



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออก  
ของประเทศไทย

(Antimicrobial and Biological Activities of Rubiaceae Plants from Eastern part of  
Thailand)

เกอัสกรหญิง ดร.เนตรชนก เจียงสีบชาติวิระ และคณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออก  
ของประเทศไทย

(Antimicrobial and Biological Activities of Rubiaceae Plants from Eastern part of  
Thailand)

เภสัชกรหญิง ดร.เนตรชนก เจียงสีบชาติวีระ <sup>1</sup>	หัวหน้าโครงการ
เภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์ <sup>1</sup>	ผู้ร่วมวิจัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุต ตั้งวัฒนาชูลีพร <sup>2</sup>	ผู้ร่วมวิจัย
อาจารย์เหมรัมย์ วชิรหัตถพงษ์ <sup>3</sup>	ผู้ร่วมวิจัย

<sup>1</sup>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>2</sup>คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>3</sup>คณะวิทยาการสารสนเทศ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 5.6/2562 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย รวมถึงขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิชาการ นักวิทยาศาสตร์ รวมถึงผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือให้การทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2565

## บทคัดย่อ

ต้นเข็มแดง (*Ixora coccinea* L.) เป็นไม้ประดับยอดนิยมในประเทศไทย ด้วยความหนาแน่นของกิ่งก้าน ลำต้นที่แข็งแรง และมีดอกสีแดงที่สวยงามจึงนำมาสร้างเป็นรั้วต้นไม้ การวิจัยนำสารสกัด 95% เอทานอลของดอกเข็มแดงจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมาหาค่าประกอบทางเคมีที่สำคัญโดยใช้ TLC และ HPLC โดยครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบ kaempferitrin ในดอกเข็มแดง ซึ่งสาร kaempferitrin นี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.54 \pm 0.02$  mg/mL ด้วยวิธี DPPH นอกจากนี้การศึกษาในหลอดทดลองของสารที่ความเข้มข้น 63  $\mu$ g/mL พบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ  $16.29 \pm 6.69\%$  อย่างไรก็ตามสารนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 100, 50 และ 25  $\mu$ g/แผ่น การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับของ kaempferitrin จะมีศักยภาพในการนำไปวิจัย และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *Ixora coccinea* L., Rubiaceae, kaempferitrin, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ มะเร็งตับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

## Abstract

*Ixora coccinea* L. is a famous ornamental plant in Thailand. The densely branched, strong stem with the beautiful red flowers was used to set as a hedge. The active 95% ethanolic extract of flowers from the Eastern part of Thailand was selected to investigate the active chemical constituents using TLC and HPLC. This research work describes, for the first time, the isolation of kaempferitrin in *I. coccinea* flowers. Kaempferitrin showed antioxidant activity with the IC<sub>50</sub> values of  $0.54 \pm 0.02$  mg/mL through the DPPH assay. Moreover, *in vitro* study of this compound at a concentration of 63 µg/mL showed the activity against liver cancer cells (HepG2) with a %growth inhibition value of  $16.29 \pm 6.69\%$ . However, it could not inhibit the growth of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans* at a concentration of 100, 50, and 25 µg/disc. These results reveal the antioxidation and cytotoxicity to liver cancer of kaempferitrin, which is suggested as a potential for the research and development of new food supplements, or anticancer drugs in the future.

Keywords: *Ixora coccinea* L., Rubiaceae, kaempferitrin, antimicrobial activity, liver cancer (HepG2), free radical scavenging activity

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
ภาคผนวก	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฌ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	2
1.2.1 วัตถุประสงค์	2
1.2.2 ขอบเขตการวิจัย	2
1.3 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม</b>	<b>4</b>
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย</b>	<b>26</b>
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	26
3.2 เลือกตัวอย่างสารสกัดของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย	26
3.3 การแยกส่วน (fraction) สารสำคัญจากสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ	26
3.4 การทำสารให้บริสุทธิ์ และหาปริมาณสารสำคัญในพืชตัวอย่าง	27
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์	27
3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น	28
3.4.1 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion	28
3.4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี disc diffusion	28

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	28
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) (anticancer activity) ด้วยวิธี MTT	29
3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง	29
3.6.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์	29
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b>	31
4.1 เลือกตัวอย่างสารสกัดของพืชวงศ์รูเปียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย	31
4.2 การแยกส่วน (fraction) ของสารสำคัญจากสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ	31
4.3 การทำสารให้บริสุทธิ์ และหาปริมาณสารสำคัญในพืชตัวอย่าง	37
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์	39
4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น	41
4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และ ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2)	42
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ</b>	44
5.1 สรุปผลการวิจัย	44
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
<b>บทที่ 6 ผลผลิต</b>	45
รายงานสรุปการเงิน	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	53
ประวัตินักวิจัยและคณะ	59

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของพืชวงศ์รูเบียซีอี	5
ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารสำคัญที่แยกได้จากพืชวงศ์ Rubiaceae	9
ตารางที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นเข็มแดง	17
ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในต้นเข็ม	22
ตารางที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดหยาบด้วย TLC	32
ตารางที่ 6 การเก็บ fraction ที่ได้จากการแยกสารด้วย Sephadex® LH-20	33
ตารางที่ 7 การรวม fractions และการทดสอบการตกผลึก	35
ตารางที่ 8 น้ำหนักของแต่ละ fractions ที่น่าสนใจ	37
ตารางที่ 9 $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR และ HMBC ของสาร M21-2 ในตัวทำละลาย DMSO- $d_6$ จากสารสกัดหยาบ 95% EtOH ดอกเข็มแดง เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง	39
ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของ kaempferitrin	42
ตารางที่ 11 ตารางแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) ของ kaempferitrin	43



## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารสำคัญที่พบในพืชวงศ์ Rubiaceae	13
รูปที่ 2 ลักษณะลำต้น ใบ และดอกของต้นเข็มแดง	15
รูปที่ 3 ลักษณะของดอก และใบของต้นเข็มแดง	16
รูปที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นเข็ม	25
รูปที่ 5 ภาพสารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดง	31
รูปที่ 6 ตัวอย่างการแยกสารในสภาวะต่าง ๆ	33
รูปที่ 7 Fractions ที่แยกได้จาก Sephadex <sup>®</sup> LH-20	34
รูปที่ 8 การรวม fraction ด้วยสภาวะ Mobile phase: EtOAc: MeOH 2:3	34
รูปที่ 9 Fraction ที่นำมาทดสอบการตกผลึก	35
รูปที่ 10 การรวม fractions ที่น่าสนใจในสภาวะต่าง ๆ	36
รูปที่ 11 Preparative TLC ของ Fraction 23 ภายใต UV 366 nm	37
รูปที่ 12 Chromatogram ของ fraction 21 – 22	38
รูปที่ 13 <sup>1</sup> H-NMR ของสาร M21_2	38
รูปที่ 14 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ Kaempferitrin	39

## ภาคผนวก

หน้า

รูป 1	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร M21_2	53
รูป 2	$^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร M21_2	54
รูป 3	COSY ของสาร M21_2	55
รูป 4	HMQC ของสาร M21_2	56
รูป 5	HMBC ของสาร M21_2	57
รูป 6	IR ของสาร M21_2	58

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

μL	Microliter
μm	Micrometer
ACN	Acetonitrile
AR	Analytical reagent
CFU	Colony forming unit
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichloromethane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FTIR	Fourier transform Infrared Spectroscopy
g	gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
mg	Milligram
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	Minimum Microbicidal Concentration
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
nm	Nanometer
TFA	Trifluoroacetic acid

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพยังคงเป็นปัญหาสำคัญทั้งในระดับชาติและทั่วโลกที่นับวันจะทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งในปี 2555 WHO มีรายงานพบการดื้อยาด้านเชื้อเอชไอวี (HIV) โดยเป็นการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาลำดับแรก (first-line treatment drugs) จึงมีแนวโน้มจะใช้จ่ายที่มีราคาสูงขึ้นไปในอนาคต ต่อมาในปี 2556 WHO รายงานว่าพบผู้ป่วยรายใหม่ที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลาย ๆ ชนิด (Multi drug-resistant Tuberculosis, MDR-TB) จำนวนถึง 480,000 ราย และพบการระบาดของวัณโรคดื้อยาแทบทุกชนิด (Extensively drug-resistant Tuberculosis, XDR-TB) ใน 100 ประเทศ จนกระทั่งปี 2557 ทาง WHO ได้ประกาศให้ทุกประเทศเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ และจัดการป้องกันการดื้อยา เนื่องจากไม่สามารถคาดการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะในอนาคตได้อีกต่อไป (WHO, 2015) ในประเทศไทยช่วงปี พ.ศ. 2543-2554 พบการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นโดยเป็นการดื้อยาหลายชนิด ซึ่งมีคนไทยติดเชื้อดื้อยามากกว่า 100,000 คนต่อปี ทำให้ต้องรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้นมากกว่า 1 ล้านวัน และเสียชีวิตเพิ่มขึ้นกว่า 30,000 รายต่อปี คิดเป็นความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจมูลค่ามหาศาล (พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, 2555) สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา ได้แก่ การใช้จ่ายด้านจุลชีพมากเกินไปจนความจำเป็น การจ่ายยาปฏิชีวนะไม่เหมาะสมกับอาการ การนำยาปฏิชีวนะสำหรับมนุษย์ไปใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ การเกษตร รวมถึงนำไปใช้ในการรักษาโรคของสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข และการพัฒนายาต้านจุลชีพตัวใหม่ยังมีน้อย เป็นต้น (พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, 2555; Ventola, 2015)

นอกจากการแก้ปัญหาจากสาเหตุข้างต้น ไม่ว่าจะเป็นการเลือกจ่ายยาให้ถูกต้องเหมาะสม การเฝ้าระวังการติดเชื้อดื้อยาในปศุสัตว์ และสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ นักวิจัยไทยยังพยายามค้นหาตัวยาใหม่ ๆ มาใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพในปัจจุบันที่มีการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณการใช้ยาต้านจุลชีพ และหากพบสารที่มีฤทธิ์ที่ดีก็สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพตัวใหม่ได้ในอนาคต การค้นหายาใหม่นั้นมาจากหลายแหล่ง เช่น พืช สัตว์ เชื้อจุลชีพ รวมถึงการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งพืชยังคงเป็นแหล่งทรัพยากรสำคัญอันดับแรกๆ ที่เลือกมาใช้ในการงานวิจัย เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวภาพ มีความแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น สามารถเก็บได้ง่าย มีหลายส่วนประกอบให้นำมาวิจัย และบางชนิดยังใช้ในการรักษาโรคสืบต่อกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ

พืชในวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) หรือพืชวงศ์เข็มจัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายวงศ์หนึ่งซึ่งพบได้ในประเทศไทยรวมถึงในเขตภาคตะวันออก โดยมีรายงานการนำพืชในวงศ์นี้ไปใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ เครื่องหอม และสีย้อม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำพืชในวงศ์นี้ไปใช้เป็นสมุนไพรสำหรับรักษาโรค เช่น ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) กระท่อม (*Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในการหาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น จากสารสกัดที่ได้จากพืชในวงศ์รูเบียซีอี ที่เก็บได้ใน

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และผลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้จะได้จัดเก็บรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูลในการสืบค้นสำหรับงานวิจัย และงานด้านการเรียนการสอนต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

### 1.2.1 วัตถุประสงค์

เพื่อแยกสารสำคัญ นำสารมาให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารที่ได้จากสารสกัดของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

### 1.2.2 ขอบเขตการวิจัย

#### 1) การแยกส่วน (fraction)

แยกสารสกัดหยาบที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ หรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่สนใจออกเป็นส่วน ๆ (fraction) ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น solvent extraction, วิธีรงค์เลขผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC), คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) เป็นต้น รวบรวม fraction ที่มีองค์ประกอบสารสำคัญที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน

#### 2) การทำสารให้บริสุทธิ์และหาปริมาณสาร

นำ fraction ที่มีองค์ประกอบสารสำคัญที่เหมือนกันมาแยก fraction ซ้ำ ๆ ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์ และหาปริมาณสารที่ได้

#### 3) พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ และโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ mass spectrometry, infrared spectroscopy, Nuclear magnetic resonance spectroscopy เป็นต้น

#### 4) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เปรียบเทียบผลที่ได้กับสารสกัดหยาบเริ่มต้นที่นำมาแยกส่วน

## 1.3 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

สารสกัดจากพืชในวงศ์รูเบียซีอี มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยส่วนต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน อาจจะทำให้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่ต่างกัน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบกลุ่มสาร และโครงสร้างของสารสำคัญจากพืชในวงศ์รูเบียซีอีที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

1.4.2 นำผลที่ได้จากงานวิจัยจัดทำเป็นฐานข้อมูลสำหรับด้านงานวิจัย และงานด้านการเรียนการสอน  
ต่อไป

## บทที่ 2 ทบพวนวรรณกรรม

พืชวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) เป็นพืชที่สามารถพบได้ในพื้นที่เขตร้อนชื้น และพบมากเป็นอันดับ 4 รองมาจากพืชสกุลออกซิเดซีอี (Orchidaceae) เอสเทอราซีอี (Asteraceae) และเลคกูมินโนซี (Leguminosae) ตามลำดับ ทั่วโลกพบการแพร่กระจายของพืชสกุลนี้มากถึง 611 สกุล 13,100 ชนิด (Govaerts et al., 2007) ในประเทศไทยพบการรายงานพืชวงศ์รูเบียซีอีจำนวน 110 สกุล 600 ชนิด (Puff et al., 2005) พืชในวงศ์นี้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น ไม้กระพุ่ม (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser) ใช้ทำเยื่อกระดาษ เปลือกโก่งกางหูช้าง (*Guettarda speciosa* L.) ที่มีรสฝาดใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาลดกรด เข็ม (*Ixora* L.) นิยมปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ ยอ (*Morinda citrifolia* L.) ใช้เป็นยาสมุนไพร เป็นต้น (ราชันย์ ภูมา, 2559)

นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของพืชวงศ์รูเบียซีอี ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ เป็นต้น ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวนี้ สามารถพบได้ทั้งในสารสกัดหยาบ และสารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิด ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 1 และยังสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของพืชวงศ์รูเบียซีอีได้หลายชนิด ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 2 และแสดงโครงสร้างของสารแต่ละชนิดดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของพืชวงศ์รูเบียซีอี

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> )	<i>Breonadia salicina</i>	สารสกัดหยาบเมทานอล และน้ำของใบ	Al-Qurainy et al., 2013
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>Salmonella typhi</i> และ <i>Bacillus subtilis</i> )	<i>Mitragyna Speciosa</i>	สารสกัดน้ำ สารสกัดแอลกอฮอล์ และสารสกัดเมทานอลของใบ	Parthasarathy et al., 2009
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> II, <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i> และ <i>Plesiomonas shigelloides</i> )	<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack.	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดเอทิลอะซิเตต สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลจากหัว (tubers) และ protocatechualdehyde	Prachayasittikul et al., 2008
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> และ <i>E. coli</i> )	<i>Dioicidendron diocum</i> Steyererm และ <i>Gonzalagunia rosea</i> Standl.	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน	Niño et al., 2006
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	<i>Elaeagia utilis</i>	สารสกัด light petroleum และสารสกัดเอทานอลจากใบ	Moreira et al., 2015
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> และ methicillin-resistance <i>S. aureus</i> SP6-106)	<i>Morinda citrifolia</i> L.	สารสกัดเอทานอลจากผล, rutin และ asperulosidic acid	Taechowisan et al., 2019
ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ( <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S.</i>	<i>Morinda citrifolia</i> L.	สารสกัดเอทานอล สารสกัดเมทานอล และสาร	Natheer et al.,



ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
<i>aureus</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas diminuta</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 6538 และ <i>E. coli</i> ATCC 25922 )		สกัดเอทิลอะซิเตตจากผล ใบ และลำต้น rutin และ asperulosidic acid	2012
ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Candida albicans</i> )	<i>Mitragyna Speciosa</i>	สารสกัดน้ำ สารสกัดแอลคาลอยด์ และสารสกัดเมทานอลของใบ	Prachayasittikul et al., 2008
ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ( <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> และ <i>Fusarium solani</i> )	<i>Dioicidendron diocum</i> Steyerm และ <i>Gonzalagunia rosea</i> Standl.	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และ สารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน	Niño et al., 2006
ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ( <i>Alternaria anternata</i> )	<i>Bathysa meridionalis</i>	สารสกัดเมทานอลจากส่วนใบ เปลือก ดอก และ ลำต้น	Moreira et al., 2015
ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ( <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Microsporum gypseum</i> และ <i>Trichophyton mentagrophytes</i> )	<i>Calycophyllum multiflorum</i>	สารสกัดไดคลอโรมีเทน สารสกัดเมทานอล และ สารสกัดน้ำจากส่วนเปลือก	Moreira et al., 2015
ฤทธิ์ต้านการอักเสบ	<i>Spermacoce articularis</i>	สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดคลอโรฟอร์ม สารสกัดเอทิลอะซิเตต สารสกัดน้ำ และสารสกัดเบนซีนจากทั้งต้น	Conserva & Ferreira, 2012
ฤทธิ์ต้านการอักเสบ	<i>Spermacoce hispida</i>	สารสกัดเมทานอลจากทั้งต้น	Conserva & Ferreira, 2012
ฤทธิ์ต้านมะเร็งเยื่อช่องปาก (KB)	<i>Pogonopus tubulosus</i>	สารสกัดกรด-ต่าง, 1', 2', 3', 4'- tetrahydro tubulosine, tubulosine และ psychotrine	Moreira et al., 2015

