



การแยกและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
ใบมะขามเทศ

โดย

นางสาววัลลิกา วิชัยดิษฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การแยกและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
ใบมะขามเทศ

โดย

นางสาววัสติกา วิชัยดิษฐ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



The isolation and chemical modification of biological active
components from *Pithecellobium dulce*

BY

Miss Watsika Vichaidit



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2014

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาววัสสิกา วิชัยดิษฐ์

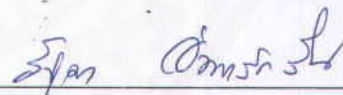
เรื่อง

การแยกและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโสมมะขามเทศ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เมื่อ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2558

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



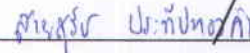
(อ.ดร. รัฐดา จันทร์กลั่น)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



(อ.ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม



(อ.ดร. สายสุรีย์ ประทีปทองคำ)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ.ดร. พีรดา ยิ่งยวด)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศ
ชื่อผู้เขียน	นางสาววิสสิกา วิชัยดิษฐ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อ.ดร. สายสุรีย์ ประทีปทองคำ
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลของใบมะขามเทศ (*Pithecellobium dulce*) ในวงศ์ *Fabaceae* สามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกมา 3 ชนิดด้วยกัน คือ kaempferol (**8**), kaempferol-3-rhamnoside (**7**) และ 4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**) โดยในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อาทิ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379, *Escherichia coli* TISTR 78 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 ด้วยวิธี disk diffusion และ minimum inhibitory concentration (MIC) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของใบมะขามเทศมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทุกชนิด โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5–50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วน kaempferol (**8**) และ kaempferol-3-rhamnoside (**7**) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น *E. faecalis* TISTR 379 โดย kaempferol (**8**) ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.02–0.17 โมลาร์ (MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึงมากกว่า 0.17 โมลาร์) และ kaempferol-3-rhamnoside (**7**) ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03–0.12 โมลาร์ (MBC มากกว่า 0.12 โมลาร์) ตามลำดับ และสาร 4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้บางชนิดคือ *S. aureus* TISTR 1466 และ

MRSA ATCC 43300 โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 1.39 โมลาร์ (MBC มากกว่า 1.39 โมลาร์) นอกจากนี้ สารสกัดหยาบจากใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลและสารบริสุทธิ์แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธีการทดสอบ DPPH assay (IC_{50} ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศเท่ากับ 197.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากผลการศึกษาสารบริสุทธิ์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงนำไปสู่การปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยการทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ อาทิ ไกลโคไซด์ ลิพิด ไบโอฟิน เป็นต้น เพื่อเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มากขึ้น โดยพบว่า kaempferol-3,6-diacetate (**29**) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.07 โมลาร์ (MBC มากกว่า 0.07 โมลาร์) kaempferol-6-oleic acid (**30**), kaempferol-6-steric acid (**31**) และ kaempferol-3-biotin (**33**) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* TISTR 78 โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.02–0.05 โมลาร์ (MBC มากกว่า 0.05 โมลาร์)

คำสำคัญ: ใบมะขามเทศ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, kaempferol, kaempferol-3-rhamnoside

Thesis Title	The isolation and chemical modification of biological active components from <i>Pithecellobium dulce</i>
Author	Miss Watsika Vichaidit
Degree	Master of Science
Department/Faculty/University	Department chemistry Faculty of science and technology Thammasat University
Thesis Advisor	Dr. Panumart Thongyoo
Thesis Co-Advisor	Dr. Saisuree Prateeptongkum
Academic Years	2014

ABSTRACT

The chemical investigation and chemical modification of biological active components from the methanolic extract of *Pithecellobium dulce*, which belongs to the *Fabaceae* family have been studied. Kaempferol (**8**), kaempferol-3-rhamnoside (**7**) and 4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**) were isolated from the methanolic extract of *Pithecellobium dulce*. The antibacterial activity of crude and all biological active compounds were tested against *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379, *Escherichia coli* TISTR 78 and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300. To determine the antibacterial activity, disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) were chosen for anti-bacterial evaluation. The methanolic extract of *Pithecellobium dulce* demonstrated a promising antibacterial activity against all bacteria with MIC values ranging from a concentration of 12.5 mg/mL to 50 mg/mL (MBC: 100 mg/mL). Kaempferol (**8**) and Kaempferol-3-rhamnoside (**7**) inhibited the growth of some bacteria except *E. faecalis* TISTR 379. Kaempferol (**8**) inhibited the growth of bacteria with the MIC values ranging from a concentration of 0.02–0.17 molar (MBC:

0.17-0.02 molar) and Kaempferol-3-rhamnoside (**7**) inhibited the growth of bacteria with the MIC values ranging from a concentration of 0.03–0.12 molar (MBC: > 0.12 molar), respectively. 4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**) inhibited the growth of some bacteria as *S. aureus* TISTR 1466 and MRSA ATCC 43300 with the MIC of 1.39 molar (MBC: > 1.39 molar). Additionally, the methanolic extract of *P. dulce* and pure compounds also exhibited antioxidative activities *via* DPPH assay (IC_{50} of the methanolic extract of *P. dulce* is 197.19 $\mu\text{g/mL}$). According to their antibacterial and antioxidative activities of pure compounds, the pure compounds have chemical modifications with glycoside, lipid and biotin to increase biological activity. Kaempferol-3,6-diacetate (**29**) inhibited the growth of *S. aureus* TISTR 1466 with MIC values ranging from a concentration of 0.07 molar (MBC: > 0.07 molar). Kaempferol-6-oleic acid (**30**), kaempferol-6-steric acid (**31**) and kaempferol-3-biotin (**33**) inhibited the growth of *E. coli* TISTR 78 with the MIC of 0.02–0.05 molar (MBC: >0.05 molar).

Keywords: *Pithecellobium dulce*, antibacterial activity, antioxidant activity, kaempferol, kaempferol-3-rhamnoside

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ในหัวข้อการแยกและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศ สำเร็จเรียบร้อยได้ก็ด้วยความเสียสละ ความอนุเคราะห์ และน้ำใจจากบุคคลหลายฝ่ายที่ได้ให้การสนับสนุน ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำงานวิจัย และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จเป็นรูปเล่ม ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สายสุรีย์ ประทีปทองคำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยขึ้นนี้ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเป็นรูปเล่ม ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. รัฐดา จันทร์กลิ่น อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเป็นรูปเล่ม ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. พิรดา ยิ่งยวด อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะกรรมการ ที่คอยให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเป็นรูปเล่ม ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อวันวี เพชรคงแก้ว อาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและความเอื้อเฟื้อห้องและอุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทน 35/2557

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในห้องแลปที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้
สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาเคมีและภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารทุกท่านในการอำนวยความสะดวกในเรื่องสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องแก้วในการทำงาน และขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อนที่คอยให้กำลังใจตลอดมา

ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ซึ่งกล่าวมาแล้วข้างต้นเป็นอย่างสูง

นางสาววัสสิกา วิชัยดิษฐ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(11)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(16)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นมะขามเทศ	4
2.2 การเก็บพืชสมุนไพร	5
2.3 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	6
2.4 สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร	7
2.5 การแยกสารบริสุทธิ์และการระบุโครงสร้างด้วยกระบวนการเคมี	10
2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)	13

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)	16
2.8 การทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยที่ผ่านมา	20
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	30
3.1 อุปกรณ์	30
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	30
3.1.2 สารเคมี	30
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
3.1.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	33
3.2 วิธีการทดลอง	33
3.2.1 การแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศ	33
3.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์	37
3.2.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)	40
3.2.3.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ	40
3.2.3.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ	41
3.2.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)	42
3.2.4.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย	42
3.2.4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (TVA)	42
3.2.4.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (disc diffusion method)	43
3.2.4.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (MIC method)	44
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	49
4.1 การสกัด	49

4.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล	49
4.3 การหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล	53
4.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบมะขามเทศ	65
4.5 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)	83
4.5.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ	83
4.5.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay)	84
4.6 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)	87
4.6.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย	87
4.6.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count; TVA)	87
4.6.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (disc diffusion method)	93
4.6.4 การทดสอบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (MIC method)	110
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	165
รายการอ้างอิง	169
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	175
ภาคผนวก ข	177
ประวัติผู้เขียน	199

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงการเตรียมสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)	45
3.2 แสดงความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารตัวอย่างในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)	46
3.3 แสดงความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของกลุ่มตัวอย่างยาปฏิชีวนะในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)	47
4.1 ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล	49
4.2 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล (8) ในตัวทำละลาย CD_3OD	55
4.3 ข้อมูล HMBC ของเคมเฟอร์อล (8) ในตัวทำละลาย CD_3OD	56
4.4 ข้อมูล HMQC ของเคมเฟอร์อล (8) ในตัวทำละลาย CD_3OD	56
4.5 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7) ในตัวทำละลาย CD_3OD	59
4.6 ข้อมูล HMBC ของเคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7) ในตัวทำละลาย CD_3OD	60
4.7 ข้อมูล HMQC ของเคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7) ในตัวทำละลาย CD_3OD	61
4.8 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวทำละลาย D_2O	63
4.9 ข้อมูล HMBC ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวทำละลาย D_2O	63
4.10 ข้อมูล HMQC ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวทำละลาย D_2O	64
4.11 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต (29) ในตัวทำละลาย CD_3OD	69
4.12 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (30) ในตัวทำละลาย CDCl_3	72
4.13 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (31) ในตัวทำละลาย CDCl_3	75

4.14 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32) ในตัวทำละลาย CDCl_3	78
4.15 ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (33) ในตัวทำละลาย CDCl_3	80
4.16 ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก	86
4.17 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับตัวควบคุมเชิงบวกเซฟาเลกซิน (disc diffusion method)	95
4.18 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (disc diffusion method)	98
4.19 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอรอล (8), เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)) โดยวิธี disc diffusion	101
4.20 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)) โดยวิธี disc diffusion	104
4.21 ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (disc diffusion method)	108
4.22 ตารางแสดงค่า MIC และ MBC ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (<i>P.dulce</i>) และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ	113
4.23 ตารางแสดงค่า MIC และ MBC ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์	131
4.24 ตารางแสดงค่า MIC และ MBC ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ	139

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นมะขามเทศ	5
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	17
2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย <i>Bacillus cereus</i>	18
2.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย <i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.7 โครงสร้างของ β -sitosterol (1), campesterol (2), stigmasterol (3), octacosanol (4), α -spinasterol (5), β -D glucoside of α -spinasterol (6) และ kaempferol-3-rhamnoside (7)	20
2.8 โครงสร้างของ kaempferol (8), quercetin (9) และ dulcitol (10)	22
2.9 โครงสร้างของ dulcin (11), saponin P _E (12) และ pitheduloside A-G (13-19)	22
2.10 โครงสร้างของ Pitheduloside (H-K) (20-23) และ echinocystic acid 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (24)	25
2.11 โครงสร้างของ genistein 4'-O- α -L-rhamnopyranoside (25), 3'-prenylapigenin 7-O-rutinoside (26) และ pithecelloside (27)	27
3.1 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างสมุนไพร	34
3.2 วิธีการวิจัยการแยกและสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศ	48
4.1 แผนภูมิการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ	52
4.2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล (เคมเฟอรอล (8), เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7), 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิกเอซิด (28))	53
4.3 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยะไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ ¹ H-, ¹³ C- long range correlations ของ เคมเฟอรอล (8)	57

4.4 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยะไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ ^1H -, ^{13}C - long range correlations ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)	61
4.5 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยะไกลของโปรตอน และอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ ^1H -, ^{13}C - long range correlations ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)	64
4.6 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (<i>P.dulce</i>), เคมเฟอรอล (8), เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) และ 4, 5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)	84
4.7 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศและสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกด้วยวิธี DPPH Assay	86
4.8 กราฟการศึกษาการเจริญและปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดของแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	88
4.9 กราฟการศึกษาการเจริญและปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i>	89
4.10 กราฟการศึกษาการเจริญและปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดของแบคทีเรีย <i>B. cereus</i>	89
4.11 กราฟการศึกษาการเจริญและปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดของแบคทีเรีย <i>E. faecalis</i>	90
4.12 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	91
4.13 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i>	91
4.14 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย <i>B. cereus</i>	92
4.15 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย <i>E. faecalis</i>	92
4.16 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย MRSA	93
4.17 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> (A), <i>B. cereus</i> (B), <i>E. coli</i> (C) และ <i>E. faecalis</i> (D) กับตัวควบคุมผลบวกเซฟาเลกซิน ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	96
4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> (A), <i>B. cereus</i> (B), <i>E. faecalis</i> (C), <i>S. aureus</i> (D) และ MRSA (E) กับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	97

- 4.19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ MRSA (D) ของสารบริสุทธิ์เคมเฟอรอล (8) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 โมลาร์) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (E), *B. cereus* (F), *S. aureus* (G) และ MRSA (H) ของสารบริสุทธิ์เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (0.12 โมลาร์) 102
- 4.20 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (A) และ MRSA (B) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.35, 0.70, 1.40 และ 2.80 โมลาร์) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของตัวควบคุมผลบวกเซฟาเลกซิน (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับแบคทีเรีย *S. aureus* (A), MRSA (B), *E. coli* (C), *B. cereus* (D) และ *E. faecalis* (E) 105
- 4.21 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ MRSA (D) ของอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ 109
- 4.22 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *E. faecalis* (C), *S. aureus* (D) และ MRSA (E) 114
- 4.23 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล (8), เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition concentration) และการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ MRSA (D) 119
- 4.24 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของอนุพันธ์ของเคมเฟอรอล ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* (A), *B. cereus* (B) และ *S. aureus* (C) 132
- 4.25 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลกซิน, สเตอริ์ปโตมัยซิน, เพนิซิลลิน วี, ไตคลอกซาซิลลิน และแวนโคมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *E. faecalis* (C), *S. aureus* (D) และ MRSA (E) 140
- ข1 ^1H NMR spectrum (CD_3OD , 400MHz) ของเคมเฟอรอล (8) 178
- ข2 ^{13}C NMR spectrum (CD_3OD , 100MHz) ของเคมเฟอรอล (8) 178

ข3	HMQC spectrum ของเคมเฟอรอล (8)	179
ข4	HMBC spectrum ของเคมเฟอรอล (8)	179
ข5	^1H NMR spectrum (CD_3OD , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)	180
ข6	^{13}C NMR spectrum (CD_3OD , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)	180
ข7	HMQC spectrum ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)	181
ข8	HMBC spectrum ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)	181
ข9	^1H NMR spectrum (D_2O , 400MHz) ของสารประกอบ 28	182
ข10	^{13}C NMR spectrum (D_2O , 100MHz) ของสารประกอบ 28	182
ข11	HMQC spectrum ของสารประกอบ 28	183
ข12	HMBC spectrum ของสารประกอบ 28	183
ข13	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของสารประกอบ 28	184
ข14	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของสารประกอบ 28	184
ข15	HPLC chromatogram ของสารประกอบ 28	185
ข16	^1H NMR spectrum ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz) ของเคมเฟอรอลกับ อะซิติก แอนไฮไดรด์ (34)	185
ข17	^1H NMR spectrum ($\text{DMSO}-d_6$, 100MHz) ของเคมเฟอรอล กับ โพรไพโอนิก แอนไฮไดรด์ (35)	186
ข18	^1H NMR spectrum (CD_3OD , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)	186
ข19	^{13}C NMR spectrum (CD_3OD , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)	187
ข20	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)	187
ข21	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)	188
ข22	HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)	188
ข23	^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)	189
ข24	^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)	189
ข25	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)	190
ข26	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)	190
ข27	HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)	191
ข28	^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)	191
ข29	^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)	192
ข30	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)	192

ข31	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)	193
ข32	HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)	193
ข33	^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)	194
ข34	^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)	194
ข35	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)	195
ข36	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)	195
ข37	HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)	196
ข38	^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-3-ไปโอทิน (33)	196
ข39	^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-3-ไปโอทิน (33)	197
ข40	อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-3-ไปโอทิน (33)	197
ข41	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-3-ไปโอทิน (33)	198
ข42	HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-3-ไปโอทิน (33)	198

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
<i>P.dulce</i>	<i>Pithecellobium dulce</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
UV-vis	Ultraviolet-visible
IR	Infrared
NMR	Nuclear magnetic resonance
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography
¹ H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
¹³ C-NMR	Carbon nuclear magnetic resonance
<i>J</i>	Coupling constant
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMF	Dimethylformamide

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
MIC	Minimum inhibition concentration
MBC	Minimum bactericidal concentration
cfu	Colony-forming unit
TLC	Thin layer chromatography
PEN V	Penicillin V

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน มนุษย์ทั่วโลกได้ตระหนักและเห็นคุณค่าของการใช้สมุนไพรมากยิ่งขึ้น เนื่องจากความเป็นพิษรุนแรงจากยาสังเคราะห์ และสารตกค้างจากกระบวนการสังเคราะห์ยา ในประเทศไทยได้ถูกจัดว่าเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ทางด้านพันธุ์พืชที่สูงมาก และได้มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในด้านต่าง ๆ ตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน หนึ่งในนั้นคือการนำมาเป็นยารักษาโรค โดยพืชสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ทั้งในแง่ของการป้องกันและการรักษาโรคต่าง ๆ มาตั้งแต่ครั้งโบราณ อาทิเช่น เป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวยา วัตถุดิบในการผลิตสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา แบบอย่างในการสังเคราะห์ยา และผลิตภัณฑ์เพื่อบำรุงสุขภาพ ในอดีตได้มีการใช้สมุนไพรโดยมิได้ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสมุนไพรนั้น ๆ แต่ในปัจจุบัน ผลจากความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์ สารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรสามารถนำมาพิสูจน์หาโครงสร้างทางเคมี ตลอดจนตรวจสอบหาค่าความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จนสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อนำไปผลิตเป็นยารักษาโรค (drug discovery) แม้ว่าในปัจจุบันจะได้มีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural Products) ไม่ว่าจะเป็นจากเชื้อรา (Fungi) และพืชสมุนไพร (Herb) กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรไทยซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง เนื่องมาจากข้อดีหลายประการ อาทิ สมุนไพรนั้นสามารถปลูกได้ง่าย ราคาถูก ไม่มีพิษ ให้ผลการรักษาได้ดีใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน และไม่ทำให้เกิดอาการดื้อยา ซึ่งจากสรรพคุณดังกล่าวทำให้สมุนไพรนั้นกลับมาได้รับความนิยม และเกิดการวิจัยหาสมุนไพรที่มีสรรพคุณที่สำคัญเพื่อใช้ในทางการแพทย์ต่อไป แต่ก็ยังมีสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดที่ยังมิได้นำมาศึกษาและหาโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างจริงจัง หนึ่งในนั้นคือ สมุนไพรที่เรียกว่า มะขามเทศ (*Pithecellobium dulce*) เป็นพืชท้องถิ่นในประเทศไทยซึ่งมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Fabaceae* หรือ *Leguminosae* อยู่ในวงศ์ย่อยคือ *Mimosoideae* (*Ingeae*) [1] โดยวงศ์ย่อย *Mimosoideae* [2] มีลักษณะเด่นคือ เป็นช่อกระจุกแน่น ช่อกระจุก หรือช่อเชิงลด ดอกย่อยขนาดเล็ก เรียงชิดกันแน่นสมมาตรแบบรัศมี กลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ เชื่อมติดกันตรงโคน เป็นหลอดสั้น ๆ หรือแยกจากกัน เกสรตัวผู้เป็นโครงสร้างที่เด่นของดอก ก้านเกสรตัวผู้ยาว เกสรตัวเมียมีรังไข่ตั้งตรง และอาจมีก้านชูรังไข่สั้น ๆ ซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ อาทิ ใช้

บรรเทาอาการอักเสบของบาดแผล อาการติดเชื้อภายในช่องปาก ต้านมะเร็ง ลดระดับคอเลสเตอรอล โรคโลหิตจาง โรคปากนกกระจอกเทศ และโรคท้องเสีย นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิตามิน และแร่ธาตุที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี3 ธาตุแคลเซียม ธาตุฟอสฟอรัส ธาตุเหล็ก โปตัสเซียม และเส้นใย เป็นต้น ซึ่งจากการนำมาผสมมาใช้ในการรักษามักใช้ในส่วนผสมและเปลือกไม้ของต้นมะขามเทศ **แต่ในส่วนของใบมักถูกนำมาใช้ประโยชน์น้อยกว่าส่วนอื่น ๆ และยังไม่มียางงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพกับแบคทีเรีย** จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจในสรรพคุณของใบมะขามเทศ ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใบมะขามเทศและนอกจากนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่สามารถแยกจากใบของต้นมะขามเทศเพื่อเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- เพื่อศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์และประเมินความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศที่สกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล อาทิ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

- เพื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี (chemical structure) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปีชนิดต่าง ๆ อาทิ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Vis spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy) และ อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

- เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ เพื่อประเมินความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ พร้อมตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ที่ทำการสังเคราะห์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผู้วิจัยมีความคาดหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถตีพิมพ์เป็นวารสารทางวิชาการหรือนำเสนอในงานประชุมวิทยาศาสตร์และผลงานวิจัยที่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรชนิดนี้และพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคต

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตงานวิจัยชิ้นนี้ คือทำการแยกหาสารบริสุทธิ์จากใบมะขามเทศที่สกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล พร้อมทำการระบุโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ทำการแยกได้จากใบมะขามเทศด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Vis spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และ อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งสารบริสุทธิ์ที่ทำการแยกได้จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ทำการทดสอบคือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 จากนั้นทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ พร้อมทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แบคทีเรีย 5 ชนิดที่กล่าวไว้ข้างต้น พร้อมทำการระบุโครงสร้างของอนุพันธ์ที่ทำการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปีเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้นเช่นเดียวกัน

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของต้นมะขามเทศ

พืช	มะขามเทศ
ชื่อไทย	มะขามเทศ
ชื่ออื่น	มะขามช้อง
ชื่ออังกฤษ	Manila tamarind
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Pithecellobium dulce</i>
ชื่อวงศ์	<i>Leguminosae</i>
ส่วนของพืชที่ใช้	ใบ

มะขามเทศเป็นพืชวงศ์เดียวกับมะขามและถั่ว มีถิ่นกำเนิดในประเทศอเมริกาเขตร้อน และกระจายปลูกในเขตร้อนทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย พืชชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมอย่างมาก ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืช ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นมะขามเทศเป็นต้นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เปลือกเรียบและมีหนามในตำแหน่งรอยก้านใบ ลำต้นสีเทาแกมขาวหรือเทาดำ แตกกิ่งก้านสาขามาก ใบเป็นใบเรียงสลับ ลักษณะบางและเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือ หูใบเป็นหนามแหลม มีตุ่มอยู่ระหว่างใบย่อย โคนต้นมีหนามสั้น ๆ 1 คู่ ดอกช่อขนาดเล็ก สีขาว เห็นเกสรตัวผู้เป็นพู่ชัดเจน ผลเป็นฝักโค้งเป็นวงกลมและแบ่งเป็นข้อคล้ายมะขามแต่มีเปลือกบางและมีสีเขียวอ่อนปนชมพู เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดง เนื้อในเป็นสีชมพูหรือสีขาว เมล็ดสีดำ พืชชนิดนี้ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดหรือตอนกิ่ง [3, 4] มะขามเทศในประเทศไทยแบ่งตามลักษณะฝักเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มฝักใหญ่ กลุ่มฝักกลาง และพันธุ์พื้นเมือง

มะขามเทศเป็นพืชที่มีแร่ธาตุและวิตามินสูงโดยเฉพาะวิตามินซี และวิตามินอี มีการปลูกเป็นการค้า อาหาร และใช้ในทางยา เช่น เปลือกต้นแก้ท้องร่วง รักษาแผลในปาก ฟันผุ ใบใช้เป็นยาห้ามเลือด ชะล้างบาดแผล และแก้ท้องร่วง เมล็ดแก้ไข้เป็นยาถ่ายพยาธิ ผลมีสารเบต้าแคโรทีน วิตามินซี และวิตามินอี ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง ต่อกระเจก โรคหัวใจ และหลอดเลือด ช่วยบำรุงประสาท สมอ ฝัวยพรณ เล็บ และเส้นผม ลดระดับคอเลสเตอรอล แก้ไอ ขับเสมหะในลำไส้ สมานแผล รักษาโรคปากนกกระจอกเทศ และบรรเทาอาการปวดฟัน เส้นใยจาก

มะขามเทศช่วยในการขับถ่าย ลดปัญหาอาการท้องผูก แคลเซียม และเหล็ก ในผลมะขามเทศช่วยรักษาโรคโลหิตจาง เสริมสร้างกระดูก และฟัน [5]



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นมะขามเทศ

(ที่มา: <http://decembertown.com/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%82%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B8%A8/> และ <https://www.flickr.com/photos/tikth/4074042679/?rb=1>)

2.2 การเก็บพืชสมุนไพร [6]

การเก็บพืชสมุนไพรต้องใช้ความรู้ในเรื่องรูปร่าง ลักษณะสัณฐานของพืช ข้อมูลด้าน สรีรวิทยา และขบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชเพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาใน ปริมาณที่สูงที่สุด ดังนั้นการเก็บพืชสมุนไพรให้ได้คุณค่าทางยามากที่สุดต้องเก็บในช่วงเวลาที่ เหมาะสมตามส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ ดังนี้

1. ประเภทรากหรือหัว

ควรเก็บในช่วงเวลาที่พืชหยุดการเจริญเติบโต ใบ ดอก ร่วงหมดแล้ว หรือในช่วงต้นฤดูหนาวถึงปลายฤดูร้อน เพราะในช่วงนี้รากและหัวมีการสะสมปริมาณตัวยาเอาไว้ค่อนข้างสูง วิธีการเก็บจะต้องใช้วิธีขุดด้วยความระมัดระวัง อย่าให้รากหรือหัวเกิดการเสียหาย

2. ประเภทใบ หรือเก็บทั้งต้น

ควรเก็บในช่วงที่พืชเจริญเติบโตมากที่สุด หรือพืชบางอย่างอาจจะระบุช่วงเวลาเก็บอย่างชัดเจน เช่น เก็บใบไม่อ่อนหรือไม่แก่เกินไป เก็บช่วงดอกตูมเริ่มบาน หรือช่วงเวลาที่ดอกบาน เป็นต้น วิธีการเก็บใบใช้การตัดหรือเด็ด

3. ประเภทเปลือกต้นและเปลือกกราก

เปลือกต้นโดยมากเก็บระหว่างช่วงฤดูร้อนต่อกับฤดูฝน ปริมาณยาในพืชสมุนไพรสูง และเปลือกต้นหรือเปลือกกรากลอกออกได้ง่าย สะดวก และอย่าลอกเปลือกออกทั้งรอบต้น เพราะกระทบกระเทือนในการส่งลำเลียงอาหารของพืชจะทำให้ตายได้ ทางที่ดีควรลอกจากเปลือกกิ่งหรือส่วนที่เป็นแขนงย่อย ไม่ควรลอกออกจากลำต้นใหญ่ของต้นไม้ หรือจะลอกออกในลักษณะครึ่งวงกลมก็ได้ ส่วนเปลือกกรากเก็บในช่วงต้นฤดูฝนเหมาะสมที่สุด

4. ประเภทดอก

โดยทั่วไปเก็บในช่วงดอกเริ่มบาน เช่น ดอกคำฝอย แต่บางชนิดเก็บในช่วงดอกตูม เช่น กานพลู เป็นต้น วิธีการเก็บใช้การตัดหรือเด็ด

5. ประเภทผลและเมล็ด

พืชสมุนไพรบางอย่างอาจจะเก็บในช่วงที่ผลยังไม่สุกก็มี เช่น ฝรั่ง เก็บเอาผลอ่อนมาเป็นยาแก้ท้องร่วง แต่โดยทั่วไปมักเก็บเมื่อผลแก่เต็มที่ เช่น มะแว้งต้น มะแว้งเครือ ดีปลี เมล็ดผักทอง เมล็ดชุมเห็ดไทย และ เมล็ดสะแก เป็นต้น วิธีการเก็บใช้การตัดหรือเด็ด

คุณภาพของยาสมุนไพรที่จะใช้รักษาโรคขึ้นอยู่กับช่วงเวลาการเก็บสมุนไพร วิธีการเก็บ และพื้นที่ปลูกพืชสมุนไพร นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงการเก็บสมุนไพรให้ถูกต้นและเก็บให้ถูกส่วน

2.3 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร [7]

ในการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรนั้นมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด สมบัติของสารในพืชที่จะมีความคงตัวทนต่อความร้อนมากน้อยเพียงใด และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ทั้งนี้แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันดังนี้

1. การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด จนกระทั่งละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้ จากนั้นทำการแยกกากสมุนไพรและระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากสารสกัดหยาบของสมุนไพร วิธีนี้มีข้อดีคือ สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย เนื่องจากต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งในการสกัดสมุนไพรโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย จะมีการใช้ตัวทำละลายซึ่งมีความแตกต่างกันตามสภาพความเป็นขี้ อาทิ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล

2. การแช่ (Percolation) [8] เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอขึ้นแล้วนำไปบรรจุในอุปกรณ์ที่เรียกว่าเครื่องสกัดกรอง (percolator) เติม

ตัวทำละลายลงไป แล้วไซสารสกัดออกมา ทำการสกัดซ้ำจนกระทั่งละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้หมด วิธีการนี้มีข้อดีเช่นเดียวกับวิธีการหมัก (marceration) คือ สารไม่ถูกความร้อน เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) [8] เป็นวิธีการสกัดโดยใช้เครื่องมือซอกท์เลต (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นเครื่องมือแบบระบบปิดที่ใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ทำโดยให้ความร้อนจนทำให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปแล้วควบแน่นลงมาในหลอดกระดาษกรองสำหรับการสกัด (thimble) ที่บรรจุสมุนไพร เมื่อสารที่สกัดได้สูงถึงระดับกัลก้นน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงมาในขวดกลั่น (flask) วนเวียนเช่นนี้จนการสกัดสมบูรณ์ (องค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาหมด) โดยสามารถสังเกตจากสีของตัวทำละลายในหลอดกระดาษกรองสำหรับการสกัด (thimble) ที่ใสขึ้น การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารสำคัญบางชนิดสลายตัวได้

2.4 สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร

คือสารประกอบที่สร้างขึ้นในธรรมชาติโดยพืช สารที่พืชสร้างขึ้นมามีจำนวนมาก และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชนั้น ๆ จำแนกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) เป็นสารที่มีอยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไป พบในพืชทุกชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน เม็ดสี และเกลืออนินทรีย์

2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษ พบต่างกันพืชแต่ละชนิด เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่มีเอนไซม์เข้าร่วม เช่น อัลคาลอยด์ (Alkaloid) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) และไกลโคไซด์ (Glycoside) เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ส่วนมากมีสรรพคุณทางยาหรือเป็นสารพิษ

กลุ่มของสารที่พบในพืชมีดังนี้

1. อัลคาลอยด์ (Alkaloid) เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นด่าง และมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร สารประเภทนี้จะมียฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ ตัวอย่างเช่น รีเซอปีน (reserpine) ในรากระย่อมมีสรรพคุณลดความดันเลือด ควินิน (quinine) ในเปลือกต้นชิงโคนา (cinchona) มีสรรพคุณรักษาโรคมาเลเรีย และมอร์ฟีน (morphine) ในยางของฝิ่นมีสรรพคุณระงับอาการปวด เป็นต้น

2. น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil) มีลักษณะเป็นน้ำมันที่ได้จากการกลั่นตัวด้วยไอน้ำมีกลิ่นรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ เบากว่าน้ำ น้ำมันนี้เป็นส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิด มักเป็นส่วนประกอบของพืชสมุนไพรที่เป็นเครื่องเทศ คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา มักเป็นด้านขับลม (flatulence) ด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) และด้านเชื้อรา (antifungal) พบในพืชสมุนไพร เช่น กระเทียม ขิง ข่า ตะไคร้ มะกรูด ไพร ขมิ้น เป็นต้น มีการจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ สารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาว (aliphatic compounds) สารเทอร์พีนส์ และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ (terpene derivatives) สารอนุพันธ์ของเบนซีน (benzene derivatives) และสารประกอบอื่นๆ

3. ไกลโคไซด์ (Glycoside) เป็นสารประกอบที่พบมากในพืชสมุนไพร มีโครงสร้างแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone; ไกลโคโคน) กับส่วนที่ไม่ได้เป็นน้ำตาล (aglycone; อะไกลโคโคน หรือ genin; เจนิน) การที่มีน้ำตาลทำให้สารนี้ละลายน้ำได้ดี ส่วนอะไกลโคโคน (aglycone) เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและเภสัชวิทยาแตกต่างกันไป และส่วนนี้เองที่ทำให้คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของไกลโคไซด์แตกต่างกันไป และทำให้แบ่งไกลโคไซด์ได้เป็นหลายประเภท เช่น

3.1 ไกลโคไซด์กระตุ้นหัวใจ (Cardiac glycoside) มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเร่งให้ไตขับของเหลวออกมาเป็นน้ำปัสสาวะได้ดีขึ้น เช่น สารโนบายีโถฝรั่ง (*Nerium odorum* Soland.) รำเพย (*Thevetia peruviana*) เป็นต้น

3.2 แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycoside) เป็นยาระบาย (laxative) สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) และสีย้อม สารกลุ่มนี้พบในใบชุมเห็ดเทศ เมล็ดชุมเห็ดไทย ใบขี้เหล็ก ใบมะขามแขก เป็นต้น

3.3 ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycoside) เมื่อผสมกับน้ำจะได้ฟองคล้ายสบู่ มักใช้เป็นสารตั้งต้นการผลิตยาประเภทสเตอรอยด์ เช่น ลูกประคำดีควาย

3.4 ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycoside) เป็นสีที่พบในดอก และผลของพืช ทำเป็นสีย้อมหรือสีแต่งอาหาร บางชนิดใช้เป็นยา เช่น สารสีในดอกอัญชัน

3.5 ไฮยาโนจินิกไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycosides) หรือไฮยาไนด์ (cyanide) ซึ่งจะอยู่ในสภาพของเกลือโซเดียมหรือแคลเซียม หากรับประทานไม่มากจะแสดงคุณสมบัติลดอาการกระวนกระวายตื่นเต้น ทำให้สงบ และผ่อนคลายกล้ามเนื้อหัวใจ และกล้ามเนื้อทั่วไปของร่างกาย เช่น เปลือกมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) และแอปปริคอต (*Prunus armeniaca*)

4. ฟีนอลและฟีนอลิกไกลโคไซด์ (Phenol and Phenolic glycosides)

4.1 สารฟีนอล (Phenol) เป็นโมโนไซคลิกอะโรมาติก (monocyclic aromatic ring) หมูฟังก์ชันที่มักพบในอนุพันธ์ของฟีนอลมีดังนี้ ไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์ คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ และกรดคาร์บอกซิลิก และอาจมีห่วงโซ่คาร์โบไฮเดรตสั้นอยู่ด้วย สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ทำลายเชื้อ (anti-septic) เช่น กรดโรสมารินิค (rosmarini acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ป้องกันอาการอักเสบซ้ำวม และต้านไวรัส (antiviral)

4.2 แทนนิน (Tannin) เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน สามารถตกตะกอนโปรตีน และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบในพืชทั่วไปที่มีรสฝาด เช่นในใบฝรั่ง ผลกล้วยน้ำว้าดิบ เป็นต้น

4.3 คูมารินและสารที่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ เช่น แก้ว (*Marraya paniculata*) จันทน์ขาว (*Apium graveolens*)

5. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) เป็นสารที่เกิดจากการสังเคราะห์แสงของพืช สามารถจำแนกเป็นกลุ่มของน้ำตาลและสารพอลิแซ็กคาไรด์

6. ไขมัน (Lipid) แบ่งออกมาเป็น 2 ชนิด คือ

6.1 ไขมันพืช ซึ่งเป็นแหล่งหลักของสารเบต้าซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) ที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาสเตียรอยด์ บางชนิดมีกรดแกมมาไลโนเลนิก (γ -linolenic acid) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ลิวโคไตรอิน (leukotrienes) และ thromboxanes) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการการจับตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และกระบวนการอักเสบ

6.2 อะซิโทจีนินส์ (acetogenins) มีสูตรโครงสร้างเป็นโซ่ยาว คาร์บอนอะตอม 35-39 ตัว ส่วนปลายเป็นแกมมาแลกโตน (γ -lactone) มีลักษณะไม่อิ่มตัว มีคุณสมบัติในการต้านเนื้องอก กำจัดแบคทีเรีย และแมลง

7. กรดอะมิโน (amino acid) และสารอนุพันธ์ ได้แก่ สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ และเล็คตินส์ (lectins)

7.1 กรดอะมิโน (amino acid) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน และเป็นสารยับยั้งการงอก

7.2 สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ อัลลีอิน (allein) อัลลิซิน (allicin) อะโจอิน (ajoene) มีคุณสมบัติต้านการเกิดลิ่มเลือด ต้านความดันโลหิตสูง ละลายไฟบริน และกำจัดเชื้อรา

7.3 เล็คติน (lectins) พบได้ทั่วไปในเมล็ดถั่ว มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงจับตัวเป็นก้อนตามบริเวณข้อต่อต่าง ๆ ของร่างกาย ช่วยขับของเสีย พืชที่มีสารกลุ่มนี้คือ เมล็ดผักกาดขาว เมล็ดผักกาดดำ เป็นต้น

8. กลูโคซิลิเนท (glucosilicates) พบในวงศ์พืชพวกผัก มีฤทธิ์ทำให้เกิดการระคายเคืองที่ผิวหนัง อักเสบ บวมแดง และเป็นตุ่มพุพอง หากใช้ปริมาณที่พอเหมาะจะบรรเทาอาการปวดคัน

9. โพรแอนโทไซยานิน (proanthocyanins) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงสารกลุ่มแทนนิน และฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยให้ระบบหมุนเวียนของเลือดดีขึ้น พบในแบล็กเบอร์รี่ (*Rubus fruticosus*) และองุ่นแดง (*Vitis vinifera*)

นอกจากนี้ยังมีสารที่พบในพืชทั่วไป เช่น มิวซิเลจ กัม น้ำยาง เรซิน และบาลซัม เอนไซม์ กรด และสเตียรอยด์

2.5 การแยกสารบริสุทธิ์และการระบุโครงสร้างด้วยกระบวนการทางเคมี

คอลัมน์โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารผสมออกจากกัน และทำให้บริสุทธิ์ อาทิ การแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา ในการแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี อาศัยความแตกต่างในการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดใน 2 วัฏภาค (phase) คือวัฏภาคหนึ่งอยู่กับที่เรียกว่าวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) มักใช้ซิลิกาเจล (silica gel; SiO_2) อะลูมินา (alumina; Al_2O_3) แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate; CaCO_3) เซลลูโลส (cellulose) หรือ ฟลอรินซิล (florisil; fluorinated silicone polymer) และอีกวัฏภาคหนึ่งเคลื่อนที่ เรียกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

การเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคนิ่ง และการละลายของสารตัวอย่างในวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นความมีขั้วของสารที่จะแยกและความมีขั้วของตัวทำละลายที่เลือกใช้ (วัฏภาคเคลื่อนที่) จึงมีผลต่อการแยกสาร กล่าวคือสารไม่มีขั้วจะเคลื่อนที่ลงมาก่อนได้เร็วกว่าสารที่มีขั้วที่เกิดแรงดึงดูดกับวัฏภาคนิ่ง นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าวมวลโมเลกุลก็มีผลในการเคลื่อนที่ของสาร กล่าวคือถ้าสารไม่มีขั้วซึ่งมีมวลโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ไม่มีขั้วที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า โดยทั่วไปแล้วพอจะเรียงลำดับความมีขั้วของสารได้ดังนี้ แอลเคน (alkanes) < แอลคีน (alkenes) < ไดอีน (dienes) < อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbons) < อีเทอร์ (ethers) < เอสเทอร์ (esters) < คีโตน (ketones) < แอลดีไฮด์ (aldehydes) < เอมีน (amines) < ฟีนอล (phenols) < แอลกอฮอล์ (alcohols) และ กรดอินทรีย์ (organic acids)

ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี มักเริ่มต้นด้วยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่มีขั้วน้อย ๆ เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับไว้ไม่ได้ออกมาก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นตามลำดับ เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับได้ดีขึ้นตามลำดับ ในบางกรณีถ้าหาตัวทำละลายเดี่ยวที่มีขั้วตามต้องการไม่ได้ก็อาจจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเรียงตามลำดับจากมีขั้วน้อยไปมาก ได้แก่ ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) หรือเฮกเซน (hexane) < ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) < คลอโรฟอร์ม (chloroform) < คาร์บอนไดซัลไฟด์ (carbon disulfide) < ไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) < ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) < เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) < อะซิโตน (acetone) < 2-โพรพานอล (2-propanol) < เอทานอล (ethanol) < เมทานอล (methanol) < กรดอะซิติก (acetic acid) ความสามารถในการชะ (eluent strength) จะมีความสัมพันธ์กับสภาพขั้ว โดยลำดับนี้เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับชนิดของตัวดูดซับ (วัฏภาคหนึ่ง) ตัวทำละลายที่มีขั้วมากจะมีความสามารถในการชะสูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารมีขั้ว เช่น ซิลิกาเจล แต่จะมีความสามารถในการชะต่ำกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารไม่มีขั้ว เช่น ถ่านกัมมันต์ หรือซิลิกาเจลที่ถูกเคลือบผิวด้วยหมู่ไฮโดรคาร์บอน หรือหมู่ไฮไลน

นอกจากนี้โครมาโตกราฟีคอลัมน์อีกประเภทหนึ่งคือ เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography) เป็นการแยกตามขนาดของสารที่ต่างกัน โดยตัวดูดซับเป็นของแข็งที่มีรูพรุนพวกเจล เช่น เซฟาเดกซ์ (sephadex) โดยสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเจลจะไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ และจะเคลื่อนที่ลงมาได้อย่างรวดเร็ว ส่วนสารที่มีขนาดเล็กจะสามารถเข้าไปในรูพรุนของเจล และใช้เวลานานในการเคลื่อนที่ลงมาด้านล่าง ทำให้สามารถแยกสารที่มีขนาดต่างกันได้

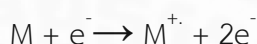
ในการระบุโครงสร้างทางเคมีได้ศึกษาใน 4 เทคนิค ดังนี้

1. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR)

เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นวิทยุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสปินซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของนิวเคลียสแต่ละชนิดภายใต้สนามแม่เหล็ก เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สำคัญที่สุด และได้รับความนิยมมากที่สุดในการนำไปใช้หาโครงสร้างของสารอินทรีย์ใช้ในการศึกษาจำนวนโปรตอน และคาร์บอนภายในโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ และสามารถดูความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนภายในโครงสร้าง

2. แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)

เทคนิคนี้อาศัยการทำให้โมเลกุลเกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วจะเรียงไอออนเหล่านี้ตามอัตราส่วนระหว่างมวลต่อประจุ (mass/charge; m/z) หลังจากนั้นจะวัดปริมาณของไอออนเหล่านั้นที่มีอยู่ การทำการวิเคราะห์โดยการใส่สารตัวอย่างลงในห้องสุญญากาศ (high-vacuum chamber) ซึ่งจะเกิดการระเหยของตัวทำละลายและถูกกระแทก (bombard) ด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง อิเล็กตรอนที่ถูกกระแทก (bombard) จะถูกยิงเข้าไปที่โมเลกุล M ทำให้อิเล็กตรอนที่อยู่ในโมเลกุลถูกยิงหลุดออกไป กลายเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวก (cation radical) ซึ่งเราเรียกว่า molecular ion; M^+



ลำของไอออนจะผ่านเข้าไปในสนามแม่เหล็กกำลังสูง ลำของไอออนจะเกิดการเบี่ยงเบนซึ่งขึ้นอยู่กับมวลของไอออน เนื่องจาก M^+ จะต้องมีมวลเท่ากับมวลโมเลกุลของสาร ดังนั้นแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) จึงเป็นเครื่องมือที่ใช้หามวลโมเลกุลของสาร แมสสเปกตรัม (mass spectrum) นอกจากจะบอกน้ำหนักโมเลกุลของสารซึ่งดูได้จากพีคของ molecular ion (M^+) แล้วยังสามารถบอกประเภทและโครงสร้างของสารอย่างคร่าว ๆ ได้เช่นกัน โดยสารแต่ละประเภทจะมีรูปแบบการแตกตัวที่ไม่เหมือนกัน

3. ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-VIS spectrophotometry)

เทคนิคนี้ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้ม (intensity) ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาว (190-1,000 นาโนเมตร) ที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณ และชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสง แล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert) ค่าการดูดกลืนแสงของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง เทคนิคนี้ใช้ระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

4. อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy)

ใช้ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารจากการเกิดอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วงรังสีอินฟราเรด (2-50 ไมโครเมตร) โดยรังสีอินฟราเรดจะทำให้พันธะในอะตอม

หรือ กลุ่มอะตอมของสารเกิดการสั่นในลักษณะต่าง ๆ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวพันธะ หรือมุมพันธะ ซึ่งแต่ละชนิดพันธะจะมีความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการสั่นเป็นค่าแน่นอน

5. อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับแยกสารที่สนใจซึ่งละลายอยู่ในสารละลายผสม กระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ สารตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่สารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง และสารที่ถูกแยกออกมาได้นั้นจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ แล้วจะแปลผลออกมาในรูปแบบกราฟที่เรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีคของสารที่เป็นองค์ประกอบผสม เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบ สามารถวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) เทคนิคนี้แตกต่างกับไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) คือ วิเคราะห์ตัวอย่างได้เร็วกว่า การแยก (resolution) ดีกว่า รองรับแรงดันได้มากกว่า และประหยัดการใช้สารเคมีเมื่อเปรียบเทียบวิธีการกับการใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) [9]

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ คาร์บอนหรี และรังสียูวี ปัจจัยดังกล่าวทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ โดยกระบวนการออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น การใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปไปเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ แต่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับแอลดีแอล (LDL: low - density lipoprotein) ซึ่งเป็นโคเลสเตอรอลชนิดเลวได้ออกซิไดซ์แอลดีแอล (oxidized LDL) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ

2.6.1 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

การที่สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกัน หรือกำจัดอนุมูลอิสระได้มีความสำคัญ เพราะจากการศึกษาวิจัยพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ โดยปกติร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่จะทำอันตราย แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็ว หรือมากเกินไปร่างกายจะกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทางคือ

1. ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย
2. ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

2.6.2 วิธีการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+•}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มีความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ 660, 734 และ 820 นาโนเมตร แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร จากการศึกษาสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ได้ตามสมการ

$$\text{ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ test sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100$$

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox (Trolox) จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย โดยอนุมูล $ABTS^{+•}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ และละลายได้ทั้งในน้ำ และสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำ หรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ $ABTS^{+•}$ ไม่ได้เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

2. วิธีวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (DPPH assay)

อนุมูล DPPH $^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{+•}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) [10]

แบคทีเรีย (bacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) มีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ส่วนใหญ่มีเซลล์เดียว และมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน สามารถแบ่งได้หลายรูปแบบ เช่น แบ่งตามรูปร่าง (กลม, ท่อน และ เกลียว) แบ่งตามการย้อมติดสีแกรม (แกรมบวก และแกรมลบ) หรือแบ่งตามความต้องการใช้ออกซิเจน (แอโรบิก (aerobic) แอนแอโรบ (anaerobe) แฟคัลเตตีฟ แอนแอโรบ (facultative anaerobe) ไมโครแอโรฟิลิก (microaerophilic)) และแบ่งตามแหล่งอาหารและพลังงาน (ออโตโทรฟ (autotroph) เฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) โฟโตโทรฟ (phototroph) และคีโมโทรฟ (chemotroph)) [11]

ในปัจจุบันการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้น (Dilution method) และการวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Diffusion method)

1. การวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีเจือจางความเข้มข้น (Dilution method)

การทดสอบความสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียวิธีนี้นิยมใช้หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยสามารถทำได้ในอาหารแข็งและอาหารเหลว ในที่นี้พืชสมุนไพรจะถูกเจือจางความเข้มข้นลงครั้งละ 2 เท่า (Two-fold serial dilution) การทดสอบวิธีนี้สามารถให้ผลได้ 2 ประเภท ทั้งผลเชิงคุณภาพ เช่น พืชสมุนไพรมีผล หรือไม่มีผลต่อเชื้อที่ทดสอบ และผลเชิงปริมาณ เช่น ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

2. การวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Diffusion method)

การทดสอบความสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ของพืชสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น โดยจะเจาะหลุมลงในอาหารวุ้น หรือวางกระดาษกรองวงกลมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ยาแพร่เข้าไปในอาหารวุ้นแบคทีเรียที่ไม่ถูกยับยั้งจะเกิดการเจริญเติบโต ส่วนบริเวณที่ถูกยับยั้งจะไม่มีอาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเกิดเป็นวงใส (inhibition zone) รอบ ๆ หลุมหรือกระดาษกรอง ข้อดีของวิธีนี้คือ ค่าใช้จ่ายน้อย ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ แต่ก็พบข้อเสีย คือ สามารถทดสอบได้เฉพาะเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดได้

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัย ประกอบด้วย

1. แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*)

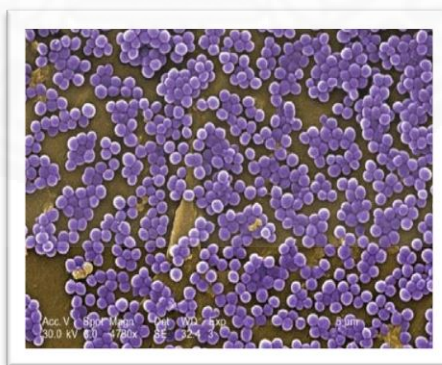


ภาพที่ 2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Escherichia coli* (*E. coli*)

(ที่มา: <http://www.astrographics.com/Gallery Prints/Display/GP2144.jpg>)

แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือเรียกโดยย่อว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ชนิดแฟคัลเตทีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) มีลักษณะเป็นรูปท่อน ไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์ แกรมลบ ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม ๆ โค้งนูน มีขอบชัดเจน มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในแผลภายนอก [12]

2. แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)



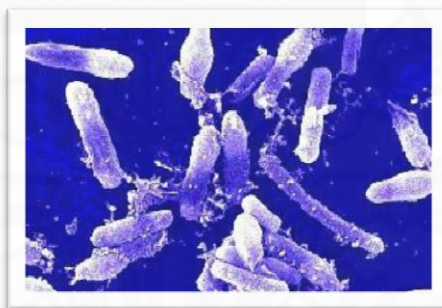
ภาพที่ 2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

(ที่มา: <http://3.bp.blogspot.com/EqQU4mRDREQ/TdJpP5R0emI/AAAAAAAAAB4/DN7r5ImMZA/s1600/staphylococcus+aureus.jpg>)

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* [13] เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในวงศ์ Micrococcaceae จัดเป็นแฟคัลเตทีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) คือ สามารถ

เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ มีโคไลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ ฆูน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน และสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 7-46 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าค่าพีเอช (pH) ที่เชื้อ *S. aureus* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 4.5-9.3 [14] เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่ง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงไปในการอาหาร จะสร้างสารพิษที่เรียกว่าเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ขึ้น สารพิษนี้ทนต่อความร้อนได้ดีมาก ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการเป็นพิษ หลังจากรับประทานอาหารที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* คือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ปวดท้องจากสารพิษ อาการมักเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายรุนแรงอาจช็อคได้ เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้โดยทั่วไปตามร่างกาย เช่น โพรงจมูก เยื่อหู ทางเดินหายใจ ผิวหนังและทางเดินอาหาร เป็นต้น [15]

3. แบคทีเรีย *Bacillus cereus* (*B. cereus*)

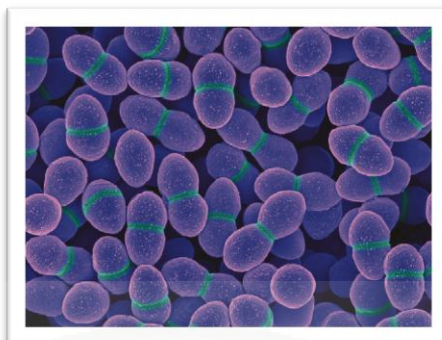


ภาพที่ 2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Bacillus cereus* (*B. cereus*)

(ที่มา: <http://microbewiki.kenyon.edu/images/9/9d/Bacilluscereus1.JPG>)

แบคทีเรีย *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus*) ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรค ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacteria) สามารถสร้างสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ การสร้างสารพิษของเชื้อ *B. cereus* จะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^5 เซลล์ต่ออาหาร 1 กรัม เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37 องศาเซลเซียส ไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที [16]

4. แบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

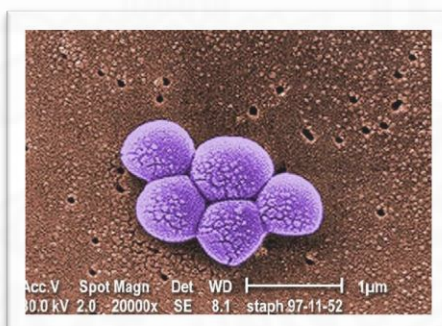


ภาพที่ 2.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

(ที่มา: <http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/119/11/ehp.119-a489b.g001.png>)

แบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* เป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม D Streptococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปร่างค่อนข้างวงรีอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อื่นเช่นเดียวกับสายพันธุ์อื่นในสกุล *Enterococcus* [17]

5. แบคทีเรีย Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)



ภาพที่ 2.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

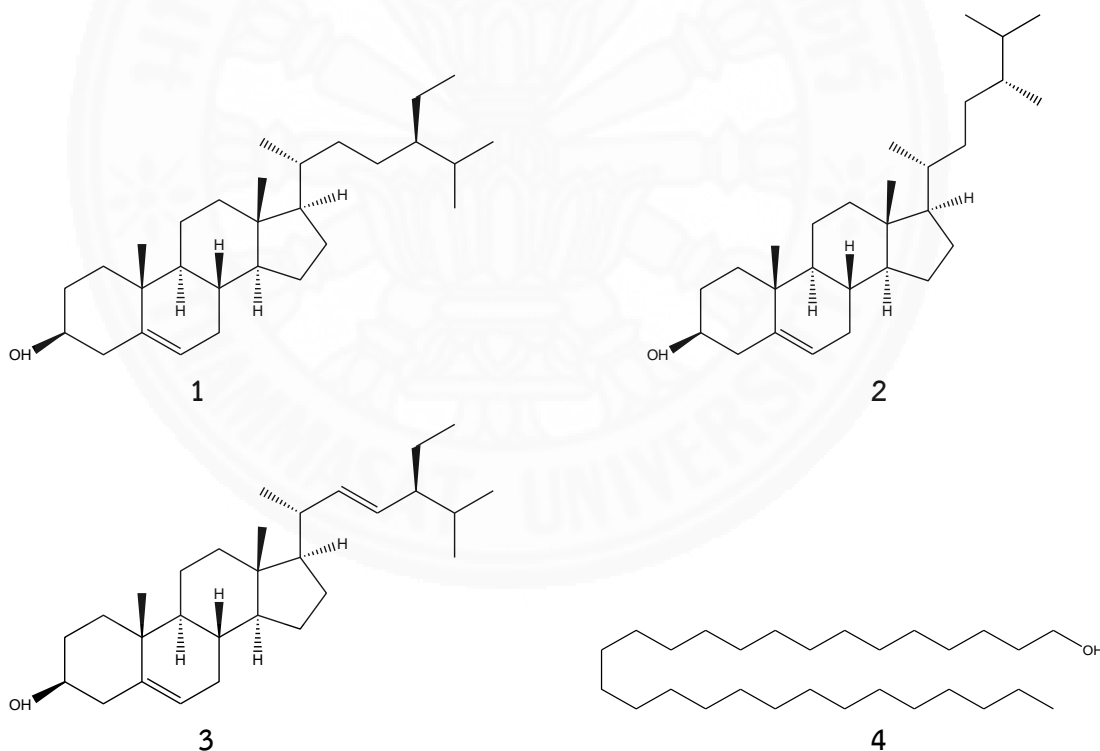
(ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Methicillin-resistant_Staphylococcus_aureus)

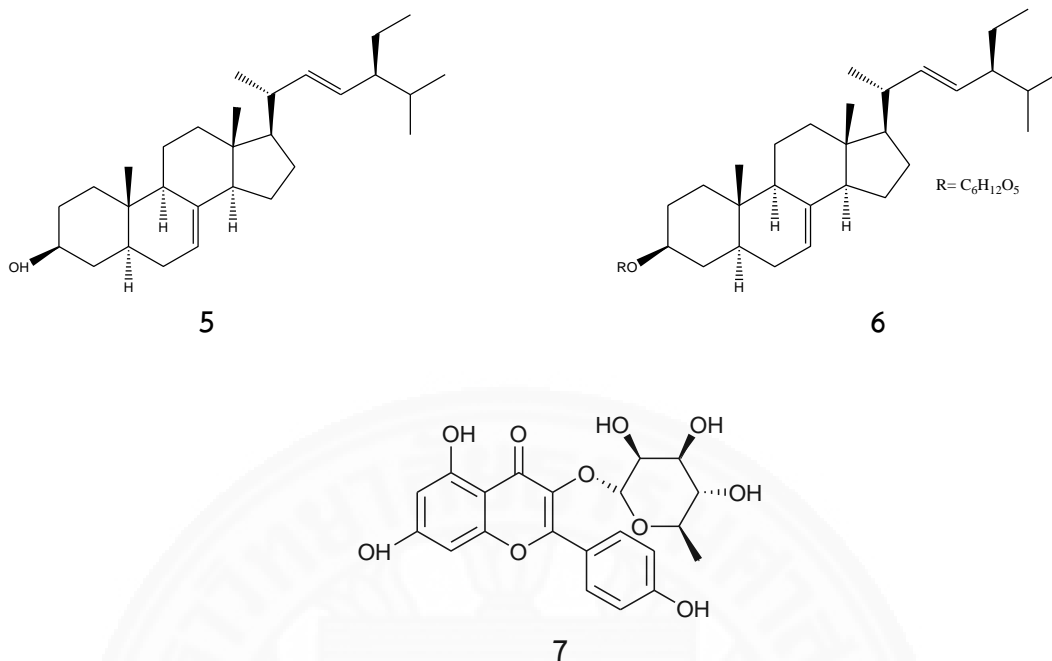
แบคทีเรีย MRSA เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin) อาจพบได้ที่ผิวหนังและในโพรงจมูกโดยไม่ก่อให้เกิดโรคแต่อย่างใด เรียกภาวะนี้ว่าการเพิ่มจำนวน (colonization) พบได้ประมาณร้อยละ 25 ถึง 30 ของประชากรทั่วไป ในกรณีที่เชื้อก่อให้เกิดโรค อาจเกิดเป็นภาวะติดเชื้อที่ผิวหนัง กระจก ปอด หรือติดเชื้อในกระแสโลหิต ซึ่งถือว่ามีความรุนแรงมากที่สุดและทำให้ผู้ป่วยถึงกับเสียชีวิตได้ ดังนั้นการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อจึงเหมือนกันทุกประการ อย่างไรก็ตามพบว่า การติดเชื้อ MRSA พบได้บ่อยในโรงพยาบาล ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อเกิดจากการสัมผัสโดยตรง ไม่แพร่กระจายทางอากาศ [18, 19]

2.8 การทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยที่ผ่านมา

ในปัจจุบัน มะขามเทศได้ถูกนำไปศึกษาแยกหาสารบริสุทธิ์จากส่วนต่าง ๆ อาทิเช่น ส่วนราก ใบ และ ลำต้นจากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำการระบุโครงสร้างด้วยเทคนิคต่าง ๆ นอกจากนั้นยังมีการนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามข้อมูลดังนี้

Nigam และ Mitra (1968) [20] มีการค้นพบสารในผลมะขามเทศ คือเบต้าซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) (1) แคมเปสเตอร์ล (campesterol) (2) และสติกมาสเตอร์ล (stigmasterol) (3) และ (1970) [21] มีการศึกษาหาสารบริสุทธิ์จากสารสกัดใบมะขามเทศในตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ พบออกทาคอซานอล (octacosanol) (4) แอลฟา-สปินาสเตอร์ล (α -spinasterol) (5) β -D glucoside of α -spinasterol (6) และเคมเฟอร์ล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside) (7)



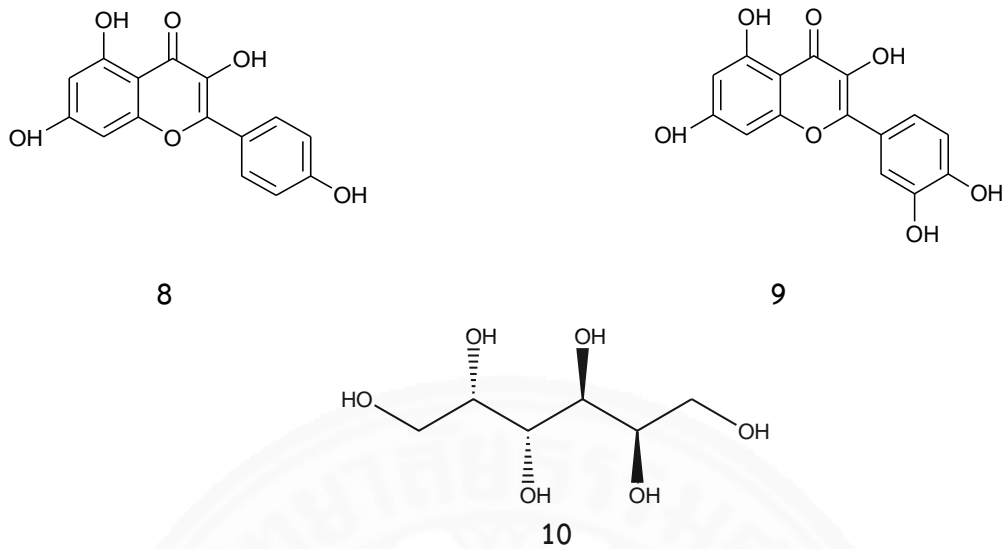


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของ β -sitosterol (1), campesterol (2), stigmasterol (3), octacosanol (4), α -spinasterol (5), β -D glucoside of α -spinasterol (6) และ kaempferol-3-rhamnoside (7)

Bhargva Krishna และคณะ (1970) [22] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) กับสารกลุ่มซาโปนิน (saponin) ที่แยกได้จากผลมะขามเทศกับหนู (albino rat) แสดงค่า ED_{50} ของซาโปนินเท่ากับ 10.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) 9.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

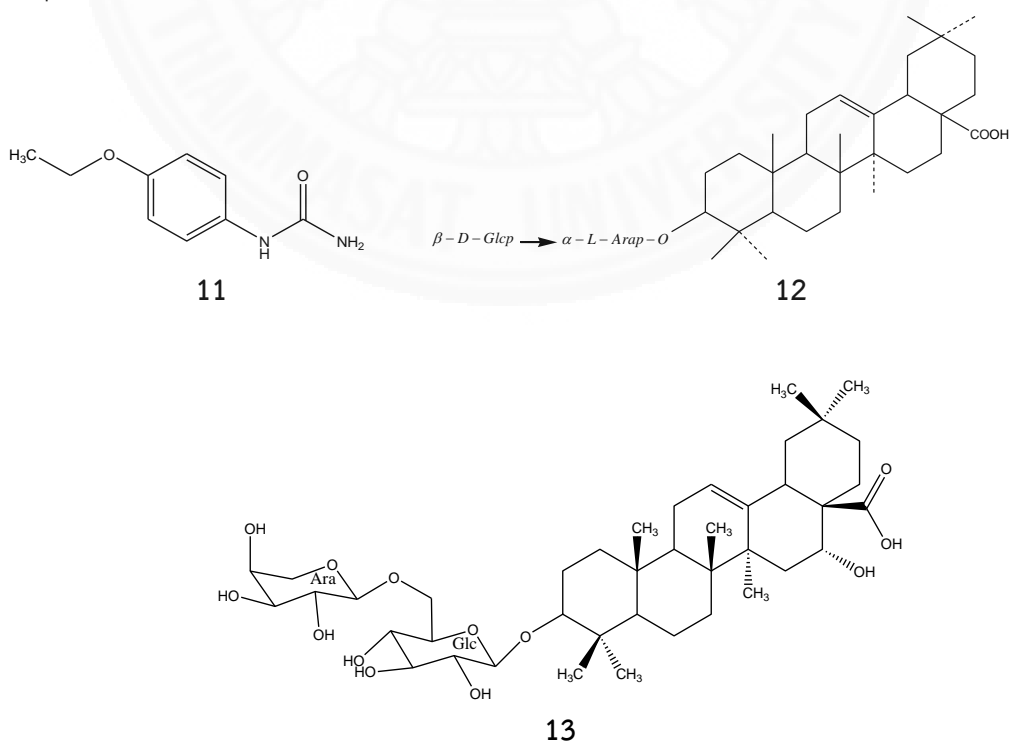
Misra และคณะ (1979) [23] ได้ศึกษาฤทธิ์ฆ่าอสุจิ (Spermicidal activity) กับสารกลุ่มซาโปนิน (saponin) ที่ได้จากมะขามเทศคือ saponin ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งในระดับการเจือจาง 0.03% กับน้ำอสุจิ

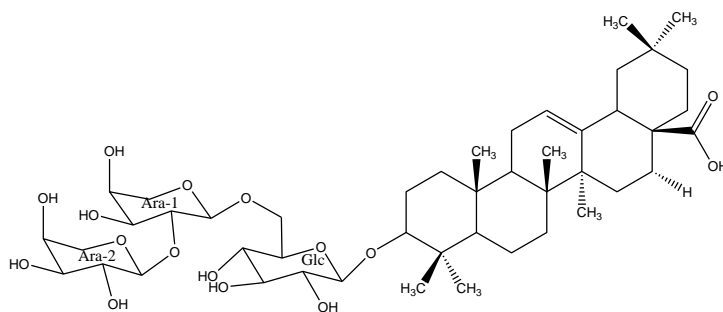
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาหาสารบริสุทธิ์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นมะขามเทศดังงานวิจัยของ Zapesochaya และคณะ (1980) [24] พบสารเคมเฟอรอล (kaempferol) (8) และเคอควิทิน (quercetin) (9) ในส่วนของเมล็ดมะขามเทศ และงานวิจัยของ Adinaraya และคณะ (1985) [25] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากใบในตัวทำละลายอินทรีย์อะซีโตน ค้นพบสารดัลซิทอล (dulcitol) (10)



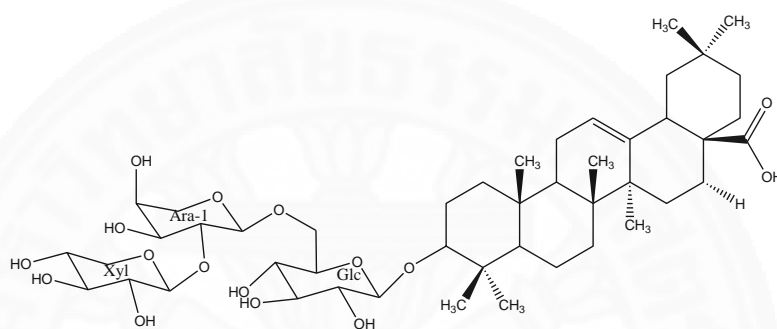
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของ kaempferol (8), quercetin (9) และ dulcitol (10)

สอดคล้องกับงานวิจัยของ P. Sahu และคณะ (1994) [26] ค้นพบสารดัลซิน (dulcin) (11) และซาโปนิน พีอี (saponin P_E) (12) ในส่วนของเมล็ดของต้นมะขามเทศ และงานวิจัยของ Nigam และคณะ (1997) [27] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากเมล็ดมะขามเทศ ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 7 ชนิด คือ Pitheduloside A-G (13-19) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนิน (Saponin)

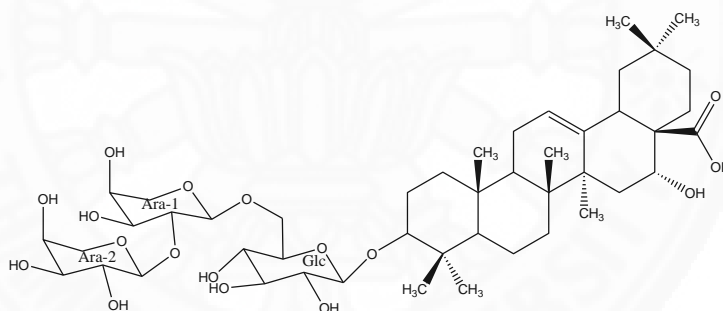




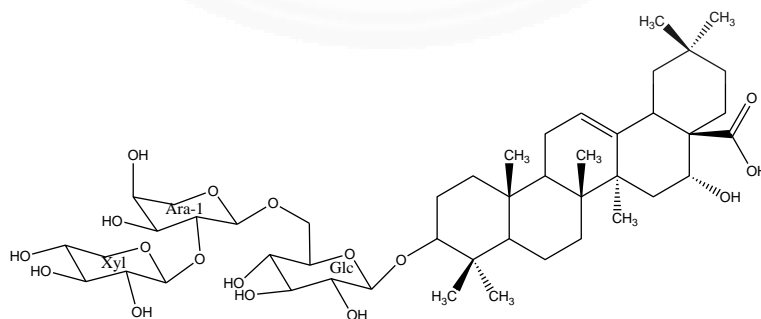
14



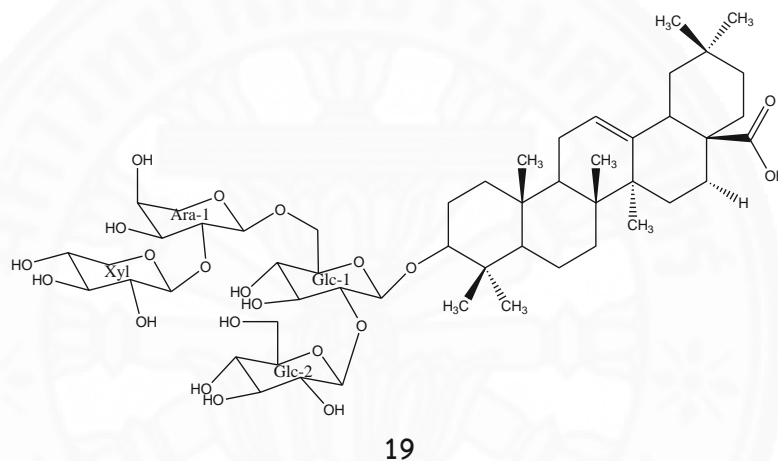
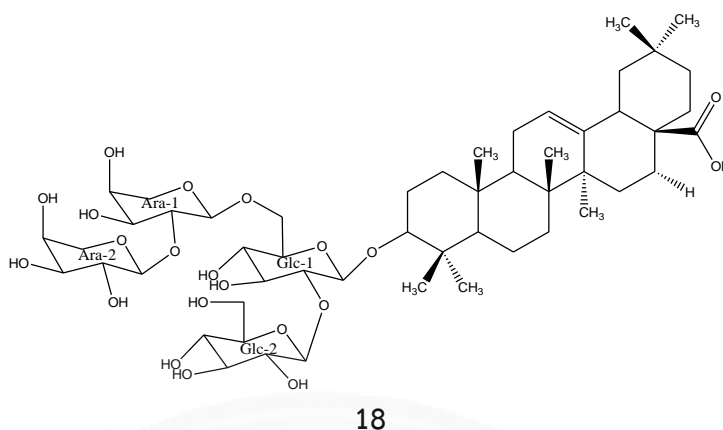
15



16

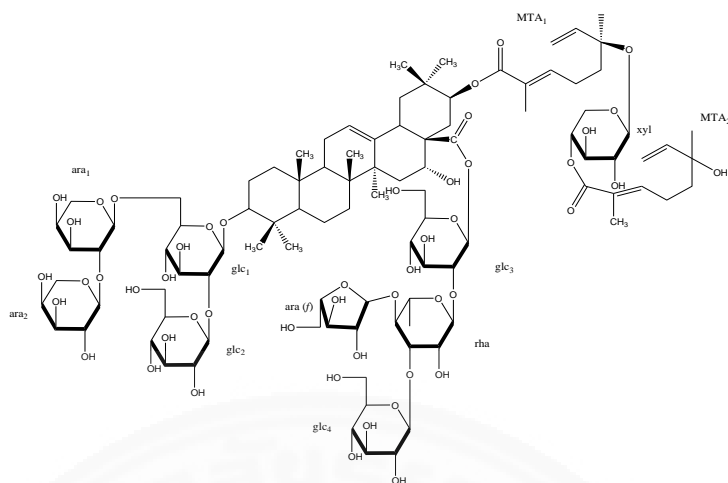


17

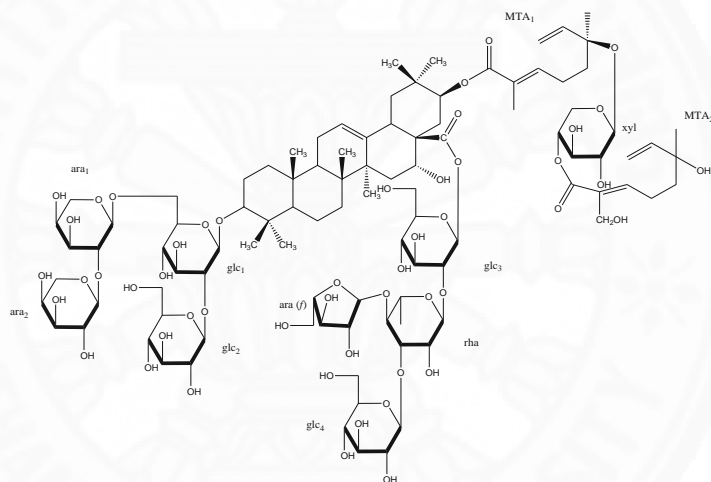


ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของ dulcin (**11**), saponin P_E (**12**) และ Pitheduloside (A-G) (**13-19**)

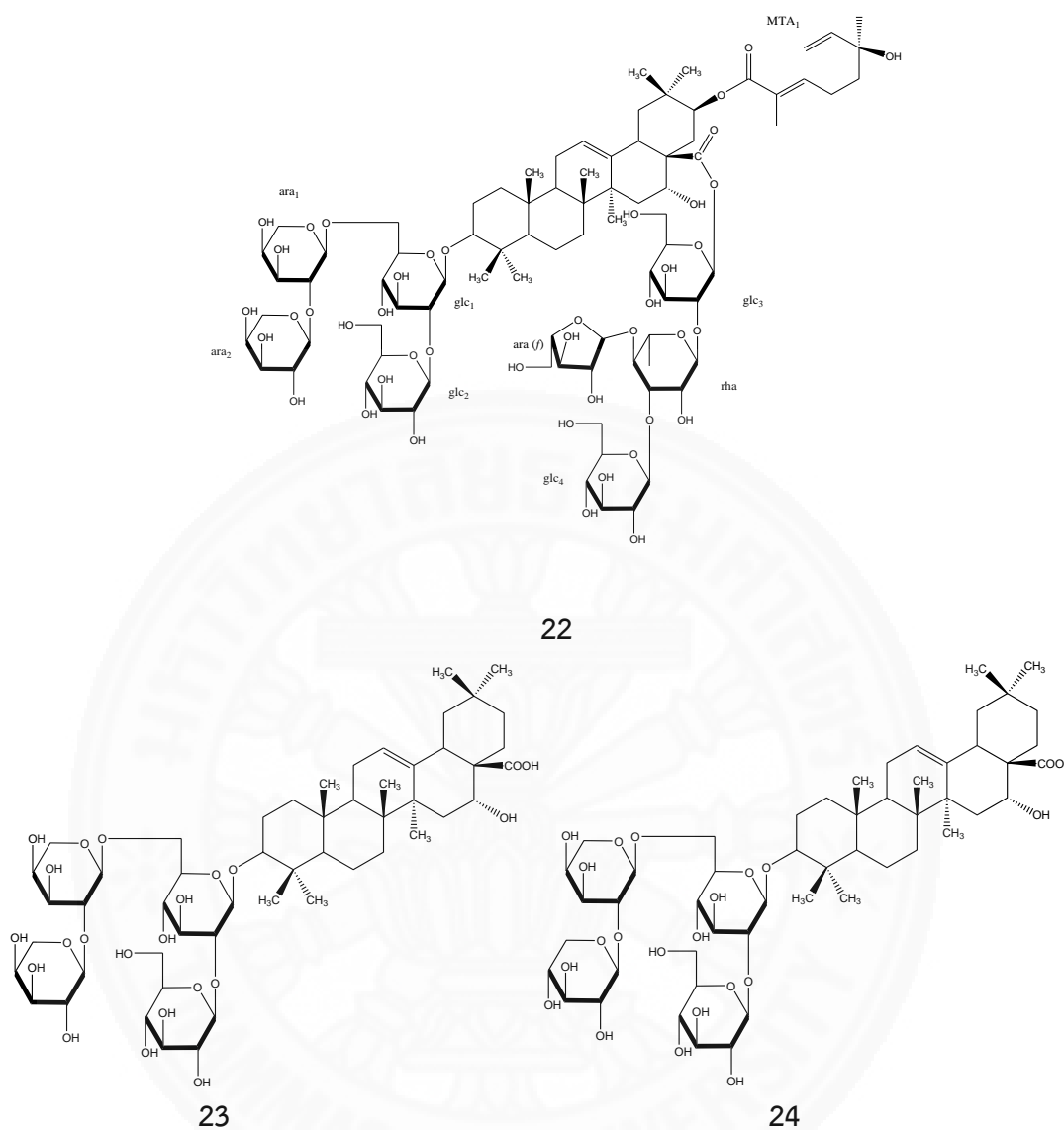
Yoshikawa และคณะ (1997) [28] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากเมล็ดมะขามเทศ ซึ่งสามารถแยกหาสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 5 ชนิด คือ Pitheduloside H-K (**20-23**) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpene) ในกลุ่มโอลิแนน (oleanane) และ echinocystic acid 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**24**) และทำการระบุโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) รวมไปถึง COSY, HMQC, HMBC, TOCSY และ ROESY



20



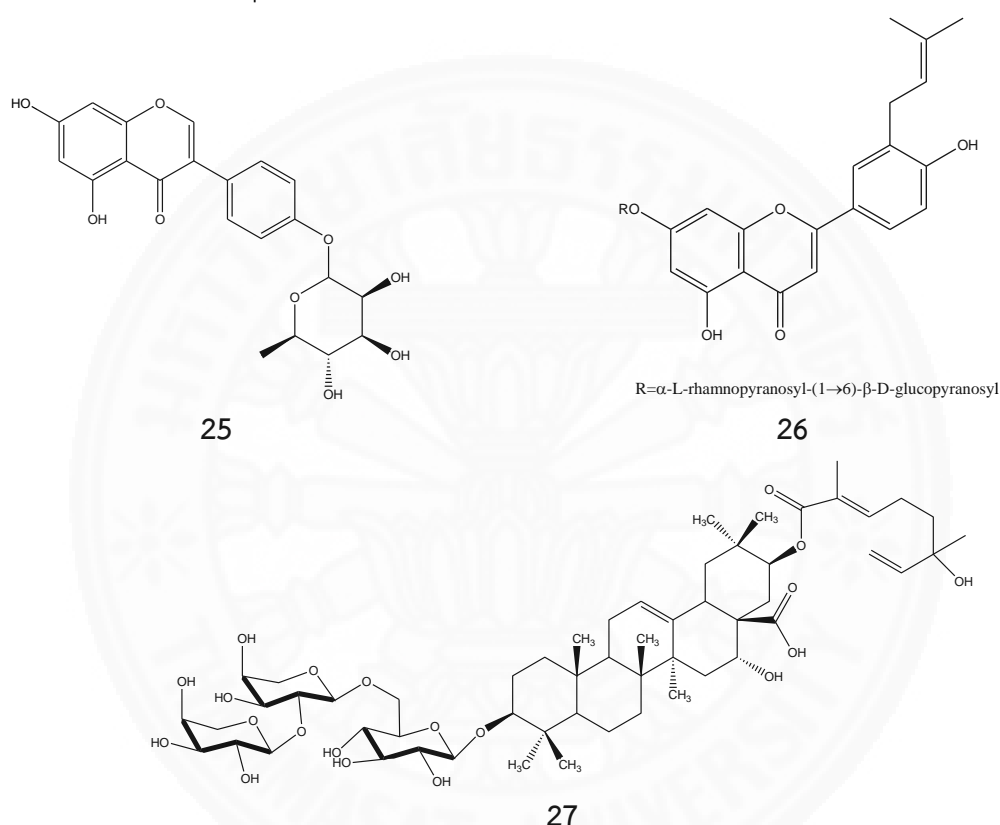
21



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ Pitheduloside (H-K) (20-23) และ echinocystic acid 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (24)

Saxena และคณะ (1998) [29] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากสารสกัดของรากมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล พบสาร genistein 4'-O- α -L-rhamnopyranoside (25) และ (1999) [30] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากลำต้นของต้นมะขามเทศ ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 1 ชนิด คือ 3'-prenylapigenine 7-O-rutinoside (26) และนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา permethylation ได้ผลิตภัณฑ์คือ tri-O-methyl-D-glucose, tri-O-methyl-L-rhamnose และ 3'-prenylapigenine และทำการสังเคราะห์ผ่าน

ปฏิกิริยา Enzymatic hydrolysis กับไดเอสเทส (diatase) ได้ผลิตภัณฑ์คือ 3'-prenylapigenine 7-O- β -D-glucopyranoside และ L-rhamnose และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา คือ 3'-prenylapigenine 7-O- β -D-glucopyranoside มาทำปฏิกิริยา almond emulsion ได้ผลิตภัณฑ์คืออะไกลโคน (aglycone) และกลูโคส (D-glucose) ในงานวิจัยของ P. Sahu, Koike และคณะ (1999) [31] ได้ศึกษาการแยกหาสารบริสุทธิ์จากเมล็ดของต้นมะขามเทศ ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 1 ชนิด คือ pithecelloside (27)



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของ genistein 4'-O- α -L-rhamnopyranoside (25), 3'-prenylapigenine 7-O-rutinoside (26) และ pithecelloside (27)

Bautista – Baños และคณะ (2000) [32] ได้รายงานผลถึงใบมะขามเทศที่มีผลต่อ *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. นอกจากนั้นในงานวิจัยของ Barrera – Necha และคณะ (2002) [33] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของเมล็ด ผล และใบของต้นมะขามเทศ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่า มีผลยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งข้อมูลนี้ยังตรงกับงานวิจัยของ Bautista – Baños, García - Domínguez และคณะ (2003) [34] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity) ของสารสกัดหยาบของใบ และเมล็ดในตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของใบมะขามเทศมีผลต่อ *Botrytis*

cinerea, *Penicillium digitatum* และ *Rhizopus stolonifer* ในผลสตรอเบอร์รี่ และงานวิจัยของ Peraza – Sánchez และคณะ (2005) [35] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity) ของรากและใบของต้นมะขามเทศ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดจากใบมะขามเทศมีผลยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มพืช 7 ชนิดที่ทำการศึกษาวิจัย

Delgado – Vargas และคณะ (2004) [36] ได้ศึกษาสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากเมล็ดมะขามเทศซึ่งเมล็ดมะขามเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส คือทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และปาเปน (papain)

Banarjee และคณะ (2005) [37] ได้ศึกษาฤทธิ์เหนี่ยวนำการแท้ง (abortifacient activity) กับสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) ที่แยกได้จากสารสกัดรากจากต้นมะขามเทศ

Pithayanukul และคณะ (2005) [38] ได้ศึกษาฤทธิ์การเป็นเซรุ่มแก้พิษงูเห่า กับกลุ่มสารโพลีฟีนอล (แทนนิน) ที่ได้จาก *Pithecellobium dulce* (PD), *Pentace burmanica* (PB), *Areca catechu* (AC) และ *Quercus infectoria* (QI) ด้วยวิธี *in vitro* neutralization จากการศึกษาพบว่าพืชกลุ่มตัวอย่างมีปริมาณแทนนิน เท่ากับ 7.80, 9.93, 6.45 และ 34.68% ตามลำดับ และปริมาณแทนนินในพืชตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งพิษงูเห่าที่ 4 LD₅₀ ที่ระดับความเข้มข้นของแทนนิน ที่แตกต่างกันของ QI, PD, PB และ AC คือ 604, 431, 220 และ 80 ไมโครกรัม/หนู ตามลำดับ และแสดงค่า ED₅₀ เท่ากับ 510.64, 364.50, 185.78 และ 62.00 ไมโครกรัม/หนู ตามลำดับ

S.D. Shanmugakumaran และคณะ (2005, 2006) [39, 40] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านวัณโรค (Antitubercular activity) ด้วยวิธี BACTEC 460 TB – Radiospirometric system กับสารสกัดจากใบมะขามเทศด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และแอลกอฮอล์ พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin), ไอโซนิอาซิด (Isoniazid), ริแฟมพิซิน (Rifampicin), อีธัมบูทอล (Ethambutol) และไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide)

Katekhaye และคณะ (2012) [41] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (total phenolic & flavonoid content) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) กับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl), ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide), ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ซิงเลตออกซิเจน (singlet oxygen) และกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid) กับสารสกัดของลำต้น และใบในตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เมทานอล และ 70% อะซีโตน จากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดลำต้นในเมทานอล (MB) สารสกัดลำต้นในอะซีโตน (AB) สารสกัดใบในเมทานอล (ML) และสารสกัดใบในอะซี

โตน (AL) แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 150.23 ± 2.8 , 16.83 ± 0.38 , 250.32 ± 4.8 และ 18.30 ± 0.43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของ MB, AB, ML และ AL เท่ากับ 0.129 ± 0.11 , 0.190 ± 0.14 , 0.084 ± 0.24 และ 0.115 ± 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของ MB, AB, ML และ AL เท่ากับ 0.43 ± 0.01 , 0.23 ± 0.01 , 0.90 ± 0.01 และ 0.25 ± 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Govindarajan และคณะ (2012) [42] ได้ศึกษาฤทธิ์ในการฆ่ายุงเต็มวัย (Adulticidal activity) จากสารสกัดของใบและเมล็ดของมะขามเทศด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิดคือ เบนซีน เฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และคลอโรฟอร์ม โดยทดสอบกับยุง *Culex quinquefasciatus* (Say) จากผลการทดสอบสารสกัดใบในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลให้ผลดีที่สุด แสดงค่า LC_{50} ของใบและเมล็ดเท่ากับ 234.97, 309.24 พีพีเอ็ม (ppm) ตามลำดับ และ LC_{90} ของใบและเมล็ดเท่ากับ 464.86, 570.80 พีพีเอ็ม (ppm) ตามลำดับ ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Rajeswary และคณะ (2014) [43] ได้ศึกษาฤทธิ์ในการฆ่ายุงเต็มวัย (Adulticidal activity) จากสารสกัดของใบและเมล็ดของมะขามเทศด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิดคือ เบนซีน เฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และคลอโรฟอร์ม โดยทดสอบกับยุง *Aedes aegypti* Linn. อายุ 5 วัน เพศเมีย ซึ่งเป็นพาหะโรคไข้เลือดออก จากผลการทดสอบสารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลให้ผลดีที่สุด แสดงค่า LC_{50} ของใบและเมล็ดเท่ากับ 218.64, 257.99 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ LC_{90} ของใบและเมล็ดเท่ากับ 426.05, 507.73 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งสารแบบละเอียด (Analytical balance, METTLER-TOLEDO)
- เครื่องชั่งสาร (Analytical balance, Sartorius รุ่น BP3100S)
- เครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator, BUCHI)
- ปั๊มแบบสุญญากาศ (Vacuum aspirator, TOKYO RIKAKIKAI รุ่น A-3S)
- กระดาษกรอง (Filter paper, Whatman เบอร์ 1)
- กระดาษกรองชุกยาต้านจุลชีพ (Antibiotic disc, 6 mm., Whatman, UK)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, TOMY SX-700)
- ตู้อบชนิดลมร้อน (Hot air oven)
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, memmert รุ่น model 400)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina air flow, DWYER รุ่น MARK II)
- นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer, Bruker-ultrashield, 400 เมกะเฮิร์ตซ์)
- แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, Thermo Finnigan)
- เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV- Visible spectrophotometer, Shimadzu รุ่น UV-1700)
- อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu รุ่น LC-30AD) และคอลัมน์ชนิด ACE C18-AR (250 x 4.6 มิลลิเมตร)
- อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Infrared spectrometer, Perkin Elmer spectrum 6X)
- เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze dry, FTS^R SYSTEM. INC.)

คัลเลอร์มิเตอร์ (Colorimeter, JENWAY 6061)

เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV lamp)

เครื่องแก้ว และอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์

3.1.2 สารเคมี

เมทานอล (Methanol, CH_3OH , Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

เมทานอล (Methanol, CH_3OH , HPLC grade, RCI Labscan, Thailand)

เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14} , Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2 , Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2 , HPLC grade, RCI Labscan, Thailand)

อะซิโตน (Acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, Fluka, Germany)

แอนนิซัลดีไฮด์ (Anisaldehyde solution, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$, Aldrich, Germany)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี6 (Dimethylsulfoxide- d_6 , DMSO, A.R. grade, Aldrich, Germany)

เมทานอล-ดี4 (Methanol- d_4 , MeOD- d_4 , A.R. grade, Cambridge Isotope, the United states)

ดิวทีเรียมออกไซด์ (Deuterium oxide, D_2O , A.R. grade, Cambridge Isotope, the United states)

คลอโรฟอร์ม-ดี (Chloroform- d , CDCl_3 - d , A.R. grade, Aldrich, Germany)

อะซีโตน-ดี6 (Acetone d_6 , C_3D_6O , A.R. grade, Wilmad Labglass, the United states)

เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20, GE, Sweden)

ซิลิกาเจล (Silica gel, 100-200 mesh, RANKEM, India)

ซิลิกาเจล (Silica gel 60 PF₂₅₄, Merck, Germany)

ไดเมทิลฟอร์มามิเด (Dimethylformamide, DMF, A.R. grade, RCI Labscan, Thailand)

โพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate, K_2CO_3)

ไซโลส (Xylose, $C_5H_{10}O_5$)

กลูโคส (Glucose, $C_6H_{12}O_6$)

กาแลกโตส (Galactose, $C_6H_{12}O_6$)

กลูโคซามีน (Glucosamine, $C_6H_{13}NO_5$, COXIUM)

โบรอนไตรฟลูออไรด์ (Boron trifluoride, BF_3 , ACROS, Belgium)

อะซีติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride, $C_4H_6O_3$, BDH, England)

โพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (Propionic anhydride, $C_6H_{10}O_3$, Fluka, Switzerland)

กรดโอเลอิก (Oleic acid, $C_{18}H_{34}O_2$, MAY&BAKER, England)

กรดสเตียริก (Stearic acid, $C_{18}H_{36}O_2$, MERCK, Germany)

กรดซินนามิก (Cinnamic acid, $C_9H_8O_2$, BDH, England)

ไบโอทีน (Biotin, $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, aapptec, the United states)

เคมเฟอร์อล (Kaempferol, $C_{15}H_{10}O_6$, abcam Biochemicals, the United states)

ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (Dicyclohexylcarbodiimide, DCC, $C_{13}H_{22}N_2$, aapptec, the United states)

4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-Dimethylaminopyridine, DMAP, $C_7H_{10}N_2$, aapptec, the United states)

รีซาซูริน (Resazurin sodium salt, Aldrich, Germany)

น้ำกลั่น (Distilled water, H_2O)

โทลูอีน (Toluene, C_7H_8 , Assay 98%, RCI Labscan, Thailand)

เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, $NaCl$, MERCK, Germany)

เมทิลไอโอดีน (Methyl iodide, CH_3I , Merck, Germany)

โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC pre-coated silica gel 60 F_{254} และ RP-18 F_{254} , หนา 0.25 หรือ 0.50 มิลลิเมตร, Merck, Germany)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient Agar, NA, DIFCO, the United states)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broth, NB, HIMEDIA, India)

3.1.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

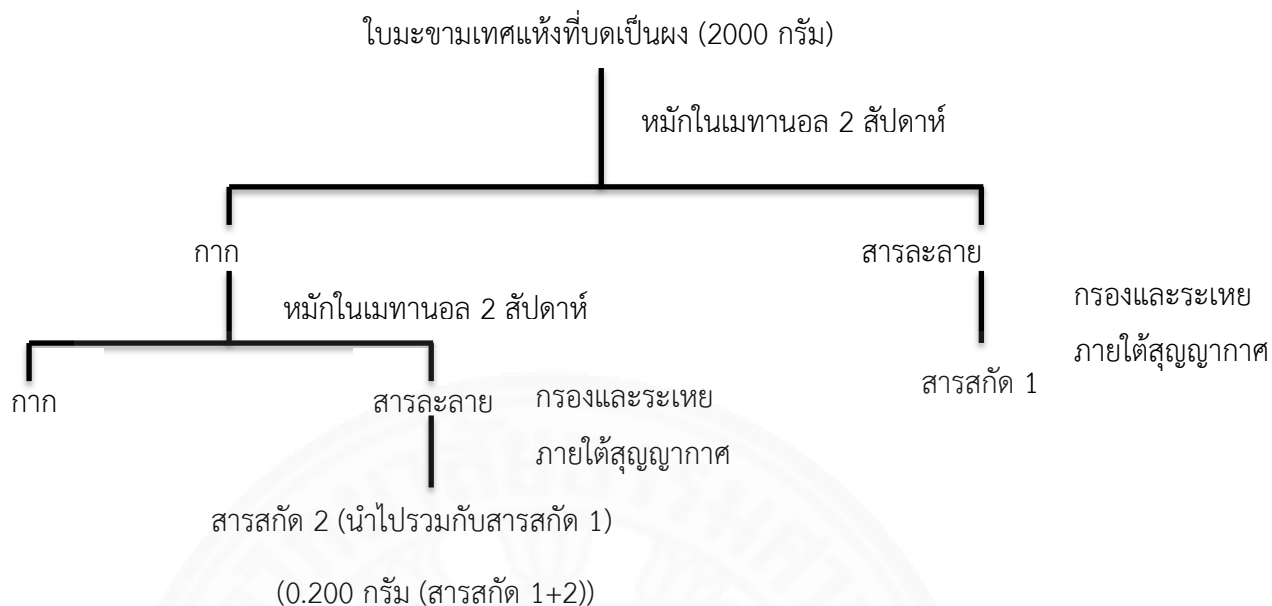
Escherichia coli TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบมะขามเทศ

3.2.1.1 นำใบมะขามเทศ (2000 กรัม) มาปั่นแล้วบดให้เป็นผงละเอียดนำมาสกัดสารด้วยวิธีการแช่ตัวอย่าง (maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง

3.2.1.2 นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรอง และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว บันทึกผลที่ได้ และคำนวณปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) เทียบกับพืชตัวอย่างแห่งดังกล่าว 3.1



ภาพที่ 3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสมุนไพร

3.2.1.3 นำสารสกัดหยาบรอสู่ขั้นตอนการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งทำการแยกผ่าน 3 เทคนิค คือ (1) เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่โดยแยกตามขนาดของสาร (2) คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่โดยแยกตามความมีขั้วของสาร และ (3) เพรพเพอร์เรทีฟโครมาโตกราฟี (Preparative layer chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (Silica gel 60 PF₂₅₄, ความหนา 0.50 เซนติเมตร) เป็นวัฏภาคคงที่พร้อมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC)

3.2.1.3.1 การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration)

นำสารสกัดมาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโดยใส่สารสกัดที่ละลายในเมทานอลบรรจุลงในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ที่บรรจุเซฟาเดกซ์ LH-20 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อย (fraction) และตรวจสอบองค์ประกอบของสารแต่ละส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, หนา 0.25 มิลลิเมตร)) ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์

(ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน โดยวิเคราะห์จากอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ขององค์ประกอบของสารที่แยกได้ โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางจากจุดกึ่งกลางของจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางของสาร}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของวัฏภาคเคลื่อนที่}}$$

บันทึกผลการทดลอง และเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบของสารในตัวอย่างแต่ละชนิด ระเหยตัวทำละลายออก และนำไปพิจารณาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

3.2.1.3.2 การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)

นำสารสกัดหยาบใบมะขามเทศที่ผ่านขั้นตอนกระบวนการแยกด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันมาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (กรณีลงแบบเปียก) โดยใส่สารสกัดที่ละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่บรรจุลงในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ที่บรรจุซิลิกาเจล (RANKEN, 100-200 mesh) เป็นวัฏภาคคงที่ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน:เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต:เมทานอล และเมทานอล ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยค่อย ๆ เพิ่มสภาพขั้วของตัวทำละลาย ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้อ้างอิงจากผลการทดลองของการทำแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อย (fraction) และตรวจสอบองค์ประกอบของสารแต่ละส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, หนา 0.25 มิลลิเมตร)) ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน โดยวิเคราะห์จากอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ขององค์ประกอบของสารที่แยกได้ โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางจากจุดกึ่งกลางของจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางของสาร}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของวัฏภาคเคลื่อนที่}}$$

บันทึกผลการทดลองและเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบของสารในตัวอย่างแต่ละชนิด ระเหยตัวทำละลายออก และนำไปพิจารณาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

การแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (กรณีลงแบบแห้ง) โดยใส่สารสกัดที่ผสมกับซิลิกาเจลที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ที่บรรจุซิลิกาเจล (RANKEN, 100-200 mesh) เป็นวัฏภาคคงที่ ซะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน:เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต:เมทานอล ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยค่อย ๆ เพิ่มสภาพขั้วของตัวทำละลาย ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้อ้างอิงจากผลการทดลองของการทำแผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อย (fraction) และตรวจสอบองค์ประกอบของสารแต่ละส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, หนา 0.25 มิลลิเมตร)) ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยสารแอนิซลดีไฮด์ แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน โดยวิเคราะห์จากอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ขององค์ประกอบของสารที่แยกได้ บันทึกผลการทดลองและเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบของสารในตัวอย่างแต่ละชนิด ระเหยตัวทำละลายออก และนำไปพิจารณาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

3.2.1.3.3 การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเพรพเพอร์เรทีฟโครมาโทกราฟีชนิดเยื่อบาง (Preparative thin layer chromatography)

นำสารสกัดมาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคเพรพเพอร์เรทีฟโครมาโทกราฟีชนิดเยื่อบาง โดยวัฏภาคคงที่คือซิลิกาเจล (ซิลิกาเจล 60 PF₂₅₄, ความหนา 0.50 เซนติเมตร) และใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (5:95) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) ชูดเอาซิลิกาเจลที่มีจุด

ที่ต้องการ นำมาสกัดออกด้วยเมทานอล กรองซิลิกาเจลออก ทำการสกัดซ้ำจนสารออกหมด ระเหยตัวทำละลายออก และนำไปพิจารณาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

3.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่แยกได้จากขั้นตอนการแยกหาสารบริสุทธิ์ในใบมะขามเทศมาทำปฏิกิริยาเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพโดยสามารถแบ่งการสังเคราะห์อนุพันธ์ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

3.2.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับไกลโคไซด์ (ไซโลส, กลูโคส, กาแลกโตส, กลูโคซามีน) (29)

นำไกลโคไซด์มาทำปฏิกิริยาเตรียมในรูปอะซิติก (acetyl) โดยใช้ไกลโคไซด์ เช่น กลูโคส ไซโลส กาแลกโตส และกลูโคซามีน ใส่ในขวดก้นกลม เต็มอะซิติกคลอไรด์ (acetyl chloride) (12 มิลลิลิตร) ทำการคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และเก็บแบบสุญญากาศ (in vacuo) ไว้ในการทำปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือ เคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.0164 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไรด์ (3 มิลลิลิตร) เต็มโพแทสเซียมคาร์บอเนต (3.4 มิลลิกรัม, 0.0246 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)) ทำการคนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมน้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติกไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) เช่น กลูโคส (8.8 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)) ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไรด์ (1 มิลลิลิตร) โดยขณะเติมน้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติกไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) ให้ทำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส คือนำขวดก้นกลมแช่ในน้ำแข็งขณะเติมน้ำตาลในรูปอะซิติกไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) เต็มโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF₃) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตร

ชั้น (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (วัฏภาคเคลื่อนที่: 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำปฏิกิริยา deprotection โดยเติม โซเดียมเมทอกไซด์/เมทานอล (5 สมมูล (equivalent)) จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่ (100% เอทิลอะซิเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ได้ผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซิเตต (kaempferol-3,6-diacetate (**29**)) (2.5 มิลลิกรัม, 24%) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (1:9) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (disc diffusion method และ MIC method)

การสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับไกลโคไซด์มีการใช้ไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆในการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับไกลโคไซด์ อาทิ ไชโลส, กาแลกโตส และกลูโคซามีน เป็นต้น ซึ่งมีวิธีการสังเคราะห์เกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับไกลโคไซด์ (กลูโคส) แต่ใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ในปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ ไชโลส (7.4 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)), กาแลกโตส (8.8 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)) และ กลูโคซามีน (8.8 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)) จากการสังเคราะห์อนุพันธ์กับไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆ อาทิเช่น ไชโลส, กาแลกโตส และกลูโคซามีน ให้ผลิตภัณฑ์ที่เหมือนกันคือ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซิเตต (kaempferol-3,6-diacetate (**29**))

3.2.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับลิปิด (โอเลอิกเอซิด, สเตียริก เอซิด, ซินนามิก เอซิด และไปโอทิน)

นำกรดโอเลอิก (23.2 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ใส่ในขวดก้นกลมมาทำการกระตุ้น (activate) กับไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมด์ (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ซึ่งละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไรม์:ไดคลอโรมีเทน (2:2

มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศคือ เคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไรด์ (1 มิลลิลิตร) ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid (30)) (3.1 มิลลิกรัม, 34%) ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (disc diffusion method และ MIC method)

การสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับลิปิด (สเตอริก เอซิด (steric acid) ซินนามิก เอซิด (cinnamic acid)) และไบโอติน (biotin) มีวิธีการสังเคราะห์เดียวกับการสังเคราะห์เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) แต่ใช้ปริมาณสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันดังนี้ สเตอริก เอซิด (23.4 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ซินนามิก เอซิด (12.2 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และไบโอติน (20.1 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ซึ่งจะได้เป็นผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid (31)) (1.9 มิลลิกรัม, 21%), เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid (32)) (2.05 มิลลิกรัม, 30%) และเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin (33)) (2.18 มิลลิกรัม, 26%)

3.2.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับ อะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) (34) และโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (propionic anhydride) (35)

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไรด์ (3 มิลลิลิตร) และทำการเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต (10.2 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) ทำการคนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ (7.5 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) หรือโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (9.6 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล

(equivalent)) ที่ทำการละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF, 1 มิลลิลิตร) โดยทำการเติมสารที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และคำนวณปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของผลิตภัณฑ์ และตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) ซึ่งอนุพันธ์เคมเฟอรอล (kaempferol) กับ อะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) (35) และโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (propionic anhydride) (36) ได้ร้อยละผลผลิตน้อยมากและไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ จึงไม่ได้นำไปศึกษาในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.2.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

3.2.3.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ [44]

3.2.3.1.1 เตรียมสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) โดยชั่ง 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) มา 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.2.3.1.2 นำสารสกัดจากใบมะขามเทศและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอรอล (kaempferol (8)) เคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) มาทดสอบบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC pre-coated silica gel 60 F254 (Merck, หน้า 0.25 มิลลิเมตร)) ซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ), เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7))) และ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (2:8) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28))

3.2.3.1.3 นำสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.3.1.1 มาป้ายลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางที่ผ่านการทดสอบ วางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที สังเกตสีของสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วบันทึกผล

3.2.3.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay) [45]

3.2.3.2.1 เตรียมสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล โดยชั่ง 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) มา 12 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.3.2.2 เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 250, 125, 50, 25, 10, และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

3.2.3.2.3 เตรียมสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 250, 125, 50, 25, 10, และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

3.2.3.2.4 ผสมสารละลายกรดแอสคอร์บิก จำนวน 2.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในความมืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (control)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) เป็นสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างต้องการวัด (blank) และน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) 100 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุม (control)

3.2.3.2.5 ผสมสารสกัด จำนวน 2.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในความมืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (control)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) เป็นสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างต้องการวัด (blank) และน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกิริลไฮดราซิล (DPPH) 100 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุม (control)

3.2.3.2.6 นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ได้จากสมการมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารสกัด (แกน X) และคำนวณหาค่า IC_{50} (IC_{50} คือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกิริลไฮดราซิล DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์)

3.2.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

3.2.4.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

3.2.4.1.1 ทำการบ่มเชื้อแบคทีเรีย (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis*) ในอาหารเหลว (nutrient broth, NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.4.1.2 นำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างเวลา (แกน X) และค่าดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารตัวอย่าง

3.2.4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count (TVA))

3.2.4.2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือ *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis* ในอาหารเหลว (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาเจือจางด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยใช้การเจือจางตามลำดับส่วน 10 เท่า (10-fold dilution) แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (nutrient agar, NA) ที่ทำการเตรียมไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4.2.2 ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง (ให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะ) คำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย Colony Forming Unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างเวลา (แกน X) กับจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (แกน Y) เพื่อหาความเข้มข้นของเซลล์ที่ในระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดตัวอย่างด้วยวิธี disc diffusion

3.2.4.2.3 นำข้อมูลของกราฟการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย และการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count, TVA) มาสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis*) ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ (CFU/mL) (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อใช้ในการคำนวณในการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารตัวอย่าง

3.2.4.2.4 การสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย MRSA โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว (NB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการบ่มและมีความขุ่นดังกล่าวมาทำการเจือจางด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยใช้การเจือจางลำดับส่วนแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (nutrient agar, NA) ที่ทำการเตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะ) แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ (CFU/mL) (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y)

3.2.4.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (disc diffusion method) [46]

3.2.4.3.1 เตรียมสารตัวอย่างโดยสารสกัดหยาบใบมะขามเทศและ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลายสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) และเคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายของอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์ (เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต; kaempferol-3,6-diacetate (29)) ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร และสารละลายอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อลกับลิปิด และไบโอติน ได้แก่ เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid (30)) เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด

(kaempferol-6-steric acid **(31)**) เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid **(32)**) และเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin **(33)**) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.2.4.3.2 เตรียมกล้าเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ โดยปรับค่าความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้มีค่าเท่ากับความขุ่นมาตรฐานแมคฟาแลนด์ (McFarland standard No. 0.5 (1.5×10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)) โดยทำการวัดความขุ่นด้วยเครื่องคัลเลอร์มิเตอร์เทียบกับกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ถ้าเชื้อมีความขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วยอาหารเหลว (NB)

3.2.4.3.3 ใช้สารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.4.3.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ก่อนหน้าแล้ว ทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว เมื่อผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำแผ่นกระดาษกรองชวยาด้านจุลชีพที่หยดสารสกัดที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร มาวางบนผิวหน้าอาหารที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เซฟาเลกซิน (Cephalexin, 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) อ่านผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นกระดาษกรองชวยาด้านจุลชีพ ในหน่วยมิลลิเมตร

3.2.4.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (MIC method) [47]

3.2.4.4.1 เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว (nutrient broth, NB) ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 5×10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบใบมะขามเทศความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจือจางตามลำดับส่วนแบบ 2 เท่า (two-fold dilution) จากนั้นเติมสารตามลำดับ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1

แสดงการเตรียมสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)

หลุมที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0.85% โซเดียมคลอไรด์ (ไม่โครลิตร)		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
สารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ไม่โครลิตร)											
(100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
3.3 x อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด เหลว (ไม่โครลิตร)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
เชื้อจุลินทรีย์ (ไม่โครลิตร) (5×10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ความเข้มข้นของสารสกัด หยาบใบมะขามเทศ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	0.1953	0.0977

สำหรับสารตัวอย่างชนิดอื่นและตัวอย่างยาเตรียมความเข้มข้นของสารอิงข้อมูลจาก การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (disc diffusion method) ดังตารางที่ 3.2 และ 3.3

ตารางที่ 3.2

แสดงความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารตัวอย่างในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>E. coli</i> TISTR 780	<i>E. faecalis</i> TISTR 379	MRSA ATCC 43300
สารสกัดหยาบใบ มะขามเทศ	100-0.098	100-0.098	100-0.098	100-0.098	100-0.098
Kaempferol (8)	50-0.049	50-0.049	50-0.049	-	50-0.049
Kaempferol-3- rhamnoside (7)	50-0.049	50-0.049	50-0.049	-	50-0.049
4,5-epoxy- piperidine-3- carboxylic acid (28)	200-0.190	-	-	-	200-0.190
Kaempferol-3,6- diacetate (29)	12.5-0.012	12.5-0.012	-	-	-
Kaempferol-6-oleic acid (30)	-	-	25-0.024	-	-
Kaempferol-6-steric acid (31)	-	-	25-0.024	-	-
Kaempferol-3- biotin (33)	-	-	25-0.024	-	-

ตารางที่ 3.3

แสดงความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของกลุ่มตัวอย่างยาปฏิชีวนะในการทดสอบการออกฤทธิ์
ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>E. coli</i> TISTR 780	<i>E. faecalis</i> TISTR 379	MRSA ATCC 43300
Cephalexin	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9
Streptomycin	5000-4.9	5-0.0048	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9
Penicillin V	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9	20-0.019	5000-4.9
Dicloxacillin	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9	5000-4.9
Vancomycin	5000-4.9	20-0.019	5000-4.9	20-0.019	5000-4.9

3.2.4.4.2 ดูดเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบใส่ลงในหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร
แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้เซฟาเล็ก
ซิน (Cephalexin, 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นตัวควบคุมผลบวก ใช้ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ที่
ปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ และเมทานอลเป็นตัวทำลาย

3.2.4.4.3 เติมสารละลายริซาซูริน (resazurin) ความเข้มข้น 0.1% ทุกหลุม
ๆ ละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อ่านผลการ
ทดลองที่ได้โดยสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นผลบวก หมายถึงสารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสีชมพูแสดง
ว่าเป็นผลลบหมายถึงสารไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยค่า MIC คือความเข้มข้น
ต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.4.4 การหาค่า MBC ใช้ห้วงเชื้อแต่ละเชื้อจากทุกหลุมที่ปรากฏสีน้ำ
เงิน/ม่วงมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
โดยการอ่านผล ซึ่ง MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารแข็ง (NA)



ภาพที่ 3.2 วิธีการวิจัยการแยกและสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไ้มะขามเทศ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสกัด

จากการสกัดพืชตัวอย่างด้วยวิธีการแช่สารตัวอย่าง (maceration) โดยนำใบมะขามเทศ (2,000 กรัม) มาปั่นแล้วบดให้เป็นผงละเอียดนำมาสกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรอง และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว บันทึกผลที่ได้และคำนวณปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) เมื่อเทียบกับพืชตัวอย่างแห้ง ดังตาราง 4.1 โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต (\% yield)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรแห้ง}} \times 100$$

ตารางที่ 4.1

ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล

พืชตัวอย่าง	น้ำหนักพืชแห้ง (กรัม)	สารสกัดหยาบในเมทานอล (กรัม)	ปริมาณร้อยละผลผลิต (% yield)
ใบมะขามเทศ	2,000	0.200	0.01

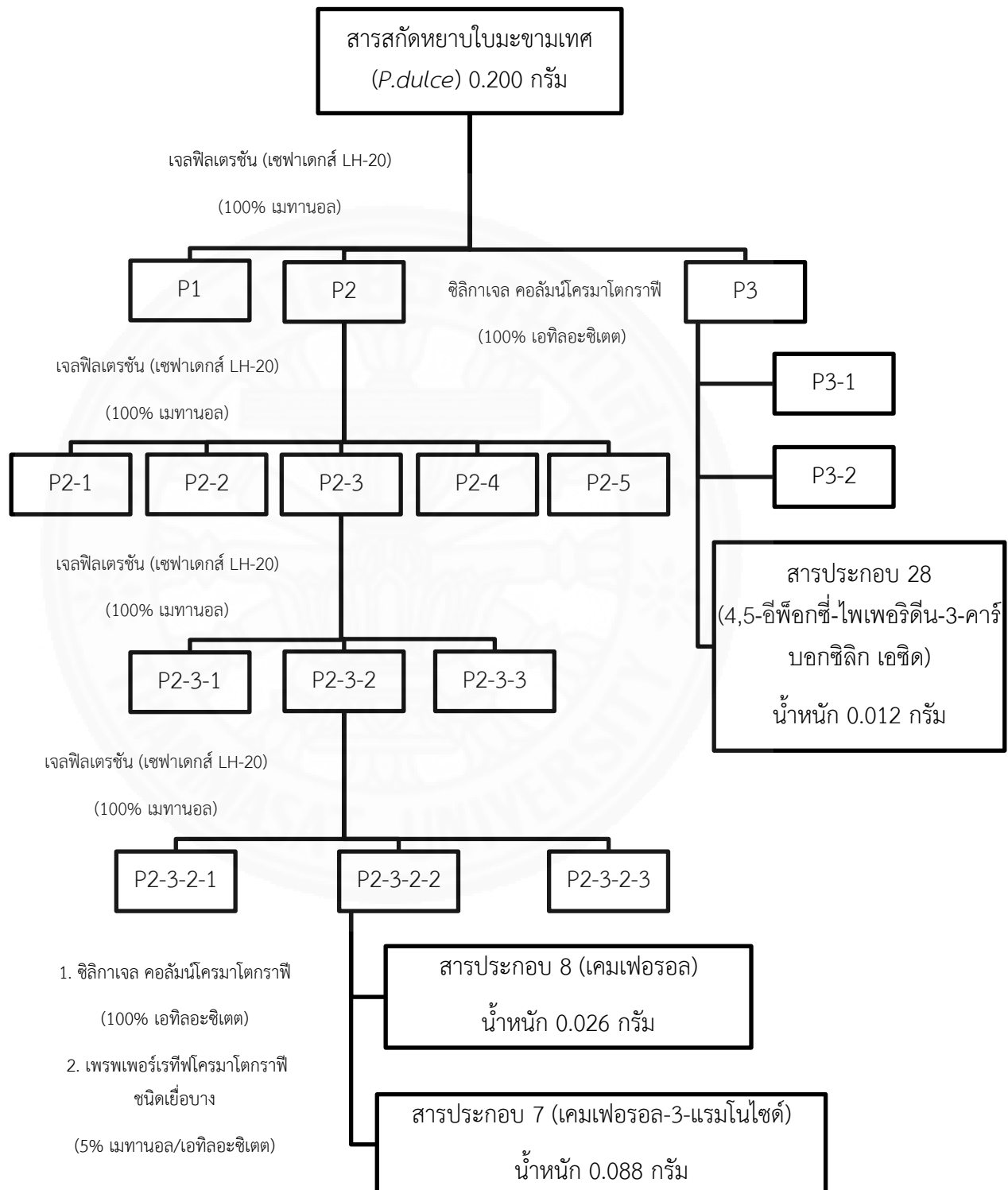
4.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล

จากการสกัดใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลได้สารสกัดหยาบจากใบมะขามเทศ 0.200 กรัม นำสารสกัดที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีเพื่อแยกหาสารบริสุทธิ์โดยทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (100% เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล: เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโน

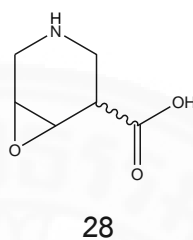
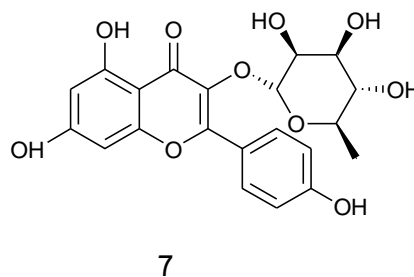
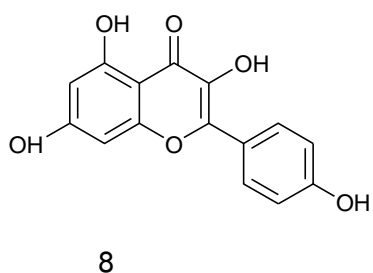
เมตร) และชুবด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันได้ส่วนย่อย 3 ส่วนด้วยกันคือ P1, P2 และ P3

นำสาร P2 ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (100% เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชুবด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน ได้ส่วนย่อย 5 ส่วนคือ P2-1, P2-2, P2-3, P2-4 และ P2-5 นำสาร P2-3 ทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (100% เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชুবด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน ได้ส่วนย่อย 3 ส่วนคือ P2-3-1, P2-3-2 และ P2-3-3 และนำสาร P2-3-2 ทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (100% เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชুবด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน ได้ส่วนย่อย 3 ส่วนคือ P2-3-2-1, P2-3-2-2 และ P2-3-2-3 จากนั้นนำสาร P2-3-2-2 ทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่ (100% เอทิลอะซิเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) และใช้เพรพเพอร์เรทีฟโครมาโตกราฟีชนิดเยื่อบางเป็นวัฏภาคคงที่ (5% เมทานอล/เอทิลอะซิเตต เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชুবด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน พบสารบริสุทธิ์สองชนิดคือ เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) น้ำหนัก 0.026 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.61 และเคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) น้ำหนัก 0.088 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองและมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.45

นำสาร P3 ทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่ (100% เอทิลอะซิเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่) ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อยพร้อมตรวจสอบองค์ประกอบส่วนย่อยด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (2:8) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยสารแอนิซัลดีไฮด์แล้วให้ความร้อนบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (stirrer) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน พบสารบริสุทธิ์คือ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**)) น้ำหนัก 0.012 กรัม มีลักษณะของสารเป็นของแข็งสีขาว ละลายได้ดีในน้ำ อัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ขององค์ประกอบของสารที่แยกได้ มีลักษณะของจุด (spot) ของสารเป็นริ้วยาว ซึ่งสามารถสรุปการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลดังแสดงในภาพ 4.1 และโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกจากสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลดังแสดงในภาพ 4.2



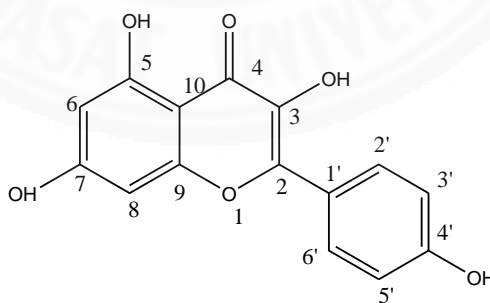
ภาพที่ 4.1 แผนภูมิการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดยีสบวมะขามเทศ



ภาพที่ 4.2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศในตัวอย่างละลายอินทรีย์เมทานอล (เคมเฟอร์อล (8), เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7), 4,5-อีพอกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28))

4.3 การหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวอย่างละลายอินทรีย์เมทานอล

4.3.1 เคมเฟอร์อล (สารประกอบ 8)



สารประกอบ 8 (เคมเฟอร์อล (kaempferol))

ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 0.026 กรัม

ค่า R_f เท่ากับ 0.61 (เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5))

^1H -, ^{13}C -NMR, HMBC และ HMQC (CD_3OD) แสดงในตาราง 4.2, 4.3, 4.4 และภาพ 4.3

^1H -NMR (CD_3OD , 400MHz) δ : 8.1 (d, 1H, $J = 9.04$ Hz), 7.0 (d, 1H, $J = 8.93$ Hz), 6.4 (d, 1H, $J = 2.05$ Hz), 6.1 (d, 1H, $J = 2.03$ Hz)

^{13}C -NMR (CD_3OD , 100MHz) δ : 175.70 (C=O), 164.10 (C-7), 161.40 (C-5), 161.20 (C-4'), 159.30 (C-9), 156.90 (C-2), 130.80 (C-3), 129.50 (C-2', 6'), 122.40 (C-1'), 115.10 (C-3', 5'), 103.30 (C-10), 99.90 (C-6), 93.60 (C-8)

MS (ESI) (+ve) m/z : 286.23 [M]



ตารางที่ 4.2

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล (8) ในเมทานอล- d_4 (CD_3OD)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	156.90
3	-	130.80
4	-	175.70
5	-	161.40
6	6.1 (d, 1H, $J = 2.03$ Hz)	99.90
7	-	164.10
8	6.4 (d, 1H, $J = 2.05$ Hz)	93.60
9	-	159.30
10	-	103.30
1'	-	122.40
2'	8.1 (d, 1H, $J = 9.04$ Hz)	129.50
3'	7.0 (d, 1H, $J = 8.93$ Hz)	115.10
4'	-	161.20
5'	7.0 (d, 1H, $J = 8.93$ Hz)	115.10
6'	8.1 (d, 1H, $J = 9.04$ Hz)	129.50

ตารางที่ 4.3

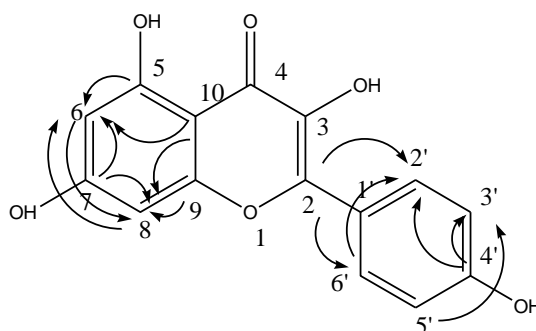
ข้อมูล HMBC ของเคมเฟอรอล (8) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

δ_H (position)	δ_C (correlated C)
H-2', H-6'	156.90
H-6	161.40
H-8	99.90
H-6, H-8	164.10
H-6	93.60
H-8	159.30
H-6, H-8	103.30
H-2', H-3'	161.20
H-3'	115.10
H-2'	129.50

ตารางที่ 4.4

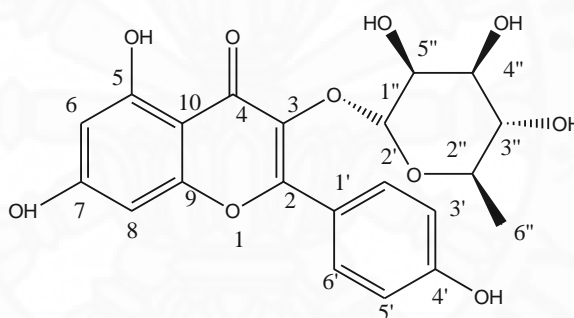
ข้อมูล HMQC ของเคมเฟอรอล (8) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

δ_H (position)	δ_C (correlated C)
H-6	99.90
H-8	93.60
H-2', H-6'	129.50
H-3', H-5'	115.10



ภาพที่ 4.3 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยยะไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ ^1H -, ^{13}C - long range correlations ของเคมเฟอร์อล (8)

4.3.2 เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (สารประกอบ 7)



สารประกอบ 7 (เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside))

ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 0.088 กรัม

ค่า R_f เท่ากับ 0.45 (เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5))

^1H -, ^{13}C -NMR, HMBC และ HMQC (CD_3OD) แสดงในตาราง 4.5, 4.6, 4.7 และภาพ

4.4

^1H -NMR (CD_3OD , 400MHz) δ : 7.8 (d, 1H, $J = 9.15$ Hz), 6.9 (d, 1H, $J = 9.15$ Hz), 6.4 (d, 1H, $J = 2.44$ Hz), 6.2 (d, 1H, $J = 2.44$ Hz), 5.4 (d, 1H, $J = 1.84$ Hz), 4.2 (dd, 1H, $J = 8.95, 3.05$ Hz), 3.7 (dd, 1H, $J = 3.34, 1.83$ Hz), 3.3 (m, 1H), 1.0 (d, 3H, $J = 5.48$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100MHz) δ : 179.00 (C=O), 165.00 (C-7), 162.00 (C-5), 161.00 (C-9), 158.00 (C-4'), 157.00 (C-2), 135.00 (C-3), 130.00 (C-2', 6'), 121.00 (C-1'), 115.00 (C-3', 5'), 105.00 (C-10), 102 (C-1''), 99.00 (C-6), 93.00 (C-8), 71.4 (C-3''), 70.7 (C-4''), 70.6 (C-2''), 70.5 (C-5''), 18 (CH_3)

MS (ESI) (+ve) m/z : 431.00 [M] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$: 431.37))



ตารางที่ 4.5

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	157.00
3	-	135.00
4	-	179.00
5	-	162.00
6	6.2 (d, 1H, $J = 2.44$ Hz)	99.00
7	-	165.00
8	6.4 (d, 1H, $J = 2.44$ Hz)	93.00
9	-	161.00
10	-	105.00
1'	-	121.00
2'	7.8 (d, 2H, $J = 9.15$ Hz)	130.00
3'	6.9 (d, 2H, $J = 9.15$ Hz)	115.00
4'	-	158.00
5'	6.9 (d, 2H, $J = 9.15$ Hz)	115.00
6'	7.8 (d, 2H, $J = 9.15$ Hz)	130.00
1''	5.4 (d, 1H, $J = 1.84$ Hz)	102.00
2''	3.3 (m, 1H)	70.60
3''	3.3 (m, 1H)	71.00
4''	3.7 (dd, 1H, $J = 3.34, 1.83$ Hz)	70.70
5''	4.2 (dd, 1H, $J = 8.95, 3.05$ Hz)	70.50
6''	1.0 (d, 3H, $J = 5.48$ Hz)	18.00

ตารางที่ 4.6

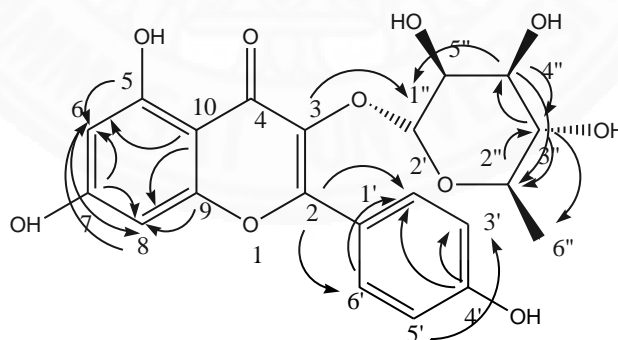
ข้อมูล HMBC ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

δ_H (position)	δ_C (correlated C)
H-2', H-6'	157.00
H-1''	135.00
H-6	162.00
H-8	99.00
H-6, H-8	165.00
H-6	93.00
H-8	161.00
H-6, H-8	105.00
H-2', H-3'	158.00
H-3'	115.00
H-2'	130.00
H-3''	70.60
H-2'', H-3'', H-4'', H-6''	71.40
H-1'', H-2'', H-3''	70.70

ตารางที่ 4.7

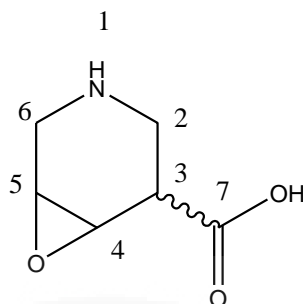
ข้อมูล HMQC ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

δ_H (position)	δ_C (correlated C)
H-6	99.00
H-8	93.00
H-2', H-6'	130.00
H-3', H-5'	115.00
H-1''	102.00
H-2'', H-3''	70.60, 71.40
H-4''	70.70
H-5''	70.50
H-6''	18.00



ภาพที่ 4.4 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระยะไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ 1H -, ^{13}C - long range correlations ของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7)

4.3.3 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (สารประกอบ 28)



สารประกอบ 28 (4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid))

ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.012 กรัม

IR (NaCl): ν_{\max} 2941.17, 1608.39, 1365.03, 1345.45, 1149.65, 993.00, 738.46 cm^{-1}

^1H -, ^{13}C -NMR, HMBC และ HMQC (D_2O) แสดงในตาราง 4.8, 4.9, 4.10 และภาพ 4.5

^1H -NMR (D_2O , 400MHz) δ : 4.17 (m, 1H), 3.85 (dd, 2H, $J = 11.8, 3.8$ Hz), 3.24 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.87 (m, 1H)

^{13}C -NMR (D_2O , 100MHz) δ : 174.00 (C=O), 61.92 (C-5), 54.09 (C-6), 38.69 (C-2), 32.87 (C-4), 28.04 (C-3)

MS (ESI) (+ve) m/z : 143.6 [M], 144.7 [M+H], 292.4 [2M+H], 310.5 [2M+Na], 451.1 [3M+Na], 469.8 [3M+K], 616.6 [4M+K] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$: 143.14))

ตารางที่ 4.8

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวที่เตรียมออกไซด์ (D_2O)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	3.24 (m, 2H)	38.69
3	1.87 (m, 1H)	28.04
4	2.15 (m, 1H)	32.87
5	4.17 (m, 1H)	61.92
6	3.85 (dd, 2H, $J = 11.8, 3.8$ Hz)	54.09
7	-	174.00

ตารางที่ 4.9

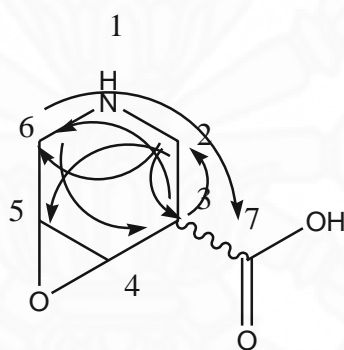
ข้อมูล HMBC 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวที่เตรียมออกไซด์ (D_2O)

δ_{C} (position)	δ_{C} (correlated H)
$\text{C}_3, \text{C}_5, \text{C}_6$	38.69
C_2, C_6	28.04
C_3, C_7	54.09

ตารางที่ 4.10

ข้อมูล HMQC 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวที่เตรียมออกไซด์ (D_2O)

δ_H (position)	δ_C (correlated C)
H-2	38.69
H-3	28.04
H-4	32.87
H-5	61.92
H-6	54.09



ภาพที่ 4.5 ข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธะในระนาบไกลของโปรตอนและอะตอมคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลแบบ 1H , ^{13}C - long range correlations ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28))

4.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบมะขามเทศ

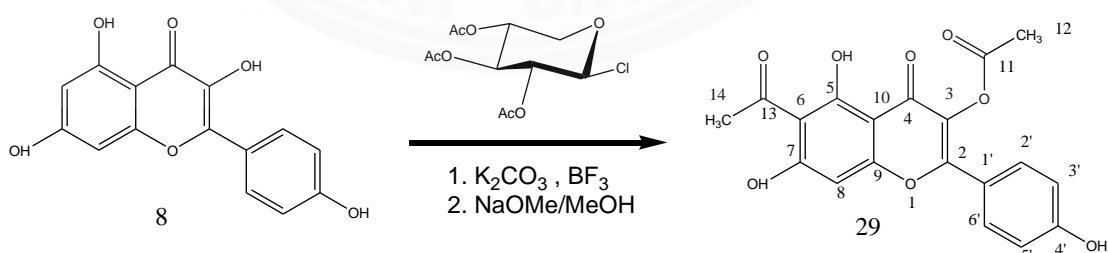
จากการศึกษาการแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากใบมะขามเทศโดยพบสารสำคัญ 3 ชนิดคือ เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากผลของฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นที่ได้จึงนำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยการทำปฏิกิริยากับไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ, ลิปิด และไบโอตินได้สารอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อลดังนี้ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (32) และเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) (33) เพื่อเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยแนวทางในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์กับสารทั้งสามกลุ่มคือ อนุพันธ์กับไกลโคไซด์เกิดจากโครงสร้างของสารบริสุทธิ์อีกชนิดหนึ่งที่พบในสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำลายอินทรีย์เมทานอล คือเคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ ซึ่งมีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี จึงนำไปสู่การปรับเปลี่ยนการใช้ไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆ อนุพันธ์ในกลุ่มที่สองคืออนุพันธ์กับไขมัน จากแนวคิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรานั้นเป็นชั้นของไขมันชนิดฟอสโฟลิปิด ดังนั้นสารที่มีลักษณะโครงสร้างของไขมันจะช่วยให้ซึมผ่านได้ดียิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาว 2 ชนิด คือกรดโอเลอิก และกรดสเตอริก และกรดไขมันที่มีวงอะโรมาติก คือกรดซินนามิก และอนุพันธ์ในกลุ่มที่สามอนุพันธ์กับไบโอติน ซึ่งจากโครงสร้างเป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้และมีสายโซ่ยาวประกอบอยู่ในโครงสร้าง จากโครงสร้างสารชนิดนี้จึงน่าจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย ซึ่งจากงานวิจัยต่างๆพบว่าสารทั้งสามกลุ่มที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์นั้นแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจึงได้เลือกสารทั้งสามกลุ่มมาสังเคราะห์ในรูปอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล [48, 49, 50, 51, 52, 53]

ในส่วนของการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์, ลิปิด และไบโอติน ได้มีการใช้เคมเฟอร์อล (C₅H₁₀O₆, abcam Biochemicals, the United states) ในกระบวนการสังเคราะห์ เนื่องจากสารเคมเฟอร์อลที่แยกได้จากกระบวนการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอในการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมด

4.4.1 เคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (Kaempferol-3,6-diacetate) (29)

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอล (kaempferol) กับไกลโคไซด์ทั้ง 4 ชนิดคือ ไฮโลส, กลูโคส, กาแลกโตส และกลูโคซามีน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมือนกันเพียงชนิดเดียว จึงนำเสนอวิธีการสังเคราะห์และปฏิกิริยาเคมีของเคมเฟอรอล (kaempferol) กับกลูโคสเท่านั้น

การสังเคราะห์นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือเคมเฟอรอล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.0164 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมคาร์บอเนต (3.4 มิลลิกรัม, 0.0246 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซีทิลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) เช่นกลูโคส (8.8 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)) และโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซีเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ (วัฏภาคเคลื่อนที่: 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซีเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำปฏิกิริยา deprotection โดยเติม โซเดียมเมทอกไซด์ในเมทานอล (5 สมมูล (equivalent)) จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซีเตต (1:9) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) (2.5 มิลลิกรัม, 24%) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.63 โดยเกิดปฏิกิริยาตั้งสมการ



นำผลิตภัณฑ์พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (IR spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) พบค่า IR (NaCl): ν_{max} 3418.46, 2924.36, 2855.06, 1618.71, 1306.29, 533.87 cm^{-1} และจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) พบสัญญาณของอะซีทิล (acetyl group) ที่ δ 2.70 (s, H-14) และ 3.37 (s, H-12) และสัญญาณของเคมเฟอรอล (kaempferol) ที่

δ 6.55 (d, $J = 2.05$, H-8), 7.80 (d, $J = 9.15$, H-3',5') และ 8.50 (d, $J = 9.15$, H-2', 6') ดังสรุปในตาราง 4.11 และจาก MS (ESI) สเปกตรัม พบ molecular ion ที่ m/z 369.20 [M - H] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $C_{19}H_{14}O_8$: 370.23)

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับไกลโคไซด์ได้ศึกษาการสังเคราะห์นอกเหนือจากวิธีการสังเคราะห์ข้างต้นด้วยวิธีการสังเคราะห์ดังนี้

- 1) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (2 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับ โปแทสเซียมคาร์บอเนต (1.2 มิลลิกรัม, 0.0012 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) คือไซโลส (1.2 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล, 1 สมมูล (equivalent)) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -79°C
- 2) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (2 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับ โปแทสเซียมคาร์บอเนต (1.2 มิลลิกรัม, 0.0012 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) คือไซโลส (2.0 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -79°C
- 3) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (2 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับ โปแทสเซียมคาร์บอเนต (1.2 มิลลิกรัม, 0.0012 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) คือไซโลส (2.0 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)) ไสโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -79°C
- 4) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (2 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับ โปแทสเซียมคาร์บอเนต (1.2 มิลลิกรัม, 0.0012 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) คือไซโลส (2.0 มิลลิกรัม, 0.004 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)) ไสโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0°C
- 5) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (5 มิลลิกรัม, 0.0116 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับ โซเดียมไฮไดรด์ (0.6 มิลลิกรัม, 0.0255 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) คือกลูโคส (3.0 มิลลิกรัม, 0.0174 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)) ไสโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0°C

- 6) เคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.0164 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมคาร์บอเนต (3.4 มิลลิกรัม, 0.0246 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) เช่นกลูโคส (8.8 มิลลิกรัม, 0.0492 มิลลิโมล, 3 สมมูล (equivalent)) และโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF₃) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0°C
- 7) เคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.0164 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยากับเพอร์ริกคลอไรด์ (44.4 มิลลิกรัม, 0.1643 มิลลิโมล, 10 สมมูล (equivalent)), น้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลไกลโคไซด์ (acetyl glycoside) เช่นกลูโคส (29.6 มิลลิกรัม, 0.1643 มิลลิโมล, 10 สมมูล (equivalent)) และ molecular sieve ทำปฏิกิริยาโดยใช้ไมโครเวฟ โดยใช้ความร้อนระดับไฟอ่อน และใช้เวลาทำปฏิกิริยาจนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์ด้วยวิธีต่างๆ พบว่าวิธีที่ 6 เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ เพราะวิธีการสังเคราะห์นี้เกิดผลิตภัณฑ์ และให้ร้อยละผลผลิตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยวิธีการสังเคราะห์วิธีอื่นๆที่ทำการศึกษานั้นมักพบปัญหาเช่นไม่เกิดปฏิกิริยาเป็นผลิตภัณฑ์, มีผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเกิดในปฏิกิริยาและไม่สามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์คือ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (Kaempferol-3,6-diacetate) (29) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ จากวัตถุประสงค์ที่มุ่งเน้นให้สารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับน้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลตั้งโครงสร้างต้นแบบคือ เคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside) (7) แต่จากการทดลองจริงสารตั้งต้นได้เข้าไปทำปฏิกิริยากันที่หมู่อะซิติลของน้ำตาลจึงได้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับไกลโคไซด์ทุกชนิด (ไซโลส, กลูโคส, กาแลกโตส, กลูโคซามีน) โดยสังเกตตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของหมู่อะซิติลจากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy)

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (Kaempferol-3,6-diacetate) (29) สารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับหมู่อะซิติลของน้ำตาลที่อยู่ในรูปอะซิติลจึงไม่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาในขั้นตอน deprotection เพราะได้ผลิตภัณฑ์เหมือนกันตั้งแต่ในขั้นตอนแรกก่อนทำปฏิกิริยา deprotection เมื่อทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเร

โซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) ดังนั้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์กับไกลโคไซด์สามารถลดขั้นตอนการ deprotection ได้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ครั้งถัดไป

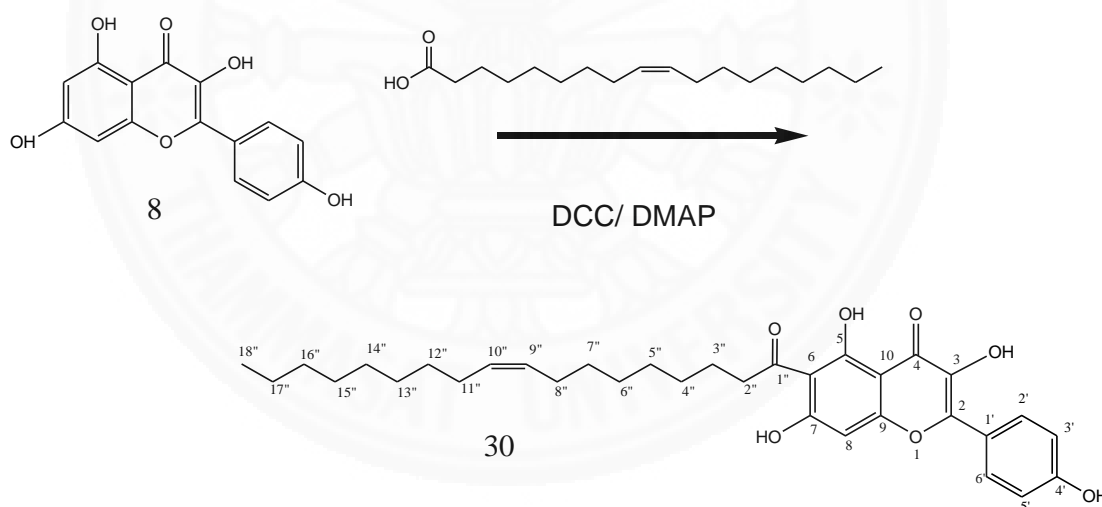
ตารางที่ 4.11

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29) ในเมทานอล-ดี4 (CD_3OD)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	156.00
3	-	130.00
4	-	179.08
5	-	161.00
6	-	99.00
7	-	164.00
8	6.55 (d, $J = 2.05$, 1H)	93.00
9	-	159.00
10	-	100.00
11	-	169.09
12	2.70 (s, 3H)	22.84
13	-	169.09
14	3.37 (s, 3H)	29.27
1'	-	122.00
2'	8.50 (d, $J = 9.15$, 1H)	130.83
3'	7.80 (d, $J = 9.15$, 1H)	114.13
4'	-	161.00
5'	7.80 (d, $J = 9.15$, 1H)	114.13
6'	8.50 (d, $J = 9.15$, 1H)	130.83

4.4.2 เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (Kaempferol-6-oleic acid) (30)

การสังเคราะห์เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยนำกรดโอเลอิก (23.2 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และ 4-ไดเมทิลอะมีโนไพริดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ลงไปในปฏิกิริยา ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จะได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) (3.1 มิลลิกรัม, 34%) มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.63 โดยเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



นำผลิตภัณฑ์พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (IR spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) พบค่า IR (NaCl): ν_{\max} 3316.52, 2928.06, 2855.06, 1706.29, 1451.74 cm^{-1} จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) พบสัญญาณของกรดโอเลอิก (oleic acid) ที่ δ 0.90 (t, $J = 6.04$, H-18''), 1.70 (m, H-4'', 5'', 6'', 7'', 12'', 13'', 14'', 15'', 16'', 17''), 2.00 (m, H-3''), 2.30 (m, H-8'', 11''), 2.40 (t, $J = 7.34$, H-2''), และ 5.35 (m, H-9'', 10'') และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 6.65 (d, $J = 2.05$, H-8), 6.65 (d, $J = 2.05$, H-3', 5') และ

8.20 (d, $J = 9.04$, H-2', 6') ดังสรุปในตาราง 4.12 และจาก MS (ESI) สเปกตรัม พบ molecular ion ที่ m/z 551.45 [M + H] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $C_{33}H_{42}O_7$: 550.69))

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับลิปิด (โอเลอิก เอซิด, สเตียริก เอซิด และ ซินนามิก เอซิด) ได้ศึกษาการสังเคราะห์นอกเหนือจากวิธีการสังเคราะห์ข้างต้นด้วยวิธีการสังเคราะห์ ดังนี้

- 1) ซินนามิก เอซิด (5.49 มิลลิกรัม, 0.0371 มิลลิโมล, 3.2 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไตรโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมด์ (7.60 มิลลิกรัม, 0.0371 มิลลิโมล, 3.2 สมมูล (equivalent)), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (0.40 มิลลิกรัม, 0.00348 มิลลิโมล, 0.3 สมมูล (equivalent)) และเติมเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (7) (5 มิลลิกรัม, 0.0116 มิลลิโมล)
- 2) กรดโอเลอิก (23.2 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไตรโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมด์ (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และเติมเคมเฟอรอล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล)

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับลิปิดด้วยวิธีต่างๆ พบว่าวิธีที่ 2 เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ เพราะวิธีการสังเคราะห์นี้เกิดผลิตภัณฑ์ และให้ร้อยละผลผลิตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยวิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 1 นั้นไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้จึงไม่ได้เลือกวิธีการสังเคราะห์นี้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับลิปิด

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับโอเลอิก เอซิด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์คือ เคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30) โดยสังเกตตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของโอเลอิก เอซิด จากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy)

