่ทำงาน โรคเกี่ยวกับปอด และเป็นโรคติดเชื้ออื่นๆ ได้ง่าย

ประสาทเภสัชวิทยาของสารเสพติดกระตุ้นประสาท

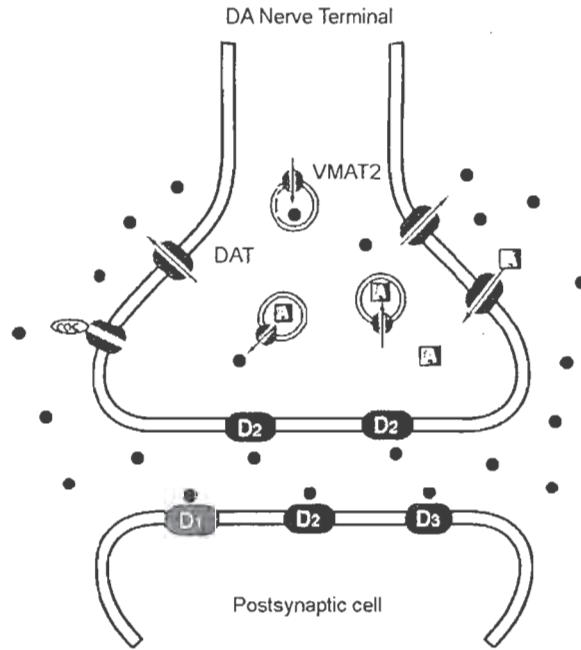
ระบบประสาท dopamine ที่สมองส่วน mesolimbic เป็นส่วนสำคัญของระบบประสาทส่วนกลางที่ควบคุมความพึงพอใจ (Reward pathway) และเป็นกระบวนการร่วมในขั้นสุดท้ายของการติดยาเสพติดต่างๆ โดยสารเสพติดส่วนใหญ่จะกระตุ้นระบบประสาทดังกล่าวโดยตรงหรือโดยอ้อม ทำให้เกิดความรู้สึกพึงพอใจและเป็นสุขซึ่งนำไปสู่การขึ้นต่อยาในที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นในทางทฤษฎี จุดรวมนี้อาจเป็นส่วนสำคัญที่สุดของกระบวนการติดยาหรือการค้นหายาต้านการติดยา



รูปที่ 1: อิทธิพลโดยตรงและโดยอ้อมของสารเสพติดต่อการสื่อสารสัญญาณประสาท dopamine ในสมองส่วน mesolimbic

สารเสพติดบางตัว เช่น โคเคน แอมเฟตามีน ยับยั้งการนำกลับของ dopamine โดย dopamine transporter (DAT) เข้าปลายประสาทที่ nucleus accumbens (NAc) สารเสพติดอื่นๆ เช่น nicotine และ ethanol เพิ่มการส่งสัญญาณของ dopaminergic neuron โดยปรับเปลี่ยนการทำงานของ receptors หรือ ion channels ที่อยู่บนเซลล์ประสาทดังกล่าว Nicotine, ethanol และ Δ^9 -THC เพิ่มการทำงานของ dopaminergic neurons ด้วยการลดการส่งสัญญาณยับยั้งของ GABAergic neuron ที่มีต่อ dopaminergic neuron ที่ ventral tegmental area (VTA).

การยุติฤทธิ์ของสารสื่อประสาทประเภท Monoamine ส่วนใหญ่เกิดโดยกระบวนการนำสารสื่อประสาทที่หลั่งออกไปแล้วกลับเข้าสู่ปลายประสาท (transporter-mediated reuptake) สารเสพติดกระตุ้นประสาทเพิ่มประสิทธิภาพการส่งสัญญาณประสาทดังกล่าวโดยขัดขวางการทำหน้าที่ขนส่งของโปรตีน transporter (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามสารเสพติดกระตุ้นประสาทแต่ละตัวมีผลแตกต่างกันในความชอบต่อโปรตีน transporter ของ dopamine, serotonin and norepinephrine เช่น โคเคนมีความชอบต่อ transporter ทั้งสามใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) ในขณะที่ amphetamine, methamphetamine และ methylphenidate มีความชอบต่อ serotonin transporter น้อยกว่าที่มีต่อ dopamine และ norepinephrine transporter นอกจากนี้สารเสพติดกระตุ้นประสาท amphetamine และ methamphetamine ยังปลดปล่อยสารสื่อประสาทออกจากปลายประสาทด้วย ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทในซัยแนปส์ได้กว่าสารเสพติดกระตุ้นประสาทอื่นๆ ที่ยับยั้งการนำกลับเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 2: แผนภูมิแสดงการสื่อสารสัญญาณประสาทที่ซัยแนปส์ของ dopaminergic neuron

ที่ปลายประสาท dopamine ถูกเก็บกักใน vesicle โดยโปรตีน VMAT2 สารสื่อ dopamine เหล่านี้เมื่อหลั่งออกสู่ซัยแนปส์จะจับกับ postsynaptic dopamine receptors ที่เซลล์เป้าหมาย ได้แก่ D₁, D₂, และ D₃ receptors นอกจากนี้ D₂ receptor ยังอยู่บนบริเวณปลายประสาทเพื่อทำหน้าที่ควบคุมการหลั่ง dopamine เชนยอนกลับ โปรตีนซึ่งเป็น dopamine transporter (DAT) อยู่ทางด้านปลายประสาทเช่นกันและทำหน้าที่ยุติฤทธิ์ของ dopamine ด้วยการนำกลับ สารเสพติดกระตุ้นประสาทออกฤทธิ์ต่อ DAT และเปลี่ยนแปลงการตอบสนองพื้นฐานของ dopamine receptor ตัวอย่าง เช่น สารเสพติด cocaine ยับยั้ง dopamine transporter และขัดขวางการนำ dopamine กลับสู่ปลายประสาททำให้เกิดผลในซัยแนปส์ได้ยาวนานขึ้น ส่วนสารเสพติด amphetamine นอกจากยับยั้ง dopamine transporter และขัดขวางการนำกลับของ dopamine uptake แล้วยังปลดปล่อย dopamine ออกจาก vesicle ในปลายประสาทอีกด้วย

A = amphetamine; COC = cocaine; DAT = dopamine transporter; VMAT2 = vesicular monoamine transporter 2

ตารางที่ 4: ความชอบของยาเสพติดกระตุ้นประสาทต่อ monoamine transporters

| ยา | Dopamine | Serotonin | Norepinephrine |
|---------------------|------------------|--------------------|------------------|
| (-) Cocaine | 478 ^a | 304 ^a | 779 ^b |
| (+) Amphetamine | 34 ^b | 3,830 ^b | 39 ^b |
| (+) Methamphetamine | 114 ^b | 2,137 ^b | 48 ^b |
| (±) Methylphenidate | 82 ^a | 7,600 ^a | 440 ^a |

^a IC₅₀ (nM); ^b Ki (nM)

การแก้ปัญหาเรื่องยาเสพติดโดยเฉพาะสารกระตุ้นประสาท กระทำได้หลายประการ อย่างหนึ่ง คือ การบำบัดรักษาผู้ติดยาเสพติด ซึ่งใช้วิธีการรักษาต่างๆ ได้แก่

1. การรักษาทางพฤติกรรม (จิตสังคม)
2. การรักษาด้วยยา
3. การรักษาแบบผสมผสาน ระหว่างการรักษาทางพฤติกรรมและการรักษาด้วยยา

ทั้งนี้ การบำบัดรักษาผู้ติดยาเสพติดดังกล่าวกระทำได้หลายมาตรการ ดังต่อไปนี้

1. ระบบสมัครใจ ผู้ติดยาเสพติดสมัครใจเข้ารับการบำบัดรักษาในสถานพยาบาลต่างๆ ซึ่งดำเนินการรักษาทั้งระบบแพทย์แผนปัจจุบัน และแผนโบราณ
2. ระบบต้องโทษ ผู้ติดยาเสพติดกระทำความผิดและถูกคุมขัง ต้องเข้ารับการบำบัดรักษา ภายใต้กฎหมายบังคับของกฎหมาย เช่น ทัศนสถานบำบัดพิเศษต่างๆ ของกรมราชทัณฑ์ กระทรวงมหาดไทย กรมคุมประพฤติ และสถานพินิจและคุ้มครองเด็กและเยาวชน สังกัดศาลเยาวชนและครอบครัวกลาง กระทรวงยุติธรรม
3. ระบบบังคับ การใช้กฎหมายบังคับให้ผู้ติดยาเสพติดเข้ารับการบำบัดรักษา ในศูนย์ฟื้นฟูสมรรถภาพที่จัดตั้งขึ้น ตามพระราชบัญญัติฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด พ.ศ. 2534

โดยทั่วไป ขั้นตอนการบำบัดรักษาผู้ติดยาเสพติด แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. *ขั้นเตรียมการ (Pre-Admission):* เป็นการศึกษาประวัติข้อมูล และภูมิหลังผู้ติดยาเสพติด ทั้งจากผู้ขอรับการรักษาและครอบครัว เพื่อซักจงให้คำแนะนำ และกระตุ้นให้ผู้ติดยาเสพติด มีความตั้งใจในการรักษา กระทำโดยการสัมภาษณ์ การลงทะเบียนและวิธีการทางการแพทย์ ได้แก่ การตรวจร่างกาย เอกซเรย์ ตรวจเลือด ตรวจปัสสาวะ ชั่งน้ำหนัก
2. *ขั้นถอนพิษยา (Detoxification):* เป็นการบำบัดอาการทางกาย ที่เกิดจากการใช้ยาเสพติด ซึ่งกระทำโดยการให้ยาชนิดอื่นทดแทน เช่น เมธาโดน ยาสมุนไพรหรือให้เลิกเสพทันทีที่เรียกว่า หักดิบ แบ่งเป็นการถอนพิษแบบผู้ป่วยนอก คือ ไม่ต้องค้างคืนในสถานพยาบาล แต่ต้องรับประทานยาตามเวลาที่กำหนด และแบบผู้ป่วยใน คือ การค้างคืนในสถานพยาบาล ซึ่งนอกจากจะถอนพิษยาแล้ว ยังมีการรักษาโรคแทรกซ้อนต่างๆ รวมทั้งการให้ความรู้ด้วย เช่น การดูแลสุขภาพ การป้องกันโรค เป็นต้น
3. *ขั้นตอนการฟื้นฟูสมรรถภาพ (Rehabilitation):* เป็นการปรับสภาพร่างกายและจิตใจ ของผู้เลิกยาให้มีความเข้มแข็ง ปรับเปลี่ยนบุคลิกภาพและพฤติกรรม ให้สามารถกลับคืนสู่สังคมได้อย่างปกติ โดยการใช้กิจกรรมต่างๆ ได้แก่ การให้คำแนะนำปรึกษา ทั้งเป็นรายบุคคลและเป็นกลุ่ม การอบรมธรรมะ การสหนาการ การฝึกอาชีพ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีรูปแบบอื่นๆ เช่น การฟื้นฟูสมรรถภาพแบบ "ชุมชนบำบัด" ซึ่งเป็นการสร้างชุมชน หรือสังคมจำลองให้ผู้เลิกยาเสพติดมาอยู่ร่วมกัน เพื่อให้การช่วยเหลือกันเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม ฝึกความรับผิดชอบการรู้จักตนเอง และแก้ไขปัญหาอย่างเหมาะสม เพื่อกลับไปดำรงชีวิตอยู่ในสังคมได้

อย่างปกติ และการฟื้นฟูจิตใจ โดยใช้หลักศาสนา ได้แก่ การนำผู้เลิกยาเสพติดเข้ารับการอุปสมถ การศึกษาหลักธรรมทางศาสนา เป็นต้น

4. **ขั้นการติดตามดูแล (After-Care):** เป็นการติดตามดูแลผู้เลิกยาเสพติดที่ผ่านการบำบัดรักษา ทั้ง 3 ขั้นตอน เพื่อให้คำแนะนำปรึกษา ให้กำลังใจ ทั้งนี้เพื่อมิให้หวนกลับไปเสพยาซ้ำอีก โดยวิธีการเยี่ยมเยียน โทรศัพท์ นัดพบ ใช้แบบสอบถามและการตรวจปัสสาวะหาสารเสพติด

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันการบำบัดรักษาผู้ติดสารเสพติดโดยเฉพาะสารกระตุ้นประสาทยังได้ประสิทธิผลต่ำ (ตารางที่ 5) สาเหตุสำคัญเนื่องจากขาดยาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการพัฒนายาดังกล่าว (ตารางที่ 6) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ได้จากผลิตผลธรรมชาติ เช่น สมุนไพรของไทย

ตารางที่ 5: การบำบัดผู้ติดแอมเฟตามีนและโคเคน

เป้าหมายการบำบัด

- บรรเทาอาการขาดยา (withdrawal symptoms)
- บรรเทาอาการอยากยา (craving)
- ยับยั้งการออกฤทธิ์ของแอมเฟตามีนและโคเคน
- ด้านผลที่เกิดจากแอมเฟตามีนและโคเคน

มีการทดลองใช้ยาหลายตัว ส่วนใหญ่ไม่ได้ผล

- ยาต้านซึมเศร้า desipramine และ bupropion ใช้ได้ผลบ้าง
- เสริมด้วย psychosocial support อย่างเหมาะสม
- หากได้ผล ต้องบำบัดติดต่อกัน 3-6 เดือน

ตารางที่ 6: เป้าหมายการค้นหายาใหม่สำหรับรักษาผู้ติดยา

- ยาซึ่งยับยั้งกลไกการทำงานของสารเสพติดในระดับเซลล์หรือโมเลกุล
- ยาซึ่งยับยั้งผลของสารเสพติดที่สร้างความสุขให้แก่ผู้เสพ
- ยาซึ่งบรรเทาอาการขาดยา (withdrawal symptoms)
- ยาซึ่งขจัดความอยากยา (drug-craving) และพฤติกรรมแสวงหายา (drug-seeking behavior)
- ยาซึ่งป้องกันการหวนกลับมาเสพใหม่ (stress-induced relapse)

มีสมุนไพรไทยจำนวนมากไม่น้อยที่ระบุไว้ในตำรายาพื้นบ้านว่ามีสรรพคุณรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ด้านซึมเศร้า (antidepressant) คลายกังวล (anxiolytic) ด้านชัก (anticonvulsant) และสงบระงับ (sedative) ซึ่งอาจนำสมุนไพรดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดผู้ติดสารเสพติดได้ ดังนั้นแผนงานวิจัย “การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท” จึงอาศัยข้อมูลในตำรายาพื้นบ้านของไทย โดยอ้างอิงจากตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรมของกองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข คัดเลือกสมุนไพรที่น่าจะมีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับประสาทส่วนกลางสมุนไพรไทยทั้งหมด 51 ชนิด นำมาสกัดเป็นชั้นต้น เพื่อส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมุ่งเน้นหาสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางที่มีฤทธิ์ต่อระบบสารสื่อโดปามีน นอร์อิพิเนเฟริน และเซโรโทนิน โดยทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการแย่งจับกับตัวรับโดปามีน D₁, D₂, D₃ receptors ตัวรับนอร์อิพิเนเฟริน α_1 receptor หรือตัวรับเซโรโทนิน 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} receptors ซึ่งข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสมุนไพรและการหา fraction ที่มีฤทธิ์มากที่สุดเพื่อทำการสกัดหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (bioassay-guided fractionation) ตลอดจนควบคุมคุณภาพของสารสกัดดังกล่าว

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการเสพติดเป็นพฤติกรรมการใช้สารซึ่งเป็นผลจากการทำงานอย่างสลับซับซ้อนของเซลล์และโมเลกุลในระบบต่างๆ ของร่างกายสัตว์หรือมนุษย์ ไม่สามารถจำลองอย่างสมบูรณ์ด้วยระบบเซลล์หรือเนื้อเยื่อนอกร่างกาย ทำให้การศึกษาในห้องปฏิบัติการอาจไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าสารสกัดสมุนไพรจะมีฤทธิ์ด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทได้จริง ดังนั้นจึงใช้แบบจำลองพฤติกรรมด้านต่างๆ ของสัตว์ทดลองเป็นเครื่องมือทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพร เพื่อให้สามารถการประเมินผลการทดลองถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เช่น พฤติกรรมเคลื่อนไหว ภาวะซึมเศร้า ภาวะวิตกกังวล ภาวะการเรียนรู้และการเกิดความจำ เป็นต้น

ในแง่การเสพติดยา จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับสารกระตุ้นประสาทซ้ำบ่อยครั้งจะเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมากและยาวนานเมื่อตกอยู่ในสภาพแวดล้อมใหม่ (Piazza and Le Moal, 1989; Bardo et al. 1996) ตลอดจนตอบสนองต่อสารกระตุ้นประสาทในครั้งต่อมามากกว่าการตอบสนองในครั้งแรก (Piazza and Le Moal, 1989) การตอบสนองเช่นนั้นมีส่วนเกิดจากการใช้สารกระตุ้นประสาทอย่างต่อเนื่องซึ่งชักนำให้การตอบสนองทางพฤติกรรมต่อสารนั้นอ่อนไหวและทวีความรุนแรงขึ้น โดยที่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจมีบทบาทในพยาธิสรีรวิทยาของการเสพติดสารกระตุ้นประสาท การศึกษาที่ผ่านมาส่วนมากซึ่งทดสอบความอ่อนไหวของพฤติกรรมจะใช้การเคลื่อนที่ (locomotor activity) เป็นตัวชี้วัด แต่การทดสอบเพียงเท่านี้จะมองข้ามคุณสมบัติด้านอื่นของสารกระตุ้นประสาท เช่น ประสิทธิภาพการส่งแรงผลักดันและเพิ่มคุณค่าของความพึงพอใจ (Robinson and Berridge 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารกระตุ้นประสาทซ้ำหลายครั้งเพิ่มความต้องการใช้สารนั้นด้วยตนเอง (Piazza et al. 1990) และเพิ่มประสิทธิภาพการส่งแรงผลักดันของสารกระตุ้นประสาทดังกล่าวในช่วงที่เกิดการเสพติด (Mendrek et al. 1998)

ขณะที่คุณสมบัติเหล่านี้มีส่วนทำให้เกิดการใช้สารกระตุ้นประสาทด้วยตนเอง แต่ยังมีข้อมูลน้อยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของคุณสมบัติดังกล่าวกับลักษณะสำคัญอื่นๆ ของการเสพติด เช่น ความโน้มเอียงหรือความเปราะบางต่อการหวนมาเสพสารกระตุ้นประสาทใหม่ระหว่างช่วงหยุดเสพระยะยาว ซึ่งความ

โน้มเอียงต่อการหวนมาเสฟใหม่สามารถศึกษาในสัตว์ทดลองได้เช่นกัน (Self 1998; Self and Nestler 1998) โดยแบบจำลองการติดยาในสัตว์เหล่านี้อาจจะทอนรูปแบบที่เป็นไปได้ของภาวะอยากยาในผู้เสฟติด เนื่องจากปัจจัยจากสภาพแวดล้อมและปัจจัยจากสารกระตุ้นประสาทในลักษณะเดียวกัน ทำให้พฤติกรรมแสวงหายาและการอยากยาในมนุษย์เกิดขึ้น (Robbins et al. 1997) นอกจากนั้นแบบจำลองดังกล่าวอาจเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมกับการทดสอบสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ระงับการอยากยา เพื่อนำไปใช้รักษาการเสฟติด (Fuchs et al. 1998) ต่อไป

เป็นที่เชื่อกันว่าการเสฟติดแอมเฟตามีนเป็นผลจากการหลั่ง dopamine เพิ่มขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง (Wise, 1996) การศึกษาในระยะหลังให้แนวความคิดว่า dopamine ในสมองส่วน mesolimbic มีบทบาทสำคัญต่อแรงผลักดันทางจิตใจหรือการเกิดความสุขใจ โดยสารสื่อประสาท dopamine ทำหน้าที่เชื่อมโยงสิ่งเร้าจากภายนอกกับการเกิดความรู้สึกพึงพอใจ (Di Chiara, 1999) การกระตุ้นระบบประสาท dopaminergic ช่วยให้สัตว์และมนุษย์เรียนรู้ที่จะจดจำประสบการณ์ซึ่งเชื่อมโยงกับความสุขตามธรรมชาติ หรือจากการใช้สารเสฟติด และมีบทบาทสำคัญในการหล่อหลอมพฤติกรรมอันเกิดจากความสุขใจหรือการใช้สารกระตุ้นประสาท ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงระยะยาวอันเกิดจากการปรับตัวของระบบประสาท dopaminergic ในสมองส่วน mesolimbic อาจมีส่วนสร้างพฤติกรรมแสวงหาสารกระตุ้นประสาทและการหวนมาเสฟสารดังกล่าวใหม่ (Spanagel and Weiss, 1999) นอกจากนั้นมีการศึกษาที่ชี้แนะบทบาทของสารสื่อประสาทอื่นๆ ในกระบวนการเสฟติดด้วย เช่น norepinephrine, serotonin, acetylcholine และ glutamate ด้วยเหตุนี้การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อระบบสารสื่อประสาท dopamine และสารสื่อประสาทอื่นที่เกี่ยวข้อง จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการอธิบายกลไกเบื้องต้นของพฤติกรรมที่เกิดขึ้นในแบบจำลองการติดยาในสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. คัดกรองสารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพบำบัดผู้ติดสารกระตุ้นประสาท ด้วยแบบจำลองพฤติกรรมในสัตว์ (Animal behavioral models)
 - ผลต่อการผลต่อการเคลื่อนไหว : Locomotor activity
 - ผลด้านภาวะซึมเศร้า : Open-space swimming
 - ผลด้านภาวะวิตกกังวล : Elevated plus maze
 - ผลต่อการเรียนรู้และความจำ : Y-maze & Morris water maze
2. ทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรจากข้อ 1 ต่อการติดสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง
 - โมเดลเชิงพฤติกรรมการติดยาในหนูขาว (Self-administration model)
3. คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการต้านการเสฟติดสารกระตุ้นประสาท เพื่อศึกษาต่อในด้านเภสัชวิทยาทั่วไป พิษวิทยา การซึมผ่านทางเดินอาหารและผ่านเข้าสู่สมอง และการพัฒนาเตรียมต้นแบบ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

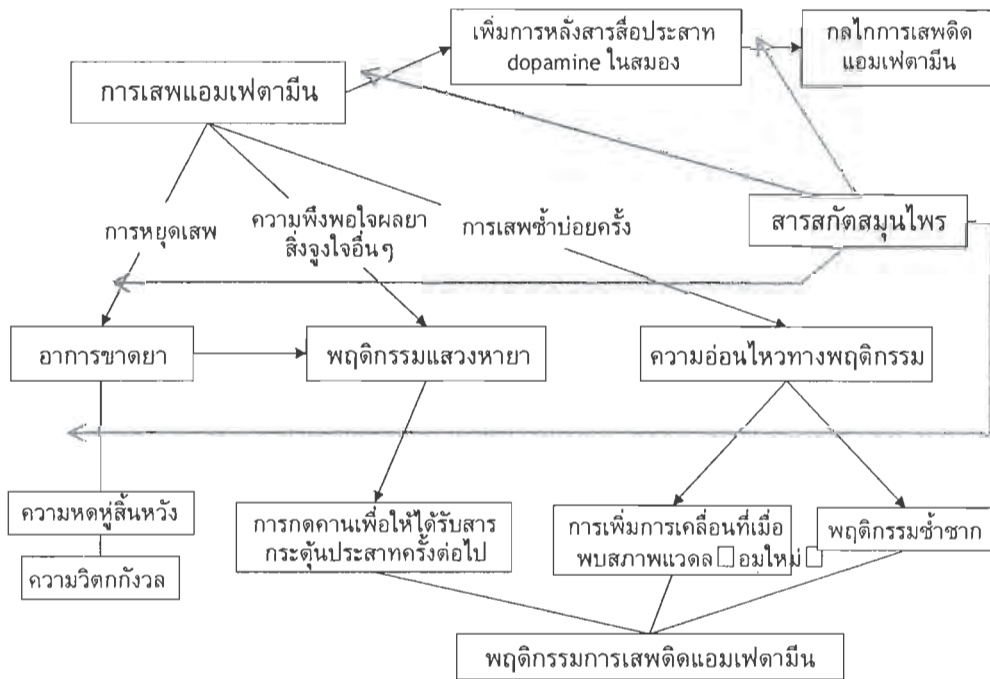
การวิจัยโครงการนี้เป็นงานที่ศึกษาในร่างกายสัตว์ทดลอง เพื่อหาแนวทางพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บำบัดผู้เสฟติดสารกระตุ้นประสาท มีขอบเขตของการวิจัยอยู่ที่การศึกษาสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพสูง โดยทดสอบกับแบบจำลอง

การเสพติดแอมเฟตามีนในสัตว์ทดลอง และการหาขนาดใช้ของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมต่อการต้านการเสพติดแอมเฟตามีนในสัตว์ทดลองดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

เป็นการวิจัยชนิดทดลอง (Experimental research) โดยมีกลุ่มควบคุม

แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



รูปที่ 3: การเสพติดแอมเฟตามีนและตำแหน่งออกฤทธิ์ด้านที่เป็นไปได้ของสารสกัดสมุนไพร

การศึกษาด้วยแบบจำลองการเสพติดในสัตว์ทดลอง พฤติกรรมแสวงหายาของหนูขาวแสดงให้เห็นจากความรุนแรงและความต่อเนื่องของการกวดขันเพื่อให้ได้สารกระตุ้นประสาทอีกครั้งหลังจากที่ได้รับครั้งก่อนไปแล้ว ดังนั้นการวัดความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการระงับหรือบรรเทาพฤติกรรมแสวงหายาดังกล่าวทั้งในสภาพปกติและสภาพที่มีสิ่งจูงใจอื่นๆ เช่น การให้สารกระตุ้นประสาทขนาดต่ำอีกครั้ง (De Wit and Stewart 1981) การดกอยู่ในสภาพซึ่งเชื่อมโยงกับการได้รับสารกระตุ้นประสาท (De Wit and Stewart 1981; Meil and See 1997; Fuchs et al. 1998) หรือภายหลังการเกิดความเครียดจากการช็อคเท้าด้วยไฟฟ้าเป็นระยะ (Ahmed and Koob 1997) จึงเป็นแนวทางทดสอบฤทธิ์ด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในสภาพซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมของผู้เสพติด สำหรับการศึกษาในโครงการวิจัยนี้จะทดสอบสารสกัดสมุนไพรว่ามีผลลดพฤติกรรมแสวงหายาในหนูขาวที่ได้รับแอมเฟตามีนซ้ำบ่อยครั้งได้หรือไม่

แอมเฟตามีนเป็นสารกระตุ้นจิตประสาทที่มีฤทธิ์แรงและทำให้เกิดการเสพติดได้ในหนูขาว การให้แอมเฟตามีนแบบเฉียบพลันทำให้หนูขาวมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ส่วนการให้แอมเฟตามีนซ้ำหลายครั้ง

ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม เช่น การขึ้นต่อยา (Drug dependence) พฤติกรรมแสวงหา และ การเปลี่ยนแปลงความอ่อนไหวทางพฤติกรรมต่อฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาท อย่างไรก็ตาม หลังจากได้รับสารกระตุ้นประสาทซ้ำหลายครั้งอย่างต่อเนื่อง เมื่อหยุดเสพจะเกิดอาการขาดยาซึ่งเป็นปัจจัยผลักดันให้แสวงหาเสพต่อไป เช่น การเกิดความหุดหู่สิ้นหวังและความวิตกกังวล ซึ่งสิ่งต่างๆ เหล่านี้สามารถศึกษาได้ในสัตว์ทดลอง ดังนั้นการทดสอบเบื้องต้นว่าสารสกัดสมุนไพรมีผลด้านความหุดหู่สิ้นหวังหรือลดความวิตกกังวลได้หรือไม่ จึงเป็นสิ่งชี้แนะถึงโอกาสการนำไปใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท และคัดกรองสารสกัดที่มีศักยภาพให้เหลือจำนวนน้อยลงต่อการทดสอบผลต่อพฤติกรรมการเสพติดยาในอันดับต่อไป

ปัจจุบันมีการศึกษากลไกระดับเซลล์และโมเลกุลของการตอบสนองทางพฤติกรรมต่อแอมเฟตามีนในโมเดลสัตว์ทดลอง (Melichar et al, 2001) กลไกทางประสาทชีววิทยาของการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมที่เกิดจากสารกระตุ้นประสาทอาจเกี่ยวข้องกับระบบประสาท dopamine ในทางประสาท mesolimbic ซึ่งส่งจากสมองส่วน ventral tegmental area บริเวณ midbrain ไปยังสมองส่วน nucleus accumbens (Di Chiara, 1999) แอมเฟตามีนเพิ่มระดับ dopamine ในซัยแนปส์และส่งเสริมการสื่อสัญญาณประสาท dopamine ใน nucleus accumbens แอมเฟตามีนออกฤทธิ์ยับยั้งการนำ dopamine กลับปลายประสาทด้วยการจับกับ dopamine transporter และเพิ่มการหลั่ง dopamine จากปลายประสาท นอกจากนี้แอมเฟตามีนยังชักนำการแสดงออกของ c-fos gene ที่บริเวณ striatum อีกด้วย

คาดว่า Dopamine D₁ receptors มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดผลเฉียบพลันและเรื้อรังของสารกระตุ้นประสาทในหนูขาว (Spanagel and Weiss, 1999) การศึกษาทางเภสัชวิทยาต่างๆ ชี้ให้เห็นว่า D₁ receptor agonists และ antagonists มีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อแอมเฟตามีนทางด้านการเคลื่อนไหวและพฤติกรรมซ้ำซาก การให้แอมเฟตามีนแก่ตัวเอง และการเลือกสภาพแวดล้อมซึ่งเชื่อมโยงกับแอมเฟตามีน นอกจากนั้น D₁ receptor antagonists สามารถป้องกันหรือทุเลาการเกิดความอ่อนไหวเชิงพฤติกรรมต่อสารกระตุ้นประสาท การให้แอมเฟตามีนซ้ำบ่อยครั้งทำให้ความไวของ D₁ receptor เพิ่มขึ้นอย่างมั่นคงในสมองส่วน nucleus accumbens ของหนูขาว ดังนั้นการใช้ D₁ receptor antagonists หรือสารที่มีผลต่อฤทธิ์ของแอมเฟตามีน ณ บริเวณสมองที่เกี่ยวข้องกับทางประสาท dopamine จึงเป็นแนวทางที่จะอธิบายพื้นฐานการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรได้

นอกจากนั้นในระยะหลังมีข้อมูลหลายด้านที่ชี้แนะว่า 5-HT receptor โดยเฉพาะ 5-HT_{1A} receptor มีบทบาทสำคัญในกระบวนการติดยาเช่นกัน (Careya et al, 2005; Mello et al, 2005; Müller et al, 2007) ด้วยเหตุนี้การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจึงเน้นที่ระบบสารสื่อประสาท dopamine และ serotonin เป็นหลัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาท เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท
2. ได้ข้อมูลประกอบผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้กำหนดเกณฑ์พิจารณาเบื้องต้นสำหรับคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรต่างๆ มาศึกษาในชุดโครงการวิจัยได้อย่างแม่นยำ
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยขยายองค์ความรู้เรื่องพยาธิสรีรวิทยาของการเสพติดและการขาดยาในปัจจุบัน
4. ได้ระบบทดสอบในสัตว์ทดลองที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวิจัยและพัฒนาายาด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาท

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง:

หนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ Swiss albino อายุ 2 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม ณ ตอนเริ่มต้นการทดลอง และหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ณ ตอนเริ่มต้นการทดลอง (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา นครปฐม) หนูเหล่านี้จะถูกเลี้ยงอยู่ในกรงโลหะปลอดสนิม (10 ตัวต่อกรงใหญ่สำหรับหนูถีบจักร และ 1 ตัวต่อกรงสำหรับหนูขาว) ซึ่งมีซีลี้อยเป็นวัสดุรองนอนในห้องพักเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุม (อุณหภูมิห้อง 25 ± 1 °C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60% และช่วงมีแสงสว่างนาน 12 ชั่วโมง นับตั้งแต่ 6.00 น.) โดยได้รับอาหารหนูสำเร็จรูป (บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด กรุงเทพ) และน้ำประปาสำหรับดื่มเท่าที่ต้องการตลอดเวลา (ยกเว้นขณะทำการทดลองเกี่ยวกับพฤติกรรม) สัตว์ทดลองถูกพักเลี้ยงในสภาพดังกล่าวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปรับตัวจนชินกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มการทดลอง การทดสอบเชิงพฤติกรรมกระทำระหว่างช่วง 9.00 น. – 18.00 น. โดยนำสัตว์ทดลองซึ่งทำการสุ่มแบ่งกลุ่มไว้แล้วไปพักในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทดลอง การทดลองกับสัตว์ทุกกรณีจะปฏิบัติให้สอดคล้องจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองในการวิจัยซึ่งกำหนดโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สารทดสอบ:

สารสกัด *Passiflora foetida* L. fraction และ sub-fractions ต่างๆ (PF001, PF003, PF002-1, PF002-2, PF002-3, PF002-4, PF002-5, PF002-6, PF002-7, PF003-1, PF003-2, PF003-3, PF003-4 and PF003-5) จากโครงการวิจัย “การสกัดแยกสารจากสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท” และโครงการวิจัย “การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาท”

เครื่องมือและอุปกรณ์:

- อุปกรณ์สำหรับวัดการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองขนาดเล็ก ควบคุมการวัดและบันทึกผลด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์: Activity cage
- อุปกรณ์สำหรับวัดความหุดหู่สิ้นหวัง: Open-space swimming test
- อุปกรณ์สำหรับวัดความวิตกกังวลของสัตว์ทดลอง: Elevated plus maze
- อุปกรณ์สำหรับวัดความจำชนิด Working memory ของสัตว์ทดลอง: Y maze
- อุปกรณ์สำหรับวัดความจำชนิด Reference memory ของสัตว์ทดลอง: Morris water maze
- กรงพร้อมอุปกรณ์สำหรับฝึกสัตว์ทดลองให้ใช้สารเสพติดด้วยตัวเอง ควบคุมการวัดและบันทึกผลด้วยระบบคอมพิวเตอร์: Operant chamber
- อุปกรณ์สำหรับควบคุมการฉีดยาและอัตราการฉีดยาให้ตัวเอง: Microinfusion pump

การวัดความวิตกกังวล (Elevated plus maze) ในหนูถีบจักร

ใช้การทดสอบด้วยชุดอุปกรณ์ตามแบบของ Pellow et al. (1985) โดยทุกส่วนของอุปกรณ์ทำจากพลาสติกโพลีไวนิลซีแซมและพื้นยางสีดำ ชุดอุปกรณ์ซึ่งยกสูงจากพื้นห้อง 50 ซม. ประกอบด้วยทางเดินตรงยาวไขว้กันเป็นรูปกากะบาท มีทางเดินเปิด 2 ทางตรงข้ามกัน (50 x 10 ซม.) และทางเดินปิด 2 ทางตรงข้ามกัน (50 x 10 x 50 ซม.) ทางเดินทั้งหมดเชื่อมกันด้วยพื้นที่เปิดโล่งตรงกลาง (10 x 10 ซม.) เมื่อเริ่มทดสอบปล่อยหนูขาวลงในที่โล่งตรงกลางและสังเกตผลเป็นเวลา 8 นาที บันทึกจำนวนครั้งที่หนูเข้าไปในทางเดินเปิด จำนวนครั้งที่หนูเข้าไปในทางเดินปิด แสดงผลเป็นจำนวนครั้งที่เข้าไปในทางเดินเปิด เวลาที่อยู่ในทางเดินเปิด สัดส่วนของเวลาที่อยู่ในทางเดินเปิดกับเวลาที่อยู่ในทางเดินทั้งหมด และสัดส่วนของจำนวนครั้งที่เข้าไปในทางเดินเปิดกับจำนวนครั้งที่เข้าไปในทางเดินทั้งหมด

การวัดความจำ (Y maze) ในหนูถีบจักร

วิธีการวัดความจำแบบ Y-maze ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamada et al. (1996) และ Yan et al. (2001) เพื่อให้เหมาะกับหนูถีบจักร เครื่องมือประกอบด้วยกล่องทางกลสามขา รูปตัว Y ทำจากพลาสติกสีดำ แต่ละขาของกล่องทางกลยาว 25 ซม. กว้าง 5 ซม. สูง 14 ซม. และวางมุม 120 องศา แยกจากกัน นำหนูถีบจักรวางลงที่ปลายข้างหนึ่งของทางกลและปล่อยให้เคลื่อนไหวอย่างอิสระในทางกลเป็นเวลา 8 นาที บันทึกการเดินเข้าทางกลแต่ละขา โดยถือว่าหนูได้เข้าทางกลนั้นเมื่ออู้งเท้าหลังของหนูผ่านเข้าไปในทางกลแล้ว นำข้อมูลการเข้าทางกลมาคำนวณพฤติกรรม spontaneous alternation ซึ่งหมายถึงการเข้าไปในทางกลแต่ละขาอย่างต่อเนื่องโดยไม่ซ้ำกันจนครบสามขา การคำนวณทำแบบนับชุดทบสามไปที่ละขา ซึ่งร้อยละของพฤติกรรม spontaneous alternation คิดได้จากการนำจำนวนชุดที่หนูเข้าทางกลถูกต้องมาหารด้วยจำนวนชุดสูงสุดที่เป็นไปได้ (จำนวนขาทางกลที่เข้าไปทั้งหมด - 2) แล้วคูณด้วย 100

การวัดความจำ (Morris Water maze) ในหนูถีบจักร

เครื่องมือที่ใช้เป็นถังน้ำกลมสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 97 ซม. และสูง 60 ซม. ในระหว่างการทดสอบเติมน้ำ (อุณหภูมิ 23 ± 2 °C) ลงในถังสูง 30 ซม. (แบ่งอาณาบริเวณถังน้ำออกเป็น 4 ส่วน) ภายในถังมีท่อนพักอยู่ที่ส่วนหนึ่งของถังแต่จมอยู่ใต้ผิวน้ำ 0.5 ซม. ถังน้ำวางอยู่ในห้องซึ่งมีสิ่งอ้างอิงทิศทางนอกถังหลายจุด (อยู่ที่เดิมตลอดการทดลอง)

การทดสอบ Reference memory: ในการฝึกแต่ละครั้ง ปล่อยหนูลงว่ายน้ำในถังน้ำ ณ จุดกำหนดหนึ่ง โกล์ขอบถัง (แบ่งเป็น 5 จุด) โดยสุ่มลำดับของตำแหน่งที่ปล่อยหนู ท่อนพักตั้งอยู่ ณ ตำแหน่งเดิมตลอดการทดสอบ ติดตามทิศทางการว่ายน้ำและบันทึกเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำจนพบท่อนพัก เมื่อพบแล้วปล่อยให้หนูพักได้ 10 วินาที ก่อนนำกลับไปไว้ในกรงเลี้ยงเดิม ในกรณีที่หนูไม่สามารถหาท่อนพักได้ในเวลา 60 วินาที จะหยุดการฝึกและบันทึกผลเป็น 60 วินาที และนำทางหนูไปสู่ท่อนพักด้วยมือ ปล่อยให้พัก 10 วินาทีและนำกลับไปไว้ในกรงเลี้ยงเดิม การฝึกนี้ทำทุกวันติดต่อกันสี่วันโดยทำวันละ 4 ครั้ง

การทดสอบ Probe test: ในวันที่ห้าของการฝึก นำหุ่นพักออกจากถังน้ำ และปล่อยหนูลงว่ายน้ำเป็นเวลา 60 วินาทีในถังน้ำ ติดตามทิศทางการว่ายน้ำและบันทึกจำนวนครั้งที่หนูว่ายข้ามอาณาบริเวณถึงน้ำส่วนที่หุ่นพักเคยอยู่และเวลาทั้งหมดที่ใช้ในอาณาบริเวณดังกล่าว

โมเดลการเสพแอมเฟตามีนด้วยตัวเอง (Intravenous self-administration of amphetamine) ในหนูขาว

วิธีการนี้ดัดแปลงมาจาก Harrod และคณะ (2001) โดยทำการอดอาหารหนูก่อนการฝึกให้กตคาน จากนั้นจึงนำหนูเข้าไปไว้ในกล่องทดสอบพฤติกรรมกตคาน (Skinner box (LE856), Pan Lab, Spain) เมื่อหนูกตคานจะเกิดแสงสีขาวสว่างขึ้นและหนูจะได้รับอาหารเม็ด 1 เม็ดเล็ก ทำการฝึกหนูให้กตคานเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง ทุกวัน โดยจำนวนครั้งในการกตคานที่จะได้อาหาร 1 เม็ดจะเพิ่มขึ้นจาก 1 ครั้ง เป็น 2 ครั้ง และเป็น 5 ครั้งในเวลา 3 วัน จนหนูสามารถกตคานได้มากกว่า 120 ครั้ง/ชั่วโมง โดยใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน หลังจากการฝึกฝนหนูจะได้รับอาหารอย่างเกินพอ จากนั้น 3-5 วันจึงทำการผ่าตัดฝังท่อโพสซิเอธิลีนเข้าหลอดเลือดดำจุกซ์กูลาร์และยึดท่อเปิดที่มีจุกเกลียวปิดอีกด้านที่ศีรษะโดยใช้เดนทัลซีเมนต์ ภายใต้การสลบด้วยยาสลบคลอรัลไฮเดรท ขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังจากผ่าตัด 5 วัน นำหนูเข้ากล่องทดสอบพฤติกรรมกตคานที่มีเครื่องฉีดสารที่ติดกับสายโพสซิเอธิลีนเพื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำจุกซ์กูลาร์ เมื่อหนูกตคานจะเกิดแสงสีขาวสว่างขึ้นและหนูจะได้รับการฉีดสารละลายเข้าหลอดเลือดดำปริมาตร 60 ไมโครลิตร ทำการฝึกหนูให้กตคานเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง ทุกวัน โดยสารละลายที่ฉีดเข้าหลอดเลือดดำมี 2 ชนิดคือ สารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ หรือ สารละลาย ดี-แอมเฟตามีน (โดยฉีดครั้งละ 50 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ทำการฝึกหนูให้กตคานเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง ทุกวัน โดยจำนวนครั้งในการกตคานที่จะได้รับการฉีดสารจะเพิ่มขึ้นจาก 1 ครั้ง เป็น 2 ครั้ง และเป็น 5 ครั้งในเวลา 3 วัน เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 5 วัน หลังจากนั้นหนูที่มีการให้ยา ดี-แอมเฟตามีนแก่ตัวเองจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะฉีดตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัด (0.9% โซเดียมคลอไรด์และไดเมทิลซัลฟอกไซด์) เข้าช่องท้อง 15 นาที ก่อนนำลงกล่องทดสอบ กลุ่มที่สอง จะได้รับสารสกัด PF003 ขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เข้าช่องท้อง 15 นาที ก่อนนำลงกล่องทดสอบ ทุกวันครบทั้ง 5 วัน

การประเมินผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองในรูปค่าเฉลี่ย (mean) \pm SEM ใช้ Student t-test ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่ให้สารสกัดสมุนไพรและกลุ่มควบคุมที่ให้ตัวทำละลาย และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม (ให้สารสกัดสมุนไพรขนาดต่างๆ และกลุ่มควบคุมที่ให้ตัวทำละลาย) ตามด้วย Fisher LSD test เพื่อหา กลุ่มที่แตกต่างกัน ในการนี้ถือว่าค่า $P < 0.05$ เป็นระดับแสดงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ในขั้นต้น ทำการทดสอบผลสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ที่มีศักยภาพ จากการเก็บรวบรวมและสกัดแยกโดยโครงการ “การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท” ตลอดจนผ่านการทดสอบคัดกรองเบื้องต้นแล้วจากโครงการ “การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ” กับแบบจำลองพฤติกรรมต่างๆ ในหนูถีบจักร ได้แก่ แบบจำลองภาวะซึมเศร้า (Open-space swimming test) ภาวะวิตกกังวล (Elevated plus maze) การเรียนรู้และความจำ (Y-maze และ Morris water maze) เนื่องจากพฤติกรรมเหล่านี้มีบทบาทหรือมีส่วนร่วมในกระบวนการติดยาและการขาดสารเสพติดกระตุ้นประสาท และสามารถกระทำได้ง่ายกว่าพฤติกรรมการติดยา ข้อมูลส่วนนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการคัดกรองสารสกัดที่มีศักยภาพให้เหลือน้อยตัวลงก่อนทดสอบกับแบบจำลองพฤติกรรมการติดยาต่อไป โดยสารสกัดที่ทดสอบได้แก่ AS001, AS003, CAR001, CAR003, PF001 และ PF003 ซึ่งมีศักยภาพการจับกับ Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptor ได้ดี (ดูรายละเอียดทางพิษเคมีและคุณสมบัติของสารสกัดเหล่านี้ในการจับตัวรับต่างๆ ได้ในรายงานของโครงการ “การสกัดแยกสารสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท” และโครงการ “การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ”)

จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยการฉีดสารสกัดขนาด 50 mg/kg เข้าช่องท้อง (IP) ในหนูถีบจักร พบว่าสารสกัด AS001 และ AS003 มีพิษต่อสัตว์ทดลอง โดยทำให้เสียชีวิตเกือบทั้งหมด (AS001, 50% ตายหลังให้ยาวันแรก และ 100% ตายหลังให้ยาวันที่ 2; AS003, 100% ตายหลังให้ยาวันแรก ทำให้ไม่สามารถวัดผลทางพฤติกรรมได้) สารสกัด CAR001 และ CAR003 ไม่มีผลต่อภาวะซึมเศร้าของสัตว์ทดลอง ในขณะที่สารสกัด PF001 และ PF003 มีผลลดภาวะซึมเศร้าของสัตว์ทดลองอย่างชัดเจน (รูปที่ 4) ดังนั้นข้อมูลการทดลองเพื่อคัดกรองเบื้องต้นชี้แนะว่าสารสกัด PF001 และ PF003 อาจมีศักยภาพเหมาะต่อการวิจัยและพัฒนาไปใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ส่วนสารสกัด AS001, AS003, CAR001 และ CAR003 นั้นมีคุณสมบัติเบื้องต้นไม่เหมาะกับการศึกษาต่อในแง่การบำบัดผู้ติดยา แต่อาจมีศักยภาพด้านอื่นซึ่งอยู่นอกขอบเขตงานของโครงการวิจัย



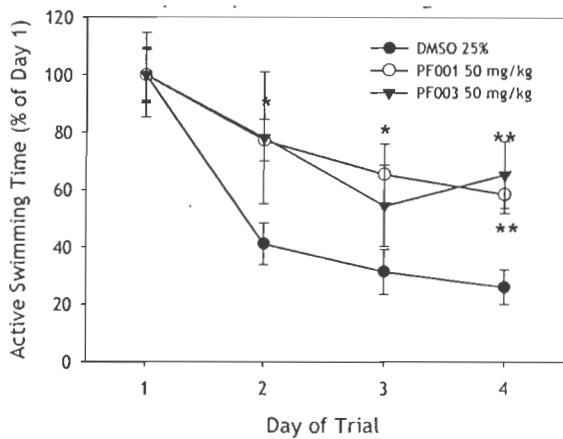
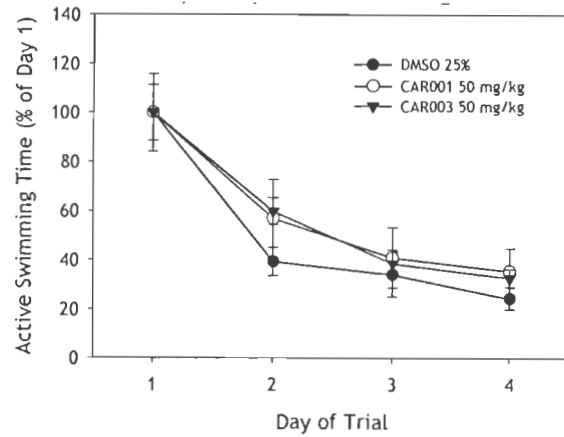
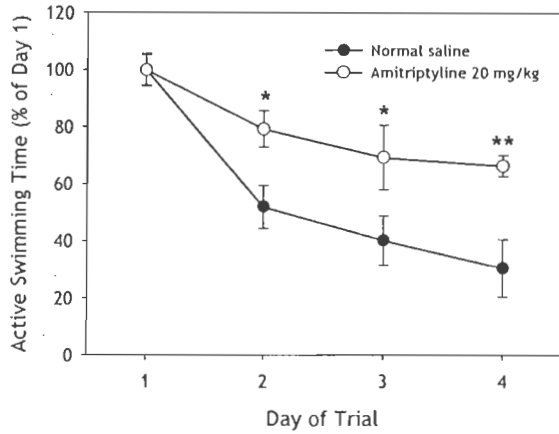
น้อยหน่า (*Annona squamosa*)



โก๋เตี้ย (*Canavalia rosea*)



กะทกรก (*Passiflora foetida*)

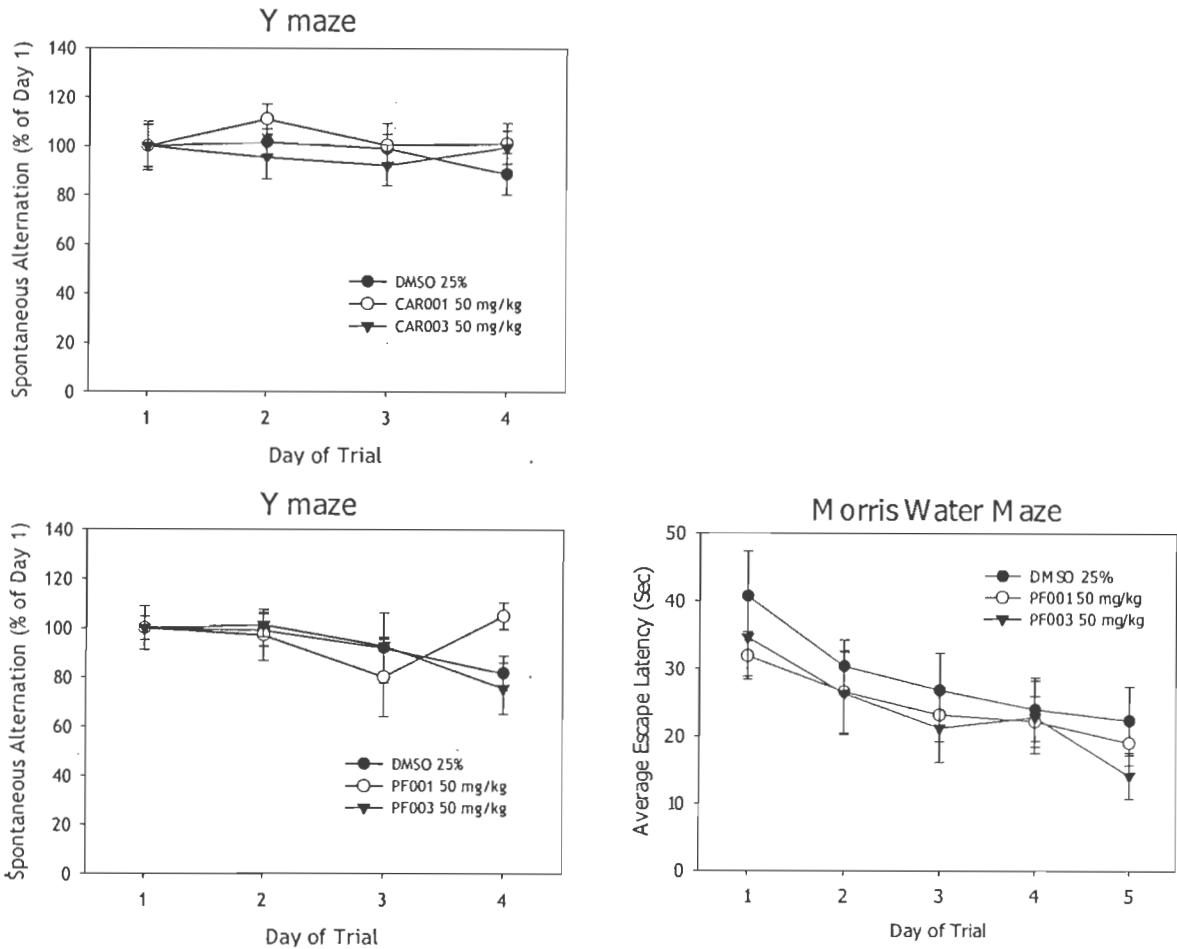


* $P < 0.05$ versus Control

** $P < 0.01$ versus Control

รูปที่ 4: ผลของสารสกัดสมุนไพร CAR และ PF fraction ต่างๆ ต่อพฤติกรรมความซึมเศร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร

จากการทดสอบด้วย Y-maze ปรากฏว่าสารสกัด CAR001 และ CAR003 ไม่มีผลต่อการเรียนรู้และความจำระยะสั้น (working memory) ของหนูถีบจักร ส่วนสารสกัด PF001 และ PF003 ในขนาดที่ต้านภาวะซึมเศร้าได้ก็ไม่มีผลต่อการเรียนรู้และความจำของหนูถีบจักรเช่นกัน (รูปที่ 5) การทดสอบสารสกัด PF001 และ PF003 ด้วยแบบจำลองการเรียนรู้และความจำ Morris water maze ซึ่งมีความไวและแม่นยำกว่า Y-maze ชี้ให้เห็นว่าสารสกัด PF001 และ PF003 ไม่มีผลกระทบต่อความจำของหนูถีบจักรในสภาพปกติ ทั้งต่อความจำระยะสั้น (working memory ใน Y-maze) และระยะยาว (reference memory ใน Morris water maze) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปว่าสารสกัด PF001 และ PF003 มีผลหรือไม่ต่อการสูญเสียความจำจากภาวะสมองเสื่อม (เนื่องจากระบบความจำในสภาพที่สมองเสื่อมมีความอ่อนไหวต่อฤทธิ์ของยาต่างๆ มากกว่าระบบความจำในสภาพปกติ)



รูปที่ 5: ผลของสารสกัดสมุนไพร CAR และ PF ต่อแบบจำลองพฤติกรรมความจำแบบต่างๆ ในหนูถีบจักร

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงนำสารสกัด PF001 และ PF003 ไปแยกเป็นสารสกัดส่วนย่อย (subfraction) ต่างๆ เพื่อทดสอบค้นหาสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์ด้านซึมเศร้าและกลไกการออกฤทธิ์ที่น่าจะเป็นต่อไป

ทำการทดสอบสารสกัดส่วนย่อยต่างๆ ของ PF001 และ PF003 (PF002-1, PF002-2, PF002-3, PF002-4, PF002-5, PF002-6, PF002-7, PF003-1, PF003-2, PF003-(3-5) PF003-3, PF003-4 และ PF003-5 ต่อพฤติกรรมกรรมการเคลื่อนไหว (Locomotor activity) เพื่อคัดกรองสารสกัดที่มีผลกระตุ้นการเคลื่อนไหว (CNS stimulants) เนื่องจากสารสกัดที่มีผลดังกล่าวจะรบกวนการทดสอบฤทธิ์ด้านซึมเศร้าทำให้ได้ผลบวกปลอม (false positive) ผลการทดลองชี้แนะว่าสารสกัดเหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร ยกเว้นสารสกัด PF003-5 ซึ่งมีผลลดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรชัดเจน (ตารางที่ 7) ดังนั้นผลด้านภาวะซึมเศร้าที่พบในสารสกัดต่างๆ เหล่านี้ จึงไม่น่าเกี่ยวข้องกับผลกระตุ้นการเคลื่อนไหวผ่านระบบประสาทส่วนกลางของสารดังกล่าว

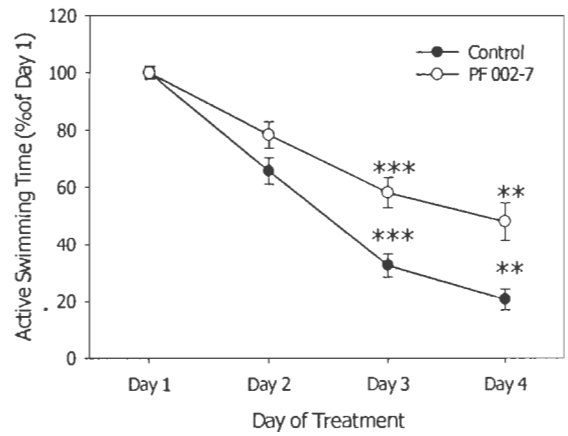
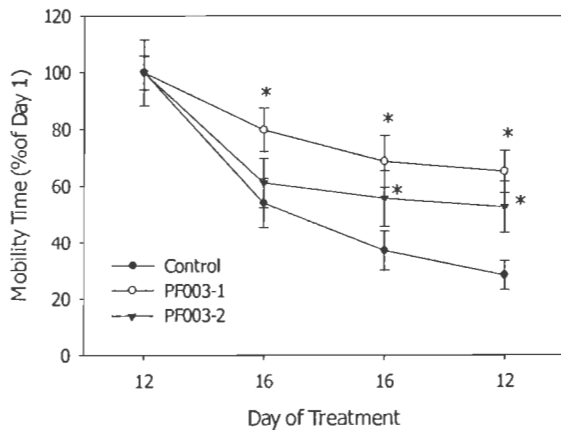
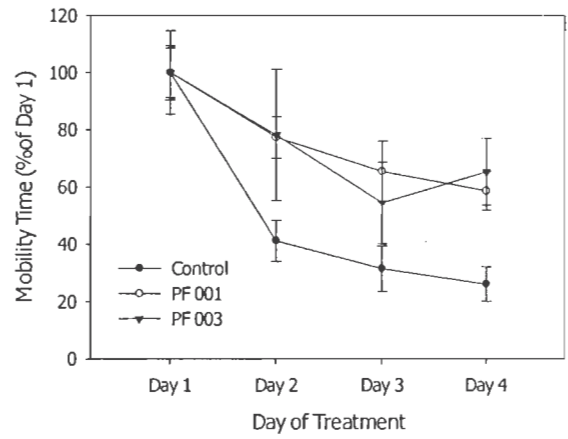
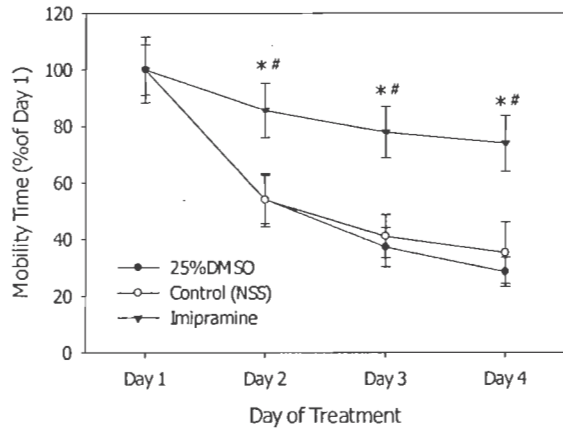
ทำการทดสอบสารสกัดส่วนย่อยต่างๆ ของ PF001 และ PF003 [PF002-(1-4), PF002-(5-6), PF002-7, PF003-1, PF003-2, และ PF003-(3-5) ต่อพฤติกรรมซึมเศร้า (Open-space swimming test) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวชี้แนะว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ด้านซึมเศร้าส่วนใหญ่อาจอยู่ในส่วนสกัดย่อย

(Subfractions) PF003-1 และ PF003-2 และ PF002-7 (รูปที่ 6 และ ตารางที่ 8) นอกจากนั้นฤทธิ์ด้านซีมีตราดังกล่าวยังสอดคล้องกับขนาดยาที่ใช้ โดยเห็นผลเพียงบางส่วนที่ขนาดยา 25 mg/kg เห็นผลชัดเจนที่ขนาดยา 50 mg/kg และเมื่อเพิ่มขนาดยาเป็น 75 mg/kg ก็ไม่ได้แสดงผลมากกว่าที่พบจากขนาดยา 50 mg/kg (รูปที่ 7) ดังนั้นในการทดสอบในภายหลังส่วนใหญ่จึงใช้ขนาดยา 50 mg/kg เป็นมาตรฐาน

ตารางที่ 7: ผลของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมกรรมการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร

| Experimental treatment | N | Locomotor activity (Counts in 60 min; Mean \pm SEM) |
|------------------------|---|----------------------------------------------------------|
| NSS | 8 | 1,006 \pm 241 |
| Control (25% DMSO) | 8 | 1,002 \pm 241 |
| PF002-1 | 8 | 1,096 \pm 347 |
| PF002-2 | 8 | 741 \pm 153 |
| PF002-3 | 8 | 1,452 \pm 199 |
| PF002-4 | 8 | 799 \pm 231 |
| PF002-5 | 8 | 1,212 \pm 254 |
| PF002-6 | 8 | 803 \pm 247 |
| PF002-7 | 8 | 601 \pm 155 |
| PF003-1 | 8 | 838 \pm 138 |
| PF003-2 | 8 | 589 \pm 113 |
| PF003-3 | 8 | 457 \pm 192 |
| PF003-4 | 8 | 522 \pm 207 |
| PF003-5 | 8 | 225 \pm 51 |

