บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

จุดหลอมเหลวของสารวัดด้วยเครื่องหาจุดหลอมเหลวแบบ Fisher-Johns ใช้หน่วยเป็นองศาเซลเซียส (^{o}C)

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม (Ultraviolet spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง UV-160A spectrophotometer (SHIMADZU) ใช้หน่วยความยาวคลื่นเป็น นาโนเมตร (nanometer,nm) และใช้ λ_{max} แทนค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงไว้มากที่สุด โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

อินฟราเรดสเปกตรัม (Infrared spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer IR 783 และ Perkin-Elmer FT-IR 783 โดยใช้ แบบ neat $CHCl_3$ หรือ KBr มีหน่วยเป็น wave number (cm^{-1})

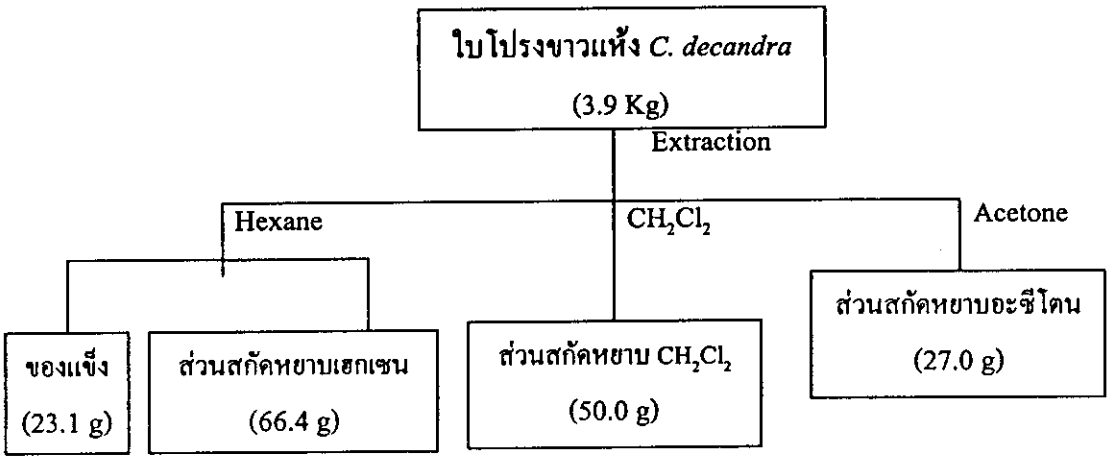
นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (Nuclear Magnetic Resonance spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง Bruker Ultra Shield™ 300 MHz NMR spectrometer โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง บอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วยสัญญาณของ chemical shift parameter, δ (ppm) และใช้สัญญาณ *s* (singlet), *br* (broad), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quartet), และ *m* (multiplet)

แมสสเปกตรัม (Mass spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง MAT 95 XL และ LCT-ESI Micromass spectrometer ข้อมูลเอกซเรย์บันทึกด้วยเครื่อง Siemens SMART CCD diffractometer ใช้ monochromated Mo-Kα radiation (λ = 0.71073 Å) using ω-scan mode และ SHELXTL สำหรับ structure solution และ refinement ค่าสเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]_D$ วัดที่ความยาวคลื่นของ Sodium D line (590 nm) ในคลอโรฟอร์มหรือเมทานอลด้วยเครื่อง AUTOPOL^{R} II หรือ JASCO P-1020 automatic polarimeter ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดหรือโครมาโทกราฟีผ่านการกลั่นที่จุดเดือดก่อนใช้งานยกเว้นใช้คลอโรฟอร์ม AR grade ตัวอยู่กับที่ ใช้ silica gel 60H (Merck) สำหรับทำ Quick column chromatography และใช้ silica gel (Merck) type 100 (0.063-0.200 nm) สำหรับ Column chromatography และใช้แผ่นสำเร็จ silica gel 60 F_{254} (Merck) ในการแยกสาร

2.2 วิธีดำเนินการ

ใบของโปรงขาว(*Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou) เก็บจากจังหวัดพังงาในเดือนมีนาคม ปี 2546 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา ยืนยันชนิดของพืชโดย ดร. กิติเชษฐ์ ศรีดิษฐ ภาควิชาชีววิทยา และเก็บตัวอย่างพืช (Collection No. K. Chantrapromma 1/46 (PSU)) ที่พิพิธภัณฑ์พืชของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

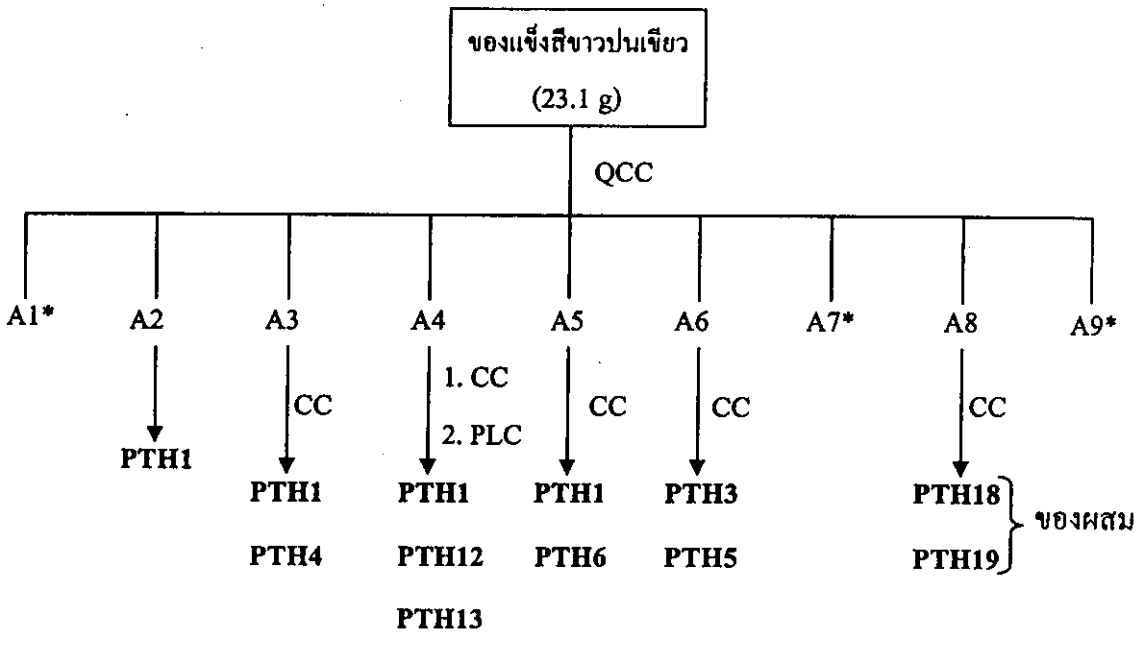
นำใบโปรงขาวตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง(3.9 kg) และนำมาบด และสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เมทิลีนคลอไรด์และอะซีโตน ตามลำดับ โดยแต่ละตัวทำละลายแช่ 2 ครั้ง และใช้ตัวทำละลายครั้งละ 20 ลิตร เมื่อนำเฮกเซนที่ผ่านการแช่มากรองและระเหยเฮกเซนออกภายใต้ความดัน มีของแข็งสีขาวปนเขียวตกออกมา(23.1 g) ซึ่งได้ทำการกรองแยกออกมา และระเหยเฮกเซนต่อจนได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนเป็นของหนืดสีเขียว (66.4 g) หลังจากนั้นได้ส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์ (50.0 g) และส่วนสกัดหยาบอะซีโตน ตามลำดับ(27.0 g) ขั้นตอนการสกัดดังแสดงในแผนผังที่ 1