ตารางที่ 4.12

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30) ในคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	143.00
3	-	129.93
4	-	173.97
5	-	156.00
6	-	108.00
7	-	157.00
8	6.65 (d, $J = 2.05$, 1H)	106.50
9	-	143.49
10	-	128.00
1'	-	129.67
2', 6'	8.20 (d, $J = 9.04$, 2H)	129.72
3', 5'	6.65 (d, $J = 2.05$, 2H)	128.50
4'	-	154.18
1''	-	177.00
2''	2.40 (t, $J = 7.34$, 2H)	39.40
3''	2.00 (m, 2H)	24.64
4''	1.70 (m, 2H)	29.23
5''	1.70 (m, 2H)	29.65
6''	1.70 (m, 2H)	29.69
7''	1.70 (m, 2H)	30.96

ตารางที่ 4.12 (ต่อ)

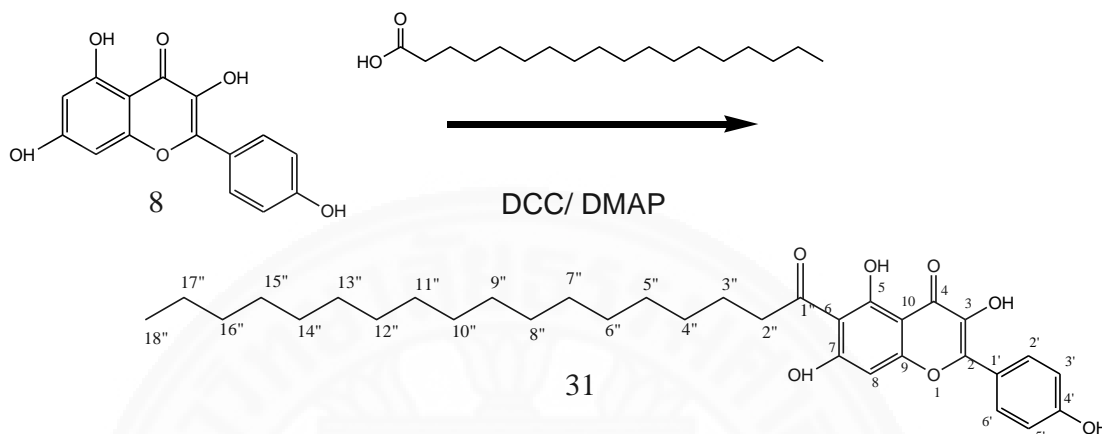
ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของ 6-โอะเลอิก เคมเฟอร์อล (30) ในคลอโรฟอร์ม- d_3 (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
8"	2.30 (m, 2H)	27.15
9"	5.35 (m, 1H)	130.00
10"	5.35 (m, 1H)	130.00
11"	2.30 (m, 2H)	27.16
12"	1.70 (m, 2H)	30.96
13"	1.70 (m, 2H)	29.69
14"	1.70 (m, 2H)	29.65
15"	1.70 (m, 2H)	29.23
16"	1.70 (m, 2H)	31.81
17"	1.70 (m, 2H)	22.55
18"	0.90 (t, $J = 6.04$, 3H)	13.90

4.4.3 เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (Kaempferol-6-steric acid) (31)

การสังเคราะห์เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยนำสเตอริก เอซิด (23.4 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ลงไปในปฏิกิริยา ตั้งปฏิกิริยาโดยคืนที่ไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่จะได้ผลิตภัณฑ์คือ

เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (**31**) (1.9 มิลลิกรัม, 21%) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.60 โดยเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



นำผลิตภัณฑ์พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (IR spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) พบค่า IR (NaCl): ν_{\max} 3348.35, 2922.55, 2849.65, 1656.35, 1221.96 cm^{-1} จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) พบสัญญาณของกรดสเตียริกที่ δ 0.9 (t, $J = 7.20$, H-18''), 1.1-1.4 (m, H-4'' - 17''), 2.0 (tt, $J = 7.50$, H-3'') และ 2.3 (t, $J = 7.50$, H-2'') และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 6.65 (d, $J = 2.05$, H-8), 7.25 (d, $J = 9.04$, H-3', 5') และ 8.20 (d, $J = 9.04$, H-2', 6') ดังสรุปในตาราง 4.13 และจาก MS (ESI) สเปกตรัม พบ molecular ion ที่ m/z 554.60 [M + H] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_7$: 552.71))

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับสเตียริก เอซิด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์คือ เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (**31**) โดยสังเกตตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของสเตียริก เอซิด จากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy)

ตารางที่ 4.13

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31) ในคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	141.70
3	-	129.00
4	-	173.00
5	-	156.00
6	-	108.00
7	-	157.00
8	6.65 (d, $J = 2.05$, 1H)	106.51
9	-	143.00
10	-	128.00
1'	-	129.00
2', 6'	8.20 (d, $J = 9.04$, 2H)	129.00
3', 5'	7.25 (d, $J = 9.04$, 2H)	128.00
4'	-	154.00
1''	-	156.87
2''	2.30 (t, $J = 7.50$, 2H)	34.11
3''	2.00 (tt, $J = 7.50$, 2H)	24.69
4''	1.10-1.40 (m, 2H)	29.13
5''	1.10-1.40 (m, 2H)	29.31
6''	1.10-1.40 (m, 2H)	29.65
7''	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
8''	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
9''	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97

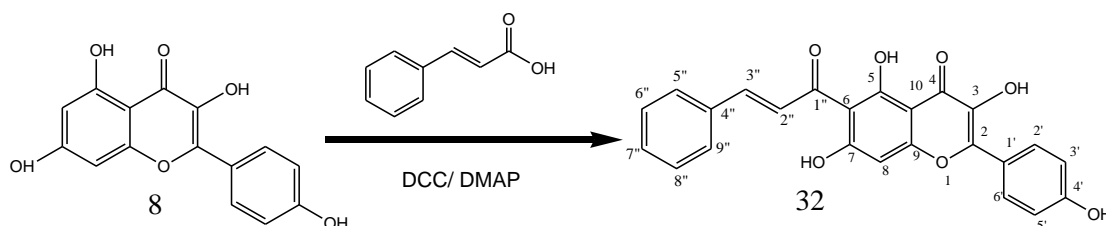
ตารางที่ 4.13 (ต่อ)

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของ เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (**31**) ในคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
10"	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
11"	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
12"	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
13"	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
14"	1.10-1.40 (m, 2H)	30.97
15"	1.10-1.40 (m, 2H)	29.43
16"	1.10-1.40 (m, 2H)	32.78
17"	1.10-1.40 (m, 2H)	22.64
18"	0.90 (t, $J = 7.20$, 3H)	14.02

4.4.4 เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (Kaempferol-6-cinnamic acid) (**32**)

การสังเคราะห์เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยนำซินนามิก เอซิด (12.2 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไดไฮโดรคลอริกซัลฟิวริก (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเคมเฟอร์อล (**8**) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ลงไปในปฏิกิริยา ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (**32**) (2.05 มิลลิกรัม, 30%) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.57 โดยเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



นำผลิตภัณฑ์พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (IR spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) พบค่า IR (NaCl): ν_{\max} 3770.30, 3456.58, 3256.44, 3064.42, 2929.87, 1708.83, 1647.48, 1598.61, 1450.20, 1230.73, 763.33 cm^{-1} จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) พบสัญญาณของกรดซินนามิกที่ δ 6.8 (d, $J = 15.00$, H-2''), 7.2 – 7.4 (m, H-3'', 6'', 7'', 8''), 7.5 (d, $J = 15.00$, H-5'', 9'') และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 6.8 (d, $J = 2.05$, H-8), 7.2 (d, $J = 9.04$, H-3', 5') และ 7.8 (d, $J = 9.04$, H-2', 6') ดังสรุปในตาราง 4.14 และจาก MS (ESI) สเปกตรัม พบ molecular ion ที่ m/z 416.25 [M], 435.90 [M+ NH_4], 440.60 [M+Na], 449.55 [M+ $\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}$], 500.50 [M+IsoProp+Na+H] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_7$: 416.38))

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อลกับซินนามิก เอซิด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์คือ เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (32) โดยสังเกตตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของซินนามิก เอซิด จากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy)

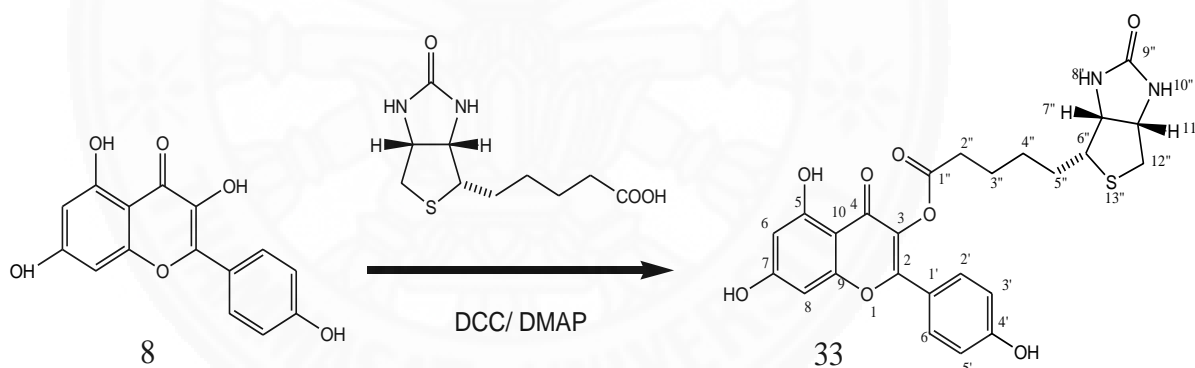
ตารางที่ 4.14

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32) ในคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	143.39
3	-	127.92
4	-	172.00
5	-	156.00
6	-	123.76
7	-	157.00
8	6.80 (d, $J = 2.05$, 1H)	119.77
9	-	143.48
10	-	128.00
1'	-	127.88
2'	7.80 (d, $J = 9.04$, 2H)	129.95
3'	7.20 (d, $J = 9.04$, 2H)	128.86
4'	-	154.00
5'	7.20 (d, $J = 9.04$, 2H)	128.86
6'	7.80 (d, $J = 9.04$, 2H)	129.95
1''	-	167.07
2''	6.80 (d, $J = 15.00$, 1H)	119.62
3''	7.20-7.40 (m, 1H)	154.11
4''	-	134.93
5''	7.50 (d, $J = 15.00$, 1H)	128.55
6''	7.20-7.40 (m, 1H)	128.90
7''	7.20-7.40 (m, 1H)	130.04
8''	7.20-7.40 (m, 1H)	128.90
9''	7.50 (d, $J = 15.00$, 1H)	128.55

4.4.5 เคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (Kaempferol-3-biotin) (33)

การสังเคราะห์เคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยนำไบโอติน (20.1 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) ทำการกระตุ้น (activate) กับไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมด์ (16.9229 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน (10.0223 มิลลิกรัม, 0.08215 มิลลิโมล, 5 สมมูล (equivalent)) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ลงไปในปฏิกิริยา ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ตลอดคืน (overnight) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จะได้เป็นผลิตภัณฑ์คือเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) (33) (2.18 มิลลิกรัม, 26%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.63 โดยเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



นำผลิตภัณฑ์พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (IR spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) พบค่า IR (NaCl): ν_{\max} 2924.36, 2845.93, 1689.51 cm^{-1} จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) พบสัญญาณของไบโอติน ที่ δ 1.0 – 2.0 (m, H-3'', H-4'', H-5''), 2.4 (t, J = 7.30, H-2''), 2.7 (d, J = 12.30, H-12''), 2.9 (dd, J = 13.20, 4.80, H-12''), 3.4 (m, H-6''), 4.3 (m, H-7''), 4.5 (m, H-11'') และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 5.3 (d, J = 2.05, H-6), 5.9 (d, J = 2.05, H-8), 6.8 (d, J = 9.04,

H-3',5') และ 8.2 (d, $J = 9.04$, H-2', 6') ดังสรุปในตาราง 4.15 และจาก MS (ESI) สเปกตรัม พบ molecular ion ที่ m/z 512.60 [M], 537.40 [M+Na], 559.65 [M+2Na-H], 579.6 [M+ACN+Na], 595.45 [M+2ACN+H] (แมสที่คำนวณของสาร (calculated for $C_{25}H_{25}O_8N_2S$: 512.54))

จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอรอลกับไบโอทิน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์คือ เคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (**33**) โดยสังเกตตำแหน่งการเข้าทำปฏิกิริยาของไบโอทิน จากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy)

ตารางที่ 4.15

ข้อมูล 1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (**33**) ในคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$)

ตำแหน่ง	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	-	154.25
3	-	132.00
4	-	173.01
5	-	161.85
6	5.3 (d, $J = 2.05$, 1H)	108.00
7	-	163.45
8	5.9 (d, $J = 2.05$, 1H)	106.71
9	-	156.68
10	-	128.00
1'	-	131.00
2'	8.2 (d, $J = 9.04$, 2H)	142.77
3'	6.8 (d, $J = 9.04$, 2H)	128.00
4'	-	157.01
5'	6.8 (d, $J = 9.04$, 2H)	128.00
6'	8.2 (d, $J = 9.04$, 2H)	142.77
1''	-	177.00
2''	2.4 (t, $J = 7.30$, 2H)	33.30

ตารางที่ 4.15 (ต่อ)

ข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของเคมเฟอร์อล-3-ไบโอทิน (33) ในคลอโรฟอร์ม-ดี (CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
3"	1.0-2.0 (m, 2H)	24.75
4"	1.0-2.0 (m, 2H)	27.29
5"	1.0-2.0 (m, 2H)	28.26
6"	3.4 (m, 1H)	55.18
7"	4.3 (m, 1H)	60.37
8"	-	-
9"	-	172.52
10"	-	-
11"	4.5 (m, 1H)	58.55
12"	2.7 (d, $J = 12.30$, 2H) 2.9 (dd, $J = 13.20, 4.80$, 2H)	39.72
13"	-	-

4.4.6 อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับ อะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) (34)

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาโดยเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต (10.2 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) ทำการคนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ (7.5 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต: เฮกเซน

(4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) พบว่าจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) พบสัญญาณของอะซีทิล (acetyl group) ที่ δ 1.65 (s) และ 2.10 (s) และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 5.70 (d, $J = 2.05$), 5.90 (d, $J = 2.05$), 6.80 (d, $J = 9.04$) และ 7.80 (d, $J = 9.04$) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.51 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์น้อยมากจึงไม่สามารถนำไปศึกษาในการแยกสารให้บริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย

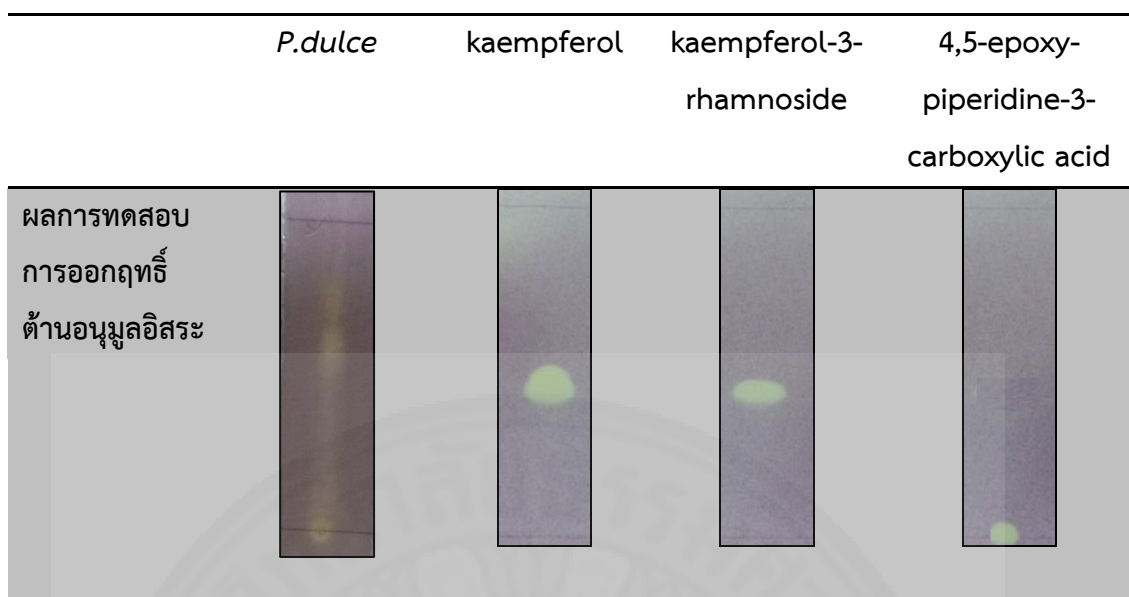
4.4.7 อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับ โพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (propionic anhydride) (35)

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือเคมเฟอร์อล (8) (5 มิลลิกรัม, 0.01643 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต (10.2 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) ทำการคนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (9.6 มิลลิกรัม, 0.0739 มิลลิโมล, 4.5 สมมูล (equivalent)) ตั้งปฏิกิริยาโดยคนทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้ เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20) เป็นวัฏภาคคงที่ และ 50% เมทานอล/ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำผลิตภัณฑ์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต:เฮกเซน (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) พบว่าจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) พบสัญญาณของโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ที่ δ 1.9 (s) และ 2.10 (s) และสัญญาณของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ที่ δ 5.70 (d, $J = 2.05$), 6.60 (d, $J = 2.05$), 7.70 (d, $J = 9.04$) และ 8.50 (d, $J = 9.04$) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.51 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์น้อยมากจึงไม่สามารถนำไปศึกษาในการแยกสารให้บริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย

4.5 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

4.5.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

นำสารสกัดจากใบมะขามเทศและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศในส่วนของสารสกัดด้วยเมทานอล (เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) มาทดสอบบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC, TLC pre-coated silica gel 60 F254 (Merck, หนา 0.25 มิลลิเมตร)) ซึ่งใช้ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (4:6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ), เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (0.5:9.5) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับเคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) และเคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (2:8) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (สำหรับ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) นำสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) โดยซึ่ง 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้มาป้ายลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ที่ผ่านการทดสอบ วางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที สังเกตสีของสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) ที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วบันทึกผล โดย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) เป็นอนุมูลที่คงตัวในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารละลายสีม่วง โดยมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร โดยอนุมูล DPPH[•] จะทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้รับโปรตอนจากสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลือง ดังนั้นถ้าแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ที่ใช้ในการทดสอบเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองสามารถสรุปได้ว่าสารตัวอย่างนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในภาพ 4.6 จากภาพพบว่าสารตัวอย่างคือ สารสกัดหยาบใบมะขามเทศ เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) บนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) จากสีม่วงเป็นสีเหลือง



ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (*P.dulce*), เคมเฟอรอล (kaempferol (8)) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28))

4.5.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay)

จากการศึกษาการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณด้วยวิธีการทดสอบ DPPH Assay โดยเตรียมสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิด (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล เป็นสารที่ใช้ในการทดสอบ และเตรียมสารตัวอย่างคือสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในส่วนของสารสกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 250, 125, 50, 25, 10, และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล ใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิด (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในความมืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (control)

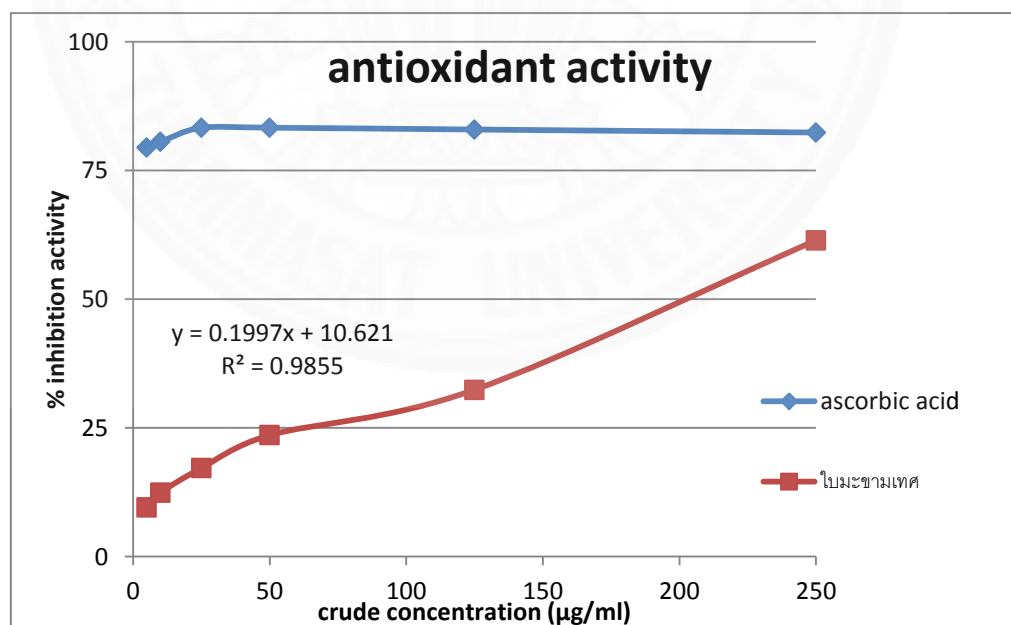
A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) เป็นสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างต้องการวัด (blank) และน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) 100 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุม (control) นำค่า ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ได้จากสมการมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารสกัด (แกน X) และ คำนวณหาค่า IC_{50} (IC_{50} คือความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของสารละลาย 2, 2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 197.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (คำนวณจากสมการ $y = 0.1997x + 10.621$ ($R^2 = 0.9855$)) และสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 4.16 และ ภาพ 4.7 จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะขามเทศมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Katekhaye และคณะ (2012) ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของ สารสกัดใบมะขามเทศในเมทานอล แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 250.32 ± 4.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.16

ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศและสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition of crude extract	% inhibition of ascorbic acid
5	9.55	79.44
10	12.40	80.56
25	17.20	83.33
50	23.60	83.33
125	32.42	82.97
250	61.43	82.39
IC ₅₀	197.19 $\mu\text{g/ml}$	< 5 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศและสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกด้วยวิธี DPPH Assay

4.6 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

4.6.1 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

การเจริญของแบคทีเรียแบ่งช่วงการเจริญเติบโตออกเป็น 4 ระยะด้วยกันคือ

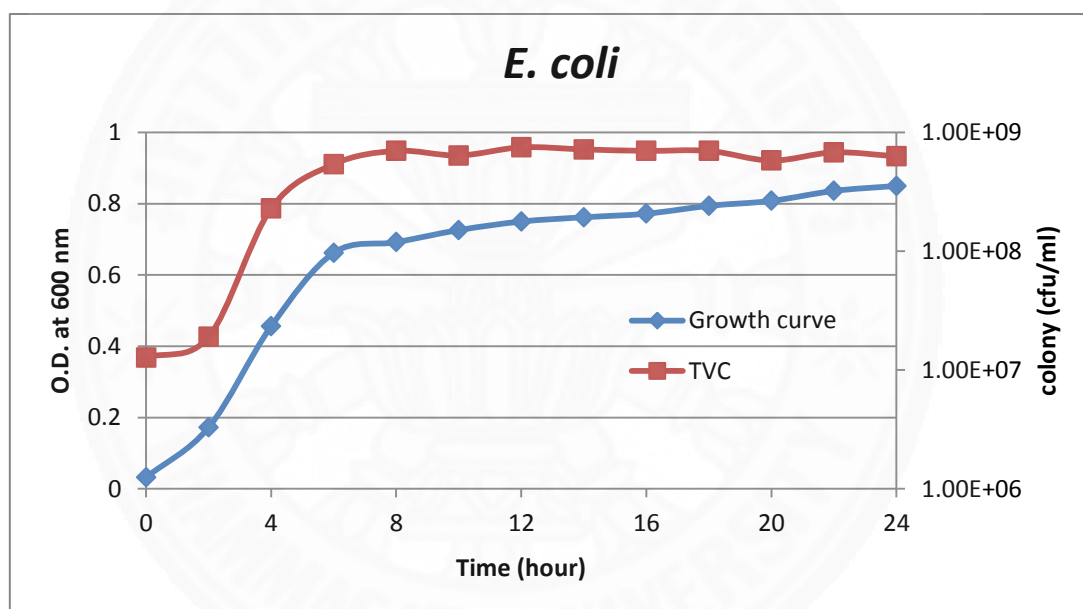
1. ระยะ lag phase เป็นระยะเริ่มต้นที่เชื้อแบคทีเรียกำลังปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จึงยังไม่มี的增加จำนวนของเชื้อแบคทีเรีย
2. ระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ (Exponential phase หรือ log phase) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่
3. ระยะที่แบคทีเรียไม่มีการเพิ่มจำนวน (Stationary phase) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก
4. ระยะที่แบคทีเรียตาย (Death phase) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและมีการตายจำนวนมากอย่างรวดเร็ว

ซึ่งการวัดการเจริญของแบคทีเรียจะศึกษาในช่วงความชันของกราฟที่ใกล้เคียงเส้นตรง (ระยะที่สอง; Exponential phase หรือ log phase) ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียได้ ทำการศึกษากับแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 379 โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างเวลา (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียคือ 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ดังแสดงในภาพ 4.8-4.11

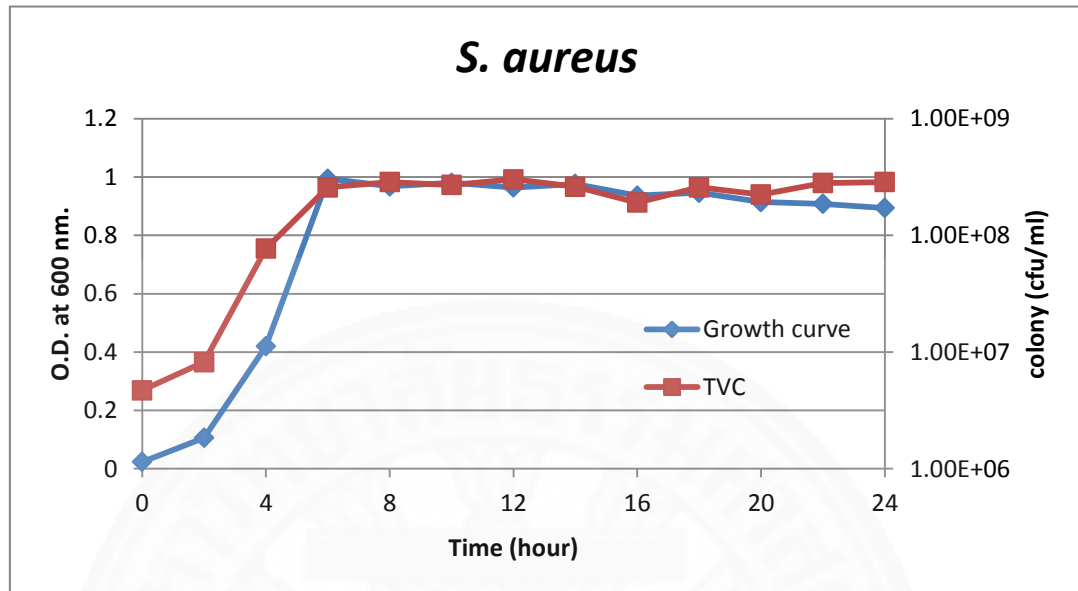
4.6.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count; TVA)

ในการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count (TVA)) ของแบคทีเรียได้ทำการศึกษากับแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 379 โดยทำการบ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบวัดการ

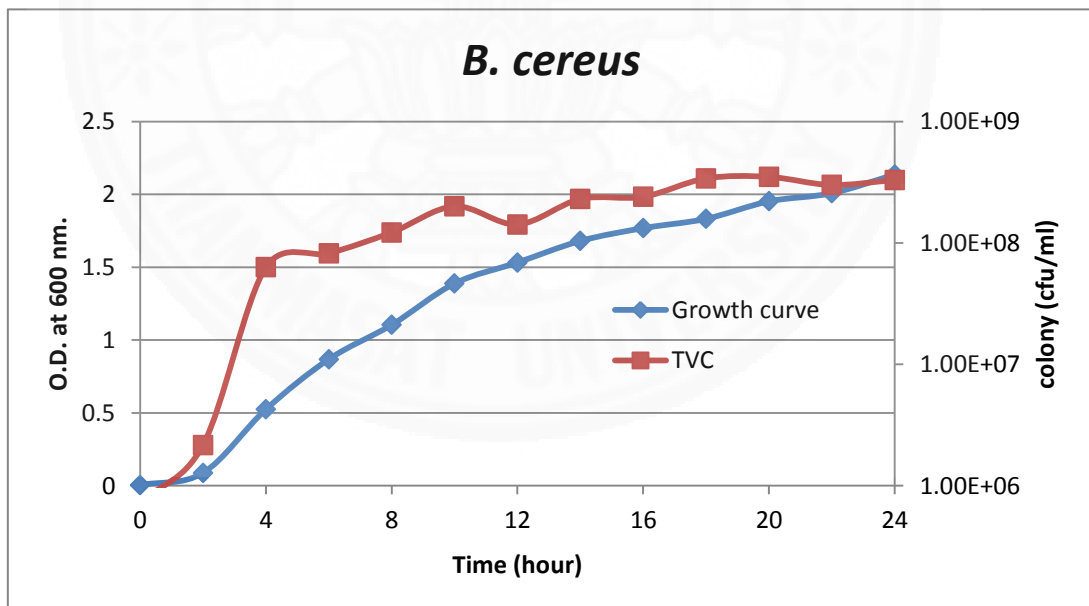
เจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการบ่มมาทำการเจือจางด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยใช้การเจือจางตามลำดับส่วนแบบเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (nutrient agar, NA) ที่ทำการเตรียมไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง (ให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะ) แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างเวลา (แกน X) กับจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (แกน Y) เพื่อดูความเข้มข้นของเชื้อที่อยู่ในช่วงเวลาที่ทำการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดตัวอย่าง ซึ่งเวลา 4 ชั่วโมง ที่ใช้ในการบ่มเชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง ดังแสดงในภาพ 4.8-4.11



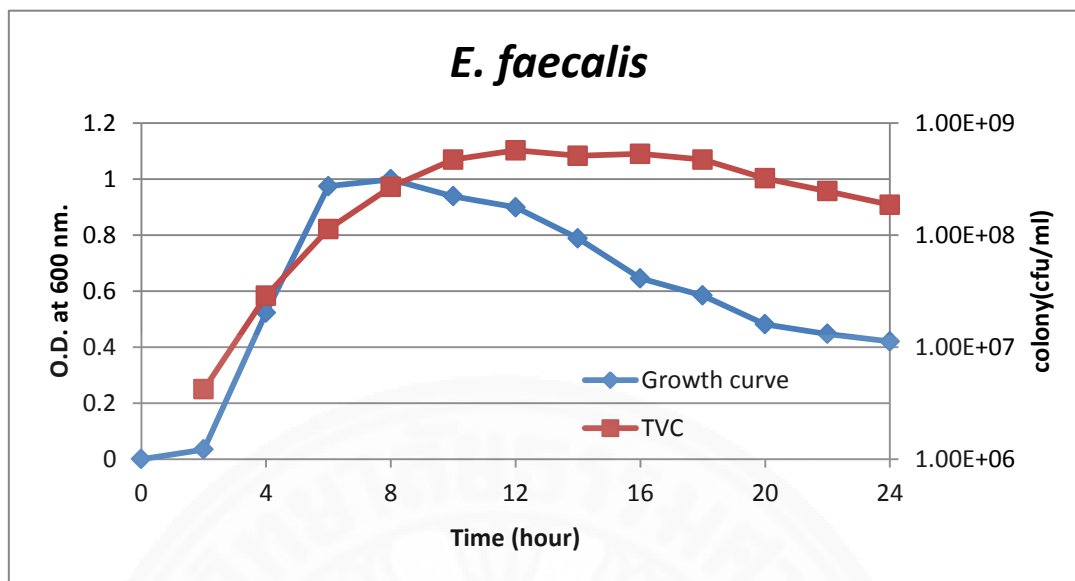
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญและการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ของ *E. coli*



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงการเจริญและการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ของแบคทีเรีย *S. aureus*

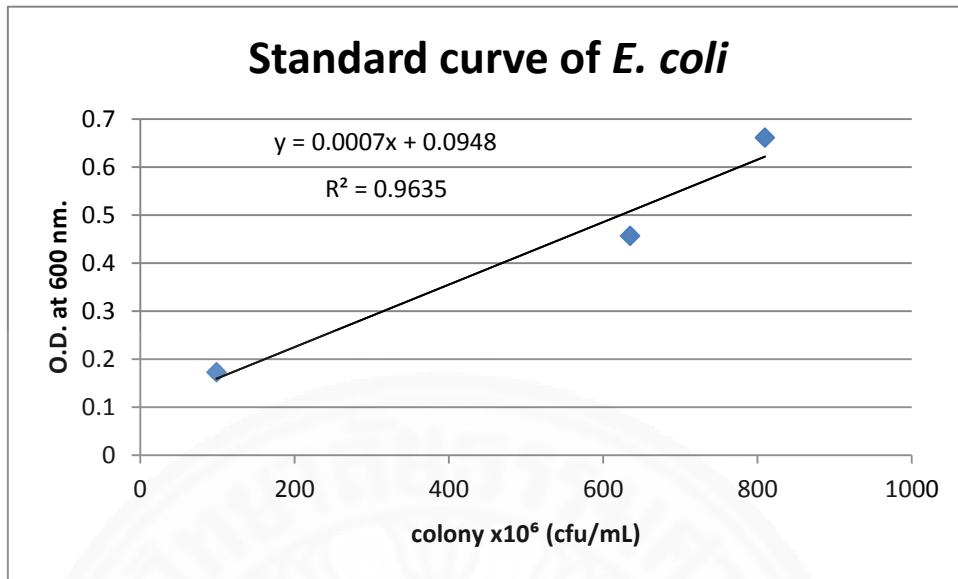


ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงการเจริญและการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ของแบคทีเรีย *B. cereus*

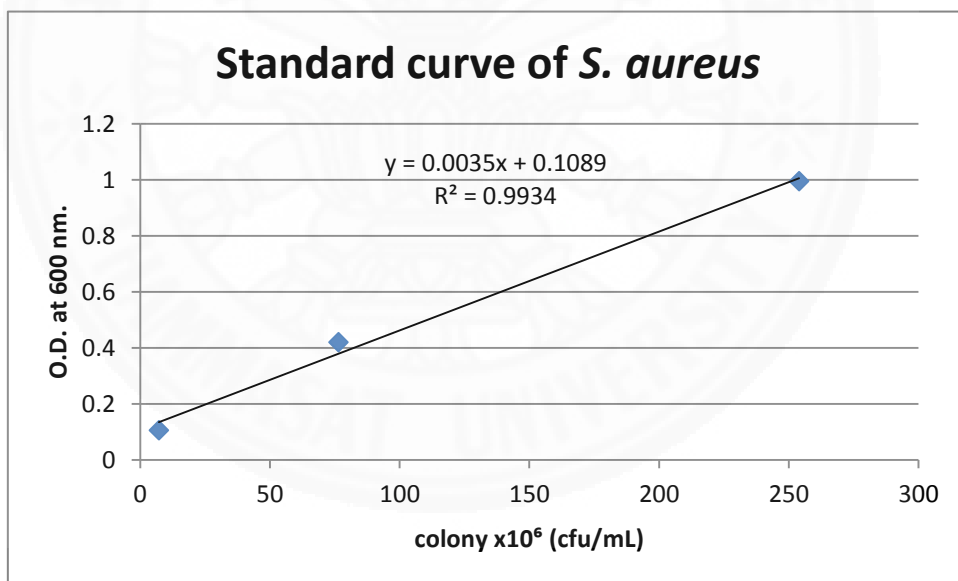


ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงการเจริญและการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ของแบคทีเรีย *E. faecalis*

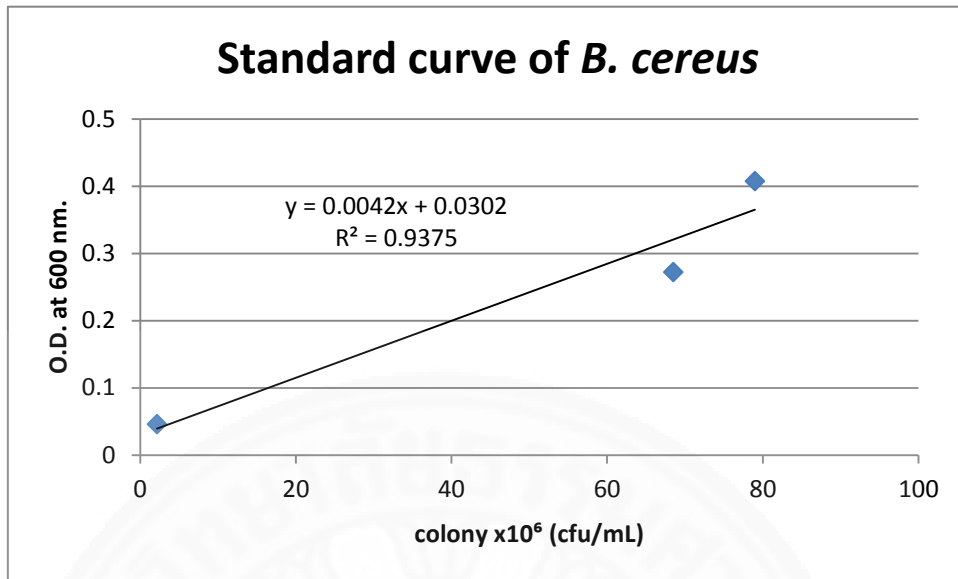
นำข้อมูลของกราฟการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย และการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count; TVA) มาสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis*) ระหว่างจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อใช้ในการคำนวณในการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง โดยเลือกข้อมูลเวลาที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตมากที่สุด (ระยะที่ 2) โดย *S. aureus*, *E. coli* และ *E. faecalis* เลือกช่วงเวลาที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต 2-6 ชั่วโมง ส่วน *B. cereus* เลือกช่วงเวลาที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต 2-4 ชั่วโมง ส่วนการสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย MRSA โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการบ่มและมีความเข้มข้นดังกล่าวมาทำการเจือจางด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ โดยใช้การเจือจางตามลำดับส่วนแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง (nutrient agar, NA) ที่ทำการเตรียมไว้ก่อนหน้านั้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง (ให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะ) นำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) ดังแสดงในภาพ 4.12 – 4.16



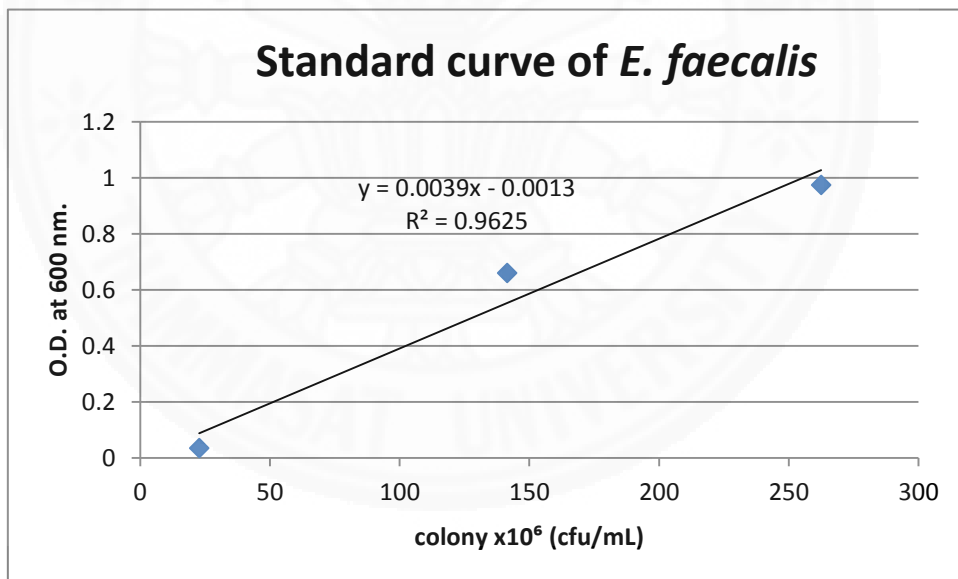
ภาพที่ 4.12 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย *Escherichia coli*



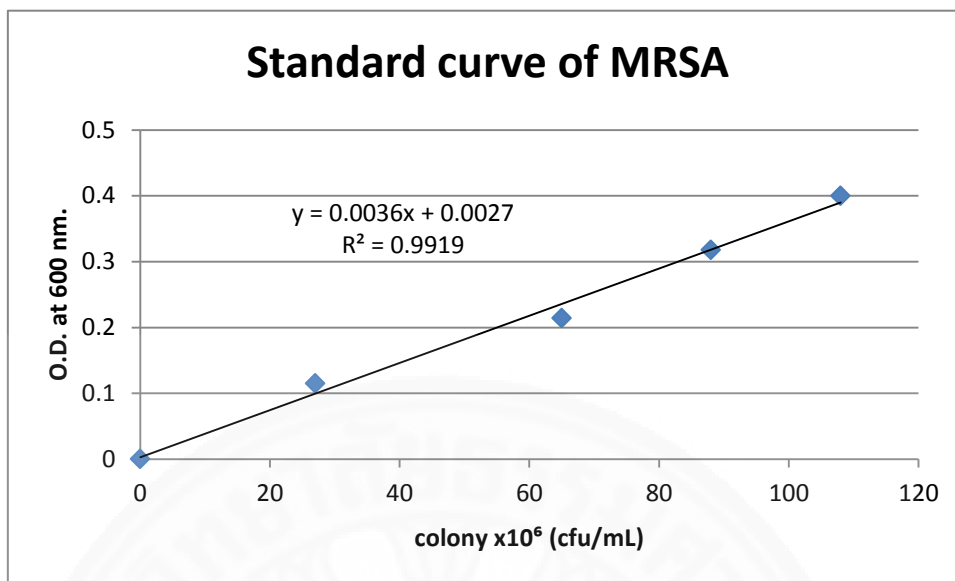
ภาพที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*



ภาพที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย *Bacillus cereus*



ภาพที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis*



ภาพที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

4.6.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง (disc diffusion method)

การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทำการศึกษากับแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ของสารตัวอย่างคือสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol) (8) เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) อนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ได้แก่ อะซีทิลเคมเฟอร์อล (acetyl kaempferol) (29) อนุพันธ์กับลิปิดและไบโอทีน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (32) เคมเฟอร์อล-3-ไบโอทีน (kaempferol-3-biotin)) (33) โดยวิธี disc diffusion method

ทำการเตรียมสารตัวอย่างโดยสารสกัดหยาบใบมะขามเทศและ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) เตรียม 4 ความเข้มข้น (50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคม

เฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7))) เตรียมความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

อนุพันธ์ของเคมเฟอรอล (kaempferol) ได้แก่อะซีทิลเคมเฟอรอล (acetyl kaempferol) (29) ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร และอนุพันธ์ของเคมเฟอรอล (kaempferol) กับลิปิดและไบโอติน (เคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (32) เคมเฟอรอล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) (33)) เตรียมที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านจุลชีพ แล้วใส่ในงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมเติมเชื้อแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้อีก หลังจากนำแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านจุลชีพใส่ในงานเพาะเลี้ยงเชื้อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เซฟาเล็กซิน (Cephalexin; 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) อ่านผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านจุลชีพในหน่วยมิลลิเมตร

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่างได้ศึกษาหาความเข้มข้นของตัวควบคุมผลบวกเซฟาเล็กซิน (Cephalexin) ที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับตัวควบคุมผลบวกที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าตัวควบคุมผลบวกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 34.00 มิลลิเมตร (ภาพ 4.17 (A)) และมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis* โดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 32.30, 22.33 และ 20.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.17 (B, C, D)) ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวควบคุมผลบวกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis* ตามลำดับ โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 33.00, 31.33, 22.33 และ 18.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.17 (A, B, C, D)) ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวควบคุมผลบวกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. faecalis* ตามลำดับ โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 33.00, 32.00, 20.67 และ 18.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.17 (A, B, C, D)) และที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวควบคุมผลบวกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E.*

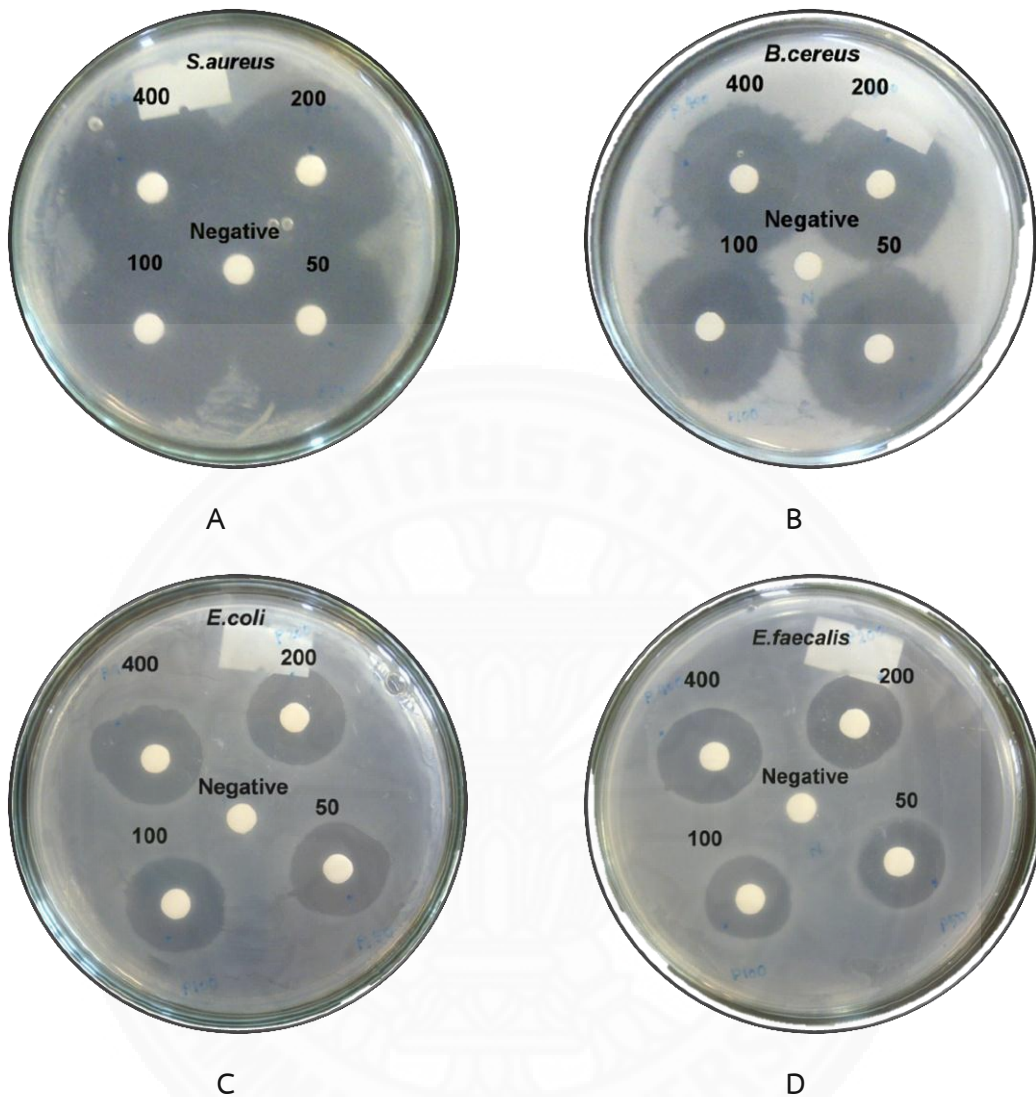
faecalis ตามลำดับ โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 30.00, 30.00, 20.50 และ 16.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.17 (A, B, C, D)) นอกจากนั้นทดสอบกับเชื้อ MRSA ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งโดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 34.50 มิลลิเมตร จากผลการทดลองผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของตัวควบคุมผลบวก (Cephalexin) ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง ข้อมูลสรุปดังตาราง 4.17

ตารางที่ 4.17

ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับตัวควบคุมผลบวกเซฟาเลกซิน (disc diffusion method)

