

ผลทางเภสัชวิทยาของ SAPONINS จากใบราตรี

อัมพวัน อภิสริยะกุล* และ สิริพันธุ์ ณรงค์ชัย**

* ภาควิชาเภสัชวิทยา และ ** ภาควิชานิติเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF SAPONINS FROM RATREE LEAVES

Amphawan Apisariyakul and Siripan Narongchai

Departments of Pharmacology and Forensic Medicine

Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

SUMMARY

The pharmacological effects of Ratree (*Cestrum nocturnum* Linn.) leaves extracts were studied in both rat sciatic nerve-gastrocnemius preparations in situ and isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. The extracts produced twitch potentiation followed by depressive effect on neuromuscular transmission. All doses of the extracts (0.33-0.267 mg/kg body weight) initially produced a slight twitch potentiation which was followed by neuromuscular blockade in the in situ study. In the isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation, the alcoholic extract in the dose of 0.36 mg/ml produced only the increase in twitch amplitude; higher doses (1.43-11.42 mg/ml) decreased the muscle contraction. The alcoholic extract significantly increased the neuromuscular blocking effect of pancuronium and succinylcholine. The neuromuscular depression produced by this extract was not antagonized by physostigmine, tetraethylammonium and Ca^{++} . The neurogenic post-tetanic potentiation (PTP) was partially blocked by this extract as well as by succinylcholine. Besides these effects, the extract caused muscle contraction with slightly increased in amplitude and prolonged duration; subsequently, it also produced spontaneous muscle contraction (fasciculation). This muscle fasciculation and contraction were abolished by pancuronium. LD₅₀ of the extract, when given i.p. to rats, was found to be 2.65 g/kg body weight. The active constituent may be saponins and certain alkaloids. The muscle relaxant property of the extract was probably due to saponins, since the decreased in twitch amplitude produced by the extract was similar to that of standard saponins. Besides neuromuscular effects, the extracts from this plant produced hypotension and decreased in intestinal tension in rats.

ในปัจจุบัน พืชสมุนไพรที่มีความสำคัญในหลายด้าน หลายสาขา การวิจัยทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรเป็นหลักฐานสำคัญในการที่จะทดสอบฤทธิ์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งคือ ราตรี ต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย (neuromuscular synapse)

ต้นราตรี มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cestrum nocturnum* Linn. อยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในหมู่เกาะอินดีส เจริญได้ดีในเขตร้อนของอเมริกา อินเดีย และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก นอกจากนั้นยังเจริญได้ดีในประเทศที่อยู่ในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มีชื่อภาษาอังกฤษคือ Queen of the night, Night blooming หรือ Jessamine (วิเชียร ๒๕๑๘, ลัดดาวัลย์ ๒๕๒๓, ณรงค์ ๒๕๒๓, พาณิ ๒๕๒๔) เป็นไม้พุ่มยืนต้น เนื้อแข็ง ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยว รูปใบรี เนื้อใบเรียบสีเขียวแก่ ลักษณะดอกเป็นดอกช่อสีขาวอมเขียว มีกลิ่นหอมมากในเวลากลางคืน จากหนังสือ "พืชสมุนไพรและประโยชน์" ของลัดดาวัลย์ (๒๕๒๓) ได้กล่าวว่า ใบราตรีสามารถใช้รักษาอาการเกร็งของกล้ามเนื้อลายและใช้รักษาโรคลมบ้าหมูได้ ในประเทศเม็กซิโกใช้ใบราตรีเป็นสมุนไพรรักษาโรคลมชัก (Chase, 1903) Walsh, 1909 และ Watt, 1962 ได้รายงานว่า ใบราตรีมีพิษ เมื่อสัตว์ได้รับเข้าไปจะมีอาการซึม หายใจช้า สัตว์บางตัวเกิดอาการพิษรุนแรงคือมีอาการชัก หดสติ และเสียชีวิตในเวลาต่อมา Hutcheon (1909) ได้รายงานว่าเมื่อสัตว์ได้รับใบราตรีเข้าไปสัตว์จะร้องครวญครางแสดงถึงความเจ็บปวด สัตว์จะนอนเหยียดคอตก แขนขาแข็งเกร็ง

ในปี 1963 Chakravarti และคณะได้สกัดสารจากใบราตรีโดยใช้ ethanol ในการสกัดพบว่า ใบราตรีมีสาร saponins และในปี 1968 Roy และ Chatterjee ได้ศึกษาผลของ saponins จากใบราตรีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม พบว่าสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อนี้ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดใบราตรีทำให้กล้ามเนื้อลายเกิดอาการเกร็งได้ (Hutcheon, 1909)

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่า สารจากใบราตรีมีผลทางเภสัชวิทยาหลายอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อระบบประสาทควบคุมกล้ามเนื้อ จึงทำให้เป็นที่น่าสนใจใน

การศึกษาว่า สารสกัดใบราตรีอาจมีบทบาทสำคัญต่อการนำส่ง impulse จากเส้นประสาท ไปยังกล้ามเนื้อลาย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบราตรีต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย โดยศึกษาเปรียบเทียบกับยาที่มีฤทธิ์ต่อระบบนี้ คือ pancuronium และ succinylcholine รวมทั้งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดนี้ ตลอดจนทำการศึกษาอาการพิษอย่างเฉียบพลัน และหา LD₅₀ ของสารสกัดใบราตรีในหนูขาว นอกจากนี้ยังทำการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญในใบราตรีที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้ด้วย

การศึกษากการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลายยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ฉะนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษากการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีต่อบริเวณนี้โดยทำการทดลองทั้งในสัตว์ทดลอง (in situ) และนอกสัตว์ทดลอง (in vitro) โดยใช้สัตว์ทดลองชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษากลุ่มสารสำคัญในใบราตรีที่มีฤทธิ์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย เปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐาน

เมื่อศึกษากลุ่มสารสำคัญในใบราตรีแล้ว จึงได้นำไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อบริเวณส่วนต่อปลายประสาทกล้ามเนื้อลายและการออกฤทธิ์ต่อระบบอื่น ๆ ด้วย

วิธีการศึกษา

ใบราตรีที่ใช้ในการวิจัยนี้เก็บได้จากต้นเดียวกันตลอดการทดลอง ใบราตรีที่ใช้เป็นใบที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป เก็บระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม นำมาล้างให้สะอาด ตากในที่ร่มจนแห้งประมาณ 3 วัน บดให้ละเอียด เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะใช้ทำการวิจัย ส่วนตัวอย่างของกิ่งใบ และดอก ได้นำไปทำเป็น Herbarium เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานต่อไป.

