

**การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์ซีทิน
(Quercetin) ซึ่งพบในใบฝรั่ง (Psidium guajava,
Myrtaceae) ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กของหนูขาว
และหนูตะเภา**

อัมพวัน อภิสริยะกุล, นุชนาฏ ชัยชนะ และ วิลาสินี อยู่สุข
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

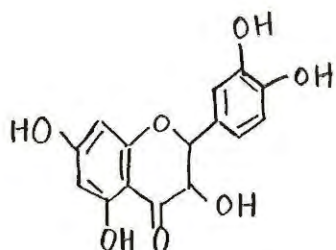
***The Pharmacological Effect of Quercetin Isolated
from the leaves of Psidium Guajava (Myrtaceae) on
Isolated Rat and Guinea-pig Ileum Preparation***

*Amphawan Apisariyakul, Nuchanart Chaichana and Wilasinee Yousukh Department
of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

Quercetin, 3,3,4,5,7-pentahydroxyflavone, a compound of yellow powder extracted from natural sources such as the leaves of Psidium guajava (Myrtaceae) exerted an inhibition of the smooth muscle contraction induced by acetylcholine, serotonin, histamine and barium chloride on isolated guinea-pig ileum preparation. It was shown that quercetin could inhibit ileal contraction induced by spasmogens with different pharmacological mechanisms and produced the inhibition of acetylcholine much more than that of serotonin, histamine and barium chloride. Therefore, the results suggested that quercetin exerts its anticholinergic properties on isolated smooth muscle preparation.

สารที่สกัดได้จากพืชธรรมชาติที่มีผลต่อการทำงานของลำไส้เล็กนั้น เราจะพบสารฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งคือ สารเคอร์ซีทิน ซึ่งสามารถพบได้ในใบและกลีบดอกของพืช โดย Lutterodt และ Maleque (1988) ได้รายงาน ว่าพบสารเคอร์ซีทินในใบฝรั่ง (Psidium guajava, Myrtaceae)⁽¹⁾ สำหรับในประเทศไทยได้มีการนำน้ำ ที่สกัดจากใบฝรั่งมาใช้รักษาอาการท้องเสีย ซึ่งสามารถ บรรเทาอาการได้ สารเคอร์ซีทินเป็นสารที่มีฟีนอลเป็นส่วนประกอบ จะปรากฏสีเหลืองชัดเจนบนกระดาษเมื่อ

ส่องด้วยแสง UV แยกจากสารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นโดย Forestal chromatograms (ค่า $R_f=41$) และสามารถแยกได้เด่นชัดโดยใช้ UV spectroscopy และ microdegradation ด้วยค่า จุดหลอมเหลวของสาร เคอร์ซีทินนี้ค่อนข้างสูง (280-357°C) สารเคอร์ซีทิน ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น ผงสีเหลือง ไม่ละลายน้ำ สูตร โครงสร้างคือ 3,3',4,5,7- pentahydroxyflavone ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$) สูตรโครงสร้างของสารเคอร์ซีทิน แสดงดังรูปที่ 1 น้ำหนักโมเลกุล = 338.3 กรัม



รูปที่ 1. แสดงสูตรโครงสร้างของสารเคอร์ซิทีน

ได้มีการศึกษาส่วนของ ileum ของหนูตะเภาที่แยกออกมานั้นพบว่า สารเคอร์ซิทีนและสารฟลาโวนอยด์บางชนิด สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย ACh, barium chloride, leukotriene B₄ และ prostaglandin E₂ ได้⁽²⁻⁵⁾ และการยับยั้งนี้พบว่าเสริมฤทธิ์กับ verapamil (Calcium channel blocker) จึงคาดว่ามีการใกล้เคียงกับแคลเซียมในการเกิดผลการยับยั้ง สารเคอร์ซิทีนยังเป็นตัวยับยั้งชนิด reversible ต่อการหดตัวของ phasic และ tonic ของ ileum ของหนูตะเภาที่ถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย ACh, prostaglandin E₂ และ antigen⁽⁶⁾ แต่ Lutterodt (1989) พบว่าสารเคอร์ซิทีนที่สกัดได้จากใบของ Psidium guajava นั้นมีการออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง ACh ในการทดลองเมื่อกระตุ้นส่วนของ ileum ของหนูตะเภาด้วยไฟฟ้า⁽⁷⁾

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบฝรั่งและสารเคอร์ซิทีนต่อการหดตัวของลำไส้เล็กของหนูขาวและหนูตะเภานอกตัวสัตว์ทดลอง รวมทั้งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่อาจเป็นไปได้

วิธีการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม และหนูตะเภา ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักประมาณ 300-400 กรัม

การเตรียมส่วนของลำไส้เล็กของหนูทดลอง (isolated ileum) เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

วิธีการเตรียมส่วนของลำไส้เล็กของหนูทดลองเพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนี้ดัดแปลงมาจากการของ Perry (1970) นำหนูทดลองมาอดอาหารหนึ่งคืนก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการผ่าตัดช่องท้องแยกลำไส้เล็กส่วนของ ileum ออกมาประมาณ 10-15 เซนติเมตร รับประทานส่วนของ ileum ที่ได้ใส่ในภาชนะแก้วที่มีน้ำยา Tyrode และออกซิเจนอยู่ ตัดส่วนของ ileum ออกเป็นท่อนๆ ท่อนละประมาณ 2 เซนติเมตร นำส่วนของ ileum ที่ได้มาใส่ใน tissue bath ที่บรรจุน้ำยา Tyrode และออกซิเจนอยู่ ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 32 องศาเซลเซียส ด้วย thermoregulator ผูกส่วนของ ileum เข้ากับ force displacement transducer FT-03C เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบด้วย Grass 7D polygraph ก่อนเริ่มทำการทดลองแต่ละครั้งปรับความตึงตัว (tension) ของกล้ามเนื้อ ileum ให้ได้ 1 กรัม บันทึกการยับยั้งของสารเคอร์ซิทีนต่อกล้ามเนื้อเรียบโดย ให้สารเคอร์ซิทีน 1 นาที่ก่อนให้ตัวกระตุ้น (spasmogen) ต่าง ๆ สำหรับตัวกระตุ้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ acetylcholine, barium chloride, serotonin และ histamine เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารเคอร์ซิทีน

การวิเคราะห์ข้อมูลและการใช้สถิติเพื่อทดสอบข้อมูล

ความสูง (amplitude) ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ที่เกิดจากการกระตุ้นโดยใช้ตัวกระตุ้นต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จะแสดงให้เห็นโดยคิดเป็นร้อยละดังนี้

ร้อยละของการลดความสูงของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

$$= \frac{[\text{control-response}]}{\text{control}} \times 100$$

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจะแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน (mean $\pm$ S.E.) การหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยสองค่า ใช้การทดสอบแบบ student "t" test โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) และ ที่ 99% ($p < 0.01$)

ผลการทดลอง

เมื่อทำการทดลองขั้นต้นโดยใช้สารสกัด (crude extract) ของใบฝรั่ง พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วย Methanol (PM) สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ acetylcholine เป็น dose-related คล้ายกับ atropine ดังแสดงในรูปที่ 2. ใน ลำไส้เล็กของหนูขาวที่แยกออกมาศึกษาในตัวสัตว์ทดลอง แสดงว่า PM มี anticholinergic effect ส่วนสารสกัดด้วย Hexane (PH) ก็สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่เกิดจาก acetylcholine ได้เช่นเดียวกัน

ในการทดลองนี้จะศึกษาฤทธิ์ของสารเคอร์ซีทีนต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูทดลองที่แยกออกมาทดลองเมื่อถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ กัน

สำหรับตัวกระตุ้นแต่ละตัวนั้นคือ acetylcholine, barium chloride, histamine และ serotonin จะใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ ileum หดตัวได้เท่า ๆ กัน คือ 1.1×10^{-6} , 8.2×10^{-6} , 9.0×10^{-7} และ 1.3×10^{-8} ตามลำดับ หยดสารเคอร์ซีทีนในขนาด 3.7×10^{-5} - 2.4×10^{-3} M ลงใน tissue bath เป็นเวลา 1 นาที ก่อนให้ตัวกระตุ้นแต่ละตัว พบว่า สารเคอร์ซีทีนสามารถยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจากตัวกระตุ้นแต่ละตัวได้ ดังแสดงในตารางที่ 1. และรูปที่ 3. และสารเคอร์ซีทีนนี้มีความแรงในการยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก ACh สูงสุด เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ขนาดของสารเคอร์ซีทีน และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine, barium chloride, histamine และ serotonin พบว่าเมื่อให้สารเคอร์ซีทีนในขนาดที่สูงขึ้นจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากขึ้นตามด้วย ดังแสดงในรูปของ dose-response regression lines (รูปที่ 4.) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) คือ 0.9909, 0.9882, 0.9707 และ 0.9859 ตามลำดับ