แบคทีเรีย	แกรม	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ที่ความเข้มข้นของตัวควบคุมผลบวกในระดับต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		50	100	200	400
<i>Escherichia coli</i>	-	20.50	20.67	22.33	22.33
<i>Bacillus cereus</i>	+	30.00	32.00	31.33	32.30
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	16.00	18.67	18.67	20.67
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	30.00	33.00	33.00	34.00
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	34.50	-	-	-

N = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ discs (6.0 มิลลิเมตร)



ภาพ 4.17 (A-D) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (A), *B. cereus* (B), *E. coli* (C) และ *E. faecalis* (D) กับตัวควบคุมผลบวกเซฟาเลกซิน (Cephalexin) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

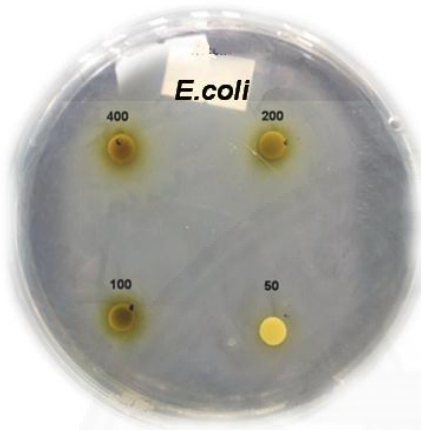
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดในโดสที่ทดสอบ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ

12.2 มิลลิเมตร (ภาพ 4.18 (D)) รองลงมาคือ MRSA มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.18 (E)) และผลการยับยั้ง *E. coli*, *B. cereus* และ *E. faecalis* แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.18 (A, B, C)) นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* และ MRSA โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.18 (A, E)) และที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบใบมะขามเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.18 (A)) ดังสรุปข้อมูลในตาราง 4.18 ตารางที่ 4.18

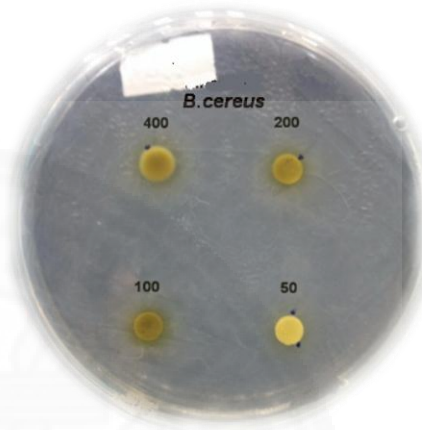
ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (disc diffusion method)

แบคทีเรีย	แกรม	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ที่ ความเข้มข้นของสารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอลในระดับต่างๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		50	100	200	400
<i>Escherichia coli</i>	-	N	7.0	7.0	7.0
<i>Bacillus cereus</i>	+	N	N	N	7.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	N	N	N	7.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	N	N	N	12.2
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	N	N	7.0	8.0

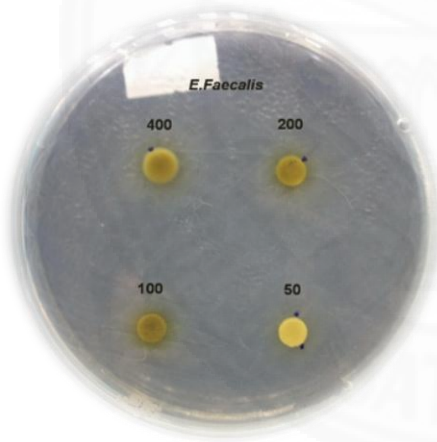
N = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ discs (6.0 มิลลิเมตร)



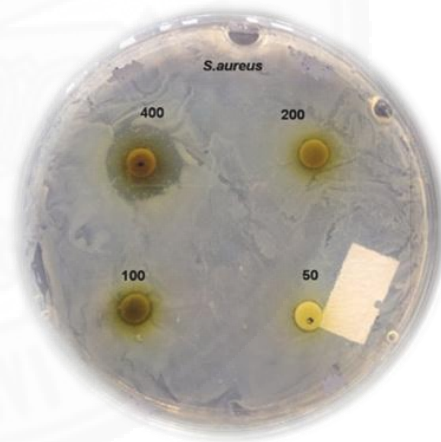
A



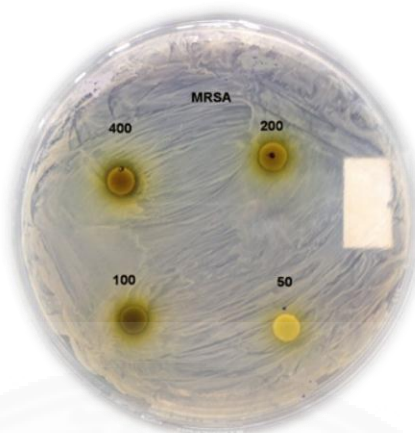
B



C



D



E

ภาพที่ 4.18 (A-E) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *E. faecalis* (C), *S. aureus* (D) และ MRSA (E) กับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ คือเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) เคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) โดยจากการทดลองได้นำสารบริสุทธิ์คือเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 และ 0.12 โมลาร์ ตามลำดับ) มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.3 มิลลิเมตร (ภาพ 4.19 (C)) รองลงมาสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli* และ MRSA โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 9.0, 8.0 และ 7.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.19 (B, A, D)) โดยทั้งสารเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. faecalis* จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) พบว่าสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.19 (G)) รองลงมาสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli* และ MRSA ได้เท่ากันโดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร (ภาพ 4.19 (F, E, H)) ดังสรุปข้อมูลในตาราง 4.19 จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์เคมเฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์

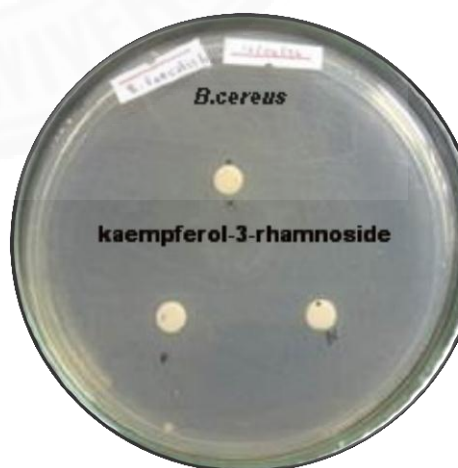
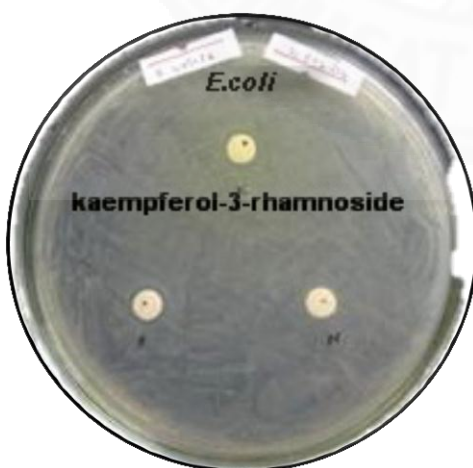
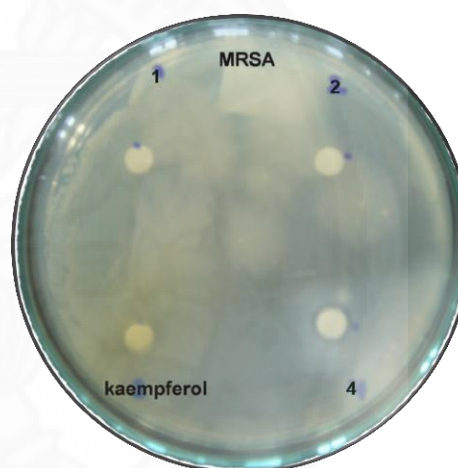
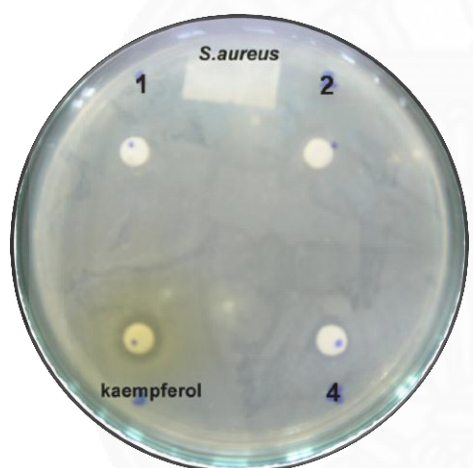
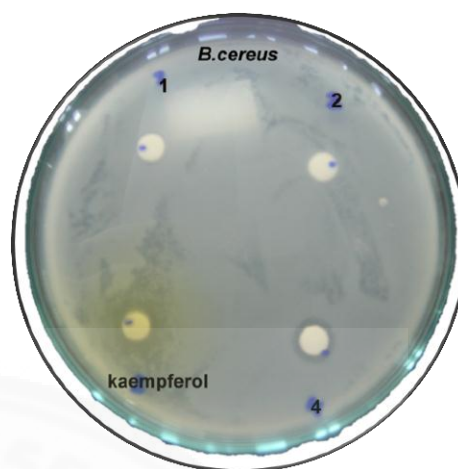
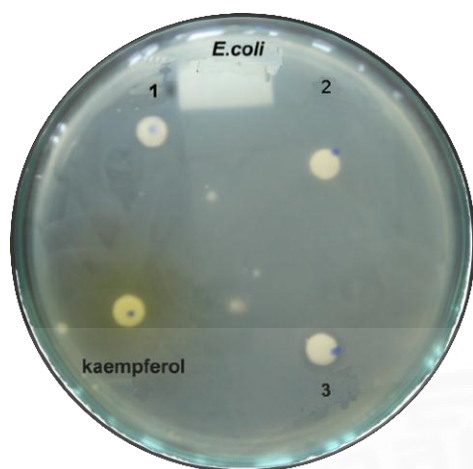
(kaempferol-3-rhamnoside (7)) ให้ผลฤทธิ์การยับยั้งดีทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ จากผลการทดลองนี้จึงเป็นแนวคิดในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธ์เคมเฟอรอล (kaempferol) โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่วนสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) เตรียม 4 ความเข้มข้น (50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือเทียบเท่ากับ 0.35, 0.70, 1.40 และ 2.80 โมลาร์ ตามลำดับ) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (2.80 โมลาร์) สารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.20 (A)) รองลงมาคือ MRSA มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร (ภาพ 4.20 (B)) แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli*, *B. cereus* และ *E. faecalis* นอกจากนั้นที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.40 โมลาร์) พบว่าสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* และ MRSA โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร และ 6.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 4.20 (A, B)) ที่ความเข้มข้นในระดับต่ำกว่าคือ 100 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.70 และ 0.35 โมลาร์) ตามลำดับ พบว่าสารไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ดังสรุปข้อมูลในตาราง 4.20 และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของตัวควบคุมผลบวก (เซฟาเลกซิน (Cephaexin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับแบคทีเรีย *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *B. cereus* และ *E. faecalis* ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) พบว่าตัวควบคุมผลบวก (เซฟาเลกซิน) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 37.0, 25.5, 23.0, 29.0 และ 22.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

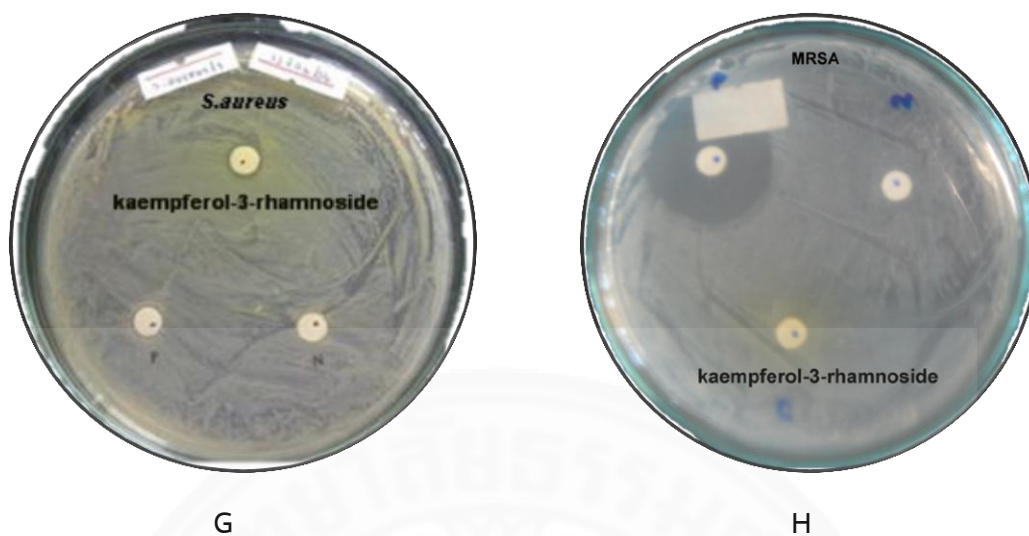
ตารางที่ 4.19

ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (8), เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7)) โดยวิธี disc diffusion method

แบคทีเรีย	แกรม	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารบริสุทธิ์	
		Kaempferol (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.17 โมลาร์)	Kaempferol-3- rhamnoside (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.12 โมลาร์)
<i>Escherichia coli</i>	-	8.0	6.5
<i>Bacillus cereus</i>	+	9.0	6.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	9.3	7.0
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	7.7	6.5

N = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ discs (6.0 มิลลิเมตร)





A (1), B (1), C (1), D (1) คือเคมเฟอรอล-3, 6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3, 6-diacetate) (29)

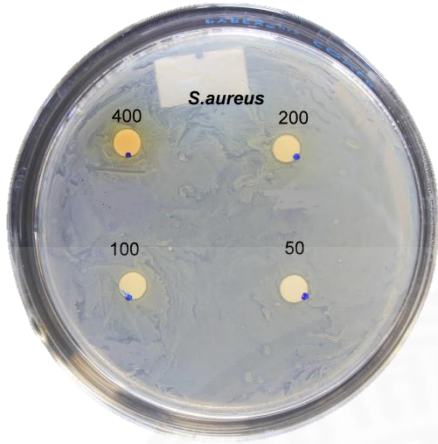
ภาพที่ 4.19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ MRSA (D) ของสารบริสุทธิ์เคมเฟอรอล (kaempferol (8)) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 โมลาร์) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (E), *B. cereus* (F), *S. aureus* (G) และ MRSA (H) ของสารบริสุทธิ์เคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.12 โมลาร์)

ตารางที่ 4.20

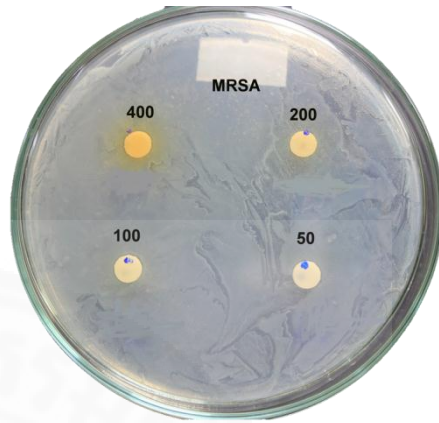
ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)) โดยวิธี disc diffusion method

แบคทีเรีย	แกรม	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ที่ ความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่างๆ			
		50 mg/ml (0.35 M)	100 mg/mL (0.70 M)	200 mg/mL (1.40 M)	400 mg/mL (2.80 M)
<i>Escherichia coli</i>	-	N	N	N	N
<i>Bacillus cereus</i>	+	N	N	N	N
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	N	N	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	N	N	7.0	7.0
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	N	N	6.5	6.5

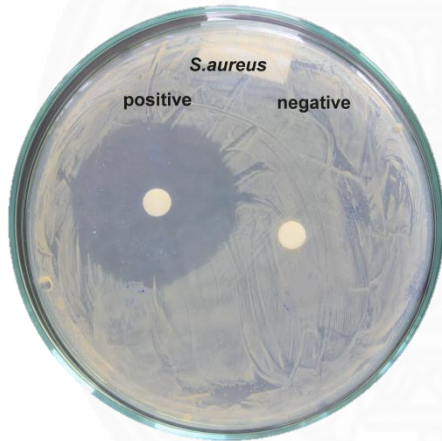
N = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ discs (6.0 มิลลิเมตร)



A



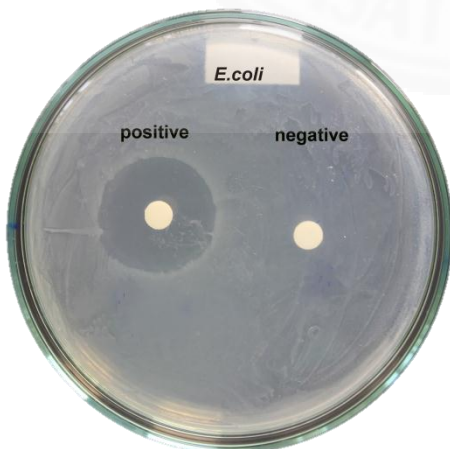
B



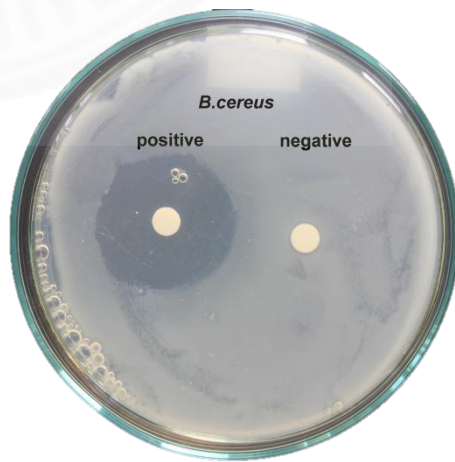
C



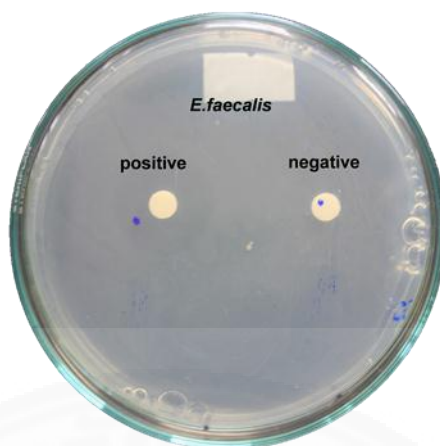
D



E



F



G

ภาพที่ 4.20 (A-G) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (A) และ MRSA (B) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid **(28)**) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.35, 0.70, 1.40 และ 2.80 โมลาร์) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของตัวควบคุมผลบวก (เซฟาเล็กซิน (Cephaexin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับแบคทีเรีย *S. aureus* (C), MRSA (D), *E. coli* (E), *B. cereus* (F) และ *E. faecalis* (G)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol)) อาทิ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (kaempferol-3,6-diacetate) **(29)** และอนุพันธ์กับลิปิดและไบโอติน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) **(30)** เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) **(31)** เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) **(32)** เคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) **(33)**) โดยเตรียมความเข้มข้นของอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ได้แก่ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (kaempferol-3,6-diacetate) **(29)** ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) และอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) กับลิปิดและไบโอติน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) **(30)** เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) **(31)** เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) **(32)** เคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) **(33)**) เตรียมที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05, 0.05, 0.06 และ 0.05 โมลาร์ ตามลำดับ) พบว่าเคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (kaempferol-3,6-diacetate)

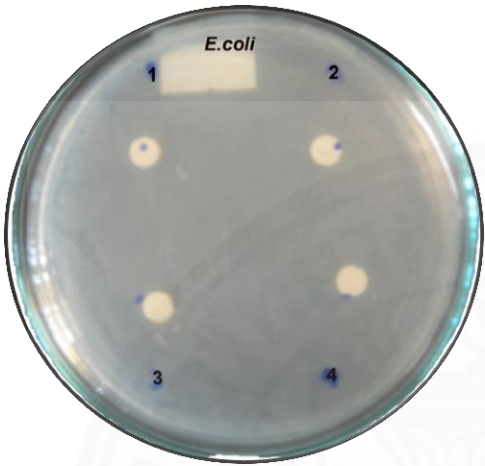
(29) ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ได้เท่ากันซึ่งแสดงให้เห็นจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.21 (B1, C1)) อนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) กับลิปิดและไบโอติน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) และเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) (33)) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05, 0.05, 0.06 และ 0.05 โมลาร์ ตามลำดับ) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดเดียวกันซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* ยกเว้นสารเคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (32) ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทุกชนิด โดยฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียสังเกตได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (ภาพ 4.21 (A1-A4)) ดังสรุปในตาราง 4.21

ตารางที่ 4.21

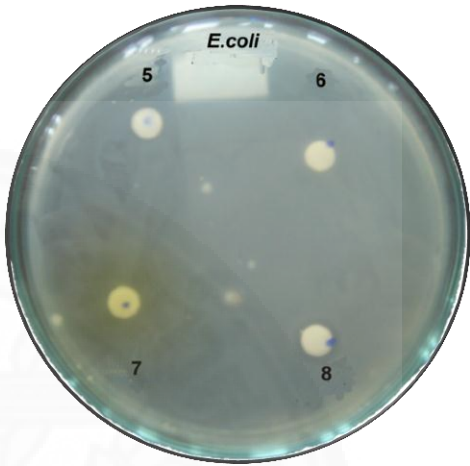
ตารางแสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (disc diffusion method)

แบคทีเรีย	แกรม	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์				
		Kaempferol-3, 6-diacetate (12.5 mg/mL; 0.03 M)	Kaempferol-6-oleic acid (25 mg/mL; 0.05 M)	Kaempferol-6-steric acid (25 mg/mL; 0.05 M)	Kaempferol-6-cinnamic acid (25 mg/mL; 0.06 M)	Kaempferol-3-biotin (25 mg/mL; 0.05 M)
<i>Escherichia coli</i>	-	N	7.0	7.0	N	7.0
<i>Bacillus cereus</i>	+	7.0	N	N	N	N
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	N	N	N	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	7.0	N	N	N	N
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+	N	N	N	N	N

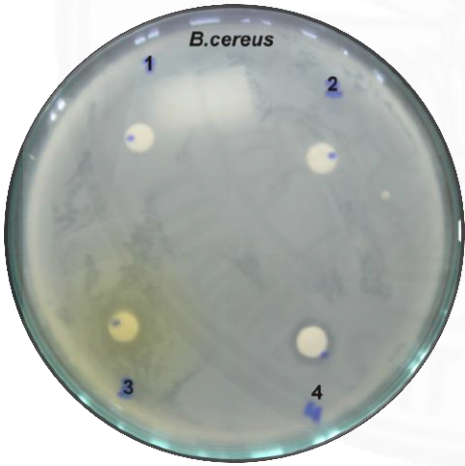
N = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ discs (6 มิลลิเมตร)



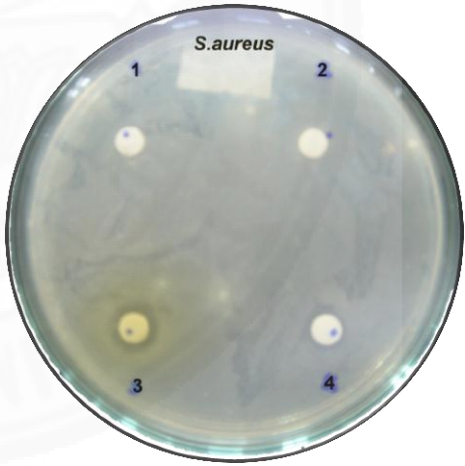
A



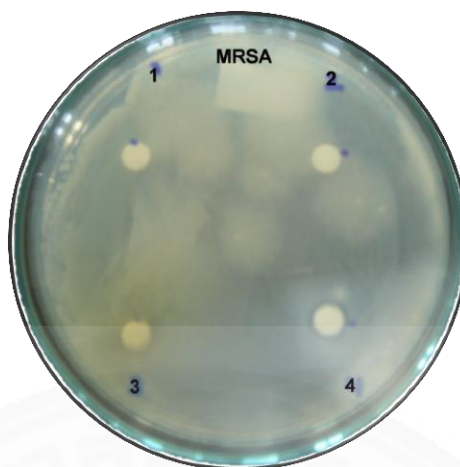
A



B



C



D

A (1) คือ เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30)

A (2) คือ เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31)

A (3) คือ เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) (32)

A (4) คือ เคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) (33)

A (5), B (1), C (1), D (1) คือ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29)

A (7), B (3), C (3), D (3) คือ เคมเฟอร์อล (kaempferol) (8)

ภาพที่ 4.21 (A-D) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ MRSA (D) ของอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ

4.6.4 การทดสอบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (MIC method)

การทดสอบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC method) ได้ทำการศึกษากับแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 กับสารตัวอย่างคือสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol) (8) เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์

(kaempferol-3-rhamnoside) (7) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid) (28) อนุพันธ์ของเคมเฟอรอล (kaempferol) ได้แก่ เคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) และอนุพันธ์กับลิปิดและไบโอทีน (เคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอรอล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอรอล-3-ไบโอทีน (kaempferol-3-biotin) (33) โดยวิธี MIC method

ในการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method) กับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดคือ *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* และ MRSA โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.22D) รองลงมาสารตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA โดยจากการทดลองให้ค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.22E) ถัดมาสารตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.22B) นอกจากนั้นสารตัวอย่างยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* และ *E. faecalis* โดยแสดงค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.22A, C) ดังแสดงในตาราง 4.22

การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method) กับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศทั้ง 3 ชนิดคือ เคมเฟอรอล (kaempferol (8)) เคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) โดยเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) และเคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) เตรียมความเข้มข้นของสารเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 และ 0.12 โมลาร์ ตามลำดับ) และสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) เตรียมความเข้มข้นของสารเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.38 โมลาร์) ซึ่งอ้างอิงการเตรียมความเข้มข้นของสารจากข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (disc diffusion method) โดยจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกับสารเคมเฟอรอล (kaempferol (8)) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบยกเว้น *E. faecalis* โดยจากการศึกษาสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุดซึ่งแสดงจากค่า MIC และ MBC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) (ภาพ 4.23(B1)) รองลงมาสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับที่สารแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์)

แต่แสดงค่า MBC ที่แตกต่างกันคือมากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) (ภาพ 4.23(C1)) ถัดมาสารตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.04 โมลาร์) และค่า MBC มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) (ภาพ 4.23(D1)) สุกท้ายสารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 โมลาร์) และค่า MBC มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) (ภาพ 4.23(A1))

นอกจากนั้นมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ตัวที่สองคือเคมเพอรอล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (**7**)) พบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ MRSA ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) และมากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) ตามลำดับ (ภาพ 4.23(C2, D2)) และสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.06 โมลาร์) และ MBC คือมากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) (ภาพ 4.23(B2)) สุกท้ายสารมีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* น้อยที่สุดโดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.12 โมลาร์) และค่า MBC คือมากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) (ภาพ 4.23(A2))

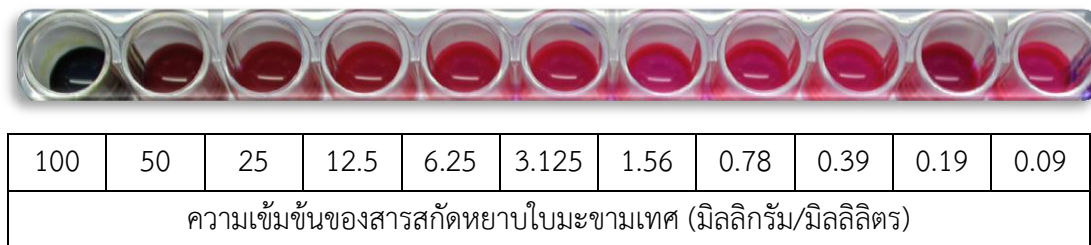
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (**28**)) พบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ MRSA โดยให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน โดยแสดงค่า MIC, MBC คือ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.39 โมลาร์) และมากกว่า 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 1.39 โมลาร์) ตามลำดับ (ภาพ 4.23(C3, D3)) ดังแสดงในตาราง 4.22

ตารางที่ 4.22

ตารางแสดงค่า MIC และ MBC ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (*P.dulce*) และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ

Strains	Sample	<i>P.dulce</i>		Kaempferol		Kaempferol-3-rhamnoside		4, 5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid	
		(mg/mL) MIC	(mg/mL) MBC	(mg/mL) MIC	(mg/mL) MBC	(mg/mL) MIC	(mg/mL) MBC	(mg/mL) MIC	(mg/mL) MBC
<i>B. cereus</i>		50	100	6.25 (0.02M)	6.25 (0.02M)	25 (0.06M)	>50 (>0.12M)	-	-
<i>S. aureus</i>		12.5	100	6.25 (0.02M)	>50 (>0.17M)	12.5 (0.03M)	>50 (>0.12M)	200 (1.39M)	>200 (>1.39M)
<i>E. coli</i>		100	100	50 (0.17M)	>50 (>0.17M)	50 (0.12M)	>50 (>0.12M)	-	-
<i>E. faecalis</i>		100	100	-	-	-	-	-	-
MRSA		25	100	12.5 (0.04M)	>50 (>0.17M)	12.5 (0.03M)	>50 (>0.12M)	200 (1.39M)	>200 (>1.39M)

(A)



(1)



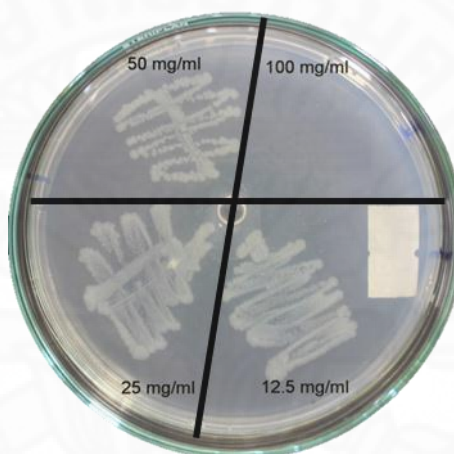
(2)

ภาพที่ 4.22 (A) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาดใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาดใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาดใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B)



(1)



(2)

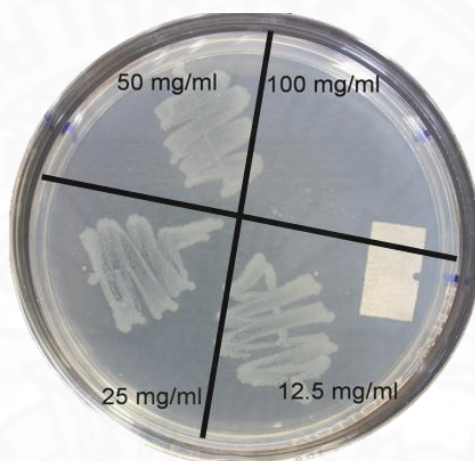
ภาพที่ 4.22 (B) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C)



100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										

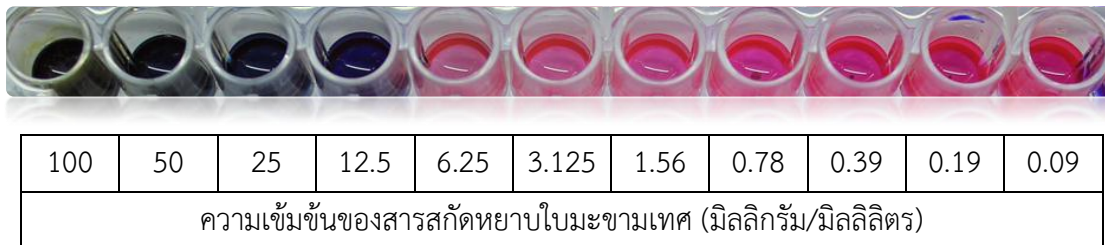
(1)



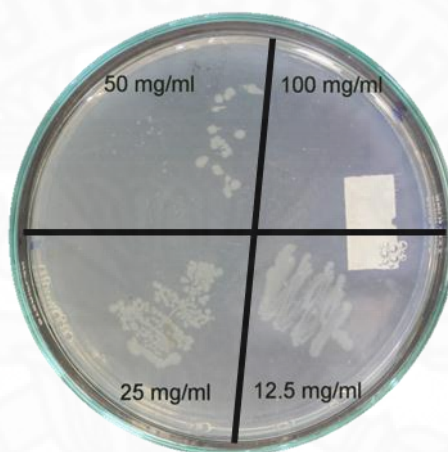
(2)

ภาพที่ 4.22 (C) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D)



(1)



(2)

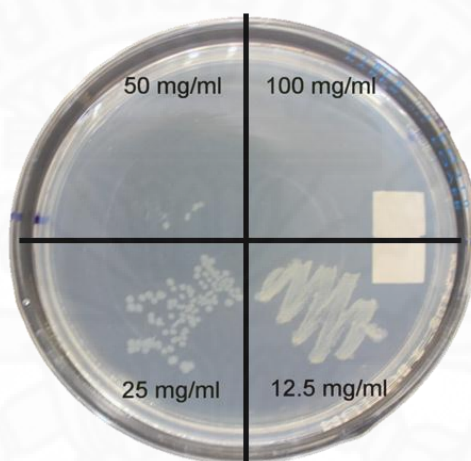
ภาพที่ 4.22 (D) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E)



100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



(2)

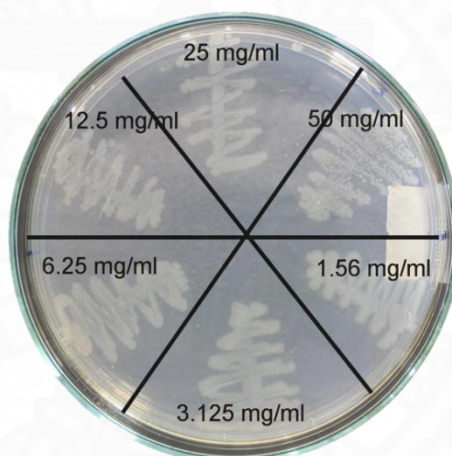
ภาพที่ 4.22 (E) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A1)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.003	0.001	0.0007	0.0003	0.0002
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (โมลาร์)										

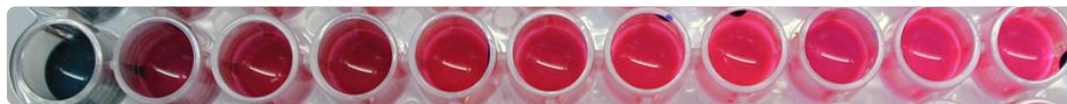
(1)



(2)

ภาพที่ 4.23 (A1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอลในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A2)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.004	0.002	0.0009	0.0004	0.0002	0.0001
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (โมลาร์)										

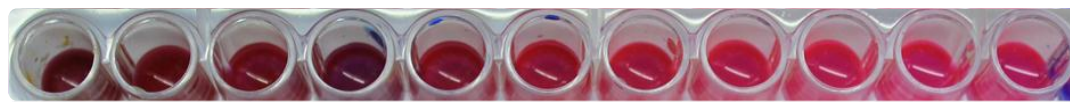
(1)



(2)

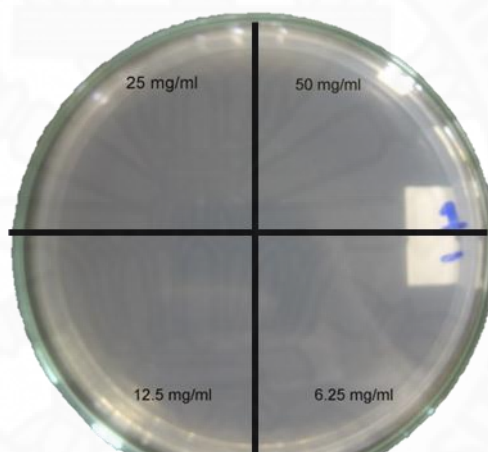
ภาพที่ 4.23 (A2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.12 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B1)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.003	0.001	0.0007	0.0003	0.0002
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (โมลาร์)										

(1)



(2)

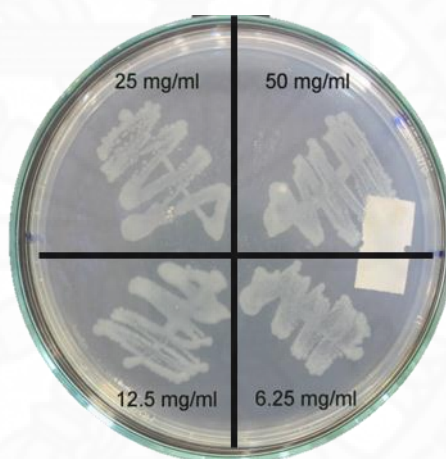
ภาพที่ 4.23 (B1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอลในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B2)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.004	0.002	0.0009	0.0004	0.0002	0.0001
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (โมลาร์)										

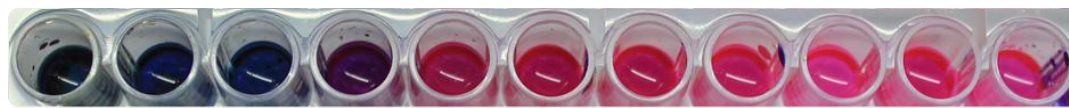
(1)



(2)

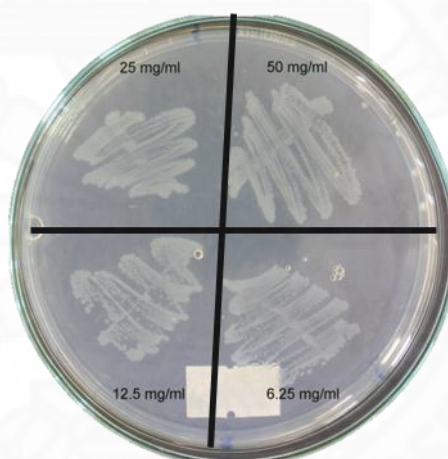
ภาพที่ 4.23 (B2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.06 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C1)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.003	0.001	0.0007	0.0003	0.0002
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (โมลาร์)										

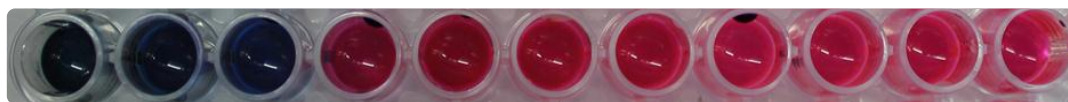
(1)



(2)

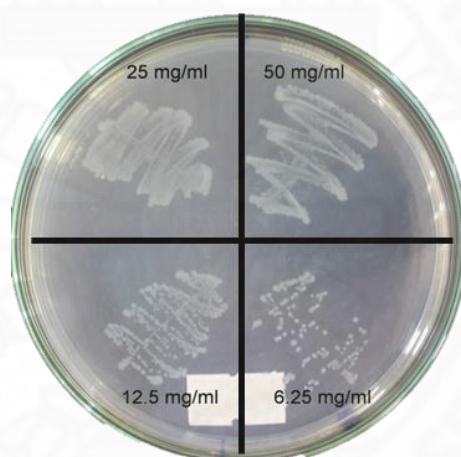
ภาพที่ 4.23 (C1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอลในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C2)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.004	0.002	0.0009	0.0004	0.0002	0.0001
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (โมลาร์)										

(1)



(2)

ภาพที่ 4.23 (C2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C3)



200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19
ความเข้มข้นของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
1.39	0.70	0.35	0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.0027	0.0013
ความเข้มข้นของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (โมลาร์)										

(1)



(2)

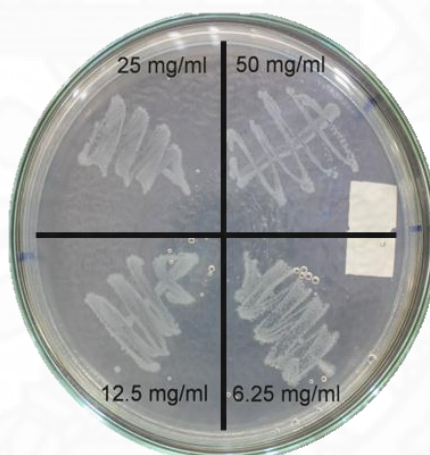
ภาพที่ 4.23 (C3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.39 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (ความเข้มข้น มากกว่า 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 1.39 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D1)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.003	0.001	0.0007	0.0003	0.0002
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล (โมลาร์)										

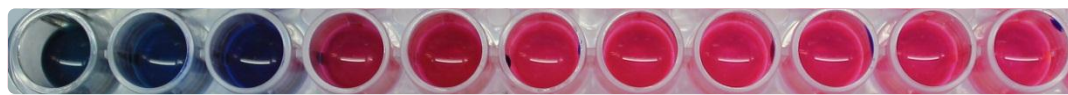
(1)



(2)

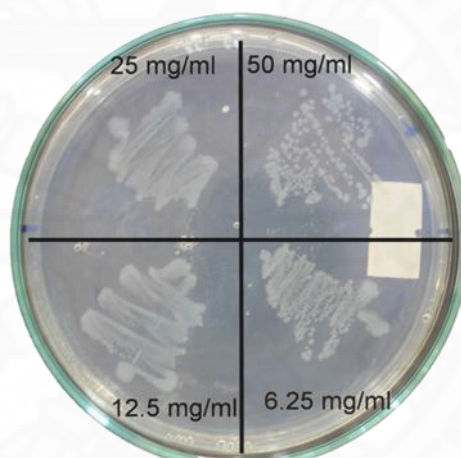
ภาพที่ 4.23 (D1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอลในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.04 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.17 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D2)



50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.12	0.06	0.03	0.01	0.007	0.004	0.002	0.0009	0.0004	0.0002	0.0001
ความเข้มข้นของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (โมลาร์)										

(1)



(2)

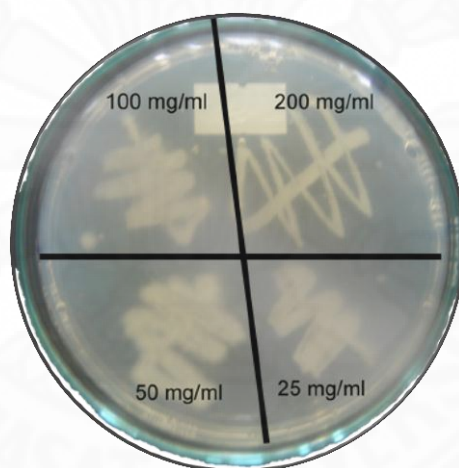
ภาพที่ 4.23 (D2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารเคมเฟอรอล-3-แรมโนไซด์ (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D3)



200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19
ความเข้มข้นของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
1.39	0.70	0.35	0.17	0.09	0.04	0.02	0.01	0.005	0.0027	0.0013
ความเข้มข้นของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (โมลาร์)										

(1)



(2)

ภาพที่ 4.23 (D3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.39 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสาร 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (ความเข้มข้น มากกว่า 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 1.39 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method) กับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol)) ได้ศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของลิปิดที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ ดังงานวิจัยของ Dilika และคณะ (2000) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกรดโอเลอิก พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบคือ *B. subtilis*, *Micrococcus kristinae* และ *Staphylococcus aureus* โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการศึกษาของ Choi และคณะ (2013) พบว่ากรดสเตียริกมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคมะเร็งในช่องปาก 12 ชนิด โดยแสดงค่า MIC อยู่ในช่วง 312.5 – 2500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกรดซินนามิกดังงานวิจัยของ Guzman (2014) พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 24 ชนิด โดยแสดงค่า MIC อยู่ในช่วง 0.4 – 13.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งลิปิดทั้งสามชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจึงถูกเลือกนำไปสังเคราะห์อนุพันธ์ของเคมเฟอร์อลเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC method) กับอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ (เคมเฟอร์อล (kaempferol)) คือ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) และอนุพันธ์กับลิปิดและไบโอทิน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอร์อล-3-ไบโอทิน (kaempferol-3-biotin) (33)) โดยเตรียมความเข้มข้นของอนุพันธ์ของเคมเฟอร์อล (kaempferol) ได้แก่ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) และอนุพันธ์กับลิปิดและไบโอทิน (เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอร์อล-3-ไบโอทิน (kaempferol-3-biotin) (33)) เตรียมที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์) จากการศึกษาพบว่า เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะซีเตต (kaempferol-3,6-diacetate) (29) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุดโดยแสดงจากค่า MIC เท่ากับ 3.125 (0.01 โมลาร์) และค่า MBC เท่ากับ 6.25 (0.02 โมลาร์) มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.24(C1)) นอกจากนั้นสารตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* โดยแสดงจากค่า MIC คือ 6.25 (0.02 โมลาร์) และค่า MBC คือมากกว่า 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.03 โมลาร์) ตามลำดับ (ภาพ 4.24(B1)) ต่อมาสารที่ทำการศึกษา สารตัวอย่างจำพวก เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) เคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) เคมเฟอร์อล-3-ไบโอทิน (kaempferol-3-biotin) (33) ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* เพียงชนิดเดียว โดย เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) (30) และเคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) (31) ให้ผลฤทธิ์ในการยับยั้ง

แบคทีเรียที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงจากค่า MIC และ MBC คือ 25 (0.05 โมลาร์) และมากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์) ตามลำดับ (ภาพ 4.24(A1, A2)) ส่วนเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (kaempferol-3-biotin) **(33)** แสดงค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) และค่า MBC คือมากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์) (ภาพ 4.24(A3)) ดังแสดงในตาราง 4.23

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง คือสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ และอนุพันธ์ของเคมเฟอรอล ได้ผลที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของผนังเซลล์ รูปร่าง และกระบวนการทำงานของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ต่างกัน ทำให้การตอบสนองของสารตัวอย่างกับแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน

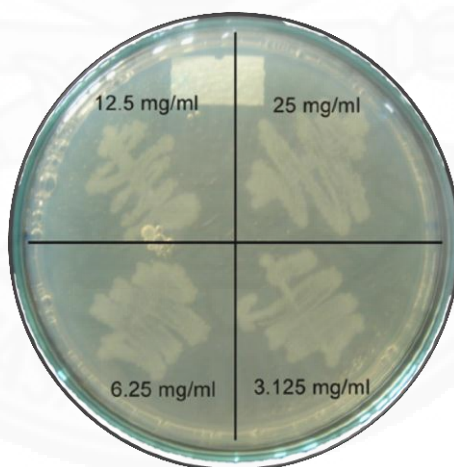
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับอนุพันธ์ในกลุ่มไขมัน และไบโอทิน พบว่าสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* เพียงชนิดเดียวซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ต่างกัน กระบวนการเริ่มต้นจากการจับของสารตัวอย่างกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ (electrostatic binding) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ สารตัวอย่างจะไปจับกับส่วนที่เป็นประจุลบบนฟอสโฟลิปิด (phospholipids), ลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharides (LPS)) และ outer membrane protein ซึ่งขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและไม่ต้องใช้พลังงาน สารตัวอย่างจะไปแทนที่ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ซึ่งเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ LPS ทำให้การจัดเรียงตัวของ LPS เสียไป ผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ฉีกขาด มีรูเกิดขึ้นและการควบคุมการซึมผ่านของสารต่างๆเสียไป หลังจากนั้นจะเข้าสู่ periplasmic space กระบวนการต่อมา สารตัวอย่างจะไปจับกับไรโบโซมทำให้มีการสร้างสารโปรตีนที่ผิดปกติซึ่งจะถูกเซลล์แบคทีเรียนำไปใช้ในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียไป

(A1)



25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049	0.024
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.05	0.02	0.01	0.006	0.003	0.001	7×10^{-4}	3.45×10^{-4}	1.63×10^{-4}	8.9×10^{-5}	4.36×10^{-5}
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (โมลาร์)										


(1)



(2)

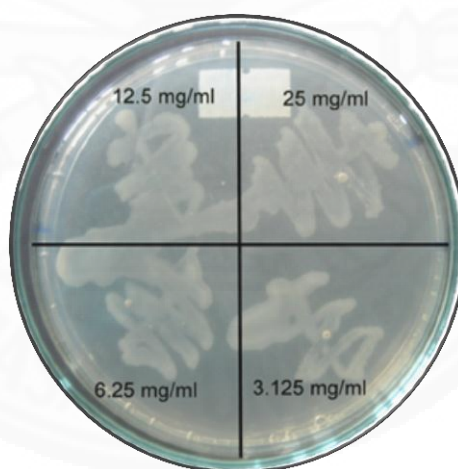
ภาพที่ 4.24 (A1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น มากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A2)



25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049	0.024
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.05	0.02	0.01	0.006	0.003	0.001	7×10^{-4}	3.44×10^{-4}	1.63×10^{-4}	8.87×10^{-5}	4.34×10^{-5}
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (โมลาร์)										

