

ฤทธิ์ของยี่โถต่อระบบหัวใจ-หลอดเลือดและสารออกฤทธิ์สำคัญ การศึกษาเปรียบเทียบกับดิจิตาลิส

จงกล เทียงดาห์ และ วีณา ศิลปอาชา

ภาควิชาเภสัชวิทยาและภาควิชาเภสัชวิทยาจักษุ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

CARDIOVASCULAR ACTIONS AND ACTIVE CONSTITUENTS OF NERIUM OLEANDER L. : A COMPARATIVE STUDY WITH DIGITALIS

Chongkol Tiangda and Weena Silpa-archa

Departments of Pharmacology and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy
Mahidol University, Bangkok 10400

ABSTRACT

The chloroform extract of the leaf and the bark of *Nerium oleander* L. was tested for cardiac glycosides using Liebermann Burchard test, Kedde's reagent and Keller-Killiani's test which gave positive result indicating the existence of cardiac glycosides in the extract. Further identification of cardiac glycosides in the chloroform and alcohol extracts by thin layer chromatography using silica gel G and silica gel GF 254 (50:50) as adsorbent, ethyl acetate/methanol/H₂O (75/10/7) as solvent systems and 50% H₂SO₄ as sprayer showed many coloured spots, one of them had R_f value near reference cardiac glycoside, oleandrin.

The biological assay of cardiac glycosides in the leaf and the bark of *Nerium oleander* L. by guinea-pig method according to BP 1980 showed that total cardiac glycosides in term of oleandrin was 0.37 and 0.44 per cent, respectively. The potency of cardiac glycosides in the leaf as compared to digitalis was 0.95, and in the bark was 1.14 which suggested that cardiac glycosides in the bark of *Nerium oleander* L. were more potent than those in the leaf and in digitalis.

The action of cardiac glycosides in the leaf and in the bark of *Nerium oleander* L. on the right ventricular strip of guinea-pig in vitro

was similar to the action of digitalis, that is, they possessed cardiotoxic action at low doses, and toxic action was produced at high doses, as shown by contracture. The infusion of diluted alcoholic extract into the vein of guinea-pig *in vivo* produced similar changes in the electrocardiogram recorded in the animal.

ยี่โถ (*Nerium oleander* L.) เป็นพืชที่ปลูกกันแพร่หลายใช้เป็นไม้ประดับ ตามตำรับยาแพทย์แผนโบราณของไทย (1) มีข้อบ่งใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ ทำให้ชีพจรเต้นเร็วและดีขึ้น และหนังสือพรรณไม้ของฟิลิปปินส์ (2) ได้อ้างถึงงานของ Aymack, Warden และ Hooper ซึ่งกล่าวว่ายาชงจากผลยี่โถใช้เป็นยาขับปัสสาวะและบำรุงหัวใจแทน ดิจิตาลิส ได้ นอกจากนั้นยังปรากฏในตำรับยาของ เม็กซิกันและฝรั่งเศสด้วย ในอินเดียใช้ใบคั้นกลั่นเอาสารบวม (3) ในญี่ปุ่นใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ (4) มีผู้พบว่าในใบและเปลือกมีสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาคล้าย cardiac glycosides รวมทั้งอาการพิษที่เกิดจากการรับประทานใบยี่โถก็คล้ายคลึงกัน (5) cardiac glycosides สำคัญที่มีในใบยี่โถคือ oleandrin (folinerin) ซึ่งมีผู้นำมาทดลองใช้รักษาผู้ป่วยโรคหัวใจวาย (6,7) พบว่าได้ผลดี ผู้ป่วยทนต่อยาได้ดี ชีพจรเต้นช้าลงและปัสสาวะเพิ่มขึ้น ในประเทศไทยสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งมีความขาดแคลนถึงเจอรดิจิตาลิส นายแพทย์ เสนอ ตัณฑเศรษฐี แห่งวชิรพยาบาลได้ศึกษาผลการขับปัสสาวะของทิงเจอร์ใบยี่โถในผู้ป่วยชาย 2 ราย ที่ได้ออกเสมและมีการบวม พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (8) ซึ่งแสดงว่าอาจนำยี่โถมาใช้แทน ดิจิตาลิสได้ แต่การนำมาใช้ทางคลินิกจำเป็นต้องทราบปริมาณของ cardiac glycosides ที่มีในผงยาให้แน่นอน เพื่อจะได้จัดขนาดยาสำหรับผู้ป่วยให้ถูกต้อง และมีความปลอดภัยในการใช้ ถึงแม้ว่ามีผู้ทำการศึกษาเรื่องนี้อย่างแล้ว (9) แต่วิธีที่ใช้ในการหาปริมาณของ cardiac glycosides นั้นได้ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานไปบ้าง และใช้ยาชงของใบยี่โถชนิดกลีบดอกซ้อน (ซึ่งเป็น *Nerium indicum* Mill.) ดังนั้นการวิจัยที่จึงได้หาปริมาณของ cardiac glycosides ที่มีในใบและเปลือกยี่โถชนิดดอกสีแดง กลีบชั้นเดียว (*Nerium oleander* L.) ด้วยวิธีมาตรฐานของ BP 1980 (10) และเปรียบเทียบกับผงดิจิตาลิสมาตรฐาน พร้อมกับหาสารสำคัญที่มีในใบและเปลือกยี่โถชนิดนี้ และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาระหว่างยี่โถที่ปลูกในประเทศไทยกับดิจิตาลิส ในด้านการเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจและการเกิดพิษโดยใช้ right ventricular strip ของหนูตะเภา

วิธีการทดลอง

การวิจัยนี้ใช้ยี่โถชนิดดอกสีแดงกลีบชั้นเดียว อายุประมาณ 10 ปี ปลุกที่ประชาชน
กรุงเทพฯ ส่วนที่นำมาใช้ในการวิจัยคือใบและเปลือก ซึ่งอาจแบ่งงานวิจัยออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่
การแยกสกัดสารสำคัญ, การทดสอบทางพิษเคมี, การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดทางเภสัชวิทยา และ
การหาปริมาณ cardiac glycosides

