การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นระย่อม

Investigation on Bioactive Compounds from *Rauvolfia serpentina*

ธิติมา รุกขไชยศิริกุล[11] สุวดี โชคชัยสิริ[2] ณัฐพล อภิรติกุล[3]
เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร[4] และรชต จันธนะตระกูล[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเหนือดินของต้นระย่อม (*Rauvolfia serpentina*) สามารถแยกสารได้ 6 ชนิด คือ สารผสมของ β-sitosterol (1) และ stigmasterol (2), picrinine (3), yohimbine (4) และสารผสมของ *E*/*Z*-vallesiachotamine (5 และ 6) โครงสร้างของสารทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สารผสม 5 และ 6 สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกจากพืชในสกุล *Rauvolfia* ส่วนสาร 3 สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกจากพืชชนิดนี้ ได้นำสารที่แยกได้จากส่วนเหนือดินและรากของต้นระย่อมมาทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งพบว่า rescidine (19) แสดงความเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) (IC_{50} 35.96 μg/ml) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) (IC_{50} 43.66 μg/ml) และเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงจากไตตัวอ่อนมนุษย์ (HEK293) (IC_{50} 43.66 μg/ml) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่า suaveoline (20) แสดงฤทธิ์สูงสุดในการต้านเชื้อแบคทีเรีย methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK-1 (MIC 200 μg/ml) และเชื้อยีสต์ *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 flucytosine-resistant (CN90113) (MIC 64 μg/ml) และพบว่า sarpagine (23) แสดงฤทธิ์สูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} 29.25 μM)

คำสำคัญ : ต้นระย่อม ฤทธิ์ทางชีวภาพ Apocynaceae *Rauvolfia serpentina*

ABSTRACT

Investigation of chemical constituents from the aerial part of *Rauvolfia serpentina* has led to the isolation of six compounds, a mixture of β-sitosterol (1) and stigmasterol (2), picrinine (3), yohimbine (4) and a mixture of *E/Z*-vallesiachotamine (5 and 6). The structures of all compounds were elucidated by spectroscopic techniques. A mixture of 5 and 6 was identified for the first time from the genus *Rauvolfia*, whereas compound 3 was identified for the first time from this species. The isolated compounds from the the aerial part and the root of *R. serpentina* were evaluated for their cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities.

[1] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
[2] นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
[3] อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[4] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

For cytotoxicity, rescidine (19) exhibited the highest activity against human cervical epithelial adenocarcinoma (HeLa) (IC_{50} 35.96 μg/ml), human colon adenocarcinoma (HT29) cell lines (IC_{50} 43.66 μg/ml) and human embryonic kidney (HEK293) cell (IC_{50} 43.66 μg/ml). Suaveoline (20) showed the highest antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK-1 (MIC 200 μg/ml) and the highest antiyeast activity against *Cryptococcus neoformans* (CN90113) (MIC 64 μg/ml) whereas sarpagine (23) showed the highest antioxidant activity (IC_{50} 29.25 μM).

Keywords : Apocynaceae, Bioactivities, *Rauvolfia serpentina*, Rayom

บทนำ

ระย่อมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rauvolfia serpentine* Benth. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นมีความสูงไม่เกิน 60 เซนติเมตร เปลือกเป็นสีขาว และมีน้ำยางสีขาว ดอกเป็นช่อสีขาว ชมพู หรือสีแดง ลักษณะดอกคล้ายดอกเข็ม ใบออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ลักษณะใบเป็นรูปรีแกมรูปหอกตรงปลายใบแหลม ผลอ่อนเป็นสีเขียว ส่วนผลสุกเป็นสีดำ สรรพคุณทางยาของระย่อม รากเป็นยาลดความดันและช่วยระงับอาการปวด โดยมี reserpine ซึ่งเป็นสารหลักเป็นตัวที่ออกฤทธิ์มากที่สุด เป็นยากล่อมประสาท รักษาอาการไข้ขับระดู รักษาอาการท้องเดิน โรคบิด ยาต้มจากรากช่วยขับปัสสาวะ เพิ่มการบีบตัวของกระเพาะปัสสาวะ และขับพยาธิ น้ำจากใบใช้เป็นยารักษาโรคแก้วตามัว (วิทย์, 2548)

พืชในสกุล *Rauvolfia* พบกระจายอยู่ทั่วไปในป่าดิบชื้น มีอยู่ประมาณ 85 ชนิดในโลก ในประเทศไทยมีเพียง 5 ชนิดได้แก่ ระย่อมหลวง (*Rauvolfia cambodiana*) ระย่อมใบบาง (*R. micrantha*) ระย่อม (*R. serpentina*) ระย่อมตีนเป็ด (*R. sumatrana*) และระย่อมใหญ่ (*R. verticillata*) (Smitinand, 2001) แต่ที่ใช้เป็นพืชสมุนไพรมีเพียง 3 ชนิด คือ ระย่อม ระย่อมหลวง และระย่อมใหญ่ สมุนไพรทั้งสามชนิดมีสรรพคุณคล้ายๆ กัน เป็นที่ทราบกันว่าพืชในสกุลนี้หลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคความดันโลหิตสูง และโรคเกี่ยวกับระบบส่วนกลาง จึงทำให้พืชในสกุล *Rauvolfia* ได้รับความสนใจศึกษากันเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมีของพืชในสกุล *Rauvolfia* พบว่าองค์ประกอบหลักคือสารกลุ่มอินโดลอัลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างที่หลากหลาย สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ เช่นฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activity) (Bemis et al., 2006) ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (antimalaria activity) (Wright et al., 1996) ลดความดัน (antihypertensive property) (Abele et al., 2003) ระงับประสาท (sedative property) (Neuss, 1980)

