

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสของสารอัลคาลอยด์จากรากระย่อม

พิมลวรรณ ทัญทุทพิจารณ์*, เฉลิม จันทรสม**,
วนิดา จันทรสม**, กรกนก อิงคินันท์***

บทคัดย่อ

กลไกหนึ่งในการรักษาโรคสมองเสื่อมคือการให้ยาต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส รากระยอมเป็นสมุนไพรนิยมใช้ในตำรับไทยที่เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงประสาท วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดจากรากระยอม จากรากแห้งสกัดด้วยเอทานอลได้เป็นสารสกัดหยาบ (RsC) และสกัดแยกสารตามกรรมวิธีการสกัดอัลคาลอยด์ได้เป็น crude alkaloid (RsA และ RsB) วิเคราะห์ด้วยวิธี Thin layer chromatography เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า RsA มี reserpine มากกว่า yohimbine และอัลคาลอยด์ต่างอ่อนอีก ๒ ชนิด RsB มีสาร yohimbine มากกว่าและอัลคาลอยด์อื่นอีก ๒ ชนิด สารสกัด RsC, RsA, RsB มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ cholinesterase ได้ โดยมีค่า IC_{50} ต่อเอนไซม์ butyrylcholinesterase เป็น 20.65 ± 0.81 , 10.74 ± 0.45 , 9.07 ± 0.48 มคก./มล. และ IC_{50} ต่อเอนไซม์ acetylcholinesterase เป็น 35.02 ± 0.76 , 28.22 ± 0.51 , 27.05 ± 0.64 มคก./มล. ตามลำดับ สาร yohimbine มีฤทธิ์ต้านเฉพาะเอนไซม์ butyrylcholinesterase ค่า IC_{50} เป็น 2.47 ± 0.46 มคก./มล. สารสกัดอัลคาลอยด์ที่มี yohimbine มากกว่าสารสกัดหยาบพบว่า มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ได้ดีกว่าเช่นกัน ดังนั้นการใช้รากระยอมในตำรับยาอายุวัฒนะโดยใช้สารสกัดอัลคาลอยด์ที่มี yohimbine จะมีส่วนช่วยเพิ่มสารสื่อประสาท acetylcholine ได้ดีขึ้น และน่าจะเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคสมองเสื่อมจากการขาดสารสื่อประสาทได้

คำสำคัญ: ระยอม, ฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

* สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** งานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

ปัจจุบันอุบัติการณ์โรคสมองเสื่อมพบได้สูงถึง ๑ : ๒๐ รายของประชากรโลกที่มีอายุเกิน ๖๕ ปี และในคนที่มียาอายุเกิน ๘๐ ปีจะมีอัตราสูงขึ้นถึง ๑ : ๔ ราย ซึ่งมีผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจโดยตรงและทางอ้อมทั้งระดับบุคคลและประเทศ ในการวิจัยค้นคว้ายาเพื่อรักษาภาวะโรคดังกล่าวพบว่าหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ที่ยอมรับในปัจจุบันและใช้ในการรักษาคือการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท acetylcholine ในสมอง เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ทำหน้าที่ hydrolyse สาร acetylcholine ทำให้ปริมาณสารสื่อประสาทลดลง อันเป็นสาเหตุหนึ่งของอาการความจำลดลงและโรคสมองเสื่อม^๑ ในสมองคนปกติพบว่ามีความเอนไซม์ AChE มากกว่า BuChE แต่ในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมพบปริมาณ BuChE เพิ่มขึ้นในขณะที่ AChE เท่าเดิมหรือลดลง^{๒, ๓} เมื่อพยาธิสภาพของโรคมากขึ้น ปริมาณ AChE ลดลงได้ถึงร้อยละ ๘๕ ในขณะที่ปริมาณ BuChE เพิ่มขึ้นโดยมีอัตราส่วน BuChE : AChE ในบริเวณ cortical ของสมองเปลี่ยนไปได้ตั้งแต่ ๐.๒ ถึง ๑๑ นอกจากนี้ยังพบปริมาณ BuChE เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มโปรตีน α -APP และโปรตีน β -amyloid ซึ่งเป็นโปรตีนไปทำลายเซลล์ประสาท ในหนูทดลองที่ทำให้ขาดเอนไซม์ AChE พบว่ามีเอนไซม์ BuChE ในเนื้อสมองมากขึ้น^๔ ในเซลล์เพาะเลี้ยง neuroblastoma พบว่าสารต้าน BuChE อย่างเฉพาะเจาะจงคือ cymserine สามารถลดการสร้างโปรตีน β -amyloid ได้ อีกทั้งเมื่อให้สาร cymserine ในหนูทดลองที่ทำให้ขาดเอนไซม์ ChE พบว่า ทำให้หนูมีความจำเรียนรู้ (cognitive performance) ได้ดีขึ้น^๕ การศึกษาขั้นคลินิกในการใช้ยา rivastigmine ซึ่งเป็นยาต้านเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการรักษาผู้ป่วยสมองเสื่อมพบว่าได้ผลการรักษาดี ยาที่มีคุณสมบัติต้าน acetylcholinesterase จึงเป็นหนึ่งในยาที่ใช้รักษาโรคดังกล่าวในระยะเริ่มแรกถึงปานกลาง ส่วนยาที่ต้าน butyrylcholinesterase ด้วยน่าจะเสริมฤทธิ์กัน^๖ ยาต้านเอนไซม์ดังกล่าวที่ต่างชนิดกันจะมีผลต่อระดับ cholinesterase ในน้ำไขสันหลัง และผลต่อการรักษาที่ต่างกัน^๗ ดังนั้นการวิจัยพัฒนาสารสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต้านเอนไซม์ ChE ทั้งสองชนิด เพื่อเสริมฤทธิ์การต้าน ChE จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยมากขึ้น

