



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมาราธสีห์
Chemical constituents and biological activities of *Euphorbia hirta* L.

ผู้วิจัย
ผศ.ดร.สุدارัตน์ หอมหวาน
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2553-2554
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ทางผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี ที่เอื้อเพื่อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ทำให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่น ตลอดจนขอขอบคุณ คุณกรชนก แก่นคำ และคุณกฤติยารัตน์ พิมพ์พงษ์ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบทุกท้องชีวภาพ ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกในการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัย

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ	การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำนมราชสีห์
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ หอมหวาน
ปีที่วิจัย	ประจำปีงบประมาณ 2553-2554
แหล่งทุน	สำนักงบประมาณแผ่นดิน

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสกัด และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ ของสารสกัด และสารบริสุทธิ์ ตรวจสอบโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ จากส่วนเหนือดินของต้นน้ำนมราชสีห์ โดยสกัดส่วนเหนือดินด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอ็กเซน, ไดคลอโรเมเทน, เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ ด้วยเครื่อง soxhlet นำสารสกัดแต่ละชนิด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ประกอบด้วย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion method และวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) ต่อเชื้อ 2 ชนิด คือ *Propionicbacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์

ผลการวิจัยการตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัด พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อสุดคือสารสกัด Ethyl acetate รองลงมาคือ สารสกัด Methanol โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 24.54 และ 28.75 µg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัด Hexane และสารสกัด Dichloromethane ไม่ออกฤทธิ์ สารสกัดน้ำนมราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *S. epidermidis* พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อ เชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* คือ สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol ส่วนสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อ เชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* คือสารสกัด Dichloromethane, สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol โดยสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อ เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือสารสกัด Ethyl acetate จากการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเอทิลอะซีเตต โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) สารสกัด Ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. acnes* โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 6.25 และ 50 mg/mL ตามลำดับ ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 50 และ 100 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดน้ำนมราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol โดยมี % Tyrosinase Inhibition เท่ากับ 50.25% และ 61.59% ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัด Ethyl acetate นำมาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคลอ้มันโนโครมาโทกราฟี โดยใช้ sephadex LH-20 เป็น adsorbent สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ EH-1 (quercitrin) 5.23% และ EH-2 (chlorogenic acid) 2.53% ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ การหาโครงสร้างของสารทั้งสอง โดยใช้เทคนิค IR, ¹H และ ¹³C-NMR การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร EH-1 และสาร EH-2 พบร่วมสารสกัดที่ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.14 และ 2.19 µg/mL ตามลำดับ และออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากันที่ 12.5 mg/mL ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* พบร่วมค่า MBC ของสาร EH-1 และ EH-2 เท่ากับ 50 และ 12.5 mg/mL ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตของต้นน้ำนมราชสีห์ ความมีการแยกสารบริสุทธิ์ชนิดอื่นๆ ต่อไป หรือนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ การปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้ออกฤทธิ์ได้สูงขึ้น การศึกษาความเป็นพิษ เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาใหม่ในการรักษาโรคเกี่ยวกับผิวน้ำดื่มน้ำต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

สารบริสุทธิ์ EH-1 และ EH-2 เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวน้ำ พบร่วมกับสารทั้งสองออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัด และออกฤทธิ์ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อถึงกลไกการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษ หรือการตั้งตัวรับ เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูง อาจพัฒนา成สาร EH-2 นำไปใช้ในด้านการต่อต้านจุลชีพได้ เช่น การปรับปรุงโครงสร้าง การหากลไกการออกฤทธิ์ ส่วนสาร EH-1 จะนำไปพัฒนาเป็นยารักษาร่วมได้ สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ พบร่วมกับสารทั้งสองไม่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ แต่สารสกัด Ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ได้ 50.25% ดังนั้นจึงอาจมีสารชนิดอื่นๆในสารสกัดที่ออกฤทธิ์ จึงอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ชื่อโครงการ	การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมาราธสีห์ (Chemical constituents and biological activities of <i>Euphorbia hirta</i> L.)
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ หอมหวล
ปีที่วิจัย	ประจำปีงบประมาณ 2553-2554
แหล่งทุน	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ ของส่วนเหนือดินต้นน้ำมาราธสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) โดยนำพังจากส่วนเหนือดิน มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เซกเซน, ไดคลอโรเมเทน, เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ ด้วยเครื่อง soxhlet นำสารสกัดแต่ละชนิด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ประกอบด้วย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการจับอนุมูลอิสระ DPPH, ฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว ต่อเชื้อ 2 ชนิด คือ *Propionicbacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* และฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไตรอซีนส์ สารสกัดที่ออกฤทธิ์จับอนุมูลอิสระได้สูงสุดคือสารสกัดเอทิลอะซีเตต รองลงมาคือสารสกัดเมทานอล โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 24.54 และ 28.75 μg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเซกเซน และสารสกัดไดคลอโรเมเทนไม่ออกฤทธิ์ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือ สารสกัดเอทิลอะซีเตต โดยมีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 50 และ 100 mg/mL ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไตรอซีนส์ พบร่วมกันของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol โดยมี % Tyrosinase Inhibition เท่ากับ 50.25% และ 61.59% ตามลำดับ

ผลทดสอบแสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตตออกฤทธิ์ดีที่สุด จึงได้ทำการแยกส่วนสารสกัดเอทิลอะซีเตต ด้วยวิธี sephadex LH-20 คลอลัมน์โครมาโทกราฟี จนกระทั่งได้สารที่ออกฤทธิ์ เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้าง ด้วย IR ¹H และ ¹³C NMR Spectroscopy พบร่วมกันของสาร quercitrin และ chlorogenic acid การทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด พบร่วมกันของสาร quercitrin และ chlorogenic acid ที่แยกได้ ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.14 และ 2.19 μg/mL ตามลำดับ ออกฤทธิ์จาเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MBC เท่ากับ 50 และ 12.5 mg/mL ตามลำดับ โดยที่สารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไตรอซีนส์

คำสำคัญ น้ำมาราธสีห์ / DPPH / ต้านจุลชีพ/ ต้านไตรอซีนส์ / quercitrin / chlorogenic acid

Chemical constituents and biological activities of *Euphorbia hirta* L.

Asst.Prof.Dr. Sudarat Hornhual

(Ph.D., Pharmaceutical Chemistry and Phytochemistry)

Research grant : National Research Council of Thailand (NRCT)

Fiscal year : 2010-2011

Abstract

Studied on chemical constituents and biological activities were carried out on the aerial part of *Euphorbia hirta* L. The powdered aerial part was successively extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol respectively by using soxhlet apparatus. These extracts were subsequently tested for their biological activities including antioxidant activity by scavenging of 2,2-diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) free radicals, antimicrobial activities by broth dilution method against two microorganisms; *Propionicbacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* and antityrosinase activity. The ethyl acetate and methanol extracts exhibited highest scavenging of DPPH with EC₅₀ values of 24.54 and 28.75 µg/ mL respectively. The hexane and dichloromethane extracts were found to be in active. The ethyl acetate extracts showed highest antimicrobial activities with MBC values of 50 and 100 mg/mL against *S. epidermidis* and *P. acnes* respectively. The extracts exhibited antityrosinase were ethyl acetate and methanol extracts with % tyrosinase inhibition values of 50.25 % and 61.59 % respectively.

The ethyl acetate extract, which appeared to be the most active fraction, was further separated using sephadex LH-20 column chromatography to afford the active component. The structure elucidation by IR ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectroscopy indicated the active components were quercitrin and chlorogenic acid. Quercitrin and chlorogenic acid exhibited scavenging of DPPH with EC₅₀ values of 2.14 and 2.19 µg/ml respectively and antimicrobial activities against *S. epidermidis* with MBC values of 50 and 12.5 mg/mL respectively. Quercitrin and chlorogenic acid were found to be in active with antityrosinase activity.

Key words *Euphorbia hirta* / DPPH / antimicrobial / antityrosinase / quercitrin / chlorogenic acid

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ	iv
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์	x
เนื้อหา	
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	15
ผลการวิจัย	23
วิจารณ์	50
สรุปและข้อเสนอแนะ	54
เอกสารอ้างอิง55	
ภาคผนวก	
ภาคผนวก 1 ภาพการเตรียมพืช	58
ภาคผนวก 2 ภาพการสกัด และสารสกัด	59
ภาคผนวก 3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	60
ภาคผนวก 4 รูปการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ	64
ภาคผนวก 5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีแนส	70
ประวัตินักวิจัย	74
บทความสำหรับเผยแพร่	75
กิจกรรมการนำเสนอจากโครงการไปใช้ประโยชน์	76
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	77
รายงานการเงิน	78

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 สารที่เติมลงใน 96-well microplate ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ไทโรซีนส์	21
2 % yield ของสารสกัดน้ำนมราชสีห์ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	23
3 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดในการออกฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH	23
4 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารสกัด ต่อเชื้อ <i>P. acnes</i>	27
5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารสกัด ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i>	27
6 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัด Ethyl acetate โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว	28
7 ร้อยละของการออกฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารสกัดน้ำนมราชสีห์	28
8 ค่า EC ₅₀ ของสาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้	33
9 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ	34
10 ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของสารที่แยกได้ โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว	35
11 ร้อยละของการออกฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสาร EH-1 และ สาร EH-2	35
12 ¹³ C NMR และ ¹ H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-1 (ใน methanol-D4)	40
13 ¹³ C NMR ค่า chemical shifts ของ EH-1 เปรียบเทียบกับ quercitrin จากเอกสารอ้างอิง	41
14 ¹ H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-1 เปรียบเทียบกับ quercitrin จากเอกสารอ้างอิง	42
15 ¹³ C NMR และ ¹ H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-2 (ใน methanol-D4)	47
16 ¹³ C NMR ค่า chemical shifts ของ EH-2 เปรียบเทียบกับ chlorogenic acid จากเอกสารอ้างอิง	48
17 ¹ H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-2 เปรียบเทียบกับ chlorogenic acid จากเอกสารอ้างอิง	49
18 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารสกัด hexane	70
19 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารสกัด dichloromethane	70
20 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารสกัด ethyl acetate	71
21 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารสกัด methanol	71
22 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสารมาตรฐาน kojic acid	72
23 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสาร EH-1	73
24 ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนของสาร EH-2	73
25 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	77

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1 เข็มแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i>	5
2 เข็มแบคทีเรีย <i>P. Acnes</i>	7
3 การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase ในปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดเป็นอนุมูลชูเปอร์ออกไซด์	10
4 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	12
5 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสาร antioxidant	12
6 Melanin pigment metabolism	14
7 น้ำมันราชสีห์ (<i>Euphorbia hirta</i> L.)	15
8 TLC ของสารสกัดจากน้ำมันราชสีห์ โดยใช้ระบบ solvent system ระบบที่ I และ II	24
9 TLC ของสารสกัดจากน้ำมันราชสีห์ โดยใช้ระบบ solvent system ระบบที่ III และ IV	25
10 TLC ของสารสกัด ethyl acetate ระบบ Solvent system II	26
11 TLC ของการรวม fraction สารสกัด ethyl acetate จากคลอลัมมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ระบบ Solvent system II	30
12 TLC ของสาร EH-1 เทียบกับสารมาตรฐาน Quercitrin	31
13 TLC ของการรวม fraction สารสกัด ethyl acetate จากคลอลัมมน์ Sephadex LH-20 และใช้ระบบ : ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water เป็น mobile phase .	32
14 TLC ของสาร EH-2 เทียบกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid	33
15 TLC ของสาร EH-1 และ สาร EH-2 ใช้ระบบ : ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water เป็น mobile phase	34
16 IR Spectrum ของสาร EH-1	36
17 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-1	36
18 ภาพขยาย 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-1 (0.9-4.5 ppm)	37
19 ภาพขยาย 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-1 (5.3-7.4 ppm)	37
20 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-1	38
21 ภาพขยาย 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-1 (17-180 ppm)	38
22 ภาพขยาย 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-1 (17-180 ppm)	39
23 IR spectrum ของ สาร EH-2	43
24 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-2	44
25 ภาพขยาย 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-2 (2.0-4.2 ppm)	44
26 ภาพขยาย 500 MHz ¹ H NMR spectrum ของสาร EH-2 (5.3-7.6 ppm)	45
27 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-2	45
28 ภาพขยาย 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-2 (38-178 ppm)	46
29 ภาพขยาย 125 MHz ¹³ C NMR spectrum ของสาร EH-2 (114-117 ppm)	46
30 TLC ของสารสกัด ethyl acetate ระบบ Solvent system: ethyl acetate-methanol-water เป็น mobile phase	51
31 โครงสร้างของสาร EH-1	52
32 โครงสร้างของสาร EH-2	53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
33 การเตรียมพีช	58
34 การสกัด และสารสกัดที่ได้	59
35 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสารสกัด ethyl acetate	60
36 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสารสกัด methanol	61
37 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสาร EH-1	62
38 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสาร EH-2	63
39 ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	64
40 ทดสอบยามาตรฐาน และตัวทำละลายต่อเชื้อ <i>P. acnes</i>	64
41 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. acnes</i> ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ	65
42 การหาค่า MIC ของ <i>P. acnes</i>	65
43 การหาค่า MBC ของ <i>P. acnes</i>	66
44 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ	66
45 ทดสอบยามาตรฐาน และตัวทำละลายต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i>	67
46 การหาค่า MIC ของ <i>S. epidermidis</i>	67
47 การหาค่า MBC ของ <i>S. epidermidis</i>	68
48 การยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของ EH-1 และ EH-2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL	68
49 การยับยั้งเชื้อ <i>P. acnes</i> ของ EH-1 และ EH-2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL	68
50 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของสาร EH-1	69
51 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของสาร EH-2 ชุดที่ 1	69
52 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของสาร EH-2 ชุดที่ 2	69
53 การหาฤทธิ์ยับยั้งเออนไซม์ไตรอซีนด้วย 96 well plate	72

คำอธิบายสัญลักษณ์

DMSO	=	dimethylsulfoxide
EC ₅₀	=	50% effective concentration
IR	=	infrared
MBC	=	minimal bactericidal concentration
mg	=	milligram
MHz	=	megahertz
MIC	=	minimal inhibitory concentration
mL	=	milliliter
mM	=	millimolar
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance spectroscopy
ppm	=	part per million
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet
μg	=	microgram
μL	=	microliter
°C	=	degree Celsius
δ	=	chemical shift

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

น้ำมาราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) เป็นไม้ล้มลุก มีน้ำยางสีขาว มีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่น เช่น นามราชสีห์ ผักโภชนาด หญ้าบ้านหมึก เป็นต้น ในตำราไทย ใช้หั้งตันรักษาโรคผิวนังผื่นคัน แก้หนองใน แก้เขี้ยว มาลาเรีย แก้หืด และขับปัสสาวะ (นิจศิริ, 2547; ฐานข้อมูลสมุนไพรไทย, 2551)

จากรายงานผลการวิจัยในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ของวัชพืชไทยจำนวน 20 ชนิด พบว่าสารสกัดเมทานอลของน้ำมาราชสีห์ ออกฤทธิ์สูงสุดในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl picrylhydrazyl) โดยมีค่า $EC_{50} = 4.48 \mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี ($EC_{50} = 6.53 \mu\text{g/mL}$) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบกับไวรัส (*Herpes simplex virus*, 2550) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พืชชนิดนี้ยังมีการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดฝี หนอง (*Staphylococcus aureus*) (Sudhakar M, et al, 2006) สารสกัดเอทานอล สามารถลดอาการปวด บวมที่อุ้งเท้าหนู (Lanwers MC, et al, 1991; Sign GD, et al, 2006) และสามารถยับยั้งอาการแพ้ขันดิรุนแรงเฉียบพลัน (anaphylaxis) ทั้งระบบผิวนัง และระบบ systemic system ได้ (Youssouf MS, et al, 2007) และสารสกัดน้ำ ทำให้สัตว์ทดลองเกิดอาการสงบ ระจัง (sedative, antianxiety) (Lanwers MC, et al, 1990) ผู้วิจัยจึงเห็นว่าพืชชนิดนี้มีศักยภาพสูงมากในการนำมาพัฒนาเป็นยากลุ่มที่ใช้กับผิวนัง เพื่อลดอาการติดเชื้อ และการแพ้ อักเสบที่ผิวนัง หรือลดความบกพร่องต่างๆที่เกิดจากโรคที่ผิวนัง หรือผิวนัง เนื่องจากปัจจุบันยาในกลุ่มดังกล่าว มักมีราคาแพง และประสิทธิภาพในการรักษาไม่ดีนัก เนื่องจากมักมีส่วนผสมของสารเติมroyder ทำให้เกิดผลข้างเคียงในการใช้ยาสูง และบดบังอาการของโรค โดยไม่ได้รักษาที่สาเหตุของโรค โดยเฉพาะการใช้ยาติดต่อ กันเป็นเวลานาน (มัณฑนาและศิริประภา, 2548) ประกอบกับยาเม็ดราคายังสูง เนื่องจากใช้วัตถุดิบที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ หรือการใช้ยากลุ่มต้านอีสตาเมิน ที่มีใช้อยู่ทั้งชนิดกิน และทา ก็ยังมีราคายังสูง และมีผลการข้างเคียงในการใช้ (ปกิต และคณะ, 2541) แต่การพัฒนายาที่สามารถใช้วัตถุดิบที่มีอยู่อย่างมหาศาลในธรรมชาติจะทำให้ราคายังถูก และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบสมุนไพรไทย เนื่องจาก雷พบน้ำมาราชสีห์ขึ้นได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัชพืช และมีวัตถุดิบอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำมาราชสีห์ออกฤทธิ์สูงมากในการจับอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบ และฆ่าเชื้อ แต่ยังไม่มีงานวิจัยที่สกัดแยกตัวยาสำคัญ หรือสารออกฤทธิ์กลุ่มดังกล่าว ใน การศึกษาเบื้องต้นพบว่าในพืชชนิดนี้มีสารกลุ่มแทนนิน อัลคาโลอยด์ และชาโภนิน (Wallace PA, et al, 1998) ดังนั้นหากสามารถพัฒนาตัวยาจากพืชสมุนไพรดังกล่าวได้ โดยการหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ก็จะทำให้ลดมูลค่าการนำเข้ายาที่มีราคายังสูงจากต่างประเทศ และส่งเสริมให้ใช้ยาที่มีประสิทธิภาพ และราคาถูกให้กับประชาชน นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมให้มีการนำวัชพืชซึ่งปกติไม่มีมูลค่า และยังเป็นศัตรุพืชที่ต้องกำลายทั้งมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ทางยาแก่ประเทศไทยได้อย่างมหาศาล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อแยกสกัด และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ ของสารสกัด และส่วนสกัดย่อยของน้ำมาราชสีห์
- เพื่อตรวจสอบโครงสร้างสาร และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ ของสารบริสุทธิ์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สกัดส่วนเหนือดินของต้นน้ำมาราชสีห์ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ประกอบด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮโรซิเนส จากนั้นแยกส่วนสกัดย่อยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วนำส่วนสกัดย่อยมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพช้า เพื่อหาส่วนสกัดย่อยที่มีศักยภาพที่จะนำไปทำการแยกหาสารออกฤทธิ์ต่อไป จากนั้นทำการแยกสารออกฤทธิ์ และพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคที่เกิดกับผิวน้ำ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวน้ำ มักทำให้เกิดการอักเสบ บวม แดง และเมื่อโรคหายแล้วมักมีรอยของโรคเกิดขึ้น ทั้งนี้ การรักษาโรคกลุ่มนี้ให้มีประสิทธิภาพสูง ควรใช้สารที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อได้ ควบคู่กับการลดการอักเสบ หากสารมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และทำให้ผิวน้ำขาวขึ้น ภายหลังจากรอยโรคหายไปแล้ว ก็นับว่าเป็นสารที่มีศักยภาพสูงมากในการรักษา

น้ำมาราชสีห์ เป็นพืชที่มีรายงานการวิจัยแล้วว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดผื่นอง ลดอาการบวมอักเสบได้ และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐานวิตามีน ที่มีเชิงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ดังนั้น หากสามารถพัฒนา หรือสกัดแยกเฉพาะตัวยาบริสุทธิ์ และหาสูตรโครงสร้างสารดังกล่าวได้ จะสามารถนำไปพัฒนาอย่างลุ่มรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดกับผิวได้ โดยทราบสารออกฤทธิ์ และรู้ขนาดการใช้ที่แน่นอน และได้ยาราคาถูก เนื่องจากพืชที่เป็นวัตถุดิบนี้ เป็นวัชพืชที่พบขึ้นทั่วทุกภูมิภาค และขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก

ทบทวนวรรณกรรม

1. การใช้ประโยชน์พื้นบ้าน

ต้นสด แก้บิด ยาบำรุงกำลัง ขับปัสสาวะ แก้ไอหืด แก้อาเจียน ขับน้ำนม แก้ไขมานาเรีย แก้หืดหอบ หลอดลมอักเสบ แก้แพ้อากาศ แก้กระซຍ トイพิการ รักษาโรคผิวหนังผื่นคัน แก้หนองใน ปัสสาวะเป็นเลือด ฝีใน ปอด ฝีที่เต้านม รักษาหูด ตาปลา และถ่ายพยาธิ (นิจศิริ, 2547)

ทั้งต้น ตัดสั้นๆ ประมาณครึ่งนิ้ว คั่วไฟพอเหลือง ชงดื่มต่างน้ำ ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะแดง หรือขุนขัน ต้นสด ต้มน้ำดื่ม เพิ่มน้ำนม และฟอกน้ำนมให้สะอาด ทั้งต้นต้มน้ำดื่ม ระจับอาการขัก แก้ไอ แก้หืด หรือผื่น น้ำดาลอ้อย ต้มน้ำดื่ม รักษาบิดมูกเลือด راك ผสมกับรากทับทิม รากส่องฟ้าดง และเดือยไก่ป่า ฝนน้ำกิน และทา แก้ไข้ทำมะลา (อาการไข้ หมวดสติ และatyโดยไม่ทราบสาเหตุ) (วงศ์สกิติย์ และคณะ, 2538)

ทั้งต้น บำรุงกำลัง บำรุงน้ำนม บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะแดง แก้ปัสสาวะเหลืองขุนขัน แก้ดัก ออก คุณธาตุ แก้トイพิการ แก้กระซຍ แก้เด็กเป็นชา ตับร้อน แก้พิษ ขับน้ำนม แก้ชื้นผดผื่นคัน แก็บิด แก้โรค หนองใน แก้ฝีในปอด แก้ฝีที่เต้านม แก้พิษบวมแดง แก้กลากเน่าเปื่อย แก้อ่อนเพลีย แก้โรคหอบหืด แก้ไอ ใช้ใน โรคเกี้ยวกับลำไส้ (นันทวัน และอรุณุช, 2541)

ทั้งต้นสด แก็บิด (ปวดเบ่ง และมีมูก หรืออาจมีเลือดด้วย) ใช้ทั้งต้นสดประมาณ 1 กำมือ หรือ 10-15 กรัม ต้มเคี่ยว 3 เอ้า 1 รับประทานวันละ 2 ครั้ง เช้า และเย็น ครั้งละ 1 แก้ว (ดรุณ และคณะ, 2541)

ใช้ทั้งต้น รสเปรี้ยว ขม เป็นยาเย็น ออกฤทธิ์ต่อตับ และธาตุ ใช้เป็นยาดับพิษร้อน ถอนพิษ ใช้ ขับน้ำนมในสตรีหลังคลอด ขับน้ำเข็นในร่างกาย แก้ลำไส้อักเสบเฉียบพลัน แก้กรวยトイอักเสบ แก็บิด อะมีบา บิดมูกเลือด แก้ขัดเบา ปัสสาวะเป็นเลือด ฝีเต้านม ฝีในปอด ฝีหนองภายใน และภายนอก แก้โรคผิวหนัง ผดผื่น คัน และน้ำกัดเท้า ปริมาณยาที่ใช้ ยาแห้งใช้ครั้งละ 15-30 กรัม ต้มน้ำรับประทาน ยาสด ใช้ครั้งละ 35-75 กรัม ใช้ภายนอกใช้น้ำต้มล้างแผล หรือใช้ตำพอกแผลฝีก็ได้ (วิทยา, 2554)

2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำนมราชสีห์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานผลการวิจัยในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ของวัชพืชไทย จำนวน 20 ชนิด พบร่วมกับสารสกัดเมทานอลของน้ำนมราชสีห์ ออกฤทธิ์สูงสุดในการจับอนุมูลอิสระDPPH ($2,2\text{-diphenyl picrylhydrazyl}$) โดยมีค่า $\text{EC}_{50} = 4.48 \mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี ($\text{EC}_{50} = 6.53 \mu\text{g/mL}$) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบกับไวรัส (สุดารัตน์ และวิรัตน์, 2550)

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

สารสกัดเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Staphylococcus aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.189, 0.2, 0.166, 0.216 mg/mL (Sudhakar M, et al, 2006)

สารสกัดเมทานอล และไดคลอโรเมเทน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Neisseria gonorrhoea* (สมควรณ, 1991) สาร สกัดเมทานอล ยับยั้งเชื้อปิดทั้ง 2 ชนิดคือ *Shigella flexneri* และ *Shigella dysenteriae* (Vijaya K, et al, 1995)

สารสกัดเอทานอล ยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคกระเพาะอาหาร และลำไส้ เมื่อใช้สารสกัด 25 μg เกิด zone of inhibition 18 มิลลิเมตร (Wang Y-C and Huang T-L, 2005; Ndip RN, et al, 2007)

สารสกัดไดคอลโรมีเทน และเอทานอล ขนาด 6 μg/mL ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ได้สูงมากคือ 100 และ 89% ตามลำดับ (Tona L, et al, 1999)

ฤทธิ์ลดอาการอักเสบ บวม ปวด

ลดอาการปวดบวมที่อุ้งเท้าสัตว์ทดลอง (Lanher MC, et al, 1991; Hiermann A and Bucar F, 1994; Sign GD, et al, 2006)

สารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ลดไข้ (yeast induced hyperthermia) และลดอาการปวดในสัตว์ทดลอง (ใช้การกระตุ้นด้วยความร้อน หรือ hot plate test (Lanher MC, et al, 1991)

ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาการแพ้

สารสกัดเอทานอลออกฤทธิ์สูงมากในการยับยั้งการแพ้ชนิดเฉียบพลันรุนแรง (anaphylaxis) โดยออกฤทธิ์ป้องกันการแพ้ชนิดนี้ได้เมื่อได้รับสารกระตุ้นที่ให้ทางปาก หรือทางผิวน้ำ แก่หนู ในขนาดตั้งแต่ 100-1,000 mg/kg โดยสามารถควบคุมการหลั่งสารฮีสตامีน และ cytokine TNF-alpha และ IL-6 ในกรณีแพ้ทั้งปฏิกิริยาจากภูมิคุ้มกัน และการแพ้ธรรมชาติได้ (Youssouf Ms, et al, 2007)

สารสกัดน้ำออกฤทธิ์แรงในการลดการปล่อยพรอสตาแกลนдинชนิด I2, E2 และ D2 (ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อ) ลดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (Hiermann A and Bucar F, 1994)

สารสกัดเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งฮีสตามีน ต้านการอักเสบ และลดการหลั่งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ ลดการสะสมของ eosinophil ที่ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนที่ถุงลมปอด จึงบรรเทาหอบหืด, ลด และควบคุมการปล่อย IL-4 และ IFN-gamma ในปฏิกิริยาการแพ้ จึงสามารถป้องกันการแพ้ทั้งระยะแรก และระยะท้ายของการเกิดปฏิกิริยาได้ (Sign GD, et al, 2006)

ฤทธิ์ทำให้ส่งระดับ

สารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ทำให้สัตว์ทดลองลดอาการตื้นเต้น โดยทำให้สัตว์ทดลองสงบ ระดับ (activities and staircase test) (Lanher M-C, et al, 1990)

การศึกษาความเป็นพิษ

ผสมน้ำน้ำมาราชสีที่ 5% ในอาหารให้หนูขาวกิน 97 วัน ไม่เกิดพิษ น้ำสกัดต้นน้ำน้ำมาราชสีที่ ป้อนหรือฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักรขนาด 6.0 กรัม/กิโลกรัม ไม่มีอาการพิษเกิดขึ้น สารสกัดด้วย 50% เอทานอล ป้อน หรือฉีดเข้าใต้ผิวน้ำหนูถีบจักร ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดพิษ สารสกัดด้วย 50% เอทานอล ป้อนหนูถีบจักรขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นขนาดสูงสุดที่หนูถีบจักรทนได้

ฉีดสารสกัดด้วยน้ำเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาด 1 มิลลิลิตร/ตัว จะทำให้เกิดพิษ น้ำสกัดจากส่วนเหนือดินของน้ำน้ำมาราชสีที่ ฉีดเข้าหลอดเลือดดำหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งมีค่า 7.4 มิลลิลิตร/กิโลกรัม (นันทวน และอรุณช, 2541)

รายงานทางคลินิก (วิทยา, 2554)

