

พืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ *Streptococcus mutans*
และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

นางสาวผกาวัลย์ มุสิกพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THAI MEDICINAL PLANTS EXHIBITING ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST
Streptococcus mutans AND *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Miss Phakawan Musikapong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

พืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ *Streptococcus mutans*
และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

โดย

นางสาวผกาวัลย์ มุสิกพงศ์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภาคกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ กักผล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภาคกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย)

ผกาวัลย์ มุสิกพงศ์ : พืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ *Streptococcus mutans* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. (THAI MEDICINAL PLANTS EXHIBITING ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *Streptococcus mutans* AND *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.สุรัชย์ พรหมกุล 130 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย โดยนำพืชสมุนไพรไทย 63 ชนิด มาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค ฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธี agar diffusion พบว่ามีสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างน้อย 1 ชนิด และสารสกัดเมทานอลจากรากอัญชัน (*Clitorea ternatea* Linn.) สามารถยับยั้ง *A. actinomycetemcomitans* ได้ดี โดยมีบริเวณยับยั้ง 12 มิลลิเมตร จึงคัดเลือกมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้สารใหม่ 3 ชนิด คือ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one 1, (+)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one 2 และ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)furan-2(5H)-one 3 นำสารบริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้ง *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสาร 1 สามารถยับยั้งการเจริญต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยมีค่า MIC เป็น 0.003 ไมโครโมลาร์ และ 160.092 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สาร 2 มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* เป็น 0.033 ไมโครโมลาร์ และ 0.003 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และสาร 3 มีค่า MIC ต่อ *A. actinomycetemcomitans* เป็น 0.003 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นของสารเป็น 146.053 ไมโครโมลาร์

สาขาวิชา:.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต:.....

ปีการศึกษา:.....2551.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:.....

4872376723 :MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIMICROBIAL/ MEDICINAL PLANT/ ROOT/ *Clitoria ternatea*/ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

PHAKAWAN MUSIKAPONG : THAI MEDICINAL PLANTS EXHIBITING ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *Streptococcus mutans* AND *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D.,130 pp.

The objective of this research is to study antimicrobial activity of Thai medicinal plant extracts against *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Dichloromethane and methanol extracts of sixty-three Thai medicinal plants were screened for antimicrobial activities against cariogenic and periodontopathic bacteria using agar diffusion method. Ten plant extracts showed antimicrobial activity against at least one of test organisms. Since the methanol extract of *Clitoria ternatea* root exhibited strongest antimicrobial activity against *A. actinomycetemcomitans* with 12 mm of inhibitory clear zone, the *C. ternatea* extract was selected for further study. Separation using chromatographic technique afforded 3 novel compounds consisting of (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one **1**, (+)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one **2** and (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)furan-2(5H)-one **3**. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the purified compounds was determined using broth microdilution method. Compound **1** exhibited antimicrobial activity against *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* with MIC values 0.033 μM and 160.092 μM , respectively. Compound **2** against *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* with MIC values 0.033 μM and 0.003 μM , respectively. Compound **3** was active against only *A. actinomycetemcomitans*, with an MIC value of 0.003 μM , but inactive at the concentration of <146.053 μM for *S. mutans*.

Field of study:.....Biotechnology.....Student's signature:.....

Academic year:.....2008.....Thesis Principal Advisor's signature:.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรหมคกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ความช่วยเหลือทุกอย่าง ที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวิชัย กรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม กรรมการ สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน รองศาสตราจารย์ ดร.เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย กรรมการและหัวหน้างานสำหรับคำแนะนำ ความเข้าใจทำให้การวิจัยเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.พสุธา ธีัญญะกิจไพศาล สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* รวมทั้งอุปกรณ์และสารเคมีหลายอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ขอบคุณภาคีวิชาเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ทุนการวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรหมคกุล และ National Center of excellent for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Material สำหรับเงินสนับสนุนการวิจัย

ขอบคุณเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก (Oral Biology Research Center, OBRC) สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความเข้าใจและกำลังใจตลอดเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง และเจ้าหน้าที่ของหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ สมาชิกห้องแล็บ 927-6 สมาชิกศูนย์วิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Centre for Bioorganic Chemistry, RCBC) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณเบญจพร เทียนสงค์ คุณสุนิสา สุวรรณเจริญ คุณจตุพล เหลียงสกุล คุณทัศพร แคล้วอ้อม คุณปรัชญา วาทะสิทธิ์ คุณกิตติพงษ์ เมฆฉาย คุณสุรศักดิ์ ปริญญา และน้องๆ ท่านอื่นๆ สำหรับแรงงาน ความช่วยเหลือ ข้อแนะนำ กำลังใจ และทุกอย่าง

สุดท้ายขอบคุณครอบครัว พ่อ แม่ พี่สาว พี่ชาย และหลานๆ สำหรับตัวอย่างพืชสมุนไพรหลายๆ ชนิดที่ใช้ในงานวิจัย สำหรับความเข้าใจ ความอดทน กำลังใจ กำลังทรัพย์ ตลอดเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ.....	3
2.1.1 เชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคฟันผุ.....	4
2.1.2 เชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ.....	5
2.2 การป้องกันโรคฟันผุและปริทันต์อักเสบ.....	7
2.3 การใช้ฟิชสมุนไพรรักษาโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ.....	10
2.3.1 ฟิชสมุนไพรรักษาโรคฟันผุ.....	13
2.3.2 อัญชัน.....	45
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	49
3.1 เครื่องมือ.....	49
3.2 จุลชีพทดสอบ.....	50
3.3 ฟิชสมุนไพรรักษา.....	50
3.4 สารเคมี.....	53
3.4.1 ตัวทำละลาย.....	53
3.4.2 สารเคมีชนิดอื่น ๆ.....	53
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	54
3.6 การเตรียมสารสกัดหยาบจากฟิชสมุนไพรรักษา.....	54
3.7 การคัดกรองหาสารสกัดหยาบจากฟิชสมุนไพรรักษาที่มี ฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารวุ้น.....	55

3.8 การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทดสอบ	
นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	56
3.8.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากรากอัญชัน.....	56
3.8.2 การคัดกรองสารสกัดหยาบจากรากอัญชัน	
โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวบ่งชี้.....	56
3.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ	
จากรากอัญชันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	57
3.10 การแยกบริสุทธิ์ลำดับส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	59
3.10.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 1	
จากลำดับส่วนที่ 37-40.....	59
3.10.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 2	
จากลำดับส่วนที่ 41-50.....	61
3.10.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 3	
จากลำดับส่วนที่ 32-34 และ 36.....	63
3.11 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	65
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล.....	66
4.1 การคัดกรองหาสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทยที่มี	
ฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion test.....	66
4.2 การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบและ	
นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	70
4.3 การแยกสารสกัดหยาบจากรากอัญชันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์.....	73
4.3.1 การแยกสารสกัดหยาบจากรากอัญชันให้บริสุทธิ์.....	73
4.3.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	74
4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	84
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	87
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	95
ภาคผนวก ก.....	96
ภาคผนวก ข.....	98
ภาคผนวก ค.....	104

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 130

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคฟันผุในมนุษย์.....	4
2.2 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสภาวะปกติและสภาวะโรคปริทันต์อักเสบ.....	8
2.3 สารต้านจุลชีพที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพช่องปาก.....	10
3.1 พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการวิจัย.....	51
3.2 ลำดับส่วนที่ชะผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	56
3.3 น้ำหนักของสารและลักษณะปรากฏที่เหลือจากการแยกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลาย.....	58
4.1 ผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ.....	66
4.2 ลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี และฤทธิ์ทางชีวภาพของแต่ละลำดับส่วน.....	71
4.3 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 1.....	74
4.4 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 1.....	77
4.5 เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสาร 1 และ puerol B.....	78
4.6 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 2.....	79
4.7 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 2.....	81
4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 3.....	82
4.9 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 3.....	84
4.10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ที่ยับยั้งจุลชีพทดสอบ.....	85

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของ bakuchiol.....	11
2.2 โครงสร้างทางเคมีของ kuwanon G.....	11
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ macelignan.....	12
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Glycyrrhizol A และ 6,8-diisoprenyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone.....	12
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin.....	13
2.6 กะทกรก.....	14
2.7 กะพังกะหมื่น.....	14
2.8 กะเพราขาว และ กระเพราแดง.....	15
2.9 ใบและดอกกะเม็ง.....	15
2.10 ต้นและลูกกระวาน.....	16
2.11 ดอกกานพลู.....	16
2.12 ใบและดอกแก้ว.....	17
2.13 เหง้าขมิ้นชัน.....	17
2.14 เหง้าขมิ้นอ้อย.....	18
2.15 ข่อย.....	18
2.16 ชำ.....	19
2.17 เหง้าขิง.....	19
2.18 จันทน์เทศ.....	20
2.19 ใบและดอกช้องแมว.....	20
2.20 ดอกดาวเรือง.....	21
2.21 ดีปลี.....	21
2.22 โศไม่รู้อุ้ม.....	22
2.23 ต้อยติ่ง.....	22
2.24 ตะขบหิน.....	23
2.25 ตะเคียนทอง.....	23
2.26 ตะเคียนหิน.....	24
2.27 ตะไคร้.....	24

2.28 ตะลิงปลิง.....	25
2.29 บอระเพ็ด.....	25
2.30 บัวบก.....	26
2.31 ประดู่บ้าน.....	26
2.32 ผักกะสัง.....	27
2.33 ผักขมหนาม.....	27
2.34 ผักคราด.....	28
2.35 ผักชี.....	28
2.36 ผักเบี้ยใหญ่.....	29
2.37 ผักเป็ด.....	29
2.38 ผักเลี่ยนผี.....	30
2.39 ผกากรอง.....	30
2.40 ใบฝรั่ง.....	31
2.41 พิกุล.....	31
2.42 ใบพลู.....	32
2.43 พลูขาว.....	32
2.44 ไพล.....	33
2.45 โป.....	33
2.46 ฟ้าทะลายโจร.....	34
2.47 มังคุด.....	34
2.48 มะขามเทศ.....	35
2.49 มะเดื่อปลั่ง.....	35
2.50 มะม่วงหิมพานต์.....	36
2.51 มะระขี้นก.....	36
2.52 ไม้ยราบ.....	37
2.53 ยางนา.....	37
2.54 ยี่หว่า.....	38
2.55 รักเร่.....	38
2.56 ผลอ่อนของละมุด.....	39
2.57 ลูกใต้ใบ.....	39

