QC43-5456

โครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารแอนทราควิโนน จากรากต้นยอป่า

Chemical Structures and Antimicrobial Activities of Anthraquinones from the Roots of *Morinda coreia*

พวงน้อย โลหะขจรพันธ์

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทบวงมหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2543

ประเทศ : ไทย
หมายเลข :
ชื่อเรื่อง : โครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารแอนทราควิโนนจากรากต้นยอป่า
ชื่อเรื่อง : Chemical Structures and Antimicrobial Activities of Anthraquinones from the Roots of *Morinda coreia*
ผู้เขียน : นางสาวพวงน้อย โลหะขจรพันธ์
หน่วยงาน : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ประเภทของเอกสาร : รายงานการวิจัย
รายละเอียดของงานพิมพ์: รายงานการวิจัย จำนวน 45 หน้า
วันที่พิมพ์ : กันยายน 2545
ภาษา : ไทย
หน่วยงานที่ให้ทุน ทบวงมหาวิทยาลัย
คำหลัก โครงสร้างทางเคมี ฤทธิ์ต้านจุลชีพ แอนทราควิโนน ยอป่า

บทคัดย่อ

การศึกษาทางพฤกษเคมีของรากยอป่า (*Morinda coreia* Ham., Rubiaceae) พบสารแอนทราควิโนนชนิดใหม่ในกลุ่ม pyrano-anthraquinone 1 ชนิด (Morein A) ซึ่งเป็นชนิดหายาก การกำหนดสูตรโครงสร้างใช้เทคนิคของเอกมิติ และ ทวิมิติ นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร) และ *Trichophyton mentagrophytes* (MIC ร้อยละ 1.25 น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัด Morein A แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร) และ *T. mentagrophytes* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร)

Country : Thailand

Number :

Title : Chemical Structures and Antimicrobial Activities of Anthraquinones from the Roots of *Morinda coreia*

Author : Puangnoi Lohakachornpan

Corporate author : -

Type of document : Research document

Publication detail : Research document 45 page

Date of publication: September 2002

Language of document : Thai

Sponsor : Ministry of University Affairs

Keywords Chemical Structures, Antimicrobial Activities, Anthraquinones, *Morinda coreia*

ABSTRACT

Phytochemical studied on the roots of *Morinda coreia* Ham. (Rubiaceae) has resulted in the isolation of Morein A, a rare type of pyrano-anthraquinone. Its structure elucidation and unambiguous NMR spectral assignment were achieved by the aid of the combination of 1D and 2D NMR technique. Crude alcoholic extract exhibited antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* (MIC more than 5.00 % w/v) and *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 1.25 % w/v). Isolated Morein A exhibited antimicrobial activities against *S. aureus* (MIC more than 5.00 % w/v) and *T. mentagrophytes* (MIC more than 5.00 % w/v).

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี รองศาสตราจารย์ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอย่างสูง ในการเป็นที่ปรึกษาของงานวิจัยนี้ ตลอดจนการตรวจแก้ไขรายงาน

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ บุษบา มาตระกูล คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ และตรวจแก้ไขรายงานบางส่วนให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยครั้งนี้เป็นจำนวนเงิน 49,920 บาท (สี่หมื่นเก้าพันเก้าร้อยยี่สิบบาทถ้วน)

พวงน้อย โลหะขจรพันธ์

เมษายน 2545

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญรูปภาพ		ฉ
รายการคำย่อ		ซ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
	วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	8
	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	8
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	9
	สารเคมีและวัสดุที่ใช้	9
	วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล	17
บทที่ 5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม		27
ภาคผนวก 1		
	ประวัติผู้วิจัย	29
ภาคผนวก 2		
	ข้อมูลสมุนไพร	30

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปคตรัมของ Morein A ที่ 600 และ 150 เมกะเฮิทซ์ใน $CDCl_3$	18
2	ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า	23
3	ฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A	23
4	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า	24
5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A	24

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพต้น ใบ ดอก และผลยอป่า	3
2	ภาพรากยอป่า	4
3	ภาพความสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์ของสารแอนทราควิโนน	6
4	ภาพสูตรโครงสร้าง ของ Morein A	17
5	ภาพการกำหนดตำแหน่งไฮโดรเจน ของ Morein A	20
6	ภาพการกำหนดตำแหน่งคาร์บอน ของ Morein A	20
7	ภาพความสัมพันธ์ของไฮโดรเจนและคาร์บอน จาก HMQC สเปคตรัม ของ Morein A	21
8	ภาพความสัมพันธ์ช่วงไกลระยะ 2-3 คาร์บอนของไฮโดรเจนและคาร์บอน จาก HMBQ สเปคตรัม ของ Morein A	21
9	ภาพลายเส้นยอป่า	33
10	ภาพอัลตราไวโอเล็ตสเปคตรัม ของ Morein A	34
11	ภาพอินฟราเรดสเปคตรัม ของ Morein A	35
12	ภาพแมสสเปคตรัม ของ Morein A (*m/z* % relative intensity)	36
13	ภาพ ^{1}H NMR สเปคตรัม ของ Morein A	37
13a	ภาพขยาย ^{1}H NMR สเปคตรัม ของ Morein A	38
13b	ภาพขยาย ^{1}H NMR สเปคตรัม ของ Morein A	39
14	ภาพ ^{13}C NMR สเปคตรัม ของ Morein A	40
15	ภาพ DEPT สเปคตรัม ของ Morein A	41
16	ภาพ HMQC สเปคตรัม ของ Morein A	42
17	ภาพ HMBC สเปคตรัม ของ Morein A	43

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
18	ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*	44
19	ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า ต่อเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes*	44
20	ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*	45
21	ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A ต่อเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes*	45

รายการคำย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
^{0}ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซ็นติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
AR	=	Analytical Reagent
$CDCl_3$	=	Deuterated chloroform
CFU	=	Colony forming unit
^{13}C NMR	=	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
2D	=	Two Dimensional
d	=	doublet (for NMR spectral data)
dd	=	doublet of doublets (for NMR spectral data)
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
δ	=	Chemical shift
EIMS	=	Electron Impact Mass Spectroscopy
eV	=	electron volt
FT-IR	=	Fourier Transform Infrared Spectrometer
^{1}H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HMBC	=	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	=	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	=	Hertz
IR	=	Infrared
J	=	coupling constant

KBr	=	Potassium bromide
λ_{max}	=	Wavelength at maximum absorption
m	=	Multiplet (for NMR spectral data)
m/z	=	mass to charge ratio
M^+	=	Molecular ion
MHz	=	Mega hertz
nm	=	nanometer
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	=	part per million
q	=	quartet (for NMR spectral data)
s	=	Singlet (for NMR spectral data)
TLC	=	Thin Layer Chromatography
TMS	=	Tetramethylsilane
t	=	Triplet (for NMR spectral data)
UV-VIS	=	Ultraviolet and Visible Spectrophotometer
$[\alpha]^t_D$	=	Specific rotation at t^0 C and Sodium D line (589 nm)

บทที่ 1
บทนำ

สมมติฐานการวิจัย

ต้น "ยอ" เป็นสมุนไพรที่คนไทยรู้จักและนำมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันนานมาแล้ว ในเกือบทุกส่วนของต้นนำมาใช้ได้ ตั้งแต่เป็นอาหาร ยา สีย้อม และเครื่องเรือน เครื่องใช้ต่างๆ เช่น ใช้แก่นต้มหรือดองสุรา รับประทานเป็นยาสำหรับขับเลือดและน้ำคาวปลาของสตรีที่เพิ่งคลอดบุตร แก้บาดทะยักปากมดลูก เป็นยาขับฟอกโลหิตระดู แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ ขับลม (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2493 : 504-5) ใบ ใช้เป็นอาหาร แก้จุกเสียด แก้ไข้ ผล ใช้ทั้งเป็นอาหารและยาแก้คลื่นไส้อาเจียน ดังปรากฏอยู่ในรายชื่อสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานที่กระทรวงสาธารณสุขแนะนำ (กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร 2537 : 130-131) ผลสุกงอมเป็นยาขับระดู ในส่วนของรากและเปลือกรากซึ่งมีสีเหลือง ใช้เป็นยาระบาย แก้เบาหวาน และเป็นสีย้อม

สำหรับยอป่าต้นนี้ (*Morinda coreia* Ham.) ลักษณะของรากมีสีเหลืองคล้ายกับรากของต้นยออื่นๆ ที่ได้มีการศึกษามาแล้วและพบว่ามีสารในกลุ่มแอนทราควิโนน จึงคาดว่าต้นยอป่าน่าจะพบสารกลุ่มเดียวกันนี้ด้วย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แอนทราควิโนน เป็นสารเคมีกลุ่มกลัยโคไซด์ ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบทั้งในพืช สัตว์ และเชื้อรา มีสีเหลือง จึงมักนำมาใช้ประโยชน์เป็นสีย้อม ในทางยา เรานำพืชที่มีสารสำคัญกลุ่มนี้มาใช้เป็นยาระบาย และเป็นยาภายนอกรักษาโรคผิวหนัง สมุนไพรในวงศ์ Rubiaceae หลายต้นที่ให้สารแอนทราควิโนน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในสกุล *Morinda* ที่พบในประเทศไทย เช่น ยอดิน (*M. angustifolia* Roxb.) ยอบ้าน (*M. citrifolia* Linn.) ยอป่า (*M. coreia* Ham.) ยอเถื่อน (*M. elliptica* Ridl.) และยอย่าน (*M. umbellata* Linn.)

ยอป่า (*M. coreia* Ham.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีขึ้นอยู่ทั่วไปตามป่าโปร่งในทุกภาคของประเทศ ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก (ภาพที่ 1) เปลือกรากมีสีเหลืองจัด (ภาพที่ 2) เป็นลักษณะที่บ่งชี้ในเบื้องต้นว่ามีสารในกลุ่มแอนทราควิโนนอยู่ จากรายงานการวิจัยพบว่ามีการศึกษาด้านองค์

ประกอบทางเคมีของใบยอป่า (Tripetch K: 2001) แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนของราก รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วย และโดยคุณประโยชน์ของสารแอนทราควิโนนซึ่งเป็นสารในกลุ่มควิโนนกลัยโคไซด์ เราได้นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในทางยา อาหาร และสีย้อม เป็นต้น ยอป่าต้นนี้จึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจต้นหนึ่งที่คาดว่าน่าจะเป็นแหล่งของสารแอนทราควิโนนแหล่งใหม่ ทำให้ได้ชนิดของวัตถุดิบเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะพืชที่ขึ้นได้และมีอยู่ในประเทศไทย เพื่อใช้ทดแทนการนำเข้า

วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย :

1. เพื่อสกัดแยกสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์จากรากต้น ยอป่า
2. เพื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารแอนทราควิโนนที่แยกได้
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากส่วนสกัดของแอลกอฮอล์และสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาและวิจัยโครงการนี้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาแหล่งวัตถุดิบ เพื่อใช้ทดแทนการนำเข้า เพิ่มทางเลือกใหม่ของการใช้สมุนไพร รวมทั้งใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์สารเลียนแบบธรรมชาติ ทำให้สามารถสังเคราะห์สารได้ในปริมาณมาก การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารแอนทราควิโนน จะทำให้ได้ข้อมูลอันจะก่อประโยชน์แก่วงการเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างศักยภาพความเป็นผู้เชี่ยวชาญในด้านการวิจัยและพัฒนาสมุนไพร เพื่อนำมาใช้ในทางยา อาหาร และเครื่องสำอาง อีกทั้งเป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในมหาวิทยาลัยมาใช้หรือทำให้เกิดประโยชน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะได้องค์ความรู้สำหรับการเรียนการสอนด้วยอีกทางหนึ่ง

ภาพที่ 1 ภาพต้น ใบ ดอก และผลยอป่า *Morinda coreia* **Ham. Rubiaceae**

ภาพที่ 2 ภาพรากยอป่า ***Morinda coreia*** **Ham.**

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แอนทราควิโนน (anthraquinone) เป็นสารสำคัญจากธรรมชาติ ที่มีความสำคัญและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากกลุ่มหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางเภสัชกรรม เช่น ใช้เป็นยาระบาย และยาถ่าย (laxative or purgative and cathartic) นิยมใช้ในรูปของ ชาสมุนไพร หรือน้ำยาสกัดจากเครื่องยา (galenical) ใช้เป็นยาแก้โรคผิวหนัง มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังนำไปใช้เป็นสีย้อม (dyestuff) สมัยก่อนรากยอใช้ย้อมสีจีวรของพระ สารในกลุ่มแอนทราควิโนน พบได้ทั้งในพืชชั้นต่ำ พวกรา (fungi) ได้แก่ *Pennicillium islandicum* ไลเคน (lichen) และพืชชั้นสูง ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ เช่น วงศ์ Bignoniaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae, Leguminosae, Lythraceae, Polygonaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae และ Verbenaceae

ยอป่าต้นที่นำมาศึกษาครั้งนี้เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae วงศ์นี้มีสมาชิกอยู่ประมาณ 500 สกุล (genera) 6,000 ชนิด (species) ส่วนใหญ่เป็นไม้ทางเขตร้อน ตัวอย่างพืชที่รู้จักคุ้นเคยกันดี นอกจากพวกยอ (*Morinda* spp.) แล้ว ได้แก่ ควินิน (*Cinchona* spp.) กาแฟ (*Coffea* spp.) และกระท่อม (*Mitragyna* spp.)