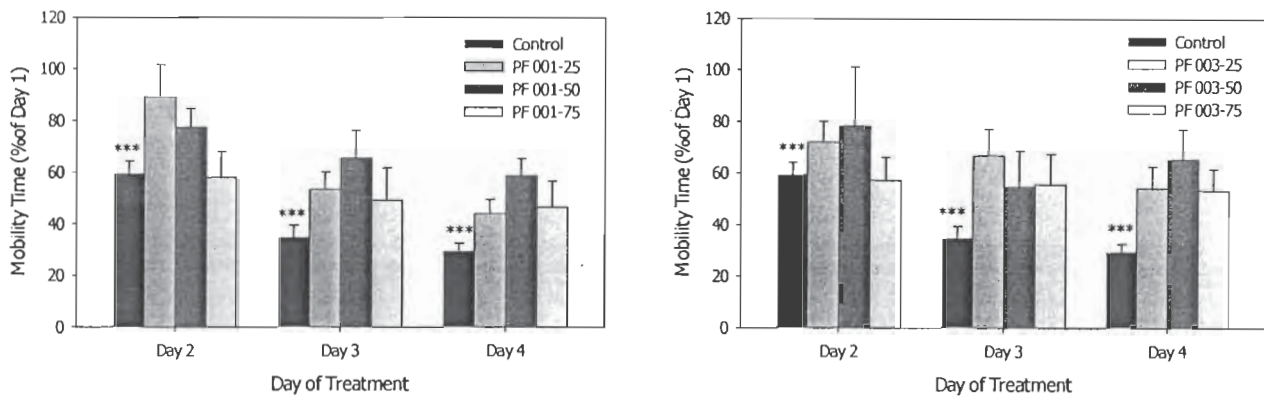
* $P < 0.05$ versus Control (25% DMSO)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus Control (DMSO)

$P < 0.05$ versus Control (NSS)

รูปที่ 6: ผลของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมความซึ่มเศร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร



*** $P < 0.001$ versus Day 1

รูปที่ 7: Dose dependency ของผลสารสกัดสมุนไพร PF001 และ PF003 ต่อพฤติกรรมความซึ่มเศร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร

ตารางที่ 8: ผลของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมซึ่มเศร้า (Open-space swimming test) ในหนูถีบจักร

| Treatment | N | Mobility Time in Minutes (Mean \pm SEM) | | | | | | | | | |
|-------------|----|-------------------------------------------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|--|--|
| | | Day 1 | | Day 2 | | Day 3 | | Day 4 | | | |
| DMSO | 14 | 10.10 | \pm 1.09 | 5.46 | \pm 0.80 | 3.76 | \pm 0.65 | 2.87 | \pm 0.48 | | |
| NSS | 14 | 9.48 | \pm 1.03 | 5.11 | \pm 0.83 | 3.89 | \pm 0.67 | 3.34 | \pm 0.95 | | |
| Imipramine | 14 | 11.16 | \pm 0.92 | 9.55 | \pm 0.99 | 8.69 | \pm 0.94 | 8.24 | \pm 1.02 | | |
| PF002-(1-4) | 14 | 9.83 | \pm 0.90 | 4.74 | \pm 0.99 | 3.32 | \pm 0.84 | 3.23 | \pm 0.76 | | |
| PF002-(5-6) | 14 | 9.73 | \pm 0.60 | 5.75 | \pm 0.83 | 3.38 | \pm 0.66 | 3.10 | \pm 0.33 | | |
| PF003-(3-5) | 14 | 9.11 | \pm 1.04 | 5.56 | \pm 1.34 | 4.21 | \pm 1.36 | 3.08 | \pm 1.03 | | |

* $P < 0.05$ versus NSS

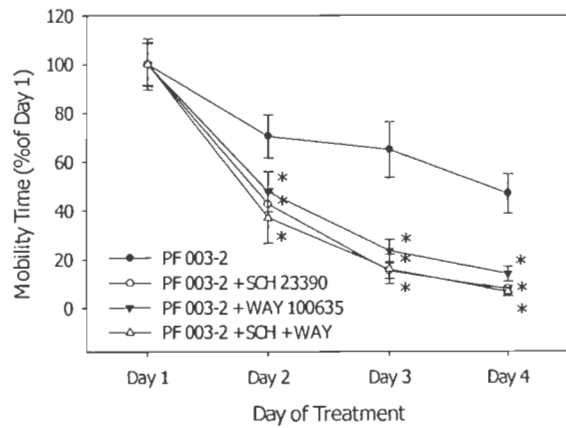
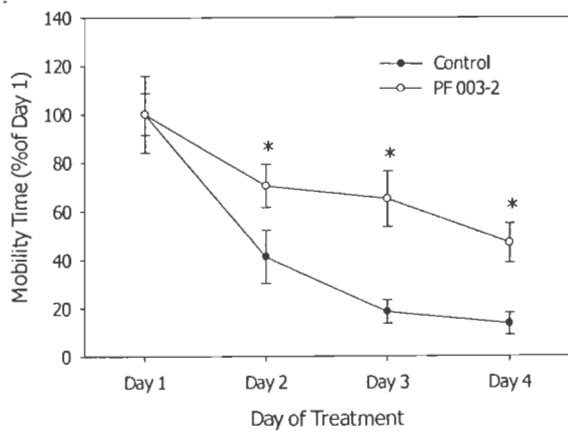
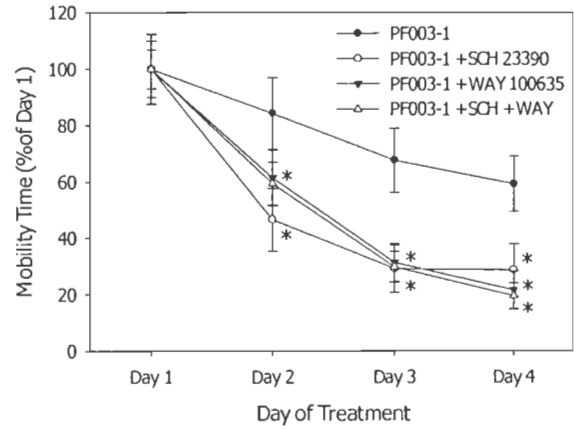
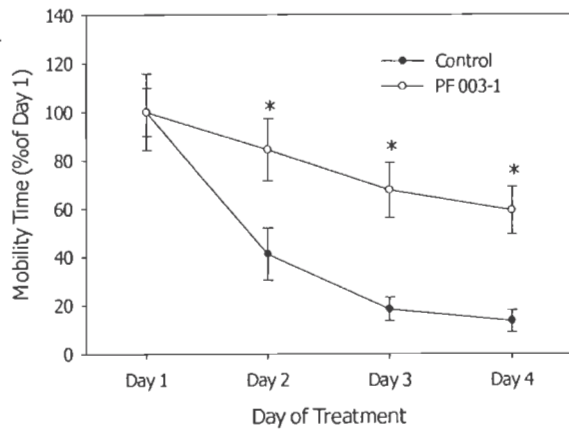
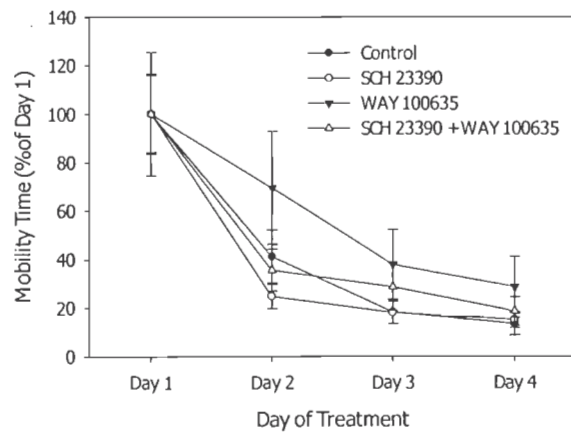
ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านภาวะซึ่มเศร้าที่น่าจะเป็นของสารสกัดส่วนย่อย PF003-1 และ PF003-2 (ซึ่งเป็น subfraction หลักในการสกัดที่ทำได้ง่าย ได้สารที่ต้องการปริมาณมาก และสามารถควบคุมมาตรฐานได้ดี) ด้วยเหตุที่ทั้ง PF003-1 และ PF003-2 มีความสามารถจับกับ Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptors ได้ดี (จากผลการคัดกรองด้วย receptor binding assay) จึงใช้ specific antagonists ต่อ Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptors ซึ่งเป็น receptor ที่มีบทบาทสำคัญในภาวะซึ่มเศร้าและการติดยาเป็นเครื่องมือพิสูจน์ความสัมพันธ์ของ receptor ดังกล่าวต่อฤทธิ์ด้านซึ่มเศร้า

ของ PF003-1 และ PF003-2 ซึ่งผลการทดลองแสดงว่าทั้ง Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptor antagonists มีผลยับยั้งฤทธิ์ด้านซึมเศร้าของสารสกัด ทั้งสองอย่างชัดเจน ดังนั้นการออกฤทธิ์ด้านซึมเศร้าของสารสกัด PF003-1 และ PF003-2 ส่วนหนึ่งอาจเกิดผ่านระบบ Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptor (รูปที่ 8 และ ตารางที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับแนวความคิดปัจจุบันที่ชี้ว่าในภาวะซึมเศร้าการทำหน้าที่ของทั้ง Dopamine D₁ และ 5-HT_{1A} receptor มีการเปลี่ยนแปลงโดยลดลงอย่างชัดเจน ยาด้านซึมเศร้าที่มีประสิทธิภาพทางคลินิก ส่วนหนึ่งมีผลกระตุ้น Dopamine D₁ และ/หรือ 5-HT_{1A} receptor (postsynaptic receptor) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการแจ่มใส รู้สึกสนุกสนานและมีความสุขกับชีวิตประจำวันมากขึ้น

ตารางที่ 9: ผลยับยั้งของ specific D₁ และ 5-HT_{1A} receptor antagonist ต่อฤทธิ์ด้านซึมเศร้า
ของสารสกัด *Passiflora foetida* ในหนูถีบจักร

| Treatment | n | Mobility Time (% of Day 1; Mean \pm SEM) | | | |
|--------------------------------------|----|--------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 4 |
| Control | 12 | 100.00 \pm 12.91 | 41.19 \pm 8.87 | 18.38 \pm 3.99 | 13.39 \pm 3.75 |
| SCH23390 | 12 | 100.00 \pm 13.53 | 24.80 \pm 4.11 | 18.05 \pm 3.70 | 15.14 \pm 2.68 |
| WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 20.83 | 69.49 \pm 18.99 | 37.85 \pm 11.67 | 28.65 \pm 10.27 |
| SCH23390 + WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 13.02 | 35.59 \pm 7.04 | 28.65 \pm 7.94 | 18.62 \pm 4.79 |
| PF003-1 | 12 | 100.00 \pm 8.14 | 84.37 \pm 10.45 | 67.64 \pm 9.30 | 59.20 \pm 8.06 |
| PF003-1 + SCH23390 | 12 | 100.00 \pm 9.98 | 46.57 \pm 9.11 [§] | 47.77 \pm 21.81 | 28.57 \pm 7.68 [§] |
| PF003-1 + WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 5.63 | 61.42 \pm 8.06 | 31.33 \pm 5.51 | 21.47 \pm 5.52 [§] |
| PF003-1 + SCH23390 + WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 10.18 | 59.41 \pm 6.24 [§] | 29.73 \pm 4.39 | 19.46 \pm 3.72 [§] |
| PF003-2 | 12 | 100.00 \pm 7.03 | 70.41 \pm 7.26 | 64.97 \pm 9.34 | 46.85 \pm 6.58 |
| PF003-2 + SCH23390 | 12 | 100.00 \pm 8.57 | 42.58 \pm 5.25 [#] | 15.30 \pm 2.61 [#] | 7.84 \pm 1.12 [#] |
| PF003-2 + WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 7.36 | 47.71 \pm 6.74 [#] | 23.58 \pm 3.64 [#] | 14.08 \pm 2.45 [#] |
| PF003-2 + SCH23390 + WAY100635 | 12 | 100.00 \pm 7.01 | 37.04 \pm 8.45 [#] | 16.01 \pm 4.93 [#] | 6.65 \pm 1.36 [#] |

* $P < 0.05$ versus Control; [§] $P < 0.05$ versus PF003-1; [#] $P < 0.05$ versus PF003-2



* $P < 0.05$ versus Control

รูปที่ 8: กลไกการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าที่น่าจะเป็นของสารสกัดสมุนไพร PF (Subfractions) ต่อพฤติกรรมความซึมเศร้าในหนูถีบจักร

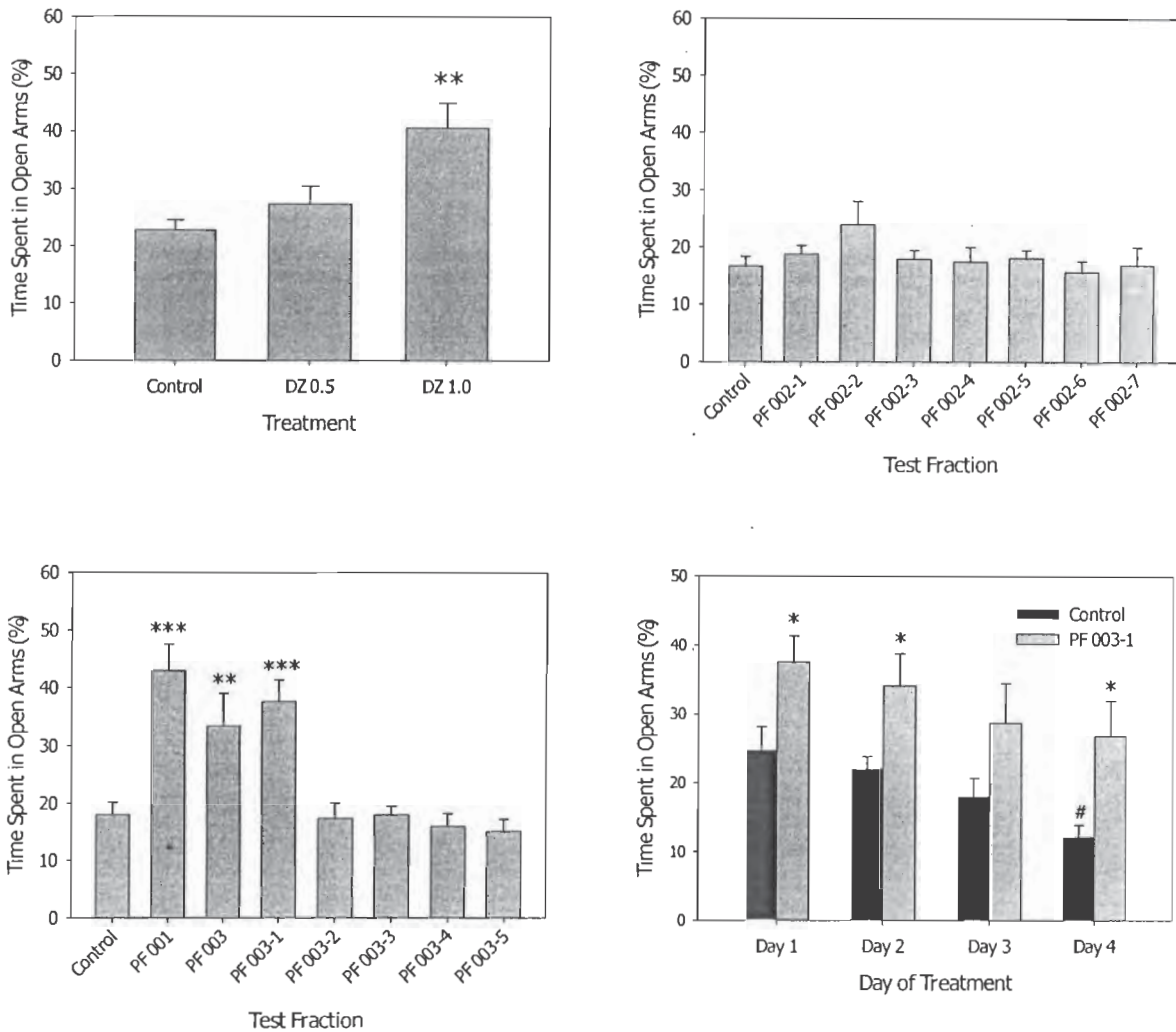
แม้ specific antagonists ของ D_1 & $5-HT_{1A}$ receptors จะมีผลลดการเคลื่อนไหว (locomotion) ของหนูเล็กอย่างชัดเจนใน activity cage (ตารางที่ 10) ซึ่งอาจทำให้การสรุปผลมีน้ำหนักน้อยลง แต่จากการทดสอบผลของ specific antagonists ของ D_1 & $5-HT_{1A}$ receptors ทั้งสองต่อ open-space swimming test ในหนูเล็ก พบว่าไม่มีผลต่อ mobility time แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สาเหตุอาจเป็นเพราะว่าการเคลื่อนไหวของหนูใน activity cage เป็นพฤติกรรมแบบ passive ซึ่งต่างจากการว่ายน้ำของหนูใน open space ซึ่งเป็นพฤติกรรมแบบ active ดังนั้นแม้หนูอยู่ในภาวะสงบระดับแต่จำเป็นต้องขยับตัวว่ายน้ำเพื่อเอาตัวรอดจากอันตราย นอกจากนั้นในทางคลินิกยาหลายตัวที่มีผลลด locomotor activity ก็ยังมีฤทธิ์ต้านซึมเศร้าได้ ซึ่งชี้แนะว่าการเคลื่อนไหวของหนูในการทดสอบทั้งสองแบบจำลองพฤติกรรมมีรากฐานจากแรงผลักดันที่ต่างกัน และควรจะมีผลกระทบต่อกันน้อย

ตารางที่ 10: ผลของยาด้านซึมเศร้า Imipramine และ Specific D_1 & $5-HT_{1A}$ receptor antagonists ต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร

| Treatment | n | Locomotor activity (Counts in 60 min; Mean \pm SEM) |
|------------|---|----------------------------------------------------------|
| NSS | 8 | 1,006 \pm 241 |
| Imipramine | 8 | 840 \pm 240 |
| WAY 100635 | 8 | 353 \pm 68 |
| SCH 23390 | 8 | 308 \pm 85 |
| WAY + SCH | 8 | 79 \pm 27 |

$P < 0.05$ versus NSS

ทำการทดสอบสารสกัด PF001 และ PF003 ตลอดจน Subfractions ต่างๆ (PF002-1, PF002-2, PF002-3, PF002-4, PF002-5, PF002-6, PF002-7, PF003-1, PF003-2, PF003-3, PF003-4 และ PF003-5) ต่อพฤติกรรมความวิตกกังวล (Elevated plus maze) ผลการทดลองดังกล่าวชี้แนะว่า นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านซึมเศร้าแล้ว สารสกัด PF001, PF003 และ PF003-1 ยังคงมีฤทธิ์คลายกังวลอย่างชัดเจนอีกด้วยจากการให้ยาแบบ acute และ subacute อย่างไรก็ตามสารสกัดใน Subfraction อื่นๆ ของ PF003 และทุก subfraction ของ PF002 ที่ทดสอบไม่แสดงฤทธิ์คลายกังวล (รูปที่ 9)



* $P < 0.05$, ** $P < .01$, *** $P < 0.001$ versus Control

$P < 0.05$ versus Day 1

รูปที่ 9: ผลของ Diazepam (DZ; 0.5, 1.0 mg/kg) และสารสกัด *Passiflora foetida* (50 mg/kg) ต่อแบบจำลองพฤติกรรมความวิตกกังวล (Elevated plus maze) ในหนูถีบจักร

ด้วยเหตุนี้ฤทธิ์คลายกังวลของสมุนไพร *Passiflora foetida* อาจเกิดจากผลของสารสำคัญใน subfraction PF003-1 เนื่องจากไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวใน subfraction อื่นๆ

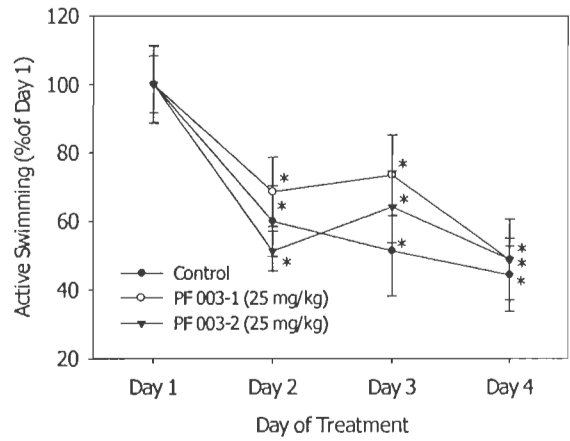
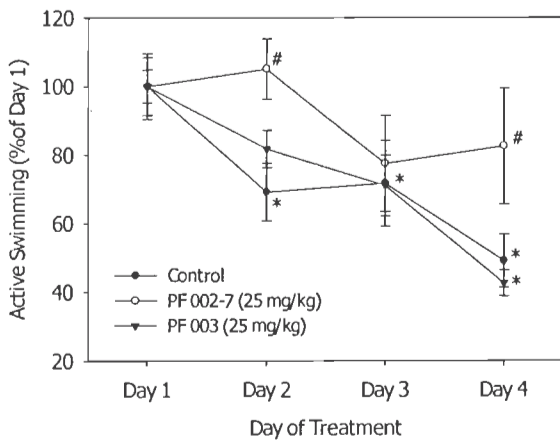
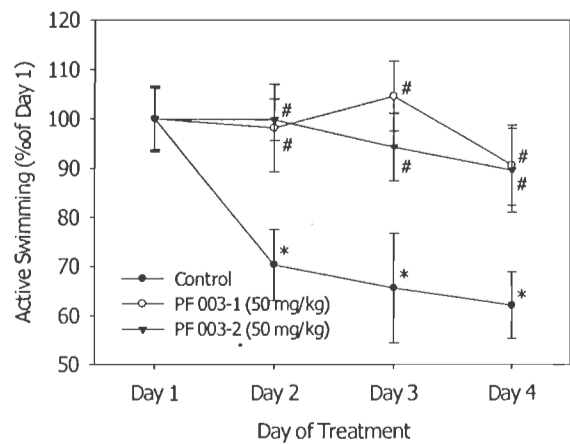
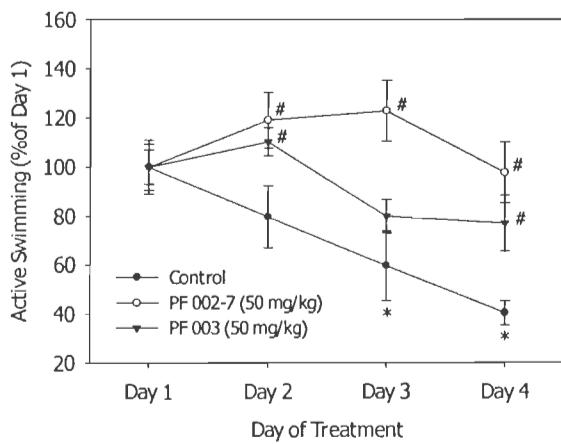
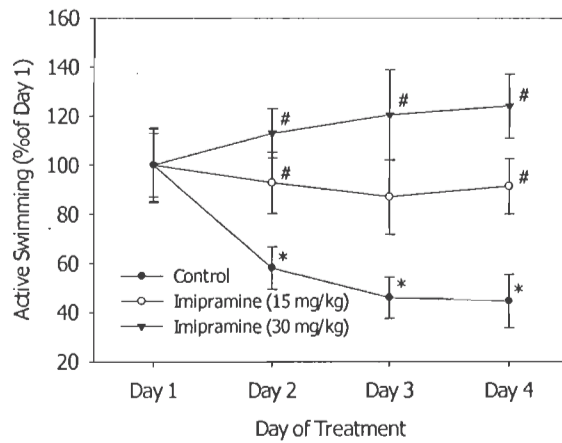
น่าสังเกตว่าฤทธิ์ต้านซึมเศร้าและฤทธิ์คลายกังวลของสารสกัดจาก *Passiflora foetida* ส่วนใหญ่อยู่ในสารสกัดส่วนเดียวกัน ซึ่งทำให้สารสกัดจากสมุนไพรนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

ลักษณะของผลทางเภสัชวิทยาที่เกิดขึ้นจากสารสกัด PF001 และ PF003 มีความสอดคล้องกับการประยุกต์ใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งในระยะเวลาที่ผู้ติดยาไม่ได้รับยาอย่างกระตั้นหัน (เช่นกรณีการเข้าบำบัดเพื่อเลิกยาเสพติดหรือไม่สามารถหายามาเสพติด) จะเกิดกลุ่มอาการขาดยา ได้แก่ หงุดหงิด วิตกกังวล สับสน ผื่นร้าย อ่อนเพลีย เหงื่อซซา หลับยาว อยากรอาหาร ซึมเศร้า อย่างไรก็ตาม

อาการที่สร้างปัญหาหนักต่อผู้ติดยา คือ ภาวะซึมเศร้าและวิตกกังวล ซึ่งในหลายกรณีทำให้ต้องหันกลับไปเสพยาใหม่ เป็นผลให้การบำบัดล้มเหลว

ด้วยเหตุผลดังกล่าว การนำสารสกัด PF001 หรือ PF003 ไปพัฒนาเป็นรูปแบบเภสัชภัณฑ์ที่ใช้สะดวก เก็บรักษาง่าย มีความคงตัว และควบคุมมาตรฐานได้แม่นยำ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์กับการบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท โดยอาจใช้ลดอาการขาดยาในช่วงเริ่มต้นบำบัด หรือใช้ทดแทนสารกระตุ้นประสาทในช่วงที่ผ่านการบำบัดแล้วแต่เกิดความอยากยาและการแสวงหายา

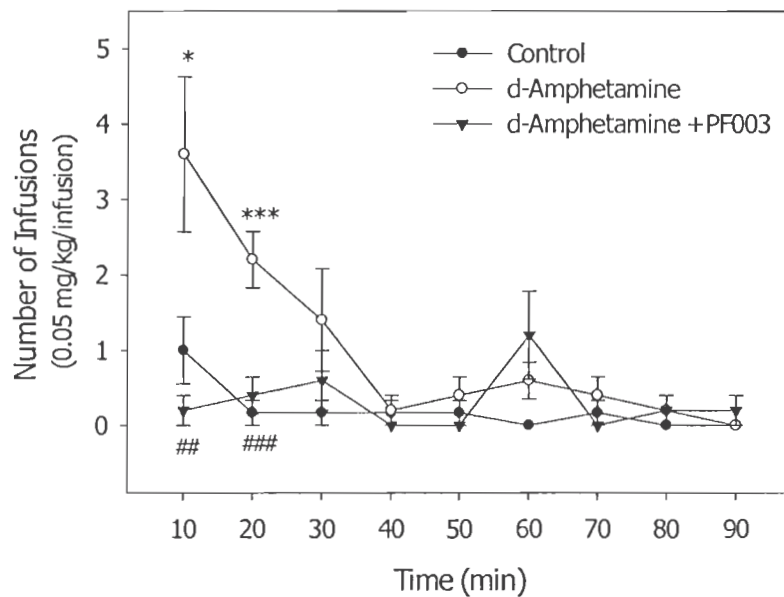
จะเห็นได้ว่าการทดสอบที่ผ่านมา ให้ยาด้วยการฉีดเข้าช่องท้องเพื่อขจัดปัญหาเรื่องการดูดซึมยา อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติการใช้ยาบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทนั้นส่วนใหญ่ให้โดยการรับประทาน เนื่องจากสะดวกและปลอดภัย ดังนั้นจึงทดสอบผลของสารสกัด *Passiflora foetida* ที่ให้ทางปากกับสัตว์ทดลอง และพบว่าการใช้สารสกัดในรูปของยาเตรียมชนิดรับประทาน (สารละลายชนิดแขวนตะกอนใน CMC) ก็ให้ผลเช่นเดียวกับการฉีดเข้าช่องท้อง (รูปที่ 10) โดยมีความแรงใกล้เคียงกัน น่าสังเกตว่าการให้สารสกัด PF002-7 ทางปากแสดงผลด้านภาวะซึมเศร้าได้ดีกว่าการให้ด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงยาในขณะดูดซึมผ่านทางเดินอาหาร



* $P < 0.05$ versus Day 1
 # $P < 0.05$ versus Control

รูปที่ 10: ผลของสารสกัด *Passiflora foetida* ที่ให้ทางปากต่อ Open-space swimming test ในหนูถีบจักร

ด้วยข้อมูลและเหตุผลต่างๆ ที่ผ่านมา จึงทดสอบผลของสารสกัด PF003 ต่อพฤติกรรมการติดยาในสัตว์ทดลอง จากผลการทดลองเบื้องต้นกับแบบจำลองการติดยากระตุ้นประสาทในหนูขาว พบว่าการให้สารสกัด PF003 (50 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง) ลดการเกิดพฤติกรรม d-amphetamine self administration ของหนูขาวอย่างชัดเจน (รูปที่ 11) โดยลดพฤติกรรมแสวงหาของหนูขาวได้เกือบสมบูรณ์ ซึ่งชี้แนะว่าอาจใช้สารสกัด *Passiflora foetida* เป็นยาบำบัดผู้เสพยาติดยากระตุ้นประสาทได้ในช่วงกำลังเสพยา โดยอาจออกฤทธิ์ยับยั้งความพึงพอใจและเป็นสุขจากฤทธิ์กระตุ้นศูนย์ควบคุมความพึงพอใจ (Reward center) ของ d-amphetamine



* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, versus Control

$P < 0.01$, ### $P < 0.001$, versus d-amphetamine

รูปที่ 11: ผลของสารสกัด *Passiflora foetida* (PF003) ต่อพฤติกรรมการติดยา (d-amphetamine self-administration) ในหนูขาว

ดังนั้นข้อมูลการศึกษาทางพฤติกรรมสัตว์ทดลองแบบต่างๆ ชี้แนะว่าสารสกัดจากกะทกรก (*Passiflora foetida*) ซึ่งเป็นสมุนไพรไทย โดยเฉพาะสารสกัดส่วน PF003 (ซึ่งเป็นส่วนที่สกัดได้ง่าย มีปริมาณสูง และมีองค์ประกอบที่ชัดเจนซึ่งทำให้ควบคุมคุณภาพได้อย่างแม่นยำ) มีศักยภาพหลายประการที่อาจนำไปใช้บำบัดผู้เสพยาติดยากระตุ้นประสาทได้ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านซึมเศร้า คลายกังวล และต้านการเสพยากระตุ้นประสาท (โดยไม่มีผลกระทบต่อการเคลื่อนไหวและความจำ) อย่างไรก็ตามข้อสรุปที่มีน้ำหนักชัดเจนต้องรอข้อมูลยืนยันทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาอีกหลายประเด็น จึงจะชี้ชัดอย่างแน่นอนว่า *Passiflora foetida* เป็นสมุนไพรไทยที่มีคุณค่าต่อผู้เสพยาติดยากระตุ้นประสาท และนำไปศึกษาทางคลินิกกับผู้ป่วยในวงกว้างต่อไป

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลงานวิจัยที่รายงานมีบางส่วนแตกต่างจากที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยตั้งแต่ต้นบ้าง ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากปัญหาทางเทคนิคที่ไม่ได้คาดคิดไว้ คณะผู้วิจัยพยายามแก้ปัญหาด้วยการหาคำตอบให้คำถามวิจัยอย่างมีประสิทธิภาพและชัดเจนมากขึ้น โดยปรับปรุงวิธีทดสอบและวัดผลให้มีความไวและความแม่นยำตามความเจริญของวิทยาการวิจัยในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามยังคงรักษาวัตถุประสงค์และเนื้อหาตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเดิม

พืชใน *Passiflora* spp. ต่างๆ (เช่น *P. incarnata* L., *P. alata* Curtis, *P. coerulea* L., *P. edulis* Sims.) เป็นตระกูลพืชพื้นบ้านที่มีการใช้เป็นยาสมุนไพรและปรากฏในตำรายาแผนโบราณของหลายประเทศ (เช่น อังกฤษ สหรัฐอเมริกา อินเดีย ฝรั่งเศส อียิปต์ เยอรมัน สวิสเซอร์แลนด์ บราซิล) สำหรับรักษาความเจ็บป่วยต่างๆ ทางกายหลากหลายชนิด เช่น ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ ขับปัสสาวะ ลดความดันโลหิต เป็นต้น ตลอดจนการใช้กับความผิดปกติทางจิตเวช เช่น ใช้กลุ่มประสาท ลดความวิตกกังวล ลดอาการนอนไม่หลับ ระวังปวด ระวังอาการฮิสทีเรีย เป็นต้น นอกจากนั้นยังใช้ *P. incarnata* ในการบำบัดการติดยาฝิ่น (Dhawan et al, 2001, 2004; Petry et al, 2001) อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับกะทกรก (*Passiflora foetida*) ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านไทยตัวหนึ่งน้อยมาก การวิจัยในโครงการนี้พบว่าสารสกัดจากกะทกรกมีผลทางเภสัชวิทยาหลายประการที่สนับสนุนการใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท โดยอาจมีกลไกหลักในการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบสารประสาท dopamine (DA) และ serotonin (5-HT) ในสมอง

ฤทธิ์ด้านซึมเศร้าเป็นตัวชี้วัดหลักที่ใช้คัดกรองสารสกัดเพื่อศึกษาต่อในเชิงละเอียด เนื่องจากมีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับการติดยา โดยมีการใช้ยาต้านซึมเศร้าบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทซึ่งได้ผลบ้างเมื่อใช้ในระยะเวลา ตลอดจนกระบวนการเกิดภาวะซึมเศร้าและการติดยามีความเกี่ยวข้องกันหลายจุด รวมถึงอิทธิพลของระบบประสาท 5-HT ด้วยการเพิ่มปริมาณ 5-HT ที่ปลายประสาทหรือการเพิ่มการตอบสนองต่อ 5-HT มีผลต้านซึมเศร้าอย่างชัดเจน ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงระบบสัญญาณประสาทที่ใช้ 5-HT มีผลต่อการเสพติดยาทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

จากการศึกษาในระยะหลังแสดงว่า 5-HT_{1A} receptor มีส่วนร่วมในพฤติกรรมต่างๆ ที่เกิดจากสารเสพติดกระตุ้นประสาท นอกจากนั้นยังพบว่าอิทธิพลของ 5-HT_{1A} receptor ชนิด pre- และ postsynaptic receptor มักสวนทางกัน ส่วนใหญ่ 5-HT_{1A} autoreceptor จะส่งเสริมพฤติกรรมที่เกี่ยวกับการติดยากระตุ้นประสาทโดยการจำกัดการตอบสนองต่อ 5-HT ณ บริเวณปลายประสาท ในทางตรงกันข้าม postsynaptic 5-HT_{1A} receptor มักยับยั้งการแสดงออกของพฤติกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการติดยาโดยตรง นอกจากนั้นยังมีอิทธิพลกับการตอบสนองต่อ 5-HT ที่เกิดเฉพาะที่โดยอาศัย feedback mechanisms (Müller et al, 2007)

ดังนั้นจะเห็นว่า 5-HT และ 5-HT_{1A} receptor มีอิทธิพลต่อทั้งภาวะซึมเศร้าและการติดยากระตุ้นประสาท สารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบดังกล่าวจึงมีศักยภาพในการรักษาความผิดปกติทั้งสองได้ โดย

อาจออกฤทธิ์ที่ 5-HT_{1A} receptor ประเภท pre- หรือ postsynaptic ก็ได้ นำสังเกตว่าสารสกัด *P. foetida* ที่นำมาทดสอบและแสดงศักยภาพด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทนอกจากมีความชอบ (affinity) มากต่อ D₁ receptor แล้วยังมีความชอบต่อ 5-HT_{1A} receptor อย่างเด่นชัดอีกด้วย จึงคาดได้ว่าฤทธิ์ทั้งสองประการนี้อาจเป็นเป้าหมายสำคัญในการคัดกรองสมุนไพรต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นยาบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

ในกรณีฤทธิ์คล้ายกังวลของสารสกัด *Passiflora* spp. สารสำคัญที่ออกฤทธิ์อาจเป็นสารกลุ่มต่างๆ ต่อไปนี้ ได้แก่ flavonoids (apigenin, vitexin, kampferol, homorientin, chrysin), harmaine alkaloids (harman, harmalin, harmalol) และ pyrone derivatives (malthol) แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถจำแนกและพิสูจน์ได้ว่าสารใดเป็นสารสำคัญดังกล่าว (Dhawan et al., 2001) อย่างไรก็ตามสารกลุ่ม flavonoids โดยเฉพาะ chrysin น่าจะเป็นไปได้มากที่สุด (Dhawan et al., 2001, Petry et al., 2001) ฤทธิ์คล้ายกังวลของ *P. incarnata* ไม่สามารถหักล้างด้วย flumazenil ซึ่งเป็น antagonist ของ benzodiazepine/GABA_A receptors ซึ่งชี้แนะว่าไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่าน GABA_A receptors (Soleimani et al., 1997) ในขณะที่มีหลักฐานแสดงว่าฤทธิ์คล้ายกังวลของพืชสมุนไพรอื่นๆ เช่น *Rubus brasiliensis*, *Matricaria chamomilla* และ *Matricaria recutita* อาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ต่อ GABA_A receptors (Tihonen et al., 1997) จากผลการวิจัยของโครงการนี้ชี้แนะว่าฤทธิ์คล้ายกังวลของ *P. foetida* อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารสำคัญใน subfraction PF003-1 ที่มีต่อ 5-HT receptor ในลักษณะคล้ายกับ Buspirone ซึ่งเป็นยาคลายกังวลทางคลินิกที่ใช้ในปัจจุบัน

ในกรณีฤทธิ์ด้านการติดยาและอาการขาดยาของ *Passiflora* spp. โดยเฉพาะ *P. incarnata* มีรายงานในระยะหลังชี้แนะว่าอาจเป็นผลของสารกลุ่ม benzoflavone ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ aromatase ซึ่งเปลี่ยน testosterone เป็น estrogen ทำให้ระดับ testosterone สูงขึ้น และมีผลดีในการด้านการติดยาและอาการขาดยาของมอร์ฟีน ภัยูชา บุหรี่ แอลกอฮอล์ และ diazepam นอกจากนี้ยังมีผลดีต่อความบกพร่องทางเพศสัมพันธ์ที่เกิดจากการเสพติดยาในระยะยาวอีกด้วย (Dhawan et al., 2004) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าพืชในตระกูลเดียวกัน เช่น *P. foetida* อาจมีฤทธิ์ดังกล่าวด้วย

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลต่างๆ ที่มีอยู่ จะเห็นว่าสารสกัดจาก *Passiflora foetida* ได้แก่ PF001, PF003, PF003-1 และ PF003-2 หรือ Subfractions อื่นที่มีศักยภาพ (เช่น PF002-7) อาจนำไปพัฒนาเป็นยาช่วยบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทได้ โดยอาจใช้ในระยะเวลาที่ผู้เสพติดกำลังใช้ยา ซึ่งสารสำคัญในสมุนไพรจะลดความพึงพอใจจากการเสพยาลง ใช้ในขณะที่เกิดอาการขาดยา (อาการหลักทางจิตเวช ได้แก่ ภาวะซึมเศร้าและวิตกกังวล) จากผลด้านภาวะซึมเศร้าและคล้ายกังวลของสมุนไพร หรือใช้ในระยะเวลาที่เลิกยาแล้วโดยใช้ทดแทนสารกระตุ้นประสาทเมื่อเกิดความอยากยา การนำสารสกัด *Passiflora foetida* ดังกล่าวไปศึกษาผลทางเภสัชวิทยาต่อระบบอื่นๆ ตลอดจนพิษระยะสั้น เพื่อวิเคราะห์ความปลอดภัย และเมื่อได้ข้อมูลความปลอดภัยมาประกอบผลการทดสอบกับแบบจำลองการติดยาแล้ว จะทำให้มีเหตุผลและหลักฐานรองรับแนวทางการประยุกต์ใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

การพัฒนายาเพื่อใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

การติดยาเป็นความผิดปกติเรื้อรังซึ่งหวนกลับเป็นใหม่ได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของสมองชัดเจน การเข้าใจกลไกทางประสาทชีวภาพของการใช้ยาในทางที่ผิดและการติดยามีส่วนช่วยชี้แนะกลยุทธ์การบำบัดรักษาที่มีประสิทธิภาพ เช่น การใช้ methadone บำบัดการเสพติดเฮโรอีนซึ่งได้ผลดีมาเป็นเวลานาน การใช้ nicotine ทดแทนซึ่งมีประสิทธิภาพในการเลิกสูบบุหรี่ และการใช้ naltrexone ในการบำบัดผู้ป่วยโรคพิษสุราเรื้อรัง (alcoholism) ในช่วงสองทศวรรษที่แล้ว การเสพติดสารกระตุ้นประสาทเป็นจุดสนใจหลักของการวิจัยในหลายสาขาทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล การศึกษาในสัตว์ทดลอง และการศึกษาในมนุษย์ อย่างไรก็ตามยังไม่มียาที่เหมาะสมซึ่งมีการยอมรับเป็นทางการให้ใช้รักษาการเสพติดสารกระตุ้นประสาท น่าสังเกตว่าการศึกษาในมนุษย์ส่วนใหญ่มุ่งไปที่การติดโคเคนมากกว่าสารกระตุ้นประสาทอื่นๆ เช่น amphetamines และ methylphenidate (Howell and Kimmel, 2008). เป็นที่กังขาว่าผลจากการศึกษาการเสพติดโคเคนจะประยุกต์กับการเสพติดสารกระตุ้นประสาทอื่นๆ ได้เพียงใด การรักษาการเสพติดโคเคน นั้นมีหลายวิธี ได้แก่ (1) การใช้ยาประเภท antagonist ต่างๆ ยับยั้งผลทำให้เคลิบเคลิ้มของโคเคนซึ่งทำให้เลิกเสพยา (2) การใช้ยาประเภท agonist ต่างๆ ทดแทนผลทางเภสัชวิทยาของโคเคนโดยคงสภาพที่เปลี่ยนไปของระบบสารสื่อประสาทและพฤติกรรม และ (3) การรักษาซึ่งลดอาการพิษหรืออาการขาดยาของโคเคน มียาหลายตัวที่ถูกประเมินเพื่อใช้บำบัดการติดโคเคน ซึ่งมีเป้าหมายการออกฤทธิ์หลากหลาย จากหลักฐานที่ปรากฏแสดงว่าการใช้ยาต้านซีมีเซร่าหรือ dopamine agonist ไม่เกิดประโยชน์สำหรับการเสพติดโคเคน การยับยั้งผลทำให้เคลิบเคลิ้มหรือพึงพอใจของสารเสพติดกระตุ้นประสาทด้วย antagonist เช่น ยาด้านโรคจิต (risperidone, flupenthixol และ olanzapine) ไม่ได้ผล ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากขาดความร่วมมือจากผู้ประกอบการพัฒนาใหม่หลายแนวทางมีแนวโน้มให้ผลรักษาที่น่าสนใจ ได้แก่ disulfiram (ซึ่งเป็นยาบำบัดการติดสุรา) และ GABA_B receptor agonist นอกจากนี้มีรายงานผลดีของการใช้ยากระตุ้นประสาทแบบ agonist ในการบำบัดการติดโคเคน และ amphetamine เช่นเดียวกัน

ยาด้านซีมีเซร่าประเภท Tricyclic เป็นตัวอย่างยาบำบัดการติดโคเคน ที่มีการศึกษามากที่สุด โดย desipramine เป็นยาดัวแรกที่มีรายงานว่าใช้ได้ผลในการทดสอบกับผู้ติดยา โดยพบว่าใช้ได้ผลในการลดการหวนกลับมาเสพยาโคเคนใหม่ แต่การศึกษากับผู้ป่วยในระยะต่อมาไม่สนับสนุนประสิทธิภาพดังกล่าวหรือได้ผลเพียงช่วงสั้นๆ ในทางทฤษฎีด้านกลไกทางเภสัชพลศาสตร์ ไม่มีเหตุผลใดที่ต้องเลือกใช้ desipramine มากกว่ายาด้านซีมีเซร่าประเภท tricyclic ตัวอื่น จากการศึกษาเบื้องต้นในมนุษย์พบว่าการใช้ fluoxetine ซึ่งเป็น selective serotonin reuptake inhibitor ให้ผลน่าพอใจ โดยลดผลกระตุ้นของโคเคนที่มีต่อจิตอารมณ์ของอาสาสมัครสุขภาพดี อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วยไม่แสดงผลดีของ fluoxetine เหนือกว่ายาหลอก หรือไม่แสดงประสิทธิภาพรักษายาของยาด้านซีมีเซร่า bupropion หรือ nefazodone

เนื่องจากยาประเภท agonist มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับที่เกิดจากสารเสพติด จึงทำให้เกิดผลต่อระบบสารสื่อประสาทในทำนองเดียวกัน ตัวอย่าง เช่น dopamine receptor agonist ที่ออกฤทธิ์โดยตรงหรือโดยอ้อม การทดสอบยาในสัตว์ตระกูลใกล้เคียงมนุษย์โดยการให้ dopamine receptor agonists ที่ออกฤทธิ์โดยตรงในแบบจำลองการให้โคเคนแก่ตนเองให้ผลไม่น่าพอใจ เช่น การให้ full และ

partial D₁-receptor agonist ระยะยาวกับลิง squirrel ลดการแสวงหาโคเคนและอาหารอย่างไม่จำเพาะเจาะจง หรือลดการแสวงหาโคเคนของลิง rhesus monkeys แบบเจาะจงบางส่วน Quinpirole ซึ่งเป็น D₂/D₃-receptor agonist ไม่ลดการแสวงหาโคเคนอย่างน่าเชื่อถือในขนาดยาที่สูงจนเกิดพิษต่อลิง squirrel. การศึกษา dopamine receptor agonist ในผู้ป่วยให้ผลที่น่าผิดหวังเช่นเดียวกัน ตัวอย่าง เช่น bromocriptine ซึ่งเป็น D₂-like receptor agonist และ partial D₁-like receptor agonist ที่ปกติใช้รักษาโรค Parkinson's disease ในการศึกษาเกี่ยวกับอาสาสมัครสุขภาพดี การให้ bromocriptine ก่อนการให้โคเคนไม่มีผลต่อการเกิดภาวะเคลิบเคลิ้มจากโคเคน และการศึกษา bromocriptine กับผู้ป่วยนอกก็ให้ผลที่ไม่ชัดเจนเช่นเดียวกัน การศึกษาในผู้ป่วยแบบไม่ปกปิดโดยให้ bupropion ร่วมกับ bromocriptine กับผู้ติดโคเคนก็ไม่ได้ผลเมื่อใช้การตรวจวัดโคเคนในปัสสาวะเป็นตัวอย่าง โดยสรุป การศึกษาที่ผ่านมาไม่สนับสนุนการใช้ bromocriptine เพื่อรักษาผู้ป่วยที่เสพติดโคเคน

การศึกษาประเมินผลของ dopamine agonist โดยอ้อมให้ผลลัพธ์หลากหลายที่น่าสนใจ โดย mazindol (ยาลดความอ้วน) ซึ่งยับยั้งการนำกลับของ dopamine และ norepinephrine ไม่เปลี่ยนแปลงผลของโคเคนต่อความรู้สึกของผู้เสพ และไม่มีผลแตกต่างจากยาหลอกในการลดการใช้โคเคน นอกจากนี้ผู้ป่วยยังทนใช้ mazindol ไม่ค่อยได้ แม้ผู้ป่วยที่เสพติดโคเคนจะทนใช้ methylphenidate ซึ่งยับยั้งการนำกลับของ dopamine และ norepinephrine (ใช้รักษา ADHD และ narcolepsy) ได้ดี แต่ก็ไม่มีประสิทธิภาพลดการใช้โคเคน อย่างไรก็ตามการศึกษา disulfiram ซึ่งเป็น dopamine agonist โดยอ้อมในผู้ป่วยให้ผลที่น่าประทับใจ โดยยับยั้งการเปลี่ยน dopamine เป็น norepinephrine ด้วยการขัดขวางเอ็นไซม์ dopamine β-hydroxylase ทำให้ระดับ dopamine ในสมองสูงขึ้น การศึกษากับผู้ป่วยในที่เสพติดโคเคนแต่ไม่ติดสุราแสดงว่า disulfiram ให้ผลดีกว่ายาหลอกในการส่งเสริมการเลิกใช้โคเคน ซึ่งได้ผลคล้ายกับการศึกษาในผู้ป่วยนอกที่เสพติดโคเคน ดังนั้นผลการศึกษานี้ชี้แนะว่า disulfiram อาจมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้เสพติดโคเคนซึ่งไม่ได้ติดสุรา

มีหลักฐานในสัตว์ทดลองและมนุษย์ในระยะหลังซึ่งสนับสนุนการใช้สารกระตุ้นประสาทรักษาการเสพติดโคเคนมากขึ้นตามลำดับ โดยการศึกษาส่วนหนึ่งในสัตว์ซึ่งใกล้เคียงมนุษย์แสดงว่าการให้สารที่ยับยั้ง dopamine transporter ลดการให้โคเคนแก่ตนเองอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการพัฒนายาใหม่ซึ่งมุ่งเป้าที่ dopamine transporter เป็นวิธีการที่มีเหตุผลในการค้นหาบำบัดการติดโคเคน ในทำนองเดียวกันการให้สารกระตุ้นการปลดปล่อย monoamine เช่น d-amphetamine ระยะยาว ลดการให้โคเคนแก่ตนเองของลิง rhesus อย่างเจาะจงและคงนาน ข้อจำกัดของการใช้สารยับยั้ง dopamine transporter และสารกระตุ้นการปลดปล่อย monoamine เป็นยารักษาการเสพติดโคเคนคือโอกาสการใช้ยาดังกล่าวในทางที่ผิดจากผลเพิ่มแรงผลักดันที่ชัดเจนของยา การศึกษาระยะหลังชี้แนะว่าอาจจำกัดประสิทธิภาพเพิ่มแรงผลักดันของยายับยั้ง dopamine transporter ได้โดยการใช้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งต่อ dopamine และ serotonin transporter เช่น อนุพันธ์ของโคเคนที่มีความชอบสูงต่อ dopamine และ serotonin transporter เมื่อให้ทดแทนโคเคนจะไม่เกิดการให้ยาแก่ตนเองที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังลดการให้โคเคนแก่ตนเองในขนาดยาที่จับ dopamine transporter เพียงบางส่วน ในทำนองคล้ายกันสารที่ปลดปล่อย monoamine มีประสิทธิภาพเพิ่มแรงผลักดันที่ลดลงเมื่อความแรงในการปลดปล่อย 5-HT เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับความแรงในการปลดปล่อย dopamine ด้วยเหตุนี้ฤทธิ์ร่วมต่อ dopamine และ serotonin transporter อาจเสริมประสิทธิภาพลดการใช้โคเคนโดยมีโอกาใช้ยาดังกล่าวในทางที่ผิดน้อย ที่สำคัญมี

ข้อมูลที่หนักแน่นจากการศึกษากับผู้ป่วยซึ่งสนับสนุนการใช้ agonist ที่ออกฤทธิ์โดยอ้อมบำบัดการใช้สารกระตุ้นประสาทในทางที่ผิดและการติดยา จากการศึกษาแบบมาตรฐานกับผู้ป่วยเสพติดโคเคนแสดงว่าการใช้ dextroamphetamine ชนิดออกฤทธิ์เนิ่นนานให้ผลดีกว่ายาหลอกในการลดการเสพติดโคเคน

ยาซึ่งมีเป้าหมายที่การทำงานของระบบประสาทซึ่งใช้สารสื่อ glutamate เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากระบบประสาทนี้มีส่วนร่วมในบริเวณสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับความพึงพอใจ และโคเคนชักนำความผิดปกติในการทำหน้าที่ของ glutamate. Modafinil ซึ่งใช้รักษาโรค narcolepsy เพิ่มการทำหน้าที่ของ glutamate โดยกลไกที่ยังไม่ทราบชัด ทำให้การสังเคราะห์และระดับ glutamate เพิ่มขึ้นในสมองส่วน striatum นำสังเกตว่า modafinil มีผลต่อผู้ที่ไม่เสพติดยาตรงข้ามกับกลุ่มอาการขาดโคเคน ในผู้ป่วยที่มีอาการขาดโคเคนอย่างรุนแรง การใช้ modafinil เพิ่มอัตราการเลิกใช้โคเคนและความร่วมมือในการรักษา นอกจากนี้การใช้ modafinil ยังลดความรู้สึกเป็นสุขจากการให้โคเคนในผู้เสพติดโคเคน โดยผู้ป่วยทนการใช้ modafinil ได้เป็นอย่างดี ขณะนี้กำลังทำการศึกษากับผู้ป่วยในวงกว้าง

ในระยะหลัง มีความสนใจต่อระบบ GABAergic มาก ในแง่การเป็นเป้าหมายของการรักษาการเสพติดโคเคน ตัวอย่าง เช่น การศึกษาการใช้ baclofen (ยาลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อด้วยกลไกการเป็น GABA_B agonist แบบไม่เจาะจง) กับผู้เสพติดโคเคน ปรากฏว่า baclofen ส่งเสริมการเลิกใช้โคเคนได้ดีกว่ายาหลอก การรักษาด้วย Tiagabine (ยาด้านลมชักที่เพิ่มระดับ GABA ในซัยแนปส์ด้วยการยับยั้ง GABA transporter) ลดการใช้โคเคนในผู้ป่วยเสพติดฝิ่นที่ได้รับ methadone ทดแทน. Topiramate เป็นยาด้านลมชักอีกตัวที่เสริมการสื่อสัญญาณของ GABA โดยมีการออกฤทธิ์ที่ซับซ้อนรวมถึงการปิดกั้น AMPA/kainate glutamate receptor ในการศึกษาในร่องกับผู้ป่วยเสพติดโคเคน ปรากฏว่าการใช้ topiramate เพิ่มการเลิกใช้โคเคน โดยสรุปการศึกษาเบื้องต้นเหล่านี้ชี้แนะว่าระบบสื่อสัญญาณ GABAergic อาจเป็นเป้าหมายที่มีประโยชน์สำหรับการพัฒนายาบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการพัฒนายาเพื่อใช้บำบัดผู้เสพติดยามีหลายแนวทาง สำหรับการศึกษาด้านเภสัชวิทยาของสารสกัด *Passiflora foetida* ในโครงการวิจัยนี้เป็นแนวทางพัฒนายาเพื่อใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทที่เลือกเป้าหมายการออกฤทธิ์ต่อระบบสื่อสัญญาณ DA และ 5-HT เนื่องจากเป็นระบบประสาทที่มีหลักฐานชัดเจนว่าเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการติดยา จากข้อมูลต่างๆ และผลการทดลองด้าน receptor binding นอก ร่างกาย และแบบจำลองพฤติกรรมในสัตว์ทดลองที่มีอยู่ชี้แนะว่าเป้าหมายดังกล่าวเป็นตัวชี้วัดที่มีประสิทธิภาพในการทำนายศักยภาพของสารทดสอบว่าสามารถพัฒนาเป็นยาบำบัดการเสพติดยาได้หรือไม่ ซึ่งในอนาคตอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์พื้นฐานอย่างหนึ่งของระบบการค้นหาและพัฒนายาใหม่เพื่อรักษาผู้ป่วยเสพติดยา อย่างก็ตามเป้าหมายการออกฤทธิ์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเสพติดยา เช่น GABA receptor, NMDA receptor ก็เป็นตัวชี้วัดที่น่าสนใจ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นหาพบสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ที่มีกลไกการรักษา ตลอดจนประสิทธิภาพและความปลอดภัย แตกต่างไปจากยาที่มีอยู่ในปัจจุบัน

บทสรุป

จากการทดสอบสมุนไพรไทยต่างๆ ปรากฏว่ากะทกรก (*Passiflora foetida*) ซึ่งเป็นสมุนไพรไทยตัวหนึ่งที่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านและในตำรายาโบราณสำหรับรักษาความเจ็บป่วยต่างๆ รวมถึงความผิดปกติทางด้านจิตใจของผู้ป่วย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการที่สนับสนุนการใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ได้แก่ ฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า คลายกังวล และเมื่อทดสอบกับพฤติกรรมการติดยาในสัตว์ทดลองก็แสดงผลด้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาทแอมเฟตามีนอย่างชัดเจน โดยอาจมีกลไกหลักในการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบสารสื่อประสาท dopamine (DA) และ serotonin (5-HT) ในสมอง ขณะนี้ยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติมทางด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเพื่อประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัย ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับผู้ป่วยติดยาต่อไป

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัย

1. ได้สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการเสพติดสารกระตุ้นประสาท และวิธีการใช้ยาที่ได้ผล
2. ได้ข้อมูลสำหรับการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทชั้น Clinical trials ในสถานบำบัดผู้ติดยาเสพติด
3. ได้ระบบวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้คุณภาพสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นขั้นตอนมาตรฐานส่วนหนึ่งในการวิจัยและพัฒนาจากสมุนไพรระดับอุตสาหกรรมของประเทศ

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ภาครัฐ เช่น ทบวงมหาวิทยาลัย กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- หน่วยงานผลิตเภสัชภัณฑ์ เช่น องค์การเภสัชกรรม บริษัทผลิตยาจากสมุนไพรของเอกชน
- สถาบันศาสนาที่ให้การช่วยเหลือด้านการฟื้นฟูสมรรถภาพ เช่น สำนักสงฆ์ถ้ำกระบอก สำนักสงฆ์วัดท่าศรีสุมงคลาราม
- สถานบำบัดผู้ติดยาเสพติดหรือชุมชนบำบัดเช่น ศูนย์เกิดใหม่ จังหวัดราชบุรี และศูนย์ชีวิตใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

- ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการแต่ละส่วนจะนำเสนอต่อที่ประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับสากลที่ได้รับการยอมรับในสาขาวิชา รวมถึงการจดสิทธิบัตร (ถ้าเป็นไปได้)
- นำเสนอผลการศึกษาสารสกัดสมุนไพรสุดท้ายหรือยาเตรียมของสารสกัดสุดท้ายที่ยืนยันฤทธิ์ในสัตว์ทดลอง พร้อมข้อมูลทางเคมีและกายภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อผู้ประกอบการอุตสาหกรรมยาภายในประเทศทั้งภาครัฐและเอกชนเพื่อแสวงหาความร่วมมือในการวิจัยและพัฒนาเชิงพาณิชย์ต่อไป
- จัดอบรมเรื่องสมุนไพรเพื่อการบำบัดผู้ติดยาเสพติด แก่ประชาชน หรือบุคลากรในสถานพยาบาล หรือสถานบำบัด

งานวิจัยในขั้นต่อไป

ทดสอบผลของรูปแบบยาเตรียมที่มีสารสกัดสมุนไพร PF003, PF003-1 และ PF003-2 ตลอดจน Subfractions ที่มีศักยภาพอื่นๆ ต่อพฤติกรรมการติดยาในสัตว์ทดลองและผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวมีผลเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการติดยาอย่างไรบ้าง และมีรูปแบบการประยุกต์ใช้รักษาได้อย่างไร โดยเน้นผลต่อการติดยาโดยร่างกาย (Physiological dependence) การขาดยา (Drug withdrawal) การอยากยา (Drug craving) และการแสวงหายา (Drug seeking)

บรรณานุกรม

- Achat-Mendes, C., Anderson, K.L. and Itzhak, Y. (2003) Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: Long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 45: 106–115.
- Ahmed, S.H. and Koob, G.F. (1997) Cocaine- but not food-seeking behavior is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology (Berl)*. 132: 289-295.
- Anisman, H. and Matheson, K. (2005) Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 525–546.
- Bardo, M.T., Donohew, R.L., and Harrington, N.G. (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* 77: 23-43.
- Becker, A.E., Grinspoon, S.K., Klibanski, A. and Herzog, D.B. (1999) Eating disorder. *N. Engl. J. Med.* 340: 1092-1098.
- Blier, P. and Ward, N.M. (2003) Is There a Role for 5-HT_{1A} Agonists in the Treatment of Depression? *Rev. Biol. Psychiatry.* 53: 193–203.
- Bremner, J.D., Vythilingam, M., Ng, C.K., Vermetten, E., Nageer, A., Oren, D.A., Berman, R.M. and Charney, D.S. (2003) Regional brain metabolic correlates of α -methylparatyrosine-induced depressive symptoms. *JAMA.* 289: 3125-3134.
- Buckley, M.J., Surowy, C., Meyer, M. and Cuzon, P. (2004) Mechanism of action of A-85380 in an animal model of depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28: 723-730.
- Cami, J. and Farre, M. (2003) Drug Addiction. *N. Engl. J. Med.* 349: 975-986.
- Careya, R.J., DePalma, G., Damianopoulos, E., Shanahan, A., Müller, C.P. and Huston, J.P. (2005) Evidence that the 5-HT_{1A} autoreceptor is an important pharmacological target for the modulation of cocaine behavioral stimulant effects. *Brain Res.* 1034: 162–171.
- Chen, C., Kano, M., Abeliovich, A., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Hashimoto, K, Thompson, R.F. and Tonegawa, S. (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* 83: 1233–1242.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E. and Roth, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2003.