(1)



(2)

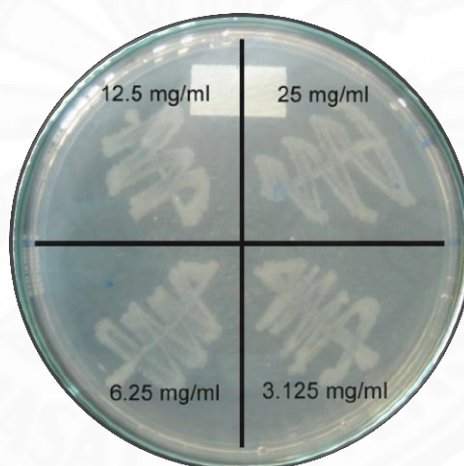
ภาพที่ 4.24 (A2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-6-สเตอริก เอซิดในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A3)



25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049	0.024
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.05	0.02	0.01	0.006	0.003	0.002	7.6×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1.76×10^{-4}	9.56×10^{-5}	4.68×10^{-5}
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (โมลาร์)										

(1)



(2)

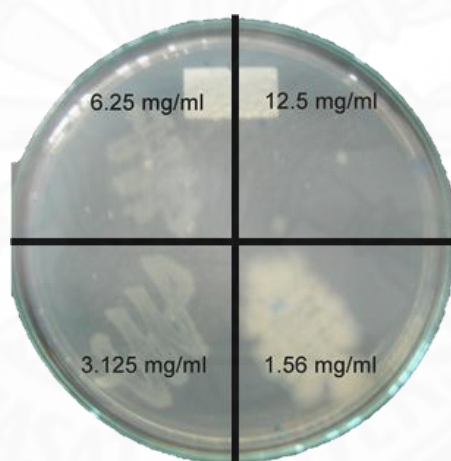
ภาพที่ 4.24 (A3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3-ไปโอติน ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น มากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B1)



12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049	0.024	0.012
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.03	0.02	0.01	0.004	0.002	0.001	5.13×10^{-4}	2.43×10^{-4}	1.32×10^{-4}	6.48×10^{-5}	3.24×10^{-5}
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (โมลาร์)										

(1)



(2)

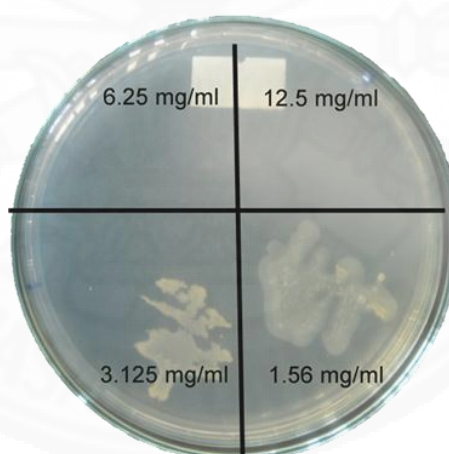
ภาพที่ 4.24 (B1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น มากกว่า 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.03 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C1)



12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.049	0.024	0.012
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)										
0.03	0.02	0.01	0.004	0.002	0.001	5.13×10^{-4}	2.43×10^{-4}	1.32×10^{-4}	6.48×10^{-5}	3.24×10^{-5}
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (โมลาร์)										

(1)



(2)

ภาพที่ 4.24 (C1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.01 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่างทั้งสารสกัดหยาบใบมะขามเทศ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ และสารอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะขามเทศ ล้วนให้ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะเพื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์จากใบมะขามเทศที่ทำการสังเคราะห์ โดยแบ่งการศึกษายาปฏิชีวนะออกเป็น 5 กลุ่มด้วยกันคือ เซฟาเลกซิน (Cephalexin) สเตร็ปโตมัยซิน (Streptomycin) เพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ไดคลอกซาซิลลิน (Dicloxacillin) และแวนโคมัยซิน (Vancomycin) โดยยาชนิดแรกที่ทำการศึกษาคือเซฟาเลกซิน (Cephalexin) เป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตร็ปโตคอคคัส (Streptococcus) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบ โรคติดเชื้อที่กระดูก หู ฝีพอง ระบายทางเดินหายใจ และระบบทางเดินปัสสาวะ โดยให้เป็นกลุ่มตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งจากการทดสอบให้ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 9.766 และค่า MBC เท่ากับ 156.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(A1)) รองลงมาสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus*, MRSA, *S. aureus* และ *E. faecalis* โดยแสดงค่า MIC และ MBC ดังนี้ 19.53 และ 19.53, 39.06 และ 78.13, 156.25 และ 625, 156.25 และ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.25(B1, E1, D1, C1)) ยาชนิดที่สองที่ทำการศึกษาคือสเตร็ปโตมัยซิน (Streptomycin) เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น วัณโรค โรคเรื้อน แผลริมอ่อน เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โดยให้ยาชนิดนี้เป็นกลุ่มตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ จากการทดสอบให้ฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 2.5 และค่า MBC เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(B2)) และสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MRSA, *S. aureus*, *E. coli* และ *E. faecalis* โดยแสดงค่า MIC และ MBC ดังนี้ 19.53 และ 39.06, 39.06 และ 39.06, 78.13 และ 78.13, 78.13 และ 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.25(E2, D2, A2, C2)) ยาชนิดที่สามที่ทำการศึกษาคือเพนิซิลลิน วี (Penicillin V) เป็นกลุ่มยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ไขหวัดที่มีแบคทีเรียแทรกซ้อน ฝีพองอักเสบ และต่อมน้ำเหลืองอักเสบ เป็นต้น ยาชนิดนี้เป็นตัวแทนจากกลุ่มตัวอย่างของยาที่รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก จากการทดสอบให้ฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. faecalis* ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC และค่า MBC เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(C3)) นอกจากนี้สารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MRSA, *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* โดยแสดงค่า MIC และ MBC ดังนี้ 19.53 และ 625, 312.5 และ 312.5, 625 และ 625, 625 และ 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.25(E3, D3, B3, A3)) ยาชนิดที่สี่ที่ทำการศึกษาคือไดคลอกซาซิลลิน

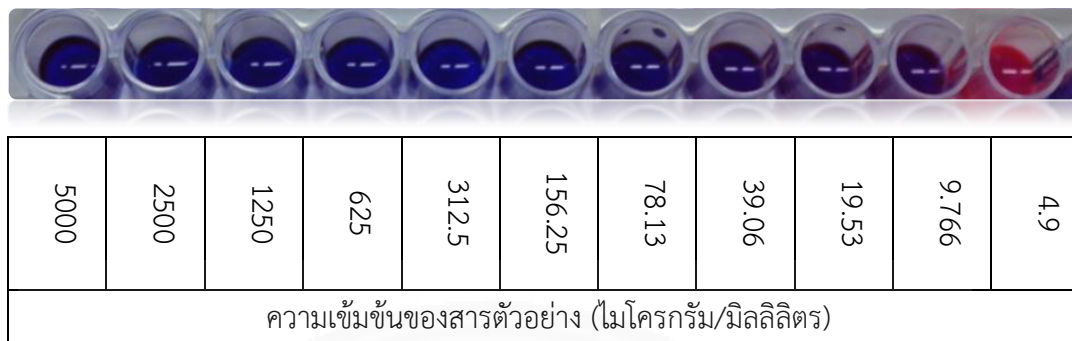
(Dicloxacillin) มีฤทธิ์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียเช่นโรคปอดอักเสบ โรคติดเชื้อที่กระดูก หู ฝวหนัง และระบบทางเดินปัสสาวะ ยาชนิดนี้เลือกเป็นยาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก และต่อต้านยาเพนิซิลลิน จากการทดสอบให้ฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC และค่า MBC เท่ากับ 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(B4)) ถัดมามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. faecalis* ซึ่งให้ค่า MIC ใกล้เคียงหรือเท่ากับฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* คือ 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่แตกต่างกันที่ค่า MBC เท่ากับ 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(C4)) สุตท้ายสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MRSA, *S. aureus* และ *E. coli* โดยแสดงค่า MIC และ MBC เท่ากันในแบคทีเรียทั้ง3ชนิด คือเท่ากับ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(E4, D4, A4)) ยาชนิดสุดท้ายที่ทำการศึกษาคือแวนโคมัยซิน (Vancomycin) ยาชนิดนี้ใช้เพื่อรักษาอาการลำไส้อักเสบ ภาวะติดเชื้อในทางเดินอาหาร และรักษาการติดเชื้อ MRSA ที่รุนแรง ยาชนิดนี้เลือกเป็นตัวอย่างยาจากกลุ่มที่รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย MRSA จากการทดสอบให้ฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 4.25(B5)) รองลงมาสารมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. faecalis*, MRSA, *S. aureus* และ *E. coli* โดยแสดงค่า MIC และ MBC ดังนี้ 10 และ 20, 312.5 และ 312.5, 312.5 และ 625, 625 และ 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพ 4.25(C5, E5, D5, A5)) ดังตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24

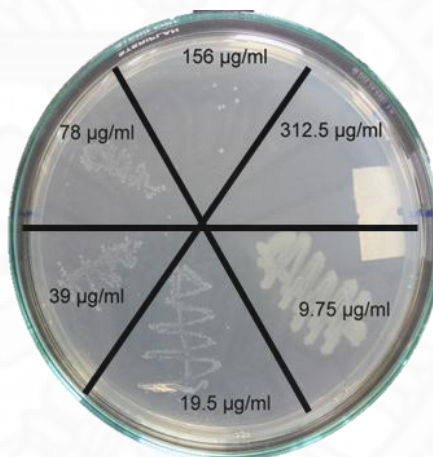
ตารางแสดงค่า MIC และ MBC ของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ

Antibiotic Drugs Bacterial Strains	Cephalexin		Streptomycin		Penicillin V		Dicloxacillin		Vancomycin	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>B. cereus</i>	19.53	19.53	2.5	5	625	625	19.53	19.53	5	10
<i>S. aureus</i>	156.25	625	39.06	39.06	312.5	312.5	1250	1250	312.5	625
<i>E. coli</i>	9.766	156.25	78.13	78.13	625	625	1250	1250	625	1250
<i>E. faecalis</i>	156.25	1250	78.13	78.13	5	5	19.53	39.06	10	20
MRSA	39.06	78.13	19.53	39.06	19.53	625	1250	1250	312.5	312.5

(A1)



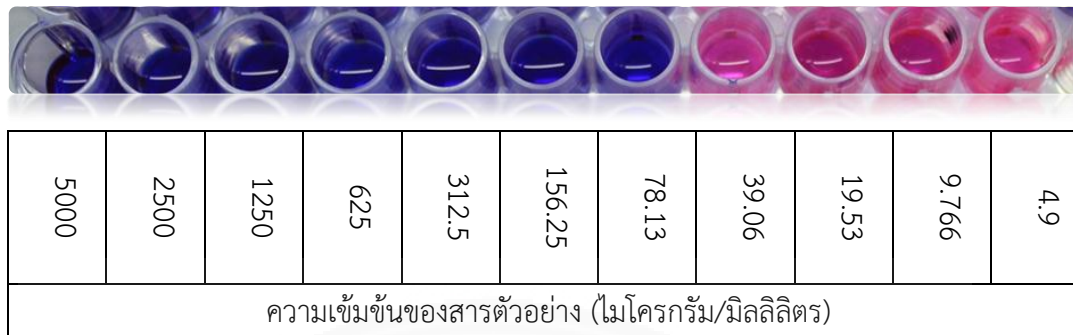
(1)



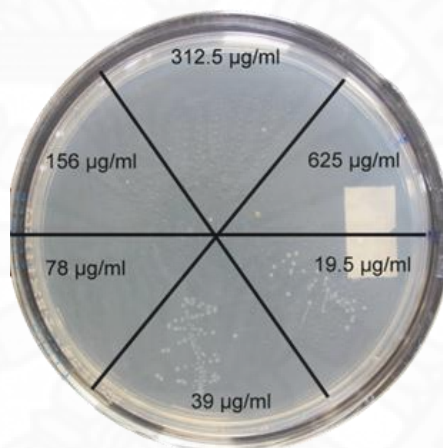
(2)

ภาพที่ 4.25 (A1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลซิมในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 9.766 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 156.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A2)



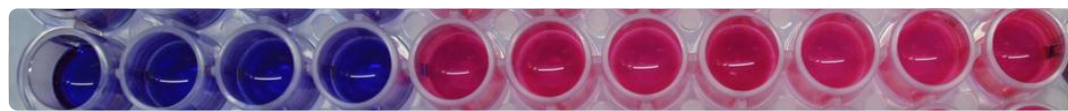
(1)



(2)

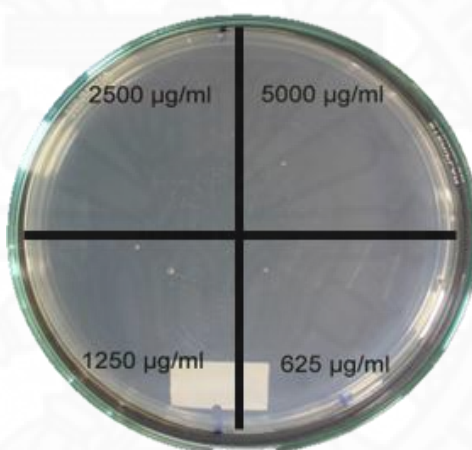
ภาพที่ 4.25 (A2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A3)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

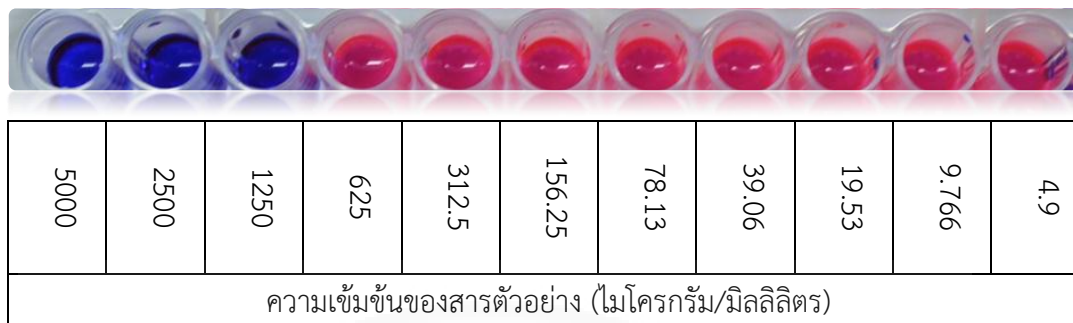
(1)



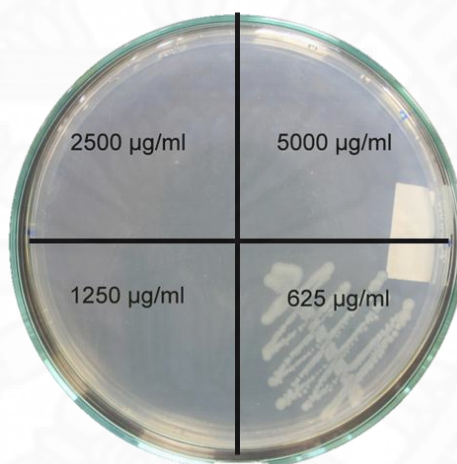
(2)

ภาพที่ 4.25 (A3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเพนิซิลิน วี ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A4)



(1)



(2)

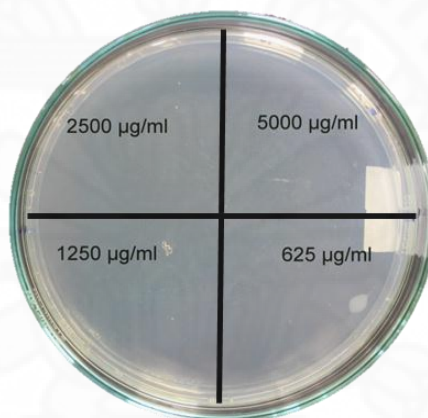
ภาพที่ 4.25 (A4) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะไดคลอกซาซิลลินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(A5)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



(2)

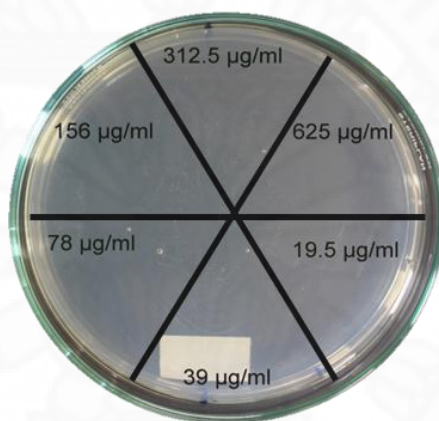
ภาพที่ 4.25 (A5) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะแวนโคมัซซิน ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. coli* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B1)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



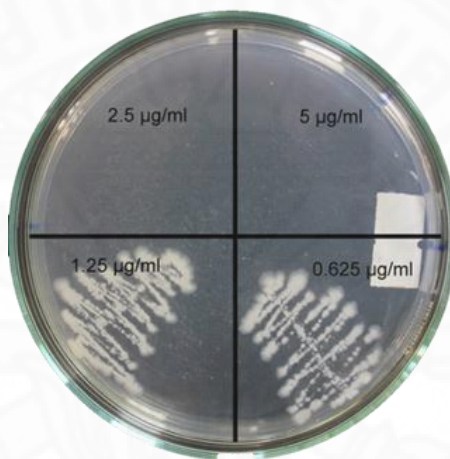
(2)

ภาพที่ 4.25 (B1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลกซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B2)



(1)



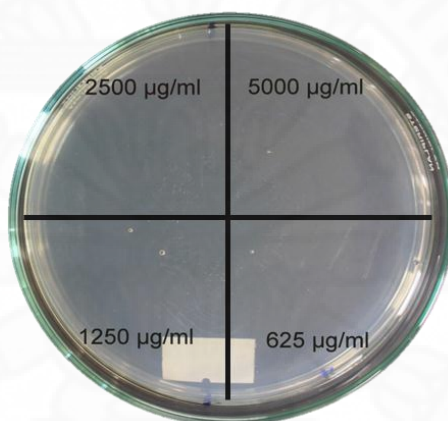
(2)

ภาพที่ 4.25 (B2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B3)



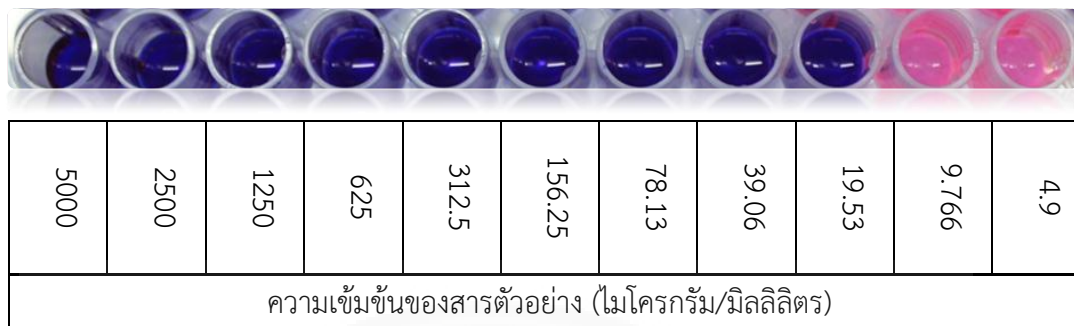
(1)



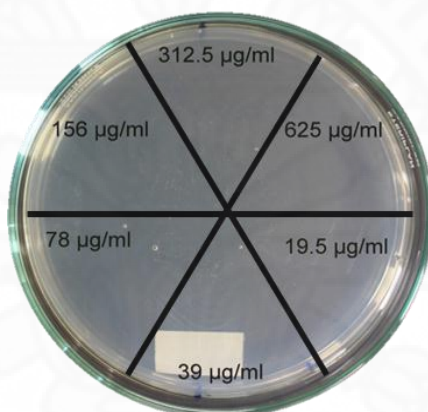
(2)

ภาพที่ 4.25 (B3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน วี ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B4)



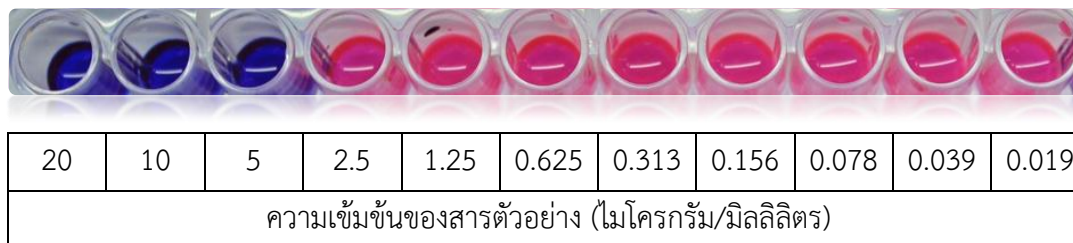
(1)



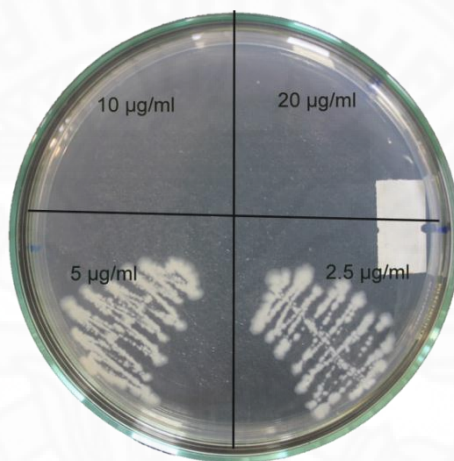
(2)

ภาพที่ 4.25 (B4) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะไดคลอกซาซิลลินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(B5)



(1)



(2)

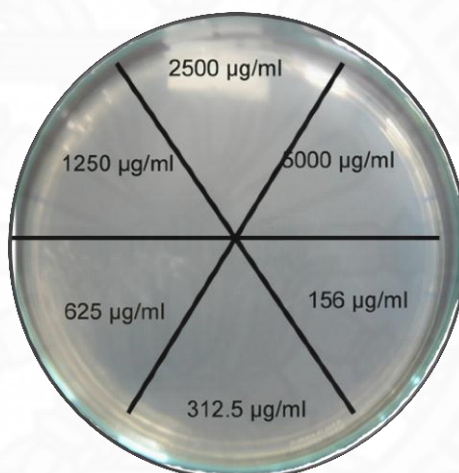
ภาพที่ 4.25 (B5) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *B. cereus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C1)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



(2)

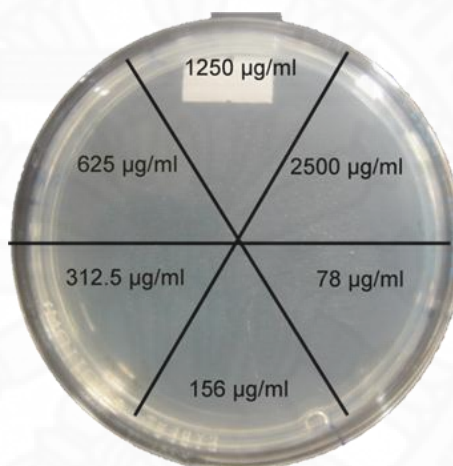
ภาพที่ 4.25 (C1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลกซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 156.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C2)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

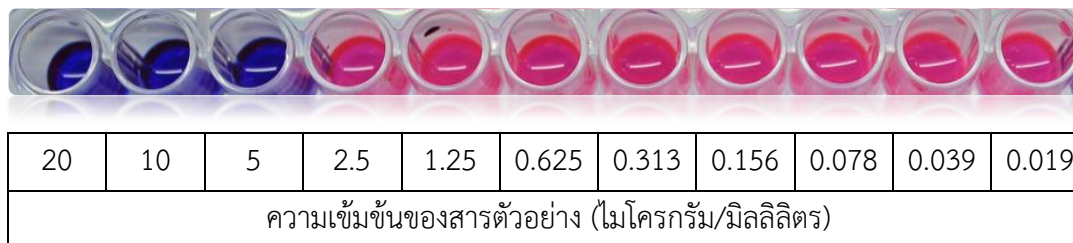
(1)



(2)

ภาพที่ 4.25 (C2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C3)



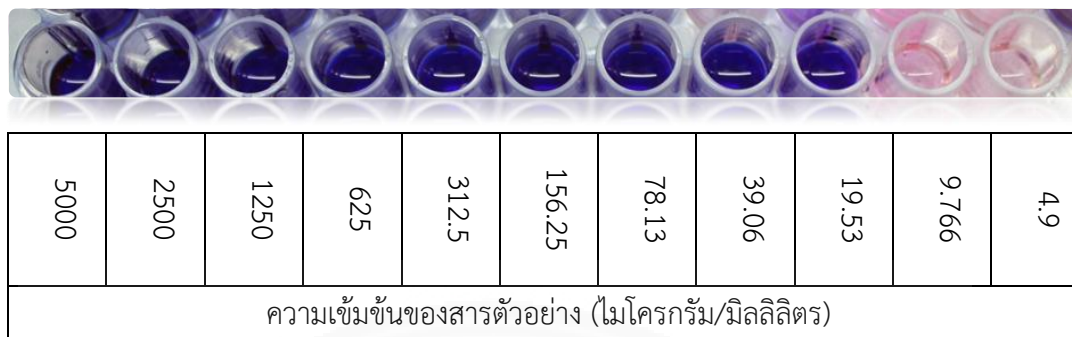
(1)



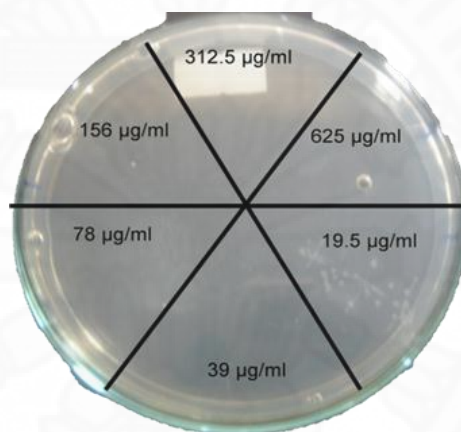
(2)

ภาพที่ 4.25 (C3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน วี ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C4)



(1)



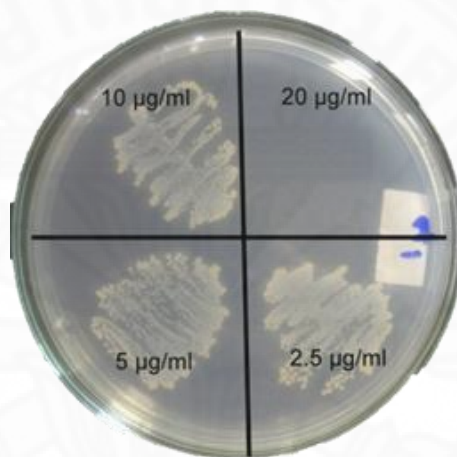
(2)

ภาพที่ 4.25 (C4) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะไดคลอกซาซิลลินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(C5)



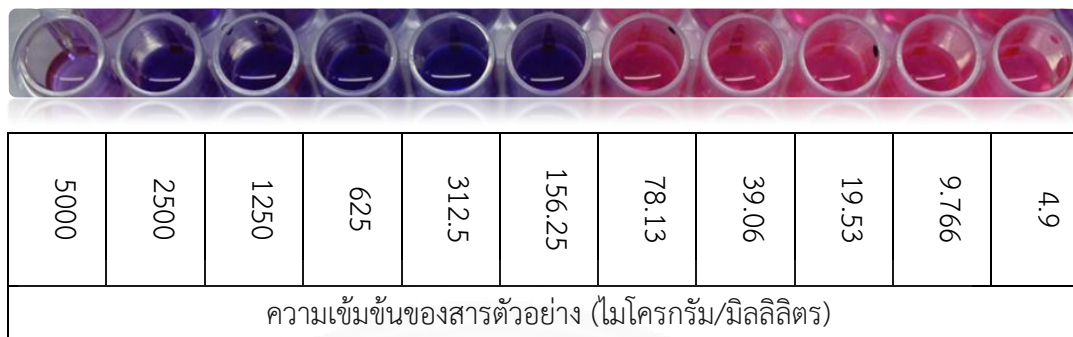
(1)



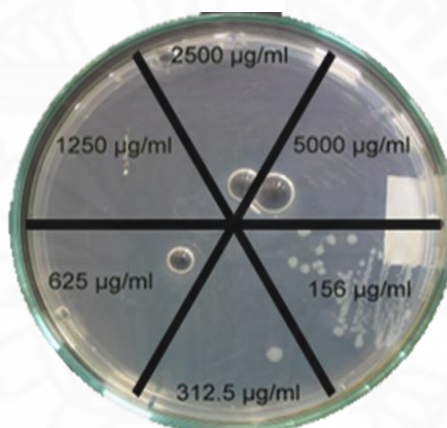
(2)

ภาพที่ 4.25 (C5) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *E. faecalis* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D1)



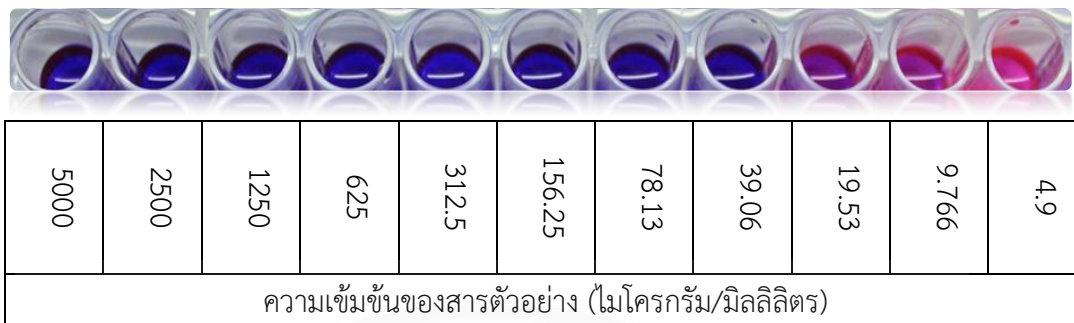
(1)



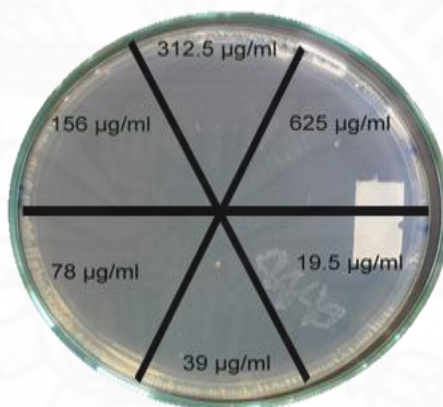
(2)

ภาพที่ 4.25 (D1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลซิมในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 156.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D2)



(1)



(2)

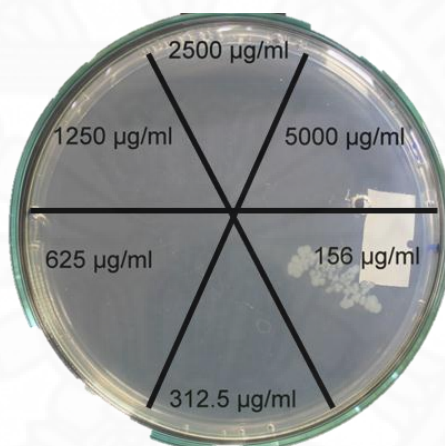
ภาพที่ 4.25 (D2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D3)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



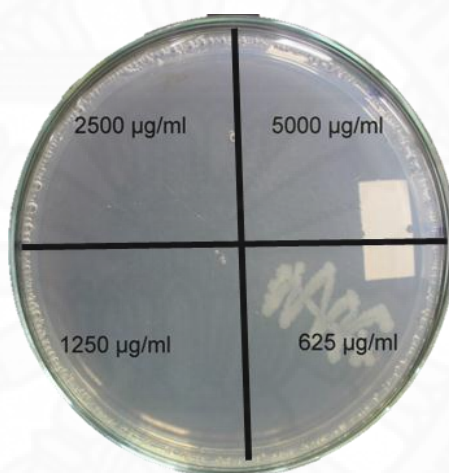
(2)

ภาพที่ 4.25 (D3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเพนิซิลิน วี ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 312.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 312.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D4)



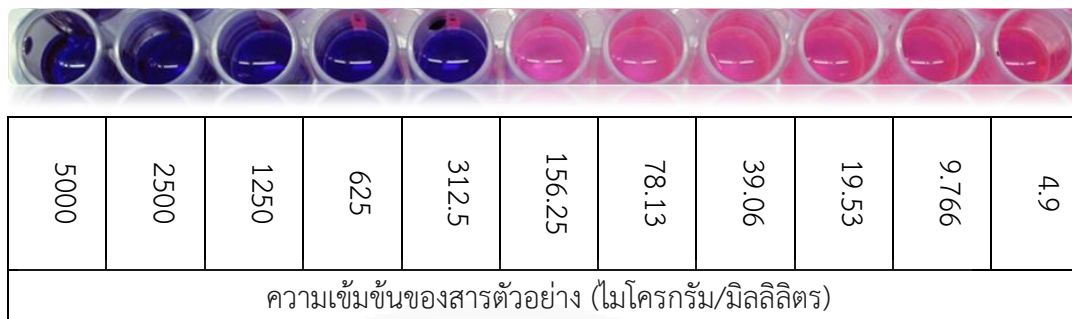
(1)



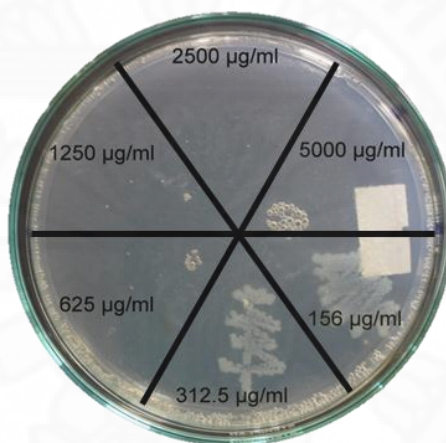
(2)

ภาพที่ 4.25 (D4) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะไดคลอกซาซิลลินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(D5)



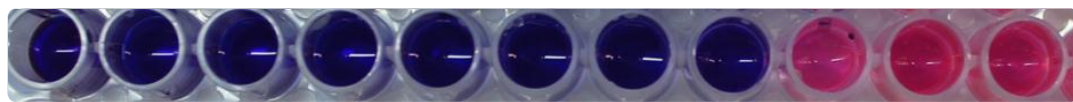
(1)



(2)

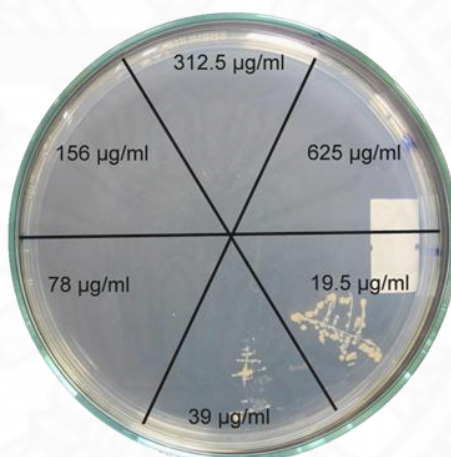
ภาพที่ 4.25 (D5) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) *S. aureus* เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 312.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E1)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

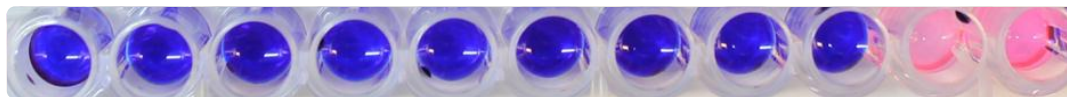
(1)



(2)

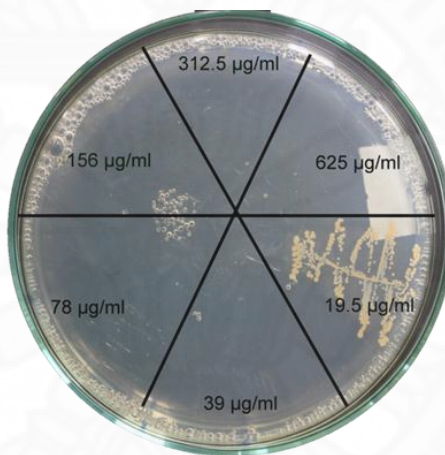
ภาพที่ 4.25 (E1) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเซฟาเลซิมในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E2)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

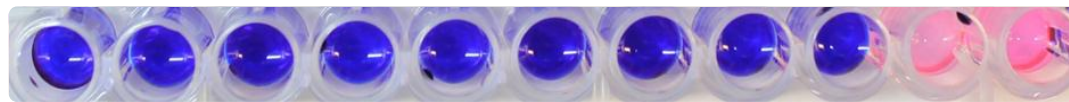
(1)



(2)

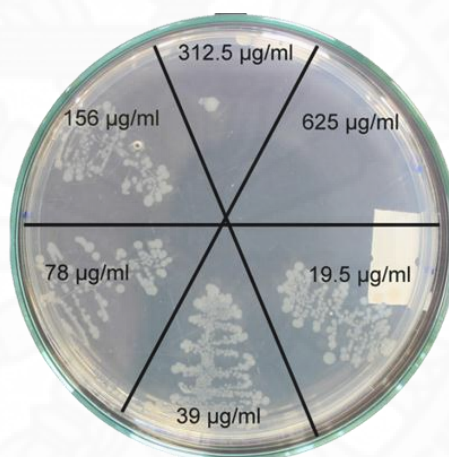
ภาพที่ 4.25 (E2) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 39.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E3)



5000	2500	1250	625	312.5	156.25	78.13	39.06	19.53	9.766	4.9
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)										

(1)



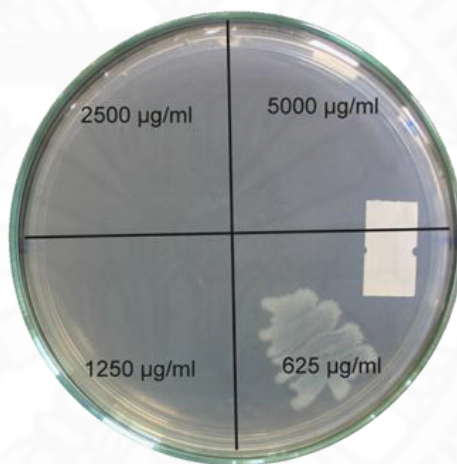
(2)

ภาพที่ 4.25 (E3) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน วี ในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 19.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E4)



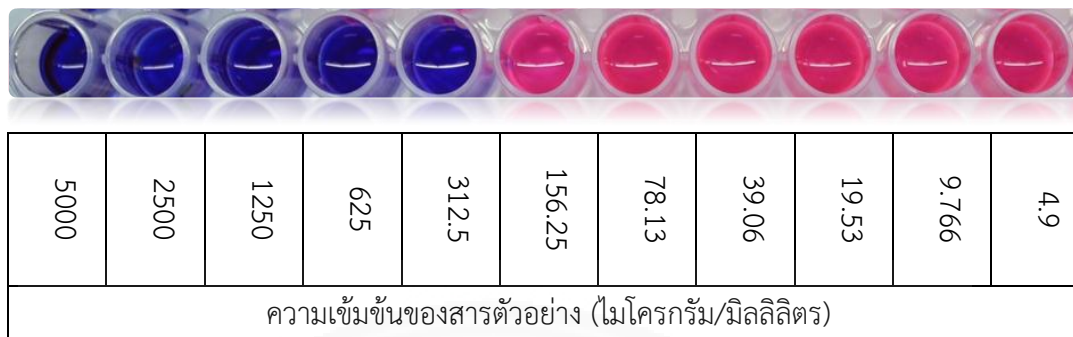
(1)



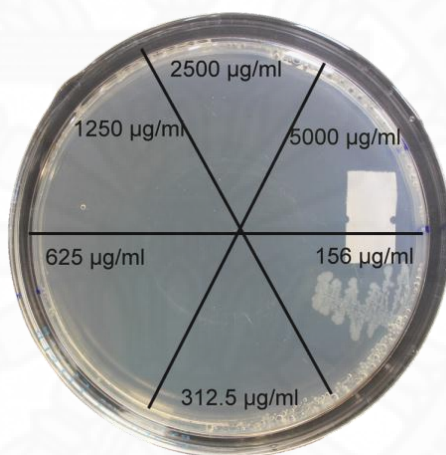
(2)

ภาพที่ 4.25 (E4) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะไดคลอกซาซิลลินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

(E5)



(1)



(2)

ภาพที่ 4.25 (E5) ผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะแวนโคมัซซินในการยับยั้งการเจริญ (Minimum inhibition concentration) และการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) MRSA เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบ 2 เท่า โดย (1) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 312.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) และ (2) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 312.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีสารสกัดหยาบจากใบมะขามเทศพร้อมศึกษาถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทำการสกัดสารหยาบด้วยวิธีการแช่ตัวอย่าง (maceration) ในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลได้สารสกัดหยาบ 0.200 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.01% นำสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลมาแยกองค์ประกอบทางเคมีผ่าน 3 เทคนิคคือ (1) เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) (2) คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และ (3) เพอร์เพอร์เรทีฟโครมาโตกราฟีชนิดเยื่อบาง (Preparative thin layer chromatography) โดยสามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ เคมเฟอร์อล (kaempferol **(8)**) 0.026 กรัม เคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside **(7)**) 0.088 กรัม และ 4,5-อีพ็อกซีไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid **(28)**) 0.012 กรัม ซึ่งโครงสร้างมีการยืนยันองค์ประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

จากการศึกษาการแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากใบมะขามเทศโดยพบสารสำคัญ 3 ชนิดดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จากผลของฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นที่ได้จึงนำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้อนุพันธ์ต่างๆดังนี้ เคมเฟอร์อล-3,6-ไดอะเซเตต (Kaempferol-3,6-diacetate) **(29)** เคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid) **(30)** เคมเฟอร์อล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid) **(31)** เคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid) **(32)** และเคมเฟอร์อล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin) **(33)** เพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งโครงสร้างมีการยืนยันองค์ประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-Visible spectrophotometry) อินฟราเรด สเปกโตรสโกปี (Infrared spectroscopy) และอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) โดยในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับไกลโคไซด์ต่าง ๆ (ไซโลส กลูโคส กาแลกโตส และกลูโคซามีน) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมือนกันเมื่อยืนยันองค์ประกอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR

spectroscopy) โดยพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ในรูปอะซีติลเคมเฟอร์อล (เคมเฟอร์อล-3, 6-ไดอะซีเตต; kaempferol-3, 6-diacetate) (29) และในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับอะซีติกแอนไฮไดรด์ (34) และโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (35) ซึ่งจากผลการศึกษาในการสังเคราะห์อนุพันธ์เคมเฟอร์อล (kaempferol) กับอะซีติกแอนไฮไดรด์ (34) และโพรไพโอนิกแอนไฮไดรด์ (35) ได้ร้อยละผลผลิตน้อยมากและไม่สามารถแยกให้สารบริสุทธิ์ได้จึงไม่นำสารกลุ่มนี้มาทำการศึกษาต่อในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งการสังเคราะห์สารอนุพันธ์สองตัวนี้ควรหาวิธีการสังเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มร้อยละผลผลิต (% yield) ของผลิตภัณฑ์และสามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ ได้

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทั้งในด้านเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพได้ทำการศึกษากับสารสกัดหยาบใบมะขามเทศในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล เคมเฟอร์อล (kaempferol (8)) เคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside (7)) และ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid (28)) โดยใช้สารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮไดรราซิล (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลที่คงตัว ในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารละลายสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร โดยอนุมูล DPPH[•] จะทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อเกิดปฏิกิริยาได้รับโปรตอนจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารละลายจะเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลือง ซึ่งสารตัวอย่างที่ทำการทดสอบเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงถึงการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณของสารสกัดหยาบใบมะขามเทศด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามเทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงค่า IC₅₀ เท่ากับ 197.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (IC₅₀ < 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

จากการศึกษาการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่างได้ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (TVA) กับแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 379 เพื่อศึกษาหาช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย (ระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ (exponential phase หรือ log phase)) และความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในช่วงเวลาการบ่มแบคทีเรีย พบว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพราะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุดและมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่าง ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารตัวอย่างด้วยวิธี disc

diffusion method และ MIC method กับแบคทีเรีย 5 ชนิดคือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Enterococcus faecalis* TISTR 379 และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 โดยใช้เซฟาแลกซิน (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร; วิธี disc diffusion method, 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร; วิธี MIC) เป็นตัวควบคุมผลบวก และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าสารสกัดหยาบใบมะขามเทศความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทุกชนิด แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.0–12.2 มิลลิเมตร (MIC อยู่ในช่วง 12.5–100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, MBC เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เคมเฟอรอล (kaempferol **(8)**) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.17 โมลาร์) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น *E. faecalis* แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.7–9.3 มิลลิเมตร (MIC อยู่ในช่วง 6.25–50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02–0.17 โมลาร์), MBC อยู่ในช่วง 6.25 ถึงมากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02 ถึงมากกว่า 0.17 โมลาร์)) เคมเฟอรอล-3-รามโนไซด์ (kaempferol-3-rhamnoside **(7)**) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.12 โมลาร์) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียยกเว้น *E. faecalis* แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 6.5–7.0 มิลลิเมตร (MIC อยู่ในช่วง 12.5–50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 – 0.12 โมลาร์), MBC มากกว่า 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.12 โมลาร์)) 4,5-อีพ็อกซีไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (4,5-epoxy-piperidine-3-carboxylic acid **(28)**) ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (2.80 โมลาร์) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้บางชนิดคือ *S. aureus* และ MRSA แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 6.5–7.0 มิลลิเมตร (MIC เท่ากับ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1.39 โมลาร์), MBC มากกว่า 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 1.39 โมลาร์)) อนุพันธ์ที่ทำการศึกษาคือเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (Kaempferol-3,6-diacetate **(29)**) ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.03 โมลาร์) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้บางชนิดคือ *S. aureus* และ *B. cereus* แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร (MIC อยู่ในช่วง 3.125–6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.01–0.02 โมลาร์), MBC อยู่ในช่วงมากกว่า 12.5–6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.03–0.02 โมลาร์)) เคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (kaempferol-6-oleic acid **(30)**), เคมเฟอรอล-6-สเตอริก เอซิด (kaempferol-6-steric acid **(31)**) และเคมเฟอรอล-3-ไบโอติน (kaempferol-3-biotin **(33)**) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.05 โมลาร์) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ชนิดเดียวคือ *E. coli* แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร ยกเว้นเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (kaempferol-6-cinnamic acid **(32)**) ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทุกชนิด (MIC อยู่ในช่วง 12.5–25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (0.02–0.05 โมลาร์), MBC

มากกว่า 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 0.05 โมลาร์)) นอกจากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะเพื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์จากใบมะขามเทศที่ทำการสังเคราะห์ โดยแบ่งการศึกษายาปฏิชีวนะออกเป็น 5 กลุ่มด้วยกันคือเซฟาเลกซิน (Cephalexin) สเตร็ปโตมัยซิน (Streptomycin) เพนิซิลลิน วี (Penicillin V) ไดคลอกซาซิลลิน (Dicloxacillin) และแวนโคมัยซิน (Vancomycin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทุกชนิด โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 9.766–156.25, 2.5–78.13, 5–625, 19.53–1250 และ 5–625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 19.53-1250, 5–78.13, 5-625, 19.53-1250 และ 10-1250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากใบมะขามเทศสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับสารบริสุทธิ์ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้อาจนำสารบริสุทธิ์ไปพัฒนาใช้แทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน ซึ่งอาจเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในอนาคต และช่วยลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายและมีผลข้างเคียงต่อเซลล์มนุษย์ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

รายการอ้างอิง

- [1] Ingeae – Wikipedia, the free encyclopedia. (n.d.). Wikipedia, the free encyclopedia. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2556, จาก <http://en.wikipedia.org/wiki/Ingeae>
- [2] Mimosoideae – วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. (n.d.). วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. สืบค้นเมื่อวันที่ สิงหาคม 2556, จาก <http://th.wikipedia.org/wiki/Mimosoideae>
- [3] บัวบูชา. (2551). ยาสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: ภูมิปัญญา
- [4] มะขามเทศ – วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. (n.d.). วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2556, จาก <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B8%82%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B9%80%E0%B8%97%E0%B8%A8>
- [5] มะขามเทศ สืบค้นเมื่อวันที่ 13 มกราคม 2558, จาก <http://www.samunpri.com/?p=10690>
- [6] ยุวดี จอมพิทักษ์. การเก็บพืชสมุนไพร. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2556, จาก <http://www.ajareeherb.com/2010-06-07-02-45-21.html>
- [7] อรัญญา มโนสร้อย และจิระเดช มโนสร้อย. (2548). น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทย. เชียงใหม่: โรงพิมพ์ครองช้าง.
- [8] มหาวิทยาลัยมหิดล. (2534). ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [9] จิรนนท์ ชัยวาฤทธิ. HPLC. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน 2557, จาก www.mfu.ac.th/center/stic/index
- [10] บุษกร อุดรภิชาติ. (2550). จุลชีววิทยาทางอาหาร. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [11] แบคทีเรีย – วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. (n.d.). วิกีพีเดีย, สารานุกรมเสรี. สืบค้นเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2558, จาก <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B9%81%E0%B8%9A%E0%B8%84%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B8%B5%E0%B8%A2>
- [12] Kaiser, Gary E. Escherichia coli. (2005) สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2556, จาก <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/diseasea/ecoli/ecoli.html>
- [13] Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265-1273.