แก้สำไส้อักเสบ บิดอะมีบा ใช้ตันสด 40-120 กรัม (แล้วแต่ช่วงอายุ และอาการ) ต้มน้ำแบ่งรับประทาน วันละ 3 ครั้ง หรือใช้ตันแห้งบดเป็นผงทำเป็นยาเม็ด (เม็ดละ 1 กรัม) รับประทานครั้งละ 5 เม็ด วันละ 3-4 ครั้ง จากการรักษาผู้ป่วยสองพันกว่าคน พบรักษาได้ผลคิดเป็น 90% โดยเฉพาะกับผู้ที่มีอาการบิด ถ่ายเป็นมูกเลือด จะเห็นผลภายใน 1-2 วัน

แก้ผื่น ผดผื่นคัน ใช้ตันสด ตำผสมกับเกลือเล็กน้อย ใช้ตำพอกแผล หรือบริเวณที่เป็นโรคผิวนัง

แก้น้ำกัดเท้า ใช้ตันสด 120 กรัม แข็งเหล้า 75 ดีกรี ประมาณ 500 มิลลิลิตร แข็งตั้งไว้ประมาณ 3-5 วัน แล้วจึงนำมาทาแผลที่เท้า

ข้อควรระวัง ไม่ควรรับประทานมากเกินกว่าปริมาณที่กำหนด เพราะจะทำให้เกิดอาการถ่ายอย่างรุนแรง แต่สามารถแก้อาการถ่ายได้โดย ใช้ชาเขียว 10 กรัม ดอกระยาน้ำผึ้ง 20 กรัม ต้มกับน้ำ 2 ถ้วย ต้มจนเหลืองน้ำ ครึ่งหนึ่ง แล้วจึงนำมารับประทาน

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมราชสีห์

พบสารกลุ่ม polyphenol จากใบ ได้แก่ gallic acid, ellagic acid, myricitrin, 3,4-di-O-galloyquinic acid, 2,4,6-tri-O-galloy-D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloy-beta-D-glucose (Chen L, 1991)

สาร tannin พบ euphorbin A-E (Yoshida T, et al, 1988; Yoshida T, et al, 1990)

สารฟลาโวนอยด์ kaemferol, leucocyanidin quercitrin, quercetin, xanthorhamnin (Blanc P and Saquisannes G, 1972)

สารเทอร์ปีโนiyd ได้แก่ α -amyrin, β -amyrin, taraxerol and esters, friedelin, campesterol (Barnes J, et al, 2007)

ส่วนสารอื่นที่มีรายงานเป็นสารพื้นฐาน เช่น กรดไขมัน สเตียรอยด์ น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น

4. ข้อมูลเชื้อจุลชีพที่ศึกษา

4.1 เชื้อ *S. epidermidis*



รูปที่ 1 เชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

(ภาพจาก www.Science Photo Library.com, 2010)

ลักษณะทั่วไป

S. epidermidis เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลมขนาดเล็กประมาณ 1 μm เรียงตัวเป็นกลุ่ม (cocci) ไม่เคลื่อนที่ จัดเป็นกลุ่มคล้ายองุ่น (รูปที่ 1) สามารถเจริญเติบโต เป็นโคลนได้ใน Blood agar และ non selective media ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกบน blood agar plates และไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จึงเรียก coagulase-negative staphylococci แต่สร้างเอนไซม์ catalase เป็น facultative anaerobe ที่สามารถเจริญเติบโตโดยใช้อาหารออกซิเจน (นริกุล และคณะ, 2526)

การติดเชื้อ

เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อยู่บนผิวนังของมนุษย์ พบร้าไปในอากาศ และสิ่งแวดล้อม มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ แต่ถ้าระบบป้องกันตัวเองของร่างกายโยสต์บกพร่อง ก็อาจทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง ในปัจจุบัน เชื้อ *S. epidermidis* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือเด็กแรกเกิด หรือในผู้ที่ใส่อุปกรณ์ทางการแพทย์ เชื้อสามารถเคลื่อนจากบริเวณผิวนังเข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อที่ลึกขึ้น และเข้าสู่กระเพาะเลือด พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถสร้าง capsule หรือ biofilm ซึ่งใน biofilm เชื้อ *S. epidermidis* สามารถป้องกันตัวเองจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน หรือยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้รักษา ส่งผลให้การรักษายากขึ้น เชื้อ *S. epidermidis* ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยมักพบในผู้ป่วยที่สอดห่อเข้าหลอดเลือด, Endocarditis, Cerebrospinal fluid (CSF) shunt infection, การติดเชื้อในผู้ที่ทำ peritoneal dialysis catheter และการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น (อิสยา, 2553) บางสายพันธุ์สร้างสารไกลโคแคลิกซ์ (glycocalyx) ที่เหนียวอุดมกากเซลล์ ซึ่งนอกจากช่วยให้มันเกาะติดกับผิวที่เรียบของพลาสติก หรือโลหะได้แล้ว ยังทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค โดยป้องกันเชื้อจากยาปฏิชีวนะ และระบบป้องกันตัวตามธรรมชาติของโยสต์

การรักษา และความไวของยาต่อเชื้อ

เชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคมักดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ยาที่ยังมีฤทธิ์ในการรักษาได้แก่ ยาในกลุ่ม Penicillinase-resistant penicillins, vancomycin, rifampin และ quinolones ตัวใหม่ๆ เช่น gatifloxacin และ moxifloxacin เป็นต้น ในรายที่ดื้อต่อ vancomycin จะใช้ antibiotics ตัวอื่น เช่น linezolid และ quinupristin/dalfopristin เป็นต้น (David and Gilbert, 2008) ปกติการรักษาทำได้ยาก เพราะเชื้อชอบอยู่ตามเครื่องมือ หรืออวัยวะเทียม ทำให้สามารถแยกตัวออกจากระบบหมุนเวียนเลือด และหลบจากยาปฏิชีวนะได้ (ภัทรชัย, 2551 ; จริยา และคณะ, 2546)

4.2 เชื้อ *Propionibacterium acnes*



รูปที่ 2 เชื้อแบคทีเรีย *P. Acnes*
(รูปจาก <http://microbewiki.kenyon.edu>, 2011)

ลักษณะทั่วไป

เชื้อ *P. acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกครูปแท่ง อาจเรียงตัวกันเป็นสายหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เขลձอาจจะติดสีไม่สม่ำเสมอ และมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น สิ้นคล้ายรูปกลม ยาว เป็นแท่งมีปลายแหลม หรือคล้ายเชือกกลุ่ม coryneform (รูปที่ 2) ซึ่งเชื้อจัดอยู่ในกลุ่ม obligate anaerobe ส่วนใหญ่ออาศัยอยู่ในรูขุมขน หรือต่อมไขมันที่ผิวนัง เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดสิว (อิสยา, 2553)

การติดเชื้อ

P. acnes เป็นสาเหตุของการเกิดโรคสิวอักเสบ (acne vulgaris) กลไกที่ก่อให้เกิดโรค เกิดจากแอนติเจนของเชื้อสามารถกระตุนการหลั่งสารกลุ่ม pro-inflammatory cytokine ร่วมกับการสร้างoenzyme อีกหลายชนิด เช่น protease, hyaluronidase และ lipase ซึ่งช่วยกระตุนการตอบสนองต่อปฏิกริยาการอักเสบ ทำให้มีการอักเสบขึ้นในต่อมไขมัน พบว่าเชื้อ *P. acnes* มีความสัมพันธ์กับการทำหัตถกรรมทางการแพทย์ และการใส่สิ่งแปรรูปломเข้าสู่ร่างกาย เช่น การให้สารน้ำทางเส้นเลือด ทำให้เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและอาจนำไปสู่การติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆ เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ กระดูกและข้ออักเสบ ฝีในสมอง เยื่อบุช่องห้องอักเสบ และการติดเชื้อในปอด โดยเฉพาะพบในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (อิสยา, 2553)

การรักษา และความไวของเชื้อต่อยา

ยาที่ใช้ในการรักษา เช่น ยาในกลุ่ม penicillins, carbapenems และ clindamycin ส่วนยา tetracyclines และ cephalosporins อาจให้ผลไม่แน่นอน ต้องทำการทดสอบความไวของเชื้อก่อน (David and Gilbert, 2008)

5. ข้อมูลทฤษฎีที่ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดียวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุด ที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจน และอิออนของโลหะtransitionซึ่งส่วนใหญ่นอกจากนั้นยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งนับว่าเป็นอนุมูล เพราะมีอิเลคตรอนจำนวน 2 อิเลคตรอน แต่ละอิเลคตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเลคตรอนเดียว ในแต่ละอิอร์บิทัล อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาพเป็นกลาглаห์ไฟฟ้า และอนุมูลในสภาพที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวก และประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระ คืออิเลคตรอนเดียวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุด ในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล A^{\cdot} อนุมูล $A^{-\cdot}$ และอนุมูล $A^{+\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเลคตรอนเดียวจะไม่เสถียร และพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนเดียวอีน ดังนั้น อนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา สามารถอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลชุบเปอร์ออกไซด์ แอนไออกอน ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี (OH^{\cdot}) อนุมูลอัลกอคอกซี (RO^{\cdot}) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี (HO_2^{\cdot}) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก

อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

เนื่องจากอนุมูลอิสระมีอิเลคตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย โดยรับอิเลคตรอนจากสารอื่นๆ ใกล้เคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเลคตรอนไป มีอิเลคตรอนไม่ครบคู่จนกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงขึ้น ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดอันตรายกับส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ที่อยู่รอบๆ บริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ไขมัน โปรตีน คาร์บอไฮเดรต หรือ ดีเอ็นเอ ส่งผลให้สารเหล่านั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป และทำให้เสียหน้าที่ในการทำงาน ดังนั้นในสภาพที่มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก จะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ และทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน อันนำไปสู่การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอ โดยไปจับกับหมู่ฟอสเฟต และน้ำตาลตีออกซีโรบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเป็นโพลีเมอร์ ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์ และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสภาพทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระสามารถพบร้าในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต โดยมีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย และแหล่งภายในร่างกาย ดังนี้ (อนันต์, 2551)

ปัจจัยภายในร่างกาย

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) ซึ่งมักจะมีแสง และความร้อนเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา มักกล่าวในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

1.1 ระยะเหนีyan (Initiation step)

การเกิดอนุคลอิสระ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการถลายน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือปฏิกิริยาเรด็อกซ์ (Redox reaction) ดังสมการ 1



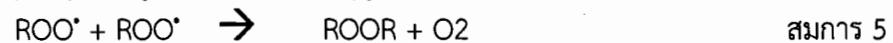
1.2 ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation step)

เป็นระยะที่อนุคลอิสระทำปฏิกิริยาต่อ โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอ่า อะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้ออนุคลอิสระตัวใหม่ได้ต่อไปเรื่อยๆ ดังสมการที่ 2 – 4



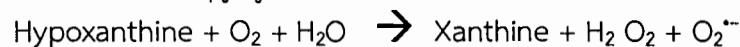
1.3 ระยะสิ้นสุด (Termination step)

เป็นขั้นตอนที่อนุคลอิสระที่เกิดขึ้นอาจจะรวมกันในรูปแบบต่างๆ ได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุคลอิสระ ดังสมการที่ 5 - 7

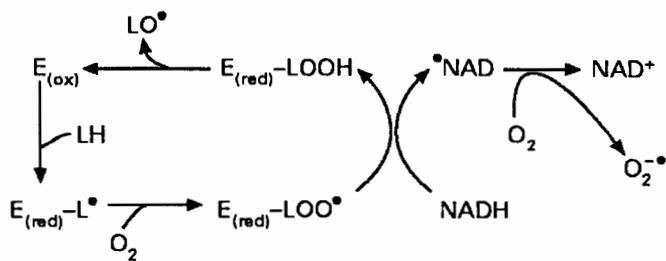


2. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

2.1 เอนไซม์ xanthine oxidase (XO) ทำหน้าที่สำคัญในการถลายนีโตรบีโนไซด์ (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine และ xanthine เป็น uric acid พร้อมๆ กับขนาดย่อ อิเล็กตรอนให้ออกซิเจน เกิดเป็นอนุคลอซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2^{\cdot\cdot}$) ดังสมการ



2.2 เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมัน (polyunsaturated fatty acid) โดยเหล็ก (Fe^{2+}) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล ทำหน้าที่ในการดึงอะตอมของไฮโดรเจนจากการไขมัน และเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมัน เกิด hydroperoxide ซึ่งจะถลายนีโตรบีโนไซด์ ดังรูปที่ 3

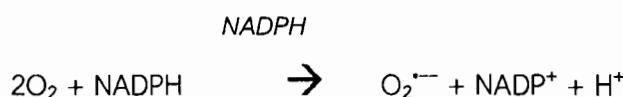


รูปที่ 3 การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase ในปฏิกริยาออกซิเดชันเกิดเป็นอนุมูลอิสระประกอบไฮด์ หมายเหตุ ; E = lipoxygenase ; LH = unsaturated lipid ; LOOH = lipid hydroperoxide ; LOO[•] = lipid peroxyl radical ; LO[•] = lipid alkoxyl radical

(รูปจาก <http://www.biochemj.org/bj/318/0805bj.3180805.htm>, 2011)

3. กระบวนการกำจัดสิ่งแผลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแผลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว จะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจนมาใช้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ (O_2^-) เป็นจำนวนมาก ดังสมการ



ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ในตรีสออกไซด์ ในตอร์เจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันอิมตัว หรือชาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสี gamma ยานบางชนิด เป็นต้น

1. ยาரักษาโรค

ยานบางชนิดสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง เช่น bleomycin, anthracyclines และ methotrexate เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมออกซิเดชัน (pro-oxidation)

2. รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอ็กซ์ (X-ray) เป็นต้น

3. ควันบุหรี่ เนื่องจากในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของ nitric oxide (NO) nitrogen dioxide (NO_2) และ peroxynitrite ($ONOO^-$) และสารมลพิษ ได้แก่ sulfur dioxide (SO_2) carbontetrachloride (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของ เอนไซม์ cytochrome P-450 hydroxylase ซึ่งมีอยู่มากในเซลล์ตับ และพบได้บ้างในเซลล์ปอด และลำไส้ ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลอิสระ (O_2^-) ภายในเซลล์ดังกล่าวได้ (อนันต์, 2551)

การป้องกันอันตราย และความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์ และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมาก ไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกาย จึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระ

ไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุสูตต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอ ต่อการรักษาปริมาณอนุสูตอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุสูตอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่อง ไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุสูต และสารออกซิเดนท์มีมากเกินสมดุล และเกิดโรคต่างๆ ขึ้นในร่างกายได้ (อนันต์, 2551)

สารต้านอนุสูตอิสระ

สารต้านอนุสูตอิสระ คือสารที่มีหน้าที่ต่อต้าน หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้ง และควบคุมอนุสูตอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุสูตอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ตัวอย่างสารต้านอนุสูตอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น amino acid, ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, tannins, tocopherols เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุสูตอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีโนอลิก (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุสูตอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีโรลธรรมชาติ และสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) alkylgallate BHA BHT TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าว ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน

2. Oxygen scavenger

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3. Secondary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสียร้าย

4. Enzymatic antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอ็นไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจน หรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5. Chelating agent หรือ sequestrant

สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริม และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสียร้าย

การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC)
การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธี ได้แก่

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT)

- วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)
- วิธี Total radical – trapping antioxidant parameter (TRAP)

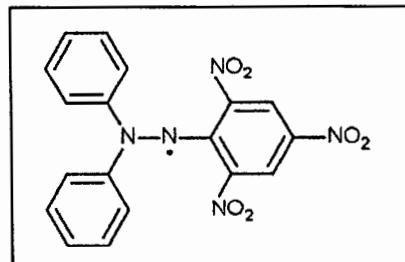
2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเลคตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET)

- วิธี Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay (DPPH)
- วิธี The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)
- วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

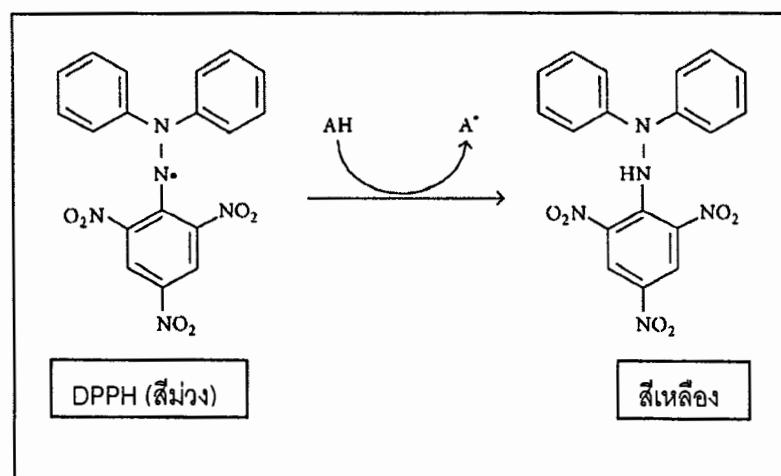
วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ใช้ในงานวิจัย

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH')

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ซึ่งเป็น stable radical (รูปที่ 4) ในตัวทำละลายและออกไซด์ ซึ่งสารละลายนี้ มีสีม่วง ซึ่งดูคลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 nm



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)



รูปที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสาร antioxidant

ถ้าตัวอย่าง (AH) มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วง ก็จะลดลง (รูปที่ 5) ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH• เหลืออยู่ 50% การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า EC₅₀ ทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH• กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน/ตัวอย่าง เพื่อหาค่า EC₅₀ โดยคำนวณ %Remaining DPPH• ตามสมการ

$$\% \text{ Remaining DPPH} = \left[\frac{\text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

นอกจากนี้แล้วก็ยังมีการรายงานในรูปของค่า IC₅₀ ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition DPPH• กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC₅₀ โดยคำนวณ % Inhibition DPPH• ตามสมการ

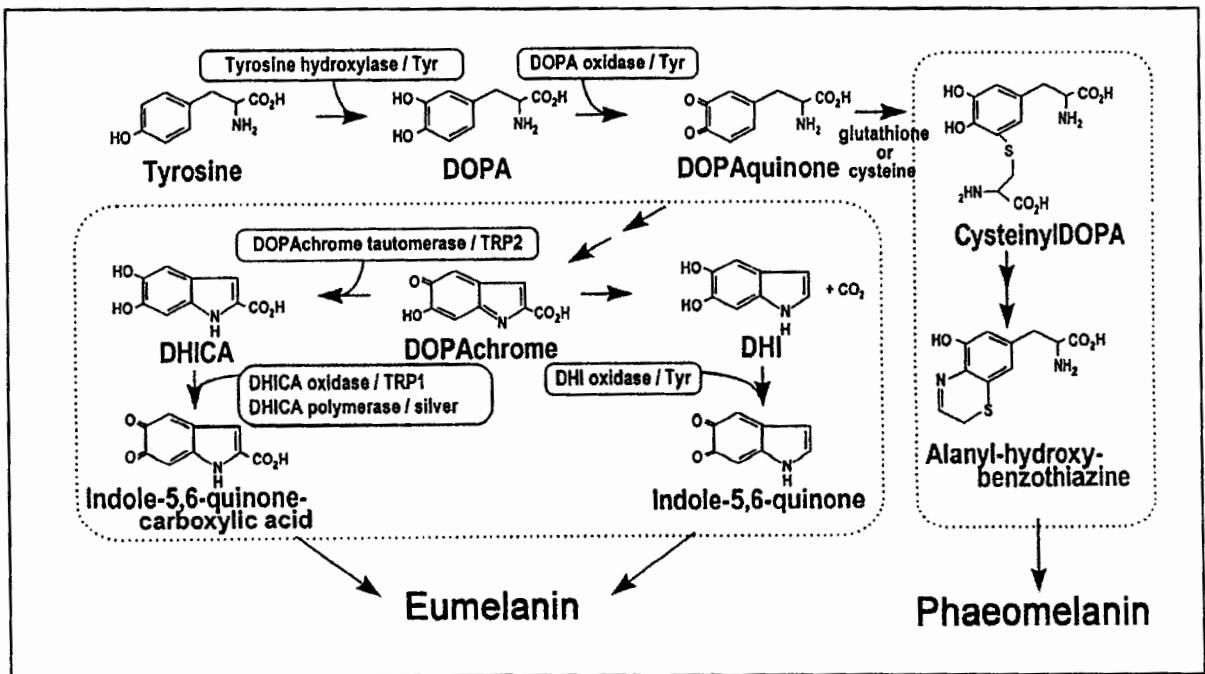
$$\% \text{ Inhibition DPPH} = \left[\frac{(\text{Abs control} - \text{Abs sample})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

ขอดี คือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง ข้อเสีย คือ ไม่สามารถใช้วินิวิเคราะห์ antioxidant activity ของเลือดได้ เพราะในปฏิกรรมการทดสอบด้วย DPPH มีตัวทำละลายประเภทแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้ปรตีนแตกตกgonได้ (โอภา และคณะ, 2549 ; นริศา, 2551)

5. ข้อมูลทฤษฎีต้านเนื้องอกไนโตรไซน์

กระบวนการเกิดสีผิวนั้น เกิดจากการทำงานของเซลล์ชนิดหนึ่งที่แทรกอยู่ในชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า (epidermis) ชื่อ “เมลานไซท์” (melanocyte) โดยเซลล์นี้ทำหน้าที่สร้างสาร “เมลาโนนิน” (melanin) ที่ใช้ในกระบวนการเกิดเม็ดสี ซึ่งทุกคนมีจำนวนเซลล์นี้เท่าๆ กัน ต่างกันที่จำนวนเมลาโนนินที่ถูกผลิตขึ้น คนที่มีผิวคล้ำ แสดงว่าเซลล์เมลาโนไซท์ มีการผลิตเมลาโนนินมากกว่าคนที่ผิวขาวกว่า นอกจากนี้เมลาโนนินยังช่วยป้องกันเซลล์ของร่างกายจากอันตรายของรังสีที่มองไม่เห็น ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และรังสีอินฟราเรด (infrared) โดยเมลาโนนินที่ถูกสร้างขึ้นจะทำหน้าที่ “กรองรังสี” ที่จะมาทำอันตรายเซลล์ผิวหนัง เมื่อผิวหนังสัมผัสกับแสงแดดมากเท่าไร เมลาโนนินก็จะถูกสร้างขึ้นมากเท่านั้น ซึ่งถ้ามีการสร้างเมลาโนนินมาก หรือน้อยเกินไปก็อาจเกิดปัญหาสีผิวแตกต่างได้ อาทิ เช่น เกิดฝ้า กระ รอยหมองคล้ำ รอยด่างขาว ขี้แมลงวันในคนสูงอายุ เป็นต้น ในภาวะปกติ สีผิวของคนเราจะเข้มขึ้นหรือจางลง ต้องมีกลไกระบุตันตามกระบวนการ ดังแสดงใน รูปที่ 6 โดยขั้นตอนการสังเคราะห์สารต่างๆ จะมีเอนไซม์ที่สำคัญที่สุด และมีบทบาทมากที่สุดในการสังเคราะห์เมลาโนนิน เพราะมีผลต่อหลายๆ pathway ในกระบวนการสร้างเมลาโนนิน โดยทำหน้าที่เปลี่ยนสารตันแบบไนโตรไซน์ (tyrosine) ไปเป็น DOPA และ DOPA quinone ไปจนถึงเม็ดสีดำของ ยูเมลาโนนิน (eumelanin) ซึ่งมีสีเข้ม (น้ำตาล-ดำ) เมื่อกระบวนการสร้างเมลาโนนินเสร็จสิ้นจะถูกส่งผ่านไปยังเซลล์ keratinocyte ที่อยู่รอบๆ จานน์เซลล์ keratinocyte จะเคลื่อนขึ้นสู่ผิวชั้นบนของหนังกำพร้า ทำให้มีสีเข้มกว่าปกติ ดังนั้นถ้าเอนไซม์นี้ทำงานมากเกินไป ก็จะทำให้เม็ดสีเมลาโนนินถูกสร้างได้มากขึ้น และอาจจะได้เม็ดสี สีดำแบบยูเมลาโนนินมากขึ้น ทำให้เกิดรอยดำ ฝ้า กระ หรือสีผิวไม่สม่ำเสมอได้

ดังนั้น ถ้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรไซน์ได้ การสังเคราะห์เมลาโนนิน ก็จะเกิดได้น้อยลงเช่นกัน และส่งผลให้การเกิดเม็ดสีดำแบบยูเมลาโนนินน้อยลงด้วย กระบวนการดังกล่าวเป็นผลทำให้สามารถป้องกันการเกิดรอยฝ้า กระ หรือสีผิวไม่สม่ำเสมอได้



รูปที่ 6 Melanin pigment metabolism

(รูปจาก http://www.bio.miami.edu/dana/250/250SS13_6.htm, 2016)

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

พืชที่ใช้ในการทำวิจัย

ส่วนหนึ่งอุดin ของต้นน้ำ้มราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) เก็บจากบริเวณป่าอนุรักษ์ตันน้ำร่องก่อ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ช่วงเดือนพฤษภาคม 2553 โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชแห้ง ไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (PHUBU no. 617, PHUBU no. 618)

น้ำ้มราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก สูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร ลำต้น เลี้ยว แผ่นใบตามพื้นดิน ชูส่วนยอดตั้งขึ้น ลำต้นและกิ่งก้านมีสีแดง มีขนสีน้ำตาลปกคลุมทั้งต้น โดยปกคลุมช่วงบน มากกว่าช่วงล่าง แต่กิ่งก้านบริเวณโคนต้น เมื่อเดิดกิ่งต้นจะพบมีน้ำยางสีขาวไหลออกมา ใบเป็นใบเดียว ออกเรียงตรงข้ามกับบริเวณข้อต้น ในรูปไข่ยาว ปลายใบแหลมสั้น ฐานใบสอบเบี้ยงเล็กน้อย ขอบใบหยักเล็กๆ แบบพันเดือย เทียนเส้นใบชัดเจน 3-4 เส้น ผิวใบมีขนปกคลุมทั้งสองด้าน ห้องใบมีขนสีน้ำตาลปนเหลืองปกคลุม ใบกว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 2-4 เซนติเมตร ก้านใบเป็นเส้น ดอกออกตลอดปี ดอกออกเป็นช่อ ออกตามซอกใบ หรือปลายยอด ดอกมีขนาดเล็ก รูปคล้ายรังษัง ดอกแยกเพศ ไม่มีกลีบดอก ไม่มีกลีบเลี้ยง ดอกย่อยมีจำนวนมาก อัดแน่นกัน มีสีเขียวปนน้ำเงิน ดอกย่อยไม่มีก้านดอก เกสรเพศผู้มี 5 อัน เกสรเพศเมีย 1 รังไข่ รูปกลมแגםสามเหลี่ยม ยอดเกสรตัวเมียมีลักษณะคล้ายเส้นสีแดงสั้นๆ 3 เส้น ใบประดับเป็นรูปถ้วย สีเขียว ผลเป็นผลแห้ง รูปกลม แגםสามเหลี่ยม ขนาดประมาณ 1.5 มิลลิเมตร มี 3 พู เมื่อสุกสีเหลืองอ่อน เมื่อแก่จะแตกได้ เมล็ดสีน้ำตาล มีขนาดเล็กมาก (นิติร, 2547; วงศ์สิทธิ์ และคณะ, 2538; นันทวน และอรุณุช, 2541)



รูปที่ 7 น้ำ้มราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.)