ประเทศไทย มีตำรายาแผนไทยหลายตำรับที่ระบุสรรพคุณเป็นยาบำรุง ยาอายุวัฒนะ ยาปลุกธาตุ ยาบำรุงสมอง ทำให้มีความจำดีแม้จะสูงอายุก็ตาม ระย้อมเป็นสมุนไพรชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kurz วงศ์ Apocynaceae ใช้ส่วนรากทำยา มีรสขมเมา สรรพคุณ แก้ปวดศีรษะเนื่องจากความดันโลหิตสูง แก้คลื่นไส้เนื่องจากดีและโลหิต ช่วยย่อยอาหาร ระบายประสาท อาการข้างเคียงที่พบได้แก่ หน้าแดง ตัวแดง แน่นจมูก และง่วงนอน อาการแทรกซ้อนจะน้อยลงถ้ารับประทานระย้อมให้เลื่องก่อนใช้ทำยา^{๘, ๙} ด้วยสำคัญเป็นสารกลุ่มอินโดลอัลคาลอยด์ประมาณ ๒๕ ชนิด เช่น อัลคาลอยด์ yohimbine มีผลระบบประสาทอัตโนมัติส่วนปลาย เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ และกระตุ้นให้หัวใจบีบตัวเร็วมากขึ้น^{๑๐} ลดการจับกลุ่มของเกล็ดเลือดในคนปกติ^{๑๑} ในต่างประเทศมีการจำหน่ายสารสกัด yohimbine ในรูปผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและในรูปสารบริสุทธิ์เป็นยารักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศของชาย^{๑๒} แต่ผลการเพิ่มความต้องการทางเพศยังไม่อาจสรุปได้เพราะขึ้นกับปัจจัยหลายประการในการทดลอง^{๑๓} เมื่อให้สาร yohimbine ขนาด ๐.๖๕ มก.ต่อน้ำหนักตัว ๑ กก. แก่คนปกติและผู้ป่วยโรคสมองเสื่อม พบว่าระดับสารนี้ในเลือดสัมพันธ์กับระดับสารในน้ำไขสันหลัง^{๑๔} แสดงว่าสาร yohimbine ถูกดูดซึมเข้าไขสันหลังได้ นอกจากนี้เมื่อทดลองให้ yohimbine แก่ผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมและคนปกติที่สูงอายุ พบว่าระดับ norepinephrine ในน้ำไขสันหลังเพิ่มขึ้นได้มากกว่าในคนปกติที่อายุน้อย ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมด้วย^{๑๕} อัลคาลอยด์จากรากระย้อมที่มีผลลดความดันโลหิตได้แก่ reserpine, recinnamine^{๑๖} และ yohimbine^{๑๗} เป็นต้น reserpine เคยใช้เป็นยาลดความดันโลหิตในยาแผนปัจจุบันชื่อการค้าคือ Serpasil พบว่าการใช้ยานี้ติดต่อกันเป็นเวลานานมีผลให้ผู้ป่วยซึมเศร้าและคิดฆ่าตัวตาย จึงยกเลิกการใช้ยานี้^{๑๘} ส่วนแพทย์แผนไทยได้กำหนดการใช้รากระย้อมเป็นยาที่ต้องควบคุมปริมาณการใช้ โดยให้ใช้รากแห้งได้ไม่เกิน ๕๐ มล.ต่อครั้งหรือ ๑๕๐ มก.ต่อวัน^{๑๙} มีตำรายาแผนไทยหลายตำรับที่ใส่ระย้อมเพื่อหวังผลช่วยให้ผู้ป่วยนอนหลับ เช่น ยาเขียวหอมและยาประสะเจตพังคีในตำรับยาสามัญประจำบ้าน ยาอายุวัฒนะชื่อลูกแปลกแม่ ยาหอมชื่ออวาโย ซึ่งเป็นยาหอมบำรุงหัวใจผสมรากระย้อมมีสรรพคุณลดความดันโลหิต เป็นต้น การศึกษาสรรพคุณอื่นของรากระย้อมที่นอกเหนือจากฤทธิ์กล่อมประสาทให้นอนหลับเช่น