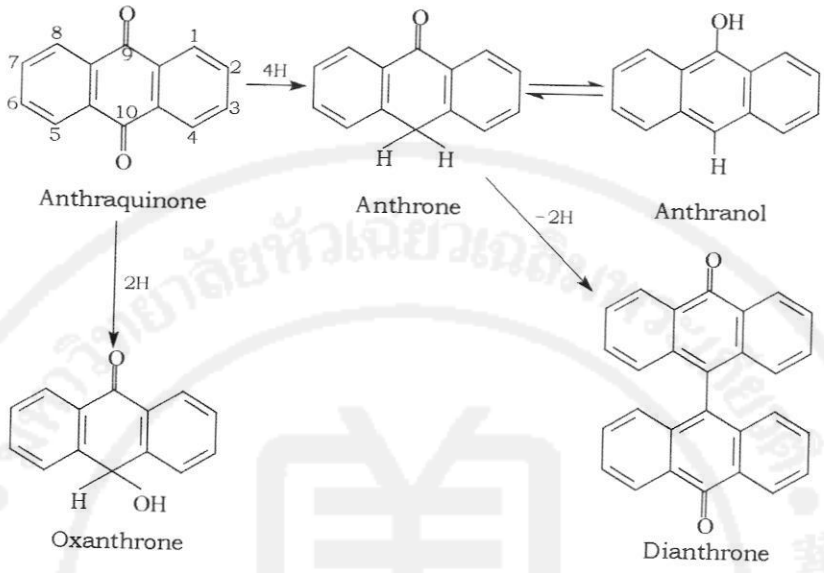
แอนทราควิโนน ในธรรมชาติพบทั้งรูปอิสระ (glycone) และรูปของกลัยโคไซด์ (glycoside) คือจับอยู่กับน้ำตาล การปรากฏตัวมีได้ทั้งแอนทราควิโนนและอนุพันธ์รีดิวซ์ฟอร์ม (ซึ่งได้แก่ oxanthrone, anthranol, anthrone) และ dianthrone

สำหรับน้ำตาลที่มาจับในโมเลกุล ได้แก่ glucose primeverose และ rhamnose

อนุพันธ์ของแอนทราควิโนน มักมีสีส้มแดง ละลายได้ในน้ำร้อน และแอลกอฮอล์เจือจางให้ผลบวกกับการทดสอบ Borntrager's test ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนทราควิโนน (Trease and Evan 1989 : 212,395-397)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แอนทราควิโนนที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายมักจะเป็นอนุพันธ์ของ 1,8 dihydroxy anthranol ทั้งที่เป็นแอนทราควิโนนอิสระ และกลัยโคไซด์ ตัวที่เป็นแอนทราควิโนนอิสระ แสดงฤทธิ์ทางยาน้อย เมื่อจับกับน้ำตาลจะช่วยในการดูดซึมและการนำไปสู่บริเวณที่

ต้องการออกฤทธิ์ โดยการเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ผนังลำไส้ใหญ่ ตัวที่ให้ฤทธิ์สูงคือ anthranol และ anthrone (Tyler *et al* 1988 : 59)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์ของสารแอนทราควิโนน

ในปี 2534 ลีและคณะ (Li *et al.* 1991) แห่งโรงพยาบาลนานจิง (Nanjing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine) ได้ทำการแยกสารแอนทราควิโนนจากต้นยอบ้าน (*M. officinalis* F.C. How : cortex) ที่ขึ้นอยู่ในแถบมณฑลกวางตุ้ง และได้รายงานการพบสารแอนทราควิโนนใหม่ 1 ชนิด คือ 2-methyl-anthraquinone ปีต่อมา ภาควิชาพฤกษเคมี แห่งมหาวิทยาลัยเมืองนานจิง (China Pharmaceutical University, Nanjing) โดยหยางและคณะ (Yang *et al.* 1992) ได้ทำการแยกสารแอนทราควิโนนจากส่วนรากของต้นยอ (*M. officinalis*) พบสารแอนทราควิโนนใหม่ 2 ชนิด คือ 1,6-dihydroxy-2,4-dimethoxyanthraquinone และ 1,6-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone นอกจากนี้ยังได้แยกสารแอนทราควิโนนจากส่วนรากของต้น D*amnacanthus indicus* พบสารแอนทราควิโนนใหม่อีก 1 ชนิดคือ 1,4-dimethoxy-2-hydroxyanthraquinone .

ทำนองเดียวกันนี้ที่มหาวิทยาลัย Pertanian ประเทศมาเลเซีย ได้ทำการศึกษาพฤกษเคมีของรากยอเถื่อน (*M. elliptica* Ridl.) พบสารแอนทราควิโนน 11 ชนิด และในจำนวนนี้เป็นชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ 2-formyl-1-hydroxyanthraquinone (Ismail *et al.* 1997)

สำหรับฤทธิ์ต้านจุลชีพ ในปี 1995 มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารแอนทราควิโนนจากรากยอ (*Morinda lucida*) โดยราทและคณะ (Rath *et al* 1995 : 107-114) แห่งสถาบันเภสัชเวท เมืองโลซาน ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ (Institute of Pharmacognosy & Phytochemistry Sch Pharm University)

อาลีและคณะ (Ali *et al* 2000 : 298-301) แห่งมหาวิทยาลัย Putra ประเทศมาเลเซีย ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านจุลชีพ รวมทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารแอนทราควิโนนที่สกัดจากรากของยอเถื่อน (*Morinda elliptica*)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยประกอบด้วยการนำรากยอป่า (*Morinda coreia* Ham.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae ไปแยกสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์ การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี และการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งในสารสกัดหยาบและในสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1. ตัวอย่างพืชและแหล่งที่มา

รากยอป่า เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมีนาคม 2543 ได้นำตัวอย่างพืชชนิดนี้มาตรวจสอบความถูกต้องของชนิดพันธุ์กับตัวอย่างมาตรฐาน (herbarium specimen) ของแผนกพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลักษณะของพืช และส่วนของราก ดังแสดงในภาพที่ 1, 2 และ 9

2. ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Bacillus subtilis ATCC 6633

2.2 เชื้อรามาตรฐานที่ใช้ ได้แก่

Candida albicans ATCC 10231

Trichophyton mentagrophytes. แยกจากผู้ป่วยฮ่องกงฟุต

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องระเหยสารภายใต้ความดัน (rotary evaporator)
- คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)
- เครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS โมเดล V-530 ซีรี่ส์ V-500, JASCO Corporation)
- เครื่องอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (FT-IR Spectrometer, Quick IR Version 2.0, Nicolet Instrument Corp.)
- เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Digital Melting Point Apparatus Series IA9200, Electrothermal)
- เครื่องอัลตราไวโอเล็ต คาบิเน็ท 254 และ 365 นาโนเมตร (Ultraviolet cabinet, "UVP" model C 70 G)
- เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ 600 เมกะเฮิทซ์ (JEOL alpha 600 MHz)
- เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (Mass-spectrometer, Hitachi M-80)

สารเคมีและวัสดุที่ใช้

- กรดกำมะถัน 10 เปอร์เซ็นต์ในเอธิลแอลกอฮอล์ (H_2SO_4 10 % in ethyl alcohol)
- ซิลิก้าเจล 60 ขนาดผง 0.040-0.063 มม. และ 0.063-0.200 มม. (Silica gel 60, Merck)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (10 % NaOH)
- ดิวเทอเรทเตทคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$)
- ไดคลอโรมีเธน (Dichloromethane)
- ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO anhydrous MW 78.13, Sigma)
- เตตราเมธิลไซเลน (Tetramethylsilane)
- ทวีน 80 (Tween 80)
- ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether)
- โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr Spectra-Tech Inc.)
- เมธิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol AR)
- แมคฟาร์แลนด์สแตนดาร์ด (Mc Farland Standard)

- อะซิโตน (Acetone)
- เอธิลอซิเตต (Ethyl acetate)
- เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)
- เฮกเซน (Hexane)
- ถาดหลุมรูปตัวยู (U-bottom microtiter plate)
- แผ่นสำเร็จรงคเลขฉาบบาง หนา 2.0 มม. (TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} precoated plate, Merck)
- Mueller Hinton Agar (MHA)
- Sabouraud dextrose agar (SDA)
- Trypticase soy agar (TSA)
- Trypticase soy broth (TSB)

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดและแยกสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

เลือกต้นยอป่า ขนาดสูงประมาณ 4-5 เมตร ซึ่งคะเนอายุให้อยู่ราวๆ 3-4 ปี ขุดรากมาล้างทำความสะอาด ล้างดินและสิ่งสกปรกออกด้วยน้ำให้สะอาด สับให้เป็นชิ้นเล็กๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตรงส่วนที่มีสีเหลืองจัด ได้แก่ส่วนเปลือกราก นำไปอบที่อุณหภูมิ 60^{0} ซ จนแห้งสนิท หลังจากนั้นนำไปบดให้เป็นผงหยาบ ชั่งน้ำหนักมา 2.5 กิโลกรัม หมักด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 วัน กรองด้วยผ้าขาวบาง ถ้าน้ำกรองยังไม่ใส นำไปกรองด้วยกระดาษกรองนัมเบอร์ 1 เก็บน้ำกรองไว้ ส่วนกากนำไปหมักซ้ำด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ อีก 3-4 ครั้ง จนน้ำกรองสีเหลืองจาง เก็บรวบรวมน้ำกรอง นำไประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50^{0} ซ ด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้ความดัน จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

แบ่งสารสกัดหยาบ ที่แห้งแล้วเป็นสองส่วน ส่วนที่ 1 นำไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ส่วนที่ 2 นำไปทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลชีพ

สารสกัดหยาบส่วนที่ 1 นำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี โดยใช้สารสกัดหยาบครั้งละประมาณ 10 กรัม นำมาผ่านคอลัมน์ซิลิก้าเจล (0.040-0.063 ม.ม.) ขนาด 4 x 30 ซม. ใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ : เอธิลอซิเตต อัตราส่วน 8 :1 เป็นตัวชะ (eluent) รวบรวมส่วนแยกต่างๆ (fractions)

ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยใช้เทคนิคของรงคเลขฉาบบาง และเครื่องวิสิเบิลอัลตราไวโอเล็ต 254 นาโนเมตร ช่วยในการทดสอบ (สเปรย์ด้วย กรดกำมะถัน 10 เปอร์เซ็นต์ในเอธิลแอลกอฮอล์) นำไปผ่านคอลัมน์ที่เล็กลง (ขนาด 2.2 x 20 ซม.) อีกหลายๆครั้ง ใช้ผงซิลิก้าเจลขนาดเล็กลง (0.063-0.200 มม.) เปลี่ยนตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเธน : ปิโตรเลียมอีเธอร์ : เฮกเซน (8:2:1) จนได้สารบริสุทธิ์

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบเอกลักษณ์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารแอนทราควิโนน บริสุทธิ์

2.1 การตรวจหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง Electrothermal : IA9200

2.2 การตรวจหาค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorbance) ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้เมธิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย และตั้งค่าช่วงความยาวคลื่นที่ 250 ถึง 450 นาโนเมตร

2.3 การตรวจหาค่าดูดกลืนแสงอินฟราเรด ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ ใช้โพแทสเซียมโบรไมด์ดิสค์ และตั้งค่าช่วงคลื่นที่ 4,000-400 เซนติเมตร$^{-1}$

2.4 การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (EIMS) ที่ 70 eV (probe)

2.5 การทดสอบบอร์นทราเกอร์ (Borntrager Test) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายของตัวอย่างในคลอโรฟอร์ม เขย่า และสังเกตสีที่เกิดขึ้นในชั้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารแอนทราควิโนน

3.1 ตรวจสอบนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปคตรัม (NMR) ของโปรตอน (^{1}H) คาร์บอน (^{13}C) HMQC และ HMBC ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ สเปคโตรมิเตอร์ (JEOL alpha 600 MHz) ใช้ดิวเทอเรทเตทคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$) เป็นตัวทำละลาย ใช้เตตราเมธิลไซเลน (TMS) เป็นมาตรฐานภายใน (internal standard) บันทึก ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR สเปคตรัมที่ 600 และ150 เมกะเฮิทซ์ การบันทึกข้อมูล chemical shift (δ) บันทึกค่าเป็น ส่วนในล้านส่วน (ppm scale)

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ

4.1 การทดสอบเบื้องต้น: ใช้วิธี Agar diffusion

4.1.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

นำสารสกัดหยาบที่ได้ส่วนที่ 2 มาทำเป็นสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 ทำให้สารละลายปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูผ่านขนาด 0.45 ไมครอน

4.1.2 การเตรียมตัวอย่างเชื้อทดสอบ

สำหรับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด นำมาเลี้ยงบนจานอาหาร trypticase soy agar (TSA) บ่มที่ 37^0 ซ 24 ชม. หลังจากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยว 4 โคโลนี มาเลี้ยงใน trypticase soy broth (TSB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37^0 ซ 2-3 ชม. ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์นัมเบอร์ 1 ด้วย TSB ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 โคโลนี ฟอร์มมิ่งยูนิต (CFU) ในหนึ่งมิลลิลิตร

สำหรับเชื้อ *Candida albicans* นำมาเลี้ยงบนหลอดวุ้นอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่ 30^0 ซ 24 ชม. หลังจากนั้น นำเชื้อมาแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐาน แมคฟาร์แลนด์ นัมเบอร์ 1 ด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ ส่วนเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* นำมาเลี้ยงบนหลอดวุ้นอาหาร SDA บ่มที่ 30^0 ซ 4 วัน ล้างสปอร์ ด้วย 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 เท่าของสารละลายมาตรฐาน แมคฟาร์แลนด์ นัมเบอร์ 1 ด้วยทวีน 80 ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU ในหนึ่งมิลลิลิตร

4.1.3 การเตรียมจานเพาะเชื้อสำหรับทดสอบ

ทำโดยละลายวุ้นอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) 25 มล. เทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 9 ซม. เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้ว นำไปอบให้แห้งที่ 37^0 ซ 1 ชม. ใช้ปลายไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายของเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ข้างต้น กำจัดส่วนเกินโดยซับแล้วหมุนหลายๆครั้งกับผนังด้านในหลอดเหนือระดับสารละลาย แล้วนำมาลากให้ทั่วบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งตำแหน่งทำมุมกัน 60 องศา จากนั้นให้เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. จำนวน 4 หลุม สำหรับใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 3 หลุม และหลุมควบคุม (control) 1 หลุม

การเตรียมจานเพาะเชื้อรา ทำเช่นเดียวกับจานเพาะเชื้อแบคทีเรีย แต่เปลี่ยนวุ้นอาหารเป็น SDA

4.1.4 วิธีการทดสอบ

หยอดสารละลายของสารสกัดที่เตรียมไว้ (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมที่เจาะไว้ ทั้ง 3 หลุม หลุมที่ 4 เป็นหลุมควบคุม (control) โดยใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 ซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยาการต้านจุลชีพ

หลังจากวางจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. นำชุดของแบคทีเรียไปบ่มที่ 37^0 ซ 24 ชม. ส่วนชุดของเชื้อรานำไปบ่มที่ 30^0 ซ 48-72 ชม.

