

บทคัดย่อ

พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. วงศ์ Scrophularaceae) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงความจำ จากการศึกษาทางสัคว์ทดลองและทางคลินิกที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดที่มีการ stanadardized แล้วของพรมมิมิมีผล เพิ่มกระบวนการเรียนรู้และความจำ ในการวิจัยเชิงบูรณาการครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความประสงค์เพื่อศึกษา ประสิทธิภาพและกลไกในการบำรุงความจำของพรมมิทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา กริยาและเภสัชจลนศาสตร์ของพรมมิ ศึกษาพิษวิทยาเรื้อรังเพื่อยืนยันความปลอดภัยของพรมมิ นอกจากนี้ยังได้ จัดทำคู่มือแนวทางในการผลิต และควบคุมคุณภาพสมุนไพรพรมมิและผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิเพื่อเป็นข้อมูลใน การถ่ายทอดเทคโนโลยีต่อไป

คณะผู้วิจัยศึกษาผลทางคลินิกของพรมมิ โดยอาสาสมัครถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยาหลอก และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม อาสาสมัครทุกคนได้รับสารเป็นเวลาานาน 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัครที่บริโภคสารสกัดจะมี การกกดการทำงานของ acetylcholinesterase AChE ตลอดจนเพิ่มการทำงานของ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) แต่ลดระดับ malondialdehyde (MDA) ใน serum ดังนั้นสารสกัดพรมมิจึงน่าจะออกฤทธิ์เพิ่ม working memory โดยการเพิ่มระดับ ACh และ ลดระดับ oxidative stress ทำให้เพิ่ม working memory

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ของหนูแรทที่ได้รับสมุนไพรโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน และได้รับโดยการ ฉีดสารสกัดโดยตรงเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดแปะก๊วย และยามาตรฐาน Donepezi จากผลการวิจัยเมื่อให้สารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) ทาง ปากเป็นเวลาานานติดต่อกัน 2 เดือน พบว่ามีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง โดยประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิกับสารสกัดแปะก๊วยไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง สารสกัด และยามาตรฐานไม่มีผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ในทางตรงกันข้ามการให้สารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำส่งผล ลดทั้งความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่ไม่มีผลต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ ในขณะที่การฉีดยา Donepezile (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อความดันโลหิต และการ ไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ

ที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาถึงผลทางสรีรวิทยาของสารสกัดพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการถ่ายทอด สัญญาณประสาทหรือผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการ ทดสอบข้อมูลในส่วนนี้โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) และยา donepezil

ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ต่อการเกิดปรากฏการณ์ถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ดีขึ้นอย่างยาวนาน (LTP) และต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองของหนูแรทที่แก่ตามธรรมชาติ ผลการทดลองหลังจากป้อนสารสกัดหรือยาติดต่อกันนาน 3 เดือน พบว่า หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 มก./กก.) มีการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ และความสามารถในการจดจำสิ่งของ ได้ดีพอๆ กับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (60 มก./กก.) และกลุ่มที่ได้รับยา donepezil (1 มก./กก.) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีของน้ำปัสสาวะส่วนฮิปโปแคมปัส จากหนูที่ได้รับพรมมิมีการเพิ่มของกลูตาเมต กลูตามีน เซอริน และกาบ้า ในขณะที่สมองของหนูกลุ่มที่ได้รับแปะก๊วยมีการเพิ่มของกลูตาเมต และเซอริน และสมองของหนูกลุ่มที่ได้รับยา donepezil มีการเพิ่มของกลูตามีน และการลดลงของไกลซีน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดพรมมิอาจจะออกฤทธิ์ผ่านทาง การเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนเพื่อที่เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่

การศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (CYP) ในตับหนูและในมนุษย์โดยวิธีการ *in vitro* ทำการประเมินความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ในไมโครโซมโดยใส่สารสกัดตั้งแต่ความเข้มข้น 1 ถึง 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดพรมมิมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยเมื่อเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน โดยสารสกัดยับยั้งปฏิกิริยา O-deethylation ของสาร 7-ethoxyresorufin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อ CYP1A2 โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 59.4 และ 836.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครโซมหนูและในมนุษย์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งปฏิกิริยา tolbutamide hydroxylation ที่ IC_{50} เท่ากับ 222.1 และ 297.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP2E1 ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP3A อย่างอ่อนทั้งในไมโครโซมหนูและในมนุษย์

ความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับของสารสกัดพรมมิทำการประเมินโดยการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.045 ถึง 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือ 0.05-0.5 ไมโครโมลาร์) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนูเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมรวมถึงการแสดงออกของ mRNA พบว่าสารสกัดพรมมิมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์และการแสดงออกของ mRNA เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสารเหนี่ยวนำมาตรฐานในแต่ละเอนไซม์ โดยสรุปแล้วสารสกัดพรมมิ มีผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ได้ต่ำโดยดูจากค่า IC_{50} ที่มีค่าค่อนข้างสูงและไม่ มีผลในเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู ผลดังกล่าวจึงสามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมิในขนาดปกติจะก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาแผนปัจจุบัน ที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดออกจากร่างกาย

ในการศึกษาการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หนึ่งในสารกลุ่ม pseudojubilogenin ในหนูสายพันธุ์ wistar ภายหลังการบริหารสารดังกล่าวโดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำในปริมาณ

10 มก./กก. ของน้ำหนักรับของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและ อุจจาระที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงหลังการบริหารยา ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (an on-membrane analysis) จากการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำพบว่าสามารถตรวจพบสาร ดังกล่าวได้ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ โดยปริมาณของ Bacopaside I ที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับ ระยะเวลาหลังการบริหารสาร และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลองที่ได้รับสาร โดยการ ป้อนมีปริมาณมากกว่าที่ตรวจพบในอุจจาระของหนูที่ได้รับสาร โดยการบริหารทางหลอดเลือดดำ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียทดสอบโดยป้อนสารสกัดขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวทางปากครั้งเดียว สังเกตอาการแสดงความเป็นพิษและพฤติกรรม โดยทั่วไปเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งไม่พบความผิดปกติ ลักษณะอาการ พฤติกรรมและการตายของหนูขาวที่ได้รับสาร สกัดพรมมิเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการป้อนสารสกัดพรมมิครั้งเดียว ทางปากในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ไม่มีผลก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน ทดสอบความ เป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวโดยป้อนสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน ประเมินอาการ พฤติกรรมและสุขภาพสัตว์ พบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ ในหนูขาวกลุ่มที่ ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูขาวกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มติดตามผล การออกฤทธิ์ของสารจะได้รับการประเมินน้ำหนักตัว สุทธิ และน้ำหนักอวัยวะ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ อวัยวะภายใน การประเมินค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในเลือด ตลอดจนการตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่ามี การเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในบางอวัยวะ มีค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกบาง ค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาค่าต่างๆ ดังกล่าวร่วมกับ ข้อมูลเกี่ยวกับอาการที่แสดง พฤติกรรมและการตรวจสุขภาพสัตว์อาจกล่าวได้ว่าการให้สารสกัดพรมมิในขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวเป็นเวลา 270 วัน ไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรัง

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจัดทำคู่มือแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ แนวทางการวิเคราะห์ ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรมมิ และแนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิขึ้น โดยใช้ข้อมูลที่ได้ผ่าน การทดลองปฏิบัติจริง พรมมิสามารถเก็บเกี่ยวได้หลังเพาะปลูกเป็นเวลา 2 เดือน ส่วนที่ใช้คือส่วนเหนือดินที่ตัด จากยอดประมาณ 10-20 ซม เมื่อเก็บเกี่ยวแล้ว พรมมิจะถูกทำให้แห้งที่ จากนั้นบดเป็นชิ้นเล็กๆ ผงพรมมิแห้ง ต้องมี total saponin glycosides ซึ่งประกอบด้วย Bacoside A₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, และ Bacopaside X ไม่ต่ำกว่า 1 % w/w และสารสกัดพรมมิต้องมี total saponin glycosides ไม่ต่ำกว่า 5 % w/w การ ผลิตพรมมิได้ผลผลิต 40 กก ต่อไร่ต่อเดือน ราคาต้นทุนพรมมิคือ 2.3 บาทต่อเม็ด