การเตรียมสารสกัดใบราตรีที่ใช้ เตรียมโดยวิธีการหมัก (marceration) ซึ่งดัดแปลงมาจากการเตรียมน้ำสกัดสมุนไพรตามวิธี ซึ่งเคยศึกษามาแล้ว (วิบูลย์ และ อัมพวัน ๒๕๒๑) โดยชั่งผงใบราตรีหนัก ๑๐ กรัม เติลงใน flask เติม 95% Ethanol ลงไป ๕๐ มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน หมักทิ้งไว้ ๑ คืน กรองผ่านผ้าก๊อซ นำสารสกัดที่ได้

ไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่อง centrifuge เช่นเดียวกับการสกัดโดยใช้น้ำ จะได้สารสกัดซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวแก่ มีความเข้มข้น ๒๐๐ มก. ต่อมิลลิลิตร, ขนาดที่ใช้ของสารสกัดในการศึกษานี้คิดจากน้ำหนักของใบราตรีแห้ง

ในกรณีที่ต้องการสารสกัดใบราตรีที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ให้นำสารสกัดที่เตรียมได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยตั้งบนหม้ออังไอน้ำ แล้วเก็บในภาชนะที่สะอาดและมีฝาปิด เก็บไว้ในตู้เย็นพร้อมที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

R_E หมายถึงสารสกัดใบราตรีที่ได้จากการสกัดด้วย 95% Ethanol

ในการศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบราตรี ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ ๑๖๐ - ๓๕๐ กรัมตลอดการทดลอง

การเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรินิค-กล้ามเนื้อกระบังลม (isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation) เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bülbbring (1946) และ Chantaratham (1974) การบันทึก directly-evoked twitch ทำได้เช่นเดียวกับการบันทึก neurally-evoked twitch แต่การบันทึกนี้ใช้ stainless steel bipolar stimulating electrode กระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมโดยตรง การเตรียมนี้ทำได้โดยเกี่ยวปลายหนึ่งของ electrode ที่บริเวณส่วนฐาน (ซึ่งอยู่ในแนวเดียวกับส่วนยอด) ของกล้ามเนื้อกระบังลม อีกปลายหนึ่งของ electrode เสียบเข้ากล้ามเนื้อกระบังลมให้อยู่ในแนวอนและชิดกับส่วนฐาน ก่อนทำการทดลองแต่ละครั้งทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลายอย่างสมบูรณ์ (Complete neuromuscular blockade) โดยใช้ pancuronium ในขนาด ๐.๐๐๕ มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันการหดตัวของกล้ามเนื้อลายซึ่งอาจเป็นผลจากการที่เส้นประสาทฟรินิคถูกกระตุ้น การเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะดิก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียส (rat sciatic nerve-gastrocnemius preparation in situ) เพื่อบันทึกการหดตัว (neurally-evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Mc. Loed (1970)

ในการศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีและยาต่อ post-tetanic potentiation (PTP) นั้นทำได้โดยฉีดสารสกัดใบราตรีหรือยาเข้าทางเส้นเลือดแดงที่ขาของหนูขาว หลังจากเกิดการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ร้อยละ ๕๐ แล้วทำการกระตุ้นเส้นประสาทไขสันหลังด้วย frequency 20 Hz นาน ๑๐ วินาที หรือทำให้เกิด repetitive stimulation แล้วเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อลายก่อนและหลังการกระตุ้นนี้

ในการศึกษาอาการพิษและหา LD₅₀ ของสารสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Loomis, 1978 คือ ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง ๑๖๐-๒๐๐ กรัม ซึ่งเพาะพันธุ์และเลี้ยงในสิ่งแวดล้อมเดียวกันตลอดการทดลอง หนูขาวที่ใช้ในการทดลองแล้วครั้งหนึ่งจะไม่ใช้ซ้ำอีก เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด biological variation ซึ่งมีอิทธิพลต่อผลของ toxicity test (Loomis, 1978)

การทดสอบสารสกัดใบราตรีต่อความดันโลหิต วัดความดันโลหิตของหนูขาวจาก common carotid artery ฉีดสารสกัดใบราตรีเข้าทางหลอดเลือดดำที่ขา บันทึกความดันโลหิตเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยดัดแปลงตามวิธีการของ L.J. Mcleod (1970) การทดสอบสารสกัดใบราตรีต่อลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาวดัดแปลงตามวิธีการของ Perry et al, 1970

การศึกษาคัดสอบและแยกสารสำคัญจากใบราตรี ใช้ Thin-layer chromatography (TLC) และ Colum Chromatography ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Stahl (1969), Harborne (1973), Morris (1964) และกำจร (2523)

ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาเภสัชวิทยาขั้นต้นของสารสกัดใบราตรี ซึ่งทำการทดลองในสัตว์ทดลองโดยศึกษาทั้งในและนอกสัตว์ทดลอง จำแนกผลการทดลองได้ดังต่อไปนี้

๑. ผลของสารสกัดใบราตรีในสัตว์ทดลองและ LD₅₀ : เมื่อฉีดสารสกัดขนาด ๑-๕ กรัมค่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องในหนูขาวพบว่า มีอาการเกร็ง ขนลุก ขาไม่มี

แรง หายใจช้าลง และสัตว์ทดลองบางตัวเสียชีวิต เมื่อให้สัตว์ทดลองกินสารสกัดใบราตรีในขนาด ๐.๒ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม โดยให้ติดต่อกันเป็นเวลา ๔ วัน จากการสังเกตอาการที่เกิดขึ้นพบว่า สัตว์ทดลองมีอาการขนลุก ขาไม่มีแรง กล้ามเนื้ออ่อนแรง หายใจช้าลง บางตัวเสียชีวิต ค่า LD_{50} (I.P.) = ๒.๖๕ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม

๒.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบราตรีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย

เมื่อนิตสารสกัดจากใบราตรีในขนาด ๐.๐๓๓ - ๐.๒๖๗ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม แล้วบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายในหนูขาวพบว่า การหดตัวของกล้ามเนื้อลายเพิ่มขึ้นภายในระยะเวลา ๑-๕ นาที หลังจากนั้นตามมาด้วยการหดตัวของกล้ามเนื้อลายลดลงมากน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของสารสกัดที่ให้เข้าไปในสัตว์ทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อลายคิดเป็นร้อยละ ของสารสกัดจากใบราตรีพบว่า สามารถทำให้การหดตัวลดลงได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1

การเปรียบเทียบการหดตัว (twitch depression) ของกล้ามเนื้อลายที่ลดลง ซึ่งเกิดจากสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วยน้ำ (R_C), สารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วยน้ำร้อน (R_H) และสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทไขอะติก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียสในหนูขาว

ขนาดของสารสกัดใบราตรี ที่ฉีดเข้าไปในหนูขาว (กรัม/กิโลกรัม)	จำนวนครั้งที่ ทำการทดลอง	การหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่ลดลง * คิดเป็นร้อยละ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน)		
		R_C	R_H	R_E
0.033	6	84.4 $\pm$ 4.20	58.8 $\pm$ 13.33	30.9 $\pm$ 4.66
0.067	6	92.5 $\pm$ 4.61	95.1 $\pm$ 2.81	80.4 $\pm$ 12.28
0.133	6	100.0 $\pm$ 0.00	99.6 $\pm$ 0.39	96.1 $\pm$ 2.57
0.267	6	100.0 $\pm$ 0.00	100.0 $\pm$ 0.00	100.0 $\pm$ 0.00

* การหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่ลดลงมากที่สุด วัดหลังจากฉีดสารสกัดใบราตรีแล้ว ๓๐ นาที

๓. การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) และ pancuronium, succinylcholine (SCh) ในการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย

เมื่อหยดน้ำสกัด R_E ลงใน tissue chamber ซึ่งมีส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวและบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย พบว่าน้ำสกัด R_E ในขนาด ๑.๔๓, ๒.๘๖, ๕.๗๑ และ ๑๑.๔๒ มิลลิกรัมต่อ ๑ มิลลิลิตร ทำให้การหดตัวของกล้ามเนื้อลายลดลงคิดเป็นร้อยละ 39.4 ± 5.53 , 57.1 ± 3.80 , 88.8 ± 4.36 และ 100.0 ± 0 ตามลำดับ pancuronium ในขนาด ๐.๐๐๐๖, ๐.๐๐๑๒ และ ๐.๐๐๕๐ มิลลิโมล/มิลลิลิตร สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้คิดเป็นร้อยละ 2.7 ± 1.12 , 38.8 ± 6.31 , 86.6 ± 4.67 และ 100.0 ± 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อหยดน้ำสกัด R_E ก่อนแล้วตามด้วย pancuronium พบว่าการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายเพิ่มมากขึ้นเป็น 48.6 ± 3.18 , 87.2 ± 5.92 , 100.0 ± 0 ตามลำดับ

ตารางที่ 2

การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ซึ่งเกิดจากสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) pancuronium โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว

ขนาดที่ใช้		จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง	การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย*		
R _E (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	pancuronium (มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร)		คิดเป็นร้อยละ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน)		
			R _E	pancuronium	R _E + pancuronium
1.43	0.0006	6	39.4 ± 5.53	2.7 ± 1.12	48.6 ± 3.18 **
2.86	0.0012	6	57.1 ± 3.80	39.8 ± 6.31	87.2 ± 5.92 **
5.71	0.0025	6	88.8 ± 4.36	86.6 ± 4.67	100.0 ± 0
11.42	0.0050	6	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100.0 ± 0

* หมายถึงการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย วัดหลังจากหยดน้ำสกัด R_E ๓๐ นาที

** ผลรวมของสารสกัดใบราตรีและ pancuronium สูงกว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจากน้ำสกัด R_E หรือ pancuronium อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3

การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ซึ่งเกิดจากสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) และ succinylcholine (Sch) โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว

ขนาดที่ใช้		จำนวนครั้งที่ทำ การทดลอง	การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย *		
R_E (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	Sch (มิลลิโมล/ มิลลิลิตร)		คิดเป็นร้อยละ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน)		
			R_E	Sch	$R_E + Sch$
1.43	0.0031	6	39.5 ± 5.53	29.7 ± 3.06	$100.0 \pm 0^{**}$
2.86	0.0062	6	57.1 ± 3.80	62.3 ± 4.96	$100.0 \pm 0^{**}$
5.71	0.0094	6	88.8 ± 4.36	81.7 ± 1.57	$100.0 \pm 0^{**}$
11.42	0.0125	6	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100.0 ± 0

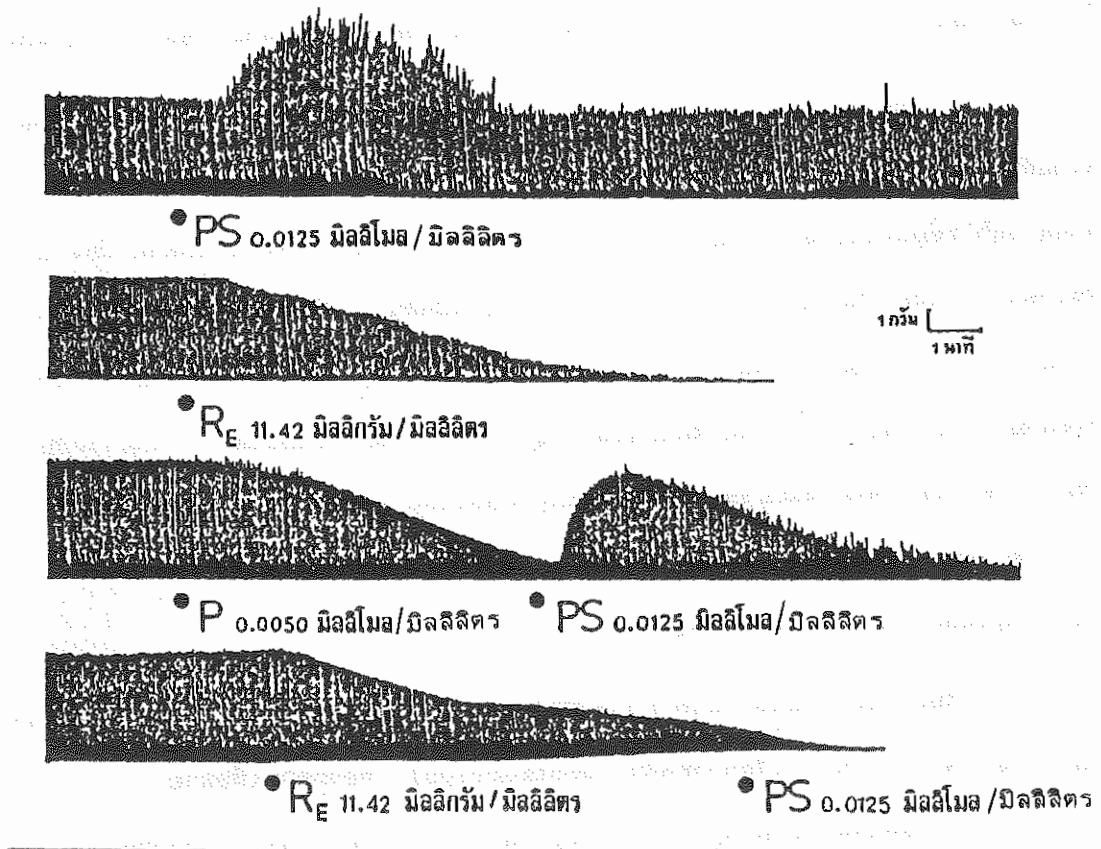
* หมายถึงการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย วัดหลังจากหยดน้ำสกัด R_E แล้ว ๓๐ นาที