1. การแยกสกัดสารสำคัญในใบและเปลือกยี่โถ

1.1 การสกัดใบและ เปลือกยี่โถด้วยน้ำและการทำเป็นน้ำสกัดแห้ง

นำใบและเปลือกมาอบให้แห้งที่ 55°C นาน 24 ชม. บดให้เป็นผง ซึ่งผงยา
บดมา 100 กรัม เติมน้ำครบนหนึ่งลิตร ตั้งบนหม้ออังไอน้ำนาน 2 ชม. คนเป็นครั้ง-
คราว แล้วตั้งทิ้งจนได้อุณหภูมิห้อง กรองผ่านผ้าขาวบาง และนำสารละลายที่กรองได้
ตั้งทิ้งในตู้เย็นค้างคืน เทส่วนที่ใสมารองผ่าน Bushner funnel ส่วนใสที่ได้นำมา
เข้าเครื่อง lyophilizer เพื่อได้น้ำออกจนแห้งเป็นผง ซึ่งจะได้ผงยาสกัดแห้งเก็บ
ไว้ใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เพื่อใช้ในการทดสอบทางเภสัชวิทยา
ต่อไป

1.2 การสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

1.2.1 สารสกัดคลอโรฟอร์ม สกัดใบและเปลือกยี่โถแห้งที่บดละเอียดแล้วด้วยคลอ-
โรฟอร์ม โดยการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่อง Soxhlet และนำไประเหย
จนแห้ง เพื่อใช้ทดสอบทางเคมีขั้นต้นด้วย phytochemical screening
และ thin-layer chromatography (TLC)

1.2.2 สารสกัดแอลกอฮอล์ สกัดด้วยแอลกอฮอล์ตามวิธีของ BP 1980 (10)
เก็บน้ำยาสกัดไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ cardiac
glycosides ต่อไป

2. การทดสอบทางเคมี

2.1 phytochemical screening

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญที่มีในใบและเปลือกยี่โถ โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี นำสารสกัดคลอโรฟอร์มจากข้อ 1.2.1 มาทำการทดสอบ steroidal moiety ด้วย Liebermann Burchard test ทดสอบ unsaturated lactone ring ด้วย Kedde's reagent และทดสอบ deoxysugar ด้วย Keller-Killiani's test

2.2 thin-layer chromatography (TLC) ของยี่โถ (ใบและเปลือกลำต้น)

นำสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบและ เปลือกลำต้นยี่โถ (ข้อ 1.2.1) และสารสกัดแอลกอฮอล์จากใบดิจิตาลิสและจากใบและ เปลือกลำต้นยี่โถ (ข้อ 1.2.2) มาตรวจสอบหาสารสำคัญด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบค่า Rf's value กับ oleandrin, digitoxin และ digoxin ซึ่งมีเงื่อนไขดังนี้ adsorbent : silica gel G และ silica gel GF₂₅₄ ในอัตราส่วนเท่ากัน ; solvent system : ethyl acetate/methanol/H₂O (75/10/7) ; detection : UV.

3. การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัด

ทดสอบฤทธิ์ cardiotonic action และ toxicity *in vitro* โดยใช้ right ventricular strip ของหนูตะเภา ขนาดประมาณ 2 x 5 มม. แช่เนื้อเยื่อในน้ำยา Tyrode ใน isolated organ bath ที่ 35°C ขนาด 20 มล. ซึ่งมี O₂ 95% และ CO₂ 5% ผ่านตลอดเวลา ให้ preload ประมาณ 0.5-0.75 กรัม และกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 5-8 โวลต์ ความถี่ 1 ครั้ง/วินาที duration 0.5 msec. รอจนกระทั่งได้ความแรงในการบีบตัวครั้งที่ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที แล้วกระตุ้นต่อไปอีกระยะหนึ่งประมาณ 1-1.5 ชม. ซึ่งจะทำให้ความแรงในการบีบตัวลดลงประมาณ 40-50% เพื่อให้หัวใจอยู่ในภาวะ failure ก่อน แล้วจึงดำเนินการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบและเปลือกยี่โถจากข้อ 1.1 เปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบดิจิตาลิส โดยนำผงยาสกัดแห้งมาละลายในน้ำกลั่นก่อนให้ได้ความเข้มข้น 5 มก./มล. หยคน้ำยาครั้งแรกในขนาด 0.1 มล. รอจนเห็นผลคงที่ แล้วจึงเพิ่มขนาดของยาครั้งละ 0.1 มล. จนกระทั่งได้ผลสูงสุด

4. การหาปริมาณ cardiac glycosides

นำสารสกัดแอลกอฮอล์ จากข้อ 1.2.2 มาทำให้เจือจางด้วย normal saline 1:7 ซึ่งจะเหลือความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ไม่เกิน 10% และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ cardiac glycosides โดยใช้ guinea-pig method ตาม BP 1980 (10) โดยใช้ digitalis powder DAB 8 ซึ่งมี digitoxin 8.38 มก./ก. และ oleandrin เป็น reference standard วัด EKG Lead II และบันทึกผลด้วยเครื่อง Dynograph (Beckman, Type R 411) ให้น้ำยาสกัดทาง external jugular vein ด้วยอัตราคงที่สม่ำเสมอ 0.2 มล./นาที่ โดยใช้เครื่อง perfusion pump (Sage Instruments, Model 351) จนกระทั่งหัวใจหยุดเต้น (EKG เป็นเส้นตรง) อ่านปริมาตรน้ำยาสกัดที่ใช้คำนวณเป็น มล./กก. ของน้ำหนักหนูตะเภา ซึ่งถือเป็น lethal dose คำนวณหาค่า potency ratio ของ unknown/standard และ fiducial limit ตาม BP 1980, Appendix XIV O (หน้า A 160 - A 161)

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกสกัดสารสำคัญ

ผลการเตรียมน้ำสกัดแห้งจากใบและเปลือกยี่โถ และจากใบดิจิตาลิส

การสกัดใบและเปลือกยี่โถด้วยน้ำแล้วนำมาระเหยแห้งโดยวิธี lyophilization ปรากฏว่าจากผงใบยี่โถ, ผงเปลือกยี่โถ และผงดิจิตาลิสมาตรฐาน 1 กรัม ได้ผงสกัดแห้ง 0.527, 0.162 และ 0.090 กรัม ตามลำดับ