- Corrigall, W.A. (1999) Nicotine self-administration in animals as a dependence model. *Nicotine Tob. Res.* 1: 11-20.
- Cowen, P.J. (2000) Psychopharmacology of 5-HT_{1A} receptors. *Nuclear Medicine and Biology* 27: 437–439.
- Crawley, J.N. (1985) Exploratory behaviour models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 37–44.
- Crowley, J.J., Jones, M.D., Leary, O.F. and Lucki, I. (2004) Automated tests for measuring the effects of antidepressants in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78: 269-274.
- Cryan, J.F., Markou, A., and Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 238-245.
- D'Aquila, P.S., Collu, M., Gessa, G.L. and Serra, G. (2000) The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 405: 365–373.
- D'Aquila, P.S., Collu, M., Pani, L., Gessa, G.L. and Serra, G. (1994) Antidepressant-like effect of selective dopamine D₁ receptor agonists in the behavioural despair animal model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* 162: 107-111.
- David, D.J.P., Renard, C.E., Jolliet, P., Hascoet, M. and Bourin, M. (2003) Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 166: 373-382.
- Davis, M. (1986) Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100: 814–824.
- Davis, M., Falls, W.A., Campeau, S. and Kim, M. (1993) Fear-potentiated startle: A neural and pharmacological analysis. *Behav. Brain Res.* 58: 175-198.
- de Wit, H. and Stewart, J. (1981) Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 75: 134-143.
- Dhawan, K. and Sharma, A. (2002) Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linnaeus in healthy male rats. *Life Sci.* 71: 3059–3069
- Dhawan, K., Dhawan, S. and Sharma, A. (2004) *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94: 1–23
- Dhawan, K., Kumar, S. and Sharma, A. (2001) Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linnaeus. *J. Ethnopharmacol.* 78: 165–170

- Dhawan, K., Kumar, S. and Sharma, A. (2001) Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia* 72: 922–926
- Dhawan, K., Kumar, S. and Sharma, A. (2002) Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *J. Ethnopharmacol* 81: 239–244
- Di Chiara, G. (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 13–30.
- Dremencov, E., Gurb, E., Lererb, B., and Newman, M.E. (2003) Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Biol. Psychiatry.* 27: 729– 739.
- Duke, J.A. Handbook of medicinal herbs, 2nd ed. New York: CRC Press, 2002.
- Emilien, G., Maloteaux, J.M., Geurts, M., Hoogenberg, K. and Cragg, S. (1999) Dopamine receptors—physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol. Ther.* 84: 133–156.
- File, S.E. (1987) The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. *Neuropharmacology* 26: 877–886.
- Fletcher, P.J. (1998) A comparison of the effects of risperidone, raclopride, and ritanserin on intravenous self-administration of d-amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60: 55-60.
- Fuchs, R.A., Tran-Nguyen, L.T., Specio, S.E., Groff, R.S. and Neisewander, J.L. (1998) Predictive validity of the extinction/reinstatement model of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)*. 135: 151-160.
- Gambarana, C., Ghiglieri, O., Tagliamonte, A., D'Alessandro, N. and De Montis, G.M. (1995) Crucial Role of D₁ Dopamine Receptors in Mediating the Antidepressant Effect of Imipramine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 147-151.
- Harrod, S.B., Dwoskin, L.P., Crooks, P.A., Klebaur, J.E. and Bardo, M.T. (2001) Lobeline attenuates d-amphetamine self-administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 172-179.
- Havemann, U., Magnus, B., Moller, H.G. and Kuschinsky, K. (1986) Individual and morphological differences in the behavioural response to apomorphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 90: 40-48.
- Hensler, J.G. (2003) Regulation of 5-HT_{1A} receptor functions in brain following agonist or antidepressant administration: Minireview. *Life Sci.* 72: 1665–1682.

- Hogg, S. (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 21–30.
- Howell, L.L. and Kimmel, H.L. (2008) Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem. Pharmacol.* 75: 196 - 217
- Kalia, M. (2005) Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* 54 (Suppl 1): 24–27.
- Klimek, V., Schenck, J.E., Han, H., Stockmeier, C.A. and Ordway. G.A. (2002) Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol. Psychiatry* 52: 740–748.
- Kropf, W. and Kuschinsky, K. (1993) Effects of stimulation of dopamine D₁ receptors on the cortical EEG in rats: different influences by a blockade of D₂ receptors and by an activation of putative dopamine autoreceptors. *Neuropharmacology.* 32: 493-500.
- Leith, N.J. and Barrett, R.J. (1976) Amphetamine and the reward system: evidence for tolerance and post-drug depression. *Psychopharmacologia.* 46: 19-25.
- Lin, H.C., Kang, B.H., Wong, C.S., Mao, S.P. and Wan, F.J. (1999) Systemic administration of D-amphetamine induced a delayed production of nitric oxide in the striatum of rats. *Neurosci. Lett.* 276: 141-144.
- Lopez-Figueroa, A.L., Norton, C.S., Lopez-Figueroa, M.O.,; Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., Lopez, J.F. and Watson, S.J. (2004) Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} Receptor mRNA Expression in Subjects with Major Depression, Bipolar Disorder, and Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55: 225–233.
- Lucki, I., Dalvi, A. and Mayorga, A.J. (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl).* 155: 315-322.
- McKinney Jr., W.T. and Bunney Jr., W.E. (1969) Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch. Gen. Psychiatry* 21: 240–248.
- Meil, W.M. and See, R.E. (1997) Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-administered cocaine. *Behav. Brain Res.* 87: 139-148.
- Melichar, J.K., Daglish, M.R.C. and Nutt, D.J. (2001) Addiction and withdrawal — current views. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 84–90.

- Mello Jr, E.L., Maior, R.S., Carey, R.J., Huston, J.P., Tomaz, C. and Müller, C.P. (2005) Serotonin_{1A}-receptor antagonism blocks psychostimulant properties of diethylpropion in marmosets (*Callithrix penicillata*). *Eur. J. Pharmacol.* 511: 43– 52.
- Menard, J. and Treit, D. (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 591–613
- Mendrek, A., Blaha, C.D. and Phillips, A.G. (1998) Pre-exposure of rats to amphetamine sensitizes self-administration of this drug under a progressive ratio schedule. *Psychopharmacology (Berl)*. 135: 416-422.
- Millan, M.J. (2004) The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 371– 384.
- Millan, M.J., Lejeune, F. and Gobert, A. (2000) Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and adrenergic transmission in frontal cortex: a review, and relevance to the actions of antidepressant agents. *J. Psychopharmacol.* 14: 114– 138.
- Müller, C.P., Carey, R.J., Huston, J.P., and De Souza Silva, M.A. (2007) Serotonin and psychostimulant addiction: Focus on 5-HT_{1A}-receptors. *Prog. Neurobiol.* 81: 133–178.
- Nestler, E.J., Gould, E., Manji, H., Bucan, M., Duman, R.S., Gershenfeld, H.K., Hen, R., Koester, S., Lederhendler, I., Meaney, M.J., Robbins, T., Winsky, L., and Zalcman, S. (2002) Preclinical models: status of basic in depression. *Biol. Psychiatry* 52: 503-528.
- Ohl, F. (2003) Testing for anxiety. *Clin. Neurosci. Res.* 3: 233–238
- Overmier, J.B. and Seligman, M.E.P. (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63: 23–33.
- Papp, M., Moryl, E. and Willner, P. (1996) Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* 296: 129–136.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14: 149-167.
- Petry, R.D., Reginatto, F., de-Paris, F., Gosmann, G., Salgueiro, J.B., Quevedo, J. et al. (2001) Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytother. Res.* 15: 162– 164.
- Piazza, P.V. and Le Moal, M. (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 67-74.

- Piazza, P.V., Deminiere, J.M., le Moal, M. and Simon, H. (1990) Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res.* 514: 22-26.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N. and Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 379-391.
- Porsolt, R.D., Bertin, A. and Jalfre, M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 299: 327-336.
- Porsolt, R.D., LePichon, R. and Jalfre, R. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732.
- Robbins, S.J., Ehrman, R.N., Childress, A.R. and O'Brien, C.P. (1997) Relationships among physiological and self-report responses produced by cocaine-related cues. *Addict. Behav.* 22: 157-167.
- Robinson, T.E. and Berridge, K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18: 247-291.
- Santos, K.C., Santos, C.A.M. and de Oliveira, R.M.W. (2005) *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *J. Ethnopharmacol.* 100: 306-309
- Schloss, P. and Henn, F.A. (2004) New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. *Pharmacol. Ther.* 102: 47- 60.
- Schwartz, K., Yadid, G., Weizman, A. and Rehavi, M. (2003) Decreased limbic vesicular monoamine transporter 2 in a genetic rat model of depression. *Brain Res.* 965: 174-179.
- Self, D.W. (1998) Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction. *Ann. Med.* 30: 379-389.
- Self, D.W. and Nestler, E.J. (1998) Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Depend.* 51: 49-60.
- Sherman, A.D., Sacquitne, J.L. and Petty, F. (1982) Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 449-454.
- Soleimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Boustia, D., Misslin, R. and Mortier, F. (1997) Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* 57: 11 - 20.
- Spanagel, R. and Weiss, F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status *Trends Neurosci.* 22: 521-527.

- Sun, M.-K. and Alkon, D.L. (2003) Open space swimming test to index antidepressant activity. *J. Neurosci. Meth.* 126: 35–40.
- Sun, M.-K. and Alkon, D.L. (2004) Induced depressive behavior impairs learning and memory in rats. *Neuroscience* 129: 129–139.
- Tihonen, J., Kuikka, J., Rasänen, P., Lepola, U., Koponen, H., Liuska, A., et al. (1997) Cerebral benzodiazepine receptor binding and distribution in generalized anxiety disorder: a fractal analysis. *Mol. Psychiatry* 2: 463 – 471.
- Vogel, H.G., eds. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
- Willner, P. (1995) Animal models of depression: validity and applications. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 49: 19–41.
- Willner, P., Muscat, R. and Papp, M. (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia. A realistic animal model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* 296: 129–136.
- Wise, R.A. (1996) Neurobiology of addiction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 243–251.
- Yamada, J., Sugimoto, Y. and Yamada, S. (2004) Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 504: 207–211.
- Yamada, K., Noda, Y., Hasegawa, T., Komori, Y., Nikai, T., Sugihara, H., and Nabeshima, T. (1996). The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 460-466.
- Yan, J. J., Cho, J. Y., Kim, H. S., Kim, K. L., Jung, J. S., Huh S. O., Suh, H. W., Kim, Y. H., and Song, D. K. (2001). Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Brit. J. Pharmacol.* 133: 89-96.
- Zomkowski, A.D.E., Rosa, A.O., Lin, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B. and Rodrigues, A.L.S. (2004) Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res.* 1023: 253-263.

โครงการวิจัยที่ 4

การศึกษาการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารและการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดสมุนไพร
โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

Permeability studies of herbal extracts through intestinal epithelium and
blood-brain barrier in cell culture models

กุมภาพันธ์ 2551

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นนทิมา วรธนะภูติ
(Assistant Professor Dr. Nontima Vardhanabhuti)
หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์
(Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun)

รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์
(Associate Professor Dr. Duangdeun Meksuriyen)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญศรี องค์กรพัฒน์กุล
(Assistant Professor Dr. Boonsri Ongpipattanakul)

ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสนับสนุนและช่วยประสานงานในการขอทุนวิจัยสำหรับแผนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเภสัชกรรม ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่และเครื่องมือวิจัย ขอขอบคุณ Dr. A. H. Schinkel แห่งสถาบัน Netherlands Cancer Institute ประเทศเนเธอร์แลนด์ ที่ได้กรุณาให้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MDR1 เพื่อใช้ในการวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณ Dr. Istvan A. Krizbai แห่งสถาบัน Hungarian Academy of Sciences ประเทศฮังการี ที่ให้ทุนแก่ ดร.พิไลวรรณดี หุตะเมขลิน ในช่วงที่เป็นนิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อไปทำวิจัยที่ประเทศฮังการีเป็นเวลา 2 ปี และให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดจนทำให้งานวิจัยในส่วนของการสร้างแบบจำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมองจากเซลล์บุโพรงหลอดเลือด และ astrocyte ของหนูขาวในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาให้มีมาตรฐานระดับสากล โดยการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งได้รับความสนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2547

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการดูดซึมสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการบำบัดผู้ป่วยสารเสพติดจากทางเดินอาหาร และเพื่อสร้างแบบจำลองในการศึกษาการซึมผ่านของสารดังกล่าวเข้าสู่สมองเพื่อคัดกรองสารสกัดในส่วนที่เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อไป รวมทั้งใช้ในการตรวจสอบโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาของสารสกัดกับพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารและเยื่อหลอดเลือดสมองที่มีหน้าที่ในการจำกัดการขนส่งของสารแปลกปลอม คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 ในการสร้างแบบจำลองของการดูดซึมสารสกัดจากทางเดินอาหาร พบว่าระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมในการเป็นแบบจำลองที่ต้องการ โดยเกิดเป็นเซลล์ชั้นเดียวที่แน่น มีค่าความต้านทานไฟฟ้าข้ามเซลล์สูง ไม่ยอมให้ฟีนอลเรดซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีผ่าน แต่ยอมให้สารมาตรฐานที่ซึมผ่านเซลล์ได้ดี คือ ซีโอฟิลีนผ่านได้ใกล้เคียงกับผลที่เคยมีผู้รายงานไว้ และมีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนที่เหมาะสมเมื่อทดสอบด้วยโพรพาราโนลอลไฮโดรคลอไรด์และโรดามีน 123 ซึ่งเป็นซับสเตรตของพี-ไกลโคโปรตีน เมื่อเลือกสารสกัดจากสมุนไพรบางส่วนมาทดสอบการซึมผ่านเบื้องต้นพบว่า สารสกัดสมุนไพรที่นำมาทดสอบไม่มีการซึมผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นระบบทดสอบ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากถูกจำกัดด้วยค่าการละลาย สำหรับแบบจำลองเพื่อศึกษาการซึมผ่านของสารเข้าสู่สมอง คณะผู้วิจัยได้ทดลองสร้างแบบจำลองจากเซลล์บุโพรงหลอดเลือดร่วมกับเซลล์แอสโตรไซต์ที่แยกจากสมองหนูขาว พบว่าได้เซลล์ชั้นเดียวที่แน่น มีค่าความต้านทานไฟฟ้าข้ามเซลล์ใกล้เคียงกับแบบจำลองที่มีผู้รายงานไว้ ซึ่งอาจนำไปใช้เบื้องต้นในการติดตามการผ่านของสารเข้าสู่สมองได้ นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาการรบกวนการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนของสารสกัดจากสมุนไพรในส่วนที่มีฤทธิ์รบกวนการจับกับตัวรับที่สมองของนิวโรทรานสมิตเตอร์อะโกนิสต์ในการทดลองแบบนอกกายได้ดี โดยการติดตามการสะสมของสารโรดามีน 123 ซึ่งเป็นซับสเตรตของ พี-ไกลโคโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 เทียบกับในเซลล์ LLC-MDR1 ซึ่งมีการแสดงออกของพี-ไกลโคโปรตีนสูง พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่นำมาศึกษามีผลรบกวนการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนโดยทำให้มีการสะสมของสารโรดามีน 123 ในเซลล์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น โดยเห็นผลในเซลล์ชนิด LLC-MDR1 ได้ชัดเจนกว่า ข้อมูลที่ได้มีประโยชน์ในการนำไปช่วยในคัดเลือกสารสกัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาต่อไป รวมทั้งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปกำหนดค่าเดือนในการใช้สารสกัดจากสมุนไพรร่วมกับยาหรือสารอื่น ๆ ที่เป็นซับสเตรตของพี-ไกลโคโปรตีนอีกด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The aim of this study was to establish *in vitro* models to predict gastrointestinal (GI) absorption and brain permeation, as well as interaction with P-glycoprotein, of Thai herbal extract that had potential for treatment of narcotic addicts. A cell culture model for GI absorption using Caco-2 cells was successfully constructed and validated. The Caco-2 culture gave tight monolayers with high transepithelial electrical resistance (TEER). The resultant monolayer totally precluded transport of highly water-soluble phenol red. The apparent permeability of theophylline, a highly permeable compound, was in agreement with those reported in the literature. P-glycoprotein (P-gp) expression was confirmed with two known P-gp substrates, propranolol HCl and rhodamine 123. When selected fractions of the herbal extract were tested on the model, no significant permeation of the extract was detected. This apparently solubility-limited absorption might be attributed to the hydrophobic nature of the extract. A model for brain permeation was constructed from a co-culture of rat-brain endothelial cells and astrocytes. The resultant cell monolayers had a comparable TEER value to those reported in the literature. The system might be suitable as a preliminary model for monitoring brain permeation of interested compounds. In addition, some selected fractions of the extract interfered with P-gp function, as evident from increased cellular accumulation of rhodamine 123 in LLC-PK1 and LLC-MDR1 cells. The fractions tested were those manifesting high inhibitory effect on brain-receptor binding of neurotransmitter agonists *in vitro*. This information will be helpful in selecting the proper fraction of the extract for further development. It will also be useful in denoting appropriate warnings if the extract is to be used concomitantly with other P-gp substrates.

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ | 4-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 4-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 4-iv |
| สารบัญ | 4-v |
| สารบัญตาราง | 4-vi |
| สารบัญรูป | 4-vii |
| คำย่อที่ใช้ | 4-viii |
| บทนำ | 4-1 |
| 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 4-1 |
| 2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย | 4-5 |
| 3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 4-6 |
| 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4-6 |
| วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย | 4-7 |
| 1. วัสดุอุปกรณ์ | 4-7 |
| 2. วิธีดำเนินการวิจัย | 4-7 |
| 2.1 การศึกษาการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 | 4-7 |
| 2.2 การศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรมะเขือเทศโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ชนิดผสม | 4-11 |
| 2.3 การทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศ | 4-16 |
| 3. ผลการวิจัย | 4-16 |
| 3.1 การศึกษาการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2 | 4-16 |
| 3.2 การศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรมะเขือเทศโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ชนิดผสม | 4-21 |
| 3.3 การทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศ | 4-25 |
| การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย | 4-28 |
| บรรณานุกรม | 4-32 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4-1 | Flux และ permeability ของ theophylline ในทิศทางของการดูดซึม (A \rightarrow B) และในทิศทางตรงข้าม (B \rightarrow A) | 4-17 |
| 4-2 | Flux และ permeability ของ propranolol HCl ในทิศทางของการดูดซึม (A \rightarrow B) และในทิศทางตรงข้าม (B \rightarrow A) | 4-18 |
| 4-3 | Flux และ permeability ของ rhodamine 123 ในทิศทางของการดูดซึม (A \rightarrow B) และในทิศทางตรงข้าม (B \rightarrow A) | 4-18 |
| 4-4 | ค่า apparent permeability ของ rhodamine 123 และ efflux ratio ในสภาวะที่มีและไม่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μ M | 4-18 |
| 4-5 | ค่า apparent permeability และ efflux ratio ของ naringenin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 4-20 |
| 4-6 | ผลการรบกวนการสะสมของ rhodamine 123 ที่เกิดจากสารสกัดสมุนไพรใน fraction ต่าง ๆ | 4-26 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4-1 | ค่า TEER ของ Caco-2 monolayer ที่วัดได้ระหว่างวันที่ 7-21 หลังการหว่านเซลล์ | 4-17 |
| 4-2 | ค่า apparent permeability ของ rhodamine 123 ในสภาวะที่มีและไม่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μ M | 4-19 |
| 4-3 | Transport profile ของ rhodamine 123 ในทิศทางของ B \rightarrow A ในสภาวะที่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μ M | 4-19 |
| 4-4 | รูปร่างหลอดเลือดและเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่แยกได้จากสมองหนูขาวบริเวณ cerebrum โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี puromycin ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 4-23 |
| 4-5 | เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่ปนเปื้อนด้วยเซลล์ชนิดอื่น (ลูกศรชี้) ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี puromycin | 4-24 |
| 4-6 | เทคนิค immunofluorescence นำมาใช้ศึกษาชนิดของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดของสมองหนูขาว ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน vWF | 4-24 |
| 4-7 | เทคนิค immunofluorescence นำมาใช้ศึกษาชนิดของโปรตีนที่เชื่อมระหว่างเซลล์บุโพรงหลอดเลือดของสมองหนูขาว เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน (A) occludin; (B) claudin-5; (C) cadherin และ (D) ZO-1 | 4-25 |
| 4-8 | การสะสมของ rhodamine 123 เมื่อให้ร่วมกับสารสกัดสมุนไพรใน fraction ต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 เปรียบเทียบกับในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MDR1 | 4-27 |

คำย่อที่ใช้

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| BBB | Blood-brain barrier |
| BSA | Bovine serum albumin |
| cm | Centimeter |
| CO ₂ | Carbon dioxide |
| CYP | Cytochrome-P oxidase enzyme |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNase | Deoxyribonuclease |
| ECGF | Endothelial cell growth factor |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| FBS | Fetal bovine serum |
| G | Gauge |
| g | Gravity |
| HCl | Hydrochloride |
| LDH | Lactate dehydrogenase |
| mg | Milligram |
| min | Minute |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NaOH | Sodium hydroxide |
| nm | Nanometer |
| nmol | Nanomole |
| P _{app} | Apparent permeability coefficient |
| PBS | Dulbecco's phosphate buffered saline |
| P-gp | P-glycoprotein |
| sec | Second |
| S.E.M. | Standard error of mean |
| TEER | Transepithelial electrical resistance |
| USA | United States of America |
| UV | Ultraviolet |
| vWF | von Willebrand factor |
| λ | Wavelength |
| μM | Micromolar |

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

การใช้สมุนไพรแบบพื้นบ้านมักใช้ส่วนของพืชหรือสัตว์ซึ่งมีองค์ประกอบของสารหลากหลายทั้งที่มีฤทธิ์และไม่มีฤทธิ์ทางการรักษา รวมถึงอาจมีสารที่ก่ออาการไม่พึงประสงค์หรือพิษปะปนอยู่ ขนาดใช้ของสมุนไพรพื้นบ้านจะค่อนข้างสูง จึงเป็นการยากที่จะนำสมุนไพรมาพัฒนาต่อเป็นรูปแบบของยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้การใช้สมุนไพรมีความสะดวก แพร่หลาย และมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยทั่วไปในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นรูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมจึงมักใช้สารสกัดสมุนไพร การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรจะลดความซับซ้อนขององค์ประกอบของสมุนไพร และช่วยกำจัดสารที่ไม่ต้องการในสมุนไพรได้บางส่วน อย่างไรก็ตาม กระบวนการสกัดที่ใช้สามารถทำให้ชนิดและปริมาณของสารที่ได้แตกต่างจากองค์ประกอบเดิมของสมุนไพร ดังนั้น จึงต้องศึกษาคุณสมบัติต่างๆของสารสกัดใหม่ เพื่อให้แน่ใจว่าส่วนประกอบที่คงเหลือยังปลอดภัยและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งหมายถึง สามารถถูกดูดซึมไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการและออกฤทธิ์ได้ การเข้าถึงเนื้อเยื่อเป้าหมายเป็นคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับชีวเภสัชกรรม อันเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสาร กับการทำงานของโครงสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนหรือกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ร่วมกันเป็นเนื้อเยื่อที่ขวางกั้นการผ่านเข้าออกของสาร (เช่น เยื่อบุผนังเส้นเลือดที่ผ่านสมอง หรือเยื่อบุทางเดินอาหาร) และอาจมีบทบาทเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารระหว่างการซึมผ่านเนื้อเยื่อโดยเอนไซม์ที่สร้างจากเซลล์เหล่านั้นด้วย การทำงานของสารต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายจึงอาจเปลี่ยนแปลง รวมถึงอาจมีฤทธิ์หรือพิษอื่นเสริมขึ้นหรือลดได้ สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์ในห้องปฏิบัติการ อาจไม่มีฤทธิ์ตามที่ต้องการในสัตว์ทดลอง ในการวิจัยและพัฒนาสารที่จะใช้เป็นยา จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนศึกษาเพื่อยืนยันในสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม สังคมปัจจุบันมีการตระหนักถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลองมากขึ้น ประกอบกับการศึกษาในสัตว์ทดลองเป็นการศึกษาที่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงมีการพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงบางชนิดให้มีคุณสมบัติที่สะท้อนถึงชีวเภสัชกรรมระหว่างสารที่ศึกษาเพื่อเป็นยาและเยื่อบุทางเดินอาหาร โดยเฉพาะเยื่อบุที่ลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการดูดซึมสูงสุด รวมทั้งชีวเภสัชกรรมระหว่างสารที่ศึกษาเพื่อเป็นยาและเยื่อบุผนังเส้นเลือดที่ผ่านสมอง เพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยคัดเลือกสารที่ควรมีการพัฒนาหรือศึกษาต่อไปในสัตว์ทดลองหรือเพื่อใช้คาดคะเนปัญหาอันเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสาร เพื่อเป็นแนวคิดในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเคมีเพิ่มเติม

การทดสอบการดูดซึมสารผ่านทางเดินอาหารโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เป็นวิธีการที่มีการพัฒนามาเป็นเวลานาน (Hidalgo et al., 1989) และ เป็นที่ยอมรับในกระบวนการวิจัยและพัฒนาโดยบริษัทชั้นนำของโลกในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นวิธีการที่

ประหยัดเวลา และสามารถใช้ในการทำนายผลในเรื่องการดูดซึมยาจากทางเดินอาหารได้ดี (Gan and Thakker, 1997) จึงเหมาะสำหรับการเลือกหาสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาที่สามารถให้โดยการรับประทานได้ เนื่องจากผลการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับการดูดซึมของยาที่ให้โดยการรับประทานในมนุษย์ (Artursson and Karlsson, 1991; Stewart et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลสำหรับการออกแบบการทดลองที่เป็นมาตรฐานค่อนข้างชัดเจน เนื่องจากมีการพัฒนาระบบเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับใช้เป็นมาตรฐานในการวิจัยและพัฒนายา เพื่อทำให้ระยะเวลาในการวิจัยและพัฒนาสั้นลง (Mainprize and Grady, 1998) การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการศึกษาการดูดซึมจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับการดูดซึมยาในระดับเซลล์ ซึ่งรวมถึงกลไกในการผ่านเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็กของสารนั้นทั้งระดับการดูดซึมและการขนส่ง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการใช้โปรตีนพวก transporter ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถให้ข้อมูลบางส่วนในเรื่องการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารในระหว่างการผ่านเซลล์ผนังลำไส้เล็ก (presystemic metabolism) ได้ และมีประโยชน์ในการให้ข้อมูลเกี่ยวกับพิษของยาหรือสารที่อาจมีต่อเซลล์ลำไส้เล็กโดยตรง (Gan and Thakker, 1997) เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้มาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ดังนั้นจึงมีข้อดีที่มีคุณสมบัติด้านสัณฐานและสรีรวิทยาของเซลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ปกติของลำไส้ของมนุษย์มากกว่าการใช้แบบจำลองจากสัตว์ ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าความแตกต่างของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารในแง่ดังกล่าวมีผลต่อกระบวนการดูดซึม และเป็นปัจจัยที่ต้องนำมาพิจารณาในการคัดเลือกแบบจำลอง (Dressman and Yamada, 1991; Dressman and Lennernas, 2000) เมื่อนำเซลล์ Caco-2 มาเพาะเลี้ยงในสภาวะของห้องปฏิบัติการเซลล์เพาะเลี้ยงแล้ว เซลล์ Caco-2 จะเปลี่ยนแปลงไปมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์ของลำไส้เล็กที่ทำหน้าที่ในการดูดซึมสาร (Mainprize and Grady, 1998) โดยพบว่าบนผนังเซลล์ของระบบเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มี โปรตีนพวก transporter ที่ใช้ในการขนส่งสารอาหารพวกกรดอะมิโน, น้ำตาล, เปปไทด์, กรดน้ำดี และ cobalamin-intrinsic factor เช่นเดียวกับที่พบในลำไส้เล็ก (Gan and Thakker, 1997) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์หลายชนิดที่พบได้ที่ brush-border membrane ของเซลล์ของลำไส้เล็กด้วย เช่น sucrase, alkaline phosphatase, aminopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase, γ -glutamyl transpeptidase เป็นต้น และพบเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมบางตัว เช่น CYP1A1, glucuronidase, sulfotransferase, glutathione S-transferase และยังมีรายงานว่าพบ เอนไซม์ cytochrom P-450 ที่มีความคล้ายคลึงกับ CYP3A ที่พบในเซลล์ลำไส้เล็กของมนุษย์ (Gan and Thakker, 1997) เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ยังมีความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในการลำเลียงสาร เช่น P-glycoprotein (P-gp) บน brush-border membrane โปรตีนนี้มีความสำคัญในการขับยาออกจากเซลล์ของลำไส้เล็ก ทำให้ยาที่เป็นขั้วสเตอรด์ไม่สามารถถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีเท่าที่ควร ทั้งๆที่มีคุณสมบัติในการละลายในไขมันที่เหมาะสมสำหรับการซึมผ่านผนังเซลล์ และเป็นปัจจัยที่นักวิจัยตระหนักถึงความสำคัญมากขึ้นในการพัฒนาและระบบนำส่งยา (Arimori and Nakano, 1998; Fleisher, 2000) ตัวอย่างยาที่มี

รายงานว่าเป็นยับยั้งของ P-gp ที่พบในทางเดินอาหาร ได้แก่ vinblastine, cyclosporin A และ celiprolol เป็นต้น (Burton et al., 1997) ตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการขนส่งสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์วัดได้จากค่าความต้านทานการซึมผ่านของประจุ (transepithelial electrical resistance, TEER) ของเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งในกรณีของ Caco-2 monolayer มีค่าประมาณ $300-400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแน่นของ epithelial membrane และเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จากลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Fleisher, 2000)

ระบบในการทดสอบการซึมผ่านของสารเข้าสู่สมองในห้องปฏิบัติการ (in vitro) มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาหรือสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง เนื่องจากการสังเคราะห์หรือค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติด้วยกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงและรวดเร็ว เช่น การใช้เทคนิคของ combinatorial chemistry ร่วมกับ high throughput screening ทำให้ได้สารที่มีศักยภาพเป็นจำนวนมาก การทดสอบในสัตว์ทดลองกับสารจำนวนมากในลักษณะของการ screening ทำได้ยาก มีราคาแพง และไม่เหมาะสมทางจริยธรรม เมื่อพิจารณาในด้านโครงสร้าง ชั้นของเซลล์ที่สารจะต้องซึมผ่านก่อนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางเรียกว่า blood-brain barrier (BBB) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์หลอดเลือด (endothelial cell) ที่ไปเลี้ยงสมอง ร่วมกับเซลล์เกลียชนิด astrocyte โครงสร้างส่วนที่เป็นอุปสรรคในการซึมผ่านของสารคือ เซลล์หลอดเลือดบริเวณสมองซึ่งเชื่อมระหว่างกันอย่างแน่นหนาอย่างมากด้วยโปรตีนชนิดพิเศษ (tight junction protein) เช่น occludin และ claudin โดยมีค่า TEER สูงถึง $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Engelbertz et al., 2000) เซลล์หลอดเลือดทำงานร่วมกับเซลล์เกลีย เซลล์ที่อยู่รอบหลอดเลือด และ extracellular matrix component เพื่อควบคุมการผ่านของสารเข้าสู่สมองทาง BBB ให้อยู่ในสภาพปกติ โครงสร้างของ BBB สามารถป้องกันการซึมผ่านของสารต่างๆได้ดี เนื่องจากไม่มี fenestra และมี pinocytotic vesicle อยู่ น้อย มี tight junction ที่แคบมาก และ ส่วนของ tight junction คิดเป็นพื้นที่เพียง 0.01% ของพื้นที่ทั้งหมด ดังนั้นสารที่ละลายได้ดีในน้ำจึงมีโอกาสดูดซึมเข้าสู่สมองได้น้อยมาก นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์หลายชนิด เช่น monoamine oxidase และ reductase ทำให้สารถูกทำลาย หรือมี electrostatic barrier ที่เกิดจากการมี sulfated glycoprotein บนเซลล์เมมเบรน ได้แก่ sulfated heparan (Eddy et al., 1997) การขนส่งสารอาหารเข้าสู่สมองต้องใช้กระบวนการพิเศษ เช่น กระบวนการ facilitated diffusion ซึ่งต้องอาศัยโปรตีนในการลำเลียง เช่น กลูโคสต้องอาศัยโปรตีน glucose transporter (Glut 1) การลำเลียงกรดอะมิโนขนาดใหญ่ต้องอาศัยโปรตีน L-transporter ที่มีคุณสมบัติเฉพาะซึ่งมีค่าทางจลนศาสตร์ที่แตกต่างจากโปรตีน transporter ที่ใช้ในการลำเลียงกรดอะมิโนที่พบในเนื้อเยื่ออื่นๆ (Bradbury, 2000) นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนที่ใช้ในการขับยากลับเข้าสู่กระแสเลือด เช่น P-gp, multidrug resistance protein และ multispecific organic anion transporter (Tsuji and Tamai, 1997; Suzuki et al., 1997; Begley et al., 2000) ทำให้การผ่านของสารเข้าสู่สมองเกิดขึ้นได้ยากยิ่งขึ้น โดยสรุปแล้วเป็นที่ยอมรับว่าการผ่านของสารเข้าสู่สมองเกิดได้ยากเนื่องจาก BBB มี tight junction ที่แน่นมาก และเกือบไม่มีกระบวนการ pinocytosis ของเซลล์

หลุดเลือดเกิดขึ้นเลย สารที่จะผ่านเข้าสู่สมองได้จะต้องละลายในไขมันได้ดีมากและมีขนาดโมเลกุลเล็ก หรือ เป็นสารที่เป็นขั้วสเตอริคของ โปรตีน transporter ที่มีอยู่บน BBB (Washington et al., 2001) การดูดซึมของยาหรือสารจากบริเวณที่ให้ยาเข้าสู่กระแสเลือดไม่ได้เป็นหลักประกันว่าสารเหล่านั้นจะเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้เสมอไป การสร้างระบบในการทดสอบการซึมผ่านของสารเข้าสู่สมองแบบ *in vitro* จึงเป็นความจำเป็นและอยู่ในความสนใจของนักวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดเป็นแบบจำลองของ BBB เช่น ECV304 และ RBE4.B เป็นต้น (Eddy et al., 1997; Scism et al., 1999; Cestelli, A. et al., 2001) แต่การพัฒนาไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เนื่องจากแบบจำลองที่พัฒนาได้มักมีค่า TEER ต่ำกว่าค่าที่มีรายงานใน *in vivo* มาก นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการใช้เซลล์บุโพรง หลอดเลือดที่แยกได้จากสมองหนูขาวโดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์ astrocyte เป็นแบบจำลองของ BBB อีกด้วย (Perrière et al., 2007)

สำหรับยารับประทานที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางนั้น กระบวนการที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือการนำส่งยาเข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย ร่างกายมีกลไกในการป้องกันการแพร่ผ่านของสารแปลกปลอม (xenobiotics) เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางโดยการเกิดกระบวนการ efflux ที่ BBB เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมไม่ให้เข้าถึงสมองได้ ซึ่ง efflux protein ที่สำคัญตัวหนึ่งที่ BBB ได้แก่ P-gp ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่สมองในปริมาณเพียงพอที่จะออกฤทธิ์ได้ ยาที่สามารถนำมาใช้กับระบบประสาทส่วนกลางได้ดีควรเป็นยาที่มีการซึมผ่านด้วยกระบวนการ passive transport และไม่เป็น ขั้วสเตอริคที่ดีของ P-gp (Mahar Doan et al., 2002) ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรกับ P-gp จึงเป็นข้อมูลที่จำเป็นต่อการพัฒนายาที่ต้องการให้ไปออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง นอกจาก P-gp จะมีการแสดงออกที่ endothelial cell ของ BBB แล้ว ยังพบ P-gp ที่ enterocyte ของลำไส้เล็กในปริมาณสูงอีกด้วย อันตรกิริยาของสารสำคัญหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของสารสกัดสมุนไพร กับ P-gp ที่ลำไส้เล็กอาจมีผลทำให้เกิดอันตรกิริยากับยาที่เป็นขั้วสเตอริคของ P-gp ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง bioavailability ของยานั้น ๆ มีรายงานว่าสารสกัดหรือส่วนประกอบในพืชหลายชนิด มีส่วนประกอบซึ่งอาจเกิดอันตรกิริยากับ P-gp ได้ เช่น grapefruit juice มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิด drug efflux ในลำไส้เล็กโดยผ่านการทำงานของ P-gp (Soldner et al., 1999) ดังนั้น การศึกษาอันตรกิริยาของสารที่จะนำมาพัฒนาเป็นยากับ P-gp จึงมีความจำเป็นในกระบวนการวิจัยและพัฒนาใหม่โดยทั่วไป ไม่จำกัดอยู่เฉพาะยาที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางเท่านั้น ทั้งนี้ การศึกษาอันตรกิริยากับ P-gp อาจทำได้หลายวิธี เช่น โดยการศึกษาผลต่อ ATPase activity ที่จับอยู่กับ recombinant human P-gp หรือ โดยศึกษาจาก binding assay ของสารที่ใช้เป็น marker หรืออาจจะทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของ P-gp โดยศึกษาการสะสมของสารที่ใช้เป็น marker ภายในเซลล์ หรือ ศึกษาการส่งผ่านอย่างมีทิศทางของสารที่ใช้เป็น marker (Varma et al., 2003; Foster et al. et al.,

2001) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยงโดยศึกษาการสะสมของสารที่ใช้เป็น marker มีข้อดีในแง่ที่สามารถศึกษาการเกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจากผลการรบกวนการทำงานของ P-gp จากสารที่สนใจได้โดยตรง และมีการรบกวนการวิเคราะห์น้อยโดยเฉพาะเมื่อทำการทดสอบกับ สารสกัดจากพืช ซึ่งอาจมีสิ่งเจือปนอยู่มาก เนื่องจากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถใช้วิธี วัดทางอ้อมโดยวัดการสะสมของสารที่เป็นซับสเตรต ของ P-gp ในเซลล์หลังจากล้างสารสกัด ออกแล้วได้ ส่วนการวัดโดย ATPase activity เป็นการวัดการเกิดสีใน reaction mixture (Foster et al. et al., 2001) ซึ่งอาจถูกรบกวนจากส่วนประกอบต่างๆของสารสกัดได้ง่าย และ การศึกษาโดยใช้ binding assay มีข้อจำกัดเนื่องจากมีประสิทธิผลต่ำทำให้ความเชื่อถือได้ของ ผลการทดลองน้อยลงด้วย (Varma et al., 2003)

2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

การศึกษาระบบการดูดซึมยาผ่านทางเดินอาหารและการซึมผ่านของยาเข้าสู่สมอง ให้ข้อมูลทางชีวเภสัชกรรมที่จำเป็นในกระบวนการพัฒนายาออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ส่วนกลาง เพื่อช่วยในการคัดเลือกสารที่สามารถเข้าสู่บริเวณออกฤทธิ์และมีศักยภาพในการ นำไปพัฒนาเป็นยารับประทาน หรือนำข้อมูลไปใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารให้มี คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมาะสมยิ่งขึ้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรให้มี ประสิทธิภาพและคุณภาพในมาตรฐานเดียวกับยาแผนปัจจุบันต้องเป็นไปตามหลักเกณฑ์ เดียวกับการพัฒนายาจากสารสังเคราะห์ การใช้วัตถุดิบเป็นสมุนไพรซึ่งมีความซับซ้อนของ องค์ประกอบมาก ทำให้การพัฒนาตามหลักเกณฑ์ดังกล่าวเป็นไปได้ยาก โครงการนี้จึงให้ความ สนใจที่จะทำการประเมินสารสกัดจากสมุนไพรซึ่งมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนน้อยลง เพื่อพัฒนา เป็นผลิตภัณฑ์ยาแทนการใช้สมุนไพรโดยตรง การใช้สารสกัดสมุนไพรมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ยาในรูปแบบยาแผนปัจจุบันเป็นที่ยอมรับ และมีผลิตภัณฑ์ในตลาดยาที่มีมูลค่าสูง ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์สารสกัด Ginkgo จาก *Ginkgo biloba* ซึ่งมีการผลิตและการควบคุมคุณภาพตาม หลักเกณฑ์การพัฒนายาสากล และมีการทดลองทางคลินิกยืนยันผลการใช้ (Williamson and Wyandt, 1998) แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่มีการพัฒนาด้วยกระบวนการดังกล่าว ในปัจจุบันมี เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น โครงการวิจัยนี้เลือกทำการทดสอบในเซลล์ เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการพัฒนาและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการวิจัยและพัฒนายา ใหม่ เนื่องจากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการวิจัยทำให้สามารถประเมินผลขั้นต้นได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อมีจำนวนของสมุนไพรและสารสกัดจากสมุนไพรที่จะต้องประเมินเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงช่วยให้สามารถควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้ง่าย ลดความแปรปรวนระหว่างการทดลองแต่ละครั้ง ช่วยให้สามารถศึกษากลไกย่อยซึ่งไม่สามารถ ศึกษาในสัตว์ทดลองได้ จึงเหมาะกับการวิจัยที่มีปริมาณสารที่จะใช้ทดสอบจำกัดเนื่องจาก ต้องการปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบต่ำกว่าในสัตว์ทดลอง และยังช่วยลดปัญหาในด้าน จริยธรรมอีกด้วย ดังนั้น การสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาระบบการดูดซึมยาผ่านทางเดิน

อาหารและการซึมผ่านของยาเข้าสู่สมองที่ได้มาตรฐาน จึงเป็นความจำเป็นและเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการวิจัยและพัฒนายาใหม่

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการดูดซึมของสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อด้านสารกระตุ้นประสาทผ่านทางเดินอาหาร โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2

2. เพื่อศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อด้านสารกระตุ้นประสาท โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ชนิดผสม (co-culture of endothelial cells and astrocytes)

3. เพื่อศึกษาแนวโน้มในการรบกวนการทำงานของ efflux transporter โดยเฉพาะ P-gp ของสารสกัดสมุนไพร เพื่อทำนายโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาของสารสกัดสมุนไพรกับยาอื่น ๆ ที่เป็นซับสเตรตของ P-gp

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อด้านสารกระตุ้นประสาทที่สามารถถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการกำหนดขนาดใช้และพัฒนาสารสกัดดังกล่าวให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพ

2. เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อด้านสารกระตุ้นประสาทหรือ เพื่อให้ได้สารที่มีการซึมผ่านเข้าสู่บริเวณที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ได้ดีหรือมีการออกฤทธิ์ได้นานขึ้นทำให้สามารถกำหนดขนาดใช้ และ/หรือกำหนดคำแนะนำในการใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ ได้ชัดเจน เพื่อการพัฒนาสารสกัดให้สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3. เพื่อให้ได้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบสารทั้งที่ได้จากสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาเป็นยาสำหรับออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางสำหรับให้โดยการรับประทาน ซึ่งหน่วยงานวิจัยอื่นๆสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2, LLC-PK1 (CL-101), HUVEC-EC-C (CRL-1730) และ G6 glioma (CCL-107) สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC) สหรัฐอเมริกา ส่วน เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MDR1 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. A. H. Schinkel แห่ง Netherlands Cancer Institute ประเทศเนเธอร์แลนด์

2. สารเคมี

L-glutamine, penicillin-streptomycin solution และ อาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium, F12K และ M199 สั่งซื้อจากบริษัท GibcoBRL

Fetal bovine serum เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Biochrom AG

สารเคมีที่ใช้เตรียม transport buffer, dimethylsulfoxide, propranolol HCl, rhodamine 123 และ verapamil HCl เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma

Phenol red เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka

Theophylline ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท บี. แอล. ฮั่ว จำกัด

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นชนิด cell culture grade หรือ AR grade

3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

Fluorescence microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, USA)

Spectrofluorometer (FP777, Jasco Corporation, Japan)

Milicell[®]-ERS potentiometer (Millipore, USA)

EVOM resistance meter (World Precision Instrument, USA)

Shaking incubator (MTS 4, Kika, Germany)

Transwell[®] insert (Corning, USA)

UV spectrophotometer (Model 7800, Jasco Corporation, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

I. การศึกษาการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2

1. การเพาะเลี้ยงและการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี glucose 4.5 gm/mL เสริมด้วย 10% fetal bovine

serum (FBS) (heat inactivated), 1% non-essential amino acid, 1% sodium pyruvate, และ 1% streptomycin-penicillin solution ภายใต้ 5% CO₂ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95% โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 0.5-0.6x10⁶ เซลล์/75 ตารางเซนติเมตร ทำการ subculture เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 70% confluence (ประมาณ 3-5 วันหลังจากการหว่านเซลล์หรือ seeding) โดยย่อย intercellular matrix ด้วย 0.25% trypsin ใน 1 mM EDTA

ในการเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาการซึมผ่านของสาร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.83x10⁵ เซลล์/พื้นที่ 4.71 ตารางเซนติเมตรของ Transwell[®] insert ที่วางอยู่ใน 6-well culture plate เพาะเลี้ยงเซลล์จน confluence แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไป นำมาทำการศึกษาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 21-28 วันหลังการหว่านเซลล์

1.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ Caco-2

1.2.1 การตรวจสอบความแน่นของ Caco-2 cell monolayer

ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่า cell monolayer ที่เตรียมได้มีการจัดเรียงตัวแน่นเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็น model ในการดูดซึมสาร โดยการวัดค่า transepithelial electrical resistance (TEER) ของ cell monolayer บน Transwell[®] insert ด้วยเครื่องมือ Millicell[®]-ERS potentiometer (Millipore, USA) และ ทำการวัดการซึมผ่านของ phenol red ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี โดยใส่ phenol red ลงใน transport buffer, pH 7.4 (Mainprize and Grady, 1998) ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ (ทั้งนี้ transport buffer ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red เป็นส่วนประกอบเพื่อป้องกันการรบกวนการวิเคราะห์) เขย่า Transwell[®] plate ที่ความเร็ว 75 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องเขย่าชนิด orbital shaker (Kila, Germany) เก็บตัวอย่างจาก receiver compartment เป็นระยะ วัดปริมาณ phenol red ที่ซึมผ่านมายัง receiver ด้วยวิธีทาง UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

1.2.2 การตรวจสอบการซึมผ่านของสารมาตรฐานที่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ดี

ทำการทดสอบการซึมผ่านของสารมาตรฐานที่มีการซึมผ่านเซลล์ได้ดี คือ theophylline ผ่าน Caco-2 cell monolayer ใน Transwell[®] plate โดยทำการศึกษาใน 2 ทิศทาง คือ จากด้าน apical ไปยังด้าน basolateral (A → B) และ จาก basolateral ไปยังด้าน apical (B → A) โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารมาตรฐานใน transport buffer เท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์ ใน การศึกษาทั้งสองทิศทาง หาปริมาณของ theophylline ด้วยวิธีทาง UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร คำนวณค่า apparent permeability coefficient (P_{app}) ของสารมาตรฐานจากสมการ

$$P_{app} = (dQ/dt) \times (1/C_0A)$$

เมื่อ

- P_{app} = ค่า apparent permeability coefficient หรือ ค่า permeability (เซนติเมตร/วินาที)
- dQ/dt = ปริมาณของ theophylline appearing ใน receiver หรือใน donor compartment (ขึ้นกับทิศทางการซึมผ่านที่ทำการศึกษา) เมื่อเทียบกับเวลา (นาโนโมลต่อวินาที)
- C_0 = ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นใน donor compartment (ไมโครโมลาร์) หรือใน receiver compartment ขึ้นกับทิศทางการซึมผ่านที่ทำการศึกษา
- A = surface area ที่เกิดการซึมผ่าน (ตารางเซนติเมตร)

1.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ P-glycoprotein บน Caco-2 monolayer

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของ efflux transporter บน Caco-2 monolayer โดยวัดการซึมผ่านของสารมาตรฐานที่เป็นซับสเตรตของ P-glycoprotein (P-gp) 2 ชนิด คือ propranolol HCl และ rhodamine 123 โดยดูจากค่า efflux ratio ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างค่า apparent permeability ที่ได้จากการศึกษาในทิศทาง B ($P_{app, BA}$) กับค่า apparent permeability ที่ได้จากการศึกษาในทิศทาง A ($P_{app, AB}$) ทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของ propranolol HCl เท่ากับ 200 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นเริ่มต้นของ rhodamine 123 เท่ากับ 20 ไมโครโมลาร์ หาปริมาณของ propranolol HCl ด้วยวิธีทาง UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และหาปริมาณของ rhodamine 123 ด้วยวิธีทาง spectrofluorometry โดยใช้ excitation wavelength ที่ 485 นาโนเมตร และใช้ emission wavelength ที่ 530 นาโนเมตร ตามลำดับ หา ค่า efflux ratio จากสมการ

$$\text{Efflux ratio} = (P_{app, BA}) / (P_{app, AB})$$

ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่า efflux transporter system บน Caco-2 monolayer มี P-gp ร่วมอยู่ด้วย โดยใช้ specific inhibitor ของ P-gp คือ verapamil HCl โดยทำการติดตามการซึมผ่านของ rhodamine 123 ในทิศทาง A \rightarrow B และในทิศทาง B \rightarrow A ในสภาวะที่มีและไม่มี verapamil HCl อยู่ด้วย ทำการทดลองโดยบ่ม Caco-2 monolayer กับสารละลาย 100 μM verapamil HCl ใน transport buffer เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น transport buffer ที่มี 100 μM verapamil HCl ร่วมกับ 20 μM rhodamine 123 ศึกษาการซึมผ่านของ rhodamine 123 ด้วยวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น

2. การตรวจสอบการซึมผ่านของสารในกลุ่ม flavonoid

เนื่องจากผลการทดสอบเบื้องต้นจากโครงการที่ 1 (การสกัดแยกสารจากสมุนไพรไทย เพื่อด้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท) ในชุดโครงการนี้ พบว่า สารประกอบในสารสกัดสมุนไพรที่ได้ น่าจะมีสารพวก flavonoid compound อยู่เป็นจำนวนมาก จึงได้ทดลองนำสารบริสุทธิ์ในกลุ่มนี้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ naringenin, chrysin และ chrysophanol มาทำการทดสอบการซึมผ่าน เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อไป

เนื่องจาก flavonoid compound ทั้งสามชนิดมีค่าการละลายในน้ำต่ำ จึงต้อง ทำการศึกษาการซึมผ่านของสารโดยใช้ transport buffer ที่มีตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) อยู่ 5% โดยปริมาตร ทั้งนี้ได้มีการทำการทดสอบผลของ DMSO ที่มีต่อเซลล์ เพาะเลี้ยงแล้วว่าไม่มีอันตรายต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญในปริมาณที่ใช้ โดยใช้ MTT reduction assay และ LDH release test ความเข้มข้นของ chrysin และ chrysophanol ที่ละลายได้มีค่า ต่ำมาก (ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จึงใช้สารละลายอิมตัวของสารทั้งสองชนิดในการ ทดสอบโดยการเขย่าสารปริมาณมากเกินพอกับตัวทำละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสาร naringenin ใช้ในความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการศึกษาการซึมผ่านของสารมาตรฐานในกลุ่ม flavonoid ใช้สภาวะที่มี pH gradient ระหว่าง apical side กับ basolateral side ของ Caco-2 monolayer โดยใช้ apical buffer ที่มี pH 6.5 และ basolateral buffer ที่มี pH 7.4 (Mainprize and Grady, 1998) ในการศึกษาสาร มาตรฐานทุกชนิด การทดลองการซึมผ่านของสารมาตรฐานทำภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วย orbital shaker ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บ ตัวอย่างเป็นระยะวิเคราะห์หาปริมาณการซึมผ่านของสารมาตรฐานด้วยวิธีทาง UV-spectrophotometry ที่ 322 นาโนเมตร

สำหรับสาร naringenin ได้ทำการทดสอบการเกิด efflux โดยเปรียบเทียบระหว่างค่า apparent permeability ในทิศทางของ B \rightarrow A กับ ค่า apparent permeability ที่ได้จากการศึกษาในทิศทางของ A \rightarrow B ด้วย

3. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการจับของสารมาตรฐานกับตัวรับในสมอง

สารสกัดสมุนไพรที่เลือกมาทำการศึกษาคือ สารสกัด ANS003, CAR003 และ PF003 ซึ่งเป็น fraction ที่แสดงฤทธิ์สูงในการยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆ ในโครงการที่ 2 (การทดสอบฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ) ในชุดโครงการนี้

เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรที่ได้ทั้ง 3 ส่วนมีค่าการละลายในน้ำต่ำมาก จึงต้องทำการละลายด้วยยาใน transport buffer ที่มีตัวทำละลาย DMSO อยู่ในปริมาณ 5% โดยปริมาตรเช่นเดียวกับการทดสอบสารในกลุ่ม flavonoid

สภาวะที่ใช้ในการศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพร ใช้สภาวะเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาการซึมผ่านของสารมาตรฐานในลักษณะที่มี pH gradient โดยใช้ transport buffer ที่มี DMSO ในปริมาณ 5% เพื่อช่วยในการละลายของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดสามารถละลายได้ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเนื่องจากในการทดลองนำร่องไม่สามารถตรวจพบสารสกัดสมุนไพรที่ซึมผ่าน Caco-2 cell monolayer เมื่อทำการเก็บตัวอย่างโดยมีการเปลี่ยนถ่าย transport buffer จึงได้ทำการทดลองโดยการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ และทำการทดลองโดยไม่มีการเปลี่ยนถ่าย basolateral buffer เลยเป็นเวลา 4 ชั่วโมงด้วย และเพื่อเป็นการยืนยันว่า สารสกัดสมุนไพรมีความคงตัวในระหว่างทำการทดสอบการซึมผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง ได้ทำการบ่มสารสกัดสมุนไพรที่ละลายอยู่ใน transport buffer ในสภาวะอุณหภูมิและเวลาที่เท่ากันเพื่อตรวจสอบลักษณะการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลาดังกล่าว

ทำการศึกษาปริมาณของสารสกัดสมุนไพรที่ซึมผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธีการทาง UV-spectrophotometry โดยการ scan ที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรที่ได้อยู่ในลักษณะของ crude extract จึงได้ทำการศึกษาเพียงเพื่อดูว่าปริมาณสารที่ผ่านเซลล์เพาะเลี้ยงมีแนวโน้มที่จะมีปริมาณมากเพียงพหรือไม

II. การศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ชนิดผสม

1. การเพาะเลี้ยง HUVEC และ G6 glioma cell line

1.1 การทดลองสภาวะในการเพาะเลี้ยง HUVEC cell line

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HUVEC-EC (CRL-1730, ATCC, USA) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง โดยทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดเปรียบเทียบกัน คือ (1) F12K CM (ตามข้อแนะนำของ ATCC) ซึ่งประกอบด้วย Kaighn's F-12K medium ร่วมกับ 10% FBS, heparin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), endothelial cell growth factor (ECGF, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ penicillin (50 units/มิลลิลิตร) ร่วมกับ streptomycin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ (2) M 199 CM (Chen et al., 2003) ซึ่งประกอบด้วย M 199 medium ร่วมกับ 20% FBS, heparin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), ECGF (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), L-glutamine (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ penicillin (100 units/มิลลิลิตร) ร่วมกับ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

1.2 การทดลองสภาวะในการเพาะเลี้ยง G6 glioma cell line

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ C6 glioma cell line (CCL-107, ATCC, USA) โดยเพาะเลี้ยงใน complete growth medium (F-12K nutrient mixture, 15% horse serum, 2.5% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากสมองหนูขาวร่วมกับ astrocyte

2.1 การแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดออกจากสมองหนูขาว

การแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Deli และคณะ (2003) โดยทำการสลับหนูขาวอายุ 2 สัปดาห์โดยใส่ในโตแก้วที่มีฮีเทอรัลครั้งละ 2-3 ตัว ปิดฝาทิ้งไว้สักพัก ใช้ปากคีบคีบหางหนูที่สลบแล้วและจุ่มหัวลงในบีกเกอร์ที่มีเอทานอล 70% นาน 2-3 นาที จากนั้นจุ่มหัวลงในบีกเกอร์ที่มี betadine 2-3 นาที หลังจากนั้นวางหนูขาวใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 เซนติเมตรที่ผ่านการอบรังสีเหนือม่วงมาก่อน ใช้กรรไกรตัดหัวหนูและย้ายหัวหนูไปวางบน Petri dish อันใหม่ที่ผ่านการอบรังสีเหนือม่วงมาก่อน ทำจนครบทั้ง 10 หัว

ภายในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบคีบหัวหนู 1 หัววางบน Petri dish ตีหัวหนูด้วยเข็มขนาด 25G ตรงปลายจมูก จากนั้นใช้ปากคีบดึงหนังขึ้นและใช้กรรไกรตัดหนังจากคอไปจนถึงปลายจมูก แะหนังออกทางด้านข้างทางซ้ายและขวา ตีหนังด้วยเข็มขนาด 25G เช็ดกะโหลกด้วยเอทานอล 70% เปิดกะโหลกด้วยกรรไกรปลายแหลมเล็กโดยปักปลายกรรไกรตรงบริเวณรอยต่อระหว่าง cerebrum และ cerebellum ดัดไปทางซ้าย ขวา และยาวไปจนสุดปลายจมูก จากนั้นใช้ปากคีบปลายโค้งแะกะโหลกออกจากกัน นำกรรไกรปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วตัดสมองบริเวณ olfactory bulb และ cerebellum ทิ้งไป เลือกเอาเฉพาะสมองบริเวณ cerebrum ย้ายไปวางใน Petri dish ที่มีบัฟเฟอร์เย็น Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) ทำซ้ำจนได้สมองบริเวณ cerebrum ครบ 10 หัว นำสมอง cerebrum ที่ได้แยกออกเป็น 2 hemisphere นำมาล้างบนกระดาษกรองเบาๆ เพื่อคัดกรองหลอดเลือด เยื่อหุ้มสมอง และ white matter ออก เอาเฉพาะส่วนที่เป็น gray matter มาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM (ที่มียาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่ด้วย) จำนวน 2 มิลลิลิตร ต่อมาใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสับ gray matter ไปมาให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ถ่ายใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM จำนวน 18 มิลลิลิตร (ที่มีส่วนผสมของ collagenase (CLS 2) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเอนไซม์ DNase I ความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อย่อยโปรตีนคอลลาเจนและดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยอาศัยปิเปตแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร ปิเปตขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมงในเครื่องอ่างน้ำที่ตั้งให้เขย่า 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดเวลา homogenate ที่ได้จะมีสีครีม ปิดเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM (ที่มียาปฏิชีวนะ

gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่ด้วย) เดิมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket ที่ 1000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ค่อยๆ ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้งไป และเพื่อไม่ให้กระทบกระเทือนต่อส่วนที่เป็น pellet จะเหลือส่วนที่เป็นน้ำใสอยู่ข้างประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร เดิมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM ที่มี bovine serum albumin (BSA) 20% จำนวน 25 มิลลิลิตร ปิเปตขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket อีก หมุนที่ 1000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เทส่วนที่เป็นน้ำใส (ซึ่งมีเซลล์ประสาท เซลล์เกลีย และ myelin) ทิ้งไป และเพื่อไม่ให้กระทบกระเทือนต่อ pellet สีแดงที่ได้ (ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์บุโพรงหลอดเลือด) ให้เหลือส่วนที่เป็นน้ำใสไว้ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร เดิมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นถ่ายไปยังหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM (ซึ่งมียาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ collagenase-dispase ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ DNase I ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมด้วย) จำนวน 13.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตขึ้นลงประมาณ 25 ครั้ง นำไปปั่นด้วยเครื่องอ่างน้ำเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM (ที่มียาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่ด้วย) จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดหัวท้าย (inverting) นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket ที่ 700g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออกและเหลือเพียง 1 มิลลิลิตรผสมเข้ากับ pellet ด้วยปิเปต เดิมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 HAM (ที่มียาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่ด้วย) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นค่อยๆ ปิเปตลงบนผิวของสารละลาย Percoll gradient 33% และนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket ที่ 1000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา สังเกตเห็นชั้นสีแดงไปทางกันหลอด (ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ที่อยู่รอบหลอดเลือด) และตรงเหนือชั้นสีแดงขึ้นไปเล็กน้อยจะเป็นตำแหน่งที่เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่ต้องการ นำ Pasteur pipette ลนไฟและค่อยๆ ดูดเอาบริเวณเหนือชั้นสีแดงดังกล่าวขึ้นมา ถ่ายใส่หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือด DMEM/F12 HAM (ประกอบด้วย 20% FBS, glutamine ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์, bFGF ความเข้มข้นสุดท้าย 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, heparin ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, และ puromycin ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket ที่ 1000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออกและเหลือเพียง 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับ pellet จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจำนวน 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด swing-bucket ที่ 700g