แผนผังที่ 1 ขั้นตอนการสกัดใบโปรงขาว

2.2.1 การแยกของแข็งจากส่วนสกัดเฮกเซน

นำของแข็งสีขาวปนเขียว (23.1 g) มาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเฮกเซนเพิ่มขั้วตามลำดับด้วยเมทิลีนคลอไรด์และเมทานอล รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 9 ส่วน วิธีการแยกดังแสดงในแผนผังที่ 2



*ไม่ได้แยกต่อ

แผนผังที่ 2 แสดงการแยกสาร **PTH1, PTH3-PTH6, PTH11, PTH12, PTH18** และ **PTH19**

ส่วน A2 (5.0 g) เป็นของแข็งสีขาวของสาร **PTH1** (R_f= 0.21, 50% คลอโรฟอร์ม/เฮกเซน)

ส่วน A3 (150.9 mg) นำมาแยกด้วย column chromatography ชะด้วย 5% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน ได้สาร **PTH1** (70.5 mg) เป็นของแข็งสีขาว และสาร **PTH4** (3.5 mg) เป็นของหนืดไม่มีสี (R_f = 0.40, 20% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน)

ส่วน A4 (354.4 mg) นำมาแยกด้วย column chromatography ชะด้วย 70% เมทิลีนคลอไรด์/เฮกเซน ได้ส่วนย่อย 4 ส่วน (A4/1a-A4/4a) จากส่วนย่อย A4/2a ได้สารสีขาวของ **PTH1** (33.4 mg).

นำส่วนย่อย A4/4a (36.6 mg) มาผ่าน column chromatography อีกครั้ง ชะด้วย 10% เอทิลอะซีเตด /เฮกเซน ได้ส่วนย่อยอีก 3 ส่วน (A4/1b-A4/3b) ซึ่งจากส่วนย่อย A4/2bได้ของแข็งสีขาวของสาร **PTH1** (1.4 mg)

นำส่วนย่อย A4/1b (15.3 mg) มาผ่าน column chromatography ชะด้วย 20% เมทิลีนคลอไรด์/เฮกเซน แยกได้สาร **PTH13** (2.0 mg) เป็นของหนืดไม่มีสี (R_f = 0.36, 20% เอทิลอะซีเตด/ เฮกเซน) และสาร **PTH12** (2.3 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f= 0.20, 15% เอทิลอะซีเตด/ เฮกเซน)

ส่วน A5 (136.9 mg) นำมาแยกด้วย column chromatography ชะด้วย 10% เอทิลอะซีเตด / เฮกเซน ได้สาร **PTH1** (4.6 mg) เป็นของแข็งสีขาว และ สาร **PTH6** (1.6 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.28, 20% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน)

ส่วน A6 มีของแข็ง จึงนำมากรองและล้างด้วยเมทิลีนคลอไรด์ ได้ของแข็งสีขาวปนเขียว (705.0 mg) ซึ่งนำมาแยกต่อด้วย column chromatography ชะด้วย 70% เมทิลีนคลอไรด์ /เฮกเซน ได้สาร **PTH3** (263.7 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.39, 25% อะซีโตน/เฮกเซน) และ **PTH5** (46.9 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.37, 25% อะซีโตน/เฮกเซน)

ส่วน A8 (500 mg) นำมาแยกด้วย column chromatography ชะด้วย 80% เมทิลีนคลอไรด์/ เฮกเซน ได้ของผสมของ สาร **PTH18** และ **PTH19** เป็นของแข็งสีขาว (12.2 mg, R_f = 0.42, 10% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์)

สาร PTH1: ของแข็งสีขาว, จุดหลอมเหลว 209-211°C; $[\alpha]_D^{28}$: +25.0° (*c* = 0.200, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3343 (O-H stretching), 2945 (C-H stretching), 1638 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz): ตารางที่ 2 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (75 MHz): ตารางที่ 2

สาร PTH3: ของแข็งสีขาว, จุดหลอมเหลว 230-231°C; $[\alpha]_D^{28}$: +16.7° (*c* = 0.150, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3382 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1645 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz) ตารางที่ 8 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz) ตารางที่ 8

สาร PTH4: ของหนืดไม่มีสี

^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 11 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 11

สาร PTH5: ของแข็งสีขาว, จุดหลอมเหลว 279-280°C; $[\alpha]_D^{28}$: +15.0° (c = 0.100, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3415 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1686 (C=O stretching), 1645 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 14 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 14