ผลด้านเอนไซม์ cholinesterase ย่อมสร้างความมั่นใจในการใช้รากะย้อมในตำรับยาบำรุงประสาทในแง่เพิ่มสารสื่อกระแสประสาท เป็นประโยชน์ในการรักษาภาวะความจำเสื่อม ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ของรากะย้อมในหลอดทดลอง

วิธีการทดลอง

การตรวจสอบตัวอย่างพืช

นำรากะย้อมที่ได้ปลูกในประเทศไทย ตรวจสอบเอกลักษณ์ตามหลักเภสัชกรรมไทย พฤษศาสตร์อนุกรมวิธาน^{๒๐} และเทียบตัวอย่างกับตัวอย่างพิพิธภัณฑ์พืชที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช

การเตรียมสารสกัดจากรากะย้อม

ล้างและหั่นรากะย้อมเป็นชิ้นขนาดเล็ก อบแห้งที่ ๔๕ องศาเซลเซียส บดละเอียด ใช้ผงรากแห้ง ๒๐ กรัม สกัดด้วยเอทานอลปริมาตร ๑๐๐ มล.ในเครื่อง Soxhlet's apparatus ที่อุณหภูมิ ๗๐ องศาเซลเซียส นาน ๕ ชั่วโมง สกัด ๓ ครั้ง ระเหยสารละลายให้แห้งในเครื่องระเหยสารแบบลดความดันที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส และทำให้แห้งสนิทด้วยวิธี Freeze dried เก็บในตู้ดูดความชื้น ได้เป็นสารสกัดอย่างหยาบ การเตรียมสกัดอัลคาลอยด์โดยใช้ผงรากแห้ง ๒๐๐ กรัม สกัดด้วยวิธีแยกส่วนด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและน้ำในสภาพความเป็นกรดต่างที่ต่างกันตามกรรมวิธีการสกัดสารสกัดอัลคาลอยด์^{๒๑} กล่าวโดยย่อได้ดังนี้ ชั่งผงรากะย้อม เติม

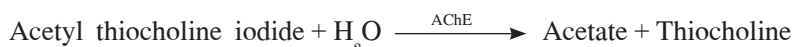
แอมโมเนียเข้มข้นเล็กน้อยผสมให้ทั่วพอชุ่มผงยา สกัดอัลคาลอยด์โดยเติมคลอโรฟอร์มให้ท่วมผงยา นำไป sonicate นาน ๑๕ นาที กรองแยกเอาส่วนสารละลายไประเหยจนแห้ง แล้วนำไปละลายในกรดเกลือเจือจาง ใส่ใน separatory funnel และสกัดแยกด้วยคลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มไประเหยแห้ง จะได้ “RsA” ซึ่งมีอัลคาลอยด์ที่เป็นด่างอ่อน ส่วนชั้นกรดที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มนำไปทำเป็นด่างโดยเติมแอมโมเนียเข้มข้นแล้วจึงสกัดด้วยคลอโรฟอร์มอีก นำชั้นคลอโรฟอร์มทำให้แห้ง จะได้ “RsB” ซึ่งมีอัลคาลอยด์ต่างแก่

การทำมาตรฐานสารสกัด

ตรวจสอบชนิดสารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography ตรวจสอบสารอัลคาลอยด์ด้วย Dragendoff's reagent เทียบกับสารมาตรฐาน reserpine และ yohimbine ปริมาณ ๐.๐๕ มก.