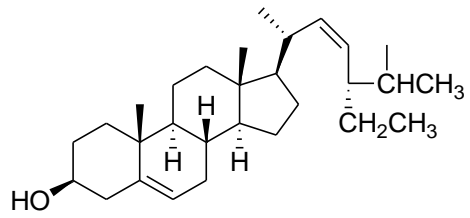
ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (brine shrimp lethality tests)	<i>Dioicidendron diocum</i> Steyererm และ <i>Gonzalagunia rosea</i> Standl.	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และ สารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน	Niño et al., 2006
ฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูก (KB-3-1)	<i>Gardenia obtusifolia</i> , <i>Gardenia sootepensis</i> , <i>Ixora cibdela</i> , <i>Mussaenda pava</i> , <i>Psychotria ophioxylodes</i>	สารสกัดหยาบเมทานอลของสมุนไพรทั้งต้น หรือ ส่วนใบของไม้ยืนต้น	Tanamatayarat et al., 2003
ฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีตับ (HuCCA-1) และมะเร็งเยื่อช่องปาก (KB)	<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack.	Protocatechualdehyde, butin และ butein	Prachayasittikul et al., 2008
ฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูก (HeLa) และมะเร็งเยื่อช่องปาก (KB)	<i>Morinda coreia</i>	Nordamnacanthal; damnacanthal, soranjidiol; 1-methoxy-2-methylantraquinone; anthragallol; 2-methoxy-6-methyl-1,3,5-trihydroxyanthraquinone; 1-hydroxy-5,6-dimethoxy-2-methylantraquinone และ lucidin-3-O-β-glucoside	Ruksilp et al., 2013
ฤทธิ์ต้านมะเร็งลิวคีเมีย (P388 leukemia)	<i>Borreria pusilla</i>	สารสกัด Ethanol-H <sub>2</sub> O 1:1	Conserva & Ferreira, 2012
ฤทธิ์ต้านเซลล์ murine fibroblast cell (L929) และ embryonic kidney cell (HEK293)	<i>Morinda citrifolia</i> L.	สารสกัดเอทานอลของผล, rutin และ asperulosidic acid	Taechowisan et al., 2019
ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3 และ Du145), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-116 และ Caco 2), มะเร็งเพาะเลี้ยงจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (A293), มะเร็ง	<i>Gardenia obtusifolia</i>	ใบ	Phromnoi et al., 2010

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
ปอด (H1299), มะเร็งศีรษะและลำคอ (SCC4), มะเร็งเม็ดเลือดขาว (KBM-5, Jurkat, HL-60 และ K562), มะเร็งเม็ดเลือดขาวมัลติเพิลมัยอีโลมา (U266, RPMI 8226 และ MM.1S), มะเร็งตับอ่อน (Panc 28) และ มะเร็งเต้านม (MCF-7 Neo และ MCF-7 HER2)			
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging method)	<i>Mitragyna Speciosa</i>	สารสกัดน้ำ สารสกัดแอลกอฮอล์ และสารสกัดเมทานอลของใบ	Parthasarathy et al., 2009
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH and SOD assays)	<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack.	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดเอทิลอะซิเตต สารสกัดไตรคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลจากหัว (tubers)	Prachayasittikul et al., 2008
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (phosphomolybdic acid และ FRAP methods)	<i>Borreria hispida</i>	สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอลจากทั้งต้น	Conserva & Ferreira, 2012
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS assays)	<i>Borreria hispida</i>	Flavonoid-rich fraction	Conserva & Ferreira, 2012
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay)	<i>Morinda citrifolia</i> L.	สารสกัดเอทานอลของผล, rutin และ asperulosidic acid	Taechowisan et al., 2019
ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ( <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium berghei</i> และ <i>Plasmodium vinckei petteri</i> )	<i>Pogonopus tubulosus</i>	Tubulosine, psychotrine และ cephaeline	Moreira et al., 2015
ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค	<i>Sommeria sabiceoides</i>	สารสกัดไตรคลอโรมีเทน	Moreira et al., 2015
ฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ (Hepatoprotective activity)	<i>Borreria articularis</i>	สารสกัดน้ำจากทั้งต้น	Conserva & Ferreira, 2012

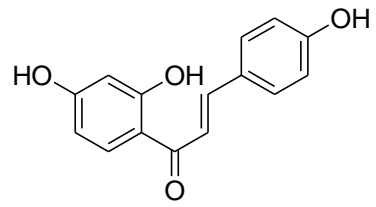
ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
ฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ (Hepatoprotective activity)	<i>Spermacoce hispida</i>	สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้น	Conserva & Ferreira, 2012

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารสำคัญที่แยกได้จากพืชวงศ์ Rubiaceae

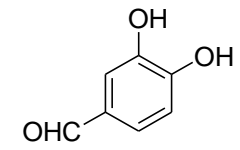
สารสำคัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช	ส่วนที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
Stigmasterol; isoliquiritigenin; Protocatechualdehyde; butin and butein	<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack.	หัว (tubers)	Prachayasittikul et al., 2008
1', 2', 3', 4'-Tetrahydrorotubulosine; tubulosine และ psychotrine	<i>Pogonopus speciosus</i>	ลำต้น	Ito et al., 1999
Tubulosine, psychotrine และ cephaeline	<i>Pogonopus tubulosus</i>	กิ่ง	Moreira et al., 2015
Nordamnacanthal; damnacanthal, soranjidiol; 1-methoxy-2-methylantraquinone; anthragallo; 2-methoxy-6-methyl-1,3,5-trihydroxyanthraquinone; 1-hydroxy-5,6-dimethoxy-2-methylantraquinone และ lucidin-3-O- $\beta$ -glucoside	<i>Morinda coreia</i>	ราก	Ruksilp et al., 2013
Rutin และ Asperulosidic acid	<i>Morinda citrifolia</i> L.	ผล	Taechowisan et al., 2019
Gardenoins E-H; dikamakiartanes A, C และ D; 5 $\alpha$ -cycloart-24-ene-3,16,23-trione และ secaubryenol	<i>Gardenia obtusifolia</i>	ตายอด	Nuanyai et al., 2011
5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone	<i>Gardenia obtusifolia</i>	ใบ	Phromnoi et al., 2010
Kaempferitrin	<i>Uncaria guianensis</i>	ใบ	Valente et al., 2009
Caffeine และ cafestol	<i>Coffea bengalensis</i>	ใบ	Martins and Nunez, 2015



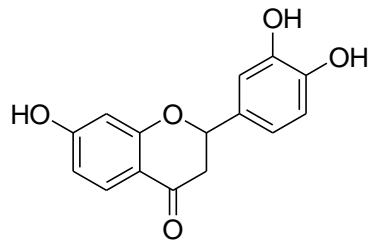
Stigmasterol



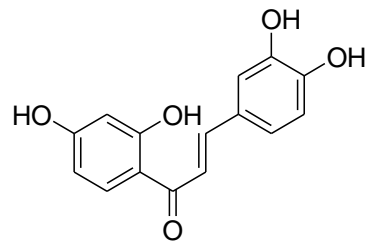
Isoliquiritigenin



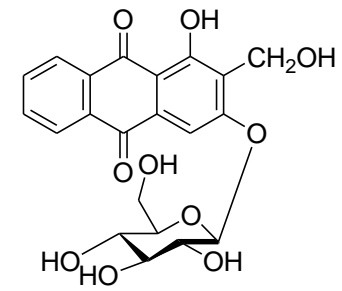
Protocatechualdehyde

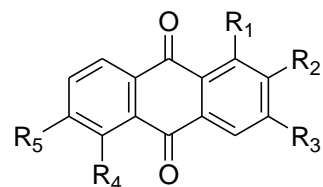


Butin

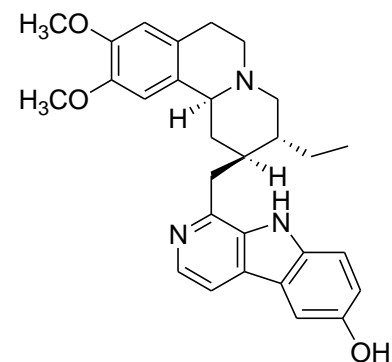


Butein

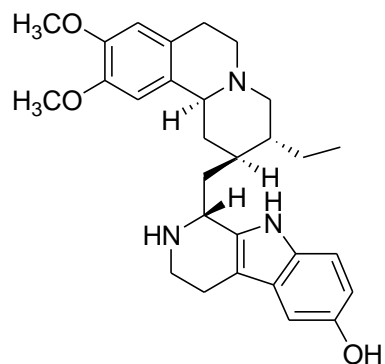
Lucidin-3-O- $\beta$ -glucoside



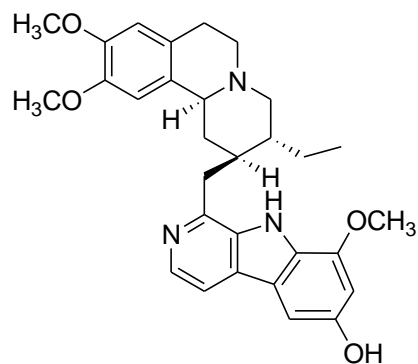
- 1: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CHO, R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H (Nordamnacanthal)
- 2: R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CHO, R<sub>3</sub> = OH, R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H (Damnacanthal)
- 3: R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H (Soranjidiol)
- 4: R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H (1-Methoxy-2-methylantraquinone)
- 5: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH, R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H (Anthragallol)
- 6: R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub> (2-Methoxy-6-methyl-1,3,5-trihydroxyanthraquinone)
- 7: R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = OCH<sub>3</sub> (1-hydroxy-5,6-dimethoxy-2-methylantraquinone)



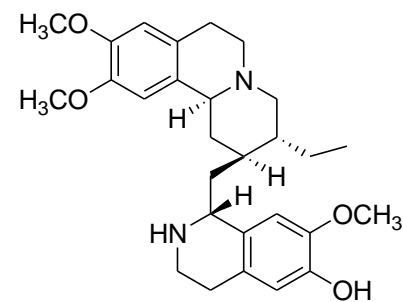
1', 2', 3', 4'-Tetrahydrotubulosine



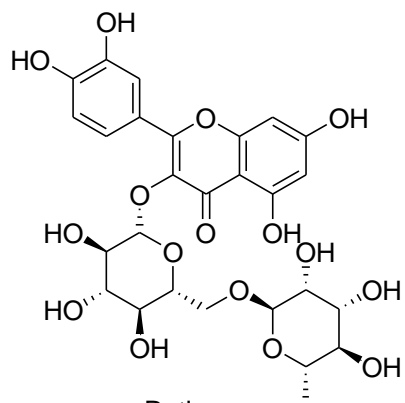
Tubulosine



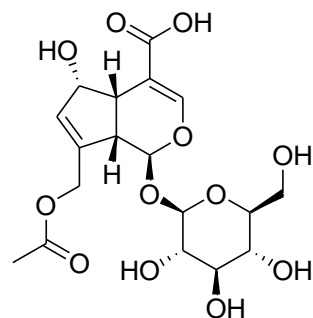
Psychotrine



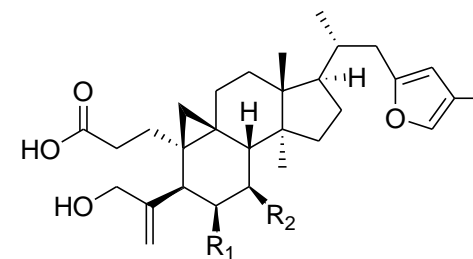
Cephaeline



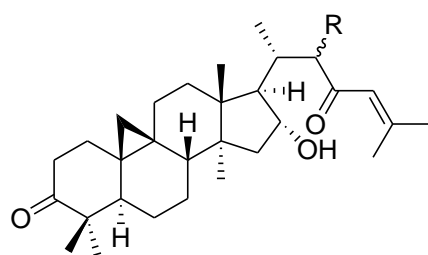
Rutin



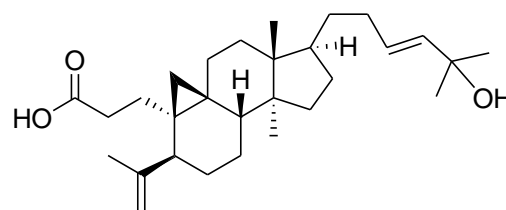
Asperulosidic acid



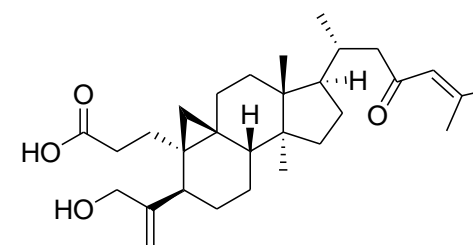
1.  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$  (Gardenoins G)
2.  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$  (Dikamakiartanes A)
3.  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$  (Dikamakiartanes B)



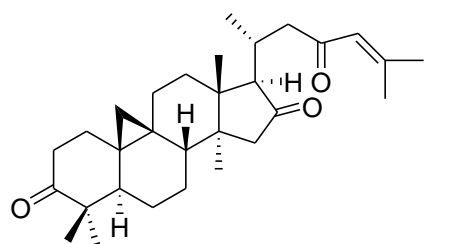
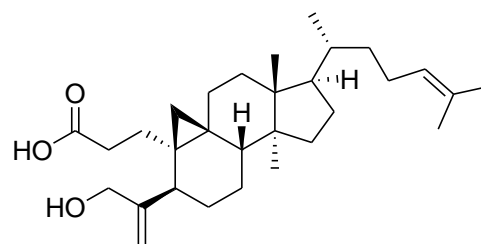
1.  $R = \text{H}$  (Gardenoins E)
2.  $R = \text{OH}$  (Gardenoins F)



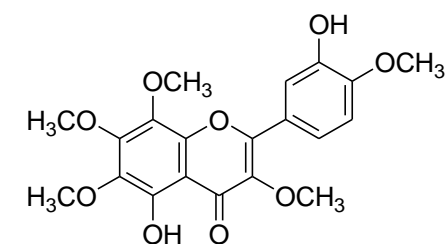
Gardenoins H



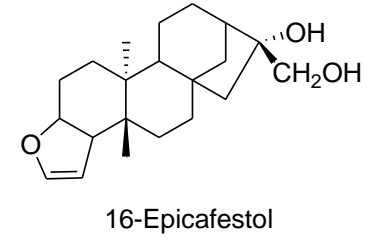
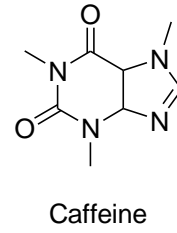
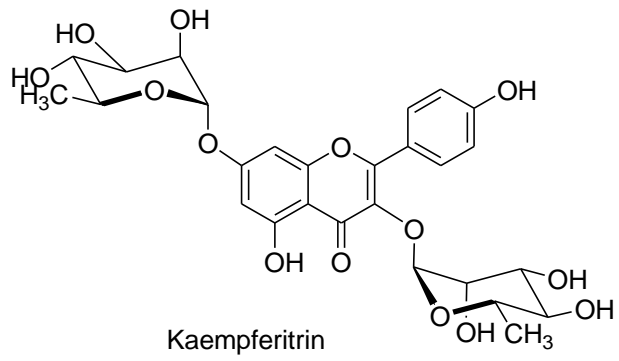
Dikamakiartanes C

5 $\alpha$ -Cycloart-24-ene-3,16,23-trione

Secaubryenol



5,3'-Dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone



รูปที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารสำคัญที่พบในพืชวงศ์ Rubiaceae



เข็มเป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae ในประเทศไทยนิยมปลูกเป็นไม้ประดับกันอย่างแพร่หลาย โดยมีขนาดความสูงของลำต้น สีของดอก และขนาดใบที่แตกต่างกัน ลำดับชั้นอนุกรมวิธาน (Taxonomic Hierarchy) ของเข็ม (Dontha et al., 2015) เรียงลำดับ ดังนี้

Kingdom	Plantae – plantes, Planta, Vegetal, plants
Subkingdom	Viridiplantae – green plants
Infrakingdom	Streptophyta – land plants
Division	Tracheophyta – vascular plants, tracheophytes
Subdivision	Spermatophytina – spermatophytes, seed plants, phanerogames
Infradivision	Angiospermae – flowering plants, angiosperms
Class	Magnoliopsida
Superorder	Asteranae
Order	Gentianales
Family	Rubiaceae – madders, rubiacees
Genus	<i>Ixora</i>
Species	<i>Ixora acuminata</i> Roxb. – bola de nieve
Species	<i>Ixora casei</i> Hance
Species	<i>Ixora coccinea</i> L. – scarlet jungle flame
Species	<i>Ixora ferrea</i> (Jacq.) Benth. – palo de hierro
Species	<i>Ixora finlaysoniana</i> Wall. ex G. Don
Species	<i>Ixora grandiflora</i> Zoll. & Moritzi – large flower jungle flame
Species	<i>Ixora macrothyrsa</i> (Teijsm. & Binn.) T. Moore
Species	<i>Ixora pavetta</i> Andrews – torch tree
Species	<i>Ixora thwaitesii</i> Hook. f. – white jungle flame
Species	<i>Ixora triantha</i> Volkens
Species	<i>Ixora arborea</i> (l. parviflora)
Species	<i>Ixora duffi</i>
Species	<i>Ixora javanica</i> (l. singaphorensis)
Species	<i>Ixora alba</i>
Species	<i>Ixora albersii</i>
Species	<i>Ixora chinensis</i>

**เข็มแดง** มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ixora coccinea* L. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (สถาบันนวัตกรรม และพัฒนากระบวนการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยมหิดล, n.d.; สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, n.d.) ดังนี้

ลักษณะทั่วไป: ไม้พุ่ม หรือไม้ยืนต้น ขนาดเตี้ย ถึงกลาง ความสูงของต้นประมาณ 0.3 - 5.0 เมตร

ใบ: ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามหรือเรียงรอบข้อ รูปหอก ปลายใบแหลม เนื้อใบหนาแข็ง ก้านใบสั้นมาก หรือไม่มีก้านใบ

ดอก: ดอกช่อออกรวมกันเป็นช่อใหญ่ที่ปลายยอด หรือกิ่งข้าง ดอกย่อยมีสีแดง ไม่มีกลิ่นหอม กลีบ

ดอกเชื่อมกันเป็นหลอดยาว ปลายหลอดกลีบแยกเป็น 4-6 กลีบ เกสรตัวผู้สีเหลือง 4 อัน ติด

อยู่ที่หลอดดอกด้านบน และอยู่สลับกับกลีบดอก เกสรตัวเมียยื่นเลยหลอดดอก มี 2 แฉก

ผล: ลักษณะกลม มีสีแดง เมื่อผลสุกจะนิ่มและเป็นสีดำ

เมล็ด: รูปโค้ง มี 1 เมล็ดในผล



รูปที่ 2 ลักษณะลำต้น ใบ และดอกของต้นเข็มแดง



รูปที่ 3 ลักษณะของดอก และใบของต้นเข็มแดง

สรรพคุณของเข็มแดงที่ใช้ในสมัยโบราณ: รากและดอกมีสรรพคุณขับเสมหะ แก้กวม แก้ท้องเสีย แก้บิด ฆ่าเชื้อ ช่วยให้เจริญอาหาร ขับน้ำย่อย ใช้เป็นยาสงบระงับ (สวนสมุนไพรรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, n.d.)

หลากหลายการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นเข็มแดง เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากทั้งสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของต้นเข็มแดง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ถ่ายพยาธิ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด ฤทธิ์ต้านโรคหอบหืด ฤทธิ์แก้อาการท้องเสีย ฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ ฤทธิ์สมานแผล ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจ ฤทธิ์ต้านกระเพาะอาหารอักเสบ และฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ประสาท เป็นต้น ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 3

ทั้งยังมีศึกษาองค์ประกอบสารสำคัญของต้นเข็มแดงด้วยการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ และมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่ได้ ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 4 และแสดงตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ดัง รูปที่ 4

ตารางที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นเข็มแดง

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ส่วนที่ใช้	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
<b>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ</b>			
	สารสกัดเมทานอล:น้ำ (7:3) ของดอก	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DPPH radical scavenging assay มีค่า IC <sub>50</sub> ที่สูงมากกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid เท่ากับ 100.53 µg/mL และ 58.92 µg/mL ตามลำดับ	Saha et al., 2008
	สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอลของดอก	สารสกัดเอทิลอะซิเตตให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงที่สุด จากการทดสอบ DPPH assay (12.86±1.14 µg/10 µL), Lipid peroxidation (121.72±7.17 µg/ml), Nitrate / Nitrite radical scavenging activity (48.57±3.85 µg/0.5mL) และ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Radical scavenging activity (27.54±1.39%) ขณะที่สารสกัดเมทานอลและสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมาตามลำดับ	Haridass et al., 2012
	สารสกัดเอทานอล (90%) จากใบ	มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DPPH, reducing power และ nitric oxide assay และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็เพิ่มขึ้นตาม	Ravi et al., 2013
<b>ฤทธิ์ต้านการอักเสบ</b>			
	สารสกัดน้ำของใบ	มีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง เมื่อทำการทดสอบในหนูแรทด้วย carrageenan-induced paw edema และ cotton pellet granuloma tests	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์</b>			
	สารสกัดเอทานอลของใบ	สารสกัดสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> และ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย agar disc diffusion method	Christy et al., 2018
	สารสกัดเอทานอล (absolute ethanol extract) ของดอก	สารสกัดต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>B. subtilis</i> โดยมี inhibition zone ขนาด 10.5 และ 12.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ด้วย agar disc diffusion method นอกจากนี้ยังมีค่า MIC ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>B. subtilis</i>	Samee et al., 2014

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ส่วนที่ใช้	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
		เท่ากับ 2,400 และ 9,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i> เท่ากับ 9,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	สารสกัดอีเทอร์ และสารสกัดเมทานอลของใบ	สารสกัดอีเทอร์มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>B. subtilis</i> ดีกว่าสารสกัดเมทานอล ด้วย agar disc diffusion method	Annapurna et al., 2003
	สารสกัดเฮกเซน สารสกัดเบนซีน สารสกัดไดเอทิลอีเทอร์ สารสกัดอะซิโตน สารสกัดเอทานอล สารสกัดเมทานอล และสารสกัดน้ำ	สารสกัดทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> และ <i>K. pneumonia</i> ด้วย agar disc diffusion method	Pulipati et al., 2012
	สารสกัด 70% เอทานอล สารสกัด 70% เมทานอล และสารสกัดน้ำของดอกและใบ	สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>P. aeruginosa</i> ด้วย agar disc diffusion method	Banerjee et al., 2014
	สารสกัดเมทานอลของใบ ดอก และลำต้น	สารสกัดทุกส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>B. cereus</i> , <i>S. pneumonia</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> และ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> แสดงค่า inhibition zone ในช่วง 6.7 to 11.3 มิลลิเมตร และมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 0.78 to 3.125 mg/mL	Marimuthu et al., 2014
	น้ำมันของใบ	มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> และ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) อยู่ในช่วง 50 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ด้วยวิธี broth microdilution	SE et al., 2018
<b>ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง</b>			
	สารสกัดของดอก	สามารถต้านมะเร็งเมื่อทดสอบในหนูไมซ์ที่เป็นมะเร็ง intraperitoneally	Dontha et al.,

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ส่วนที่ใช้	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
		transplanted Dalton's lymphoma (ascetic and solid tumours) and Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) ทำให้หนูมีชีวิตที่ยาวนานขึ้น	2015
	สารสกัดเอทานอลของผล, สารสกัดเฮกเซนของดอก, สารสกัดจากเมทานอล/น้ำที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของใบ, สารสกัดจากเฮกเซน:เอทิลอะซิเตต (1:1) ที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของใบ, สารสกัดจากเฮกเซนที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของใบ, สารสกัดจากเอทิลอะซิเตตที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของผล และสารสกัดจากคลอโรฟอร์มที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของผล	สารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เท่ากับ $-2.97 \pm 9.22$ , $21.47 \pm 5.44$ , $9.25 \pm 4.73$ , $7.49 \pm 5.16$ , $22.55 \pm 3.23$ , $-5.53 \pm 7.07$ , $94.93 \pm 0.74\%$ ตามลำดับ และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL60) เท่ากับ $1.27 \pm 3.86$ , $-25.64 \pm 9.33$ , $1.38 \pm 1.35$ , $32.25 \pm 9.39$ , $58.78 \pm 1.34$ , $18.83 \pm 5.74$ และ $92.97 \pm 2.39\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากคลอโรฟอร์มที่ partition จากสารสกัดเอทานอลของผลมีค่า $IC_{50}$ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL60) เท่ากับ $38.25$ และ $36.92 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ	da Silva, et al., 2016
	สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอลของดอก	สารสกัดเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ดีที่สุดโดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ $42.28 \pm 1.63 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามด้วยสารสกัดเมทานอล และสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ $73.50 \pm 3.22$ และ $119.47 \pm 4.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ	Haridass et al., 2012
<b>ฤทธิ์ถ่ายพยาธิ (Anthelmintic activity)</b>			
	สารสกัดของราก	สารสกัดคลอโรฟอร์มออกฤทธิ์ดีในการถ่ายพยาธิ <i>Pherituma posthuma</i> (พยาธิไส้เดือนอินเดีย) มากกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์	Dontha et al., 2015
	สารสกัดของดอก	สารสกัดเอทิลอะซิเตตออกฤทธิ์ดีที่สุดในในการถ่ายพยาธิ <i>Pherituma posthuma</i> (พยาธิไส้เดือนอินเดีย) มากกว่าสารสกัดเฮกเซน สารสกัดเอทานอล สารสกัดเมทานอลและสารสกัดน้ำ	Pulipati et al., 2012

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ส่วนที่ใช้	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
<b>ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด</b>			
	kaempferol และ luteolin	สามารถยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจนโดยมีค่า IC <sub>50</sub> เท่ากับ 3.55 and 2.56 µg/mL ตามลำดับ	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ต้านเชื้อลิชมาเนีย (Antileishmanial activity)</b>			
	สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอลของใบ	สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Leishmania donovani</i> (strain AG 83) ในระยะ promastigotes ด้วย <i>in vitro</i> promastigote cell toxicity assay โดยใช้ MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ต้านโรคหอบหืด (Anti-asthmatic activity)</b>			
	สารสกัดแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic extract)	สารสกัดขนาด 1,000 และ 1,500 mg/kg ช่วยลดการอักเสบของเซลล์โดยการกด eosinophil และยับยั้งแอรลิไฮโดรคาร์บอนรีเซพเตอร์ (AHR) ในหนูทดลอง (rat)	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์แก้อาการท้องเสีย (Anti-diarrhoeal activity)</b>			
	สารสกัดน้ำจากใบ และดอก	สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งอาการท้องเสีย เมื่อทดสอบในหนู (rat) ด้วยวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดอาการท้องเสียโดยใช้น้ำมันละหุ่ง, castor oil induced enteropooling และ charcoal meal test	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ (Hepatoprotective activity)</b>			
	สารสกัดเอทานอล	มีฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation อย่างมีนัยสำคัญ ในการทดสอบในหลอดทดลอง	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์สมานแผล (Wound healing activity)</b>			
	สารสกัดแอลกอฮอล์ของดอก	เมื่อทดสอบด้วย dead space wound model ในหนู (rat) พบว่าสารสกัดช่วยเพิ่มน้ำหนัก granuloma tissue, tensile strength, hydroxyl proline และ glycosaminoglycan content อย่างมีนัยสำคัญ	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจ (Cardioprotective activity)</b>			

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ส่วนที่ใช้	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
	สารสกัดเมทานอลของใบ	ทดสอบด้วย doxorubicin-induced cardiac toxicity ในหนู (rat) โดยการให้หนูรับประทานสารสกัด 1 สัปดาห์ ตามด้วยการให้ยา doxorubicin ร่วมกับสารสกัด 14 วันถัดไป ในวันที่ 22 บันทึกค่า hemodynamic parameters และ ค่า ECG รวมถึงการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของหัวใจ ได้ผลสรุปว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสามารถป้องกันโรคหัวใจได้	Dontha et al., 2015
	สารสกัดเมทานอลของดอก	ทดสอบด้วย doxorubicin-induced cardiac toxicity ในหนู (rat) โดยการให้หนูรับประทานสารสกัด 1 สัปดาห์ ตามด้วยการให้ยา doxorubicin ร่วมกับสารสกัด 14 วันถัดไป ในวันที่ 22 บันทึกค่า hemodynamic parameters และ ค่า ECG รวมถึงการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของหัวใจ ได้ผลสรุปว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกสามารถป้องกันโรคหัวใจได้	Momin et al., 2011
<b>ฤทธิ์ต้านกระเพาะอาหารอักเสบ (Anti-ulcer activity)</b>			
	สารสกัดของใบสด	มีฤทธิ์ต้านกระเพาะอาหารอักเสบใน pyloric ligation (PL) และ hypothermic-restraint stress (HRS) induced gastric ulcer models in Albino rats	Dontha et al., 2015
<b>ฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ประสาท (Neuroprotective activity)</b>			
	สารสกัดของใบ	ช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาท เมื่อทดสอบโดยกระตุ้นความเป็นพิษต่อระบบประสาทด้วย AlCl <sub>3</sub> และกระตุ้นความเป็นพิษต่อระบบประสาทด้วย 3-nitropropionic acid ในโมเดล albino rats	Dontha et al., 2015

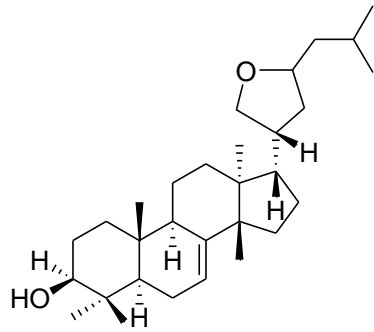


ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในต้นเข็ม

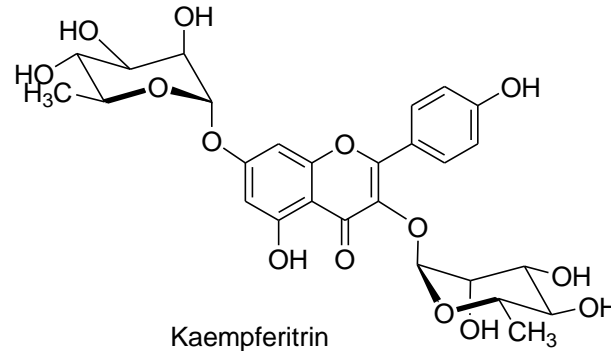
ส่วนที่ใช้	กลุ่มสาร	ชื่อสาร	วิธีการแยกสกัด	เอกสารอ้างอิง
-	alkaloids, glycoside, flavonoids, steroids, triterpenoids, tannins, saponins และ resins	-	การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น	Joshi et al., 2013
ดอก	alkaloids, glycosides, tannins, flavonoids, steroids และ carbohydrates	-	การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น	Pulipati et al., 2012
น้ำมันของดอก	องค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม triterpenes ตามด้วย monoterpenes, sesquiterpenes และ esters	มีสารทั้งหมด 54 ชนิด โดยองค์ประกอบหลักคือ ursolic acid; oleanolic: lupeol; geranyl acetate; linalyl acetate; neryl acetate, terpineol acetate; borneol acetate ethyl cinnamate; cyperene และ $\alpha$ -copaene	Gas chromatography	Obuzor et al., 2011
น้ำมันของใบ	hydrocarbons, alcohols, carboxylic acids, esters, aldehydes, ketones, sesquiterpenoids และ triterpenoids	มีสารทั้งหมด 43 ชนิด โดยองค์ประกอบหลักคือ Decane; linalool; malonic acid; 3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol และ heptadecanal	Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)	SE et al., 2018
ใบ	triterpenes	17 $\beta$ -dammara-12, 20-diene-3 $\beta$ -ol; $\beta$ -sitosterol;	-	Dontha et al.,

ส่วนที่ใช้	กลุ่มสาร	ชื่อสาร	วิธีการแยกสกัด	เอกสารอ้างอิง
		lupeol และ D-mannitol		2015
ดอกแห้ง	cycloartenol esters; lupeol fatty ester	lupeol; ursolic acid; oleanolic acid และ sitosterol	-	Dontha et al., 2015
สารสกัดเมทานอล	-	ixorapeptide I และ ixorapeptide II	-	Dontha et al., 2015
ใบ	alkaloid	camptothecin	RP-HPLC	Dontha et al., 2015
สารสกัดเอทานอลของ ราก	-	9,12-octadecadienoic acid; di-n-octyl phthalate; $\beta$ -amyrin; kaempferol-7-O-glucoside; kaempferitrin และ quercitrin	silica gel column chromatography	Joshi et al., 2013
สารสกัดเมทานอลของ ดอก	-	biochin A; myricetin; quercetrin; rutin; diadzein และ formononetin	HPLC, HPTLC and Gas Chromatography–Mass Spectrometry technique	Sumathy et al., 2011
ดอกสด	triterpenoids	Ixoroid; stigmast-5-en-3-O- $\beta$ -D-glucoside; 5-O- caffeoylquinic acid และ D-mannitol	vacuum liquid chromatography, preparative TLC และ silica gel column chromatography	Versiani et al., 2012
สารสกัดเฮกเซนของ ดอก	-	$\alpha$ - and $\beta$ -amyrin	silica gel column chromatography	da Silva, et al., 2016
สารสกัดเมทานอลจากราก และสารสกัด ปิโตรเลียมอีเทอร์ สาร สกัดคลอโรฟอร์ม สาร	-	gallic acid, pyrocatechol, catechin, chlorogenic acid, coumarin, <i>p</i> - coumaric acid, และ quercetin	HPLC	Muhammad et al., 2020

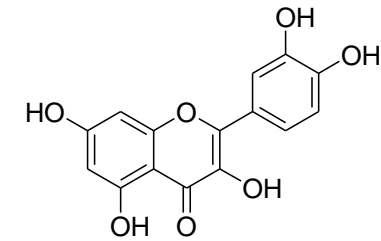
ส่วนที่ใช้	กลุ่มสาร	ชื่อสาร	วิธีการแยกสกัด	เอกสารอ้างอิง
สกัดเอทิลอะซิเตต ที่ ได้จากการแยกส่วน ของสารสกัดเมทานอล จากราก				



