



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์จากไคร้

Chemical Components and antimicrobial activity of pure compounds from *Glochidion daltonii* Kurz

นางวารี เนื่องจำนงค์ (หัวหน้าโครงการวิจัย)

นางสาววิสาตรี คงสุนทรเจริญ (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์จากไคร้

Chemical Components and antimicrobial activity of pure
compounds from *Glochidion daltonii* Kurz

นางวาริ เนิ่งจำนงค์ (หัวหน้าโครงการวิจัย)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี

นางสาววิสาตรี คงสุนทรเจริญ (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 55/2558

บทคัดย่อ

การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ (*Glochidion daltonii* Kurz) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวมีจุดหลอมเหลว 166 -168 °C พิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และจากการเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับสารอ้างอิงกลุ่ม triterpene พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้ คือ Glochidone และจากการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีพบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลว 212-215°C ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับสารอ้างอิงพบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้คือ Lupeol เมื่อนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส พบว่า Lupeol และ Glochidone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา เมื่อนำมาศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมของ Lupeol และ Glochidone กับยาเตตราซัยคลิน พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (FICI เท่ากับ 0.27 และ 0.26 ตามลำดับ) และพบการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนเฉพาะกับ Lupeol กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC25922 (FICI เท่ากับ 0.56) จุดเวลาที่ Lupeol และ Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลินจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดเพื่อยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ATCC25922 ในเวลา 2-6 ชั่วโมง

Abstract

The isolation of natural products from crude hexane extract of the roots of *Glochidion daltonii* Kurz were carried out by chromatographic techniques. It obtained one pure compound from crude hexane extract of roots *Glochidion daltonii* Kurz that was white needle crystal with melting point 166 -168 °C . The structure was identified by spectroscopic techniques, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT-90, DEPT-135 respectively. The comparison these spectra to the reference spectra of triterpene compounds, indicated that pure compound was Glochidone. The isolation of natural products from crude hexane and of the leaves of *Glochidion daltonii* Kurz were carried out by chromatographic techniques. one pure compound obtained from crude hexane extract of leaves of *Glochidion daltonii* Kurz that was white crystal with melting point 214-215°C. The structure was identified by spectroscopic techniques, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT-90, DEPT-135. The comparison between these spectra and the reference spectra of terpenoids, the pure compounds was Lupeol . The antibacterial activity was indicated that Lupeol could inhibit the growth of some species of opportunistic bacteria. The results were also revealed that Lupeol or Glochidone, combined to tetracycline, indicated synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa* with FICI of 0.27, and 0.26, respectively. Also, partially synergistic effect of only Lupeol with tetracycline was found against *Escherichia coli* ATCC25922 with FICI of 0.56. The times that both Lupeol and Glochidone could inhibit the growth of *P. aeruginosa* and *E. coli* ATCC25922 were at the 2-6 hour from starting the inoculums Lupeol or Glochidone with tetracycline.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	4
2.2 ทฤษฎีการสกัด	6
2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี	6
2.4 การตกผลึก	7
2.5 จุดหลอมเหลว	7
2.6 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	7
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
2.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 สารเคมี	12
3.2 อุปกรณ์	12
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
บทที่ 5 สรุปอภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	48
5.2 ข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	73
ประวัติคณะผู้วิจัย	74
ผลผลิต (ouput)	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จากส่วนสกัดเฮกเซนรากของไคร้	28
4.2	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	29
4.3	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	29
4.4	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	29
4.5	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 5 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	30
4.6	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้	33
4.7	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	34
4.8	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	34
4.9	ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้	35
4.10	เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ Lupeol และ Glochidone และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียฉวยโอกาส	39
4.11	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร Lupeol และยาปฏิชีวนะเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว....การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 และ <i>P. aeruginosa</i> ดื้อยาและไม่ดื้อยา	40
4-12	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร Glochidone และยาปฏิชีวนะเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว....การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 และ <i>P. aeruginosa</i> ดื้อยาและไม่ดื้อยา	41
4-13	เปรียบเทียบประสิทธิภาพ ณ จุดเวลาที่เหมาะสมของสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	46

ตารางที่

หน้า

4-14	เปรียบเทียบประสิทธิภาพ ณ จุดเวลาที่เหมาะสมของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญของ...แบคทีเรีย	47
5-1	ค่า chemical shift (^1H NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	49
5-2	ค่า chemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	51
5-3	ค่า chemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้	54
5-4	ค่า chemical shift (^1H NMR) จากสารอ้างอิง และ ChemDraw..... (version10.0) ของสารอ้างอิง (Lupeol)เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 2-1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้	59
5-4	ค่า chemical shift (^{13}C NMR) จากสารอ้างอิง และ ChemDraw..... (version10.0) ของสารอ้างอิง (Lupeol) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 2-1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้	61
5-5	ค่า chemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (faction ที่ 1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้	64

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
3.1	ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	16
3.2	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	17
3.3	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	18
3.4	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	18
3.5	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 5 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	19
3.6	ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	20
3.7	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	21
3.8	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	21
3.9	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	22
3.10	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	22
3.11	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 5 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	23
4.1	^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของผลึก fraction ที่ 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	30
4.2	^{13}C NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของผลึก fraction ที่ 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	31
4.3	DEPT-90 ของผลึก fraction ที่ 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	31
4.4	DEPT-135 ของผลึก fraction ที่ 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของไคร้	32
4.5	^1H -NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จาก fraction ที่ 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	36
4.6	^{13}C -NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จาก fraction ที่ 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	36

รูปที่	หน้า
4.7 DEPT-90 ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	37
4.8 DEPT-135 ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้	37
4.9 ผลของสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (time kill assay)	44
4.10 ผลของสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ต่อหน่วยเวลา (time kill assay)	44
4.11 ผลของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (time kill assay)	45
4.12 ผลของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ต่อหน่วยเวลา (time kill assay)	45
5.1 สูตรอ้างอิงกลุ่มไทรเทอร์พีน	48
5.2 สูตรโครงสร้างของ Glochidone	57
5.3 สูตรโครงสร้างของ Lupeol	58

5.2	โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนรากของไคร้	
2.21	ขั้นตอนการสกัดสารจากไคร้	19
	ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	
	DEPT-135 ของผลึก fraction 5.3	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 1	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 2	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 3	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 4	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 5	
	ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเอทานอล ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 1	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 2	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 3	
	ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 4	
	IR spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จาก fraction ที่ 2.1	
	¹ H-NMR spectrum(400 MHz ,CDCl ₃) ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จาก fraction ที่ 2.1	
	สูตรโครงสร้างของ lupeol	
	¹ H NMR spectrum (400 MHz, CDCl ₃) ของผลึก fraction 5.3	
	¹³ C NMR spectrum (400 MHz, CDCl ₃) ของผลึก fraction 5.3	
	DEPT-90 ของผลึก fraction 5.3	

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันกำลังตื่นตัวเรื่องผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกันมากมีการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรแทนสารสังเคราะห์ต่าง ๆ และมีการผลิตผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรออกมามากมายในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยา เครื่องสำอาง อาหาร และชาเพื่อสุขภาพ สาเหตุที่มีแนวโน้มในการใช้สมุนไพรเพิ่มขึ้นเนื่องจากมนุษย์มีแนวคิดกลับคืนสู่ธรรมชาติซึ่งเป็นวิธีที่ดีในการดูแลสุขภาพ¹

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่อยู่คู่มาพร้อมกับชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์มานาน โดยใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคมามากแต่โบราณ หากพืชสมุนไพรชนิดใดให้ประโยชน์ในการรักษาโรคก็จะจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันไปทำให้เกิดเป็นยาใช้กันในชุมชนหรือเป็นยาแผนโบราณ² สมุนไพรโดยทั่วไปนั้นมักนึกถึงแต่เฉพาะยาที่ได้จากพืชเท่านั้น แต่ตามพระราชบัญญัติยา สมุนไพร หมายถึง ยาจากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังไม่ได้มีการนำมาผสมกับตัวยาอื่นๆ ประด่างสี กลิ่นรสให้ผิดไปจากเดิม หรือแปรสภาพ คือ ยังเห็นเป็นชิ้นส่วนของพืช สัตว์ แร่ธาตุ แม้จะถูกหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือบดละเอียดแล้วก็ตาม³

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีป่าเขตร้อน มีความหลากหลายทางทรัพยากรทางชีวภาพ พันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ และแร่ธาตุ ในอดีตมีการใช้ยาสมุนไพรรักษาโรคกันอย่างกว้างขวาง และเนื่องจากมีสมุนไพรจำนวนมากใช้รักษาโรคได้ สมุนไพรบางชนิดที่เรามีความคุ้นเคยก็ถูกนำมาใช้รักษาโรคด้วยตนเอง ต่อมาเมื่ออุตสาหกรรมผลิตยาเคมีสังเคราะห์มีความเจริญก้าวหน้าอย่างต่อเนื่องทำให้ความนิยมในการใช้ยาสมุนไพรลดน้อยลงจนกระทั่งระยะหนึ่งผู้บริโภคได้ตระหนักถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากฤทธิ์และความเป็นพิษของยาเคมีสังเคราะห์มากขึ้น จึงทำให้ยาสมุนไพรกลับเป็นที่สนใจและมีความสำคัญขึ้นอีกครั้ง ซึ่งตัวยามีในสมุนไพรบางตัวมีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยกว่ายาสังเคราะห์ แม้ปัจจุบันจะยังมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ตัวยาสสำคัญหลายชนิดก็ยังคงได้จากการสกัดจากพืชสมุนไพร ทำให้สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีจำนวนมากที่มีประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม

การนำสมุนไพรมาใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคนั้นเดิมนำมาใช้ในรูปของพืชสดหรือนำมาตากแห้ง ต่อมา มีการนำเอาสารสกัดจากสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาในรูปของสารสกัดหยาบ ซึ่งจะมีในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือ ส่วนผสมซับซ้อนของสารประกอบหลายชนิด แต่สารสกัดอย่างหยาบมีการใช้เวลาในการเตรียมน้อยกว่าและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรบางชนิดอาจมาจากการผสมกันของสารหลายๆชนิด ถ้าอยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ อาจจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาน้อยลงหรืออาจจะไม่มีเลย ดังนั้นจึงนิยมนำสมุนไพรมาใช้ในรูปของสารสกัดหยาบมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการเตรียมสารบริสุทธิ์ยังเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องทำการศึกษา เพราะจะทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบในพืชได้ ก็ต่อเมื่อองค์ประกอบนั้นอยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์เท่านั้น และสารบริสุทธิ์นี้สามารถนำมาใช้รักษาโรคหรือเป็นสารมาตรฐานได้ ซึ่งส่วนใหญ่ไม่มีขายในท้องตลาด จำเป็นต้องทำการสกัดแยก อีกทั้งสมุนไพรบางชนิดยังจำเป็นต้องใช้องค์ประกอบในรูปสารบริสุทธิ์มาใช้ในการผลิตยา เครื่องสำอาง อาหาร เป็นต้น²

สมุนไพรมีประโยชน์ด้านรักษาโรคต่างๆมากมาย ตลอดจนทำให้สารบริสุทธิ์ที่รักษาโรคได้ จึงนำสมุนไพรต่างๆมาศึกษาวิจัยหาสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในแง่ต่างๆแล้วนำข้อมูลไปพัฒนาพืชสมุนไพรให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป³

โรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียฉวยโอกาส เช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Methicillin resistant* และ *Staphylococcus aureus* (MRSA) ถูกจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่ร้ายแรงที่สุดเพราะเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อของคนที่อยู่ในโรงพยาบาลที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจ⁴ เป็นสาเหตุให้มีการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้นโดยแบคทีเรียเหล่านี้มีกลไกที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น โดยสามารถก่อโรคเมื่อร่างกายอ่อนแอในหลายๆ ระบบของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบหมุนเวียนโลหิต ระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่บาดแผล เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไชกระดูกอักเสบ การติดเชื้อจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ และการสอดใส่เครื่องมือแพทย์ ปอดบวม เป็นต้น^{5,6} เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ต้องการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จึงทำให้มีทางเลือกในการใช้ยาปฏิชีวนะน้อยลงทุกขณะ จำเป็นต้องค้นคว้าหาชนิดใหม่เพื่อใช้ยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะหลายชนิด^{5,6,7} นอกจากนี้ยังต้องมีการนำเข้ายาชนิดใหม่ๆ ซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ ส่งผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลารักษานานขึ้น การนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาโรค จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยา เนื่องจากสมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติ หาง่าย ราคาถูก ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ง่าย ลดผลข้างเคียงที่เกิดจากยาแผนปัจจุบัน

พืชในวงศ์ Euphorbiaceae สามารถรักษาโรคต่างๆ ได้มากมาย เช่น มันทู *Glochidion littorale* จะใช้รากและลำต้น มีสรรพคุณแก้ร้อนใน เป็นยาบำรุง ภาคใต้นิยมใช้รับประทานเป็นผักสด หรือใช้เป็นเครื่องเคียงแกงเผ็ดส่วนที่นำมาใช้ คือใบและยอดอ่อน ไคร้เส็ด (*Glochidion hirsutum* Muell. Arg.) ใช้เปลือกบดเป็นผงละลายกับน้ำร้อนดื่มเป็นยาหอม บำรุงหัวใจ⁸ และไคร้เส็ดมีสารที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งและแก้ปัญหาหลอดเลือดแข็งตัวได้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก ซึ่งอนุมูลอิสระนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ เช่น ภาวะความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ ระบบภูมิคุ้มกันลดลง และโรคมะเร็ง เป็นต้น ไคร้เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Glochidion* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glochidion daltonii* Kurz ที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ราก นำมาใช้ปรุงเป็นยา แก้กษัย ขับปัสสาวะ แก้ไข้เชิงซึม เบาพิการ นอกจากนี้ยอดอ่อนของต้นยังใช้รับประทานได้⁹

จะเห็นได้ว่าพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ จึงสนใจที่จะนำ ไคร้ (*Glochidion daltonii* Kurz) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae และสกุล *Glochidion* มาศึกษาแยกหาสารบริสุทธิ์ เพื่อนำไปเป็นประโยชน์ทางการแพทย์และด้านอื่นๆต่อไป เช่น นำมาพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่มักพบในคนไข้เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคติดเชื้อไม่ได้ผล หรือนำไปใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสต่อไปนอกจากนี้อาจนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานวิจัยเชิงลึกเพื่อใช้เป็นสารต้านมะเร็งในอนาคต

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากและใบไคร้
2. เพื่อสกัดสารอินทรีย์จากรากและใบไคร้ ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน
3. เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากและใบไคร้
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์จากรากและใบไคร้
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์จากรากและใบไคร้

1.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สกัดสารจากส่วนรากและใบไคร้ ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน
2. แยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากและใบไคร้
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ด้วยข้อมูลทางสเปคโทรสโคปี
4. เพื่อศึกษาความสามารถของสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด เฮกเซนของรากและใบไคร้ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ฉวยโอกาส 10 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *S. aureus*

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลลัพธ์ธรรมชาติ²

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) เป็นสารชีวโมเลกุล (biological molecules) ซึ่งโดยปกติหมายถึงสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เป็นสารที่เกิดขึ้นในธรรมชาติที่ผลิตขึ้นได้โดยสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต กล่าวคือเมื่อขาดสารเหล่านี้แล้วไม่ทำให้สิ่งมีชีวิตต้องตายนั้นเอง สารปฐมภูมิ (primary metabolites) คือสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ก็ตาม แต่สารใดที่นอกเหนือไปจากนี้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบางส่วนไปจากสารปฐมภูมิ จะกลายเป็นสารทุติยภูมิ

การพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทำให้สามารถสกัด และแยกสารเคมีบริสุทธิ์ที่มีคุณประโยชน์ทางยาในพืชสมุนไพร พืชสมุนไพรแต่ละชนิดจะประกอบด้วยสารเคมีทางวิทยาศาสตร์หลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าเป็นสารสำคัญ (active constituents) โดยอาจแบ่งกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 7 กลุ่ม ดังนี้

2.1.1 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)¹⁰ ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ มอนอแซ็กคาไรด์ มอนอแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้ง เซลลูโลส และไกลโคเจนเกิดจากกลูโคสหลายโมเลกุลมารวมตัวกันเป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่

2.1.2 ไขมัน (lipids)¹¹ ลิพิดเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุหลัก คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน หรืออาจประกอบด้วยไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยมีอะตอมของออกซิเจนต่ออะตอมของคาร์บอนน้อยกว่าในคาร์โบไฮเดรตมาก ลิพิดส่วนใหญ่เป็นสารประกอบ ประเภทเอสเทอร์ของกรดไขมัน กับ กลีเซอรอล ลิพิดอาจแบ่งออกเป็น คือ ลิพิดอย่างง่ายหรือลิพิดธรรมดา (simple lipid) ซึ่งได้แก่ ไขมัน น้ำมัน และไข ลิพิดเชิงประกอบ (compound lipid) หมายถึง ลิพิดอย่างง่ายที่มีองค์ประกอบอื่นรวมอยู่ด้วยเช่น ฟอสโฟลิพิด ประกอบด้วยลิพิดอย่างง่ายและหมู่ฟอสเฟต ไกลโคลิพิด ประกอบด้วยลิพิดอย่างง่ายและคาร์โบไฮเดรต ลิโปโปรตีน ประกอบด้วยลิพิดอย่างง่ายและโปรตีน และลิพิดเบ็ดเตล็ด (miscellaneous lipid) ซึ่งหมายถึง สารอื่นๆ ที่มีสมบัติคล้ายกับลิพิด แต่ไม่ได้เป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล ไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลายเบส สารเหล่านี้ได้แก่ สเตอรอยด์ วิตามินที่ละลายได้ในน้ำมัน และสารประกอบประเภทเทอร์พีน

2.1.3 น้ำมันหอมระเหย (essentile oil)¹² คือของเหลวที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรนานาชนิดสามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง เช่น น้ำมันดอกจปี เป็นต้น ซึ่งอาจสกัดมาจากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชนั้นๆ เช่น สกัดมาจากผล ดอก ใบ เมล็ด เปลือก ก้าน เป็นต้น วิธีการสกัดที่นิยมใช้คือ การกลั่นไอน้ำ และการใช้สารเคมีเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีนับร้อยชนิดซึ่งออกฤทธิ์เสริมกัน หลังจากการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ได้จะถูกนำมาสังเคราะห์ เพื่อกลั่นแยกหาสารต่างๆ ที่มีกลิ่นหอม สารเหล่านี้จะถูกนำไปผสมผสานและสร้างเป็นกลิ่นใหม่ๆต่อไป

2.1.4 วิตามิน (vitamin)¹³ เป็นสารอาหารที่มีหน้าที่ช่วยการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย การขาดวิตามินอาจเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ได้มากมาย วิตามินแบ่งเป็นประเภทที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ วิตามินบี วิตามินซี วิตามินเอ ดี อี เค และ วิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ ดี อี เค

- **2.1.5 เทอร์พีนอยด์ (terpenoids)**¹³ เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากในพืชชั้นสูงและพบได้ในส่วนที่ หลากหลายของพืช ตั้งแต่เมล็ด ลำต้น ดอก หรือใบ และพบในพืชชั้นต่ำบางชนิดเช่น รา มอส สาหร่าย เป็นต้น แม้แต่ในสิ่งมีชีวิตได้ทะเลก็ยังมี การค้นพบสารในกลุ่มนี้เช่นกัน เทอร์พีนอยด์เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ ไอโซพรีนตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม

2.1.6 สเตอรอยด์ (steroid)¹⁴ เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีการชีวสังเคราะห์เปลี่ยนแปลงมาจาก สารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ มีหน้าที่สำคัญต่อระบบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต สเตอรอยด์มีโครงสร้างหลักเป็นวง 4 วงเชื่อมต่อกัน โดยที่ 3 วง (A, B และ C) เป็นวงหกเหลี่ยมและวง 5 เหลี่ยม 1 วง (D) เช่น คลอเรสเตอรอล ฮอริโมนอะดรีโนโคติคอยด์ ฮอริโมนเพศ และ กรดน้ำดี เป็นต้น

2.1.7 อัลคาลอยด์ (alkaloid)¹⁵ เป็นสารกลุ่มใหญ่ ส่วนมากพบในพืชชั้นสูง เป็นสารที่มักมีรสขมใน โมเลกุลมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีสมบัติเป็นด่าง เมื่ออยู่ในรูปของเกลือจะละลายน้ำได้เป็นกลุ่มสาร ที่นำมาใช้มากเพื่อเป็นยารักษาโรคและมีจำนวนไม่น้อยที่เป็นสารพิษ อัลคาลอยด์ที่นำมาใช้ในการรักษาโรค ต่างๆ เช่น อะโทรปีน (atropine) จากต้นและใบลำโพงมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ จึงมักใช้ผสมในยาแก้ปวด ท้อง นอกจากประโยชน์ในการรักษาแล้วอัลคาลอยด์จำนวนไม่น้อยที่เป็นพิษต่อร่างกาย ใช้เป็นยาพิษ ยาฆ่า แมลงและใช้ในการล่าสัตว์

2.1.8 ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)¹⁶ เป็นสารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยวงอะโรมาติก ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนและ aromatic hydroxyl flavonoids สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามระดับการออกซิเดชันและหมู่ฟังก์ชันของ C ring คือ flavonol flavonones flavones isoflavones flavonols และ anthocyanidins สารประกอบ flavonoid อาจเรียกได้ว่าเป็นสาร nutraceutical ซึ่งหมายถึง อาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำมาใช้เป็นยาหรือมีประโยชน์ต่อ สุขภาพ ทั้งในด้านการป้องกันและการรักษาโรค เช่น สาร antioxidant สาร antimicrobial สาร antiviral สาร anti-inflammatory สารantidiabetic ผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต

2.1.9 คูมาริน (coumarin)¹⁷ มีโครงสร้างโดยทั่วไปคือ 2- α -benzopyrone พบในธรรมชาติทั้ง รูปแบบไกลโคไซด์และอะไกลโคโคน เป็นสารจำพวกแลกโตนไกลโคไซด์ด้วย มีการจำแนกคูมารินตามลักษณะ โครงสร้างออกเป็น simple coumarins furanocoumarins pyrocoumarins phenyl coumarins และ bicoumarins พบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์คูมารินส์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมได้ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของยาต้านการแข็งตัวของเลือดรักษาโรค ช่วยขยายตัวของหลอดเลือด และใช้เป็นส่วนประกอบของ ตำรับยาต้านไวรัสเอชไอวี พืชที่พบสารคูมารินได้แก่พรรณผักกาดเมล็ดทอนกา เป็นต้น