เครื่องมือ

เครื่องวัดความเข้มข้นของสารละลายน้ำ (HACH odyssey. HACH company,USA.
 หัวกรองจุลินทรีย์ (Swinnex) Milipore, Ireland
 Anaerobic jar (Heraeues®)
 Autoclave H-88LL (Kokuson®)
 Chromato-vue Cabinet model CC-60 (UVP,Inc®)
 Cool room (KBO Technology (Heraeues®)
 FT/IR (Perkin Elmer®)
 Hot air oven (Heraeues®)
 Hot plate (Torrey pines scientific®)
 Incubator B6766 (Heraeues®)
 Laminar air flow HBB 2460 (Holten®)
 Laboratory Mill (Fritschi®)
 Micropipette (Socorex®)
 NMR spectrometer, 500 MHz (Bruker®)
 Rotary evaporator (Buchi®)
 Soxhlet apparatus (Buchi®)
 Spectrophotometer (Novaspec II®)
 Ultrasonic (Bransonic®)
 UV-Spectrophotometer (with microplate reader) (Thermo Electron Corporation®)
 Vacuum pump (Sartorius®)
 Vertex-mixer (IKA®)
 Water bath (Heto ®)

สารเคมี

Acetic acid, glacial (Merck®)
 Chloroform (JT Baker®)
 Chlorogenic acid (Acros®)
 Dichloromethane (Carlo erba ®)
 Dimethyl Sulfoxide (Merck®)
 Disodium hydrogen phosphate (Carlo erba ®)
 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Fluka ®)
 Ethanol (Carlo erba ®)
 Ethyl acetate (Carlo erba ®)
 Formic acid (RCI Labscan®)
 Kojic acid (Acros®)
 Hexane (Carlo erba ®)
 Hydrochloric acid (BDH Limited®)
 L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine)(Acros®)
 Methanol (Carlo erba ®)
 Quercitrin (Sigma®)

Sephadex LH-20, 75-150 μ m (Mitsubishi kasei Corporation®)
 Sodium dihydrogen phosphate (Carlo erba ®)
 Sodium hydroxide (Mallinckrodt®)
 Sulfuric acid (JT Baker®)
 Tannic acid (Fluka ®)
 TLC aluminium sheets silica gel 60 (Merck®)
 TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Merck®)
 Tyrosinase (Sigma®)
 α-Tocopherol (Vitamin E) (Fluka ®)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain heart Infusion broth (BHI) Merck. Merck KGaA ,Germany
2. Agar powder Criterion. Hardy diagnostic,USA.
3. Tryptic Soy Agar Criterion. Hardy diagnostic,USA.
4. Tryptic Soy Broth BD. Becton Dickinson company,USA.
5. Glucose anhydrous Unilab. Asia Pacific Specialty Chemicals Limited,Australia
6. Tetracycline antibiotic disc Oxoid. Oxoid limited,England
7. Gas pack BD. Becton Dickinson company,USA.
8. Microbiology Anaerotest, Merck. Merck KGaA ,Germany

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Propionibacterium acnes* DMST 14916
2. *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505 (ATTC 12228)

1. วิธีการทดลอง

1. การสกัด และหาระบบ TLC ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด

นำส่วนเนื้อดินของน้ำนมราชสีห์ ที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบด นำผงพีชจำนวน 300 กรัม สกัดด้วยวิธี Soxhlet apparatus โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ตามลำดับความมีข้าว คือ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol และนำสารสกัดที่ได้ไปกรอง ด้วยเครื่องกรองแบบสูญญากาศ แล้วนำไปประเทยแห้ง ด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้สารสกัดทั้งหมด 4 ชนิด คือ สารสกัด hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol

นำสารสกัดทั้งหมด มาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC โดยใช้ silica gel 60 F₂₅₄ เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) และใช้ตัวทำละลายระบบเคลื่อนที่ (mobile phase) ตามด้านล่างนี้ สเปรย์ TLC plate ด้วย sulfuric acid (30% ใน เมทานอล) และนำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที

ระบบที่ 1 : chloroform

ระบบที่ 2 : ethyl acetate - methanol - water (45:5:5)

ระบบที่ 3 : chloroform - methanol – acetic acid (75:20:10)

ระบบที่ 4 : butanol- acetic acid - water (upper phase) (40:10:50)

2. การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH

DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) ซึ่งเป็น stable free radical เมื่อละลายในเมทานอล จะมีสีม่วง และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption) ที่ 515 nm เมื่อเติมสารทดสอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระ DPPH ลงในหลอดทดลอง DPPH จะเปลี่ยนเป็น 2,2-diphenylpicrylhydrazine (สีเหลือง) และเมื่อปฎิกริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว จะวัดปริมาณ DPPH ที่เหลืออยู่ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และคำนวณหาค่า EC₅₀

การทดสอบวิธี color reaction ตามวิธีการของ Sanchez-Medina et al., 2001 โดยเตรียมสารทดสอบความเข้มข้น 1 mg/mL ในเมทานอล และเตรียมอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 2 mM โดยละลายในเมทานอลเข่นกัน การเตรียมปฎิกริยาทดสอบโดยเติมสารละลาย DPPH จำนวน 200 μL ลงในหลอดทดลอง (เท่ากันทุกหลอด) ที่มีสารตัวอย่างในความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น โดยปริมาตรสุดท้ายของทุกหลอดทดสอบเป็น 3 mL เขย่าให้เข้ากันด้วย Vertex mixing จากนั้นตั้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้เกิดปฎิกริยาสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm โดยใช้ DPPH ที่ละลายในเมทานอล เป็น control และใช้เมทานอลเป็น blank

การแปลงผลทดสอบโดยการคำนวณหาค่าการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารทดสอบที่ 50% (EC₅₀) จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบ กับ % inhibition โดย

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{Absorbance}_{\text{control}} - \text{Absorbance}_{\text{sample}}) / \text{Absorbance}_{\text{control}}] \times 100$$

การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC-DPPH

วิธีนี้ใช้หลักการเดียวกับวิธี color reaction แต่จะทดสอบบน TLC plate โดยการ run สารทดสอบบน TLC ด้วยระบบ solvent systems ที่เหมาะสม แล้วนำ TLC plate มา spray ด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 % ใน methanol จากนั้นปล่อยให้เกิดปฎิกริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง บริเวณที่ออกฤทธิ์ต่อ DPPH จะเกิดเป็น spot สีเหลือง บนพื้น plate สีขาว

3. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Chomnawang MT, et al, 2005)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย Propionibaccterium acnes และ Staphylococcus epidermidis ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักทำให้เกิดหนอง และสิวที่ผิวน้ำ

3.1 การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition Zone) ด้วยวิธี Disc diffusion method

3.1.1 การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อของสารสกัด

3.1.1.1 การเตรียมสารสกัด

- 1) เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 300, 200 และ 100 mg/mL ในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ในกรณีที่สารสกัดไม่ละลาย เติม 1 % DMSO เพื่อช่วยในการละลาย
- 2) กรองสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น ผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน
- 3) นำสารสกัดที่ผ่านการกรองแล้ว หยดใส่ในกระดาษทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.1.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้ในการทดสอบ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar + 1% กลูโคส สำหรับเพาะเลี้ยง *Propionicbacterium acnes* โดยชั่งน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำกากลั่นตามปริมาณที่กำหนด ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย นำเข้าฝาเชือในหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเติม 1% กลูโคสที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อลงไป เช่นไห้เข้ากัน และทำการเตรียมงานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ทึ้งให้แข็ง นำมาผิงในตู้ปราศจากเชื้อให้ผิวน้ำแห้ง แล้วจึงนำไปทดสอบ

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) สำหรับเพาะเลี้ยง *Staphylococcus epidermidis* โดยชั่งน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำกากลั่นตามปริมาณที่กำหนด ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำเข้าฝาเชือในหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเทอาหารจากหลอดทดลองลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ทึ้งให้แข็ง นำมาผิงในตู้ปราศจากเชื้อ ให้ผิวน้ำแห้ง แล้วจึงนำไปทดสอบ

3.1.1.3 การเตรียมเชื้อสำหรับใช้ในการทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ *Propionicbacterium acnes* DMST 14916 และ *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505 (ATTC 12228) เลี้ยงใน BHI Agar slant + 1% กลูโคส ปั่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน ในขณะที่ *Staphylococcus epidermidis* เลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Agar สภาวะมีออกซิเจน เมื่อครบเวลา นำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองปรับความชื้นเท่ากับแมคฟาร์แลนด์ หมายเลข 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU

3.1.1.4 ขั้นตอนการทดสอบหาระบบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition Zone)

1. จุ่ม cotton swab ที่ปราศจากเชื้อลงในเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ และป้ายบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด 3 ระบบ
2. วางกระดาษทดสอบ (disc) ที่หยดสารสกัด แต่ละชนิดในตำแหน่งที่กำหนดไว้ และใช้กระดาษทดสอบ tetracycline (30μg/disc) เป็น Positive control
3. นำจานเพาะเชื้อที่ทำการทดสอบกับเชื้อ *Propionibacterium acnes* ใส่ใน anaerobic jar และใส่ gas pack และ indicator ที่ใช้ทดสอบสภาวะไร้อากาศลงไป และรีบปิดฝาทันที นำไปปั่มที่ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่จานเพาะเชื้อที่ทำการทดสอบ *Staphylococcus epidermidis* นำไปปั่มที่ 35-37 °C ในสภาวะมีอากาศ
4. วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น และบันทึกผลการทดสอบ

3.1.1.5 การอ่านผล

เมื่อบ่มเชื้อแต่ละชนิดในสภาวะที่กำหนดแล้ว ให้วัดขนาดโคนใส่ที่เกิดขึ้นโดยวัดจากขอบโคนข้างหนึ่งไปยังขอบโคนอีกข้างหนึ่งโดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษทดสอบ บันทึกผลเป็นมิลลิเมตร

หมายเหตุ : สารทดสอบที่มีฤทธิ์คือทำให้เกิด Inhibition zone มากกว่า 6 มิลลิเมตร

(ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร)

3.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัด โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method)

- 1) เตรียมเชื้อ *Propionicbacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1.3
- 2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Broth + 1% กลูโคส สำหรับทดสอบ *Propionicbacterium acnes*

และ Tryptic Soy Broth (TSB) สำหรับทดสอบ *Staphylococcus epidermidis* ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 มม. ปริมาตร 0.5 มล. จำนวน 9 หลอด เขียนหมายเลขกำกับเป็นหลอดที่ 2-10 และเตรียมหลอดปราศจากเชื้อจำนวน 1 หลอด และเขียนหมายเลขกำกับเป็นหมายเลข 1

3) เติมสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ลงในหลอดทดลองที่ 1 และ 2

4) เจือจางสารตั้งแต่หลอดที่ 2-9 แบบ two fold เมื่อถึงหลอดที่ 10 ให้ทึบไป

5) เติมเชื้อลงในหลอดทดลองทุกหลอดปริมาตร 0.5 มล. นับคือหลอดที่ 10 จะเป็นหลอดควบคุมที่มีเฉพาะอาหารและเชื้อ และหลอดที่ 1 จะมีเฉพาะสารสกัด และเชื้อ

6) อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (หลอดที่ไม่ชุ่น) ถือเป็น MIC

MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์

3.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัด

1) ใช้ inoculating loop ขนาด 10 มิโครลิตร แตะสารละลายในหลอดที่ไม่ชุ่นทุกหลอดมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar + 1% กลูโคส และ Tryptic Soy Agar สำหรับทดสอบ *Propionicbacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* ตามลำดับ

2) อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเพาะเชื้อ ค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำให้ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

MBC = ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

4. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเออนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงจาก Matsuda T, et al, 2008 และ Likhithwitayawuid K, et al, 2000)

ใช้วิธีการทดสอบ Dopachrome method อาศัยหลักการทำงานของเออนไซม์ไทโรซิเนส ที่ทำให้เกิดออกซิเดชันของ L-DOPA เป็น dopaquinone ซึ่งสาร quinone ที่เกิดขึ้นสามารถเกิด polymerization เป็นสารกลุ่มเมลานิน ซึ่งมีผลทำให้ผิวคล้ำ หากสารทดสอบสามารถยับยั้งการทำงานของเออนไซม์ไทโรซิเนสได้ จะทำให้การเกิดเมلانินน้อยลง วิธีนี้จึงใช้ L-DOPA เป็น substrate และทำการวัดปริมาณของ dopachrome ซึ่งเป็นผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ L-DOPA โดยมีเออนไซม์ ไทโรซิเนส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา dopachrome เป็นสารที่มีสีแดงสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 492 nm หากสารทดสอบสามารถยับยั้งเออนไซม์ได้ ก็จะลดปริมาณ dopachrome ที่เกิดขึ้น ทำให้การดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าวลดลง

4.1 การเตรียมสารละลายต่างๆ

- การเตรียมสารละลาย 20 mM phosphate buffer (pH 6.8)

สารละลาย A: ละลาย NaH₂PO₄.2H₂O (312 มิลลิกรัม) ในน้ำ (100 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: ละลาย Na₂HPO₄ (284 มิลลิกรัม) ในน้ำ (100 มิลลิลิตร)

นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน และปรับ pH ให้ได้ค่า 6.8

- การเตรียมสารละลายน้ำ L-DOPA
ชั่ง L-DOPA 2.0 มิลลิกรัม ละลายน้ำ phosphate buffer 10 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายนีเช่่ม tyrosinase 100 unit/mL
ชั่งนีเช่่ม 1.0 มิลลิกรัม ละลายน้ำ phosphate buffer 10 มิลลิลิตร
- การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช
ชั่งสารสกัด 0.03 กรัม ละลายน้ำด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ที่ใช้ในการสกัดสารจำนวน 3 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลามาตรฐาน (kojic acid) และสารบริสุทธิ์ (quercitrin และ chlorogenic acid)
ชั่งสาร 3 มิลลิกรัม ละลายน้ำ phosphate buffer 3 มิลลิลิตร ยกเว้น quercitrin ละลายน้ำด้วยเมทานอล

4.2 การทดสอบฤทธิ์

ทำการทดสอบโดยใช้ 96-well microplate สำหรับตัวอย่างสารทดสอบหนึ่งๆ กำหนดให้ใช้ 4 หลุม (well) เรียกชื่อเป็น A B C และ D โดยแต่ละหลุมมี reaction mixture (160 μL) มีส่วนประกอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารที่เติมลงใน 96-well microplate ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซินส์

Sample	Phosphate buffer (pH 6.8) (μL)	Tyrosinase solution (μL)	Standard or Test sample (μL)	Water (μL)
A	20	20	-	120
B	20	-	-	140
C	20	20	20	100
D	20	-	20	120

หลังจากผสมสารละลายน้ำแต่ละหลุมให้เข้ากันดีแล้ว ตั้งทึ้งไว้ประมาณ 10 นาที และเติมสารละลายน้ำ L-DOPA (20 μL) ลงในแต่ละหลุม จากนั้นทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายน้ำแต่ละหลุมที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยใช้ microplate reader

4.3 การคำนวณค่าฤทธิ์ยับยั้ง

$$\text{ค่าฤทธิ์ยับยั้งร้อยละ} = \frac{100 [(A-B)-(C-D)]}{(A-B)}$$

A	= ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม A
B	= ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม B
C	= ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม C
D	= ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม D

5. การแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ sephadex LH-20 เป็น adsorbent เตรียม sephadex LH-20 จำนวน 25 กรัม นำไปประจำตัวในตัวทำละลาย เมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน (1:1) และตั้งทึ้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้พองตัวเต็มที่ จากนั้น นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร x ยาว 100 เซนติเมตร เทตัวทำละลายที่ใช้ pack คอลัมน์ ผ่านลงไปหลายๆครั้ง จนกว่า sephadex จะ pack ตัวแน่นดี ตั้งทึ้งไว้อีก 1 คืน ก่อนนำไปใช้แยกสาร

5.1 แยกสาร EH-1 จากสารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต จำนวน 0.2182 กรัม ละลายในเมทานอล จำนวน 2 มิลลิลิตร และนำไป load ลงบนคอลัมน์ เติม mobile phase เมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน (1:1) เก็บ fraction 1-31 และเมทานอล 100% เก็บ fraction 32-73 (fraction ละ 20 มิลลิลิตร) หลังจากนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้ว นำมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ silica gel 60 F₂₅₄ และระบบ solvent system คือ เอทิลอะซีเตต-เมทานอล-น้ำ (45:5:5) นำมาตรวจสอบภายใต้แสง UV (254 nm) จากนั้นนำ TLC plate ไปสเปรย์ด้วย สารละลายกรดชัลฟูริก (เมทานอล:กรดชัลฟูริก=7:3) แล้วนำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที และทำการรวม fraction ที่มีองค์ประกอบคล้ายกัน

การแยกส่วนสกัดเอทิลอะซีเตตเพิ่มเติม อีกทั้งสิ้น 0.8654 กรัม โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้วิธีการเดียวกัน

นำ fraction ที่รวมแล้ว มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC-DPPH

5.2 แยกสาร EH-2 จากสารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต จำนวน 0.2059 กรัม ละลายในเมทานอล จำนวน 2 มิลลิลิตร และนำไป load ลงบนคอลัมน์ เติม mobile phase คือน้ำ 100% เก็บ fraction ละ 10 มิลลิลิตร ได้ทั้งสิ้น 30 fraction หลังจากนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้ว นำมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ silica gel 60 F₂₅₄ และระบบ solvent system คือ เอทิลอะซีเตต-กรดฟอร์มิก-กรดอะซิก-น้ำ (50:5.5:5.5:13) นำมาตรวจสอบภายใต้แสง UV (254 nm) จากนั้นนำ TLC plate ไปสเปรย์ด้วย สารละลายกรดชัลฟูริก (เมทานอล:กรดชัลฟูริก=7:3) แล้วนำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที และทำการรวม fraction ที่มีองค์ประกอบคล้ายกัน

การแยกส่วนสกัดเอทิลอะซีเตตเพิ่มเติม อีกทั้งสิ้น 0.8321 กรัม โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้วิธีการเดียวกัน

นำ fraction ที่รวมแล้ว มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC-DPPH

6. การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

นำสารที่แยกได้มาตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไตรอซีเนสที, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ TLC-DPPH

7. การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้

ใช้เทคนิค spectroscopy ได้แก่ FT/IR (KBr disc)

¹H-NMR, ¹³C-NMR โดยใช้เครื่อง 500 MHz NMR Spectrometer โดยใช้ methanol-D4 เป็นสารละลาย อ่านค่าโดยเปรียบเทียบกับสาร internal standard (TMS)

ผลการวิจัย

1. การสกัด และหาระบบ TLC ที่เหมาะสมในการแยกสารสกัด

การสกัดส่วนเหนือดินของต้นน้ำ้มราชสีห์ จำนวน 300 กรัม ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ได้น้ำหนักสารสกัด 9.241, 3.839, 4.975 และ 41.892 กรัม ตามลำดับ คิดเป็น % yield ดังแสดงในตารางที่ 2 และ TLC ดังแสดงในรูปที่ 8-9

ตารางที่ 2 % yield ของสารสกัดน้ำ้มราชสีห์ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

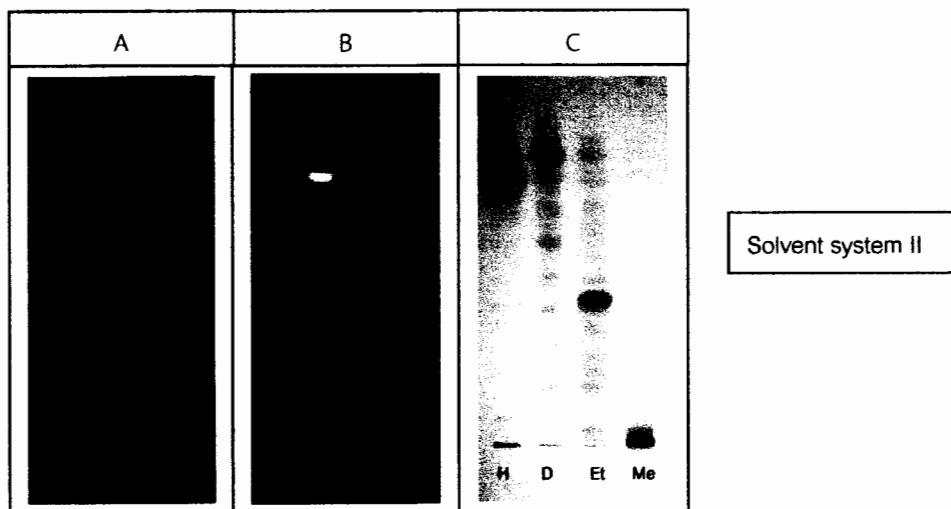
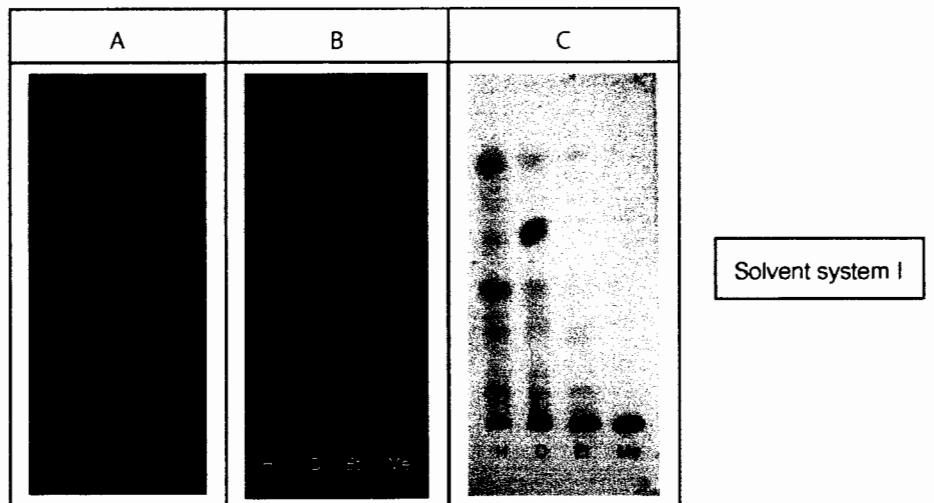
สารสกัด	% yield
สารสกัด Hexane	3.08
สารสกัด Dichloromethane	1.28
สารสกัด Ethyl acetate	1.66
สารสกัด Methanol	13.96

2. การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH

การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัด พบร้าสารสกัดที่ออกฤทธิ์สุดคือ สารสกัด Ethyl acetate รองลงมาคือ สารสกัด Methanol ส่วนสารสกัด Hexane และสารสกัด dichloromethane ไม่ออกฤทธิ์ (ตารางที่ 3) จึงนำสารสกัด Ethyl acetate ไปทดสอบด้วยวิธี TLC-DPPH เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแยกสารบริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 10

ตารางที่ 3 ค่า EC₅₀ ของสารสกัดในการออกฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH

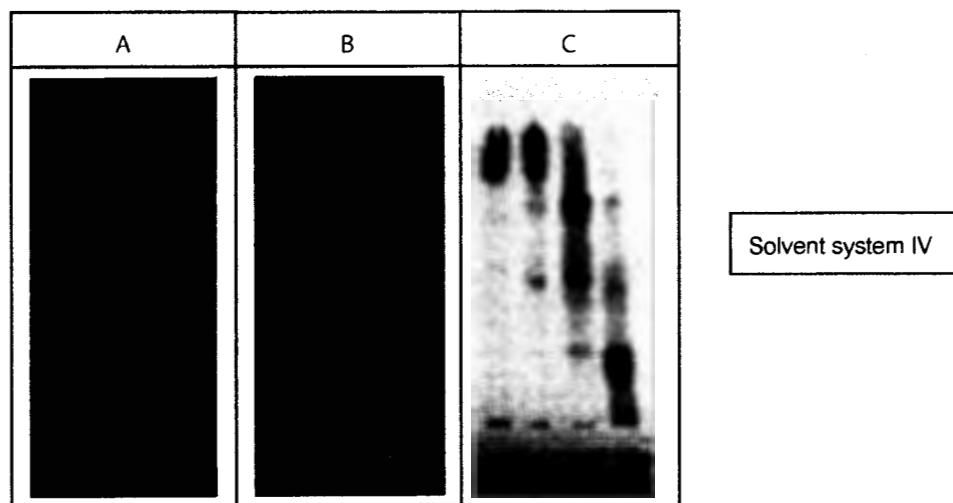
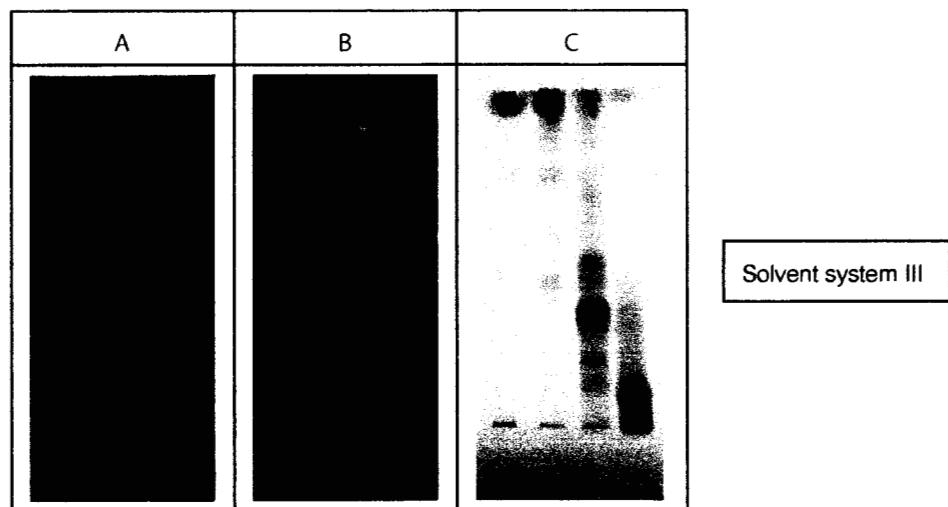
สารทดสอบ	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)
สารสกัด Hexane	> 900
สารสกัด Dichloromethane	> 900
สารสกัด Ethyl acetate	24.54 \pm 1.82
สารสกัด Methanol	28.75 \pm 0.97
Tannic acid	2.37 \pm 0.18
α -Tocopherol	6.53 \pm 0.48



รูปที่ 8 TLC ของสารสกัดจากน้ำมาราธีน์ โดยใช้ระบบ solvent system ระบบที่ I และ II

Adsorbent : silica gel 60 F254
 Solvent system I : chloroform
 Solvent system II : ethyl acetate - methanol - water (45:5:5)
 Detection : A = UV light 254 nm, B = UV light 366 nm
 C = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ 110 °C, 10 นาที

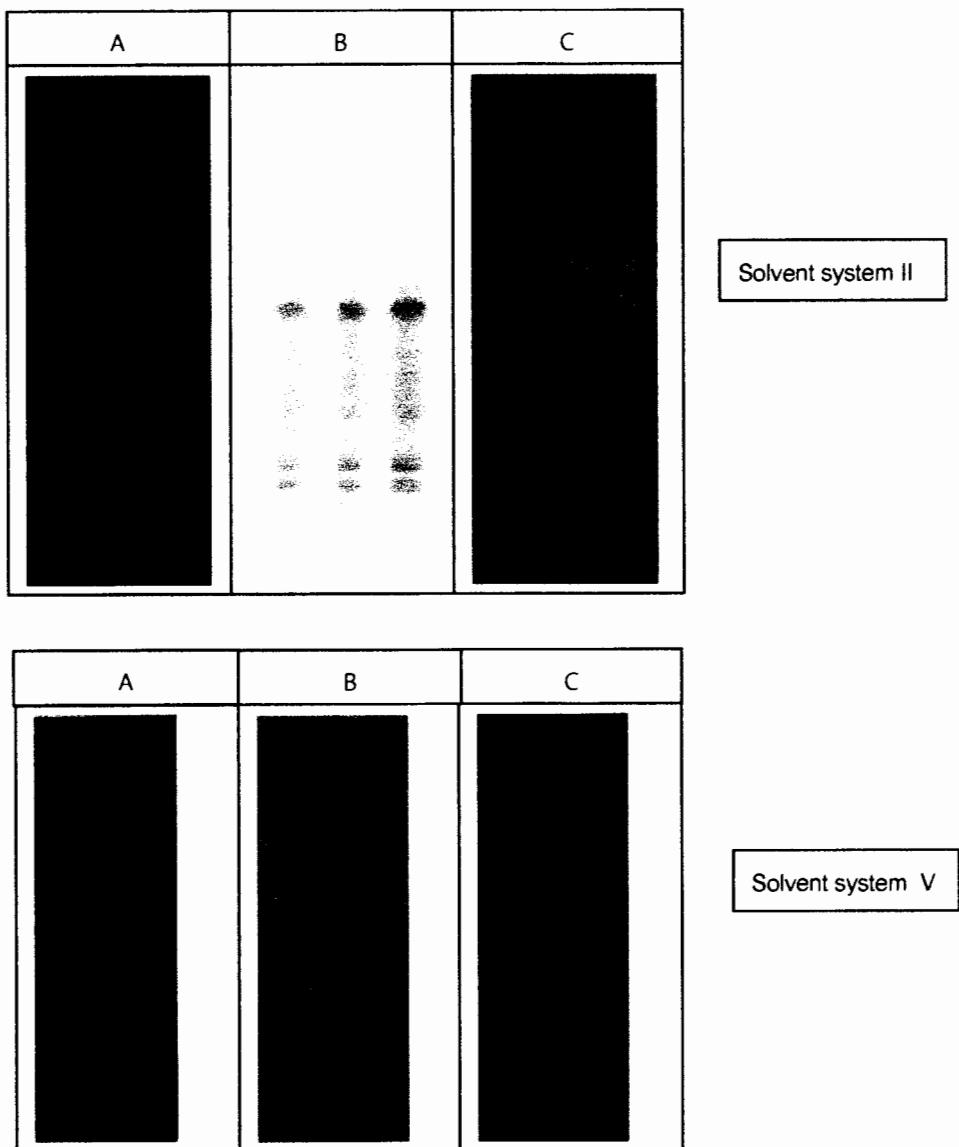
(H = สารสกัด hexane, D = สารสกัด dichloromethane, Et = สารสกัด ethyl acetate,
Me = สารสกัด methanol)



รูปที่ 9 TLC ของสารสกัดจากน้ำมาราธสีท์ โดยใช้ระบบ solvent system ระบบที่ III และ IV

Adsorbent : silica gel 60 F254
 Solvent system III : chloroform - methanol – acetic acid (75:20:10)
 Solvent system IV : butanol- acetic acid - water (40:10:50)
 Detection : A = UV light 254 nm, B = UV light 366 nm
 C = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ 110°C, 10 นาที

(H = สารสกัด hexane, D = สารสกัด dichloromethane, Et = สารสกัด ethyl acetate,
Me = สารสกัด methanol)



รูปที่ 10 TLC ของสารสกัด ethyl acetate โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ

Solvent system II : ethyl acetate-methanol-water (45:5:5),

Solvent system V: ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13)

Detection : A = UV light 254 nm

B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ 110°C, 10 นาที

C = 0.2% DPPH ใน methanol

หมายเหตุ แต่ละแผ่น spot สารสกัด ethyl acetate ชั้น 3 แบบ

3. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition Zone) ด้วยวิธี Disc diffusion method