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากระย่อม พบอินโดลอัลคาลอยด์หลายกลุ่มได้แก่ กลุ่ม yohimbine, กลุ่ม heteroyohimbine, กลุ่ม ajmaline และ กลุ่ม sarpagine แต่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ค่อนข้างน้อย (Siddiqui et al., 1985a,b, 1987 a-e; Hanhinen and Lounasmaa, 2001; Wachsmuth and Matusch, 2002; Itoh et al., 2005) และเมื่อเร็วๆ นี้ Rukachaisirikul et al. (2017) ได้รายงานการแยกสารใหม่ในกลุ่ม ajmaline 1 ชนิดคือ 21-*O*-methylisoajmaline และสารที่เคยพบมาแล้วอีก 21 ชนิด คือ 6'-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl) glomeratose A, ajmaline, isoajmaline, (+)-tetraphyllicine, yohimbine, reserpine, reserpinine, loganic acid, 7-deoxyloganic acid, สารผสมของ β-sitosterol และ stigmasterol, tetrahydroalstonine, venoterpine, 3-*epi*-β-yohimbine, methyl 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamate, สารผสมของ β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside และ stigmasterol 3-*O*-β-D-glucopyranoside, rescidine, suaveoline, 3-hydroxysarpagine และ sarpagine จากรากระย่อม และได้รายงานว่า reserpine แสดงฤทธิ์ขยายหลอดเลือดสูงสุด (vasorelaxant activity) (EC_{50} 0.05 μM)

คือมีฤทธิ์มากกว่าสารมาตรฐานอะซีติลโคลีนประมาณ 1.6 เท่า และ suaveoline แสดงฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (anticholinesterase activity) (IC_{50} 15.58 μM) สำหรับบทความนี้จะรายงานการสกัดแยกสารจากส่วนเหนือดินของระย่อมซึ่งมีผู้ทำการศึกษาน้อย และทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนเหนือดินและรากของระย่อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารและการแยกสาร

นำส่วนเหนือดินที่แห้งและบดจนละเอียดแล้ว (404.4 ก.) มาแช่ในเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และเมทานอลตามลำดับที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองตัวทำละลายและนำไประเหยภายใต้ความดัน ได้สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลอะซีเตต และสารสกัดชั้นเมทานอลตามลำดับ

นำสารสกัดชั้นเฮกเซน (21.3 ก.) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ใช้ซิลิกาเจล และใช้ระบบชะเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ) รวมกลุ่มได้ 8 กลุ่ม (H1-H8) นำกลุ่ม H4 (2.27 ก.) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ใช้ซิลิกาเจล และใช้ระบบชะเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 80:20) ได้สารผสมระหว่าง β-sitosterol (1) และ stigmasterol (2) (45.1 มก.)

นำสารสกัดชั้นเอทิลอะซีเตต (7.2 ก.) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ใช้ซิลิกาเจลและใช้ระบบชะเฮกเซน เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ) รวมกลุ่มได้ 7 กลุ่ม (E1-E7) นำกลุ่ม E4-E6 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีหลายครั้ง แต่ไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้

นำสารสกัดชั้นเมทานอล (37.7 ก.) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ใช้ Sephadex LH-20 และใช้ระบบชะเมทานอล-ไดคลอโรมีเทน 60:40) รวมกลุ่มได้ 4 กลุ่มย่อย (M1-M4) กลุ่ม M2 (8.8 ก.) ถูกนำมาแยกด้วยคอลัมน์โคร-มาโตกราฟี (ใช้ซิลิกาเจล และใช้ระบบชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 97:3) รวมกลุ่มได้ 8 กลุ่มย่อย (M2.1-M2.8) นำกลุ่ม M2.3 (1.8 ก.) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ใช้ Sephadex LH-20 และใช้ระบบชะเมทานอล-ได-คลอโรมีเทน 70:30) รวมกลุ่มได้ 3 กลุ่มย่อย (M2.3.1-M2.3.3) นำกลุ่ม M2.3.1 (40 มก.) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมา-โตกราฟี 2 ครั้ง (ใช้ซิลิกาเจล ใช้ระบบชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ครั้งแรกใช้อัตราส่วน 99.5:0.5 ส่วนครั้งที่สองใช้อัตราส่วน 97:3) ได้ picrinine (3) (3.6 มก.) กลุ่ม M2.3.2 (1.45 ก.) ถูกนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเหมือนกลุ่ม M2.3.1 ได้ yohimbine (4) (9.6 มก.) นำกลุ่ม M2.5 (1.19 ก.) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 3 ครั้ง (ใช้ซิลิกาเจล และใช้ระบบชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 90:10) ได้สารผสม *E/Z*-vallesiachotamine (5 และ 6) (4.5 มก.)

สารผสม 1 และ 2 เป็นผงสีขาว จากการเปรียบเทียบ ^{1}H NMR สเปกตรัมกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ (Chaturvedula & Prakash, 2012) และเปรียบเทียบ TLC กับ สาร authentic สรุปได้ว่าสาร 1 และ 2 คือ สารผสมระหว่าง β-sitosterol และ stigmasterol; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0.65, 0.67, 0.78, 0.82, 0.98 และ 1.22 (สัญญาณละ 3H, s, 6 x CH_3), 3.50 (1H, m, H-3), 4.99 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.6 Hz, H-23 ของ stigmasterol), 5.12 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.6 Hz, H-22 ของ stigmasterol), 5.33 (1H, br s, H-6).