2.1.10 แคโรทีนอยด์ (carotenoid)¹⁸ เป็นรงควัตถุ (pigment) สีส้ม แดง และส้มแดง เป็น ไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง ละลายได้ในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ สลายตัว ได้ง่าย เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้เมื่อละลายอยู่ในน้ำมัน ทำงานร่วมกับคลอโรฟิล (chlorophyll) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียว ดูดซับพลังงานจากแสงแดด และช่วยการเจริญเติบโตของพืชหน้าที่ ของแคโรทีนอยด์มีหลายอย่างคือ นอกจากจะเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอแล้ว ยังทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ป้องกันเนื้องอก และมีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพด้านอื่นๆ

ได้แก่ ลดความเสี่ยงเกี่ยวกับการเสื่อมของตาเนื่องจากสูงอายุ และต่อกระจก ลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็งบางชนิด และโรคหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ กลุ่มแคโรทีน (carotenes)¹⁹ เป็นสารที่ร่างกายต้องเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอ หรือที่เรียกว่าโปรวิตามินเอ เป็นวิตามินที่ละลายในไขมันกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll)²⁰ เป็น รงควัตถุที่สีเหลืองของสารแคโรทีนชนิดที่มีออกซิเจนอยู่ในโครงสร้าง หรืออยู่ในรูปอนุพันธ์ที่ถูกออกซิไดซ์ของแคโรทีน สามารถพบได้ในสัตว์ เช่น สีเหลืองของไข่ไก่ มาจากไก่ที่กินแซนโทฟิลล์จากอาหารเข้าไป เช่น ลูเทอีน (lutein)

2.2 ทฤษฎีการสกัด²¹

ตัวทำละลายแต่ละชนิดสามารถละลายสารต่างๆได้แตกต่างกัน คุณสมบัติอันนี้จึงนำมาใช้เป็นหลักในการแยกสารออกโดยการละลายด้วยตัวทำละลาย

2.2.1 Maceration วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดโดยทำการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารในพืชสมุนไพรแล้วนำพืชสมุนไพรไปใส่ไว้ในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถทำการเขย่าเป็นเวลา และแช่ไว้อย่างน้อย 7 วัน จากนั้นนำมากรองแล้วบีบเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ไปทำการกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกให้หมด แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อน ทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากของผสม ทำโดยเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในสารที่ต้องการสกัด จากนั้นเขย่าแรงๆหรือนำไปต้ม เพื่อให้สารที่ต้องการจะสกัดละลายในตัวทำละลายที่เลือกไว้ สารที่สกัดได้นั้นยังเป็นสารละลายอยู่ ถ้าต้องการทำให้บริสุทธิ์ควรจะนำสารที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกมาก่อน อาจจะไประเหย หรือนำไปกลั่นต่อไป

2.2.3 Soxhlet Extraction เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ตัวทำละลายจะต้องมีจุดเดือดต่ำ เมื่อตัวทำละลายระเหยจะนำสารจากพืชสมุนไพรไปด้วยจากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดรูปชมพู่ด้วยวิธีกาลักน้ำ ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่วนเวียนไป การใช้ความร้อนอาจทำให้สารที่ระเหยง่ายระเหยออกไป จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่าย เป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง

2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

ทฤษฎีโครมาโทกราฟี (chromatography)²² เป็นการแยกสารผสมที่มีสี หรือสารที่สามารถทำให้เกิดสีได้ วิธีการนี้จะมีเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยที่สารในเฟสคงที่ จะทำหน้าที่ดูดซับ (adsorb) สารผสมด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์ สารที่ใช้ทำเฟสคงที่จึงมีลักษณะเป็นผงละเอียดมีพื้นที่ผิวมากเช่น อลูมินา (Al_2O_3) และซิลิกาเจล (SiO_2) หรืออาจจะใช้วัสดุที่สามารถดูดซับได้ดี เช่น ซอล์ก กระจาดาช ซึ่งสารที่ทำหน้าที่ดูดซับในเฟสอยู่กับที่ เช่น น้ำ ส่วนเฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่ชะ (elute) เอาสารผสมออกจากเฟสคงที่ให้เคลื่อนที่ไปด้วย การจะเคลื่อนที่ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารในสารผสมกับตัวดูดซับในเฟสอยู่กับที่ ดังนั้นสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จึงได้แก่

พวกตัวทำละลาย เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เบนซีน การทำโครมาโทกราฟีสามารถทำได้หลายวิธีจะแตกต่างกันที่เฟสคงที่ว่าอยู่ในลักษณะใด

2.3.1 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ทำได้โดยการบรรจุสารที่เป็นเฟสคงที่ เช่น อลูมินาหรือซิลิกาเจลไว้ในคอลัมน์ แล้วเทสารผสมที่เป็นสารละลายของเหลวลงสู่คอลัมน์ สารผสมจะผ่านคอลัมน์ช้าๆ โดยตัวทำละลายซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาสารไป สารในเฟสคงที่จะดูดซับสารในสารผสมไว้ส่วนประกอบใดของสารผสมที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนที่ถูกดูดซับไม่ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้สารผสมแยกจากกันได้

2.3.2 โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ(plane chromatography) โดยทำเฟสคงที่ให้มีลักษณะเป็นครีมนั้น แล้วเคลือบบนแผ่นกระจกให้ความหนาของการเคลือบเท่ากันตลอดแล้วนำไปอบให้แห้ง หยดสารละลายของสารผสมที่ต้องการแยกบนแผ่นที่เคลือบเฟสคงที่นี้ไว้ แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ไว้ โดยให้ระดับของตัวทำละลายต้องอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสอยู่กับที่ด้วยการซึมตามรูเล็กเหมือนกับน้ำที่ซึมไปในกระดาษหรือผ้า เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพมีขั้ว (polarity) ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (polar molecules) จะชะเอาสารในสารผสมที่เป็นสารมีขั้วไปด้วยได้เร็ว ส่วนสารที่ไม่มีขั้วในสารผสมจะถูกชะพาไปได้ช้า สารผสมก็จะแยกออกจากกัน

2.4 การตกผลึก

การตกผลึก (Crystallization)²³ เป็นวิธีทำสารให้บริสุทธิ์ หรือเป็นวิธีแยกสารออกจากกันอีกวิธีหนึ่ง โดย ตัวทำละลายที่เหมาะสมจะต้องละลายผลึกได้ดีที่อุณหภูมิสูง และไม่ละลายผลึกที่อุณหภูมิต่ำ

2.5 จุดหลอมเหลว

จุดหลอมเหลว²⁴ คือ อุณหภูมิที่สารอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างสถานะของแข็งและสถานะของเหลวที่ความดัน 1 บรรยากาศ จุดหลอมเหลวเป็นค่าเฉพาะของสาร(ของแข็ง)แต่ละชนิด ดังนั้นจึงใช้จุดหลอมเหลวตรวจสอบชนิดของสารได้ ปกติสารบริสุทธิ์จะหลอมเหลวที่อุณหภูมิหนึ่งๆ อุณหภูมิเดียว คือ เป็นตัวเลขค่าเดียวหรือจุดเดียว เช่น 58 °C แต่ในทางปฏิบัติในการวัดจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์อาจวัดได้เป็นช่วงอุณหภูมิ คือ อุณหภูมิตั้งแต่ของแข็งเริ่มหลอมที่ตาสังเกตเห็นได้จนถึงอุณหภูมิที่ของแข็งหลอมเหลวหมด เช่น 58-59 °C สารบริสุทธิ์มีช่วงการหลอมเหลวแคบ (อยู่ในช่วง 0.5-1°C) ส่วนสารไม่บริสุทธิ์มีช่วงการหลอมเหลวกว้างและมีอุณหภูมิช่วงการหลอมเหลวต่ำกว่าช่วงการหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์ชนิดนั้น

2.6 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน มีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย บางชนิดยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (microbistatic) ขณะที่บางชนิดออกฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ (microbicidal) บางชนิดมีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะจำแนกได้ดังนี้⁷

2.6.1 การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลลิน (Penicillin) [เซฟาโลสปอริน](#) (Cephalosporins) แวนโคไมซิน (Vancomycin) บาซิทราซิน (Bacitracin) เป็นต้น โดยยาเหล่านี้จะออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในระดับต่างๆ ขึ้นกับชนิดของยา มีผลทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์แตกตาย ยาในกลุ่มนี้บางขนานอาจมีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์บางอย่างในเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้ผนังเซลล์แตก (autolysis) ด้วย

2.6.2 รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลิมัยซิน บี (polymyxin B) โคลิสติน (Colistin) และ Polyene antifungal agents เป็นต้น ยาพวกนี้ออกฤทธิ์โดยหุ้มน้ำมันที่มีประจุไฟฟ้าซึ่งอยู่ที่ผิวโมเลกุลของยาทำปฏิกิริยากับอิมูนที่มีประจุไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ในการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เสียไป เซลล์ตายเนื่องจากสูญเสียสารสำคัญๆ เช่น กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน และขาดแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โซเดียม โปแตสเซียม แอมโมเนีย ไฮโดรเจน เป็นต้น

2.6.3 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ DNA dependent RNA polymerase จึงมีผลต่อการสร้างอาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์

2.6.4 ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เตตราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) Macrolide antibiotic และคลินดามัยซิน (Clindamycin) เป็นต้น ยาพวกนี้จะออกฤทธิ์โดยไปจับกับไรโบโซมของจุลินทรีย์ ที่ตำแหน่ง 30 หรือ 50 subunit ซึ่งขึ้นกับชนิดของยามีผลขัดขวางการทำงานของไรโบโซม การสร้างโปรตีนของจุลินทรีย์จึงถูกยับยั้ง จุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญเติบโต (static activity)

2.6.5 รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม ยากลุ่มนี้มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม จึงแย่งจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้ และการยับยั้งลักษณะแบบนี้พบว่าสามารถฟื้นฟูสภาพเดิมเมื่อปริมาณของยาลดลง หรือหมดฤทธิ์ยา หรือเมื่อมีสารตั้งต้นที่เอนไซม์ไปแย่งกันจับนั้นเพิ่มกว่าปกติ ยาที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยทั่วไปจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่บางชนิดที่ออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ

แบคทีเรียฉวยโอกาสที่สำคัญ เช่น *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* , *Serratia marcescens*, *Methicillin resistant* และ *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อของคนที่อยู่ในโรงพยาบาลที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจซึ่งการติดเชื้อจากแบคทีเรียเหล่านี้ถือเป็นปัญหาที่สำคัญระดับประเทศ เพราะก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น ดื้อต่อยากลุ่มเพนนิซิลลิน แอมพิซิลลิน โพลีมิกซิน สเตรปโตมัยซิน เตตราไซคลิน เป็นต้น และมักพบผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ผู้ป่วยเกิดการแพ้ยา ระบบร่างกายเสียสมดุล เนื่องจากยาปฏิชีวนะเข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ นอกจากนี้การรับประทานยาปฏิชีวนะไม่ครบขนาดหรือบอยติดต่อกันเป็นเวลานานก็อาจทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยา จากปัญหาเหล่านี้ทำให้เราต้องพัฒนายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เพื่อทดแทนยาตัวเก่าที่รักษาไม่ได้ผลซึ่งทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น สูญเสียรายได้จำนวนมากในระดับชาติ

การศึกษาพืชวงศ์ Euphorbiaceae ในสกุล *Glochidion* พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ Lupanes, betulinic acid และ terpene สารกลุ่ม betulinic acid มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด melanoma , neuroblastoma และ ovarian carcinoma พบว่า betulinic acid ที่ระดับ

ความเข้มข้นสูงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์ จึงน่าจะมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการใช้เป็นยาต้านมะเร็งในอนาคต^{25, 26} นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม Triterpenoids, Lupanes และ betulinic acid ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทางการแพทย์ใช้เป็นยาต้านมะเร็ง (Anti-cancer drug) มะเร็งแอปพลิเคชันมี premised จึงสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งโดยการยับยั้งเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์ polyamines ได้แก่ ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase, spermidine synthase และ spermine synthase นอกจากนี้มีรายงานพบว่า betulinic acid สามารถจะยับยั้งเอนไซม์ที่สังเคราะห์ leukotriene biosynthesis คือ lipoxygenase อนุพันธ์ของ triterpenoids เช่น glycyrrhetic 3-monoacetate acid และ betulinic acid สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งอื่นๆ จากหลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม Triterpenoids และ Lupanes อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งหรืออาจนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย^{26, 27}

พืชในสกุล *Glochidion* ให้สารบริสุทธิ์กลุ่ม Triterpenoids, Lupanes และ betulinic acid เป็นส่วนใหญ่ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย²⁷⁻³⁸ โคร้เป็นพืชอีกต้นหนึ่งในสกุล *Glochidion* การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงทำการหาสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากและใบโคร้ ซึ่งคาดว่าจะได้สารบริสุทธิ์ในกลุ่ม Triterpenoids ชนิดเดิมหรือชนิดใหม่และสารบริสุทธิ์กลุ่มใหม่ที่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสได้ ซึ่งผลการศึกษาคั้งนี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการพิจารณาในการนำสมุนไพรไทยมาพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่มักพบในคนไข้เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคติดเชื้อไม่ได้ผลหรือนำไปใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสต่อไป

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปี 1974 Dutta B., และคณะ²⁷ ได้ศึกษาทำการสกัด *Glochidion accuminatum* โดยใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่า ได้สารที่ใหม่คือ glochidone glochidonol และ β -sitosterol

ปี 2007 Hai-Tao Xiao., และคณะ²⁸ ได้ศึกษาทำการสกัดเหง้าของ *Glochidion coccineum* โดยใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่า ได้สารที่ใหม่คือ glochieriosides A and B ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ปี 1998 Yoshio T. Chieko M. และคณะ²⁹ ได้ศึกษาการสกัดส่วนบนของต้น *Glochidion obovatum* โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า ได้สารใหม่ 2 ชนิด คือ neoligan glucoside (7S,8R)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-O- β -glucoside

ปี 2003 Hideaki O. และคณะ³⁰ ศึกษาการสกัดใบของต้น *Glochidion zeylanicum* โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า ได้สาร 2 ชนิด คือ (3S,5R,6R,7E,9S)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol-3-O- β -D-glucopyranoside และ (3S,5R,6R,7E,9S)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 9-O- β -D-glucopyranoside

ปี 2003 Wai-Haan H. และคณะ³¹ ได้ศึกษาการสกัดลำต้นของ *Glochidion eriocarpum* พบว่า ได้สาร 6 ชนิด คือ lupa-1,20-(29)dien-3-one lup-20(29)-en-1 β ,3 α -diol 1- β -hydroxylup-20(29)en-3-one lup-20(29)-en-1 β ,3 β -diol lup-20(29)-en-3 α ,23-diol และ lup-20(29)-en- α ,3 β -diol

ปี 2004 Peter C. Healy และคณะ³² ศึกษาการสกัดส่วนด้านนอกของเปลือกต้น *Glochidion ferdinandi* โดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย พบว่า ได้สารที่ใหม่ 2 ชนิด คือ 2-hydroxy-6-methyl-8-methoxy-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid และ 2-hydroxy-6-hydroxymethyl-8-methoxy-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

ปี 2007 Okamoto และคณะ³³ ศึกษาต้นไม้อิงสกุล *Glochidion* เพื่อศึกษาผลของสาร betulinic acid ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด melanoma neuroblastoma และเซลล์ ovarian carcinoma ของมนุษย์ พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งเปลี่ยนแปลงรูปร่างและไปเร่งให้เกิดโปรแกรมแห่งความตายกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว leukemias ในระยะเริ่มต้น

ปี 2009 Kiem และคณะ³⁴ ศึกษาสาร Glochieriosides A จาก *Glochidion eriocarpum* พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง HL-60 HT-29 MCF-7 และ SK-OV ให้ค่า IC50 เท่ากับ 5.5, 6.8, 29.1, 22.7 uM ตามลำดับ

ปี 2011 Machana และคณะ³⁵ ศึกษาพืช 6 ชนิดรวมทั้ง *Glochidion daltoni* พบว่าสามารถฆ่ามะเร็งตับคือ human hepatocarcinoma (HepG2) cell line ด้วยกลไกการยับยั้งโปรแกรมความตายคือ apoptosis

ปี 2011 Sharma และคณะ³⁶ พบว่าส่วนสกัดจากเมธานอลของ *Glochidion zeylanicum* มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง HepG2 HT 29 และ PC3 cell line

ปี 2011 Thang และคณะ³⁷ ศึกษาสารบริสุทธิ์จากใบของ *Glochidion obliquum* พบว่าฆ่าเซลล์มะเร็งของมนุษย์ และมีผลควบคุมการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase และ NADPH oxidase ใน microglial cell ของหนู

ปี 2012 Nhiem และคณะ³⁸ พบสารบริสุทธิ์ 10 ชนิด จากทุกส่วนของ *Glochidion eriocarpum* มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง HL-60 และ HCT-116 cell line โดยไปเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax และควบคุมผ่านทาง ERK และ p38

2.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

2.8.1 ด้านวิชาการ

งานวิจัยนี้อาจจะได้สารบริสุทธิ์ใหม่ที่ยังไม่เคยค้นพบมาก่อนในสมุนไพรหรือค้นพบสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยทางวิชาการในหรือต่างประเทศ ทั้งนี้เป็นการสร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทย และนักวิจัยในองค์กรต่าง ๆ อาจนำผลงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในแง่ต่าง ๆ ทำให้เกิดงานวิจัยหรือองค์ความรู้ใหม่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้หน่วยงานมีสารเคมีและอุปกรณ์ทางเคมีมากขึ้นทำให้เกิดความคล่องตัวในการทำงานวิจัยมากขึ้นซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอน

2.8.2 ด้านนโยบาย

งานวิจัยนี้ให้ความรู้แก่ประชาชนทั่วไป โดยผ่านทางสื่อต่าง ๆ เช่น หนังสือพิมพ์ วารสารเคมีต่าง ๆ เพื่อให้ประชาชนทราบว่าสมุนไพรนี้มีสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ ทำให้ประชาชนมั่นใจว่าบริโภคสมุนไพรแล้วรักษาโรคได้จริง

วงการแพทย์แผนไทย ถ้าสารบริสุทธิ์อยู่ในสมุนไพรชนิดนี้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จะเป็นการสนับสนุนให้ใช้สมุนไพรนี้เป็นยารักษาโรคได้อีกชนิดหนึ่ง หรือใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ซึ่งมีอาการข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน

วงการแพทย์แผนปัจจุบัน นำไปสู่การค้นพบยารักษาโรคต่างๆชนิดใหม่ ที่สกัดหรือแยกได้จากสมุนไพรนี้ ทำให้ใช้ทดแทนหรือเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการสกัดหรือแยกยาบางชนิดจากสมุนไพรชนิดนี้ แทนการสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูง

2.8.3 ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์

นำไปสู่การจดสิทธิบัตรของยารักษาโรคบางชนิดใหม่จากสมุนไพร เพื่อสร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทย

ผลิตยารักษาโรคจากสมุนไพรนี้ในปริมาณมากออกวางจำหน่ายในราคาถูกลงกว่ายาที่รักษาโรคชนิดเดียวกันวางขายในท้องตลาด นอกจากนี้ยารักษาโรคที่ได้จากสมุนไพรนี้อาจมีประสิทธิภาพสูงกว่าและราคาถูกลงกว่ายาที่ใช้รักษาโรคนั้นที่ใช้อยู่ในวงการแพทย์แผนปัจจุบัน

2.8.4 ด้านสังคมและชุมชน

ทำให้ทราบว่าพืชสมุนไพรนี้มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พืชสมุนไพรนี้จึงมีคุณค่า มีประโยชน์สมควรที่จะอนุรักษ์หรือส่งเสริมให้มีการปลูกมากขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่อไป

สารบริสุทธิ์ที่ได้ อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ด้านจุลชีพ ด้านแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ด้านมาลาเรีย หรือ apoptosis ทั้งนี้การศึกษากลไกการต้านจุลินทรีย์ และการพิสูจน์ประสิทธิภาพของสมุนไพรในตำรายาไทย ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อวงการชีวเคมี เภสัชเคมี หรือบริษัทอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนาไปสู่แคปซูลยารักษาโรคต่างๆ ต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของรากและใบไคร้มีดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 เฮกเซน (hexane)
- 3.1.2 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)
- 3.1.3 เมทานอล (methanol)
- 3.1.4 อะซิโตน (acetone)
- 3.1.5 แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate)
- 3.1.6 ไอโอดีน (iodine)
- 3.1.7 ซิลิกาเจล 60 (0.063-0.200 mm) รหัสสินค้า 1.07734.2500 สำหรับ column บริษัท MERCK
- 3.1.8 ซิลิกาเจล 60 PF₂₅₄ รหัสสินค้า 1.07747.2500 สำหรับ thin layer chromatography บริษัท MERCK

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร
- 3.2.2 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.7 เซนติเมตร ยาว 62 เซนติเมตร
- 3.2.3 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 40.5 เซนติเมตร
- 3.2.4 เครื่องดูดสุญญากาศ บริษัท EDWARDS
- 3.2.5 เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) ความถี่ 400 MHz รุ่น Avance บริษัท Bruker
- 3.2.6 เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)
- 3.2.7 หลอดกำเนิดแสง UV
- 3.2.8 แผ่นแก้วไมโครสไลด์
- 3.2.9 หลอดคาพิลลารี
- 3.2.10 ชุดกรองผลึก