การทดสอบฤทธิ์ด้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase

ใช้วิธีการทดสอบตามหลักการของ Ellman ๑๙๖๑^{๒๒} หลักการโดยย่อ คือ สาร Acetyl thiocholine iodide เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ โดยมีเอนไซม์ acetylcholinesterase จะได้เป็นสาร Thiocholine สารนี้ทำปฏิกิริยากับ Dithiobisnitrobenzoate ได้สารสีเหลือง ซึ่งตรวจวัดได้ด้วย เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น ๔๐๕ นาโนเมตร



ความเข้มข้นของสีจะแปรผกผันกับปริมาณสารต้านเอนไซม์ในสารสกัดจากพืช การทดสอบเอนไซม์ butyrylcholinesterase ก็ทำเช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนชนิดเอนไซม์และชนิดสารตั้งต้นปฏิกิริยา วิธีการทดลองใช้ภาชนะทดลองขนาด ๙๖ หลุม และคำนวณผลตามวิธี Ingkaninun ๒๐๐๑^{๒๓, ๒๔} โดยอ่านผลปฏิกิริยาทันทีด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น ๔๐๕ นาโนเมตร ทุกๆ ๕ วินาที ในเวลา ๒ นาที ผลที่ได้เป็นค่าร้อยละ

ของ enzyme activity และคำนวณร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) โดย % inhibition = 100 - enzyme activity สารทดสอบที่มีค่า % inhibition มากกว่าร้อยละ ๗๐ ที่ความเข้มข้นสารสกัด ๐.๑ มก./มล. จึงหาค่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ร้อยละ ๕๐ (IC₅₀) โดยเจือจางความเข้มข้นสารสกัดตามลำดับ และทดสอบปฏิกิริยาเอนไซม์เช่นเดียวกัน ทำการทดลองจำนวน ๓ ซ้ำ

(3 independence experiment) ทั้งนี้ในทุกการทดลองใช้ cholinesterase inhibitor คือสาร galantamine เป็น Positivecontrol

การคิดสถิติ

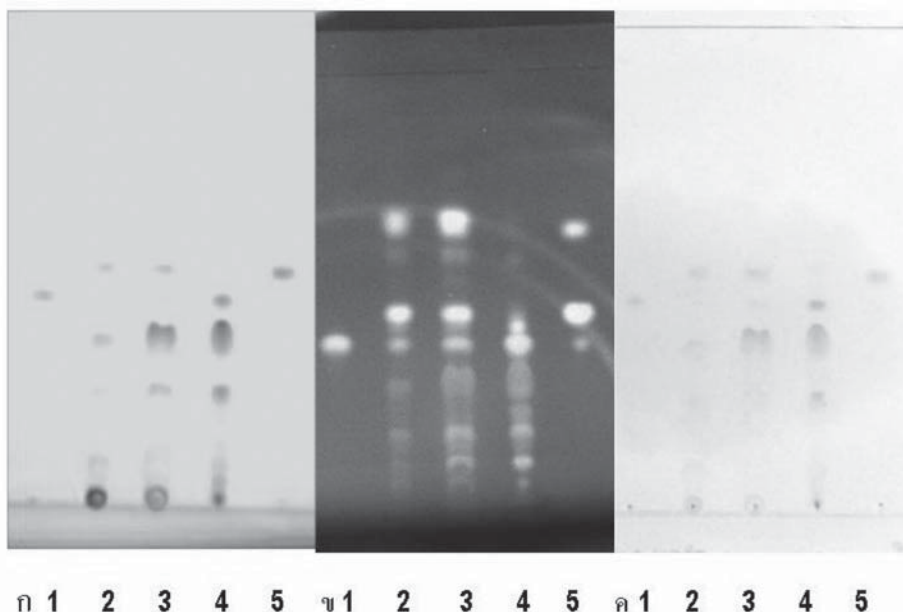
คำนวณค่าเฉลี่ยของ independence experiment นำเสนอเป็นค่า means $\pm$ SEM