สาร 3 เป็นผงสีเหลืองอ่อน $[\alpha]_D^{27}$ -16.8° (c 0.34, $CHCl_3$) (lit. $[\alpha]_D$ -42°, $CHCl_3$) (Chatterjee et al., 1965); จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR และการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่มีผู้รายงานไว้ (Batista et al., 1996) สรุปได้ว่าสาร 3 คือ picrinine; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.46 (3H, d, *J* = 5.8 Hz, H-18), 1.84 (1H, br d, *J* = 11.4 Hz, Ha-14), 2.13 (1H, dt, *J* = 11.4, 3.6 Hz, Hb-14), 2.25 (1H, dd, *J* = 13.6, 2.0 Hz, Ha-6), 2.42 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-16), 3.10 (1H, d, *J* = 17.6 Hz, Ha-21), 3.27

(1H, br s, H-15), 3.40 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, Hb-6), 3.63 (3H, s, $COOCH_3$), 3.76 (1H, br d, *J* = 17.6 Hz, Hb-21), 3.88 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-3), 4.84 (1H, br s, H-5), 5.27 (1H, s, -NH), 5.40 (1H, br q, *J* = 5.8 Hz-19), 6.74 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-12), 6.77 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-10), 7.06 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-11), 7.11 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-12); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 12.7 (C-18), 25.8 (C-14), 30.9 (C-15), 40.2 (C-6), 46.2 (C-21), 51.1 (C-7), 51.4 ($COOCH_3$), 51.7 (C-16), 52.0 (C-3), 87.3 (C-5), 106.2 (C-2), 110.6 (C-12), 120.8 (C-10, 19), 125.0 (C-9), 128.8 (C-11), 135.0 (C-8), 135.4 (C-20), 147.4 (C-13), 172.3 (C-17); ESMS (+ve): m/z (% rel. Intensity) 339.8 $[M+H]^+$ (100).

สาร 4 เป็นผงสีเหลืองอ่อน $[\alpha]_D^{29}$ +57.2° (c 1.34, MeOH) (lit. $[\alpha]_D^{25}$ +57.8°, MeOH) (Torres et al., 2013); จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR และการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่มีผู้รายงานไว้ (Clivio et al., 1991; Torres et al., 2013) สรุปได้ว่าสาร 4 คือ yohimbine; ^{1}H NMR ($CDCl_3$ + 3 หยดของ CD_3OD, 400 MHz): δ 1.24 (1H, q, *J* = 11.8 Hz, Ha-14), 1.35 (1H, m, Ha-19), 1.50 (2H, Ha-19, H-20)[a], 1.51 (1H, Ha-18)[a], 1.91 (1H, Hb-18)[b], 1.95 (1H, H-15)[b], 2.04 (1H, br d, Hb-14), 2.15 (1H, t, *J* = 10.4 Hz, Ha-21), 2.28 (1H, dd, *J* = 11.6, 1.6 Hz, H-16), 2.55 (1H, td, *J* = 10.8, 4.2 Hz, Ha-5), 2.69 (1H, br d, *J* = 16.0 Hz, Ha-6), 2.86 (1H, br d, *J* = 10.4 Hz, Hb-21), 2.92 (1H, m, Hb-6), 3.01 (1H, m, Hb-5), 3.26 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-3), 3.73 (3H, s, OCH_3), 7.01 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-10), 7.06 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11), 7.25 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-12), 7.40 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-9), 8.66 (1H, br s, -NH), [a,b] สัญญาณซ้อนทับกัน; ^{13}C NMR ($CDCl_3$ + 3 หยดของ CD_3OD, 100 MHz): 21.4 (C-6), 23.1 (C-19), 31.3 (C-18), 33.6 (C-14), 36.4 (C-15), 40.1 (C-20), 51.7 (-OCH_3), 52.0 (C-16), 52.8 (C-5), 60.0 (C-3), 61.1 (C-21), 66.8 (C-17), 107.4 (C-7), 110.7 (C-12), 117.9 (C-9), 119.0 (C-10), 121.0 (C-11), 127.0 (C-8), 134.1 (C-2), 135.9 (C-13), 175.5 (CO); ESMS (+ve): m/z (% rel. Intensity) 355.5 $[M+H]^+$ (100).

สารผสม 5 และ 6 เป็นผงสีเหลืองอ่อน $[\alpha]_D^{27}$ +32.9° (c 0.35, $CHCl_3$) (lit. $[\alpha]_D^{25}$ -54°, c 0.06, $CHCl_3$ ของ *E*-vallesiachotamine และ $[\alpha]_D^{25}$ +204°, c 0.1, $CHCl_3$ ของ *Z*-vallesiachotamine) (Waterman and Zhong, 1982); จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR และการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่มีผู้รายงานไว้ (Sauerwein and Shimomura, 1990; Waterman and Zhong, 1982) สรุปได้ว่าสารผสม 5 และ 6 คือ *E/Z*-vallesiachotamine; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 1.89 (1H, m, Ha-14), 2.06 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-18 ของ *E*-isomer), 2.15 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-18 ของ *Z*-isomer)[a], 2.15 (1H, Hb-14)[a], 2.78 (1H, m, Ha-6), 2.89 (1H, m, Hb-6), 3.60 (3H, s, H-22), 3.71 (2H, m, H-5), 3.97 (1H, br s, H-15), 4.20 (1H, br d, *J* = 11.2 Hz, H-3 ของ *Z*-isomer), 4.43 (1H, br d, *J* = 10.0 Hz, H-3 ของ *E*-isomer), 6.51 (1H, q, *J* = 7.5 Hz, H-17 ของ *Z*-isomer), 6.65 (1H, q, *J* = 7.2 Hz, H-17 ของ *E*-isomer), 7.08 (1H, m, H-10), 7.12 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, H-11), 7.27 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-12), 7.45 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-9), 7.65 (1H, s, H-21), 8.14 (1H, br s, -NH), 9.33 (1H, s, H-23 ของ *E*-isomer), 10.25 (1H, s, H-23 ของ *Z*-isomer), [a] สัญญาณซ้อนทับกัน; ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 14.9 (C-18), 22.0 (C-6), 28.2 (C-15), 33.8 (C-14), 49.3 (C-3), 50.6 (C-22), 51.0 (C-5), 90.4 (C-20), 108.5 (C-7), 110.9 (C-12), 118.5 (C-9), 119.9 (C-10), 122.9 (C-11), 128.0 (C-8), 133.0 (C-2), 137.0 (C-13), 146.3 (C-16), 147.1 (C-21), 152.9 (C-17), 168.5 (C-19), 196.0 (C-23); ESMS (-ve): m/z (% rel. Intensity) 349.7 $[M-H]^-$ (100).