2. ผลการทดสอบทางเคมี

2.1 phytochemical screening จากสารสกัดคลอโรฟอร์มของใบและเปลือกยี่โถ

การทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีพบว่า Liebermann Burchard test ได้สีม่วง Kedde's reagent ได้สีม่วงแดง และ Keller-Killiani's test ได้วงแหวนสีแดงตรงรอยต่อระหว่างชั้นและสารละลายชั้นบนมีสีเขียว ซึ่งเป็นผลบวกทั้ง-

หมด แสดงว่ามีsteroidal moiety, unsaturated lactone ring และ deoxy-sugar เป็นส่วนประกอบของสารสกัดในใบและเปลือกยี่โถ

2.2 thin-layer chromatography

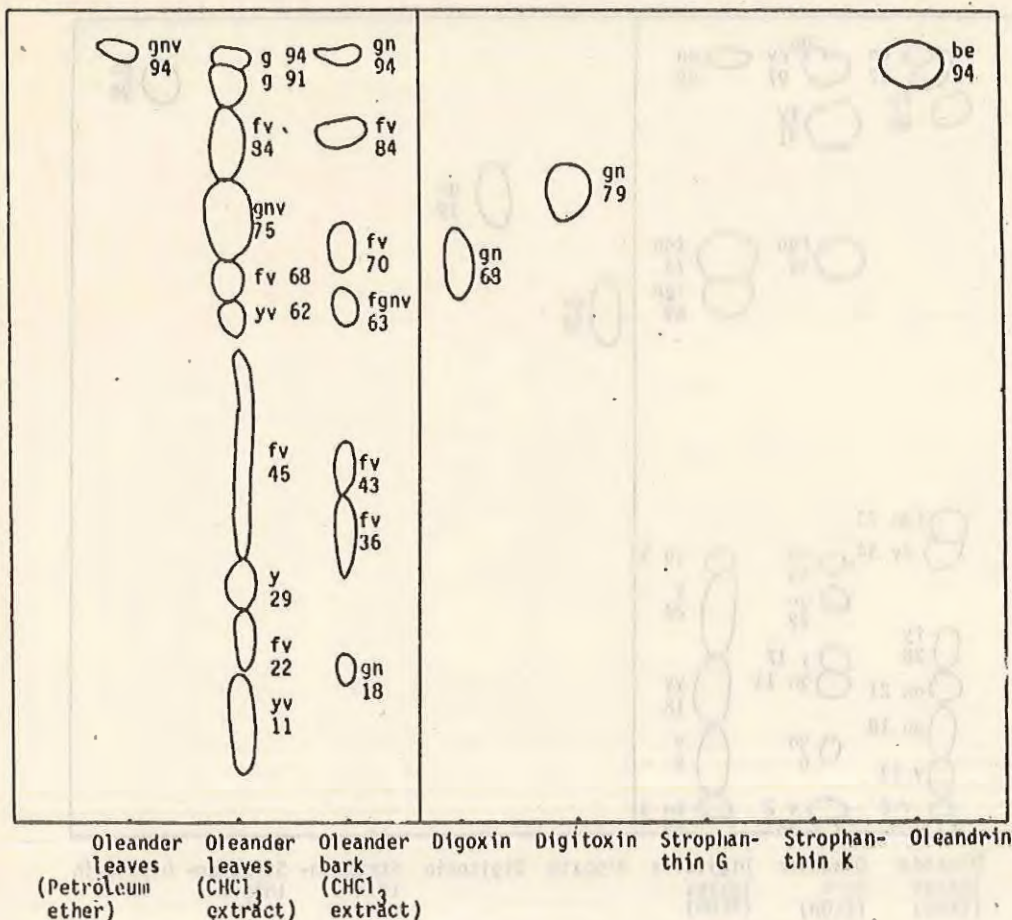
หลังจากพ่น chromatogram ของสารสกัดคลอโรฟอร์มและแอลกอฮอล์จากใบและเปลือกยี่โถด้วย 50% H_2SO_4 ในเมทานอล พบว่ามีจุดสีต่างๆ และได้ค่า R_f ดังปรากฏในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัด

ผลการทดสอบ cardiotonic action

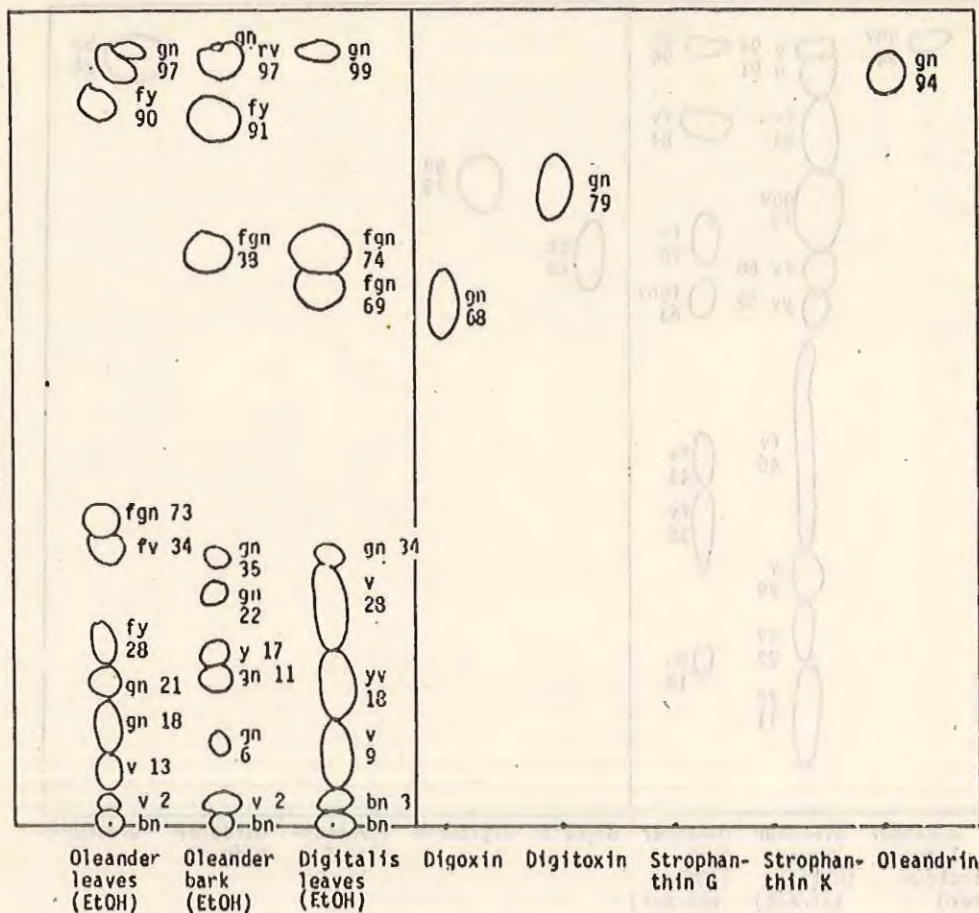
เมื่อหยดสารสกัดจากใบและเปลือกยี่โถลงใน isolated organ bath และวัดความแรงในการบีบตัวที่เวลา 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที พบว่ามีฤทธิ์เพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจ โดยออกฤทธิ์ได้เร็วหลังได้รับยาประมาณ 5 นาที เกิดฤทธิ์สูงสุดในเวลาประมาณ 50 นาที และมีฤทธิ์อยู่ได้นาน แม้หลังเวลา 90-120 นาที ก็ยังมีแรงบีบตัวสูงกว่า control ก่อนได้รับยา (รูปที่ 3)