ผลการทดลอง

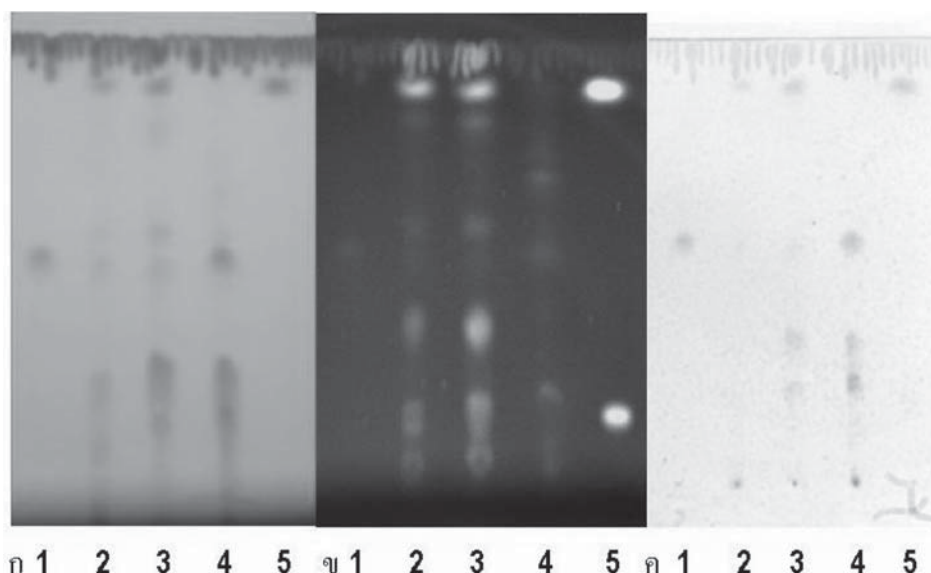
รากระย่อมเก็บจากจังหวัดราชบุรี ในเดือนมีนาคม ๒๕๕๓ ตัวอย่างรากแห้งและพืชพันธุ์พืช เก็บไว้ที่สาขาแพทย์แผนไทยประยุกต์ specimen number PT 65 และตัวอย่างสดต้นระย่อมได้จัดปลูกไว้ที่สวนสมุนไพรของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ การตรวจสอบลักษณะตัวอย่างระย่อมจำแนกได้ว่าเป็น *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kruz และเทียบกับตัวอย่างพืชพันธุ์พืชที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืชได้ตรงกับตัวอย่างที่ BKF 12222 และ BKF 26310

การสกัดสารได้สารสกัดอย่างหยาบ (crude extract of *Rauvolfia serpentina*, RsC) ๕๐๐ มก. คิดเป็นผลผลิตร้อยละ (% yield) เป็น ๒.๕ และสกัดแยกสารอัลคาลอยด์ที่เป็นด่างอ่อนส่วนที่ ๑ คือ RsA

๓๔๕ มก. (% yield เป็น ๐.๑๓๓) จากการตรวจสอบด้วยลายพิมพ์ TLC เทียบกับสารมาตรฐานพบว่า มีอัลคาลอยด์ reserpine เป็นสารหลักและมี yohimbine และอัลคาลอยด์อื่นที่ไม่ทราบชนิดอีก ๒ ชนิด สารสกัดอัลคาลอยด์ส่วนที่ ๒ คือ RsB ๑๕๗ มก. (% yield เป็น ๐.๐๕๕) มี yohimbine เป็นสารหลักและอัลคาลอยด์อื่นที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีก ๒ ชนิด (รูปที่ ๑, ๒) ผลฤทธิ์ต้านเอนไซม์ของสารสกัดแต่ละส่วนที่ละลายในเอทานอลความเข้มข้นสาร ๐.๑ มก./มล. พบว่าสารสกัด RsC, RsA, RsB สามารถยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ได้มากกว่าร้อยละ ๗๐ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัด RsA, RsB มีผลต้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ดีเป็นร้อยละ ๘๗.๒๐ และร้อยละ ๕๐.๑๖ ตามลำดับ ทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัด RsC, RsA, RsB ได้ผลตามตาราง พิจารณาจากค่า IC_{50} เห็นได้ว่าสารสกัดรากระย่อมทุกส่วนได้ผลต้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ดีกว่าเอนไซม์ acetylcholinesterase และสารสกัดอัลคาลอยด์ที่มีสาร yohimbine ได้ผลดีกว่าสารสกัดหยาบ สารมาตรฐาน reserpine ไม่มีผลต้านเอนไซม์ดังกล่าว ส่วน yohimbine ด้านเฉพาะเอนไซม์ Butyrylcholinesterase ค่า IC_{50} เป็น ๒.๔๗ ± ๐.๔๖ มก./มล.