3.2.11 chamber

3.2.12 เครื่องชั่ง

3.2.13 ชุดกลั่น ตัวทำละลาย

3.2.14 ชุดเครื่องแก้วพื้นฐาน

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเก็บและการเตรียมสารตัวอย่าง

นำส่วนรากและใบของไคร้จากจังหวัดเชียงรายซึ่งเก็บโดยกรมป่าไม้ แล้วนำสับเป็นชิ้นเล็กๆ ตากให้แห้งแล้วบดให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นนำส่วนรากและใบที่แห้งบดละเอียดไปชั่งน้ำหนักและบันทึก น้ำหนักนำไปใส่ในถุงผ้าสีชาวมัดปากถุงให้เรียบร้อย บรรจุใส่ในถังสแตนเลสที่มีฝาปิดสนิท เทตัวทำละลาย เฮกเซนลงไปในถัง จนท่วมถุงผ้า ปิดฝาให้สนิท ทำการแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นไซตัวทำละลาย ออกมานำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหย แบบหมุนได้ส่วนสกัดหยาบ ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง นำส่วนสกัด หยาบรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนและดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศนำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนัก

3.3.2 การเตรียม TLC

นำซิลิกาเจลสำหรับทำ TLC มาผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม คนให้ซิลิกาเจลผสมเข้า กันเป็นลักษณะ slurry จากนั้นเตรียมแผ่นไมโครสไลด์ที่สะอาดมาประกบคู่กันเซ็ดด้วยอะซิโตนเพื่อเป็นการ กำจัดน้ำแล้วตามด้วยเฮกเซนเพื่อกำจัดคราบไขมันทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นไมโครสไลด์ที่เตรียมไว้จุ่มลงใน สารละลายซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ แกะแผ่นไมโครสไลด์ที่ประกบกันไว้ออกจากกันเคาะเบาๆ เพื่อให้การ กระจายของซิลิกาเจลเสมอกันทั่วทั้งแผ่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.3.3 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นการหาอัตราส่วนของระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกันระหว่างเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท เริ่มจากเตรียมตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทใน อัตราส่วนต่างๆกัน ปริมาตร 10 ml ใส่ใน chamber ปิดฝาให้สนิท นำหลอดคาพิลลารีจุ่มในสารตัวอย่างที่ ต้องการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมมาแล้วจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปใส่ใน chamber ที่มี ตัวทำละลายผสมที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน แล้วปิดฝาให้สนิท รอให้ตัวทำละลาย เคลื่อนที่จนสุดแผ่นที่มีซิลิกาเจลเคลือบอยู่ นำแผ่น TLC ออกจาก chamber แล้วนำไปส่องดูด้วยหลอด กำเนิดแสง UV ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมระบบตัวทำละลายใดที่สามารถแยก สารออกจากกันได้ดีที่สุดจะเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการแยกสารต่อไป

3.3.4 การเตรียมคอลัมน์

การเตรียมคอลัมน์ต้องเลือกขนาดคอลัมน์ให้เหมาะสมที่สามารถบรรจุกับปริมาณของส่วนสกัดที่ต้องการแยกกับซิลิกาเจล ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของคอลัมน์ โดยใช้อัตราส่วนของซิลิกาเจลกับส่วนสกัดเป็น 40:1 จากนั้นนำคอลัมน์ที่เหมาะสมแห้งและสะอาดมาวางยึดติดไว้กับ clamp ให้แน่นและตั้งตรง แล้วเทซิลิกาเจลใส่ในปิกเกอร์เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมจนท่วม ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน ใส่สำลีลงไปเล็กน้อย ใส่ทรายลงไปเพื่อปรับระดับผิวหน้าให้เสมอกัน ค่อยๆเทส่วนผสมของซิลิกาเจลกับตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไป เปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกมา ในระหว่างที่เทส่วนผสมของซิลิกาเจล ต้องใช้สายยางเคาะคอลัมน์เบาๆเพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวกันแน่น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวด้วยตัวทำละลาย

3.3.5 การบรรจุสารตัวอย่าง

ปล่อยตัวทำละลายให้อยู่ในระดับเดียวกับซิลิกาเจลจากนั้นเตรียมสารตัวอย่างโดยเอาสารทดสอบผสมกับตัวทำละลายและซิลิกาเจลจำนวนเล็กน้อย ระบายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุน ค่อยๆเทสารผสมนั้นลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ปล่อยให้อยู่ในระดับเดียวกันกับซิลิกาเจล จากนั้นเติมเมกนีเซียมซัลเฟตลงไปเพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบและดูดซับน้ำที่อาจปนมากับตัวทำละลายที่ใช้ชะ แล้วทำการชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อไป

3.3.6 การแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

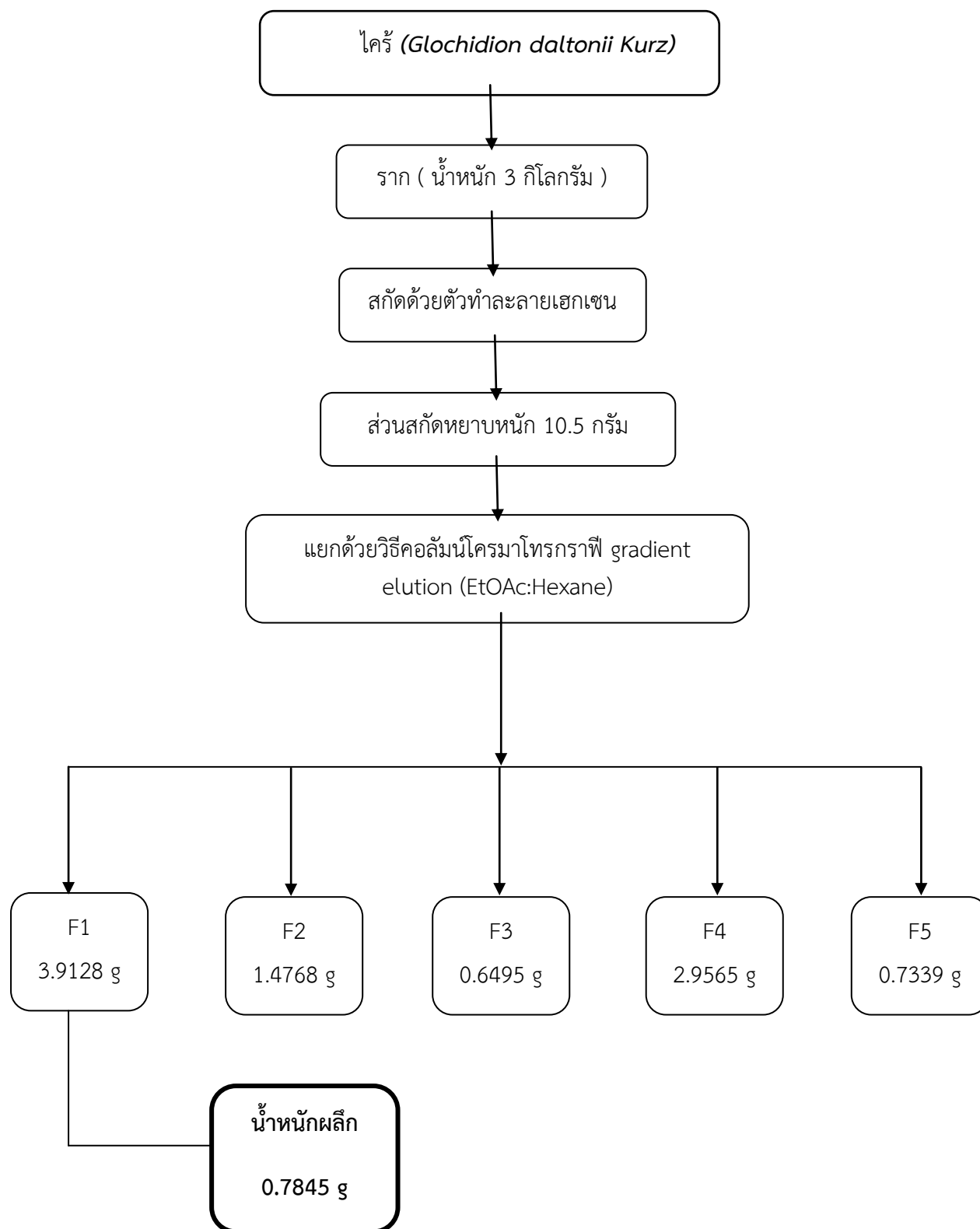
การแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีทำได้โดยการทำให้ gradient elution ซึ่งเป็นการค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของระบบตัวทำละลายโดยจะเริ่มจาก 100% เฮกเซน และค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นเอทิลอะซิเตทจนกระทั่งถึง 100% เอทิลอะซิเตท ซึ่งถือว่ามีขั้วมากที่สุด และใส่ตัวทำละลาย 100% เมทานอลเพื่อชะสารที่เหลืออยู่ในคอลัมน์ออกมาให้หมด ขณะทำการทดลองจะทำการเก็บสารที่แยกได้ (eluent) จากคอลัมน์ ด้วยขวดกักกลมขนาด 250 cm³ แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนเกือบแห้งใช้คาปิลลารีดูดสาร นำมา spot ลงบนแผ่น TLC โดยเทียบ 2 fraction ซึ่งตำแหน่งที่ 1 และ 3 จะเป็นสารแต่ละ fraction ตำแหน่งที่ 2 บนแผ่น TLC นั้นจะเป็นการรวมสารสอง fraction ที่นำมา spot เทียบ นำแผ่น TLC ที่ spot สารแล้วใส่ลงใน chamber ที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาให้สนิทรอจนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่นที่มีซิลิกาเจลเคลือบอยู่ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องด้วยหลอดกำเนิดแสง UV จะมองเห็นสารแยกออกเป็นจุด ถ้าไม่เห็นให้นำไปใส่ลงใน chamber ที่บรรจุกลีตโอไอดินเอาไว้ หากค่า R_f ของสารแต่ละจุด และรวมสารที่มีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเป็น fraction เดียวกัน แล้วก็นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุนดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ นำไปชั่งน้ำหนักของสาร ถ้า fraction ใดได้เป็นของแข็งให้นำไปตกผลึกใหม่ ส่วน fraction ใดที่ยังไม่พบของแข็งหรือยังไม่บริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอ ให้นำไปทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีในทำนองเดียวกันจนได้ของแข็ง ส่วนสารที่มีปริมาณน้อยและจากการตรวจสอบด้วย TLC พบรังควัตถุก็จะไม่นำสารมาแยกต่อ

3.3.7 การตกผลึก

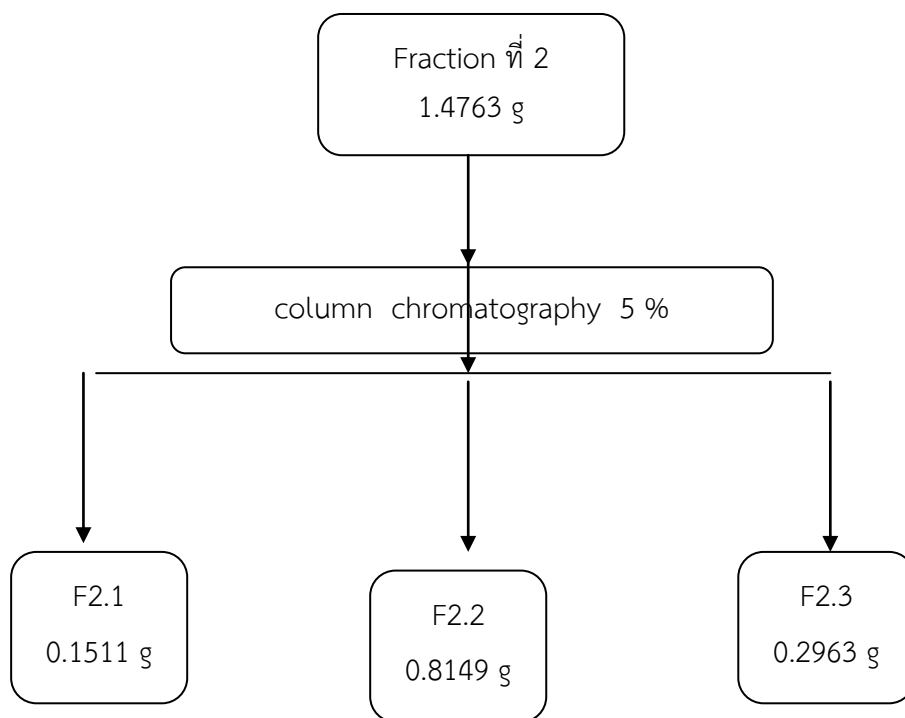
นำสารที่เป็นของแข็งที่สามารถแยกได้เป็นของแข็งมาเติมตัวทำละลายที่เหมาะสม นำไปให้ความร้อนเพื่อละลายสารตัวอย่าง กรองสารละลายขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรองผลึกที่ได้ด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างผลึกด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ตกผลึก ทำให้แห้ง นำผลึกที่ได้เก็บใส่ใน vial บันทึกน้ำหนักที่ได้ หาจุดหลอมเหลวเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป

3.3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์

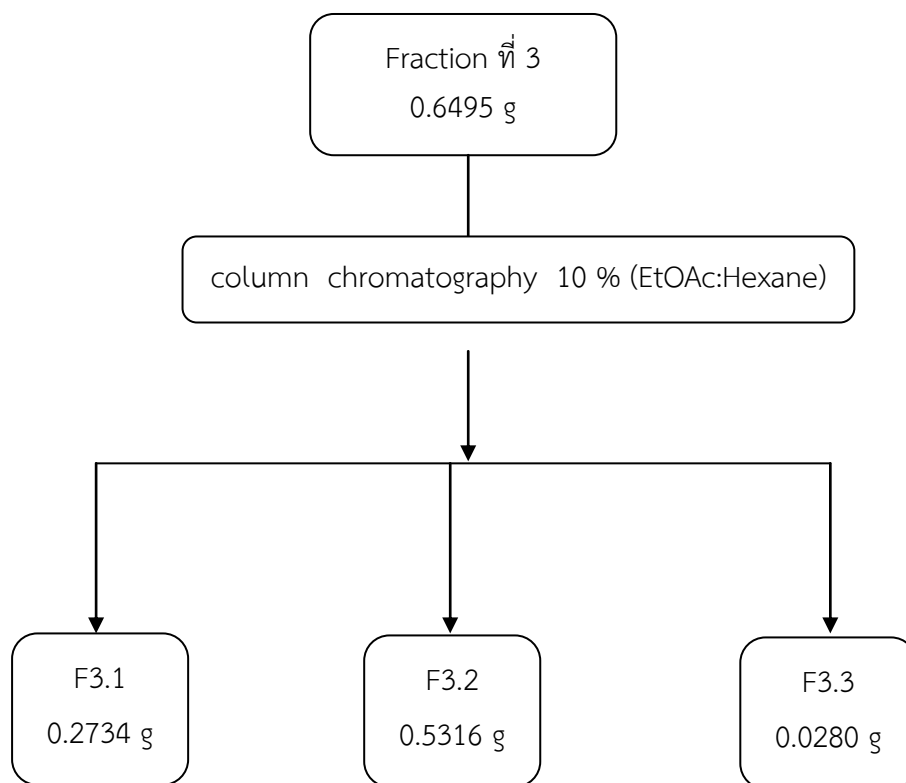
นำผลึกที่ได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปคโตรสโคปี เพื่อหาสูตรโครงสร้าง ในการทดลองนี้ได้ทำการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ด้วยวิธีการทดลองข้างต้น ซึ่งการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1-3.5 และส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ด้วยวิธีการทดลองข้างต้น ซึ่งการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.6 – 3.9



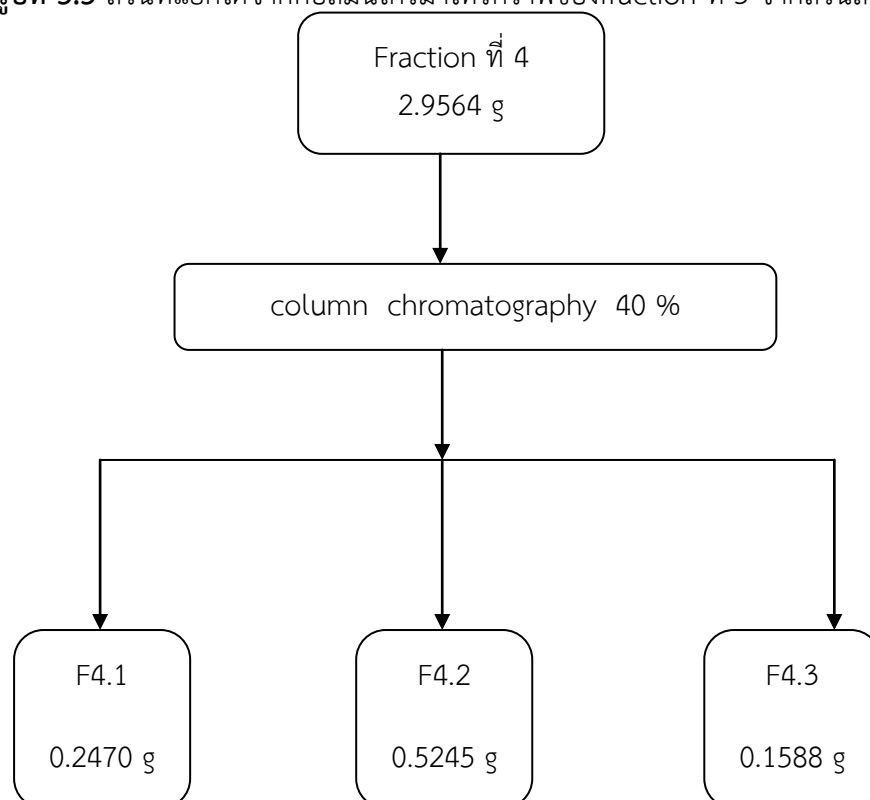
รูปที่ 3.1 ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากไคร้



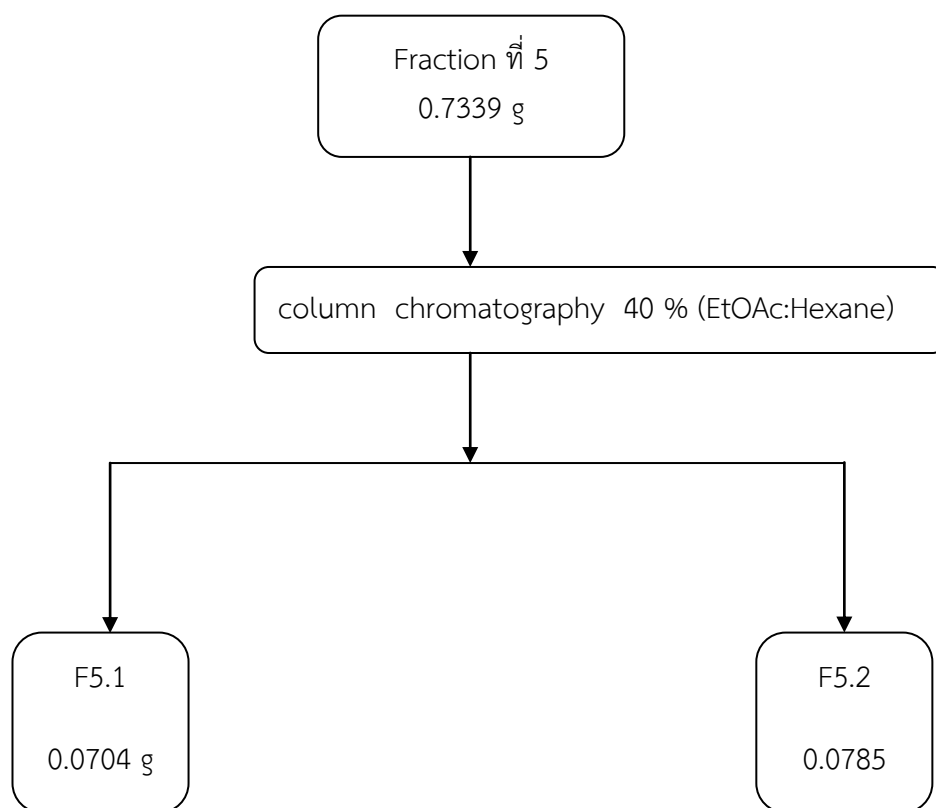
รูปที่ 3.2 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของfraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้



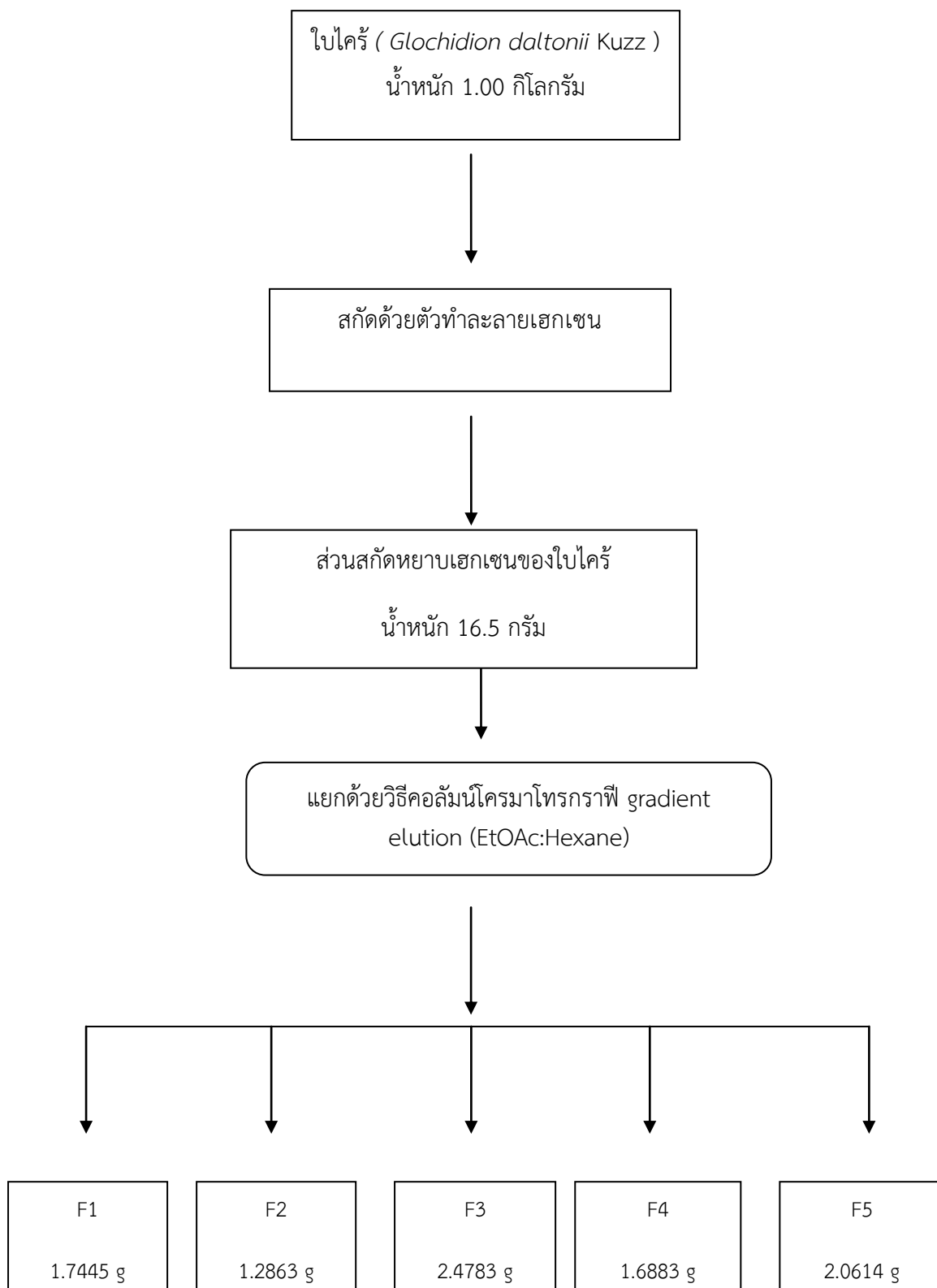
รูปที่ 3.3 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของfraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้