สารสกัดจากเปลือกยี่โถ 0.05 มล. มีผลเพิ่มแรงบีบตัวน้อยมาก และเพิ่มแรงบีบตัวได้สูงสุดเมื่อใช้ 0.1 มล. (เท่ากับ 0.025 มก. ของผงน้ำสกัดแห้ง/มล.ของน้ำยา Tyrode หรือ 0.155 มก. ของเปลือกยี่โถบด/มล. ของน้ำยา Tyrode) ซึ่งสามารถเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจได้ถึง $258.2 \pm 54.0\%$ ($n = 10$) การเพิ่มขนาดของยาอีก 0.1 มล. ไม่ทำให้แรงบีบตัวเพิ่มขึ้นแต่กลับลดลง พร้อมกับเกิด contracture และ ventricle หยุดเต้นในที่สุด (รูปที่ 4) ส่วนสารสกัดจากใบในขนาด 0.1 มล. เท่ากับสารสกัดจากเปลือกเพิ่มแรงบีบตัวได้น้อยมากเพียงประมาณ 16% ต้องเพิ่มขนาดของยาจนถึง 0.5 มล. (คือ 0.125 มก. ของผงน้ำสกัดแห้ง/มล.ของน้ำยา Tyrode หรือ 0.237 มก. ผงใบยี่โถบด/มล. ของน้ำยา Tyrode) จึงเพิ่มแรงบีบตัวได้สูงสุดที่ $246.8 \pm 37.6\%$ ($n = 6$) การเพิ่มขนาดของยาให้ผลเช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือก คือเกิด contracture และหัวใจหยุดเต้นในที่สุด



รูปที่ 1 TLC ของสารสกัดคลอโรฟอร์มจากเปลือกลำต้นและใบยี่โถเทียบกับ references (digoxin, digitoxin, oleandrin) ตัวเลขใน chromatogram คือค่า hR_f 's value (เท่ากับ $100 \times R_f$'s), solvent system : EtOH/MeOH/H₂O (75/10/7); adsorbent : silica gel G + silica gel GF²⁵⁴ 1:1 (be = blue, bn = brown, g = grey, gn = green, r = red, y = yellow, yv = yellow-violet, rv = red-violet, gnv = green-violet, f = faint)

สารสกัดจากใบดิจิตาลิสออกฤทธิ์ช้ากว่าสารสกัดจากยี่โถ คือเห็นผลหลังได้รับยา 10 นาที และจะเห็นฤทธิ์สูงสุดในเวลาประมาณ 50 นาทีเช่นกัน การให้ยา 0.1 มล. ไม่ทำให้แรงบีบตัวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเป็น 0.2 มล. สามารถเพิ่มแรงบีบตัวได้เล็กน้อย การเพิ่มขนาดของยาเป็น 0.3 มล. (เท่ากับ 0.075 มก. ของผงน้ำสกัดแห้ง/มล. น้ำยา Tyrode หรือ 0.833 มก. ผงดิจิตาลิส/มล. น้ำยา Tyrode) จะได้แรง

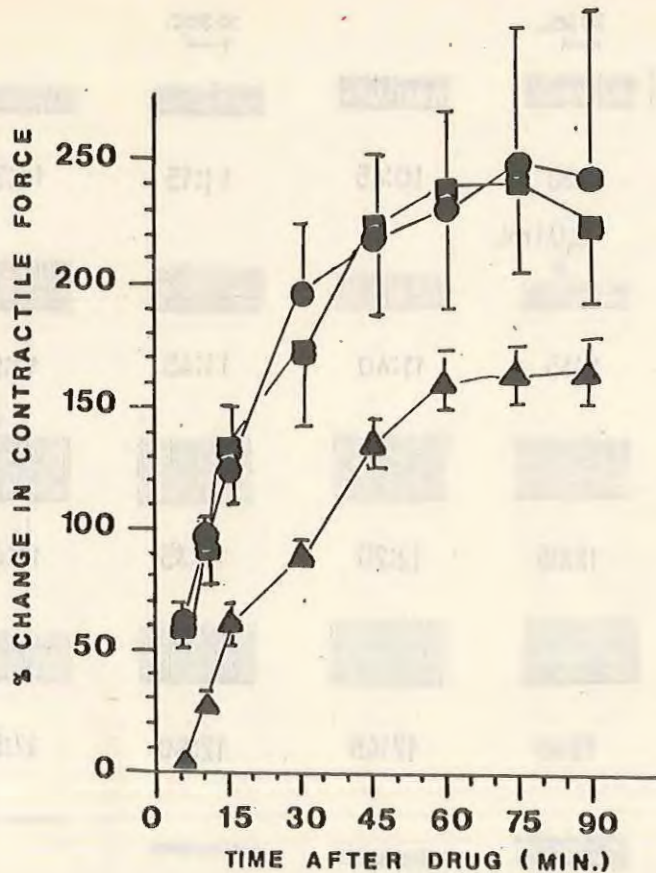


รูปที่ 2 TLC ของสารสกัด 80% EtOH จากเปลือกลำต้นและใบยี่โถเทียบกับจากใบดิจิตาลิสและ references (digitoxin, digoxin, oleandrin) ตัวเลขใน chromatogram คือค่า R_F 's value, solvent system : EtOH/MeOH/H₂O (75/10/7) ; adsorbent : silica gel G + silica gel GF₂₅₄ 1:1 (คำย่อของสีต่าง ๆ เช่นเดียวกับในรูปที่ 1)