รูปที่ ๑ แสดงโครมาโตแกรมรกละขมิบบางของสารสกัดจากรากระย่อม ใช้ absorbent เป็น silica GF²⁵⁴ และ solvent system เป็น Toluene : EtOAc : Diethylamine ๒ : ๒ : ๑ ตรวจตำแหน่งสารด้วยแสงยูวี ๒๕๔ นาโนเมตร (ก) ๓๖๕ นาโนเมตร (ข) และพ่นน้ำยา Dragendoff (ค); ๑ = Yohimbine ค่า $rf = ๐.๔๑๕$, ๒ = RsC, ๓ = RsA, ๔ = RsB, ๕ = Reserpine ค่า $rf = ๐.๔๘๗$



รูปที่ ๒ แสดงโครมาโตแกรมรกลเลขผิวบางของสารสกัดจากรากกระเทียม ใช้ absorbent เป็น silica GF₂₅₄ และ solvent system เป็น EtOAc : Methanol : Water ๑๐ : ๑.๓๕ : ๑ ตรวจตำแหน่งสารด้วยแสงยูวี ๒๕๔ นาโนเมตร (ก) ๒๖๕ นาโนเมตร (ข) และพ่นน้ำยา Dragendoff (ค); ๑ = Yohimbine ค่า rf = ๐.๕๔๕, ๒ = RsC, ๓ = RsA, ๔ = RsB, ๕ = Reserpine ค่า rf = ๐.๘๖๓

ตารางที่ ๑ แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งฤทธิ์ต้านเอนไซม์ Acetylcholinesterase และ Butyrylcholinesterase ของสารสกัดอย่างหยาบ (RsC) และสารสกัดอัลคาลอยด์ (RsA, RsB) จากรากกระเทียม และแสดงค่า IC₅₀ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน galantamine

สารสกัด	% yield	ผลต้าน AChE (means ± SEM)		ผลต้าน BuChE (means ± SEM)	
		% การยับยั้ง (๐.๑ มก./มล.)	IC ₅₀ (มกก./มล.)	% การยับยั้ง (๐.๑ มก./มล.)	IC ₅₀ (มกก./มล.)
RsC	๒.๕	๗๕.๗๘ ± ๑.๔๗	๓๕.๐๒ ± ๐.๗๖	๗๕.๐๒ ± ๑.๓๒	๒๐.๖๕ ± ๐.๘๑
RsA	๐.๑๗๓	๗๒.๓๓ ± ๐.๔๒	๒๘.๒๒ ± ๐.๕๑	๘๗.๒๐ ± ๐.๖๐	๑๐.๗๕ ± ๐.๔๘
RsB	๐.๐๕๕	๗๓.๓๓ ± ๐.๕๔	๒๗.๐๕ ± ๐.๖๕	๕๐.๑๖ ± ๐.๓๐	๕.๐๗ ± ๐.๔๕
reserpine		๒๓.๕๖ ± ๑.๖๗	-	๒๑.๓๐ ± ๑.๘๔	-
yohimbine		๓๔.๔๕ ± ๑.๒๔	-	๕๗.๔๗ ± ๐.๔๖	๒.๔๗ ± ๐.๔๖
Galantamine			๐.๒๑๗ ± ๐.๐๐๕		๑.๐๖ ± ๐.๐๐๕

สรุปและวิจารณ์ผล

สารสกัดอัลคาลอยด์ RsB มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ดีที่สุดมีค่า IC₅₀ = ๕.๐๗ มกก./มล. ซึ่งมีอัลคาลอยด์ yohimbine และอัลคาลอยด์อื่นที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีก ๒ ชนิด สารสกัดอัลคาลอยด์ RsA มีค่า IC₅₀ = ๑๐.๗๕ มกก./มล. ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือน RsB แต่มี reserpine เพิ่ม และ

สารสกัดหยาบมีค่า IC₅₀ = ๒๐.๖๕ มกก./มล. ซึ่งส่วนประกอบเหมือน RsA แต่ปริมาณอัลคาลอยด์น้อยกว่า เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ดังกล่าวของสารมาตรฐานพบว่าเฉพาะสาร yohimbine เท่านั้นที่มีผลต้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ และเป็นอัลคาลอยด์ที่มีปริมาณมากในส่วนสกัด RsB สำหรับฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดจากรากกระเทียมนั้นอาจเป็น