สารสกัดน้ำมาราชสีทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *S. epidermidis* พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* คือ สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol ส่วนสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* คือสารสกัด Dichloromethane, สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol โดยสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือสารสกัด Ethyl acetate ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารสกัด ต่อเชื้อ *P. acnes*

ความเข้มข้น (mg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone (มม.) (n=3)				
	สารสกัด Hexane	สารสกัด Dichloromethane	สารสกัด Ethyl acetate	สารสกัด Methanol	Tetracycline (30μg/disc)
300	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	11.17 ± 0.65	7.83 ± 0.35	
200	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.47 ± 0.40	0.00 ± 0.00	
100	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.53 ± 0.06	0.00 ± 0.00	
					14.40±0.26

ตารางที่ 5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารสกัด ต่อเชื้อ *S. epidermidis*

ความ เข้มข้น (mg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone (มม.) (n=3)				
	สารสกัด Hexane	สารสกัด Dichloromethane	สารสกัด Ethyl acetate	สารสกัด Methanol	Tetracycline
300	0.00 ± 0.00	7.27 ± 0.47	10.43 ± 0.21	8.00 ± 0.61	
200	0.00 ± 0.00	6.13 ± 0.06	10.10 ± 0.10	6.33 ± 0.21	
100	0.00 ± 0.00	6.23 ± 0.15	8.53 ± 0.29	0.00 ± 0.00	
					26.27 ± 0.31

3.2 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเอทิลอะซีเตท โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method)

สารสกัด Ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่า เชื้อ *P. acnes* ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัด Ethyl acetate โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว

ชนิดของเชื้อ	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>P. acnes</i>	50	100
<i>S. epidermidis</i>	6.25	50

4. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase

สารสกัดน้ำนมราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol โดยสารสกัดสารสกัด Methanol ออกฤทธิ์สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ร้อยละของการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนaseของสารสกัดน้ำนมราชสีห์

สารทดสอบ	% Tyrosinase Inhibition
สารสกัด Methanol	61.59%
สารสกัด Ethyl acetate	50.25%
สารสกัด Hexane	25.38%
สารสกัด Dichloromethane	ไม่มีฤทธิ์
Kojic acid	69.90%

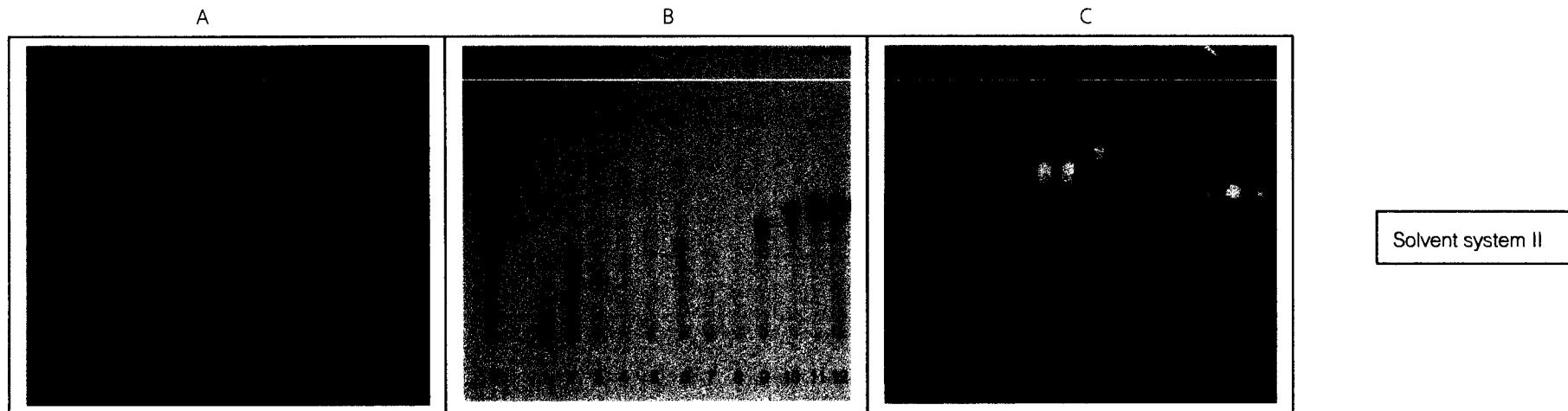
5. การแยกสารบริสุทธิ์

5.1 แยกสาร EH-1 จากสารสกัด Ethyl acetate

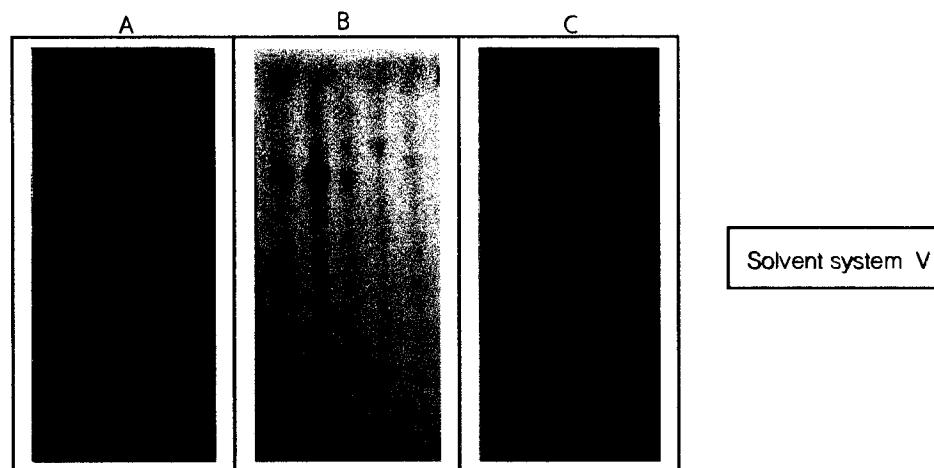
สารสกัด Ethyl acetate จำนวน (0.218 กรัม) เมื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาตอกราฟฟิ โดยใช้ Sephadex LH-20 (75-150 μm) จำนวน 25 กรัม เป็น adsorbent และใช้ตัวทำละลายในการ elute สารผ่านคอลัมน์ด้วย methanol-water (1:1) และ methanol ตามลำดับ เก็บรวม fraction ได้ทั้งสิ้น 15 fractions (Fr) น้ำหนักดังนี้ Fr1(0.006 กรัม), Fr2(0.067 กรัม), Fr3(0.010 กรัม), Fr4(0.008 กรัม), Fr5(0.008 กรัม), Fr6(0.006 กรัม), Fr7(0.003 กรัม), Fr8(0.001 กรัม), Fr9(0.0045 กรัม), Fr10(0.0035 กรัม), Fr11(0.0114 กรัม), Fr12(0.0073 กรัม), Fr13(0.0077 กรัม), Fr14(0.0248 กรัม), Fr15(0.0219 กรัม) TLC แสดงในรูปที่ 11 สาร EH-1 (0.0114 กรัม) ถูก elute ออกมาใน fraction ที่ 11 ด้วย methanol และพบว่าเป็น spot ที่ออกฤทธิ์ เมื่อทดสอบด้วย TLC-DPPH สาร EH-1 พบรอบ spot เดียว ลักษณะของสาร EH-1 เป็นผงสีเหลืองจำนวน 11.40 มิลลิกรัม ภาค TLC เมื่อใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent ระบบ mobile phase: ethyl acetate-methanol-water (45:5:5) สาร EH-1 มีค่า $R_f = 0.48$ ซึ่งมีค่าตรงกับสารมาตรฐาน Quercitrin (รูปที่ 12)

5.2 แยกสาร EH-2 จากสารสกัด Ethyl acetate

สารสกัด Ethyl acetate จำนวน (0.2059 กรัม) เมื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาตอกราฟฟิ โดยใช้ Sephadex LH-20 (75-150 μm) จำนวน 25 กรัม เป็น adsorbent และใช้ตัวทำละลายในการ elute สารผ่านคอลัมน์ด้วย water 100% เก็บรวม fraction ได้ทั้งสิ้น 7 fractions (Fr) น้ำหนักดังนี้ Fr1(0.0021 กรัม), Fr2(0.006 กรัม), Fr3(0.0086 กรัม), Fr4(0.0147 กรัม), Fr5(0.0184 กรัม), Fr6(0.0097 กรัม), Fr7(0.0052 กรัม) TLC แสดงในรูปที่ 13 สาร EH-2 (0.0052 กรัม) ถูก elute ออกมาใน fraction ที่ 7 และพบว่าเป็น spot ที่ออกฤทธิ์ เมื่อทดสอบด้วย TLC-DPPH สาร EH-2 พบรอบ spot เดียว ลักษณะของสาร EH-2 เป็นผงสีขาว จำนวน 5.20 มิลลิกรัม ภาค TLC เมื่อใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent ระบบ mobile phase: ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13) สาร EH-2 มีค่า $R_f = 0.39$ ซึ่งมีค่าตรงกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid (รูปที่ 14)



Et = สารสกัดหงายบ ethyl acetate



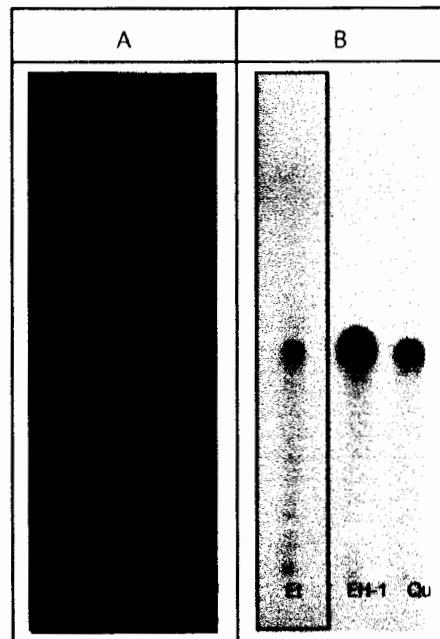
รูปที่ 11 TLC ของการรวม fraction สารสกัด ethyl acetate จาก columน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ Solvent system II : ethyl acetate-methanol-water (45:5:5), Solvent system V:ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13) เป็น mobile phase

Detection

: A = UV light 254 nm

B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ $110^\circ C$, 10 นาที

C = 0.2% DPPH ใน methanol

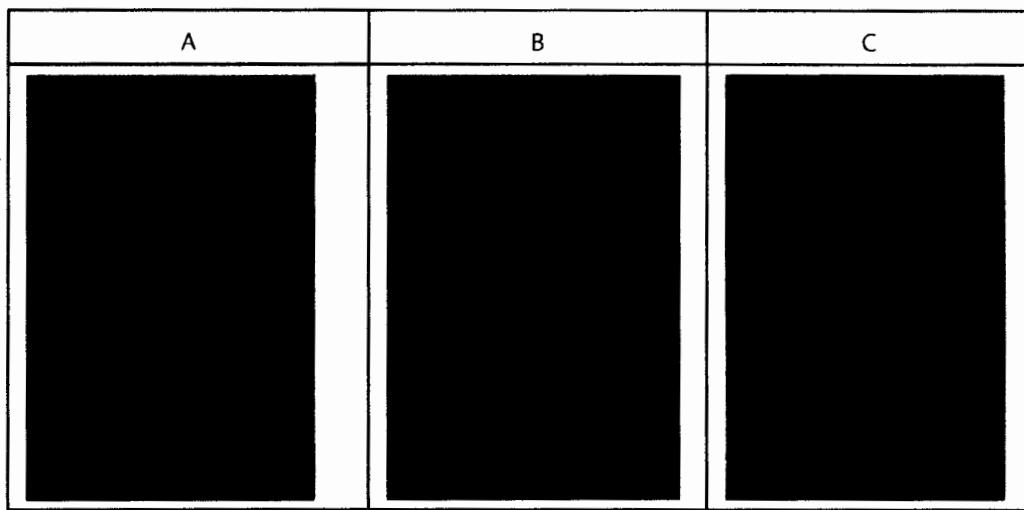


Et = สารสกัดหอยนางรม ethyl acetate

Qu = Quercitrin

รูปที่ 12 TLC ของสาร EH-1 เทียบกับสารมาตรฐาน Quercitrin โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ Solvent system: ethyl acetate-methanol-water (45:5:5) เป็น mobile phase

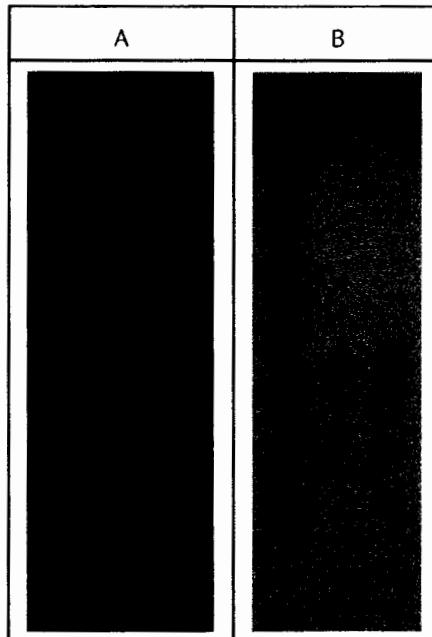
Detection A = UV light 254 nm
 B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ $110^\circ C$, 10 นาที



Et = สารสกัดหมาย ethyl acetate

รูปที่ 13 TLC ของการรวม fraction สารสกัด ethyl acetate จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ : ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13) เป็น mobile phase

Detection A = UV light 254 nm
 B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ $110^\circ C$, 10 นาที
 C = 0.2% DPPH ใน methanol



Et = สารสกัด helyan ethyl acetate

Ch = Chlorogenic acid

รูปที่ 14 TLC ของสาร EH-2 เทียบกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ Solvent system: ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13) เป็น mobile phase

Detection A = UV light 254 nm

B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ 110°C, 10 นาที

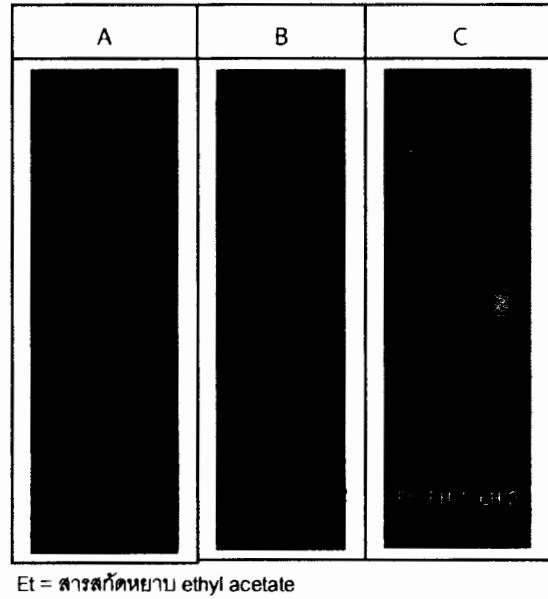
6. การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

6.1 การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH

การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระของสาร EH-1 และสาร EH-2 ที่แยกได้ พบร้าสารทั้งสองออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 และสารทั้งสองให้ผลบางกมือทดสอบด้วยวิธี TLC-DPPH ดังแสดงในรูปที่ 15

ตารางที่ 8 ค่า EC₅₀ ของสาร EH-1 และสาร EH-2 ที่แยกได้

สารทดสอบ	EC ₅₀ (μ g/mL) (n=3)
สาร EH-1	2.14 ± 0.03
สาร EH-2	2.19 ± 0.04



รูปที่ 15 TLC ของสาร EH-1 และ สาร EH-2 โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ: ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (50:5.5:5.5:13) เป็น mobile phase

Detection A = UV light 254 nm

 B = 30% H_2SO_4 ใน methanol และอบที่ 110°C, 10 นาที

 C = 0.2% DPPH ใน methanol

6.2 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

6.2.1 การทดสอบhabarivinylยับยั้งเชื้อ (Inhibition Zone) ด้วยวิธี Disc diffusion method

สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. acne* โดยที่ สาร EH-1 ออกฤทธิ์ดีกว่า EH-2 ตั้งแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone (มม.) (n=3)	
	สาร EH-1	สาร EH-2
<i>S. epidermidis</i>	7.17 ± 0.02	6.92 ± 0.12
<i>P. acne</i>	6.60 ± 0.00	6.60 ± 0.00

ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ 200 (mg/ml)

6.2.2 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารที่แยกได้ โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method)

สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากัน และฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* พบร้า สาร EH-2 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดที่แยกได้ โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว

MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
สาร EH-1	สาร EH-2	สาร EH-1	สาร EH-2
12.5	12.5	50	12.5

6.3 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase

สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase พบร้าสารทั้งสองไม่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ร้อยละของการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase ของสาร EH-1 และ สาร EH-2

สารทดสอบ	% Tyrosinase Inhibition
สาร EH-1	-300.83%
สาร EH-2	-133.33%

7. การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้

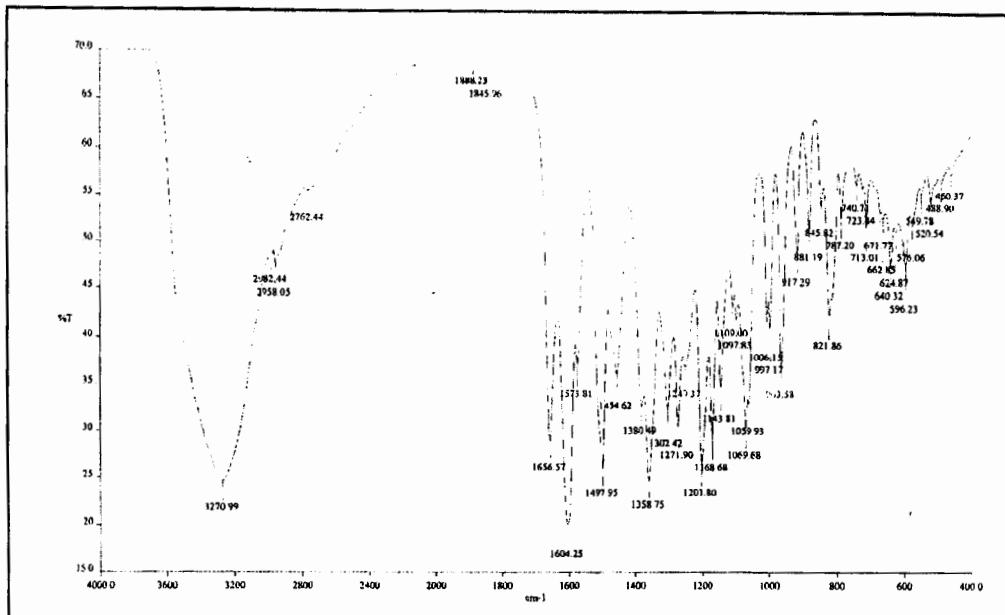
สาร EH-1 เป็นผงสีเหลือง และ สาร EH-2 เป็นผงสีขาว การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ทั้งสองชนิด โดยใช้เทคนิค FT-IR และ NMR Spectroscopy (¹H-NMR และ ¹³C-NMR)

7.1 สาร EH-1

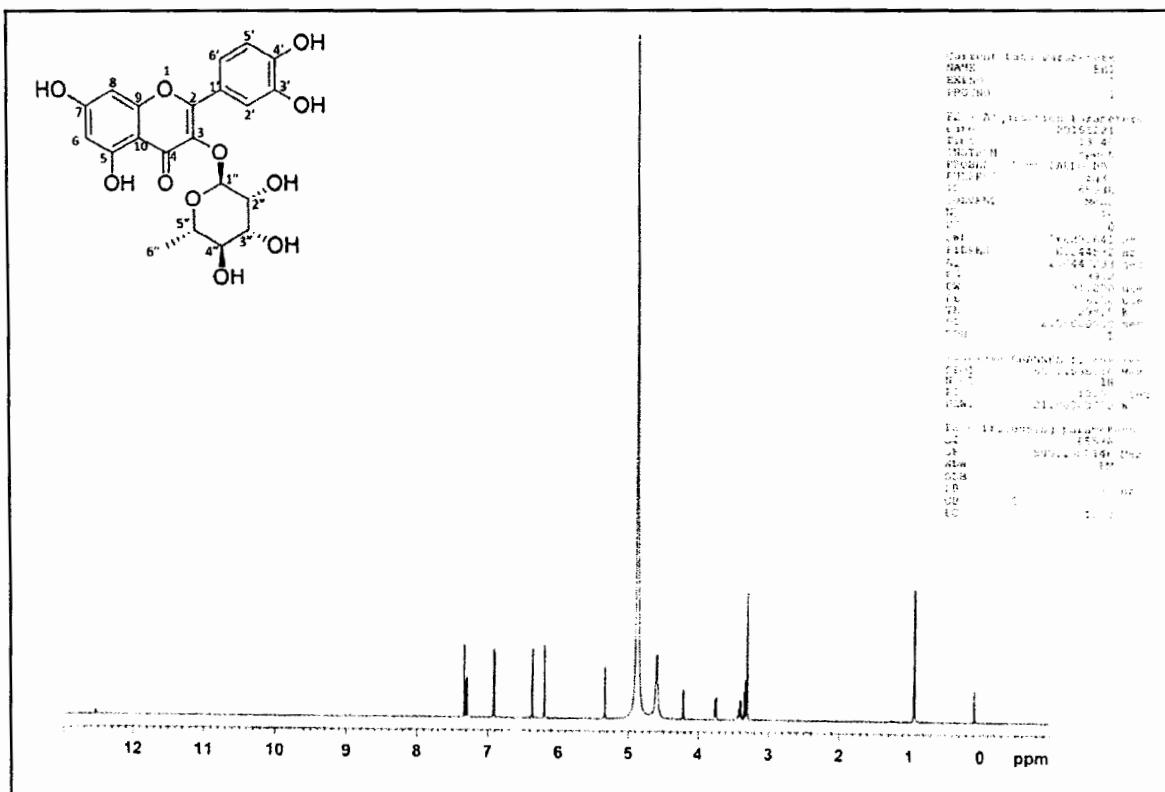
ลักษณะสาร : ผงสีเหลืองเข้ม

IR (KBr) : ν_{max} (cm⁻¹) 3270 (-OH stretching of phenol); 2958 (C-H stretching); 1656 (C=O stretching); 1604, 1497 (C-C aromatic ring stretching); 1358 (-OH bending of phenol);, 1271 (C-O stretching of aryl ether); 1201 (C-O stretching of phenol); 1168 (C-CO-C stretching and bending in ketone); 821 (C-H bending of aromatic hydrocarbon) (รูปที่ 16)

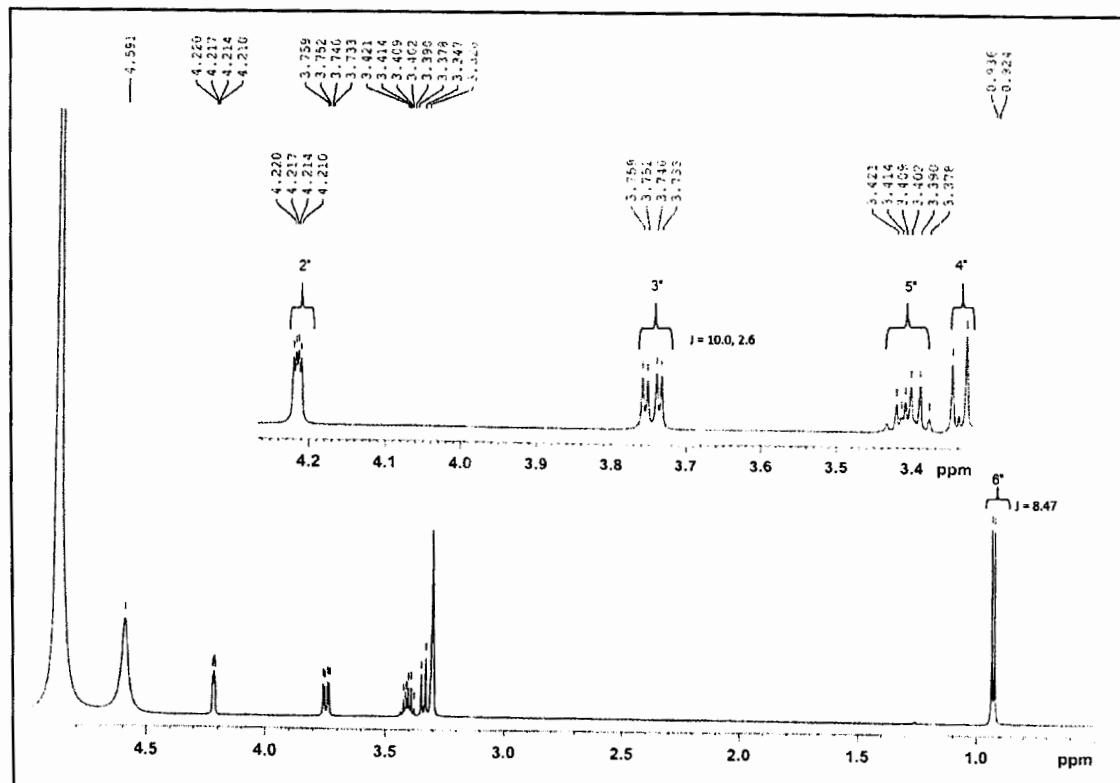
¹H-NMR และ ¹³C-NMR, ดูจากรูปที่ 17-22 และตารางที่ 12-14



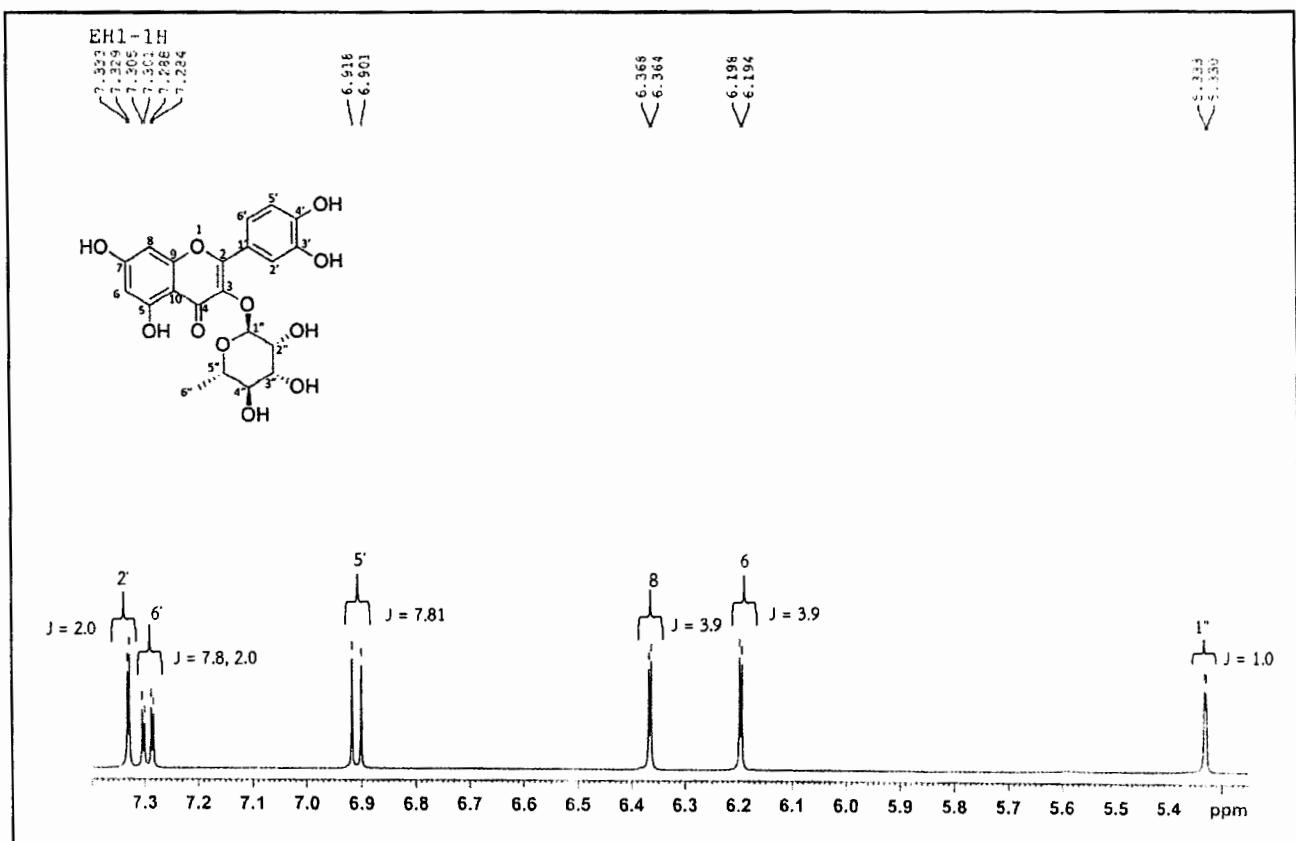
รูปที่ 16 IR Spectrum ของสาร EH-1



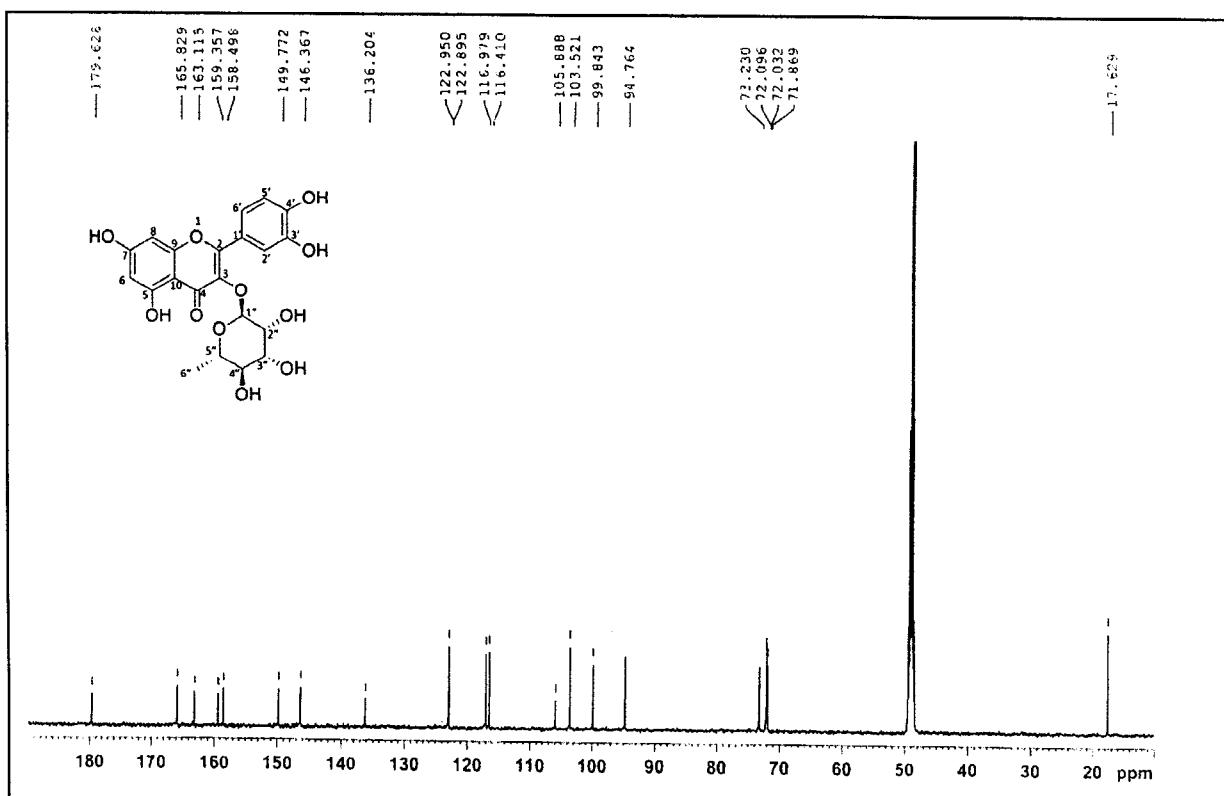
รูปที่ 17 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-1