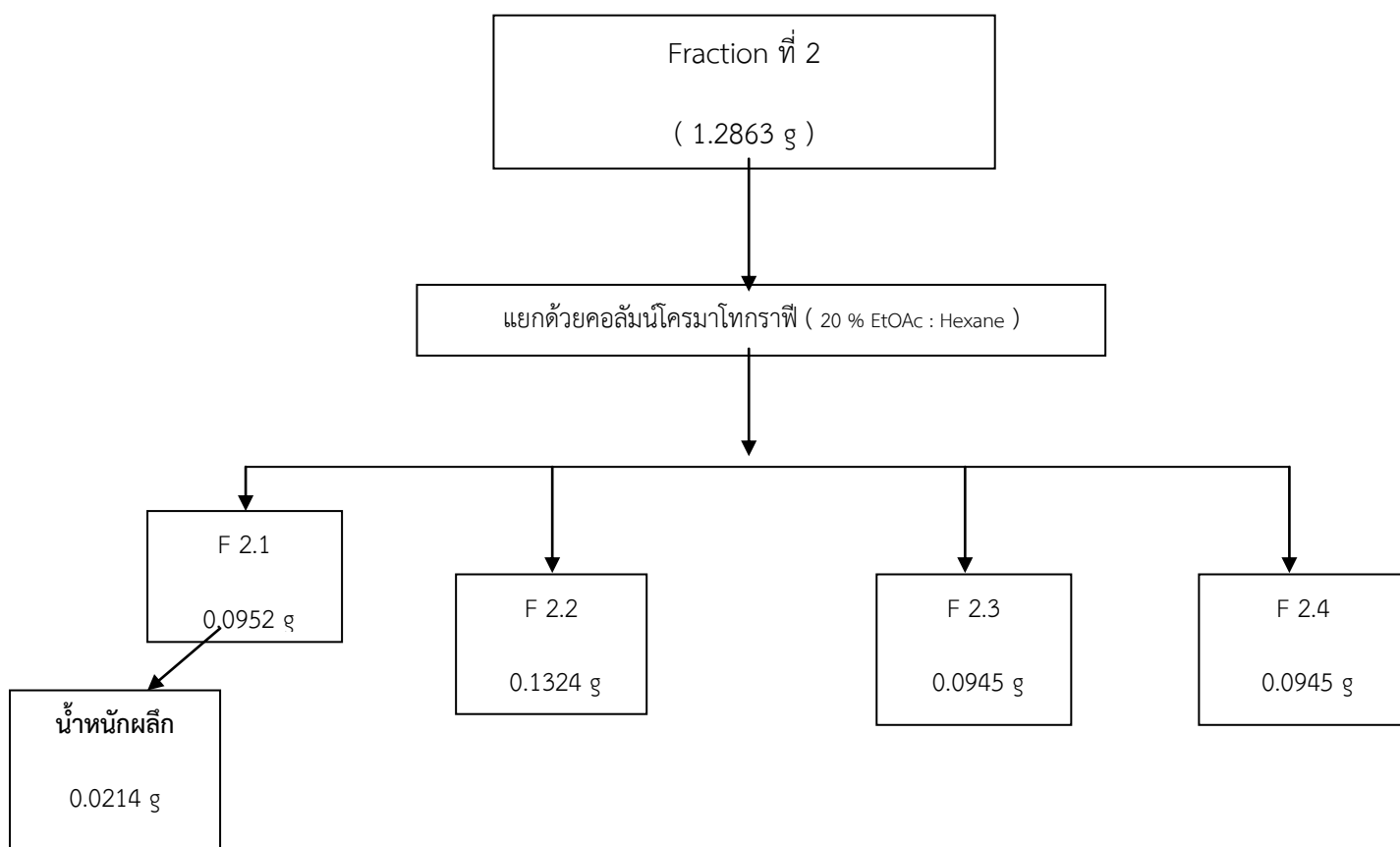
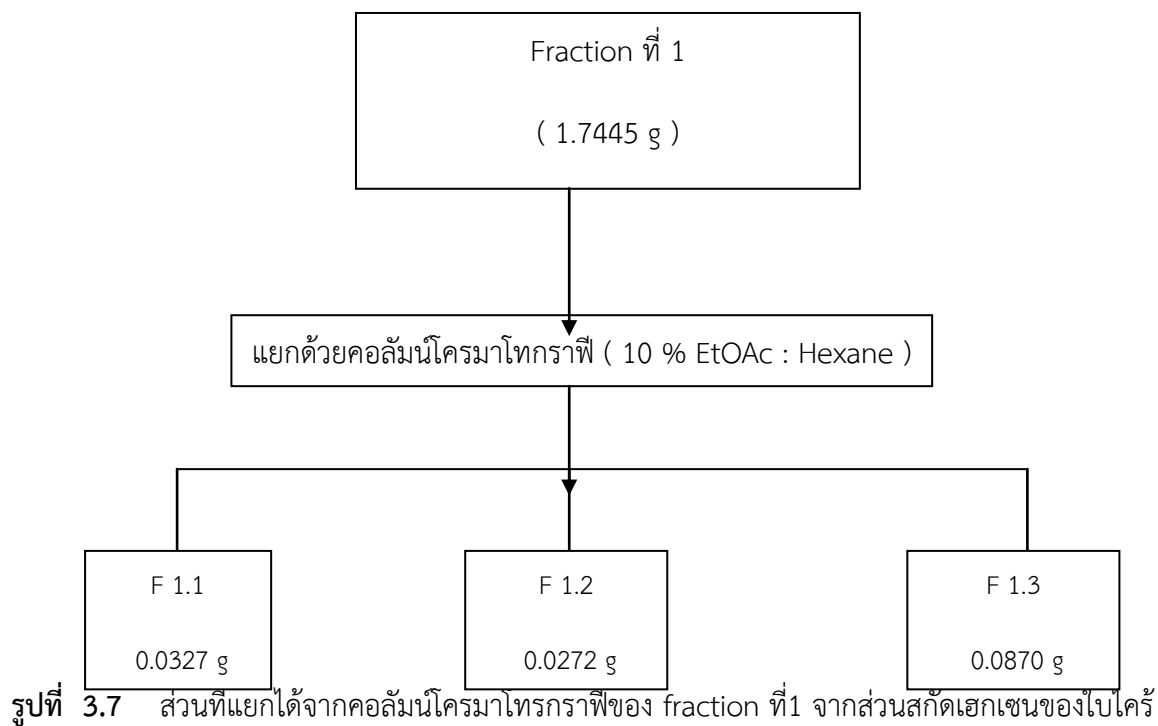
รูปที่ 3.4 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของfraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

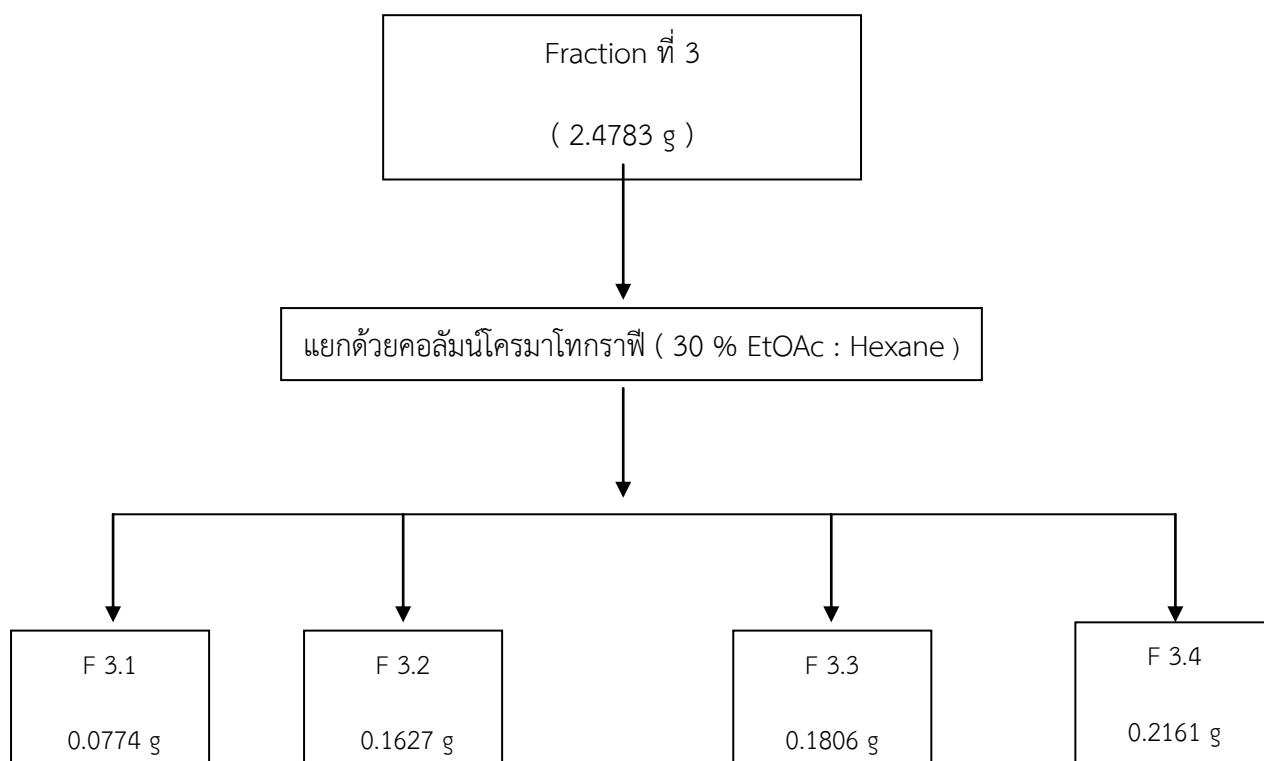


รูปที่3.5 ส่วนที่แยกได้คอลัมน์โครมาโทกราฟีของfractionที่5จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

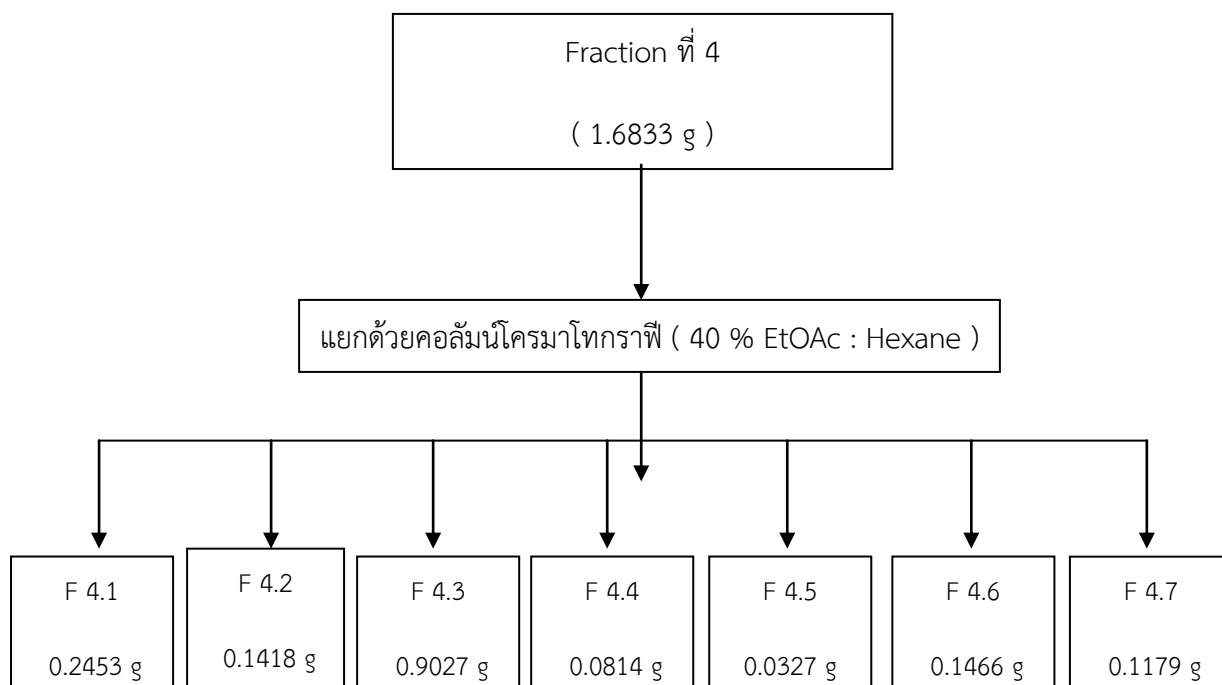


รูปที่ 3.6 ส่วนที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของไปไคร้

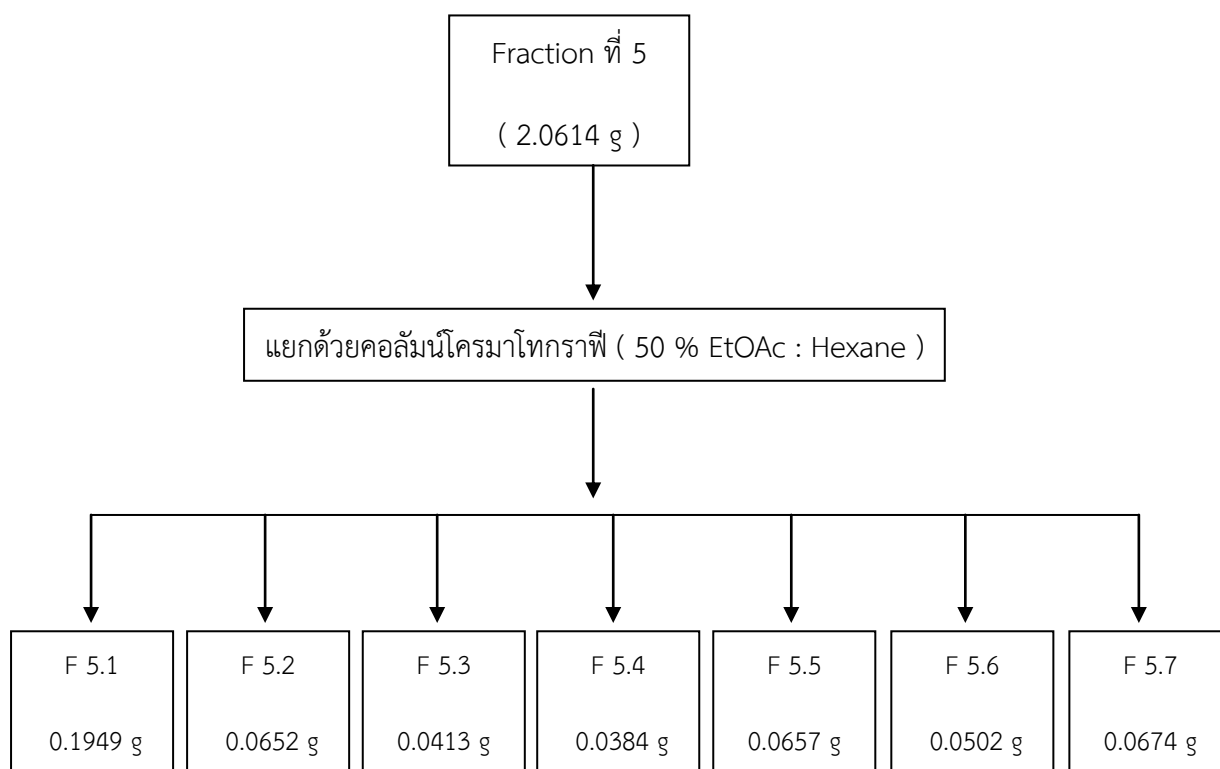




รูปที่ 3.9 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้



รูปที่ 3.10 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้



รูปที่ 3.11 ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ fraction ที่ 5 จากส่วนสกัดหยาดเฮกเซนของใบไคร้

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

3.3.9 การเตรียมสารทดสอบ (stock solution)

เตรียม Master stock ของสารทดสอบ โดยชั่งสารทดสอบ 0.36697 กรัม มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 426 กรัมต่อโมล แล้วนำไปละลายด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 43,071.5 ไมโครโมลาร์ นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall Corporation U.S.A.) จะได้ Master stock จากนั้นจึงเตรียมสารละลายที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ โดยดูดสารละลาย Master stock ของสารทดสอบ ปริมาตร 47.55 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีก 952.45 ไมโครลิตร ลงใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วย Vortex mixer จะได้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 2048 ไมโครโมลาร์ และเจือจางความเข้มข้นลดลงที่ 1024 ไมโครโมลาร์ โดยการดูดสารละลายลงใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำเช่นนี้จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทดสอบ

การเตรียม Master stock ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่ 1 โมลาร์ โดยชั่งยาแอมพิซิลลิน 0.3714 กรัม และชั่งยาเตตราซัยคลิน 0.4444 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมสารที่ความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ โดยดูดสารละลายยาปริมาณ 20.48 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 979.52 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วย Vortex mixer จะได้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 2048 ไมโครโมลาร์ และเจือจางความเข้มข้นลดลงสองเท่าด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมสารละลายสารทดสอบ

3.3.10 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

(minimal inhibitory concentration)

3.3.10.1 วิธีของ Broth dilution assay³⁹ ในขั้นตอนนี้ใช้สำรวจหาเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบ และเพื่อคัดเลือกหาเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ก่อนที่จะนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมของสารทดสอบกับยาปฏิชีวนะในลำดับถัดๆ ไป โดยทำการทดสอบดังนี้คือ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อมาทดสอบ 4-5 โคโลนี แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarlane 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) เพื่อให้เชื้อมีปริมาณที่เท่ากัน ดูดเชื้อที่เทียบความขุ่นกับ McFarlane 0.5 แล้วมาปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ GE-4 ที่ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์, 1024, 512, 256 และ 128 ไมโครโมลาร์ จำนวนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดเชื้อจากที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลืออยู่ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางลง 10 เท่า ดังนั้นจะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นเลือกเอาเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ไมโครโมลาร์มาทำการทดลอง ดูดเชื้อที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วทำการ spread plate รอให้แห้งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนี บันทึกผลและหาค่าเฉลี่ยของโคโลนีแบคทีเรียที่รอดชีวิต CFU (Colony forming unit)/ml จากสูตร

จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง = A (Colony) \times B (dilution) \times 10 หน่วยเป็น cfu/ml

A ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียบนจานอาหาร 3 จาน ที่ระดับการเจือจางเดียวกัน

B ส่วนกลับของระดับการเจือจาง

3.3.10.2 วิธีของ Agar diffusion assay³⁹ ใช้เพื่อยืนยันผลการทดสอบกับเชื้อที่จะนำมาศึกษา ใน 3.3.3

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 โดยปรับความขุ่นของเชื้อ ด้วย sterile sodium chloride 0.85 % เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 19 มิลลิลิตร มาผสมกับแบคทีเรียที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อให้อาหารแข็ง จากนั้นทำการเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรเพื่อใส่สารทดสอบ นำสารทดสอบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่ระดับความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในการทดลองนี้ใช้ DMSO เมทานอล และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองวิธี Agar diffusion susceptibility test ของสารทดสอบเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแต่ละชนิด จำนวน 3 ซ้ำ นำไปบันทึกผลการทดลอง และหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC

3.3.11 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration)

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะคือยาแอมิพิซิลลินและเตตราซัยคลินซึ่งเป็นยาต้านอนุพันธ์ของยาแผนปัจจุบันที่ใช้กันอยู่ทั่วไป

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ที่เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ DMSO หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น ปฏิชีวนะ 2048 ไมโครโมลาร์ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ หลุมละ 20 ไมโครลิตรทุกหลุมที่เหลือ หลังจากนั้นให้นำสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้น จำนวน 20 ไมโครลิตรหยอดลงในหลุมเดิมที่ใส่ยาปฏิชีวนะ 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) เป็นเซนติเมตร และทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ นำไปบันทึกผลการทดลอง และหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC และการหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพพร้อม FICI หรือ (Fractional Inhibitory Concentration Index)

การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Chung *et al.*, 2011)⁴⁰

การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI คือค่าที่ใช้บอกประสิทธิภาพร่วมเมื่อใช้สารทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะแล้ว สารทดสอบทั้งสองชนิดออกฤทธิ์อย่างไร เช่น เสริมฤทธิ์กัน หรือต้านฤทธิ์กัน เป็นต้น ซึ่งดูจากค่า FICI ระหว่างค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ กับค่า FIC ของสารทดสอบ โดยคำนวณได้ดังนี้

1. FIC ของยาปฏิชีวนะ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

2. FIC ของสารทดสอบ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของสารทดสอบเพียงอย่างเดียว

3. FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ+FIC ของสารทดสอบ

แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI ได้ดังนี้

เมื่อ $FICI \leq 0.5$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)

$0.5 < FICI < 1$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)

$FICI = 1$ หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)

$1 < FICI \leq 4$ หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)

$FICI > 4$ หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

3.3.12 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบสารทดสอบกับยาปฏิชีวนะด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบการใช้สารทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS version 15

3.3.13 การศึกษาผลของสารทดสอบผสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)