2.58 ว่านชักมดลูก.....	40
2.59 สะแกนา.....	40
2.60 สะบ้าลิง.....	41
2.61 สาบเสือ.....	41
2.62 เสม็ดขาว.....	42
2.63 หนอนตายหยาก.....	42
2.64 หมาก.....	43
2.65 หัสคุณ.....	43
2.66 หนุ่ป่าเกล็ดหอยจีน.....	44
2.67 อบเชย.....	44
2.68 อินทนิลน้ำ.....	45
2.69 อัญชัน.....	45
2.70 โครงสร้างทางเคมีของ delphinidins.....	46
2.71 โครงสร้างทางเคมีของ malonylated flavonol glycoside ที่แยกได้จากดอกอัญชัน.....	47
2.72 โครงสร้างทางเคมีของ ternatins และ preternatins.....	48
3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1.....	61
3.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2.....	62
3.3 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3.....	65
4.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร (ก) สาร 1 (ข) puerol B.....	75
4.2 HMBC ของสาร 1.....	75
4.3 NOE ของสาร 1.....	76
4.4 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2.....	80
4.5 HMBC ของสาร 2.....	80
4.6 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3.....	83
4.7 HMBC ของสาร 3.....	83
4.8 NOE ของสาร 3.....	83
1ข วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับรากอัญชัน.....	98
2ข วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับลูกใต้ใบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน.....	98
3ข วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับลูกใต้ใบที่สกัดด้วยเมทานอล.....	99
4ข วงใส่ของ <i>S. mutans</i> กับเปลือกมะม่วงหิมพานต์.....	99

5x วงใส่ของ <i>S. mutans</i> กับไบโसेม็ดขาว.....	100
6x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับดอกกานพลู.....	100
7x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับรากผักกาด.....	101
8x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับใบฝรั่ง.....	101
9x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับ ไบบอระเพ็ดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน.....	102
10x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับไบโसेม็ดขาว.....	102
11x วงใส่ของ <i>A. actinomycetemcomitans</i> กับ ไบบอระเพ็ดที่สกัดด้วยเมทานอล.....	103
1ค ยูวี สเปกตรัมของสาร 1.....	104
2ค IR สเปกตรัมของสาร 1.....	105
3ค ¹ H-NMR สเปกตรัมของสาร 1.....	106
4ค ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสาร 1.....	107
5ค MS สเปกตรัมของสาร 1.....	108
6ค HSQC สเปกตรัมของสาร 1.....	109
7ค HMBC สเปกตรัมของสาร 1.....	110
8ค COSY สเปกตรัมของสาร 1.....	111
9ค ยูวี สเปกตรัมของสาร 2.....	112
10ค IR สเปกตรัมของสาร 2.....	113
11 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสาร 2.....	114
12ค ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสาร 2.....	115
13ค MS สเปกตรัมของสาร 2.....	116
14ค HSQC สเปกตรัมของสาร 2.....	117
15ค HMBC สเปกตรัมของสาร 2.....	118
16ค COSY สเปกตรัมของสาร 2.....	119
17ค TOCSY สเปกตรัมของสาร 2.....	120
18ค ยูวี สเปกตรัมของสาร 3.....	121
19ค IR สเปกตรัมของสาร 3.....	122
20ค ¹ H-NMR สเปกตรัมของสาร 3.....	123
21ค ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสาร 3.....	124

22ค MS สเปกตรัมของสาร 3.....	125
23ค HSQC สเปกตรัมของสาร 3.....	126
24ค HMBC สเปกตรัมของสาร 3.....	127
25ค COSY สเปกตรัมของสาร 3.....	128
26ค TOCSY สเปกตรัมของสาร 3.....	129

คำอธิบายสัญลักษณ์

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ATCC	American type culture collection
$\mu\text{g/mL}$	microgram per milliliter
BHIA	brain heart infusion agar
BHIB	brain heart infusion broth
CD_3OD	deuterated methanol
$^{13}\text{C-NMR}$	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	^1H - ^1H correlation spectroscopy
d	doublet (for NMR spectral data)
dd	doublet of doublet (for NMR spectral data)
DMSO	dimethyl sulfoxide
δ	chemical shift
ϵ	molar absorptivity
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
INT	p-iodonitrotetrazolium violet, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride
IR	infrared spectrophotometer
J	coupling constant (for NMR spectral data)
λ_{max}	wavelength of maximum absorption
MBC	minimum bactericidal concentration (ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อทดสอบ)
MHz	megahertz
MIC	minimum inhibitory concentration (ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ)
MS	mass spectrometer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MW	molecular weight
$[M+H]^+$	protonated molecular ion
NA	nutrient agar
NB	nutrient broth
NMR	nuclear magnetic resonance
ppm	part per million
PRPs	proline-rich protein
s	singlet (for NMR spectral data)
t	triplet (for NMR spectral data)
TLC	thin layer chromatography (โครมาโทกราฟีแบบบาง)
TOF	Time of flight
TSA	trypticase soy agar
TSB	trypticase soy broth
UV	ultraviolet
Vis	visible
YMA	yeast malt extract medium agar
YMB	yeast malt extract medium broth

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ เป็นปัญหาที่สำคัญทางทันตสาธารณสุข จากรายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2545 (คณะกรรมการทันตสุขภาพแห่งชาติ กองทันตสาธารณสุข, 2545) พบโรคฟันผุในฟันน้ำนมร้อยละ 87.4 ฟันแท้ร้อยละ 57.3 และพบว่าเมื่อผู้ป่วยมีอายุเพิ่มขึ้นโอกาสเกิดฟันผุมีมากขึ้น สำหรับปัญหาสภาวะปริทันต์ในกลุ่มเด็กพบว่า มีเหงือกอักเสบร้อยละ 76.9 และ 84.5 ในกลุ่มอายุ 12 ปี และ 15 ปีตามลำดับ ส่วนผู้สูงอายุพบมีร่องลึกปริทันต์ร้อยละ 61.6 และพบการฟุที่รากฟันร่วมด้วย ซึ่งปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรคดังกล่าว คือ เชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ คือเชื้อ *Streptococcus mutans* ที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บนผิวฟันและเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ในช่องปาก (Burne, 1998) โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีความซับซ้อนในการเกิดโรค สาเหตุหนึ่งในการก่อให้เกิดโรค คือเชื้อ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) ที่มีอยู่ในคราบจุลินทรีย์ (Slots และ Ting, 1999) การรวมกันอยู่ในรูปคราบจุลินทรีย์นี้ ทำให้จุลินทรีย์มีความแข็งแรงและการกำจัดทำได้ยากขึ้น (Houte, 1982; Socransky และ Haffajee, 2002) การป้องกันโรคจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งและมีหลายแนวทางปฏิบัติ แนวทางหนึ่งที่ได้รับการศึกษามานาน คือ การจำกัดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Silverstone และคณะ, 1981)

วิธีการที่นิยมนำมาใช้ลดจำนวนของแบคทีเรีย คือ การใช้สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ร่วมกับการแปรงฟันอย่างถูกวิธี เช่น การใช้คลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine) แต่อาจมีอาการแพ้หรือผลข้างเคียงเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (Jones, 1997; Slot และ Ting, 2002) การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในช่องปากจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ โดยคนไทยใช้สมุนไพรในการรักษาโรคในช่องปากมาตั้งแต่อดีต และมีการใช้ในหลายรูปแบบ เช่น ใช้กิ่งข่อยมาเคี้ยวหรือถูฟัน ใช้เปลือกมะขามเทศ เกลือทะเล และหัวข่าแดงมาต้มด้วยน้ำ นำมาอมแก้ปวดฟัน (ศักดิ์ชาย, 2546) ใช้ดอกดาวเรืองแห้ง 1 บาท ต้มน้ำกิน หรือใช้ต้นสดของกะเม็งตัวเมียฝังไฟให้แห้ง ตำให้ละเอียด แล้วนำไปพอกที่เหงือก (พจนานุกรมวิพฤโษณะ และคณะ, 2541) แต่ยังมีพืชสมุนไพรไทยที่ปรากฏในตำรับยาขนานต่างๆ ที่มีสรรพคุณในการฆ่าเชื้อจุลชีพ และ/หรือแก้ปวด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดและฤทธิ์ต้านจุลชีพ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยถึงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans*
2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่พบว่า มีฤทธิ์การยับยั้ง *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* สูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงชนิดของพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* และได้สารบริสุทธิ์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ

โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคสำคัญในช่องปาก สาเหตุหลักเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ (plaque) ที่เกาะอยู่บนผิวฟัน และเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ในช่องปาก เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์จะอยู่ร่วมกันในรูปของไบโอฟิล์ม (biofilms) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) หรือไกลโคแคลลิกซ์ (glycocalyx) ร้อยละ 75-80 และโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์อีกร้อยละ 15-20 ของปริมาณ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดอยู่ร่วมกัน (Socransky และ Haffajee, 2002) การอยู่ร่วมกันในรูปของไบโอฟิล์มทำให้เชื้อมีความแข็งแรง และการกำจัดเชื้อทำได้ยากมากขึ้น เนื่องจากไกลโคแคลลิกซ์ที่เป็นส่วนนอกของไบโอฟิล์มสามารถป้องกันการเข้าออกของสาร และภายในไบโอฟิล์มเองจะมีการกำจัดของเสียที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละโคโลนีผ่านทางช่องทางลำเลียงของเสีย เมื่อให้สารต้านจุลชีพจะออกฤทธิ์ได้เต็มที่เฉพาะส่วนนอกของไบโอฟิล์ม และความเข้มข้นของสารจะลดลงเมื่อเข้าไปส่วนลึกของไบโอฟิล์ม และยังถูกกำจัดผ่านทางช่องทางลำเลียงดังกล่าว นอกจากนี้การอยู่ร่วมกันของเชื้อหลายๆ ชนิดสามารถเพิ่มหรือชักนำให้มีการแสดงของยีนเพิ่มขึ้น มีผลต่อความสามารถในการป้องกันเซลล์ให้มากขึ้น (Brown และ Gilbert, 1993)