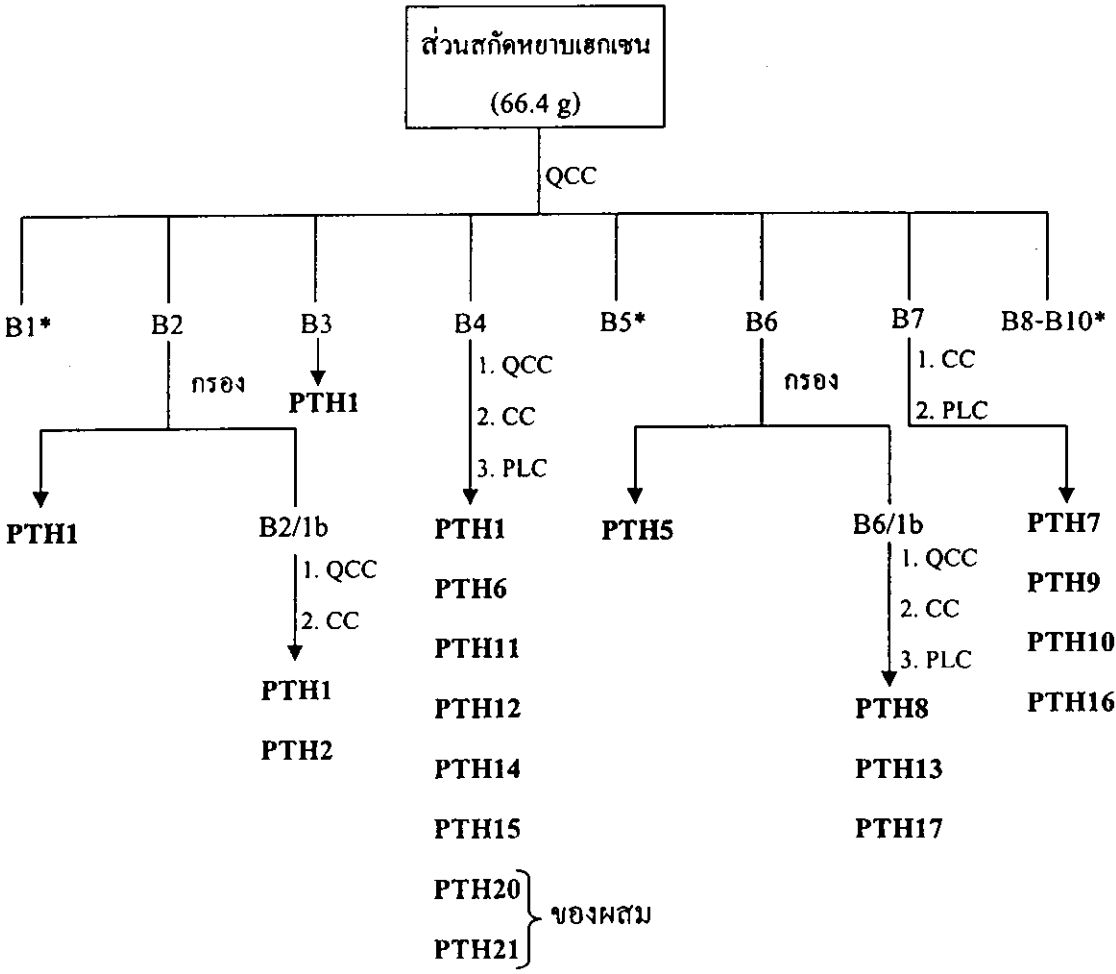
สาร PTH6: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 266-270°C, $[\alpha]_D^{28}$: -10.0° (c = 0.050, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3436 (O-H stretching), 2947 (C-H stretching), 1704 (C=O stretching), 1643 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 17 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 17

สาร PTH11: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 166-167°C; $[\alpha]_D^{28}$: +200.0° (c = 0.050, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε): 227 (4.10), 313 (4.38); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3397 (O-H stretching), 2936 (C-H stretching), 1670 (C=O stretching), 1602 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 32 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 32

สารd PTH12: ของหนืด ไม่มีสี $[\alpha]_D^{28}$: +38.5° (c = 0.052, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε): 224 (3.88), 310 (4.03); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3413 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1697 (C=O stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 35 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 35

สาร PTH18 และ PTH19: ของแข็งสีขาว IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3414 (O-H stretching), 2937 (C-H stretching), 1680 (C=O stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz) (ภาพประกอบที่ 53)

2.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซน



* ไม่ได้แยกต่อ

แผนผังที่ 3 แสดงการแยกสาร **PTH1, PTH2, PTH6-PTH17, PTH20** และ **PTH21** จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซน

นำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนซึ่งเป็นของหนืดสีเขียวเข้ม (66.4 g) มาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเฮกเซน เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซีเตด รวมส่วนที่มี TLC แบบเดียวกันเข้าด้วยกัน ได้ 10 ส่วน(B1-B10) ดังแสดงในแผนผังที่ 3

ส่วน B2 นำมากรอง และล้างด้วยเฮกเซน ได้ของแข็งสีขาวของ **PTH1** (2.78 g) และสารละลายที่ได้จากการกรอง ซึ่งเมื่อนำมาระเหยแห้งแล้วได้เป็นของหนืดสีเหลือง (B2/1b) (12.4 g) ซึ่งนำไปแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ เพิ่มขั้วด้วยเมทิลีนคลอไรด์ ได้ส่วนย่อย 6 ส่วน (B2/2a-B2/2f) ซึ่งส่วนย่อยที่ B2/2e (white solid) เป็นของแข็งสีขาวของ **PTH1** (3.0 g).

ส่วนย่อย B2/2d (1.8 g) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 50% เมทิลีนคลอไรด์/เฮกเซน แยกได้ของแข็งสีขาวของ **PTH1** (830.7 mg)

ส่วนย่อย B2/2b (977.2 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกด้วยวิธีcolumn chromatography ใช้ 50% เมทิลีนคลอไรด์/เฮกเซน แยกได้ส่วนย่อย B2/3a-B2/3c

ส่วนย่อย B2/3b (104.8 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 2% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้สาร **PTH2** (67.3 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.28, 5% ethyl acetate in hexane).

ส่วน B3 เป็นของแข็งสีขาวของ **PTH1** (14.5 g).