ผลของอัลคาลอยด์อื่นอีก ๒ ชนิดที่ไม่อาจระบุชนิดได้ เพราะทั้งสาร reserpine และ yohimbine ไม่มีฤทธิ์ด้านเอนไซม์นี้ ดังจะเห็นได้ว่าสารสกัด RsB มีฤทธิ์ด้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ดีกว่าเอนไซม์ acetylcholinesterase และตรงกับผลจากการทดลองของสาร yohimbine^{๒๖} ทำนองเดียวกับยาแผนปัจจุบันคือ rivastigmine ที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมขั้นต้นถึงปานกลาง^{๒๕} ที่มีผลเฉพาะเจาะจงด้านเอนไซม์ butyrylcholinesterase ได้ดี ดังกล่าวข้างต้นแล้วว่าสาร yohimbine สามารถดูดซึมน้ำเข้าไขสันหลังในผู้ป่วยสมองเสื่อมได้ ดังนั้นการใช้รากชะอมในรูปของสารสกัดอัลคาลอยด์ น่าจะได้รับด้วยยาสำคัญออกฤทธิ์มากกว่าการใช้สารสกัดหยาบหรือการใช้ผงยาที่ไม่สกัด อีกทั้งในสารสกัดอัลคาลอยด์ RsB ไม่มีอัลคาลอยด์ reserpine จึงเป็นการลดฤทธิ์ไม่พึงประสงค์หรืออาการซึมเศร้าจาก reserpine เมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานได้^{๒๗} นอกจากนี้การใช้สารสกัด RsB น่าจะให้ผลดีกว่าการใช้สารมาตรฐาน yohimbine เพราะในสารสกัดนี้ยังมีสารอัลคาลอยด์ชนิดอื่นที่มีผลด้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้อีกด้วย สำหรับขนาดรากชะอมที่แพทย์แผนไทยจำกัดปริมาณการใช้ผงยาแห้งได้ไม่เกิน ๑๕๐ มก.ต่อวันนั้น เมื่อคำนวณเป็นสารสกัด RsB ได้เท่ากับ ๐.๑๔๘ มก. ซึ่งมากกว่าค่า IC_{50} อยู่ถึง ๑๖ เท่า อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลเพิ่มความจำและการเรียนรู้ในสัตว์ทดลองและความปลอดภัยของสารสกัดในขนาดที่ใช้

ผลการวิจัยนี้สนับสนุนและสร้างความมั่นใจในการใช้รากชะอมในตำรับยาไทยเพื่อรักษาโรคสมองเสื่อม ที่สามารถนำไปประยุกต์พัฒนาสูตรตำรับยา หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้ป่วย หรือแม้แต่คนปกติที่ต้องการบำรุงสมองได้ ที่นับวันผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้จะมีมูลค่าการตลาดเพิ่มขึ้น และน่าพัฒนาใช้ในรูปแบบสารสกัดเพื่อให้ได้ด้วยยาออกฤทธิ์โดยตรงคือ yohimbine และลดผลข้างเคียงจากสารอื่นในรากชะอม

เอกสารอ้างอิง

๑. จุฑามณี สุทธิสีสังข์. ยารักษาโรคอัลไซเมอร์. ใน ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา. นงลักษณ์ สุวานิชย์ศิลป์ (บรรณาธิการ), คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; ๒๕๔๖. หน้า ๑๒๘-๑๓๒.
๒. Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, Lee B, Ingram DK, Lahiri DK. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin* 2001;17:159-65.
๓. Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:307-18.
๔. Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003;Sep18:[Suppl 1]:S1-5.
๕. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002;110:627-39.
๖. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17213-8.
๗. Onoe ML, Trevisiol M, Aguglia E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin Interv Aging* 2007;2:17-32.