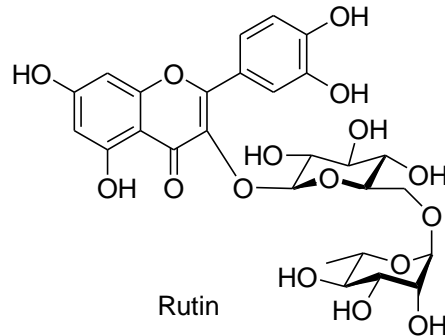
Ixoroid



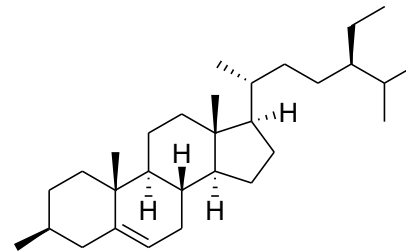
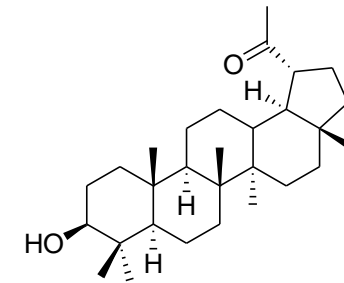
Kaempferitrin



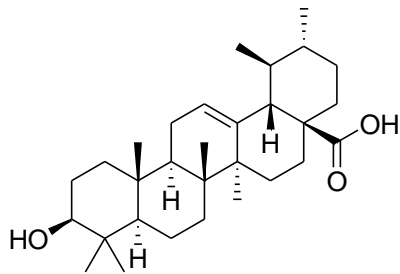
Quercitrin



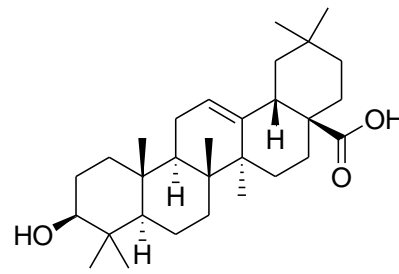
Rutin

 $\beta$ -Sitosterol

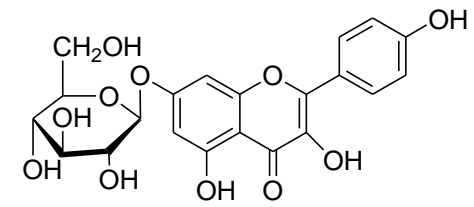
Lupeol



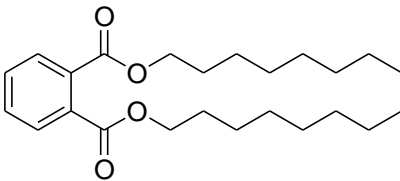
Ursolic acid



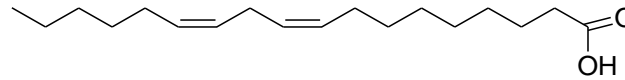
Oleanolic acid



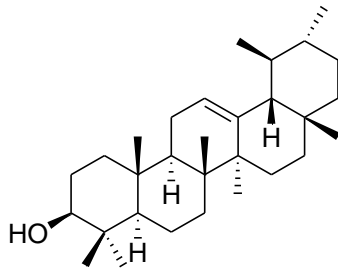
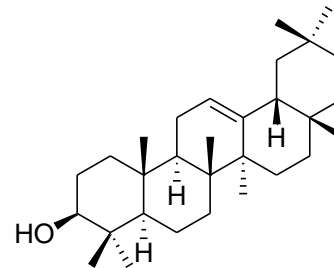
Kaempferol-7-O-glucoside



9,12-Octadecadienoic acid



Di-n-octyl phthalate

 $\alpha$ -Amyrin $\beta$ -Amyrin

รูปที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นเข็ม

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ประกอบด้วย

อุปกรณ์และสารเคมี	ผู้ผลิต
EtOH (Ar grade), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (AR grade), Ethyl acetate (AR grade), acetic acid (Ar grade) และ DMSO	RCI Labscan, Thailand
MeOH (Ar grade และ HPLC grade)	Honeywell, USA
Acetonitrile (HPLC grade)	Chem-Lab, Belgium
DPPH, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> และ Sephadex <sup>®</sup> LH-20	Sigma-Aldrich, USA
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox)	Aldrich, USA
Ascorbic acid	KemAus, Australia
Muller Hinton agar	Criterion, USA
DMEM, FBS และ MTT	Invitrogen, USA
TFA, TLC silica gel 60 F <sub>254</sub> (aluminium sheet 20 x 20 cm), TLC silica gel 60 RP-18 F <sub>254</sub> (aluminium sheet 20 x 20 cm) และ silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm) for column chromatography (70 – 230 mesh ASTM)	Merck, German
VertiSep <sup>™</sup> UPS C-18 HPLC Column (4.6 mm x 250 mm), 5 μm	Vertical Chromatography, Thailand

#### 3.2 เลือกตัวอย่างสารสกัดของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

เลือกตัวอย่างสารสกัดของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) ที่ดีที่สุดจากผลการวิจัยในโครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS) 2561A10803030 สัญญาเลขที่ 100/2561 (เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ และคณะ, 2564) ได้แก่ สารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดง

#### 3.3 การแยกส่วน (fraction) สารสำคัญจากสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ

##### 3.2.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

หาชนิด อัตราส่วนของ mobile phase และเลือกใช้ stationary phase ที่เหมาะสม เพื่อให้สารสำคัญแยกออกจากกันมากที่สุด สังเกตจุดของสารที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm (CAMAG<sup>®</sup> UV Cabinet 4, Lambda Scientific, Thailand) โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้ ได้แก่ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, EtOAc และน้ำ

3.2.2 ทำการแยกส่วน (fraction) ด้วย Sephadex LH-20 ด้วยคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.2 cm ความสูงของ Sephadex ที่ใช้ 55 cm ละลายสารสกัดหยาบด้วย MeOH และใช้ MeOH เป็น

mobile phase เก็บปริมาตรของแต่ละ fraction โดยการสังเกตสีของ band สารที่ปรากฏบนคอลัมน์ รวมถึงสีของ fraction ที่ได้

### 3.4 การทำสารให้บริสุทธิ์ และหาปริมาณสารสำคัญในพืชตัวอย่าง

ใช้เทคนิคทาง chromatography ได้แก่

#### 3.4.1 Preparative TLC กำหนดสภาวะการวิเคราะห์ ดังนี้

TLC plate : TLC silica gel 60 F254 (aluminium sheet 20 x 20 cm)

Mobile phase : EtOAc: MeOH 1:1 (acetic acid 1 หยด)

Solvent front : 18 cm

เครื่องตรวจวัด: UV cabinet (Spectroline® CM UV-viewing cabinet, Supelco, USA) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm

#### 3.4.2 High Performance liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu HPLC 20A, Shimadzu, Japan) กำหนดสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้

Column : C-18 HPLC Columns (4.6 mm x 250 mm), 5  $\mu$ m

อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง

อัตราการไหล : 2.5 mL/min

Injection volume : 20  $\mu$ L

Mobile phase : Acetonitrile (ACN):0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (50:50, 70:30, 100:0)

: MeOH: 0.1% TFA (50:50, 70:30, 100:0)

: MeOH: 0.1% TFA (40:60)

เครื่องตรวจวัด : UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 nm

### 3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) ด้วยเครื่อง Bruker Avance III HD 400 (Bruker, USA) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารด้วยวิธี reflectance โดยใช้อุปกรณ์ attenuated total reflectance (ATR) ของเครื่อง Nicolet 6700 FTIR (Fourier transform Infrared Spectroscopy) (Thermo Fisher Scientific, USA) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเทคนิค Mass spectrometry (MS) ด้วยเครื่อง Bruker Daltonic Esquire 3000 plus (Bruker, USA)

### 3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น

แบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบเป็น laboratory strain ที่มาจากสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และก่อนทำการทดสอบได้ทำการพิสูจน์เชื้อด้วยหลักการทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อ (identification) ของเชื้อ

#### 3.4.1 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion

ทำการทดสอบตามวิธีของ Bauer et al. (1966) โดยนำเชื้อจากโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ของ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ ใส่ลงใน normal saline solution (NSS) ให้มีความเข้มข้นเทียบเท่า Standard McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ด้วยเครื่อง McFarland Densitometer จากนั้นนำ cotton swap ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในหลอดที่มีเชื้อ นำเชื้อไปเพาะเลี้ยงบน Muller Hinton agar โดยระบายเชื้อประมาณ 4 - 5 ระบาย ให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงวางดิสก์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 50 และ 25  $\mu\text{g}$  พร้อมกับดิสก์ที่ใส่ DMSO 20  $\mu\text{L}$ , tetracycline 30  $\mu\text{g}$  และ chloramphenicol 30  $\mu\text{g}$  ที่ใช้เป็นตัวควบคุม โดยวางดิสก์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibitory zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

#### 3.4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี disc diffusion

ดำเนินการทดสอบตามวิธีของ Bauer et al. (1966) โดยนำเชื้อจากโคโลนีของเชื้อราบริสุทธิ์ ได้แก่ *C. albicans* ใส่ลงใน normal saline solution (NSS) ให้มีความเข้มข้นเทียบเท่า Standard McFarland No. 2 ( $1 - 2 \times 10^8$  CFU/mL) ด้วยเครื่อง McFarland Densitometer จากนั้นนำ cotton swap ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในหลอดที่มีเชื้อ นำเชื้อเพาะเลี้ยงบน Muller Hinton agar โดยระบายเชื้อประมาณ 4 - 5 ระบาย ให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงวางดิสก์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 50 และ 25  $\mu\text{g}$  พร้อมกับดิสก์ที่ใส่ DMSO 20  $\mu\text{L}$ , fluconazole 25  $\mu\text{g}$  และ itraconazole 10  $\mu\text{g}$  ที่ใช้เป็นตัวควบคุม วางดิสก์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibitory zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

(Jiangseubchatveera et al., 2017)

- 1) เตรียมสารละลาย 10  $\mu\text{M}$  DPPH ใน EtOH

- 2) เตรียมสารละลายของสารตัวอย่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันใน EtOH จำนวน 8 ความเข้มข้น
- 3) เติมสารละลายของสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นจำนวน 20  $\mu\text{L}$  ลงใน 96 – well plate แล้วเติม DPPH จำนวน 180  $\mu\text{L}$
- 4) ตั้งทิ้งในที่มืดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (Multi-mode microplate reader, FLUOStar Omega 2020, Germany)
- 5) คำนวณหาค่า % DPPH scavenging activity จากสมการ
 
$$\frac{(Ac-As)}{Ac} \times 100$$
 เมื่อ Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH และ As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
- 6) คำนวณหาค่า IC<sub>50</sub> (ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50%) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid และ Trolox

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) (anticancer activity) ด้วยวิธี MTT

วิธีการทดสอบนี้ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Manapradit et al. (2013)

#### 3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

- 1) ละลายสารตัวอย่างด้วย 100% DMSO (ให้ความเข้มข้นสูงสุดของ DMSO ไม่เกิน 1%)
- 2) กรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองสารขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  สำหรับใช้ในการทดสอบ
- 3) เจือจางด้วย DMEM ที่มี 10% FBS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

#### 3.6.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์

- 1) ปลูกเซลล์ไลน์ จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/mL ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  บ่มเซลล์ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> นาน 24 ชั่วโมง
- 2) หลังจากครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารออกจากแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ปริมาตร 100  $\mu\text{L}/\text{well}$
- 3) เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL, 10  $\mu\text{L}/\text{well}$  เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/mL จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> นาน 2 ชั่วโมง
- 4) ดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และเติมสารที่ละลายผลึก Formazan ในที่นี้ใช้ 100% DMSO ปริมาตร 100  $\mu\text{L}/\text{well}$
- 5) นำไปวัดค่า OD ที่ wavelength 550 nm (Multi-mode microplate reader, FLUOStar Omega 2020, Germany)
- 6) คำนวณค่า % Growth inhibition ของสารแต่ละชนิด โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Growth inhibition} = [(A - B)/A] \times 100$$



A = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่มีการให้สารตัวอย่าง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่เลี้ยงในสารที่ตัวอย่าง

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ในที่นี้ คือหลุมที่เติมสารละลาย 100% DMSO) มาหักลบออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 เลือกตัวอย่างสารสกัดของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

จากผลการวิจัยในโครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS) 2561A10803030 สัญญาเลขที่ 100/2561 (เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ และคณะ, 2564) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบ hexane, สารสกัดหยาบ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และสารสกัดหยาบ 95% EtOH ที่ได้จากการหมักส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบมะคังแดง ใบกระมอบ ใบหนามแห้ง และใบยอป่าจากจังหวัดสระแก้ว ใบและผลยอบ้าน และใบและดอกพุฒซ้อนจาก จังหวัดชลบุรี ใบและดอกเข็มแดง ใบและกิ่งกิ่งจากจังหวัดจันทบุรี ใบกระท่อมและใบหนามเค็ดจากจังหวัดตราด ใบและดอกเข็มขาวจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ใบและกิ่งขี้วัว ใบและกิ่งส้มกบจากจังหวัดระยอง ใบและกิ่งกระท่อมนา ใบและกิ่งกระท่อมเนินจากจังหวัดปราจีนบุรี รวมสารสกัดหยาบทั้งหมด 72 ชนิด เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ และเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans* ด้วยวิธี disc diffusion ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay และทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดงที่ความเข้มข้น 2 และ 1 mg/disc สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จุลชีพทั้ง 3 ชนิดให้ inhibition zone อยู่ในช่วง 8 – 16 mm ทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในบรรดาสารสกัดหยาบทั้งหมดซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.017 ± 0.002 mg/mL นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับโดยมีค่า %cytotoxicity เท่ากับ 36.98% จึงเลือกสารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดง มาทำการแยก fraction ของสารสำคัญต่อไป



รูปที่ 5 ภาพสารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดง

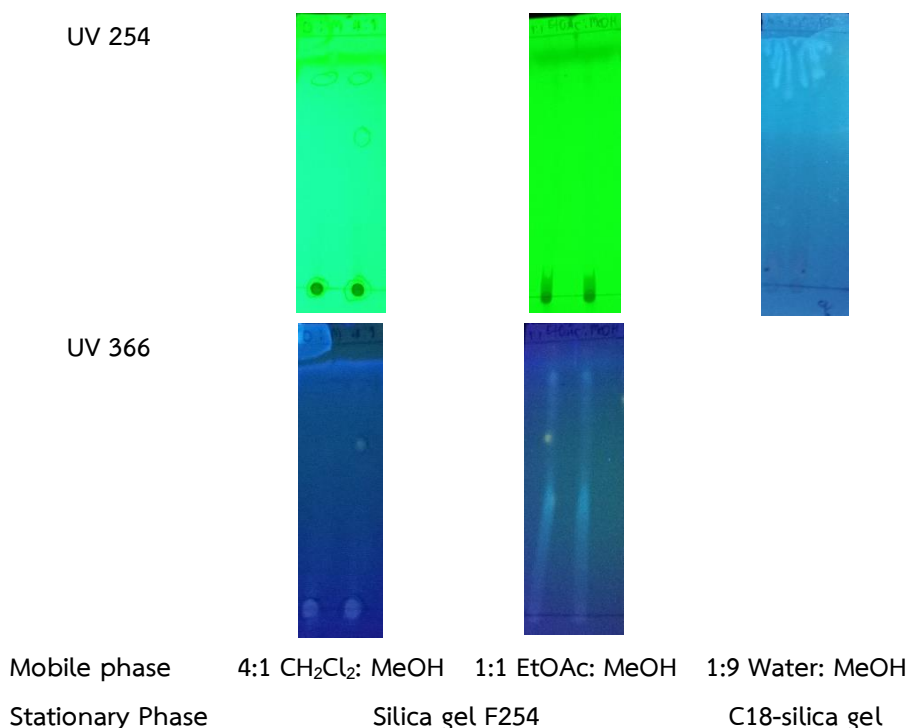
### 4.2 การแยกส่วน (fraction) ของสารสำคัญจากสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ

Thin Layer Chromatography (TLC) ละลายสารสกัดหยาบ 95% ethanol ของดอกเข็มแดง ด้วย EtOH หรือ MeOH นำมา spot บนแผ่น TLC ขนาด 2 x 7 เซนติเมตร แล้วจึงนำแผ่น TLC นี้ใส่ลงในแทงก์ที่อิมตัวด้วยระบบ mobile phase แต่ละสภาวะ ปิดฝาแทงก์ และรอให้สารเคลื่อนที่จนถึง solvent front จึงนำแผ่น TLC ออกจากแทงก์ รอจนแผ่น TLC แห้ง แล้วจึงตรวจสอบตรวจสอบสารที่

แยกออกมาด้วยการดูจุดของสารที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ดังแสดงผลในตารางที่ 5 พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการแยกสารคือ 1:1 EtOAc: MeOH