อ่านผลการทดลองที่ได้ โดยวัดขนาดของวงใส (clear zone) ของหลุมที่มีสารสกัด บันทึกผลโดยใช้เครื่องหมาย บวก (+) หรือลบ (-) ซึ่งหมายความว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพและไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพตามลำดับ

สารสกัดที่ทำให้เกิดวงใส นำไปหาค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ต่อไป

4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC)

ใช้วิธี broth microdilution (Barry 1991, Woods and Washington, 1995;Espinel-Ingroff and Pfaller, 1995;C.M. Mann and J.L. Markham 1998) ดังมีรายละเอียดดังนี้

4.2.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อสำหรับวิเคราะห์

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ให้ทำเช่นเดียวกันกับวิธีการทดสอบเบื้องต้น (4.1.2) แล้วนำมาทำให้เจือจางเป็น 1:100 ด้วยสารละลายที่ปราศจากเชื้อ MHB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และด้วย SDB สำหรับเชื้อรา จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 CFU ในหนึ่งมิลลิลิตร

4.2.2 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสำหรับวิเคราะห์ MIC

เตรียมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดหยาบ ด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 กรองให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 5.00-0.04 เปอร์เซ็นต์ (ใช้วิธี two fold dilution) ด้วยสารละลายอาหารปราศจากเชื้อ MHB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หรือ SDB สำหรับเชื้อรา

4.2.3 วิธีการวิเคราะห์ MIC

หยอดตัวอย่างสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเชื้อที่เตรียมไว้อีก 50 ไมโครลิตรลงในถาดหลุมรูปตัวยูที่ปราศจากเชื้อ (96-well sterile U-bottom microtiter plate) แต่ละหลุม (แถว A) ทำเช่นเดียวกันนี้ซ้ำอีกครั้ง (duplicate แถว B) ดังแสดงในรูปหน้า 16 สำหรับหลุมที่

เป็นหลุมควบคุมผลบวก (positive control) ให้ใช้สารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรอย่างเดียว และหลุมที่เป็นหลุมควบคุมผลลบ (negative control) ใช้สารละลายอาหารปราศจากเชื้อ MHB หรือ SDB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรอย่างเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^0 ซ 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 30^0 ซ 48-72 ชั่วโมง สำหรับเชื้อรา ความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อคือค่า MIC

อ่านผลการทดลองที่ได้ โดยวัดความขุ่น (turbidity) บันทึกผลโดยใช้เครื่องหมาย บวก (+) หรือลบ (-) ดังนี้

ผล - สารละลายใส (สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้)

ผล + สารละลายขุ่น (เชื้อจุลชีพยังสามารถเจริญเติบโตได้)

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

5.1 การทดสอบเบื้องต้น

วิธีการทดลองและการดำเนินการทดลองทำเช่นเดียวกันกับขั้นตอนที่ 4.1 ยกเว้นเฉพาะตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่างสารสกัด ใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์แทนทวีน 80

5.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

วิธีการทดลองและการดำเนินการทดลองทำเช่นเดียวกันกับขั้นตอนที่ 4.2 ยกเว้นเฉพาะตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่าง สารสกัด ใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์แทนทวีน 80

<u>การอ่านผลการทดสอบของค่า MIC</u>

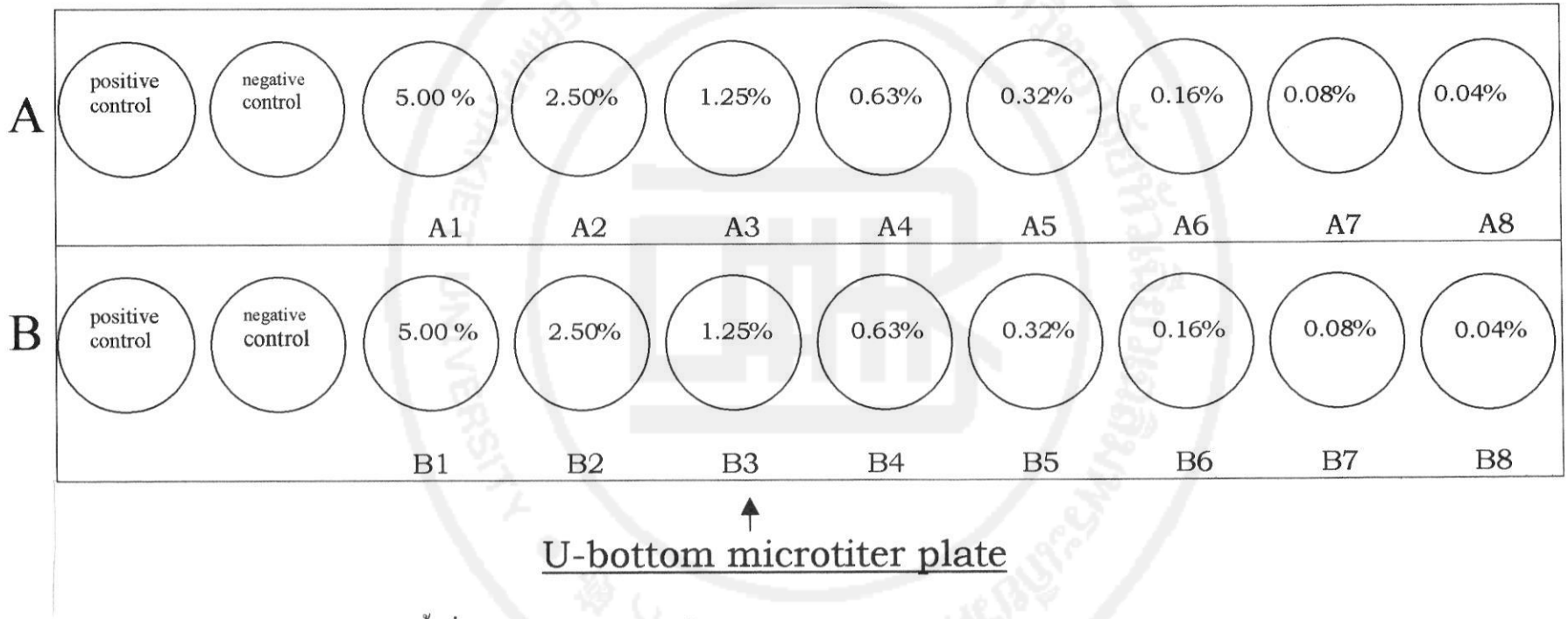
การทดสอบตัวอย่างสารสกัดกับการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ความเข้มข้นของสารสกัด (w/v)	positive control	negative control	5.00 %	2.50 %	1.25 %	0.63 %	0.32 %	0.16 %	0.04 %	0.08 %
แถว A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
แถว B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

✳ 0.63% คือความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

ตัวอย่างประกอบวิธีการทดสอบการหาค่า MIC

ทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*



Positive control : สารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

Negative control : สารละลายอาหารปราศจากเชื้อ MHB หรือ SDB ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

แถว A1-A8 = ตัวอย่างสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร + สารละลายของเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

แถว B = การทำซ้ำกับแถว A

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การสกัดและแยกสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

รากยอป่าแห้ง (*Morinda coreia* Ham.) หนัก 2.5 กิโลกรัม นำมาแยกเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเอธิลแอลกอฮอล์ ได้หนักประมาณ 250 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลวเหนียวข้นสีน้ำตาลดำ มีตะกอนสีเหลืองทองปนอยู่ด้วย เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกต่อโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี พบว่ามีสารในกลุ่มแอนทราควิโนนอย่างน้อย 5 ชนิด โดยมีค่าอาร์เอฟ (Rf value*) ที่ปรากฏบนแผ่นรงคเลขผิวบาง (thin layer chromatography) เท่ากับ 0.36, 0.26, 0.80, 0.40 และ0.46 เมื่อใช้วัตถภาคเคลื่อนที่เป็นไดคลอโรมีเธน : ปิโตรเลียมอีเธอร์ : เฮกเซน (8:2:1) และสามารถแยกสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์ชนิดใหม่ได้ 1 ชนิด คือส่วนที่มีค่าอาร์เอฟเท่ากับ 0.36 (Morein A)

ส่วนที่ 2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารแอนทราควิโนนบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีได้ผลดังนี้

2.1 สารที่นำมาตรวจหาจุดหลอมเหลวเริ่มเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นเหลืองคล้ำลง ที่อุณหภูมิ 153-154 ^{0} ซ จากนั้นก็เริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ที่อุณหภูมิ 191-193 ^{0} ซ เนื่องจากมีการสลายตัว (decomposed)

2.2 ผลการทดลองแสดงค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตสูงสุดที่ 270, 340 และ 410 นาโนเมตร (ภาพที่ 10) แสดงว่ามีหมู่ฟังก์ชั่นโครโมฟอร์ที่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นของอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล (200-800 นาโนเมตร) เป็นสารที่มีนิวเคลียสเป็น 9,10 anthracenedione

*Rf value คืออัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนจากจุดเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดของวัตถภาคเคลื่อนที่กับระยะทางการเคลื่อนของสารตัวอย่างจากจุดเริ่มต้นเดียวกัน

2.3 ผลการทดลองแสดงค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3453 ซม$^{-1}$ แสดงหมู่ O-H stretching, ที่ 1675 และ 1625 ซม$^{-1}$ แสดงหมู่ carbonyl stretching และ aromatic vibration ที่ระหว่างช่วง 1605-1515 ซม$^{-1}$ (ภาพที่ 11)

2.4 ผลการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล แสดงโมเลคิวลาร์ไอออนเท่ากับ 322 เอเอ็มยู (M^+ 322 amu) ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{14}O_5$

m/z (% relative intensity) (ภาพที่ 12)

322 [M^+] (53), 293 (57), 277 (100), 265 (17), 249 (5), 209 (6), 181 (6), 165 (16), 152 (15), 119 (7), 97 (10)

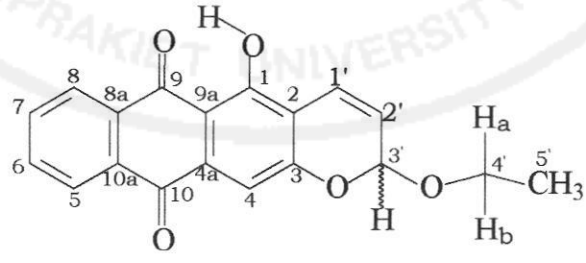
2.5 การทดสอบบอร์นทราเกอร์ (Borntrager Test) ได้สีชมพูเกิดขึ้นที่ชั้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ แสดงว่าเป็นสารแอนทราควิโนน

ส่วนที่ 3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารแอนทราควิโนน

3.1 ^{1}H NMR spectrum (ตารางที่ 1 ภาพที่ 13)

3.2 ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 1 ภาพที่ 14)

จากข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีเหล่านี้ จึงกำหนดสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้จากรากยอป่า ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยปรากฏในรายงานใด ดังนี้ (Morein A)



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ Morein A

ตารางที่ 1 โปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปคตรัมของ Morein A ที่ 600 และ 150 เมกะเฮิทซ์ใน $CDCl_3$

Carbon position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	160.32	-OH 13.27 (1H, s)
2	114.49	-
3	157.79	-
4	109.45	7.42 (1H, s)
4 a	133.61★	-
5	127.34	8.26 (1H, m)
6	134.22★★	7.78 (1H, m)
7	134.12★★	7.78 (1H, m)
8	126.79	8.28 (1H, m)
8 a	133.54★	-
9	187.15	-
9 a	110.86	-
10	181.98	-
10 a	133.40★	-
1′	119.77	7.17 (1H, d, J = 9.90 Hz)
2′	120.62	5.99 (1H, dd, J = 3.66, 9.90 Hz)
3′	95.61	5.82 (1H, d, J = 3.66 Hz)
4′a, 4′b	64.33	3.73 (1H, q, J = 7.14 Hz) 4.00 (1H, q, J = 7.14 Hz)
5′	15.19	1.23 (3H, t, J = 7.14 Hz)

★ และ ★★ สลับตำแหน่งกันได้

จากสเปคตรัมของ ^{1}H NMR (ตารางที่ 1 ภาพที่ 13 13a และ 13b) แสดงว่ามี hydroxy proton 1 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 1 chemical shift (δ) ที่สนามต่ำ (downfield) 13.27 ppm (as broad singlet) เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิล ที่ตำแหน่ง 9 downfield chemical shift ของ aromatic methine proton สังเกตเห็นได้ที่ δ 7.42 8.26 7.78 7.78 8.28 ppm แสดงว่ามี aromatic proton ที่ตำแหน่งที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ

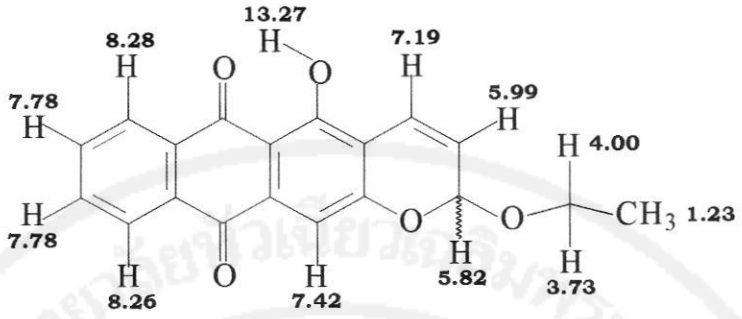
ที่ δ 7.17 ppm (d, J = 9.90 Hz) δ 5.99 ppm (dd, J = 3.66, 9.90 Hz) δ 5.82 ppm (d, J = 3.66 Hz) แสดงว่ามี proton 1 อะตอม ที่ตำแหน่งที่ $1'$, $2'$ และ $3'$ ตามลำดับ (ABX system) ที่ δ 3.73 และ 4.00 ppm (q, J = 7.14 Hz, q, J = 7.14 Hz) แสดงว่ามี methylene proton ($H_{4'a}$ และ $H_{4'b}$) ที่ตำแหน่งที่ $4'$ และที่ δ 1.23 ppm (t, J = 7.14 Hz) แสดงว่ามี methyl proton ที่ตำแหน่งที่ $5'$