ไบโอฟิล์มสามารถยึดเกาะได้ทั่วภายในช่องปากทั้งส่วนผิวฟัน เหงือก ลิ้น และเนื้อเยื่อแก้ม แต่เนื่องจากบริเวณผิวฟันไม่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเหมือนบริเวณอื่นๆ จึงทำให้ไบโอฟิล์มยึดเกาะที่ผิวฟันได้นาน และแน่นหนากว่าทุกบริเวณ (Gibbons, 1989) การเกิดไบโอฟิล์มเริ่มต้นจากโปรตีนในน้ำลาย โดยเฉพาะกลุ่มที่มีโพรลีนจำนวนมาก (proline-rich protein; PRPs) และสเตเธอริน (statherin) เข้าจับกับผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ของผิวฟัน กลายเป็นฝ้า (pellicle) บาง ๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยึดจับ (receptor) ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามายึดเกาะ โดยใช้โปรตีนยึดจับ (adhesin) ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการยึดจับที่เหนียวแน่นขึ้น ต่อมาเชื้อจุลินทรีย์จะแบ่งตัวมากขึ้น และจะมีเชื้อชนิดใหม่ใช้โปรตีนบนผิวเซลล์ยึดจับกับเชื้อเริ่มต้นต่อกันไปอย่างเป็นระบบ Socransky และ Haffajee, 2002 ได้จัดแบ่งชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ตามลำดับของการเข้ายึดจับได้ 6 กลุ่ม และให้สัญลักษณ์ของกลุ่มต่างๆ เป็นสี ได้แก่

- 1) สีเหลือง เป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีพิมเบรีย (fimbriae) ที่ยื่นจากผนังเซลล์ ช่วยในการยึดติดกับผิวฟัน และโปรตีนจากน้ำลายที่ผิวฟัน
- 2) สีเขียว มีเชื้อ *Capnocytophaga* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- 3) สีม่วง จะมาติดต่อกับเชื้อในกลุ่มสีเขียว และทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการเข้ายึดของแบคทีเรียในกลุ่มต่อไป ในกลุ่มนี้มักจะเป็นเชื้อ *Veillonella parvular* และ *Actinomyces odontolyticus*
- 4) สีฟ้า เป็นกลุ่มของ *Actinomyces* sp.
- 5) สีส้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Prevotella intermedia*
- 6) สีแดง เช่น *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* และ *Bacteroides forsythus* โดยมีกลุ่ม *Fusobacterium* ซึ่งสามารถยึดจับได้ดีกับโปรตีนในผ้า เป็นตัวสำคัญในการยึดแบคทีเรียในกลุ่มสีส้มและสีแดงให้เข้ากับกลุ่มอื่น ๆ

2.1.1 เชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคฟันผุ

ในปี ค.ศ. 1992 Hardie ได้รวบรวมเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่ก่อโรคในฟันผุมนุษย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดฟันผุมากกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ คือ *S. mutans* เนื่องจากในปี ค.ศ. 1924 Clark สามารถแยก *S. mutans* จากรอยโรคฟันผุของมนุษย์ ในปี ค.ศ. 1970 Littleton และคณะ แยกเชื้อ *S. mutans* ได้จากทุกรอยฟันผุในเด็กอายุ 13-14 ปี และในปี ค.ศ. 1972 Hoerman และคณะ แยกเชื้อดังกล่าวได้จากรอยฟันผุทุกซี่ในผู้ใหญ่วัย 17-22 ปี (Hamada และ Slade, 1980)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคฟันผุในมนุษย์ (Hardie, 1992)

จุลินทรีย์สำคัญที่พบ	จุลินทรีย์ที่อาจพบ
Mutans <i>Streptococci</i>	Other <i>Streptococci</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>
<i>S. sobrinus</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>L. casei</i>	<i>A. viscosus</i> (serovar 2)
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. acidophilus</i>	

S. mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) ผนังเซลล์ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) โปรตีน และกลีเซอรอล จากกรดไขมัน ที่ผนังเซลล์มีส่วนที่ยื่นออกมาเพื่อใช้ในการยึดเกาะเรียกว่าฟิมเบรีย (fimbriae) *S. mutans* เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด และสามารถผลิตกรดได้ (aciduric และ acidogenic) โดยกระบวนการสลายสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ด้วยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอเรส (glycosyltransferase) ทำให้เกิดเป็นกรดแลคติก (lactic acid) ที่สามารถสลายผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ ออกมาเป็นแร่ธาตุอยู่ในคราบจุลินทรีย์และน้ำลาย ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า กระบวนการสลายแร่ธาตุ (demineralization) ในขณะที่เดียวกันที่น้ำลายและคราบจุลินทรีย์เองก็มีแร่ธาตุพวกแคลเซียม และฟอสเฟต ที่สามารถตกตะกอน และย้อนกลับเข้าสู่ตัวฟันได้เรียกว่ากระบวนการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) เมื่อกระบวนการสลายและคืนกลับแร่ธาตุเกิดภาวะเสียสมดุล จะก่อให้เกิดรอยโรคที่พบเป็นลักษณะจุดขาว (white spot lesion) ซึ่งเป็นอาการของโรคฟันผุระยะเริ่มแรก โดยในระยะเริ่มต้นจะยังคงมีผิวเคลือบฟันด้านนอกอยู่ แต่มีการสูญเสียแร่ธาตุข้างใต้ผิวเคลือบฟัน (subsurface lesion) ถ้าทิ้งไว้โดยไม่มีการลดกระบวนการสลายแร่ธาตุ และเสริมการเกิดกระบวนการคืนกลับแร่ธาตุ ก็จะมีการสลายแร่ธาตุจากเคลือบฟันมากขึ้น จนกระทั่งเกิดเป็นรูฟันในที่สุด (Hamada และคณะ, 1984) (Loesche, 1986) และ (Islam และคณะ, 2007)

ปัจจัยที่มีผลกับการเกิดโรคฟันผุ

1. ปริมาณเชื้อก่อโรค และความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะกับผิวฟัน
2. ลักษณะของแต่ละบุคคล ได้แก่ ภูมิคุ้มกันในน้ำลาย สภาพแวดล้อมของฟัน การได้รับฟลูออไรด์ป้องกันฟันผุจากแหล่งต่าง ๆ การดูแลสุขภาพช่องปาก
3. อาหารที่รับประทาน ชนิดของอาหาร ปริมาณ และความถี่ในการรับประทาน น้ำตาล ซึ่งมีผลต่อการเกิดคราบจุลินทรีย์

2.1.2 เชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่มีความซับซ้อนในการเกิดโรค แม้จะทราบสาเหตุของการเกิดโรคว่ามาจากเชื้อจุลินทรีย์ในคราบจุลินทรีย์ แต่ยังมีการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปถึงชนิดของเชื้อก่อโรคมาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า 400 สายพันธุ์ในร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) (Paster และคณะ, 2006) ทำให้มีการกล่าวถึงทฤษฎีคราบจุลินทรีย์

นอกจากนี้วัณโรคปริทันต์ยังมีการแสดงออกของอาการทางคลินิกหลายรูปแบบ คือ โรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis) โรคปริทันต์อักเสบรุกราน (aggressive periodontitis) และโรคปริทันต์เนื้อตาย (necrotizing periodontitis) (Samaranayake, 2006)

เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ ชนิดของเชื้อก่อโรคในสภาวะปกติ และภาวะที่เกิดโรคพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยในบริเวณที่ไม่เป็นโรคมียีสต์เฉลี่ยประมาณ 10^3 - 10^4 โคโลนี ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง หรือกลม แต่เมื่อภาวะของโรคมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น จะพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง และแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้มากขึ้น ปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเป็น 10^4 - 10^6 โคโลนี เมื่อเข้าสู่ภาวะการเป็นโรคเหงือกอักเสบ และอาจจะเพิ่มขึ้นเป็น 10^5 - 10^8 โคโลนี เมื่ออาการลุกลามจนกลายเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (Socransky และ Haffajee, 2002; Samaranayake, 2006) โดยสามารถสรุปชนิดของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

จากสมมติฐานของคอคช (Koch's postulates) ที่กล่าวไว้ว่า 1) ปริมาณของเชื้อชนิดนั้นมีมากในบริเวณที่เกิดโรค ขณะที่บริเวณที่ไม่เป็นโรคมียีสต์ในปริมาณน้อยหรือไม่มีเลย 2) เมื่อกำจัดเชื้อชนิดนั้นออกไปแล้ว อาการของโรคดีขึ้น 3) ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อชนิดนั้นเพิ่มสูงขึ้น 4) เชื้อชนิดนั้นผลิตปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกที่ตรวจพบ และ 5) เมื่อนำเชื้อชนิดนี้ไปทดสอบกับสัตว์ทดลอง พบว่ามีการทำลายเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับในมนุษย์ จากผลการศึกษาที่ผ่านมาจึงสามารถกล่าวได้ว่า *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* และ *P. intermedia* น่าจะเป็นเชื้อหลักในการก่อโรคปริทันต์อักเสบ เนื่องจากพบเชื้อเหล่านี้ในรอยโรคที่กำลังลุกลามมีปริมาณมากกว่าในรอยโรคที่หยุดลุกลามแล้ว และตรวจพบระดับแอนติบอดีในเลือดและน้ำเหลืองเหงือก จากผู้ป่วยสูงกว่าระดับในคนที่ไม่เป็นโรค นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดยังสามารถผลิตเอ็นไซม์ และสารที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเหงือก

Actinobacillus actinomycetemcomitans เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น ผิวขรุขระ ไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) พบได้ทั่วไปในช่องปาก รวมทั้งในเลือด และสมอง อาจจะทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อบุโพรงหัวใจ เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะพบลักษณะของโคโลนีกลม ผิวเรียบมัน และโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบลักษณะคล้ายดาวกลางโคโลนี ความรุนแรงของ *A. actinomycetemcomitans* สามารถยึดจับเซลล์ได้แน่นเหนียวด้วยพิมเบรียที่ผนังเซลล์ มีการผลิตสารพิษพวกลิวโคทอกซิน (leukotoxin) เอนโดทอกซิน (endotoxin, LPS) รวมทั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่ยับยั้งภูมิคุ้มกันที่ร่างกายผลิตขึ้นได้ อีกทั้งไลโปพอลิแซคคาไรด์ ที่ผนังเซลล์จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และอวัยวะปริทันต์ถูกทำลายไปด้วย (Fives-Taylor และคณะ, 1999; Socransky และ Haffajee, 2005) ซึ่งภายหลัง *A. actinomycetemcomitans* ได้ถูกจัดลำดับชื่อสกุลใหม่เป็น *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* เนื่องจากพบว่า *A. actinomycetemcomitans* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดในระดับสายพันธุ์ (genus) กับเชื้อในสกุล *Heamophilus* (*H. paraphrophilus*, *H. aphrophilus* และ *H. segnis*) (Nørskov-Lauritsen และคณะ, 2005) นอกจากนี้จากการทำถอดรหัสยีน (gene encode) พอลิเปปไทด์ (polypeptide) ของกรดอะมิโน 462 ตัว พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนของ *A. actinomycetemcomitans* ตรงกันกับเชื้อในสกุล *Heamophilus* ร้อยละ 74.5 ทำให้สามารถแยก *A. actinomycetemcomitans* ออกจากสกุล *Actinobacillus* และจัดสกุลใหม่ร่วมกับเชื้อในสกุล *Heamophilus* ได้เป็นสกุล *Aggregatibacter* (Nørskov-Lauritsen และ Killan, 2006)

2.2 การป้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ

การรักษาโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ ต้องใช้ระยะเวลาานาน และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ดังนั้นการมีสุขภาพช่องปากที่ดี และยังคงดำรงสภาวะที่ดีนั้นได้ต่อไปด้วยการป้องกันก่อนเกิดโรคจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งมีหลายแนวทางปฏิบัติ แนวทางหนึ่งที่ได้รับการศึกษามานาน คือ การจำกัดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคให้อยู่ในระดับต่ำจนไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Silverstone และคณะ, 1981; Hardie, 1992 และ Islam และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสภาวะปกติและสภาวะโรคปริทันต์อักเสบ
(ดัดแปลงจาก Samaranayake, 2006)

สภาวะ	เชื้อจุลินทรีย์สำคัญที่พบ	หมายเหตุ
ปกติ	<i>Streptococcus sanguis</i>	ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อาจพบพวกสไปโรซีต (spirochaete) หรือเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ รูปร่างเป็นแท่งบ้าง
	<i>Streptococcus oralis</i>	
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	
	<i>Actinomyces viscosus</i>	
	<i>Veillonella spp.</i>	
โรคเหงือกอักเสบเรื้อรัง	<i>Streptococcus sanguis</i>	ประมาณร้อยละ 55 เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก สไปโรซีต และเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ รูปร่างเป็นแท่ง
	<i>Streptococcus milleri</i>	
	<i>Actinomyces israelii</i>	
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	
	<i>Prevotella intermedia</i>	
	<i>Capnocytophaga spp.</i>	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
<i>Veillonella spp.</i>		
โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ประมาณร้อยละ 75 เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe)
	<i>Prevotella intermedia</i>	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
	<i>Tannerella forsythia</i>	
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	
	<i>Selenomonas spp.</i>	
	<i>Capnocytophaga spp.</i>	
	<i>Spirochaetes</i>	
โรคปริทันต์อักเสบรุนแรง	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	ประมาณร้อยละ 65-75 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นบาซิลไล
	<i>Capnocytophaga spp.</i>	
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
	<i>Prevotella intermedia</i>	

การกำจัด และลดจำนวนของ *S. mutans* จะช่วยป้องกันการเกิดโรคฟันผุได้ ฟลูออไรด์ (fluoride) เป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุหลายชนิด เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก เนื่องจากมีคุณสมบัติลดการละลายและเสริมการสะสมของแร่ธาตุที่ผิวฟัน อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ จึงสามารถควบคุมสมดุลของเชื้อ และลดการเกิดสภาวะเป็นกรดในช่องปาก (Clarkson, 1991) การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารต้านจุลชีพเป็นสิ่งที่ได้ผล เนื่องจาก *S. mutans* ไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น เพนนิซิลิน แอมพิซิลิน อิริโทรมัยซิน (Ferretti และ

การยับยั้งและควบคุมการติดเชื้อ รวมถึงการส่งเสริมสภาวะแวดล้อมเพื่อให้เกิดการงอกใหม่ หรือการเจริญทดแทนของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ถูกทำลาย และคงสภาพการทำหน้าที่ปกติของเนื้อเยื่อปริทันต์ไว้ เป็นการป้องกันที่ดีของโรคปริทันต์อักเสบ (Academy report, 2001) การลดจำนวน และลดโอกาสของแบคทีเรียก่อโรค เช่น ควบคุมการสะสมของแผ่นคราบจุลินทรีย์ด้วยวิธีเชิงกล (mechanical plaque control) การขูดหินน้ำลายเพื่อให้ผิวฟันปราศจากสิ่งสะสม การเกลารากฟันเพื่อให้เคลือบรากฟันแข็งแรงและเรียบ แต่มีรายงานว่า การขูดหินน้ำลาย และการเกลารากฟันอาจไม่สามารถกำจัดเคลือบรากฟันที่ติดเชื้อได้ทั้งหมด รวมถึงการกำจัดจุลชีพที่ผิวของเคลือบรากฟัน บริเวณช่องรากฟัน และร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากๆ จึงมีโอกาสที่จะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคซ้ำ (Borghetti และคณะ, 1987) การใช้สารเคมีบำบัด เช่น การให้ยาต้านจุลชีพได้เหงือก ยาปฏิชีวนะ ยาต้านการอักเสบจึงถูกนำมาใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลชีพในคราบจุลินทรีย์ (Mandel, 1988) การให้ยาในรูปแบบของการให้ทั้งระบบ (systemic) ให้ผลดีต่อการรักษา แต่ต้องใช้ในปริมาณสูงเพื่อให้ยามีความเข้มข้นเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในบริเวณที่ต้องการ การให้ยาในปริมาณสูงอาจทำให้มีอาการข้างเคียง เช่น การแพ้ และการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร รวมถึงการดื้อยาของเชื้อต่างๆ และหากมีการใช้ยาในระยะยาวอาจส่งผลต่อเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ได้ (Slots และ Jorgensen, 2000)

สารต้านจุลชีพที่ใช้ไม่ควรทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของเชื้อมากจนทำให้เกิดเชื้อฉวยโอกาส หรือทำลายเชื้อประจำถิ่น การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นสูงพอควร ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือฆ่าเชื้อโรคได้ แต่ที่ความเข้มข้นต่ำก็ควรสามารถลดปัจจัยก่อความรุนแรงที่เชื้อสร้างขึ้น เช่น ลดการผลิตเอนไซม์ หรือลดความเข้มข้นของสารพิษ การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจึงพิจารณาตามการออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ เรียกว่า minimum bactericidal concentration (MBC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เรียกว่า minimum inhibitory concentration (MIC) สารต้านจุลชีพที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพช่องปากนั้น แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารต้านจุลชีพที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพช่องปาก (Mandel, 1988) และ (Marsh, 1992)

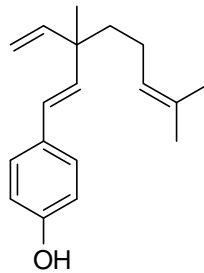
สารที่ใช้	ตัวอย่าง	ผลิตภัณฑ์
บิสไบกวไนด์ (bisbiguanide)	chlorhexidine, alexidine	น้ำยาบ้วนปาก
สารทำความสะอาด (detergent)	sodium lauryl sulfate	น้ำยาบ้วนปากยาสีฟัน
เอนไซม์	mutanase, glucanase amylglucosidase	ยาสีฟัน
น้ำมันหอมระเหย	thymol, eucalyptol	น้ำยาบ้วนปาก
ฟีนอล	tricosan, hexylresorcinol	น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน
สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds)	cetylpyridinium chloride, benzethonium chloride	น้ำยาบ้วนปาก
ไอออนของโลหะ	เงิน พรอท ทองแดง สังกะสี	น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน
สารสกัดจากพืช	sanguinarine	น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน

สารต้านจุลชีพที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ คลอเฮกซิดีน เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมทั้งยีสต์ นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ใหม่ได้ มีการศึกษาว่าหลังจากบ้วนปากด้วยคลอเฮกซิดีนเพียง 1 ครั้ง ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในน้ำลายลดลงร้อยละ 10-20 และอยู่ในระดับคงที่เป็นเวลาประมาณ 7 ชั่วโมง แต่คลอเฮกซิดีนก็มีผลข้างเคียง คือ การติดสีเหลืองอมน้ำตาลบนผิวฟัน โดยเฉพาะบริเวณขอบเหงือก ซอกฟัน และวัสดุอุดสีเหมือนฟัน การแปรงฟันเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดสีออกได้หมด จำเป็นต้องใช้เครื่องขูดหินปูนช่วย นอกจากนี้คลอเฮกซิดีนยังมีรสขม และทำให้เกิดอาการแสบร้อนเนื้อเยื่อในช่องปาก และอาจมีโอกาสดังกล่าวหากใช้เป็นเวลานาน (Matthijs และ Adriaens, 2002)

2.3 การใช้พืชสมุนไพรในการป้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ

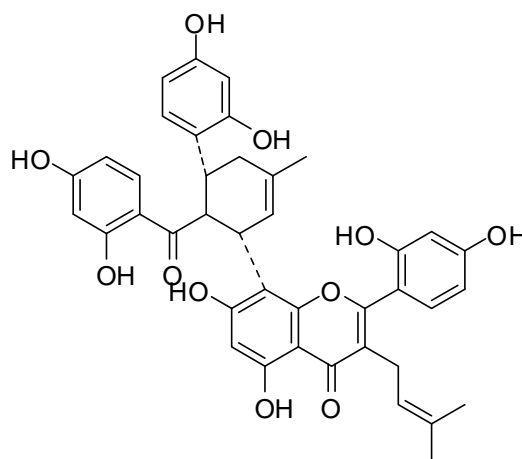
สมุนไพรตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุ ซึ่งมีได้ผสมหรือแปรสภาพ แต่ตามความเข้าใจส่วนใหญ่คำว่าสมุนไพรมักจะหมายถึงพืช ในปัจจุบันรูปแบบการใช้พืชสมุนไพรมีการปรับเปลี่ยนไปจากเดิม โดยนำพืชสมุนไพรมาสกัดแยกหาองค์ประกอบหรือสารออกฤทธิ์ นำสารออกฤทธิ์ที่แยกได้มาใช้ประโยชน์ ทำให้มีข้อมูลตามหลักวิทยาศาสตร์สามารถนำไปใช้ได้อย่างถูกหลัก ลดผลข้างเคียง และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล (วิธนา, 2534) มีการศึกษาเกี่ยวกับสารที่แยกจากพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ เช่น