ตารางที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดหยาบด้วย TLC

Stationary Phase	Solvent ละลายสารสกัด	Mobile phase	ผลการทดลอง
Silica gel F <sub>254</sub>	EtOH	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	UV 254: สารไม่เคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น
		3:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : methanol (MeOH)	UV 254: สารบางส่วนเคลื่อนที่ออกไปแต่ยังมีสารติดที่จุดเริ่มต้น และเกิด tailing UV 366: สารแยกเป็น 2 จุด มีสีฟ้าด้านบนสุดและสีส้ม
		1:4 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	UV 254: สารเคลื่อนที่ออกไปพร้อมกันทั้งหมด เห็นเป็นจุดเดี่ยวด้านบนใกล้ solvent front และเกิด tailing
	MeOH	4:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	UV 254: สารไม่เคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น UV 366: สารแยกเป็น 2 จุด มีสีฟ้าด้านบนสุดและสีส้มตรงจุดเริ่มต้น
		1:1 EtOAc: MeOH	UV 254: สารบางส่วนเคลื่อนที่ออกไปแต่ยังมีสารติดที่จุดเริ่มต้น และเกิด tailing UV 366: สารแยกเป็น 2 จุด มีสีฟ้า แต่เกิด tailing
C18-silica gel	MeOH	100% MeOH	สารเคลื่อนที่ออกไปพร้อมกันทั้งหมด เห็นเป็นจุดเดี่ยวด้านบนใกล้ solvent front มีบางส่วนเหลืออยู่ที่จุดเริ่มต้น และเกิด tailing
		100% Water	สารไม่เคลื่อนที่ติดอยู่ที่จุดเริ่มต้น
		1:9 Water: MeOH	สารเคลื่อนที่ออกไปพร้อมกันทั้งหมด ขึ้นไปใกล้ solvent front แต่ระยะห่างจาก solvent front มากกว่า 100% MeOH มีบางส่วนเหลืออยู่ที่จุดเริ่มต้น และเกิด tailing



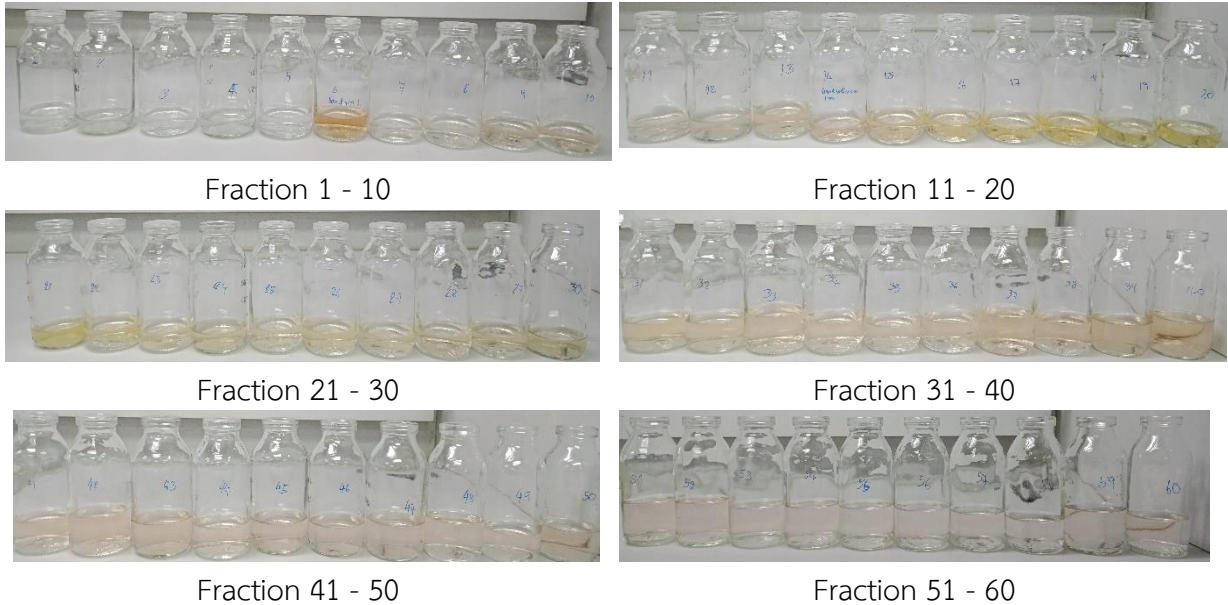
รูปที่ 6 ตัวอย่างการแยกสารในสภาวะต่าง ๆ

เนื่องจากสารสกัดมีขี้ผึ้งจึงมีโอกาสดูดซับในคอลัมน์หากแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งระบบ normal phase และ reversed phase จึงเลือกใช้ Sephadex<sup>®</sup> LH-20 มาใช้ในการแยกสาร โดยโหลดสารสกัดปริมาณ 1.29 g ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.2 cm บรรจุ Sephadex<sup>®</sup> ให้มีความสูง 55 cm และใช้ MeOH เป็น mobile phase สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 60 fractions ดังแสดงใน

รูปที่ 7 และเก็บปริมาตรของแต่ละ fraction จากสีของ band สารที่ปรากฏบนคอลัมน์ ดังแสดงในตารางที่ 6 สารละลายแต่ละ fraction ที่ได้ มีสีโทนชมพูอมส้มจนถึงสีเหลืองเข้ม

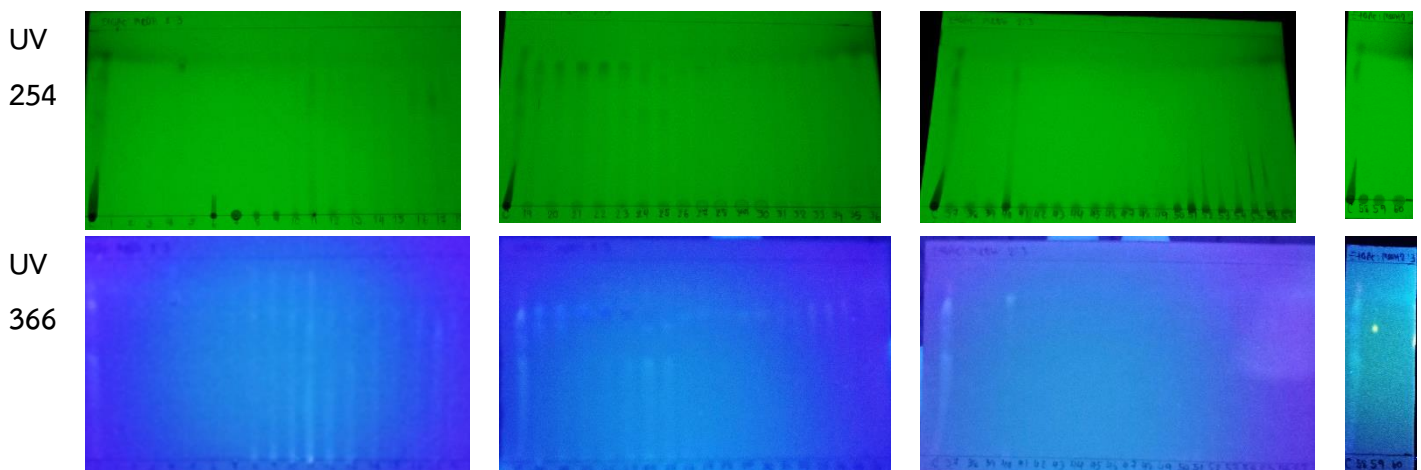
ตารางที่ 6 การเก็บ fraction ที่ได้จากการแยกสารด้วย Sephadex<sup>®</sup> LH-20

Fractions	ปริมาตร/fraction (mL)
1 - 30	20
31 -50	30
51 - 60	50

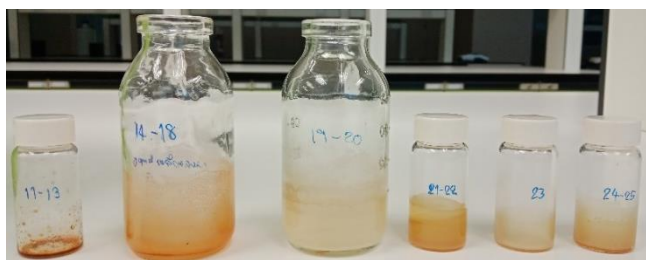


รูปที่ 7 Fractions ที่แยกได้จาก Sephadex® LH-20

พบว่ายังมีสารติดอยู่บน Sephadex® แม้ว่าจะชะด้วย MeOH ก็ไม่สามารถนำสารออกมาได้ทั้งหมด ในการรวม fraction โดยการดู spot บนแผ่น TLC Silica gel F<sub>254</sub> ด้วยระบบ EtOAc: MeOH 2:3 สังเกตจำนวนสารที่แยกได้ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ได้ทั้งหมด 17 fractions (รูปที่ 8 และตารางที่ 7) เมื่อทำให้แห้งพบว่า 6 fractions ให้สารละลายสีน้ำตาลขุ่น หรือมีตะกอนสีเหลือง ดังรูปที่ 9 ซึ่งมีแนวโน้มสามารถตกผลึกได้ จึงทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกดังแสดงใน ตารางที่ 7 แต่พบว่าไม่มีสภาวะใดที่สามารถตกผลึกสารได้ พบเพียงตะกอนละเอียดขนาดเล็กที่มีความเบา สามารถกระจายในสารละลายได้



รูปที่ 8 การรวม fraction ด้วยสภาวะ Mobile phase: EtOAc: MeOH 2:3



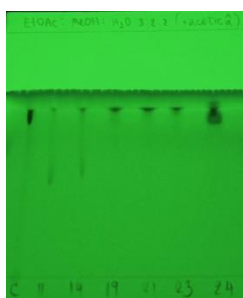
รูปที่ 9 Fraction ที่นำมาทดสอบการตกผลึก

ตารางที่ 7 การรวม fractions และการทดสอบการตกผลึก

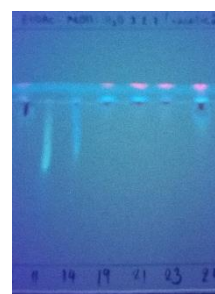
Fractions ที่ได้จากระบบ EtOAc: MeOH 2:3	การทดสอบการตกผลึก*
1 – 3	-
4 – 5	-
6	-
7	-
8 – 10	-
11 – 13	สารละลายสีน้ำตาลขุ่น หรือมีการตกตะกอน
14 – 18	สีเหลือง ระเหย solvent จนแห้ง
19 – 20	- เติม MeOH ลงไป ไม่สามารถละลายสาร
21 – 22	กลับมาได้ทั้งหมด นำไป sonication พบว่า
23	สารละลาย ได้หมด ตั้งทิ้งไว้เริ่มเกิดตะกอน จึง
24 – 25	นำไปแช่เย็น เพื่อดูการตกผลึก 1 คืน ไม่เกิดการ ตกผลึก และปริมาณของตะกอนไม่เพิ่มขึ้น - เติม $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ และ hexane ไม่สามารถ ละลายสารได้ทั้งหมด ไม่ว่าจะให้ความร้อน หรือ sonication - เติม EtOAc จะละลายสารได้สารละลายสี น้ำตาล ไม่ช่วยให้เกิดการตกผลึก
26 – 30	-
31 – 36	-
37 – 39	-
40	-
41 – 50	-
51 – 60	-

\*ไม่ได้ทดสอบ หรือไม่ได้รวม fraction ด้วยระบบดังกล่าว

นำทั้ง 6 fractions (fractions 11-13, 14-18, 19-20, 21-22, 23 และ 24-25) ที่น่าสนใจมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร บนแผ่น TLC Silica gel F<sub>254</sub> โดยใช้ mobile phase EtOAc: MeOH: water 3:2:2 และเติม acetic acid 2 หยด ต่อ mobile phase 3 mL ดังแสดงในรูปที่ 10 เริ่มมีสารแยกออกจากกันได้เพิ่มขึ้น แต่ขั้วค่อนข้างสูงเกินไป ลองปรับลดความเข้มข้นของระบบลงเป็น EtOAc: MeOH 3:2 ปรากฏว่าสารส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น เมื่อปรับเพิ่มขั้วของระบบขึ้นมาเป็น EtOAc: MeOH 1:1 ปรากฏว่าสารมีการเคลื่อนที่แยกได้ดีขึ้น แต่เกิด tailing จึงเติม acetic acid ลงไป 1 หยด ในระบบ EtOAc: MeOH 1:1 (รูปที่ 10) การเกิด tailing ลดลง จึงเลือกระบบนี้มาใช้แยกสารสำคัญด้วย preparative TLC ต่อไป น้ำหนักของสารที่ได้แสดงในตารางที่ 8



UV 254



UV 366

Mobile phase: EtOAc: MeOH: water 3:2:2 (acetic acid 2 หยด/mobile phase 3 mL)



UV 254



UV 366

Mobile phase: EtOAc: MeOH 1:1 (acetic acid 1 หยด)

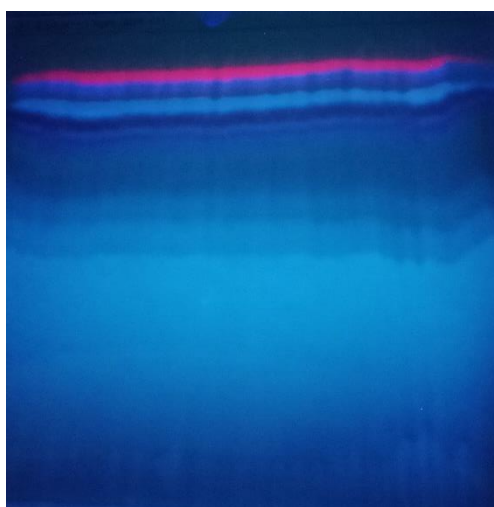
รูปที่ 10 การรวม fractions ที่น่าสนใจในสภาวะต่าง ๆ

## ตารางที่ 8 น้ำหนักของแต่ละ fractions ที่น่าสนใจ

Fractions	น้ำหนัก (mg)
11 – 13	280
14 –18	210
19 – 20	120
21 – 22	110
23	80
24 – 25	110

### 4.3 การทำสารให้บริสุทธิ์ และหาปริมาณสารสำคัญในพืชตัวอย่าง

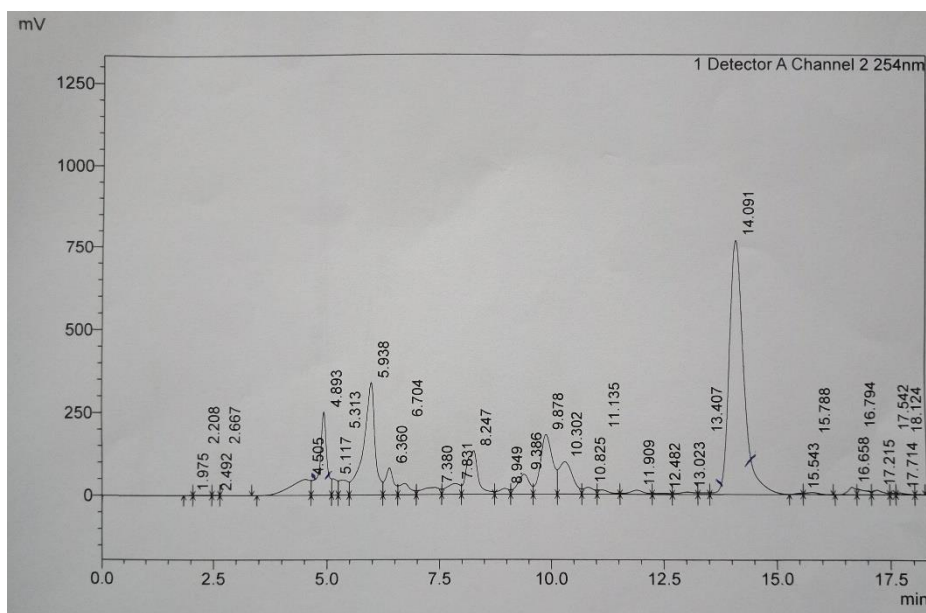
**4.3.1 Preparative TLC** นำ fraction ที่ 23 มาละลายด้วย MeOH แล้วนำมา spot เป็นแถบกว้าง ประมาณ 0.3 mm ยาวประมาณ 19 cm ลงบน TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (aluminium sheet 20 x 20 cm) ใช้ระบบ mobile phase: EtOAc: MeOH 1:1 (acetic acid 1 หยด) ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ 18 cm และตรวจสอบแถบสารที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm พบว่ามีแถบสารมีสีเกิดขึ้นทั้งหมด 5 แถบจาก UV 366 nm (แถบสีแดง, สีฟ้า, สีเขียว, สีน้ำเงินทึบแสง และสีน้ำเงิน) (รูปที่ 11) ตัดแต่ละแถบสี และจุด silica gel ของแต่ละแถบสี เพื่อนำมาสกัดสารสำคัญด้วย 80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH เมื่อระเหยตัวทำละลายออกและทำให้แห้ง ได้สารสำคัญปริมาณน้อยมาก (10, 20, 10, <10, <10 และ 20 mg ตามลำดับ) ลักษณะทางกายภาพของสารที่ได้ พบว่าแถบสีแดงและสีฟ้า มีลักษณะเป็นของแข็งขนาดเล็กสีขาว แถบสีเขียวเป็นของแข็งคล้ายเข็มสีขาวปนกับคราบสารสีขาว แถบสีน้ำเงินทึบแสงเป็นของแข็งคล้ายเข็มสีขาวปริมาณมากปนกับสารสีน้ำตาล และแถบสีน้ำเงินเป็นคราบสารสีขาวปนกับสารสีน้ำตาล