คัดเลือกโคโลนี ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3-4โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำ มาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่า McFarland No. 0.5 ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร MHB 3 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารทดสอบที่คำนวณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำการศึกษ Time-Kill Assay และเตรียมน้ำกลั่นความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการทดสอบควบคู่กับชุดควบคุม ได้แก่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และสารทดสอบที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำหลอดทดสอบทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมง ที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10,12, 24 และ 48

ตามลำดับ ใช้ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเจือจางเป็นลำดับ (Serial Dilution) แล้ว Spread Plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า \log_{10} จำนวนเซลล์ (CFU/ml)

3.3.14 หาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญ (The effectiveness antibacterial activity; EAA) และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า \log_{10} จำนวนเซลล์ (CFU/ml) คำนวณจากสูตรดังนี้คือ

$$EAA (\%) = \frac{N_0 - N_E}{N_0} \times 100$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มควบคุม

N_E คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์

4.1 ผลการทดลองจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

จากการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ทำโดยนำรากของไคร้แห้งที่บดละเอียดแล้ว น้ำหนัก 3 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ได้ส่วนสกัดหยวนน้ำหนัก 10.5 กรัม ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นแบบ gradient คือตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท โดยเริ่มต้นจากเฮกเซน 100 % และค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นเรื่อยๆจนถึง 100 % เอทิลอะซิเตท และตามด้วยเมทานอลเป็นลำดับสุดท้ายเป็นการทำให้สารออกจากคอลัมน์ให้หมด สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 fraction ดังตารางที่ 4.1-4.5

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (5%EtOAc : Hexane)
F1	ของแข็งสีเหลืองอ่อน	3.9128	0.53
F2	ของเหลวหนืดสีเหลือง	1.4768	0.71
F3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.6495	0.78
F4	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.9565	0.70
F5	ของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม	0.7339	0.34

fraction ที่ 1 ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อนและเมื่อทำการตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนได้ผลึกสีขาวละเอียดน้ำหนัก 0.7845 กรัม ผลึกที่ได้นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่องแมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี เพื่อหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และมีจุดหลอมเหลว 166 – 168 °C ส่วน fraction ที่ 2,3,4,5 ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (10%EtOAc : Hexane)
F2.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส	0.1511	0.45,0.71
F2.2	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส	0.8149	0.65,0.49
F2.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส	0.2963	0.55,0.72

ใน fraction ที่ 2 สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 fraction ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองใสเมื่อนำไปทดสอบตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีรงควัตถุสารมีปริมาณน้อยจึงไม่นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (5%EtOAc : Hexane)
F3.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.2734	0.71, 0.65
F3.2	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.5316	0.46, 0.65
F3.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.0280	0.72, 0.60

ใน fraction ที่ 3 สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 fraction ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อนเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีรงควัตถุสารมีปริมาณน้อยจึงไม่นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.4 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (5%EtOAc : Hexane)
F4.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.2470	0.61, 0.50
F4.2	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.5245	0.40, 0.46
F4.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน	0.1588	0.59, 0.40

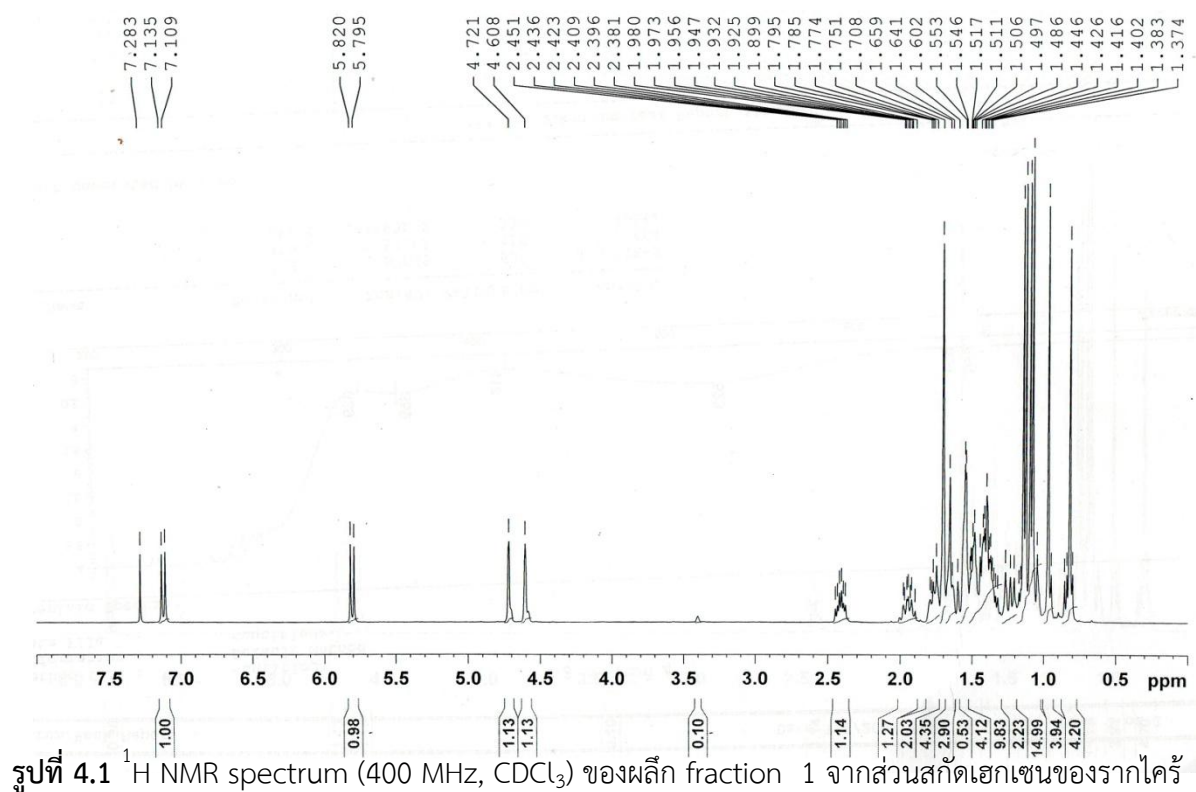
ใน fraction ที่ 4 สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 fraction ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อนเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีรงควัตถุและสารมีปริมาณน้อยจึงไม่นำไปแยกต่อกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

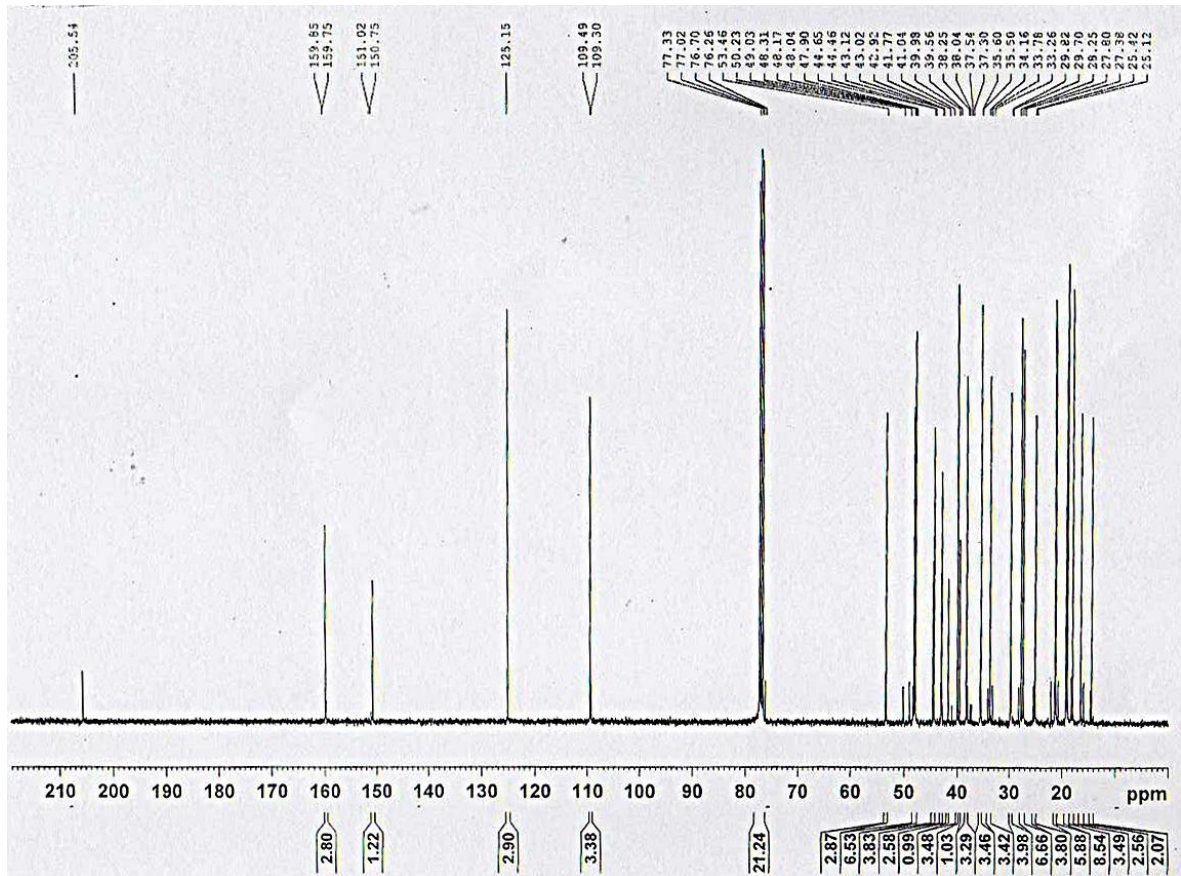
ตารางที่ 4.5 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 5 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (5%EtOAc : Hexane)
F5.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส	0.0704	0.75, 0.46
F5.2	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส	0.0785	0.35, 0.42

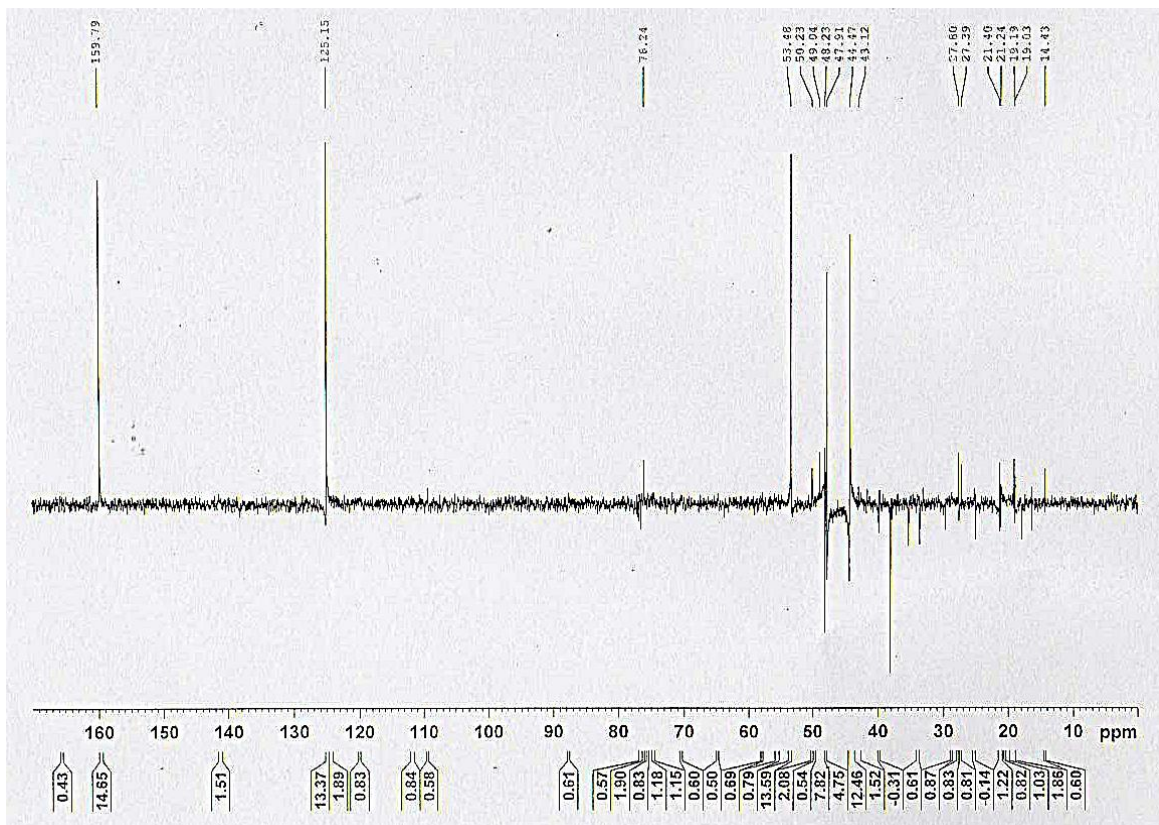
ใน fraction ที่ 5 สามารถแยกได้ทั้งหมด 2 fraction ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองใสเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีรงควัตถุและมีปริมาณสารน้อยจึงไม่นำไปแยกต่อ

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด จาก fraction 1 เมื่อนำมาตกผลึกด้วยเฮกเซนได้ผลึกรูปเข็มสีขาวละเอียดมีน้ำหนัก 0.7845 กรัม นำผลึกที่ได้ไปหาจุดหลอมเหลวได้เท่ากับ 166-168 °C จากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 ได้สเปกตรัมแสดงดังรูปที่ 4.1- 4.4

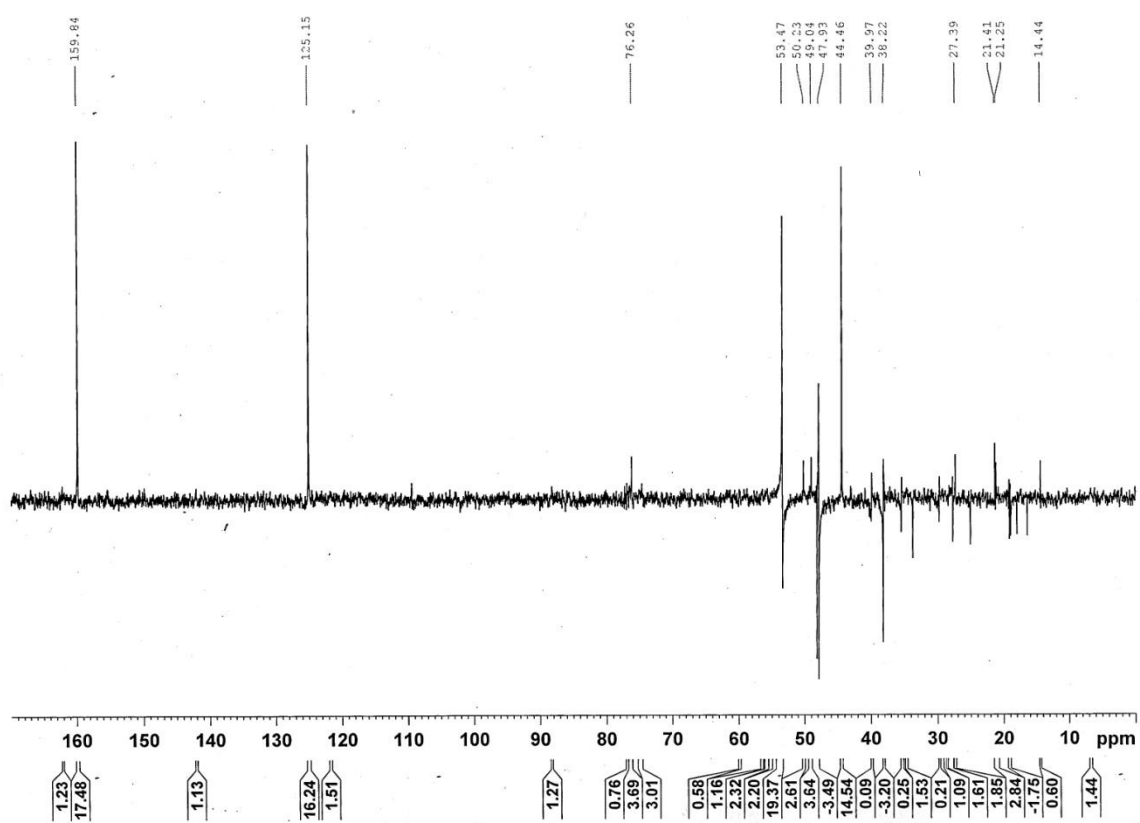




รูปที่ 4.2 ^{13}C NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของผลึก fraction 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้



รูปที่ 4.3 DEPT-90 ของผลึก fraction1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้



รูปที่ 4.4 DEPT-135 ของผลึก fraction 1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

4.2 ผลการทดลองจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

จากการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดหยาบของเฮกเซนของใบไคร้ ทำโดยนำส่วนใบของไคร้ที่แห้งและบดละเอียด น้ำหนัก 1 กิโลกรัมมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน น้ำหนัก 16.5 กรัม ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นแบบ gradient elution ของตัวทำละลายระหว่างเอทิลอะซิเตท:เฮกเซนโดยเริ่มต้นจากเฮกเซน 100 % และค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นเรื่อยๆ จนถึง 100 % เอทิลอะซิเตท และตามด้วยเมทานอลเป็นลำดับสุดท้ายสามารถแยกได้ทั้งหมด 5 fraction ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (10%EtOAc : Hexane)
F1	ของเหลวหนืดสีดำ	1.7445	0.43
F2	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม	1.2863	0.52 ,0.33
F3	ของเหลวหนืดสีดำ	2.4783	0.55
F4	ของเหลวหนืดสีดำ	1.6883	0.61,0.45
F5	ของเหลวหนืดสีดำ	2.0614	0.66

จากตารางที่ 4.6 สามารถทำการส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ได้ทั้งหมด 5 fraction โดยลักษณะของสารที่สังเกตได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด และเมื่อนำทุก fraction มาทดสอบด้วย TLC พบว่า fraction ที่ 2,3,4 ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกต่อกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วน fraction ที่ 1 ไม่พบการเคลื่อนที่ของสาร จึงไม่นำมาแยกต่อและ fraction ที่ 5 เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC ปรากฏแถบสีเหลืองซึ่งไม่ใช่สีม่วง คาดว่าน่าจะเป็นรงควัตถุจึงไม่ทำการแยกต่อ

ตารางที่ 4.7 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 2 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (20%EtOAc : Hexane)
F2.1	ของเหลวสีชมพูอ่อน	0.0952	0.44
F2.2	ของเหลวหนืดสีดำ	0.1324	0.48,0.51
F2.3	ของเหลวหนืดสีเทาเข้ม	0.0945	0.65

จากตารางที่ 4.7 สามารถทำการแยกส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวทำละลาย 20 % เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนสามารถแยกได้ 3 fraction ดังตารางที่ 4.7 พบว่า fraction ที่ 2.2,2.3 เป็นลักษณะของเหลวหนืดเมื่อนำมาทดสอบด้วย TLC ปรากฏว่ามีแถบสีเหลืองอยู่แสดงว่าอาจมีรงควัตถุปน ส่วน fraction ที่ 2.1 เมื่อทิ้งไว้ให้แห้ง เกิดเป็นผลึกสีขาวนำมาทดสอบด้วย TLC พบว่าสารที่ได้บริสุทธิ์จึงทำการตกผลึกใหม่ด้วยเฮกเซน ได้ผลึกสีขาว นำผลึกที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่องแมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี เพื่อหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และหาจุดหลอมเหลวได้ 212-215°C

ตารางที่ 4.8 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 3 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้

Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (30%EtOAc : Hexane)
F3.1	ของเหลวหนืดสีเขียวขี้ม้า	0.0774	0.38
F3.2	ของเหลวหนืดสีดำ	0.1627	0.51
F3.3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม	0.1806	0.63
F3.4	ของเหลวหนืดสีดำ	0.2161	0.62

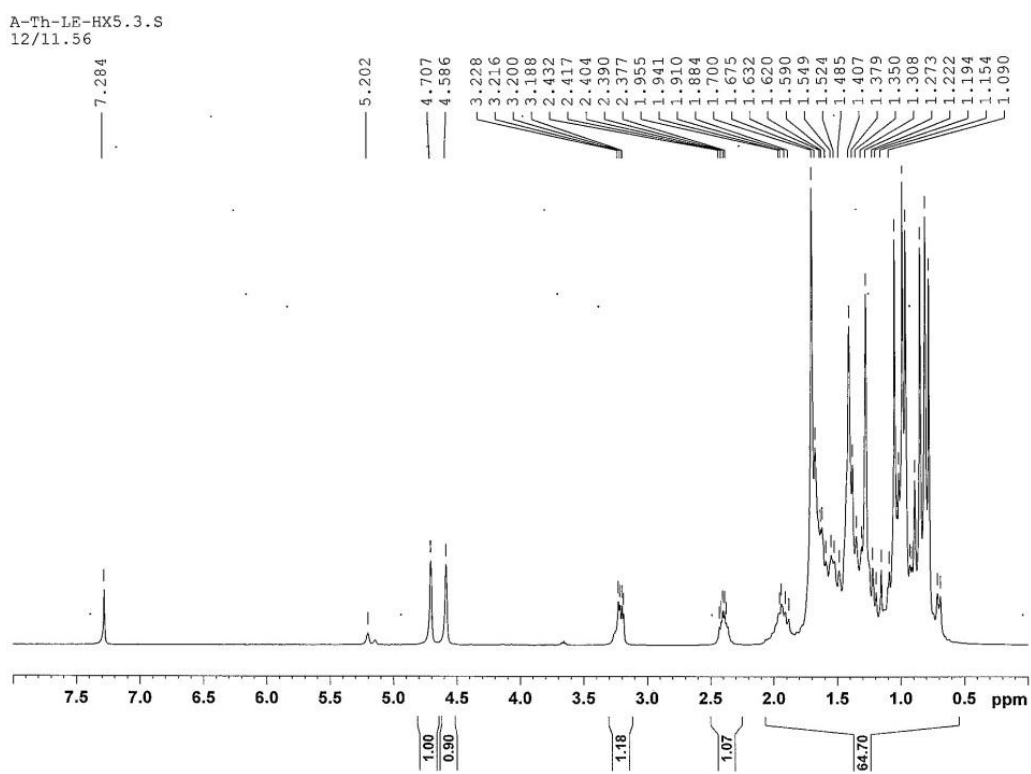
จากตารางที่ 4.8 สามารถทำการส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ได้ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 30 % เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน สามารถแยกได้ทั้งหมด 4 fraction ดังตารางที่ 4.8 พบว่าสารที่ได้ของเหลวหนืดสีดำและสีน้ำตาลแดง เมื่อนำไปตรวจสอบด้วย TLC พบว่าปรากฏแถบสีเขียวอยู่ ซึ่งน่าจะเป็นรงควัตถุจึงไม่นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.9 ลักษณะสาร น้ำหนัก และค่า R_f ของสารที่สกัดได้จาก fraction ที่ 4 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้