ปี 2001 Kutsura และคณะ นำเมล็ดของ *Psoralea corylifolia* มาสกัดด้วยอีเทอร์ มาแยกองค์ประกอบทางเคมี ได้สาร bakuchiol ซึ่งเป็นสารพวก phenolic isoprenoid นำมายับยั้งเชื้อในช่องปาก 18 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้ง *S. mutans* ที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ เช่น *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sorbinus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *A. viscosus* และ *P. gingivalis* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 1-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



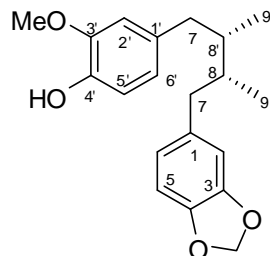
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ bakuchiol

ปี 2003 Park และคณะ นำเปลือกกรากของ *Morus alba* ที่สกัดด้วยเมทานอล มาแยกองค์ประกอบทางเคมีแล้วนำมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคในช่องปาก 8 ชนิด พบสาร kuwanon G ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ที่ระดับความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



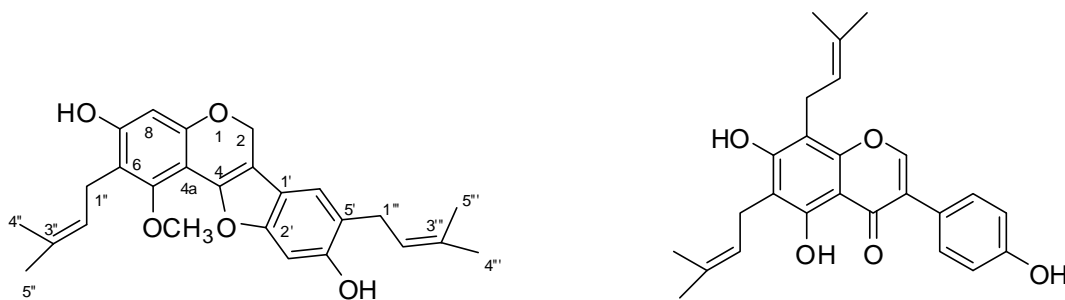
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ kuwanon G

ปี 2006 Chung และคณะ แยกสารจากดอกจันทน์เทศ *Myristica fragrans* พบว่า macelignan สามารถยับยั้ง *S. mutans* ที่ระดับความเข้มข้น 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งเชื้อชนิดชนิดอื่นๆ เช่น *S. sorbinus*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ที่ความเข้มข้น 2-31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ macelignan

ปี 2006 Jian และคณะ แยกสารจากรากของชะเอม *Glycyrrhiza uralensis* พบสาร pterocarpenes ชนิดใหม่ glycyrrhizol A และ glycyrrhizol B และ isoflavonoids ที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 4 ชนิด คือ 5-O-methylglycryol, isoglycyrol, 6,8-diisoprenyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone และ gancaonin G เมื่อนำมาทดสอบกับ *S. mutans* พบว่า Glycyrrhizol A และ 6,8-diisoprenyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

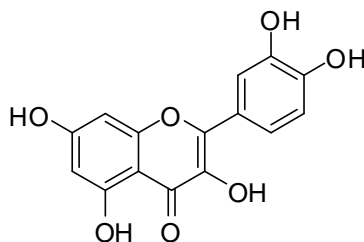


รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Glycyrrhizol A (ซ้าย)

และ 6,8-diisoprenyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone (ขวา)

ปี 2006 Inagaki และคณะ สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *Eucalyptus globules* พบสารในกลุ่มของ macrocarpals แล้วนำมาทดสอบการเจริญกับเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* และ *A. actinomycetemcomitans* พบว่า

ปี 2008 Li และ Xu สกัดแยกสารออกฤทธิ์จากใบบัว นำมายับยั้งเชื้อก่อโรคปริทันต์อีกเสบ 5 สายพันธุ์ คือ *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* และ *A. naeslundii* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เป็น 0.625, 1.25, 1.25, 0.625 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์คุณลักษณะของสารออกฤทธิ์พบว่าเป็นสาร quercetin



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin

2.3.1 พืชสมุนไพรไทยกับการรักษาโรคในช่องปาก

คนไทยใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคมาตั้งแต่อดีต และมีการใช้ในหลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็นยาพอก ยาชง ยาต้ม ยาดอง เป็นต้น แต่ละส่วนของพืชสมุนไพรไม่ว่าจะเป็น ราก ดอก ลำต้น ใบ เปลือก อาจจะมีสรรพคุณที่แตกต่างกัน หากจะนำมาใช้จึงต้องมีการศึกษาถึงข้อมูลเหล่านี้เพื่อที่จะได้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรที่ถูกต้อง จะต้องใช้ให้ถูกต้อง ถูกส่วน ถูกขนาด ถูกวิธี และใช้ให้ถูกกับโรค เช่นเดียวกับการใช้พืชสมุนไพรไทยรักษาโรคในช่องปาก มีตำราหลายขนานที่กล่าวถึงพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้ปวดฟัน แก้เหงือกบวม เหงือกอักเสบ แก้รำมะนาด รวมทั้งฆ่าเชื้อโรค และรักษาบาดแผล งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณดังกล่าว คือ

2.3.1.1 กะทกรก (*Passiflora foetida* Linn. วงศ์ Passifloraceae)

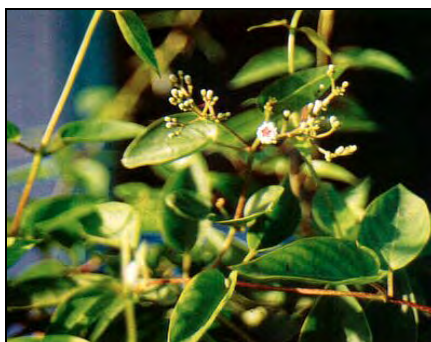
สรรพคุณ เนื้อไม้ ควบคุมธาตุ ถอนพิษเบื่อเมาทุกชนิด รักษาบาดแผล ราก แก้ไข้ แก้กามโรค ใบ ใช้ตำให้ละเอียดแล้วคั้นเอา น้ำดื่มเป็นยาเบื่อและขับพยาธิ ดอก ขับเสมหะ แก้ไอ ผล แก้ปวด บำรุงปอด ใบสด ใช้พอกแก้สิ่ว ต้น ใช้ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ แก้ไอ และอาการบวม (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.6 กะทกรก

2.3.1.2 กะพังโหม (*Paederia foetida* Linn. วงศ์ Rubiaceae)

สรรพคุณ ราก แก้ตาฟาง ตาแฉะ ตามัว แก้ท้องเสีย ลำไส้พิการ แก้โรค ตานขโมย แก้จุกเสียด ขับน้ำเหลืองเสีย รักษาฝีซ่าน เถา แก้ซาง แก้ธาตุพิการ แก้ตัวร้อน ยาขับ ไล่เดือน ขับลมในลำไส้ แก้ไข้ ท้องอืดเฟ้อ รักษาโรมาเนียด ใบ แก้ตานซาง แก้ดีรั่ว แก้ธาตุพิการ ถอนพิษงู ขับพยาธิไล่เดือน แก้วโรมาเนียด แก้ปวดฟัน แก้ปวดศีรษะ แก้คัน เป็นยาระบายอ่อนๆ ดอก ขับน้ำนม แก้ไข้จับสั่น ผล ขับน้ำนม แก้ไข้จับสั่น แก้วริดสีดวงทวาร แก้ท้องมาน (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.7 กะพังโหม

2.3.1.3 กะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn. วงศ์ Labiatae)

สรรพคุณ ราก แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ แก้จุกเสียด แก้ธาตุพิการ แก้ปวดท้อง แก้วลม แก้ไข้ ขับโลหิต แก้วโรมาเนียด แก้วสมหะ แก้หืด ไอ สะอึก ต้น บำรุงธาตุ แก้ปวดท้อง แก้วลม ตานซาง ขับลม แก้ท้องร่วง ใบ บำรุงธาตุ แก้ปวดท้อง แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ ขับลม แก้จุกเสียด แก้ว คลื่นไส้ อาเจียน แก้วโรคผิวหนัง ขับเหงื่อ แก้วเจ็บหู แก้ปวดฟันที่เป็นรู ดอก แก้ท้องอืดเฟ้อ ผล



รูปที่ 2.8 กะเพราขาว (ช้าย) กะเพราแดง (ขวา)

2.3.1.4 กะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn. วงศ์ Compositae)

สรรพคุณ ราก ขับลมในลำไส้และกระเพาะอาหาร แก้อาเจียนเป็นเลือด แก้โรคลม บำรุงโลหิต ต้น ขับลมให้กระจาย ห้ามเลือด แก้ดีซ่าน แก้โรคผิวหนัง แก้ไอ แก้หลอดลมอักเสบ แก้ปวดเมื่อย ใบเป็นยาถ่าย แก้โรคลม แก้ผมร่วง รักษาแผล ดอก แก้ดีซ่าน ลูกขับผายลม (นันทวัน และอรนุช บก., 2539) ดอกกระจับปวด เคี้ยวอมแก้ปวดฟัน (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.9 ใบและดอกกะเม็ง

2.3.1.5 กระวาน (*Amomum testaceum* Ridl. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ราก ใช้ฟอกเลือด หัว หรือหน่อ ขับพยาธิในเนื้อให้ออกทางผิวหนัง แก้ลมและเสมหะ เปลือก แก้ไข้ผอมเหลือง โรคผิวหนัง บำรุงธาตุ กระพี้ แก้โรคผิวหนัง แก่น กระจายพิษเสีย แก้โรคโลหิตเป็นพิษ ขับไล่พิษภัย ใบ แก้ไข้เซื่องซึม ขับลม ขับเสมหะ แก้วำมะนาด ดอก แก้วตาเจ็บ ตาฟาง ตามัว ผล แก้ลม ขับลม แก้วคั่นเหียนอาเจียน แก้วเสมหะ บำรุง