** ผลรวมของสารสกัดใบราตรีและ Sch สูงกว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจากน้ำสกัด R_E หรือ Sch อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Succinylcholine ในขนาด ๐.๐๐๓๑, ๐.๐๐๖๒, ๐.๐๐๙๔ และ ๐.๐๑๒๕ มิลลิโมลต่อมล. สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้คิดเป็นร้อยละ 29.7 ± 3.06 , 62.3 ± 4.96 , 81.7 ± 1.57 และ 100.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อหยดน้ำสกัด R_E ก่อนแล้วตามด้วย succinylcholine พบว่าทำให้ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้มากขึ้นเป็น 100.0 ± 0 ในทุกขนาดของน้ำสกัด R_E เมื่อให้ร่วมกับ succinylcholine ในแต่ละขนาดที่ใช้

๔. การเปรียบเทียบผลของ physostigmine (PS), tetraethylammonium (TEA) และ Ca^{++} ในการต้านฤทธิ์การลดการหดตัว (twitch depression) ของกล้ามเนื้อลาย ซึ่งเกิดจากสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) และ pancuronium

เมื่อหยด physostigmine ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม reversible anticholinesterase agents ในขนาด ๐.๐๑๒๕ มิลลิโมลต่อมิลลิลิตรลงใน tissue chamber ที่มี



รูปที่ 1 ผลของ physostigmine (PS) ต่อการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ซึ่งเกิดจาก pancuronium (P) และน้ำสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว

ส่วนของเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวและบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย
นี้พบว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อลายเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หลังจากให้ pancuronium ในขนาด
0.0050 มิลลิโมล/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้มากอย่างเห็น
ได้ชัดแล้วให้ physostigmine ในขนาดเดียวกัน พบว่าสามารถต้านฤทธิ์การลดการหดตัวของ
กล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก pancuronium แต่ physostigmine ไม่สามารถต้านฤทธิ์การ
ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจากสารสกัด R_E ได้เลย (รูปที่ 1) tetraethyl-
ammonium (TEA) ซึ่งเป็น potent anticurare agent ในขนาด ๒.๕ มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร
เพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้เล็กน้อย และในการทดลองบางครั้ง TEA ไม่มีผลต่อการหดตัว

ของกล้ามเนื้อลาย เมื่อให้ TEA ในขนาดเดียวกันนี้สามารถต้านการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก pancuronium แต่ TEA ไม่สามารถต้านการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายจากน้ำสกัด R_E

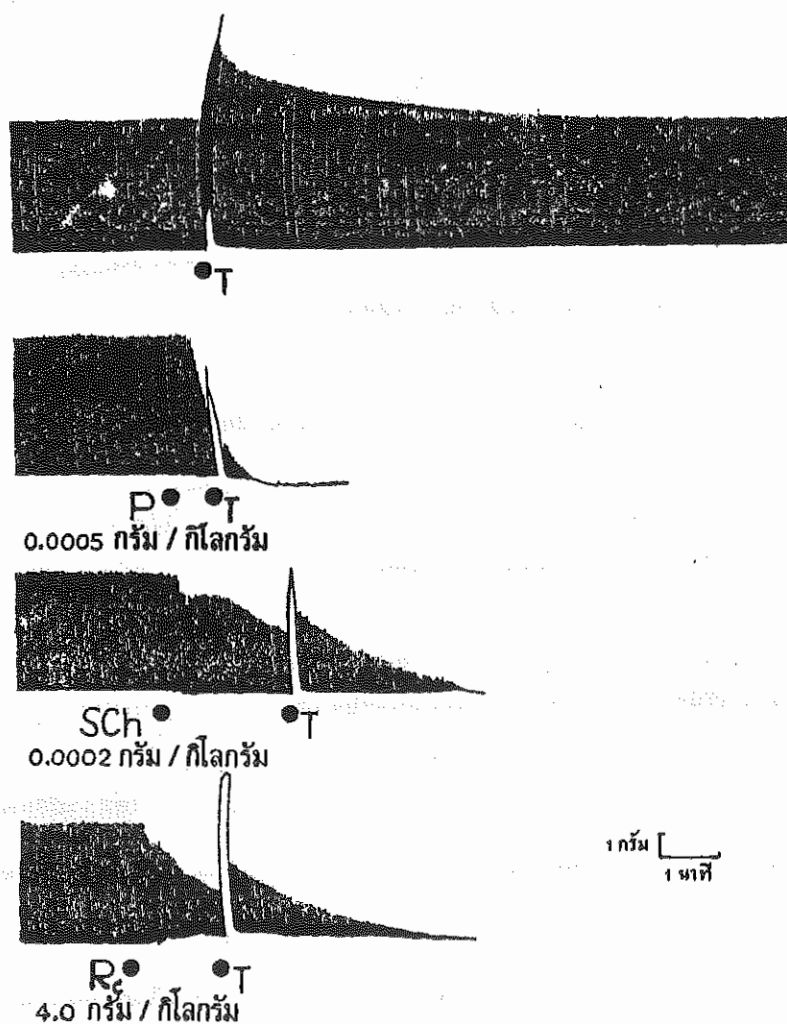
เมื่อทำ repetitive stimulation โดยกระตุ้นเส้นประสาทไขสันหลังด้วยไฟฟ้า ความถี่สูง ๆ (20 Hz) เป็นเวลา ๑๐ วินาที ทำให้เกิด PTP อย่างเห็นได้ชัดเจน และจากการทำ repetitive stimulation ภายหลังเกิดการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ซึ่งเกิดจากการฉีด pancuronium, ๐.๐๐๐๕ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม, succinylcholine, ๐.๐๐๐๒ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม และน้ำสกัด R_C ๔.๐ กรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม ตามลำดับเข้าทางเส้นเลือดแดงของหนูขาวพบว่า pancuronium สามารถยับยั้งการเกิด PTP ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ succinylcholine หรือน้ำสกัด R_C สามารถยับยั้งการเกิด PTP ได้บางส่วน แสดงว่าน้ำสกัด R_C สามารถยับยั้งการเกิด PTP คล้ายกับ succinylcholine ดังแสดงในรูปที่ 2

๔. การเปรียบเทียบผลของสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) และ acetylcholine (ACh) ในการเกิดการหดตัว (contraction) ของกล้ามเนื้อลาย

เมื่อหยดสารสกัด R_E และ acetylcholine ลงใน tissue chamber ที่มีส่วนของเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวและบันทึกการหดตัว (contraction) ของกล้ามเนื้อลายนี้ พบว่าน้ำสกัด R_E ในขนาด ๑.๔๓ มิลลิกรัมต่อ ๑ มิลลิลิตร ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้สูงมาก นอกจากนี้น้ำสกัด R_E ยังมีผลทำให้เกิดอาการพริ้วของกล้ามเนื้อลาย (fasciculation) (รูปที่ 3 A)

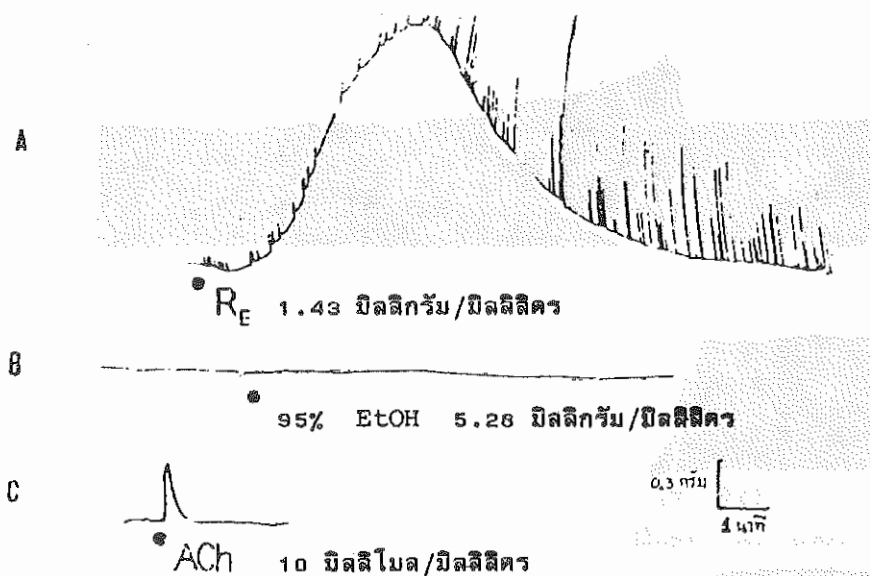
การหดตัวที่เกิดจากน้ำสกัด R_E เกิดขึ้นเป็นเวลานานกว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก acetylcholine ๑๐ มิลลิโมล เมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำสกัด R_E และ 95% Ethanol พบว่า 95% Ethanol ไม่มีผลทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย (รูปที่ 3B)

เมื่อหยดน้ำสกัด R_E ในขนาด ๑.๔๓ มิลลิกรัมต่อ ๑ มิลลิลิตร ตามหลัง pancuronium ในขนาด ๐.๐๐๕๐ มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร พบว่า pancuronium สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจากน้ำสกัด R_E ได้บางส่วนและสามารถยับยั้งอาการพริ้วของกล้ามเนื้อลาย (fasciculation) ที่เกิดจากน้ำสกัด R_E ได้



รูปที่ 2 เปรียบเทียบผลของ pancuronium (P), succinylcholine (Sch) และน้ำสกัดใบราตรีที่สกัดด้วยน้ำ (R_c) ต่อ post-tetanic potentiation (PTP) จาก Tetanic stimulation (T) โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทไขกระดูก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนิเมียสในหนูขาว

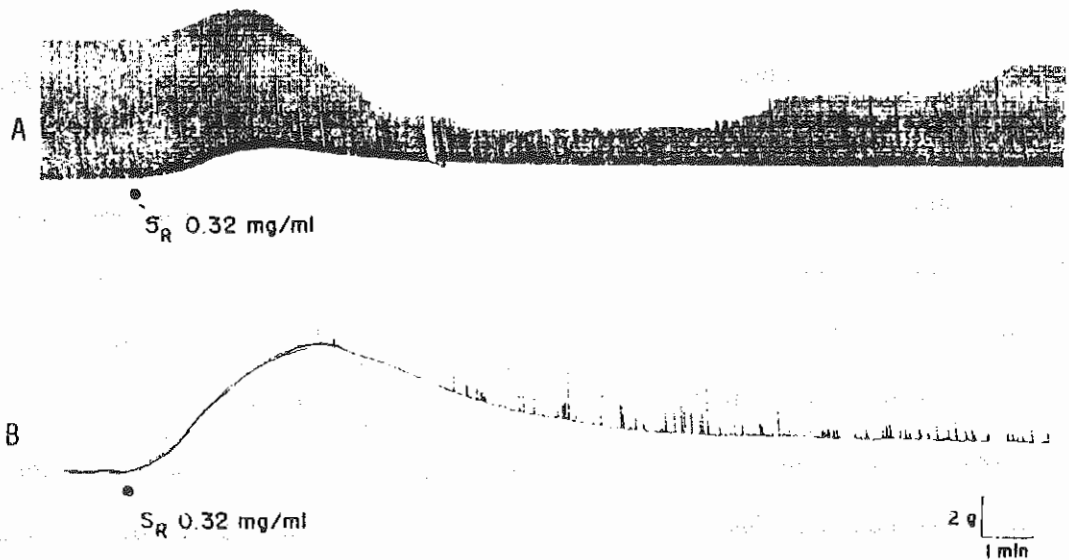
๖. การแยกสารสำคัญจากใบราตรี เมื่อแยกส่วนประกอบจากใบราตรีโดยวิธี TLC พบว่ามีส่วนสำคัญแยกให้เห็นชัด ได้ ๕ ส่วน นำไปทดสอบอัลกาลอยด์ (alkaloids) ซะโปนิน (saponins) แอนทราควิโนน (anthraquinones) และแทนนิน (tannins) เมื่อนำไปแยกโดย column chromatography โดยใช้ silica gel พบอัลกาลอยด์และผลของอัลกาลอยด์นี้สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายเล็กน้อย ในการสกัดแยกหา saponins