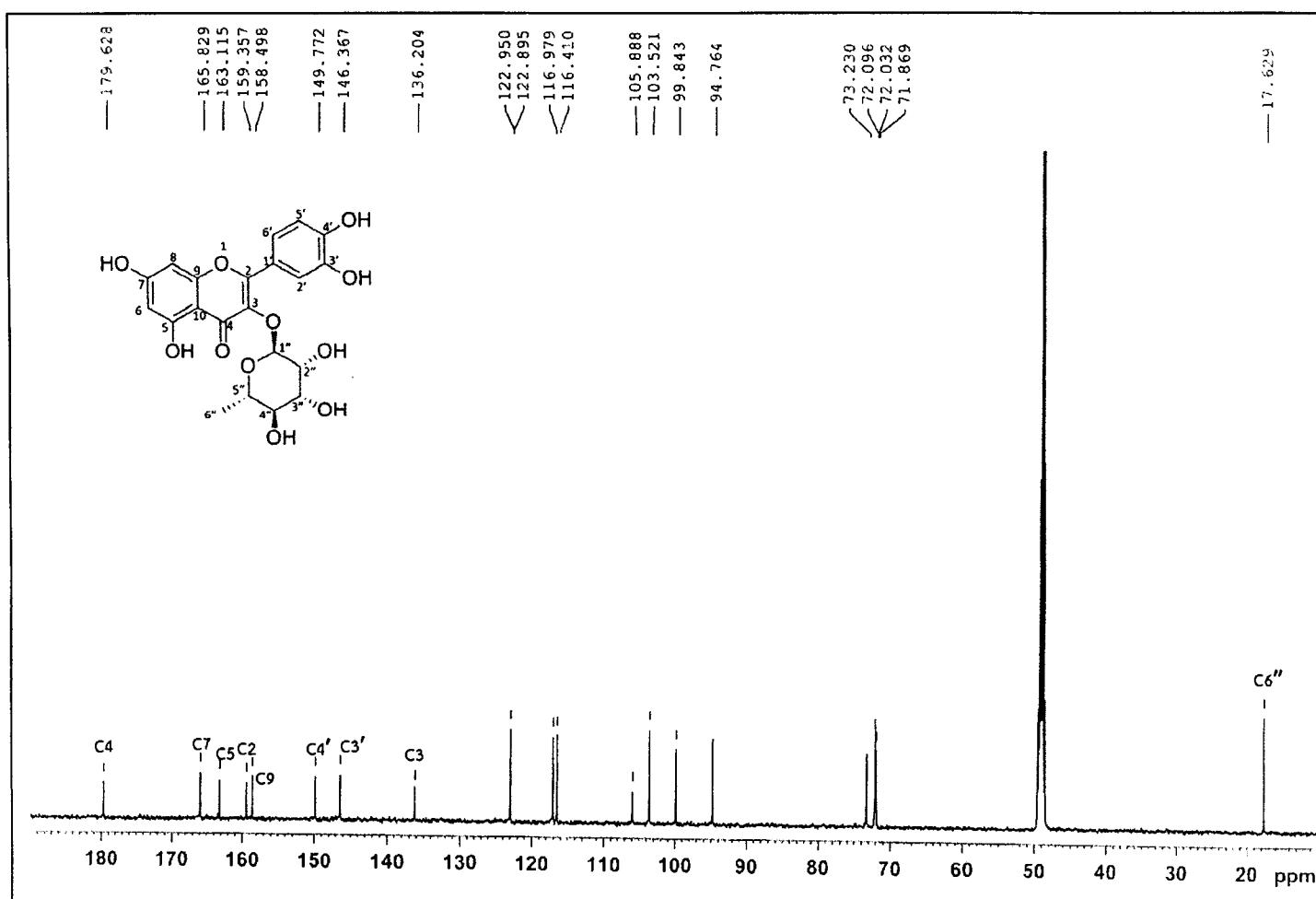
รูปที่ 18 ภาพขยาย 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-1 (0.9-4.5 ppm)



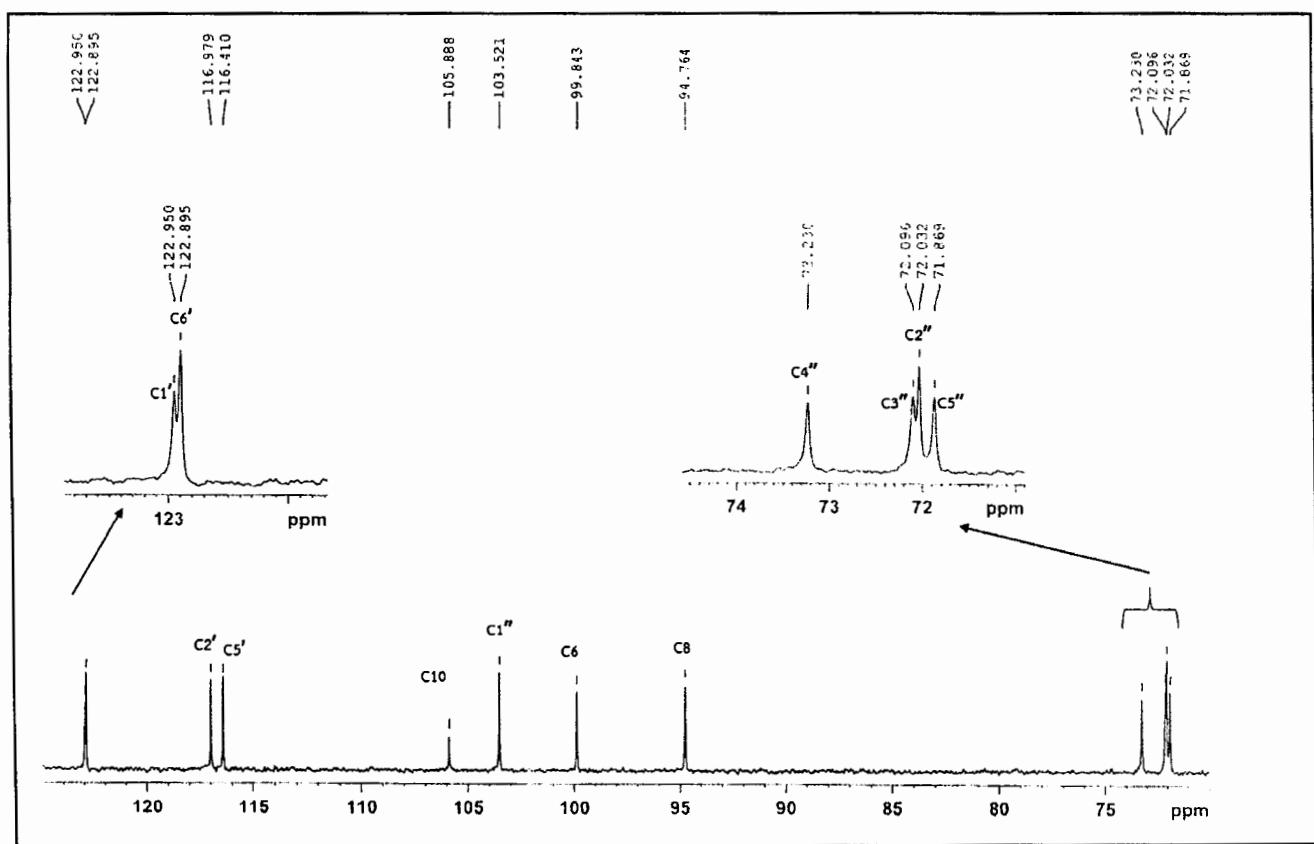
รูปที่ 19 ภาพขยาย 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-1 (5.3-7.4 ppm)



รูปที่ 20 125 MHz ^{13}C NMR spectrum ของสาร EH-1



รูปที่ 21 ภาพขยาย 125 MHz ^{13}C NMR spectrum ของสาร EH-1 (17-180 ppm)



รูปที่ 22 ภาพขยาย 125 MHz ^{13}C NMR spectrum ของสาร EH-1 (17-180 ppm)

ตารางที่ 12 ^{13}C NMR และ ^1H (NMR) ค่า chemical shifts ของ EH-1 (ใน methanol-D₄)^a

ตำแหน่งของคาร์บอน	^{13}C (δ /ppm)	^1H (δ /ppm) ^b
2	159.35	
3	136.20	
4	179.62	
5	163.11	
6	99.84	6.19 d ($J = 3.90$ Hz)
7	165.82	
8	94.76	6.36 d ($J = 3.90$ Hz)
9	158.49	
10	105.88	
1'	122.95	
2'	116.97	7.33 d ($J = 2.00$ Hz)
3'	146.36	
4'	149.77	
5'	116.41	6.91 d ($J = 7.81$ Hz)
6'	122.89	7.30 dd ($J = 7.81, 2.00$ Hz)
1''	103.52	5.33 d ($J = 1.00$ Hz)
2''	72.03	4.22 m
3''	72.09	3.74 dd ($J = 10.00, 2.60$ Hz)
4''	73.23	3.34 t ($J = 5.26$ Hz)
5''	71.86	3.40 m
6''	17.62	0.92 d ($J = 8.47$ Hz)

^a ^1H (500 MHz) โดยใช้ TMS เป็น internal standard และ ^{13}C (125 MHz) โดยใช้ solvent signal เป็น reference

d = doublet, dd = doublet of doublet, m = multiplet, s = singlet

ตารางที่ 13 ^{13}C NMR ค่า chemical shifts ของ EH-1 เปรียบเทียบกับ quercitrin จากเอกสารอ้างอิง (Wei-Ku Z, et al, 2012)

ตำแหน่งของ carbon	^{13}C (δ/ppm) ^a EH-1	^{13}C (δ/ppm) ^b quercitrin
2	159.35	158.4
3	136.20	135.8
4	179.62	179.4
5	163.11	163.2
6	99.84	99.5
7	165.82	165
8	94.76	94.5
9	158.49	158
10	105.88	105.8
1'	122.95	122.9
2'	116.97	116.8
3'	146.36	145.9
4'	149.77	149
5'	116.41	116.2
6'	122.89	122.6
1''	103.52	102.8
2''	72.03	71.5
3''	72.09	72.2
4''	73.23	73.1
5''	71.86	71.3
6''	17.62	17.8

^a ^{13}C NMR 125 MHz โดยใช้ metanol-D₄ เป็นตัวทำละลาย

^b ^{13}C NMR 100 MHz โดยใช้ acetone-D₄ เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 14 ^1H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-1 เปรียบเทียบกับ quercitrin จากเอกสารอ้างอิง (Wei-Ku Z, et al, 2012)

ตำแหน่งโปรตرون	^1H (δ /ppm) ^a EH-1	^1H (δ /ppm) ^b quercitrin
6	6.19 d ($J = 3.90$ Hz)	6.27 d ($J = 2.1$ Hz)
8	6.36 d ($J = 3.90$ Hz)	6.47 d ($J = 2.1$ Hz)
2'	7.33 d ($J = 2.00$ Hz)	7.50 d ($J = 2.2$ Hz)
5'	6.91 d ($J = 7.81$ Hz)	7.00 d ($J = 8.3$ Hz)
6'	7.30 dd ($J = 7.81, 2.00$ Hz)	7.40 dd ($J = 8.3, 2.2$ Hz)
1''	5.33 d ($J = 1.00$ Hz)	5.52 d ($J = 1.4$ Hz)
2''	4.22 m	4.33 dd ($J = 3.5, 1.4$ Hz)
3''	3.74 dd ($J = 10.00, 2.60$ Hz)	3.73 dd ($J = 9.8, 3.5$ Hz)
4''	3.34 t ($J = 5.26$ Hz)	3.36 t ($J = 9.0$ Hz)
5''	3.40 m	3.38 m
6''	0.92 d ($J = 8.47$ Hz)	0.92 d ($J = 5.9$ Hz)

^a ^1H (NMR) 500 MHz โดยใช้ methanol-D₄ เป็นตัวทำละลาย

^b ^1H (NMR) 400 MHz โดยใช้ acetone-D₄ เป็นตัวทำละลาย

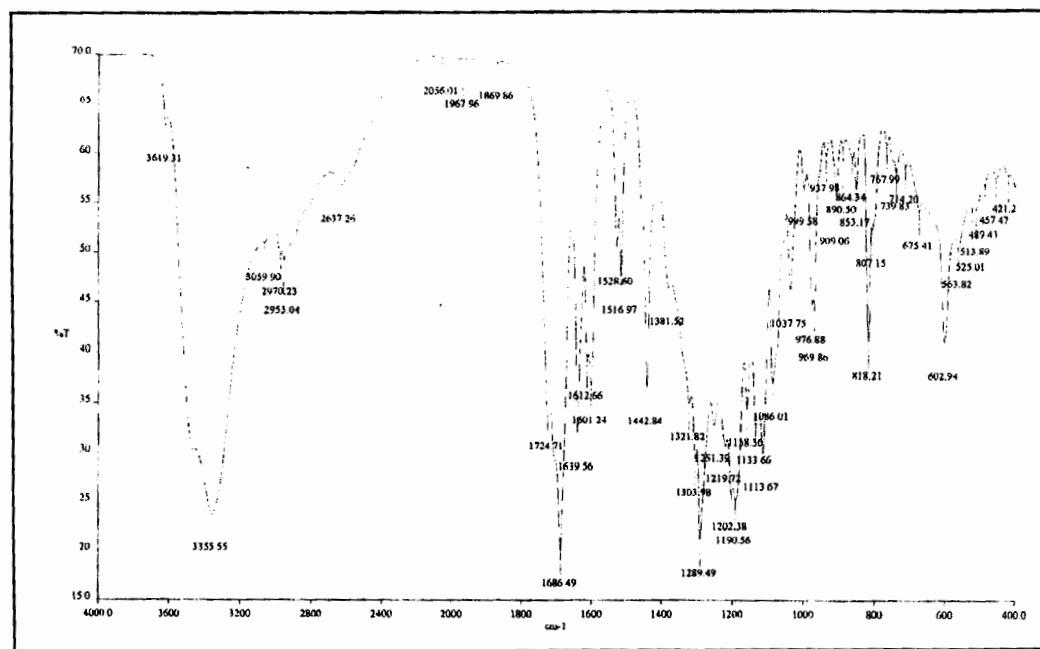
d = doublet, dd = doublet of doublet, m = multiplet, t = triplet

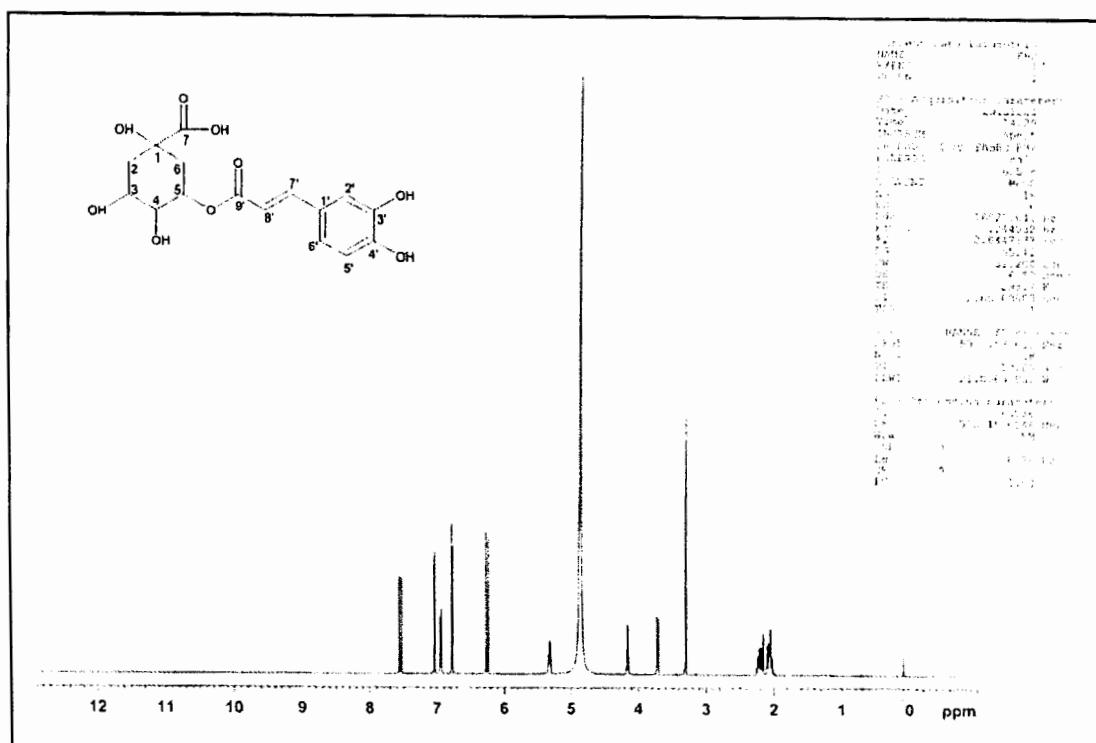
7.2 สาร EH-2

ลักษณะสาร : ผงสีขาว

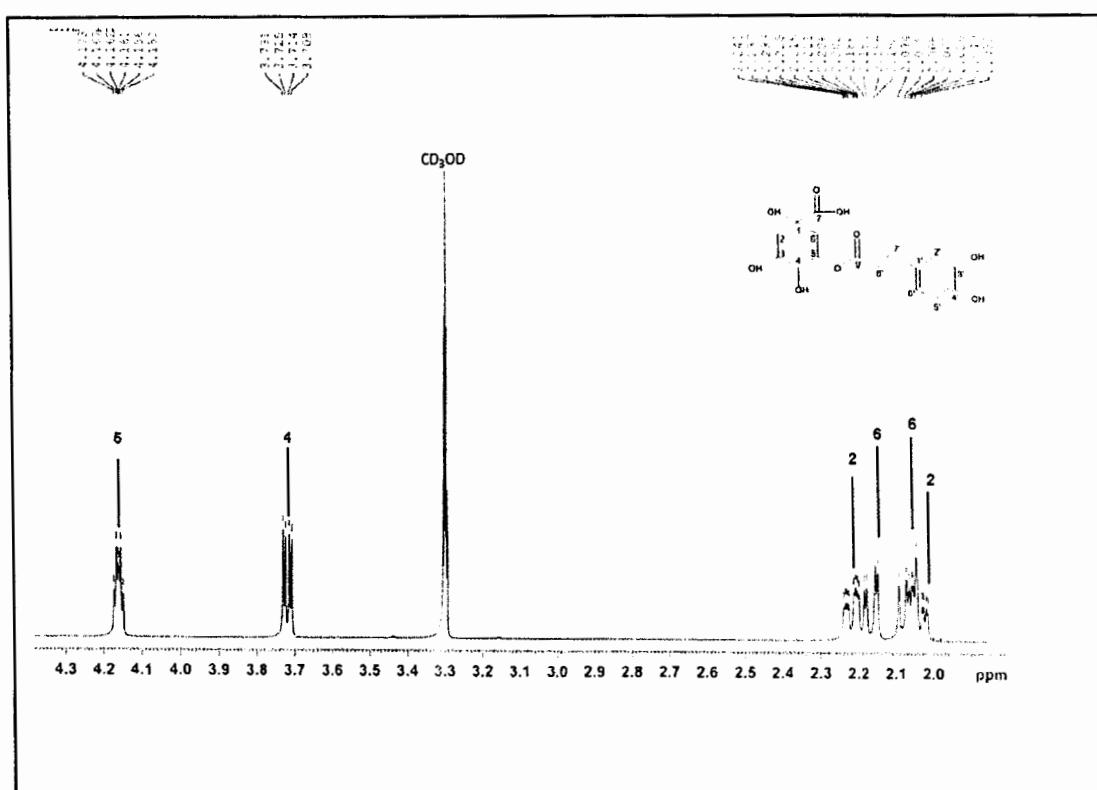
IR (KBr) : ν_{max} (cm^{-1}) 3355 (-OH aromatic alcohol stretching); 3059 (Ar-H aromatic ring stretching); 2953, 2970 (CH=CH stretching); 1686 ($\delta\text{C=O}$); 1516 ($\text{-C=C-aromatic ring}$); 1442 (CH_2 bending) 1289 (C-O) stretching; (รูปที่ 23)

$^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$, ดูจากรูปที่ 24-29 และตารางที่ 15-17

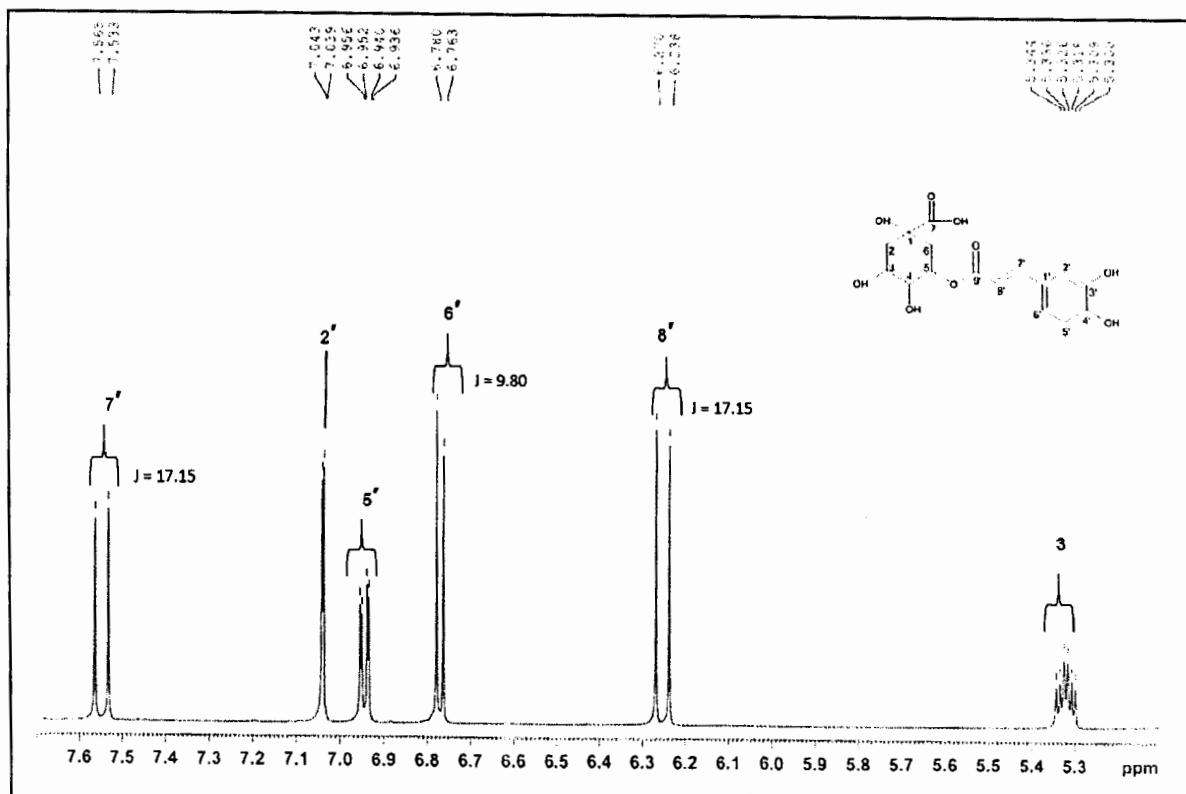




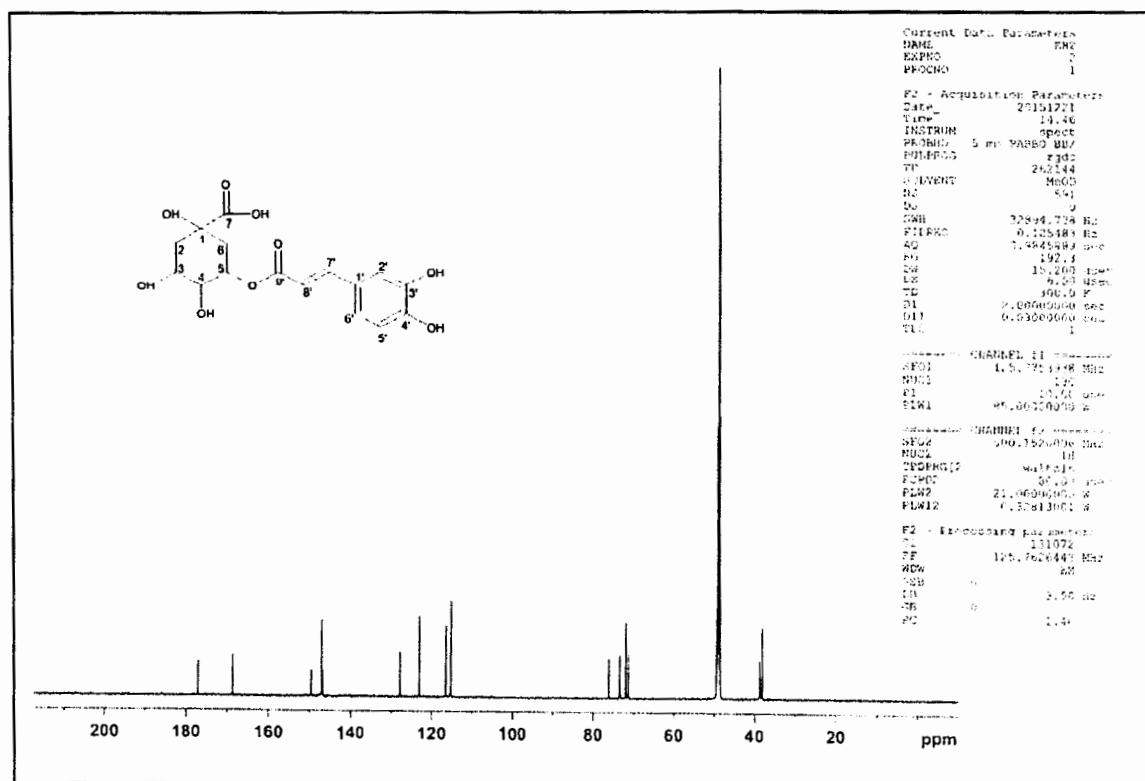
รูปที่ 24 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-2