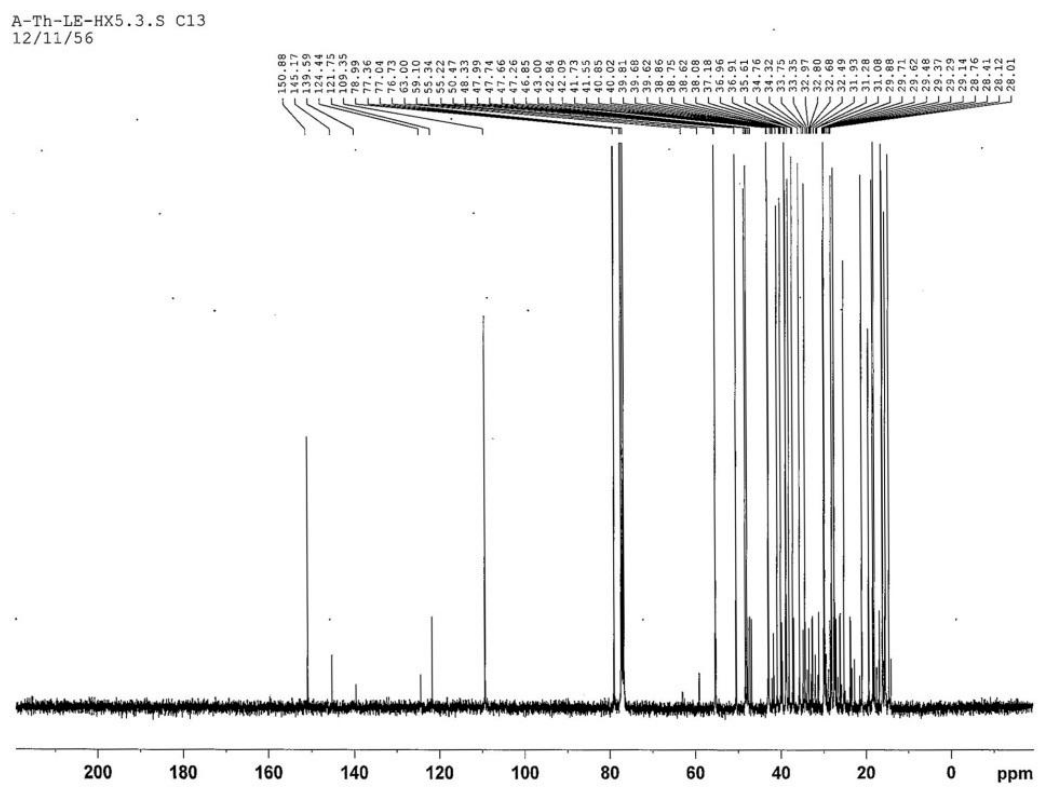
Fraction	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (g)	ค่า R_f (40%EtOAc : Hexane)
F4.1	ของเหลวสีเขียว	0.2453	0.22
F4.2	ของเหลวสีเขียวอ่อน	0.1418	0.34
F4.3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	0.9027	0.41
F4.4	ของเหลวหนืดสีเหลืองน้ำตาล	0.0814	0.58
F4.5	ของเหลวหนืดสีดำ	0.1963	0.61
F4.6	ของเหลวหนืดสีดำ	0.1466	0.62,0.44
F4.7	ของเหลวหนืดสีดำ	0.1179	0.54

จากตารางที่ 4.9 สามารถทำการส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ได้ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 40 % เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน สามารถแยกได้ทั้งหมด 7 fraction ดังตารางที่ 4.9 พบว่าสารที่ได้ของเหลวหนืดสีดำและสีเขียวเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย TLC ปรากฏแถบสีเขียวอยู่และเมื่อดังตั้งทิ้งไว้ให้แห้งสารไม่เกิดผลึก สารที่ได้มีรังควัตถุปนอยู่มากจึงไม่สนใจทำการแยกต่อ

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ พบว่า fraction ที่ 2.1 ได้สารที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.3313 กรัม เมื่อนำมาทดสอบด้วย TLC พบว่าเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์ จึงนำไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปีและหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 ซึ่งได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.5 - 4.8 และมีจุดหลอมเหลว 212-215°C

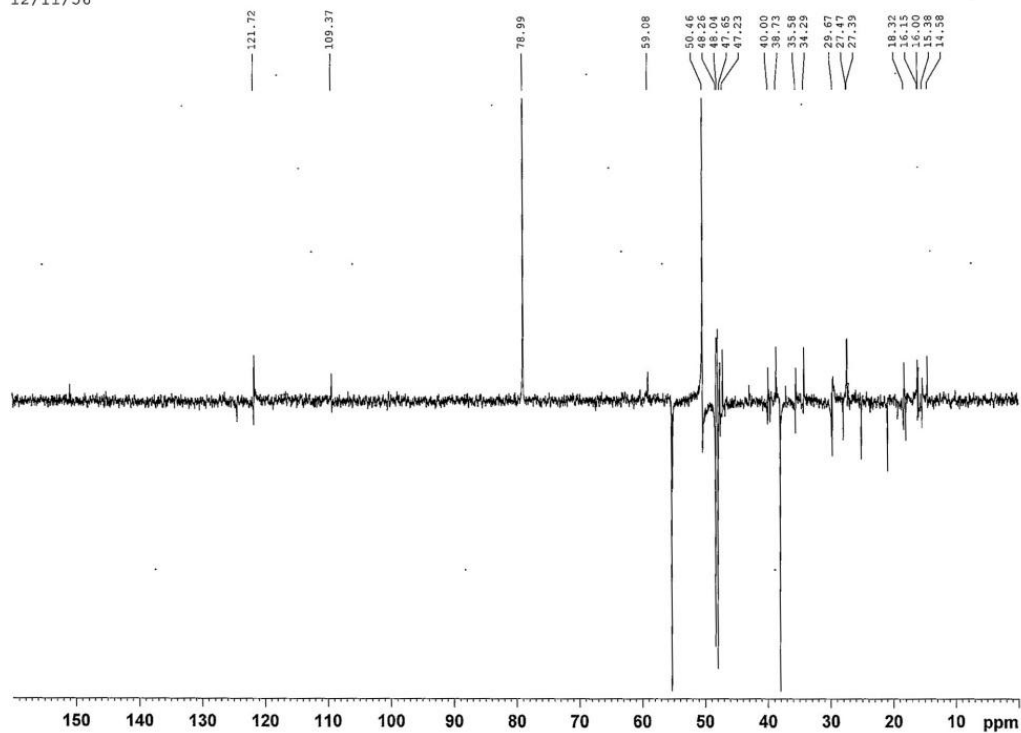


รูปที่ 4.5 ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไค้



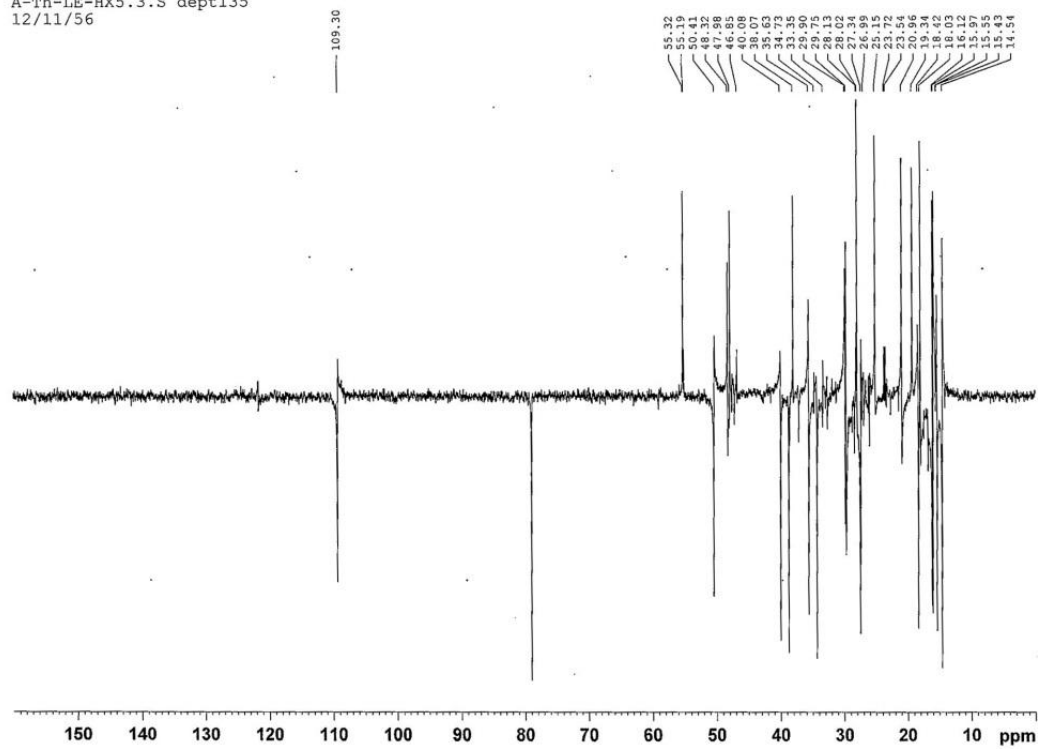
รูปที่ 4.6 ^{13}C NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไค้

A-Th-LE-HX5.3.S dept90
12/11/56



รูปที่ 4.7 DEPT-90 ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้

A-Th-LE-HX5.3.S dept135
12/11/56



รูปที่ 4.8 DEPT-135 ของผลึก fraction 2.1 จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

4.3 ผลการสำรวจประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution assay

ผลของสารบริสุทธิ์ (Lupeol) จาก *G. daltonii* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียฉวยโอกาส โดยการหาความเข้มข้นของ Lupeol ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส 10 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.10- 4.13 พบว่า Lupeol มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *A. baumannii* MRSA, *P. mirabilis* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากัน คือ 128 ไมโครโมลาร์ รองลงมาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* *K. pneumoniae* และ *P. vulgaris* มีค่า MIC เท่ากับ 512 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน พบว่า Lupeol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 128-512 ไมโครโมลาร์ ตารางที่ 4.10 นอกจากนี้ยังพบว่า เตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ Lupeol มีประสิทธิภาพดีกว่าแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และ Lupeol ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* ATCC25922 และเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ คือ *P. aeruginosa* ไม่ดีเยี่ยม ส่วนประสิทธิภาพของแอมพิซิลลินให้ผลการทดสอบน้อยที่สุดในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 10 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.10

ผลของสารบริสุทธิ์ (Glochidone) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *B. subtilis* โดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 512 ไมโครโมลาร์ รองลงมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1024 ไมโครโมลาร์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* และ *P. aeruginosa* ไม่ดีเยี่ยม ให้ค่า MIC เท่ากับ 2048 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามสารบริสุทธิ์ Glochidone ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, MRSA และ *S. aureus* และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ Glochidone กับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าสารบริสุทธิ์ Glochidone สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ พบว่า Glochidone มีประสิทธิภาพน้อยกว่าเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.10

4.4 ประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร Lupeol หรือ Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธี agar diffusion assay

เมื่อทดลองใช้สารบริสุทธิ์ (Lupeol หรือ Glochidone) ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ เตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางชนิดที่พบโอกาสติดเชื้อในโรงพยาบาลสูงและก่อให้เกิดปัญหาคือยาในหอผู้ป่วยของโรงพยาบาล คือ *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินร่วมกับสารบริสุทธิ์ Lupeol ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้น ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้ง 2 ชนิด กล่าวคือ เมื่อใช้ยา

เตตราซัยคลิน ร่วมกับ Lupeol (ซึ่งดูได้จากค่า FICI) จะพบการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 (FICI เท่ากับ 0.56) และเสริมฤทธิ์กันได้ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (FICI เท่ากับ 0.27) (ตารางที่ 4.11) และเช่นเดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินร่วมกับสารบริสุทธิ์ Glochidone สามารถเสริมฤทธิ์กันเมื่อใช้ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (FICI = 0.26) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 เพราะลำพัง Glochidone เพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ จึงไม่สามารถหาค่า FICI ได้ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ Lupeol และ Glochidone และยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียฉวยโอกาส

แบคทีเรีย	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (ไมโครโมลาร์)				ยาปฏิชีวนะ
	ชนิดแบคทีเรีย	Lupeol	Glochidone	แอมพิซิลลิน	
แกรมบวก	<i>B. cereus</i>	512	512	128	128
	<i>B. subtilis</i>	>2048	512	2048	512
	MRSA	128	>2048	128	128
	<i>S. aureus</i>	128	>2048	128	128
แกรมลบ	<i>A. baumannii</i>	256	1024	2048	128
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2048	>2048	>2048	256
	<i>K. pneumoniae</i>	512	>2048	128	1024
	<i>P. aeruginosa</i> ไม่ดื้อยา	1024	2048	>2048	64
	<i>P. mirabilis</i>	128	2048	128	2048
	<i>P. vulgaris</i>	128	>2048	1024	512

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร Lupeol และยาปฏิชีวนะเมื่อเปรียบเทียบกับใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ดื้อยาและไม่ดื้อยา

แบคทีเรีย	MIC alone	MIC combination	MIC alone	FIC	FIC	FICI	แปลผลดัชนีชี้วัด ประสิทธิภาพพร้อม
	เตตราซัยคลิน	เตตราซัยคลิน+ Lupeol	Lupeol	เตตราซัยคลิน	Lupeol		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	128	2048	0.50	0.063	0.56	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
<i>P. aeruginosa</i> ไม่ดื้อยา	64	16	1024	0.25	0.016	0.27	เสริมฤทธิ์กัน
<i>P. aeruginosa</i> ดื้อยา	>2048	-	>2048	-	-	-	-

แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพพร้อม FICI ได้ดังนี้

เมื่อ $FICI \leq 0.5$	หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)
$0.5 < FICI < 1$	หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)
$FICI = 1$	หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
$1 < FICI \leq 4$	หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
$FICI > 4$	หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonist)

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร Glochidone และยาปฏิชีวนะเมื่อเปรียบเทียบกับใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ดื้อยาและไม่ดื้อยา

แบคทีเรีย	MIC alone	MIC combination	MIC alone	FIC	FIC	FICI	แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม
	เตตราซัยคลิน	เตตราซัยคลิน+ Glochidone	Glochidone	เตตราซัยคลิน	Glochidone		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	64	>2048	0.25	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ไม่ดื้อยา	64	16	2048	0.25	0.008	0.26	เสริมฤทธิ์กัน
<i>P. aeruginosa</i> ดื้อยา	>2048	-	>2048	-	-	-	-

แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI ได้ดังนี้

เมื่อ $FICI \leq 0.5$	หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)
$0.5 < FICI < 1$	หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)
$FICI = 1$	หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
$1 < FICI \leq 4$	หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
$FICI > 4$	หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonist)

ดังนั้นควรเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินเพียงอย่างเดียว หรือเพิ่มประสิทธิภาพของเตตราซัยคลินเมื่อผสมกับ Lupeol และ Glochidone เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียให้ดียิ่งขึ้นเพราะมีฤทธิ์เสริมกัน ส่วนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยาด้วยยาแอมพิซิลลินเพียงชนิดเดียวนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ) และสุดท้ายเมื่อผสมปฏิชีวนะเตตราซัยคลินกับ Lupeol และ Glochidone ก็ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา จึงไม่สามารถหาค่า FICI ได้ (ตารางที่ 4.11)

จากการหาค่า MIC (ตารางที่ 4.12) ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าสาร Lupeol และ Glochidone เมื่อผสมเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และสามารถออกฤทธิ์ร่วมกันได้ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา (สามารถลดค่า MIC ของยาเตตราซัยคลินลงอย่างน้อย 1-4 เท่า) แต่เมื่อผสมกับแอมพิซิลลินกลับไม่ให้เกิดผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกัน (ไม่แสดงผล) ดังนั้นจึงทำการทดสอบต่อไปเฉพาะกับการทดสอบกับเตตราซัยคลินเท่านั้น เพื่อหาประสิทธิภาพของสาร Lupeol และ Glochidone ต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ณ จุดเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ยาและสาร Lupeol และ Glochidone ยังคงออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อจะอธิบายให้เห็นว่าสาร Lupeol และ Glochidone สามารถลดปริมาณการใช้ยา และออกฤทธิ์ร่วมได้ดีกับยาปฏิชีวนะ เพราะการลดการใช้ยาปฏิชีวนะจะช่วยเพื่อลดอัตราเสี่ยงของการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส โดยได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสาร Lupeol และ Glochidone ร่วมกับเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในลำดับต่อไปในการศึกษาตอนที่ 4.5

4.5 ผลของสารบริสุทธิ์ต่อหน่วยเวลา (Time-kill assay) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

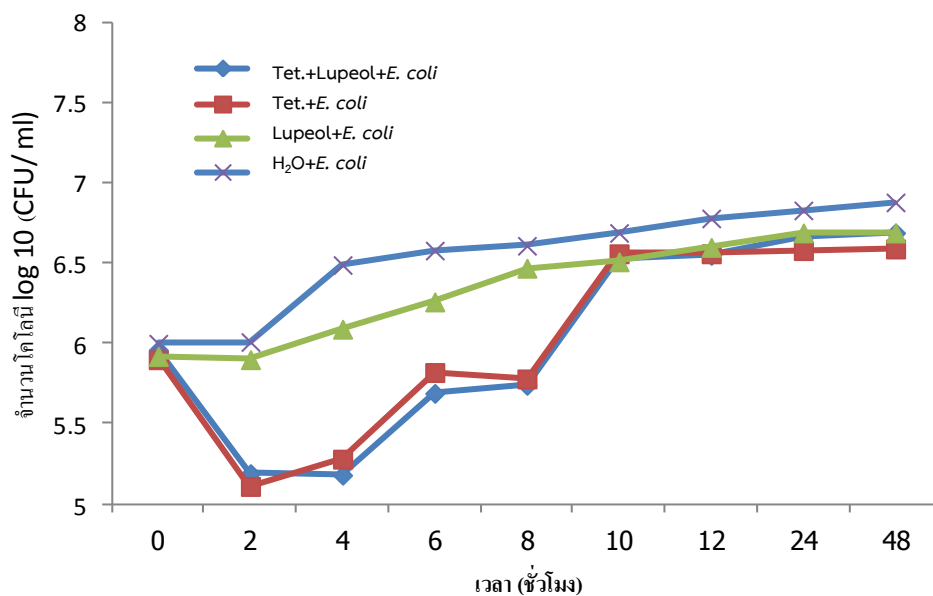
จากผลการศึกษาหาจุดเวลาที่เหมาะสมต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ในการเสริมฤทธิ์กันของ Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน พบว่าเมื่อเลือกใช้สาร Lupeol เท่ากับ $4 \times \text{MIC}$ (2048 ไมโครโมลาร์/512 ไมโครโมลาร์) และยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน เท่ากับ $2 \times \text{MIC}$ (256 ไมโครโมลาร์/128 ไมโครโมลาร์) จะพบว่าเมื่อใช้ Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินปริมาณลดลงดังกล่าวข้างต้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 กล่าวคือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย จะลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 95.10 ของการยับยั้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC25922 ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.13)

จากผลการศึกษาหาจุดเวลาที่เหมาะสมต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาในการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ Lupeol ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน พบว่า เมื่อเลือกใช้ Lupeol เท่ากับ $64 \times \text{MIC}$ (1024 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ $4 \times \text{MIC}$ (64 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 6 กล่าวคือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมร้อยละ 54.90 ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.13)

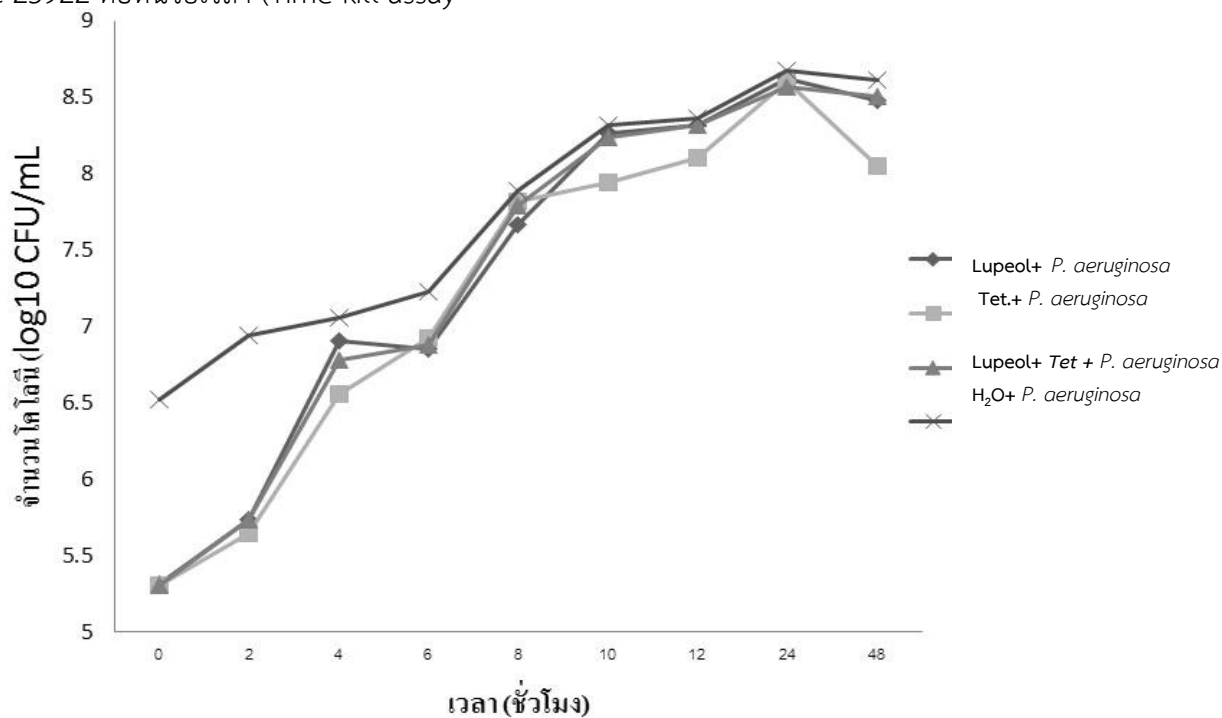
จากผลการศึกษาหาจุดเวลาที่เหมาะสมต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 ในการเสริมฤทธิ์กันของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน พบว่าเมื่อใช้สาร Glochidone เท่ากับ $8 \times \text{MIC}$ (2048 ไมโครโมลาร์/ 256 ไมโครโมลาร์) และยาปฏิชีวนะ เตตราซัยคลิน เท่ากับ $4 \times \text{MIC}$ (256 ไมโครโมลาร์/ 64