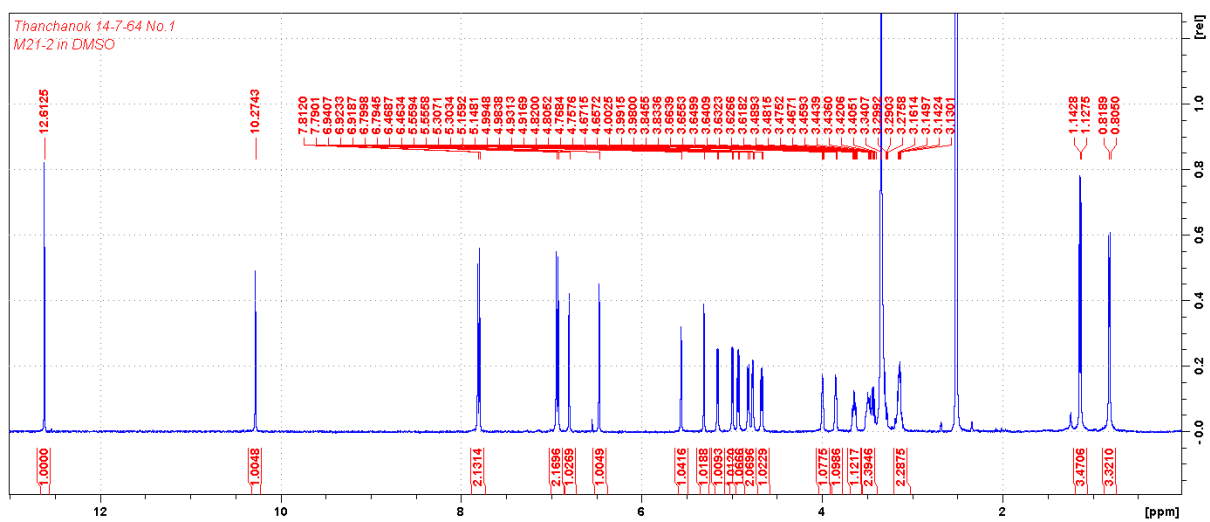
รูปที่ 11 Preparative TLC ของ Fraction 23 ภายใต้ UV 366 nm



4.3.2 HPLC คอลัมน์ที่ใช้เป็น C-18 มาในการหาสถานะที่เหมาะสมในการแยกสาร fraction 21 – 22 เริ่มต้นจากระบบ gradient ด้วย ACN:0.1% TFA 50:50 , 70:30 และ 100:0 ตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 nm พบว่าสารแยกออกจากกันไม่ได้ จึงเปลี่ยนเป็นระบบ gradient ด้วย MeOH: 0.1% TFA (50:50, 70:30, 100:0) พบว่าสารแยกออกจากกันได้ดีขึ้น peak สารมีความคมชัด จึงใช้ระบบนี้แยกสารโดยกำหนดระบบ isocratic ที่ 0 – 10 นาที MeOH: 0.1% TFA 50:50, 10 – 15 นาที MeOH: 0.1% TFA 70:30 และ 15 – 20 นาที MeOH: 0.1% TFA 100:0 (รูปที่ 12) เก็บสารสำคัญที่ออกจากคอลัมน์ในนาที่ที่ 4.9 และ 14 นาที (fraction M21\_1 และ M21\_2) และได้ส่งพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย  $^1\text{H-NMR}$  (รูปที่ 13) พบว่า fraction M21\_2 มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีปริมาณ 4.8 mg



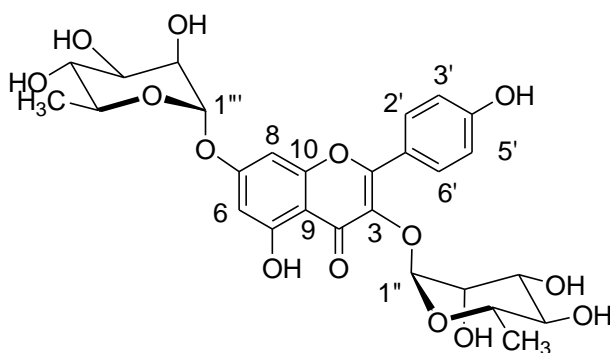
รูปที่ 12 Chromatogram ของ fraction 21 – 22



รูปที่ 13  $^1\text{H-NMR}$  ของ M21\_2

#### 4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์

สาร M21-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวนวล มีเลขมวลโมเลกุล  $m/z$   $[M+1]^+$  579.2 ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุล  $C_{27}H_{30}O_{14}$  วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR พบสัญญาณ O-H stretching ที่หมายเลขคลื่น  $3370\text{ cm}^{-1}$  C=O stretching ที่หมายเลขคลื่น  $1691\text{ cm}^{-1}$  C=C stretching ของวงอะโรมาติกที่  $1658\text{ cm}^{-1}$  และ C-O stretching ที่หมายเลขคลื่น  $1203\text{ cm}^{-1}$  จากข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร M21-1 มีค่า chemical shift ตรงกับสาร kaempferitrin ที่มีรายงานก่อนหน้านี้โดย (Valente et al., 2009) (ตารางที่ 9) จึงสรุปได้ว่าสาร M21-2 คือสาร kaempferitrin (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ Kaempferitrin

ตารางที่ 9  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR และ HMBC ของสาร M21-2 ในตัวทำละลาย DMSO- $d_6$  จากสารสกัดหยาบ 95% EtOH ดอกเข็มแดง เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง

ตำแหน่ง	$\delta_{\text{exp}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )			$\delta_{\text{lit}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Valente, L.M., et al (2009))	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMBC (C→H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
2	158.3		7.79	157.8	
3	135.0		5.30	134.5	
4	178.4			178.0	
5	161.4		12.61	160.9	
5-OH		12.61 (s)			
6	99.9	6.46 (d, $J$ 2.13 Hz)	12.61	99.4	d 6.46 (d, $J$ 2.4 Hz)
7	162.2		5.55, 6.46, 6.79	161.7	
8	95.1	6.79 (d, $J$ 2.12 Hz)	6.46	94.6	6.79 (d, $J$ 2.0 Hz)
9	156.6		6.79	156.1	

ตำแหน่ง	$\delta_{\text{exp}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )			$\delta_{\text{lit}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Valente, L.M., et al (2009))	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMBC (C→H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
10	106.3		6.46, 12.61	105.8	
1'	120.8			120.7	
2'	131.2	7.79 (dd, $J=8.73, 1.88$ Hz)		130.7	7.80 (d, $J=8.8$ Hz)
3'	115.9	6.93 (dd, $J=8.73, 1.88$ Hz)	6.93, 10.28	115.4	6.93 (d, $J=8.8$ Hz)
4'	160.6		6.93, 10.28		
4'-OH		10.28 (s)			
5'	115.9		6.93, 10.28	115.4	6.93 (d, $J=8.8$ Hz)
6'	131.2	7.79 (dd, $J=8.73, 1.88$ Hz)		130.7	7.80 (d, $J=8.8$ Hz)
1''	102.3	5.30 (d, $J=1.59$ Hz)		101.9	5.30 (d, $J=1.6$ Hz)
2''	70.6	3.99 m		70.0	3.99 (dd, $J=1.6, 3.2$ Hz)
2''-OH		4.99 (s)			
3''	71.2	3.48 m		70.3	3.47 (dd $J=3.2, 8.8$ Hz)
3''-OH		4.66 (s)			
4''	71.6			71.1	3.15 (t, $J=8.8$ Hz)
4''-OH		4.76 (s)			
5''	70.5	3.13 (m)		70.7	3.13 (m)
5''-CH <sub>3</sub>	18.4	0.82 (d, $J=5.65$ Hz)		17.9	0.81 (d, $J=5.6$ Hz)
1'''	98.9	5.55 (d, $J=1.59$ Hz)	5.15	98.4	5.56 (d, $J=1.6$ Hz)
2'''	70.3	3.85 (m)		69.8	3.84 (dd, $J=1.6, 3.4$ Hz)
2'''-OH		5.15 (s)			
3'''	70.7	3.64 (m)	5.55	70.2	3.64 (dd, $J=3.4, 9.2$ Hz)
3'''-OH		4.82 (s)			
4'''	72.1	3.29 (m)	1.31	71.6	3.31 (t, $J=9.2$ Hz)

ตำแหน่ง	$\delta_{\text{exp}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )			$\delta_{\text{lit}}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Valente, L.M., et al (2009))	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMBC (C→H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
5''	70.8	3.44 (m)		70.0	3.43 (m)
5''-	17.8	1.31 (d, $J=6.61$ Hz)		17.5	1.13 (d, $J=6.4$ Hz)

Kampferitrin (kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside) เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ kaempferol โดยมีกระบวนการชีวสังเคราะห์มาจาก phenylpropanoid (Zhao et al., 2014) จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบการแยกสาร kampferitrin ได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Bauhinia forficata*, *Pterogyne nitens*, *Sedum dendroideum* (Calderón-Montaño et al., 2011), *Hedyotis verticillate* (Hamzah et al., 1994), *Ixora Coccinea* (Joshi et al., 2013), *Arabidopsis thaliana*, *Bahuinia forficata*, *Chromolaena subscandens*, *Dryopteris crassirhizoma*, *Epimedium acuminatum*, *Epimedium acuminatum*, *Justicia spicigera*, *Lotus corniculatus*, *Pterogyne nitens*, *Sedum dendroideum* และ *Uncaria guianensis* (Ramos-Hernández et al., 2017) เป็นต้น

สำหรับต้นเข็มแดงพบ kaempferitrin เป็นองค์ประกอบของรากที่สกัดด้วยเอทานอล (Joshi et al., 2013) ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้ นับเป็นครั้งแรกที่ค้นพบ kaempferitrin ในดอกเข็มแดงที่สกัดด้วยเอทานอล การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ kaempferitrin มากมายพบว่ามีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านอาการซึมเศร้า ต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Ramos-Hernández et al., 2017; Patel, 2021) โดยฤทธิ์ที่เด่นที่สุดจะเป็นฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยสารจะออกฤทธิ์คล้ายกับอินซูลิน สามารถใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน และอาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Patel, 2021)

#### 4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ของ kaempferitrin ด้วยวิธี disc diffusion และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) ที่ปรากฏเป็น clear zone ซึ่งผลการทดสอบแสดงค่า inhibition zone (mm) ของสารแต่ละความเข้มข้น ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) เทียบกับสารมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า kaempferitrin ที่ความเข้มข้น 100, 50 และ 25  $\mu\text{g}/\text{disc}$  ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. Albicans* ได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า kaempferitrin ที่แยกได้จากสารสกัดเอทิลอะซิเตตที่มาจากสารสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบเมทานอลส่วนลำต้นของ *Bryophyllum pinnatum* (Lank.) Oken สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 32, 32 และ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ และมีค่า MMC เท่ากับ 32, 64 และ 64 ตามลำดับ (Tatsimo et al., 2012) ในการวิจัยครั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าความ

เข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบมีค่าน้อยเกินไป หากเพิ่มความเข้มข้นในการทดสอบอาจพบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่เป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้านี้

ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของ kaempferitrin

ชื่อสาร	ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) ที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์								
	<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>C. albicans</i>		
	100	50	25	100	50	25	100	50	25
Kaempferitrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NSS 0.85% <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) <sup>a</sup>	28.33 $\pm$ 2.08			13.67 $\pm$ 2.52			-		
Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) <sup>a</sup>	24.00 $\pm$ 2.00			-			-		
Fluconazole (25 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) <sup>a</sup>	-			-			27.00 $\pm$ 1.73		
Itraconazole (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) <sup>a</sup>	-			-			18.67 $\pm$ 0.58		

\*แสดงค่าเป็น inhibition zone หน่วยเป็น mm; - คือ No inhibition zone: เส้นผ่านศูนย์กลางของดิสก์เท่ากับ 6 mm; ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง; <sup>a</sup>Controls

#### 4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) และทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging โดยวัดผลการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยารีดักชัน ที่เปลี่ยน DPPH radical เป็น DPPH-H ที่ความยาวคลื่น 520 nm พบว่า kaempferitrin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $0.54 \pm 0.02$  mg/mL ซึ่งยังมีค่า  $\text{IC}_{50}$  สูงกว่า controls คือ ascorbic acid และ trolox ดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 11 ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า kaempferitrin ที่แยกได้จากส่วนทั้งต้นของ *Bryophyllum pinnatum* (Lank.) Oken มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $8.73 \pm 0.51$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tatsimo et al., 2012) และยังพบว่า kaempferitrin ที่แยกได้จากส่วนใบของ *Bauhinia forficata* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่สูง โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $84 \pm 7.8$   $\mu\text{M}$  (de Sousa et al., 2004) นั้นแสดงว่า kaempferitrin เป็นสารสำคัญหนึ่งในสารสกัดยาสูบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดงที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมักนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระในร่างกายที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค และอาการที่สำคัญต่าง ๆ เช่น การเกิดริ้วรอย มะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น kaempferitrin จากดอกเข็มแดงอาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือการพัฒนาใหม่ต่อไป

**ตารางที่ 11** ตารางแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ (HepG2) ของ kaempferitrin

สาร	DPPH <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Anticancer activity <sup>a</sup> (% Growth inhibition)
Kaempferitrin	0.54 ± 0.02	16.29 ± 6.69
Ascorbic acid <sup>b</sup>	0.0036 ± 0.0004	-
Trolox <sup>b</sup>	0.0054 ± 0.0003	-

<sup>a</sup>ทำซ้ำ 3 ครั้ง; <sup>b</sup>Controls; NA = No activity at test concentrations

สำหรับฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ของ kaempferitrin ด้วยวิธี MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 63 µg/mL สามารถต้านเซลล์มะเร็งตับโดยมีค่า % growth inhibition เท่ากับ 16.29 ± 6.69% (ตารางที่ 11) ดังนั้น kaempferitrin จึงเป็นสารสำคัญหนึ่งในสารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดงที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ และผลการวิจัยครั้งนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของ kaempferitrin ด้วยวิธี MTT ในเซลล์หลายชนิด ได้แก่ MDA-MB-231 (มะเร็งเต้านม), HeLa (มะเร็งปากมดลูก), SKOV-3 (มะเร็งรังไข่), DU-145 (มะเร็งต่อมลูกหมาก), HepG2 (มะเร็งตับ), SW-480 (มะเร็งลำไส้ใหญ่) เทียบกับยา paclitaxel และ cisplatin พบว่า kaempferitrin สามารถต้านเซลล์ HeLa ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 45 µM สำหรับเซลล์ HepG2 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 85 µM ซึ่งออกฤทธิ์ด้อยกว่ายามาตรฐาน (Alonso-Castro, et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า kaempferitrin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) ที่ขนาด 30 µM ทั้งยังกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผ่านกลไก PI3K/AKT signaling pathway (Govindarasu et al., 2002) ทั้งนี้สาร kaempferitrin จากดอกเข็มแดงในขนาดความเข้มข้นที่สูงขึ้นอาจมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาจนำมาเป็นเป้าหมายในการพัฒนารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบ 95% EtOH ของดอกเข็มแดงที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ เมื่อนำมาแยก fractions เพื่อหาค่าประเภทของสารสำคัญด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ preparative TLC และ HPLC ได้สารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์น้ำหนัก 4.8 mg เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่าเป็น kaempferitrin ซึ่งเป็นครั้งแรกที่ค้นพบสารนี้ในดอกเข็มแดง ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ พบว่า kaempferitrin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบต่ำเกินไป แต่พบว่า kaempferitrin มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.54 \pm 0.02$  mg/mL และยังต้านเซลล์มะเร็งระดับโดยมีค่า %growth inhibition เท่ากับ  $16.29 \pm 6.69\%$  ที่ความเข้มข้น  $63 \mu\text{g/mL}$  จากผลการวิจัยครั้งนี้ก็สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ว่า kaempferitrin เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการค้นพบว่าดอกเข็มแดงสามารถใช้เป็นแหล่งของสารสำคัญจากธรรมชาติแหล่งหนึ่งที่จะนำมาสกัดแยก kaempferitrin ไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือยาใหม่ต่อไป

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

- ควรสกัดแยกสาร kaempferitrin เพิ่มปริมาณด้วยวิธีการอื่น ๆ เช่น reversed phased column chromatography เพื่อให้ได้ปริมาณสารมากพอที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* และอาจทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่เป็นปัญหาสำคัญในงานสาธารณสุข ประเทศไทย
- ควรทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ABTS assay, FRAP assay, ORAC assay เป็นต้น และอาจหากลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติม
- ควรทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่สำคัญชนิดอื่น ๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น
- ควรทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่พบจากรายงานวิจัยก่อนหน้า เช่น ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น
- ควรแยกสารสำคัญอื่น ๆ เพิ่มเติมที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในดอกเข็มแดง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

## บทที่ 6 ผลผลิต

1. ได้ทราบองค์ประกอบสารสำคัญในดอกเข็มแดง
2. ได้ทราบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ ของ kaempferitrin ที่แยกได้จากดอกเข็มแดง
3. ได้ทราบว่าวิธีการสกัดแยก kaempferitrin จากดอกเข็มแดง
4. นำผลงานวิจัยไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง (Peer Review) ในระดับชาติหรือนานาชาติ



## รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS) 59327 สัญญาเลขที่ 5.6/2562  
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์รูเปียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) เนตรชนก เจียงสีบชาติวีระ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 31 ก.ย. 2564 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 31 มี.ค. 2565

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี 5 เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ต.ค. 2561

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	267,660	บาท	เมื่อวันที่ 11 ม.ค. 2562
งวดที่ 2 (40%)	.....	บาท	เมื่อวันที่.....
งวดที่ 3 (10%)	.....	บาท	เมื่อวันที่.....
<b>รวม</b>	<b>267,660</b>	<b>บาท</b>	

### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	40,000	0	40,000
2. ค่าจ้าง	90,000	45,000	45,000
3. ค่าวัสดุ	229,320	148,660	80,660
4. ค่าใช้สอย	174,000	74,000	100,000
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (ไปรตระบุเป็นข้อย่อย)			
6.1 ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	59,480	29,740	29,740
6.2 ค่าสาธารณูปโภค	2,000	0	2,000
<b>รวม</b>	<b>594,800</b>	<b>297,400</b>	<b>297,400</b>

(ศาสตราจารย์ ดร.เนตรชนก เจียงสีบชาติวีระ)  
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

## เอกสารอ้างอิง

เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ, สมาวดี เปลี่ยนวงษ์, มารุต ตั้งวัฒนาชุติพร และเหมรัมย์ วชิรหัตถพงษ์. (2564). *ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์รูเบียซีอีในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย* (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข. (2555). เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ วิกฤตและทางออก, *HSRI Forum*, 1(1), 3–6.