บีบตัวสูงสุดที่ $166.5 \pm 12.9\%$ ($n = 5$) ซึ่งต่ำกว่าฤทธิ์ของใบและเปลือกยี่โถ การเพิ่มขนาดยาอีก 0.1 มล. ไม่ทำให้แรงบีบตัวเพิ่มขึ้นกว่าเดิม แต่ทำให้เกิด contracture และหัวใจหยุดเต้นเช่นเดียวกับยี่โถ (รูปที่ 5)

4. ผลการหาปริมาณ cardiac glycosides ในใบและเปลือกยี่โถ

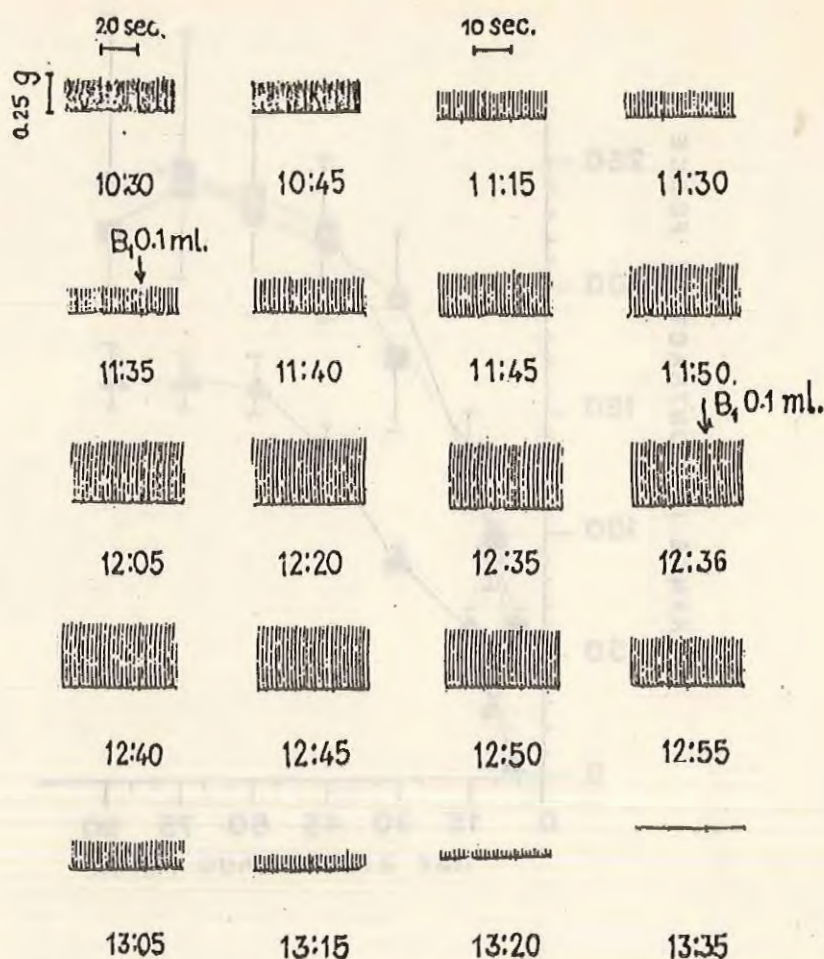
การฉีดสารสกัดของใบและเปลือกยี่โถจากข้อ 1.2.2 เข้าทาง external jugular vein ของหนูตะเภาโดยวิธี infusion พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ EKG เช่นเดียวกับ



รูปที่ 3 ฤทธิ์ในการเพิ่มแรงบีบตัวของไอบียีโด, เปลือกยี่โด และใบดิจิตาลิส ใน right ventricular strip ของหนูตะเภา ที่เวลา 5-90 นาที หลังได้รับยาในขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มแรงบีบตัวได้สูงสุด โดยไม่เกิด contracture (●—● เปลือกยี่โด 0.155 มก./มล.ของน้ำยา Tyrode, n = 10 ; ■—■ ไอบียีโด 0.237 มก./มล.ของน้ำยา Tyrode, n = 6 ; ▲—▲ ใบดิจิตาลิส 0.833 มก./มล.ของน้ำยา Tyrode, n = 5)

การให้ดิจิตาลิส หรือ oleandrin และในที่สุด EKG เป็นเส้นตรง แสดงว่าหัวใจหยุดเต้น ขนาดของยาที่ทำให้หัวใจหนูตะเภาหยุดเต้น (lethal dose) คิดเป็น มล./น้ำหนักหนูตะเภา เป็น กก. และคิดเป็นกรัมของผงยาบด/น้ำหนักหนู เทียบกับ digitalis และ oleandrin แสดงในตารางที่ 1

เมื่อนำค่าเหล่านี้มาคำนวณหา potency ratio ของ test/standard ตาม



รูปที่ 4 ตัวอย่างการบันทึกผลแสดงฤทธิ์ของผงน้ำสกัดแห้งละลายน้ำของเปลือกยี่โถ (ความเข้มข้นของน้ำยา 5 มก./มล.) ต่อการเปลี่ยนแปลงแรงบีบตัวของ right ventricular strip ของหนูตะเภาที่เวลาต่าง ๆ

BP 1980, Appendix XIV O โดยคำนวณจาก $\text{antilog } (\bar{X}_S - \bar{X}_U)$ ($\bar{X}_S$ = mean log lethal dose ของ reference standard, $\bar{X}_U$ = mean log lethal dose ของใบหรือเปลือกยี่โถ) จะได้ค่า potency ratio ของใบยี่โถ/คิจิตาลิสเท่ากับ 0.95 และของเปลือกยี่โถ/คิจิตาลิสเท่ากับ 1.14 เมื่อคำนวณหาค่า fiducial limit จาก $\text{antilog } (M \pm tS_M)$ ($M = \bar{X}_S - \bar{X}_U$ และ S_M = variance ของ M) ที่ $P = 0.05$ พบว่า fiducial limit ของ potency ของใบและเปลือกยี่โถ อยู่ระหว่าง 80-115 และ 95-138% ตามลำดับ