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactivity Assay)

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในปริมาณมากพอจากส่วนเหนือดินและรากของต้นระย่อมซึ่งนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ yohimbine (4), 6'-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)glomeratose A (7), ajmaline (8), isoajmaline (9), (+)-tetraphyllicine (10), reserpine (11), reserpinine (12), loganic acid (13), 7-deoxyloganic acid (14), tetrahydroalstonine (15), venoterpine (16), 3-*epi*-α-yohimbine (17), methyl 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamate (18), rescidine (19), suaveoline (20), 21-*O*-methylisoajmaline (21), 3-hydroxysarpagine (22) และ sarpagine (23)

2.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic activity)

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้วิธี resazurin microplate assay (Brien et al., 2000) และ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งถูกดัดแปลงสำหรับ mammalian cell cytotoxicity (Freimoser et al., 1999) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ Vero cells (African green monkey kidney) ใช้วิธี green fluorescent protein (GFP)-based assay สำหรับเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงจากไตตัวอ่อนมนุษย์ (HEK293) เซลล์มะเร็งเหล่านี้ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เซลล์ HeLa, HT29 และ HEK293 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์, penicillin 100 ยูนิต/มล., streptomycin 100 ไมโครกรัม/มล. และ *l*-glutamine (4 มิลลิโมลาร์) โดยเซลล์ทุกชนิดถูกเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเซลล์ MCF-7 ถูกเพาะเลี้ยงเหมือนวิธีที่กล่าวข้างต้นยกเว้นอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย insulin 1 เปอร์เซ็นต์

วิธีทดสอบ นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ให้มีความหนาแน่น 10,000 เซลล์ต่อหลุม และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง ละลายสารตัวอย่างในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ เติมลงในเซลล์ที่เป็น monolayer ของเซลล์มะเร็ง แล้วเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การกำหนดเซลล์รอดชีวิต (cell viability) ใช้วิธี MTT assay โดยนำเซลล์ไปบ่มกับสารละลาย 0.5% MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออก เติม DMSO 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการวัดแถบดูดกลืนที่ 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) หาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ในการทดสอบนี้ใช้ doxorubicin เป็น positive control ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (SA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK-1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (PA), *Escherichia coli* ATCC25922 (EC), *Acinetobacter baumannii* NPRC005 (AB005) เชื้อยีสต์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Candida albicans* NCPF3153 (CA3153), *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 flucytosine-resistant (CN90113) เชื้อราที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Microsporum gypseum* clinical isolate (Mg) และ *Penicillium marnefeii* clinical isolate (PM)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ broth microdilution method ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012)

วิธีทดสอบ นำสารทดสอบมาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 มก./มล. สำหรับเก็บเป็น stock solution แล้วเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นเจือจางด้วยอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:25 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มล. ดูดสารทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม สารทดสอบละ 3 หลุม นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจางด้วย MHB ในอัตราส่วน 1:200 ดูดเชื้อมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่มีสารทดสอบ ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นเท่ากับ 200 ไมโครกรัม/มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง หยอดสี resazurin (0.18%) 10 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาต้านแบคทีเรียควบคู่กับสารทดสอบทุกครั้งโดยใช้ยา vancomycin สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ MRSA และใช้ยา gentamicin สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล.

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ microdilution method CLSI MA38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008a)

วิธีทดสอบ ทำการทดสอบในทำนองเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่ใช้อาหาร SDB ในการทดสอบ และใช้เชื้อยีสต์ที่เตรียมขึ้น แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* จากนั้นทำการหยอดสี resazurin (0.18%) 10 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม บ่มต่อ 2-3 ชั่วโมง สำหรับ *C.albicans* และ 24 ชั่วโมงสำหรับ *C.neoformans*

ทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์ของยาต้านยีสต์ควบคู่กับสารสกัดทุกครั้งโดยใช้ยา amphotericin B ทดสอบกับยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล.