จากสเปคตรัมของ ^{13}C NMR (ตารางที่ 1 ภาพที่ 14) บอกว่าสารตัวนี้ประกอบด้วย คาร์บอน 19 ตัว จาก DEPT (ภาพที่ 15) พบว่ามี quarternary carbon 9 ตัว methylene carbon 1 ตัว methine carbon 8 ตัว และ methyl carbon 1 ตัว ที่ δ 187.15 และ 181.98 ppm แสดงว่า มี ketone group ที่ตำแหน่ง 9 และ 10 และสัญญาณที่ δ 160.32 แสดงถึงคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 1 ที่มีหมู่ hydroxy

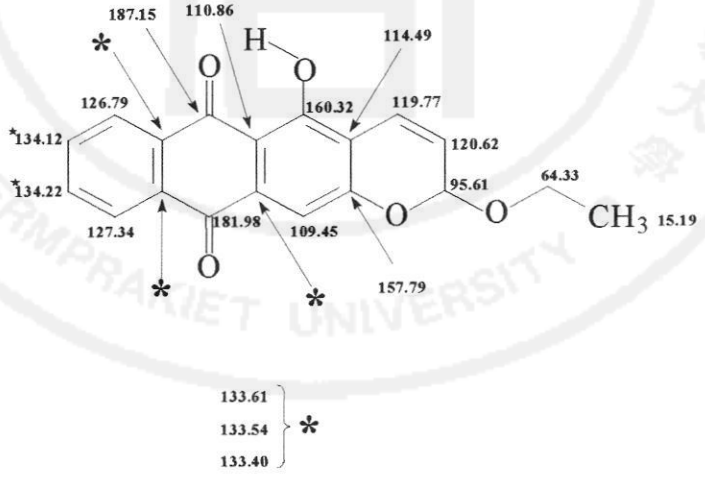
จากสเปคตรัมของ HMQC (ภาพที่ 16) ช่วยในการกำหนดตำแหน่งของคาร์บอนที่ correlate กับ proton (^{1}H - ^{13}C correlation) ซึ่งจะแสดงให้เห็นด้วยเส้นโค้ง ดังแสดงในภาพที่ 5

จากสเปคตรัมของ HMBC (ภาพที่ 17) จะช่วยยืนยันถึงความสัมพันธ์ที่สำคัญระหว่าง โปรตอนและคาร์บอน (long range ^{1}H - ^{13}C correlation) ซึ่งจะแสดงให้เห็นด้วยเส้นโค้ง ดัง แสดงในภาพที่ 6

อนึ่ง คาร์บอนที่ตำแหน่ง $3'$ มีลักษณะเป็น chiral center methine proton ที่ตำแหน่งนี้ อาจเป็น α หรือ β ส่งผลให้มี isomer ขึ้นได้ 2 ชนิด จึงจำเป็นต้องมีการวัดค่า optical rotation และแสดงค่า specific rotation $[\alpha]_D$ ด้วย แต่เนื่องจากมีเวลาจำกัดและความไม่พร้อมของเครื่อง มือ จึงไม่ได้รายงานผลในส่วนนี้ไว้

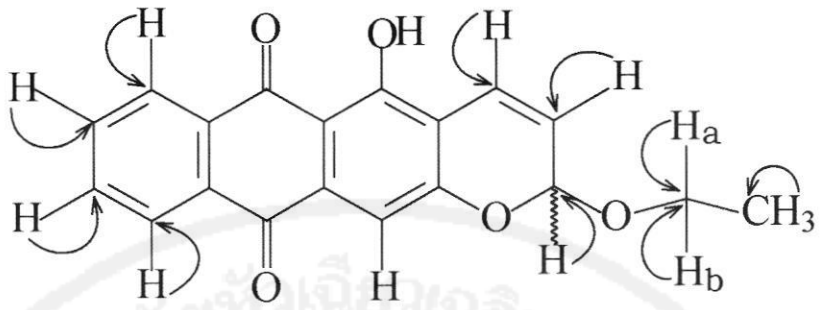


ภาพที่ 5 ภาพการกำหนดตำแหน่งไฮโดรเจน ของ Morein A

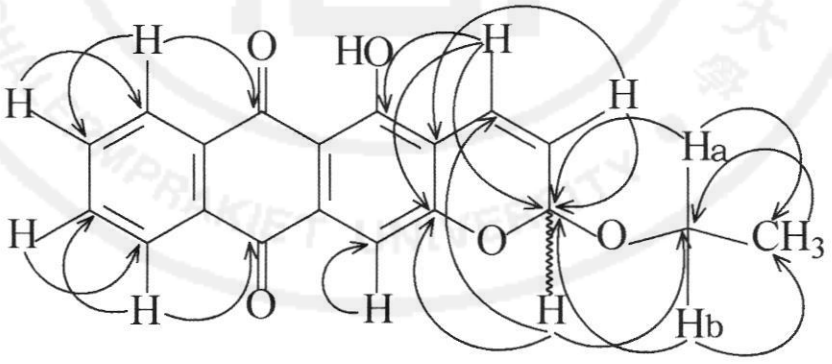


★ และ ★★ สลับตำแหน่งกันได้

ภาพที่ 6 ภาพการกำหนดตำแหน่งคาร์บอน ของ Morein A



ภาพที่ 7 ภาพความสัมพันธ์ของไฮโดรเจนและคาร์บอน จาก HMQC สเปคตรัม ของ Morein A



ภาพที่ 8 ภาพความสัมพันธ์ช่วงไกลระยะ 2-3 คาร์บอนของไฮโดรเจนและคาร์บอน จาก HMBQ สเปคตรัม ของ Morein A

ส่วนที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ

การทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่ม ดังนี้

Staphylococcus aureus ATCC 29213 เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มกรัมบวก

Escherichia coli ATCC 25922 เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มกรัมลบ

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มกรัมลบ

Bacillus subtilis ATCC 6633 เป็นตัวแทนเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสร้างสปอร์

Candida albicans ATCC 10231 เป็นตัวแทนเชื้อรา

Trichophyton mentagrophytes เชื้อราแยกจากผู้ป่วยฮ่องกงฟุต

4.1 การทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ต่อต้านทั้งเชื้อแบคทีเรีย (*S. aureus*) และเชื้อรา (*T. mentagrophytes*) ดังแสดงในตารางที่ 2 (ภาพแสดงฤทธิ์การฆ่าเชื้อดังแสดงในภาพที่ 18 และ 19)

4.2 ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร และ *T. mentagrophytes* ร้อยละ 1.25 น้ำหนัก/ปริมาตร (ตารางที่ 4)

ส่วนที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารบริสุทธิ์ Morein A

5.1 การทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ต่อต้านทั้งเชื้อแบคทีเรีย (*S. aureus*) และเชื้อรา (*T. mentagrophytes*) ดังแสดงในตารางที่ 4 (ภาพแสดงฤทธิ์การฆ่าเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 20 และ 21)

5.2 ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร และ *T. mentagrophytes* มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร (ตารางที่ 5)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ จะเห็นว่า ความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อรา *T. mentagrophytes* ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบมีมากมายหลายชนิด อาจมีบางชนิดที่ช่วยเสริมฤทธิ์กัน ทำให้มีความแรงเพิ่มขึ้น ส่วนฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียนั้น ค่าความแรงมีความแตกต่างที่ไม่ชัดเจนนัก ซึ่งก็ไม่ได้หมายความว่าในสารสกัดหยาบจะไม่มีสารอื่นที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่ อาจจะมีอีกหลายชนิด แต่ในทางกลับกัน สารเหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ต้านกันเองก็ได้

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า

เชื้อจุลินทรีย์	ผลการทดลอง	เงื่อนไข
Staphylococcus aureus ATCC 29213	+ (16 มม.)	37^{O} ซ 24 ชม.
Escherchia coli ATCC 25922	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Bacillus subtillis ATCC 6633	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Candidaa lbicans ATCC 10231	-	30^{O} ซ 48-72 ชม.
Trichophyton mentagrophytes แยกจากผู้ป่วย	+++ (34 มม.)	30^{O} ซ 48-72 ชม.

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของ **Morein A**

เชื้อจุลินทรีย์	ผลการทดลอง	เงื่อนไข
Staphylococcus aureus ATCC 29213	+ (13 มม.)	37^{O} ซ 24 ชม.
Escherchia coli ATCC 25922	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Bacillus subtillis ATCC 6633	-	37^{O} ซ 24 ชม.
Candidaa lbicans ATCC 10231	-	30^{O} ซ 48-72 ชม.
Trichophyton mentagrophytes แยกจากผู้ป่วย	+ (10 มม.)	30^{O} ซ 48-72 ชม.

- ไม่แสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพ

\+ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (zone) = 10-19 มม. (แสดงฤทธิ์น้อย)

++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (zone) = 20-25 มม.

+++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (zone) = 25-30 มม.

++++ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (zone) = >30 มม.

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า (ร้อยละน้ำหนัก/ปริมาตร)

เชื้อจุลินทรีย์	ผลการทดลอง	เงื่อนไข
Staphylococcus aureus ATCC 29213	>5.00	37^{O} ซ 24 ชม.
Trichophyton mentagrophytes แยกจากผู้ป่วย	1.25	30^{O} ซ 72 ชม.

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพ **Morein A** (ร้อยละ น้ำหนัก/ปริมาตร)

เชื้อจุลินทรีย์	ผลการทดลอง	เงื่อนไข
Staphylococcus aureus ATCC 29213	>5.00	37^{O} ซ 24 ชม.
Trichophyton mentagrophytes แยกจากผู้ป่วย	>5.00	30^{O} ซ 72 ชม.

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การสกัดแยกสารสำคัญจากรากต้นยอป่า (*Morinda coreia* Ham., Rubiaceae) พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม pyrano-anthraquinone 1 ชนิด คือ Morein A ซึ่งเป็นชนิดหายาก ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ให้ผลบวกกับการทดสอบบอร์นทราเกอร์ ที่ใช้ทดสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนน

การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เช่นการตรวจหาจุดหลอมเหลว พบว่าสารชนิดนี้สลายตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 191-193^{0} ซ เมื่อตรวจสอบสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตสูงสุดในระหว่างช่วงคลื่น 250-450 นาโนเมตร (เมธิลแอลกอฮอล์) ได้ค่าที่ 270, 340 และ 410 นาโนเมตร การตรวจหาหมู่ฟังก์ชั่น ที่ความถี่ของช่วงคลื่นอินฟราเรดระหว่าง 4,000-400 ซม$^{-1}$ (โพแตสเซียมโบรไมด์) พบหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ 3395 ซม$^{-1}$ และ คาร์บอนิล (C-O) ที่ 1675 และ 1625 ซม$^{-1}$ และการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ ที่ 70 อิเลคตรอนโวลท์ พบว่า Morein A มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 322 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล คือ $C_{19}H_{14}O_5$

การอธิบายสูตรโครงสร้าง ใช้เทคนิค เอกมิติ และ ทวิมิติ นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ เมื่อทำการกำหนด (assignment) ตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนและคาร์บอนในสูตรโครงสร้าง พบว่ามีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 4 อย่างไม่มีข้อสงสัย

การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ *Staphylococcus aureus* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร) และเชื้อรา คือ *Trichophyton mentagrophytes* (MIC ร้อยละ 1.25 น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัด Morein A แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร) และ *T. mentagrophytes* (MIC มากกว่าร้อยละ 5.00 น้ำหนัก/ปริมาตร)

อภิปรายและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยพื้นฐาน มุ่งเน้นการหาองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นข้อมูลสำหรับใช้พัฒนาต่อในด้านต่างๆ ได้แก่ ด้านเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมสีย้อม อย่างไรก็ดี งานศึกษาต้นยอป่าครั้งนี้เป็นเพียงการเริ่มต้นการสำรวจองค์ประกอบทางเคมีเท่านั้น ยังมีงานที่ควรต้องทำต่อคือการแยกสารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มแอนทราควิโนน ที่พอจะทราบในเบื้องต้นแล้วว่า

ยังมีอยู่อีกหลายชนิดที่รอการพิสูจน์ทั้งทางเคมีและชีวภาพ นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพแล้ว การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาก็มีความจำเป็นต้องทำการศึกษาต่ออีกด้วยเช่นกัน การค้นหาแหล่งวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศ เพื่อเพิ่มทางเลือก ทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ และการพัฒนาศักยภาพของทรัพยากรบุคคล จึงเห็นควรได้รับการส่งเสริมจากมหาวิทยาลัยต่อไปอีก

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บรรณานุกรม

เต็ม สมิตินันท์. (2523). ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง.: 61, 222, 276.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. (2493). ไม้เทศเมืองไทย. พิมพ์ครั้งแรก. กรุงเทพฯ : เขษมบรรณกิจ. : 504-5.

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร (2537). สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม) พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : พี. เอ. ลิฟวิ่ง จำกัด : 130-131

Ali, AM : Ismail, NH : Mackeen, MM :Yazan, LS : Mohamed, SM : Ho, ASH and Lajis, NH. (2000) Antiviral, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Anthraquinones Isolated from the Roots of *Morinda elliptica* Pharmaceutical Biol 38 4 : 298-301

Barry, A.L. (1991). Procedures and Theoretical Considerations for Testing Antimicrobial Agents In Agar Media. In Lorian, V. (ed.). Antibiotics In Laboratory Medicine. 3rd Ed.pp. 1-16 Baltimore. William & Wilkins Co.

Botanical Name *Morinda coreia* [cited 2002 Jan 23]. [1 screens]. Available from : URL:http://flora.sut.ac.th/thai/botanict.htlm

Ismail, NH : Ali, AM : Aimi, N : Kitajima, M : Takayama, H and Lajis, NH. (1997) Anthraquinones from *Morinda elliptica* Phytochemistry 45 8: 1723-1725.

Li S., Ouyang Q., Tan X., Shi S., and Yao Z. (1991) Chemical Constituents of *Morinda officinalis* How. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* Nov; 16 (11) : 675-6, 703.