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดไบราตรี (R_E) และ ACh, ในการหดตัวของกล้ามเนื้อลายในส่วนเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อ กระบังลมของหนูขาว

ทำได้โดยสกัดด้วย 95% Ethanol, diethyl ether, n-butanol ได้สารมีลักษณะเกล็ดสีน้ำตาล นำไปทดสอบทางเคมีเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นสาร saponins (กำจกร, ๒๕๒๓) จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า ลดการหดตัวหรือลด amplitude ของ neurally-evoked twitch เมื่อให้ saponins ที่แยกได้เข้าไปในหลอดทดลองซึ่งมีกล้ามเนื้อกระบังลมอยู่พบว่า ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวได้ และเกิดการกระตุ้นกล้ามเนื้อเป็นเวลานาน ผลของ saponins ที่แยกได้จากไบราตรีต่อกล้ามเนื้อลายได้ แสดงไว้ในรูปที่ 4

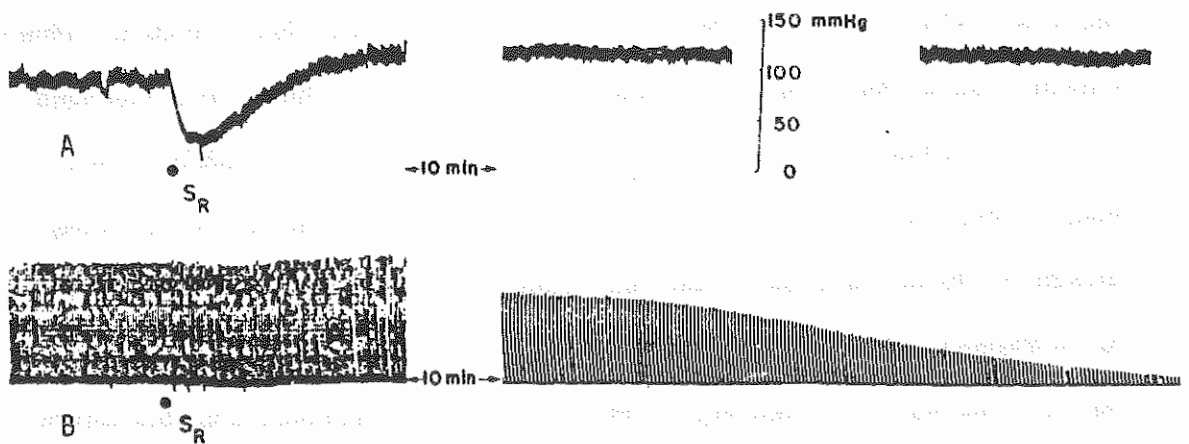
๗. การทดสอบสารสกัดจากไบราตรีต่อความดันโลหิต และต่อลำไส้เล็กของหนูขาว เมื่อฉีดสารสกัดไบราตรีในขนาด ๐.๓ มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำ ที่ขาของหนูขาวพบว่า ความดันโลหิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด การลดความดันโลหิตนี้เกิดขึ้นชั่วคราว แล้วกลับเข้าสู่ระดับปกติ ในขณะที่ความดันโลหิตลดลงนั้น สาร saponins ยังไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย หลังจากนั้นการทำงานของกล้ามเนื้อลายจะลดลงจนไม่สามารถทำงานได้ แต่ความดันโลหิตของสัตว์ทดลองยังสามารถบันทึกได้ (รูปที่ 5) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากไบราตรี มีผลลดการหดตัวของลำไส้เล็กได้



รูปที่ 4 ผลของ saponins ที่แยกได้จากใบราตรีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย

A. ผลของ saponins ในการลดการทำงานของกล้ามเนื้อลาย

B. ผลของ saponins กระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย
ได้เอง



รูปที่ 5 ผลของ saponins ที่แยกได้จากใบราตรีต่อความดันโลหิตและการหดตัวของกล้ามเนื้อลายในหนูขาว

A. saponins จากใบราตรีในขนาด 0.3 mg/kg ลดความดันโลหิต

B. saponins 0.3 mg/kg ลด amplitude ของ neurally-evoked twitch โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทไขอะดิก-กล้ามเนื้อแอสโตรกนีเมียส

วิจารณ์

จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบราตรี ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย เสริมฤทธิ์กับ pancuronium, succinylcholine การลดการหดตัวหรือการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อลายนี้ ไม่สามารถต้านฤทธิ์ได้โดย physostigmine, tetraethylammonium นอกจากนั้นสารสกัดจากใบราตรียังสามารถยับยั้งการเกิด post-tetanic potentiation ได้บางส่วน อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้คาดว่าสารสกัดจากใบราตรีออกฤทธิ์ที่บริเวณส่วนต่อปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย ในปี 1968 Roy และ Chatterjee ได้รายงานว่ สารสกัดจากใบราตรีมีผลต่อกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวเช่นเดียวกันกับในการศึกษานี้คือ ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย สารสกัดใบราตรีในขนาดต่ำอาจทำให้มีการเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเล็กน้อยและเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นมาก ในขนาดที่สูงขึ้นจะทำให้ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้มากขึ้นจนเกิดการลดการหดตัวได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดทั้งสามลักษณะคือสกัดด้วยน้ำร้อน น้ำเย็น และ 95% ethanol ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย แล้วพบว่า สารสกัดทั้งสามนี้สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้เช่นเดียวกัน