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ microdilution method CLSI MA27-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008b)

วิธีทดสอบ ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีสต์ แต่ใช้เชื้อราที่เตรียมขึ้น แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อราทุกวันภายใต้กล้อง stereo zoom และจะทำการหยอดสี resazurin (0.18%) 10 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมเมื่อทำการบ่มได้ 3 วัน

การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ให้ทำการทดสอบในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยใช้สารทดสอบที่ความเข้มข้น 0.25-128 ไมโครกรัม/มล. ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น การอ่านค่า MIC จะอ่านที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งเชื้อได้โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมนั้นยังคงเป็นสีน้ำเงิน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH radical scavenging activity (Blois, 1958; Mokbel and Hashinaga, 1996)

วิธีทดสอบ เติมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical (ในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.004% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 2 มล. ลงในสารละลายของสารตัวอย่างในเมทานอล (1 มล.) ซึ่งมีความเข้มข้นต่างๆ กัน 6 ความเข้มข้น ตั้งสารผสมในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำสารผสมไปวัดค่า absorbance โดยใช้

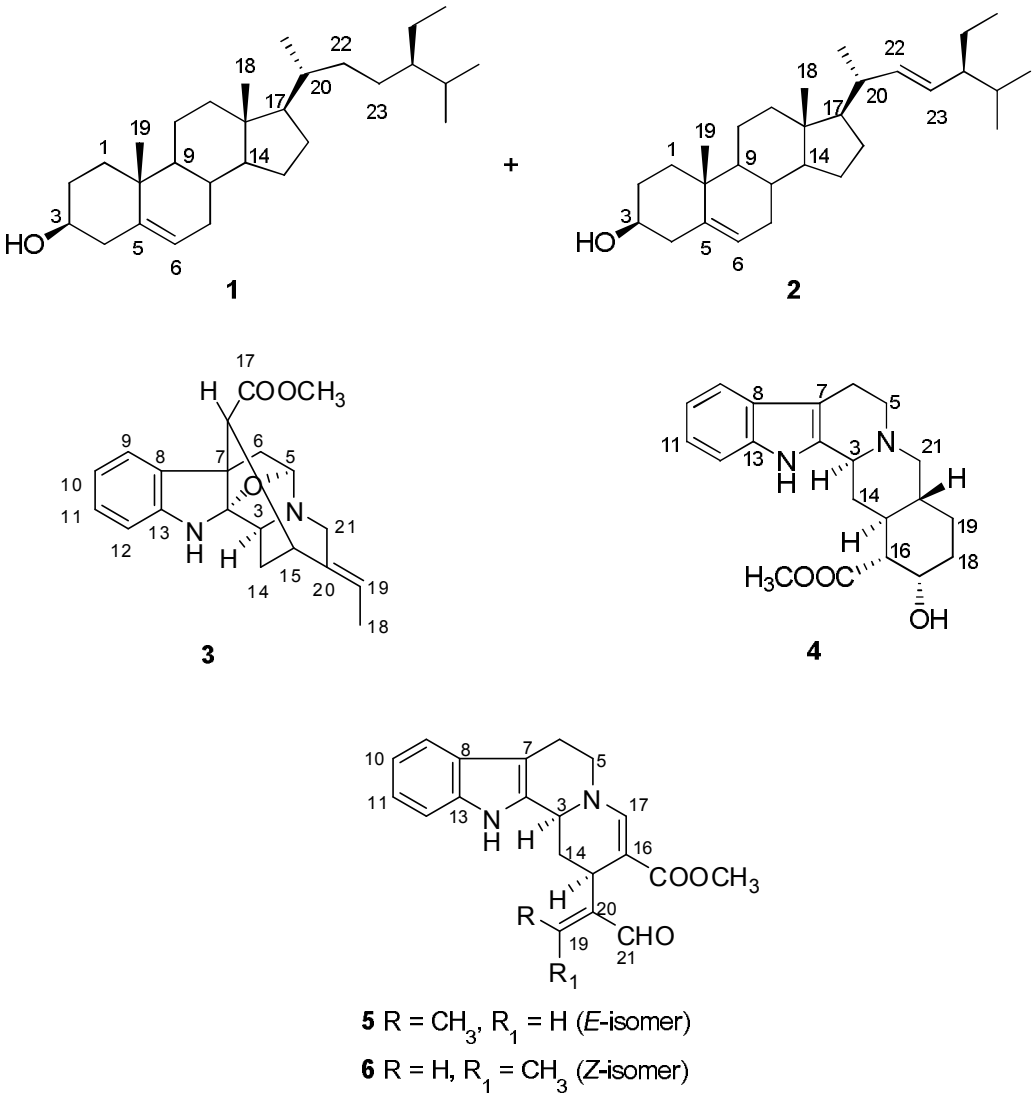
เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การคำนวณค่า % inhibition ของ DPPH free radical (I%) มีสูตรดังนี้

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample}/A_{blank}) \times 1000$$

เมื่อ A_{blank} คือ absorbance ของ control reaction และ A_{sample} คือ absorbance ของสารตัวอย่าง ส่วนความเข้มข้นของสารที่แสดง 50% inhibition (IC_{50}) คำนวณจากกราฟที่พลอตระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารละลาย การทดสอบทำ 3 ซ้ำ ใช้ gallic acid เป็น positive control

ผลการวิจัย

จากการนำส่วนเหนือดินของต้นระย่อมมาแช่ในเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และเมทานอลตามลำดับที่อุณหภูมิห้องแล้วนำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นเฮกเซน 2 ชนิด คือ สารผสมระหว่าง β-sitosterol (1) และ stigmasterol (2) (Chaturvedula and Prakash, 2012) และจากสารสกัดชั้นเมทานอลแยกได้ 3 ชนิด คือ picrinine (3) (Batista et al., 1996), yohimbine (4) (Clivio et al., 1991; Torres et al., 2013) และ สารผสมของ *E/Z*-vallesiachotamine (5 และ 6) (Sauerwein and Shimomura, 1990; Waterman and Zhong, 1982) สำหรับการหาเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 1-6 (รูปที่ 1) อาศัยข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปีโดยใช้เทคนิค NMR เป็นส่วนใหญ่และทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานไว้แล้ว สารผสม 1 และ 2 และสาร 4 เคยแยกได้จากรากของต้นระย่อม (Rukachaisirikul et al., 2017) สาร 3 เคยแยกได้จากพืชในสกุล *Rauvolfia* หลายชนิด เช่นจากใบของ *Rauwolfia sellowii* (Batista et al., 1996) ส่วนสารผสม 5 และ 6 เคยแยกได้จากพืชหลายชนิด เช่นเมล็ดของ *Strychnos tricalysioides* (Waterman and Zhong, 1982) รากของ *Amsonia elliptica* (Sauerwein and Shimomura, 1990) และส่วนเหนือดินของ *Psychotria bahiensis* (Paul et al., 2003) อย่างไรก็ตามสารผสม 5 และ 6 สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกจากพืชสกุล *Rauvolfia* ส่วนสาร 3 สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกจากพืชชนิดนี้