๘. Darreh-Shori T, Soininen H. Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review of recent clinical studies. *Curr Alzheimer Res* 2010; 7:67-73. Review.
๙. กองการประกอบโรคศิลปะ, สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. ตำรับยาแผนโบราณ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย; ๒๕๔๑.
๑๐. กองการประกอบโรคศิลปะ, สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. ตำรับยาแผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรมไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย; ๒๕๔๕.
๑๑. Kucio C, Jonderko K, Piskorska D. Does yohimbine act as a slimming drug? *Isr J Med Sci* 1991;27:550-6.
๑๒. Berlin I, Crespo-Laumonier B, Cournot A, Landault C, Aubin F, Legrand JC, Puech AJ. The alpha 2-adrenergic receptor antagonist yohimbine inhibits epinephrine-induced platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49:362-9.
๑๓. Adeniyi AA, Brindley GS, Pryor JP, Ralph DJ. Yohimbine in the treatment of orgasmic dysfunction. *Asian Androl* 2007; 9:403-7.
๑๔. Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 2001;53:417-50.
๑๕. Le Corre PA, Peskind ER, Chevanne F, Raskind MA, Le Verge R. Cerebrospinal fluid and plasma disposition of yohimbine and 11-hydroxy-yohimbine in young and older healthy subjects, and Alzheimer's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;52:135-8.
๑๖. Peskind ER, Wingerson D, Murray S, Pascualy M, Dobie DJ, Le Corre P et al. Effects of Alzheimer's disease and normal aging on cerebrospinal fluid norepinephrine responses to yohimbine and clonidine. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52:774-82.
๑๗. Wilkins RW, Judson WE, Stone RW, Hollander W, Huckabee WE, Friedman IH. Reserpine in the treatment of hypertension; a note on the relative dosage and effects. *N Engl J Med* 1954;250:477-8.
๑๘. Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med* 1954;251:1006-8.
๑๙. Biaggioni I, Robertson RM, Robertson D. Manipulation of norepinephrine metabolism with yohimbine in the treatment of autonomic failure. *J Clin Pharmacol* 1994; 34:418-23.
๒๐. Santisuk T, Larsen K, editors. Flora of Thailand, Part 1. The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok. Royal Printing Co Ltd; 1999.
๒๑. ออมบุญ ล้วนรัตน์. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ๒๕๓๖. หน้า ๒๔-๖๘.
๒๒. Ellman, G.L., Lourtney, D.K., Andres, V., Gmelin G. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol* 1961;7:88-95.
๒๓. Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol* 2003;89:261-4.
๒๔. Ingkaninun K, Changvijit K, Suwanborirux K. Vobasiny-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J Pharm Pharmacol* 2006;58:847-52.

๒๕. Ballard CG. Advance in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. Eur Neurol 2002; 47:64-70.
๒๖. Orhan I, Naz Q, Kartal M, Tosun F, Sener B, Choudhary MI. In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. Z Naturforsch C 2007;62:684-8.

Abstract

Cholinesterase inhibitor from *Rauvolfia serpentina* alkaloids

Pimolvan Tappayuthpijarn*, Chalerm Jansom**, Vanida Jansom**, Kornkanok Ingkaninun***

* Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Research Center, Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Faculty of Pharmaceutical Science, Naresuan University

Cholinesterase inhibitors are used in the treatment of memory impairment diseases. *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth.ex.Kurz (RS) has been used as additional herb in some Thai traditional anti-rejuvenating and neurotonic remedies to potentiate hypnotic and tranquil effects. The aim of this study was to study the anticholinesterase activities of various crude extracts from RS root. Ethanolic extract (RsC) and two fractions of crude alkaloid extracts RsA and RsB were separated from dried root of the plant. By means of thin layer chromatography revealed that RsA was composed of reserpine as major alkaloid, yohimbine and other 2 weak-base alkaloids as minus alkaloids whereas RsB was mainly composed of yohimbine and traced with other two alkaloids. Enzyme inhibitory activity of both acetylcholinesterase (AChE) and human butyrylcholinesterase (BuChE) were performed on RsC, RsA, RsB and yohimbine by the method of Elman. The IC_{50} values of RsC, RsA, RsB on BuChE were 20.65 ± 0.81 , 10.79 ± 0.45 , 9.07 ± 0.48 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and on AChE were 35.02 ± 0.76 , 28.22 ± 0.51 , 27.05 ± 0.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectively. Yohimbine showed inhibitory effect only on BuChE with IC_{50} values of 2.47 ± 0.46 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. The results revealed that the crude alkaloid extracts containing yohimbine had more benefit effect than crude extract on increasing acetylcholine and this could be useful for neurodegenerative disease.

Key words: *Rauvolfia serpentina*, cholineesterase inhibitor