ราชันย์ ภูมา. (2559). *สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ): เกล็ดพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา*. กรุงเทพฯ: สำนักหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยมหิดล. (n.d.). *เข็มแดง*.

<https://il.mahidol.ac.th/e->

[media/plants/webcontent3/interactive\\_key/key/describ/kemdaeng.htm](https://il.mahidol.ac.th/e-media/plants/webcontent3/interactive_key/key/describ/kemdaeng.htm)

สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. (n.d.). *เข็มแดง*.

[https://pttherbgarden.pttplc.com/herb\\_detail.aspx?herb=qBcTbHX1z5UCeL2LHq3%2bA%3d%3d](https://pttherbgarden.pttplc.com/herb_detail.aspx?herb=qBcTbHX1z5UCeL2LHq3%2bA%3d%3d)

Alonso-Castro, Á. J., Ortiz-Sánchez, E., García-Regalado, A., Ruíz, G., Núñez-Martínez, J. M., González-Sánchez, I., Quintanar-Jurado, V., Morales-Sánchez, E., Domínguez, F., López-Toledo, G., Cerbón, M., & García-Carrancá, A. (2013). Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *Journal of ethnopharmacology*, 145(2), 476–489.

Al-Qurainy, F., AR, Z. G., Khan, S., Nadeem, M., Tarroum, M., Alaklabi, A., & Thomas, J. (2013). Antibacterial activity of leaf extract of *Breonadia salicina* (Rubiaceae), an endangered medicinal plant of Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 3212–3219.

Annapurna, J., Amarnath, P., Amar Kumar, D., Ramakrishna, S., & Raghavan, K.V. (2003). Antimicrobial activity of *Ixora coccinea* leaves. *Fitoterapia*, 74, 291–293.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493–496.

Calderón-Montaña, J. M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298–344.

Christy, A. O., Temitope, O. O., & Bamidele, A. (2018). Antimicrobial activity, chemical compositions and proximate analysis of *Ixora coccinea* L. leaves on some clinical pathogens. *International Journal of Current Research*, *10*(08), 72555–72561.

Conserva, L. M., & Ferreira, J.C. Jr. (2012). Borreria and Spermaceae species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. *Pharmacognosy Reviews*, *6*(11), 46–55.

da Silva, T. B., Costa, C. O., Galvão, A. F., Bomfim, L. M., Rodrigues, A. C., Mota, M. C., Dantas, A. A., Dos Santos, T. R., Soares, M. B., & Bezerra, D. P. (2016). Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*:199.

de Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T. B., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., & Silva, F. R. (2004). Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-*O*-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, *67*(5), 829–32.

Dontha, S., Kamurthy, H., Mantripragada, B.R., & Reddy, M.M. (2015). Phytochemical and Pharmacological Profile of *Ixora*: a Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *6*(2), 567–584.

Govaerts, R., Frodin D. G., Ruhsam, M., Bridson, D. M., & Davis, A. P. (2007). World Checklist & Bibliography of Rubiaceae. The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/compilersReviewers.do>

Govindarasu, M., Abirami, P., Rajakumar, G., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Aba Alkhalil, F. F., Aloliqi, A. A., Thiruvengadam, M., & Vaiyapuri, M. (2022). Kaempferitrin inhibits colorectal cancer cells by inducing reactive oxygen species and modulating PI3K/AKT signalling pathway. *Process Biochemistry*, *116*, 26–37.

Hamzah, A. S., Lajis, N. H., Sargent, M. V. (1994). Kaempferitrin from the leaves of and its biological activity. *Planta Medica*, *60*(4), 388–389.

Haridass, S., Sekar, S., Vijayan, R., Jayakumar, S., Thimizarasu, S., Krishnamurthy, V.M., & Chidambaram, S.B. (2012). Relative antioxidant and cytotoxic activities of *Ixora coccinea* flower extracts. *Journal of Pharmacy Research*, *5*(3), 1403–1408.

Ito, A., Lee, Y. H., Chai, H. B., Gupta, M. P., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. (1999). 1',2',3',4'-Tetrahydrodehydroxylated tubulosine, a Cytotoxic Alkaloid from *Pogonopus speciosus*. *Journal of Natural Products*, *62*, 1346–1348.

Jiangseubchatveera, N., Liawruangrath, S., Teerawutgulrag, A., Santiarworn, D., Pyne, S. G., & Liawruangrath, B. (2017). Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. *Chiang Mai Journal of Science*, 44(1), 193–202.

Joshi, A. B., Surlikar, P. M., & Bhoobe, M. (2013). *Ixora coccinea* Linn: phytochemical investigation. *International journal of research in pharmacy and chemistry*, 3(3), 691–696.

Kumar, V. R., Shankar, K. R., & Priyabhandhavi, P. (2013). *In vitro* Evaluation of Antioxidant activity of Ethanolic leaf extract of *Ixora coccinea*. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(2), 380–387.

Manapradit, N., Poeaim, S., & Charoenying, P. (2013). Biological activity of crude extract from *Barleria strigosa*. National Genetics Conference 2013 (NGC2013). *Thai Journal of Genetics*, 5(1), 192–195.

Marimuthu, M. M., Aruldass, C. A., Sandrasagaran, U. M., Mohamad, S., Ramanathan, S., Mansor, S. M., & Murugaiyah, V. (2014). Antimicrobial activity and phytochemical screening of various parts of *Ixora coccinea*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(10), 423–429.

Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422–13495.

Momin, F., Shaikh, S., Khan, N., Joshi, R., Shikalgar, T., & Naikwade, N. (2011). Cardioprotective effect of *Ixora Coccinea* Linn. flower extract on doxorubicin induced cardiomyopathy in rats. *Pharmacologyonline*, 3, 1145–1158.

Moreira, V. F., Vieira, I. J. C., & Braz-Filho, R. (2015). Chemistry and Biological Activity of Condamineae Tribe: A Chemotaxonomic Contribution of Rubiaceae Family. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 2612–2631.

Muhammad, H., Qasim, M., Ikram, A., Versiani, M. A., Tahiri, I. A., Yasmeen, K., Abbasi, M. W., Azeem, M., Ali, S. T., & Gul, B. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of *Ixora coccinea* root and quantification of phenolic compounds using HPLC. *South African Journal of Botany*, 135, 71–79.

Natheer, S. E., Sekar, C., Amutharaj, P., Rahman, M. S. A., & Khan, K. F. (2012). Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 6(11), 783–788.

Niño, J., Narváez, D. M., Mosquera, O. M., & Correa, Y. M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 566–570.

Nuanyai, T., Sappapan, R., Vilaivan, T., & Pudhom, K. (2011). Gardenoins E-H, cycloartane triterpenes from the apical buds of *Gardenia obtusifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, *59*(3), 385–387.

Obuzor, G. U., & Nwakanma, G. U. (2011). Chemical composition of essential oil of *Ixora coccinea* flower from Port Harcourt, Nigeria. *International Journal of Academic Research*, *3*(2), 381–384.

Parthasarathy, S., Bin Azizi, J., Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Said, M. I., & Mansor, S. (2009). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules*, *14*(10), 3964.

Patel, D. K. (2021). Pharmacological Activities and Therapeutic Potential of Kaempferitrin in Medicine for the Treatment of Human Disorders: A Review of Medicinal Importance and Health Benefits. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, *21*(2), 104–114.

Phromnoi, K., Reuter, S., Sung, B., Limtrakul, P., & Aggarwal, B. B. (2010). A dihydroxy-pentamethoxyflavone from *Gardenia obtusifolia* suppresses proliferation and promotes apoptosis of tumor cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Anticancer Research*, *30*(9), 3599–3610.

Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2008). Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules*, *13*(4), 904.

Puff, C., Chayamarit, K., & Chamchumroon, V. (2005). Rubiaceae of Thailand: A pictorial guide to indigenous and cultivated Genera. Bangkok: The Forest Herbarium, National Park Wildlife and Plant Conservation.

Pulipati, S., Srinivasulu, T., & Srinivasa Babu, P. (2012). *In vitro* Evaluation of Anthelmintic activity of flower extract of *Ixora coccinea* Linn. *The Indian Pharmacist-July 2012*, 51–54.

Pulipati, S., Srinivasulu, T., Madhavi, K., & Srinivasa Babu, P. (2012). Evaluation of Antibacterial Activity of Flower Extracts of *Ixora coccinea* Linn. *The Indian Pharmacist-March 2012*. 53–55.

Ramos-Hernández, R. R., Sánchez-Medina, A., Bravo-Espinoza, I., Ramos-Morales, F. R., Domínguez-Ortiz, M. Á., Fernández-Pomares, C., Ramos-Hernández, G. E., & Hernández-

Aguilar, M. E. (2017). Biological activities of Kaempferitrin-A short review. *Pharmacologyonline*, 3, 79–90.

Ruksilp, T., Sichaem, J., Khumkratok, S., Siripong, P. & Tip-pyang, S. (2013). Chemical Constituents of the Roots of *Morinda coreia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 746–748.

Saha, M. R., Alam, M. A., Akter, R., & Jahangir, R. (2008). *In vitro* free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3(2), 90–96.

Samee, W., Kititasserani, C., Skulmanit, S., & Wattanachaiyingcharoen, R. (2014). Antimicrobial Activity of Flower Extracts in Thailand. *Dialogue on Pharmacy and Health Care Practice*, 1(4), 99–104.

SE, O., Ugbabe, G. E., Oladosu, P. O., JA, I. R., Egharevba, H. O., Kunle, O. F., Elisha, E. P. & Chibuiké, A. J., & Ettah, U. O. (2018). Chemical constituents and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Ixora coccinea* L (Rubiaceae) collected from North Central Nigeria. *International Journal of Bioassays*, 7, 5630–5637.

Soma, B., Namita, B., Tapashi, G., Resma, S., Haque, F. N., Abhisikta, D., & Ria, B. (2014). Antibacterial activity of *Ixora coccinea* against selected bacterial pathogens isolated from clinical samples. *Journal of Mycopathological Research*, 52(1), 103-106.

Sumathy, H., Sangeetha, J., & Vijayalakshmi, K. (2011). Chromatographic fingerprint analysis of *Ixora coccinea* methanolic flower extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(4), 327–330.

Taechowisan, T., Sarakoat, P., & Phutdhawong, W. S. (2019). Major Chemical Composition of Fruit Extracts of *Morinda citrifolia* L. and their Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxicity Properties. *Journal of Applied Sciences*, 19, 366–375.

Tanamatayarat, P., Limtrakul, P., Chunsakaow, S., & Duangrat, C. (2003). Screening of Some Rubiaceae Plants for Cytotoxic Activity Against Cervix Carcinoma (KB-3-1) Cell Line. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(3-4), 167–172.

Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. d. D., Havyarimana, L., Csupo, r. D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J. R., & Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes* 5, 158.

Valente, L. M., Bizarri, C. H., Liechocki, S., Barboza, R. S., Paixão, D. D., Almeida, M. B., Benevides, P. J., Magalhães, A., & Siani, A. C. (2009). Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 1041–1045.

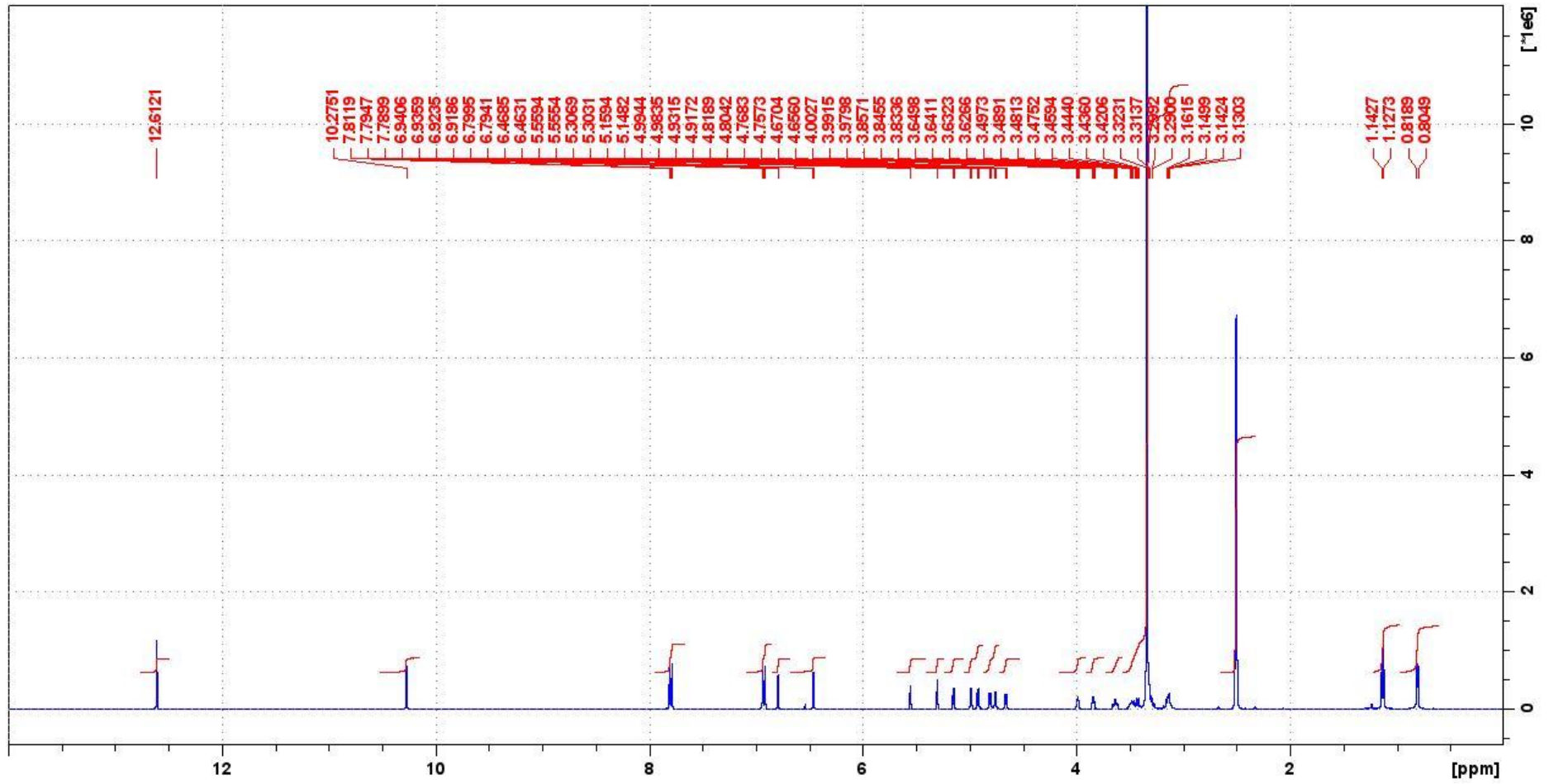
Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.

Versiani, M. A., Ikram, A., Khalid, S., Faizi, S., & Tahiri, I. A. (2012). Ixoroid: A new triterpenoid from the flowers of *Ixora coccinea*. *Natural Product Communications*, 7(7): 831–834.