รูปที่ 5 ตัวอย่างการบันทึกผลแสดงฤทธิ์ของผงน้ำสกัดแห้งละลายน้ำของดิจิตาลิสมาตรฐาน (digitalis powder DAB 8 ความเข้มข้นน้ำยาที่ใช้ 5 มก./มล.) ต่อการเปลี่ยนแปลงแรงบีบตัวของ right ventricular strip ของหนูตะเภาที่เวลาต่าง ๆ

เมื่อคำนวณปริมาณ total cardiac glycosides ในใบและเปลือกยี่โถในรูปแบบของ oleandrin พบว่าในใบและเปลือก 1 กรัม จะมี cardiac glycosides 3.7 และ 4.4 มก. หรือเท่ากับ 0.37 และ 0.44% โดยมี fiducial limit ที่ $P = 0.05$ เท่ากับ 96-112 และ 96-119% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 lethal dose ของ ดีจิตาลิส (1.25×10^{-2} ก./มล.), oleandrin (5×10^{-5} ก./มล.), ไบและเบลิออกซีได (1.25×10^{-2} ก./มล.) ในหนูตะเภาที่ผสม ตามวิธีของ BP 1980

ยา	จำนวนสัตว์ทดลอง	เวลาให้ยา (นาที)	ปริมาตรยาที่ให้ (มล.)	น้ำหนักหนูตะเภา (ก.)	lethal dose	
					(มล./กก.)	(ก./กก.)
ดีจิตาลิส	7	21 ± 2	4.2 ± 0.3	311 ± 12	13.54 ± 0.95	0.169 ± 0.012
oleandrin	6	29 ± 2	5.8 ± 0.4	443 ± 11	13.10 ± 0.85	* 6.551 ± 0.425
ไบซีได	12	27 ± 4	5.3 ± 0.3	380 ± 12	14.16 ± 0.72	0.177 ± 0.010
เบลิออกซีได	6	27 ± 1	5.4 ± 0.1	463 ± 17	11.71 ± 0.42	0.146 ± 0.005

* $\text{ก.} \times 10^{-4} / \text{กก.}$

วิจารณ์

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบและเปลือกยี่โถ พบว่าให้ผลบวกกับ Lieberman Burchard test, Kedde's reagent และ Keller-Killiani's test แสดงว่ามีสารพวก cardiac glycosides อยู่ในใบและเปลือกยี่โถ ซึ่งเมื่อนำสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบและเปลือกยี่โถไปทำ TLC เพื่อหาค่า Rf's value เปรียบเทียบกับ oleandrin ซึ่งเป็น cardiac glycoside ตัวสำคัญในยี่โถ ก็พบว่าได้จุดต่าง ๆ หลายจุดที่น่าสนใจ และมีค่า Rf's value ใกล้เคียง oleandrin คือจากเปลือกยี่โถได้แก่ จุดที่ 5 Rf's value 0.84 และจากใบยี่โถได้แก่จุดที่ 5 Rf's value 0.84 และ 0.91 ถึงแม้ว่ามีอยู่จุดหนึ่งซึ่ง Rf's value เท่ากับ 0.94 ซึ่งเป็นค่าของ oleandrin แต่การที่ผู้วิจัยไม่สนใจจุดนี้ เพราะว่าการทดสอบด้วยสารสกัดปิโตรเลียม อีเทอร์ ของใบยี่โถได้ Rf's value 0.94 เช่นกัน ซึ่งแสดงว่าจุดนี้เป็นสารพวกคลอโรฟิลหรือไขมัน การที่สารที่น่าสนใจมีค่า Rf's value น้อยกว่า oleandrin ที่ใช้เปรียบเทียบ อาจอธิบายได้ว่าได้เกิดปฏิกิริยามาบางอย่างขณะสกัดสาร หรือเพราะเก็บตัวอย่างไว้นานเกินไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้อาจเป็น

acetyl group ตำแหน่งที่ 16 อาจถูก hydrolysed ไปเป็น -OH; อาจเกิด hydrolysed ตรง C-3 ที่มีน้ำตาลมาเกาะ; อาจเกิด hydrolysed ที่ methyl ether ของน้ำตาล oleandrin ซึ่งจะทำให้ polarity ของสารเปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้ Rf's value เปลี่ยนแปลง การพิสูจน์ยืนยันการคาดคะเนดังกล่าวจะต้องพิสูจน์โครงสร้างของสารที่มี Rf value ดังกล่าวด้วยวิธีทาง spectroscopy

ค่า Rf จากสารสกัดแอลกอฮอล์ ของใบดิจิตาลิสที่น่าสนใจคือ 0.69 และ 0.74 ซึ่งอาจเป็น digitoxin และ gitoxin แต่เนื่องจากผู้วิจัยไม่มี gitoxin สำหรับเปรียบเทียบ จึงไม่อาจยืนยันได้ ส่วนในใบและเปลือกยี่โถได้จุดที่น่าสนใจคือ Rf ที่ 0.91 และ 0.90 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็น oleandrin

Oleandrin หรือ folinerin มีฤทธิ์ต่อหัวใจเช่นเดียวกับดิจิตาลิส มี cardio-
tonic action ใน isolated heart ของแมว สุนัข กบ (11) และใน embryo

chick heart (12) การวิจัยนี้ใช้ right ventricular strip ของหนูตะเภาที่พบว่าไบและเปลือกยี่โลมีฤทธิ์เช่นเดียวกับ digitalis นั่นคือมี positive inotropic action สามารถเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งอยู่ในภาวะ failure ให้ดีขึ้นมากกว่า 200% สารสกัดของไบและเปลือกยี่โลออกฤทธิ์เร็ว และเมื่อล้างสารออกฤทธิ์จะค่อยๆ หดไป นอกจากนั้นอาการพิษที่เห็นก็คล้ายคลึงกัน คือมี contracture และพบว่ามี spontaneous contraction เกิดขึ้นในบาง preparation