เมื่อทราบว่าสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% ethanol มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลายในการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ดังนั้นในการศึกษา หากกลไกการออกฤทธิ์จึงได้เลือกสารสกัดที่สกัดด้วย 95% ethanol เพื่อหลีกเลี่ยงการออกฤทธิ์ของสารอินทรีย์ซึ่งอาจจะละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายออกมาในอัลกอฮอล์ ดังนั้นในการศึกษา พิษสมุนไพรร่อกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามักนิยมใช้การสกัดด้วยอัลกอฮอล์ เพื่อให้แน่ใจว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานั้นไม่ใช่สารเคมีที่เป็นสารอินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% ethanol หรือน้ำสกัด R_E สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้มากกว่าคอนโทรล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลเนื่องมาจากสารสำคัญซึ่งสกัดได้จากใบราตรี

จากการศึกษาพบว่า การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจากสารสกัดใบราตรี นั้นเสริมฤทธิ์โดยยาในกลุ่มคลายตัวกล้ามเนื้อ คือ pancuronium ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม nondepolarized neuromuscular blocking drugs และ succinylcholine ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม depolarized neuromuscular blocking drugs

เมื่อฉีดสารสกัดใบราตรีเข้าทางช่องท้องของหนูขาว พบว่ามีอาการอ่อนเปลี้ยของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน หนูไม่มีแรง สัตว์ทดลองหายใจช้าลงและหยุดหายใจ จะเห็นว่าอาการเหล่านี้คล้ายกับอาการพิษที่เกิดจากการที่สัตว์บางชนิดได้รับใบราตรีเข้าไปซึ่งรายงานโดย Chase (1903) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบราตรีออกฤทธิ์กดการหายใจโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการนำส่ง impulse ที่บริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลายดังกล่าวแล้วข้างต้น ในปี 1968 Roy และ Chatterjee ได้รายงาน bahwa ใบราตรีมีผลในการทำลายเม็ดเลือดแดงและต่อมาได้มีผู้พบว่า สาร saponins ซึ่งได้จากใบราตรีทำให้เกิดอาการพิษได้ คือ ทำให้หนูถีบจักรหายใจเร็วตามด้วยการหายใจลำบาก และเสียชีวิตเนื่องจากหยุดหายใจ (ลิวรรณ, ๒๕๒๒) ดังนั้นอาการพิษที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากการทำลายเม็ดเลือดแดงทำให้สัตว์ทดลองมีการหายใจเร็วขึ้นมาก่อนเนื่องจากการนำเข้าของออกซิเจนและขับออกของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เม็ดเลือดแดงลดน้อยลง ทำให้ระดับของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นจึงมีการปรับตัวให้หายใจเร็วขึ้น (Ganong, 1979) saponins คือไกลโคไซด์ซึ่งเป็นสารพิษที่อาจพบในพืชที่มีพิษ (Ikan, 1969) จากผลการทดลองนี้เมื่อสกัด saponins จากใบราตรีแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทพรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว พบว่า saponins ที่สกัดได้จากใบราตรีสามารถลดการทำงานของกล้ามเนื้อกระบังลมได้ นอกจากนี้ยังสงสัยอีกด้วยว่าทำให้การหดตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นซึ่งอาจจะ เป็นสาเหตุของอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ อาการเหล่านี้สอดคล้องกับอาการที่เกิดขึ้นหลังจากสัตว์ทดลองได้รับใบราตรีไม่ว่าจะให้โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องหรือโดยให้สัตว์ทดลองกินเข้าไป อาการเกร็งที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองหลังจากได้รับสารสกัดใบราตรีนั้นเป็นที่น่าสนใจเกิดว่าจะเกิดขึ้นมาก่อนอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อลายเสมอไป และประกอบกับการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีและ succinylcholine ดังกล่าวข้างต้น จึงอาจคาดได้ว่าสารสกัดใบราตรีอาจออกฤทธิ์คล้ายกับยาในกลุ่ม depolarized neuromuscular blocking drugs มากกว่ายาในกลุ่ม nondepolarized neuromuscular blocking drugs

จากผลการทดลองพบว่า LD_{50} ของสารสกัดใบราตรีที่สกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ ๒.๖๕ กรัมค่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม (I.P.) จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้ต่างกับ LD_{50} ในหนูถีบจักร ในรายงานของ ลิวรรณ (๒๕๒๒) ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง ขนาดและความเข้มข้น

ของสารสกัดที่ใช้ สาเหตุการเกิดอาการพิษของสารสกัดใบราตรีส่วนหนึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้ง การนำส่ง impulse ที่บริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย

จากรายงานของ Halim และคณะ (1971) พบว่าอัลคาลอยด์ที่พบในใบราตรี คือ nicotine, normicotin, cotinine และ myosmine ในการศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากใบราตรีออกฤทธิ์โดยเพิ่มการหดตัวแล้วตามด้วยการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายขึ้นอยู่กับขนาดที่ใช้ จะคาดได้ว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้อาจเป็น nicotine แต่จากการศึกษาโดย Thin Layer Chromatography พบว่าค่า R_F ของส่วนที่แยกได้จากสารสกัดใบราตรีซึ่งคาดว่า มีอัลคาลอยด์นั้นต่างกับค่า R_F ของ nicotine. จึงเป็นการยากที่จะบอกได้ว่าสารมีฤทธิ์คล้าย nicotine อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ทำการแยกอัลคาลอยด์ในสารสกัดใบราตรีโดยวิธี Column Chromatography พบว่าอัลคาลอยด์ที่แยกได้มีปริมาณน้อยมากเช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Halim และคณะ (1971) เมื่อนำไปทดสอบผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลายพบว่า การลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายไม่เด่นชัด จากการทดลองนี้ทำให้คาดว่าสารออกฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายอาจไม่ใช่อัลคาลอยด์จึงได้ทำวิธีการสกัด saponins จากใบราตรีแล้วนำไปทดสอบโดยวิธี froth test และ hemolysis test พบว่าได้ผลบวก แสดงว่าในใบราตรีมี saponins จึงได้นำเอาส่วนของ saponins ที่สกัดได้นี้ไปทดสอบต่อกล้ามเนื้อลายเปรียบเทียบกับ saponins บริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็นคอนโทรล พบว่าสารสกัดที่คาดว่า เป็น saponins จากใบราตรีทำให้เกิดการเพิ่มความตึงตัวของกล้ามเนื้อลายและสามารถทำให้เกิดการลดการทำงานของกล้ามเนื้อลายคล้ายกับ saponins บริสุทธิ์ และทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายได้มากและเป็นเวลานานรวมทั้งทำให้เกิดการกระตุ้นของกล้ามเนื้อลายได้คล้ายกับ saponins เช่นเดียวกัน การออกฤทธิ์ของสารสกัด saponins ที่ได้จากใบราตรีซึ่งทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายนี้สนับสนุนรายงานของ Roy และ Chatterjee (1968) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อลายในใบราตรีน่าจะเป็น saponins