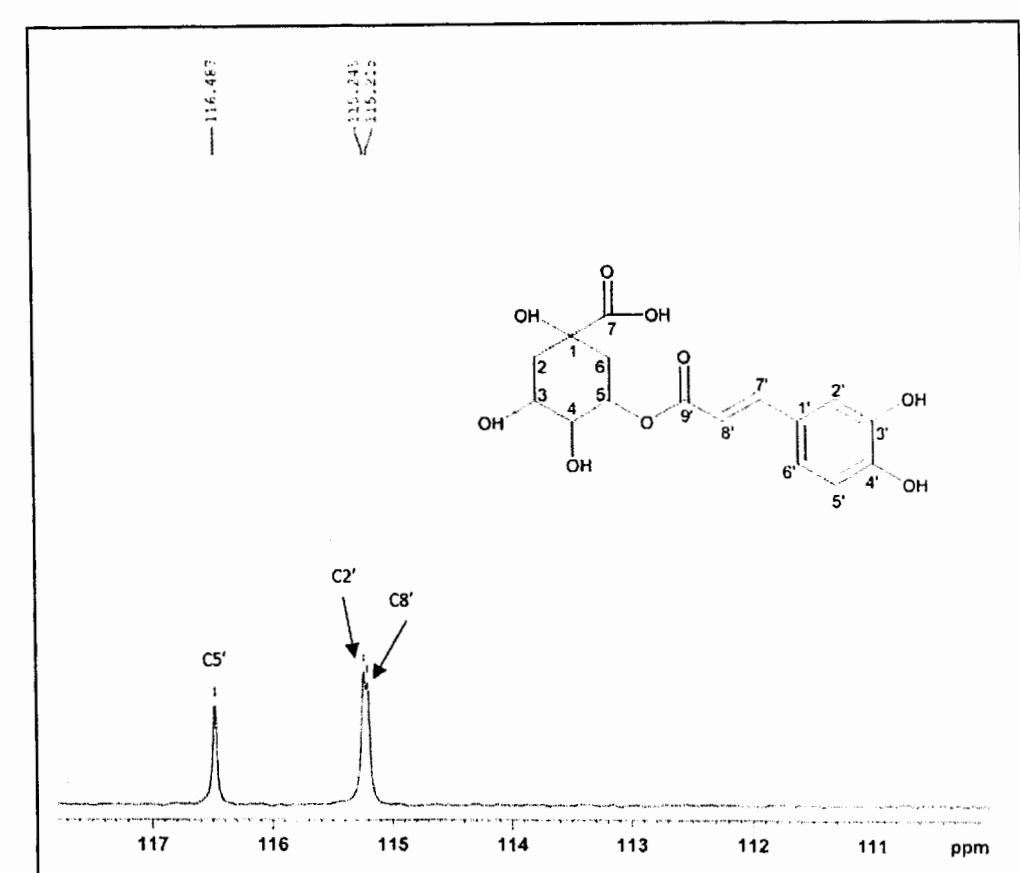
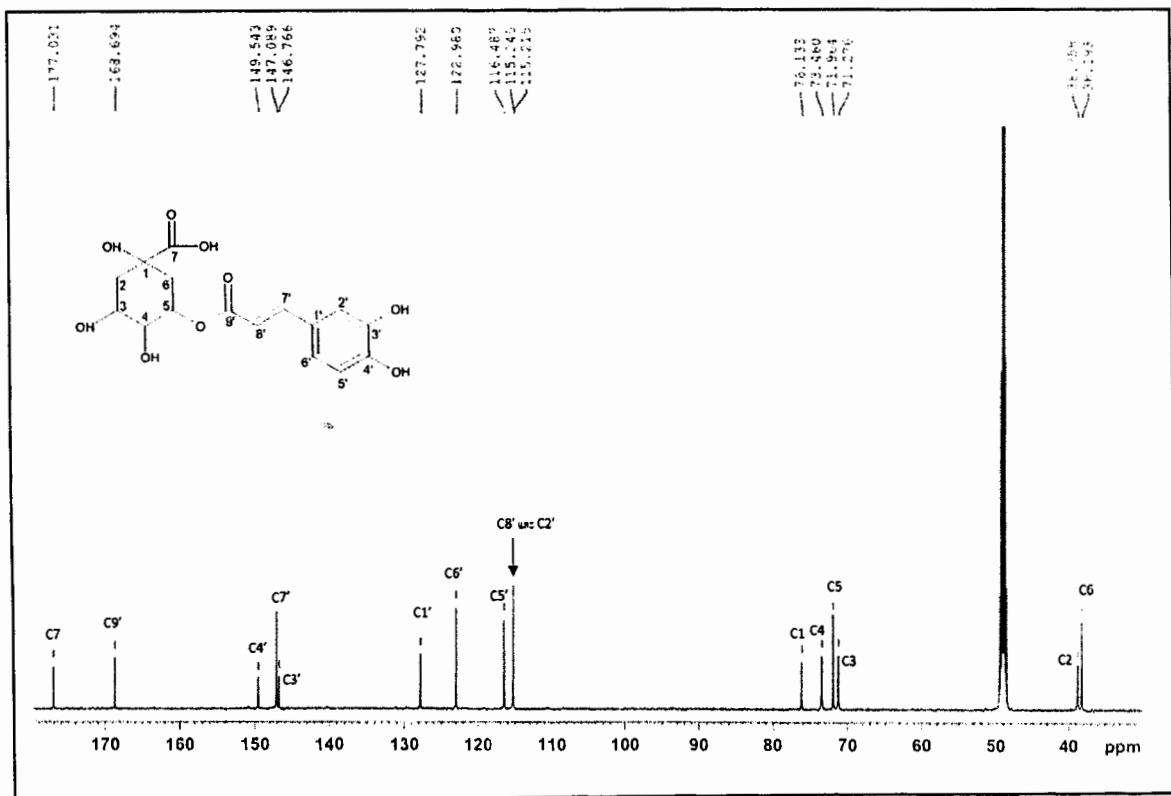
รูปที่ 25 ภาพขยาย 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-2 (2.0-4.2 ppm)



รูปที่ 26 ภาพขยาย 500 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร EH-2 (5.3-7.6 ppm)



รูปที่ 27 125 MHz ^{13}C NMR spectrum ของสาร EH-2



รูปที่ 28 ภาพขยาย 125 MHz ^{13}C NMR spectrum ของสาร EH-2 (38-178 ppm)

ตารางที่ 15 ^{13}C NMR และ ^1H (NMR) ค่า chemical shifts ของ EH-2 (ใน methanol-D₄)^a

ตำแหน่งของคาร์บอน	^{13}C (δ /ppm)	^1H (δ /ppm) ^b
1	76.13	
2	38.75	2.02 m
		2.21 m
3	71.27	5.32 m
4	73.46	3.72 d
5	71.96	4.16 m
6	38.19	2.05 m
		2.14 d
7	177.03	
1'	127.79	
2'	115.24	7.04 s
3'	146.76	
4'	149.54	
5'	116.48	6.95 d
6'	122.98	6.77 d ($J = 9.80 \text{ Hz}$)
7'	147.08	7.55 d ($J = 17.15 \text{ Hz}$)
8'	115.21	6.25 d ($J = 17.15 \text{ Hz}$)
9'	168.69	

^a ^1H (500 MHz) โดยใช้ TMS เป็น internal standard และ ^{13}C (125 MHz) โดยใช้ solvent signal เป็น reference

d = doublet, m = multiplet, s = singlet

ตารางที่ 16 ^{13}C NMR ค่า chemical shifts ของ EH-2 เปรียบเทียบกับ chlorogenic acid จากเอกสารอ้างอิง (Saurez-Quiroz ML, et al, 2014)

ตำแหน่งของ คาร์บอน	^{13}C (δ/ppm) ^a EH-2	^{13}C (δ/ppm) ^a chlorogenic acid
1	76.13	74.71
2	38.75	37.33
3	71.27	70.51
4	73.46	72.06
5	71.96	70.57
6	38.19	36.76
7	177.03	175.61
1'	127.79	126.32
2'	115.24	113.86
3'	146.76	145.33
4'	149.54	148.11
5'	116.48	115.07
6'	122.98	121.58
7'	147.08	145.66
8'	115.21	113.79
9'	168.69	167.27

^a ^{13}C NMR และ ^1H (NMR) 500 MHz โดยใช้ methanol-D₄ เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 17 ^1H NMR ค่า chemical shifts ของ EH-2 เปรียบเทียบกับ chlorogenic acid จากเอกสารข้างต้น
(Saurez-Quiroz ML, et al, 2014)

ตำแหน่งโปรตرون	^1H (δ /ppm) EH-2	^1H (δ /ppm) chlorogenic acid
2	2.02 m	2.02 br t
	2.21 m	2.22 br d
3	5.32 m	5.31 t
4	3.72 d	3.71 d
5	4.16 m	4.15 br s
6	2.05 m	2.05 br d
	2.14 d	2.14 d
2'	7.04 s	7.02 br s
5'	6.95 d	6.94 d
6'	6.77 d ($J = 9.80$ Hz)	6.75 d
7'	7.55 d ($J = 17.15$ Hz)	7.56 d
8'	6.25 d ($J = 17.15$ Hz)	6.22 d

^a ^1H (NMR) 500 MHz โดยใช้ methanol-D₄ เป็นตัวทำละลาย

br=broad, d=doublet, m=multiplet, s=singlet, t=triplet

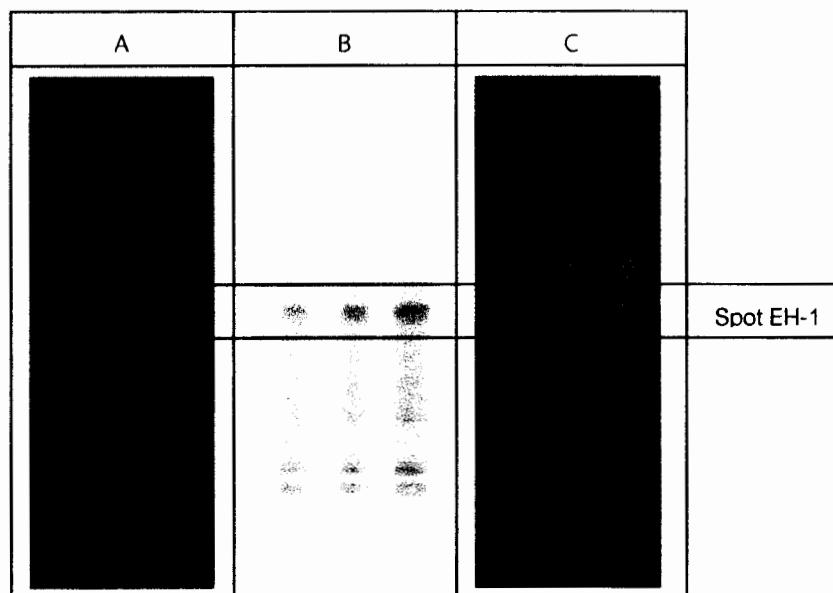
วิจารณ์

จากการทบทวนวรรณกรรม การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นน้ำ้มราชสีห์พบว่า รายงานผลการวิจัยใน การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความถูกต้องความเป็นพิษต่อเซลล์ ของวัชพืชไทยจำนวน 20 ชนิด สารสกัดเมทานอล ของน้ำ้มราชสีห์ ออกฤทธิ์สูงสุดในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl picrylhydrazyl) โดยมีค่า EC₅₀ = 4.48 ไมโครกรัม/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินอี (EC₅₀ = 6.53 μg/mL) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบ กับไพรทะเล (สุดารัตน์ และวิรัตน์, 2550) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพืชชนิดนี้ยังบังยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดฝี หนอง (*Staphylococcus aureus*) (Sudhakar M, et al, 2006) ทำให้ผู้วิจัยพยาบาลศึกษาการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนส์ เพื่อนำมาใช้กับโรคที่เกิดกับผิวน้ำ โดยเฉพาะ โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวน้ำ มักทำให้เกิดการอักเสบ บวม แดง และเมื่อโรคหายแล้วมักมีรอยของโรคเกิดขึ้น ทั้งนี้ การรักษาโรคกลุ่มนี้ให้มีประสิทธิภาพสูง ควรใช้สารที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อได้ ควบคู่กับการลดการอักเสบ หากสารมี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และทำให้ผิวน้ำขาวขึ้น ภายหลังจากการอยโรคหายไปแล้ว ก็นับว่าเป็นสารที่มีศักยภาพสูง มากในการรักษา จึงได้ใช้การทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้อง 3 ประการ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ และ ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ไทโรซีนส์ เป็นแนวทางในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่แยกได้

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากต้นน้ำ้มราชสีห์ จากส่วนเหนือดินด้วยตัวทำละลายชนิด ต่างๆ โดยนำมาทดสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ที่สุดคือ สารสกัด Ethyl acetate รองลงมาคือ สารสกัด Methanol เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *S. epidermidis* พบร่วมกับสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* คือ สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol ส่วน สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* คือสารสกัด Dichloromethane, สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol โดยสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด คือสารสกัด Ethyl acetate สาร สกัดน้ำ้มราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซีนส์ พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกสารสกัด Ethyl acetate มาทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป เนื่องจากเป็นสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้สูงในทุกการทดสอบ โดยใช้การ ทดสอบ TLC-DPPH เป็นการทดสอบร่วมเพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่ต้องการแยก

การแยกสารบริสุทธิ์ใช้เทคนิคคลุมั่นไฮโดรกราฟฟิค โดยใช้ Sephadex LH-20 ซึ่งเป็น adsorbent ที่มี โครงสร้างเป็น cross link of dextran molecule ที่มีความจำเพาะสูงกว่า adsorbent ชนิดอื่นๆ เนื่องจากสารที่ ต้องการแยกจะสามารถแทรกซึมเข้าไปในโมเลกุลเล็กๆ ของ adsorbent ที่มีลักษณะเป็น porous bead และทำให้การ แยกมีประสิทธิภาพ แต่การเก็บ adsorbent ชนิดนี้ควรเก็บไว้ในที่ค่อนข้างชื้น และต้องทำให้พองตัวสมบูรณ์ก่อนนำ 10ad ลงใน colloidal (Determann H, 1969) โดยจะเกิดกลไกการแยกแบบ size exclusion หรือการแยกตามขนาด โมเลกุล โดยโมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะแทรกตัวเข้าไปตามรูของ adsorbent ทำให้เคลื่อนที่ออกมายังช่องที่มี ขนาดใหญ่กว่า ในกรณีนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ mobile phase คือเมทานอล และน้ำ ที่ใช้ในการช่วยสาร ออกจากคลุมั่น โดยใช้ methanol-water (1:1) และ methanol ตามลำดับ ดังนั้นกลไกการแยกจึงเกิดขึ้นทั้ง การใช้ ขนาด และความมีข้อข้องโมเลกุลเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยสารอื่นๆ และสาร impurities จะถูกแยกออกมามีใช้ methanol-water (1:1) ขณะที่สาร EH-1 จะออกมานำเมื่อ elute ด้วย methanol 100% สำหรับการแยก สาร EH-2 ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้น้ำ 100% เป็น mobile phase พบร่วมสามารถกำจัดสารอื่นๆ และสาร impurities ที่ มีโมเลกุลใหญ่กว่าจะถูกชะออกมาก่อน ตามด้วยสาร EH-2 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะออกมากายหลัง ด้วยกลไก size exclusion

การตรวจสอบด้วย TLC-DPPH เพื่อใช้เป็นการทดสอบร่วมในการระบุสารออกฤทธิ์ที่ต้องการแยก (รูปที่ 30) พบว่าบริเวณ spot สีเหลืองเข้มในรูป B ซึ่งเป็น major spot ออกฤทธิ์ส่วน spot ด้านล่าง ออกฤทธิ์ต่ำกว่า ขณะที่ spot ด้านบน อาจเกิดการซ้อนทับของหลาย spot จึงได้ทำการแยก spot สีเหลืองเข้ม (EH-1) ผ่านคอลัมน์



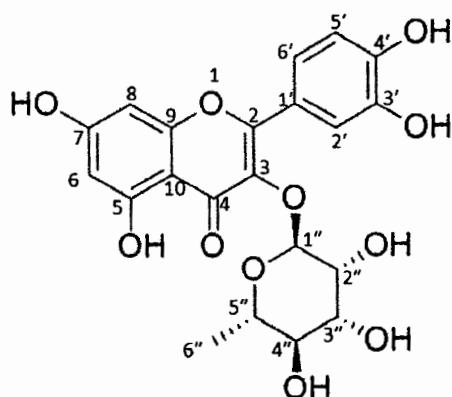
หมายเหตุ แต่ละแผ่น spot สารสกัด ethyl acetate ช้า 3 แผ่น

รูปที่ 30 TLC ของสารสกัด ethyl acetate โดยใช้ silica gel 60 F254 เป็น adsorbent และใช้ระบบ Solvent system: ethyl acetate-methanol-water (45:5:5) เป็น mobile phase

Detection :
 A = UV light 254 nm
 B = 30% H₂SO₄ ใน methanol และอบที่ 110°C, 10 นาที
 C = 0.2% DPPH ใน methanol

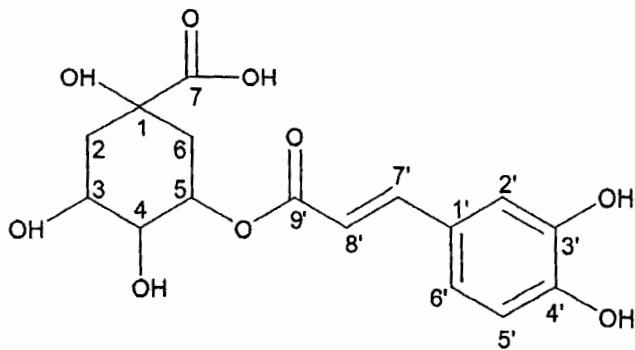
สาร EH-1 ในรูปสารบริสุทธิ์ ซึ่งเป็น major spot ถูกแยกออกจากสารสกัด Ethyl acetate โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โดยมาตรากราฟฟี่ จาก fraction ที่ 11 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม จากการวิเคราะห์โครงสร้างข้อมูล NMR และ IR โดยการเปรียบเทียบข้อมูล spectroscopic data กับสารที่ทราบโครงสร้างทางเคมีแล้ว (Wei-Ku Z, et al, 2012) พบว่าเป็นสารกลุ่ม flavonol glycoside ซึ่ง quercetin 3-O- α -L rhamnoside (quercitrin) (รูปที่ 31) จากข้อมูล IR พบค่า ν_{max} (cm⁻¹) 3270 (-OH stretching of phenol); 1656 (C=O stretching) จากข้อมูล ¹H NMR พบว่ามีจำนวน 5 aromatic proton ได้แก่ H6 และ H8 ซึ่งเกิด long range coupling และเกิด signal เป็น doublet โดยที่ค่า δ 6.19 เป็นตำแหน่งของ H6 และที่ δ 6.36 เป็นตำแหน่งของ H8 โดยมีค่า J=3.9 เท่ากัน สำหรับ aromatic proton ที่ downfield คือ H5' เกิด coupling กับ H6' เกิดสัญญาณเป็น doublet ที่ค่า δ 6.91 (J=7.81 Hz) ที่ตำแหน่ง H6' เกิดสัญญาณ dd (J = 7.81, 2.00 Hz) ที่ค่า δ 7.30 เนื่องจากเกิด coupling กับ H5' และเกิด long range coupling กับ H2' ส่วนที่ H2' อยู่ที่ตำแหน่ง δ 7.33 d (J=2.00 Hz) สำหรับตำแหน่งโปรตอนที่น้ำตาล rhamnose พบ methyl proton (3H) ที่ตำแหน่ง 6" ที่ค่า δ 0.92 d (J = 8.47 Hz) เนื่องจากเกิด coupling กับ H5"

(1H) ส่วน H5" เกิด multiplet ที่ค่า δ 3.4 ส่วนโปรตอรอนที่ H1" downfield กว่าตำแหน่งที่เหลือเนื่องจากได้รับอิทธิพลจาก -O- 2 ตำแหน่ง สเปกตรัมของ ¹³C NMR พบรัญญาณที่ downfield ที่ค่า δ 179.62 คือ carbonyl carbon (-C=O), olefinic carbon ของ C2 และ C3 ที่ค่า δ 159.35 และ 136.20 ตามลำดับ ที่ค่า δ 163.11 คือ =C-OH ของ H5 สำหรับตำแหน่งอื่นๆ มีค่าตรงกับการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Wei-Ku Z, et al, 2012) จึงสรุปได้ว่า EH-1 คือ quercitrin (quercetin 3-O- α -L rhamnoside) ซึ่งเป็นสารกลุ่มพลาโนอยด์ นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC พบร่วมค่า Rf ของ EH-1 ตรงกับสารมาตรฐาน quercitrin



รูปที่ 31 โครงสร้างของสาร EH-1

สาร EH-2 ในรูปสารบริสุทธิ์ ซึ่งเป็น minor spot ถูกแยกออกจากสารสกัด Ethyl acetate โดยใช้เทคนิค kolamn chromatography จาก fraction ที่ 7 มีลักษณะเป็นผงสีขาว จากการวิเคราะห์โครงสร้างข้อมูล NMR และ IR โดยการเปรียบเทียบข้อมูล spectroscopic data กับสารที่ทราบโครงสร้างทางเคมีแล้ว (Saurez-Quiroz ML, et al, 2014) พบร่วมค่า เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ชื่อ 5-o-caffeooyl quinic acid (chlorogenic acid) (รูปที่ 32) จากข้อมูล IR พบร่วมค่า ν_{max} (cm⁻¹) 3355 (-OH aromatic alcohol stretching); 3059 (Ar-H aromatic ring stretching); 2953, 2970 (CH=CH stretching); 1686 (>C=O); 1516 (-C=C-aromatic ring); 1442 (CH₂ bending) และ 1289 (C-O stretching) จากข้อมูล ¹H NMR พบร่วมค่า 2 ortho-coupled doublet ของ แต่ละ proton ที่ค่า δ 6.95, 6.77 และ singlet ที่ δ 7.04 ซึ่งแสดงถึง tri-substituted aromatic ring พบร่วมค่า 2 ตำแหน่ง ของแต่ละโปรตอรอน ที่ค่า δ 7.55(H- 7') และ 6.25(H- 8') แสดงถึง trans-di-substituted ethylene ในโมเลกุล สำหรับตำแหน่งอื่นๆ มีค่าตรงกับการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Saurez-Quiroz ML, et al, 2014) จากข้อมูล ¹³C NMR พบร่วมค่า จำนวนการบอนทั้งหมด 16 ตำแหน่ง โดยพบร่วม carbonyl carbon 2 ตำแหน่ง ที่ค่า δ 177.03 และ 168.69 ซึ่งตรงกับคาร์บอนที่ 7 และ 9' ตามลำดับ พบร่วม 2 aromatic carbon ที่จับกับ OH ที่ค่า δ 146.76 และ 149.54 ซึ่งตรงกับคาร์บอนที่ 3' และ 4' ตามลำดับ พบร่วม olefinic carbon 2 ตำแหน่ง ที่ค่า δ 147.08 และ 115.21 ซึ่งตรงกับคาร์บอนที่ 7' และ 8' ตามลำดับ พบร่วม 4 aromatic carbon ที่ตำแหน่ง 1', 2', 5' และ 6' ที่ค่า δ 127.79, 115.24, 116.48 และ 122.98 ตามลำดับ คาร์บอน 3 ตำแหน่งที่ต่อ กับ OH ที่ค่า δ 76.13, 71.27 และ 73.46 คือ คาร์บอนที่ 1, 3 และ 4 ตามลำดับ คาร์บอน 1 ตัว ที่ต่อ กับ ester group ที่ค่า δ 71.96 คือ carbon ที่ตำแหน่ง 5 และ methylene carbon 2 ตัว ที่ δ 38.75 และ 38.19 คือ carbon ที่ตำแหน่ง 2 และ 6 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า EH-2 คือ chlorogenic acid (5-o-caffeooyl quinic acid) นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC พบร่วมค่า Rf ของ EH-2 ตรงกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid



รูปที่ 32 โครงสร้างของสาร EH-2

ปัจจุบันมีรายงานสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 5,000 ชนิด โดยพลาโนนอยด์จัดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ที่ออกฤทธิ์สูงสุด และมีหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน (Zhang Y, et al, 2014) รวมทั้ง EH-1 ซึ่งพบว่าออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารมาตรฐาน tannic acid และ วิตามินอี ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงเบนซิน 2 วง เชื่อมต่อกับวง pyran (C6-C3-C6) โดยการที่มี OH บน aromatic ring หลายตำแหน่ง ทำให้มีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) แล้ว โมเลกุลยังคงมีความเสถียร ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม polyphenol สำหรับสาร chlorogenic acid จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบได้ในพืชหลายชนิด และมีโครงสร้างของ phenolic group ในโมเลกุล

สารบริสุทธิ์ EH-1 และ EH-2 เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวน้ำ พบร่วมกันว่าสารทั้งสองออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัด และออกฤทธิ์ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษ หรือการตั้งตัวรับ เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ๆจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูง

สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. acne* โดยที่สาร EH-1 ออกฤทธิ์ดีกว่า EH-2 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) พบร่วมกันว่าสารทั้งสอง ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากัน และฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (MBC) ต่ำเชื้อ *S. epidermidis* พบร่วมกันว่า สาร EH-2 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า แต่การออกฤทธิ์ยังต่ำกว่าสารมาตรฐาน โดยสาร EH-1 ออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับสารสกัด ส่วนสาร EH-2 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัด จึงอาจพัฒนาเป็นยาต้านอนุมูลอิสระ นำไปใช้ในด้านการต่อต้านจุลชีพได้ เช่น การปรับปรุงโครงสร้าง การหากลไกการออกฤทธิ์ ส่วนสาร EH-1 อาจนำไปพัฒนาเป็นยารักษาร่วมได้ สาร EH-1 และ สาร EH-2 ที่แยกได้ เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อ *S. epidermidis* พบร่วมกันว่าสารทั้งสองไม่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* แต่สารสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ 50.25% ดังนั้นจึงอาจมีสารชนิดอื่นๆในสารสกัด ที่ออกฤทธิ์จึงอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

การสกัดส่วนเหนือดินของต้นน้ำ้มราชสีห์ (*Euphorbia hirta L.*) ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ได้น้ำหนักสารสกัด คิดเป็น % yield 3.08, 1.28, 1.66 และ 13.96 ตามลำดับ

การตรวจสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัด พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ที่สุดคือ สารสกัด Ethyl acetate รองลงมาคือ สารสกัด Methanol โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 24.54 และ 28.75 μg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัด Hexane และสารสกัด dichloromethane ไม่ออกฤทธิ์ สารสกัดน้ำ้มราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ *S. epidermidis* พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* คือ สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol ส่วนสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* คือสารสกัด Dichloromethane, สารสกัด Ethyl acetate และสารสกัด Methanol โดยสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือสารสกัด Ethyl acetate จากการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเอทิลอะลกอฮอล์โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) สารสกัด Ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. acnes* โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 6.25 และ 50 mg/mL ตามลำดับ ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 50 และ 100 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดน้ำ้มราชสีห์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase พบร่วมสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol โดย % Tyrosinase Inhibition เท่ากับ 50.25% และ 61.59% ตามลำดับ

สารสกัด Ethyl acetate นำมาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคลอ้มนีโครมาโดยใช้ sephadex LH-20 เป็น adsorbent และแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ EH-1 (quercitrin) 5.23% และ EH-2 (chlorogenic acid) 2.53% ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย การหาโครงสร้างของสารทั้งสองด้วยเทคนิค IR, ¹H และ ¹³C-NMR โดยเปรียบเทียบกับเอกสารที่มีรายงานโครงสร้างแล้ว

สาร EH-1 และ สาร EH-2 ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.14 และ 2.19 μg/mL ตามลำดับ และออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากันที่ 12.5 mg/mL และฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* พบร่วมค่า MBC ของสาร EH-1 และ EH-2 เท่ากับ 50 และ 12.5 mg/mL ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตของต้นน้ำ้มราชสีห์ ควรมีการแยกสารบริสุทธิ์ชนิดอื่นๆ ต่อไป หรือนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ การปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้ออกฤทธิ์ได้มากขึ้น การศึกษาความเป็นพิษ เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาใหม่ในการรักษาโรคเกี่ยวกับผิวนังต่อไป