Malcolm, S.A. and Sofora, E.A. (1969). Antimicrobial Activity of Selected Nigerian Folk Remidies and Their Constituents Plants. Lloydia 32 : 512-7.

Mann, C.M. and Markham, J. L. (1998). A New Method for Determining The Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. J Appl Microbiol 84 : 538-544.

Rath, G : Ndonzao, M and Hostettmann, K. (1995) Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida* Int J Pharmacog 33 2 : 107-114

Trease, G.E and Evans, W.C (1989). Pharmacognosy. 13th ed. p 420 London : University Press, Cambridge Great Britain.

Tripetch Kanchanapoom, Ryoji Kasai, Kazuo Yamasaki (2001). Chemical Constituents of *Morinda coreia* International Workshop on Bioactive Natural Products, October 10, 2001 The Auditorium of Science Council of Japan

Tyler, V.E.; Brady, L.R and Robbers, J.E. (1988). Pharmacognosy. 9th ed. pp 103, 133. Philadelphia : Lea & Feber

Yang, YJ : Shu, HY and Min Z. D. (1992).Anthraquinones isolated from *Morinda officinalis* and *Damnacanthus indicus*. *Yao Xue Bao* ; 27(5) : 358-64

ภาคผนวก

ภาคผนวก 2

ภาคผนวก 2

ข้อมูลสมุนไพร

ต้นยอป่า

ชื่อสามัญ ยอป่า (ไทย อิสาณ ใต้) ยอป่าใบขน สลักป่า สลักหลวง (พายัพ) อุ้มลูกดูหนัง (สระบุรี) กะมูดู (มลายู)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Morinda coreia* Ham. (Synomyms : *Morinda tomentosa* Roth., *Morinda tinctoria* Roxb.)

วงศ์ RUBIACEAE

ลักษณะของพืช ยอป่า เป็นไม้พุ่มถึงไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงได้ถึง 15 เมตร เปลือกต้นหนาสีน้ำตาลเหลือง แตกเป็นร่องลึกตามยาวลำต้น ต้นแก่สีเทา-น้ำตาลแดง กิ่งอ่อนหน้าตัดเป็นสี่เหลี่ยม กิ่งอ่อนและใบอ่อนมีขนนุ่มปกคลุมมากกว่าใบแก่ ใบเดี่ยวสีเขียวอมเหลือง (ใบแห้งสีค่อนข้างดำ) เรียงตัวแบบตรงข้าม มีหูใบร่วม (interpetiolar stipule) 2 อัน รูปสามเหลี่ยม ฐานกว้าง 2-5 ม.ม. ยาว 1.5-4 มม. ใบรูปไข่กลับหรือรูปขอบขนาน ขนาดใบกว้าง 3-10 ซม. ยาว 8-20 ซม. ก้านใบกลม ยาว 1.5-2.5 ซม โคนใบเรียวแคบลงค่อนข้างแหลมหรือ oblique ปลายใบกว้างหรือเรียวแคบลงและมีติ่งแหลม ขอบใบเรียบ ผิวหลังใบมีขนสากมือ ท้องใบขนนุ่มและยาวกว่าด้านหลังใบ เนื้อแก่นไม้มีสีเหลืองเข้ม ดอกเล็กสีขาว.ออกเป็นช่อแบบ head คล้ายดอกยอบ้าน ออกตามซอกใบหรือปลายกิ่ง ก้านช่อดอกยาว 1-3 ซม. ฐานรองดอกอวบอ้วนเป็นรูปทรงกลม ผิวนอกของฐานรองดอกเป็นส่วนรังไข่ของดอกย่อยที่เชื่อมติดกันเป็นก้อนกลมหรือรี เส้นผ่าศูนย์กลาง ฐานรองดอกกว้าง 7-10 ซม ดอกย่อย ไม่มีก้านดอก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียวแกมขาว ติดกันเป็นรูปถ้วย ยาว 0.5-1 มม.

กลีบดอก 5 กลีบ สีขาวติดกันเป็นหลอดยาว 10-15 ม.ม. ตอนปลายแยกเป็น 5 แฉก แต่ละแฉกกว้าง 2-3.5 ม.ม. ยาว 7-9 ม.ม. ปลายแหลม ขอบเรียบ เกสรเพศผู้มี 5 อัน ติดบนหลอดกลีบดอก ก้านชูอับเรณูสั้นกว่าหลอดกลีบดอก เกสรเพศเมียมี 1 อัน รังไข่เป็นชนิด inferior สีเขียว ก้านเกสรยาว 15-18 มม. ยาวพ้นหลอดกลีบดอก ยอดเกสรเป็นเส้น 2 แฉก แต่ละแฉกยาว 2-4 มม. รังไข่มี 2 ห้อง มีไข่อ่อนห้องละ 1 ผลเชื่อมติดกันเป็นผลรวมที่มีเนื้อสดแบบ drupe รูปร่างยาวรี กว้าง 1.5-3 ซ.ม. ยาว 2-5 ซ.ม. ขนาดเล็กกว่ายอบ้าน มีตารอบตัวเหมือนกัน เมล็ดจำนวนมาก รูปยาวบิดเบี้ยว มีเกิดตามป่าเบญจพรรณป่าโปร่งทั่วไปแถวจังหวัดสระบุรี และมีประปรายตามภาคอื่นๆ พวกขายสมุนไพรมักนำมาขายตามร้านในงานเทศกาลนมัสการพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี และเปลี่ยนแปลงชื่อใหม่ว่า "อุ้มลูกดูหนัง" เพื่อให้ประชาชนเข้าใจว่าเป็นของใหม่

ประโยชน์ทางยา แพทย์ตามชนบทใช้แก่นต้มหรือดองสุรา รสขมร้อน รับประทานเป็นยาขับเลือดและน้ำคาวปลาสำหรับสตรีที่เพิ่งคลอดบุตรใหม่ๆให้แห้ง และป้องกันสันนิบาตหน้าเพลิง บาดทะยักปากมดลูกได้ด้วย ตามปกติเป็นยาขับฟอกโลหิตระดู แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ ขับผายลมดี

การขยายพันธุ์ ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ผลจะแก่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคม

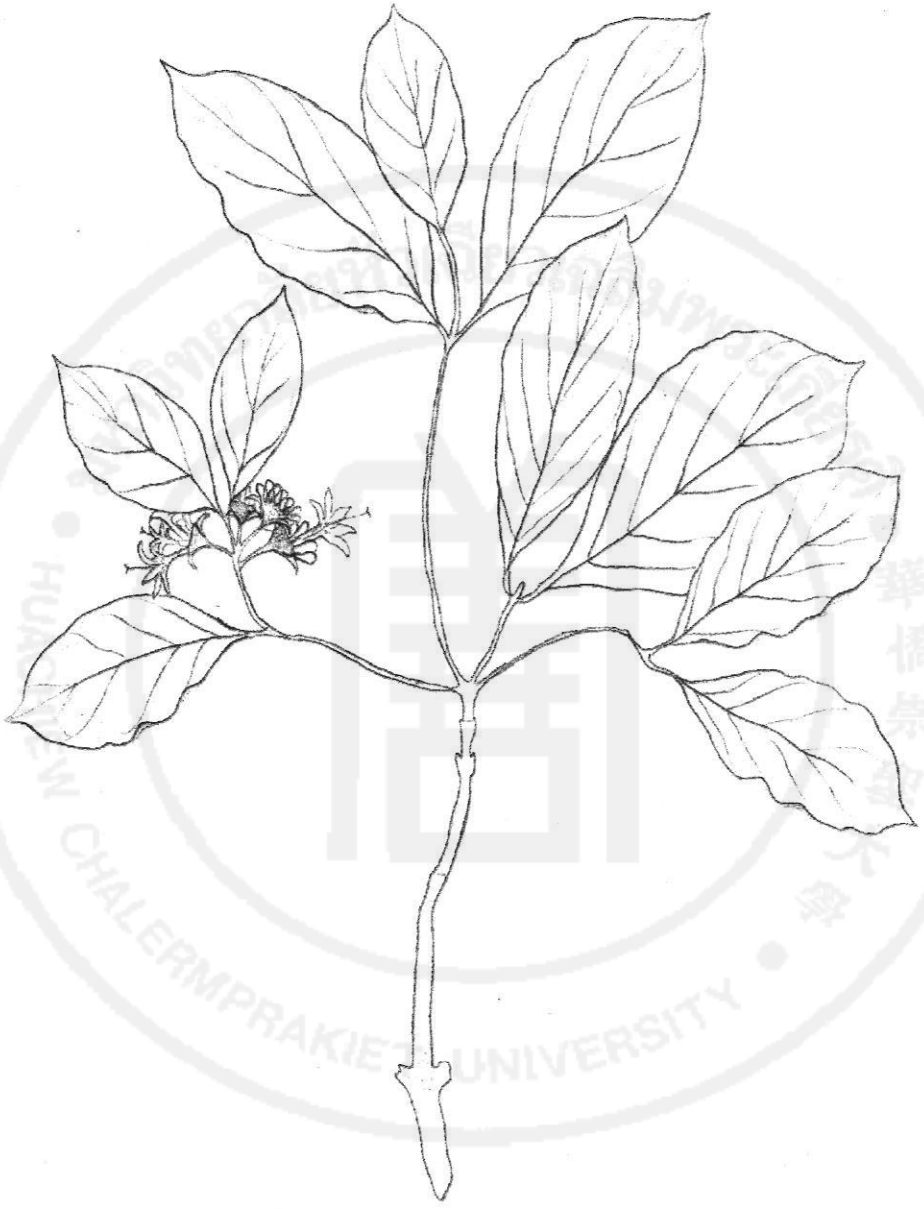
Standard Herbarium Specimen

THE FOREST HERBARIUM (BKF)
ROYAL FOREST DEPARTMENT
FLORA OF THAILAND

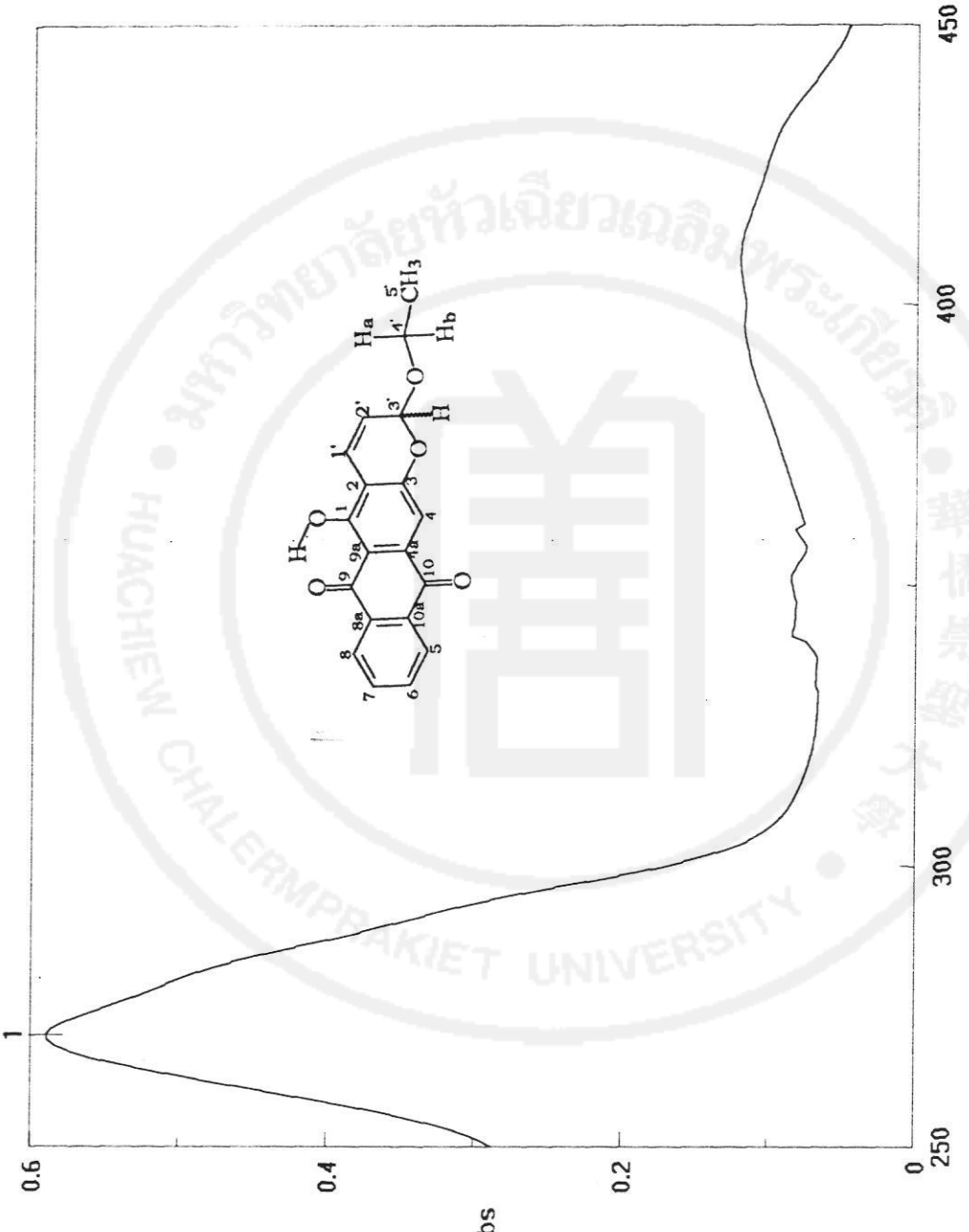
รูปแสดงแหล่งที่พบต้นยอป่า

BKF No.	22640
SN.	052788
Botanical name :	*Morinda coreia* Ham.
Local name :	ยอป่า
Locality :	ท่าเรือ กิ่งอำเภอ ไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี
Date :	29/3/92
Note :	Tree ขนาดเล็ก ขึ้นตามป่าแพะ เปลือกนอกต้นขรุขระ เปลือกในเมื่อสับสีเหลือง ใบเดี่ยว ดอกสีขาว มีกลิ่นหอม เนื้อไม้สีเหลือง