รูปที่ 2.10 ต้นและลูกกระวาน

2.3.1.6 กานพลู (*Syzygium caryophyllus* Bullock & Harrison วงศ์ Myrtaceae)

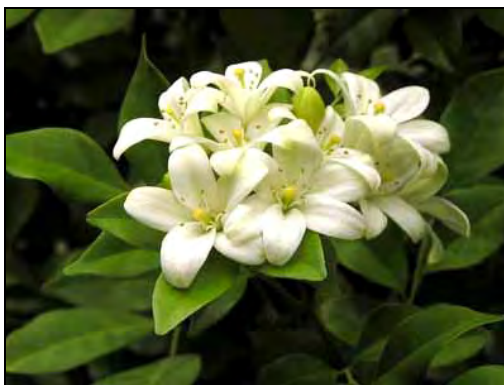
สรรพคุณ เถา แก้หืด เปลือกต้น แก้ปวดท้อง แก้ลม คุมธาตุ ไบ แก้สะอึก แก้ปวดมวน ดอก แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย ท้องขึ้น แก้ลม แก้เหน็บชา แก้หืด แก้ไอ ฟอกโลหิต ขับเสมหะ แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด น้ำมัน แก้ปวดท้อง แก้ไอ ระวังอาการปวดฟัน ระวังกระดูก แก้โรคลม (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.11 ดอกกานพลู

2.1.3.7 แก้ว (*Murraya paniculata* Jack วงศ์ Rutaceae)

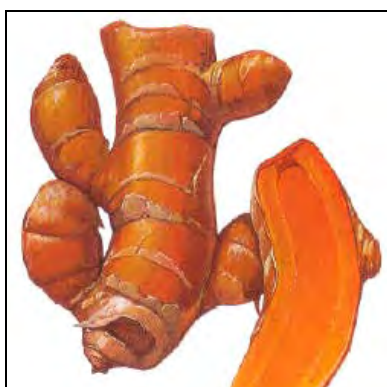
สรรพคุณ ราก แก้ปวดเอว เปลือกต้น แก้ปวดท้อง ขับโลหิตระดู ไบ ขับโลหิต แก้ท้องเสีย รักษาตาแดง แก้บิด แก้ปวดฟัน แก้จุกเสียด แก้ไข้ แก้ไอเรื้อรัง บำรุงธาตุ ดอก แก้ไอเรื้อรัง แก้ไข้ ไซซ์อักษเสบ แก้กระหายน้ำ แก้เวียนศีรษะ (สุนทรี่, 2540)



รูปที่ 2.12 ใบและดอกแก้ว

2.1.3.8 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ราก ยาบ่ารุง แก้อาการชัก ลดไข้ แก้อาการฟกช้ำ ผิวน้ำผึ้ง คัน แก้อาการอักเสบ เหง้า แก้อาการผื่นคัน แก้อาการปวดท้อง ท้องอืด แก้อาการลมพิษ ฆ่าเชื้อพยาธิ รักษาแผลในลำไส้ เจริญอาหาร ขับเสมหะ สมานแผล (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.13 เหง้าขมิ้นชัน

2.1.3.9 ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Roscoe วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ราก แก้อาการอักเสบ เหง้า สมานลำไส้ รักษาบาดแผลเรื้อรัง แก้อาการปวดท้อง ขับเสมหะ แก้อาการเจ็บ แก้อาการอักเสบ แก้อาการอักเสบ แก้อาการอักเสบ แก้อาการอักเสบ แก้อาการอักเสบ บำรุงกำลัง ใบ ขับปัสสาวะ แก้อาการอักเสบ (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.14 เหง้าขมิ้นอ้อย

2.1.3.10 ช่อย (Streblus asper Lour. วงศ์ Moraceae)

สรรพคุณ ราก แก้ปวดแผล ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการ แก้พยาธิ แก้พยาธิ รำมะนาด เปลือกต้น แก้ปวดฟัน แก้เหงือกบวม บำรุงหัวใจ แก้ท้องเสีย แก้บิด แก้โรคผิวหนัง แก้ริดสีดวงจมูก ทวาร แก่น แก้เบาหวาน แก้แมงกินฟัน แก้ริดสีดวงจมูก เนื้อไม้ แก้ปวดฟัน แก้กระษัย ใบ เป็นยาระบายอ่อนๆ แก้กระหายน้ำ แก้ปวดประจำเดือน ผล แก้โลหิตและลม เมล็ด เป็นยาอายุวัฒนะ แก้โลหิตและลม แก้ท้องอืดเฟ้อ น้ำมัน ทาแก้ริดสีดวง ทั้งต้น แก้แมงกินฟัน (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.15 ช่อย

2.3.1.11 ข่า (Alpinia galanga Linn. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ราก แก้เสมหะ แก้เหน็บชา แก้เลือดเสีย ขับลม บำรุงโลหิต เหง้า รักษาโรคผิวหนัง แก้ท้องอืดแน่น รักษากลากเกลื้อน แก้ปวดท้อง แก้ปวดฟัน แก้โลหิต แก้ฟกบวม ใบ แก้กลากเกลื้อน รักษาโรคเหน็บชา ผล แก้ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ช่วยย่อยอาหาร ทั้ง



รูปที่ 2.16 ข่า

2.3.1.12 ขิง (*Zingiber officinale* Rosce. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ เจริญอาหาร แก้เสมหะในคอ ฆ่าพยาธิ แก้ลม แก้บิด แก้โรคตา บำรุงธาตุไฟ แก้แน่นในอก เหง้า เจริญอากาศธาตุ แก้ไข้ แก้นอนไม่หลับ แก้คลื่นเหียนอาเจียน แก้ท้องเสีย แก้นิ่ว แก้โรคในปาก ต้น ขับลม แก้นิ่ว ใบ แก้กำเดา ขับลม ดอก แก้โรคอันบังเกิดแก้ดวงหทัย แก้โรคตา บำรุงหัวใจ (นันทวัน และอรนุช บก., 2539)



รูปที่ 2.17 เหง้าขิง

2.3.1.13 จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Linn. วงศ์ Myristicaceae)

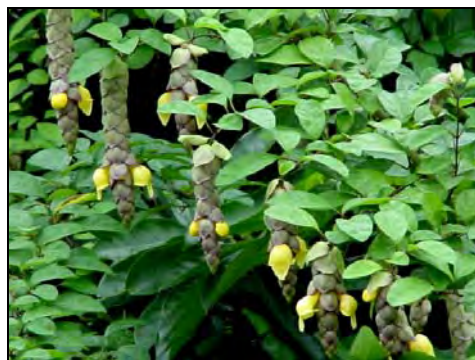
สรรพคุณ ราก บำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้ เนื้อไม้ แก้ไข้ตีเดือด บำรุงปอด หัวใจ แก่น แก้ไข้ตีเดือด แก้ไข้ บำรุงปอด หัวใจ ตับ น้ำดี แก้กระสับกระส่าย แก้ตาตาย ผล แก้ลม



รูปที่ 2.18 จันทน์เทศ

2.3.1.14 ช้องแมว (*Gmelina philipensis* Cham. วงศ์ Verbenaceae)

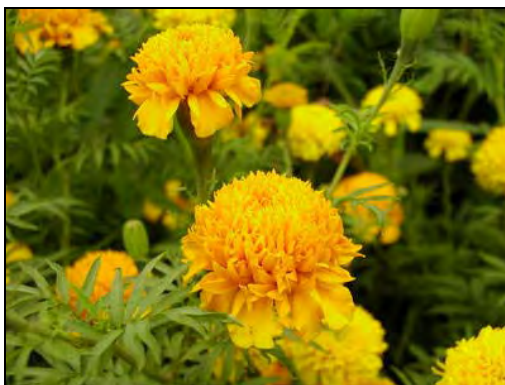
สรรพคุณ ราก แก้วพิษฝึภายใน แก้วกระษัย แก้วร้อนใน รักษาตา แก้วบาดแผล แก้วปวดศีรษะ แก้วเหงือกบวม แก้วปวดฟัน ขับพยาธิ ขับเหงื่อ ต้น แก้วร้อน ดับพิษ ใบ แก้วปวดหู แก้วบวม แก้วมร่ว่ง แก้วเหงือกบวม แก้วปวดฟัน รักษาแผล แก้วปวดศีรษะ ลูก แก้วไอ แก้วปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อ แก้วแผลถูกน้ำกัด (นันทวัน และอรุณช บก., 2539)



รูปที่ 2.19 ใบและดอกช้องแมว

2.3.1.15 ดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn. วงศ์ Compositae)

สรรพคุณ ต้ม ขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง แก้จุกเสียด ไบ แก้ฝีหนอง ดอก แก้ไอกรน แก้ปวดฟัน แก้ตาเจ็บ แก้แผลมีหนอง ทั้งห้า ขับลมในลำไส้ แก้แน่นท้อง ปวดท้อง แก้ฝีลม แก้จุกเสียด (สุนทรี, 2540)



รูปที่ 2.20 ดอกดาวเรือง

2.3.1.16 ดีปลี (*Piper chaba* Hunt วงศ์ Piperaceae)

สรรพคุณ ราก บำรุงธาตุ แก้ลม แก้ตัวร้อน แก้อัมพาต เถา แก้เสมหะ พิการ แก้ปวดท้อง แก้ปวดฟัน แก้จุกเสียด ท้องขึ้นอืดเฟ้อ แก้ปวดเมื่อยตามตัว ไบ แก้หิดไธ แก้ปวดเมื่อย ผล แก้อัมพาต เป็นยาขับระดู บำรุงธาตุ แก้ท้องร่วง เจริญอาหาร แก้ปวดท้อง แก้ลมวิงเวียน แก้คุดทะราด ทั้งต้น แก้พิษงู แก้เสมหะ แก่น้ำลายเหนียว แก้ไอ (นันทวัน และอรุณช บก., 2541)



รูปที่ 2.21 ดีปลี

2.3.1.17 โดไม่รู้ล้ม (*Elephantopus scaber* Linn. วงศ์ Compositae)