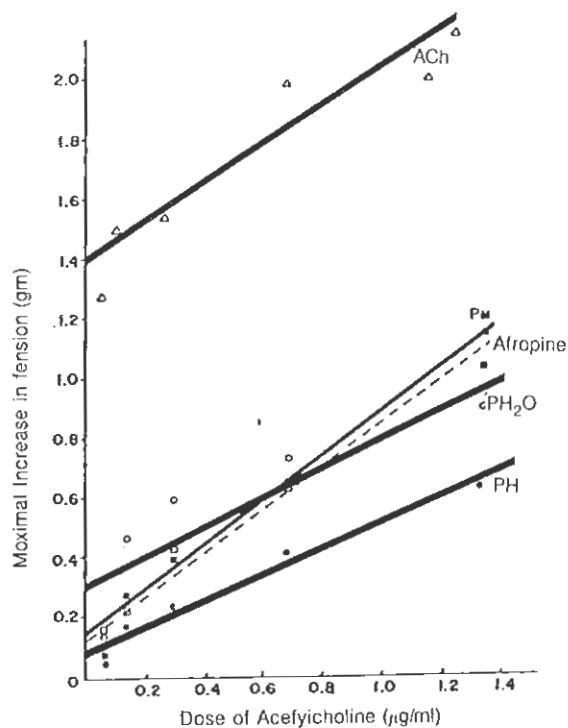
ตารางที่ 1. แสดงการเปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารเคอร์ซีทีนต่อการหดตัวของ ileum ที่ถูกกระตุ้นด้วย acetylcholine (ACh), barium chloride (BaCl_2), histamine (HA) และ serotonin (5-HT) โดยใช้กล้ามเนื้อ ileum ของหนูตะเภาที่แยกออกมาศึกษา

ขนาดของ สารเคอร์ซีทีน (โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่ถูกกระตุ้นด้วย			
	ACh ($1.1 \times 10^{-6}\text{M}$)	BaCl_2 ($8.2 \times 10^{-6}\text{M}$)	HA ($9.0 \times 10^{-7}\text{M}$)	5-HT ($1.3 \times 10^{-8}\text{M}$)
3.7×10^{-5}	$43.1 \pm 2.0^{**}$	ND	ND	ND
7.5×10^{-5}	$60.1 \pm 6.0^{**}$	$35.8 \pm 9.7^*$	ND	ND
1.5×10^{-4}	$68.5 \pm 3.9^{**}$	$59.5 \pm 13.2^*$	$42.5 \pm 3.3^{**}$	ND
3.0×10^{-4}	$83.2 \pm 2.2^{**}$	$82.1 \pm 4.1^{**}$	$67.5 \pm 4.6^{**}$	$38.2 \pm 5.2^{**}$
6.0×10^{-4}	ND	$93.1 \pm 1.1^{**}$	$88.7 \pm 1.8^{**}$	$63.4 \pm 9.1^{**}$
1.2×10^{-3}	ND	ND	$94.7 \pm 1.4^{**}$	$78.2 \pm 6.3^{**}$
2.4×10^{-3}	ND	ND	ND	$90.7 \pm 3.6^{**}$

ND : Not determined

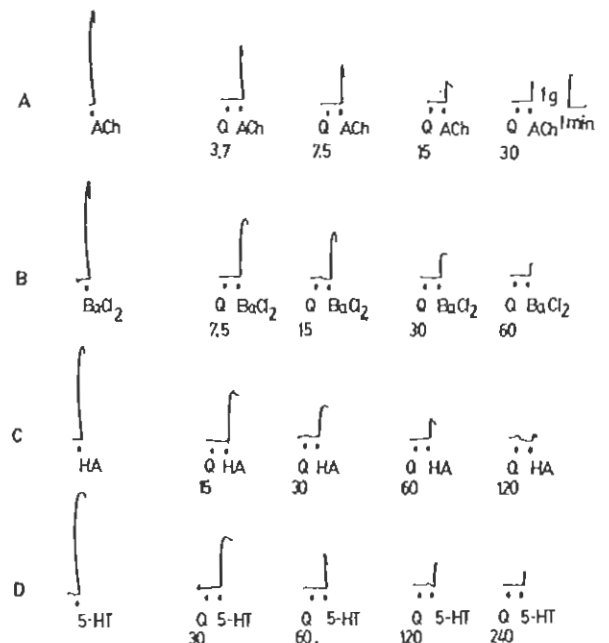
ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน ($n = 5$)

*, ** ค่าแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $p < 0.01$)