Collector :Pricha No.385

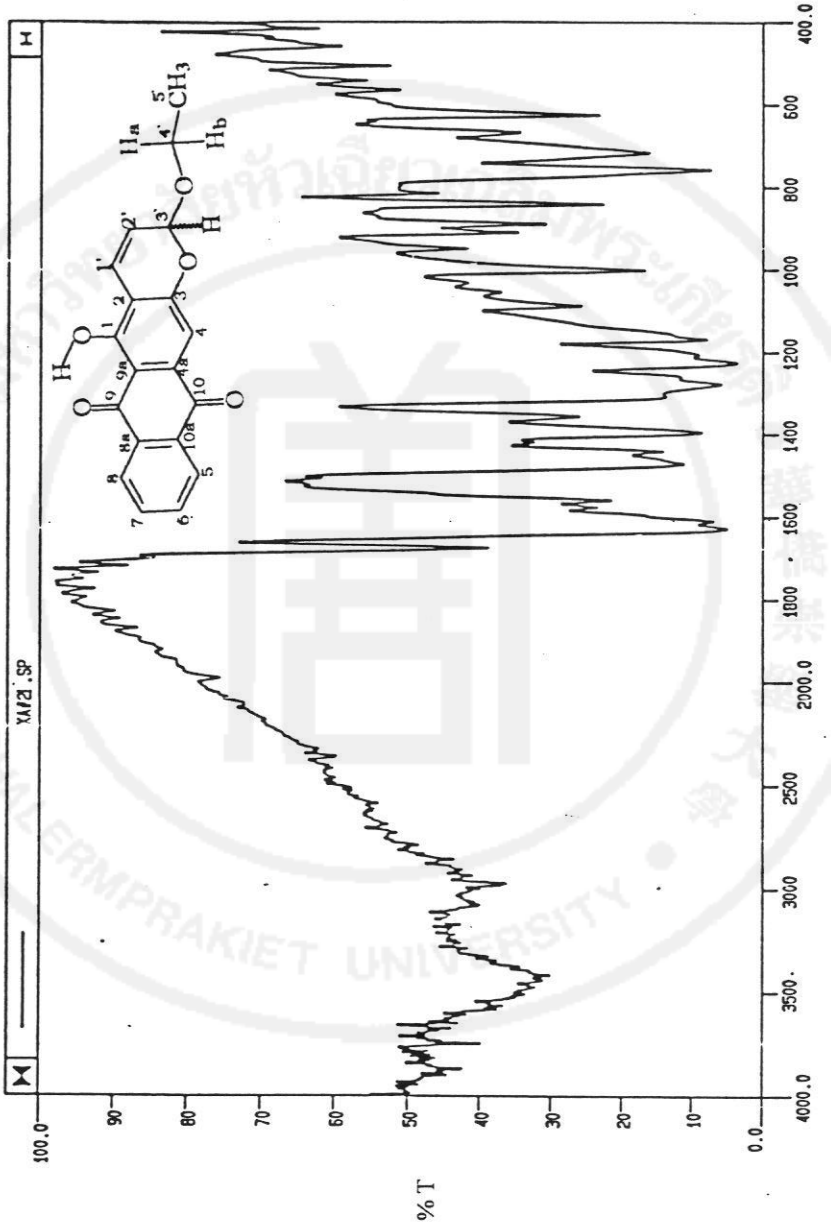


ภาพที่ 9 ภาพลายเส้นยอป่า ***Morinda coreia*** **Ham.**

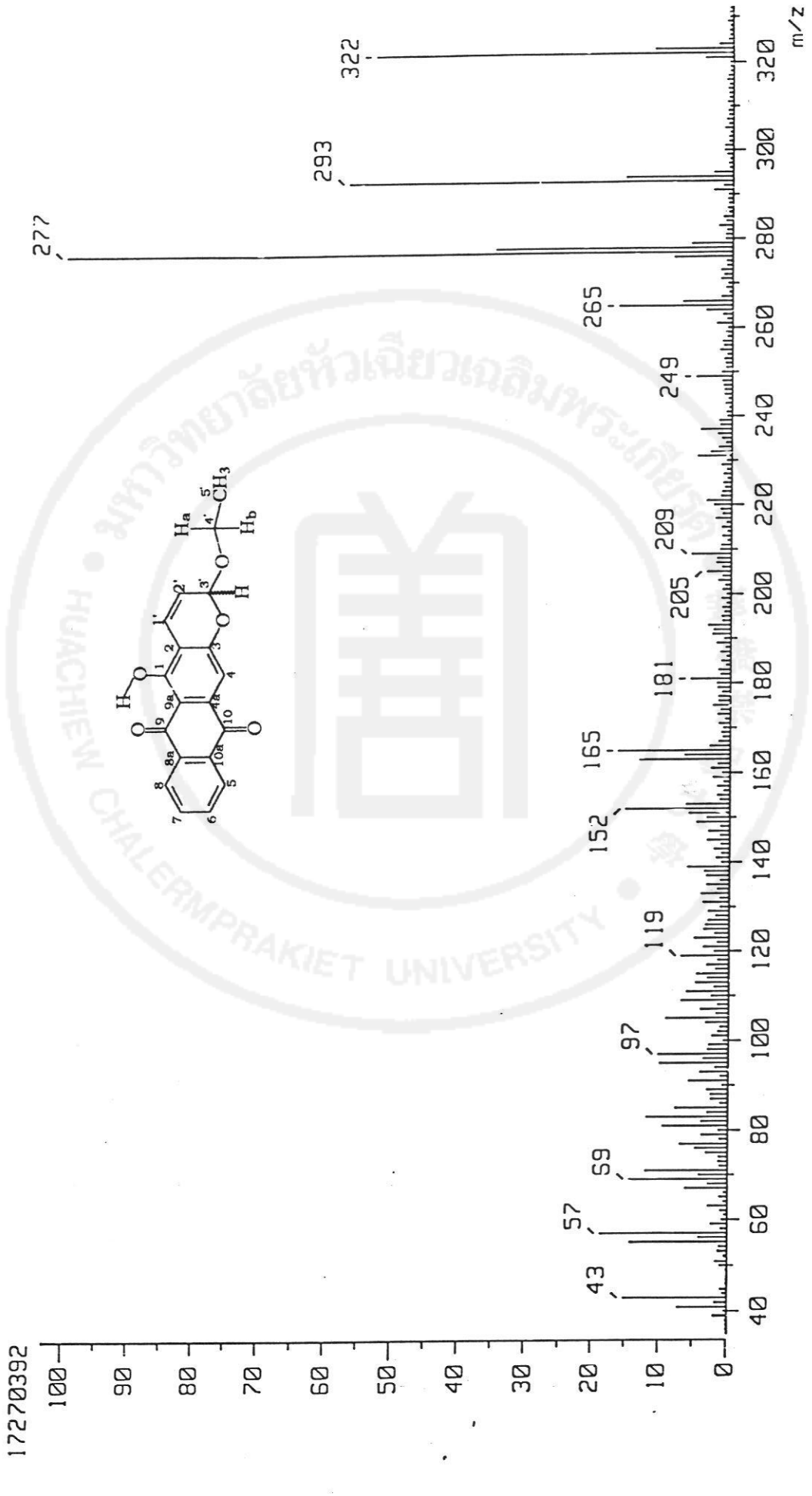


ภาพที่ 10 ภาพอัลตราไวโอเล็ตสเปคตรัมของ Morein A

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

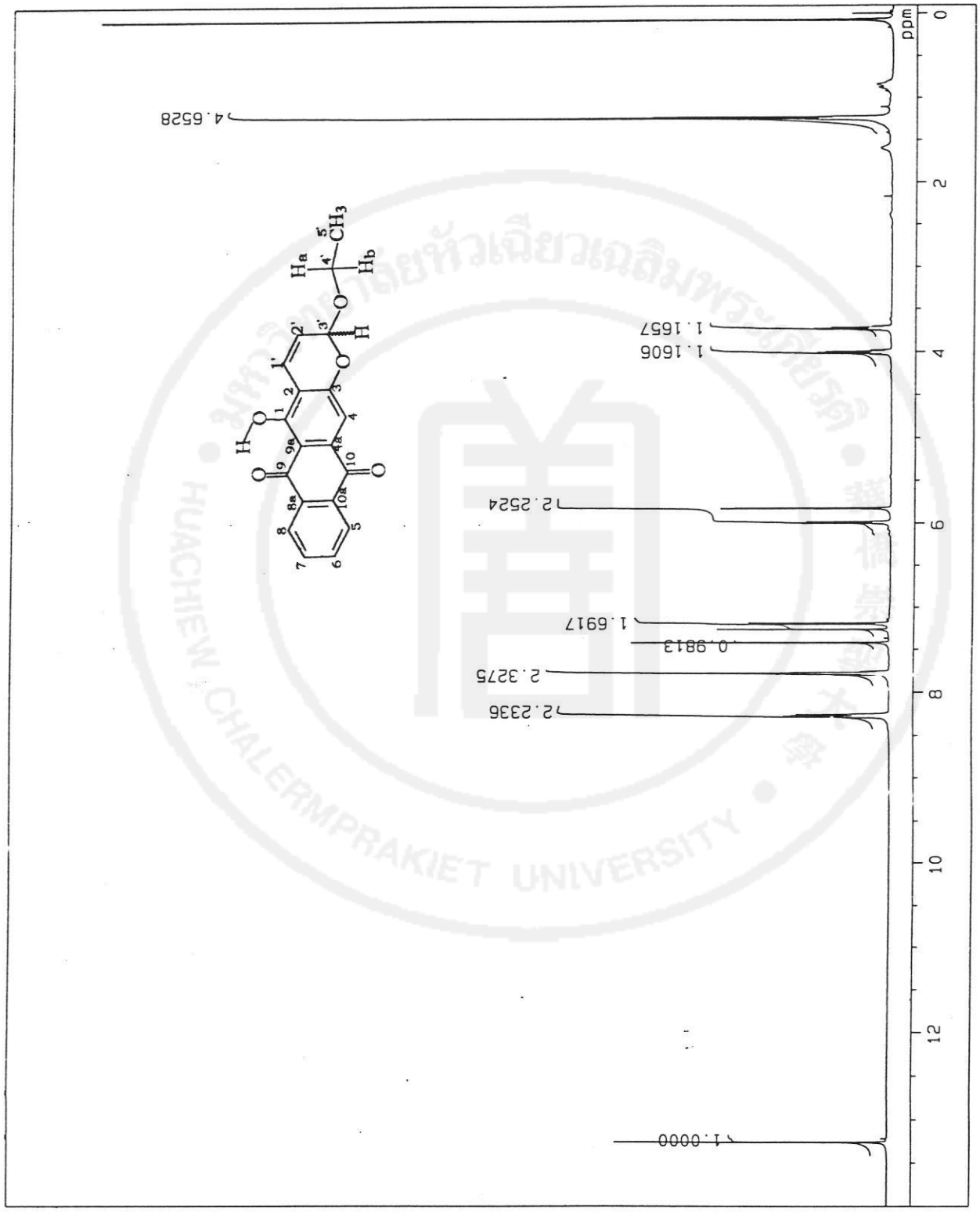


ภาพที่ 11 ภาพอินฟราเรดสเปคตรัมของ Morein A

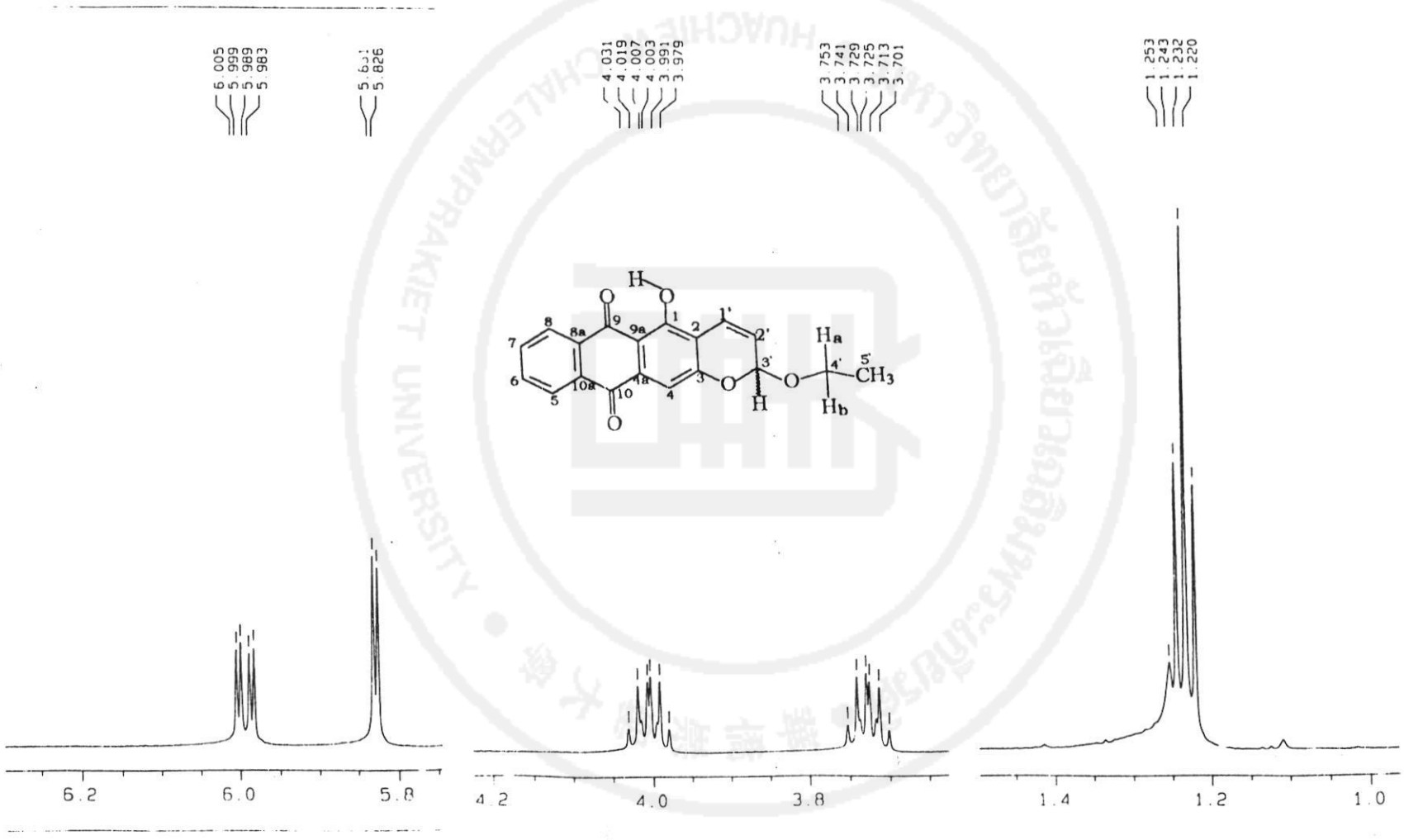


ภาพที่ 12 ภาพแมสสเปคตรัมของ Morcin A (*m/z* % relative intensity)