สรรพคุณ ราก ขับปัสสาวะ แก้ไข้ตัวร้อน แก้ไอเรื้อรัง แก้บิด ขับระดู
แก้ปวดฟัน แก้ฝี แผลมีหนอง ใบ แก้ไข้ ขับปัสสาวะ แก้อ่อนเพลีย รักษาอาการโรค ทั้งต้น แก้ไข้ ขับ
ปัสสาวะ ขับน้ำเหลืองเสีย บำรุงหัวใจ แก้ไอ แก้บิด แก้กามโรค แก้บวมน้ำ แก้เจ็บคอ แก้ตาแดง แก้
แผลงู แก้แมลงมีพิษกัดต่อย (นันทวัน และอรนุช บก., 2541)



รูปที่ 2.22 โดไม่รู้ล้ม

2.3.1.18 ต้อยติ่ง (*Hygrophila erecta* Hochr. วงศ์ Acanthaceae)

สรรพคุณ ราก ตับพิษ แก้ปัสสาวะพิการ ใบ แก้ปวดฟัน เมล็ด สมาน
แผล ดูดหนอง (นันทวัน และอรนุช บก., 2541)



รูปที่ 2.23 ต้อยติ่ง

2.3.1.19 ตะขาบหิน (*Muehlenbeckia platyclada* Meissn. วงศ์

Polygonaceae)

สรรพคุณ ต้น แก้พิษตะขาบ แมลงป่อง แก้ฟกช้ำ กิ่ง พอกแผล ใบ แก้พิษตะขาบ แมลงป่อง แก้อยอก ฟก บวมเคล็ด แก้หูเป็นน้ำหนอง แก้ช้ำ พอกแผล (นันทวัน และอรนุช บก., 2541)



รูปที่ 2.24 ตะขาบหิน

2.3.1.19 ตะเคียนทอง (*Hopea odorata* Roxb. วงศ์ Dipterocarpaceae)

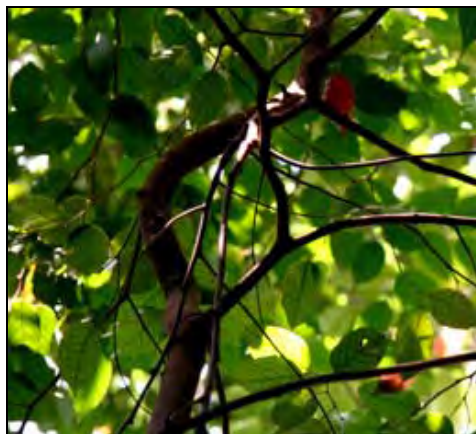
สรรพคุณ เปลือกต้น แก้ปวดฟัน แก้เหงือกบวม เนื้อไม้ แก้คุดทะราด แก้ท้องร่วง คุมธาตุ สมานแผล แก่น แก้กำเดา แก้เสมหะ แก้คุดทะราด ยาง สมานแผล แก้ท้องเสีย แก้บิดปิดธาตุ (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.25 ตะเคียนทอง

2.3.1.20 ตะเคียนหิน (*Hopea ferrea* Laness. วงศ์ Dipterocarpaceae)

สรรพคุณ ดอกใช้เข้ายาเป็นเกสรร้อยแปด เปลือกใช้ล้างแผลผสมกับเกลือ
อมป้องกันฟันผุ เนื้อไม้ใช้เป็นส่วนประกอบทำยารักษาโรคเลือดลมไม่ปกติ แก้กระษัย (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.26 ตะเคียนหิน

2.3.1.21 ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates* Stapf วงศ์ Gramineae)

สรรพคุณ ราก แก้เสียดแน่นบริเวณหน้าอก แก้ไข้เบื่ออาหาร หัว แก้
ปัสสาวะขัด แก้กาเดา ไบ ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ขับลมในลำไส้ ทั้งต้น ขับลม ทำให้เจริญ
อาหาร ขับปัสสาวะ แก้ปวดท้อง โคนต้น รักษาเกลิ้น น้ำมัน แก้แน่นท้อง แก้ปวดเมื่อย ขับลม ขับ
เหงื่อ แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ (นันทวัน และอรุณช บก., 2541)



รูปที่ 2.27 ตะไคร้

2.3.1.22 ตะลิงปลิง (*Averrhoa bilimbi* Linn. วงศ์ Oxalidaceae)

สรรพคุณ ราก แก้พิษร้อนในกระหายน้ำ แก้ริดสีดวงทวาร บำรุง
กระเพาะอาหาร ดับไข้ ดอก แก้ไอ ผล แก้ไข้ แก้ไอ เจริญอาหาร แก้เลือดออกตามไรฟัน (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.28 ตะลิงปลิง

2.3.1.23 บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* Miers ex Hook. f. & Thoms. วงศ์

Menispermaceae)

สรรพคุณ ราก แก้โลหิตเป็นพิษ แก้ไข้พิษ ต้นและเถา แก้ไข้ ดับพาร้อน
แก้ร้อนในกระหายน้ำ บำรุงกำลัง บำรุงน้ำดี เจริญอาหาร แก้อะอืด ทั้งต้น แก้ไข้ แก้ร้อนในกระหาย
น้ำ ใบ พอกปิดฝี แก้ไข้ แก้อาหารระคายเคือง แก้ปวดฟัน ฆ่าพยาธิ ดอก ขับพยาธิ ผล แก้เสมหะเป็นพิษ
แก้ไข้ (นันทวัน และอรนุช บก., 2541)



รูปที่ 2.29 บอระเพ็ด

2.3.1.24 บัวบก (*Centella asiatica* Linn. วงศ์ Umbelliferae)

สรรพคุณ ตัน แก้วน้ำใน แก้วทองเสี้ย ชับปัสสาวะ แก้วอ่อนเพลีย ใบ เป็น ยาบำรุง บำรุงหัวใจ รักษาโรคผิวหนัง ชับปัสสาวะ แก้วอ่อนเพลีย แก้วทองเสี้ย แก้วร้อนใน แก้วฟกช้ำ เมล็ด แก้วบิด แก้วไข้ ทั้งต้น บำรุงหัวใจ แก้วอ่อนเพลีย ชับเลือด แก้วอาการเริ่มเป็นบิด แก้วฟกช้ำ แก้วช้ำใน เจริญอาหาร ลดความดัน (นันทวัน และอรนุช บก., 2541)



รูปที่ 2.30 บัวบก

2.3.1.25 ประดู่บ้าน (*Ptercarpus indicus* Willd วงศ์ Papilionaceae)

สรรพคุณ ราก แก้วไข้ เปลือก แก้วปากเปื่อย แก้วทองเสี้ย แก้วโรคบิด เนื้อไม้ บำรุงธาตุ แก้วเสมหะ แก้วไข้ แก่น บำรุงโลหิต แก้วเสมหะ บำรุงธาตุ แก้วระชัย ใบและดอก แก้วผดผื่น คัน พอกแผล ยาง แก้วทองเสี้ย แก้วโรคปากเปื่อย (นันทวัน และอรนุช บก., 2541) ภูมิปัญญา ท้องถิ่นภาคใต้ นำเปลือกมาใช้แก้ปวดฟัน



รูปที่ 2.31 ประดู่บ้าน

2.3.1.26 ผักกะสัง (*Peperomia pellucida* H.B. วงศ์ Piperaceae)

สรรพคุณ ใบ รักษาโรคคุดักปิดลักเปิด แก้ไข้ แก้ชักเสบ ทั้งต้นรักษาฝี
แผล (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.32 ผักกะสัง

2.3.1.27 ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* Linn. วงศ์ Amaranthaceae)

สรรพคุณ ต้น ดับพิษภายในและภายนอก แก้บิดมูกเลือด ริดสีดวงจมูก
ทวาร แก้ผื่นคัน แก้รำมะนาด รักษาฝี แผลพุพอง (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.33 ผักขมหนาม

2.3.1.28 ผักคราด (*Spilanthes acmella* Murr. วงศ์ Compositae)

สรรพคุณ รสเฝื่อน ใช้ต้นสดตำผสมเหล้าหรือน้ำส้มสายชู อมแก้ฝีในลำคอ หรือต้มน้ำลายอักเสบ ทำให้ลื่นซา แก้ไข้ ยาพื้นบ้านใช้ยอดแก้ปวดฟัน ขับปัสสาวะ แก้บิด ระวังไธ (สุนทรี, 2540)



รูปที่ 2.34 ผักคราด

2.3.1.29 ผักชี (*Coriandrum sativum* Linn. วงศ์ Umbelliferae)

สรรพคุณ ทั้งต้น เป็นยาละลายเสมหะ แก้หัด ผื่น ขับเหงื่อ ขับลม ท้องอืดท้องเฟ้อ ผล บำรุงกระเพาะอาหาร ทำให้เจริญอาหาร แก้หัด แก้บิด แก้ริดสีดวงทวาร (สุนทรี, 2540)



รูปที่ 2.35 ผักชี

2.3.1.30 ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* Linn. วงศ์ Portulacaceae)

สรรพคุณ ทั้งต้น การกินผักเบี้ยสด ๆ จะมีประโยชน์ต่อพืชมมาก น้ำคั้นจากต้นนำไปผสมกับน้ำมันกุหลาบ ใช้อมแก้คอเจ็บ และแก้เหงื่ออกบวม และทำให้พืชนอน ใบ ใช้ทาภายนอกแก้อาการอักเสบ และแผลต่าง ๆ น้ำคั้นจากใบสดใช้ผสมกับน้ำผึ้งและน้ำตาล ปรงเป็นยาแก้อาการกระหายน้ำ แก้ไอแห้ง แก้อาการขัดเบา เมล็ด เป็นยาถ่ายพยาธิ (สุนทรี, 2540) และ (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.36 ผักเบี้ยใหญ่

2.3.1.31 ผักเป็ดไทย (*Alternanthera sessilis* DC. วงศ์ Amaranthaceae)

สรรพคุณ ต้น เป็นยาฟอกเลือด บำรุงเลือด ดับพิษเลือด และเป็นยาระบายอ่อน ๆ แก้ท้องร่วง แก้บิด แก้พิษงูกัด รักษาแผล (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.37 ผักเป็ด

2.3.1.32 ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* Linn. วงศ์ Capparaceae)