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใส่ทิ้ง นำ pellet ที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือด จำนวน 5 มิลลิลิตร แบ่งมา 0.5 มิลลิลิตรถ่ายใส่จานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม (ที่ได้เคลือบด้วย fibronectin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ collagen type IV ความเข้มข้นสุดท้าย 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งได้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดไปก่อนหน้าแล้วหลุมละ 1 มิลลิลิตร เคาะเบาๆ ข้างจานเพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์กระจายตัว บ่มในตู้ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วันรุ่งขึ้นส่งกล้องจะพบว่าเซลล์บุโพรงหลอดเลือดกระจายออกจากหลอดเลือด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 2 ดูดอาหารเก่าออกและแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี puromycin ทุกวันเว้นวัน

2.2 การแยกเซลล์ astrocyte ออกจากสมองหนูขาว

การแยกเซลล์ astrocyte ดัดแปลงมาจากวิธีของ Perriere และคณะ (2005) หนูขาวอายุ 1 วันทำให้สลบด้วยอีเทอร์ จากนั้นจุ่มหัวลงในบีกเกอร์ที่มีเอทานอล 70% และในบีกเกอร์ที่มี betadine ตามลำดับเพื่อทำความสะอาด ใช้กรรไกรตัดหัวหนูและย้ายไปวางบน Petri dish ที่ผ่านการอบรังสีเหนือม่วงมาก่อน

ภายในตู้ปลอดเชื้อ ตริ่งหัวหนูด้วยเข็มขนาด 25G ตรงปลายจุ่ม จากนั้นใช้ปากคีบดึงหนังขึ้นและใช้กรรไกรตัดหนังจากคอไปจนถึงปลายจุ่ม แปะหนังออกทางด้านข้างทางซ้ายและขวา ตริ่งหนังด้วยเข็มขนาด 25G เช็ดกะโหลกด้วยเอทานอล 70% เปิดกะโหลกด้วยกรรไกรปลายแหลมเล็กโดยปักปลายกรรไกรตรงบริเวณรอยต่อระหว่าง cerebrum และ cerebellum ดัดไปทางซ้าย ขวา และยาวไปจนถึงปลายจุ่ม จากนั้นใช้ปากคีบปลายโค้งแฉกกะโหลกออกจกกัน นำกรรไกรปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วตัดสมองบริเวณ olfactory bulb และ cerebellum ทิ้งไป เลือกเอาเฉพาะสมองบริเวณ cerebrum ย้ายไปวางใน Petri dish ที่มีบัฟเฟอร์เย็น Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ที่ไม่มีแคลเซียมและแมกนีเซียม นำสมอง cerebrum ที่ได้แยกออกเป็น 2 hemisphere มากลึงบนกระดาษกรองเบาๆ เพื่อตัดกรองเอาเยื่อหุ้มสมองและ white matter ออก เอาเฉพาะส่วนที่เป็น gray matter มาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (ที่มียาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตรต่อมาใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อสับ gray matter ไปมาให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ถ่ายใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS 10% จำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้เข็มขนาด 20G ที่ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร จุ่มลงไปดูดขึ้นลงประมาณ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้นอนก้นประมาณ 1 นาที นำส่วนบนกรองผ่านเมมเบรนขนาด 40 ไมครอนและรองรับด้วยหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับส่วนที่นอนก้นให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้นอนก้น นำส่วนบนกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 40 ไมครอนลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดเดิม ทำซ้ำเช่นนี้อีก 3 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลง

ในเซลล์ที่ได้ทั้งหมดจนครบ 50 มิลลิลิตร แบ่งครึ่งละ 5 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาคส์เลี้ยงเซลล์ (T25 flask) จำนวน 10 ฟลาคส์ บ่มในตู้ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วันติดต่อกัน หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เซลล์ astrocyte ที่เพาะเลี้ยงใน T25 flask ได้นานถึง 3 สัปดาห์เหมาะสำหรับที่จะนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุโพรงหลอดเลือด

2.3 เทคนิค immunofluorescence เพื่อยืนยันว่าเป็นเซลล์บุโพรงหลอดเลือด

เทคนิค immunofluorescence ที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Farkas และคณะ (2005) ทำโดยเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดบน coverslip จนเต็มพื้นที่ ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS (pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ให้อยู่กับที่ด้วยตัวทำลายผสมระหว่างเอทานอลและกรดอะซิติก (95:5) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ล้างออกและบล็อกด้วยสารละลาย BSA 3% ในบัฟเฟอร์ PBS (blocking solution) นาน 30 นาที จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนต่อไปนี้คือ von Willebrand factor (primary vWF antibody), occludin, claudin-5, ZO-1 และ cadherin ที่อยู่ใน blocking solution ในอัตราส่วน 1:200 นาน 1.5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นบ่มต่อด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง Cy3 (Cy3 conjugated secondary antibody) วัดการเรืองแสงบนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

2.4 การวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านข้ามผิวเซลล์บุโพรงหลอดเลือด

คุณสมบัติการลำเลียงสารผ่านระหว่างเซลล์บุโพรงหลอดเลือด (paracellular permeability) สามารถวัดได้จากค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านข้ามผิวเซลล์จากด้านบนไปด้านล่าง (ค่า TEER) และเพื่อสร้างรูปแบบเซลล์จำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมอง (blood-brain barrier, BBB) ได้ดัดแปลงมาจากหลายวิธีด้วยกัน (Dehouck et al., 1990; Krizbai et al., 2005; Rubin et al., 1991) โดยเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดบน transwell filter insert (0.4 ไมครอน ที่ถูกเคลือบด้วย fibronectin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ collagen type IV ความเข้มข้นสุดท้าย 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จนเต็มพื้นที่ จากนั้นนำ filter insert นี้ไปใส่ใน transwell plate ที่มีเซลล์ astrocyte เจริญเต็มพื้นที่เช่นกัน ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงด้านบน filter insert และอีก 1.5 มิลลิลิตรที่มี hydrocortisone ความเข้มข้น 0.55 ไมโครโมลาร์ผสมอยู่ด้วย ลงด้านล่างของ Transwell® plate (Hoheisel et al., 1998) จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม CPT-cAMP ความเข้มข้นสุดท้าย 250 ไมโครโมลาร์ และ RO20-1724 ความเข้มข้นสุดท้าย 17.5 ไมโครโมลาร์ ลงทั้งด้านบนและด้านล่างของ transwell plate วัดค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านข้ามผิวเซลล์จากด้านบนไปด้านล่างด้วยเครื่อง EVOM

resistance meter (World Precision Instrument สหรัฐอเมริกา) คำนวณค่า TEER ได้จากค่าความต้านทานที่อ่านได้ลบด้วยค่าความต้านทานของ blank และค่า correction factor เมื่อวัดบนพื้นที่ผิวของ filter หน่วยที่อ่านได้คือโอห์มตารางเซนติเมตร ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)

III. การทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพร

เซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพร คือ เซลล์ LLC-PK1 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จาก porcine kidney เซลล์ LLC-MDR 1 ซึ่งมีการแสดงออกของ P-gp สูงกว่าปกติที่ได้จากการ transfect เซลล์ LLC-PK1 ด้วย MDR1 gene เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย medium ชนิด M 199 ที่มี FBS อยู่ 1 % และมี penicillin G sodium 100 หน่วย/มิลลิลิตร และ streptomycin sulfate 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รวมอยู่ด้วย

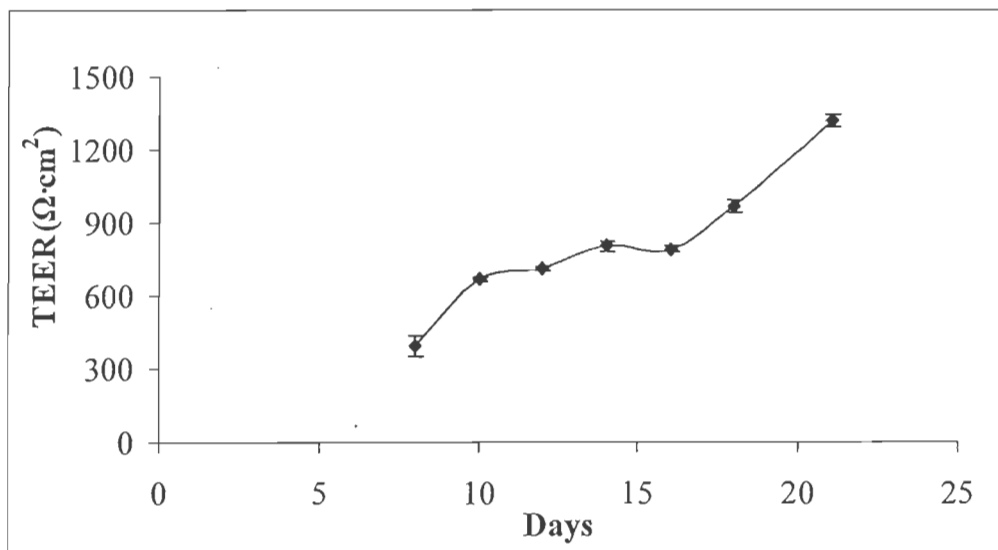
ทำการเพาะเซลล์ลงใน 12-well plate ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม (1.32×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) เลี้ยงเซลล์จน confluence เป็นเวลา 5 วัน เปลี่ยน medium เป็น transport buffer, pH 7.4 หรือ $100 \mu\text{M}$ verapamil หรือ สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเปลี่ยน medium เป็น rhodamine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ verapamil ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ หรือ สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเซลล์ที่ 37 เซลเซียส ต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างเซลล์ด้วย ice-cold PBS 3 ครั้ง ย่อยเซลล์ด้วย 0.2 N NaOH แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน นำมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford และหาปริมาณ rhodamine 123 ด้วย spectrofluorometry ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้ว

ผลการวิจัย

I. การศึกษาการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2

1. การเพาะเลี้ยงและการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Caco-2

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในสภาวะที่ระบุไว้ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตดี มีค่า population doubling time ในช่วง 30-34 ชั่วโมง เมื่อวัดค่า TEER เพื่อตรวจสอบความแน่นของ cell monolayer พบว่า ไม่สามารถวัดค่า TEER ได้ก่อนวันที่ 7 นับจากหว่านเซลล์ เนื่องจากยังไม่ได้ monolayer ที่แน่นพอ ณ วันที่ 21 นับจากการหว่านเซลล์ monolayer ที่ได้มีค่า TEER เฉลี่ย เป็น $1,319 \pm 63 \Omega\cdot\text{cm}^2$ การเปลี่ยนแปลงค่า TEER ของ Caco-2 monolayer เป็นดังแสดงในรูปที่ 4-1



รูปที่ 4-1 ค่า TEER ของ Caco-2 monolayer ที่วัดได้ระหว่างวันที่ 7-21 หลังการหว่านเซลล์

เมื่อวัดค่าการซึมผ่านของ phenol red ที่เวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีค่าต่ำกว่า 5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่จะหาปริมาณได้ในการวิเคราะห์ (lower limit of quantification) ดังนั้น ค่า flux ของ phenol red ที่คำนวณได้จึงมีค่าน้อยกว่า 1.7% ต่อชั่วโมง แสดงว่า Caco-2 monolayer ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะของการทดลองนี้มีความแน่นมาก

ค่า flux และ ค่า permeability ของ theophylline, propranolol HCl และ rhodamine 123 ในทิศทางของการดูดซึม (A → B) และในทิศทางตรงข้าม (B → A) เป็นดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4-1 ถึง 4-3

ตารางที่ 4-1 Flux และ permeability ของ theophylline ในทิศทางของการดูดซึม (A → B) และในทิศทางตรงข้าม (B → A) ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. (n = 3)

| Transport direction | Flux (nmol/cm ² min) | Permeability coefficient (cm/s) x 10 ⁵ | TEER * (Ω·cm ²) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Absorptive (A → B) | 0.39 ± 0.02 | 3.24 ± 0.14 | 1,064/1,097 |
| Secretory (B → A) | 0.72 ± 0.06 | 5.58 ± 0.43 | 856/967 |

* ค่า TEER วัดก่อนและหลังสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 4-2 Flux และ permeability ของ propranolol HCl ในทิศทางของการดูดซึม (A → B) และในทิศทางตรงข้าม (B → A) ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. (n = 3)

| Transport direction | Flux (nmol/cm ² min) | Permeability coefficient (cm/s) × 10 ⁵ | TEER (Ω·cm ²) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|
| Absorptive (A → B) | 0.41 ± 0.02 | 3.21 ± 0.08 | 1,235 |
| Secretary (B → A) | 0.85 ± 0.07 | 7.05 ± 0.53 | 1,251 |

* ค่า TEER วัดก่อนและหลังสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 4-3 Flux และ permeability ของ rhodamine 123 ในทิศทางของการดูดซึม (A → B) และในทิศทางตรงข้าม (B → A) ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. (n = 3)

| Transport direction | Flux (nmol/cm ² min) × 10 ⁴ | Permeability coefficient (cm/s) × 10 ⁷ | TEER (Ω·cm ²) |
|---------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|
| Absorptive (A → B) | 6.03 ± 0.44 | 4.42 ± 0.28 | 1,087 |
| Secretary (B → A) | 40.69 ± 2.39 | 28.10 ± 1.66 | 1,200 |

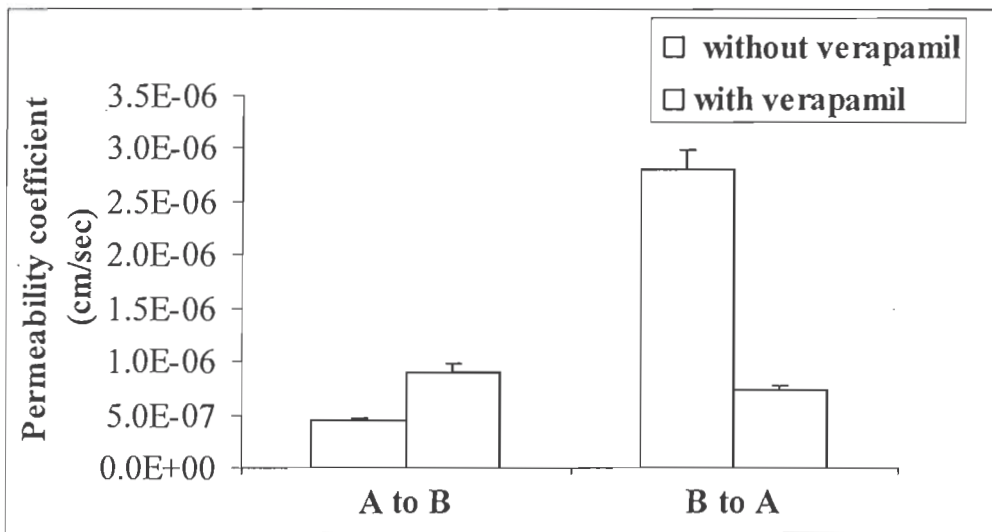
* ค่า TEER วัดก่อนและหลังสิ้นสุดการทดลอง

ค่า efflux ratio ของ theophylline, propranolol HCl และ rhodamine 123 มีค่าเท่ากับ 1.72, 2.19 และ 6.36 ตามลำดับ และเนื่องจาก rhodamine 123 มีค่า efflux ratio สูง จึงเลือกใช้ rhodamine 123 ในการทดสอบต่อไป

เมื่อทดลองทำการยับยั้งการทำงานของ P-gp ด้วย specific inhibitor คือ verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าค่า permeability ของ rhodamine 123 ในทิศทางของ A → B และ B → A ใกล้เคียงกันซึ่งต่างจากกรณีที่ไม่มี verapamil HCl อย่างชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และรูปที่ 4-2

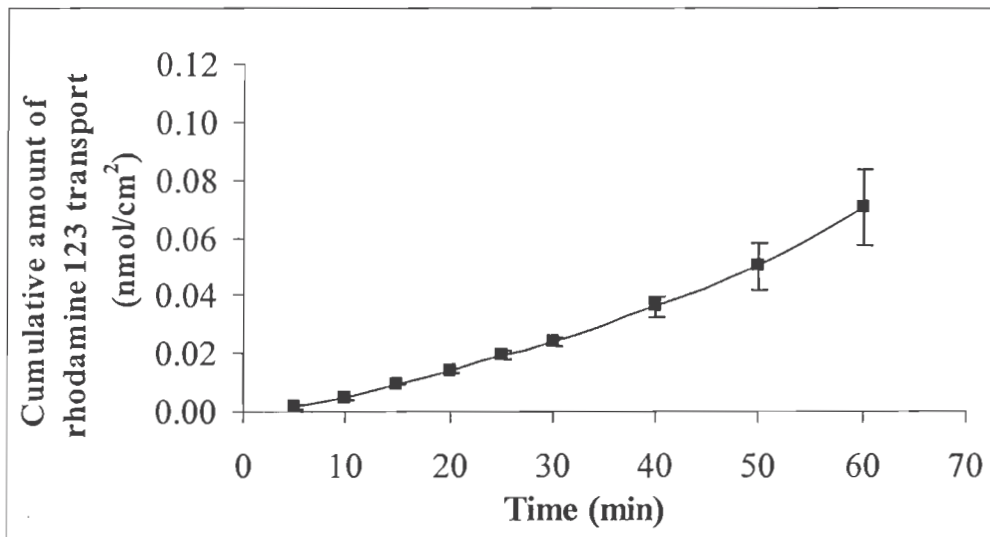
ตารางที่ 4-4 ค่า apparent permeability ของ rhodamine 123 และ efflux ratio ในสภาวะที่มี และไม่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μM ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. (n = 3)

| Substrate (μM) | P _{app, AB} × 10 ⁷ (cm/s) | P _{app, BA} × 10 ⁷ (cm/s) | Efflux ratio |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------|
| Rhodamine123 (20 μM) | 4.42 ± 0.28 | 28.1 ± 1.66 | 6.36 |
| Rhodamine123 (20 μM) +Verapamil (100 μM) | 9.03 ± 0.76 | 7.28 ± 0.45 | 0.81 |



รูปที่ 4-2 ค่า apparent permeability ของ rhodamine 123 ในสภาวะที่มีและไม่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μM ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. ($n = 3$)

ในสภาวะที่มี verapamil HCl นั้น พบว่า transport profile ของ rhodamine 123 ในทิศทางของ $B \rightarrow A$ มีค่าความชันเพิ่มขึ้นหลังเวลาผ่านไป 30 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4-3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงความชันของ transport profile นี้ไม่พบในทิศทางของ $A \rightarrow B$



รูปที่ 4-3 Transport profile ของ rhodamine 123 ในทิศทางของ $B \rightarrow A$ ในสภาวะที่มี verapamil HCl ที่ความเข้มข้น 100 μM อยู่ด้วย ค่าที่แสดงคือ mean S.E.M. ($n = 3$)

2. การตรวจสอบการซึมผ่านของสารในกลุ่ม flavonoid

ไม่สามารถตรวจพบการซึมผ่านของสาร chrysophanol และ chrysin ผ่าน Caco-2 cell monolayer ได้ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากความเข้มข้นของสารใน saturated solution มีค่าต่ำเกินไป

(< 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เนื่องจากปัญหาการละลายของสารใน buffer แม้ว่าจะมี DMSO อยู่ในปริมาณ 5%

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ naringenin เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน apical และ basolateral buffer ที่มี DMSO อยู่ 5% พบว่าสามารถตรวจพบการซึมผ่านของสารได้ทั้งจากด้าน apical ไปยังด้าน basolateral และจากด้าน basolateral ไปยังด้าน apical ทั้งนี้สามารถคำนวณหา apparent permeability ของ naringenin โดยวิธี UV-spectrophotometric method (Shimadzu UV-1601, Japan; ที่ $\lambda = 322 \text{ nm}$) ได้ผลดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่า apparent permeability และ efflux ratio ของ naringenin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. (n = 5-6)

| สารมาตรฐาน | Apparent permeability (cm/sec) $\times 10^6$ | | Efflux ratio (secretory/absorptive) |
|---------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| | Absorptive (A \rightarrow B) | Secretory (B \rightarrow A) | |
| Naringenin (1mg/mL) | 1.35 \pm 0.06 | 1.46 \pm 0.15 | 1.18 |

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการซึมผ่านจากด้าน apical ไปยังด้าน basolateral กับค่าปริมาณการซึมผ่านจากด้าน basolateral ไปยังด้าน apical ของ naringenin จะเห็นว่าค่า efflux ratio มีค่าใกล้เคียง 1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร naringenin ซึมผ่าน Caco-2 cell monolayer ได้โดยไม่เกิดกระบวนการ efflux ที่มีนัยสำคัญ

3. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการจับของสารมาตรฐานกับตัวรับในสมอง

ไม่สามารถตรวจพบการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญได้ แม้ว่าจะทำการทดสอบโดยไม่มีการเปลี่ยนถ่าย transport buffer เลยเป็นเวลานานถึง 4 ชั่วโมง และจากการทดสอบเบื้องต้นไม่พบว่าการดูดกลืนแสงของสารสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ชัดเจนเมื่อบ่มสารสกัดสมุนไพรใน transport buffer แสดงว่า การที่ไม่สามารถตรวจพบสารสกัดสมุนไพรใน receiver compartment ได้ ไม่ได้เกิดจากการสลายตัวของสารสกัดสมุนไพรใน transport buffer

II. การศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ชนิดผสม

1. การเพาะเลี้ยง HUVEC และ G6 glioma cell line

ในการทดสอบการเพาะเลี้ยง HUVEC พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด F12K CM ทำให้เซลล์เกาะติดพื้นภาชนะได้ดี และจะเจริญเติบโตได้อย่างช้า ๆ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด M199 CM เซลล์จะเจริญเติบโตได้ดีเพียง 1 สัปดาห์เท่านั้น หลังจากนั้นเซลล์จะหยุดการเจริญและหลุดร่อนจากพื้นภาชนะ จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด F12K CM ซึ่งในระยะแรกของการเลี้ยงเซลล์ด้วย F12K CM สามารถเลี้ยงให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้เพียง 60% confluence เท่านั้น แต่เมื่อปรับวิธีการในกระบวนการ subculture สามารถเพิ่มการเจริญของเซลล์ได้ถึง 80-90% confluence แต่เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ช้ามากและจากคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์มี population doubling ได้เพียง 34 รอบเท่านั้นทำให้คุณภาพของเซลล์ที่ได้ยังไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ทดสอบเพื่อใช้เป็นแบบจำลองของการขนส่งสารเข้าสู่สมอง

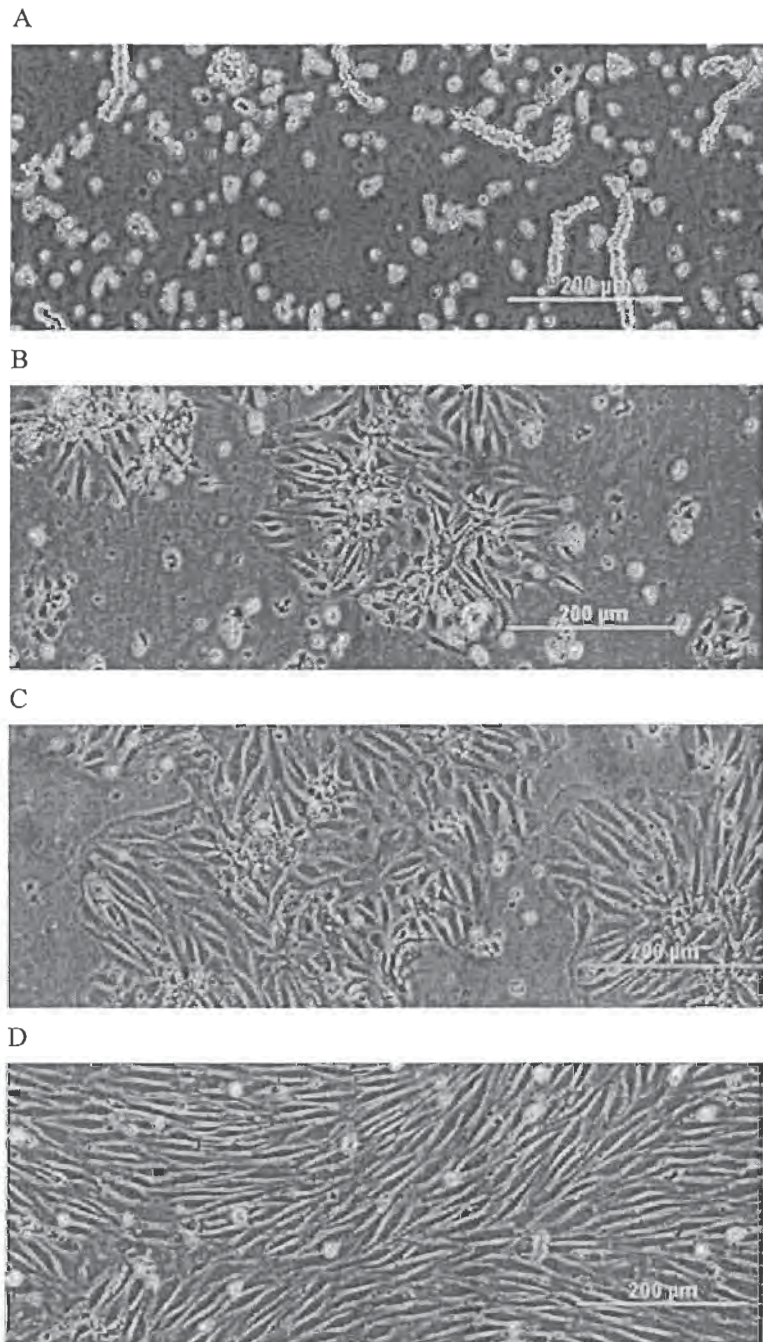
ส่วนกรณีของ G6 glioma cell line การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ศึกษาทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี โดยไม่มีปัญหาใด ๆ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากสมองหนูขาวร่วมกับ astrocyte

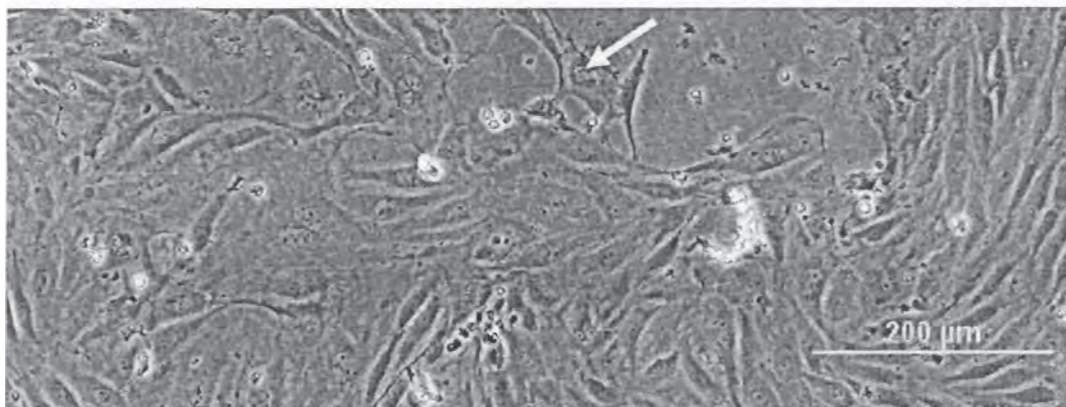
2.1 การแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดออกจากสมองหนูขาว

เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่แยกได้จากสมองหนูขาวบริเวณ cerebrum เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นรูปแบบเซลล์จำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมอง (BBB model) (Calabria et al., 2006; Perriere et al., 2005) ภายหลังปั่นด้วย Percoll gradient 33% พบเซลล์บุโพรงหลอดเลือดอยู่ในชั้นที่มีความหนาแน่นระหว่าง 1.033 1.047 อย่างไรก็ตามการแยกให้ได้เซลล์บุโพรงหลอดเลือดจำนวนมากเพื่อนำมาทำแบบจำลองของ BBB นั้นยังมีข้อจำกัดอยู่ที่มักปนเปื้อนด้วยเซลล์ชนิดอื่น แต่ด้วยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์บุโพรงหลอดเลือดในสมองมักพบโปรตีน P-gp เป็นจำนวนมากกว่าเซลล์ชนิดอื่นในสมอง ดังนั้นเพื่อเลี้ยงเซลล์บุโพรงหลอดเลือดให้ได้จำนวนมากจึงได้ใส่ยาปฏิชีวนะ puromycin (ซึ่งเป็นยับยั้งของ P-gp และยังไปยับยั้งกระบวนการแปลรหัส หรือ translation inhibitor) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในระยะเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงด้วยเพื่อกำจัดเซลล์ชนิดอื่น ยกเว้นเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่จะไม่ถูกทำลาย เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์วิภาค (phase-contrast microscope) จะพบหลอดเลือดเล็กๆ ยาวประมาณ 200 ไมครอนเกาะติดบนพื้นพลาสติกที่เคลือบด้วย fibronectin และ collagen IV (รูปที่ 4-4 A) หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 1 วันพบว่าเซลล์บุโพรงหลอดเลือดมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle-shape) กระจายเป็นแนวรัศมีออกจากหลอดเลือดและไปจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม (รูปที่ 4-4 B) ในวันที่ 2 เซลล์บุโพรงหลอดเลือดแบ่งตัวเร็วและเจริญหนาแน่นขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 4-4 C)

จนกระทั่งเกือบเต็มฟลาค์ในวันที่ 5-7 (รูปที่ 4-4 D) สำหรับกรณีที่ไม่ได้ใส่ puromycin ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในระยะเริ่มต้นจะพบเซลล์ชนิดอื่นเช่น เซลล์ที่อยู่รอบหลอดเลือด (รูปที่ 4-5) ปะปนเป็นจำนวนมากจนทำให้เซลล์บุโพรงหลอดเลือดเจริญเติบโตไม่ได้ดีได้จำนวนน้อยมาก จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า puromycin ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะสมสำหรับแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดออกจากเซลล์ชนิดอื่น



รูปที่ 4-4 รูปร่างหลอดเลือดและเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่แยกได้จากสมองหนูขาวบริเวณ cerebrum โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี puromycin ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (A) หลอดเลือดที่เพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์ (วันที่ 0) (B) วันที่ 1 รูปร่างเซลล์บุโพรงหลอดเลือดคล้ายกระสวยเจริญออกในแนวรัศมี (C) วันที่ 2 เซลล์บุโพรงหลอดเลือดเจริญมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และในวันนี้จะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี puromycin (D) วันที่ 5 เซลล์บุโพรงหลอดเลือดเจริญเกือบเต็มพลาสติก สเกลขนาด 200 ไมครอน



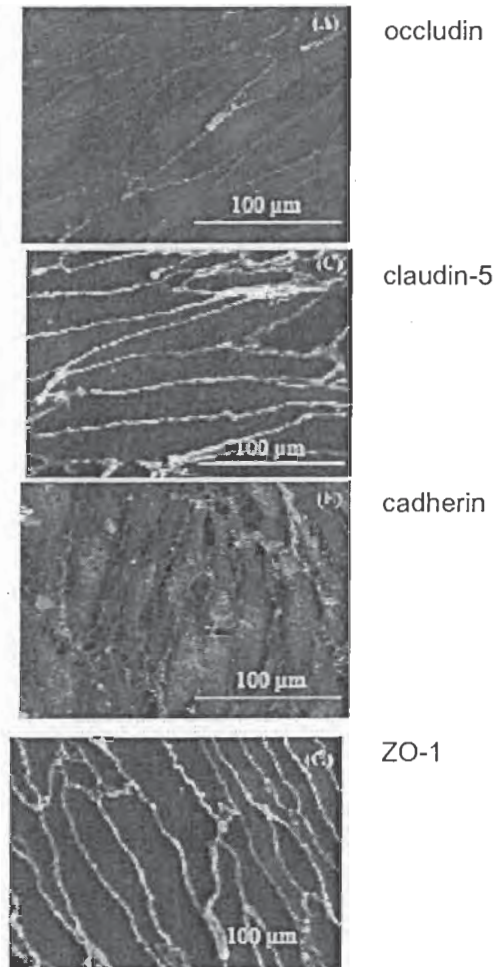
รูปที่ 4-5 เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่ปนเปื้อนด้วยเซลล์ชนิดอื่น (ลูกครี) ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี puromycin สเกลขนาด 200 ไมครอน

2.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากสมองหนูขาวด้วยเทคนิค immunofluorescence (Characterization of rat cerebral endothelial cells)

เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์วัฏภาค (phase-contrast microscope) พบว่ารูปร่างของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยงได้จะเป็นรูปกระสวย มีนิวเคลียสเป็นรูปไข่ (รูปที่ 4-4 D) และเพื่อยืนยันว่าเป็นเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจะใช้เทคนิค immunofluorescence โดยย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ vWF (von Willebrand factor หรือ Factor VIII) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนสร้างจากเซลล์บุโพรงหลอดเลือด เพื่อให้เกล็ดเลือดมาเกาะตรงบริเวณที่ผนังหลอดเลือดถูกทำลายและยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็นเซลล์บุโพรงหลอดเลือด เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงจะเห็นการเรืองแสงของ vWF รอบนิวเคลียสภายในเซลล์บุโพรงหลอดเลือด (รูปที่ 4-6) ด้วยเทคนิค immunofluorescence เมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะยังพบโปรตีนเชื่อมระหว่างเซลล์บุโพรงหลอดเลือดเช่น occludin, claudin-5, cadherin และ ZO-1 ตามขอบเซลล์บุโพรงหลอดเลือดด้วย (รูปที่ 4-7)



รูปที่ 4-6 เทคนิค immunofluorescence นำมาใช้ศึกษาชนิดของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดของสมองหนูขาว ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน vWF สเกลขนาด 50 ไมครอน



รูปที่ 4-7 เทคนิค immunofluorescence นำมาศึกษาชนิดของโปรตีนที่เชื่อมระหว่างเซลล์บุโพรงหลอดเลือดของสมองหนูขาว เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน (A) occludin; (B) claudin-5; (C) cadherin และ (D) ZO-1 สเกลขนาด 100 ไมครอน

2.3 การวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่านข้ามผิวเซลล์บุโพรงหลอดเลือด

เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ astrocyte ที่แยกได้จากสมองหนูขาว พบว่าค่า TEER อยู่ระหว่าง $132-273 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่เคยมีรายงานในรูปแบบเซลล์จำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมองที่ได้จากสมองหนูขาว (Gumbleton and Audus, 2001, Perrière et al., 2007)

III. การทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพร

เมื่อทำการบ่มสารสกัดสมุนไพรในสภาวะต่าง ๆ กับเซลล์ชนิด LLC-PK1 และ LLC-MDR1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเลือกใช้ fraction ต่าง ๆ ของสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ PF003, PF002-7 และ PF003(3-5) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4-6 และ รูปที่ 4-4

ตารางที่ 4-6 ผลการรบกวนการสะสมของ rhodamine 123 ที่เกิดจากสารสกัดสมุนไพรใน fraction ต่าง ๆ

| สภาวะในการทดสอบ | LLC-PK1 | | LLC-MDR1 | |
|------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | Rho 123/BSA (nmol/mg) | คิดเป็น เท่า | Rho 123/BSA (nmol/mg) | คิดเป็น เท่า |
| Cell | 0.039 ± 0.063 | | 0.032 ± 0.027 | |
| Rho | 0.302 ± 0.026 | 1.00 | 0.093 ± 0.026 | 1.00 |
| V+Rho_V | 0.506 ± 0.011 | 1.67 | 0.235 ± 0.048 | 2.53 |
| PF003+Rho_PF003 | 0.776 ± 0.078 | 2.57 | 0.496 ± 0.048 | 5.34 |
| PF002-7+Rho_PF002-7 | 0.907 ± 0.052 | 3.01 | 0.573 ± 0.081 | 6.18 |
| PF003 (3-5) +Rho_PF003 (3-5) | 0.479 ± 0.007 | 1.59 | 0.194 ± 0.020 | 2.10 |

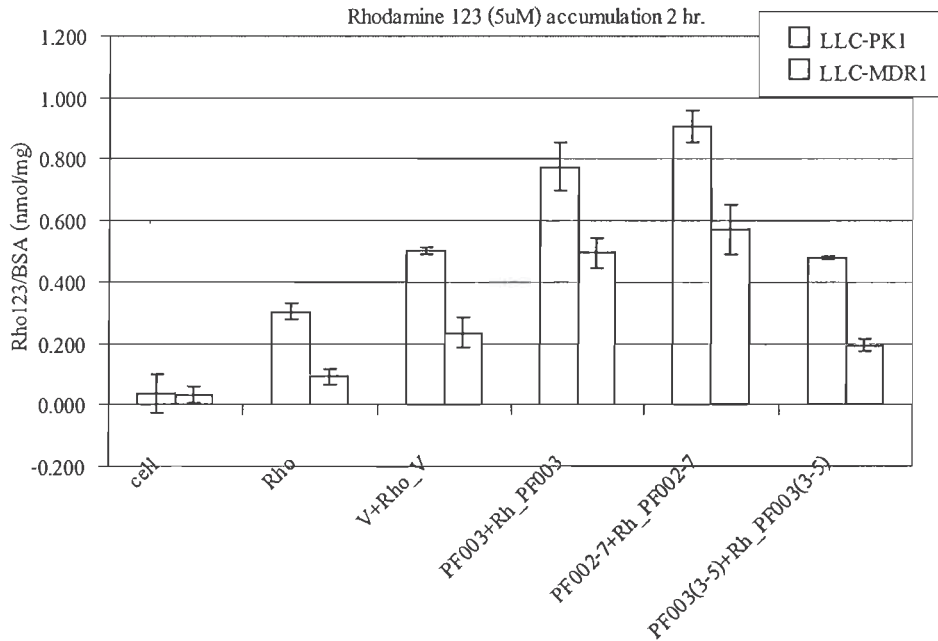
เมื่อ สภาวะที่ทำการศึกษา ได้แก่

Cell = solvent control

Rho = ป่มเซลล์กับสารละลาย rhodamine 123 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

V+Rho_V = สภาวะที่มีการ pretreatment เซลล์ด้วย verapamil เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการ co-treatment ด้วย verapamil และ rhodamine 123

Fraction+Rho_Fraction = สภาวะที่มีการ pretreatment เซลล์ด้วยสารสกัดตาม fraction ที่ระบุ เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการ co-treatment ด้วยสารสกัดใน fraction นั้น ๆ และ rhodamine 123



รูปที่ 4-8 การสะสมของ rhodamine 123 เมื่อให้ร่วมกับสารสกัดสมุนไพรใน fraction ต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 เปรียบเทียบกับในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MDR1

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 fraction สามารถเปลี่ยนแปลงการทำงานของ efflux transporter บนเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดได้ โดยมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของ efflux transporter บนเซลล์ LLC-MDR1 ได้ชัดเจนกว่าบนเซลล์ LLC-PK1 และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพร เป็นตามลำดับ ดังนี้ PF002-7 > PF003 > PF003(3-5) นอกจากนี้การรบกวนการทำงานของ efflux transporter บนเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดสมุนไพรใน fraction ที่ PF002-7 และ PF003 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลชัดเจนกว่าผลที่ได้จากการใช้ verapamil ซึ่งเป็น P-gp inhibitor มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสร้างแบบจำลองของเซลล์เยื่อบุลำไส้จากเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าสามารถสร้าง monolayer ที่แน่น มีค่า TEER สูงเหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการซึมผ่านของสารทาง transcellular pathway ได้ดี โดยปกติแล้วค่า TEER ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ยอมรับกันว่าเหมาะสมในการใช้เป็นแบบจำลองของการนำส่งสารต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ หลังหว่านเซลล์แล้ว 21 วัน (Walter and Kissel in 1995; Hunter, Hirst, and Simmons, 1993; Troutman and Thakker, 2003) นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบยืนยันด้วยการศึกษาการซึมผ่านของสารที่ละลายน้ำได้ดี คือ phenol red พบว่า มีค่าการซึมผ่านน้อยกว่า 5% ต่อชั่วโมงตามที่ต้องการ (Martel, Monteiro, and Lemos, 2003) เมื่อทดสอบการซึมผ่านของสารมาตรฐานที่มีรายงานว่าสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ก็พบว่าค่าการซึมผ่านของสารมาตรฐาน theophylline มีค่าอยู่ในช่วงที่เคยมีผู้รายงานไว้ คือ $2.61 \pm 1.5 \times 10^{-5}$ เซนติเมตรต่อวินาที ถึง $4.65 \pm 0.12 \times 10^{-5}$ เซนติเมตรต่อวินาที (Yamashita et al., 2000; Corti et al., 2006) แสดงว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มีสภาวะของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นแบบจำลองในการซึมผ่านของสารได้ นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้ยังมีการแสดงออกของ efflux system ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการในการนำมาใช้เป็นแบบจำลองของการดูดซึมสารผ่านทางเดินอาหาร โดยเห็นได้จากการศึกษาสารมาตรฐานที่มีรายงานว่า เป็นยับยั้งของ P-gp คือ propranolol HCl และ rhodamine 123 (D' Emanuele et al., 2004; Troutman and Thakker, 2003) ที่นำมาใช้ทดสอบให้ค่า efflux ratio มากกว่า 2 (Faassen et al., 2002) เมื่อทำการทดสอบชนิดของ efflux transporter บนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้ พบว่ามีการแสดงออกของ P-gp ซึ่งเป็น efflux transporter ที่สำคัญบนเซลล์ของลำไส้ที่มีบทบาทในการขัดขวางการดูดซึมสารอยู่ด้วย ซึ่งเห็นได้จากการที่เมื่อใช้ verapamil ซึ่งเป็น specific inhibitor ของ P-gp ยับยั้งการทำงานของ P-gp แล้ว การซึมผ่านของ rhodamine 123 ในทิศทางของการดูดซึม ($A \rightarrow B$) มีค่าเพิ่มขึ้น และค่าการซึมผ่านในทิศทางตรงข้าม ($B \rightarrow A$) ลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งผู้วิจัยกลุ่มอื่นๆ ใช้ปรากฏการณ์นี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการแสดงออกของ P-gp เช่นเดียวกัน (Hunter, Hirst, and Simmons, 1993; Troutman and Thakker, 2003) นอกจากนี้ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้ verapamil เป็น P-gp inhibitor ค่าความชันของกราฟของการซึมผ่านของ rhodamine 123 ในทิศทาง $B \rightarrow A$ เป็นเส้นตรงในช่วง 30 นาทีแรก หลังจากนั้นการซึมผ่านของ rhodamine 123 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า verapamil สามารถยับยั้งการทำงานของ P-gp ได้ดีในช่วง 30 นาทีแรก แต่เมื่อเวลาผ่านไปและมี rhodamine 123 สะสมในเซลล์มากขึ้น ทำให้ concentration gradient ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์สูงขึ้น rhodamine 123 จึงซึมผ่านออกจากเซลล์ด้วยกระบวนการ passive diffusion ได้มากขึ้น

เนื่องจากการศึกษาในโครงการที่ 1 (การสกัดแยกสารจากสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท) ของชุดโครงการนี้ พบว่า สารประกอบในสารสกัดสมุนไพรที่ได้นำจะมีสาร

พวก flavonoid compound อยู่เป็นจำนวนมาก ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม flavonoid มาทำการทดสอบการซึมผ่านเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 cell monolayer เพื่อทดสอบระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่สร้างขึ้นและเพื่อหาแนวทางในการใช้สารในกลุ่มนี้เป็น chemical marker หรือ biomarker ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อไป พบว่า เมื่อในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาทำการศึกษาการซึมผ่านของสาร flavonoid มาตรฐานที่มีค่าการละลายต่ำกว่า 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คือ chrysophanol และ chrysin ไม่สามารถตรวจพบการซึมผ่านของสารดังกล่าวผ่าน Caco-2 cell monolayer ได้ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากความเข้มข้นของสารใน transport buffer มีค่าต่ำเกินไป เนื่องจากปัญหาการละลายของสารแม้ว่าจะมี DMSO อยู่ด้วยในปริมาณ 5% ก็ตาม ยาที่มีค่าการละลายต่ำกว่า 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จัดอยู่ในกลุ่มที่อาจมีปัญหาในการดูดซึมที่ถูกจำกัดด้วยค่าการละลาย (solubility-limited absorption) เนื่องจากการดูดซึมหรือการกระจายตัวของยาไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ต้องมีสมดุลระหว่างค่าการละลายและค่า permeability ของยาผ่านเซลล์ (Dressman and Lennernas, 2000) แต่เมื่อใช้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้นทำการทดสอบกับสาร naringenin ซึ่งสามารถละลายได้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปรากฏว่าสามารถตรวจพบการซึมผ่านของสารนี้ได้ทั้งในทิศทางของการดูดซึมและในทิศทางตรงข้าม และจากการที่ naringenin มีค่า apparent permeability ต่ำกว่า propranolol HCl แสดงว่า naringenin ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีการซึมผ่านเซลล์ได้ดี (highly permeable) (Cerep application note, 2003) แต่อาจเป็นสารที่มีการดูดซึมจากทางเดินอาหารได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากมีค่า apparent permeability สูงกว่า 1×10^{-6} cm/sec เมื่อทำการทดสอบกับ Caco-2 monolayer (Artursson, Palm, and Luthman, 2001) ดังนั้น ผลการวิจัยจึงแสดงให้เห็นว่าระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้นมีความเหมาะสม สามารถใช้เป็นระบบคัดกรองสารในด้าน การดูดซึมผ่านลำไส้เล็กได้ดี

เมื่อใช้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยงที่สร้างขึ้นนี้ทำการทดสอบเบื้องต้นกับสารสกัดสมุนไพรบาง fraction ที่แสดงฤทธิ์สูงในการยับยั้งการจับกับตัวรับชนิดต่างๆในโครงการที่ 2 (การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ) ไม่พบการซึมผ่านของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากสารสกัดที่นำมาใช้ทดสอบเป็น fraction ที่ยังมีส่วนประกอบที่ หลากหลายอยู่มาก และ concentration gradient ของส่วนประกอบแต่ละส่วนในสารสกัดอาจจะไม่สูงเพียงพอที่จะเป็น driving force ให้สารซึมผ่านเซลล์ได้ หรือ อาจเกิดเนื่องจากส่วนประกอบในสารสกัดมีความชอบไขมันสูงซึ่งเมื่อผ่านเข้าสู่ Caco-2 cell แล้วถูกกักอยู่ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม โดยสรุปแล้วการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัดกรองความสามารถในการดูดซึมผ่านทางเดินอาหารของสารสำคัญ ควรทำเมื่อได้ fraction ของสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูงพอสมควร และมี chemical marker หรือ biological marker ที่เหมาะสม ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นแบบจำลองจะมีประโยชน์ในการช่วยจำกัด fraction ที่จะนำไปทำการศึกษาวินิจฉัยให้แคบลง ในกรณีที่มีจำนวน fraction ที่มีฤทธิ์ที่ต้องการอยู่เป็นจำนวนมาก การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงช่วยในการคัดกรองสารสำคัญนี้เป็นแนวทางที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสำหรับอุตสาหกรรมการพัฒนายาใน

ต่างประเทศ (Hartman, 2004) แต่อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น โดยเฉพาะเมื่อการดูดซึมของสารนั้น ๆ ถูกจำกัดด้วยการละลายเนื่องจากสภาวะในทางเดินอาหารในร่างกายมีการหลั่งสารหลายชนิดที่อาจมีผลช่วยในการละลาย เช่น กรดในกระเพาะอาหาร หรือ น้ำดี เป็นต้น เมื่อได้ผลเบื้องต้นจากการใช้แบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงแล้ว การทดสอบซ้ำในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันผลจึงคงยังเป็นสิ่งที่จำเป็นเช่นเดียวกัน

ในการสร้างแบบจำลองของ BBB ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HUVEC ซึ่งเป็น cell line ที่ได้จาก cell bank ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเซลล์มีการเติบโตช้าและมีช่วงชีวิตจำกัดเพียง 34 population doubling เท่านั้น คณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนไปสร้างแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปฐมภูมิ (primary cell line) จากเซลล์บุโพรงหลอดเลือดและ astrocyte ของหนูขาวแทนรูปแบบเซลล์จำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมอง ประกอบด้วยเซลล์บุโพรงหลอดเลือดในสมองทำงานร่วมกับเซลล์ astrocyte และเซลล์ที่อยู่รอบหลอดเลือด คุณสมบัติของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่อยู่ในสมองจะแตกต่างจากเซลล์บุโพรงหลอดเลือดทั่วไป กล่าวคือเซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่อยู่ในสมองจะยึดเหนี่ยวกันอย่างแน่นหนาด้วยโปรตีนที่เชื่อมระหว่างเซลล์ เช่น occludin, claudin-5 ความหนาของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดสม่ำเสมอ ภายในเซลล์มีไมโทคอนเดรียเป็นจำนวนมาก ไม่ค่อยพบ pinocytic vesicle ในไซโทพลาซึม เซลล์บุโพรงหลอดเลือดในสมองที่นิยมใช้มักแยกจากสมองวัว หมู แมว หนูขาว หรือ หนูถีบจักร (Abbott et al., 2006; Fletcher et al., 2006; Perriere et al., 2007; Smith et al., 2007; Weidenfeller et al., 2005) เซลล์บุโพรงหลอดเลือดที่แยกได้จากสัตว์ใหญ่จะได้เป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมของวัวและหมูยังมีข้อจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับของมนุษย์และหนู (Gumbleton and Audus 2001) และจากปัญหาด้านจริยธรรมของการใช้เซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากมนุษย์ทำให้หันมานิยมใช้เซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากหนูขาว ได้มีการพัฒนาเรื่อยมาจนได้ผลสัมพัทธ์กับค่าที่ได้จากสัตว์ทดลองโดยตรง (Abbott et al., 1992; Calabria et al., 2006; Domotor et al., 1999; Parkinson and Hacking, 2005; Perriere et al., 2005;) สำหรับเซลล์บุโพรงหลอดเลือดจากสมองชนิด immortalization (immortalized brain endothelial cell) หรือ cell line ถึงแม้จะสะดวกและไม่ต้องสูญเสียสัตว์ทดลอง แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถทำให้เกิดคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับ BBB เท่าที่ต้องการได้ และเมื่อเลี้ยงไปช่วงระยะหนึ่งพบว่า phenotype หรือ genotype อาจเปลี่ยนไปทำให้สูญเสียคุณลักษณะการเป็นแบบจำลองของ BBB ไปในที่สุด

ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดและเซลล์ astrocyte จากสมองหนูขาว แต่ก็มีเซลล์ชนิดอื่นมาปะปนเช่น เซลล์ที่อยู่รอบหลอดเลือด (pericyte) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) และ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) จึงได้มีความพยายามที่จะกำจัดเซลล์ปนเปื้อนเหล่านี้โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม (Abbott et al., 1992) อย่างไรก็ตามขั้นตอนที่สำคัญในการแยกเซลล์บุโพรงหลอดเลือดให้ได้จำนวนมากคือการใช้เอนไซม์ย่อยตามด้วยการแยกเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงแบบ density gradient

centrifugation โดยใช้ Percoll ที่มีความหนาแน่นเป็นลำดับเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงทิ้งออกไปที่จะมารบกวนการเกาะติดของเซลล์บุโพรงหลอดเลือดบนพื้นพลาสติก นอกจากนี้ยังใช้ยาปฏิชีวนะ puromycin ซึ่งเป็นยับยั้งการแปลรหัส (translation inhibitor) ทำให้เซลล์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมาถูกทำลายไปยกเว้นเซลล์บุโพรงหลอดเลือด เหตุผลที่เซลล์บุโพรงหลอดเลือดไม่ถูกทำลายเพราะเซลล์ชนิดนี้มีโปรตีน P-gp เป็นจำนวนมากคอยผลักยาปฏิชีวนะชนิดนี้ออกไป จึงไม่ถูกทำลาย ดังนั้นเมื่อใส่ puromycin ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะได้ปริมาณเซลล์บุโพรงหลอดเลือดมากขึ้นเมื่อเทียบกับไม่ได้ใส่ puromycin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเพื่อให้เซลล์บุโพรงหลอดเลือดยึดเกาะกับพื้นพลาสติกได้ดีจะต้องเคลือบพื้นพลาสติกด้วยโปรตีน fibronectin และ collagen IV ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular matrix) คอยยึดเซลล์เข้ากับบริเวณโดยรอบที่รองรับเซลล์บุโพรงหลอดเลือดในสมอง (Hamann et al., 1995) ค่า TEER ที่ได้จากงานวิจัยนี้ใกล้เคียงกับรูปแบบเซลล์จำลองการขนส่งระหว่างเลือดและสมองที่มีรายงาน (Gumbleton and Audus, 2001, Perrière et al., 2007) และเหมาะสำหรับการศึกษาการผ่านเข้าสู่สมองของสารสกัดสมุนไพร ถ้าทราบ chemical/bio-marker สำหรับติดตามการซึมผ่านของสารเข้าสู่สมอง รูปแบบเซลล์ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเป็นระบบการนำส่งยาเข้าสู่สมองต่อไป

เมื่อพิจารณาจากผลการทดสอบการรบกวนการทำงานของ efflux transporter ของสารสกัดสมุนไพรบาง fraction ที่ได้เลือกมาทดสอบ โดยดูผลจากการสะสมของ rhodamine 123 ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 และ LLC-MDR1 จะเห็นได้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีผลในการเพิ่มการสะสม rhodamine 123 ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-MDR1 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ P-gp สูงกว่าปกติ ได้ชัดเจนกว่าผลในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LLC-PK1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรเหล่านั้น อาจมีผลในการรบกวนการทำงานของ P-gp ผลในการรบกวนการทำงานของ efflux transporter พบได้จากสารที่เป็นส่วนประกอบในพืชอีกหลายชนิด ซึ่งในพืชและสารสกัดจากพืชบางชนิดอาจมีสารที่มีผลเพิ่มการทำงานของ P-gp (Soldner et al., 1999; John et al., 1999) นอกจาก P-gp จะมีการแสดงออกที่ endothelial cell ของ BBB แล้ว ยังพบ P-gp ที่ enterocyte ของลำไส้เล็กในปริมาณสูงอีกด้วย ดังนั้นอันตรกิริยาของสารสำคัญหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของสารสกัดสมุนไพร กับ P-gp อาจมีผลทำให้เกิดอันตรกิริยากับยาที่เป็นยับยั้งการขนส่งของ P-gp ได้ทั้งที่บริเวณหลอดเลือดสมองและที่ลำไส้เล็ก ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ หรือ bioavailability ของยานั้น ๆ ได้ ข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาของสารสกัดต่อ P-gp ที่ทดสอบในระบบเซลล์เพาะเลี้ยง ช่วยให้สามารถคาดคะเนถึงการเกิดอันตรกิริยาของสารสกัดต่อยารชนิดอื่นซึ่งมีการขนส่งผ่านเมมเบรนด้วย P-gp เช่นเดียวกัน จึงมีประโยชน์ในการช่วยคัดเลือกส่วนสกัดที่เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ทางคลินิกต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลเหล่านี้ยังมีประโยชน์ในการนำไปช่วยในการกำหนดขนาดและวิธีการให้ยา ค่าเดือนในการใช้ยา รวมทั้งช่วยในการกำหนดรูปแบบที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ยาที่จะพัฒนาต่อไปอีกด้วย

บรรณานุกรม

- Abbott, N.J., Hughes, C.C.W., Revest, P.A., Greenwood, J. 1992. Development and characterization of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* 103: 23-37.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 41-53.
- Arimori, K. and Nakano, M. 1998. Drug exsorption from blood into the gastrointestinal tract. *Pharm. Res.* 15: 371-375.
- Artursson, P. and Karlsson, J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 880-885.
- Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 27-43.
- Begley, D.J., Khan, E.U., Rollinson, C., Abbott, J., Regina, A., and Roux, F. The role of brain extracellular fluid production and efflux mechanisms in drug transport to the brain. In Begley, D.J., Bradbury, M.W., and Kreuter, J., eds. 2000. *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS.* New York: Marcel Dekker, Inc, pp. 93-108.
- Bradbury, M.W. 2000. History and Physiology of the blood-brain barrier in relation to delivery of drugs to the brain. In Begley, D.J., Bradbury, M.W., and Kreuter, J., eds. *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS.* New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 1-7.
- Burton, P.S., Goodwin, J.T., Conradi, R.A., Ho, N.F.H., and Hilgers, A.R. 1997. In vitro permeability of peptidomimetic drugs: the role of polarized efflux pathways as additional barrier to absorption. *Adv. Drug Del. Rev.* 23: 143-156.
- Calabria, A.R., Weidenfeller, C., Jones, A.R., de Vries, H.E., Shusta, E.V. 2006. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J. Neurochem.* 97: 922-933.
- Cerep application note. Caco-2 permability. Available on line at: www.cerep.fr [12 December 2004]
- Castelli, A., Catania, C., D'Agostino, S., Di Liegro, I., Licata, L., Schiera, G., Pitarresi, G.L., Savettieri, G., De Caro, V., Giandalia, G., and Giannola, L.I. 2001.

- Functional Feature of a novel model of blood brain barrier: studies on permeation of test compounds. *J. Control. Rel.* 76: 139-147.
- Chen et al. 2003. The expression, regulation and adhesion function of a novel CD molecule, CD226, on human endothelial cells. *Life Sciences* 73: 2373-2382.
- Corti, G., Maestrelli, F., Cirri, M., Zerrouk, N., and Mura, P. 2006. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27: 354-362.
- Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 54: 1798-1801.
- Deli, M.A., Abraham, C.S., Niwa, M., Dalus, A. 2003. N,N-diethyl-2[4-(phenylmethyl)phenoxy] ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflam. Res.* 52: S39-S40.
- D'Emanuele, A., Jevprasesphant, R., Penny, J., and Attwood, D. 2004. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transports and enhance oral bioavailability. *J. Control. Rel.* 95: 447-453.
- Domotor, E., Sipos, I., Kittel, A., Abbott, N.J., Adam-Vizi, V. 1998. Improved growth of cultured brain microvascular endothelial cells on glass coated with a biological matrix. *Neurochem Int.* 33: 473-478.
- Dressman, J.B. and Lennernas, H., eds. 2000. Oral drug absorption: Prediction and assessment. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 31-135.
- Dressman, J.B. and Yamada, K. 1991. Animal models for oral drug absorption. in Welling, P.G., Tse, F.L.S., and Dighe, S.V., eds. *Pharmaceutical bioequivalence*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 235-266.
- Eddy, E.P., Maleef, B.E., Hart, T.K., and Smith, P.L. 1997. In vitro models to predict blood-brain barrier permeability. *Adv. Drug Del. Rev.* 23: 185-198.
- Engelbertz, C., Korte, D., Nitz, T., Franke, H., Haselbach, M., Wegener, J., and Gall, H.-J. 2000. The development of in vitro models for the blood-brain and blood-CSF barriers. In Begley, D.J., Bradbury, M.W., and Kreuter, J., eds. *The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 33-63.
- Farkas, A., Szatmari, E., Orbok, A., Wilhelm, I., Wejksza, K., Nagyoszi, P., Hutamekalin, P., Bauer, H., Bauer, H.-C., Traweger, A., Krizbai, I. 2005. Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of β -catenin in cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 80: 855-861.