ไมโครโมลาร์) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 กล่าวคือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจะลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 89.99 ของการยับยั้ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 4.11, ตารางที่ 4.14)

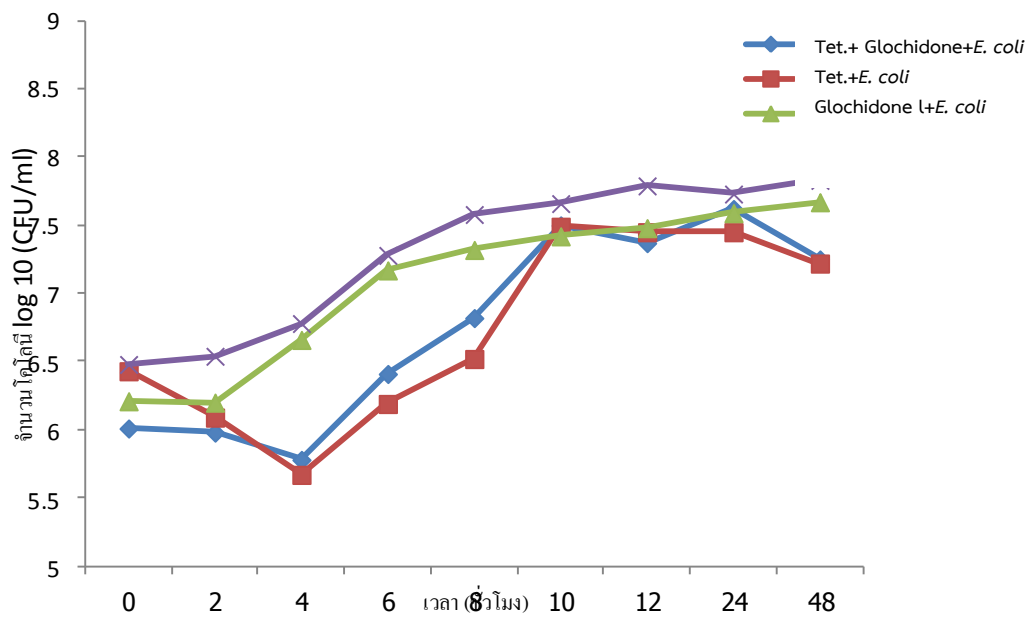
จากผลการศึกษาหาจุดเวลาที่เหมาะสมต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดี้อย่าในการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน พบว่าเมื่อใช้ Glochidone เท่ากับ 4xMIC (2048 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ 4xMIC (64 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 2 กล่าวคือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมร้อยละ 77.26 ของการยับยั้ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 4.12, ตารางที่ 4.14)



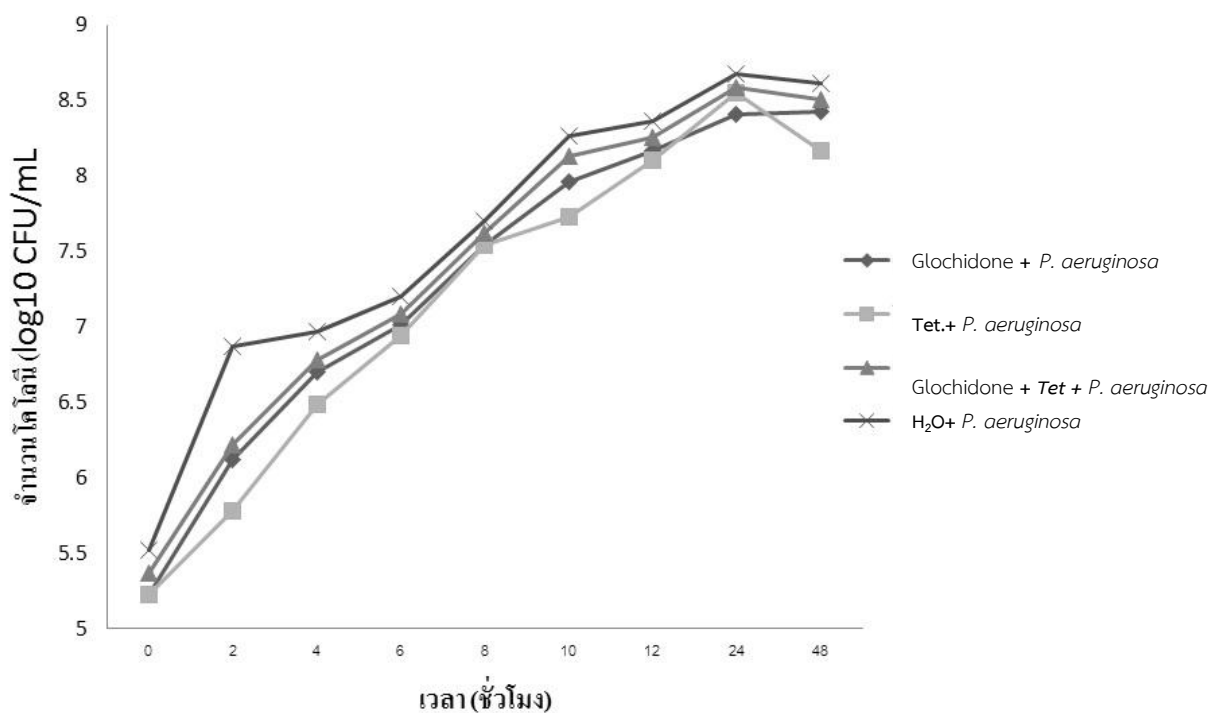
รูปที่ 4.9 ผลของสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (Time kill assay)



รูปที่ 4.10 ผลของสาร Lupeol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ตั้ยา ต่อหน่วยเวลา (time-kill assay)



รูปที่ 4.11 ผลของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (Time kill assay)



รูปที่ 4.12 ผลของสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาต่อหน่วยเวลา (time-kill assay)

ตารางที่ 4.13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ณ จุดเวลาที่เหมาะสมของสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	เวลาที่เหมาะสมของการยับยั้งการเจริญของ Lupeol	
	Lupeol +ยาเตตราซัยคลิน	ค่า EAA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	95.10±1.73
<i>P. aeruginosa</i> ไม้ดื้อยา	6	54.90±27.80

ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ณ จุดเวลาที่เหมาะสมของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	เวลาที่เหมาะสมของการยับยั้งการเจริญของ Glochidone	
	Glochidone + ยาเตตราซัยคลิน	ค่า EAA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	89.99±2.89
<i>P. aeruginosa</i> ไม้ดื้อยา	2	77.26±15.76

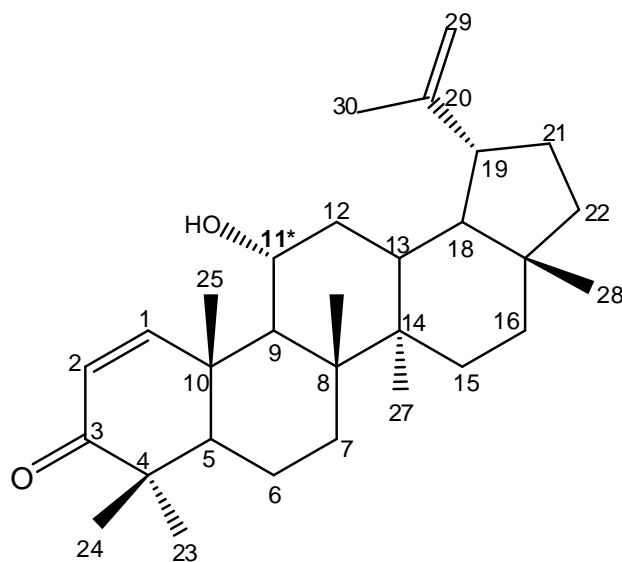
บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์

จากการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากไคร้ โดยนำส่วนรากของไคร้ น้ำหนัก 3 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนได้ส่วนสกัดหยาบหนัก 10.5 กรัม นำส่วนสกัดที่ได้ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์มา 1 ชนิด จาก fraction ที่ 1 นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 ซึ่งสรุปได้ดังตารางที่ 5.1-5.3 พบว่าจากข้อมูล NMR มี 30 คาร์บอน ซึ่งควรจะเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนและเมื่อค้นหาจากรายงานการวิจัยต่างๆพบว่าข้อมูลทาง NMR ของสารบริสุทธิ์ที่ได้มีข้อมูลใกล้เคียงกับข้อมูล NMR ของไตรเทอร์พีน 41 ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 สูตรโครงสร้างสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีน

ตารางที่ 5.1 ค่า chemical shift (^1H NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งโปรตอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_{H} เอกสารอ้างอิง ⁴¹	δ_{H} ChemDraw Ultra	δ_{H} fraction 1
CH	1	8.30 d	6.66	7.12 (d)
	2	5.71 d	5.98	5.80 (d)
	11*	4.85 dt	-	-
	19	2.40 dt	2.18	2.42 (m)
	13	1.90 t	1.40	1.94 (m)
	9	1.75	1.51	1.75-1.63 (m)
	5	1.55	1.66	
	18	1.45	1.43	
CH ₂	29	4.61,4.73	5.11,4.92	4.72,4.60 (b)
	12	1.98	1.68,1.43	1.95 (m)
	16	1.45,1.56	1.56,1.31	1.60-1.55 (m)
	7	1.44	1.56,1.31	
	21	1.40,2.01	1.64,1.39	
	6	1.35,1.90	1.53,1.28	
	22	1.31,1.40	1.55,1.30	

ตารางที่ 5.1 ค่า chemical shift (^1H NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ (ต่อ)

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งโปรตอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_{H} เอกสารอ้างอิง ⁴¹	δ_{H} ChemDraw Ultra	δ_{H} fraction 1
CH ₂	15	1.24,1.40	1.56,1.31	1.60-1.55 (m)
	11*	-	1.28	
CH ₃	30	1.70 s	1.82	1.70 s
	25	1.26 s	1.30	1.15 s
	23	1.12 s	1.30	1.13 s
	24	1.12 s	1.30	1.10 s
	26	1.11 s	1.04	1.08 s
	27	0.98 s	1.04	0.97 s
	28	0.80 s	1.04	0.84 s

หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างระหว่าง ^1H NMR สารบริสุทธิ์(fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนรากของไคร้กับสารอ้างอิง

ตารางที่ 5.2 ค่า chemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		$\delta_{\text{เอกสารอ้างอิง}}^{41}$	$\delta_{\text{ChemDraw Ultra}}$	$\delta_{\text{fraction 1}}$
C	3	205.3	204.5	205.5
	20	150.2	150.3	150.8
	4	45.0	44.6	44.6
	17	43.0	43.0	43.1
	8	42.9	29.9	43.0
	14	42.8	43.3	42.9
	10	40.6	35.5	39.9
CH	2	165.1	125.6	159.8
	1	136.6	158.1	125.1
	11*	70.6	-	-
	5	52.9	53.7	53.5
	9	48.9	58.5	48.3
	19	47.7	48.0	48.1
	18	47.5	48.7	47.9
	13	37.1	36.3	37.5

ตารางที่ 5.2 ค่า chemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ (ต่อ)

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		$\delta_{\text{เอกสารอ้างอิง}}^{41}$	$\delta_{\text{ChemDraw Ultra}}$	$\delta_{\text{fraction 1}}$
CH_2	29	113.5	110.6	109.4
	22	39.8	40.0	39.5
	12	37.3	35.5	37.3
	16	35.3	35.6	35.6
	7	34.5	35.3	34.1
	21	29.7	29.8	29.8
	15	27.3	26.4	27.8
	11*	-	21.4	21.2
	6	18.9	19.0	19.3
CH_3	24	28.2	21.8	28.2
	23	21.4	21.8	22.1
	25	19.9	19.2	20.8
	30	19.3	21.7	19.1
	28	18.0	18.5	18.2
	26	17.4	18.9	16.4

ตารางที่ 5.2 ค่า chemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10) ของสารอ้างอิงกลุ่มไตรเทอร์พีนเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนรากของไคร้ (ต่อ)

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		$\delta_{\text{เอกสารอ้างอิง}}^{41}$	$\delta_{\text{ChemDraw Ultra}}$	$\delta_{\text{fraction 1}}$
CH_3	27	14.4	15.0	15.9

หมายเหตุ * แสดงความแตกต่างระหว่าง ^{13}C NMR สารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้กับสารอ้างอิง

ตารางที่ 5.3 ค่า chemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (fraction ที่1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		DEPT-90	DEPT-135	^{13}C NMR
CH	2	159.7	159.7	159.8
	1	125.1	125.1	125.1
	5	53.4	53.4	53.5
	9	49.0	49.0	48.3
	19	48.2	48.2	48.1
	18	47.9	47.9	47.9
	13	37.5	37.5	37.5
CH ₂	29	-	109.4	109.4
	22	-	39.5	39.5
	12	-	37.3	37.3
	16	-	35.6	35.6
	7	-	34.1	34.1
	21	-	29.8	29.8
	15	-	27.8	27.8
	11	-	21.2	21.2

ตารางที่ 5.3 ค่า chemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 1) จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ (ต่อ)

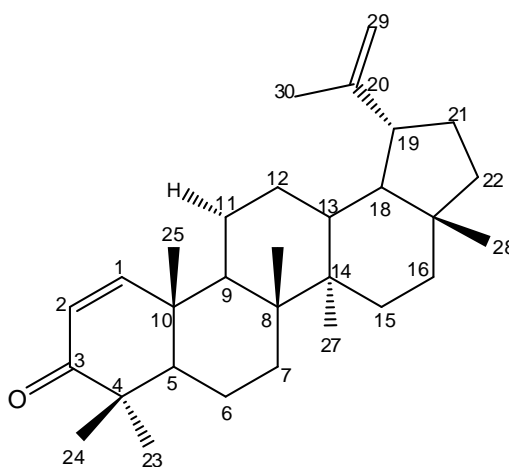
ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		DEPT-90	DEPT-135	^{13}C NMR
CH ₂	6	-	19.3	19.3
CH ₃	24	-	28.2	28.2
	23	-	22.1	22.1
	25	-	20.8	20.8
	30	-	19.1	19.1
	28	-	18.2	18.2
	26	-	16.4	16.4
	27	-	15.9	15.9
C	3	-	-	205.5
	20	-	-	150.8
	4	-	-	44.6
	17	-	-	43.1
	8	-	-	43.0
	14	-	-	42.9
	10	-	-	39.9

จากข้อมูล ^1H NMR ของสารบริสุทธิ์ ตารางที่ 5.3 ของ fraction ที่ 1 พบว่ามีค่า chemical shift ที่ 7.12 ppm (d) เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 1 ค่า chemical shift ที่ 5.80 ppm (d) เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 2 ค่า chemical shift ที่ 2.42 ppm (m) เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 19 ค่า chemical shift ที่ 1.94 ppm (m) เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 13 ค่า chemical shift ระหว่าง 1.75-1.63 ppm (m) เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 3 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 9, 5, และ 18 ค่า chemical shift ที่ 4.60, 4.72 ppm (b) เป็นพีคของ methylene proton (-CH₂-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 29 ค่า chemical shift ที่ 1.95 ppm (m) เป็นพีคของ methylene proton (-CH₂-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 12 ค่า chemical shift ระหว่าง 1.60-1.55 ppm (m) เป็นพีคของ methylene proton (-CH₂-) 7 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 16, 7, 21, 6, 22, 15 และ 11 ค่า chemical shift 1.70 s, 1.15, 1.13, 1.10, 1.08, 0.97, 0.84 ppm (s) เป็นพีคของ methyl proton (-CH₃-) 7 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 30, 25, 23, 24, 26, 27 และ 28 ตามลำดับ

จากข้อมูล ^{13}C NMR ตารางที่ 5.2 ของ fraction 1 พบว่ามีค่า chemical shift ที่ 205.5 ppm เป็นพีคของ quaternary carbon (-C-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 3 ค่า chemical shift ที่ 150.3 ppm เป็นพีคของ quaternary carbon (-C-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 20 ค่า chemical shift ที่ 44.6, 43.1, 43.0, 42.9, 39.9 ppm เป็นพีคของ quaternary carbon (-C-) 5 หมู่ ที่ตำแหน่ง 4, 17, 8, 14, 10 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 159.8 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 2 ค่า chemical shift ที่ 125.1 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 1 ค่า chemical shift ที่ 53.5, 48.3 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 2 หมู่ ที่ตำแหน่ง 5, 9 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 48.1 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 19 ค่า chemical shift ที่ 47.9 และ 37.5 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 2 หมู่ ที่ตำแหน่ง 18, 13 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 109.4 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 29 ค่า chemical shift ที่ 39.5, 37.3, 35.6, 34.1, 29.8, 27.8, 21.2 และ 19.3 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) ทั้งหมด 8 พีค ที่ตำแหน่ง 22, 12, 16, 7, 21, 15, 11 และ 6 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 28.2, 22.1, 20.8 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) ทั้งหมด 3 พีค ที่ตำแหน่ง 24, 23, 25 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 19.1 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 30 ค่า chemical shift ที่ 18.2, 16.4 และ 15.9 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) ทั้งหมด 3 พีค ที่ตำแหน่งที่ 28, 26 และ 27 ตามลำดับ

จากข้อมูล DEPT 90 ที่ค่า chemical shift 159.8 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 พีค ค่า chemical shift 125.1 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 พีค ค่า chemical shift ระหว่าง 37.5 – 53.5 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 5 พีค จากข้อมูล DEPT 135 ที่ ค่า chemical shift 159.8 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 พีค ค่า chemical shift 125.1 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 พีค ค่า chemical shift ระหว่าง 37.5 – 53.5 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 5 พีค ซี่งขึ้น ค่า chemical shift 109.4 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) 1 พีค ค่า chemical shift ระหว่าง 19.3-39.5 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) ทั้งหมด 8 พีค ซี่งลง ค่า chemical shift ระหว่าง 15.9-28.2 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) ทั้งหมด 7 พีค ซี่งขึ้น

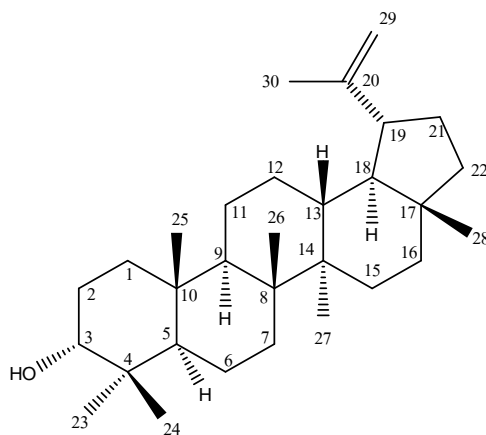
เมื่อนำข้อมูลของ DEPT-90 และ DEPT-135 มาเปรียบเทียบกับ ¹³C NMR พบว่า เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 7 พีค เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) ทั้งหมด 9 พีค และเป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) ทั้งหมด 7 ส่วนพีคที่เหลือเป็นพีคของ quaternary carbon (-C-) ทั้งหมด 7 พีค จากการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR และยืนยันพีคต่างๆด้วย DEPT 90 และ DEPT 135 พบว่าใน ¹H NMR และ ¹³C NMR ไม่พบ methine carbon (-CH-) ในตำแหน่งที่ 11 แต่จะพบ methylene carbon (-CH₂-) ในตำแหน่งที่ 11 แทน ซึ่งสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จาก fraction ที่ 1 ของส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้มีลักษณะของแข็งทำการตกผลึกด้วยเฮกเซนผลึกเป็นรูปเข็มสีขาวละเอียดมีน้ำหนัก 0.7845 กรัมจุดหลอมเหลว 166 -168 °C (อ้างอิง 169 -171 °C)⁴¹ สารบริสุทธิ์ที่ได้คือ Glochidone ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 สูตรโครงสร้างของGlochidone

การแยกสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ได้สารบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวซึ่งน่าจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนที่มี 30 คาร์บอน และสารที่ได้ในส่วนสกัดเฮกเซนรากของไคร้เป็นของแข็งที่สามารถนำไปตกผลึกได้และเมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่าสารที่ได้เป็นสารบริสุทธิ์ชื่อว่า Glochidone

จากการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้โดยนำใบไคร้ น้ำหนัก 1.00 กิโลกรัมมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนได้ส่วนสกัดหยาบหนัก 16.5 กรัม นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์มา 1 ชนิดจาก fraction ที่ 2 นำไปตกผลึกด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจะได้ผลึกสีขาวน้ำหนัก 0.0214 กรัม จุดหลอมเหลว 214-215°C (จุดหลอมเหลวอ้างอิง 212-215°C⁴²) นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 ดังตารางที่ 5.4-5.6 พบว่าข้อมูลจาก ¹³C NMR แสดงจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 30 คาร์บอน ซึ่งใกล้เคียงกับสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์และเมื่อทำการค้นหาจากงานวิจัยต่างๆ พบว่าข้อมูลทาง ¹³C NMR ของสารบริสุทธิ์ที่ได้มีข้อมูลใกล้เคียงกับ Lupeol⁴² ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 สูตรโครงสร้างของ Lupeol