ส่วน B4 (7.1 g) นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ 15% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้สาร **PTH6** (4.0 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.28, 20% ethyl acetate in hexane), และของผสมของ **PTH20** และ **PTH21** (886.7 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.37, 20% acetone in hexane) และส่วนย่อย 3 ส่วน (B4/1a, B4/1b and B4/1e)

ส่วนย่อย B4/1b (4.1627 g) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ 10% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ของแข็งสีขาวของ **PTH1** (229.6 mg), **PTH6** (34.7 mg) **PTH11** (381.9 mg), และส่วนย่อย 3 ส่วน (B4/2d, B4/2e and B4/2g)

ส่วนย่อย B4/2d (961.9 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 5% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ ส่วนย่อย 4 ส่วน (B4/3a-B4/3d) ซึ่งส่วนย่อย B4/3c เป็นของแข็งสีขาวของ **PTH11** (110.1 mg)

นำส่วนย่อย B4/3a (41.3 mg) มาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ 70% เมทิลีนคลอไรด์/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 2 ส่วน (B4/4a and B4/4b)

นำส่วนย่อย B4/4a (14.0 mg) มาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ 15% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ของแข็งสีขาวของ **PTH15** (1.4 mg, R_f = 0.33, 15% ethyl acetate in hexane) และ **PTH14** (5.5 mg) (R_f = 0.18, 15% ethyl acetate in hexane)

นำส่วนย่อย B4/2e (28.3 mg) มาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ชะด้วย 10% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ของแข็งสีขาวของ **PTH11** (16.5 mg, R_f = 0.20, 15%

เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน) และ **PTH12** (2.6 mg, R_f = 0.36, 20% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน) เป็นของหนืดไม่มีสี

ส่วน B6 นำมากรองและล้างด้วยเมทิลีนคลอไรด์ ได้สาร **PTH5** (812.3 mg) และสารละลายที่ผ่านการกรองเป็นของแข็งสีเขียวหลังจากระเหยตัวทำละลายแล้ว (B6/1b, 5.1 g) ซึ่งนำมาแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซีเตด แยกได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (B6/2a-B6/2e)

ส่วนย่อย B6/2b (1.0503 g) เป็นน้ำมันสีเขียวเข้ม นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 20% อะซีโตน/เฮกเซน แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วนaceto (B6/3a-B6/3c)

ส่วนย่อย B6/3b (849.3 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วย 10% อะซีโตน/เฮกเซน ได้ **PTH8** (62.4 mg) เป็นของแข็งสีขาวas (R_f = 0.32, 20% อะซีโตน/เฮกเซน)

ส่วนย่อย B6/2d (578.6 mg) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ 10% อะซีโตน/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B6/3d-B6/3f)

ส่วนย่อย B6/3e (301.4 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 20% อะซีโตน/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B6/4d-B6/4f)

ส่วนย่อย B6/4e (141.3 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH13** (5.6 mg, R_f = 0.15, 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์) เป็นของแข็งสีขาว และส่วนย่อย 3 ส่วน (B6/5a-B6/5C)

ส่วนย่อย B6/5b (52.0 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography และชะด้วย 5% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน subfractions (B6/6a-B6/6c)

ส่วนย่อย B6/6b (38.8 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี thin layer chromatography ใช้ 5% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ **PTH17** (23.2 mg) เป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.45, 10% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์)

ส่วนย่อย B6/5c (21.1 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH13** (4.6 mg) เป็นของแข็งสีขาว

ส่วน B7 (2.73 g) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 2% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (B7/1a-B7/1e)

ส่วนย่อย B7/1b (32.5 mg) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ 20% อะซีโตน/เฮกเซน) เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH16** (14.0 mg) เป็นของหนืดไม่มีสี (R_f = 0.18, 20% อะซีโตน/เฮกเซน)

ส่วนย่อย B7/1c (10 mg) นำมาแยกต่อวิธี preparative thin layer chromatographyใช้ 20% อะซีโตน/เฮกเซน แยกได้ **PTH16** (2.4 mg) เป็นของหนืดไม่มีสี

ส่วนย่อย B7/1d (1.973 g) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B7/2a-B7/2c)

ส่วนย่อย B7/2b (809.1 mg) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH7** เป็นของแข็งสีขาว(19.5 mg, Rf = 0.18, 20% อะซีโตน/เฮกเซน) **PTH9** เป็นของแข็งสีขาว (4.3 mg, R_f = 0.29, 10% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์) และส่วนย่อย 2 ส่วน (B7/3a and B7/3d)

ส่วนย่อย B7/3a (88.9 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 20% อะซีโตน/เฮกเซน แยกได้ **PTH10** เป็นของแข็งสีขาว (13.1 mg, R_f = 0.42, 10% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์)

ส่วนย่อย B7/2c (196.4 mg) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ 3% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH7** (4.3 mg) และ **PTH9** (1.6 mg) เป็นของแข็งสีขาว

สาร PTH2: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 163-165°C; $[\alpha]_D^{28}$: +50.0° (*c* = 0.010, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 2914 (C-H stretching), 1704 (C=O stretching), 1642 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 5 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 5

สาร PTH7: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 215-219°C, $[\alpha]_D^{28}$: -13.3° (*c* = 0.150, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3416 (O-H stretching), 2926 (C-H stretching), 1635 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 20 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 20

สาร PTH8: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 234-235°C; $[\alpha]_D^{28}$: -22.7° (*c* = 0.220, CHCl3); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3414 (O-H stretching), 2941 (C-H stretching), 1694 (C=O stretching), 1643 (C=C stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 23 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 23

สาร PTH9: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว >275°C (decompose); $[\alpha]_D^{28}$: -45.6° (*c* = 0.125, MeOH); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3413 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1697 (C=O stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 26 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 26

สาร PTH10: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 245-247°C, $[\alpha]_D^{28}$: +6.4° (*c* = 0.078, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3413 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1697 (C=O stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 29 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 29

สาร PTH13: ของแข็งสีขาว ไม่เสถียร สลายตัว

EI-MS, $[M-H_2O]^+$ *m/z* 572.4187 (Calcd. for $C_{39}H_{56}O_3$: 572.4229). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 38 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 38 ($CDCl_3$)

สาร PTH14: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 167-169°C; $[\alpha]_D^{27}$: +140° (*c* = 0.003, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 234 (4.02), 298 (4.06), 325 (4.20); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3534 (O-H stretching), 2936 (C-H stretching), 1703 (C=O stretching), 1604 (C=C stretching); ESI TOF-MS ($[M-H]^-$) m/z 601.4244 (calcd. For $C_{40}H_{57}O_4$: 601.4256); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 41 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 41

สาร PTH15: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 195-197°C, $[\alpha]_D^{27}$: +41.66° (*c* = 0.060, $CHCl_3$), UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 235 (3.57), 296 (3.56), 325 (3.71); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3538 (O-H stretching), 2936 (C-H stretching), 1708 (C=O stretching), 1595 (C=C stretching); ESI TOF-MS ($[M-H]^-$) m/z 601.4260 (calcd. For $C_{40}H_{57}O_4$: 601.4260); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 42 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 42