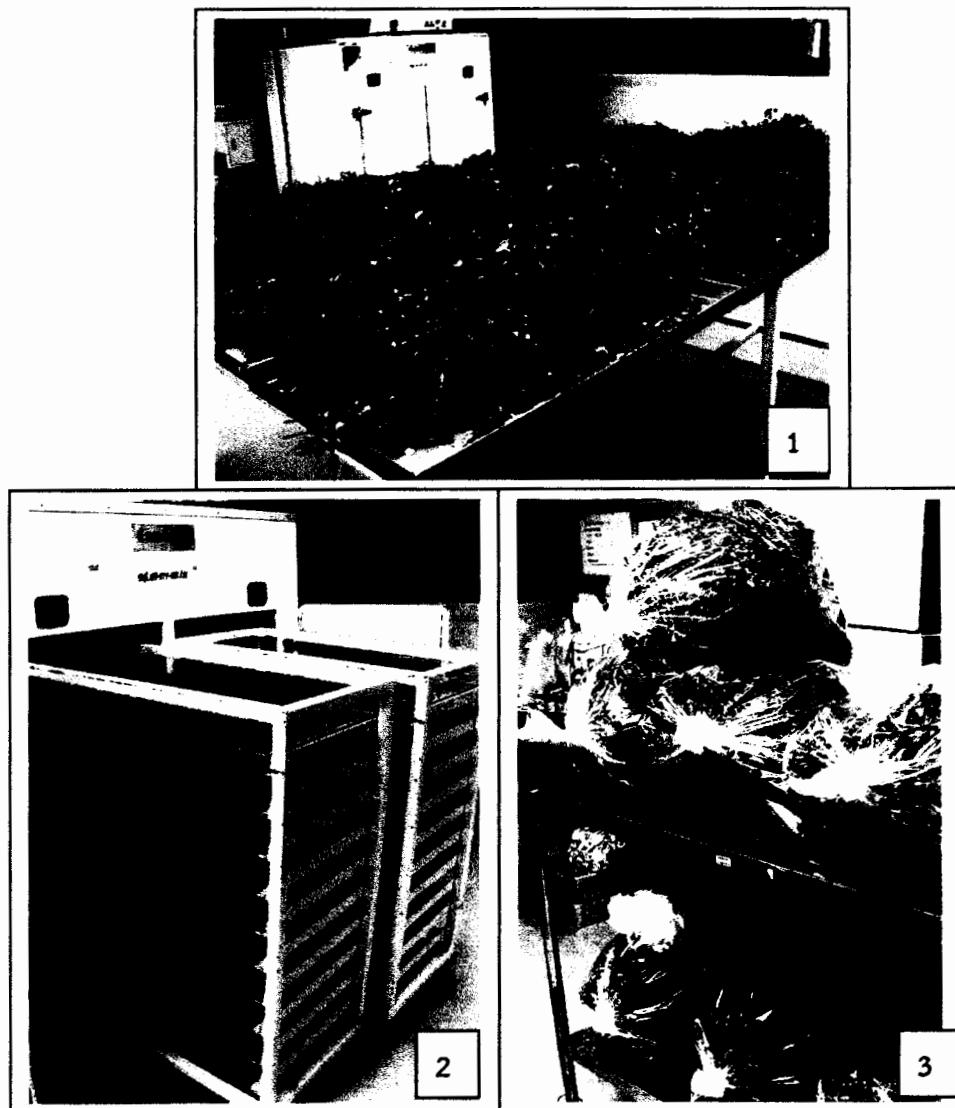
เอกสารอ้างอิง

- จริยา ชมารินทร์และคณะ. แบคทีเรียไทยพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น : ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2546
- ดรุณ เพ็ชรพลาย, จาเรย์ บันสิทธิ์, ณุณัตรา จันทร์สุวนิชย์, ประตอน ทองศรีรักษ์, ชาตรี ชาญประเสริฐ.
สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). พิมพ์ครั้งที่ 4. รุ่งเรืองสารสนการพิมพ์:กรุงเทพมหานคร, 2541.
- นริศา คำแก่น. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร. กรุงเทพฯ : กีอปปี้บ็อกซ์ , 2551.
- นริกุล สุระพัฒน์ และคณะ. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร:
กรุงเทพมหานคร, 2526.
- นันทวน บุณยะประภัสสร และอรุณ โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2). ประชาชน จำกัด :
กรุงเทพมหานคร, 2541.
- นิจศิริ เรืองรังษี. สมุนไพรไทย Thai herbs เล่ม 1. ฐานการพิมพ์:กรุงเทพมหานคร, 2547
- ปกิต วิชัยานนท์, สุกัญญา โพธิกรรม, เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม. ตำราโรคภัยแพ้ Allergy 2000's. ชวนพิมพ์:
กรุงเทพมหานคร, 2541.
- ภัทรชัย กีรติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยศิลปากร. การประชุมเชิงปฏิบัติการ
เรื่องการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพ
รัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เนื่องในโอกาสเฉลิมพระชนมายุครบ 60 พรรษา. 8-9 มิถุนายน
2558, ณ หอประชุมภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม.
- มัณฑนา ภาณุมาภรณ์ และศิรประภา หับทิม. การบริบาลทางเภสัชกรรมในผู้ป่วยโรคภัยแพ้. กรุงเทพ
เวชสาร : สมุทรปราการ :, 2548.
- วงศ์สกิตย์ ฉั่วกลุ, รุ่งระวี เด็มศิริกุษ์กุล, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วิชิต เปานิล. สยามไภัชยพถกษ์:ภูมิ
ปัญญาของชาติ. ออมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชิชิ่ง จำกัด (มหาชน) : กรุงเทพมหานคร, 2538
- วิทยา บุญราพัฒน์. สารนุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้ป้อยในประเทศไทย. ส.จิตราการพิมพ์:
กรุงเทพมหานคร, 2554
- สุดารัตน์ หอมหลวง และวิรัตน์ จันทร์ตรี, 2550. รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาทางเคมี และฤทธิ์ทาง
ชีวภาพของวัชพืชในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัย อุบลราชธานี
ประจำปี 2550.
- อนันต์ สกุลกิม. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 8 (1),
2551. หน้า 1-7.
- อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังสีภานุรัตน์. แบคทีเรียทางการแพทย์, พิมพ์ครั้งที่ 2
สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย:กรุงเทพมหานคร,. 2553.
- โอลga วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจุ่ง, จันทนา บุณยะรัตน์, มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง.สารต้านอนุมูลอิสระ Radical
Scavenging Agents. พี.เอ.ส.พรินต์:กรุงเทพมหานคร, 2549.
- Barnes J, Anderson LA, Philipson JD. 2007. Herbal Medicine. 3rd. Pharmaceutical
Press:London.
- Blanc P and Saquisannes G, 1972. Flavonoids of *Euphorbia hirta*. Planta Med Phytother
6(2): 106-109.

- Chen L. 1991. Polyphenol from leaves of *Euphorbia hirta* L. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 16(1): 38-39.
- David N., Gilbert MD, Robert C., Moellering MD, George M. Eliopoulos, Merle A. Sande. 2008. THE SANFORD GUIDE TO ANTIMICROBIAL THERAPY. Congo J Ethnopharmacology 93:27-32.
- Determan H. 1969. Gel Chromatography. Springer Verlag:New York.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Ethnopharmacology 101:330-333.
- Hiermann A and Bucar F, 1994. Influence of some traditional medicinal plants of Senegal on prostaglandin biosynthesis. J Ethnopharmacology 42(4):111-116.
- Lanher MC, Fleurentin J, Cabalion P, Rolland A, Dorfman P, Misslin R, Pelt J-M. 1990. Behavioral effects of *Euphorbia hirta*. I : sedative and axiolytic properties. J Ethnopharmacology 29(2):189-198.
- Lanher MC, Fleurentin J, Dorfmann P, Mortier F, Pelt JM. 1991. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of *Euphorbia hirta*. Planta Med 57(3): 225-231.
- Likhitwitayawuid K, Sritularak B, De-Eknamkul W. 2000. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus gomezianus*. Planta Med 66: 275-277.
- Matsuda T, Odaka Y, Natsuko O, Nakamuto K, Kuninago H. 2008. Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemon grass (*Cymbopogon citratus*). J Agric Food Chem 56:597-601.
- Ndip RN, Tarkang AEM, Mbullah SM, Luma HN, Malongue A, Ndip LM, Nyongbela K, Wirmum C, Efange MN. 2007. In vitro anti *Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from north west Cameroon. J Ethnopharmacology 114:452-457.
- Sanchez-Medina A, Garcia-Sosa K, May-Pat F, Pena-Rodriguez LM. 2001. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. Phytomedicine, 8(2):144-151.
- Saurez-Quiroz ML, Campos AA, Alfaro GV, Gonzales-Rios O, Villeneuve P, Figueroa-Espinoza Mc. 2014. Isolation of green coffee chlorogenic acids usins activated carbon. J food composition and analysis. 33:55-58.
- Sign GD, Kaiser P, Youssouf MS, Singh S, Khajuria A, Koul A, Bani S, Kapahi BK, Satti NK, Suri KA, Johri RK. 2006. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. Phytother Res 20(4): 316-321.
- Sudhakar M, Rao CV, Rao PM, Raju DB, Venkateswarlu Y. 2006. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. Fitoterapia 77: 378-380.
- Tona L, Cimanga RK, Mesia K, Musuamba CT, Bruyne TD, Apers S, Hernans N, Miert SV, Pieters L, Totte J, Vlietinck AJ. 2004. In vitro antiplasmodial activity of extracts

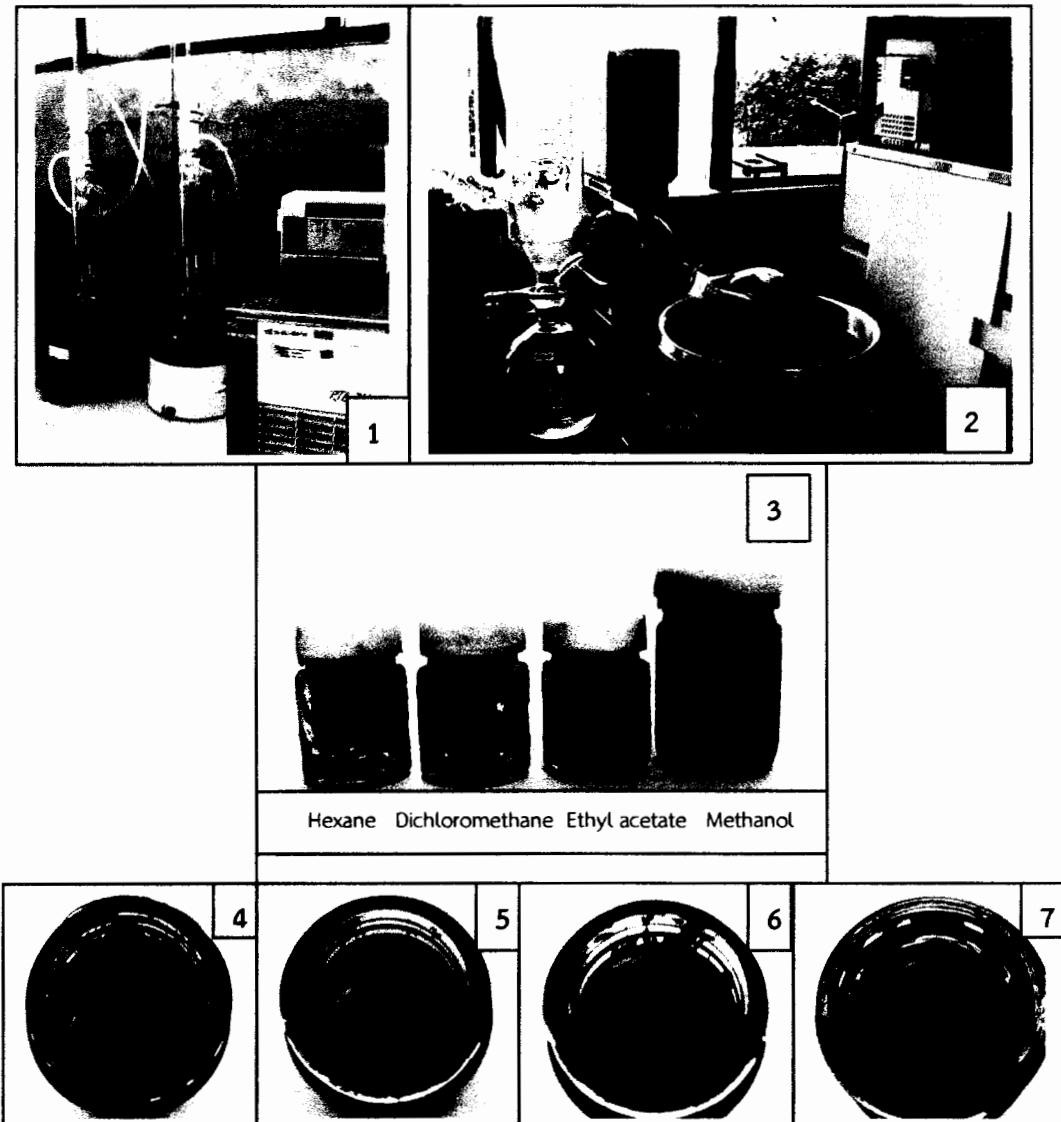
- and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo . J Ethnopharmacology 93(1):27-32.
- Vijaya K, Ananthan S, Nalini R. 1995. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenol 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella spp.*-a cell culture study. J Ethnopharmacology 49:115-118.
- Wang Y-C, Huang T-L, 2005. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS Immunology Med Micro 43(2): 295-300.
- Wei-Ku Z, Jie-Kun X, Li Z, Guan-Hua D. 2012. Flavonoids from the bran of *Avena sativa*. Chinese J Nat Med 10(2):0110-0114
- Yoshida T, Chen L, Shingu T, Okuda T. 1988. Tannins and related polyphenols of Euphorbiaceous plants. IV. Euphorbin A and B, Novel dimeric dehydroellagitannins from *Euphorbia hirta*. Chem Pharm Bull 36(8): 2940-2949.
- Yoshida T, Namba O, Chen L, Okuda T. 1990. Euphorbia E, a hydrolysable tannin dimer of highly oxidized structure from *Euphorbia hirta*. Ibid 38(4):1113-1115.
- Youssouf Ms, Kaiser P, Tahir M, Singh GD, Singh S, Sharma VK, Satti NK, Haque SE, Johri RK. 2007. Fitoterapia 78:535-539.
- Zhang Y, Wang D, Yang L, Zhou D, Zhang J. 2014. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. Plos one 9(8):1-11.
- http://www.Science Photo Library.com/images/download_lo_res.html?id=670066671.
2010. *S. epidermidis* . [accessed 2011, January]
- <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Propionibacterium> [accessed 2011, January]
- <http://www.biochemj.org/bj//318/0805bj.3180805.htm> [accessed 2011, January]
- http://www.bio.miami.edu/dana/250/250SS13_6.htm l[accessed 2016, July]
- ฐานข้อมูลสมุนไพรไทย, ภาควิชาเภสัชพูนิศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. น้านมราชสีห์.
<http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/medplantdatabase>, accessed ส.ค. 2551.

ภาคผนวก 1 ภาพการเตรียมพืช



รูปที่ 33 การเตรียมพืช (1=พืชสด, 2=อบพืช, 3=พืชแห้งแล้ว)

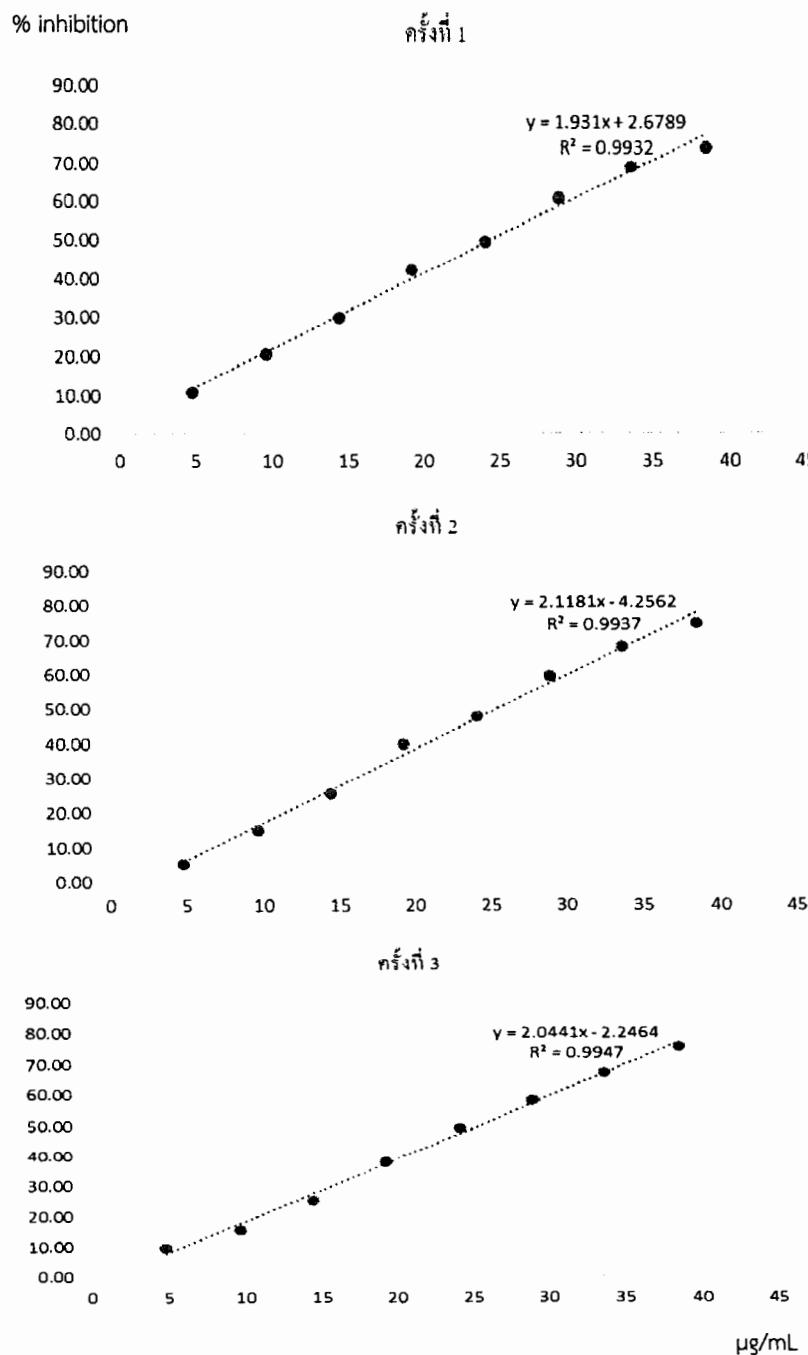
ภาคผนวก 2 ภาคการสกัด และสารสกัด



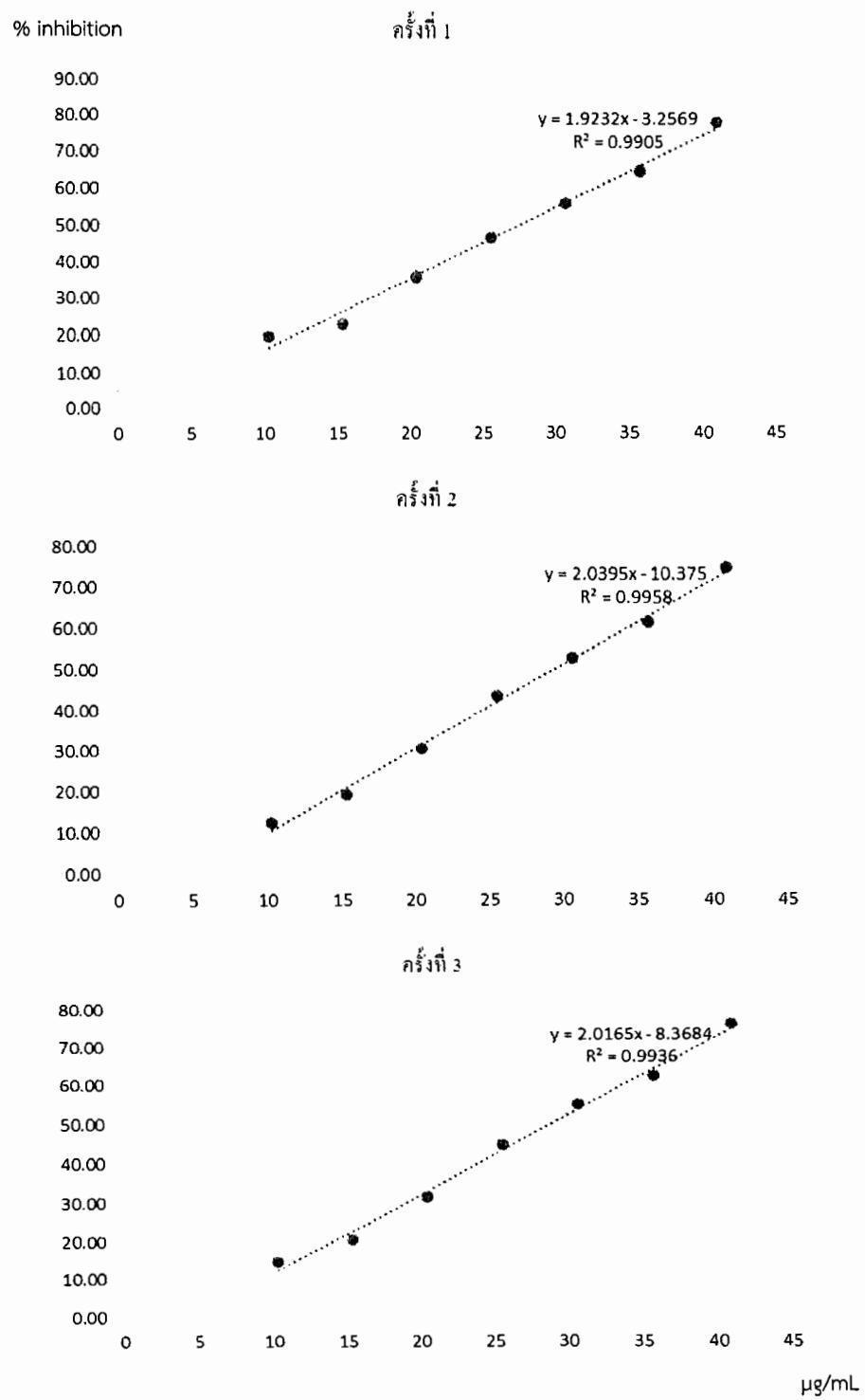
รูปที่ 34 การสกัด และสารสกัดที่ได้

(1=สกัดพีชด้วย Soxhlet , 2=ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator, 3=สารสกัดที่ได้, 4=สารสกัด헥าน, 5=สารสกัดdichloromethane, 6=สารสกัดethylacetate, 7=สารสกัดmethanol)

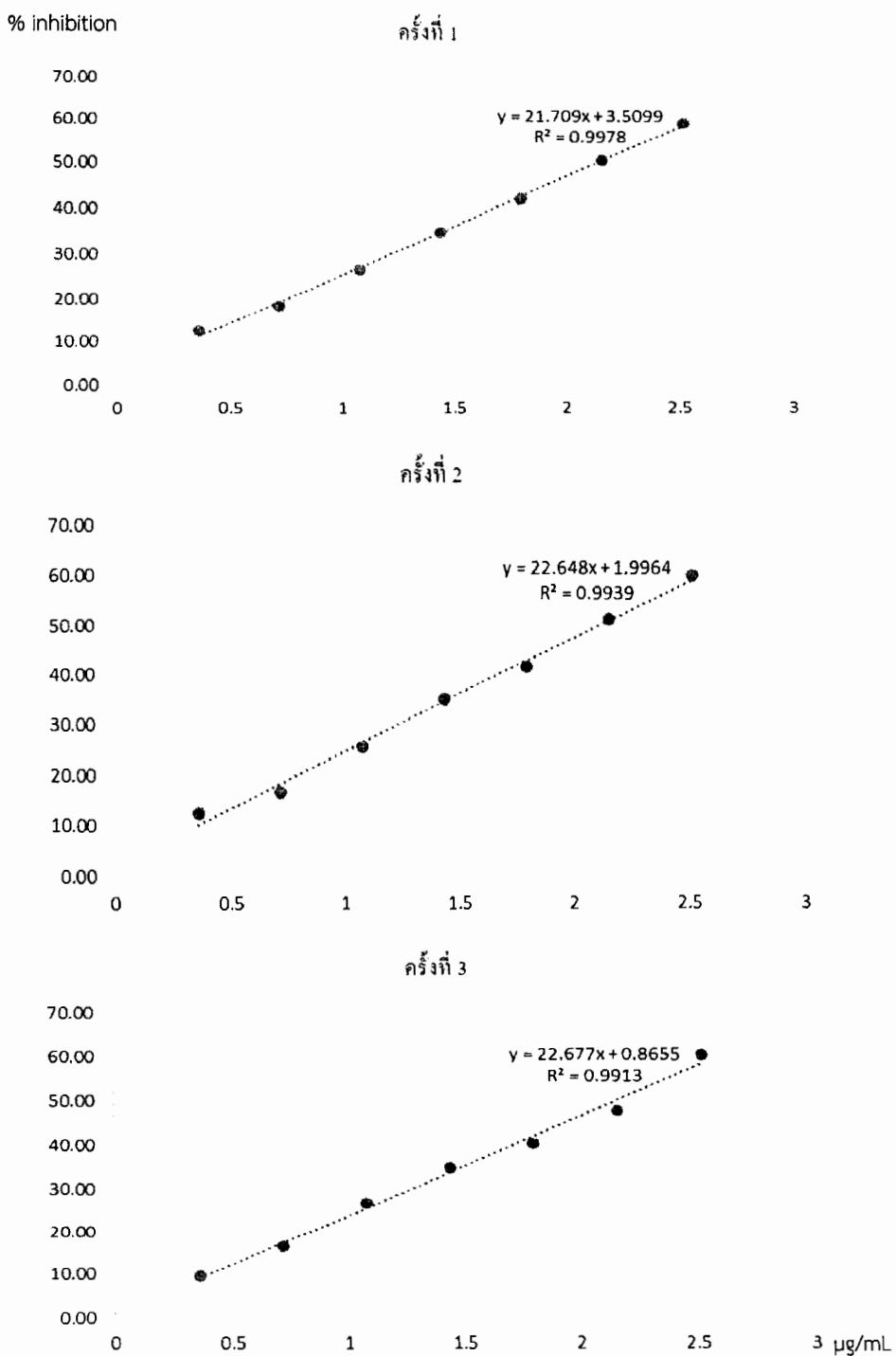
ภาคผนวก 3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH



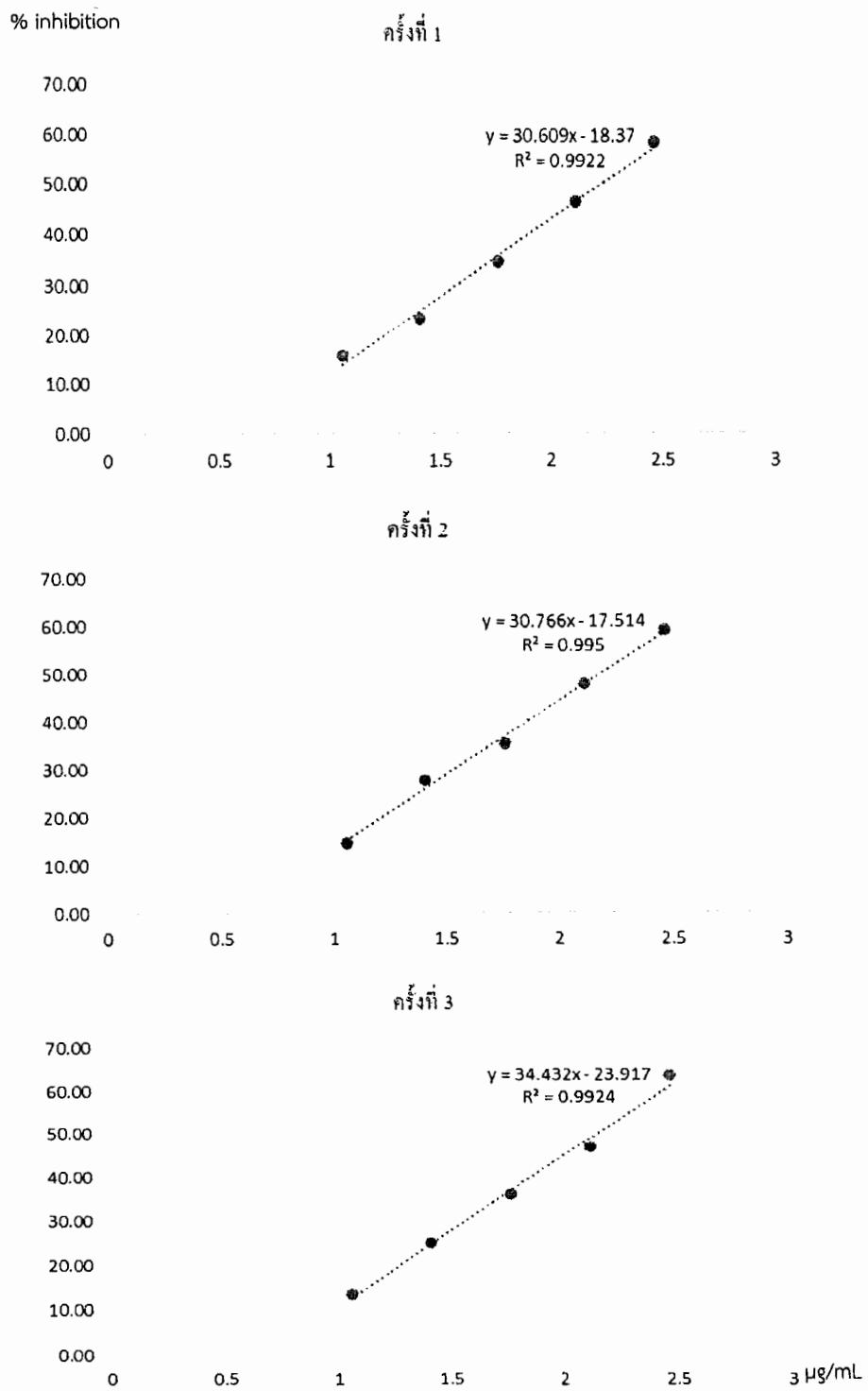
รูปที่ 35 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสารสกัด ethyl acetate