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae family) is well known as herbal medicine for memory enhancing. Previous data from animal studies and clinical trial study in middle-aged and elderly healthy volunteers showed that Brahmi standardized extract could enhance learning and memory. In this integrative project, we aimed at investigation of the efficacy and mechanisms of the extract in animals and human. In addition, drug interaction and pharmacokinetics of the extract were studied. The chronic toxicity was conducted in order to assure the safety of the plant extract. The guidelines for production and quality control of Brahmi tablet and the raw material were made for technology transferring to industries.

In clinical study, total 60 healthy elderly volunteers were divided into 3 separated groups including placebo, Brahmi extract at doses of 300 and 600 mg per day. The results showed that Brahmi extract treated groups showed the reduction of acetylcholinesterase (AChE) activity. The enhanced activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and the reduction of malondialdehyde (MDA) were also observed. Therefore, Brahmi extract might enhance working memory by increasing the level of ACh and by decreasing oxidative stress leading to the increased working memory.

The effect of Brahmi ethanolic extract, in comparison with ginkgo extract and standard drug for Alzheimer's disease, Donepezil, on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate in rats were investigated. Two experimental protocols were implemented including 1) Subchronic effect: Rats were orally administered with Brahmi extract (40 mg/kg BW), ginkgo extract (60 mg/kg BW) or Donepezil (1 mg/kg BW) daily for 2 months and 2) Acute effect: Rats were intravenously injected with Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW), ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW), and Donepezil (1 mg/kg BW). We found that subchronic administration of either Brahmi extract (40 mg/kg BW) or ginkgo (60 mg/kg BW) significantly increased superficial cerebral blood flow, but had no effect on blood pressure and heart rate when compared with control group. On the other hand, treatment with Donepezil (1 mg/kg BW) for 2 months had no significant effect on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate. Intravenous injection (i.v.) of Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW) or ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW) produced a dose-dependent, transient hypotensive effect and decreased superficial cerebral blood flow, but had no effect on heart rate in anaesthetized rats. On the contrary, Donepezil (1 mg/kg BW, i.v.) had no effect on blood pressure and superficial blood flow, but decreased heart rate.

Due to a lack of information regarding its physiological actions on changes in synaptic transmission and neurotransmitters in the hippocampus, we, therefore, investigated these issues by comparing the effects of Brahmi extract to those of *Ginkgo biloba* and donepezil on learning and memory, induction of long term potentiation (LTP), and changes of amino acid neurotransmitters in naturally aging rats. The results following 3 month oral administration of the extract/drug demonstrated that 40 mg/kg Brahmi extract -treated group showed a similar efficacy of both spatial memory and object recognition as 60 mg/kg Ginkgo extract -treated and 1 mg/kg donepezil-treated groups which were significantly better than those of the vehicle control group. In addition, a biochemical assay of homogenized hippocampal tissues isolated from Brahmi extract group showed increases of glutamate, glutamine, serine and GABA levels, whereas those from Ginkgo extract -treated group showed increases of glutamate and serine and those from donepezil -treated group showed an increase of glutamine and a decrease of glycine. These results indicate that Brahmi extract may act via the changes of amino acid neurotransmitters in the hippocampus to improve a cognitive function of aging rats.