- [14] Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., & Wyn-Jones, P. (2004). 9 - Other heterotrophic plate count bacteria: Flavobacterium, Klebsiella, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus. In S. P. C. E. H. S. Wyn-Jones (Ed.), *Microbiology of Waterborne Diseases* (pp. 125-143). London: Academic Press.
- [15] Laurie, C., Aynsley, C.H., Richard, L. (2003). *Micro – facts the Working Companion for Food Microbiologists*. Royal society of chemistry.
- [16] Bacillus cereus สืบค้นเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม 2556, จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116>
- [17] Enterococcus faecalis – Wikipedia, the free encyclopedia. (n.d.). Wikipedia, the free encyclopedia. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม 2556, จาก http://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis
- [18] Muto, C. A. M. D. M. S., Jernigan, J. A. M. D. M. S., Ostrowsky, B. E. M. D. M. P. H., Richet, H. M. M. D., Jarvis, W. R. M. D., Boyce, J. M. M. D., & Farr, B. M. M. D. M. (2003). SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Enterococcus • *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(5), 362-386.
- [19] Thamlikitkul, V., Jintanothaitavorn, D., Sathitmethakul, R., Vaithayaphichet, S., Trakulsomboon, S., & Danchaiwijitr, S. (2001). Bacterial infections in hospitalized patients in Thailand in 1997 and 2000. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 84(5), 666-673.
- [20] Nigam, S. K., & Mitra, C. R. (1968). Pithecellobium dulce. IV. Constituents of flowers, heartwood, and root bark. *Planta Med*, 16(3), 335-337.
- [21] Nigam, S. K., & Mitra, C. R. (1970). Pithecellobium dulce. V. Chemistry of the seed saponin and constituents of the leaves. *Planta Med*, 18, 44-50.
- [22] Bhargva Krishna, P., Gupta, M. B., & Chittranjan, R. (1970). Anti inflammatory activity of Saponins and other Natural Products. *Indian J. Med. Res.* 58, 724.
- [23] Misra, G., Nigam, S. K., Singh, S., & Saxena, R. C. (1979). Steroid and Triterpenoid Saponins as Spermicidal agents. *Indian Drugs*. 17(1), 6-8.
- [24] Zapesochay, G. G., Yarosh, E. A., Syanidze, N. V., & Yarosh, G. I. (1980). Flavanoids of the leaves of Pithecellobium dulce. *Khim. Prir. Soedin.* 2: 252-253.

- [25] Adinarayana, D., & Ramachandraiah chetty, P. (1985) Chemical Investigation of Some Medicinal Plants Occurring in Southern India. *Indian. J. Chem.* 24B: 453
- [26] Sahu, N. P., & Mahato, S. B. (1994). Anti-inflammatory triterpene saponins of *Pithecellobium dulce*: Characterization of an echinocystic acid bisdesmoside. *Phytochemistry*, 37(5), 1425-1427.
- [27] Nigam, S. K., Gopal, M., Uddin, R., Yoshikawa, K., Kawamoto, M., & Arihara, S. (1997). Pithedulosides A-G, oleanane glycosides from *pithecellobium dulce*. *Phytochemistry*, 44(7), 1329-1334.
- [28] Yoshikawa, K., Suzaki, Y., Tanaka, M., Arihara, S., & Nigam, S. K. (1997). Three Acylated Saponins and a Related Compound from *Pithecellobium dulce*. *Journal of Natural Products*, 60(12), 1269-1274.
- [29] Saxena, V. K., & Singhal, M. (1998). Geinstein 4'- O-alpha -L rhamnopyranoside from *Pithecellobium dulce*. *Fitoterapia*, 69(4), 305-306.
- [30] Saxena, V. K., & Singhal, M. (1999). Novel prenylated flavonoid from stem of *Pithecellobium dulce*. *Fitoterapia*, 70(1), 98-100.
- [31] P. Sahu, N., Koike, K., Jia, Z., Banerjee, S., Achari, B., & Nikaido, T. (1999). A Minor Acylated Triterpenoid Saponin from the Seeds of *Pithecellobium dulce*. *Journal of Chemical Research, Synopses*(9), 558-559.
- [32] Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., & Barrera-Necha, L. L. (2000). Antifungal screening of plants of the state of Morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *ReV. Mex. Fitopatol*, 18, 36-41.
- [33] Barrera-Necha, L., Bautista-Baños, S., Jiménez-Estrada, M., & Reyes-Chilpa, R. (2002). Influence of leaf, fruit and seed powders and extracts of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Fabaceae) on the in Vitro vegetative growth of seven postharvest fungi. *ReV.Mex. Fitopatol*, 20, 66-70.
- [34] Bautista-Baños, S., García-Domínguez, E., Barrera-Necha, L. L., Reyes-Chilpa, R., & Wilson, C. L. (2003). Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 29(1), 81-92.

- [35] Peraza-Sánchez, S. R., Chan-Che, E. O., & Ruiz-Sánchez, E. (2005). Screening of Yucatecan Plant Extracts To Control *Colletotrichum gloeosporioides* and Isolation of a New Pimarene from *Acacia pennatula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2429-2432.
- [36] Delgado-Vargas, F., López-Valdés, H. E., Valdés-Rodríguez, S., Blanco-Labra, A., Chagolla-López, A., & López-Valenzuela, E. d. J. (2004). Isolation and Properties of a Kunitz-Type Protein Inhibitor Obtained from *Pithecellobium dulce* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6115-6121.
- [37] Banarjee, A. (2005). Studies on alkylated resin from *Pithecellobium dulce*. *J Indian Chem Soc.* 82, 186-187.
- [38] Pithayanukul, P., Ruenraroengsak, P., Bavovada, R., Pakmanee, N., Suttisri, R., & Saen-oon, S. (2005). Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 527-533.
- [39] Shanmugakumaran, S. D., Amerjothy, S., Balakrishna, K. & Vasantha kumar, M. S. (2005). Antimycobacterial properties of leaf extracts of *Pithecellobium dulce* Benth. *Indian Drugs*. 42(6), 392-395.
- [40] Shanmugakumaran, S. D., Amerjothy, S., & Balakrishna, K. (2006). Pharmacognostical, Antibacterial and Antifungal Potentials Of The Leaf extracts of *Pithecellobium dulce* Benth. *Phcog. Mag.* 7(2), 163-167.
- [41] Katekhaye, S. D., & Kale, M. S. (2012). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth wood bark and leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(3), 47-57.
- [42] Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., & Yogalakshmi, K. (2012). Adulticidal activity of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(2), 124-128.
- [43] Rajeswary, M., & Govindarajan, M. (2014). Adulticidal properties of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Family: Fabaceae) against dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, Supplement 1(0), S449-S452.
- [44] Mandal, S., Patra, A., Samanta, A., Roy, S., Mandal, A., Mahapatra, T. D., & Nandi,

- D. K. (2013). Analysis of phytochemical profile of Terminalia arjuna bark extract with antioxidative and antimicrobial properties. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(12), 960-966.
- [45] Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. d., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127-130.
- [46] Prasannabalaji, N., Muralitharan, G., Sivanandan, R. N., Kumaran, S., & Pugazhvendan, S. R. (2012). Antibacterial activities of some Indian traditional plant extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, Supplement 1(0), S291-S295.
- [47] Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif.)*, 42(4), 321-324.
- [48] Kharrat, N., Aissa, I., Sghaier, M., Bouaziz, M., Sellami, M., Laouini, D., & Gargouri, Y. (2014). Lipophilization of Ascorbic Acid: A Monolayer Study and Biological and Antileishmanial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(37), 9118-9127.
- [49] Prabhakar, P. K., & Doble, M. (2011). Interaction of Cinnamic Acid Derivatives with Commercial Hypoglycemic Drugs on 2-Deoxyglucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9835-9844.
- [50] Soares da Costa, T. P., Tieu, W., Yap, M. Y., Zvarec, O., Bell, J. M., Turnidge, J. D., Polyak, S. W. (2012). Biotin Analogues with Antibacterial Activity Are Potent Inhibitors of Biotin Protein Ligase. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(6), 509-514.
- [51] Dilika, F., Bremner, P. D., & Meyer, J. J. M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from Helichrysum pedunculatum: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 71(4), 450-452.
- [52] Choi, J. S., Park, N. H., Hwang, S. Y., Sohn, J. H., Kwak, I., Cho, K. K., & Choi, I. S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *J Environ Biol*, 34(4), 673-676.
- [53] Guzman, J. D. (2014). Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, 19(12), 19292-19349.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลาย



การเตรียมสารละลายแอนิซัลดีไฮด์ (anisaldehyde)

เอทานอล 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร และแอนิซัลดีไฮด์ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเตรียมเสร็จแล้วทำการเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

การเตรียม 0.85% โซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

การเตรียม 0.1% รีซาซูริน (resazurin solution)

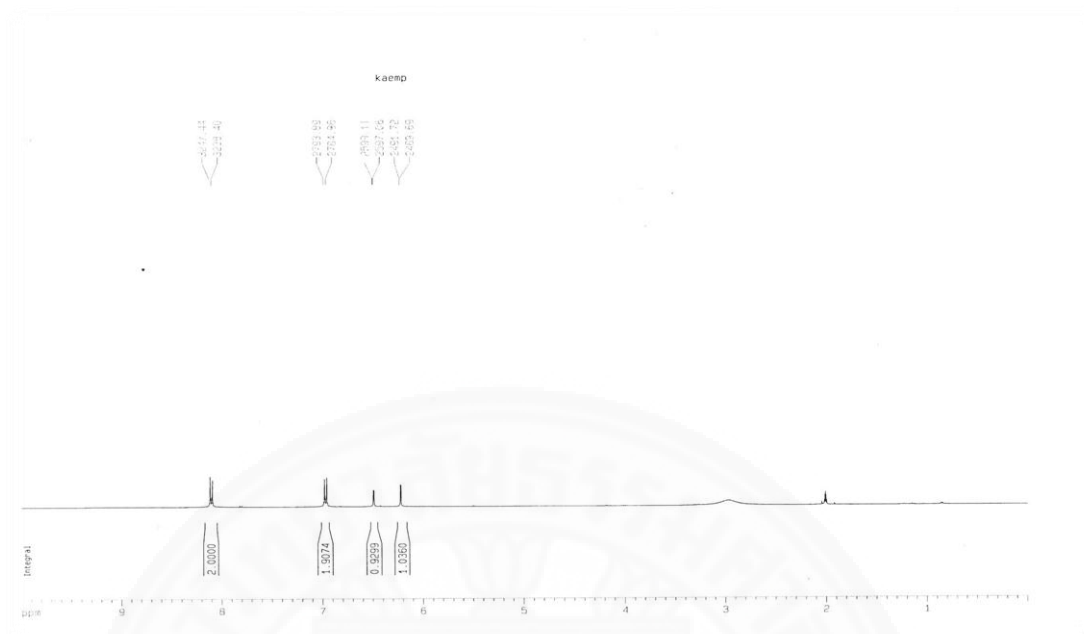
ชั่งรีซาซูริน (Resazurin sodium salt) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

การเตรียม 3.3xอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (3.3xNB)

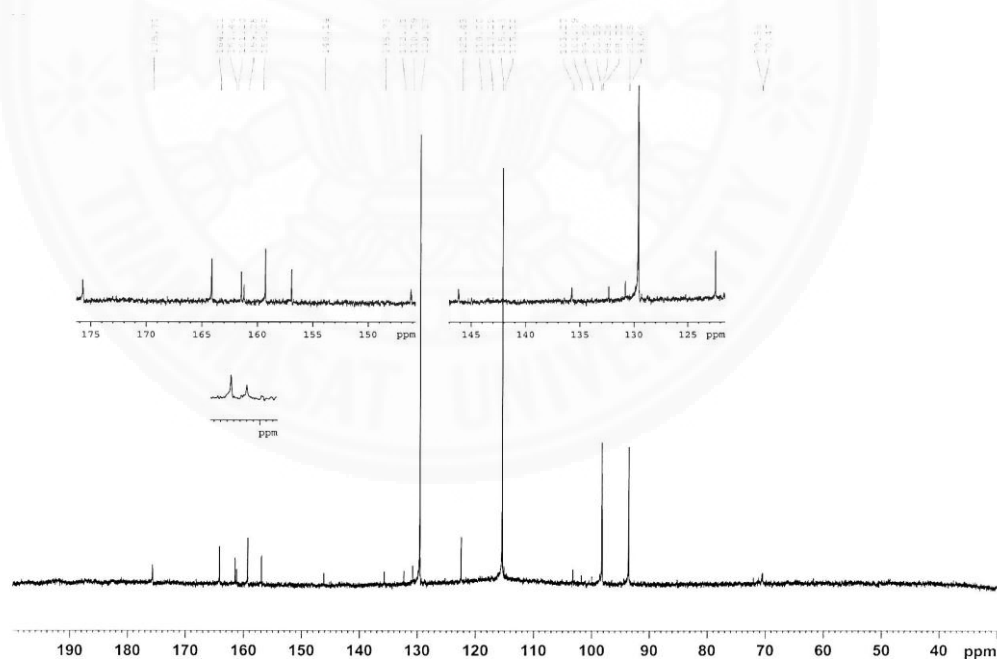
ชั่งอาหารสำเร็จรูป NB 4.29 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์และอนุพันธ์

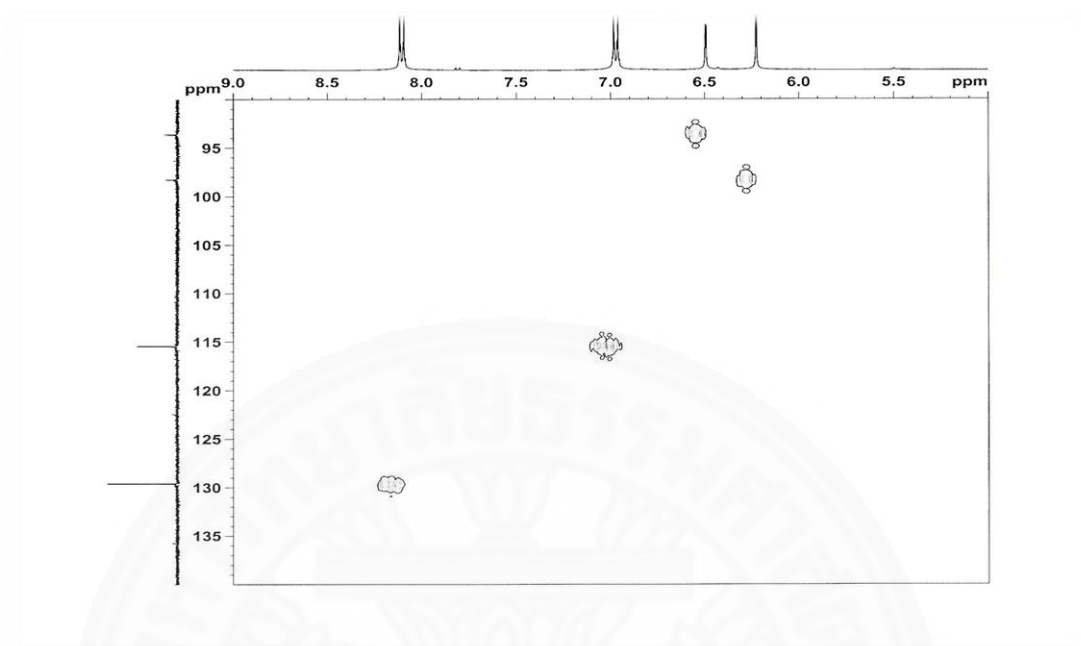




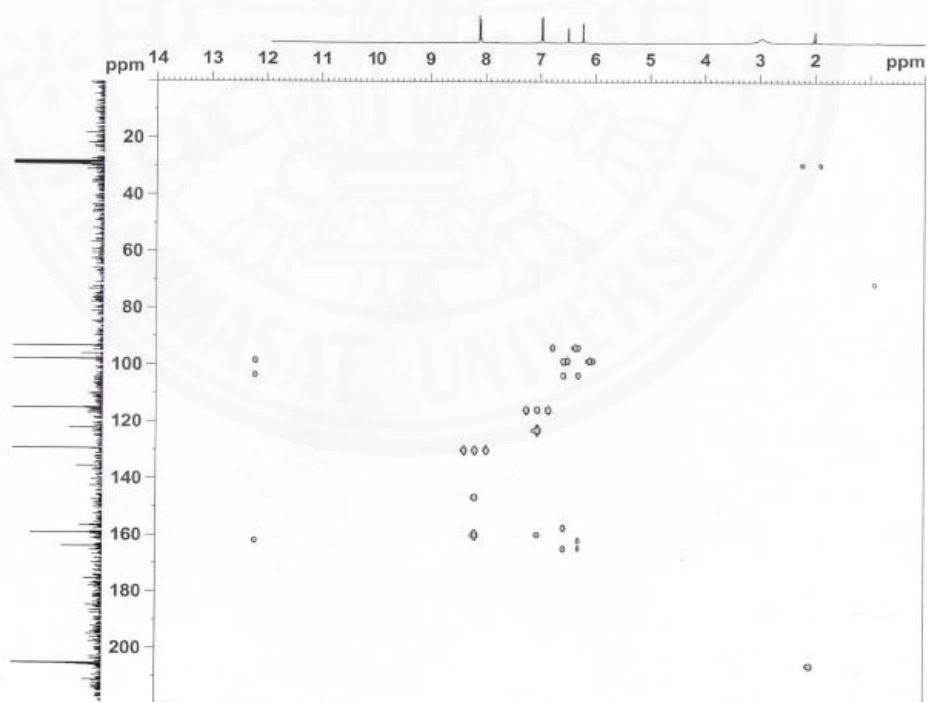
ภาพที่ ข1 ¹H NMR spectrum (CD₃OD, 400MHz) ของเคมเฟอรอล (8)



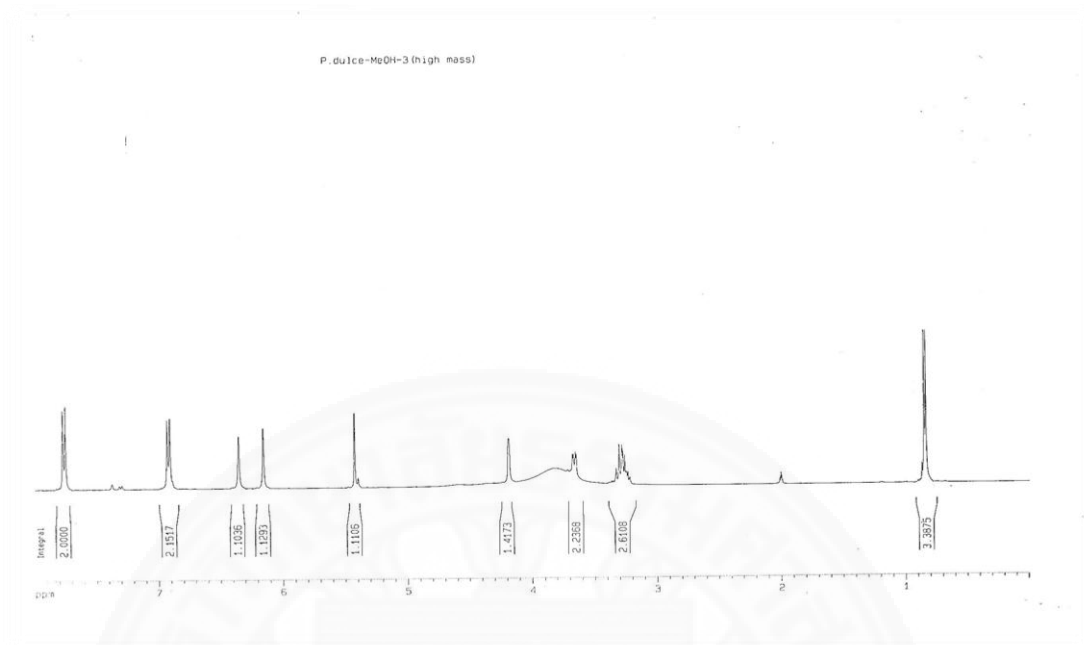
ภาพที่ ข2 ¹³C NMR spectrum (CD₃OD, 100MHz) ของเคมเฟอรอล (8)



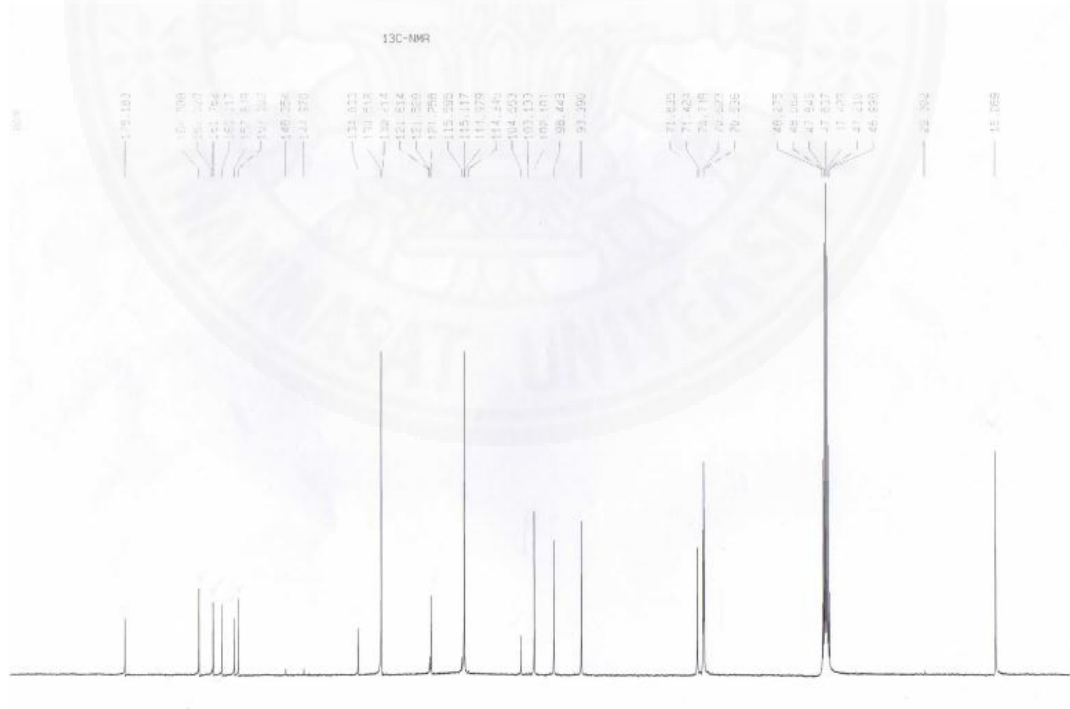
ภาพที่ ข3 HMQC spectrum ของเคมเฟอรอล (8) ในตัวทำละลาย CD_3OD



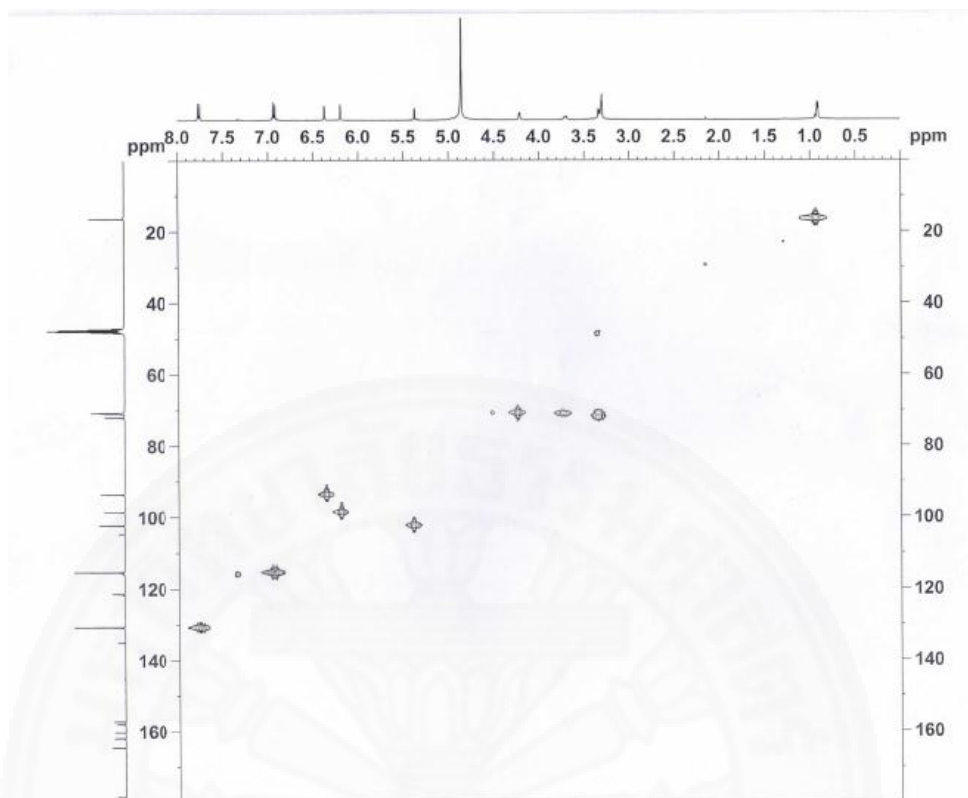
ภาพที่ ข4 HMBC spectrum ของเคมเฟอรอล (8) ในตัวทำละลาย CD_3OD



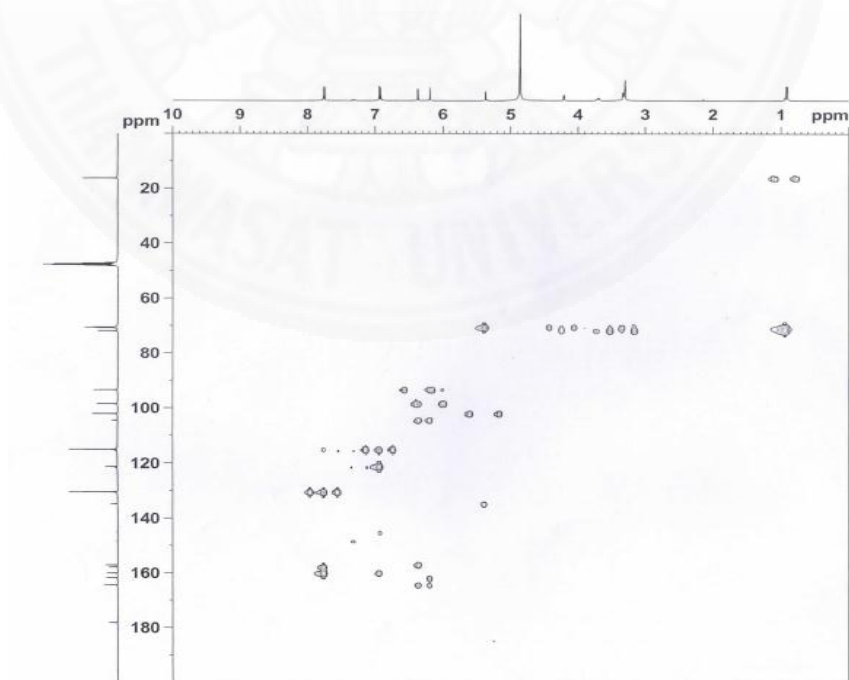
ภาพที่ ข5 ^1H NMR spectrum (CD_3OD , 400MHz) ของแคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (7)



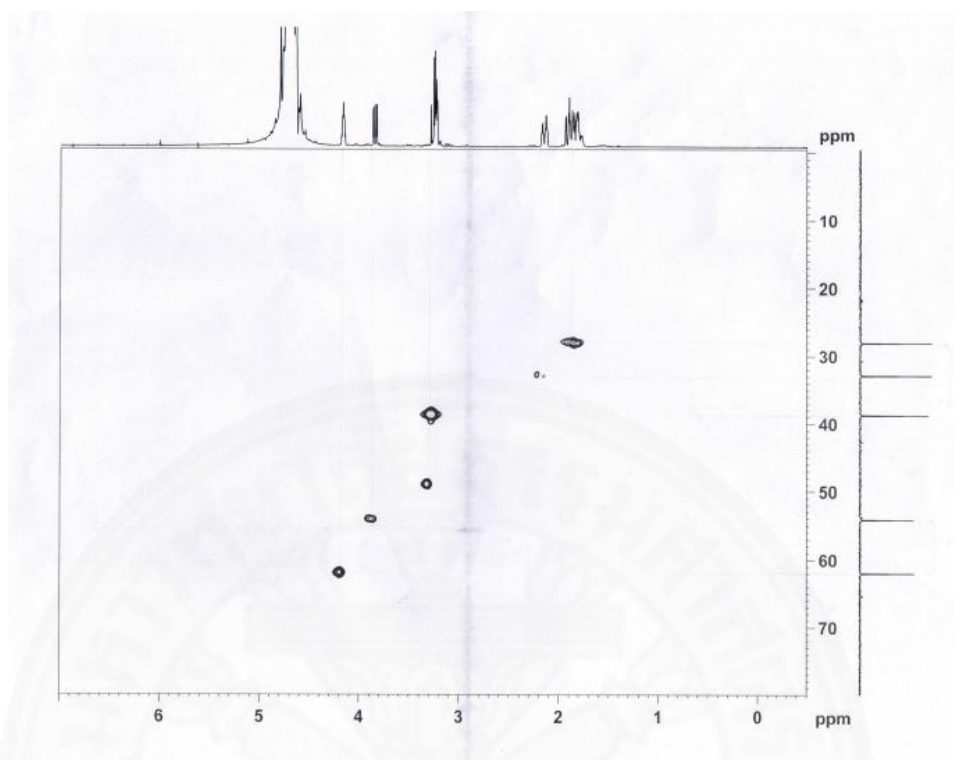
ภาพที่ ข6 ^{13}C NMR spectrum (CD_3OD , 100MHz) ของแคมเฟอร์อล-3-รามโนไซด์ (7)



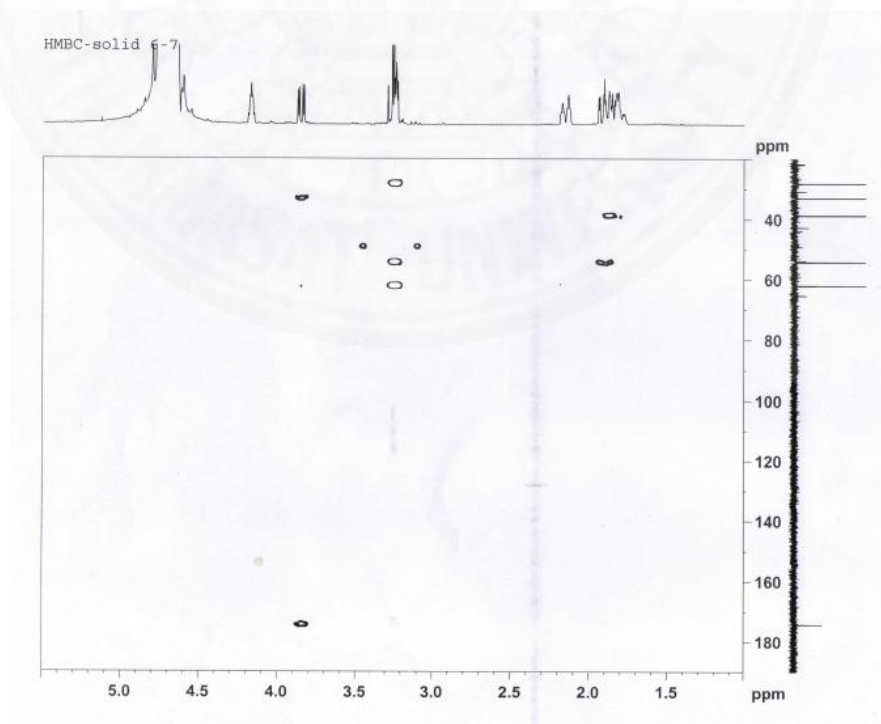
ภาพที่ ข7 HMQC spectrum ของแคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7) ในตัวทำละลาย CD_3OD



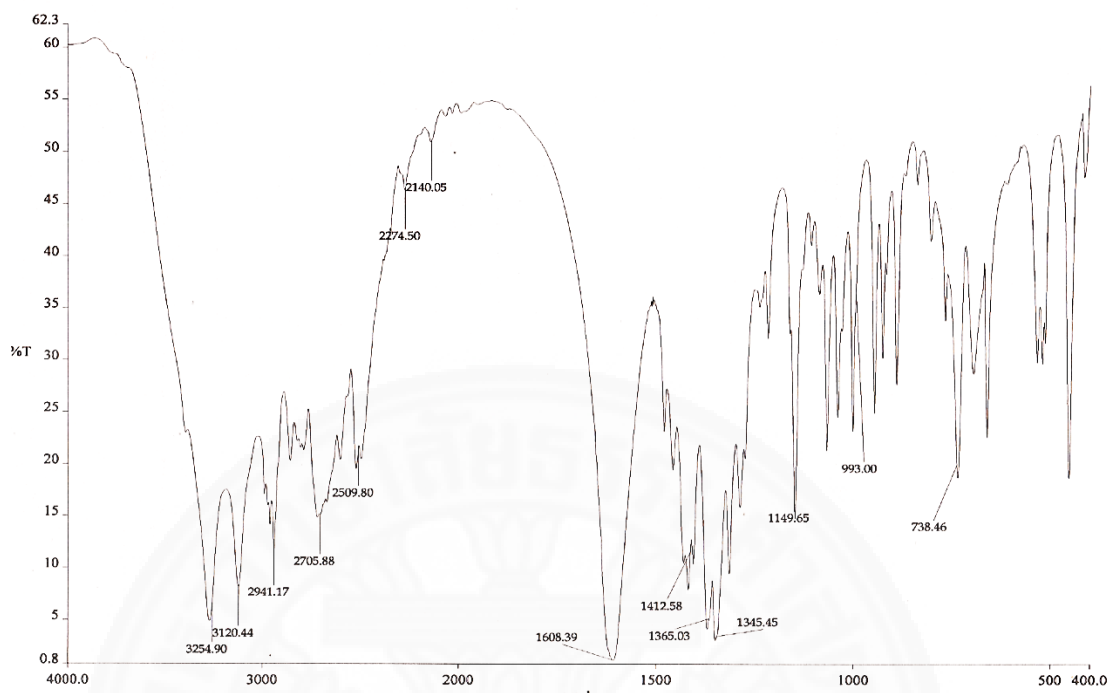
ภาพที่ ข8 HMBC spectrum ของแคมเฟอร์อล-3-แรมโนไซด์ (7) ในตัวทำละลาย CD_3OD



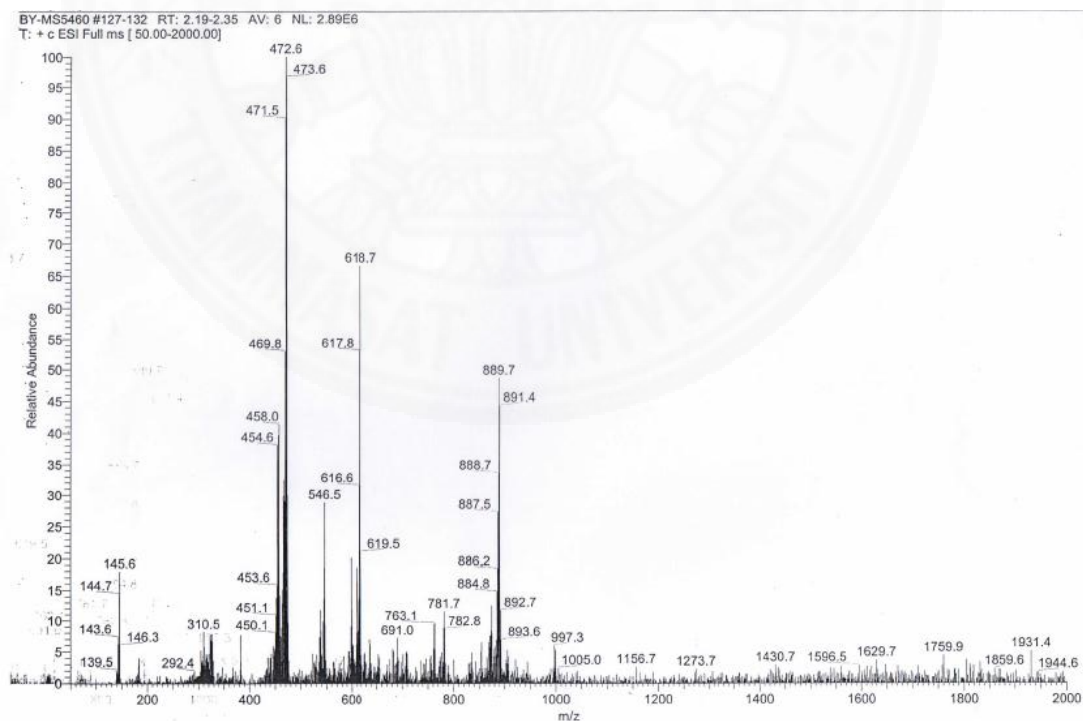
ภาพที่ ข11 HMQC spectrum ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไฟเพอริน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ในตัวทำละลาย D_2O



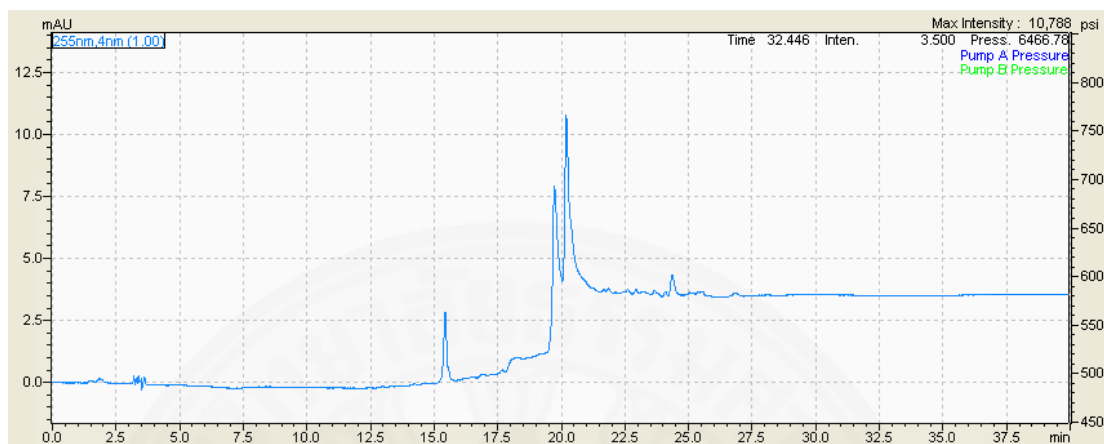
ภาพที่ ข12 HMBC spectrum ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไฟเพอริน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28) ใน D_2O



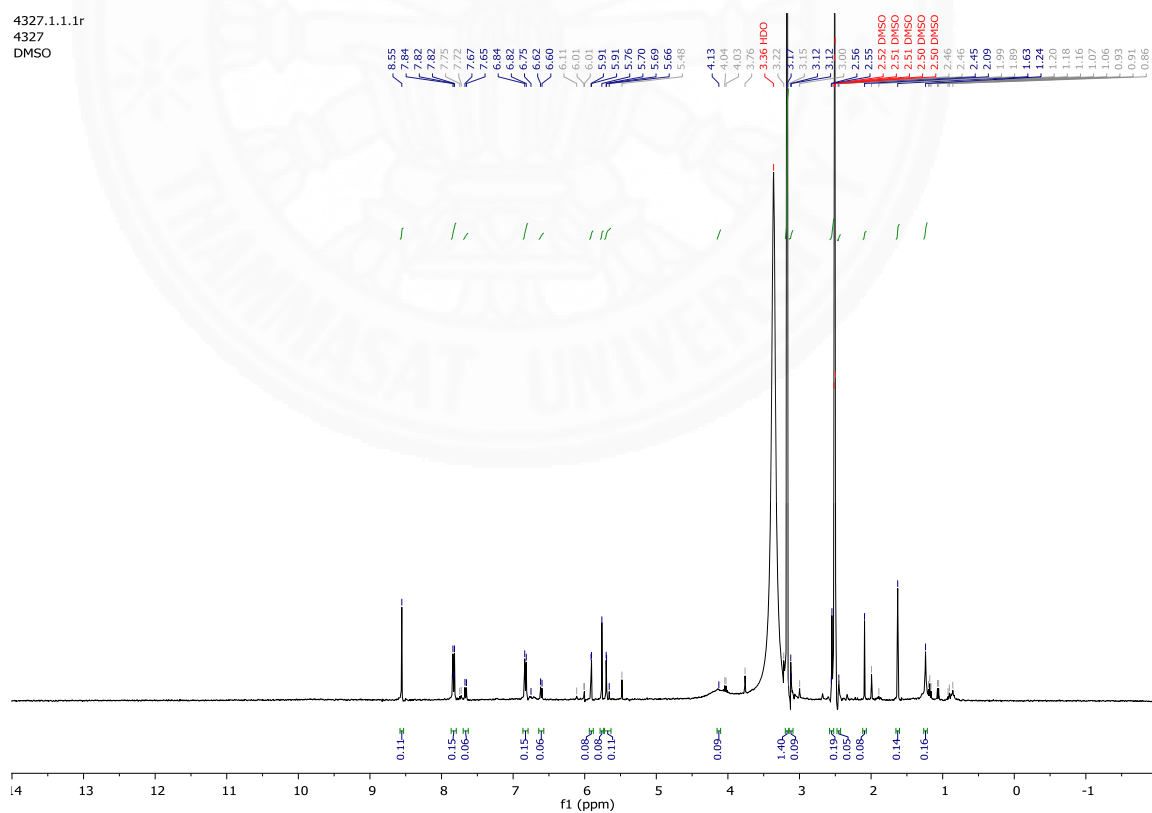
ภาพที่ ข13 อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไฟเพอริติน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)



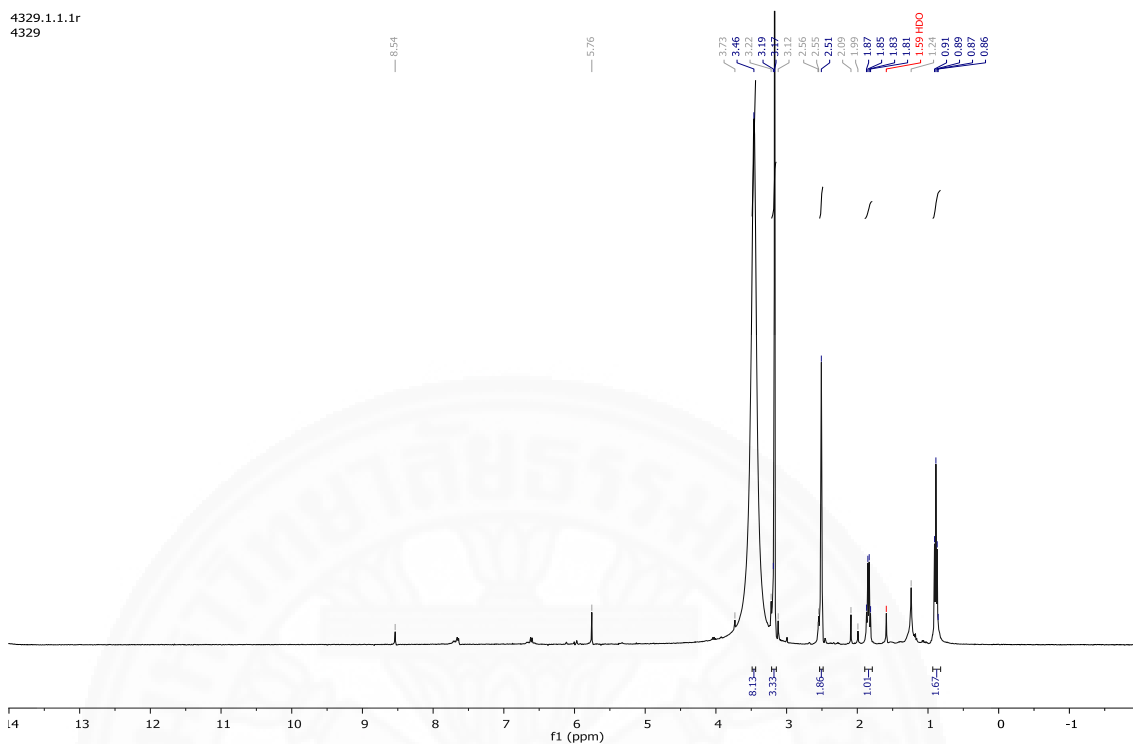
ภาพที่ ข14 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไฟเพอริติน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)



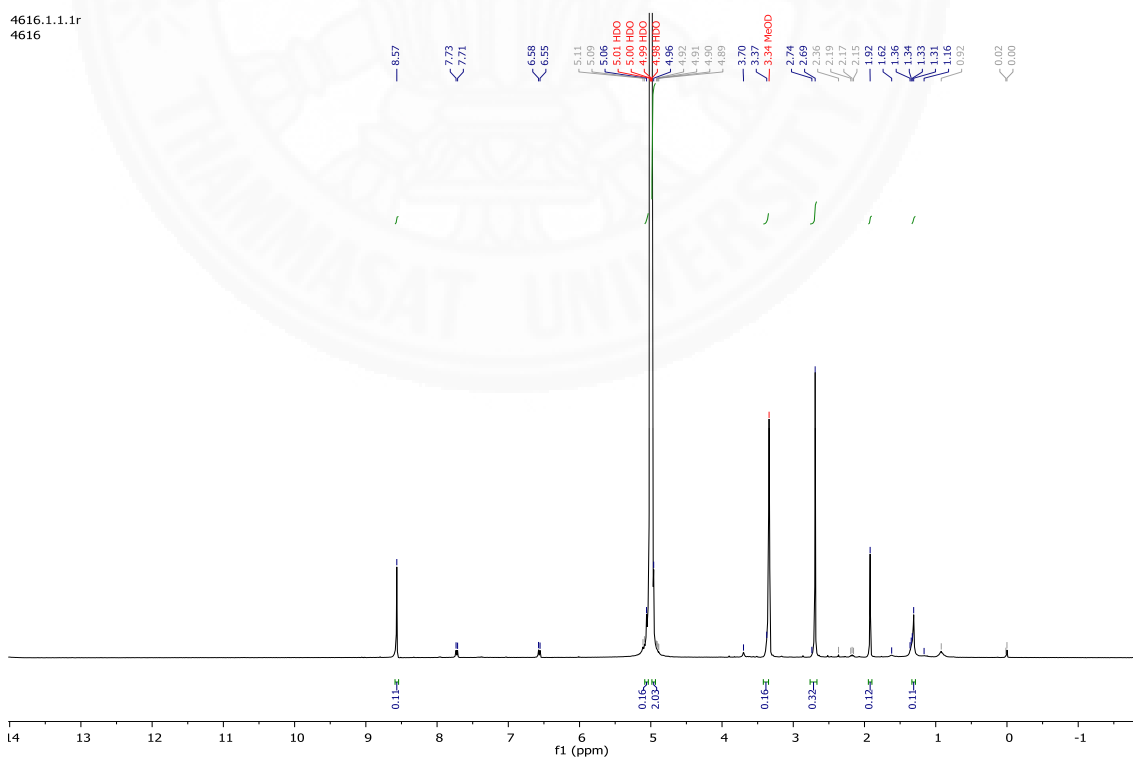
ภาพที่ ข15 HPLC chromatogram ของ 4,5-อีพ็อกซี-ไพเพอริดีน-3-คาร์บอกซิลิก เอซิด (28)