รูปที่ 1 โครงสร้างของสาร **1-6** ซึ่งแยกได้จากส่วนเหนือดินของต้นระย่อม

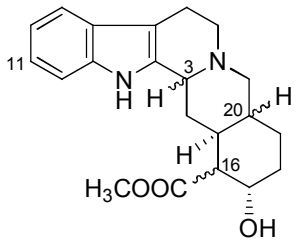
นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในปริมาณมากพอจากส่วนเหนือดินและรากของต้นระย่อมมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ชนิด คือ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1-3 สำหรับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนเหนือดินและรากของต้นระย่อมที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ yohimbine (4), 6'-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)glomeratose A (7), ajmaline (8), isoajmaline (9), (+)-tetraphyllicine (10), reserpine (11), reserpinine (12), loganic acid (13), 7-deoxyloganic acid (14), tetrahydroalstonine (15), venoterpine (16), 3-*epi*-α-yohimbine (17), methyl 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamate (18), rescidine (19), suaveoline (20), 21-*O*-methylisoajmaline (21), 3-hydroxysarpagine (22) และ sarpagine (23) (รูปที่ 2)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในตารางที่ 1 พบว่าสาร 4, 7-10, 13, 14, 16-18 และ 21-23 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงจากไตตัวอ่อนมนุษย์ (HEK293) ส่วนสาร 11, 15 และ 19 แสดงความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง HEK293 (IC_{50} 31.88-49.43 μg/ml) จากสารที่นำมาทดสอบทั้งหมด 16 ชนิดมีเพียงสาร 19 เท่านั้นที่แสดงความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) (IC_{50} 35.96 μg/ml) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

(HT29) (IC_{50} 43.66 μg/ml) นอกจากนี้พบว่าสารทั้งหมดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

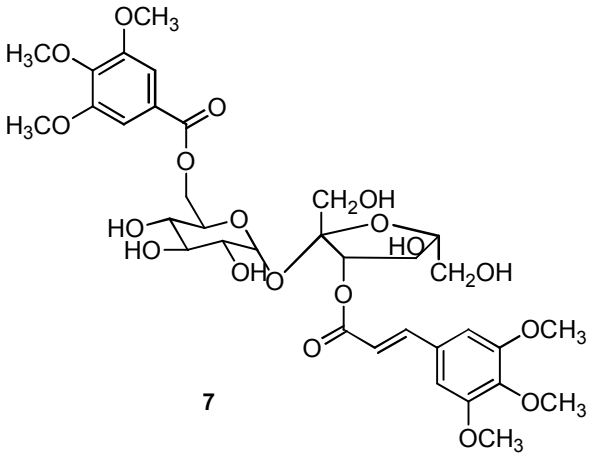
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในตารางที่ 2 พบว่าสารทั้งหมด 14 ชนิดที่ทดสอบไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (SA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (PA), *Escherichia coli* ATCC25922 (EC), *Acinetobacter baumannii* NPRC005 (AB005) เชื้อยีสต์ *Candida albicans* NCPF3153 (CA3153) และเชื้อรา *Microsporum gypseum* clinical isolate (Mg) และ *Penicillium marnefeii* clinical isolate (PM) มีเพียงสาร (20) ที่แสดงฤทธิ์ต่ำในการต้านเชื้อแบคทีเรีย methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK-1 (MIC 200 μg/ml) ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 flucytosine-resistant (CN90113) พบว่ามีเพียงสาร 4 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ชนิดนี้ ได้แก่สาร 20 แสดงฤทธิ์ปานกลาง (MIC 64 μg/ml) ส่วนสาร 11, 12 และ 15 แสดงฤทธิ์ต่ำ (MIC 128-200 μg/ml)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตารางที่ 3 พบว่าจากสารที่นำมาทดสอบ 9 ชนิดมีเพียงสาร 2 ชนิดที่แสดงฤทธิ์นี้ ได้แก่สาร 23 แสดงฤทธิ์ปานกลาง (IC_{50} 29.25 μM) และสาร 12 แสดงฤทธิ์ต่ำ (IC_{50} 174.44 μM)