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY



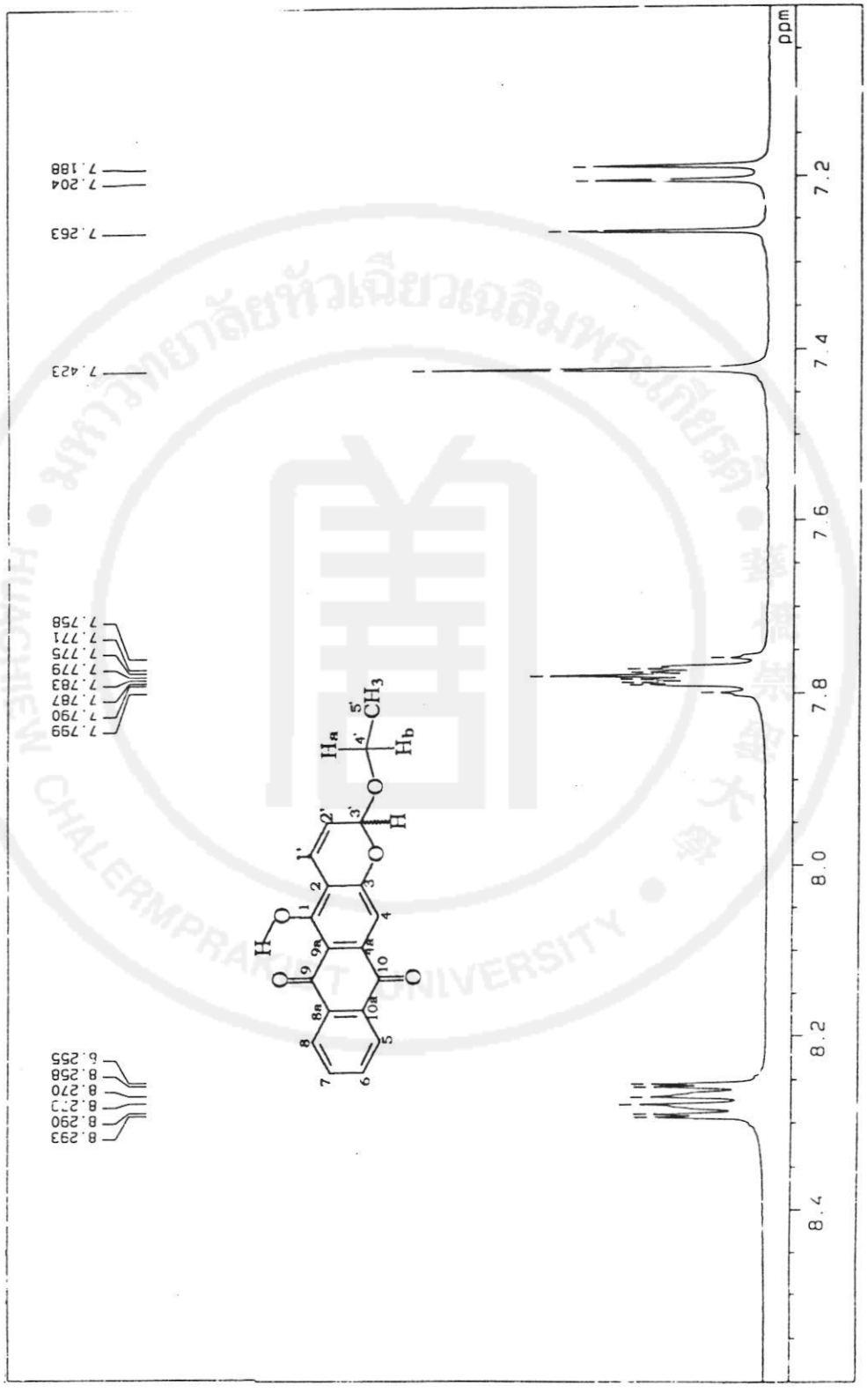
ภาพที่ 13 ภาพ ^{1}H NMR สเปกตรัมของ Morein A



ภาพที่ 13a ภาพขยาย ^{1}H NMR สเปคตรัมของ Morein A

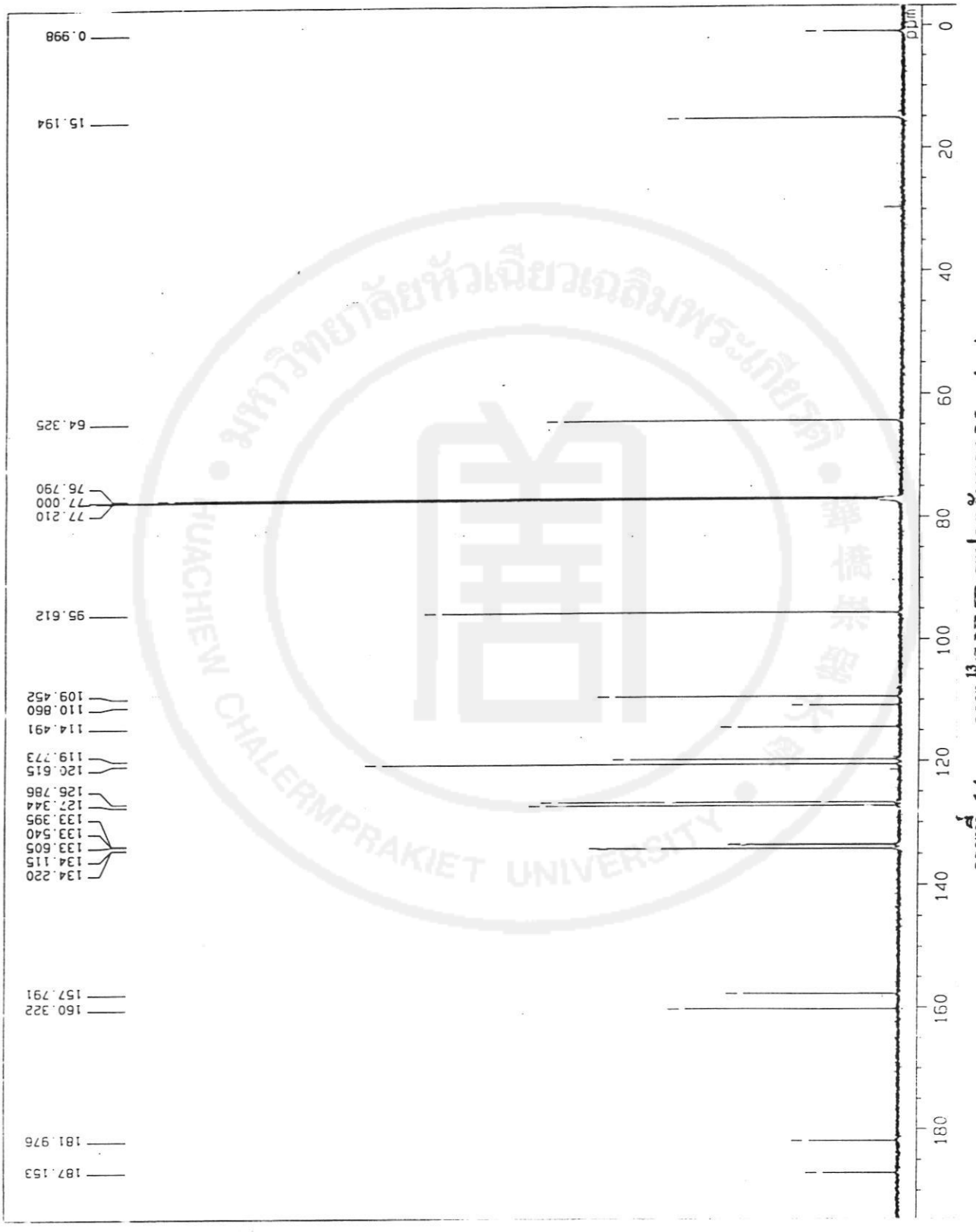
ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