- Faassen, F., Vogel, G., Spanings, H., and Vromans, H. 2003. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Inter. J. Pharm.* 263: 113-122.
- Fleisher, D. 2000. Biological transport phenomena in the gastrointestinal tract: Cellular mechanisms. in Amidon, G.L., Lee, P.I., and Topp, E.M., eds. *Drugs and the pharmaceutical sciences* vol. 102: Transport processes in pharmaceutical systems. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 147-184.
- Fletcher, N.F., Brayden, D.J., Brankin, B., Worrall, S., Callanan, J.J. 2006. Growth and characterization of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109: 233-244.
- Foster, B.C., et al. 2001. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J. Pharm. Pharmaceutic. Sci.* 4(2):176-184.
- Gan, L.L.-S. and Thakker, D.R. 1997. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Adv. Drug Del. Rev.* 23: 77-98.
- Gumbleton, M., Audus, K.L. 2001. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* 90: 1681-1698.
- Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R., del Zoppo, G.J. 1995. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26: 2120-2126.
- Hartman, D. Permeability screen using Caco-2 or MDCK cell monolayers. Available on line at: www.ricerca.com/pages/RC1/permeability.html [12 December 2004]
- Hidalgo, J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749.
- Hoheisel, D., Nitz, T., Franke, H., Wegener, J., Hakvoort, A., Tilling, T., Galla, H-J. 1998. Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 312-316.
- Hunter, J., Hirst, B.H., and Simmons, N.L. 1993. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm. Res.* 10: 743-749.

- Johne, A., Brockmoller, J., Bauer, S., Maurer, A., Langheinrich, M., Roots, I. 1999. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin. Pharmacol. Ther.* 66: 338-345.
- Krizbai, I.A., Bauer, H., Amberger, A., Hennig, B., Szabo, H., Fuchs, R., Bauer, H.C. 2000. Growth factor-induced morphological, physiological and molecular characteristics in cerebral endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 594-600.
- Mahar Doan, K.M., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Wring, S.A., Shampine, L.J., Serabjit-Singh, C.J., Adkison, K.K., and Polli, J.W. 2002. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303:1029-1037.
- Mainprize, T., and Grady, L.T. 1998. Standardization of an in vitro method of drug absorption. *Pharmacopeial Forum* 24: 6015-6023.
- Martel, F., Monteiro, R., and Lemos, C. 2003. Uptake of serotonin at the apical and basolateral membranes of human intestinal epithelial (Caco-2) cells occurs through the neuronal serotonin transporter (SERT). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 355-362.
- Parkinson, F.E., Hacking, C. 2005. Pericyte abundance affects sucrose permeability in cultures of rat brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1049: 8-14.
- Perriere, N., Demeuse, P.H., Garcia, E., Debray, R.M., Andreux, J-P., Couvreur, P., Scherrmann, J-M., Tamsamani, J., Couraud, P-O., Deli, M.A., Roux, F. 2005. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* 93: 279-289.
- Perrière, N., Yousif, S., Cazaubon, S., Chaverot, N., Bourasset, F., Cisternino, S., Declèves, X., Hori, S., Terasaki, T., Deli, M., Scherrmann, J.M., Tamsamani, J., Roux, F., and Couraud, P.O. 2007. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res.* 1150: 1-13.
- Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., Morales, J., Tanner, L.I., Tomaselli, K.J., Bard, F. 1991. A cell culture model of the blood brain barrier. *J. Cell Biol.* 115: 1725-1735.
- Scism, J.L., Laska, D.A., Horn, J.W., Gimple, J.L., Pratt, S.E., Shepard, R.L., Dantzig, A.H., and Wrighton, S.A. 1999. Evaluation of an in vitro coculture model for the blood-brain barrier: comparison of human umbilical vein endothelial cells

- (ECV304) and rat glioma cells (C6) from two commercial sources. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 35: 580-592.
- Smith, M., Omid, Y., and Gumbleton, M. 2007. Primary porcine brain microvascular endothelial cells: Biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. *J. Drug Targeting*. 15: 253-268.
- Soldner, A., Christians, U., Susanto, M., Wachter, V.J., Silverman, J.A., and Benet, L.Z. 1999. Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport. *Pharm. Res.* 16: 478-484.
- Stewart, B.H., Chan, O.H., Lu, R.H., Reyner, E.L., Schmid, H.L., Hamilton, H.W., Steinbaugh, B.A., and Taylor, M.D. 1995. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.* 12: 693-699.
- Suzuki, H., Terasaki, T., and Sugiyama, Y. 1997. Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood cerebrospinal fluid barrier on the deposition of xenobiotics in the central nervous system. *Adv. Drug Del. Rev.* 25: 257-285.
- Troutman, M.D., and Thakker, D.R. 2003. Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharm. Res.* 20: 1210-1224.
- Tsuji, A and Tamai, I. 1997. Blood-brain barrier function of P-glycoprotein. *Adv. Drug Del. Rev.* 25: 287-298.
- Varma, M.V.S., et al. 2003. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* 48:347-359.
- Walter, E., and Kissel, T. 1995. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3: 215-230.
- Weidenfeller, C., Schrot, S., Zozulya, A., Galla, H-J. 2005. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res.* 1053: 162-174.
- Williamson, J.S. and Wyandt, C.M. 1998. An herbal update. *Drug Topics*. June 1: 66-75.
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., and Tokuda, H. 2000. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10: 195-204.

โครงการวิจัยที่ 5

การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต้านสารกระตุ้นประสาทในสัตว์ทดลอง *In vivo*
Toxicity evaluation of herbal extracts against CNS stimulants

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วาชีรี ลิมปานสิทธิกุล
(Assistant Professor Dr. Wacharee Limpanasithikul)

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล
(Assistant Professor Dr. Suree Jainmongkol)

ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสนับสนุนแผนงานวิจัยนี้
โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาให้มีมาตรฐานระดับ
สากล โดยการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งได้รับความ
สนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549

บทคัดย่อภาษาไทย

จากการคัดเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพร 52 ชนิด เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาท โดยทดสอบเบื้องต้นถึงความสามารถในการจับกับตัวรับสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้อง dopamine 1 receptor (D_1 receptor), α_1 -adrenergic receptor และ 5-hydroxytryptamine 2 receptor แบบ *in vitro* และทดสอบฤทธิ์ลดภาวะสิ้นหวังในสัตว์ทดลอง พบว่าสิ่งสกัด dichloromethane จากใบกระทกรก [*Passiflora foetida* (PF-003)] มีฤทธิ์ดีที่สุดในการจับกับ D_1 receptor และมีฤทธิ์ลดภาวะสิ้นหวังในหนูขาว ดังนั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป จึงทำการศึกษาความเป็นพิษของ PF-003 ในระยะเฉียบพลันในหนูถีบจักรสายพันธุ์ Swiss albino ทั้งสองเพศ (n=5 ในแต่ละเพศ) โดยทำการให้สิ่งสกัด PF-003 ที่ละลายใน dimethylsulfoxide ที่ขนาดของสิ่งสกัด 5, 50, 300 และ 2,000 mg/kg body weight เข้าทางช่องท้อง จากการสังเกตพฤติกรรมของสัตว์ ทุกชั่วโมงในวันแรก และทุกวันจนครบ 14 วัน พบว่า PF-003 ในขนาด 2000 mg/kg มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่ไม่พบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันที่ ของ PF-003 ความเข้มข้น 5, 50 และ 300 mg/Kg เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลตรวจทางพยาธิวิทยาของอวัยวะสำคัญ คือ ตับ ไต หัวใจ ปอด และม้าม ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Crude extract of *Passiflora foetida* leaves was the one among 52 plant species which were screened for activities against CNS stimulant by using *in vitro* receptor binding assay on dopamine 1 (D1), α_1 -adrenergic and 5-hydroxytryptamine 2 (5-HT₂) receptors. It significantly bound to D1 and 5-HT₂ receptors. PF-003 is the dichloromethane extraction fraction from of *Passiflora foetida* leaves. It had significantly binding activity against dopamine 1 receptor (D₁ receptor) *in vitro* and also demonstrated potential antidepressant activity in animal model of depression. For future benefit in clinic, the acute toxicity of PF-003 was assessed by using both sexes of Swiss albino mice (n=5 for each group). PF-003 in dimethylsulfoxide solution, at the doses 5, 50, 300, and 2,000 mg/kg body weight, was intraperitoneally (i.p.) injected into animals. The treated animals were observed every hour on the 1st day and every 2 times/day on day2-day14. The result demonstrated that PF-003 at the dose 2,000 mg/kg body weight had acute toxicity. The treated animals died within 4 hours after injection. However PF-003 at the lower doses, 5-300 mg/kg body weight had no toxicity on treated animals when compared to the untreated control animals. The pathological changes of liver, kidney, lung, heart, and spleen of the treated animal were also not significant when compared to the control group.

สารบัญ

| | หน้า |
|-------------------------------------------------------------|-------|
| กิตติกรรมประกาศ | 5-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 5-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 5-iv |
| สารบัญ | 5-v |
| สารบัญตาราง | 5-vi |
| บทนำ | 5-1 |
| 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 5-1 |
| 2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย | 5-1 |
| 3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 5-3 |
| 4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย | |
| 4.1 สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ | 5-3 |
| 4.2 สัตว์ทดลอง | 5-3 |
| 4.3 การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลัน | 5-3 |
| 4.4 การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง | 5-3 |
| 5. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล | |
| 5.1 การเตรียมสารละลายของสิ่งสกัด PF-003 | 5-4 |
| 5.2 การทดสอบพิษเฉียบพลัน | 5-4 |
| 6. สรุปผลการทดลอง | 5-13 |
| 7. เอกสารอ้างอิง | 5-13 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ 1 | | หน้า |
|------------|-----------------------------------------------------|------|
| | Observation sheet for acute toxicity test of PF-003 | |
| 1.1 | Female, control group (DMSO) | 5-5 |
| 1.2 | Male, control group (DMSO) | 5-6 |
| 1.3 | Female, PF-003 5 mg/kg body weight | 5-7 |
| 1.4 | Male, PF-003 5 mg/kg body weight | 5-8 |
| 1.5 | Female, PF-003 50 mg/kg body weight | 5-9 |
| 1.6 | Male, PF-003 50 mg/kg body weight | 5-10 |
| 1.7 | Female, PF-003 300 mg/kg body weight | 5-11 |
| 1.8 | Male, PF-003 300 mg/kg body weight | 5-12 |

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาการติดสารเสพติดที่มีฤทธิ์กระตุ้นประสาท ยังคงเป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทย รวมทั้งเป็นผลเสียต่อสุขภาพร่างกายและจิตใจของผู้เสพ เพราะสารกระตุ้นประสาทสามารถรบกวนหรือทำลายการทำงานของเนื้อเยื่อประสาท ตลอดจนสมดุลของสารสื่อประสาทต่างๆ การรักษาการติดยาในปัจจุบันมักเป็นการใช้กลุ่มยากล่อมประสาทที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้เกิดแนวทางที่ต้องการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท โดยสืบค้นข้อมูลเพื่อหาสมุนไพรในประเทศที่มีรายงานหรือการอ้างอิงจากตำรายาพื้นบ้านว่ามีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง มาทำการศึกษาวิจัยด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้ได้มาซึ่งพืชสมุนไพรในท้องถิ่นที่สามารถใช้แก้ปัญหาจากการเสพยาออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ทั้งยังเป็นการส่งเสริมการพึ่งตนเอง โดยอาจทำให้เกิดพัฒนาญาใหม่ที่ผ่านกระบวนการวิจัยที่ครบวงจร

จากการคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรจำนวน 52 ตัวอย่าง นำมาทำการทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทในหลอดทดลองโดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการจับตัวรับในระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเสพติดของสารกระตุ้นประสาท (α -adrenergic, dopamine และ serotonin receptor) และจากการนำสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งการจับตัวรับ dopamine 1 receptor มาศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการดูพฤติกรรมของหนูขาวเมื่อได้รับสารสกัด พบว่าสิ่งสกัด dichloromethane จากใบกระทกรก [*Passiflora foetida* (PF-003)] สามารถยับยั้งการจับตัวรับ dopamine 1 receptor มากกว่า 50% และมีผลลดสถานะสิ้นหวังในหนูขาว

จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้เห็นแนวโน้มว่า *P. foetida* อาจนำมาพัฒนาให้เป็นยาได้ โดยอาจนำไปใช้ในการแก้ปัญหาทางสุขภาพจิตอย่างความเครียด ความกังวล หรือการนอนไม่หลับ ที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานความเป็นพิษของพืชสมุนไพรตัวนี้ ดังนั้นการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของ *P. foetida* คือ PF-003 โดยการทดสอบความเป็นพิษของสาร จึงเป็นการศึกษาที่สำคัญ

2. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

เป็นที่ยอมรับว่าการใช้ยาสมุนไพรเป็นทางเลือกในการรักษาโรคที่มีส่วนช่วยลดการพึ่งพาต่างประเทศ การพัฒนาสมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐานสากลควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นหลักฐานยืนยันประสิทธิภาพ ปลอดภัย และความเหมาะสมในการนำมาใช้ ซึ่งจะทำให้การใช้ยาสมุนไพรเกิดประโยชน์ได้จริงอย่างกว้างขวาง เนื่องจากยาสมุนไพรมีใช้ในไทยมานานแล้วองค์การอาหารและยาจึงอนุโลมว่าไม่จำเป็นต้องศึกษาความปลอดภัยในสัตว์อีกหากมีหลักฐานยืนยันความ

ปลอดภัยอย่างเพียงพอจากประสบการณ์การใช้ในมนุษย์ อย่างไรก็ตามหากมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบของยา เช่น ทำอยู่ในรูปสารสกัดสมุนไพร ย่อมต้องมีการพิสูจน์ความปลอดภัยตามหลักสากลทำนองเดียวกับยาแผนปัจจุบัน โดยต้องทำการศึกษาพิษวิทยาของสารในสัตว์ทดลอง

ความรุนแรงของอาการจากพิษของสารใด ๆ รวมทั้งสารสกัดสมุนไพร ขึ้นกับขนาดของยา ในการทดสอบความเป็นพิษของยา Trevan (1927) เป็นผู้ริเริ่มใช้ค่า median lethal dose (LD50) ซึ่งเป็นขนาดของยา (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 มาใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสาร และจากการที่มีเด็กเสียชีวิตจากยากุ่ม sulphonamide (pontosil) ในปี ค.ศ. 1937 ทำให้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาออกกฎหมายว่าสารทุกชนิดต้องผ่านการทดสอบความเป็นพิษก่อนจะนำมาใช้เป็นยาในมนุษย์ได้ ปัจจุบันนี้การทดสอบความเป็นพิษของสารในสัตว์ทดลองถือเป็นมาตรฐานสากลทั่วโลก เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ในมนุษย์และเป็นแนวทางในการลดหรือป้องกันอันตรายจากการใช้ต่อไป

การประเมินความเป็นพิษของสมุนไพรในสัตว์ทดลอง เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยทางคลินิก โดยทั่วไปจะทำการประเมินความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และพิษตามระยะเวลาที่ได้รับสาร พิษเฉียบพลันทำการศึกษาภายใน 14 วัน พิษกึ่งเฉียบพลันทำการศึกษาภายใน 1 เดือน พิษเรื้อรังทำการศึกษาภายใน 3 เดือน และพิษเรื้อรังทำการศึกษาภายใน 12 เดือน การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเป็นการประเมินผลที่อัตราการเสียชีวิตของหนูถีบจักร และ/หรือหนูขาวหลังจากได้รับสารทางปากภายในเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติภายในเวลา 2 สัปดาห์หลังจากนั้น และตรวจสอบผลของการเกิดพิษต่ออวัยวะเป้าหมาย ข้อมูลจากการทดสอบพิษเฉียบพลันจะมีประโยชน์ในการเลือกขนาดเพื่อใช้ในการทดสอบพิษระยะอื่น ส่วนการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรัง ทำโดยการป้อนสารทางปากติดต่อกันทุกวันในหนูขาว เป็นเวลาตามที่กำหนดในการทดสอบพิษประเภทต่างๆ และหลังจากนั้นจึงทำการศึกษาพยาธิสภาวะที่อาจเกิดขึ้นได้ ด้วยการประเมินอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว การกินอาหาร พฤติกรรมและสรีระสภาพโดยรวม รวมทั้งผลการวิเคราะห์เลือดทางเคมีคลินิก ผลการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา และพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่สำคัญ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพิษในระยะต่างๆจะนำไปใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาว่าควรทำการศึกษาต่อในมนุษย์หรือไม่ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกขนาดยาที่เหมาะสมเพื่อทำการทดสอบในมนุษย์ รวมทั้งเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังหรือให้คำเตือนถึงอันตรายต่ออวัยวะและระบบต่างๆของร่างกายที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้สาร

ดังนั้นการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในสัตว์ทดลองมาแล้วว่ามีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาท โดยการทดสอบความเป็นพิษของสารในระยะต่างๆที่เหมาะสมกับระยะเวลาที่จะนำไปใช้จริงในการรักษารวมถึงพิษเฉียบพลัน จึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อนำผลที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวในระดับคลินิกต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ประเมินความเป็นพิษของสิ่งสกัด dichloromethane จากใบ *P. foetida* (PF-003) ในสัตว์ทดลอง

4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

สิ่งสกัด PF-003 ที่ผ่านการทดสอบทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* ว่ามีฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาท นำมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายในสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) เนื่องจาก PF-003 ละลายไม่ดีทั้งในน้ำและน้ำมัน และไม่สามารถทำให้อยู่ในรูปยาแขวนตะกอนที่เหมาะสมได้

4.2 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรสายพันธุ์ Swiss albino ทั้งสองเพศ น้ำหนัก 25-35 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และควบคุมให้มีช่วงแสงสว่างนาน 12 ชั่วโมง ช่วงมืดนาน 12 ชั่วโมง อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง

4.3 การทดสอบพิษเฉียบพลัน

ใช้หนูถีบจักรทั้งสองเพศ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลาย DMSO และกลุ่มทดลองที่ได้รับสิ่งสกัด PF-003 โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) เพียงครั้งเดียว ในขนาดต่างๆ คือ 5, 50, 300 และ 2,000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ทำการสังเกตและจดบันทึกการตายและอาการผิดปกติของสัตว์ทดลองทุกๆ ชั่วโมงใน 24 ชั่วโมงแรก และสังเกตวันละ 2 ครั้งในวันถัดไปจนครบ 14 วัน ทำการอดอาหารสัตว์ทดลอง 18 ชั่วโมงก่อนทำสลับเพื่อเก็บอวัยวะสำคัญ ได้แก่ ดับ ไต หัวใจ ปอด และม้าม เก็บแช่ไว้ใน 10% formalin in phosphate buffer solution ก่อนนำไปประเมินทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar น้ำหนักตัว 250 กรัม ทั้งสองเพศ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) คือ กลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายหรือสารแขวนลอย (suspending agents) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรทุกวันตามระยะเวลาที่ทดสอบ ในขนาดที่เหมาะสมอีก 3 ขนาด ตลอดเวลาทำการทดลองมีการสังเกตและจดบันทึกอย่างสม่ำเสมอ และมีการชั่งน้ำหนักตัวและอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ เมื่อครบตามกำหนดเวลาของการทดลอง ทำการอดอาหารสัตว์ทดลอง 18 ชั่วโมงก่อนทำสลับเพื่อทำการเจาะเลือดจาก inferior vena cava และทำการเก็บอวัยวะสำคัญ ได้แก่ ดับ ไต หัวใจ ม้าม ดับอ่อน ปอด และลำไส้ แล้วเก็บแช่ไว้ในสารละลายฟอร์มาลิน ก่อนนำไป

ประเมินทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป ส่วนตัวอย่างเลือดนำไปทำการตรวจทางโลหิตวิทยาและหาค่าทางชีวเคมีต่างๆ ในเลือด

5. ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

5.1 การเตรียมสารละลายของสิ่งสกัด PF-003

คณะผู้วิจัยทำการละลายสิ่งสกัด PF-003 ในตัวทำละลาย (solvent) ชนิดต่างๆ เพื่อให้เป็นสารละลายที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 2000 mg/ml พบว่าสารสกัดไม่ละลายในตัวทำละลายต่างๆที่สามารถใช้เตรียมให้เป็นสารละลายหรือสารแขวนตะกอน (ได้แก่ น้ำ ethanol, 0.25% carboxymethylcellulose suspension, 5% Tween in 0.25% carboxymethyl cellulose หรือ corn oil) เพื่อให้หนูกวางปาก สามารถละลายได้ดีใน dimethyl sulfoxideethanol (DMSO) เท่านั้น และมีการละลายน้อยมากในตัวทำละลายแบบ cosolvent ที่ประกอบด้วย DMSO ที่ต่ำกว่า 1% DMSO ในการทดสอบจึงต้องใช้สารสกัดในตัวทำละลาย DMSO และให้เข้าทางช่องท้องแทนการให้ทางปาก

5.2 การทดสอบพิษเฉียบพลัน

จากการทดลองครั้งแรก พบว่าสิ่งสกัด PF-003 ในขนาด 2000 mg/kg body weight มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยหนูเสียชีวิตทั้งหมดภายใน 4 ชั่วโมงแรก หลังได้รับสารสกัด ส่วนความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 300 mg/kg body weight จากการสังเกตทุกชั่วโมงใน 24 ชั่วโมงแรก และวันละ 2 ครั้งในวันถัดไปจนครบ 14 วัน ไม่พบความผิดปกติของสัตว์ทดลองที่ได้รับ PF-003 ทุกขนาด เมื่อเทียบกับหนูกุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อครบ 14 วัน น้ำหนักของหนูทั้งสองกลุ่มยังเพิ่มขึ้นและไม่มีความแตกต่างกันด้วย การที่ PF-003 ในขนาด 2000 mg/Kg มีความเป็นพิษสูงอาจเนื่องมาจากปัญหาด้านการละลายของสิ่งสกัด แม้ว่าจะละลายได้ใน DMSO ก่อนได้รับเข้าสู่ร่างกาย แต่เมื่อให้ยาเข้าร่างกายตัวทำละลายอาจเจือจางด้วยน้ำในร่างกายของสัตว์ทดลอง ทำให้เกิดการตกตะกอนและรบกวนการทำงานของอวัยวะภายในร่างกายได้

จากการทดสอบซ้ำโดยใช้สิ่งสกัด PF-003 ในขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg body ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับครั้งแรก คือ ไม่พบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูกุ่มทดลองที่ได้รับสิ่งสกัด PF-003 เมื่อครบ 14 วัน พบว่า น้ำหนักหนูมีการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1.1-1.8) ทำการรอดอาหารสัตว์ทดลอง 18 ชั่วโมงก่อนทำสลับเพื่อเก็บอวัยวะสำคัญ ได้แก่ ดับ ไต หัวใจ ปอด และม้าม ดับอ่อน เพื่อนำไปประเมินทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบความแตกต่างทางพยาธิวิทยาระหว่างหนูที่ได้รับสิ่งสกัด PF-003 กับหนูกุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO

Table 1.1 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Female, control group (DMSO)

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | normal | sleepy | normal | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 30 | 33 |
| No. 2 | 29.5 | 32 |
| No. 3 | 30 | 31.5 |
| No. 4 | 30 | 35 |
| No.5 | 30 | 32 |

Table 1.2 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Male, control group (DMSO)

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | normal | sleepy | normal | sleepy |
| 3 rd | normal | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 32 | 43 |
| No. 2 | 33 | 39 |
| No. 3 | 35 | 40.5 |
| No. 4 | 34 | 40 |
| No.5 | 32 | 39 |

Table 1.3 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Female, PF-003 5 mg/kg body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | sleepy | sleepy | sleepy | normal | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 35 | 36 |
| No. 2 | 34 | 33 |
| No. 3 | 30 | 33 |
| No. 4 | 30 | 35 |
| No.5 | 30 | 32 |

Table 1.4 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Male, PF-003 5 mg/kg. body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | normal | sleepy | normal | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 31 | 39 |
| No. 2 | 30 | 39.5 |
| No. 3 | 31 | 40.5 |
| No. 4 | 32 | 41.5 |
| No.5 | 35 | 43 |

Table 1.5 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Female, PF-003 50 mg/kg body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | sleepy | normal | normal | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 32 | 36 |
| No. 2 | 35 | 37 |
| No. 3 | 30 | 35 |
| No. 4 | 32 | 35 |
| No.5 | 34 | 36 |

Table 1.6 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Male, PF-003 50 mg/kg. body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | sleepy | normal | sleepy | normal | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 34 | 41.5 |
| No. 2 | 30 | 40 |
| No. 3 | 33 | 42 |
| No. 4 | 31 | 41 |
| No.5 | 30 | 38 |

Table 1.7 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Female, PF-003 300 mg/kg body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | normal | sleepy | normal | normal |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 31 | 35 |
| No. 2 | 34 | 38 |
| No. 3 | 30 | 33 |
| No. 4 | 32 | 35 |
| No.5 | 31 | 37 |

Table 1.8 Observation sheet for acute toxicity test of PF-003

Male, PF-003 300 mg/kg. body weight

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Day1 | | | | | |
| 1 st hour | normal | normal | normal | normal | normal |
| 2 nd | normal | normal | sleepy | sleepy | sleepy |
| 3 rd | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 4 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| 5 th | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy | sleepy |
| Day2 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day3 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day4 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day5 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day6 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day7 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day8 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day9 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day10 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day11 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day12 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day13 | normal | normal | normal | normal | normal |
| Day14 | normal | normal | normal | normal | normal |

Body weight of animal on day1 and day 14

| | Day1 | Day14 |
|-------|------|-------|
| No. 1 | 32 | 41.5 |
| No. 2 | 31 | 37 |
| No. 3 | 30 | 37.5 |
| No. 4 | 33 | 40 |
| No.5 | 31 | 38 |

ในการทดลองพบว่าการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายที่ทำให้ไม่สามารถให้ยาแก่สัตว์ทดลองทางปากได้ และพบว่า DMSO มีผลทางพยาธิวิทยาบ้างเล็กน้อยต่อดับและปอด ดังนั้นควรมีการพัฒนาารูปแบบของสิ่งสกัดให้เหมาะสมเพื่อสามารถให้ยาทางปากได้

5.2 การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

เนื่องจากต้องใช้สารปริมาณมากในการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาวทั้งสองเพศ ทำให้ไม่สามารถผลิตสิ่งสกัด PF-003 ให้เพียงพอกับการทดสอบได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องการละลายของสิ่งสกัดดังกล่าวข้างต้นที่ต้องให้ในสัตว์ทดลองทุกวันติดต่อกันนาน 90 วัน จึงไม่สามารถทำการทดลองส่วนนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ได้

6. สรุปผลการทดลอง

สิ่งสกัดจากใบกระทกรก (*P. foetida*) ที่แยกส่วนโดยใช้ dichloromethane (PF-003) มีความเป็นพิษเฉียบพลันที่ขนาด 2000 mg/kg body weight แต่ไม่พบพิษเฉียบพลันที่ขนาด 300 mg/kg body weight และต่ำกว่า ในขณะที่ขนาดที่เห็นฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้าที่อาจพบได้ในการบำบัดผู้เสพยาเสพติดรุนแรงที่ขนาด 50 mg/kg body weight ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า PF-003 มีแนวโน้มว่ามีค่อนข้างปลอดภัย การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังและพิษเรื้อรังของสิ่งสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมกว่าการศึกษาครั้งนี้ จะช่วยยืนยันผลสรุปนี้ได้

7. เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการพัฒนาาหลักแห่งชาติ 2543 บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2524 (บัญชียาจากสมุนไพร) พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

Auletta, C.S. 1995. Acute, subchronic, and chronic toxicology, in *CRC Handbook of Toxicology*. Deralanko, M.J. and Hollinger, M.A., eds. CRC Press, Inc, USA.

Chan P.K. and Heyes A.W. 1989 Principle and Method for Acute Toxicity and Eye Irritancy. In Hayes A.W. ed. Principles and Methods of Toxicology. 2nd ed. New York, Raven Press Ltd.

Chengelis CP. 1995. Acute Toxicity Testing in Drug Safety Evaluation. In Gad SC. Ed. Safety Assessment for Pharmaceuticals. 1st ed. New York. Van Nostrand Reinhold.

Gad SC. 1995 Subchronic and Chronic Toxicity Studies. In Gad SC. Ed. Safety Assessment for Pharmaceuticals. 1st ed. New York. Van Nostrand Reinhold.

Rhodes C. 2000 Principles of testing for acute toxic effects. In Ballantyne B., Marr T.C. and Syversen T. eds. General and Applied Toxicology. 2nd ed. London. MacMillan Reference Ltd.

Cunney H. and Hodgson E.: 2004 Toxicity testing in Hodgson E. ed. The Textbook of Modern Toxicology, 3rd ed., New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.,

โครงการวิจัยที่ 6

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาท
สัตว์ทดลอง

**The ancillary pharmacology of herbal extracts with inhibitory effects against
narcotic CNS stimulants**

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล

(Assistant Professor Dr. Suree Jianmongkol)

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชรี ลิมปนสิทธิกุล

(Assistant Professor Dr. Wacharee Limpanasithikul)

ผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2551

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการดำเนินงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวสาลินี ศิโรตม นิสิตบัณฑิตศึกษา หลักสูตรมหาบัณฑิตสาขา เกษษวิทยา ที่ได้มีส่วนร่วมและดำเนินการวิจัยอันเป็นส่วนหนึ่งของงานวิทยานิพนธ์ และนางสาวปารณีย์ ญาติมาก ที่ได้มีส่วนร่วมและดำเนินการวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะเกษตรศาสตร์ และ ภาควิชาเกษตรวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสนับสนุนแผนงานวิจัยนี้

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีมาตรฐานระดับสากล โดยการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งได้รับความสนับสนุนงบประมาณจาก ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549

บทคัดย่อภาษาไทย

จากการศึกษากระทกรกซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีการใช้มานาน พบความเป็นไปได้ในการนำมาต้านฤทธิ์สารกระตุ้นประสาท เนื่องจากพบฤทธิ์ต้านการซึมเศร้าในแบบจำลองการซึมเศร้าในหนูถีบจักร และความสามารถในการจับกับ dopamine และ serotonin receptor ได้อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆของกระทกรกยังมีไม่มากนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่สกัดด้วย dichloromethane ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารสกัด dichloromethane ของกระทกรกจำนวน 6 subfractions ได้แก่ PF002-1, PF002-5, PF002-7, PF003-1, PF003-2 and PF003-(3-5) ที่มีต่อการทำงานของหัวใจ หลอดเลือด หลอดลมและลำไส้เล็ก โดยศึกษาในอวัยวะที่แยกจากกายสัตว์ทดลอง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดกระทกรก fractions ต่างๆ (ความเข้มข้น 101 µg/ml) สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ หลอดลมและลำไส้เล็กส่วนไอเลียม ที่ถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วยสารกระตุ้นได้ โดยในแต่ละ fractions จะมีความแรงและความจำเพาะในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน สารสกัด PF002 เป็น fractions ที่มีความจำเพาะอย่างมากต่อการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ถูกกระตุ้นด้วย serotonin โดยมีลำดับความแรงคือ PF002-5 > PF002-7 > PF002-1 ~ PF003s นอกจากนี้สารสกัดทั้งหมดมีผลค่อนข้างน้อย (< 30%) ต่อการยับยั้งการหดตัวของหลอดลมที่กระตุ้นด้วย acetylcholine, histamine และ serotonin ในส่วนของผลต่อลำไส้เล็กพบว่า PF002-1 และ PF003-1 เป็นสารสกัดที่แรงที่สุดในการยับยั้งการหดตัวของไอเลียมที่กระตุ้นด้วย BaCl₂ และ acetylcholine สำหรับผลต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจนั้น PF003-2 มีผลกดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายและขวาในช่วงแรก หลังจากนั้นจะเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแรงบีบตัวของหัวใจที่เพิ่มขึ้นถูกยับยั้งได้ด้วย propranolol และ ketanserin แสดงว่าสารสกัดทั้ง 2 นำที่จะออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นที่ β -adrenoceptor และ serotonin receptor สารสกัดกระทกรก fractions ต่างๆ ส่วนใหญ่ไม่พบว่ามีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา ยกเว้น PF003-(3-5)ซึ่งมีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา

โดยสรุปแล้วสารสกัดกระทกรกที่สกัดด้วย dichloromethane ในแต่ละ fraction มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยตรงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจ ทั้งนี้ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับความไวของอวัยวะที่นำมาทดสอบ ชนิดของสารกระตุ้นการหดตัว และสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด ซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่นอกเหนือไปจากระบบประสาทส่วนกลางเหล่านี้เป็นข้อมูลชี้ถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเพื่อใช้บำบัดโรคต่างๆ ตลอดจนผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นได้ของสารสกัดกระทกรก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Passiflora foetida extracts were good candidates for treatment of CNS Stimulant Addicts due to their potential antidepressant activities in the *in vivo* animal model of depression and their ability to bind dopamine and serotonin receptors. However, few investigations have been carried out for other pharmacological actions of *P. foetida*. This study, therefore, aimed to investigate the potential effects of *P. foetida* dichloromethane extracts (6 subfractions: arbitrarily coded as PF002-1, PF002-5, PF002-7, PF003-1, PF003-2 and PF003-M) on contractility of various muscles including isolated rat thoracic aorta and atria as well as isolated guinea-pig trachea and ileum. Our results showed that the extracts (101 µg/ml) were able to suppress, with differential degree, aortic, ileum and tracheal contractions evoked by various contractants. Apparently, PF002 subfractions were highly selective inhibitors against serotonin-induced aortic contractions. A relative order of the inhibitory potency of the extracts was PF002-5 > PF002-7 > PF002-1 ~ PF003s. The extracts elicited slightly inhibitory effects (less than 30%) against acetylcholine-, histamine-, and serotonin-induced trachea contractions. Moreover, PF002-1 and PF003-1 were the most potent inhibitor of ileum contraction induced by BaCl₂ and acetylcholine. The results also showed that PF003-2 had transiently depressed contractile force on both left and right atria, followed by significant increasing the force of contraction. The positive inotropic effect of PF003-2 was partially inhibited by propranolol and ketanserin, suggesting the involvement of beta adrenoceptor and serotonin receptors. PF003-2, and others PF subfractions, except PF003-(3-5), had no significant chronotropic effect on right atria. PF003-(3-5), by contrast, showed significant negative chronotropic effect to right atria.

In conclusion, the present study suggested that *P. foetida* extracts possessed intrinsic activities that could directly affect contractility of smooth muscle and cardiac muscle. In addition, these effects could be influenced by tissue sensitivity, types of stimulants, and chemical constituents in each of the extracts. These peripheral effects of PF subfractions could be attributable to the therapeutic potential or side effect of *Passiflora foetida*.

สารบัญ

| | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| กิตติกรรมประกาศ | 6-ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 6-iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 6-iv |
| สารบัญ | 6-v |
| สารบัญรูป | 6-vi |
| คำย่อที่ใช้ | 6-vii |
| บทนำ | 6-1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 6-1 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 6-2 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 6-2 |
| ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย | 6-3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ | 6-3 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 6-4 |
| สัตว์ทดลอง | 6-4 |
| เครื่องมือและอุปกรณ์สำคัญ | 6-4 |
| สารเคมีสำคัญ | 6-4 |
| วิธีการทดลอง | 6-5 |
| • การเตรียมกล้ามเนื้อเนื้อจากอวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลอง | 6-5 |
| • การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการวิเคราะห์ข้อมูล | 6-6 |
| ผลการทดลอง | 6-7 |
| ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ | 6-7 |
| ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของลำไส้เล็กส่วนไอเลียม | 6-9 |
| ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของหลอดลม | 6-10 |
| ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของหัวใจ | 6-11 |
| อภิปรายและสรุปผลการวิจัย | 6-17 |
| บรรณานุกรม | 6-21 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย PE 10 μ M, Dopamine 1 μ M, Serotonin 1 μ M, และ KCl 40 mM | 6-8 |
| 2 | ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน Ilium ที่แยกจากกายหนูตะเภาก็ถูกกระตุ้นด้วย BaCl ₂ 1 mM, ACh 10 μ M และ histamine 10 μ M | 6-9 |
| 3 | ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภาก็ถูกกระตุ้นด้วย ACh 10 μ M, histamine 10 μ M และ serotonin 10 μ M | 6-10 |
| 4 | ผลของสารสกัด PF003-2 (101 μ g/ml) ที่มีต่อแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนด้านซ้ายและขวา | 6-11 |
| 5 | ผลของสารสกัดกะทกรก fraction ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 101 μ g/ml ต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และห้องบนด้านขวา (R Force) | 6-12 |
| 6 | ผลของสารสกัดกะทกรก fraction ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 101 μ g/ml ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา (R Rate) | 6-13 |
| 7 | ผลของสารสกัดกะทกรก PF003-2 ที่ความเข้มข้น 101 μ g/ml ต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห้องบนด้านขวา (R Force; R Rate) เมื่อให้ภายหลังจากให้ propranolol 10 μ M เป็นเวลา 5 นาที | 6-14 |
| 8 | ผลของสารสกัดกะทกรก PF003-2 ที่ความเข้มข้น 101 μ g/ml ต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห้องบนด้านขวา (R Force; R Rate) เมื่อให้ภายหลังจากให้ ketanserin 10 μ M เป็นเวลา 5 นาที | 6-15 |
| 9 | ผลของ Tyramine (10 μ M) (รูปด้านซ้าย) และสารสกัดกะทกรก PF003-2 (101 μ g/ml (รูปด้านขวา) ที่มีต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห้องบนด้านขวา (R Force; R rate) ที่แยกจากกายหนูขาวปกติและหนูขาวที่ได้รับ reserpine | 6-16 |

คำย่อที่ใช้

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| ACh | Acetylcholine |
| BaCl ₂ | Barium chloride |
| CaCl ₂ | Calcium chloride |
| DA | Dopamine |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamine; serotonin |
| Hz | Hertz |
| µg | Microgram |
| µg/ml | Microgram per milliliter |
| NaCl | Sodium chloride |
| NaHCO ₃ | Sodium bicarbonate |
| KCl | Potassium chloride |
| KH ₂ PO ₄ | Dihydrogen potassium phosphate |
| Kg | Kilogram |
| L | Left |
| MgCl ₂ | Magnesium chloride |
| MgSO ₄ | Magnesium sulfate |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| NE | Noradrenaline; norepinephrine |
| PE | Phenylephrine |
| R | Right |
| µM | Micromolar |

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรหรือสารใดๆเพื่อนำมาใช้เป็นยานั้น นอกเหนือไปจากการพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลของสารนั้นในการออกฤทธิ์ที่เป้าหมายตามต้องการแล้ว ยังต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงหรืออาการอันไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้ยานั้นๆ ทั้งนี้เพราะเมื่อยาเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกกระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกายไม่จำกัดเฉพาะแต่เป้าหมายที่ต้องการเท่านั้น ดังจะเห็นได้ว่าสารกระตุ้นประสาทต่างๆ เช่น กัญชา โคเคน คาเฟอีน นิโคตินหรือ แอมเฟตามีนออกฤทธิ์ที่สมองทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของสารสื่อประสาทและตัวรับ โดยเฉพาะแอมเฟตามีนและอนุพันธ์ซึ่งเป็น sympatomimetic agents มีผลคล้ายกับการออกฤทธิ์ของสารสื่อประสาทกลุ่มนอร์แอดรีนาลีน (noradrenaline; NE), โดปามีน (dopamine; DA) และซีโรโตนิน (serotonin; 5-HT) ในสมอง และได้มีรายงานเกี่ยวกับผลของสารเหล่านี้ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ความดันโลหิตสูง และหัวใจเต้นผิดจังหวะ (Boyer and Shannon, 2005; Ogawa, et al., 2002) นอกจากนี้ยาที่ใช้บำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาทเหล่านี้ซึ่งมักอยู่ในกลุ่มยาก่อมประสาทก็สามารถทำให้เกิดอาการข้างเคียงเหล่านี้ได้เช่นกัน โดยขึ้นกับคุณสมบัติจำเพาะทางเภสัชวิทยาของยาตัวนั้นๆ ทั้งนี้เพราะสารสื่อประสาทและตัวรับซึ่งเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาทหรือสารที่ใช้ต้านสารกระตุ้นประสาทไม่ได้มีอยู่เฉพาะแต่ในสมองเท่านั้น แต่ยังพบได้ในระบบประสาทส่วนปลายซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆของร่างกายเช่นหัวใจ หลอดเลือด กระเพาะอาหาร ลำไส้ เป็นต้น

ประเด็นที่สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ต้องมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของระบบอวัยวะอื่นๆของร่างกายนอกเหนือจากระบบประสาทส่วนกลางคือ การกระจายของตัวรับสารสื่อประสาทในระบบอวัยวะต่างๆนั้นมีความแตกต่างกันและผลทางเภสัชวิทยาที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นตัวรับต่างชนิดกันอาจมีความแตกต่างกันได้ เช่นตัวรับสารสื่อประสาทกลุ่มนอร์แอดรีนาลีน ประกอบด้วย แอลฟา-1, แอลฟา-2, เบตา-1, เบตา-2 และ เบตา-3 ซึ่งถ้ากระตุ้นตัวรับ แอลฟา-1 ในหลอดเลือดจะทำให้หลอดเลือดหดตัว ในขณะที่การกระตุ้น ตัวรับเบตา-2 จะทำให้หลอดเลือดขยายตัว อย่างไรก็ตามฤทธิ์โดยรวมต่อหลอดเลือดของนอร์แอดรีนาลีน คือการหดตัวของหลอดเลือด เพราะหลอดเลือดมีตัวรับแอลฟา-1 อยู่มากกว่าตัวรับเบตา-2 เป็นต้น นอกจากนี้ความจำเพาะหรือความสามารถของสารสื่อประสาทหรือสารใดๆที่จับตัวรับยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อผลทางเภสัชวิทยาที่เกิดขึ้นเช่น Isoproterenol ซึ่งเป็น sympatomimetic agents ที่ออกฤทธิ์ที่ตัวรับเบตา และมีฤทธิ์น้อยมากต่อตัวรับแอลฟา จึงสามารถใช้ขยายหลอดเลือดผ่านทางกระตุ้นตัวรับเบตา โดยไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดซึ่งต้องอาศัยการกระตุ้นผ่านตัวรับแอลฟา เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าผลทางเภสัชวิทยาที่เกิดจากการทำงานของสารสื่อประสาทและตัวรับมีความซับซ้อน ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับแผนงานวิจัยนี้ที่จะต้องศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทที่ได้ว่ามีผลโดยตรงต่อการทำงานของระบบอวัยวะที่สำคัญของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบหัวใจ หลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจ นอกเหนือไปจากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีต่อสมองในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งได้ทำการศึกษาในโครงการวิจัยที่ 2 และ 3 แล้ว เพื่อให้ได้ข้อมูลมาช่วยในการพัฒนาสารสกัดนี้ขึ้นเป็นยาที่สามารถใช้ได้ผลและมีความปลอดภัยในการใช้สำหรับบำบัดโรคหรืออาการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานระบบประสาทส่วนกลางต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นการค้นพบและทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวยังอาจนำมาซึ่งการค้นพบยาใหม่ที่มีผลต่อกลไกการทำงานของสารสื่อประสาทและตัวรับซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในการพัฒนาขึ้นใช้สำหรับบำบัดโรคในระบบอื่นๆเช่น โรคในระบบหัวใจ หลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจต่อไป

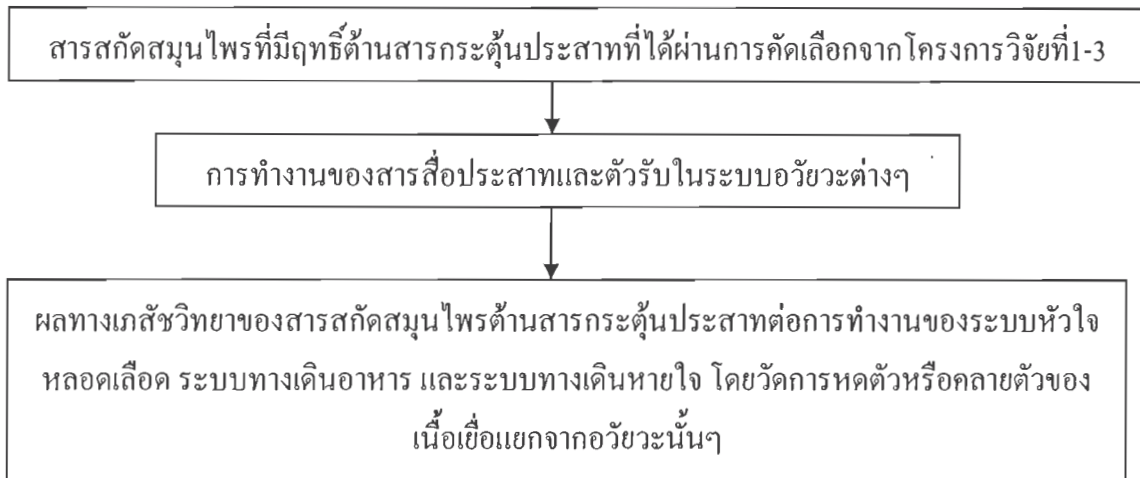
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทที่มีผลโดยตรงต่อการทำงานของระบบหัวใจ หลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจ ทั้งนี้สารสกัดสมุนไพรที่เลือกมาศึกษาได้แก่สารสกัดสมุนไพรจากโครงการที่ 1 ที่ผ่านการประเมินว่ามีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทในโครงการที่ 2 และ โครงการที่ 3
2. เพื่อเปรียบเทียบผลทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทต่ออวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลองที่ปกติและจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารเสพติด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากโครงการวิจัยที่ 1-3 มาแล้วนั้น จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทที่มีผลต่อการทำงานของหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่ ลำไส้ และหลอดลมโดยใช้อวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลอง (หนูขาว หรือ หนูตะเภา) ซึ่งสามารถใช้ทดสอบผลโดยตรงทางเภสัชวิทยาของสารสกัดได้ ทั้งนี้โดยอาศัยแนวความคิดว่าการออกฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทโดยเฉพาะแอมเฟตามีนของสารสกัดสมุนไพรเกี่ยวข้องเนื่องกับการทำงานของสารสื่อประสาทและตัวรับในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งสารสื่อประสาทและตัวรับดังกล่าวสามารถพบได้ระบบประสาทส่วนปลายที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆของร่างกาย ดังนั้นสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านสารกระตุ้นประสาทอาจจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบหัวใจ หลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจได้เช่นกัน

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual framework) ของโครงการวิจัย



การพัฒนายานั้นต้องมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อค้นหาฤทธิ์ในการรักษาโรคของยานั้นๆ ตลอดจนอธิบายถึงผลข้างเคียง หรืออาการอันไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น ในการพัฒนาสมุนไพรเพื่อเป็นยาบำบัดผู้ติดสารเสพติดกระตุ้นประสาทก็เช่นเดียวกัน นอกจากต้องศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่ระบบประสาทส่วนกลางตามโครงการวิจัยที่1-3 แล้ว จำเป็นที่ต้องศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบการทำงานอื่นๆของร่างกายด้วย ซึ่งการทดสอบในอวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลอง เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถบ่งชี้ผลของยาที่มีโดยตรงต่ออวัยวะนั้นๆ อย่างมีประสิทธิภาพ เชื่อถือได้ ประหยัด รวดเร็ว ไม่มีปัจจัยอื่นเช่นตำรับยาซึ่งมีผลต่อความเข้มข้นของยาที่ถูกดูดซึมเข้าร่างกายมาเกี่ยวข้องต่อการแปลผล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ผลการศึกษาสามารถให้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการประเมินหรือทำนายการก่อให้เกิดผลข้างเคียงหรืออาการอันไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้สารสกัดสมุนไพรนี้ นอกจากนี้ยังอาจใช้ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรว่าสามารถบำบัดหรือบรรเทาอาการข้างเคียงที่เกิดเนื่องจากการใช้สารกระตุ้นประสาท หรือจากการถอนยา
2. ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรนี้ที่มีผลต่อการทำงานของระบบอวัยวะอื่นๆที่สำคัญของร่างกาย นอกจากฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางนำมาซึ่งการค้นพบยาใหม่ที่สามารถใช้บำบัดหรือรักษาโรคในระบบอื่นๆ
3. ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรนี้ชี้้นำถึงการศึกษาวิจัยในเชิงลึกต่อไปเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่มีต่อระบบการทำงานต่างๆของร่างกาย ซึ่งเป็น

การสร้างองค์ความรู้ใหม่และสร้างระบบฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนาจากสมุนไพรรักษาให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

หนูขาว (สายพันธุ์ Wistar rats) หรือ หนูตะเภา (Dunkin Hartley Guinea-pig) เพศผู้ น้ำหนัก 200-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม และนำมาเลี้ยงต่อที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการปรับสภาพร่างกาย 1-2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์สำคัญ

- Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย ฉนวนแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้หล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 15 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกจากกายแล้วมาทดลอง และมีช่องสำหรับการผ่านเข้าของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbogen gas) ซึ่งเป็นก๊าซผสมระหว่างออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 95% และ 5% ตามลำดับ นอกจากนี้ชั้นนอกของ organ bath จะมีน้ำไหลเวียนที่ส่งมาจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของ Organ bath ให้คงที่ที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง
- เครื่องมือวัดแรงในการหดตัวของเนื้อเยื่อแบบ isometric force transducer รุ่น MLT 050/A (ADInstruments, Australia)
- เครื่องแปลงและขยายสัญญาณ รุ่น PowerLab /4sp พร้อมโปรแกรม PowerLab (Chart V 5.0.2) (ADInstruments, Australia)

สารเคมีสำคัญ

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาที่สำคัญได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Acetylcholine (Ach), Phenylephrine (PE), Potassium chloride (KCl), Dopamine (DA), Serotonin (5HT) และ Barium chloride (BaCl₂) มาจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit และ Tyrode เช่น NaCl , KCl , CaCl₂ , MgCl₂ , KH₂PO₄ , NaHCO₃ , Glucose , MgSO₄ , EDTA มาจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) และ APS Chemicals Limited (Seven Hills, NSW, Australia).

สารทดสอบได้แก่ สารสกัดกะทกรก fraction ย่อยดังนี้ PF 002-1, PF 002-5, PF 002-7, PF 003-1, PF 003-2 และ PF003 (mix 3-4-5)

วิธีการทดลอง

- การเตรียมกล้ามเนื้อเนื่องจากอวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรด้านสารกระตุ้นประสาทที่มีผลโดยตรงต่อการทำงานของหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่ ลำไส้ส่วนไอเลียม และหลอดเลือดที่แยกจากสัตว์ทดลองดังนี้

1. เตรียมสัตว์ทดลองโดยทำให้หมดความรู้สึกโดยวิธี cervical dislocation จากนั้นเปิดช่องอกหรือช่องท้องเพื่อผ่าตัดเอาอวัยวะที่ต้องการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ หัวใจ (Straumann et al., 2001; Fitzgerald and Reid, 1994) หลอดเลือดแดงใหญ่ (Straumann et al., 2001; Noguera and D'Ocon, 1993; Ljung and Kjellstedt, 1987) ลำไส้ส่วนไอเลียม (Barlow and Khan, 1959) และหลอดเลือด (Reinheimer et al., 2000) ทั้งนี้สัตว์ทดลองที่ใช้ได้แก่ หนูขาว(สายพันธุ์ Wistar rats) หรือหนูตะเภา (Dunkin Hartley Guinea pig) ตามความเหมาะสม ในกรณีที่เปิดช่องท้องเพื่อผ่าตัดแยกลำไส้ส่วนไอเลียมนั้น จะตัดกระบังลมสัตว์ทดลองก่อนตัดแยกอวัยวะทุกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าสัตว์ไม่มีชีวิตขณะตัดแยกอวัยวะ

2. เมื่อได้อวัยวะที่ต้องการศึกษาแล้ว จะนำมาใส่ใน physiological solution ตามความเหมาะสมโดยใช้สารละลาย Krebs-Henseleit สำหรับหลอดเลือด หลอดลมและหัวใจ หรือสารละลาย Tyrode สำหรับลำไส้ส่วนไอเลียม และให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเนื้อเยื่อได้รับกาซคาร์โบเจนตลอดเวลา จากนั้นทำความสะอาดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดออกจนหมดแล้วเตรียมอวัยวะที่ต้องการศึกษาตามความเหมาะสมตามวิธีมาตรฐานที่ระบุในเอกสารอ้างอิงข้างต้นเช่น ตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ในลักษณะเกลียว จะได้ชิ้นกล้ามเนื้อเรียบเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ตัดแบ่งให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร หรือตัดแยกหัวใจออกเป็นส่วน atrium ซ้าย และขวา เพื่อดูผลต่อการเดินของหัวใจ ส่วนหลอดเลือดและลำไส้ส่วนไอเลียมให้ตัดแนวขวางได้ลักษณะวงแหวนที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

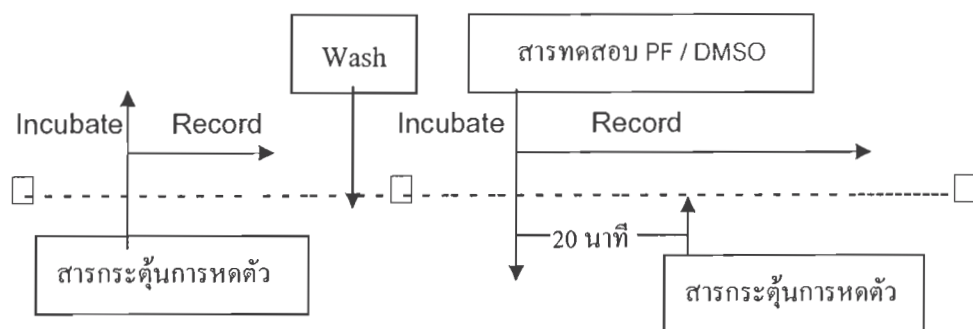
อนึ่งการศึกษาในกล้ามเนื้อหลอดเลือดจะทำการทดสอบการมีอยู่ของเซลล์เยื่อบุผิว (endothelium) โดยกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย PE (1 μ M) แล้วเติม ACh (10 μ M) ซึ่งเป็น endothelium dependent vasodilator หลอดเลือดที่ปราศจากเซลล์เยื่อบุผิวจะไม่เกิดการคลายตัว เมื่อได้รับ ACh

3. เมื่อได้กล้ามเนื้อที่ต้องการศึกษาแล้ว ให้นำมาแขวนใน Organ bath ที่มี physiological solution ตามความเหมาะสม และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยตรึงปลายข้างหนึ่งของชิ้นเนื้อกับ Organ bath และให้ปลายอีกด้านหนึ่งของชิ้นเนื้อผูกติดกับ transducer ที่ต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณ และเครื่องบันทึกผลการทดลอง จากนั้นปรับความตึงตัวของเนื้อเยื่อให้มีความตึงขณะพัก ประมาณ 1 กรัม และทิ้งไว้ให้มีแรงตึงคงที่ ประมาณ 60 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลอง

• การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ละลายสารสกัดสมุนไพรมใน DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และใส่ลงใน physiological solution ใน Organ bath ที่มีอวัยวะที่ต้องการทดสอบแขวนอยู่ ทั้งนี้ความเข้มข้นของ DMSO ใน organ bath 15 ml ตลอดการศึกษาไม่มากกว่า 0.25%v/v และใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการวิเคราะห์ผล

2. ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรมต่อการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อที่ได้จากอวัยวะต่างๆ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของแรงตึง (force) ที่บันทึกผลไว้ รวมถึงอัตราการเต้นของหัวใจ ทั้งจากที่สารสกัดสมุนไพรมเองเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองดังกล่าว หรือ ผลของสารสกัดสมุนไพรมที่มีต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารสื่อประสาทต่างๆ เช่น noradrenaline หรือ phenylephrine (PE), histamine และ 5-HT เป็นต้น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพรมเป็นกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ได้แสดงรูปแบบการทดลองในแผนภาพการศึกษาที่ 1



แผนภาพการศึกษาที่ 1

3. ข้อมูลที่ได้จะถูกรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย(mean \pm standard error of mean) ของเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของกล้ามเนื้อเมื่อได้รับสารสกัดสมุนไพรเทียบกับก่อนได้รับสารสกัดสมุนไพรโดยมีจำนวนตัวอย่าง (n) = 4-8 เพื่อการทดสอบทางสถิติ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารสกัดสมุนไพรและกลุ่มควบคุมที่มี DMSO ใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย post hoc test ชนิด Dunnett's นอกจากนี้ในบางกรณีใช้ Student's t-test ตามความเหมาะสม เพื่อประกอบการรายงานผลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรต่อระบบอวัยวะต่างๆ ทั้งนี้พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบสารสกัดจากกะทกรก fraction ย่อยต่างๆ ที่คัดเลือกจากความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับและมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยดังรายละเอียดในโครงการที่ 2 และฤทธิ์ที่มีต่อการทำงานของระบบประสาทในสัตว์ทดลองดังรายละเอียดตามโครงการที่ 3 โดยทดสอบสารสกัดจากกะทกรกที่ความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่ง fraction ย่อยที่นำมาศึกษาผลที่มีต่อการทำงานของอวัยวะที่แยกจากกายสัตว์ทดลองได้แก่ PF 002-1, PF 002-5, PF 002-7, PF 003-1, PF 003-2 และ PF003 (mix 3-4-5)

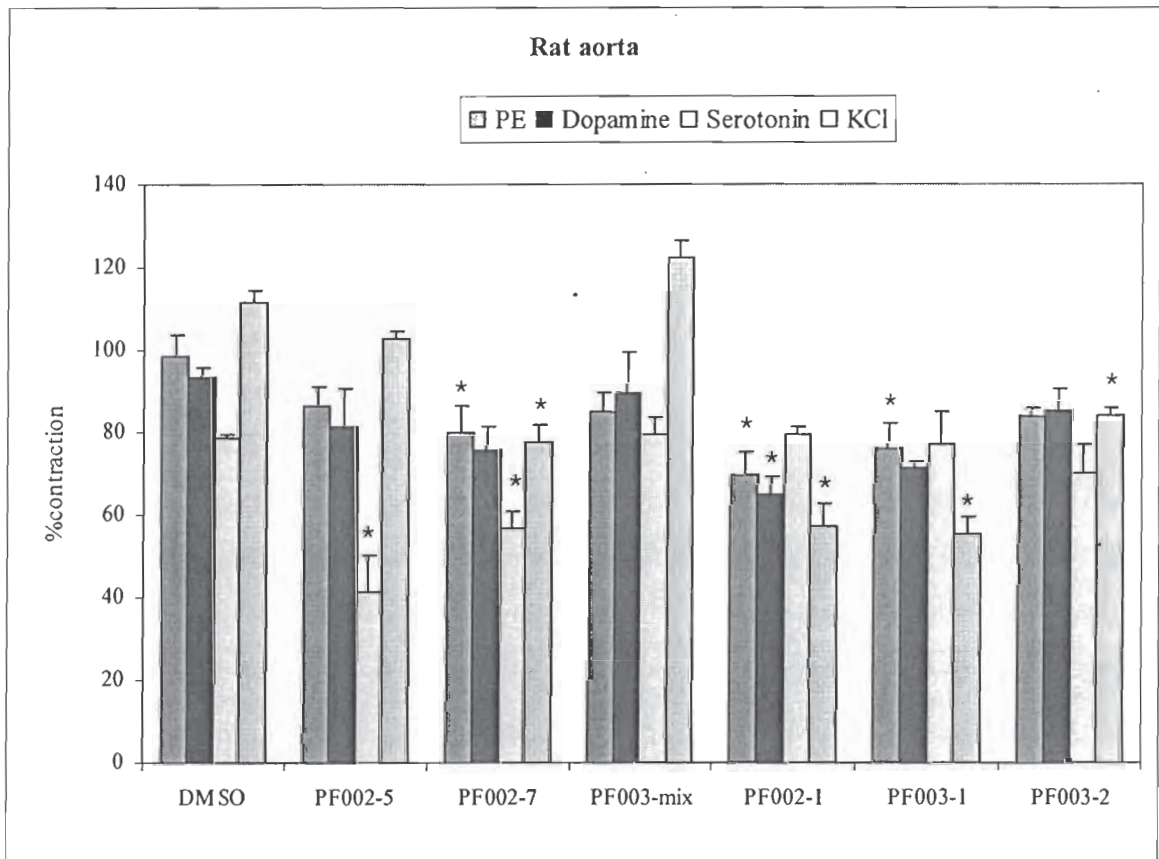
ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่

ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ ได้ศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว ทั้งนี้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะยังคงมีเซลล์เยื่อบุผิวอยู่ไม่น้อยกว่า 60% เมื่อใส่สารทดสอบความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแขวนอยู่และ incubate 20 นาทีไม่พบว่าสารทดสอบมีผลเปลี่ยนแปลงแรงดึงตัวของหลอดเลือดขณะพักแต่อย่างใด เมื่อครบ 20 นาทีแล้วจึงเติมสารกระตุ้นการหดตัวได้แก่ PE 10 μM (α_1 agonist) หรือ serotonin 1 μM (5HT receptor agonist) หรือ dopamine 1 μM (Dopamine receptor agonist) หรือ potassium chloride (KCl) 40 mM (depolarized membrane) ซึ่งผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารกระตุ้นต่างๆ จะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของหลอดเลือดก่อนที่จะได้รับสารทดสอบดังแสดงในรูปที่ 1

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดในความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่ละลายได้ มีผลน้อยต่อการตอบสนองของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย α_1 agonist หรือ

Dopamine โดยยับยั้งการหดตัวเมื่อได้รับสารกระตุ้นได้สูงสุดประมาณ 35% ทั้งนี้ PF 002-1 เป็นสารในกลุ่มที่มีความแรงสูงสุด อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ Serotonin เป็นสารกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด พบว่าสารสกัด PF002-5 และ PF002-7 มีผลยับยั้งการหดตัวได้ดีที่สุดในกลุ่ม โดย PF002-5 มีผลยับยั้งการหดตัวได้ถึง 60% ส่วน PF002-7 มีผลยับยั้งการหดตัวได้ถึง 43% นอกจากนี้เมื่อใช้ KCl 40 mM เป็นสารกระตุ้นการหดตัวโดยการทำให้เกิด membrane depolarization พบว่า PF 002-1 และ PF 003-1 ให้ผลสูงสุดในการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด โดยมีผลยับยั้งการหดตัวได้ 45%

อึ่งในการศึกษา ได้ทดสอบสารสกัดต่างๆในความเข้มข้น 10 µg/ml พบว่าสารสกัดในความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่ได้รับสารกระตุ้นการหดตัวต่างๆแต่อย่างใด

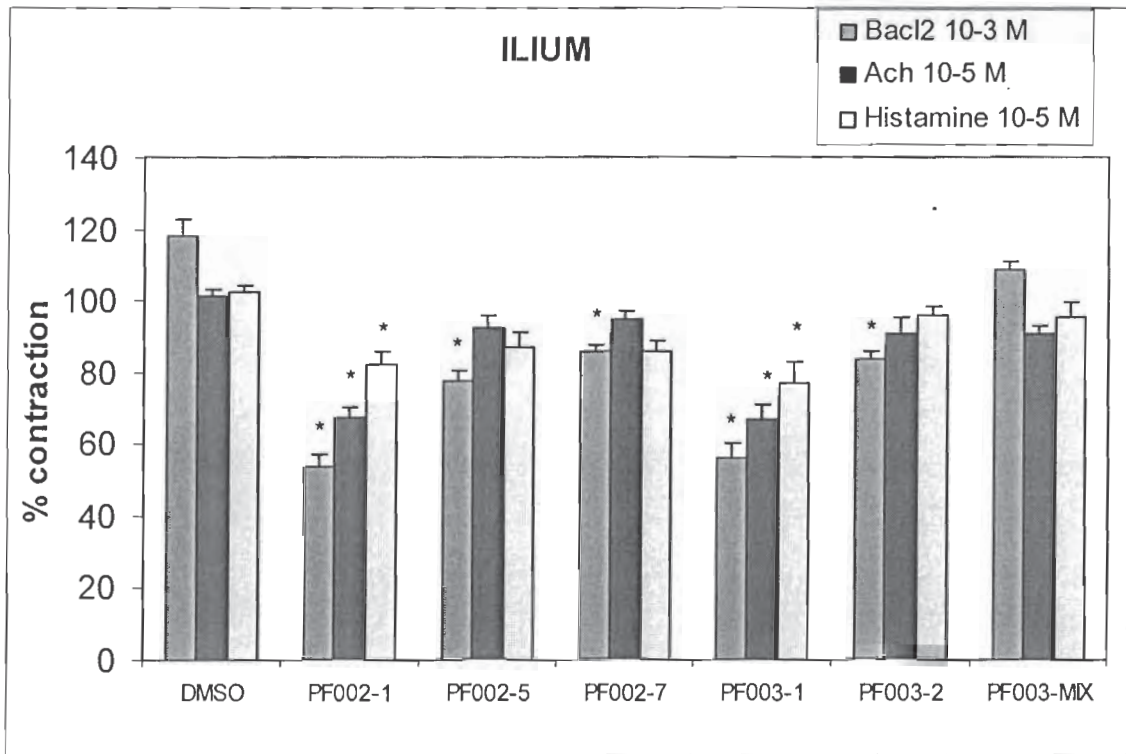


รูปที่ 1 ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย PE 10 µM, Dopamine 1 µM, Serotonin 1 µM, และ KCl 40 mM (n=4-6 separated experiments)

*นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)

ผลโดยตรงของสารสกัดกระทกต่อการทำงานของลำไส้เล็กส่วนไอเลียม

ผลโดยตรงของสารสกัดต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ได้ศึกษาใน model ของลำไส้เล็กส่วนไอเลียม (Ilium) ที่แยกจากกายหนูตะเภาที่งดอาหารเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมงก่อนการนำสัตว์ทดลองนั้นมาผ่าแยกอวัยวะ โดยที่ในช่วงงดอาหารนั้นสัตว์ทดลองจะได้รับน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลา ทั้งนี้การงดอาหารจะช่วยลดการเกิด spontaneous contraction ของเนื้อเยื่อได้ เมื่อใส่สารทดสอบความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ลงใน organ bath ที่มีลำไส้แขวนอยู่และ incubate 20 นาทีไม่พบว่าสารทดสอบมีผลกระตุ้นการหดตัวของลำไส้ขณะพักแต่อย่างใด เมื่อครบ 20 นาทีแล้วจึงเติมสารกระตุ้นการหดตัวได้แก่ BaCl_2 1 mM, ACh 10 μM และ histamine 10 μM ซึ่งผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของลำไส้เล็กต่อสารกระตุ้นได้รายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของลำไส้ก่อนที่จะได้รับสารทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2



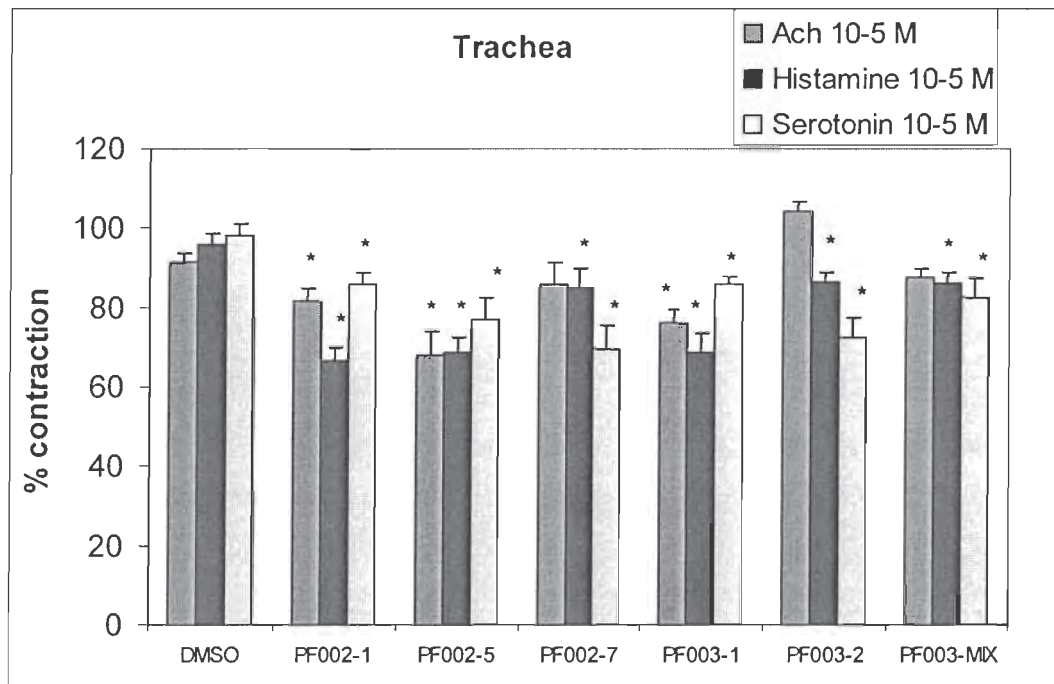
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน Ilium ที่แยกจากกายหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย BaCl_2 1 mM, ACh 10 μM และ histamine 10 μM ($n = 4-6$ separated experiments) *นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดทุกตัวยกเว้น PF003 (mix 3-4-5) ในความเข้มข้น 101.3 $\mu\text{g/ml}$ มีผลยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน Ilium ที่แยกจากกายหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย BaCl_2 1 mM ทั้งนี้ PF 002-1 และ PF 003-1 เป็นสารในกลุ่มที่มีความแรงสูงสุด โดยมีผลยับยั้งการหดตัวได้

ประมาณ 50% นอกจากนี้สารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีผลยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กที่ถูกกระตุ้นด้วย ACh 10 μ M และ histamine 10 μ M เช่นกัน แม้ว่าผลของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดที่มีผลต่อลำไส้เมื่อกระตุ้นด้วย histamine 10 μ M จะไม่แตกต่างจากสารทดสอบ PF002-5 และ PF002-7

ผลโดยตรงของสารสกัดกระทกรกต่อการทำงานของหลอดลม

ผลโดยตรงของสารสกัดต่อการทำงานของระบบทางเดินหายใจ ได้ศึกษาใน model ของหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา โดยใช้สารทดสอบความเข้มข้น 101 μ g/ml ให้อารมณ์ร่วมกับหลอดลม 20 นาที แล้วจึงเติมสารกระตุ้นการหดตัวได้แก่ ACh 10 μ M, histamine 10 μ M และ serotonin 10 μ M ซึ่งผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของหลอดลม ต่อสารกระตุ้น จะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของหลอดลมก่อนที่จะได้รับสารทดสอบดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย ACh 10 μ M, histamine 10 μ M และ serotonin 10 μ M (n=4-6 separated experiments)

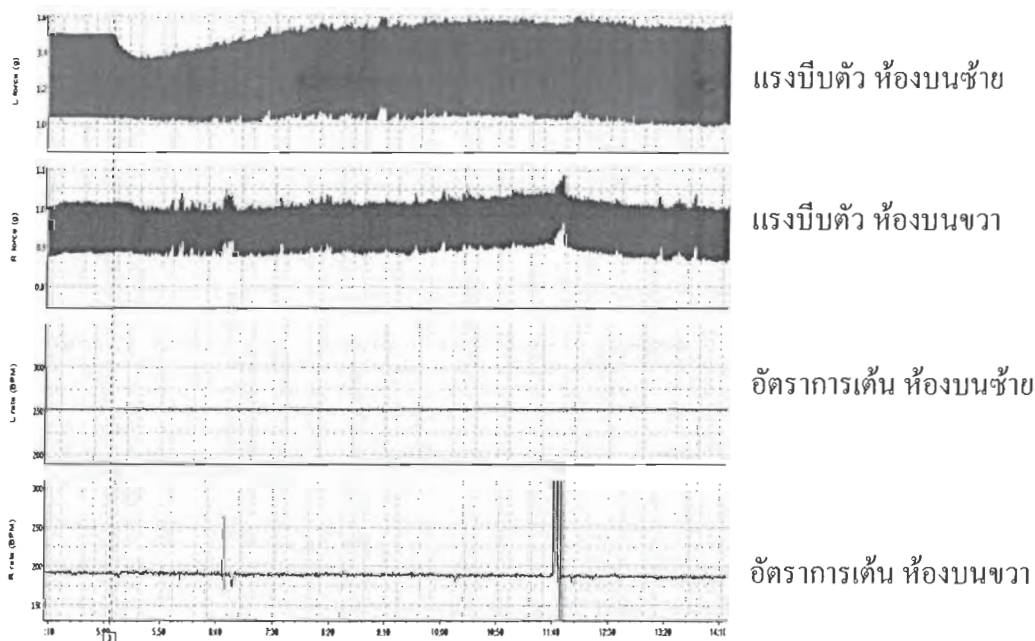
*นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดในความเข้มข้น 101 μ g/ml มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นด้วย ACh 10 μ M histamine 10 μ M และ serotonin 10 μ M ไม่

มากนัก โดยมีผลยับยั้งสูงสุดประมาณ 30% ทั้งนี้ ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดลมที่ถูกกระตุ้น 3 ชนิดไม่แตกต่างกันมากนัก

ผลโดยตรงของสารสกัดกะทกรกต่อการทำงานของหัวใจ

ผลโดยตรงของสารสกัดต่อการทำงานของหัวใจ ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกะทกรกต่ออัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจใน model ของหัวใจห้องบน (atrium) ด้านซ้ายและขวาที่แยกออกจากกายหนูขาว โดยใช้สารทดสอบความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งตัวอย่างของผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งในการแปลผลการทดลองนั้นจะไม่คำนวณผลของสารที่มีต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนซ้ายเนื่องจากในการศึกษาได้ใช้ไฟฟ้า 4.2 Hz 5 milliseconds กระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้าย ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจห้องบนซ้ายคงที่ ตลอดการศึกษา

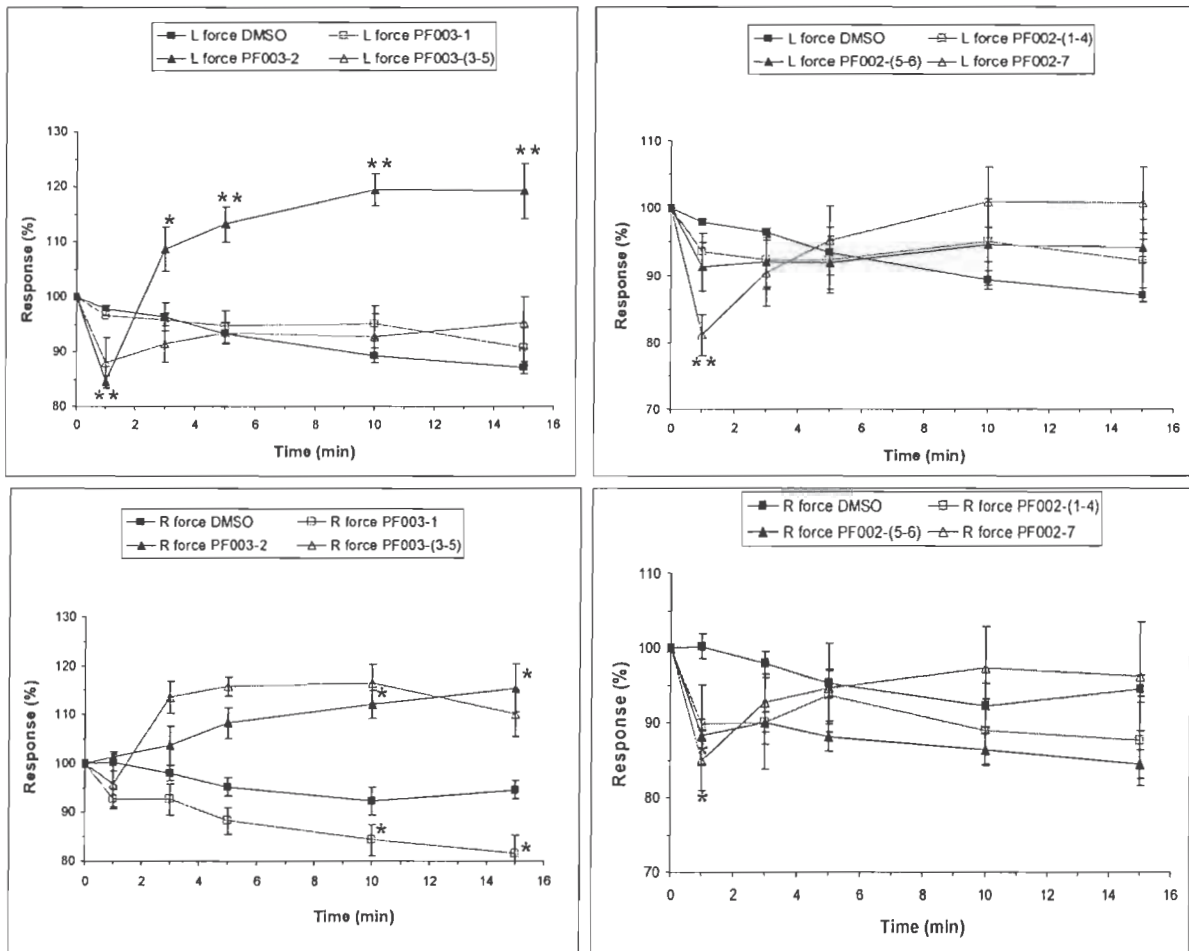


รูปที่ 4 ผลของสารสกัด PF003-2 (101 $\mu\text{g/ml}$) ที่มีต่อแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนด้านซ้ายและขวา

จากผลการทดลองดังปรากฏตามรูปที่ 5 และ 6 พบว่าสารสกัดกะทกรก PF002 -1 และ PF002 -5 ไม่มีผลต่อแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายและขวา ตลอดจนไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา ในขณะที่ PF003 -1 ซึ่งไม่มีผลต่อแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย สามารถลดการบีบตัวของหัวใจห้องบนขวาได้ $15.7 \pm 3.2\%$ และ $18.5 \pm 4.0\%$ เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 10 และ 15 นาทีตามลำดับ โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา สวนสารสกัด PF002 -7 นั้นพบว่า มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายและขวา ในช่วง 1-3 นาทีแรกเมื่อหยดสารสกัด

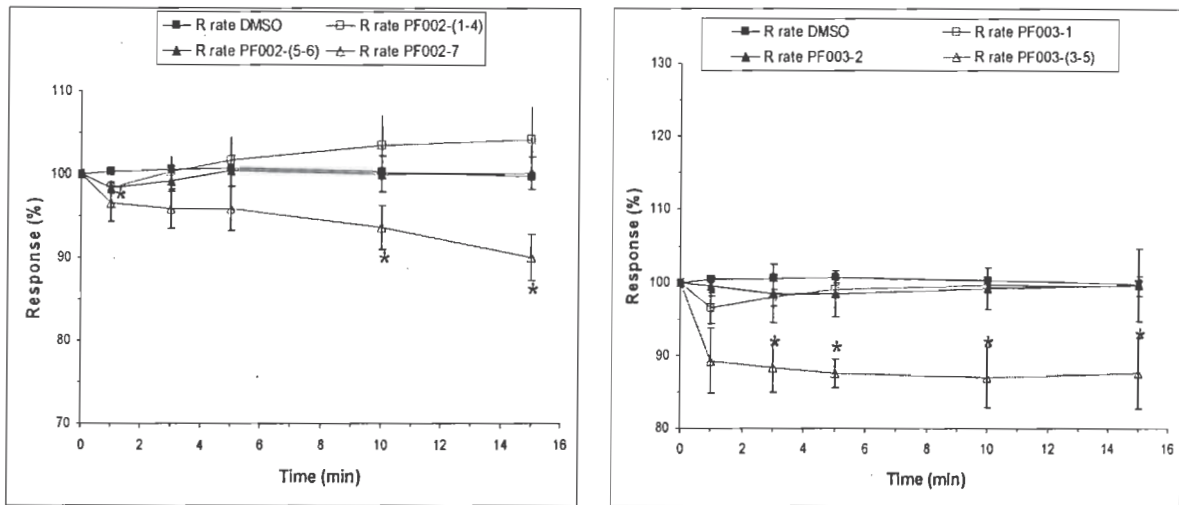
จากนั้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อกลับเข้าสู่ปกติ แต่ PF002 -7 มีฤทธิ์กดการเต้นของหัวใจห้องบนขวา ตลอด 15 นาทีที่บันทึกผล

ผลของ PF003-2 พบว่ามีผลกดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายและขวาในช่วงแรก (1-3 นาทีแรกหลังจากได้รับสาร) หลังจากนั้นจะเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายอีก $8.76 \pm 4.01\%$ และ $19.22 \pm 4.95\%$ ในเวลา 3 นาทีและ 15 นาที ตามลำดับ ($p < 0.05$, $n = 6$). PF003-2 ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามสารสกัด PF003-(3-5) มีผลกดแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายและขวาในช่วงนาทีแรก ซึ่งแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายจะเข้าสู่ภาวะปกติแต่ห้องบนขวาจะบีบตัวเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 3 เป็นต้นไป ในขณะที่อัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาจะลดลง 9.61 ± 1.53 และ $14.87 \pm 1.17\%$ ในนาทีที่ 3 และ 15 นาที ($p < 0.05$)



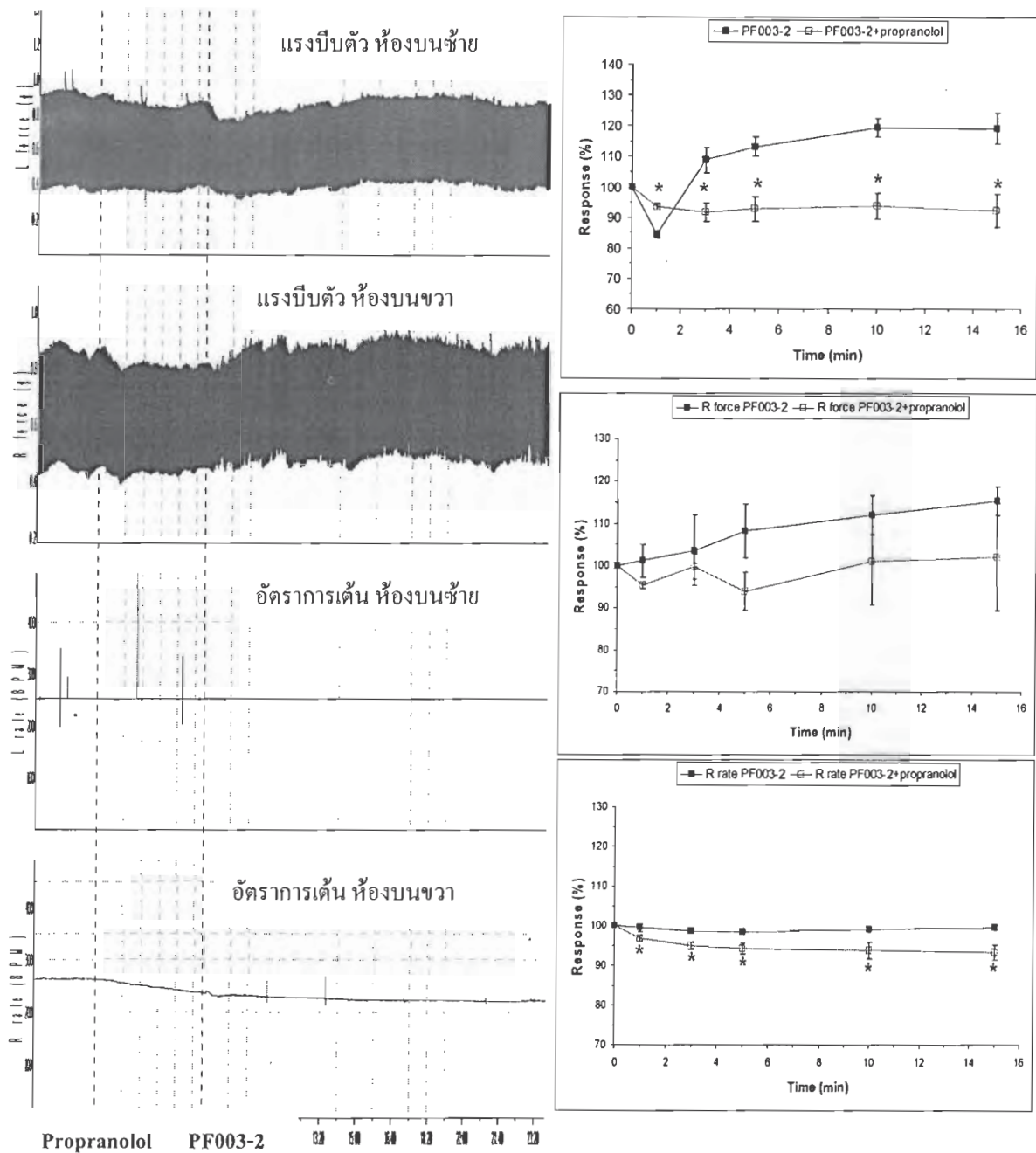
รูปที่ 5 ผลของสารสกัดกะทกรก fraction ต่างๆที่ความเข้มข้น $101 \mu\text{g/ml}$ ต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และห้องบนด้านขวา (R Force) ($n = 6$ separated experiments)

** $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ นัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)



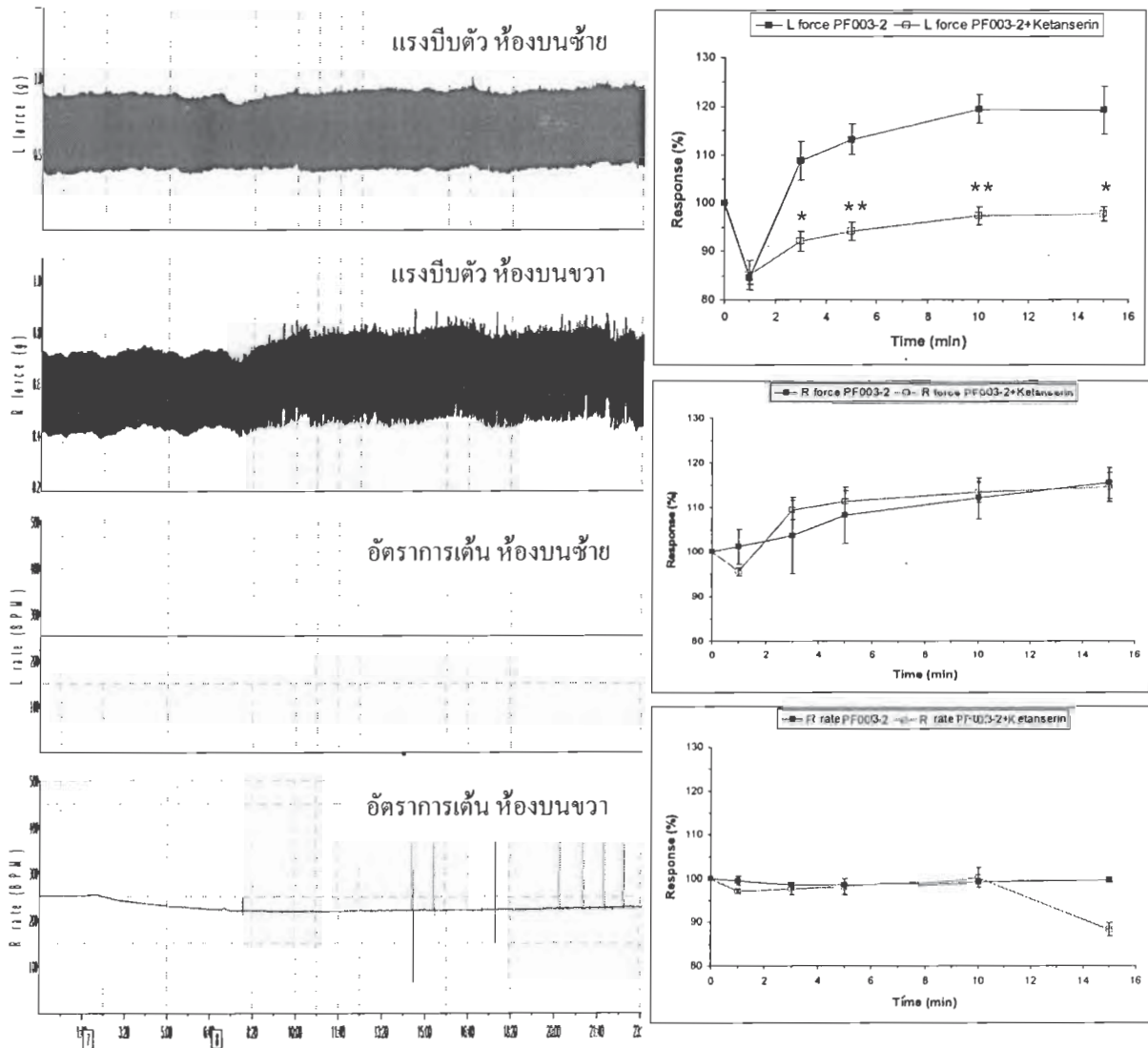
รูปที่ 6 ผลของสารสกัดกะทกรก fraction ต่างๆที่ความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ต่ออัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวา (R Rate) ($n=6$ separated experiments)
 $**p<0.05$ นัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (DMSO)

ผลในการเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายของ PF003-2 สามารถถูกยับยั้งได้บางส่วนด้วย propranolol (β -blocker; 10 μM) (รูปที่ 7) หรือ ketanserin (5-HT₂ receptor antagonist; 10 μM) (รูปที่ 8) ส่วนผลที่มีต่อแรงบีบของหัวใจห้องบนขวาของ PF003-2 นั้น propranolol มีผลยับยั้งได้บ้าง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนขวาลดลงในกลุ่มที่ได้รับ propranolol ซึ่งผลการลดการเต้นของหัวใจดังกล่าว เป็นผลที่คาดหมายได้จากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ propranolol (รูปที่ 7) ในส่วนของ ketanserin นั้น จากการศึกษพบว่า ketanserin ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ PF003-2 ที่หัวใจห้องบนขวาแต่อย่างใด



รูปที่ 7 ผลของสารสกัดกระทกรก PF003-2 ที่ความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ต่อแรงบีบตัวของห่องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห่องบนด้านขวา (R Force; R Rate) เมื่อให้ยาหลังจากให้ propranolol 10 μM เป็นเวลา 5 นาที (แผนภาพด้านซ้าย) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองที่เกิดขึ้นจากค่า baseline ตั้งแต่ได้รับ PF003-2 เป็นเวลา 15 นาที ได้แสดงในแผนภาพด้านขวา ($n = 6$ separated experiments)

* $p < 0.05$ นัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่ม PF003-2 (unpaired t -test)

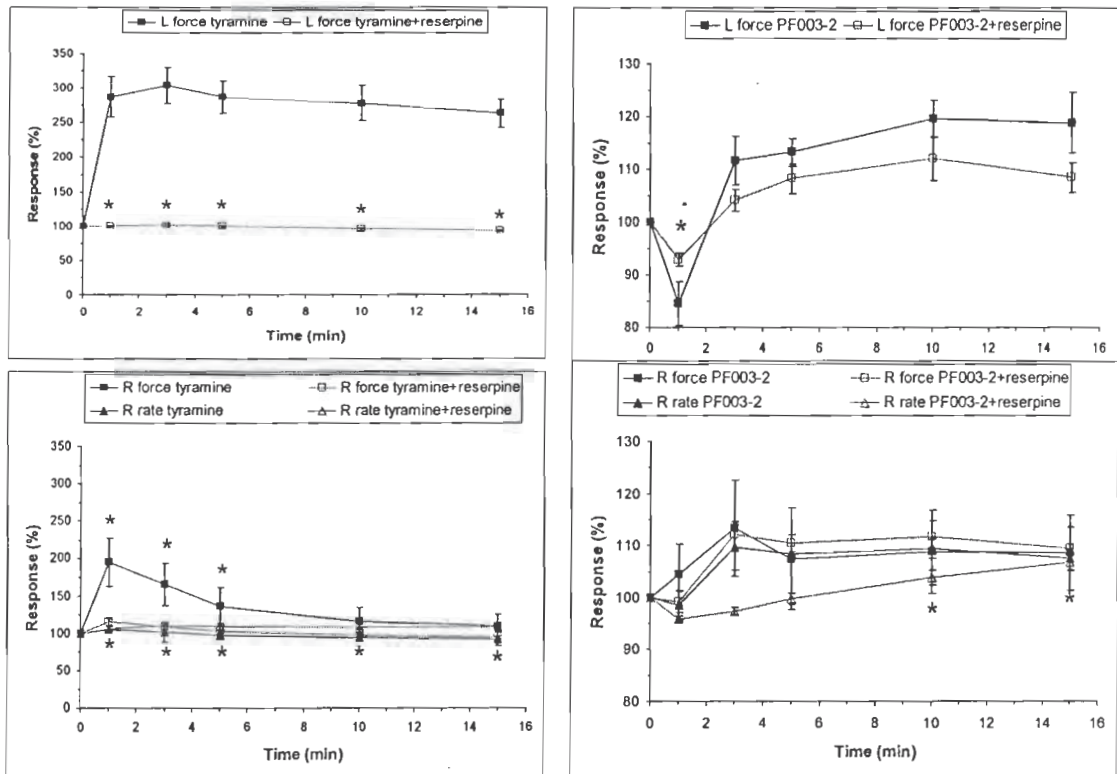


Ketanserin PF003-2

รูปที่ 8 ผลของสารสกัดกะทกรก PF003-2 ที่ความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห้องบนด้านขวา (R Force; R Rate) เมื่อให้ภายหลังจากให้ ketanserin 10 μM เป็นเวลา 5 นาที (แผนภาพด้านซ้าย) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองที่เกิดขึ้นจากค่า baseline ตั้งแต่ได้รับ PF003-2 เป็นเวลา 15 นาที ได้แสดงในแผนภาพด้านขวา (n= 6 separated experiments)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ นัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่ม PF003-2 (unpaired t -test)

ในการศึกษานี้ยังได้ทดสอบผลของ PF003-2 ที่ความเข้มข้น 101 $\mu\text{g/ml}$ ที่มีต่อหัวใจที่แยกจากหนูขาวที่ได้รับ reserpine ขนาด 5 mg/kg ซึ่งฉีดเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 2 วัน ทั้งนี้ reserpine จะมีฤทธิ์ยับยั้งการ reuptake ของ catecholamine ทำให้เกิดการขาดนอร์แอดรีนาลีนในแหล่งเก็บที่ปลายประสาท (presynaptic catecholamine storage) ทั้งนี้การขาดนอร์แอดรีนาลีนดังกล่าวจะสามารถยืนยันได้จากการใช้ tyramine เป็นตัวกระตุ้นการบีบตัวของหัวใจที่แยกจากกาย ซึ่ง tyramine จะไม่มีผลกระตุ้นหัวใจที่แยกจากหนูที่ได้รับ reserpine ให้บีบตัวได้ (รูปที่ 9 ซ้าย) ดังนั้นรูปแบบการทดลองนี้จึงใช้เป็น model เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด PF003-2 ในการกระตุ้นการหลั่ง catecholamine จากแหล่งเก็บ ทำให้สามารถกระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ของ PF003-2 ในหัวใจที่แยกจากกายหนูปกตินั้นไม่แตกต่างจากหัวใจที่แยกจากหนูที่ได้รับ reserpine (รูปที่ 9 ขวา) ดังนั้นการออกฤทธิ์ของ PF003-2 ไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการหลั่ง catecholamine



รูปที่ 9 ผลของ Tyramine (10 μM) (รูปด้านซ้าย) และสารสกัดกะทกรก PF003-2 (101 $\mu\text{g/ml}$) (รูปด้านขวา) ที่มีต่อแรงบีบตัวของห้องบนด้านซ้าย (L Force) และแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของห้องบนด้านขวา (R Force; R rate) ที่แยกจากกายหนูขาวปกติและหนูขาวที่ได้รับ reserpine (n= 7 separated experiments)

* $p < 0.05$ นัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่ม tyramine ในหนูปกติ (unpaired t -test)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในโครงการอื่นที่พบว่าสารสกัดด้วย dichloromethane ของกะทกรกได้แก่ สารกลุ่ม PF 003 (PF002-1, PF002-5, PF002-7, PF003-1, PF003-2 และ PF003-(3-5mix)) เป็นกลุ่มที่น่าจะมีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางรวมทั้งฤทธิ์ด้านซึมเศร้า ตลอดจนสารในกลุ่มดังกล่าวสามารถจับกับตัวรับของสารสื่อประสาทที่สำคัญเช่น α 1-adrenergic, dopaminergic และ serotonergic receptors ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในระบบอวัยวะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารสื่อประสาทโดยใช้การหดตัวของกล้ามเนื้อเป็นแบบจำลองในการศึกษา ระบบอวัยวะที่ศึกษาได้แก่ หลอดลม หลอดเลือด ลำไส้เล็กส่วนไอเลียม และหัวใจห้องบนขวาและห้องบนซ้ายซึ่งใช้เป็นแบบจำลองที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปสำหรับการศึกษาการทำงานของระบบทางเดินหายใจ ระบบไหลเวียนโลหิต ระบบทางเดินอาหารและหัวใจ ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดกะทกรกที่ทดสอบทุกตัวไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม หลอดเลือด และลำไส้เล็กส่วนไอเลียม ในขณะที่ PF003-2 พบว่ามีคุณสมบัติเป็น inotropic agents สามารถเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบนได้ อย่างไรก็ตามการที่สารสกัดไม่มีผลกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ บ่งบอกว่าสารกลุ่มต่างๆดังกล่าวไม่มีฤทธิ์โดยตรงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของ membrane (membrane depolarization) หรือกระตุ้นการทำงานของตัวรับต่างๆที่มีอยู่ที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดลม หลอดเลือด และลำไส้เล็กส่วนไอเลียม เช่น α 1-adrenergic, dopaminergic, cholinergic, histamine และ serotonergic receptors เป็นต้น อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติในการเป็น antagonists หรือ blockers ของตัวรับสารสื่อประสาทต่างๆ โดยใช้ตัวกระตุ้นตัวรับที่จำเพาะในกล้ามเนื้อเรียบของอวัยวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าสารสกัดต่างๆมีความสามารถที่จะยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ถูกกระตุ้นได้ โดยที่มีความแตกต่างกันในเรื่องของความแรง ความจำเพาะต่อตัวรับ และชนิดของอวัยวะที่ศึกษา ซึ่งเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลของการจับกับตัวรับ (receptor binding assays) แล้วจะยืนยันได้ว่าสารสกัดกะทกรกที่สกัดด้วย dichloromethane ประกอบด้วยสารที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะกับตัวรับที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบในอวัยวะต่างๆได้

ผลของสารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆที่นำมาทดสอบกับหลอดเลือด ได้แสดงให้เห็นว่า PF002-5 และ PF002-7 เท่านั้นที่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-HT นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของ PF002-5 ยังมีความจำเพาะ (selectivity) อย่างมากในการยับยั้งผลของ 5-HT และไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย α 1-adrenergic และ dopaminergic agonists ซึ่งสารสกัด PF ที่ได้ทดสอบทั้งกลุ่มมีผลน้อยมากในการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นที่ตัวรับ α 1 และ dopamine สำหรับสารสกัด PF003-1 and PF003-2 ซึ่งมีฤทธิ์ด้านซึมเศร้าในสัตว์ทดลองนั้น ไม่มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่กระตุ้นด้วย 5-HT, dopamine

และมีผลยับยั้ง $\alpha 1$ agonist ประมาณ 20% เท่านั้น ดังนั้นจึงอาจจะประเมินได้ว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีผลเด่นชัดที่จะเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดที่มีต่อสารสื่อประสาทในกลุ่ม 5-HT และ catecholamine ผลที่น่าสนใจจากการศึกษานี้คือการได้แก่ PF003-1 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย KCl ได้ถึง 45% ทั้งนี้ KCl กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดได้โดยกระตุ้นการไหลเข้าของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์จากการเหนี่ยวนำให้เกิด membrane depolarization และการเปิดของ calcium channel จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัด PF003-1 มีผลต่อการไหลเข้าของแคลเซียมที่เกี่ยวข้องกับ membrane depolarization ซึ่งรายละเอียดดังกล่าวน่าจะได้อธิบายต่อไป

ผลของสารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดนั้นไม่เด่นชัดเนื่องจากสารสกัดทุก fractions ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นสำคัญได้แก่ ACh histamine และ serotonin ไม่เกินกว่า 30% ตลอดจนผลของสารสกัดในด้านความจำเพาะ (selectivity) ต่อตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดกะทกรกจะเห็นได้ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของ PF002-1 และ PF003-1 เมื่อใช้ $BaCl_2$ และ ACh เป็นตัวกระตุ้น และเป็นที่น่าสนใจว่าผลของสารสกัดทั้ง 2 มีความคล้ายคลึงกันทั้งในด้านความแรงและความจำเพาะในการยับยั้งการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ACh และ histamine นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า สารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆ มีผลน้อยต่อลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย histamine และโดยทั่วไปแล้วความจำเพาะ (selectivity) ของสารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆ (ยกเว้น PF002-1 และ PF003-1) ในการยับยั้งการทำงานของตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่แตกต่างกันมากนัก

แม้ว่าสารสกัดกะทกรก fractions ต่างๆจะไม่มีผลต่อแรงดึงตัวขณะพักของกล้ามเนื้อในระบบหลอดเลือด หลอดลม และลำไส้เล็ก แต่เมื่อทดสอบกับกล้ามเนื้อหัวใจพบว่าสารสกัดกะทกรกบาง fractions มีผลฤทธิ์ต่อโดยตรงต่อการทำงานของหัวใจห้องบน โดยที่ PF002-1, PF002-5 และ PF003-1 ไม่มีผลต่อการทำงานของหัวใจ ในขณะที่ PF002-7, PF003-2 และ PF003-(3-5) มีฤทธิ์ในการกดแรงบีบตัวและ อัตราการเต้นในช่วงนาทีแรก ซึ่งต่อมาอีก 10 -15 นาที ผลของ PF003-2 จะกลับเป็นการกระตุ้นการบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย และผลกลับเข้าสู่ภาวะปกติในหัวใจห้องบนขวา ส่วนผลที่กดอัตราการเต้นของหัวใจของ PF003-(3-5) จะคงอยู่ตลอด 15 นาทีที่บันทึกผล แสดงว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลต่อการควบคุมการเต้นของหัวใจ (pacemaker activity) และเป็นไปได้ว่าสารสกัดนี้อาจก่อให้เกิดปัญหาการเต้นผิดจังหวะของหัวใจ (arrhythmia) ได้ ดังนั้นจึงประเมินได้ว่า PF003-2 มีฤทธิ์เชิงบวกต่อการทำงานของหัวใจ โดยที่ฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัว (positive inotropic effect) ที่ไม่น่าจะก่อให้เกิดปัญหาการเต้นผิดจังหวะของหัวใจ (arrhythmogenesis)

กลไกที่สำคัญในการกระตุ้นการบีบตัวของหัวใจได้แก่การกระตุ้นตัวรับ β -adrenoceptor ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่สารสกัด PF003-2 มีฤทธิ์บางส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นตัวรับ

ดังกล่าว เนื่องจาก propranolol ซึ่งเป็น β -adrenoceptor antagonist สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ PF003-2 ได้แม้จะไม่สมบูรณ์ และเป็นไปได้ที่ PF003-2 มีผลต่อตัวรับ serotonin เนื่องจาก ketanserin ซึ่งเป็น serotonin blocker สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ PF003-2 ได้บางส่วนเช่นกัน การกระตุ้นตัวรับ serotonin จะมีผลเพิ่มแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนของหนูขาว (Kaumann and Levy, 2006) และได้มีรายงานแสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นระบบซิมพาเทติกเช่น epinephrine หรือ norepinephrine สามารถกระตุ้นตัวรับ serotonin ที่หัวใจได้ (Aloya and Walker, 1988) แม้ว่าผลที่เกิดขึ้นในหลอดลมของ PF003-2 ที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดนี้ยับยั้งผลของ serotonin ในการทำให้หลอดลมหดตัว ดังนั้นกลไกที่เกี่ยวข้องกับตัวรับ serotonin ของ PF003-2 ยังคงต้องศึกษาต่อไปถึงความเป็นไปได้ในการออกฤทธิ์เป็น partial agonist ของสารสกัด

นอกจากนี้จากการศึกษาในหัวใจที่แยกจากสัตว์ทดลองที่ได้รับ reserpine เพื่อทดสอบกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการ reuptake ของสารสื่อประสาท norepinephrine ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่เพิ่มแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจได้ ดังมีตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ต้านซึมเศร้า (antidepressant) กลุ่ม tricyclic antidepressant เช่น imipramine amitryptiline (Thanacoody, 2005, Yildiz et al., 2002) ซึ่งการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด PF003-2 ไม่มีผลในการยับยั้งกระบวนการ reuptake ของสารสื่อประสาท norepinephrine แต่อย่างใด

ดังที่ทราบโดยทั่วไปแล้วว่าสารสกัดสมุนไพรมีสารต่างๆเป็นองค์ประกอบเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารสกัดกะทกรกในการศึกษานี้เป็นสารที่ได้จากการสกัดอย่างต่อเนื่องหลายขั้นตอนที่จำกัดลักษณะขององค์ประกอบให้มีลักษณะที่ละลายได้ดีใน dichloromethane ทำให้มีข้อจำกัดทางการละลายเพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ ในการศึกษานี้แม้จะใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย แต่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบได้คือ 101 $\mu\text{g/ml}$ อย่างไรก็ตามเมื่อลดความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบลง 10 เท่า ไม่ปรากฏผลแต่อย่างใด ทำให้ประเมินได้ว่าผลที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร และถึงแม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่ได้ออกแบบมาเพื่อเปรียบเทียบความไวในการตอบสนองของระบบอวัยวะที่มีต่อการออกฤทธิ์โดยตรงของสารสกัดกะทกรกก็ตาม แต่ผลการศึกษาได้ชี้ให้เห็นว่ากล้ามเนื้อหัวใจห้องบนที่แยกจากกายหนูขาวมีความไวต่อการออกฤทธิ์ของ PF003-2 และ PF003-(3-5) มากกว่ากล้ามเนื้อเรียบอื่นที่ใช้ในการศึกษา และกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่แยกจากกายหนูขาวมีความไวที่จะตอบสนองต่อ PF002-5 และ PF002-7 มากกว่ากล้ามเนื้อหลอดลมและลำไส้เล็กที่ได้จากหนูตะเภา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ serotonin เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งนี้ความแตกต่างที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจเนื่องจากสารองค์ประกอบจำนวนมากที่มีอยู่ในสารสกัด และความแตกต่างในด้านความหนาแน่นและการกระจายตัวของตัวรับชนิดต่างๆในระบบอวัยวะ ซึ่งควรจะได้มีศึกษาเพิ่มเติม และทำการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ของสารสกัดกะทกรกต่อไป

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ถึงผลของสารสกัดกะทกรกที่อาจจะมีโดยตรงต่อการทำงานของระบบอวัยวะอื่น เช่นการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด หลอดลม ลำไส้ และกระตุ้นการบีบตัวของหัวใจ แม้ว่าอาจยังมีได้ขยายผลการศึกษาต่ออวัยวะที่แยกจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารเสพติดเนื่องจากอุปสรรคในการจัดหาสารเสพติดและแบบจำลองในการชักนำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะติดยา แต่ผลการศึกษาสามารถให้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการประเมินหรือทำนายการก่อให้เกิดผลข้างเคียง หรืออาการอันไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้สารสกัดกะทกรกนี้ ตลอดจนเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้แนะถึงการศึกษาวิจัยในเชิงลึกต่อไปเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่มีต่อระบบการทำงานต่างๆของร่างกาย ซึ่งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่และสร้างระบบฐานข้อมูลสำหรับการพัฒนาจากสมุนไพรเพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

บรรณานุกรม

- Aloya, V.J., and Walker, R.F. (1988). Alpha adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology* 48: 61-66.
- Barlow, R.B., and Khan, I. (1959). The use of guinea pig ileum preparation for testing the activity of substances which imitated or antagonize the actions of 5hydroxytryptamine and tryptamine *Br. J. Pharmacol* 14: 553-558.
- Boyer, E.W., and Shannon, M. (2005). The Serotonin Syndrome. *N Engl J Med* 352:1112-20.
- Fitzgerald, J.L and Reid, J.J. (1994). Sympathomimetic actions of methylene-dioxy methamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 826-832.
- Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2006). 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 111: 674-706.
- Ljung, B., and Kjellstedt, A. (1987). Functional antagonism of noradrenaline responses by Felodipine and other calcium antagonists in vascular smooth muscle. *J Cardiovascular Pharmacol* 10: S82-S88.
- Noguera, M. A., and D'Ocon, M. (1993) Evidence that depletion of internal calcium stores sensitive to noradrenaline elicits a contractile response dependent on extracellular calcium in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 110: 864-867.
- Ogawa, T., Sugidachi, A., Tanaka, N., Fujimoto K., and Asai F. (2002). Pharmacological profiles of R-96544, the active form of a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist R-102444. *Eur. J. of Pharmacology* 457: 107-114.
- Phillis, B.D, Ong, J., White, J.M, and Bonnielle, C. (2001) Modification of d-amphetamine-induced responses by baclofen in rats. *Psychopharmacology* 153: 277-284.

- Reinheimer, T., Mohlig, T., Zimmermann, S., Hohle, K.D., and Wessler, I. (2000). Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 534-538.
- Straumann, D., Chatterjee, S., and Statkow, P. (2001). Comparison of the effects of an alcoholic St. John's wort extract on various isolated organs. *Pharmacopsychiatry Suppl* 1:S143-145.
- Thanacoody, H.K., and Thomas, S.H. (2005). Tricyclic antidepressant poisoning: cardiovascular toxicity. *Toxicological reviews* 24: 205-214.
- Yildiz, A., Gönül, A.S., and Tamam, L. (2002). Mechanism of action of antidepressant: Beyond the receptors. *Bull Clin Psychopharmacol* 12: 194-200.

โครงการวิจัยที่ 7

การพัฒนายาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรรักษาสารกระตุ้นประสาท

Development of herbal product prototype for suppression of
addictive CNS stimulants

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญศรี องค์กรพัฒนกุล
(Assistant Professor Dr. Boonsri Ongpipattanakul)
หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นนทิมา วรรณะภูติ
(Assistant Professor Dr. Nontima Vardhanabhuti)
ผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. วัลลภา ทาทอง
(Dr. Walapa Tatong)
ผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัย “การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อบำบัดผู้เสพติดสารกระตุ้นประสาท” ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2549 เพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีมาตรฐานระดับสากล

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในโครงการด้วยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2548 – 2549 ขอขอบคุณทีมคณะผู้วิจัยในแผนงานวิจัยนี้ คณาจารย์ บุคลากร ผู้ช่วยวิจัย นิสิตบัณฑิตศึกษาของภาควิชาชีวเคมี โดยเฉพาะนางสาวดวงกมล ภูมิราช อีกทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. ไกรสิทธิ์ อัมพรายณ์ ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม ที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อครุภัณฑ์และอนุญาตให้ใช้สถานที่และสาธารณูปโภค ทั้งในและนอกเวลาราชการ โดยไม่คิดค่าใช้จ่ายแต่อย่างใด

บทคัดย่อ

สารสกัดจากใบกะทกรกเป็นสมุนไพรที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นด้วยการทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน และได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในแบบจำลองพฤติกรรมในสัตว์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะอาการที่พบได้ในผู้ติดสารกระตุ้นประสาท การศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพและประเมินความคงตัวของสารสกัดกะทกรก ตลอดจนการศึกษาต้นแบบยาเตรียมเพื่อใช้ในการศึกษาทางคลินิกต่อไป จึงเป็นเป้าหมายงานของโครงการนี้ ผลการศึกษาทำให้ได้วิธี reverse-phase HPLC ที่สามารถแสดงโครมาโตแกรมขององค์ประกอบในสารสกัดกะทกรกได้มากกว่า 7 ชนิด ภายในระยะเวลาการวิเคราะห์ 85 นาที มีค่าความแม่นยำ การวิเคราะห์ซ้ำ และความแปรปรวนระหว่างวันของตำแหน่งพีค และพื้นที่ใต้พีคที่สามารถปรับปรุงให้อยู่ในช่วง 0.5 – 5 % พีคที่เป็นสารสำคัญทางชีวภาพด้วยผลทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีนคือ พีคที่ 51 นาที ซึ่งคาดว่าคือ ฟลาโวนอยด์ luteolin พีคอื่นที่พบและมีการยืนยันโครงสร้างของสารคือ พีคที่ 56-57 นาที ประกอบด้วยฟลาโวนอยด์ acacetin และ chrysoeriol พีคที่คาดว่าเป็ vitexin หรืออนุพันธ์ของ vitexin คือ พีคที่ 29 นาที บริเวณโครมาโตแกรมของฟลาโวนอยด์ทั้งสามตำแหน่ง เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างได้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ได้จากการสกัดต่างครั้งกัน และอาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับตัวรับโดปามีน ผลการประเมินความคงตัวเบื้องต้นของสารสกัดกะทกรกพบว่า สารสกัดกะทกรกมีความคงตัวดี แต่อาจสลายตัวได้เร็วขึ้นเมื่อสัมผัสแสง การพัฒนาผลิตภัณฑ์จึงต้องคำนึงถึงวิธีการป้องกันแสงด้วย สำหรับการพัฒนายาเตรียมต้นแบบ ได้ศึกษาสูตรตำรับยาเม็ดและพบว่า การเกาะตัวของผงยา และการดกอัดได้เป็นเม็ดยาที่ดีนั้นต้องการสารช่วยคือ แป้งที่ผ่านการก่อเจลบางส่วน (partially pre-gelatinized starch) ร่วมกับไฮดรอกซีโพรพิลเซลลูโลส โดยสามารถบรรจุสารสกัด 50 มก. ในเม็ดยาขนาด 250 มก. อย่างไรก็ตาม การประเมินความคงตัวของยาเม็ด และงานพัฒนาสูตรตำรับยาเม็ดในขนาดนำร่องยังคงต้องมีการดำเนินการต่อไปเพื่อสนับสนุนงานวิจัยด้านคลินิก

ABSTRACT

Passiflora foetida leave extract has been screened to show binding activity to dopamine receptor, and elicit bioactivity in animal behavioral models simulating symptoms found in CNS stimulant addicts. To support the development phase of the bioactive extract, this project was aimed to develop an analytical method for quality control and stability evaluation of *P. foetida* extract, in addition to initiating a prototype formulation for clinical testing. From the study, a reverse-phase HPLC method which could demonstrate more than 7 constituents in a 85-min chromatogram was achieved. The precisions, repeatabilities and the interday variations of all retention times and peak areas could be optimized to be within 0.5 – 5%. Based on the dopamine receptor binding assay, a biomarker peak at the retention time of 51 minutes was identified. The peak was likely to be flavonoid luteolin. Structurally confirmed flavonoids, acacetin and chrysoeriol were identified to be at 56 – 57 minutes. A peak at 29 minutes was also believed to be vitexin or vitexin derivatives. The chromatograms at those three retention times were found to be varied when lot-to-lot extracts were compared. Those chromatographic areas might also be related to the dopamine receptor binding activity. The preliminary stability results of *P. foetida* extract showed a good stability. Nonetheless, the extract exhibited a faster degradation by light exposure. A light protection measure should be considered in the final product development. Initial study on tablet formulation indicated that better binding and compressibility of the drug powder could be achieved through the use of partially pre-gelatinized starch, together with hydroxypropylcellulose, producing 250-mg tablets of 50 mg *P. foetida* extract per tablet. Further work on the stability of the formulation and the pilot production scale is needed to support the clinical study.