จากการทดสอบทางเคมีพบว่า cardiac glycosides ในไบและเปลือกยี่โล ย่อมเป็นการสนับสนุนการทดลองทางเภสัชวิทยาว่า positive inotropic effect ของไบและเปลือกยี่โลใน right ventricular strip ของหนูตะเภา เป็นผลจาก cardiac glycosides ที่มีอยู่ ซึ่งน่าจะเป็น oleandrin นั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากไบและเปลือก จะเห็นว่าสารสกัดจากไบยี่โลคิดเป็นปริมาณผงยาบด/มล. ของน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงกว่าสารสกัดจากเปลือก (คือของไบ 0.237 มก./มล. และของเปลือก 0.155 มก./มล.) แต่ให้ผลในการเพิ่ม contractile force พอๆ กัน (รูปที่ 3) แสดงว่า cardiac glycosides ที่มีในเปลือกย่อมมีปริมาณสูงกว่าในไบ การหาปริมาณของ cardiac glycosides ตาม BP ด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (guinea-pig method) ก็ได้ผลสนับสนุน คือ lethal dose ของไบยี่โล คิดเป็น มล./น้ำหนักหนูตะเภาสูงกว่าเมื่อใช้เปลือก หรือมีปริมาณ cardiac glycosides ในเปลือกสูงกว่าไบนั่นเอง ดังนั้นอาจใช้ผลการทดสอบ cardiotonic action ของ cardiac glycosides ต่อ right ventricular strip ของหนูตะเภาในการทำ biological assay ของ cardiac glycosides ได้อีกวิธีหนึ่ง เช่นเดียวกับที่มีผู้แนะนำให้ใช้ embryo chick heart (12)

ปริมาณของ cardiac glycosides ในไบและเปลือกยี่โลเมื่อเปรียบเทียบกับใบดิจิตาลิส พบว่าไบยี่โลมีความแรงของ cardiac glycosides น้อยกว่าใบดิจิตาลิส (potency ratio เท่ากับ 0.95) แต่เปลือกยี่โลมีความแรงมากกว่าใบดิจิตาลิส (potency ratio เท่ากับ 1.14) ดังนั้นด้านนำยี่โลไปใช้ทางคลินิก ขนาดของยาที่ใช้ถ้าเป็นไบต้องใช้สูงกว่าเปลือก และขนาดใช้ของไบยี่โลย่อมสูงกว่าขนาดใช้ของใบดิจิตาลิส แต่ขนาดใช้ของเปลือกยี่โลจะต่ำกว่าใบดิจิตาลิส

กรุงไกร และ ประเสริฐศักดิ์ (9) ได้ทดลองหาขนาดของยี่โถที่ทำให้หัวใจหยุดเต้น โดยวิธี infusion เข้าหลอดเลือดดำ คิด lethal dose เป็นกรัมของผงยา/น้ำหนักหนู เป็นกิโลกรัม พบว่าใบยี่โถดอกแดงเมื่อใช้ยาชง 0.5% เท่ากับ 0.234 และ 1% เท่ากับ 0.1438 ดอกชมพู (0.5%) เท่ากับ 0.119 ดอกขาว (0.3%) เท่ากับ 0.100 และของดิจิตาลิส (1%) เท่ากับ 0.305 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาซึ่งใช้วิธีเดียวกัน แต่ใช้ยี่โถชนิดดอกสีแดง กลับขึ้นเดียว สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 80% ความเข้มข้นของน้ำยาสกัดที่ใช้ infusion เท่ากับ 1.25% ได้ค่า lethal dose เท่ากับ 0.177 ± 0.010 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักหนู ($n = 12$) และของดิจิตาลิส เท่ากับ 0.169 ± 0.012 กรัม/กิโลกรัม ($n = 7$) การที่ได้ขนาด lethal dose แตกต่างกันไปเป็นผลจากมีปริมาณของ cardiac glycosides แตกต่างกันไป ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการสกัด แหล่งที่ปลูกและอายุแตกต่างกันก็ได้ การวิจัยนี้ยังได้หาปริมาณในเปลือกด้วย ซึ่งได้ค่า lethal dose เท่ากับ 0.146 ± 0.005 กรัม/กิโลกรัม ($n = 6$)

เนื่องจาก oleandrin หรือ folinerin เป็น cardiac glycoside ตัวสำคัญที่มีในยี่โถ การวิจัยนี้จึงหาปริมาณของ cardiac glycosides ทั้งหมดในรูปของ oleandrin ตามที่มีผู้รายงานไว้พบปริมาณของ oleandrin ต่างๆ กัน คือ 0.08% (12), 1.15% (13) และ 0.03% (14) ซึ่งอาจเป็นผลจากมีแหล่งกำเนิด อายุ วิธีการสกัด และวิธีการวิเคราะห์ต่างกัน นอกจาก oleandrin ยังพบ cardiac glycosides อื่นอีกหลายชนิด (15) ส่วนในเปลือกพบ glycosides 2 ชนิด คือ cortenerin ซึ่งคล้ายกับ folinerin และ rosagenin ซึ่งมีฤทธิ์คล้าย strychnine สำหรับการวิจัยนี้ใช้ยี่โถดอกสีแดง กลับดอกขึ้นเดียว ที่ปลูกในประเทศไทย อายุประมาณ 10 ปี และสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 80% ตามวิธีของ BP 1980 (10) ก็พบปริมาณของ cardiac glycosides ทั้งหมดในรูปของ oleandrin แตกต่างออกไป นั่นคือ ใบได้เท่ากับ 0.37% และในเปลือกเท่ากับ 0.44% ซึ่งสูงกว่าใบ อันน่าจะเกิดจากเหตุผลดังกล่าวแล้วข้างต้น

เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ EKG ก่อนหัวใจหยุดเต้น พบว่าได้ abnormal EKG แบบเดียวกันกับสัตว์ที่ได้ดิจิตาลิส ก่อนที่ EKG จะเป็นเส้นตรง ระยะแรกๆ พบการเปลี่ยนแปลงของ PR interval และพบว่ามีอาการลดอัตราการเดินทางของหัวใจ การทดลองของกรุงไกร และ

ประเสริฐศักดิ์ (9) ก็พบการเปลี่ยนแปลงของ EKG แบบเดียวกัน และพบ bradycardia, flat T-wave, ST-depression และ/หรือ inverted T wave, prolonged PR-interval, ventricular extrasystole, ventricular fibrillation และ cardiac standstill และหนูตะเภาทุกตัวหัวใจหยุดเต้นในท่าบีบตัว อาการพิษที่พบในคนมักเป็นอาการของระบบทางเดินอาหาร และคล้ายคลึงกับอาการพิษจากดิจิตาลิส ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง วิงเวียน เดินโซเซ ม่านตาขยาย อุจจาระร่วงมีเลือดออก หัวใจอ่อน มีโคมา และตาย (16)