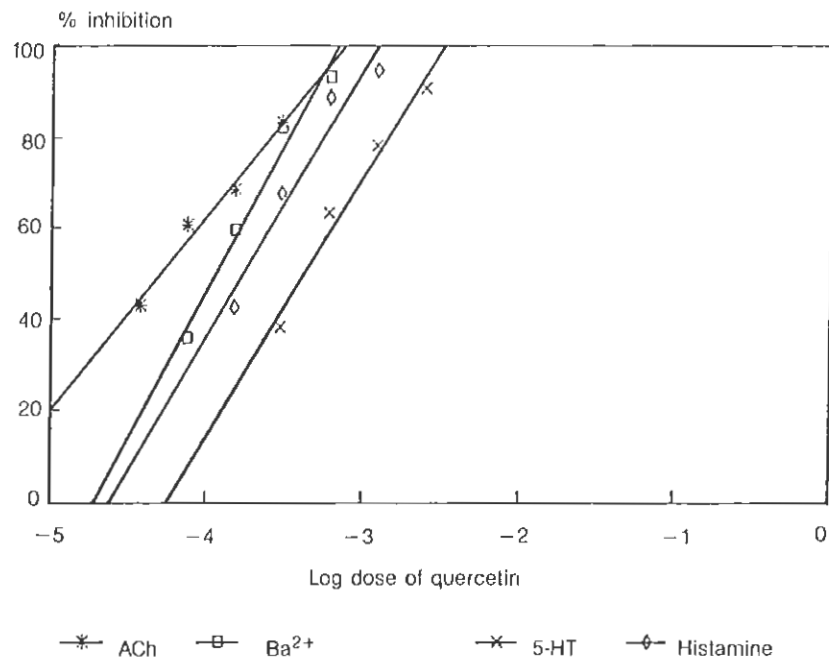
รูปที่ 2. แสดง dose-response regression line ของสารสกัดจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ต่อลำไส้เล็กของหนูขาวที่แยกออกมาศึกษา นอกตัวสัตว์ทดลอง

PM : สารสกัดที่สกัดจาก methanol
 PH₂O : สารสกัดที่สกัดจาก น้ำ
 PH : สารสกัดที่สกัดจาก hexane



รูปที่ 3. แสดงการยับยั้งของสารเคอร์ซีทีนต่อการหดตัวของ ileum ที่ถูกกระตุ้นด้วย acetylcholine (ACh), barium chloride (BaCl₂), histamine (HA) และ serotonin (5-HT) โดยใช้กล้ามเนื้อ ileum ของหนูตะเภาที่แยกออกมาศึกษา

A : สารเคอร์ซีทีน ($3.7-30 \times 10^{-6}$ M) สามารถยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก ACh (1.1×10^{-6} M) ได้
 B : สารเคอร์ซีทีน ($7.5-60 \times 10^{-6}$ M) สามารถยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก barium chloride (8.2×10^{-6} M) ได้
 C : สารเคอร์ซีทีน ($15-120 \times 10^{-6}$ M) สามารถยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก histamine (9.0×10^{-6} M) ได้
 D : สารเคอร์ซีทีน ($30-240 \times 10^{-6}$ M) สามารถยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก 5-HT (1.3×10^{-6} M) ได้



รูปที่ 4. แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารเคอร์ซีทินต่อการหดตัวของ ileum ที่ถูกกระตุ้นด้วย acetylcholine (ACh), barium chloride (Ba^{2+}), histamine และ 5-HT โดยใช้กล้ามเนื้อ ileum ของหนูตะเภาที่แยกออกมาศึกษา ซึ่งแสดงในรูปของ log dose regression-lines

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า สารเคอร์ซีทิน มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ถูก กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ส่วนของ ileum ของหนูตะเภา ซึ่งตัวกระตุ้นที่ใช้คือ ACh, barium chloride, histamine และ 5-HT เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ACh ออกฤทธิ์โดยจับกับ M_3 -receptor บนผิวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ ileum ของหนูตะเภา จากนั้นกระตุ้น phosphoinositide hydrolysis ทำให้เกิดการหลั่ง Ca^{2+} ออกจาก internal membrane ส่งผลให้ กล้ามเนื้อเรียบหดตัว⁽⁸⁾ ส่วน barium chloride ออกฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อ contractile proteins โดยการไปจับกับ calmodulin กลายเป็น Ba^{2+} -calmodulin complex ซึ่งจะไปกระตุ้น myosin light chain kinase ส่งผลให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว^(9,10) สำหรับกลไกของ histamine นั้น จะไปกระตุ้น H_1 -receptor บนผิวกล้ามเนื้อเรียบ