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| กิตติกรรมประกาศ | 7 - ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | 7 - iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 7 - iv |
| สารบัญ | 7 - v |
| สารบัญตาราง | 7 - vi |
| สารบัญรูป | 7 - vii |
| บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง | 7 - 1 |
| ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวคิดในการทำวิจัย | 7 - 2 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 7 - 2 |
| วัสดุอุปกรณ์ | |
| งานวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพร | 7 - 3 |
| งานศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน | 7 - 3 |
| งานพัฒนาสูตรตำรับ | 7 - 4 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | |
| การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ | 7 - 5 |
| การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 7 - 5 |
| การศึกษาสารเครื่องหมาย | 7 - 5 |
| การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนโดยเทคนิค radioligand receptor binding assay | 7 - 6 |
| การศึกษาความคงตัวของสารสกัดกะทกรก | 7 - 6 |
| การพัฒนาสูตรตำรับเบื้องต้น | 7 - 7 |
| ผลการทดลอง | |
| การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC สำหรับสารสกัดกะทกรก | 7 - 8 |
| การศึกษาสารเครื่องหมาย | 7 - 14 |
| การศึกษาความคงตัวของสารสกัดกะทกรก | 7 - 27 |

| | |
|---------------------------------------------------|--------|
| การพัฒนายาเตรียมต้นแบบ | |
| การพัฒนาตำรับยาน้ำ | 7 - 30 |
| การพัฒนาตำรับยาเม็ดแข็ง | 7 - 30 |
| อภิปรายและสรุปผลการทดลอง | |
| การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ | 7 - 32 |
| ความคงตัวของสารสกัดกระทกและการพัฒนาต้นแบบยาเตรียม | 7 - 34 |
| บรรณานุกรม | 7 - 35 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 7 - 1 | สรุปตำแหน่งพีคหลักที่ 280 nm และค่า precision, repeatability และ interday precision ของ retention time จากสภาวะการวิเคราะห์ที่เลือกใช้ | 7 -13 |
| 7 - 2 | พีคหลักที่ 280 nm และค่า precision, repeatability และ interday precision ของ peak area จากสภาวะการวิเคราะห์ที่เลือกใช้ | 7 -13 |
| 7 - 3 | ข้อมูลพื้นที่ใต้พีคที่พบในโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรกที่ความยาวคลื่น 260, 280, และ 370 nm | 7 - 17 |
| 7 - 4 | ความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และตัวรับโดปามีน 2 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของผลึกและ fractions ที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก | 7 - 22 |
| 7 - 5 | ความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของสารสกัดกะทกรกที่สกัดต่างครั้งกัน แต่ใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน | 7 - 24 |
| 7 - 6 | พีคบนโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย photodiode array HPLC ที่ 320 nm ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการจับตัวรับโดปามีน 1 | 7 - 24 |
| 7 - 7 | ความสามารถในการยับยั้งการจับตัวรับโดปามีน 1 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาที่ 30-34 °C ปราศจากแสง หรือสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเทียบกับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C ปราศจากแสง | 7 - 29 |
| 7 - 8 | ปริมาณของส่วนประกอบต่างๆในสูตรตำรับยาเม็ดกะทกรก | 7 - 31 |
| 7 - 9 | ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับ | 7 - 31 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 7 - 1 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 10 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 10 mg/ml ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ และใช้ photodiode array detector | 7 - 9 |
| 7 - 2 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 °C และใช้ photodiode array detector | 7 - 9 |
| 7 - 3 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid (A) และเมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และน้ำ (B) แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 °C และใช้ UV-vis detector | 7 - 10 |
| 7 - 4 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และ acetonitrile (1 : 1) กับ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 20 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 °C และใช้ UV-vis detector | 7 - 11 |
| 7 - 5 | ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ที่สิ้นสุดเวลาที่ 85 นาที ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 °C และใช้ photodiode array detector หมายเลข 1 - 7 แสดงพีคหลักที่พบ (^a พีคของ chrysin ที่เติมในสารสกัด ^b กลุ่มพีคจากคอลัมน์) | 7 - 14 |

- 7 - 6 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ครั้งเดียวกันของสารสกัดกะทกรกที่ความยาวคลื่น 260 nm (โครมาโตแกรม A), 280 nm (โครมาโตแกรม B) และ 370 nm (โครมาโตแกรม C) เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient เวลาการวิเคราะห์ 85 นาที ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 °C และใช้ photodiode array detector พิกัดที่เวลา 64 – 65 นาที เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด 7 - 16
- 7 - 7 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และ สารฟลาโวนอยด์อ้างอิง ได้แก่ Apigenin (โครมาโตแกรม B), Kaemferol (โครมาโตแกรม C), Luteolin (โครมาโตแกรม D), Quercetin (โครมาโตแกรม E), Naringin (โครมาโตแกรม F), และ Vitexin (โครมาโตแกรม G) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล 7 - 18
- 7 - 8 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF-D (โครมาโตแกรม B), PF3 (โครมาโตแกรม C), PF2 (โครมาโตแกรม D) และ PF-E (โครมาโตแกรม E) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล 7 - 19
- 7 - 9 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) สารอ้างอิง luteolin (โครมาโตแกรม B), และผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF-D (โครมาโตแกรม C) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล 7 - 19
- 7 - 10 โครงสร้างเคมีของสารฟลาโวนอยด์ chrysoeriol, acacetin และ apigenin 7 - 20
- 7 - 11 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) ผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF3 (โครมาโตแกรม B) และสารอ้างอิง apigenin (โครมาโตแกรม C) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล 7 - 20

- 7 - 12 UV scan ในช่วงความยาวคลื่น 190 – 450 nm วิเคราะห์จากโครมาโตแกรมของพีคที่ 29 นาที (A) และโครมาโตแกรมของสารอ้างอิง vitexin (B) เมื่อใช้ photodiode array detector เทียบกับ UV scan ของ vitexin (C) และ isovitexin (D) ที่รายงานโดย Y. Zhang et al. *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) pp.177–185 สังเกตลักษณะของการดูดกลืนแสงที่บริเวณความยาวคลื่น 300 – 325 nm ที่เป็นลักษณะเด่นของ vitexin เทียบกับ isovitexin 7 - 21
- 7 - 13 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และ fractions จากการสกัดด้วยวิธี semi-preparative HPLC ได้แก่ fraction-A (โครมาโตแกรม B) fraction-B (โครมาโตแกรม C) fraction-C (โครมาโตแกรม D) โครมาโตแกรมทั้ง 4 ได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล พีคที่เวลา 64 – 65 นาที (โครมาโตแกรม A) เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด 7 - 22
- 7 - 14 โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรกที่ได้จากการสกัดใหม่แต่ละครั้งโดยใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดกะทกรก – 1, สารสกัดกะทกรก – 2 , สารสกัดกะทกรก – 3 ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 6.85 mg/ml 5.53 mg/ml และ 5.00 mg/ml ตามลำดับ พีคที่เวลา 64 – 65 นาที ของโครมาโตแกรมทั้งหมด เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด 7 - 25
- 7 - 15 โครมาโตแกรมที่ 320 nm ของสารสกัดกะทกรกที่ได้จากการสกัดใหม่แต่ละครั้งโดยใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดกะทกรก – 1, สารสกัดกะทกรก – 2 , สารสกัดกะทกรก – 3 ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 6.85 mg/ml 5.53 mg/ml และ 5.00 mg/ml ตามลำดับ พีคที่เวลา 64 – 65 นาที ของโครมาโตแกรมทั้งหมด เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด 7 - 26
- 7 - 16 พื้นที่ใต้กราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน 7 - 28

- 7 - 17 พื้นที่ไดักราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C เปรียบเทียบกับพื้นที่ไดักราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C และสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน 7 - 28
- 7 - 18 การลดลงของพื้นที่ไดักราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C ปราศจากแสง เปรียบเทียบกับพื้นที่ไดักราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C และสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน 7 - 29

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ ซึ่งมีสารสำคัญเป็นสารบริสุทธิ์นั้น เป้าหมายหลักของการศึกษาเพื่อเลือกรูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสม คือ การรักษาไว้ซึ่งปริมาณและฤทธิ์ของสารสำคัญให้คงอยู่ได้อย่างน้อยตลอดช่วงอายุของผลิตภัณฑ์ตามเกณฑ์มาตรฐานของหน่วยงานซึ่งกำกับดูแลความปลอดภัยในการใช้ยา รวมถึงความสามารถเลือกรูปแบบยาเตรียมที่สะดวกต่อการใช้ และมีสารองค์ประกอบในตำรับที่เอื้อต่อความคงตัวของสารสำคัญ ปราศจากพิษหรือการปนเปื้อนของสิ่งที่เป็นพิษ ขั้นตอนการศึกษารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมจึงเป็นขั้นตอนการวิจัยที่สำคัญมาก และมักดำเนินการตั้งแต่ขั้นการศึกษาระดับ Preclinical โดยเฉพาะอย่างยิ่งก่อนขั้นตอนการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์และพิษในสัตว์ทดลอง (Möller, 1993) การกำหนดลำดับชั้นเวลาของการศึกษารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมในแผนการวิจัยและพัฒนา จะทำให้ได้ยาเตรียมต้นแบบที่ใกล้เคียงกับยาเตรียมซึ่งจะใช้ต่อไปในการศึกษาทางคลินิกมากที่สุด อันจะทำให้การแปลผลที่ได้จากการตรวจสอบฤทธิ์และความเป็นพิษในสัตว์ทดลองมีความชัดเจนว่าเป็นผลจากสารสำคัญหรือมีปัจจัยของตำรับยาเตรียมและวิธีการให้ยาร่วมด้วยหรือไม่

ในด้านการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ที่มาจากสารสกัดสมุนไพร มักเป็นที่เข้าใจโดยทั่วไปว่า สารสกัดสมุนไพรเป็นสารจากธรรมชาติและมีความปลอดภัยสูง การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดสมุนไพรโดยมากจึงมีการควบคุมหรือมีการวิจัยและพัฒนาน้อยกว่าการพัฒนาใหม่ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม สารสำคัญจากสมุนไพรอาจมีโครงสร้างทางเคมีที่มีความคงตัวน้อย (Mao et al., 2000; Haynes et al., 1994; Fairbairn et al., 1976) ตลอดจนแหล่งวัตถุดิบของสมุนไพรอาจไม่มีมาตรฐาน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการศึกษาอย่างเป็นระบบ มีความแปรปรวนของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในมาตรฐานสากล องค์กรเช่น European Medicinal Evaluation Agency (EMA) จึงกำหนดให้ใช้แนวปฏิบัติ (guideline) ที่จัดทำโดย International Conference of Harmonization (ICH) สำหรับการศึกษาความคงตัวในสภาวะปกติและสภาวะเร่งของสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรและยาเตรียมสารสกัดสมุนไพรในรูปแบบยาแผนปัจจุบันที่ต้องการระบุข้อบ่งใช้ในการรักษาอย่างชัดเจน (Bilia et al., 2001)

โครงการวิจัยที่นำเสนอนี้เป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัยซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยใช้วิธีและกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้นประสาทเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการบำบัดผู้เสพติด โดยมีแผนดำเนินการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ตามที่ต้องการเป็นเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบยาแผนปัจจุบันที่สอดคล้องตามหลักเกณฑ์ที่ยอมรับเป็นมาตรฐานสากล คณะผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาเพื่อให้ได้รูปแบบยาเตรียมซึ่งมีปริมาณสารสกัดสมุนไพรที่สม่ำเสมอ มีความคงตัวในสภาวะการเก็บปกติ มีคุณสมบัติที่เอื้อให้สารสกัดสมุนไพรถูกดูดซึมและออกฤทธิ์ในร่างกายได้ในเวลาที่เหมาะสม โดยข้อมูลการศึกษาที่ได้ มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการเป็นส่วนหนึ่งของ

เอกสารเพื่อสนับสนุนการขออนุมัติให้ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์สารสกัดสมุนไพรดังกล่าวทางคลินิกต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

แนวทางการพัฒนาสารจากสมุนไพรเพื่อเป็นทางเลือกของการรักษาโรคในปัจจุบันมักมุ่งศึกษาฤทธิ์ที่ชัดเจนของสารจากสมุนไพร ตลอดจนมีการศึกษาเพื่อควบคุมคุณภาพและประกันคุณภาพที่ให้ความเชื่อมั่นในระดับที่ใกล้เคียงกับการพัฒนาสารสังเคราะห์หรือกึ่งสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นยาใหม่ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสารจากสมุนไพรนั้น มีความซับซ้อนกว่าการพัฒนาสารสำคัญเดี่ยวที่เป็นยาใหม่ในด้านจำนวนองค์ประกอบของสารสำคัญ ซึ่งหากยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าสารใดออกฤทธิ์ ก็มักพัฒนาสารสกัดทั้งหมดโดยถือเสมือนว่า สารเหล่านั้นเป็นสารสำคัญทั้งสิ้น (Hefendehl, 1987) ดังนั้น การศึกษาความคงตัวของสารสกัดและผลิตภัณฑ์ของสารสกัด จึงต้องติดตามปริมาณของสารทุกตัวในลักษณะของ fingerprint chromatogram เป็นอย่างน้อย โดยตามเกณฑ์ที่ยอมรับคือ ปริมาณสารสำคัญทั้งหมดต้องไม่เปลี่ยนแปลงเกินกว่า 10% ของค่าเริ่มต้นที่ได้จากการวิเคราะห์ (EMA.,1999)

ในด้านรูปแบบยาเตรียมของสารสกัดสมุนไพรซึ่งมุ่งให้ออกฤทธิ์ภายในร่างกายนั้น มักพบรายงานการใช้รูปแบบยาเตรียมของแข็งสำหรับรับประทาน เช่น ยาเม็ด (tablet) หรือแคปซูล (capsule) ส่วนรูปแบบยาเตรียมของเหลวสำหรับรับประทานหรือยาฉีด มีรายงานการใช้น้อยกว่าเมื่อสืบค้นจากฐานข้อมูลทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์สาธารณสุข (MEDLINE) อย่างไรก็ตาม การเลือกรูปแบบยาเตรียมจะถูกจำกัดโดยคุณสมบัติของสารในสมุนไพร สำหรับการเริ่มดำเนินการศึกษา อาจอาศัยข้อมูลการสลายตัวของสารในสมุนไพรและคุณสมบัติในการละลายเป็นสิ่งช่วยชี้ความเป็นไปได้ในการเตรียมรูปแบบยาต่าง ๆ โดยในเบื้องต้น ควรมีการศึกษายาเตรียมทั้งในรูปแบบยาเม็ดหรือแคปซูลสำหรับรับประทาน และรูปแบบสารละลายเพื่อเป็นยาฉีด ซึ่งสำคัญต่อการศึกษาฤทธิ์ทางการรักษาและพิษวิทยาในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ ควรมีข้อมูลความคงตัวเบื้องต้นของยาเตรียมต้นแบบ เพื่อให้ทราบสภาวะที่ควรใช้ในการเก็บรักษาอย่างต่อเนื่องเพื่อคาดการณ์อายุการใช้ของยาเตรียมต้นแบบระหว่างการศึกษการใช้ในสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ความคงตัวของสารสกัดสมุนไพร (Stability-indicating assay) พัฒนายาเตรียมต้นแบบสำหรับการศึกษาฤทธิ์และพิษของสารสกัดสมุนไพรในสัตว์ทดลอง และศึกษาความคงตัวเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรต่อความร้อน และแสง

วัสดุอุปกรณ์

งานวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดกะทกรก ตัวอย่างกะทกรกถูกเก็บจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดระยอง ชลบุรี และนนทบุรี เฉพาะส่วนใบถูกอบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปแช่สกัดด้วย 95% ethanol ได้เป็นสิ่งสกัด 95% ethanol หรือเรียกว่า fraction 001 ซึ่งถูกนำมาสกัดต่อโดยวิธี partition ระหว่างตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ dichloromethane และน้ำ สิ่งสกัดในชั้น dichloromethane ถูกนำมา partition ต่อด้วย hexane และ 90% methanol ได้สิ่งสกัด hexane หรือเรียกว่า fraction 002 กับสิ่งสกัด 90% methanol หรือเรียกว่า fraction 003 สิ่งสกัด fraction 003 นี้ถูกทำให้แห้ง และเป็นสารสกัดที่ชุดโครงการวิจัยได้พิจารณาเลือกเป็นสารสกัดกะทกรกที่จะศึกษาและใช้พัฒนายาเตรียมต้นแบบ

สารฟลาโวนอยด์อ้างอิง Chrysin ความบริสุทธิ์ 97%, Naringin ความบริสุทธิ์ 90%, Quercetin dehydrate ความบริสุทธิ์ 98%, Apigenin ความบริสุทธิ์ 95%, และ Kaempferol ความบริสุทธิ์ 90% จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ส่วน Vitexin ความบริสุทธิ์ 96% และ Luteolin ความบริสุทธิ์ 99% จากบริษัท Fluka (Buchs SG, Switzerland)

ตัวทำละลาย Methanol, acetonitrile เกรด HPLC และกรดอะซิติก เกรดงานวิเคราะห์ จัดซื้อจากบริษัท Labscan Asia (กรุงเทพฯ ประเทศไทย)

คอลัมน์ HPLC คอลัมน์ Hypersil Gold C18 แบบ analytical (4.6 x 250 mm ขนาดอนุภาค 5 μm) แบบ semi-preparative (10 x 250 mm ขนาดอนุภาค 5 μm) และ guard คอลัมน์ (4.6 X 4 mm ขนาดอนุภาค 5 μm) จากบริษัท Thermo Scientific (Waltham, USA)

Syringe filter จาก National Scientific (Rockwood, USA) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 mm ทำด้วย nylon ขนาดรูกรอง 0.45 μm

ชุดเครื่องมือ HPLC เป็นชุดเครื่อง HPLC ของบริษัท Shimadzu (Kyoto, Japan) ประกอบด้วย system controller (SCL-10 AVP), pumps (LC-10ADVP), degasser (DGU-14A), autosampler (SIL-10ADVP), column oven (CTO-10ASVP), diode array detector (SPD-M10AVP), UV-vis detector (SPD-10 ADVP), fraction collector (FRC-10A) และโปรแกรมควบคุมการทำงานของชุดอุปกรณ์รุ่น 6.14SP1

เครื่อง UV-vis spectrophotometer รุ่น Genesys 5 บริษัท Spectronics Corp. (Westbury, USA)

เครื่อง sonicator รุ่น Transsonic 890 บริษัท Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co KG (Singen, Germany)

งานศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน

สารรังสี [Methoxy ^3H] Raclopride จาก Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, USA) [N-methyl- ^3H] SCH23390, 8-Hydroxy-[^3H] DPAT จาก Amersham Biosciences GE Healthcare UK Limited (Buckinghamshire, UK)

สารเคมี R-(+)-SCH23390 HCl, S-(-)-Raclopride L-(+)-tartrate salt, (+)-Butaclamol HCl, Polyethyleneimine จากบริษัท Sigma (Steinheim, Germany)

ชุดกรองสารรังสี (12-25 Sampling Manifold) จาก Millipore corporation (Bedford, USA)

เครื่อง *homogenizer* (Glas -Col™) จากบริษัท Cole-PARMER (Terre Haute, USA)

งานพัฒนาสูตรตำรับ

Starch 1500 Partially pregelatinized starch (Colorcon™) จากบริษัท MERCHANT SQUARE Singapore

Avicel PH101 Microcrystalline cellulose จากบริษัท Asahi Kasei chemicals Tokyo, JAPAN

HPC (M) Hydroxypropyl cellulose (medium type) จาก บริษัท NISSO SODA, JAPAN

เครื่องตอกสากเดี่ยว บริษัท เขียวเฮง กรุงเทพ

เครื่องวัดความกร่อน Erweka APPARATEBAU-G.m.b.H, Type TA3

เครื่องวัดความแข็ง Schleuniger-2E, Dr. Schleuniger Productronic AG, (Solothurn, Switzerland)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

ซังและละลายสารสกัดกะทกรกด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลาย 1% กรดอะซิติก ในสัดส่วน 1: 1 ให้ได้สารสกัดกะทกรกความเข้มข้นโดยประมาณ 5 mg/ml นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้การละลายเกิดสมบูรณ์ กรองสารละลายที่ได้ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm เก็บสารละลายที่กรองแล้วในขวดแก้วสีชา ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค High Performance Liquid

Chromatography (HPLC)

การศึกษาสารองค์ประกอบภายในสารสกัดกะทกรกทำได้โดยการแยกสารสกัดด้วยวิธี HPLC สภาวะที่ใช้ในการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด reversed phase C-18 อนุภาค 5 μm ขนาด 4.6 x 250 mm ต่อเชื่อมกับ guard คอลัมน์ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 ml / นาที เวลาในการวิเคราะห์ 85 - 100 นาที ตรวจวัดสารด้วย photodiode array detector พร้อมกับศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่าง ๆ ต่อความสามารถในการแยกพีค และความสูงของพีค ดังนี้ 1) ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่าง (injection volume) ในช่วง 10 - 30 μl 2) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์ในช่วง 25 - 45 $^{\circ}\text{C}$ 3) การเปลี่ยน organic modifier ระหว่าง methanol และ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่ และ 4) อัตราการเปลี่ยนสัดส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ (gradient) สภาวะในการวิเคราะห์ที่เลือกใช้จะถูกทดสอบในด้าน 1) precision โดยการฉีดวิเคราะห์สารตัวอย่างเดียวกัน 6 ครั้ง และคำนวณ % relative standard deviation (RSD) ของ peak retention และ peak area, 2) repeatability โดยการเตรียมตัวอย่างใหม่ 6 ครั้ง แล้วทำการวิเคราะห์ เพื่อนำผลมาคำนวณ % RSD ของ peak retention และ peak area 3) interday precision โดยฉีดสารตัวอย่างเดียวกันติดต่อกัน 3 วัน และนำผลทั้งหมดมาคำนวณ % RSD ของ peak retention และ peak area

การศึกษาสารเครื่องหมาย

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อค้นหาสารเครื่องหมายทางชีวภาพของสารสกัดกะทกรก ทำโดยการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดด้วยวิธี semi-preparative HPLC และนำสารกึ่งบริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการจับกับตัวรับโดปามีน สภาวะที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่แบบ isocratic ที่มี methanol และ 1% กรดอะซิติกในสัดส่วน 60 : 40 คอลัมน์ชนิด reversed phase C-18 อนุภาค 5 μm ขนาด 10 mm x 250 mm อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 4 ml / นาที เวลาในการวิเคราะห์ 35 นาที ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ไว้ที่ 45 $^{\circ}\text{C}$ ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 300 μl จากนั้นเก็บ fraction ต่าง ๆ ดังนี้

| Fraction | ช่วงเวลา (นาที) |
|----------|-----------------|
| A | 5.22 – 6.00 |
| B | 6.15 – 7.00 |
| C | 8.45 – 9.30 |

ระเหยตัวทำละลายใน fraction ต่าง ๆ ออกที่อุณหภูมิ 50 °C ภายใต้สูญญากาศ (evaporation) ละลาย fraction ที่แห้งแล้วอีกครั้งด้วย methanol ปิเปตสารละลายเข้มข้นที่ได้ใส่ใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ระเหย methanol ในสารละลาย fraction ออกอีกครั้งหนึ่งด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อแห้งแล้ว นำ vial มาชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของ fraction ที่แยกได้

นำสารสกัด fraction ทั้งสามมาศึกษาโครมาโตแกรมด้วย HPLC และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และตัวรับโดปามีน 2 ด้วยเทคนิค radioligand receptor binding assay

ในการค้นหาสารเครื่องหมายทางชีวภาพของสารสกัดกะทกรกนี้ นอกจากจะศึกษา fraction ที่แยกได้จาก semi-preparative HPLC แล้ว ยังได้ศึกษาสารบริสุทธิ์ที่ตกผลึกได้จากโครงการที่ 1 อีกทั้งได้ศึกษาโครมาโตแกรมของสารฟลาโวนอยด์ที่อาจพบได้ในพืชตระกูล *Passiflora* ร่วมด้วย

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนโดยเทคนิค radioligand receptor binding assay

รายละเอียดวิธีการเตรียมเมมเบรนตัวรับจากสมองบริเวณ striatum ของหนูขาว เพื่อใช้ในการศึกษาการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 การเตรียมเนื้อเยื่อเมมเบรนตัวรับโดปามีน 2 จากเซลล์เพาะเลี้ยง A9LhD2 เพื่อใช้ในการศึกษาการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 2 ตลอดจนขั้นตอนการศึกษาการจับกับตัวรับทั้งสองชนิดอยู่ในวิธีดำเนินการวิจัยของโครงการที่ 2 เรื่อง การทดสอบฤทธิ์ต้านสารกระตุ้นประสาทของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ โดยสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบจะละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 µg / ml

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดกะทกรก

ชั่งสารสกัดกะทกรกบรรจุในขวดแก้วปิดฝาขวดละ 5-6 mg และเก็บสารตัวอย่างไว้ในสภาวะแตกต่างกันดังนี้

- 1) - 20 °C ปราศจากแสง (ใช้แผ่นอลูมิเนียมบางหุ้มขวดเพื่อป้องกันแสง)
- 2) 4 - 8 °C ปราศจากแสง (ใช้แผ่นอลูมิเนียมบางหุ้มขวดเพื่อป้องกันแสง)
- 3) 30 - 34 °C ภายใต้แสงเหนือม่วงในตู้ UV oven ความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร

- 4) 30 - 34 °C ปราศจากแสง (ใช้แผ่นอลูมิเนียมบางหุ้มขวดเพื่อป้องกันแสง)

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารตัวอย่างในสภาวะการเก็บด้วยเทคนิค HPLC

การพัฒนาสูตรตำรับเบื้องต้น

ละลายสารสกัดกะทกรกใน ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 1 g / 30 ml แล้วค่อย ๆ ผสมสารละลายดังกล่าวกับ carriers ที่นิยมใช้ในสูตรตำรับยาเม็ดแข็งที่ออกตรง อาทิ lactose, Aerosil 200, MgO, Starch 1500, Avicel PH102, และ PVP K90 การศึกษาการผสมเบื้องต้นได้ใช้วิธีการบดผสมในโกร่ง และวิธีการเขย่าผสมในภาชนะปิด ผงยาที่ได้ถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติการไหลของผง และ compressibility จากนั้นผงยาจะถูกนำไปทดสอบการตอกอัดเป็นเม็ด พร้อมศึกษาความแข็งของเม็ดยาด้วยวิธีการสังเกตด้วยตาเปล่า และการวัดด้วยเครื่อง hardness tester

นอกจากการศึกษาดำรับยาเม็ดแล้ว ยังได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมยาน้ำหรือยาแขวนตะกอน ดังนี้คือ การหาการละลายของสารสกัดกะทกรกใน polyethylene glycol 400 ที่อุณหภูมิ 25 °C และการเตรียมตำรับยาแขวนตะกอนสารสกัดกะทกรก ใน sodium carboxy methyl cellulose (sodium CMC) และ methyl cellulose (MC) โดยเริ่มต้นให้สารสกัดละลายใน 95% ethanol ในความเข้มข้นประมาณ 50 mg/ml จากนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าว 1 ml มาผสมกับ sodium CMC หรือ MC โดยมีการเติมน้ำจนสัดส่วนของ ethanol ในตำรับเป็น 20% และสัดส่วนของ sodium หรือ MC เป็น 0.08%

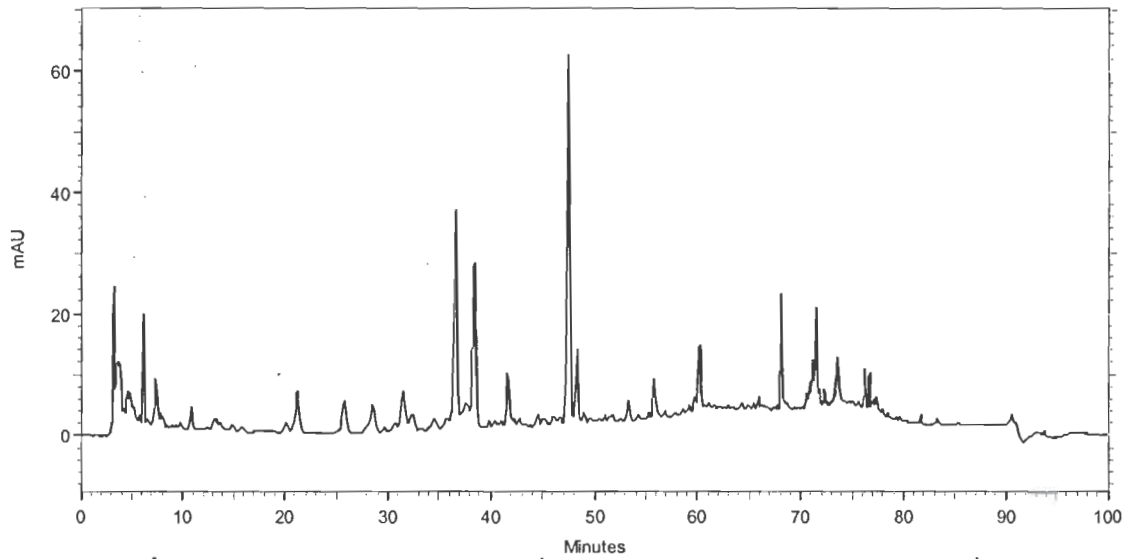
ผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC สำหรับสารสกัดกะทกรก

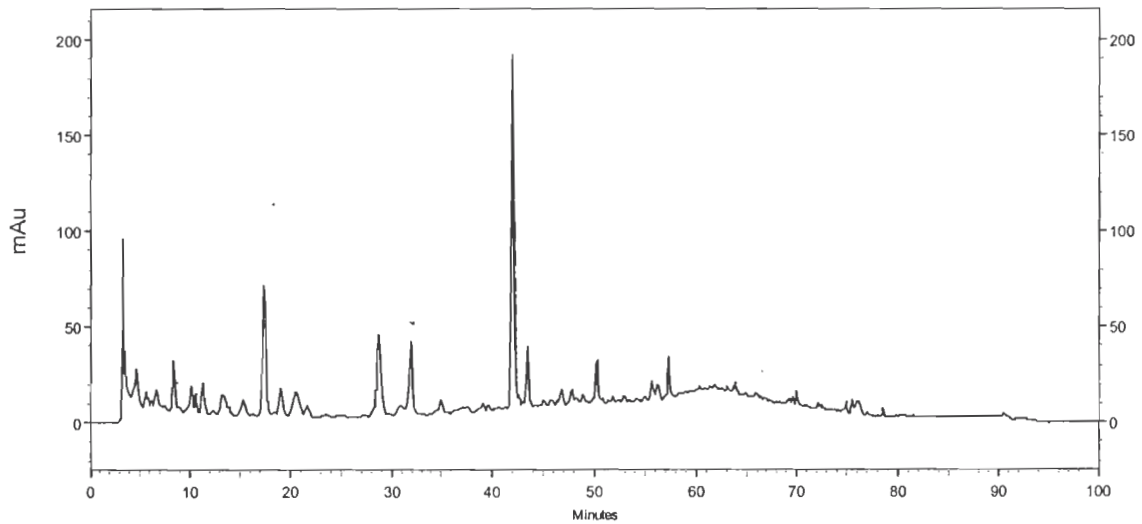
เนื่องจากสารสกัดกะทกรกที่จะพัฒนาเป็นยาเตรียมต้นแบบเพื่อศึกษาการใช้ในสัตว์ทดลองและการใช้ทางคลินิกต่อไปนั้น เป็นสารสกัดหยาบ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในสารสกัดจะมีความเป็นขั้วต่างกันมาก ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เบื้องต้น จึงได้ใช้ methanol เป็น organic modifier และมี 1% acetic acid เป็นตัวทำละลายผสมในเฟสเคลื่อนที่ และทำการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของตัวทำละลายทั้งสองชนิดตามเวลา (solvent gradient) ดังนี้

| เวลา (นาที) | % methanol |
|-------------|------------|
| 0.01 | 20 |
| 20 | 20 |
| 50 | 50 |
| 75 | 100 |
| 85 | 100 |
| 90 | 20 |
| 100 | 20 |

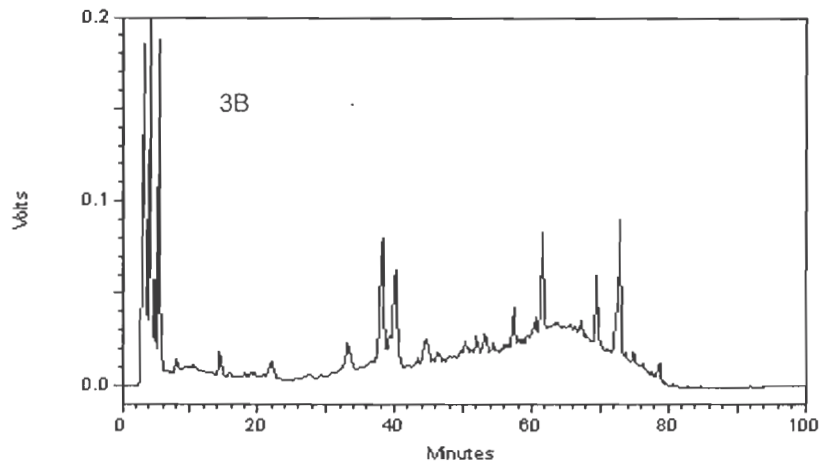
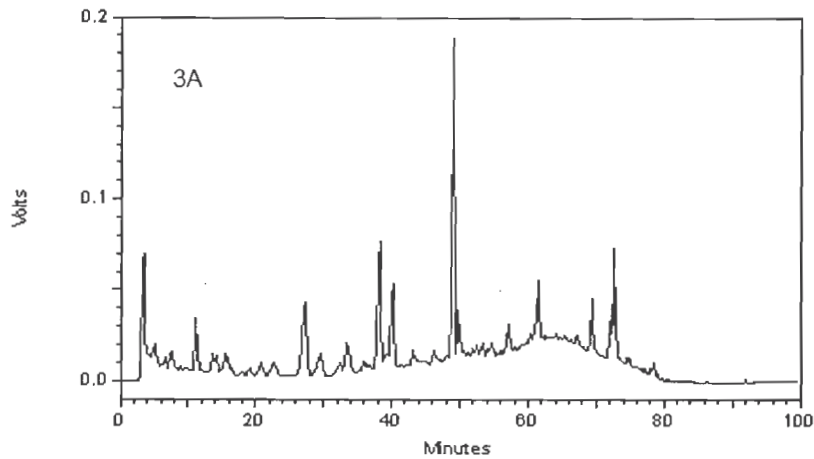
ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรกจากสภาวะการวิเคราะห์ดังกล่าวได้แสดงในรูปที่ 7 - 1 อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้สังเกตพบความแปรปรวนของโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดกะทกรก ซึ่งคาดว่าส่วนหนึ่งมาจากสภาวะการทดลองเช่น อุณหภูมิห้องที่เปลี่ยนแปลง การมีกรดหรือไม่มีกรดในสารละลายตัวอย่างก่อนฉีด จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ระหว่างการวิเคราะห์ให้อยู่ที่ 25, 35, และ 45 °C ตลอดจนการเตรียมสารละลายของสารสกัดก่อนฉีดในสารละลายผสมระหว่าง methanol และ 1% acetic acid ผลการทดลองพบว่า พีคแยกออกจากกันได้ชัดเจนขึ้นโดยเฉพาะในส่วนต้นของโครมาโตแกรม (ช่วงเวลาดังแต่ 0 – 20 นาที) อีกทั้งความสูงของพีคหลักเพิ่มขึ้นมากกว่าสัดส่วนตามปริมาณสารสกัดที่ฉีด (รูปที่ 7 - 2) นอกจากนี้ยังได้ศึกษายืนยันผลของการเติมกรดในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า การแยกพีคจะชัดเจนขึ้นและความสูงของพีคเพิ่มขึ้น (รูปที่ 7 - 3)



รูปที่ 7 - 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 10 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 10 mg/ml ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ และใช้ photodiode array detector



รูปที่ 7 - 2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 $^{\circ}$ C และใช้ photodiode array detector

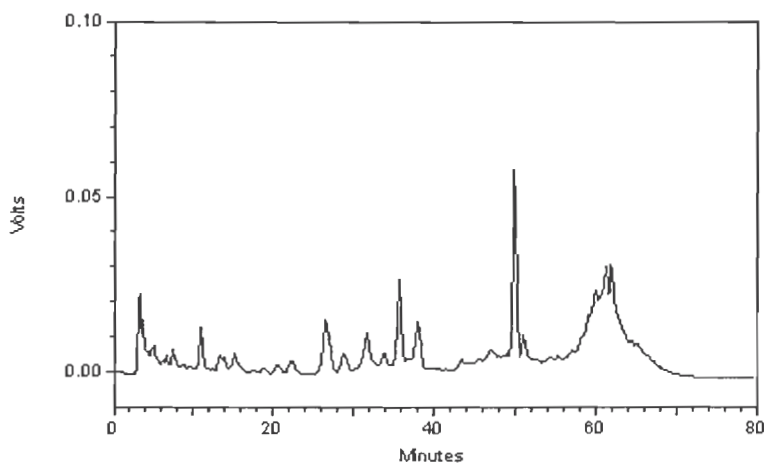


รูปที่ 7 - 3 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid (A) และเมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และน้ำ (B) แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 $^{\circ}$ C และใช้ UV-vis detector

ในการศึกษาเพื่อลดระยะเวลาการวิเคราะห์ให้สั้นลงนั้น คณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้ acetonitrile ร่วมกับ methanol ในสัดส่วน 1 : 1 เป็น organic modifier เพื่อลด polarity ของเฟสเคลื่อนที่ และคาดว่าจะทำให้สารออกจากคอลัมน์เร็วขึ้น ตลอดจนปรับอัตราการเปลี่ยนแปลงของ solvent gradient เป็น

| เวลา (นาที) | % สารละลายผสม methanol กับ acetonitrile | % สารละลาย 1% acetic acid |
|-------------|--------------------------------------------|------------------------------|
| 0.01 | 20 | 80 |
| 20 | 20 | 80 |
| 25 | 30 | 70 |
| 35 | 30 | 70 |
| 40 | 40 | 60 |
| 50 | 40 | 60 |
| 55 | 60 | 40 |
| 60 | 60 | 40 |
| 70 | 20 | 80 |
| 80 | 20 | 80 |

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ได้โครมาโตแกรมที่ดีกว่าการใช้ methanol เป็น organic modifier เพียงชนิดเดียว (รูปที่ 7 - 4)



รูปที่ 7 - 4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และ acetonitrile (1 : 1) กับ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ปริมาตรการฉีด 20 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 $^{\circ}$ C และใช้ UV-vis detector

แม้เมื่อทดลองใช้ acetonitrile เป็น organic modifier เพียงตัวเดียว ก็ไม่ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีขึ้น (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จากผลการศึกษาทั้งหมดที่ได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ปรับอัตราการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid อีกครั้งหนึ่ง พร้อมกับได้ศึกษาโครมาโตแกรมของ chrysin ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่พบใน *Passiflora caerulea* และ *Passiflora incarnata* ที่สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน พีคของ chrysin ที่ได้ไม่ตรงกับพีคใด ๆ ในโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรก (รูปที่ 7 - 5) จึงคาดว่า chrysin ไม่เป็นสารสำคัญในกะทกรก และอาจใช้ chrysin เป็น internal standard ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยการวิเคราะห์สารสกัดกะทกรกที่ได้จากการสกัดแต่ละครั้ง (lot-to-lot) อัตราการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ มีรายละเอียดดังนี้

| เวลา (นาที) | % methanol | % สารละลาย 1% acetic acid |
|-------------|------------|---------------------------|
| 0.01 | 20 | 80 |
| 20 | 20 | 80 |
| 50 | 50 | 50 |
| 63 | 75 | 25 |
| 68 | 75 | 25 |
| 75 | 20 | 80 |
| 85 | 20 | 80 |

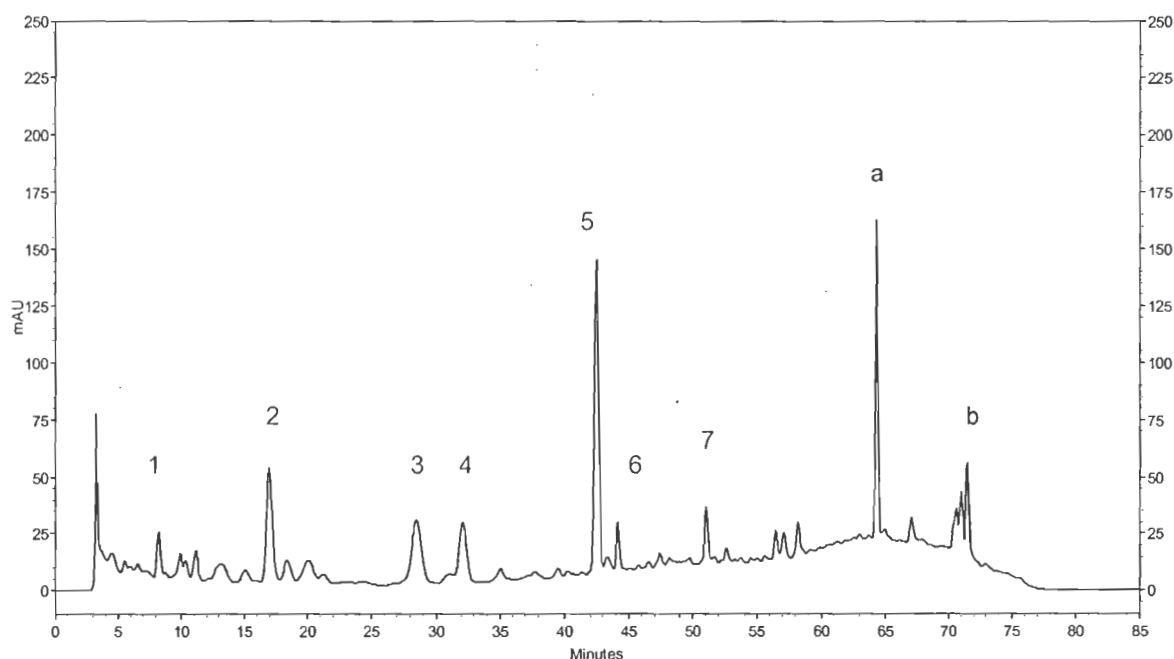
ในการสรุปตำแหน่งพีคหลัก ได้ตั้งเกณฑ์เลือกพีคที่มีพื้นที่ใต้พีคไม่น้อยกว่า 300,000 mAU-min เป็นพีคที่ชัดเจนและปรากฏสม่ำเสมอในโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดที่วิเคราะห์ (รูปที่ 7 - 5) ค่า precision, repeatability และ interday precision พีคต่าง ๆ ดังกล่าว ณ สภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 7 - 1 และ 7 - 2

ตารางที่ 7 - 1 สรุปตำแหน่งพีคหลักที่ 280 nm และค่า precision, repeatability และ interday precision ของ retention time จากสมภาวะการวิเคราะห์ที่เลือกใช้

| พีค | เวลา (นาที) | % RSD (precision) n = 6 | % RSD (repeatability) n = 6 | % RSD (interday precision) n = 3 |
|-----|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 | 8.1 | 0.20 | 0.00 | 0.30 |
| 2 | 16.8 | 1.90 | 0.47 | 2.51 |
| 3 | 28.2 | 2.00 | 0.60 | 2.37 |
| 4 | 31.9 | 1.25 | 0.46 | 1.51 |
| 5 | 42.4 | 0.53 | 0.26 | 0.71 |
| 6 | 44.1 | 0.39 | 0.21 | 0.55 |
| 7 | 51.0 | 0.42 | 0.21 | 0.57 |

ตารางที่ 7 - 2 พีคหลักที่ 280 nm และค่า precision, repeatability และ interday precision ของ peak area จากสมภาวะการวิเคราะห์ที่เลือกใช้

| พีค | Peak area (mAU-min) | % RSD (precision) n = 6 | % RSD (repeatability) n = 6 | % RSD (interday precision) n = 3 |
|-----|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 | 367,157 | 4.50 | 2.42 | 10.3 |
| 2 | 1,282,643 | 0.90 | 3.96 | 1.02 |
| 3 | 1,227,406 | 2.99 | 4.58 | 2.62 |
| 4 | 733,759 | 2.61 | 5.90 | 7.65 |
| 5 | 2,392,627 | 1.19 | 3.95 | 0.42 |
| 6 | 293,495 | 1.21 | 4.52 | 0.63 |
| 7 | 388,323 | 0.95 | 2.57 | 6.38 |



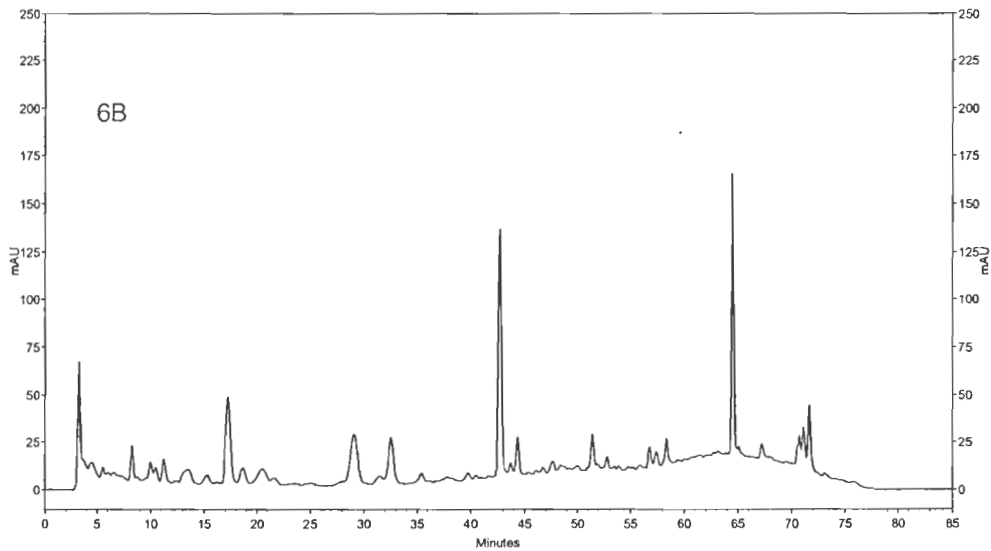
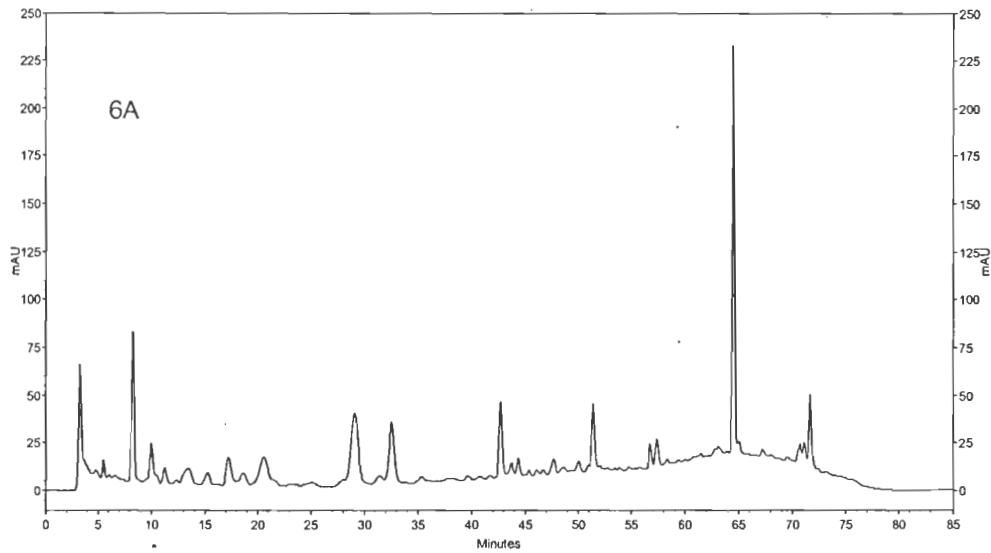
รูปที่ 7 - 5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient ที่สิ้นสุดเวลาที่ 85 นาที ปริมาณการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 $^{\circ}$ C และใช้ photodiode array detector หมายเลข 1 - 7 แสดงพีคหลักที่พบ (^a พีคของ chrysin ที่เดิมในสารสกัด ^b กลุ่มพีคจากคอลัมน์)

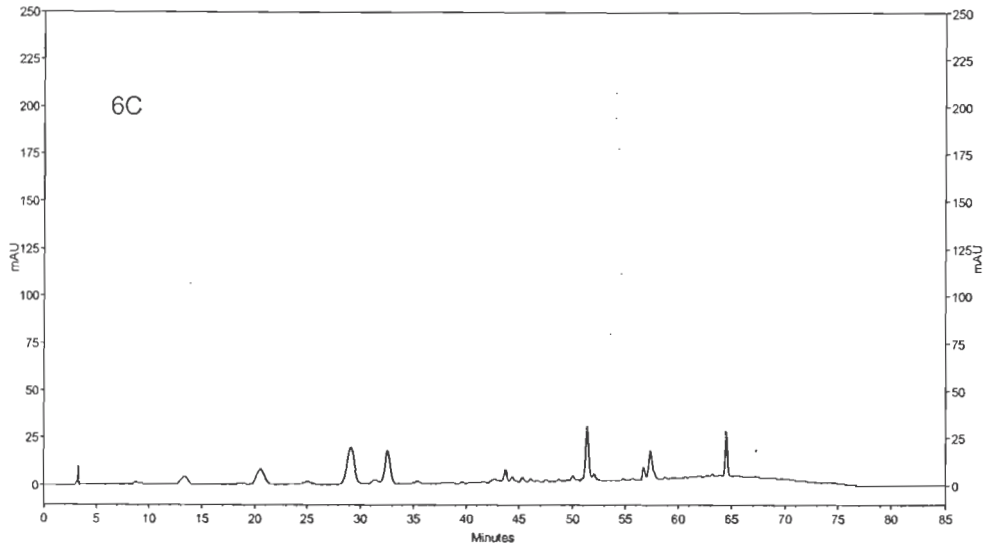
การศึกษาสารเครื่องหมาย

สารโครงสร้างฟลาโวนอยด์มักเป็นสารสำคัญประเภทหนึ่ง ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพร การค้นหาสารเครื่องหมาย (marker) เบื้องต้นด้วย HPLC โครมาโตแกรม จึงเป็นการค้นหาพีคขององค์ประกอบในสารสกัดกะทกรกที่คาดว่าเป็นสารฟลาโวนอยด์ โดยอาศัยคุณสมบัติของสารฟลาโวนอยด์ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ 260, 280, และ 370 nm การศึกษาดังกล่าวทำได้โดยง่ายเมื่อมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย photodiode array detector และทำให้คณะผู้วิจัยสามารถเปรียบเทียบโครมาโตแกรมเดียวกันที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 7 - 6 รายละเอียดผลการวิเคราะห์พื้นที่ใต้พีคของแต่ละโครมาโตแกรมได้แสดงในตารางที่ 7 - 3 จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้คาดว่า พีคที่มีความเป็นไปได้ว่ามาจากสารฟลาโวนอยด์มีประมาณ 5 พีคคือ พีคที่มี retention time ประมาณ 20, 29, 33, 51 และ 57 นาที

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบ retention time ของสารฟลาโวนอยด์ที่คาดว่าจะพบในพืชตระกูล *Passiflora* อาทิ apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol และ vitexin ในสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันกับสารสกัดกะทกรก พบว่า สารอ้างอิง vitexin มี retention time ใกล้เคียงกับ

พีคของสารสกัดกะทกรกที่ประมาณ 29 นาที สารอ้างอิง luteolin มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารสกัดกะทกรกที่ประมาณ 51 นาที สารอ้างอิง apigenin มี retention time ใกล้เคียงกับพีคขนาดเล็กของสารสกัดกะทกรกที่ประมาณ 55 - 57 นาที

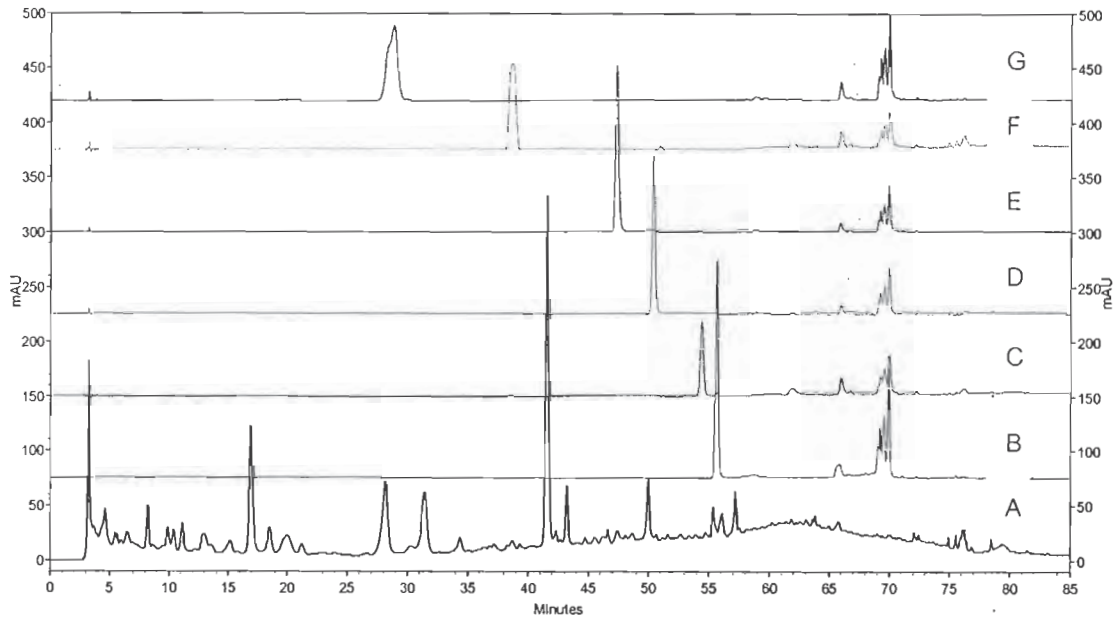




รูปที่ 7 - 6 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ครั้งเดียวกันของสารสกัดกะทกรกที่ความยาวคลื่น 260 nm (โครมาโตแกรม A), 280 nm (โครมาโตแกรม B) และ 370 nm (โครมาโตแกรม C) เมื่อระบบเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 1% acetic acid แปรสัดส่วนตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ตาม gradient เวลาการวิเคราะห์ 85 นาที ปริมาณการฉีด 30 μ l ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 5 mg/ml อุณหภูมิคอลัมน์ 45 $^{\circ}$ C และใช้ photodiode array detector พิกที่เวลา 64 - 65 นาที เป็นพิกของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด

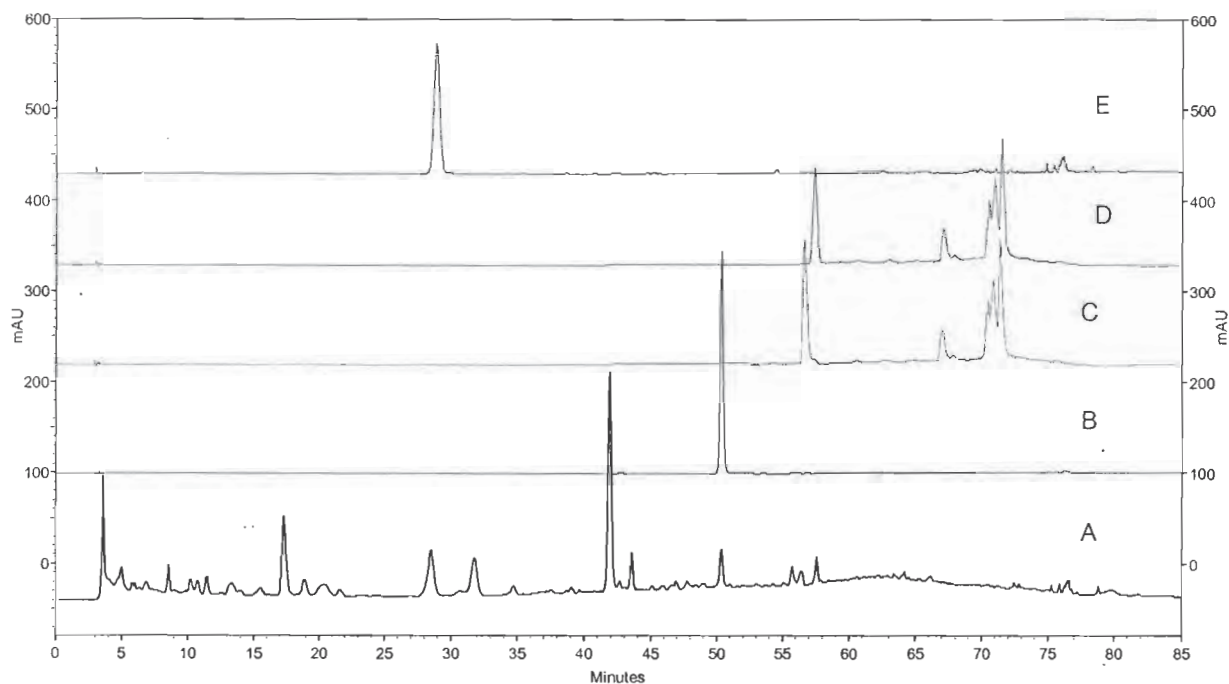
ตารางที่ 7 - 3 ข้อมูลพื้นที่ใต้พีคที่พบในโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรกที่ความยาวคลื่น 260, 280, และ 370 nm (+ หมายถึงขนาดพื้นที่ใต้พีค 200,000 – 800,000 mAU-min, ++ หมายถึงขนาดพื้นที่ใต้พีค 800,001 – 1,500,000 mAU-min, +++ หมายถึงขนาดพื้นที่ใต้พีค 1,500,000 – 3,000,000 mAU-min)

| พีค | เวลา | ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร | ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร | ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร |
|---------------|-------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 3.27 | +++ | ++ | - |
| 2 | 4.47 | - | + | - |
| 3 | 8.32 | ++ | + | - |
| 4 | 13.52 | + | + | - |
| 5 | 17.30 | + | ++ | - |
| 6 | 20.50 | ++ | + | + |
| 7 | 29.10 | +++ | ++ | ++ |
| 8 | 32.57 | ++ | + | + |
| 9 | 42.73 | + | +++ | - |
| 10 | 44.37 | - | + | - |
| 11 | 51.37 | + | + | + |
| 12 | 57.34 | - | - | + |
| 13 chrysin | 64.46 | +++ | +++ | + |
| 14 | 71.57 | + | + | - |

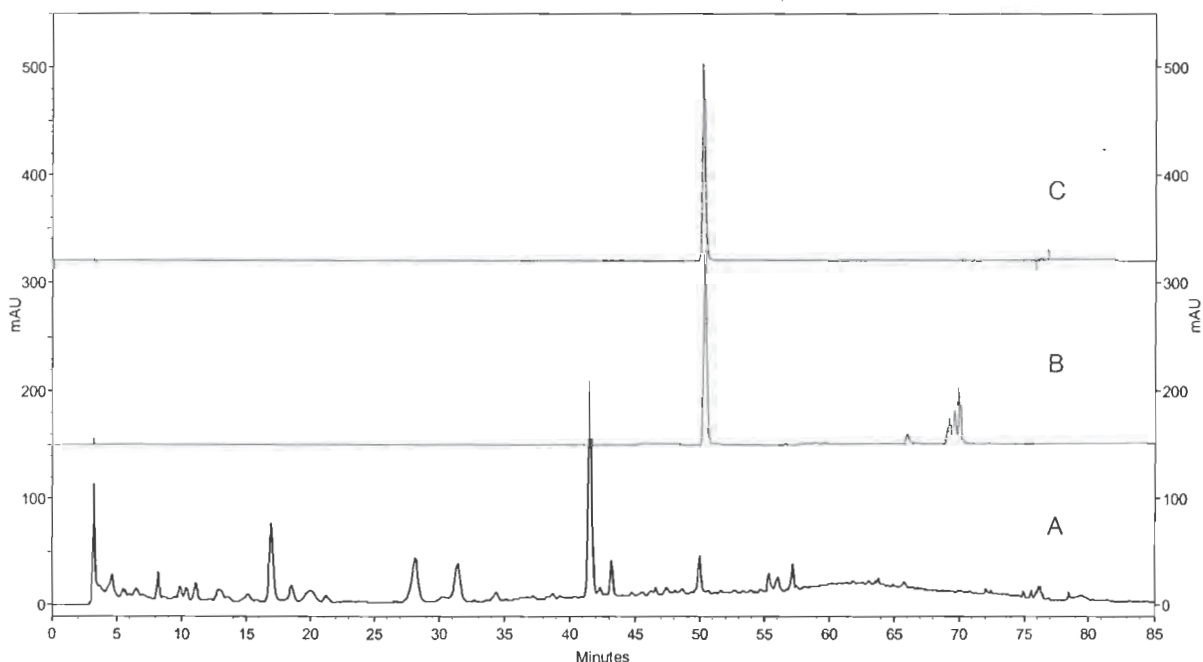


รูปที่ 7 - 7 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และ สารฟลาโวนอยด์อ้างอิง ได้แก่ Apigenin (โครมาโตแกรม B), Kaemferol (โครมาโตแกรม C), Luteolin (โครมาโตแกรม D), Quercetin (โครมาโตแกรม E), Naringin (โครมาโตแกรม F), และ Vitexin (โครมาโตแกรม G) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล

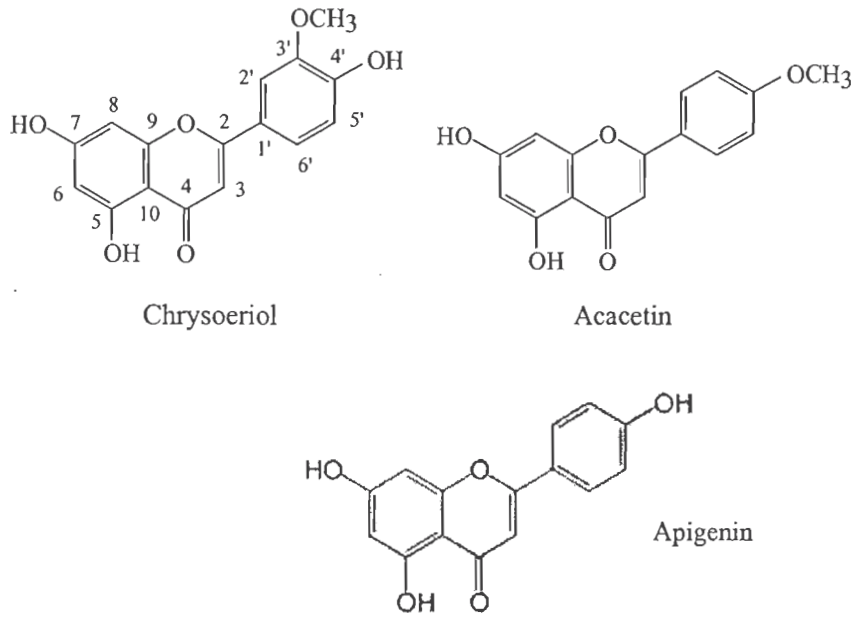
การวิเคราะห์หองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกะทกรก ได้ดำเนินการต่อด้วยวิธีการตกผลึกสารบริสุทธิ์ ซึ่งในโครงการที่ 1 สามารถตกผลึกสารได้กว่า 9 ชนิด ในจำนวนนี้ ได้ทดลองวิเคราะห์โครมาโตแกรมของผลึกบางชนิดที่มีปริมาณเพียงพอ อาทิ PF-D, PF2, PF3 และ PF-E ดังแสดงในรูปที่ 7 - 8 PF-D มี retention time ตรงกับสารอ้างอิง luteolin (รูปที่ 7 - 9) ส่วน PF2 และ PF3 ผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีจากโครงการที่ 1 สนับสนุนว่า PF2 คือ chrysoeriol และ PF3 คือ acacetin สารทั้งสองมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ apigenin (รูปที่ 7 - 10) ทำให้คาดว่าพีคขนาดเล็ก 3 พีคที่ retention time ประมาณ 55-57 นาที คือ apigenin, chrysoeriol และ acacetin ตามลำดับของ retention time ซึ่งจะสอดคล้องกับ polarity ของสารทั้งสาม (รูปที่ 7 - 11) ส่วนผลึก PF-E นั้น มีความเป็นไปได้สูงว่า เป็นสารโครงสร้างคล้าย vitexin หรือเป็น vitexin โดยมีผลการศึกษา UV scan ช่วง 190 – 450 nm จากข้อมูลโครมาโตแกรมของสารอ้างอิง vitexin เมื่อใช้ photodiode array detector เทียบกับ UV scan ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันของพีคที่ 29 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะการดูดกลืนแสงที่คล้ายคลึงกัน และไม่เหมือนกับ isovitexin ตามที่มีการรายงาน (รูปที่ 7 - 12)