Folinerin ซึ่งสกัดได้จากใบยี่โถ มีคุณสมบัติทนทานต่อกรดได้ดี เก็บได้นานเป็นปี และสามารถให้โดยการรับประทานได้ มีการสะสมน้อยกว่า digitoxin (17) มีผู้นำ folinerin มาใช้รักษา cardiac insufficiency โดยให้ผู้ป่วยรับประทานหรือสอดเข้าทางทวารหนัก พบว่าได้ผลดี มีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจิตาลิสคือ ชีพจรลดลง พร้อมกับขับปัสสาวะ น้ำหนักตัวลดลง ยาออกฤทธิ์เร็ว และผู้ป่วยทนทานต่อยาได้ดี (6) ผู้ป่วยที่ได้รับยาจนถึง 5.6 มิลลิกรัมภายใน 14 วัน ไม่มีอาการข้างเคียงของระบบทางเดินอาหารหรือระบบไหลเวียน และไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของ EKG ที่บ่งถึงการเกิดอาการพิษ นอกจากนั้นมีผู้ทดลองนำ foliandrin ซึ่งอาจเป็น folinerin นั้นเอง ไปใช้ในผู้ป่วยสูงอายุซึ่งเป็นโรคหัวใจวาย (7) พบว่ามี cardiotonic และ diuretic action ได้ผลดี ยาออกฤทธิ์เร็ว ถูกขับออกเร็ว มีการสะสมน้อย ไม่พบอาการพิษยกเว้นรายเดียวที่มีอาการอาเจียนเนื่องจากขนาดยาสูงไป และเมื่อลดขนาดยาลงก็ทนทานต่อยาได้ดี ในประเทศไทยสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งขาดแคลนดิจิตาลิส มีผู้นำหึ่งเจอร์ใบยี่โถมาทดลองใช้ในผู้ป่วยได้อีกสามที่มีการบวม 2 ราย พบว่ามีฤทธิ์ขับปัสสาวะ และได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (8)

สรุป

จากการวิจัยนี้อาจสรุปได้ว่า ยี่โถมีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจิตาลิสทั้งในด้านความเป็นพิษและผลในการรักษา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่นๆ จึงอาจนำหึ่งเจอร์จากใบหรือเปลือกยี่โถมาใช้แทนหึ่งเจอร์ดิจิตาลิส แต่ต้องปรับขนาดที่ใช้ให้เหมาะสมโดยต้องทำการหาปริมาณ cardiac glyco-

sides ที่มีอยู่ก่อน ซึ่งอาจใช้วิธีชีววิเคราะห์ดังการวิจัยที่เปรียบเทียบกับยามาตรฐานเช่นดิจิตาลิส นอกจากนั้นยังอาจสกัดเอาสารสำคัญ เช่น oleandrin หรือ folinerin ออกมาใช้แทน digitoxin หรือ digoxin การสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ย่อมเสียเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่า และ ทำยาเตรียมได้ยากกว่าการใช้ในรูปของทิงเจอร์ แต่จะได้ยาที่มีความคงตัวดีและได้ปริมาณยาที่แน่นอนเมื่อนำไปใช้

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งสนับสนุนโครงการวิจัยนี้โดยการอุดหนุนด้านเงินทุน
วิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. เสี่ยม พงษ์นุรอด, ไม้เทศเมืองไทย : สรรพคุณของยาเทศและยาไทย เกษมบรรณกิจ, พระนคร, 2514.
2. Quisumbing, E. Medicinal Plants of the Phillippines. Vol.II Manila Bureau of Printing, pp. 729-32, 1951.
3. Chopra, R.N., Chopra, I.C. and Varma, B.S. Glossary of Indian Medicinal Plants, New Delhi Council of Scientific & Industrial Research, 1956.
4. Takatori, J. Colored Atlas Medicinal Plants of Japan, Hirokawa Pub., Tokyo, 1970.
5. Lewis, W.H., and Elvin Lewis, M.P.F. Medicinal Botany : Plants affecting man's health. John Wiley and Sons, N.Y., 51, 1977.
6. Schwab, R. Klinische Erfahrungen mit dem Herzmittel Folinerin aus Folia Nerii Oleandri. Klin. Wschr. 14 : 564-567, 1935.
7. Droller, H. Foliandrin in geriatric practice. Cardiologia 22 : 118-124, 1953.
8. กรุงไกร เจนพานิชย์, บทความบางเรื่องเกี่ยวกับสมุนไพร โรงพิมพ์ทางมกุฎราชวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 84, 2522.
9. กรุงไกร เจนพานิชย์ และประเสริฐศักดิ์ ตูจินดา เภสัชวิทยาของใบยี่โถไทย สารศิริราช 26(7) : 1333-1341, 1974.

10. British Pharmacopoeia, Vol. II. Appendix XIV.F. Biological assay of prepared digitalis, The University Press, Cambridge, pp. A 151-A 152, 1980.
11. Sevilla Marcos, J.M. and Soler y Monsalve, J.M. Nerium oleander and its active components. *Excerpta Med, Sect II* 1964; 7 : 449. through : *Chem. Abs.* 49 : 13512, 1955.
12. Wolfred, M.M. The evaluation of the glycoside, oleandrin, on the embryo chick heart. *J.Amer. Pharm. Ass.* 38 : 581-584, 1949.
13. Straub, W. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 14 : 149, 1918, through : Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M.G. (eds). *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.* E & S Livingstone Ltd, Edinburg, 91, 1962.
14. Ghielmetti, G., Castoldi, C.F. and Capra, C. Preparation and chemical and biological assay of oleandroside, a cardiotonic glucoside from *Nerium oleander*. *Chem. Abs.* 53 : 2537, 1949.
15. Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M.G. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.* Livingstone Ltd., Edinburg, 91, 1962.
16. Steyn, D.G. *Fmg in S. Afr.* 16 : 11, 1941. through: Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M.G. (eds.) *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.* E & S Livingstone Ltd, Edinburg, 91, 1962.
17. Flury, F. and Neumann, W. Über folinerin. *Klin. Wschr.* 14 : 562-64, 1985.