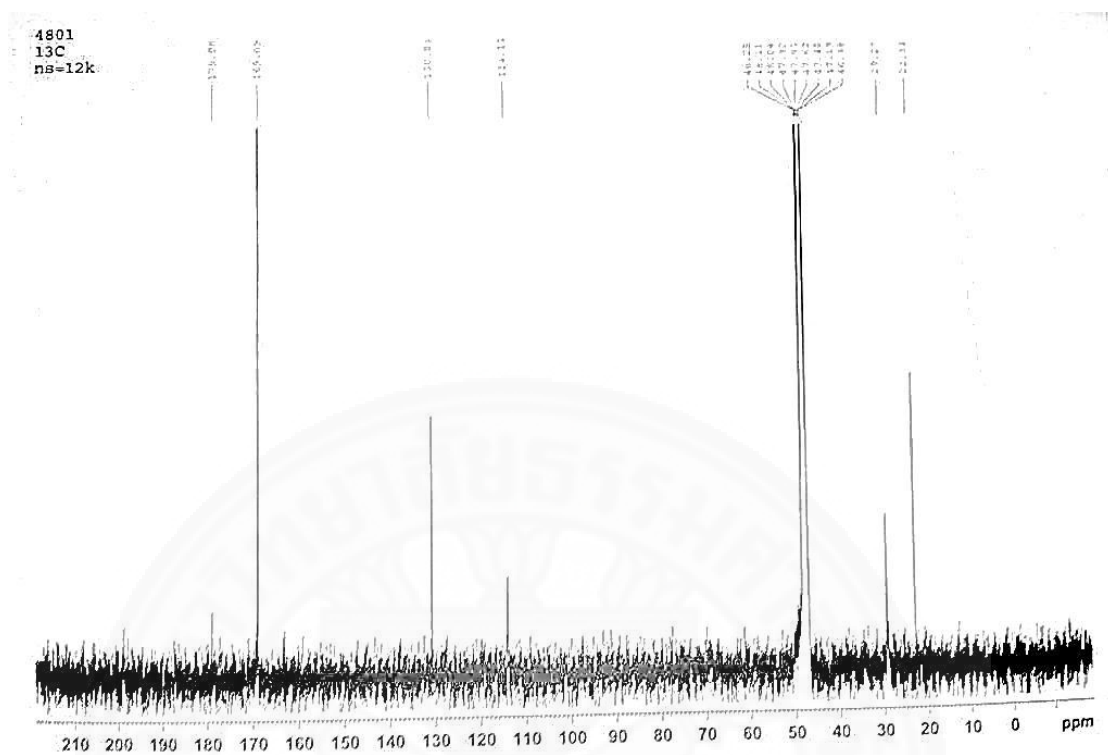
ภาพที่ ข17 ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 400MHz) ของอนุพันธ์เคมเฟอรอล กับอะซิติล แอนไฮไดรด์ (34)



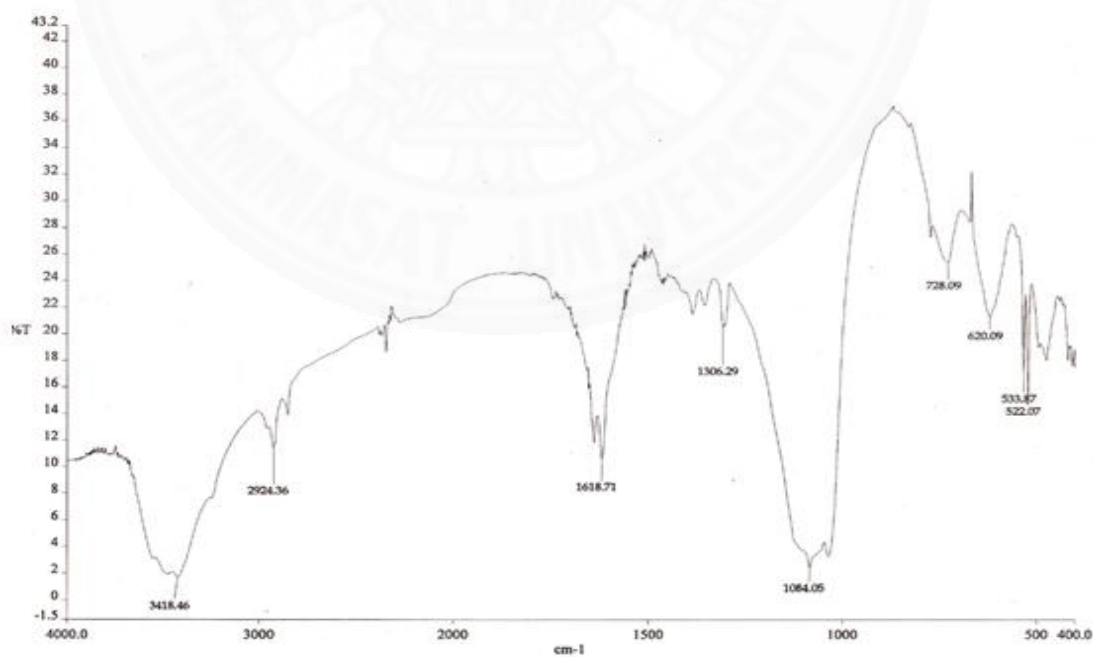
ภาพที่ ข17 ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 400MHz) ของอนุพันธ์เคมเฟอรอล กับโพรไพโอนิก แอนไฮไดรด์ (35)



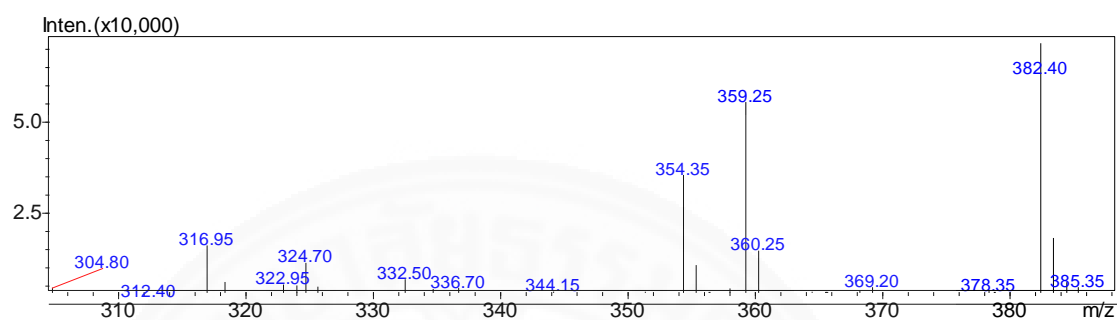
ภาพที่ ข18 ^1H NMR spectrum (CD₃OD, 400MHz) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)



ภาพที่ ข19 ^{13}C NMR spectrum (CD_3OD , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)



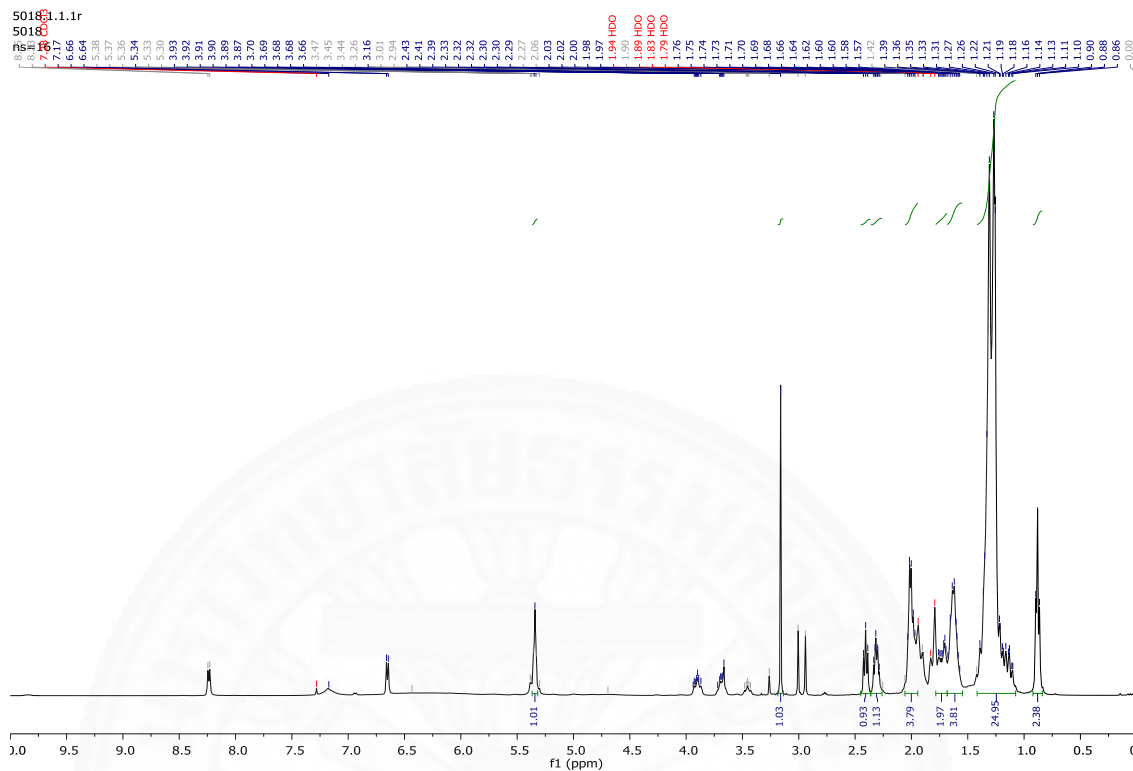
ภาพที่ ข20 อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)



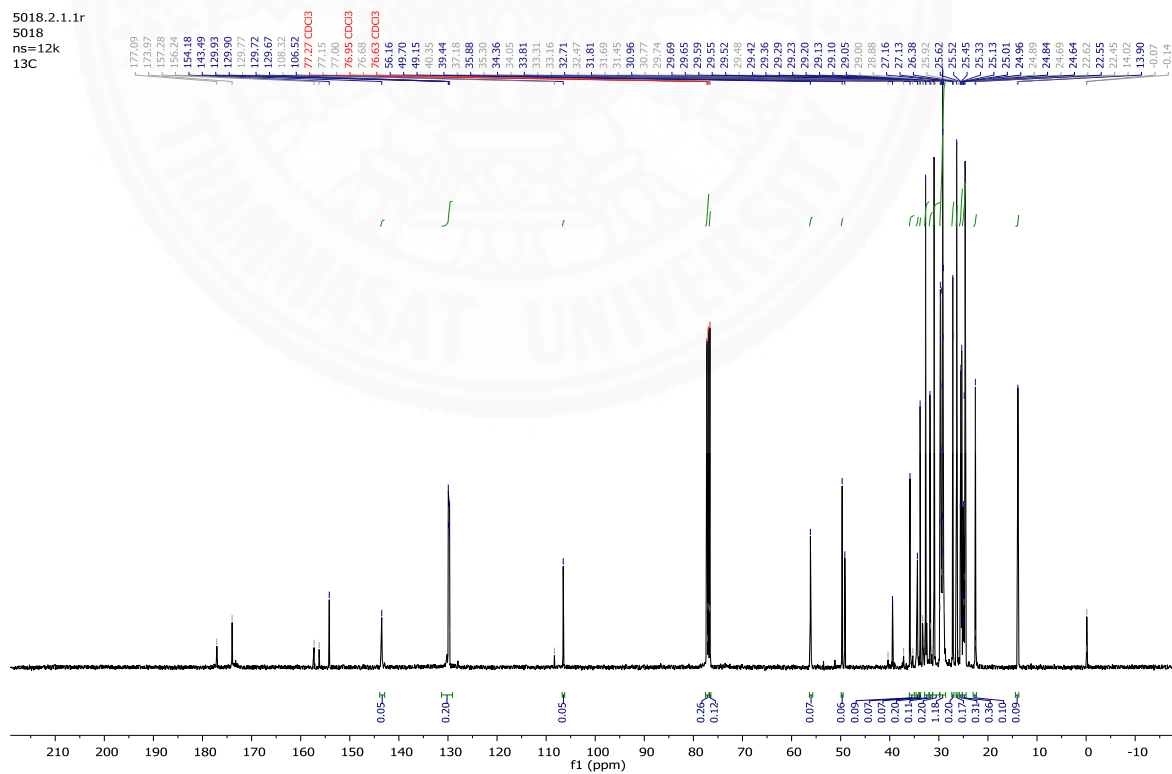
ภาพที่ ข21 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)



ภาพที่ ข22 HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-3,6-ไดอะซีเตต (29)



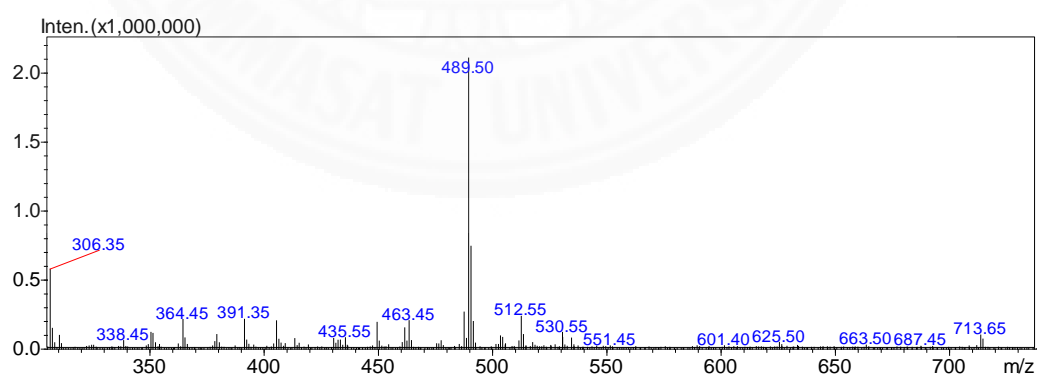
ภาพที่ ข23 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)



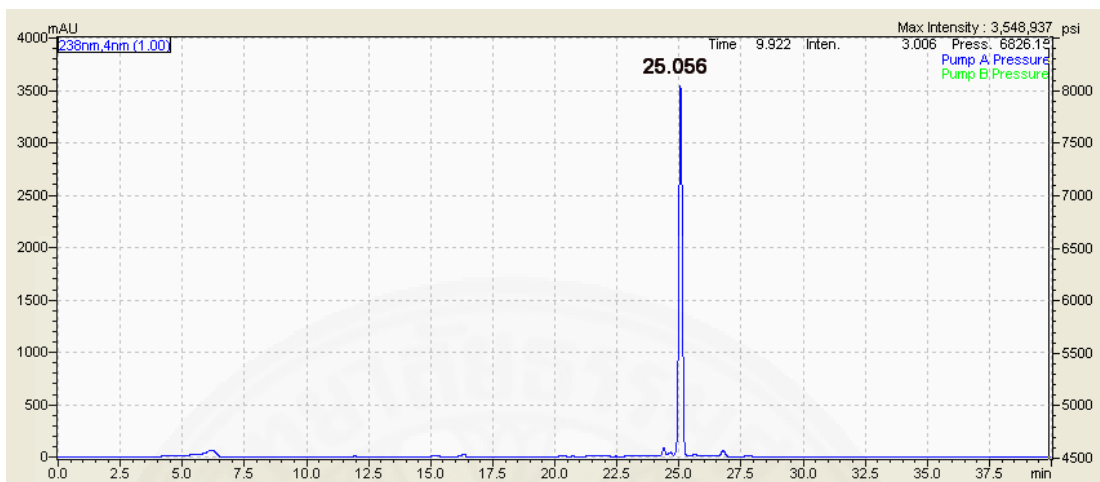
ภาพที่ ข24 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)



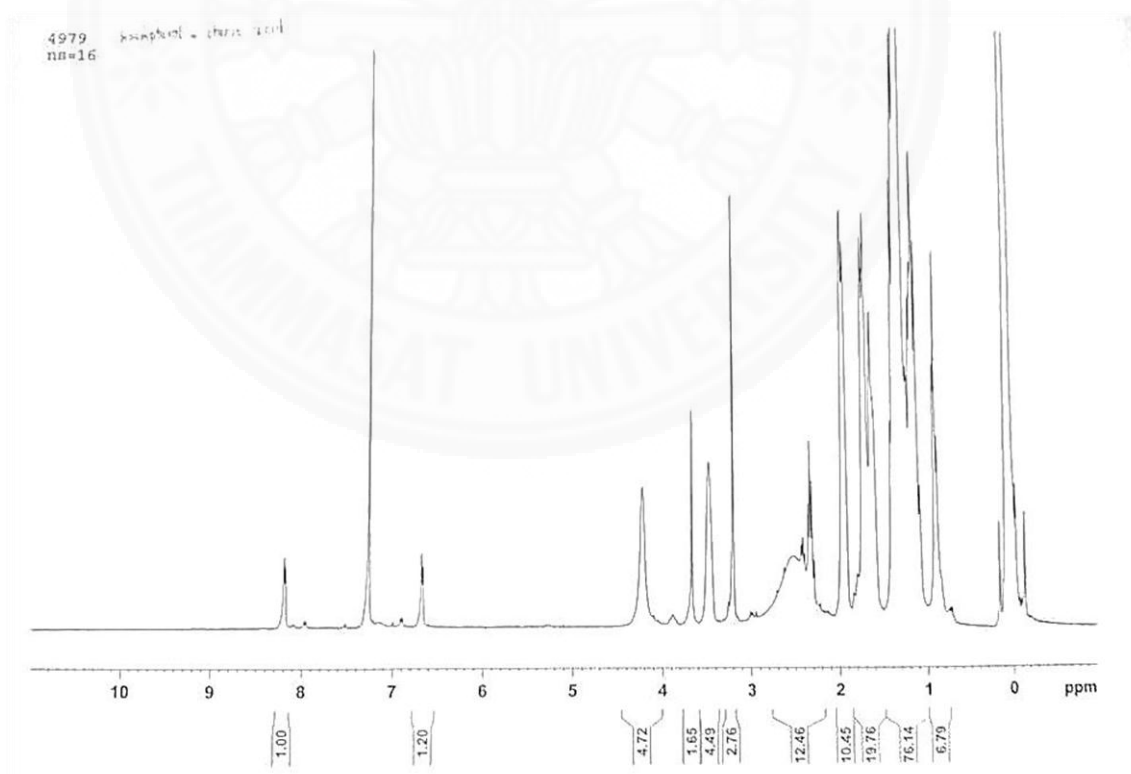
ภาพที่ ข25 อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของแคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (30)



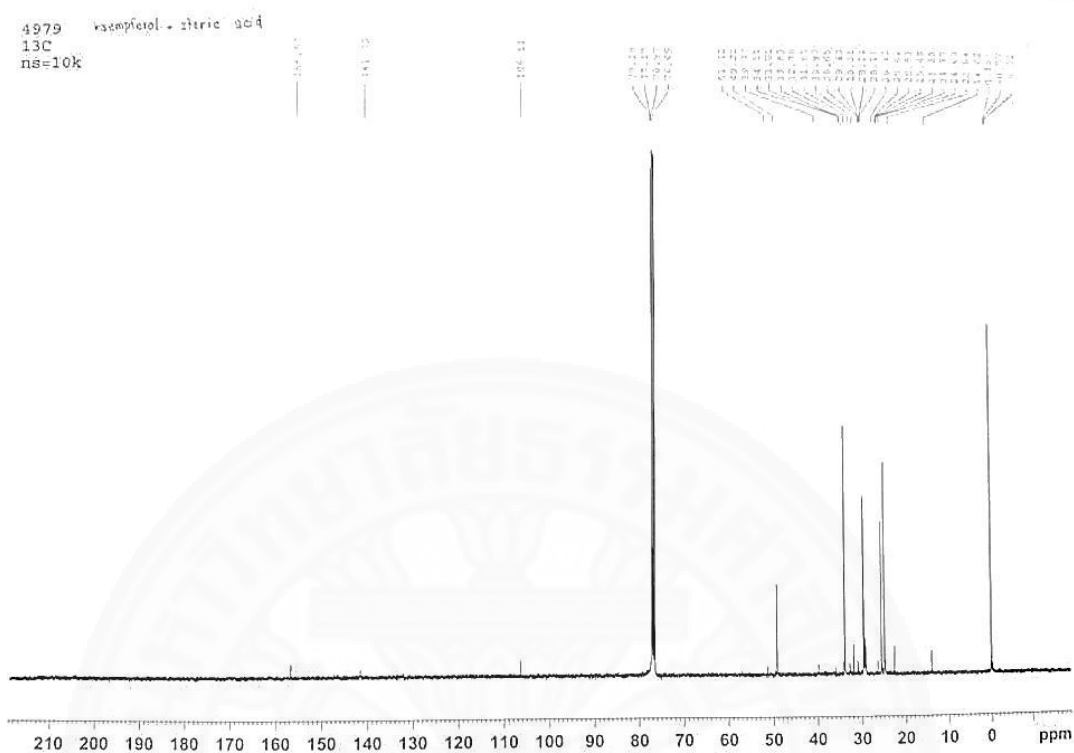
ภาพที่ ข26 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของแคมเฟอร์อล-6-โอเลอิก เอซิด (30)



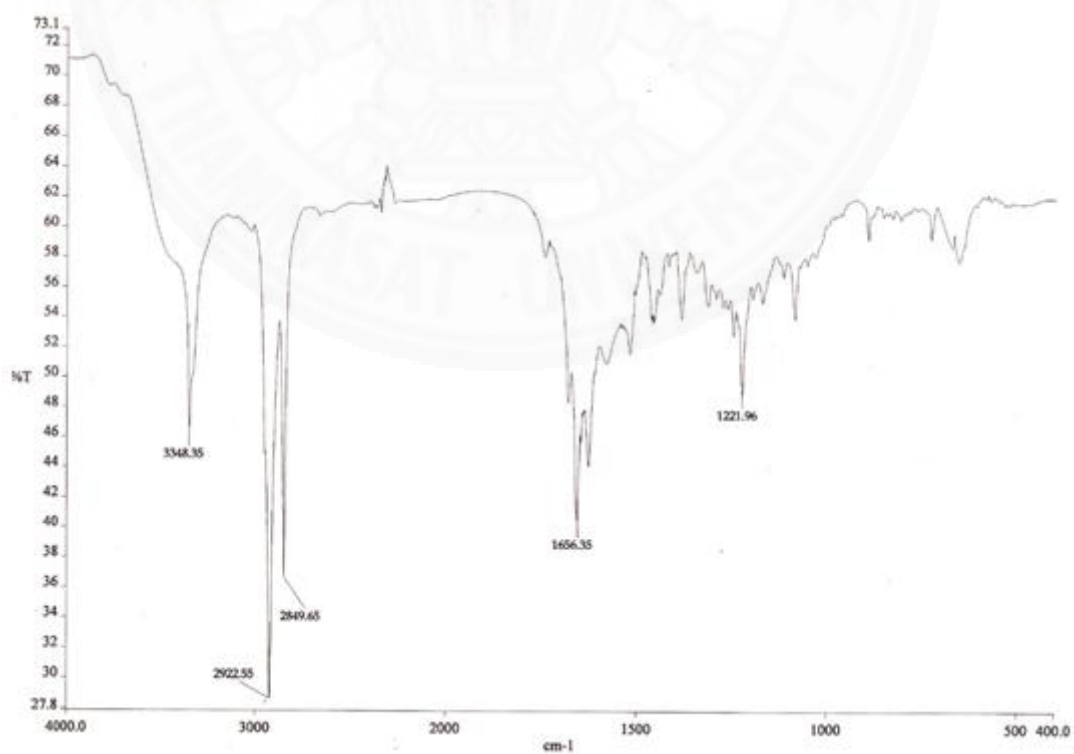
ภาพที่ ข27 HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-โอเลอิก เอซิด (30)



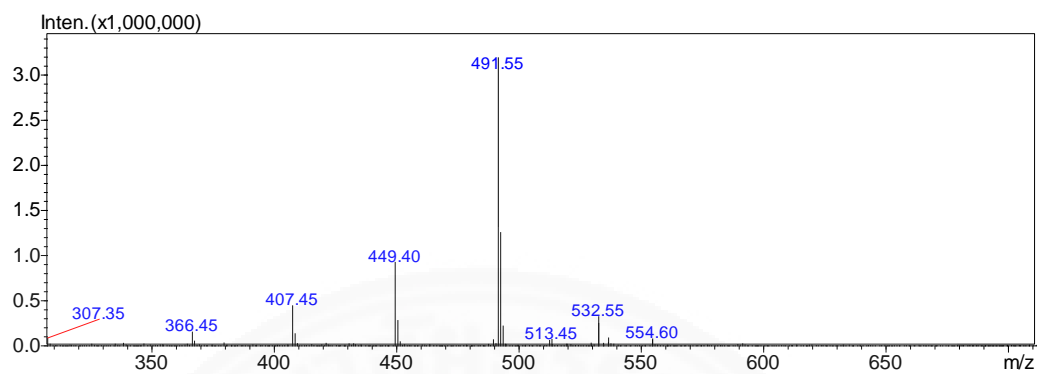
ภาพที่ ข28 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-สเตอริก เอซิด (31)



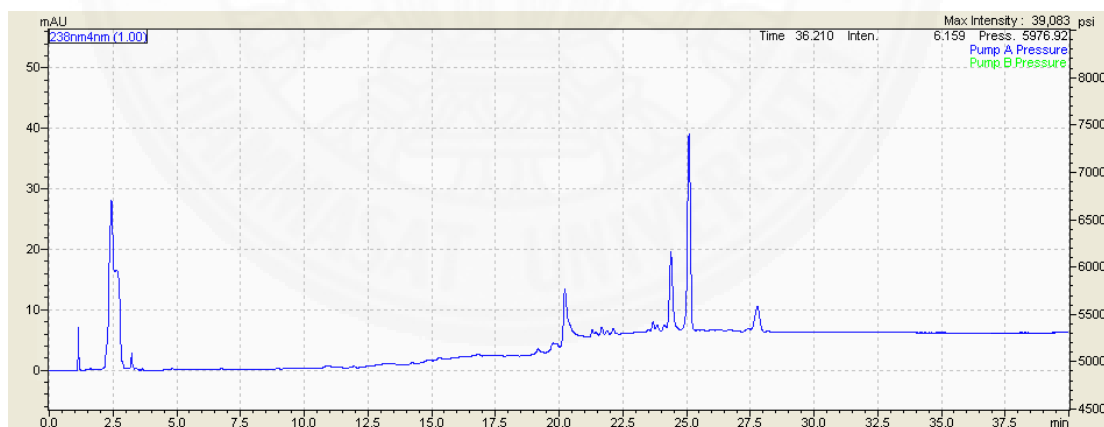
ภาพที่ ๒๙ ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของแคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (31)



ภาพที่ ๓๐ อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของแคมเฟอร์อล-6-สเตียริก เอซิด (31)

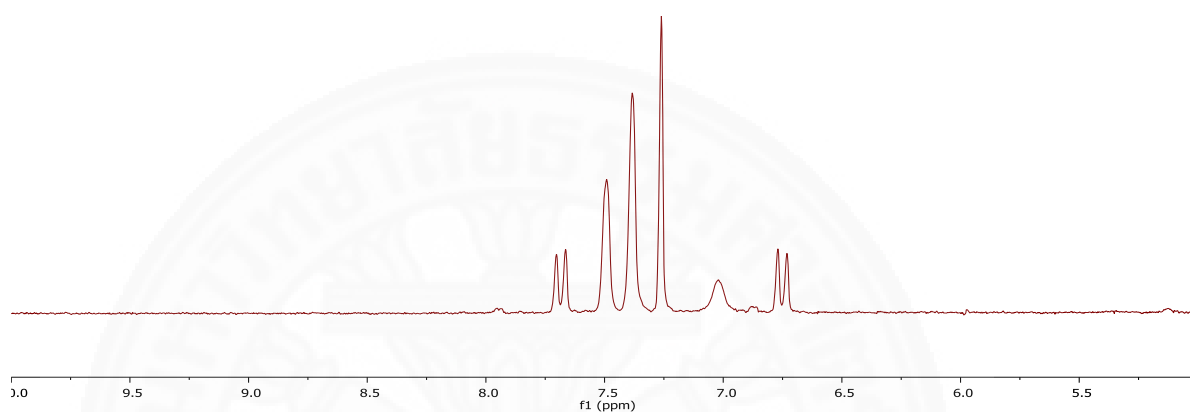


ภาพที่ ข31 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)

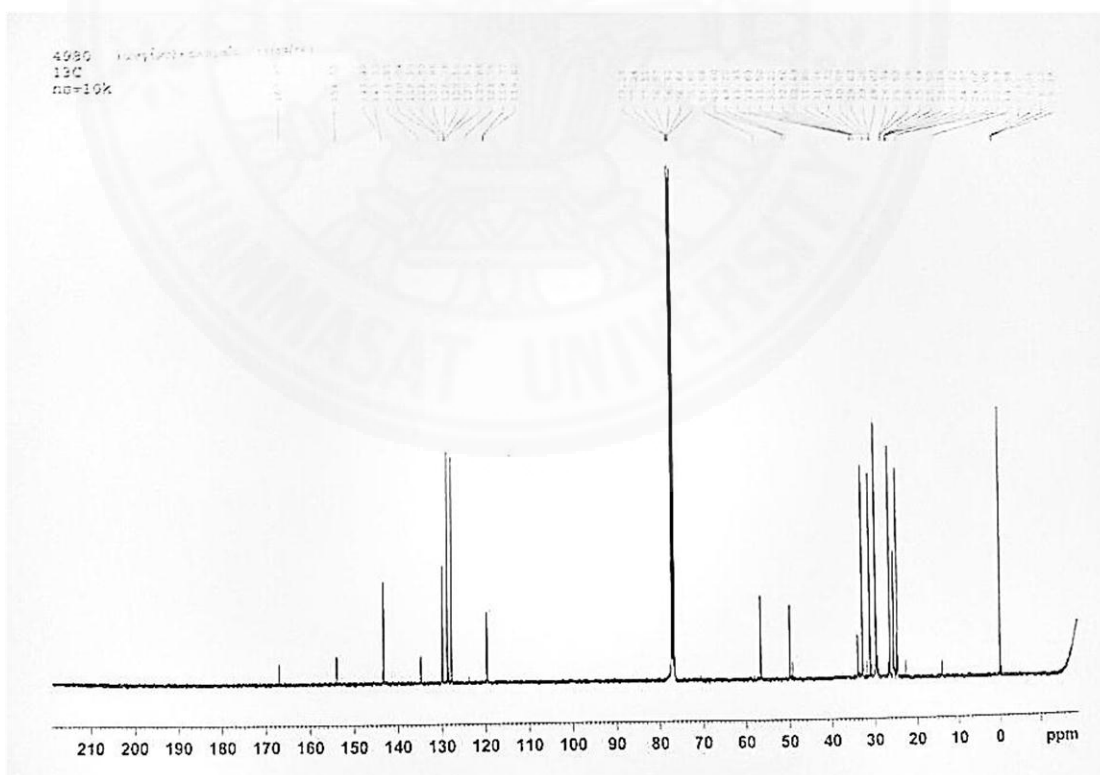


ภาพที่ ข32 HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-สเตียริก เอซิด (31)

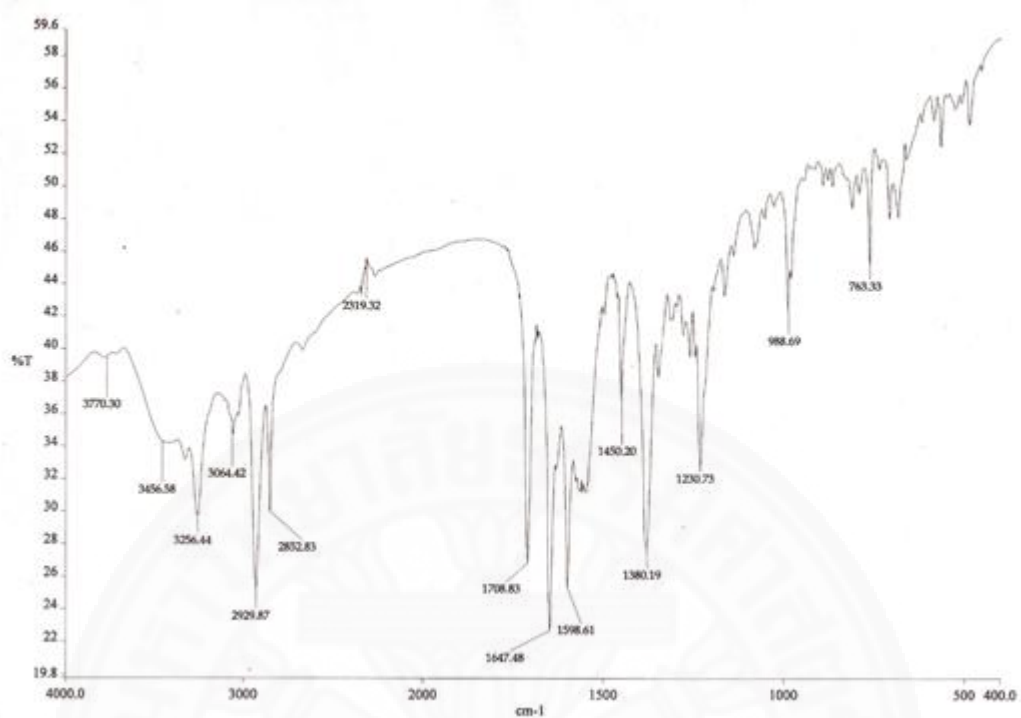
5929.1.1.1r
5929



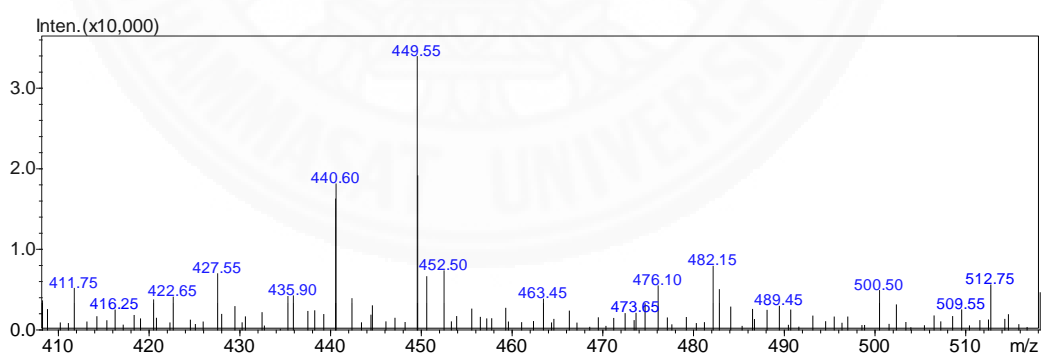
ภาพที่ ข33 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400MHz) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)



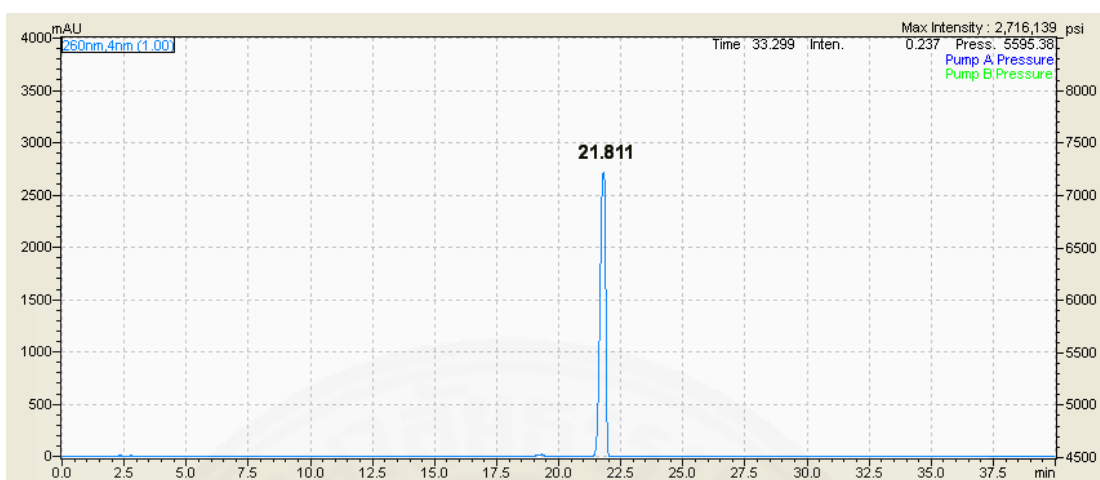
ภาพที่ ข34 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)



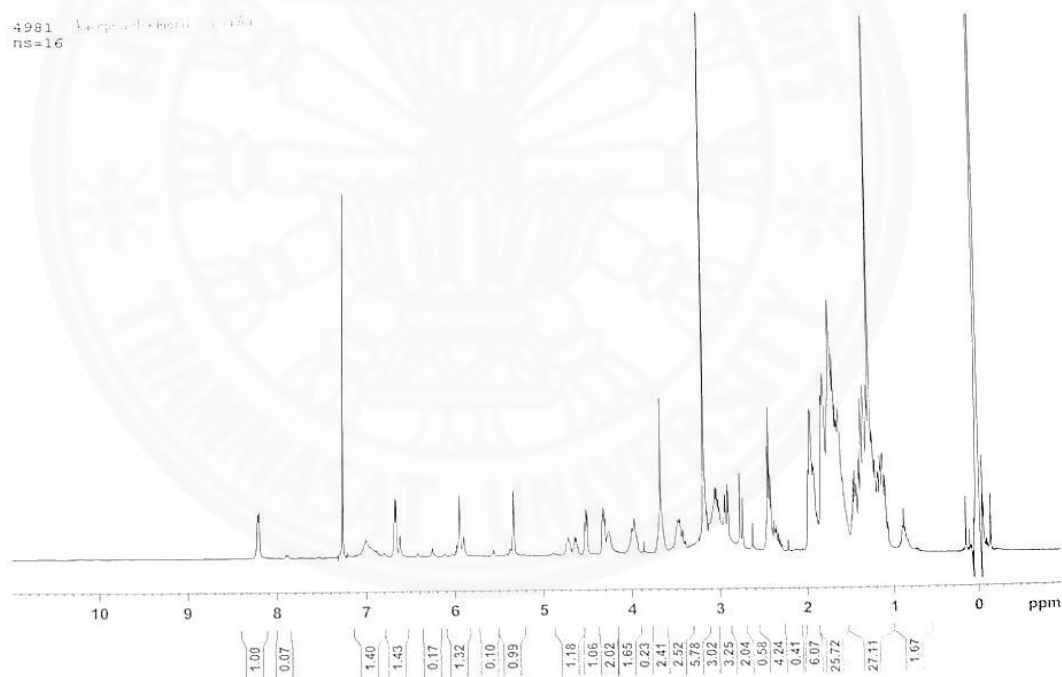
ภาพที่ ข35 อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (32)



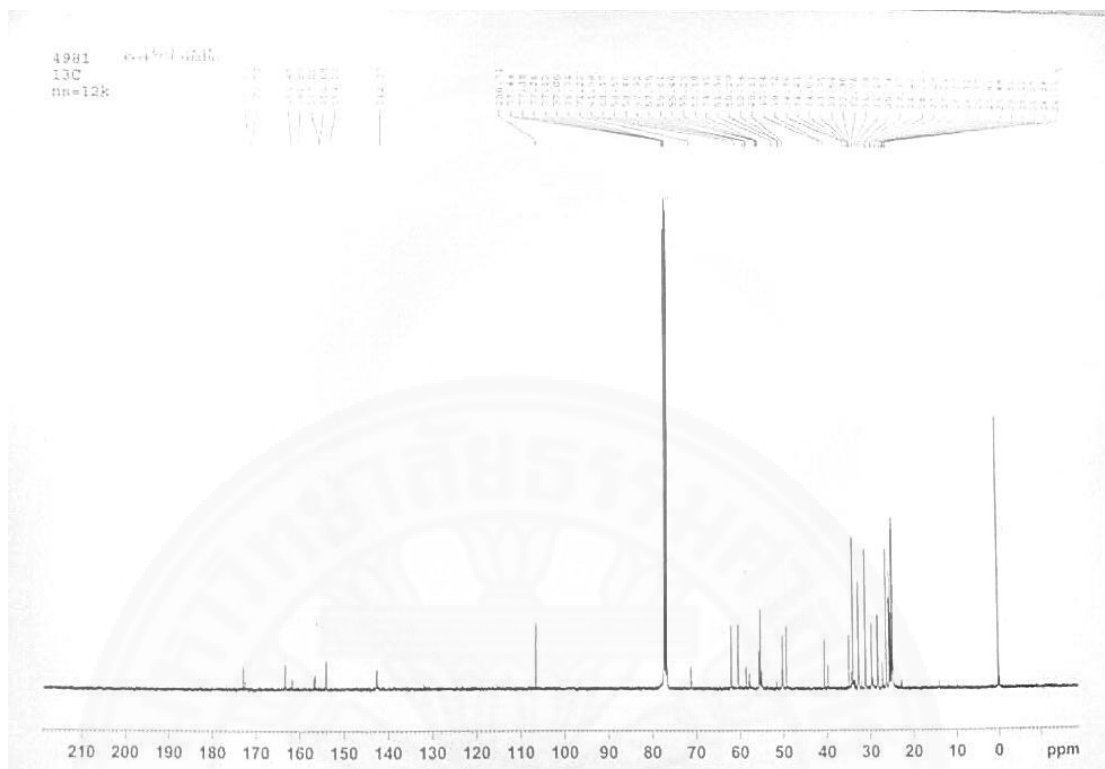
ภาพที่ ข36 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอร์อล-6-ซินนามิก เอซิด (32)



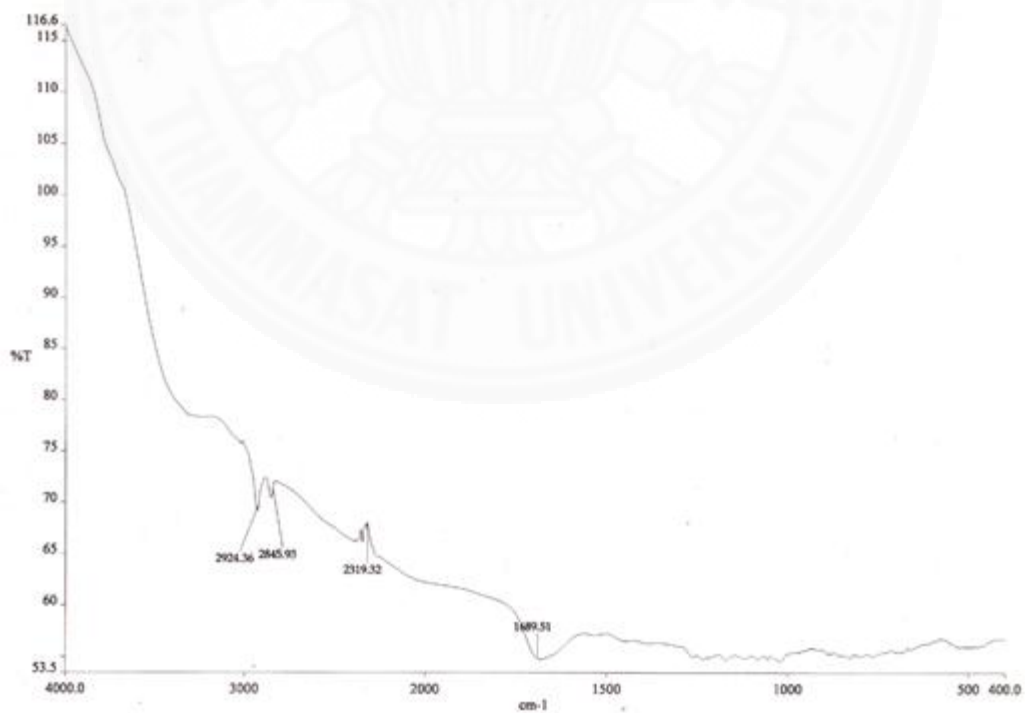
ภาพที่ 37 HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-6-ซินนามิก เอซิด (32)



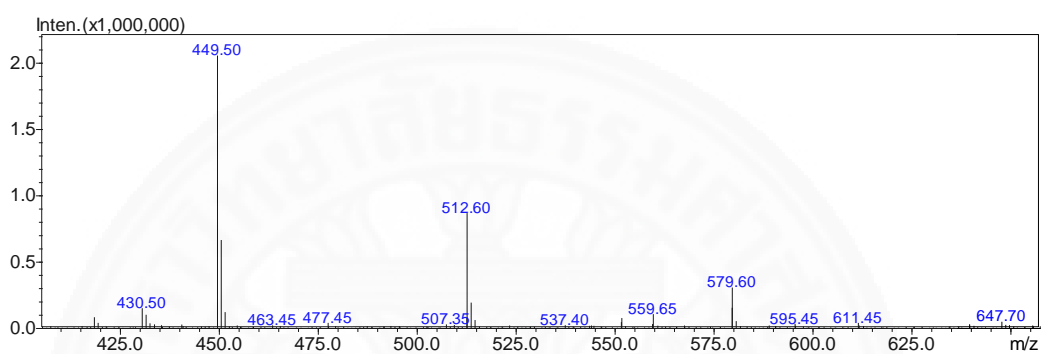
ภาพที่ 38 ^1H NMR spectrum (CDCl₃, 400MHz) ของเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (33)



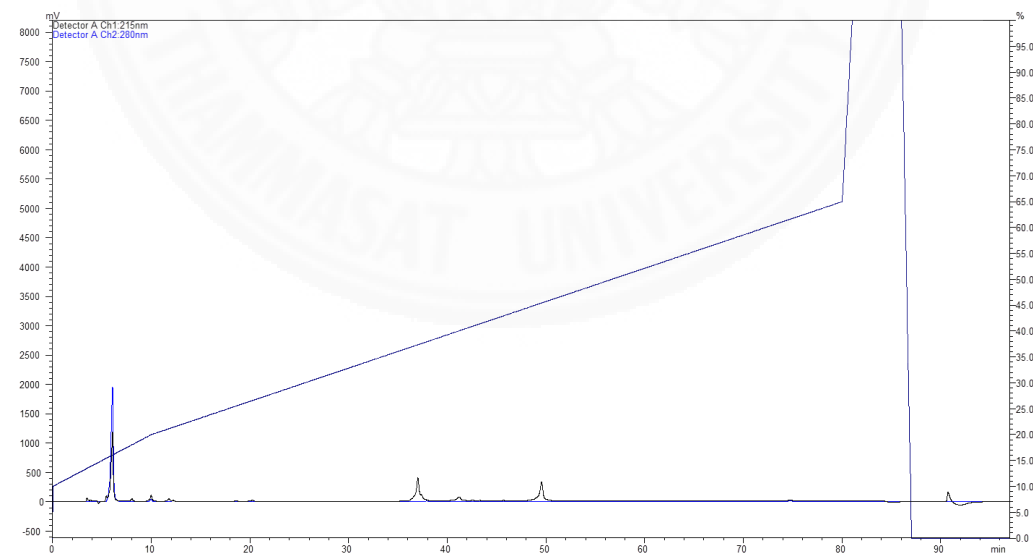
ภาพที่ ข39 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100MHz) ของเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (33)



ภาพที่ ข40 อินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectrum) ของเคมเฟอรอล-3-ไบโอทิน (33)



ภาพที่ ข41 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของเคมเฟอรอล-3-โบโอทิน (33)



ภาพที่ ข42 HPLC chromatogram ของเคมเฟอรอล-3-โบโอทิน (33)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาว วัสสิกา วิชัยดิษฐ์
วันเดือนปีเกิด	26 ตุลาคม 2532
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา	ทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตาม สัญญาเลขที่ ทน 35/2557
ผลงานทางวิชาการ	Watsika Vichaidit, Panumart Thongyoo, editor Anti-oxidant and anti-bacterial properties of leaf extract of <i>Pithecellobium dulce</i> , The Fifth International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5); 5-8 May 2014; Phuket, Thailand
ประสบการณ์ทำงาน	-