หรือ H_2 -receptor บน myenteric plexus ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว^(11, 12) ส่วน 5-HT ออกฤทธิ์ผ่าน D-receptor หรือ $5-HT_2$ -receptor บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ⁽¹³⁾ และ ยังสามารถออกฤทธิ์ผ่าน M-receptor หรือ $5-HT_3$ -receptor บน myenteric plexus ซึ่งทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ จากการทดลองนี้พบว่า สารเคอร์ซีทินมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจากตัวกระตุ้นแต่ละตัวที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งผลนี้ตรงกับรายงานที่กล่าวมาข้างต้น จากการศึกษานี้อาจสรุปได้ว่า สารเคอร์ซีทินมีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบด้วยกลไกหลายกลไก อย่างไรก็ตาม สารเคอร์ซีทินให้ผลในการยับยั้งการหดตัวของ ileum ที่เกิดจาก ACh มากที่สุด นั่นคือ สารเคอร์ซีทินมีกลไกในการออกฤทธิ์ผ่าน M_3 -receptor ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ ileum ของหนูตะเภาด้วย จากการวิจัยนี้พบว่า สารสกัดจากใบฝรั่งมี anticholinergic effect ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหนูขาว สามารถยับยั้งการหดตัวที่เกิดจาก

acetylcholine ในกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กของหนูตะเภาด้วย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่ว่า สารเคอร์ซีทีนอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการบรรเทาอาการท้องเดินได้

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยนี้ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจนเสร็จเรียบร้อย ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้และขอขอบคุณหน่วยสัตวทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ช่วยเหลืองานด้านสัตวทดลอง

References

- Lutterodt, G.D. and Malegue, A.: Effects on locomotor activity in mice of narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves. J. Ethnopharmacol 1988; 24:219-231.
- Middleton, E. The Flavonoids. Trends in Biological Science, 5:335-338, 1984.
- Abdalla, S.S. and Abu Zarga, M.H. : Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica*, on isolated guinea pig ileum. Planta Medica 1987; 53:322-324.
- Capasso, F. Pinto, A. Mascolo, N. Autore, G. and Franco, F.P. : Effects of flavonoids on PEG₂- and LTD₄-induced contractions of the guinea-pig ileum. Pharmacol Res Commun 1988, 20:201-202.
- Capasso, A. Pinto, A. Mascolo, N. Autore, G. and Capasso F. : Reduction of agonist-induced contractions of the guinea-pig isolated ileum by flavonoids. Phytotherapy Research. 1991; 5:85-87.
- Macander, P. : Flavonoids affect acetylcholine, prostaglandin E₂ and antigen-mediated smooth muscle contraction. Prog. Clin. Biol. Res 1986; 213:489-492.
- Lutterodt, G.D. : Unhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrheal disease. J. Ethnopharmacol. 1989; 25:235-247.
- Ashkenazi, A. Peralta, E.G. Winslow, J.W., Ramachandran, J. and Capon, J. : Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. Trends Pharmacol Sciences Suppl Dec 1989; 16-22.
- Nasu, T. and Urakawa, N. : Effect of cholinergic drugs on calcium movement in guinea-pig taenia coli. Japanese J Pharmacol 1973; 24:467-473.
- Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. : Strontium accumulation by sarcoplasmic reticulum and mitochondria in vascular smooth muscle. Science 1971; 174:954-958.
- Bareicha, I. and Silva, M.R.E. : Occurrence of H₂-receptors for histamine in the guinea pig intestine. Biochem Pharmacol 1975; 24:1215-1219.
- Barker, L.A. and Ebersole, B.J. : Histamine H₂-receptors on guinea-pig ileum myenteric plexus neurones mediate the release of contractile agents. J Pharmacol Exp Ther 1982; 221:69-75.
- Gaddum, J.H. and Picarelli, Z.P. : Two kinds of tryptamine receptor. Br J Pharmacol 1957; 12:323-328.
- Costa, M. and Furness, J.B. : The site of action of 5-hydroxytryptamine in nerve-muscle preparations from the guinea-pig small intestine and colon. Br J Pharmacol 1979; 65:237-248.
- Wood, J.D. and Mayer, C.J. : Serotonergic activation of tonic type enteric neurons in guinea-pig small bowel. J Neurophysiol 1979; 42:582-593.
- Saxena, P.R. Richardson, B.P. Mylecharane, E.J. Middlemiss, D.N. Humphrey, P.P.A. Fozard, J.R. Feniuk, W. Engel G. and Bradley, P.B. : Functional receptors for 5-hydroxytryptamine. Trends Pharmacol sciences 1986; 7.