ส่วนการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีต่อความดันโลหิตทำให้ลดความดันโลหิตนั้น อาจเนื่องมาจากการลดความแรงบีบตัวของหัวใจและขยายตัวของหลอดเลือดตามรายงานของ ลิวรรณ (๒๕๒๒) ผลต่อความดันโลหิตเห็นได้ชัด ในขณะที่การหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่วัดได้ อยู่ในระดับปกติ แสดงว่าการลดความดันโลหิตเกิดขึ้นก่อนที่กล้ามเนื้อลายจะอ่อนแรงลงและความดัน

โลหิตจะกลับสู่ระดับปกติภายในระยะเวลา ๑๕ นาที หลังจากนั้นกล้ามเนื้อลายจะมีการหดตัวลดลงมาก โดยเฉพาะในขนาดสูง ๆ นอกจากนี้สารสกัดจากใบราตรี มีผลลดการหดตัวของลำไส้เล็กได้ จะเห็นว่า สารสกัดใบราตรี มีฤทธิ์ต่อการหดตัวของทั้ง กล้ามเนื้อลาย และ กล้ามเนื้อเรียบ จึงเป็นที่ น่าสนใจศึกษาลักษณะทางเคมี ผลทางเภสัชวิทยา และการประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. กำจร มณูญพิญ, Phytochemical Screening Techniques หนังสือประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ ๒ ๑๒-๑๖ พฤษภาคม ขมรมพฤกษเคมี และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า ๑๔๔-๒๐๖, ๒๕๒๓.
2. ณรงค์ โทณานนท์ รายชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย งานวิจัยไม้ชั้นพื้นฐาน กองวิจัยผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ ประเทศไทย, ๒๕๒๓.
3. พาณี เตชะเสน สมุนไพร กระประยุกต์ความรู้ทางเภสัชวิทยาไปกับยาแผนโบราณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ๒๕๒๑.
4. พาณี เตชะเสน พิษวิทยา หลักการวินิจฉัยและรักษา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ๒๕๒๔.
5. สัตคารัลย์ บุญรัตนการกิจ และณอมจิต สุภาวิดา ชื่อพืชสมุนไพรและประโยชน์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ๒๕๒๓.
6. สิวรรณ นิ่มกุลรัตน์, การศึกษาฤทธิ์ของสารที่สกัดได้จากใบราตรีต่อระบบหัวใจ เส้นเลือด และการหายใจ วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ๒๕๒๒.
7. วิเชียร จีรวงศ์ หนังสือสมาคมสมุนไพร งานนิทรรศการสมุนไพร ครั้งที่ ๑ ๑๓-๑๔ ตุลาคม, ๒๕๑๘.
8. วิบูลย์ ฤทธิพิศ และ อัมพวัน อภิสริยะกุล ผลของกลอยต่อบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อ เชียงใหม่เวชสาร ๑๗ : ๖๓-๗๐, ๒๕๒๑.
9. อัมพวัน อภิสริยะกุล เภสัชวิทยาของบริเวณส่วนต่อปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ๒๕๒๗.
10. Bülbring E. Observations on the isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation of the rat. Brit J. Pharmac. 1 : 38, 1946.
11. Chakravati; R.N., S. Datta and M.N. Mitra, "Yuccagenin from cestrum nocturnum Linn". Bull Culcutta School Trop. Med. 11 : 56-57, 1963.
12. Chase, W.H. In Watt J.M., and B. Brayer (ed). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 8 edn., E&S Livingstone Ltd. London and Edinburgh, 1962, p. 945., 1903.

13. Goldstein, A., L. Aronow, and S.M. Kalman. Principles of Drug Action : The Basis of Pharmacology 2 edn, Standford University, School of Medicine, California, 1974. pp. 357-436.
14. Harborne, J.B. Phytochemical Methods. Chapman and Hall, London, 1973., pp. 182-192.
15. Halim, A.F., R.P. Collins and M.S. Berigarl "Alkaloids produced by *Cestrum nocturnum* and *cestrum diurnum*". Plants Medica. 20 : 44-49, 1971.
16. Hutcheon, 1909. In Watt, J.D. and B. Breyer (ed). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 8 edn, E&S Livingstone Ltd., London and Edinburgh, 1962, p. 945.
17. Litchfield, J.T. Dr., and F. Wilcoxon, "A Simplified method of evaluating dose-effect experiments" J. Pharmacol. Ther. 96 : 99-113 , 1949.
18. Loomis, T.A. Essentials of Toxicology. 3 edn., University of Washington, School of Medicine, Washington, 1978., pp. 16-18, 195-208.
19. Mc. Loed. et al. Pharmacological Experiments on Intact Preparations. E.&S Livingstone Ltd., London, 1970., pp 37-41.
20. Morris, C.J.O.R., and P. Morris. Separation Methods in Biochemistry. Sir. Pitman and Sons Ltd., London, 1964., pp 138-192.
21. Perry, W.L.M. et al, Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. E & S Livingstone Ltd., London, 1970., pp 30-33.
22. Roy, A.R., and M.L. Chatterjee, Pharmacological observations on saponins from *cestrum diurnum* and *cestrum nocturnum*. Indian J. Exph. Biol. 6 : 160-162., 1968.
23. Stahl, E. Thin-Layer Chromatography : A Laboratory Handbook, New York, 1969., p 421-431.
24. Walsh, L.H. 1909. In Watt, J.M., and B. Breyer (ed) The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 8 edn., E&S Livingstone Ltd., London and Edinburgh, 1962, p 145.
25. Watt, J.M. and B Breyer. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa 8 edn., E&S. Livingstone Ltd., London and Edinburgh, 1962., p 945.