0043. 54560

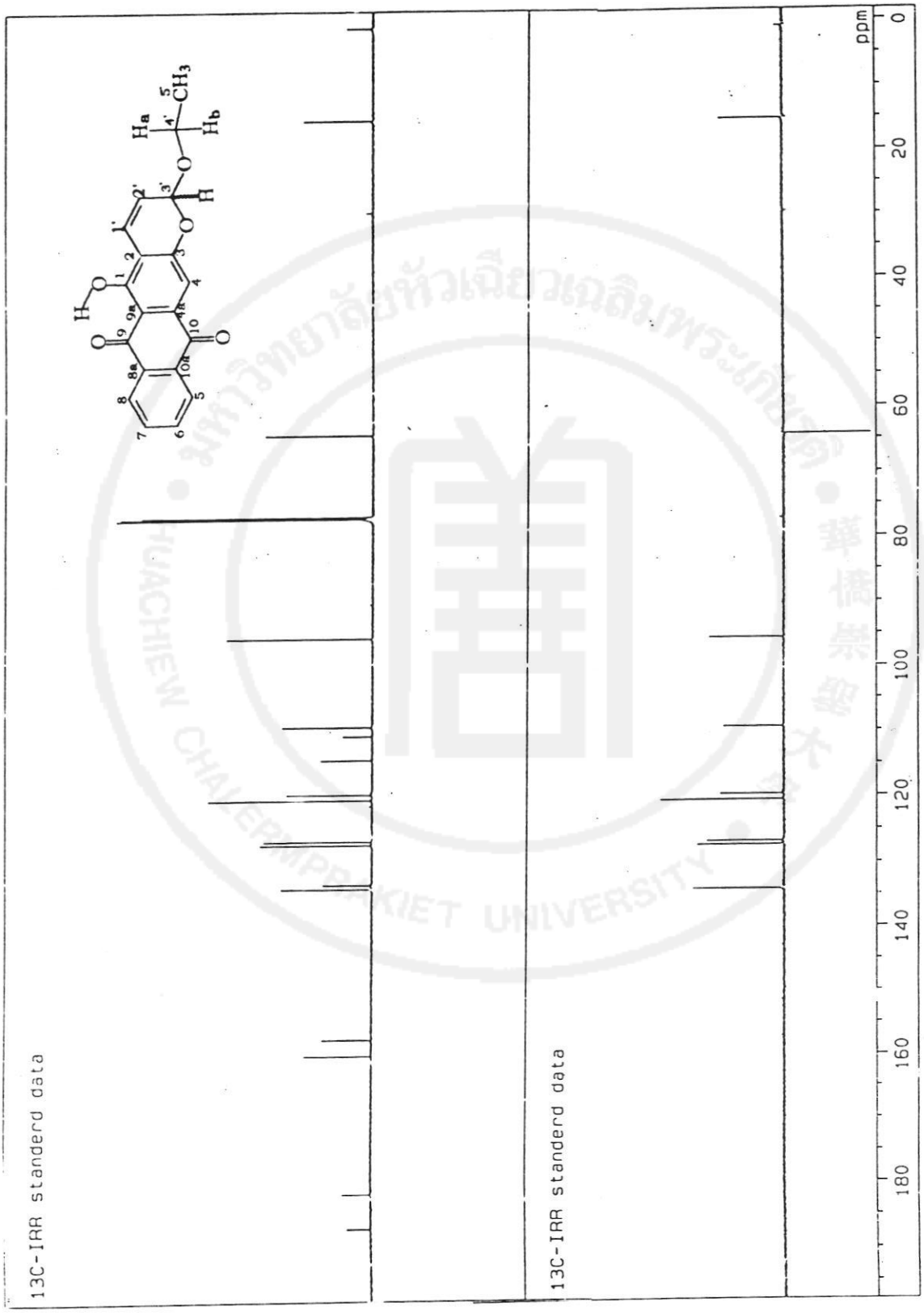


ภาพที่ 13b ภาพขยาย ^{1}H NMR สเปคตรัมของ Morein A

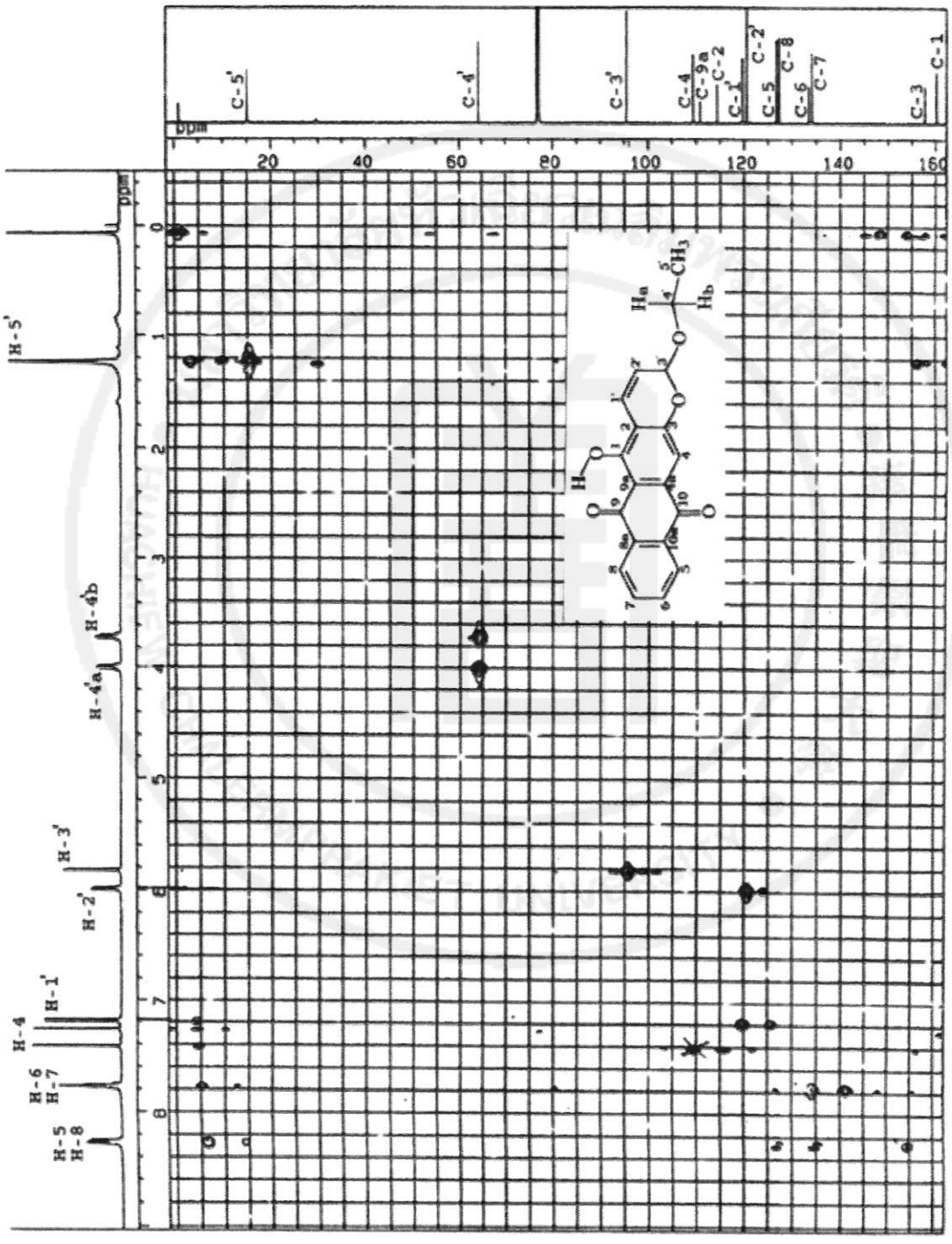
วฤก
กล
พ46ฤก
2545



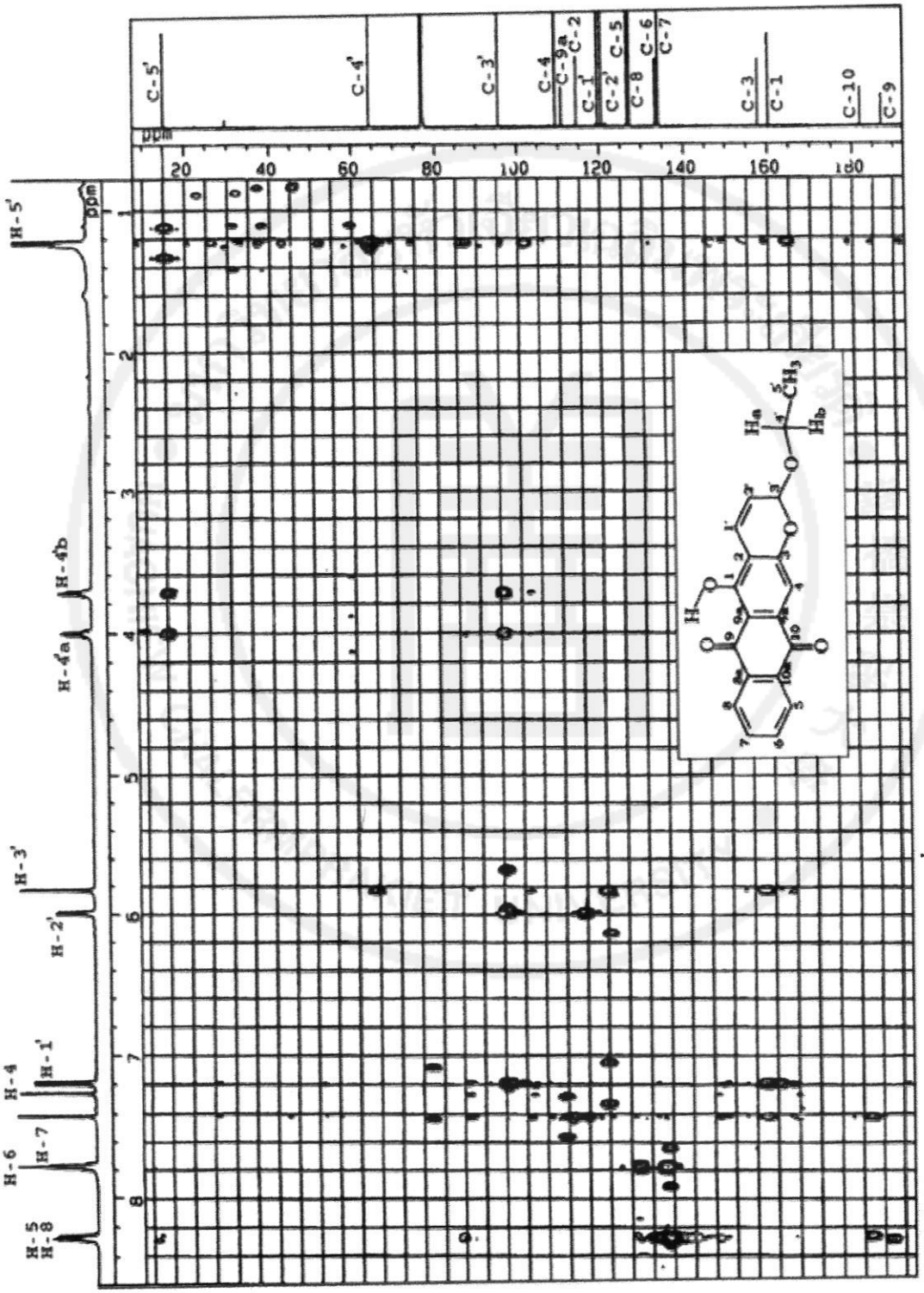
ภาพที่ 14 ภาพ ^{13}C NMR สเปคตรัมของ Morein A



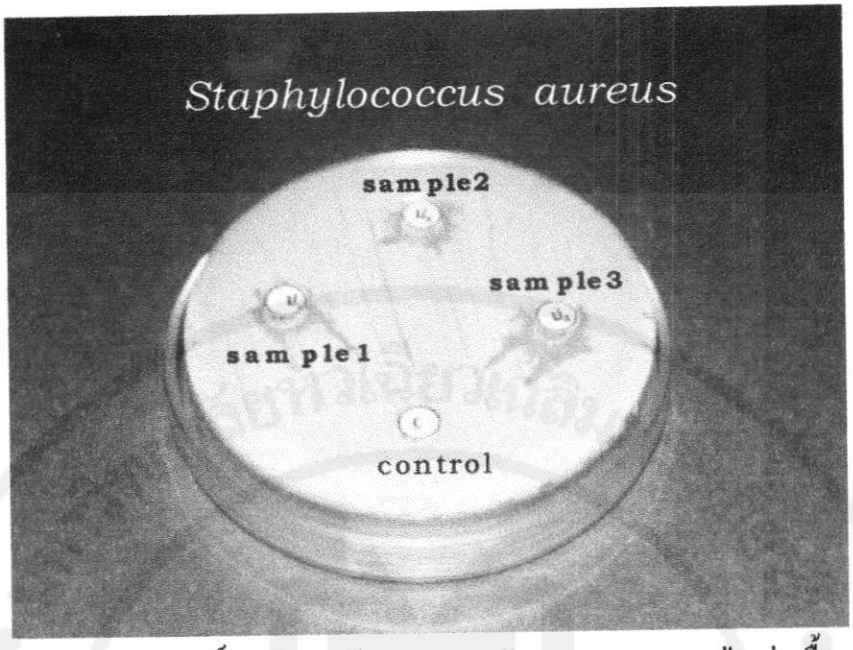
ภาพที่ 15 ภาพ DEPT สเปคตรัมของ Morein A



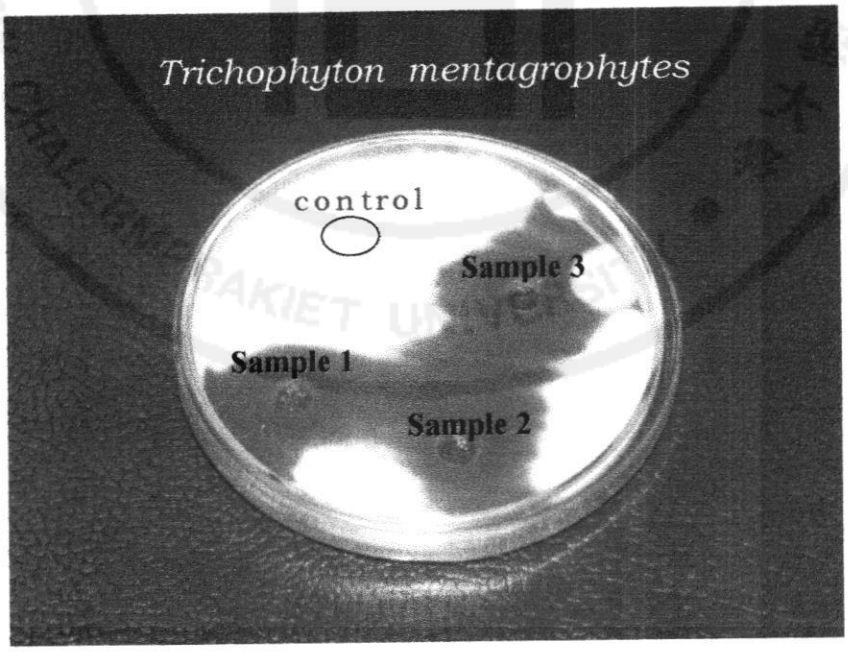
ภาพที่ 16 ภาพ HMQC สเปคตรัมของ Morein A



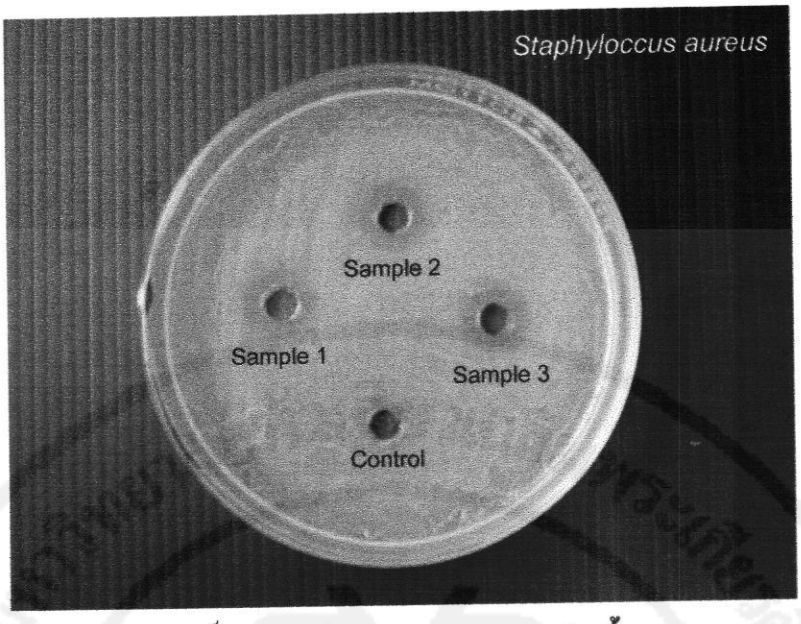
ภาพที่ 17 ภาพ HMBC สเปคตรัม ของ Morein A



ภาพที่ 18 ภาพแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ความเข้มข้น 10 % โดยใช้ 0.1 % Tween 80 เป็น control และทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม (sample 1,2,3)

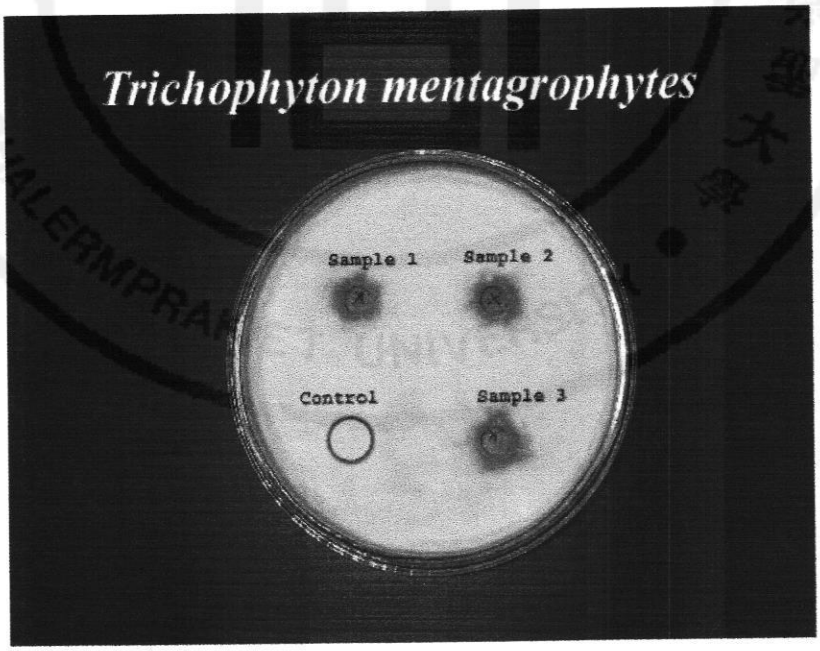


ภาพที่ 19 ภาพแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากรากยอป่า ต่อเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ที่ความเข้มข้น 10 % โดยใช้ 0.1 % Tween 80 เป็น control และทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม (sample 1,2,3)



ภาพที่ 20 **ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A ต่อเชื้อ**

Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้น 10 % โดยใช้ 0.1 % Tween 80 เป็น control และทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม (sample 1,2,3)



ภาพที่ 21 **ภาพแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพของ Morein A ต่อเชื้อ**

Trichophyton mentagrophytes ที่ความเข้มข้น 10 % โดยใช้ 0.1 % Tween 80 เป็น control และทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม (sample 1,2,3)

ภาคผนวก 1

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพวงน้อย โลหะขจรพันธ์

ประวัติการศึกษา ภ.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภ.ม. (จุลชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1494, 1495