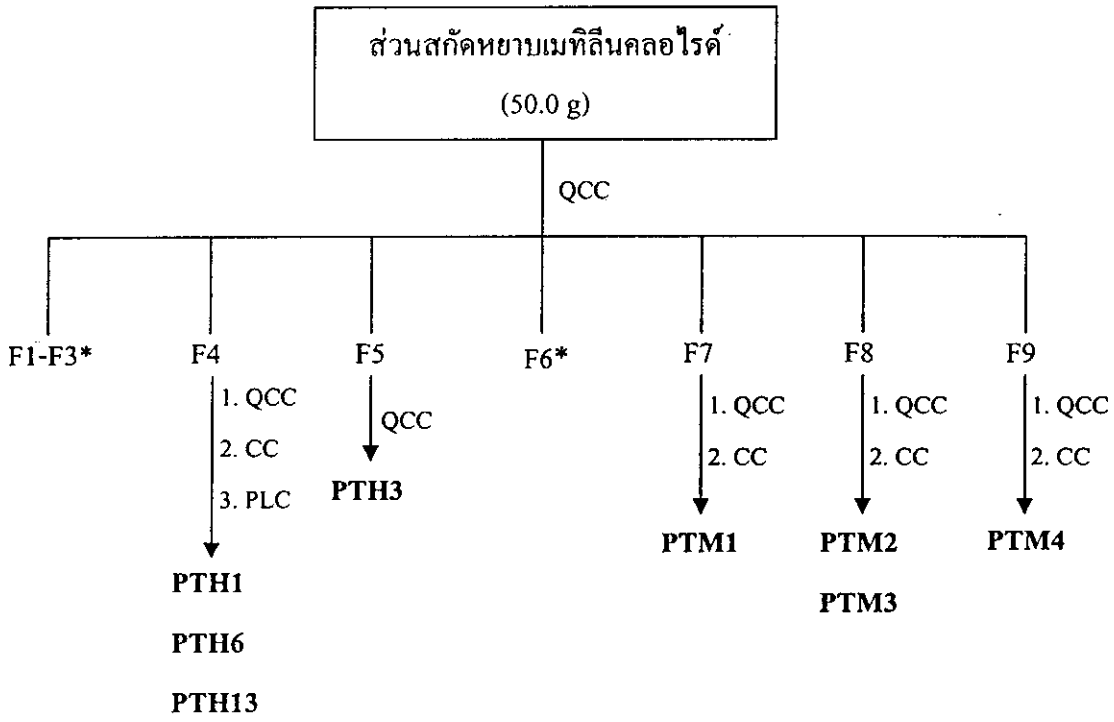
สาร PTH16: colorless viscous oil; $[\alpha]_D^{28}$: +15.0° (*c* = 0.020, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 233 (4.04), 295 (4.00), 325 (4.12); IR (neat) $\nu_{max}cm^{-1}$): 3534 (O-H stretching),

2936 (C-H stretching), 1703 (C=O stretching), 1604 (C=C stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz): ตารางที่ 45 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (75 MHz): ตารางที่ 45

สาร PTH17: ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 147-149°C; $[\alpha]_D^{28}$: +10.6° (c = 0.047, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 244 (3.82), 298 (3.92), 328 (4.02); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3413 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1671 (C=O stretching), 1616 (C=C stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz): ตารางที่ 48 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (75 MHz): ตารางที่ 48

สาร PTH20 และ PTH21: ของแข็งสีขาว IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3425 (O-H stretching), 2938 (C-H stretching), 1642 (C=C stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δppm) (300 MHz) (ภาพประกอบที่ 54)

2.2.3 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์



* ไม่ได้แยกต่อ

แผนผังที่ 4 การแยกสาร **PTH1, PTH3, PTH6, PTH13** และ **PTM1-PTM4** จากส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์

ส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์ (50.0 g) เป็นของหนืดสีเขียว นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเฮกเซน เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซีเตดและเมทานอลตามลำดับ รวมส่วนที่มี TLC คล้ายกันเข้าด้วยกัน แยกได้ 9 ส่วน F1-F9 (**แผนผังที่ 4**)

ส่วน F4 (5.0 g) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ 15% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH1** (812.6 mg) **PTH6** (42.3 mg) และส่วนย่อย F4/1b และ F4/1d

ส่วนย่อย F4/1b (921.4 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 15% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F4/3a-F4/3c)

นำส่วนย่อย F4/3b (81.6 mg) มาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ 5% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F4/4a-F4/4c)

ส่วนย่อย F4/4b (39.8 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 10% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ **PTH13** (5.0 mg) เป็นของหนืดไม่มีสี

ส่วน F5 (8.11 g) เป็นของหนืดสีเขียว นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเฮกเซน เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซีเตด แยกได้ส่วนย่อย 2 ส่วน (F5/1a and F5/1b)

ส่วนย่อย F5/1b (6.0 g) นำมาแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วย 15% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F5/2a-F5/2c)

ส่วนย่อย F5/2b นำมากรองและล้างด้วยเมทิลีนคลอไรด์ ได้ **PTH3** (4.1 mg)

ส่วน F7 (3.0201g) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเฮกเซน เพิ่มขั้วด้วยเอทิลอะซีเตด แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F7/1a-F7/1c)

ส่วนย่อย F7/1b (1.5313 g) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F7/2a-F7/2c)

ส่วนย่อย F7/2b (335.8 mg) เป็นของหนืดสีเขียวเข้ม นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วย 2% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F7/3a-F7/3c)

ส่วนย่อย F7/3b (55.0 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 2% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F7/4a-F7/4c)

ส่วนย่อย F7/4b เป็นของแข็งสีเขียวเข้ม นำมาล้างด้วยเมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ **PTM1** เป็นของแข็งสีขาว (1.6 mg, R_f = 0.24, 30% เอทิลอะซีเตด/เมทิลีนคลอไรด์) และสารละลายที่ผ่านการกรองเป็นของหนืดสีเขียวเข้มหลังจากระเหยตัวทำละลายแล้ว (24.8 mg) ซึ่งนำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 30% เอทิลอะซีเตด/เมทิลีนคลอไรด์ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน(F7/5a-F7/5C).