The ability of Brahmi extract to affect rat and human cytochrome P450 (CYP) activities was examined *in vitro*. The potential for inhibition of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A by BME (1-10,000 µg/mL) was evaluated with pooled rat and human liver microsomes. BME exhibited minimal capacity to inhibit any CYP enzyme, compare to the reference inhibitors. Brahmi extract inhibited the O-deethylation of 7-ethoxyresorufin, a marker substrate for CYP1A2 with IC₅₀ value of 59.4 and 836.1 µg/mL in rat and human liver microsomes, respectively. Brahmi extract also inhibited tolbutamide hydroxylation both in rat and human microsomes with IC₅₀ value of 222.1 and 297.6 µg/mL, respectively but did not affect rat and human CYP2E1. BME was found to be a weak inhibitor of CYP3A in rat and human liver microsomes with IC₅₀ value of 321.9 and 481.8 µg/mL, respectively.

The potential for induction of CYP activity was evaluated by exposing primary cultured of rat hepatocytes to Brahmi extract (0.045-0.45 µg/mL). Enzymatic activities were performed by the direct incubation of hepatocyte monolayers with the specific substrates of each CYP. The mean activities and expression of CYP1A2, CYP2C and CYP3A from Brahmi extract -treated hepatocytes were slightly higher than those in the solvent-treated controls but were less than those produced by reference inducers of these enzymes. In summary, BME has been demonstrated *in vitro* to be a low potent of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A both in rat and human liver microsomes and a modest inducer of CYP *in vitro* in rat hepatocytes. Due to the relatively low degree of alteration of the enzyme activities *in vitro* and to the concentrations of BME required to obtain appreciable effects, a high incidence of clinically significant interactions would not be

expected. However, these *in vitro* results are being used in evaluation of clinical reports of apparent herb-drug interaction and in the design of subsequent studies targeted at further elucidation of the clinical relevance, if any, of those *in vitro* findings.

The metabolism of Bacopaside I, one of pseudojubilogenin type glycosides, was studied in wistar rats after oral and intravenous administration at the dose of 10 mg/kg body weight. An on-membrane analysis; one of an immunoassay technique was used to analyze for Bacopaside I and its metabolites in urine and feces samples collected after dosing at 12, 24, 36 and 48 h. The results showed that only feces samples after oral administration could be detected for Bacopaside I while this compound could be detected in both urine and feces samples from rats after intravenous administration. In addition, the results from quantitative analysis of Bacopaside I in the samples showed non-relationship between Bacopaside I amount and time after administration. More Bacopaside I was detected in feces samples after oral administration compared to intravenously.

Acute toxicity of Brahmi extract was conducted in male and female rats by single oral administration with the extract at 5,000 mg/kg body weight. The toxic signs and behaviors were observed within 14 days. The results showed no sign of differences as compared the control rats. In conclusion, single oral administration with the Brahmi extract at 5,000 mg/kg body weight did not significantly cause acute toxicity. For the chronic toxicity test, after oral feeding both male and female rats daily with the Brahmi extract at 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days, signs, animal behavior and health monitoring were then investigated. There were no abnormalities in the test groups as compared to the control rats. Furthermore, the test and control groups (the day of 270th) and the satellite group (298th) were analyzed by measuring their final body and organ weights, taking necropsy, and examining hematology, blood clinical chemistry, and microanatomy. The results show an increase or decrease of body and some organ weights, significantly difference of some hematological and clinical blood chemical values when compared with the control groups. However, analyses of these results combined with the information of signs, behavior and health monitoring can finally make a conclusion that an oral administration of the Brahmi extract at the doses of 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days does not produce chronic toxicity.

The guidelines on good agricultural and collection practices for Brahmi, the Guidelines for analysis of saponins in Brahmi and the guidelines for manufacturing of Brahmi tablets were established from the experimental work. Brahmi was ready for harvesting 2 month after cultivation. The shoot of Brahmi which was 10-20 cm from the topmost of the plant was collected, dried at 55 °C and ground. the dried Brahmi

powder should contain total saponin glycosides consisting of BacosideA₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, and Bacopaside X not less than 1 % w/w. The standardized extract of Brahmi should contain not less than 5 % total saponin. The production of Brahmi dried powder was approximately 40 kg/rai/month. The cost of tablet was calculated as 2.3 baht /tablet.