ตารางที่ 5.4 ค่า chemical shift (^1H NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0) ของสารอ้างอิง (Lupeol) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งโปรตอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_{H} เอกสารอ้างอิง ⁴²	δ_{H} ChemDraw Ultra	δ_{H} สารบริสุทธิ์ (fraction 2.1)
CH	3	3.18 (dd)	3.15	3.19 (dd, $J = 4.722$ Hz, 4.750 Hz)
	5	0.68 (d)	1.39	0.69 (d)
	9	1.23 (m)	1.39	1.27 (m)
	13	1.66 (m)	1.40	1.63 (m)
	18	1.36 (dd)	1.43	1.38 (m)
	19	2.38 (dt)	2.18	2.38 (m)
CH ₂	1	0.90 (s), 1.67 (s)	1.28, 1.53	0.89 (m), 1.70 (m)
	2	1.85 (d), 1.94 (m)	1.47, 1.72	1.88 (m), 1.94 (m)
	6	1.40 (m), 1.50 (m)	1.28, 1.53	1.55 (m), 1.59 (m)
	7	1.36 (m), 1.40 (m)	1.31, 1.56	1.41 (m), 1.52 (m)
	11	1.22 (m), 1.40 (m)	1.28, 1.53	1.22 (m), 1.48 (m)
	12	1.00 (d), 1.61 (m)	1.28, 1.53	1.02 (m), 1.62 (m)
	15	0.99 (t)	1.31, 1.56	0.99 (m)
	16	1.34 (d)	1.31, 1.56	1.35 (m)
	21	1.32 (m), 1.92 (m)	1.39, 1.64	1.31 (m), 1.91 (m)
	22	1.19 (m)	1.30, 1.55	1.20 (m)
29	4.54 (m), 4.66 (m)	4.92, 5.11	4.59 (s), 4.71 (s)	

ตารางที่ 5.4 (ต่อ) ค่า chemical shift (^1H NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0) ของสารอ้างอิง (Lupeol) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction 2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของโปรตอน	ตำแหน่งโปรตอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_{H} เอกสารอ้างอิง ⁴²	δ_{H} ChemDraw Ultra	δ_{H} สารบริสุทธิ์ (fraction 2.1)
CH ₃	23	0.74 (s)	0.99	0.71 (m)
	24	0.76 (s)	0.99	0.78 (m)
	25	0.80 (s)	1.04	0.81 (m)
	26	0.92 (s)	1.04	0.92 (m)
	27	0.94 (s)	1.04	0.93 (m)
	28	1.01 (s)	1.04	1.03 (m)
	30	1.66 (s)	1.82	1.68 (m)

จากตารางที่ 5.4 ข้อมูล ^1H NMR ของ fraction 2.1 ปรากฏค่า chemical shift 0.69, 1.27, 1.63 และ 1.38 ppm เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 4 หมู่ ที่ตำแหน่ง 5, 9, 13 และ 18 ตามลำดับ ค่า chemical shift 3.19 ppm เป็นพีคของ methine proton (-CH-OH) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 3 ค่า chemical shift 2.38 ppm เป็นพีคของ methine proton (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 19 ค่า chemical shift (0.89, 1.70), (1.88, 1.94), (1.55, 1.59), (1.41, 1.52), (1.22, 1.48), (1.02, 1.62), 0.99, 1.35, (1.31, 1.91) และ 1.20 ppm เป็นพีคของ methylene proton (-CH₂-) 10 หมู่ ที่ตำแหน่ง 1, 2, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 21 และ 22 ตามลำดับ ค่า chemical shift (4.59, 4.71) ppm เป็นพีคของ methylene proton (-C=CH₂) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 29 ค่า chemical shift 0.71, 0.78, 0.81, 0.92, 0.93 และ 1.03 ppm เป็นพีคของ methyl proton (-CH₃) 6 หมู่ ที่ตำแหน่ง 23, 24, 25, 26, 27 และ 28 ตามลำดับ ค่า chemical shift 1.68 ppm เป็นพีคของ methyl proton (-CH₃) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 30

ตารางที่ 5.5 ค่าchemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0) ของสารอ้างอิง(Lupeol) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของคาร์บอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_c เอกสารอ้างอิง ⁴²	δ_c ChemDraw Ultra	δ_c สารบริสุทธิ์ (fraction 5.3)
C	4	38.70	38.80	38.86
	8	40.00	40.90	40.02
	10	37.10	37.40	37.18
	14	43.00	42.90	43.00
	17	42.80	43.00	42.84
	20	150.20	150.30	150.88
CH	3	79.00	78.60	78.99
	5	55.30	55.20	55.34
	9	50.40	50.30	50.47
	13	38.00	37.90	38.08
	18	48.30	48.40	48.33
	19	47.90	48.00	47.99

ตารางที่ 5.5 (ต่อ) ค่าchemical shift (^{13}C NMR) จากเอกสารอ้างอิงและ ChemDraw Ultra (version 10.0) ของสารอ้างอิง(Lupeol) เปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ (fraction ที่2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของคาร์บอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		δ_c เอกสารอ้างอิง ⁴²	δ_c ChemDraw Ultra	δ_c สารบริสุทธิ์ (fraction 2.1)
CH ₂	1	38.00	38.40	38.62
	2	27.40	27.40	24.47
	6	18.30	17.40	18.34
	7	34.30	35.20	34.32
	11	20.90	21.70	20.96
	12	25.10	25.40	25.17
	15	27.40	26.40	27.41
	16	35.60	35.60	35.61
	21	29.80	29.80	29.88
	22	38.70	40.00	38.75
	29	109.30	110.60	109.35
CH ₃	23	27.90	23.40	28.01
	24	15.30	23.40	15.39
	25	16.10	16.10	16.13
	26	15.90	18.50	16.00
	27	14.50	15.00	14.57
	28	18.00	18.50	18.02
	30	19.30	21.70	19.33

จากตารางที่ 5.5 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ fraction 2.1 ปรากฏค่า chemical shift ที่ 38.86, 40.02, 37.18, 43.00 และ 42.84 ppm เป็นพีคของ quaternary carbon (-C-) 5 หมู่ ที่ตำแหน่ง 4, 8, 10, 14 และ 17 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 150.88 ppm เป็นพีคของ quaternary carbon (-C=CH₂) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 20 ค่า chemical shift ที่ 55.34, 50.47, 38.08 และ 48.33 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 4 หมู่ ที่ตำแหน่ง 5, 9, 13 และ 18 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 78.99 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-OH) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 3 ค่า chemical shift ที่ 47.99 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 19 ค่า chemical shift ที่ 38.62, 24.47, 18.34, 34.32, 20.96, 25.17, 27.41, 35.61, 29.88 และ 38.75 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) 10 หมู่ ที่ตำแหน่ง 1, 2, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 21 และ 22 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 109.35 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-C=CH₂) 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 29 ค่า chemical shift ที่ 28.01, 15.39, 16.13, 16.00, 14.57 และ 18.02 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃) 6 หมู่ ที่ตำแหน่ง 23, 24, 25, 26, 27 และ 28 ตามลำดับ ค่า chemical shift ที่ 19.33 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃) 1 หมู่ ที่ตำแหน่ง 30

จาก ^1H NMR และ ^{13}C NMR พบว่ามีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับ Lupeol

ตารางที่ 5.6 ค่า chemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของคาร์บอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		DEPT-90	DEPT-135	^{13}C NMR
CH	3	78.99	79.00	78.99
	5	59.08	50.40	55.34
	9	50.46	50.40	50.47
	13	38.73	38.60	38.08
	18	48.26	48.20	48.33
	19	48.04	47.80	47.99
CH ₂	1	-	38.07	38.62
	2	-	23.72	24.47
	6	-	18.42	18.34
	7	-	34.73	34.32
	11	-	20.96	20.96
	12	-	25.15	25.17
	15	-	27.34	27.41
	16	-	35.63	35.61
	21	-	29.90	29.88
	22	-	40.08	38.75
	29	-	109.30	109.35

ตารางที่ 5.6 (ต่อ) ค่าchemical shift ของ DEPT-90, DEPT-135 และ ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ (fraction ที่ 2.1) จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้

ชนิดของคาร์บอน	ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า δ (ppm)		
		DEPT-90	DEPT-135	^{13}C NMR
CH_3	23	-	28.40	28.01
	24	-	15.30	15.39
	25	-	16.10	16.13
	26	-	16.00	16.00
	27	-	14.60	14.57
	28	-	18.20	18.02
	30	-	20.90	19.33
C	4	-	-	38.86
	8	-	-	40.02
	10	-	-	37.18
	14	-	-	43.00
	17	-	-	42.84
	20	-	-	150.88

จากข้อมูล DEPT-90 ปรากฏค่า chemical shift ที่ 78.99, 59.08, 50.46, 38.73, 48.26, 48.04 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 6 พีค ข้อมูล DEPT-135 ปรากฏค่า chemical shift ที่ 79.00, 50.40, 50.40, 38.60, 48.20 และ 47.80 ppm เป็นพีคของ methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 6 พีค ค่า chemical shift ที่ 38.07, 23.72, 18.42, 34.73, 20.96, 25.15, 27.34, 35.63, 29.90, 40.08 และ 109.30 ppm เป็นพีคของ methylene carbon (-CH₂-) ทั้งหมด 11 พีค ค่า chemical shift ที่ 28.40, 15.30, 16.10, 16.00, 14.60, 18.20 และ 20.90 ppm เป็นพีคของ methyl carbon (-CH₃-) 7 พีค

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล DEPT-90 และ DEPT-135 กับข้อมูล ^{13}C NMR พบว่ามี methine carbon (-CH-) ทั้งหมด 6 พีค พีคของ methylene (-CH₂-) ทั้งหมด 11 พีค และพีคของ methyl (-CH₃-) ทั้งหมด 7 พีค ส่วนที่เหลือคือพีคของ quaternary carbon (-C-) 6 พีค

จากการศึกษาข้อมูลจาก ^1H NMR, ^{13}C NMR แล้วทำการยืนยันโครงสร้างด้วย DEPT-90 และ DEPT-135 จึงคาดว่าสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์จาก fraction ที่ 2 คือ Lupeol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูป 5.3

จากการทดลองแยกหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่บริสุทธิ์ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ได้สารบริสุทธิ์ จาก fraction ที่ 1 และส่วนสกัดเฮกเซนของรากไคร้ได้สารบริสุทธิ์จาก fraction ที่ 2.1 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่อยู่ในกลุ่มไตรเทอร์พีนเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก

1. สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดจึงไม่สามารถนำมาตกผลึกได้
2. ผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินี้อาจละลายในตัวทำละลายเมทานอลและตัวทำละลายเฮกเซนได้น้อย จึงพบสารบริสุทธิ์เพียงตัวเดียว
3. สารที่แยกได้ไม่บริสุทธิ์ และมีปริมาณน้อย จึงไม่สามารถนำไปแยกต่อได้
4. สารที่แยกมีรังควันอยู่มาก จึงไม่สามารถนำไปแยกต่อได้

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำสาร Lupeol และ Glochidone (สารในกลุ่ม lupane) มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส 10 สายพันธุ์ พบว่า Lupeol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอย่างชัดเจน แต่ให้ผลการทดสอบกับเชื้อบางสายพันธุ์ และให้ผลการทดสอบฤทธิ์ค่อนข้างดีกว่ายาแอมพิซิลลิน แต่ให้ผลน้อยกว่ายาเตตราซัยคลิน⁴³ ซึ่งสนับสนุนรายงานที่สารประกอบกลุ่ม terpene สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยอาจจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ และยังพบว่าสารกลุ่มไกล์เคียง terpene นี้ยังเกี่ยวข้องกับ การผ่านเข้าออกของ K⁺ ต่อเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* หรือ มีฤทธิ์ไปรบกวนการทำงานของ phospholipids bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ และยังส่งผลต่อระบบเอนไซม์ และสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย⁴³ กลไกที่คาดว่า Lupeol และ Glochidone อาจยับยั้งการทำงานของคล้ายสารกลุ่ม triterpenoids ที่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ DNA และการสังเคราะห์ macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก⁴⁰ อย่างไรก็ตาม lupanes อาจมีความเป็นพิษสูง เพราะการศึกษาเกี่ยวกับการสลายอีโมโกลบินที่เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย lupanes ซึ่งชักนำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ซึ่งถือเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับการพัฒนาทางด้านการแพทย์ จากการติดตามผลของ lupanes จากธรรมชาติ และ oleanane แสดงให้เห็นว่า lupanes สามารถสลาย อีโมโกลบินและยังสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และสัมพันธ์กับการเกิด

โปรแกรมแห่งความตายได้⁴⁴ จากงานวิจัยนี้จึงต้องทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Lupeol และ Glochidone เช่น ถ้า Lupeol และ Glochidone ช่วยนำพาการดูดซึมยาเข้าเซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น ควรนำมาทดสอบประสิทธิภาพการซึมผ่านของ Lupeol และ Glochidone เข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ด้วย Nitrocefin assay เป็นต้น⁴⁵

เมื่อนำสาร Lupeol และ Glochidone มาทดสอบฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสกลุ่มที่มักก่อให้เกิดปัญหาที่อยู่ในโรงพยาบาล คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาและไม่ดื้อยา พบว่าสาร Lupeol ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิด คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา และสามารถลดค่า MIC ของการใช้เตตราซัยคลินลงมากกว่า 2 เท่าของค่า MIC เดิมของยาเมื่อใช้เพียงตัวเดียว แต่ Lupeol ไม่สามารถออกฤทธิ์ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน (ไม่แสดงผลการทดสอบ) และ เมื่อนำ Glochidone มาทดสอบฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินให้ผลเสริมฤทธิ์เฉพาะกับการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาเท่านั้น นอกนั้นไม่สามารถหาค่า FICI ได้ (ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อออกฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเชื้อ คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ดื้อยา) และผลของการวิเคราะห์หาจุดเวลาที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของสาร Lupeol และ Glochidone เมื่อผสมยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าชั่วโมงที่ 4 และ 6 น่าจะเป็นเวลาที่ที่ดีที่สุดของการออกฤทธิ์ของ Lupeol และ Glochidone ตามลำดับ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 และออกฤทธิ์ร่วมกันได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 6 และ 2 ตามลำดับ ในยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการนำสารบริสุทธิ์ Lupeol และ Glochidone ที่ได้จากต้นไคร้ มาทดสอบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดทำงานวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่นๆของไคร้หมัด เช่น ด้านมะเร็ง ด้านการอักเสบ และด้านเชื้อไวรัส นอกจากนี้ควรศึกษากลไกการทำงานของสารบริสุทธิ์ Lupeol และ Glochidone จากต้นไคร้ต่อไปเพื่อระบุกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ Lupeol และ Glochidone ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาในระดับเชิงโมเลกุลกับแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต หรือศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือเชื้อราในกลุ่มอื่นๆต่อไปเพื่อสามารถนำสารบริสุทธิ์ Lupeol และ Glochidone จากต้นไคร้ไปพัฒนาใช้แทนหรือควบคู่กับยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลในปัจจุบัน เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสในอนาคต

บรรณานุกรม

1. วันเฉลิม จันทรากุล. (2537). *สมุนไพรไทย ชูรภกิจหมื่นล้าน*. กรุงเทพฯ: นาบอนอิงค์.
2. รัตนา อินทรานุกุล. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
3. จิตรพิ บัวผัน. (2548). *เรียนรู้เรื่องสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: พีรามิต. ความเป็นมาของพืชสมุนไพรไทย. วันที่ค้นข้อมูล 6 ธันวาคม พ.ศ. 2552, เข้าถึงจาก <http://www.google.com>
4. นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพมหานครมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
5. Alekshun, M.N., and Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, (2007), 128, 1037-1050.
6. David, G., Slack, C. B. &Peutherer, J. F. *Medical Microbiology*. London: ElsevierScience Limited. (2012).
7. Kumar, A., and Schweizer, H. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2005) 57, 1486-1513.
8. มั่นปู้. วันที่ค้นข้อมูล 12 มกราคม พ.ศ. 2555, เข้าถึงจาก http://www.tungsong.com/NakhonSri/vegetable/group_1/1_27.html
9. ไคร้เส็ด. วันที่สืบค้น 12 มกราคม พ.ศ. 2555, เข้าถึงจาก <http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=109>
10. คาร์โบไฮเดรต. วันที่สืบค้น 12กุมภาพันธ์ 2555 เข้าถึงจาก <http://nuengruthai5230.blogspot.com/2010/06/carbohydrate-c-h-o-2-1.html>
11. ไชมัน. วันที่สืบค้น 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem8/dream/15.html
12. น้ำมันหอมระเหย. วันที่สืบค้น 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก http://www.pharmacy.cmu.ac.th/dic/newsletter/newpdf/newsletter9_1/essential_20oil.pdf และ <http://www.millioncandle.com/knowledge/60--essential-oil-.html>

13. วิตามิน. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://www.patrunning.info/show.php?Category=board&No=6593>
14. สเตอรอยด์. วันที่สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/steroid.htm
15. อัลคาลอยด์. วันที่สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://www.qsbq.org/article03_48.htm
16. ฟลาโวนอยด์. วันที่สืบค้น 16 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://modrenfarmers.blogspot.com/2011/03/blog-post.html>
17. คูมาริน. วันที่สืบค้น 16 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://th.wikipedia.org/wiki/เภสัชเวช>
18. แคโรทีนอยด์. วันที่สืบค้น 16 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/carotenoid>
19. แคโรทีน. วันที่สืบค้น 16 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://www.nutritionthailand.com/nutrition/vocab/wordcap/carotenoid>
20. แซนโทฟิลด์. วันที่สืบค้น 16 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://pharm.swu.ac.th/psi/content/content10_1.5.48/vol_10_no_1_2005_pg058-066_Carotenoid.pdf
21. การสกัด. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
<http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Forum&file=viewtopic&t=2157>
22. โครมาโทกราฟี. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem11/sub10.html
23. การตกผลึก. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter5.pdf
24. การหาจุดหลอมเหลว. วันที่สืบค้นข้อมูล 12 กุมภาพันธ์ 2555, เข้าถึงจาก
http://www.electron.rmutphysics.com/itsara/ForStudents_Tutor/MyLab/lab1tutor.htm

25. Kris-Etherton, P., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of medicine* (2002), 113(9b), 71S-88S.
26. Cushine, T.P.T and Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial agents* (2005), 26, 343-356.
27. B., Dutta S., Maiti BC., Pradhan DK. and Talapatra SK. Terpenoid constituents of Indian *Glochidion* species: *Glochidion accuminatum* and *Glochidion thomsoni* Partial synthesis of glochidone. *Australian Journal of Chemistry* (1974), 27(12), 2711 – 2714.
28. Xiao [H.T.](#), He [H.P.](#), [J Peng I.](#), [Wang Y.H.](#), [Yang X.W.](#), [Hu X.J.](#), Hao [X.Y.](#) and Hao [X.J.](#) Two new norbisabolane sesquiterpenoid glycosides from *Glochidion coccineum*. *Journal of Asian Natural Products Research* (2008), [10 \(1\)](#).
29. Yoshio Takeda*, Chieko Mima, Toshiya Masuda, Eijihirata,† Anki Takushi ‡ and Hideaki Otsuka §., Glochidioboside, A Glucoside of (7S,8R)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol from leaves of *Glochidion obvatum*. *Phytochemistry* (1998), 49(7), 2137-2139.
30. Hideaki Otsuka^{a,*}, Eiji Hirata^b, Takakazu Shinzato^c, Yoshio Takeda^d. Stereochemistry of megastigmane glucosides from *Glochidion zeylanicum* and *Alangium premnifolium*. *Phytochemistry* (2003), 62, 763–768.
31. Wai,H.H and Man,M. L. Lupene triterpenoids from *Glochidion eriocarpum* . *Phytochemistry* (1976), 15, 561-562.
32. Peter C.H., Ailsa H. , Nai T.D., John I.P., Roger G.S., et al. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. *Phytochemistry* (2004), 65, 2373–2378.
33. Okamoto T., Kawakita A., Kato M. Interspecific variation of floral scent composition in *Glochidion* and its association with host- specific pollinating seed Parasite (Epicephala). *Journal of Chemical Ecology* (2007), 57, 1065-1081.
34. Keim P.V. et al. New triterpenoid saponins from *Glochidion eriocarpum* and their cytotoxicity activity. *Chemistry Pharmacology Bulletin* (2009), 102-105.

35. Machana S., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Nonpunya A., Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese Medicine* (2011), 6, 39-46.

36. Sharma J.V.C., Pitchaiah G, Stayavati D.S., Venkateswara R., Sanjay kuma H., Vikram. In-vitro anticancer activity of methanolic extract of roots of *Glochidion zeylanicim* (Gaertn.). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical sciences* (2011), 760-763.

37. Thang et al. Chemical constituents of the leaves of *Glochidion obliquum* and their bioactivity. *Arch Pharm Res* (2011), 34, 383-389.

38. Nhiem NX et al. Cytotoxicity oleanane-type triterpene saponins from *Glochidion eriocarpum*. *Arch Pharm Res* (2012). 35, 19-26.

39. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne, PA.

40. Chung, P.Y., Navaratnam, P. and Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10(25), 1-6.

41. Carolina P. Reyes,^a Marvin J. Nunez,^a Ignacio A. Jimenez,^a Jerome Busserolles,^b Mari^a J. Alcaraz^b and Isabel L. Bazzocchi^{a,*}. (2006). Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14,1573–1579.

42. Laghari, A.H., Memona, S., Nelofarb, A., Khan, K.M. (2011), *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol, *Industrial Crops and Products*, 34, 1141– 1145.

43. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008) The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25, 120-127.

44 Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette K., Mshvildadze, V. and Andre.(2009). Haemolytic activity cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17(5), 2002 – 2008.

45. Eumkeb, G. and Chukrathok, S. 2013. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* *Phytomedicine*, 20, 262– 269.

ภาคผนวก

ไคร้ (*Glochidion daltonii* Kurz)



ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Glochidion daltonii* Kurz

วงศ์ : Euphorbiaceae

ชื่อสามัญ : ไคร้

เป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับกันใบมีลักษณะเป็นรูปวงรีคล้ายไข่กลับหัว ขนาดของใบมีความกว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 7-12 เซนติเมตร มีขนนุ่มละเอียดทั้งสองด้าน ออกดอกเป็นช่อ ออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ ดอกย่อยหลายดอก กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว ขนาดเล็ก ผลแห้ง แตกได้ รูปกลมแป้น สีเขียว มีหลายพูผลอ่อนสามารถรับประทานได้ส่วนรากสามารถนำทำเป็นยา แหล่งที่พบ : พบตามป่าดิบริมน้ำหรือป่าดิบเขา ที่ระดับความสูง 700-1,200 เมตร ออกดอกติดผลช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม

(*Glochidion daltonii* Kurz วันที่สืบค้น 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 เข้าถึงจาก <http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=36594>)