ส่วนย่อย F7/5b (7.0 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ 30% เอทิลอะซีเตด/เมทิลีนคลอไรด์ เป็นตัวชะ แยกได้ **PTM1** เป็นของแข็งสีขาว (1.1 mg)

ส่วน F8 (1.3696 g) เป็นของหนืดสีเขียว นำมาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ใช้เมทิลีนคลอไรด์เพิ่มขั้วด้วยเมทานอล เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F8/1a-F8/1c)

ส่วนย่อย F8/1b (584.0 mg) เป็นของหนืดสีเขียว นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 20% เอทิลอะซีเตด/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ **PTM2** เป็นของหนืดไม่มีสี (2.6 mg, R_f = 0.12, 30% เอทิลอะซีเตด/เมทิลีนคลอไรด์) และส่วนย่อย 3 ส่วน (F8/2a, F8/2c and F8/2d)

ส่วนย่อย F8/2c (117.0 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้ 3% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์เป็นตัวชะ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F8/3a-F8/3c), จากส่วนย่อย F8/3b แยกได้ **PTM2** เป็นของหนืดไม่มีสี (6.0 mg)

ส่วนย่อย F8/3c (59.8 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 40% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน แยกได้ **PTM3** เป็นของหนืดไม่มีสี (3.2 mg) (R_f = 0.26, 50% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน) และส่วนย่อย 2 ส่วน (F8/3d and F8/3f)

ส่วนย่อย F8/3f (26.8 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง นำมาแยกต่อด้วยวิธี flash column chromatography ใช้ 50% เอทิลอะซีเตด/เฮกเซน เป็นตัวชะ แยกได้ **PTM2** เป็นของหนืดไม่มีสี (4.1 mg)

ส่วน F9 (3.1 g) ซึ่งนำไปแยกต่อด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเมทิลีนคลอไรด์เพิ่มขั้วด้วยเมทานอล แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F9/2a-F9/2c)

ส่วนย่อย F9/2a (241.1 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 7% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (F9/3a-F9/3c)

ส่วนย่อย F9/3b (28.4 mg) นำมาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ชะด้วย 25% อะซีโตน/เมทิลีนคลอไรด์ แยกได้ **PTM4** เป็นของหนืดไม่มีสี (4.8 mg) (R_f = 0.29, 7% เมทานอล/เมทิลีนคลอไรด์)

สาร PTM1: ของแข็งสีขาว IR (KBr) ν_{max} (cm-1): 3413 (O-H stretching), 2942 (C-H stretching), 1697 (C=O stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 51 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (75 MHz): ตารางที่ 51

สาร PTM2: ของหนืดไม่มีสี $[\alpha]_D^{28}$: +36.6° (c = 0.041, $CHCl_3$);
UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 236 (4.00); IR (neat $CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}): 3408 (O-H stretching), 2968 (C-H stretching), 1651 (C=O stretching); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 56 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δppm) (75 MHz): ตารางที่ 56

สาร PTM3: ของหนืดไม่มีสี $[\alpha]_D^{28}$: +125.0° (*c* = 0.032, $CHCl_3$);
UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 235 (3.89); IR (neat $CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}): 3408 (O-H stretching), 2968 (C-H stretching), 1651 (C=O stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 59 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 59

สาร PTM4: ของหนืดไม่มีสี $[\alpha]_D^{28}$: + 34.5° (*c* = 0.220, MeOH);
UV (MeOH) λ_{max} (nm) (log ε) : 236 (3.91), 280 (3.42); IR (neat $CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}): 3408 (O-H stretching), 2968 (C-H stretching), 1651 (C=O stretching); ^1H NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (300 MHz): ตารางที่ 63 ^{13}C NMR ($CDCl_3$) (δ ppm) (75 MHz): ตารางที่ 63

2.2.4 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบอะซีโตน

นำส่วนสกัดหยาบอะซีโตน (27.0 g) มาแยกด้วยวิธี quick column chromatography ชะด้วยเมทิลีนคลอไรด์ และเพิ่มขั้วด้วยอะซีโตน แยกได้ **PTH1** ปริมาณไม่มากนัก สารที่อยู่ในส่วนสกัดนี้เป็นสารขั้วสูง ไม่สามารถหาระบบแยกได้ จึงไม่ได้ดำเนินการต่อ

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำส่วนสกัดหยาบเฮกเซน เมทิลีนคลอไรด์ และอะซีโตน และสารบริสุทธิ์ที่มาจากส่วนสกัดที่ให้ผลบวก ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ

2.2.5.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราและเชื้อแบคเตรี ทดสอบที่ภาควิชาจุลชีววิทยา

2.2.5.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อโปรโตซัว ทดสอบที่ภาควิชาจุลชีววิทยา

2.2.5.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรม แห่งชาติ

2.2.5.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคเตรี มีวิธีดำเนินการ ดังนี้

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคเตรี (Lorian, 1996)

เชื้อที่ทดสอบ ได้แก่

1. *Staphylococcus aureus* ATCC25923
2. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1
3. *Escherichia coli* ATCC25922
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

นำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบหาความไวต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด โดยวิธี standard disc diffusion ใช้ยามาตรฐานอย่างน้อย 5 ชนิด

- *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 วางแผ่นยา amikacin, ampicillin, erythromycin, oxacillin และ vancomycin
- *E. coli* ATCC 25922 วางแผ่นยา ampicillin, amikacin, gentamicin, tetracycline และ cephalothin
- *P. aeruginosa* ATCC27853 วางแผ่นยา amikacin, gentamicin, tetracycline, chloramphenicol และ netilmicin

การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion

เพาะเลี้ยงแบคเตรียบนวุ้นอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) แล้วนำแผ่น paper disc (dia. ca 6 mm) ชุบสารสกัดวางลงบนวุ้นอาหาร เพาะเลี้ยงที่ 35 °C 18 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น disc หน่วยเป็น mm สารที่ให้ inhibition zone ไม่ชัดเจน จะบันทึกผลเป็น + หรือ -

Crude extract (C) ทดสอบที่ความเข้มข้น 1 mg/แผ่น หรือ 1,000 µg/แผ่น

Fraction (F) or Pure (P) ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1 mg/แผ่น หรือ 100 µg/แผ่น

สารสกัดที่ให้ inhibition zone จะนำไปทดสอบหาค่า **Minimum inhibitory concentration** (MIC) ต่อไป

การหาค่า MIC โดยวิธี Agar microdilution method (Lorian, 1996)

การเตรียม Inoculum

นำแบคเตรีที่ต้องการทดสอบมา streak บนอาหาร NA แล้วนำไปบ่มเชื้อในตู้ incubator อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็น colony เดี่ยว ๆ มา 4-5 colonies แล้วนำไปลงในอาหาร NB ต่อจากนั้นจึงนำไปเขย่าในเครื่อง shaker โดยใช้ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ sterile normal saline solution ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางเชื้อ 1:100 ด้วย sterile normal saline solution