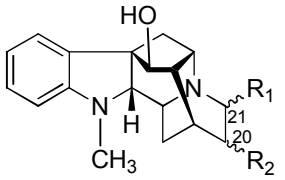


4 H-3α, H-16α, H-20β

17H-3β, H-16β, H-20α



7

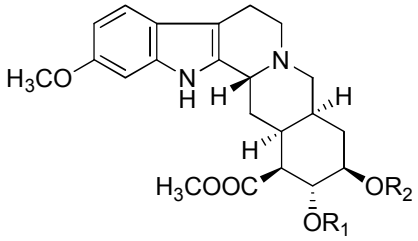


8 20*S*,21*R*; R_1 = OH; R_2 = CH_2CH_3

9 20*R*,21*S*; R_1 = OH; R_2 = CH_2CH_3

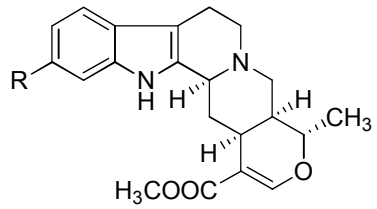
10 R_1 = H; R_2 = =$CHCH_3$

21 20*R*,21*S*; R_1 = OCH_3; R_2 = CH_2CH_3



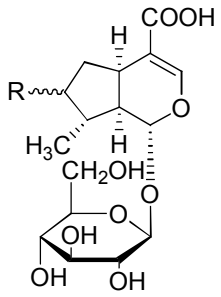
11 R_1 = OCH_3, R_2 = 3,4,5-trimethoxybenzoyl

19 R_1 = OH, R_2 = *trans*-3,4,5-trimethoxycinnamoyl



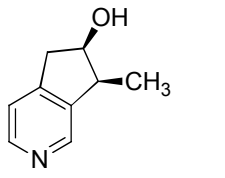
12 R = OCH_3

15 R = H

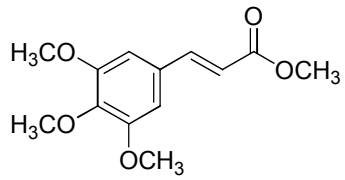


13 R = OHα

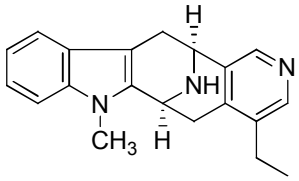
14 R = H



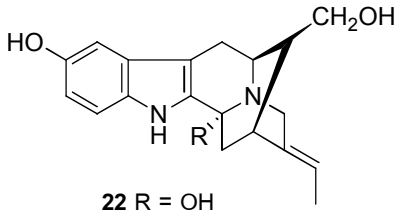
16



18



20



22 R = OH

23 R = H

รูปที่ 2 โครงสร้างของสาร **4** และสาร **7-23** ซึ่งนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากต้นระย่อม

สารประกอบ	ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (IC_{50}, μg/ml)			
	HEK293	HeLa	MCF-7	HT29
Yohimbine (**4**)	NA	NA	NA	NA
6'-*O*-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl) glomeratose A (**7**)	NA	NA	NA	NA
Ajmaline (**8**)	NA	NA	NA	NA
Isoajmaline (**9**)	NA	NA	NA	NA
(+)-Tetraphyllicine (**10**)	NA	NA	NA	NA
Reserpine (**11**)	37.61	NA	NA	NA
Loganic acid (**13**)	NA	NA	NA	NA
7-Deoxyloganic acid (**14**)	NA	NA	NA	NA
Tetrahydroalstonine (**15**)	49.43	NA	NA	NA
Venoterpine (**16**)	NA	NA	NA	NA
3-*epi*-α-Yohimbine (**17**)	NA	NA	NA	NA
Methyl 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamate (**18**)	NA	NA	NA	NA
Recidine (**19**)	31.88	35.96	NA	43.66
21-O-Methylisoajmaline (**21**)	NA	NA	NA	NA
3-Hydroxysarpagine (**22**)	NA	NA	NA	NA
Sarpagine (**23**)	NA	NA	NA	NA
Doxorubicin	0.198	0.42	0.68	3.14

NA = Inactive

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้จากต้นระย่อม

สารประกอบ	Bacteria MIC (μg/ml)					Yeast MIC (μg/ml)		Filamentous MIC (μg/ml)	
	SA	*MRSA SK1*	*PA*	*EC*	*AB005*	*CA3153*	*CN90113*	*MG*	*PM*
Yohimbine (**4**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6'-*O*-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl) glomeratose A (**7**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ajmaline (**8**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reserpine (**11**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	128	NA	NA
Reserpinine (**12**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	200	NA	NA
Loganic acid (**13**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7-Deoxyloganic acid (**14**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tetrahydroalstonine (**15**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	200	NA	NA
Venoterpine (**16**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3-*epi*-α-Yohimbine (**17**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Methyl 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamate (**18**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Suaveoline (**20**)	NA	200	NA	NA	NA	NA	64	NA	NA
3-Hydroxysarpagine (**22**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Sarpagine (**23**)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Vancomycin	1	0.5							
Gentamicin			NA	NA					
Colistin					NA				
Amphotericin B						NA	0.25		NA
Miconazole								NA	

NA= Inactive at $\geq$ 200 μg/ml

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้จากต้นระย่อม

สารประกอบ	IC_{50} (μM)
6'-*O*-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)glomeratose A (**7**)	-
Yohimbine (**4**)	-
Reserpine (**11**)	-
Reserpinine (**12**)	174.44
Loganic acid (**13**)	-
Venoterpine (**16**)	-
3-*epi*-α-Yohimbine (**17**)	-
Suaveoline (**20**)	-
Sarpagine (**23**)	29.25
Gallic acid	6.21

สรุปและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการแยกสารผสม *E*/*Z*-vallesiachotamine (5 และ 6) จากพืชในสกุล *Rauvolfia* และ picrinine (3) จากต้นระย่อม (*Rauvolfia serpentina*) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารที่แยกได้จากส่วนเหนือดินและรากของต้นระย่อมรวม 16 ชนิด พบว่ามีสารเพียง 6 ชนิดได้แก่ reserpine (11), reserpinine (12), tetrahydroalstonine (15), rescidine (19), suaveoline (20) และ sarpagine (23) เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว เนื่องจากมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากต้นระย่อมค่อนข้างน้อยมาก ผลการทดสอบจากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ต้นระย่อมเป็นสมุนไพรในการรักษาโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยประเภทการวิจัยมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย ขอขอบคุณ น.ส.กันยารัตน์ จันทร์แจ้ง และ น.ส.นิลุบล สอนแก้ว นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาเคมีประยุกต์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ช่วยบันทึกแมสสเปกตรัม และค่า specific rotation สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2548. พจนานุกรมสมุนไพรไทย (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพมหานคร: รวมสาส์น (1977) จำกัด.