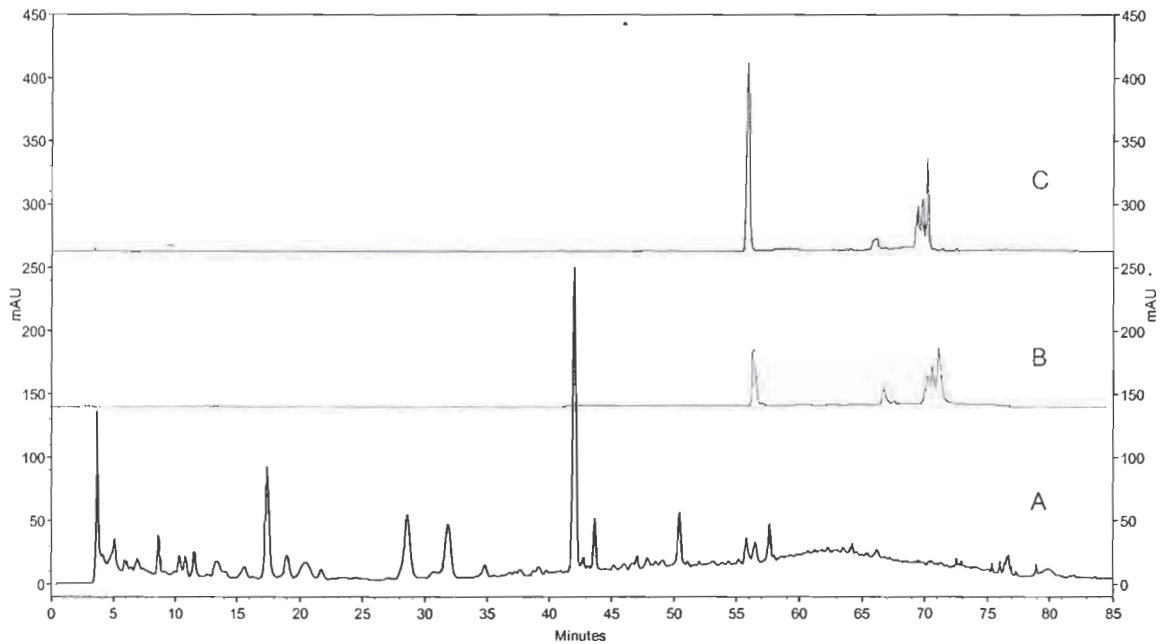
รูปที่ 7 - 8 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF-D (โครมาโตแกรม B), PF3 (โครมาโทแกรม C), PF2 (โครมาโตแกรม D) และ PF-E (โครมาโตแกรม E) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล



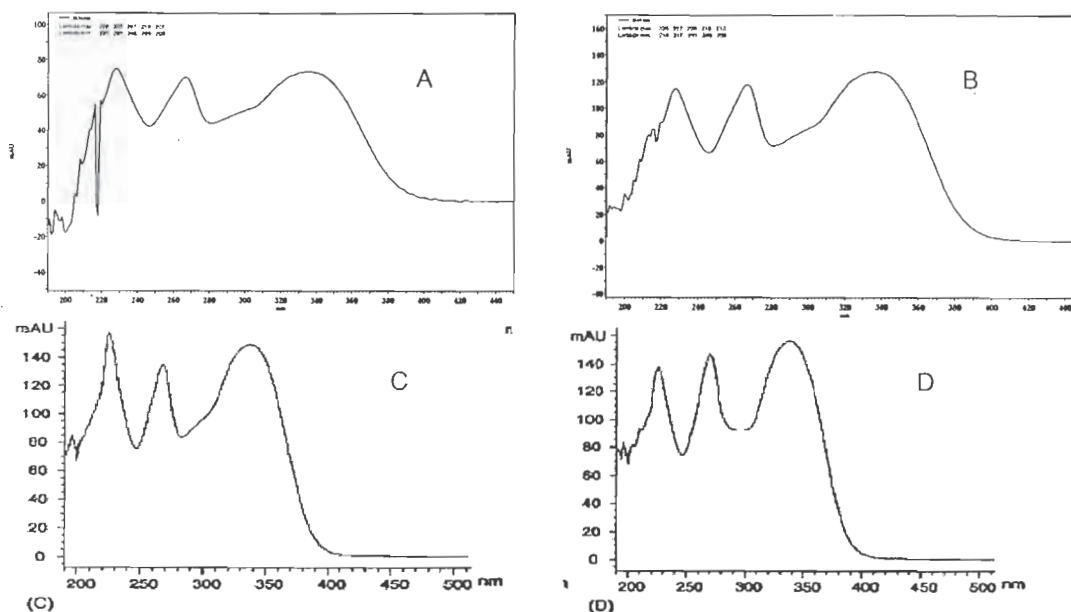
รูปที่ 7 - 9 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) สารอ้างอิง luteolin (โครมาโตแกรม B), และผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF-D (โครมาโตแกรม C) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล



รูปที่ 7 - 10 โครงสร้างเคมีของสารฟลาโวนอยด์ chrysoeriol, acacetin และ apigenin

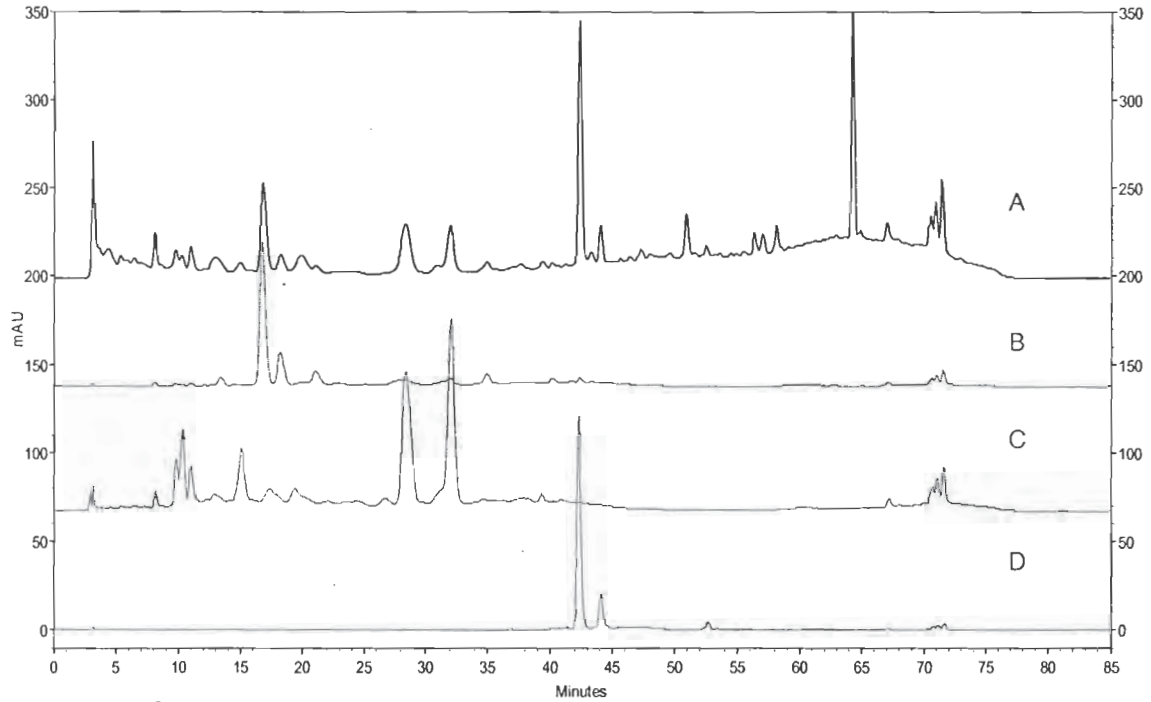


รูปที่ 7 - 11 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) ผลึกที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก PF3 (โครมาโตแกรม B) และสารอ้างอิง apigenin (โครมาโตแกรม C) โครมาโตแกรมทั้งหมดได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล



รูปที่ 7 - 12 UV scan ในช่วงความยาวคลื่น 190 – 450 nm วิเคราะห์จากโครมาโตแกรมของพีคที่ 29 นาที (A) และโครมาโตแกรมของสารอ้างอิง vitexin (B) เมื่อใช้ photodiode array detector เทียบกับ UV scan ของ vitexin (C) และ isovitexin (D) ที่รายงานโดย Y. Zhang et al. *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) pp.177–185 สังเกตลักษณะของการดูดกลืนแสงที่บริเวณความยาวคลื่น 300 – 325 nm ที่เป็นลักษณะเด่นของ vitexin เทียบกับ isovitexin

นอกจากความพยายามในการแยกสารองค์ประกอบมาศึกษาด้วยวิธีการตกผลึกแล้ว คณะผู้วิจัยยังได้แยก fraction ของสารองค์ประกอบด้วยวิธี semi-preparative HPLC เพื่อให้ได้มาซึ่งสารกึ่งบริสุทธิ์ที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนด้วย โดยคาดหวังว่า ผลการศึกษาดังกล่าวอาจนำไปสู่การบ่งชี้พีคที่เป็นสารเครื่องหมายทางชีวภาพ (biomarker) บนโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรก ความสามารถในการค้นพบสารเครื่องหมายทางชีวภาพ จะช่วยให้วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC มีประสิทธิภาพในการประเมินคุณภาพของสารสกัดมากขึ้น องค์ประกอบของ fraction 3 กลุ่ม ที่แยกได้คือ fraction A, B และ C สามารถแสดงดังรูปที่ 7 - 13 fraction A ประกอบด้วยสารที่มาจากพีคที่ 2 เป็นส่วนใหญ่ fraction B ประกอบด้วยสารที่มาจากพีคที่ 1 กับพีคที่คาดว่าคือ vitexin เป็นส่วนใหญ่ ส่วน fraction C ประกอบด้วยสารซึ่งมาจากพีคเด่นที่ประมาณ 43 นาที ผลการศึกษการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และตัวรับโดปามีน 2 ของ fraction ทั้งสาม สารที่ได้จากการตกผลึก อาทิ PF-D, PF-E, PF2 และ PF3 รวมถึงสารอ้างอิง เช่น vitexin luteolin และ naringin พบว่า เฉพาะ PF-D ซึ่งน่าจะเป็น luteolin และสารอ้างอิง luteolin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ในวิธีการทดสอบซึ่งใช้ radioligand receptor binding assay (ตารางที่ 7 - 4)



รูปที่ 7 - 13 แสดงการ overlay โครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรก (โครมาโตแกรม A) และ fractions จากการสกัดด้วยวิธี semi-preparative HPLC ได้แก่ fraction-A (โครมาโทแกรม B) fraction-B (โครมาโตแกรม C) fraction-C (โครมาโตแกรม D) โครมาโตแกรมทั้ง 4 ได้ถูกปรับขนาดเพื่อให้สามารถแสดงผลในรูปเดียวกันได้ ค่าบนแกน Y จึงไม่ควรใช้ในการแปลผล พีคที่เวลา 64 – 65 นาที (โครมาโตแกรม A) เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด

ตารางที่ 7 - 4 ความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 และตัวรับโดปามีน 2 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของผลึกและ fractions ที่แยกได้จากสารสกัดกะทกรก (NA หมายถึง ไม่มีข้อมูล)

| สารตัวอย่าง | ความเข้มข้น (mg/ml) | % การยับยั้ง ตัวรับโดปามีน 1 (Mean \pm SEM) | % การยับยั้ง ตัวรับโดปามีน 2 |
|-------------------|---------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|
| Fraction A | 100 | -9.62 \pm 2.66 | 9.65 \pm 0.16 |
| Fraction B | 100 | 6.62 \pm 1.54 | -3.42 \pm 1.47 |
| Fraction C | 100 | -8.26 \pm 1.66 | 4.27 \pm 1.43 |
| PF-D (luteolin?) | 100 | 38.81 \pm 1.22 | NA |
| PF-E (vitexin?) | 100 | 0.18 \pm 1.72 | NA |
| PF2 (chrysoeriol) | 100 | 0.6 | NA |
| PF3 (acacatin) | 100 | -13.2 | NA |
| Vitexin | 100 | -0.42 \pm 0.77 | 3.87 \pm 7.81 |
| Luteolin | 100 | 21.51 \pm 4.24 | 73.94 \pm 0.95 |
| Naringin | 100 | 0.12 \pm 0.39 | NA |

การศึกษาความแปรปรวนขององค์ประกอบในสารสกัดกะทกรกที่มาจากการสกัดใหม่ แยกครั้งกัน แต่ใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัด 3 ครั้งที่ทำโดยผู้ปฏิบัติการสกัดต่างกัน และขนาดปริมาตรของการสกัดต่างกัน สามารถให้สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการจับต่อตัวรับโดปามีน 1 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญได้ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 7 - 5

โครมาโตแกรมของสารสกัดจากการสกัดทั้งสามครั้งจากวิธี HPLC และติดตามการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบทั้งที่ 280 และ 320 nm (รูปที่ 7 - 14 และรูปที่ 7 - 15) พบว่า โครมาโตแกรมที่ 320 nm แสดงพีคสำคัญต่าง ๆ ได้ชัดเจนกว่าการติดตามที่ 280 nm และกลุ่มพีคจากคอลัมน์ที่บริเวณ 70-73 นาทีจะไม่ปรากฏบนโครมาโตแกรม ข้อสังเกตที่พบจากโครมาโตแกรมทั้งสาม (ตารางที่ 7 - 6) ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการจับต่อตัวรับโดปามีน 1 และสอดคล้องกับผลการศึกษา fraction A, B, และ C ที่ได้จากการแยกด้วย semi-preparative HPLC สารจากการดกผลึก PF-D, PF-E และสารอ้างอิง vitexin กับ luteolin คือ

1) กลุ่มพีคบริเวณ 28-33 นาที ซึ่งคาดว่ามาจากสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง vitexin หรือเป็น vitexin ด้วยนั้น อาจไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1

2) พีคที่ 51-52 นาที ซึ่งคาดว่าเป็นสารโครงสร้างคล้าย luteolin น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งต่อการจับกับตัวรับโดปามีน 1

3) พีคที่บริเวณ 42-45 นาที คาดว่าไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งต่อการจับกับตัวรับโดปามีน 1 แต่พบเด่นชัดในสารสกัดกะทกรกทุกตัวอย่าง ซึ่งอาจใช้ศึกษาต่อเป็น chemical marker

4) พีคที่บริเวณ 17-22 นาที คาดว่าไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งต่อการจับกับตัวรับโดปามีน 1

5) สัดส่วนของพีค 3 พีค ที่ 55-57 นาที โดยเฉพาะสัดส่วนของพีคที่คาดว่าคือ apigenin นั้น อาจมีความสำคัญต่อความสามารถในการยับยั้งต่อการจับกับตัวรับโดปามีน 1 แต่พีคตาม 2 พีค คือ chrysoeriol และ acacetin ไม่พบว่าสามารถยับยั้งต่อการจับกับตัวรับโดปามีน 1

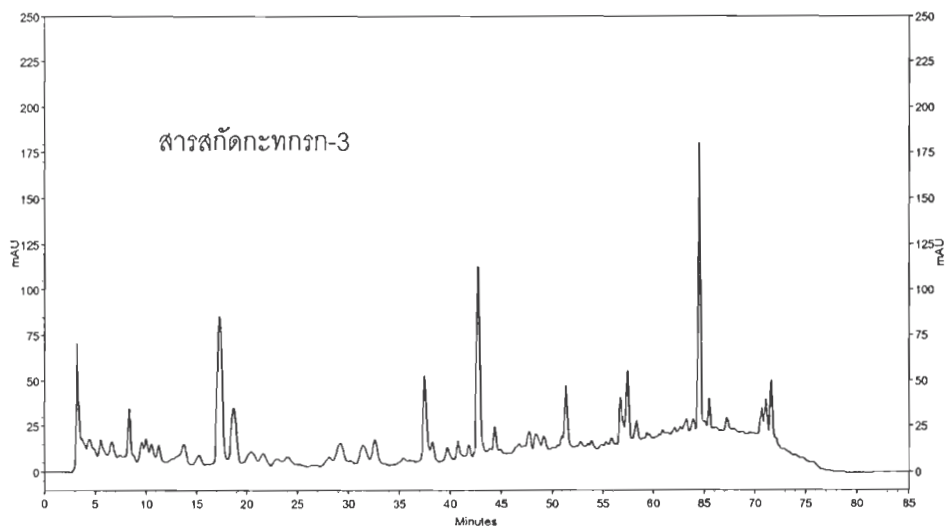
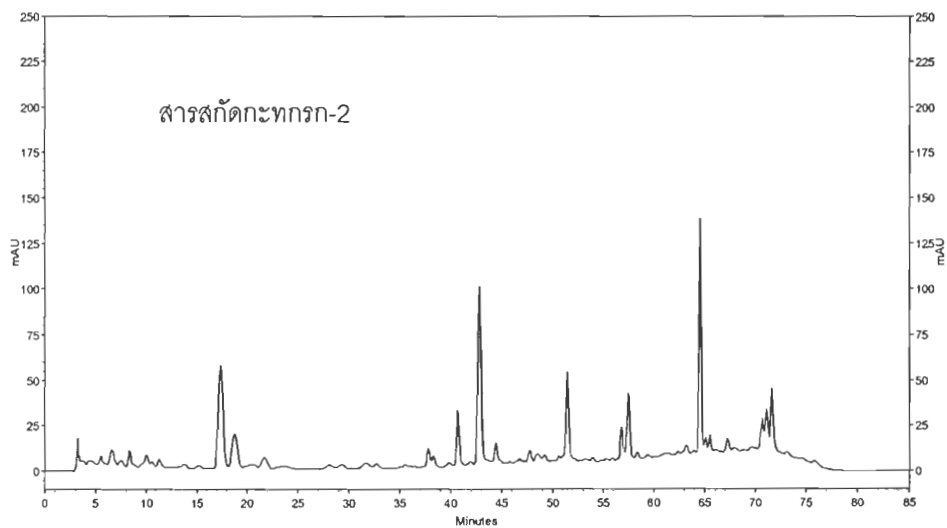
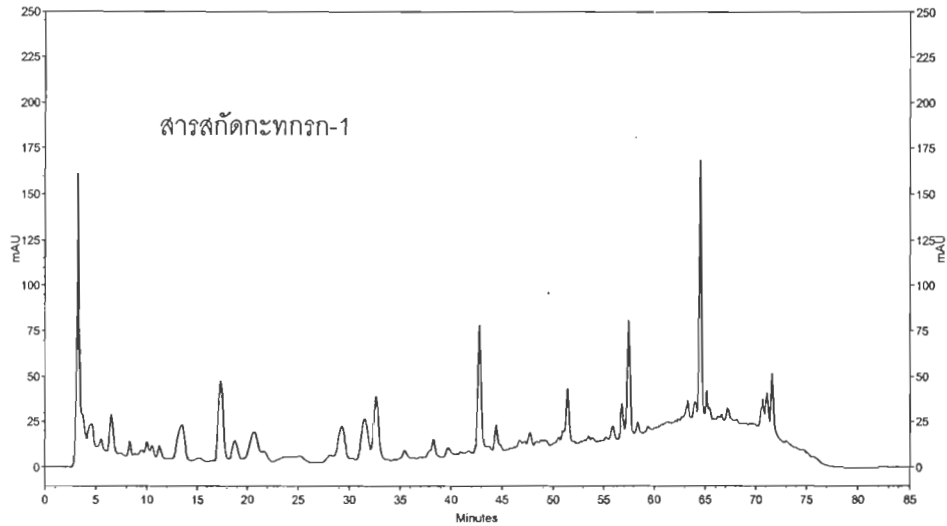
อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการยับยั้งการจับต่อตัวรับโดปามีนทั้งสองชนิด เป็นข้อมูลเพียงส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ ยังมีข้อมูลอีกหลายส่วน อาทิ ข้อมูลการถูกดูดซึมเข้าร่างกาย ข้อมูลเมแทบอลิซึมของสารที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ในสัตว์ทดลองหรือผู้ใช้ การบ่งชี้พีคที่เป็นสารเครื่องหมายทางชีวภาพดังแสดงข้างต้น จึงเป็นการบ่งชี้เบื้องต้น

ตารางที่ 7-5 ความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน 1 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของสารสกัดกะทกรกที่สกัดต่างครั้งกัน แต่ใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน

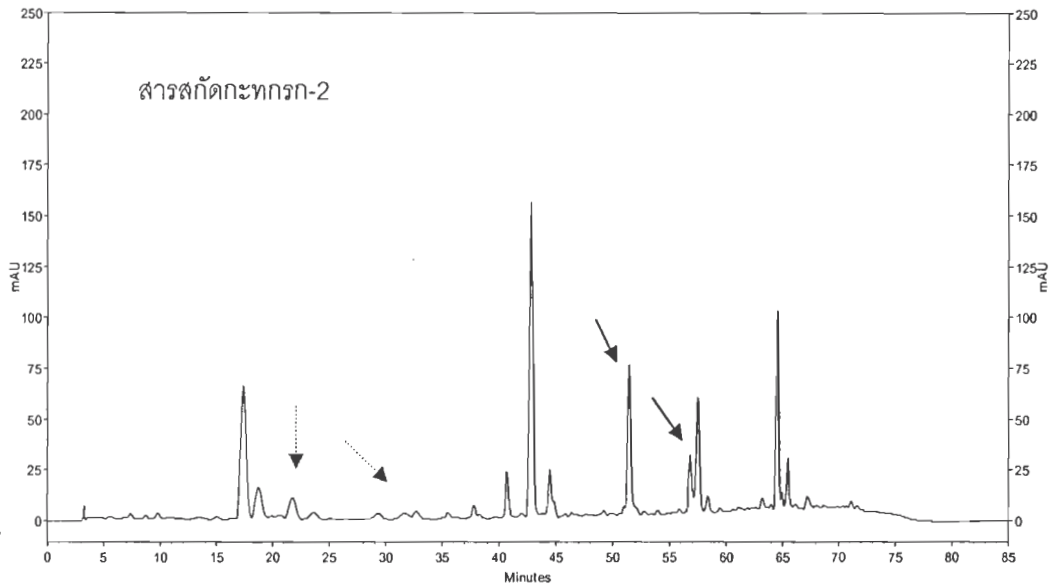
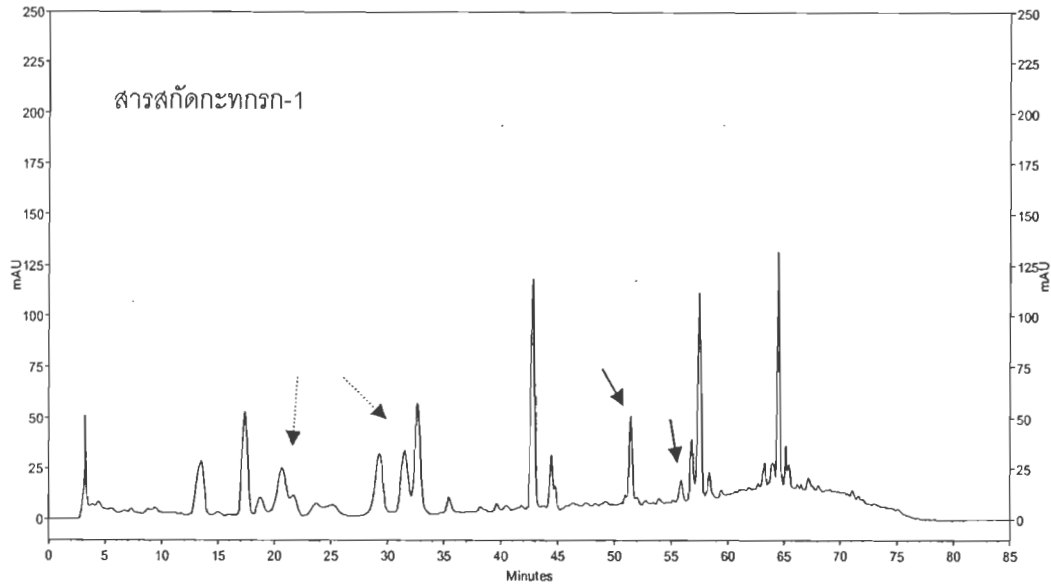
| สารตัวอย่าง | ความเข้มข้น (mg/ml) | % การยับยั้ง ตัวรับโดปามีน 1 (Mean \pm SEM) |
|------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|
| สารสกัดกะทกรก -1 | 100 | 16.48 \pm 1.51 |
| สารสกัดกะทกรก -2 | 100 | 28.21 \pm 2.70 |
| สารสกัดกะทกรก -3 | 100 | 26.20 |

ตารางที่ 7-6 พีคบนโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย photodiode array HPLC ที่ 320 nm ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการจับต่อตัวรับโดปามีน 1 (\checkmark หมายถึง น่าจะเกี่ยวข้อง, \times หมายถึง ไม่น่าจะเกี่ยวข้อง)

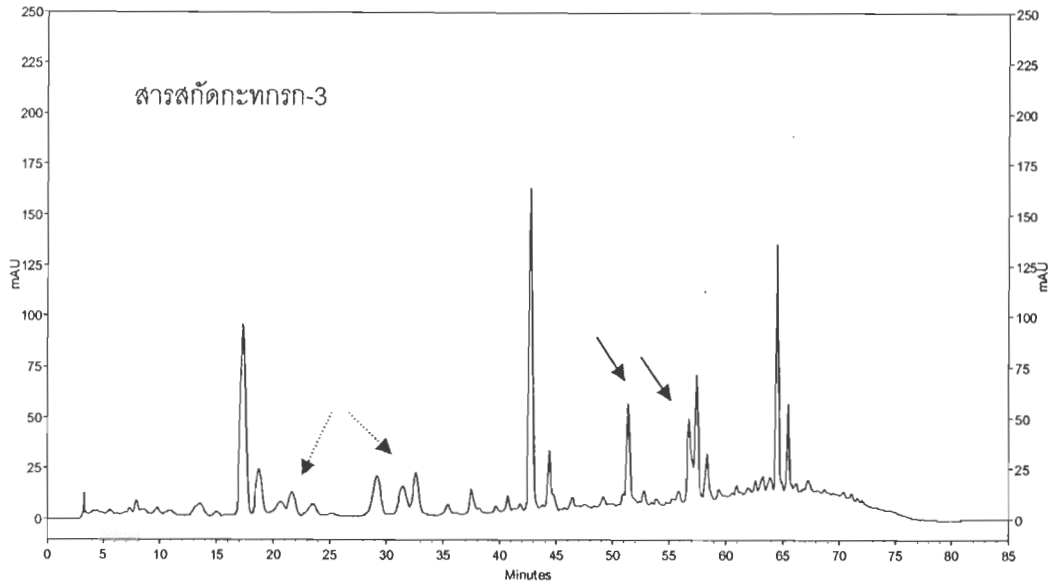
| บริเวณโครมาโตแกรม | ความสัมพันธ์กับ ความสามารถในการยับยั้ง การจับต่อตัวรับโดปามีน 1 | โครงสร้างของสารที่คาดว่า เป็นไปได้ |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. กลุ่มพีคบริเวณ 28-33 นาที | \times | Vitexin |
| 2. พีคที่ 51-52 นาที | \checkmark | Luteolin |
| 3. พีคเด่นที่บริเวณ 42-45 นาที | \times | |
| 4. พีคที่บริเวณ 17-22 นาที | \times | |
| 5. พีค 3 พีค ที่ 55-57 นาที | \checkmark / \times | Apigenin, chrysoeriol, acacetin |



รูปที่ 7 - 14 โครมาโตแกรมที่ 280 nm ของสารสกัดกะทกรกที่ได้จากการสกัดใหม่แต่ละครั้งโดยใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดกะทกรก - 1, สารสกัดกะทกรก - 2 , สารสกัดกะทกรก - 3 ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 6.85 mg/ml 5.53 mg/ml และ 5.00 mg/ml ตามลำดับ พีคที่เวลา 64 - 65 นาที ของโครมาโตแกรมทั้งหมด เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด



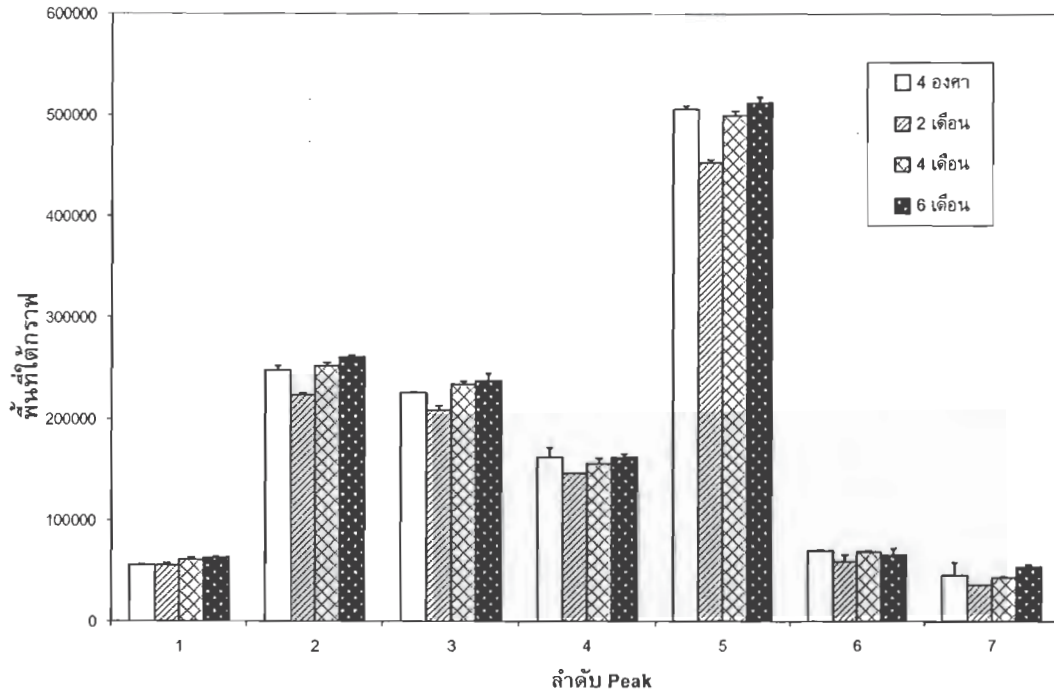
รูปที่ 7 - 15 โครมาโตแกรมที่ 320 nm ของสารสกัดกะทกรกที่ได้จากการสกัดใหม่แต่
 ละครั้งโดยใช้ตัวอย่างพืชตั้งต้นเดียวกัน ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดกะทกรก
 - 1, สารสกัดกะทกรก - 2 , สารสกัดกะทกรก - 3 ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 6.85
 mg/ml 5.53 mg/ml และ 5.00 mg/ml ตามลำดับ พีคที่เวลา 64 - 65 นาที ของโครมา
 โดแกรมทั้งหมด เป็นพีคของสารอ้างอิง chrysin ที่เติมลงในสารสกัด



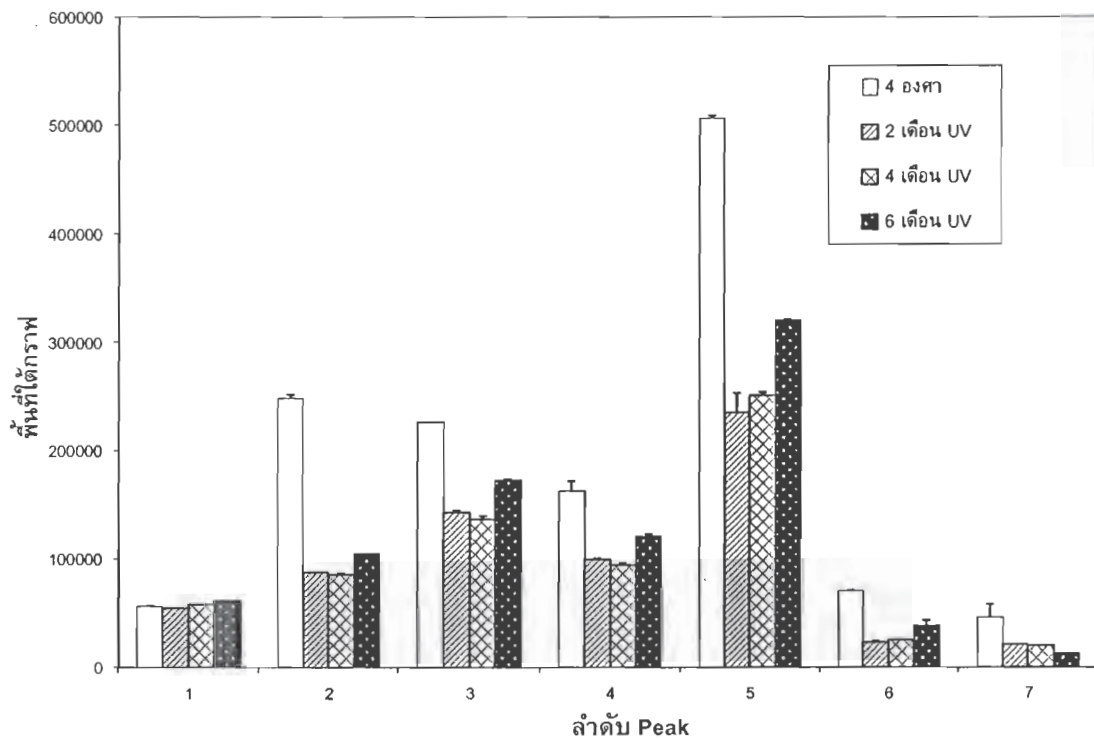
รูปที่ 15 (ต่อ)

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดกะทกรก

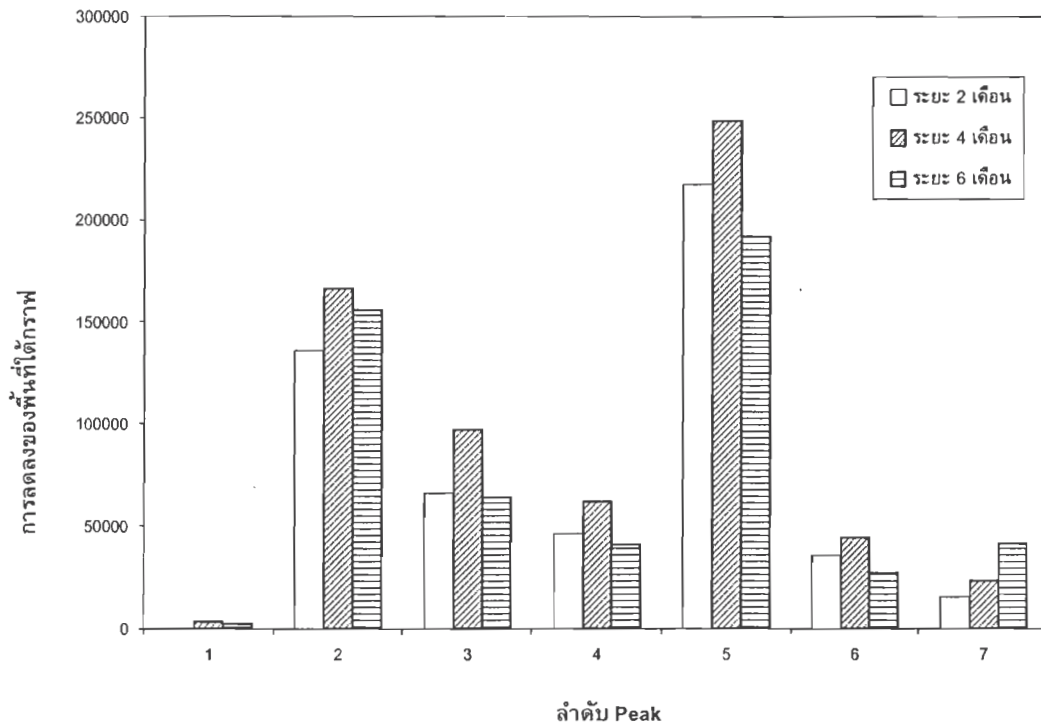
จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของโครมาโตแกรมของสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-34 °C กับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C เป็นระยะ 6 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเด่นชัดของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหลัก 7 พีค ซึ่งประกอบด้วยพีคที่เวลา 8, 17, 28, 32, 42, 44 และ 51 นาที (รูปที่ 7 - 16) แต่การเก็บตัวอย่างสารสกัดที่อุณหภูมิ 30-34 °C และสัมผัสแสงติดต่อกัน พบว่า พื้นที่ใต้กราฟของพีคส่วนใหญ่จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่เก็บรักษาที่ 4 °C ปราศจากแสง (รูปที่ 7 - 17) การลดลงนี้พบว่าน่าจะมาจากปัจจัยการสัมผัสแสง โดยมีการลดลงของพีคหลักทุกพีค เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลโครมาโตแกรมของสารสกัดที่สัมผัสแสงและไม่สัมผัสแสง ที่อุณหภูมิ 30-34 °C (รูปที่ 7 - 18) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการได้สัมผัสแสงนี้จะเปลี่ยนแปลงรวดเร็ว โดยสังเกตเห็นว่าพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีคไม่ลดต่อไปมากนักแม้ระยะเวลาในการสัมผัสแสงจะนานขึ้นจาก 2 เดือนเป็น 6 เดือน นอกจากนี้ เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการจับต่อตัวรับโดปามีน 1 ของสารสกัดที่เก็บรักษาที่สภาวะต่างกันในระยะเวลาดังกล่าว พบว่า สารสกัดที่ถูกแสงเป็นระยะเวลา 2 อาทิตย์ 6 เดือน หรือ 12 เดือน จะยับยั้งการจับกับตัวรับได้ลดลง 12-18% เมื่อเทียบกับความสามารถของสารสกัดที่ไม่ถูกแสงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นระยะเวลาเท่ากัน และสารสกัดที่ถูกแสงเหล่านั้น สามารถยับยั้งการจับต่อตัวรับได้ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7 - 7)



รูปที่ 7 - 16 พื้นที่ใต้กราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน



รูปที่ 7 - 17 พื้นที่ใต้กราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C และสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน



รูปที่ 7 - 18 การลดลงของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหลักที่พบ (280 nm) จากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C ปราศจากแสง เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคเดียวกันจากสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาไว้ที่ 30-34 °C และสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 เดือน

ตารางที่ 7-7 ความสามารถในการยับยั้งการจับตัวรับโดปามีน 1 ด้วยวิธี radioligand receptor binding assay ของสารสกัดกะทกรกที่เก็บรักษาที่ 30-34 °C ปราศจากแสง หรือสัมผัสแสง ultraviolet ที่มีความเข้มแสง 1.0056×10^{-3} วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเทียบกับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C ปราศจากแสง

| ระยะเวลา | % การลดลงของความสามารถในการยับยั้งการจับตัวรับเมื่อเทียบกับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C ปราศจากแสง | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| | สารสกัดที่เก็บในสภาวะปราศจากแสง | สารสกัดที่เก็บในสภาวะสัมผัสแสง UV |
| 2 สัปดาห์ | 36.5 | 54.5 |
| 6 เดือน | 18.0 | 30.3 |
| 12 เดือน | 31.5 | 47.5 |

การพัฒนายาเตรียมต้นแบบ

การพัฒนาตำรับยาน้ำ

คณะผู้วิจัยได้ทดลองเตรียมตำรับยาน้ำของสารสกัดกะทกรกเพื่อใช้ในการศึกษากับสัตว์ทดลอง และพบว่าสารสกัดกะทกรกสามารถละลายได้ดีพอสมควรใน polyethylene glycol 400 โดยมีค่าการละลายประมาณ 10-15 mg/mL ที่อุณหภูมิ 25 °C และได้ทดลองเตรียมสารละลายแขวนตะกอนของสารสกัดกะทกรกใน MC และ sodium CMC เพื่อใช้ในกรณีที่ต้องการเพิ่มขนาดยา พบว่า สารละลายแขวนตะกอนที่ได้จาก 0.8% sodium CMC และมีสารสกัดอยู่ 10 mg/mL จะมีลักษณะเป็นสารเนื้อเดียวกัน ขณะที่สารละลายแขวนตะกอนที่เตรียมด้วย MC ที่ความเข้มข้นของสารแขวนตะกอนและสารสกัดกะทกรกใกล้เคียงกัน จะมีตะกอนของสารสกัดมากกว่า ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกที่จะศึกษาการเตรียมสารละลายแขวนตะกอนของสารสกัดกะทกรกใน sodium CMC ต่อไป เพื่อปรับปรุงสัดส่วนของสารแขวนตะกอนให้เหมาะสมกับปริมาณสารสกัดที่อาจเพิ่มในตำรับ

การพัฒนาตำรับยาเม็ดแข็ง

ด้วยสารสกัดกะทกรกไม่ละลายน้ำ และละลายได้น้อยในสารละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำที่มีสัดส่วนน้ำมากกว่า 20% การพัฒนาตำรับยาเม็ดจึงเป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการศึกษาด้านแบบผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้ทางคลินิก สารสกัดกะทกรกมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และข้นเหนียว การทำให้สารสกัดมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมกับการดอกอัดเป็นยาเม็ด จึงได้ผสมสารสกัดหยาบกับ carrier ที่นิยมใช้ทางเภสัชภัณฑ์ โดยในการทดลองครั้งแรกพบว่า สารสกัดเมื่อผสมกับ Aerosil ในสัดส่วน 1:7 แล้ว ยังมีลักษณะเป็นสารเหนียว Aerosil จึงอาจไม่ใช่ carrier ที่เหมาะสม ส่วนผงที่ได้จากการผสมกับ MgO ในสัดส่วน 1:7 เป็นผงที่มีลักษณะร่วนไม่ติดโกร่ง แต่ผงดังกล่าวอาจยังไม่เหมาะสมกับการดอกอัด เมื่อปรับเติม lactose เป็น carrier ร่วมกับ Aerosil ที่สัดส่วน 1:20:1 (สารสกัดหยาบ: lactose: Aerosil) พบว่า ให้ผงที่มีลักษณะร่วนไม่ติดโกร่ง แต่ไม่สามารถดอกอัดเป็นเม็ดได้ ในการทดลองต่อมาจึงได้เพิ่มสารที่อาจเป็น carrier มากขึ้นในสัดส่วนต่าง ๆ และผสมกับสารสกัดซึ่งละลายในเอทานอล (ประมาณ 0.1 g/ml) ในโกร่ง (แบบที่ 1) หรือผสมกับสารละลายของสารสกัดที่ละลายโดยการเขย่าผงยาในภาชนะปิด (แบบที่ 2) สูตรตำรับที่ได้ทดลองทั้งหมดตั้งแสดงในตารางที่ 7 - 8 สูตรทั้งหมดจะมีปริมาณสารสกัดประมาณ 50 mg/น้ำหนักเม็ดยา 250 mg ผงยาที่ผสมแล้วจะถูกนำไปประเมินคุณสมบัติทางกายภาพด้านการไหลของผงยาความสามารถในการเกาะตัว และความแข็งของเม็ดยา รวมถึงข้อสังเกตต่าง ๆ ด้วยตาเปล่า ผลการประเมินสูตรตำรับทั้ง 8 ได้แสดงในตารางที่ 7 - 9

จากสูตรตำรับที่ทดลองมีเพียงสูตรตำรับที่มี hydroxypropyl cellulose และ Starch 1500 ที่สามารถให้ผงยาที่เกาะตัวได้ดี ดอกอัดเป็นเม็ดที่วัดความแข็งด้วยเครื่อง hardness

tester ได้ อย่างไรก็ตาม การไหลของผงยา ยังคงต้องปรับปรุงด้วยการเติมสารช่วยไหล (glidant) ภายหลัง และเม็ดยาที่ได้จะต้องนำมาศึกษาการแตกตัวต่อไป

ตารางที่ 7 - 8 ปริมาณของส่วนประกอบต่างๆในสูตรตำรับยาเม็ดกะทกรก

| สาร / วิธีเตรียม | ปริมาณ (g) | | | | | | | |
|---------------------|-------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Rx1 | Rx2 | Rx3 | Rx4 | Rx5 | Rx6 | Rx7 | Rx8 |
| วิธีเตรียม | แบบ 1 | แบบ 1 | แบบ 1* | แบบ 2 | แบบ 2 | แบบ 2 | แบบ 2 | แบบ 1 |
| สารสกัดกะทกรก | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Starch 1500 | 10 | 10 | 10 | 19 | 17 | 16 | 17 | 19.4 |
| Avicel PH102 | | | | | 3 | 3 | | |
| PVP K90 | | | | 1 | | 1 | 3 | |
| Aerosil 200 | | 0.15 | | | | | | |
| HPC (M) | | | | | | | | 0.6 |
| Total weight | 10.5 | 10.65 | 10.5 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |

หมายเหตุ แบบ 1 คือการผสมในโกร่ง ,แบบ 1* คือการผสมในโกร่งแล้วพรมน้ำลงบนผงยาเล็กน้อยแล้วอบที่ 40 °C และ แบบ 2 คือการผสมสารในกระป๋องยา

ตารางที่ 7 - 9 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับ

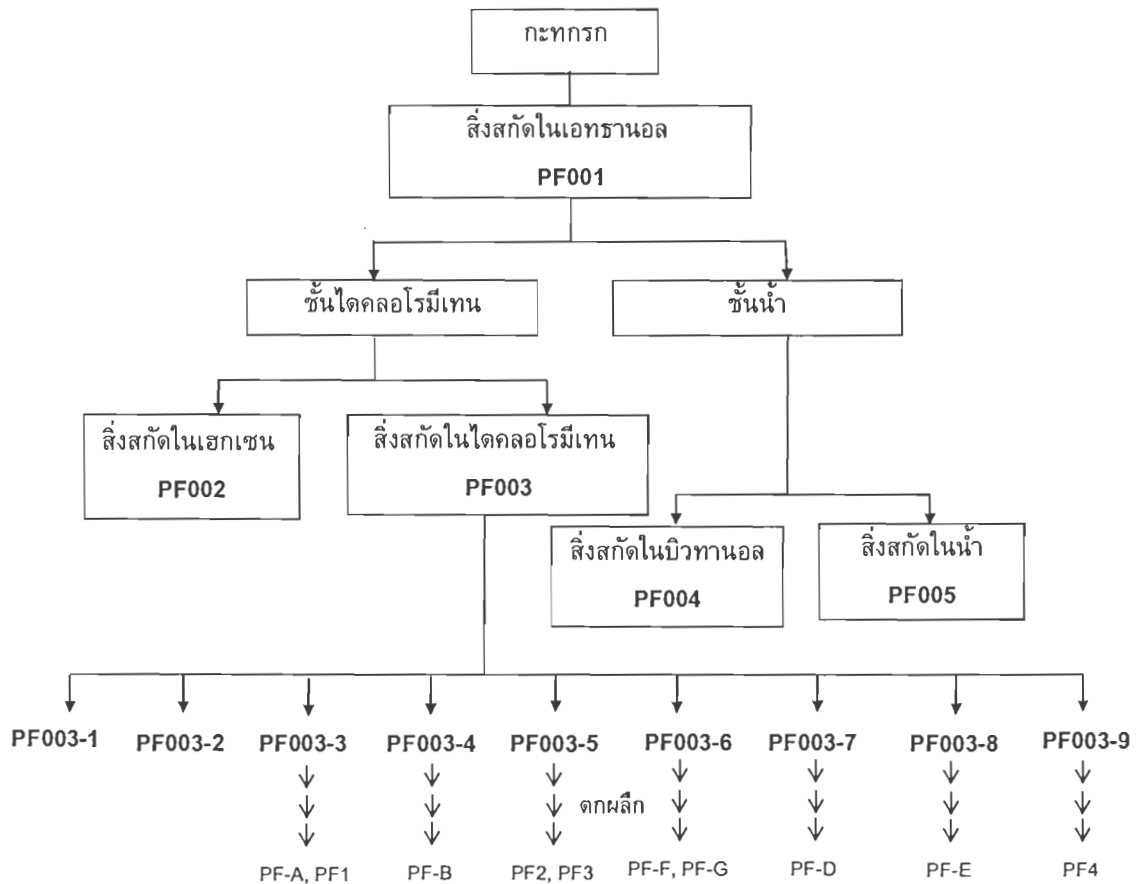
| ตำรับที่ | angle of repose (θ) | % compressibility | ความสามารถในการยัดเกาะ | ความแข็ง |
|----------|------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | ไม่ไหล | 29 | เกาะตัวที่แรงอัดสูง | วัดไม่ได้ |
| 2 | 27 | 28 | ไม่เกาะตัว | วัดไม่ได้ |
| 3 | ไม่ไหล | 30 | เกาะตัวที่แรงอัดสูง | วัดไม่ได้ |
| 4 | 18 | 28 | เกาะตัวที่แรงอัดสูงแต่ชอบยาที่มีความกร่อนสูงกร่อนทันทีหลังจากดอกเสร็จ | วัดไม่ได้ |
| 5 | มีส่วนที่ไม่ไหลผ่านกรวย | 38 | ที่แรงอัดสูงสุดเม็ดยาเกาะตัวได้อ่อนมาก กดแล้วแตก | วัดไม่ได้ |
| 6 | 24 | 34 | เกาะตัวที่แรงอัดสูงแต่ชอบยาที่มีความกร่อน | วัดไม่ได้ |
| 7 | มีส่วนที่ไม่ไหลผ่านกรวย | 28 | ไม่ค่อยเกาะตัว | วัดไม่ได้ |
| 8 | มีส่วนที่ไม่ไหลผ่านกรวย | 19 | เกาะตัวได้ดี | 2.4Kpa |

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรและผลิตภัณฑ์

โครงการวิจัยนี้ เป็นส่วนงานที่สนับสนุนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การประเมินคุณภาพ และความคงตัว ตลอดจนการพัฒนาเตรียมต้นแบบของสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีน และสามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในแบบจำลองพฤติกรรมในสัตว์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะอาการของการติดสารกระตุ้นประสาท ซึ่งจากการทดสอบตัวอย่างพืช 52 ชนิด ตัวอย่างพืชกระทกรกเป็นตัวอย่างเดียวที่แสดงศักยภาพ ในระยะแรก มีการทดสอบสิ่งสกัดกระทกรกที่แยกจากชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ หรือ fractions ดังแผนภูมิที่แสดงข้างล่างนี้

แผนภูมิแสดงสิ่งสกัดและสารที่ตกผลึกได้จากขั้นตอนการสกัดใบกระทกรก



ต่อมาเมื่อชุดโครงการได้พิจารณาผลทางชีวภาพร่วมกับต้นทุนการสกัดแล้ว สิ่งสกัดในขั้นตอนที่ 3 ในชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (PF003) เป็นสิ่งสกัดเดียวที่ชุดโครงการได้มอบหมายให้โครงการนี้ศึกษาต่อเนื่องเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์

การศึกษาโครมาโตแกรมด้วยวิธี HPLC เป็นกระบวนการเบื้องต้นที่ใช้ได้ผลดีกับงานศึกษาองค์ประกอบเพื่อควบคุมคุณภาพของสมุนไพร อีกทั้งเป็นวิธีการที่สามารถต่อเชื่อมกับเทคนิค mass spectrometry เพื่อประกอบการวิเคราะห์โครงสร้างของสารองค์ประกอบในภายหลังได้ ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC โดยเฉพาะเพื่อบ่งชี้ชนิดและคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร มักจะพัฒนาให้แสดงจำนวนพีคมากที่สุด และมีระยะเวลาการวิเคราะห์ที่ไม่ยาวนานไป การปรับสภาวะการวิเคราะห์จึงมีการทดลองแปรค่าขององค์ประกอบหลายอย่าง ตั้งแต่ การเตรียมสารละลายก่อนการฉีด ชนิดคอลัมน์ที่ใช้ ตัวทำละลายที่จะใช้ในระบบเฟสเคลื่อนที่ อัตราการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนตัวทำละลาย อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ การเลือกความยาวคลื่นของแสงที่จะติดตามพีค ปริมาตรการฉีด ฯลฯ ส่วนในงานที่เกี่ยวข้องกับความคงตัว อาจปรับเปลี่ยนสภาวะที่ใช้สำหรับโครมาโตแกรมเพื่อบ่งชี้ชนิด ซึ่งมักเรียกว่า fingerprint chromatogram ให้เหมาะสมมากขึ้นสำหรับการติดตามพีคที่มีการเปลี่ยนแปลงและมีข้อมูลสนับสนุนความสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการศึกษาสารสกัดกะทกรกเพื่อให้ได้โครมาโตแกรมที่บ่งชี้สารองค์ประกอบ พบว่า สภาวะการวิเคราะห์ที่ให้ผลดีระดับหนึ่งคือ สภาวะที่ประกอบด้วย reverse-phase C18 คอลัมน์ มีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและสารละลาย 1% กรดอะซิติก โดยเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเมทานอล จาก 20% ถึง 75% ในเวลา 68 นาที คอลัมน์ถูกควบคุมอุณหภูมิที่ 45 °C อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm สภาวะดังกล่าวแสดงพีคหลักไม่น้อยกว่า 7 พีค แต่ละพีคมีค่า precision, repeatability และ interday precision ของ retention time สูงสุด 2.5% และมีค่า precision, repeatability และ interday precision ของ peak area ไม่เกิน 5% เป็นส่วนใหญ่ แปรปรวนสูงสุดที่ 10% พีคที่แสดงความแปรปรวนมากคือ พีคที่มีขนาดเล็กไม่ถึง 400,000 mAU-min และพีคที่อาจเป็นพีคเชิงซ้อน (complex peak) ซึ่งยังแยกจากกันไม่ได้ในสภาวะการวิเคราะห์ที่ใช้ อย่างไรก็ตาม การลดความแปรปรวนข้างต้น อาจทำได้โดยการเปลี่ยนความยาวคลื่นจาก 280 nm เป็น 320 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่สารฟลาโวนอยด์ดูดกลืนแสงได้มากกว่า และจากการนำโครมาโตแกรมมาวิเคราะห์ผลใหม่ พบว่าการติดตามที่ 320 nm จะให้ค่า precision, repeatability และ interday precision ของ retention time สูงสุด 2.4% และมีค่า precision, repeatability และ interday precision ของ peak area สูงสุด 5%

นอกจากนี้ ในการพยายามบ่งชี้พีคที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับคุณภาพของสารสกัดกะทกรก โครงการวิจัยนี้ได้เน้นที่การค้นหาพีคของสารฟลาโวนอยด์ที่มีรายงานการพบในพืชอื่นของสกุลกะทกรก โดยเบื้องต้นได้ใช้ค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ 260, 280 และ 370 nm ในการบ่งชี้พีคที่เป็นสารฟลาโวนอยด์ จากนั้นใช้วิธีการเปรียบเทียบ retention time ของสารฟลาโวนอยด์อ้างอิงที่มีในห้องตลาด ผลการศึกษาทำให้คาดว่า พีคที่ 29 นาทีหรือผลึก PF-E เป็นสารโครงสร้างคล้าย vitexin หรือ เป็น vitexin พีคที่ 51 นาทีหรือผลึก PF-D เป็นสารโครงสร้างคล้าย luteolin หรือเป็น luteolin ส่วนพีคที่ 56.9 นาที และพีคที่ 57.5 นาที เป็นพีคของ acacetin และ

chrysoeriol หรือผลึก PF3 และ PF2 ในรายละเอียดแผนภูมิแสดงสิ่งสกัดและสารที่ตกผลึกได้จากขั้นตอนการสกัดใบกะทกรก และมีงานยืนยันโครงสร้างทางเคมีจากโครงการย่อยที่ 1 ข้อสังเกตเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครมาโตแกรมในบริเวณ 55-57 นาทีพบว่า เป็นบริเวณที่มักปรากฏเป็นพีคเรียงกัน 3 พีค โดยพีคนำหน้านั้น มี retention time (ประมาณ 56.6 นาที) ซึ่งต่างจากสารฟลาโวนอยด์อ้างอิง apigenin ซึ่งมี retention time (ประมาณ 55.8 นาที) เพียง 1.4% ในการวิเคราะห์ต่างวัน อีกทั้ง acacetin เป็นสาร methoxylated form ของ apigenin คณะผู้วิจัยจึงคาดว่า พีคนำในบริเวณ 55 - 57 นาทีนั้น อาจเป็น apigenin

จากการศึกษารายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟลาโวนอยด์ จะพบการศึกษาฟลาโวนอยด์ apigenin, vitexin, luteolin เพื่อผลการใช้ด้านการเป็น antioxidant, การบำบัดอาการของกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด และต้านคลายกัวล (Erdogan, et al., 2007; Keyhanian and Stahl-Biskup, 2007; Paladini, et al. 2006) โครงการวิจัยจึงได้แยกสารองค์ประกอบออกด้วยวิธี semi-preparative HPLC และนำ fraction ย่อยที่แยกได้ พร้อมสารที่ตกผลึกได้จากโครงการย่อยที่ 1 ที่มีปริมาณมากพอ และสารฟลาโวนอยด์อ้างอิงบางชนิดมาทดสอบการจับกับตัวรับโดปามีน ผลการทดลองมีเพียงผลึกที่คาดว่า เป็น luteolin และสารอ้างอิง luteolin เท่านั้นที่แสดงความสามารถในการยับยั้งการจับกับตัวรับโดปามีนที่ชัดเจน ดังนั้น จึงอาจจะระบุว่าพีคที่ 51 นาที เป็นพีคของสารเครื่องหมายทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม การค้นหาพีคอื่นที่เป็นสารเครื่องหมายทางชีวภาพ จำเป็นต้องมีข้อมูลจากฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง และข้อมูลการการดูดซึมและเมแทบอลิซึมของสารองค์ประกอบแต่ละชนิดประกอบด้วยจึงจะสมบูรณ์ ดังนั้น การวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ อาจต้องดูในภาพรวมเช่น ینگการวิเคราะห์กลุ่มพีคที่เป็นสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เป็นต้น

ความคงตัวของสารสกัดกะทกรกและการพัฒนาต้นแบบยาเตรียม

การประเมินความคงตัวเบื้องต้นของสารสกัดกะทกรกทำโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครมาโตแกรมของสารสกัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30-34 °C เทียบกับสารสกัดที่เก็บรักษาที่ 4 °C ตลอดจนเปรียบเทียบการเก็บภายใต้สภาวะที่สัมผัสแสง และไม่สัมผัสแสง พบว่า สารสกัดอาจสลายตัวได้ในสภาวะที่สัมผัสแสง แต่ไม่พบพีคใหม่เกิดขึ้นในโครมาโตแกรม ดังนั้น จึงคาดว่า ความคงตัวของสารสกัดค่อนข้างดี และสามารถมีแนวทางแก้ปัญหาเพื่อการสลายตัวเนื่องจากแสงได้

การพัฒนาต้นแบบยาเตรียมของสารสกัดกะทกรกในรูปยาน้ำที่มีต้นทุนราคาที่เหมาะสม มีความเป็นไปได้ค่อนข้างน้อยเมื่อพิจารณาจากค่าการละลายของสารสกัดในตัวทำละลายที่ปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับสำหรับเภสัชภัณฑ์ โครงการวิจัยจึงได้เลือกศึกษาการเตรียมยาเม็ดอุปสรรคสำคัญคือการทำให้ผงยาเกาะตัวได้ดี จากการทดลอง องค์ประกอบที่มีความสำคัญที่ทำให้สูตรตำรับมีความเป็นไปได้คือ hydroxypropylcellulose และกระบวนการเตรียมผงยาในระดับนำร่องที่คาดว่าควรศึกษาต่อไปคือ กระบวนการ wet granulation เพื่อให้ได้ผงยาที่เกาะตัว หรือการ spray-dry เพื่อให้ผงยาที่เหมาะสมต่อการบรรจุในแคปซูล

บรรณานุกรม

- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Morgenni, F., Mazzi, G., and Vincieri, F. F. (2001). Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm. Sci.* 213:199 - 208.
- EMA. (1999). Working Part on Herbal Medicinal Products (HMPWP), Stability testing of HD, HDP, and HMP guidelines 25, p. 48.
- Erdogan, A., Most, A. K., Wienecke, B., Fehsecke, A., Leckband, C., Voss, R., Grebe, M. T., Tillmanns, H. Schaefer, C. A. and Kuhlmann, C. R. (2007). Apigenin-induced nitric oxide production involves calcium-activated potassium channels and is responsible for antiangiogenic effects. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1774-1781.
- Fairbairn, J. W., Liebmann, J. A., and Rowan, M. G. (1976). The stability of cannabis and its preparations on storage. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 1 - 7. [Abstract].
- Haynes, R. K. and Vonwiller, S. C. (1994). Extraction of artemisinin and artemisinic acid: preparation of artemether and new analogues. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: S23 - 6. [Abstract].
- Hefendehl, F. W. Requirements of the licensing authority of the Federal Republic of Germany concerning the stability testing of drug products, with special reference to phytopharmaceuticals. In W. Grimm (ed.), *Stability Testing of Drug Products: Scientific criteries, guidelines and official state requirements in Europe, Japan and USA.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1987, pp. 104 - 112.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedure Methodology, Nov. 1996 (ICH - Q2b).
- Keyhanian, S., and Stahl-Biskup, E. (2007). Phenolic constituents in dried flowers of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) and their in vitro antioxidative capacity. *Planta Med.* 73: 599 – 602.
- Mao, Y. P., Tao, X. L., and Lipsky, P. E. (2000). Analysis of the stability and degradation products of triptolide. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 3 - 12. [Abstract].
- Möller, H. Stability testing in relation to guidelines in the EC, Japan and USA- A recommendation. In W. Grimm and K. Krummen (eds.), *Stability Testing in the EC, Japan and the USA: Scientific and Regulatory Requirements.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1993, pp. 167-176.

Paladini, A. C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C. and Medina, J. H. (1999). Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 519 - 526.

Well, J. I. *Pharmaceutical Preformulation : The physicochemical properties of drug substances.* Ellis Horwood Limited, 1988. p. 23