การทดสอบกับสารสกัด

เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้อง การทดสอบรวม 11 ความเข้มข้น โดยจะเจือจางแบบ 2-fold dilution ซึ่งใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เมื่อได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 11 ความเข้มข้นแล้ว ก็ทำการผสมกับอาหาร MHA ซึ่งหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45-50 °C ในอัตราส่วน 1:10 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ

Crude extract (C) ทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 1024- µg/mL (อยู่ในช่วง 1024 -1 µg/mL)

Fraction (F) or Pure (P) ทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 128 µg/mL (อยู่ในช่วง 128-0.125 µg/mL)

หากปริมาณสารมีน้อยจะทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้

หลังจากนั้นใช้ micropipette ดูดสารสกัดกับอาหารที่ผสมกันดีแล้วใส่ใน sterile microtiter plate หลุมละ 200 µL โดยจะทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ หยดเชื้อที่เตรียมไว้แล้วหลุมละ 10 µL (มีเชื้อประมาณ $1.5x10^4$ CFU/หลุม)

สำหรับ control จะทำ 3 ซ้ำเหมือนกัน โดย positive control จะใช้ DMSO แทนสารสกัดและหยดเชื้อ 10 µL/หลุม ส่วน negative control จะเหมือนกับ positive control แต่ไม่ต้องหยดเชื้อลงไป แล้วจึงนำไปบ่มเชื้อในตู้ incubator อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

- *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 ทดสอบกับยา vancomycin ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 µg/mL
- *E. coli* ATCC 25922 กับยา gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 µg/mL
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 กับยา tetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 32-0.063 µg/mL

การอ่านผลการทดลอง

\+ แสดงว่ามีเชื้อขึ้นบนวุ้นอาหาร

\- แสดงว่าไม่มีเชื้อขึ้นบนวุ้นอาหาร

ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้นบนวุ้นอาหาร

การทดสอบฤทธิ์ต้านรา

เชื้อที่ทดสอบ คือ

1. *Human pathogenic yeasts* ได้แก่

Candida albicans NCPF3153

Cryptococcus neoformans 3 isolates

1.1 *Cryptococcus neoformans* clinical isolate

1.2 *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, flucytosine sensitive strain

1.3 *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, flucytosine resistant strain

ทำการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion และหาค่า MIC เช่นเดียวกับการทดสอบแบคเตรี แต่ใช้ วุ้นอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) และอ่านผลหลังจากเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ และทดสอบกับยาต้านรามาตรฐานด้วย คือ amphotericin B ที่ระดับเข้มข้น 16-0.003 µg/mL

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใย (filamentous fungi)

การทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี hyphal extension- inhibition assay (Huang *et al.*, 2000)

Human pathogenic fungi ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

1. *Microsporum gypsuem* clinical isolate

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยเลี้ยง *M. gypsuem* เป็นเวลา 4 วัน เลี้ยง *P. marneffei* เป็นเวลา 5 วัน นำแผ่น disc ที่ชุบสารสกัด วางห่างจากปลายเส้นใย (บริเวณขอบโคโลนี) 0.5 เซนติเมตร และแผ่น disc ที่ชุบ DMSO เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน ทำสารสกัดละ 2 ซ้ำ

Crude extract (C) ทดสอบที่ความเข้มข้น 1 mg/แผ่น หรือ 1,000 µg/แผ่น

Fraction (F) or Pure (P) ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1 mg/แผ่น หรือ 100 µg/แผ่น

การอ่านผล

สังเกตการยับยั้งเชื้อ โดยเชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตชิดขอบแผ่น disc

รายงานผลเป็น + ถ้ามีการยับยั้ง

รายงานผลเป็น - ถ้าไม่มีการยับยั้ง

การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดต่อเชื้อรา *M. gypseum* โดยวิธี broth microdilution (ดัดแปลงตามวิธีจาก NCCLS, 1997)

วิธีเตรียม Conidial suspension

เลี้ยง *M. gypseum* บนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ใส่ glass bead ลงไปประมาณ 15-20 เม็ด เกลี่ยไปมาเพื่อให้โคนิเดียหลุดออกมา แล้วเติม 0.85% NaCl ไร้เชื้อลงไป ดูดโคนิเดียที่แขวนลอยอยู่ใน 0.85% NaCl ใส่ในหลอดทดลอง นำไปนับจำนวนโคนิเดียด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ $4x10^3$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ด้วย Sabouraud dextrose broth (SDB)

วิธีเตรียมยาที่ใช้ทดสอบ

ละลายยา amphotericin B ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ให้มีความเข้มข้น 3,200 µg/mL แล้วเจือจางยาใน SDB ให้ได้ความเข้มข้น 64 µg/mL จากนั้นเจือจางยาแบบ two fold dilutionใน SDB จำนวน

10 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหาร 2 เท่า (ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 32-0.06 µg/mL)

วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน DMSO แล้วเจือจางสารสกัดแบบ two fold dilution ใน SDB ให้ได้สารสกัดชนิดละ 10 ความเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในอาหาร 2 เท่า

Crude extract (C) ทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 1024- µg/mL (อยู่ในช่วง 1024 -1 µg/mL)

Fraction (F) or Pure (P) ทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 128 µg/mL (อยู่ในช่วง 128-0.125 µg/mL)

หากปริมาณสารมีน้อยจะทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้

วิธีการทดสอบเพื่อหาค่า MIC

ผสมยาหรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µL กับเชื้อ (conidial suspension $4x10^3$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 µL (อัตราส่วน 1:1) ในหลุม microtiter plate ไร้เชื้อ สำหรับหลุมที่ 11 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว เพื่อตรวจสภาวะไร้เชื้อ และหลุมที่ 12 ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็น growth control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

การอ่านผล

ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 80% เมื่อเปรียบเทียบกับ growth control ซึ่งอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นด้วยกล้องสเตอริโอซูม

ยาควบคุม คือ amphotericin B

2.2.5.2 ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว

1. เชื้อที่ใช้ทดสอบ *Entamoeba histolitica* และ *Giardia intestinalis*

เชื้อ *E. histolitica* สายพันธุ์ HM-1:IMSS เป็นสายพันธุ์ก่อโรค ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.จุฑาทิพย์ ศิริพันธุ์ ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