Abele, E., Abele, R., Dzenitis, O. and Lukevics, E. 2003. Indole and isatin oximes: Synthesis, reactions, and biological activity. Chem. Het. Comp. (Engl. Transl.) 39: 3-35.

Batista, C. V. F., Schripsema, J., Verpoorte, R., Rech, S. B. and Henriques, A. T. 1996. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. Phytochemistry 41: 969-973.

Bemis, D. L., Capodice, J. L., Gorroochurn, P., Katz, A. E. and Buttyan, R. 2006. Anti-prostate cancer activity of a β-carboline alkaloid enriched extract from *Rauwolfia vomitoria*. Int. J. Oncol. 29: 1065-1073.

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature (London), 181, 1199-1200.

Brien, J. O., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. 2000. Invesvestegation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European J. Biochem. 267: 5421-5426.

Chatterjee, A., Mukherjee, B., Ray, A. B. and Das, B. 1965. The alkaloid of the leaves of *Alstonia scholaris* R. Br. Tetrahedron Lett. 41: 3633-3637.

Chaturvedula, V. S. P. and Prakash, I. 2012. Isolation of stigmasterol and β-sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Int. Curr. Pharm. J. 1: 239-242.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI documents M38-A2. Wayne, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document 3. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M07-A9. Wayne, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clivio, P., Richard, B., Deverre, J. R., Sevenet, T., Zeches, M. and Oliver, L. L. M. 1991. Alkaloids from leaves and root bark of *Ervatamia hirta*. Phytochemistry 30: 3785-3792.

Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M. and Tuor, U. 1999. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. Appl. Environ. Microb. 65: 3727-3729.

Hanhinen, P. and Lounasmaa, M. 2001. Revision of the structure of ajmalimine. J. Nat. Prod. 64, 686-687.

Itoh, A., Kumashiro, T., Yamaguchi, M., Nagakura, N., Mizushina, Y., Nishi, T. and Tanahashi, T. 2005. Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. J. Nat. Prod. 68: 848-852.

Mokbel, M. S. and Hashinaga, F. 1996. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. Food Chem. 94: 529-534.

Neuss, N. 1980. Indole and biogenetically related alkaloids (Chapter 17). New York, NY: Academic Press.

Paul, J. H. A., Maxwell, A. R. and Reynolds, W. F. 2003. Novel bis(monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. J. Nat. Prod. 66: 752-754.

Rukachaisirikul, T., Chokchaisiri, S., Suebsakwong, P., Suksamrarn, A. and Tocharus, C. 2017. A new ajmaline-type alkaloid from the roots of *Rauvolfia serpentina*. Nat. Prod. Commun. (in press).

Sauerwein, M. and Shimomura, K. 1990. 17α-*O*-Methylyohimbine and vallesiachotamine from roots of *Amsonia elliptica*. Phytochemistry 29: 3377-3379.

Siddiqui, S., Ahmad, S. S. and Haider, S. I. 1987a. A new alkaloid ajmalimine from the roots of *Rauwolfia serpentina*. Planta Med. 53: 288-289.

Siddiqui, S., Ahmad, S. S. and Haider, S. I. 1987b. Isolation of indobinine, a new alkaloid from roots of *Rauwolfia serpentina* Benth. Indian J. Chem. B 26: 279-280.

Siddiqui, S., Ahmad, S. S. and Haider, S. I. 1987c. Isolation of a new alkaloid “yohambinine” from *Rauwolfia serpentina* Benth. Tet. Lett. 28: 1311-1312.

Siddiqui, S., Ahmad, S. S., Haider, S. I. and Siddiqui, B. S. 1985a. Isolation and structure of a new alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina* Benth. Heterocycles 23: 617-622.

Siddiqui, S., Ahmad, S. S., Haider, S. I. and Siddiqui, B. S. 1987d. Ajmalicidine, an alkaloid from *Rauwolfia serpentina*. Phytochemistry 26: 875-877.

Siddiqui, S., Haider, S. I. and Ahmad, S. S. 1987e. A new alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina*. J. Nat. Prod. 50: 238-240.

Siddiqui, S., Haider, S. I., Ahmad, S. S. and Siddiqui, B. S. 1985b. Isolation and structure of a new alkaloid from *Rauwolfia serpentina* Benth. Tetrahedron 41: 4577-4580.

Smitinand, T. 2001. Thai plant names (Rev. ed.). The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok.

Torres, Z. E. D. S., Silveira, E. R., Silva, L. F. R., Lima, E. S., Vasconcellos, M. C. D., Uchoa, D. E. D. A., Filho, R. B. and Pohlit, A. M. 2013. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. Molecules 18: 6281-6297.

Wachsmuth, L. and Matusch, R. 2002. Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. Phytochemistry 61: 705-709, and references cited therein.

Waterman, P. G. and Zhong, S. 1982. Vallesiachotamine and isovallesiachotamine from the seeds of *Strychnos tricalysioides*. J. Med. Plant Res. 45: 28-30.

Wright, C. W., Phillipson, J. D., Awe, S. O., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Quetin-Leclercq, J. and Angenot, L. 1996. Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydronium bases. Phytother. Res. 10: 361-363.