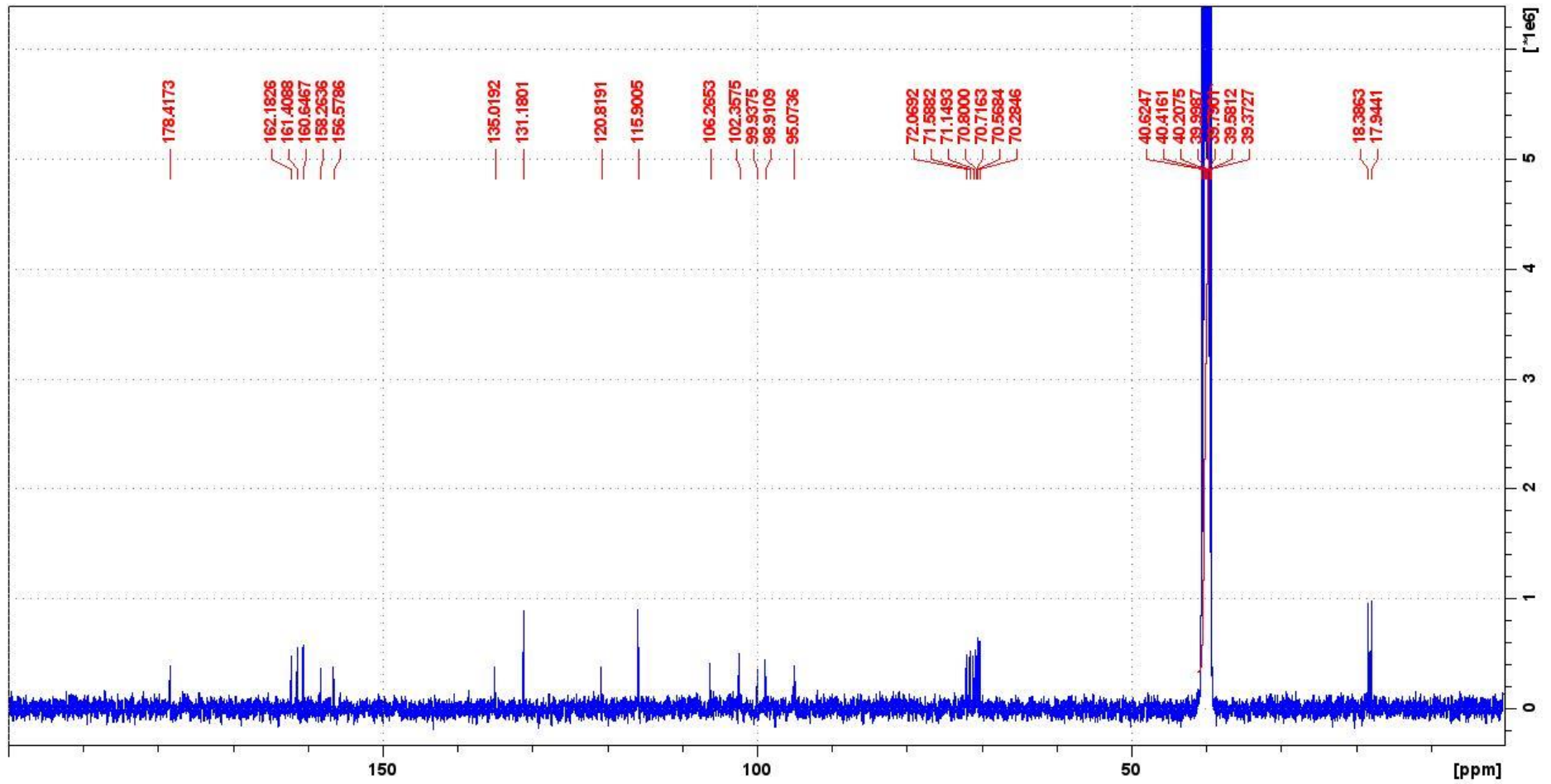
World Health Organization. (2015). *Antimicrobial resistance (Fact sheet No. 194)*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

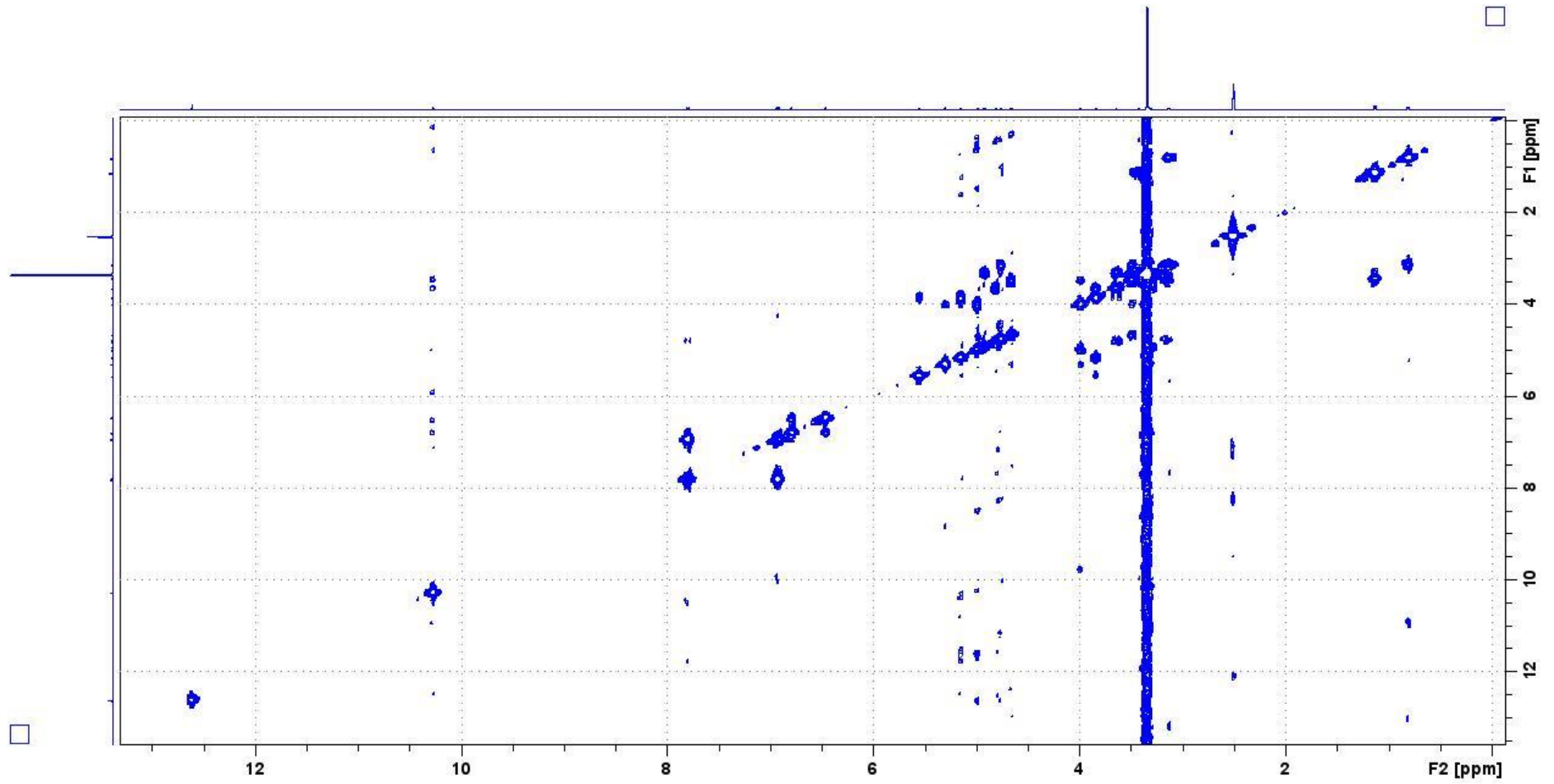
Zhao, S., Li, X., Cho, D. H., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., & Park, S. U. (2014). Accumulation of kaempferitrin and expression of phenyl-propanoid biosynthetic genes in kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Molecules*, 19(10), 16987–16997.

## ภาคผนวก

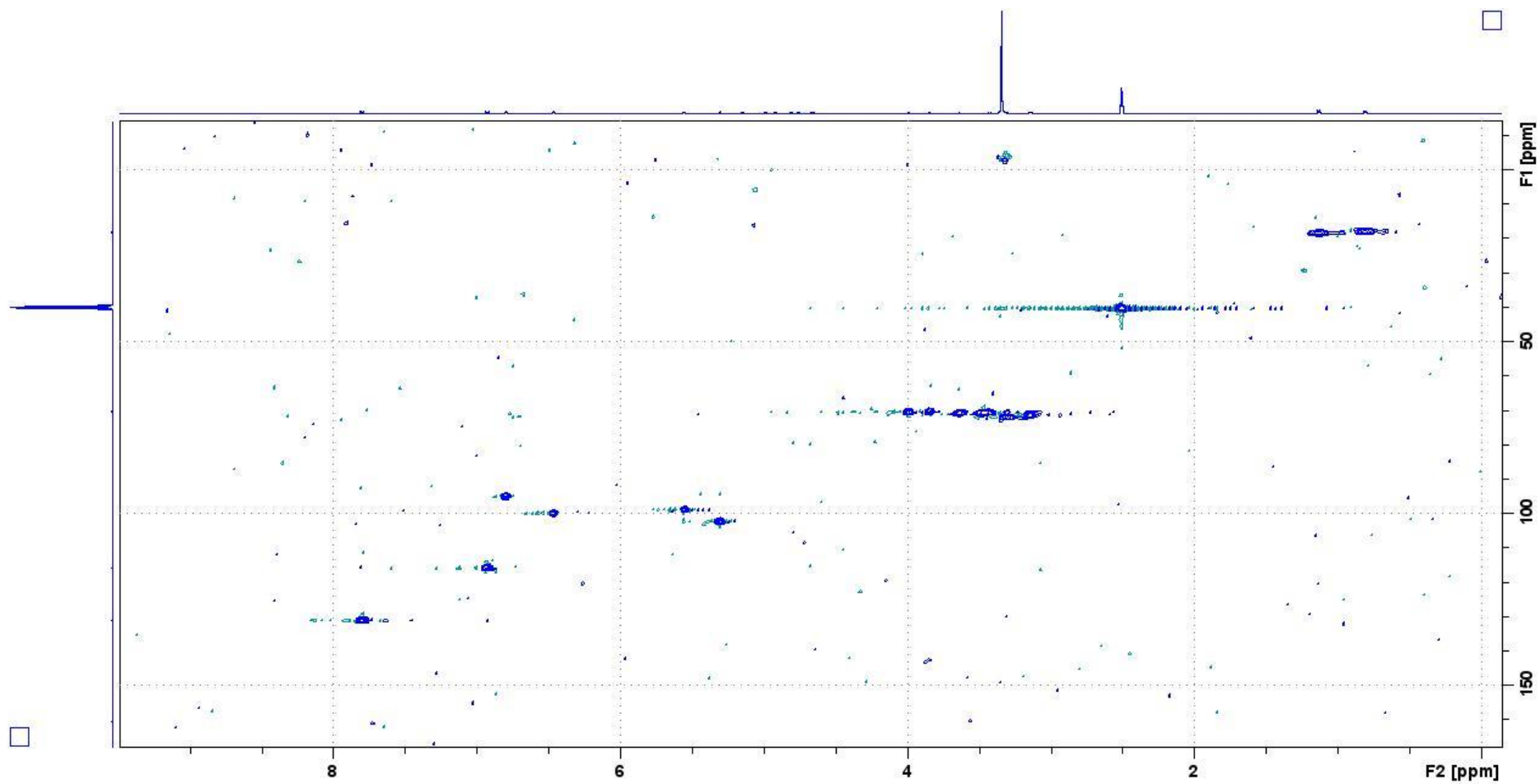
รูป 1  $^1\text{H-NMR}$  ของสาร M21\_2



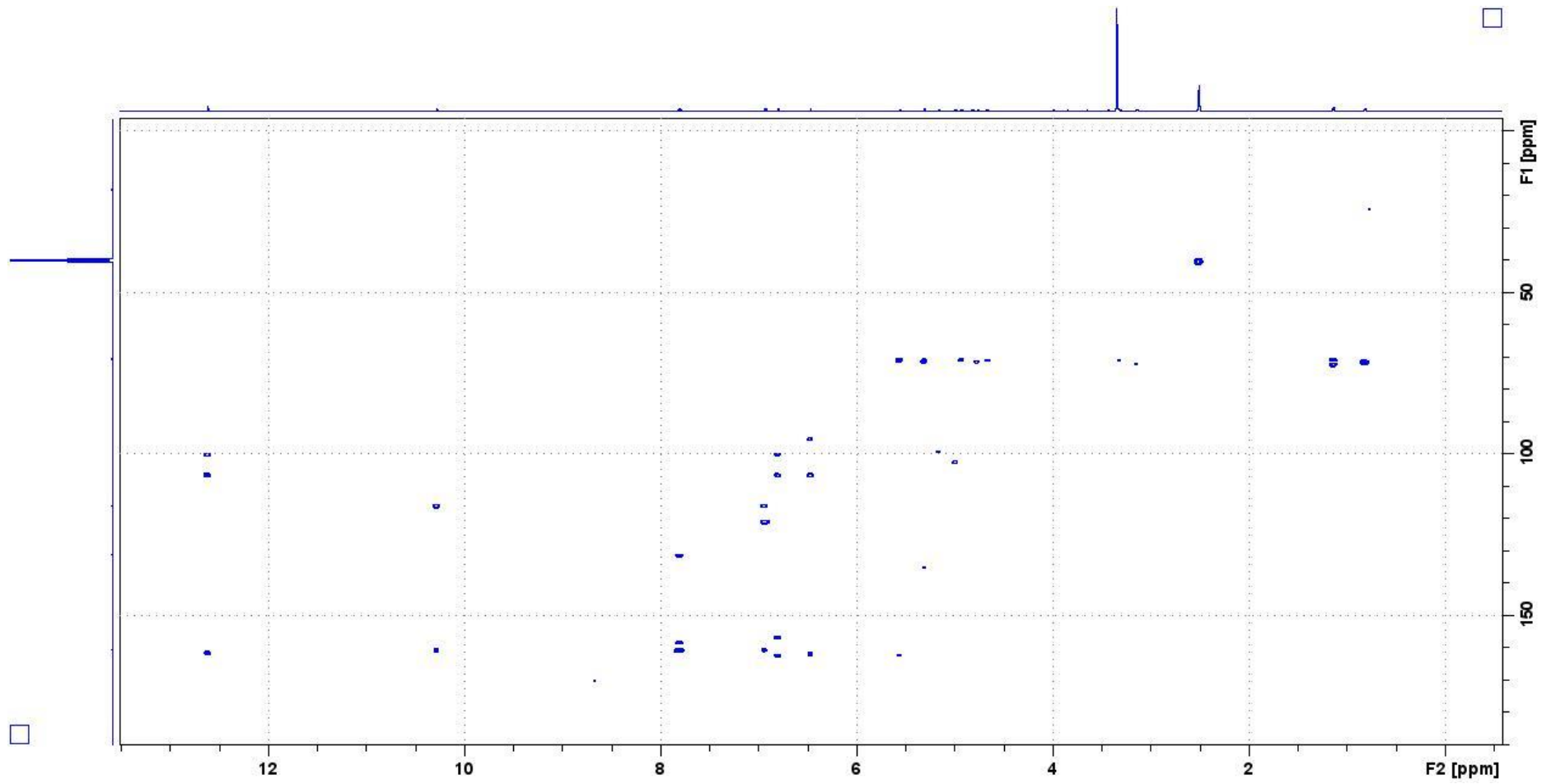
รูป 2  $^{13}\text{C}$ -NMR ของสาร M21\_2



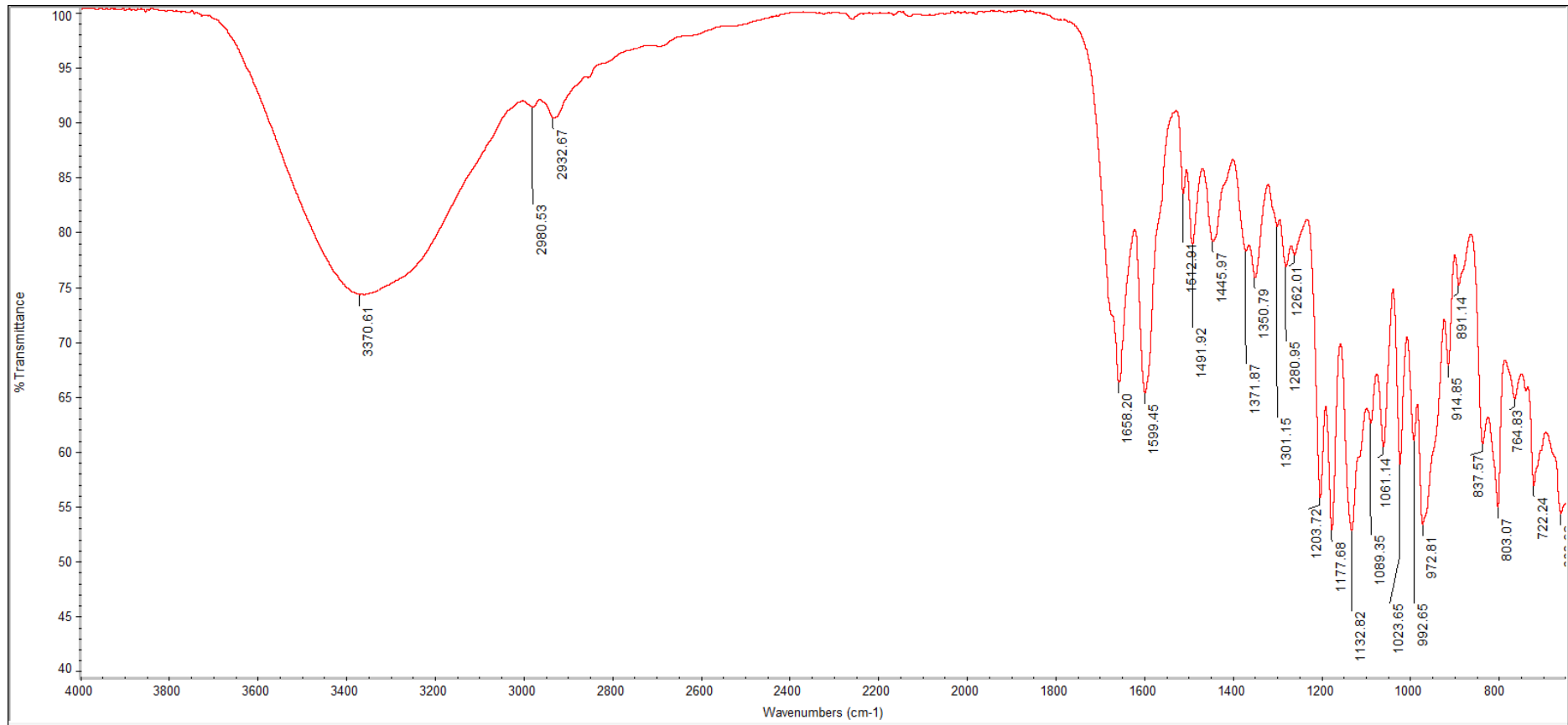
รูป 3 COSY ของสาร M21\_2



รูป 4 HMQC ของสาร M21\_2



รูป 5 HMBC ของสาร M21\_2



รูป 6 IR ของสาร M21\_2