เชื้อ *G. intestinalis* เป็นสายพันธุ์ไทย แยกจากผู้ป่วยที่มีซิสท์ของโปรโตซัวนี้

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *E. histolitica* เลี้ยงแบบ axenic culture (ไม่มีแบคเตรีปนเปื้อน) ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 16X 125 mm ในอาหาร YI-S ที่มี 10% Calf Bovine Donor Serum วางหลอดให้เอียงประมาณ 45° เชื้อ

จะเจริญเกาะที่บริเวณด้านล่างในหลอดแก้ว บ่มใน incubator ที่ 37°C เปลี่ยนอาหารทุกๆ 48 ชม โดยใช้ pasture pipette ดูดอาหารเก่าออกจนหมด และเติมอาหารใหม่ลงไปจนมีปริมาตรเป็น 70-80% (ประมาณ 10.5-12 mL) ของหลอดฝาเกลียว

เชื้อ *G. intestinalis* เลี้ยงแบบ axenic culture (ไม่มีแบคเตรีปนเปื้อน) ในหลอดฝาเกลียว ขนาด 16X 125 mm ในอาหาร YI-S ที่มี Bile ที่มี 10% Horse Serumวางหลอดให้เอียงประมาณ 45° เชื้อจะเจริญเกาะที่บริเวณด้านล่างในหลอดแก้ว บ่มใน incubator ที่ 37°C เปลี่ยนอาหารทุกๆ 48 ชม โดยใช้ pasture pipette ดูดอาหารเก่าออกจนหมด และเติมอาหารใหม่ลงไปจนมีปริมาตรเป็น 70-80 mL

วิธีทดสอบ (Sawangjaroen *et al.*, 2005)

1. นำเชื้อ ที่มีอายุประมาณ 20-30 ชั่วโมง (มีเชื้อเจริญเต็มด้านในของหลอดทดลอง โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope) มาแช่ในน้ำแข็ง 15-20 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดจากหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,250 rpm เป็นเวลา 7 นาที ดูดเอาตะกอนเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ นับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer ปรับให้ได้ความเข้มข้น 4x 10^5 cell/ml

2. ผสมสารสกัดที่เตรียมไว้กับอาหารเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 2,000 µg/mL tissue culture plate ชนิด 96 หลุมๆละ 200 µ l สมุนไพรละ 2 หลุม และเจือจางลำดับที่ สอง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสมุนไพรใน plate เป็นดังนี้ 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.9 µg/mL โดยในแต่ละหลุมมีสารสกัดสมุนไพร100 µ L

3. ใช้เชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 4x 10^5 cell/mL ใส่ใน tissue culture plate ที่เตรียมสารสกัดสมุนไพรไว้แล้วหลุมละ 100 µ l ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นดังนี้ 1000, 500, 250,125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 3.9 และ 1.95 µg/ml

4. ยามาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคือ **metronidazole** ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.62 µg/mL

5. เตรียมหลุมควบคุมโดยใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่มีอยู่ในสารสกัดสมุนไพร 3 หลุม และหลุมที่ใส่แต่เชื้ออย่างเดียวโดยไม่มียาหรือสารสกัดสมุนไพร 4 หลุม

6. นำ tissue culture plate ไปบ่มในที่ที่ไม่มีออกซิเจน โดยใช้ Anaerocult A mini (MERK) ใส่ในตู้ incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำ ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ชนิด inverted microscope ให้เกรดในแต่ละหลุม ดังนี้

1+ เชื้อตายมากกว่า 90%

2+ 20-50 %ของเซลล์มีลักษณะปกติ บางเซลล์มีการเคลื่อนที่

3+ เชื้อเจริญใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

4+ กลุ่มควบคุม

ค่า **MIC** คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อตายมากกว่า 90%

8. นำ plate ไปแช่เย็นโดยวางบนน้ำแข็ง 15-20 นาที นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ใช้สี Trypan blue 0.04%) โดยใช้ เลือกนับเฉพาะเซลล์ที่ไม่ติดสี และนับซ้ำอีกครั้ง (นับหลุมละ 2 ครั้ง) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มียาหรือสารสกัดสมุนไพร บันทึกผล

9. ทำซ้ำสารสกัดสมุนไพรและยาอย่างละ 2 ครั้ง

10. คำนวณความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพร หรือยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 50% (IC_{50}) โดยนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ทำอย่างน้อย 2 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ โดยเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มียา หรือสารสกัดสมุนไพร นำค่าที่ได้มาแปลงเป็นค่า probit เขียนกราฟระหว่างค่า probit และ log ของความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือยา ให้ แกน Y เป็นค่า probit และแกน X แสดงค่า log ความเข้มข้น คำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรหรือยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ 50% (IC_{50}) จากสมการเส้นตรงของกราฟ

2.2.5.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ใช้ NCIH-187 cell lines (small cell lung cancer) ใช้วิธี calorimetric โดยใช้ ellipticine เป็น positive control (Skehan *et al.* 1990) และ DMSO 10% เป็น negative control

นำเซลล์ ระยะ logarithmic growth มาทำให้เจือจางเป็น 10^5 cells/ml. ละลายสารทดสอบใน 10% DMSO (ความเข้มข้น 20 mg/mL) ทำสารละลายที่ได้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.4 mg/mL ใช้เป็น stock solution

ผสม stock solution (10 µL) และ cell suspension (190 µL) ใน microliter plate (ความเข้มข้น 20 mg/mL ด้วย 0.05 % DMSO) ถ้าสารแสดงฤทธิ์ที่ ความเข้มข้น 20 mg/mL ทำการทดสอบต่อ โดยทำ stock solution ให้เจือจางเท่าตัวด้วย DMSO 10% แล้วนำไปผสมกับเซลล์ ตามที่กล่าวแล้ว ถ้าสารแสดงฤทธิ์ ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อยๆ

อบ plate ใน incubator ที่ 37° C ภายใต้บรรยากาศของ กาซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น fix เซลล์ ด้วย 50% trichloroacetic acid อบ plate ที่ 4° C เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำ และเป่าให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เซลล์ติดสีด้วย 0.05 %

sulforhodamine B (SRB) ใน 1% acetic acid เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นกำจัด SRB ด้วย 1% acetic acid ทำ plate ให้แห้ง แล้ว ละลายสีที่ติดเซลล์ด้วย 10 mM Tris bse เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าสาร วัด optical density ที่ ความยาวคลื่น 510 nm Ellipticine ซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบ แสดงค่า IC_{50} ที่ 0.3 μg/mL