รูปที่ 36 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสารสกัด methanol

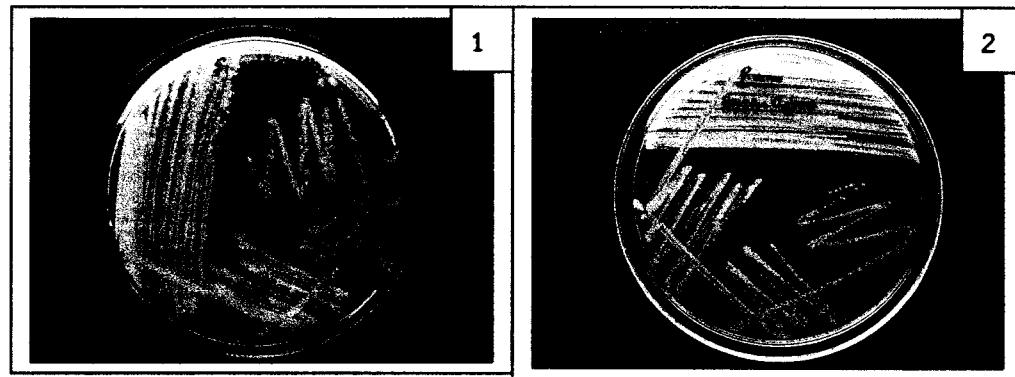


รูปที่ 37 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสาร EH-1

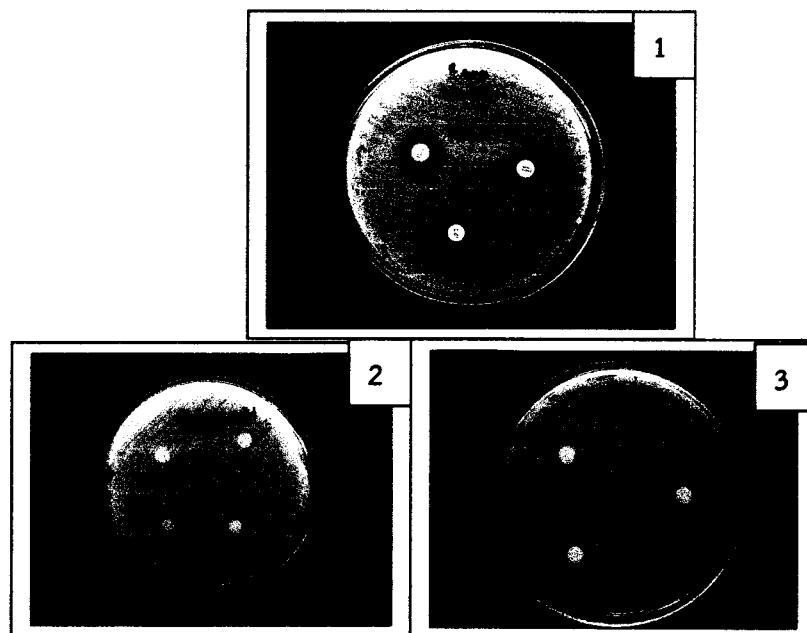


รูปที่ 38 กราฟแสดงความเข้มข้น และ % inhibition ของสาร EH-2

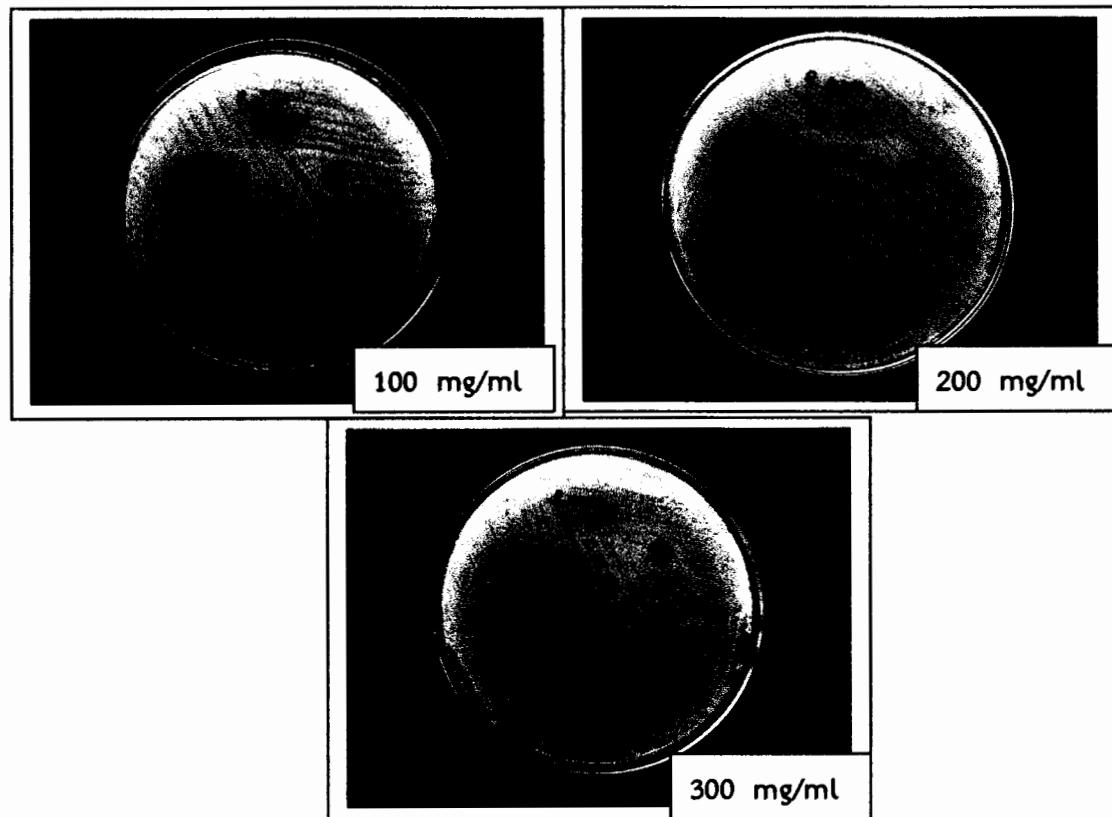
ภาคผนวก 4 รูปการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ



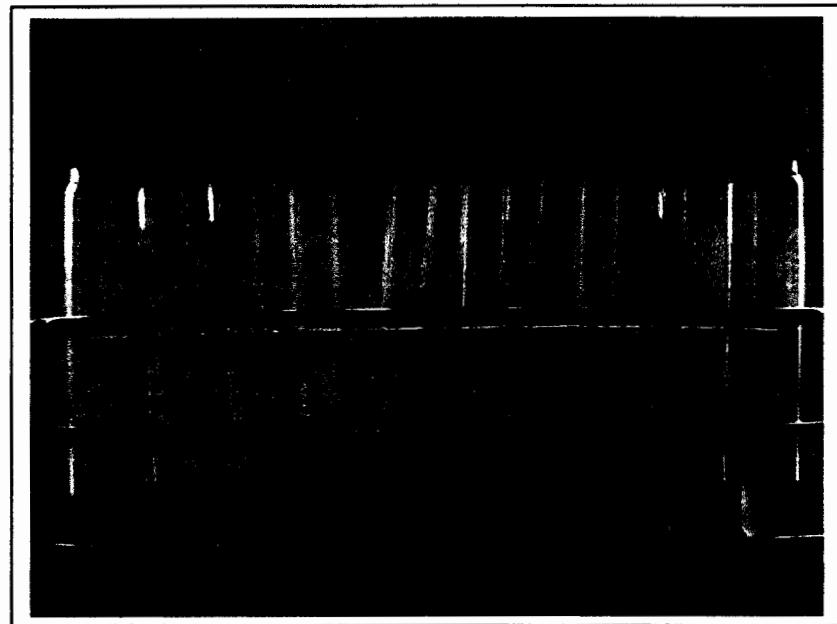
รูปที่ 39 ลักษณะของเชื้อจุลทรรศ์ที่ใช้ในการทดสอบ
1=เชื้อ *Propionicbacterium acnes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI + 1 % glucose agar,
2=เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA



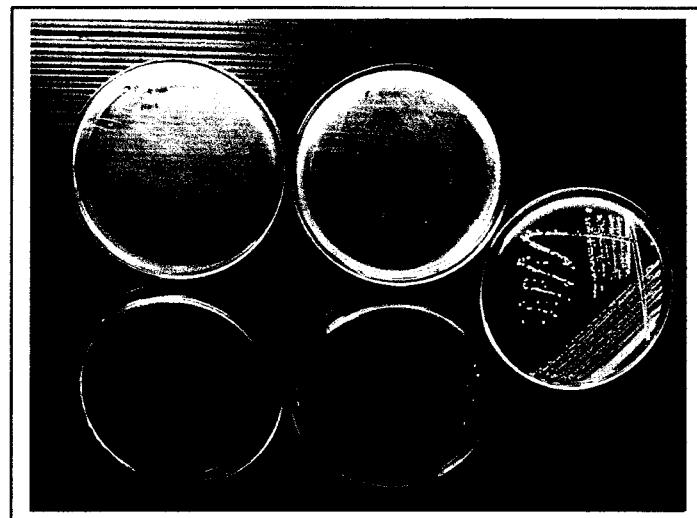
รูปที่ 40 ทดสอบยาตราชาน และตัวทำละลายต่อเชื้อ *P. acnes*
1=ยาตราชาน tetracycline 30 $\mu\text{g}/\text{disc}$
2=ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากพืช
3= ตัวทำลายที่ช่วยในการละลายสาร (1% DMSO)



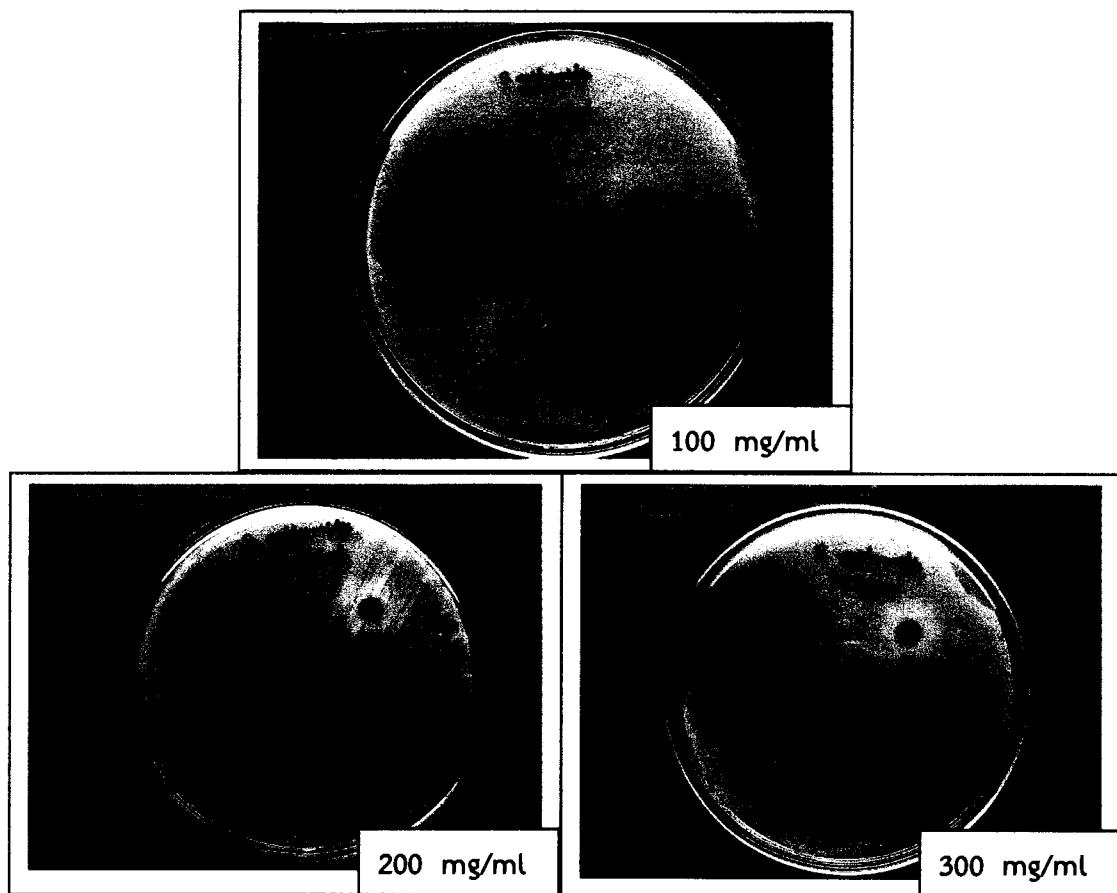
รูปที่ 41 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ



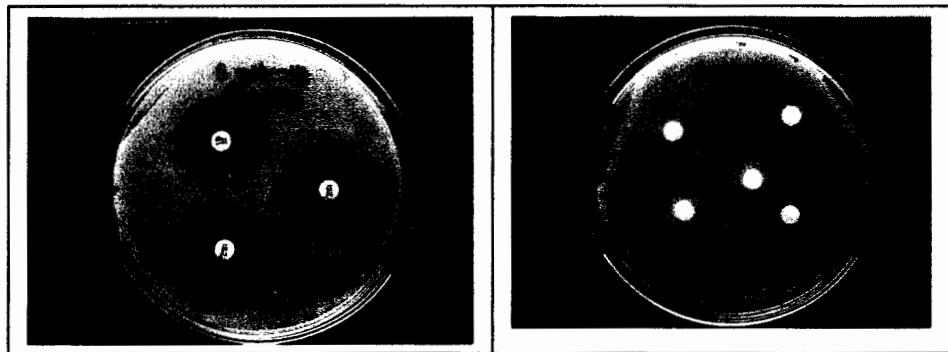
รูปที่ 42 การหาค่า MIC ของ *P. acnes*



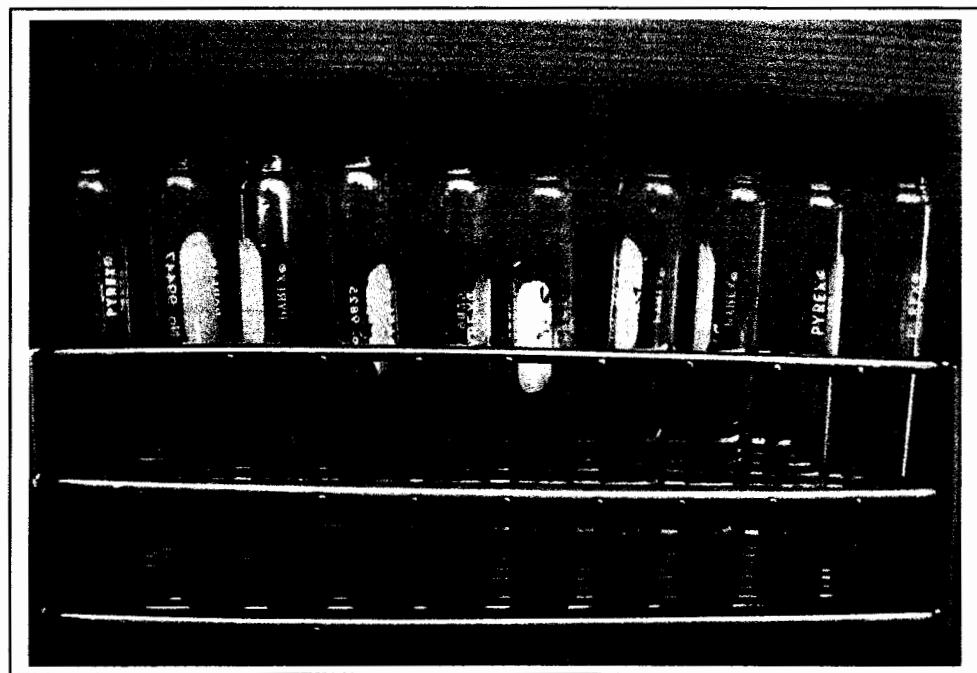
รูปที่ 43 การหาค่า MBC ของ *Propionicbacterium acnes*



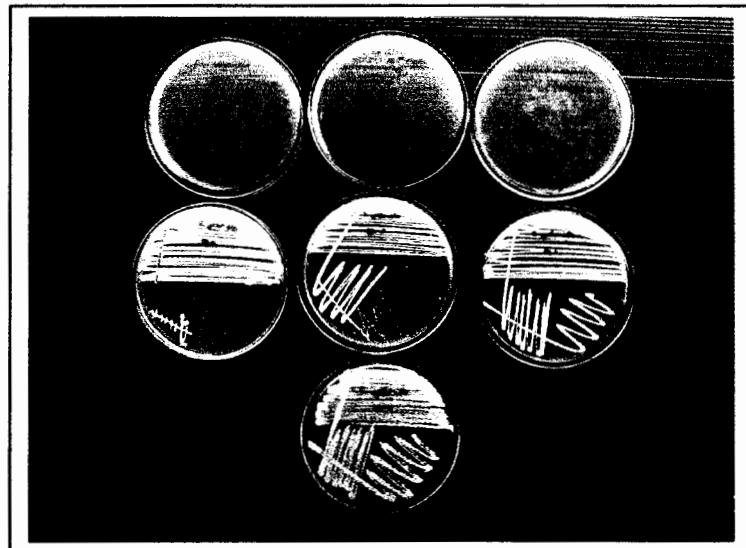
รูปที่ 44 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ



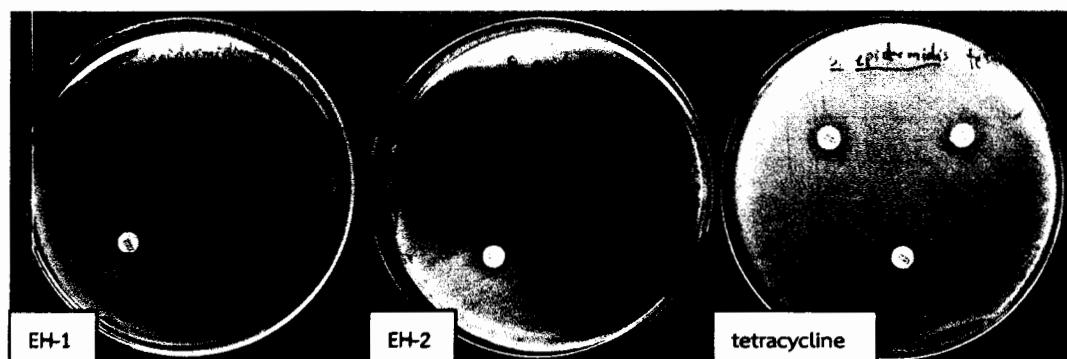
รูปที่ 45 ทดสอบยาตราชูน และตัวทำละลายต่อเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*
 1=ยาตราชูน tetracycline 30 µg/disc
 2=ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และสารช่วยละลาย (1% DMSO)



รูปที่ 46 การหาค่า MIC ของ *S. epidermidis*



รูปที่ 47 การหาค่า MBC ของ *S. epidermidis*



รูปที่ 48 การยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ของ EH-1 และ EH-2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/ml



รูปที่ 49 การยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ของ EH-1 และ EH-2 ที่ความเข้มข้น 200 mg/ml



รูปที่ 50 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของสาร EH-1



รูปที่ 51 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของสาร EH-2 ชุดที่ 1



รูปที่ 52 การหาค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของสาร EH-2 ชุดที่ 2

ตารางที่ 20 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนaseของสารสกัด ethyl acetate

Sample	A	B	C	D
EtOAc	0.09	0.017	0.222	0.177
	0.07	0.016	0.224	0.178
	0.086	0.014	0.201	0.193
Ave	0.082	0.016	0.216	0.183
A-B=		0.066	C-D=	0.033
%Tyrosinase inhibition				50.25

ตารางที่ 21 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนaseของสารสกัด methanol

Sample	A	B	C	D
MeOH	0.114	0.022	0.276	0.236
	0.108	0.013	0.272	0.225
	0.123	0.021	0.253	0.229
Ave	0.115	0.019	0.267	0.230
A-B=		0.096	C-D=	0.037
%Tyrosinase inhibition				61.59

ภาคผนวก 5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไตรอซีเนส

ตารางที่ 18 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไตรอซีเนสของสารสกัด hexane

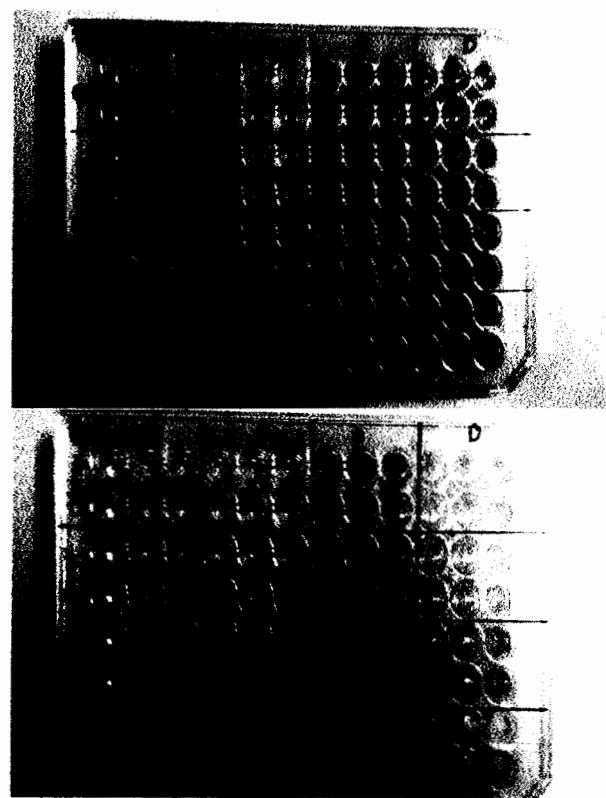
Sample	A	B	C	D
Hexane	0.083	0.005	0.074	0.014
	0.07	0.011	0.067	0.019
	0.069	0.009	0.071	0.032
Ave	0.074	0.008	0.071	0.022
A-B=		0.066	C-D=	0.049
%Tyrosinase inhibition				25.38

ตารางที่ 19 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไตรอซีเนสของสารสกัด dichloromethane

Sample	A	B	C	D
CH ₂ Cl	0.074	0.051	0.078	0.023
	0.081	0.023	0.075	0.028
	0.077	0.024	0.078	0.042
Ave	0.077	0.033	0.077	0.031
A-B=		0.045	C-D=	0.046
%Tyrosinase inhibition				-2.99

ตารางที่ 22 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนของสารมาตรฐาน kojic acid

Sample	A	B	C	D
Kojic	0.158	0.05	0.1	0.007
	0.168	0.045	0.008	0.007
	0.141	0.043	0.011	0.006
Ave	0.156	0.046	0.040	0.007
A-B=		0.110	C-D=	0.033
%Tyrosinase inhibition				69.91



รูปที่ 53 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนด้วย 96 well plate

ตารางที่ 23 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนสของสาร EH-1

Sample	A	B	C	D
EH-1	0.087	0.044	0.143	0.063
	0.086	0.042	0.141	0.069
	0.082	0.049	0.146	0.042
Ave	0.085	0.045	0.143	0.058
A-B=	0.040	C-D=	0.085	
%Tyrosinase inhibition			-113.33	

ตารางที่ 24 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนสของสาร EH-2

Sample	A	B	C	D
EH-2	0.087	0.044	0.205	0.045
	0.086	0.042	0.222	0.058
	0.082	0.049	0.22	0.063
Ave	0.085	0.045	0.216	0.055
A-B=	0.040	C-D=	0.160	
%Tyrosinase inhibition			-300.83	

ประวัตินักกิจจย

ชื่อ นางสุدارัตน์ หอมหวาน
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ (อาจารย์)
การศึกษา ปร.ด. (เคมี และพฤกษ์เคมี), มหาวิทยาลัยมหิดล, 2549
สถานที่ทำงาน กลุ่มวิชาเภสัชเคมี และเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353630, โทรสาร 045-288384
ที่อยู่ อาคารพักอาศัยอาจารย์หลังที่ 5 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 093-3260788

E-mail address pharmacom888@gmail.com

บทความสำหรับเผยแพร่

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนเหนือดินต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) โดยนำผงจากส่วนเหนือดิน มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอกเซน, ไดคลอโรเมเทน, เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ ด้วยเครื่อง soxhlet นำสารสกัดแต่ละชนิด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ประกอบด้วย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการจับอนุมูลอิสระ DPPH, ฤทธิ์ต้านจุลชีวิตัววิธีเจือจางในอาหารเหลว ต่อเชื้อ 2 ชนิด คือ *Propionicbacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* และฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซีนส์ สารสกัดที่ออกฤทธิ์จับอนุมูลอิสระได้สูงสุดคือสารสกัดเอทิลอะซีเตต รองลงมาคือสารสกัดเมทานอล โดยมีค่า EC₅₀ = 24.54 และ 28.75 µg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอกเซน และสารสกัดไดคลอโรเมเทนไม่ออกฤทธิ์ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือสารสกัดเอทิลอะซีเตต โดยมีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากัน 50 และ 100 mg/mL ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่า 50% คือ สารสกัด Ethyl acetate และ สารสกัด Methanol โดย % Tyrosinase Inhibition เท่ากับ 50.25% และ 61.59% ตามลำดับ

ผลทดสอบแสดงว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตตออกฤทธิ์ที่สุด จึงได้ทำการแยกส่วนสารสกัดเอทิลอะซีเตต ด้วยวิธี sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโดยกราฟี จนกระทั่งได้สารที่ออกฤทธิ์ เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้าง ด้วย IR ¹H และ ¹³C NMR Spectroscopy พบว่าคือ quercitrin และ chlorogenic acid การทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด พบว่าสาร quercitrin และ chlorogenic acid ที่แยกได้ ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.14 และ 2.19 µg/mL ตามลำดับ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* โดยมีค่า MBC เท่ากับ 50 และ 12.5 mg/mL ตามลำดับ โดยที่สารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซีนส์

ปัจจุบันมีรายงานสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 5,000 ชนิด โดย flaโวนอยด์จัดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ที่ออกฤทธิ์สูงสุด และมีหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน (Zhang Y, et al, 2014) รวมทั้ง quercitrin ซึ่งพบว่าออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารมาตรฐาน tannic acid และ วิตามินอี ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง เชื่อมต่อกันวง pyran (C6-C3-C6) โดยการที่ มี OH บน aromatic ring หลายตำแหน่ง ทำให้มีอิเลคทรอน 1 ตัว กับอนุมูลอิสระ (DPPH) แล้วโมเลกุล ยังคงมีความเสถียร ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม polyphenol สำหรับสาร chlorogenic acid จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบรได้ในพืชหลายชนิด และมีโครงสร้างของ phenolic group ในโมเลกุล

สารบริสุทธิ์ quercitrin และ chlorogenic acid เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวหน้า พบร่วมกับสารทั้งสองออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัด และออกฤทธิ์ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อถึงกลไกการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษ หรือการตั้งตัวรับ เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูง สาร chlorogenic acid มีศักยภาพในการนำไปศึกษาต่อไป ด้านการต่อต้านจุลชีพ เช่น การปรับปรุงโครงสร้าง การหากลไกการออกฤทธิ์ ส่วน quercitrin อาจนำไปพัฒนาเป็นยารักษาร่วมได้ quercitrin และ chlorogenic acid ที่แยกได้ เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ พบว่าสารทั้งสองไม่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ แต่สารสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนส์ได้ 50.25% ดังนั้นจึงอาจมีสารชนิดอื่นๆ ในสารสกัด ที่ออกฤทธิ์จึงอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากการไปใช้ประโยชน์

-ยังไม่มี-

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

แผนงานที่วางแผนไว้	ปีที่ 1 (เดือนที่)				กิจกรรมที่ดำเนินการ/ผลที่ได้รับ
	3	6	9	12	
1. เก็บ และเตรียมตัวอย่างพืช	↔				เก็บ อบ และบดตัวอย่างพืช / ได้ผงส่วนเนื้อดินของพืช
2. การสกัดเพื่อตรวจสอบเบื้องต้น		↔			สกัดพืชเพื่อนำไปตรวจสอบเบื้องต้นแล้ว / ได้สารสกัด 4 fraction
3. การตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด(Antioxidant, Antibacterial และการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase)		↔			ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด / ได้ผลทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดทั้งหมด
4. การสกัด และแยกสารจากส่วนของพืชที่ออกฤทธิ์			↔		สกัดและแยกสารด้วยcold lamination โตรกราฟฟี / ได้ส่วนของสารสกัดที่ออกฤทธิ์
5. การทดสอบฤทธิ์Antioxidant, Antibacterial และการยับยั้ง tyrosinase ของส่วนสกัดย่อย และสารบริสุทธิ์			↔		ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ / ได้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์
6. การแยก และตรวจสอบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์			↔		แยกและตรวจสอบโครงสร้างสารบริสุทธิ์ / ทราบโครงสร้างสารบริสุทธิ์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อแยกสกัด และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase ของสารสกัด และส่วนสกัดย่อยของน้ำมาราธสีท์ (บรรลุวัตถุประสงค์ ตามแผนงานที่ 1-5)
- เพื่อตรวจสอบโครงสร้างสาร และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนase ของสารบริสุทธิ์ (บรรลุวัตถุประสงค์ ตามแผนงานที่ 6)

รายงานการเงิน

**โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมาราธสีร์
ประจำปีงบประมาณ 2554**

วงเงินงบประมาณโครงการรวม 312,400 บาท (สามแสนหนึ่งหมื่นสองพันสี่ร้อยบาทถ้วน)

1. งบดำเนินการ	284,000.00 บาท
----------------	----------------

รายละเอียดงบดำเนินการ

หมวดค่าตอบแทน	14,200.00 บาท
หมวดค่าใช้สอย	158,932.70 บาท
หมวดวัสดุ	110,867.30 บาท

2. งบสาธารณูปโภค	28,400.00 บาท
------------------	---------------

รวมเป็นเงินทั้งสิ้น 312,400.00 บาท
(สามแสนหนึ่งหมื่นสองพันสี่ร้อยบาทถ้วน)