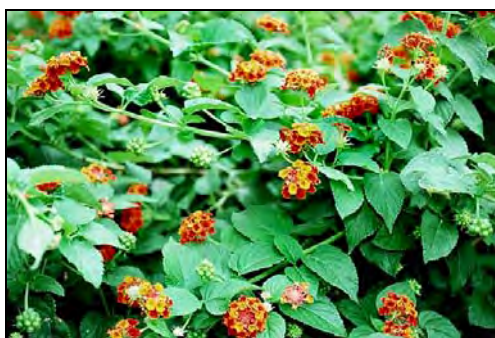
สรรพคุณ ทั้งต้น ขับหนองในในร่างกาย ทำให้หนองแห้ง ใช้ภายในเป็นยาแก้ฝีในปอด ลำไส้ ตับ โรคไขข้ออักเสบ ขับพยาธิในลำไส้ ใช้ภายนอกแก้หูอักเสบ ยาขงแก้โรคผิวหนัง รับประทานเล็กน้อยทำให้อายากอาหาร บรรเทาอาการจุกเสียด โรคบิด ใช้ล้างแผลเรื้อรัง สูดเอาไอที่ดมพืชแก้ปวดหัว (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.38 ผักเสี้ยนผี

2.3.1.33 ผกากรอง (*Lantana camara* Linn. วงศ์ Verbenaceae)

สรรพคุณ ใบ มีรสขม เย็น ใช้แก้บวม ขับลม แก้แผลผดผื่นคันที่เกิดจากความชื้นหรือ หิด ดอกมีรสขมจัดเย็น ใช้แก้อักเสบ ห้ามเลือด แก้วัณโรค อาเจียนเป็นเลือด แก้ปวดท้องอาเจียน แก้ผื่นคันที่เกิดจากความชื้นและรอยฟกช้ำที่ รากใช้แก้หวัด ปวดศีรษะ ใช้สูง ปวดฟัน คางทูม รอยฟกช้ำที่เกิดจากการกระทบกระแทก (สุนทรี, 2540)



รูปที่ 2.39 ผกากรอง

2.3.1.34 ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn. วงศ์ Myrtaceae)

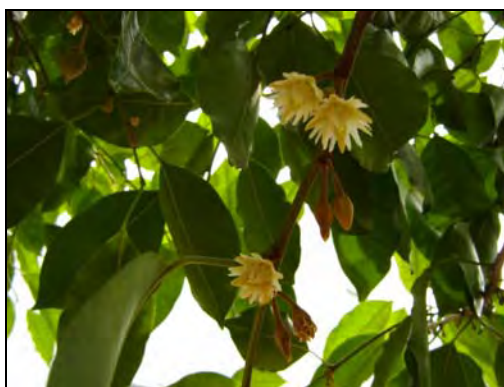
สรรพคุณ เปลือกกราก เปลือกต้น ใบเพสลาด แก้ท้องร่วงท้องเดิน ใบสด เคี้ยวระงับกลิ่นปาก ผลสุกเป็นยาระบาย และช่วยดูดกลิ่น ผลดิบแก้ท้องเดิน และป้องกันรักษาโรค ลักปิดลักเปิด (พเยาว์, 2529)



รูปที่ 2.40 ใบฝรั่ง

2.3.1.35 พิกุล (*Mimusops elengi* Linn. วงศ์ Sapotaceae)

สรรพคุณ ดอก เป็นยาบำรุงหัวใจ ปวดหัว เจ็บคอ ขับเสมหะผลสุก รับประทานแก้ปวดศีรษะและแก้โรคในลำคอและปากเปลือก ยาอมกลั้วคอ ด้างปาก แก้เหงื่ออก บวม รำมะนาดเมลิ็ด ขับปัสสาวะ แก้โรคท้องผูกใบ ฆ่าพยาธิแก้น้ำที่ราก เป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต ขับลมกระพี้ แก้เกลื้อน (สุนทรี, 2540)



รูปที่ 2.41 พิกุล

2.3.1.36 พญู (*Piper betle* Linn. วงศ์ Piperaceae)

สรรพคุณ ใบ แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด แก้ปากเหม็น ขับลมในลำไส้ แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย กระตุ้นให้กระปรี้กระเปร่า ใช้ภายนอก แก้ปวด บวม ฟกช้ำ ฆ่าเชื้อโรคหนองฝีวิธโรค แก้การอักเสบของเยื่อจมูก และแก้กลาก แก้น้ำกัดเท้า แก้คัน แก้ลมพิษ ลนไฟนอบท้องเด็ก แก้ปวดท้อง แก้ลูกอึดทะยาน (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.42 ใบพญู

2.3.1.37 พญูขาว (*Houttuynia cordata* Thunb. วงศ์ Saururaceae)

สรรพคุณ ทั้งต้น แก้กามโรค เข้าข้อ แก้โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ทำให้แผลแห้ง ฆ่าเชื้อโรคทางเดินปัสสาวะ ขับปัสสาวะ ทาภายนอกให้เลือดมาเลี้ยงผิวหนัง (วุฒิมิ, 2540)



รูปที่ 2.43 พญูขาว

2.3.1.38 ไพล (Zingiber cassumunar Roxb. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ไบ แก้กัร่นเนื้อคร่นตัว แก้กัปวดเมื้อย ดอก แก้กัข้ใน กระจาย เลื้อดที่เป็นลิมเป็นกัอน กระจายเลื้อดอ้นเก็ดแต่อภินุญญาณธาดู ทำลายเลื้อดเสื้อย ขั้บระดู ตัน แก้กัอุจจาระพิการ แก้กัธาดูพิการ ราก แก้กัเลื้อดก้าเดาออกทางปากทางจุมก แก้กัอาเจียน เป็นเลื้อด เหง้า ขั้บระดู แก้กัเหน็บซา แก้กัปวดท้อง แก้กับิตมุกเลื้อด ขั้บลม แก้กัท้องเสื้อย แก้กั ล้าลั้ช้กัเสบ ขั้บเลื้อดร้วย แก้กัมุดกัิตระดูซาเว แก้กัอาเจียน แก้กัปวดพิน แก้กัอาเจียนเป็นเลื้อด แก้กัเด็กเป็นขั้สูงตัวสัันตาเหลื้อก แก้กัเคล็ดขั้ดยอก ข้อเท้าแพลง แก้กัโรคผิวหนั้ง แก้กัฝี่ ทา เคลื้อบแผลป้องกัันการติดเชื้อ ดูดหนองสมานแผล แก้กัปวดเมื้อยกล้ามนื้อ เป็นยาซา เฉพาะที่ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.44 ไพล

2.3.1.39 โฟ (Ficus religiosa Linn. วงศ์ Moraceae)

สรรพคุณ ไบ แก้กัโรคผิวหนั้ง ผล ช่วยย่อยอาหาร ระบายท้อง เมล็ดเป็น ยาบ้ารู้งร่างกาย เปลื้อกตัน ต้มเอาน้ำอมแก้กัปวดพิน แก้กัเหงื้อกเป็นหนอง ต้าพอกแก้กั อักเสบบวม (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.45 โฟ

2.3.1.40 ฟ้ายะลวยใจ (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees วงศ์

Acanthaceae)

สรรพคุณ ทั้งต้น แก้ไข้ แก้หวัด แก้ต่อมทอนซิลอักเสบ แก้ปอดอักเสบ
แก้บิด แก้ท้องเดิน ใบ บดผสมน้ำมันพืช ทาแผลน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ใบสด นำมาเคี้ยวกลืนน้ำแก้
คออักเสบ เจ็บคอ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.46 ฟ้ายะลวยใจ

2.3.1.41 มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn. วงศ์ Guttiferae)

สรรพคุณ เปลือกผล แก้ท้องร่วง แก้บิดมูกเลือด แก้ไข้ท้องเสีย ฝนกับน้ำ
ปูนใส ทาแผลเน่าเปื่อยพุพอง แผลมีหนอง สมานแผลสด ต้มชะล้างบาดแผล เนื้อหุ้มเมล็ด
บำรุงกำลัง บำรุงร่างกาย แก้ร้อนใน เนื่องจากรับประทานทุเรียน ยางจากผล แก้บิด
ท้องร่วง ไล่แผลหนอง (ก่องกานดา, 2540)



รูปที่ 2.47 มังคุด

2.3.1.42 มะขามเทศ (*Pithecellobium dulce* Benth. วงศ์ Mimosoideae)

สรรพคุณ เปลือกต้น แก้โรคในปากคอ แก้แมงกินฟัน รักษาบาดแผลมีเชื้อ ต้มชะล้างบาดแผล สมานแผล ต้มดื่มแก้ท้องร่วง (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.48 มะขามเทศ

2.3.1.43 มะเดื่อปล้อง (*Ficus hispida* Linn.f. วงศ์ Moraceae)

สรรพคุณ เปลือกต้นและราก ขับเสมหะ แก้ท้องเสีย แก้ประดง เม็ดฝิ่น คั้นตามผิวหนัง แก้เม็ดสี แก้พิษในกระดูง (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.49 มะเดื่อปล้อง

2.3.1.44 มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale* Linn วงศ์

Anacardiaceae)

สรรพคุณ เมล็ด แก้กกลาก เกลิ้น โรคผิวหนัง แก้ผื่นแพ้ในโรคเรื้อน
ทำลายเนื้องอก เปลือก แต้มกัดหัวหูดและตาปลา (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.50 มะม่วงหิมพานต์

2.3.1.45 มะระขี้นก (*Momordica charantia* Linn. วงศ์ Cucurbitaceae)

สรรพคุณ ใบ แก้ท่อน้ำดีอักเสบ เป็นยาทำให้อาเจียน แก้ไข้ แก้ตัวร้อน
แก้ปากเปื่อย แก้พิษฝี บำรุงน้ำดี แก้ตับม้ามพิการ แก้อักเสบพบบวม แก้ปวดเนื่องจากลม
คั่งในข้อ ดอก แก้หอบหืด ผลอ่อน บำรุงน้ำดี เจริญอาหาร บำรุงร่างกาย บำรุงเลือดระดู
ขับพยาธิ เป็นยาระบายอ่อนๆ ราก แก้วริดสีดวงทวารหนัก แก้แผลอักเสบ บำรุงธาตุ สมาน
แผล ใบและราก แก้โรคเบาหวาน (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.51 มะระขี้นก

2.3.1.46 ไมยราบ (*Mimosa pudica* Linn. วงศ์ Mimosoideae)

สรรพคุณ ทั้งต้น แก้ไข้ แก้นอนไม่หลับ แก้ตานโมย แก้ตาบวม แก้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ แก้หัด ผื่นคันตามตัว แก้แผลฝี บำรุงน้ำมัน ขับปัสสาวะ แก้กระษัย ไตพิการ แก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบ แก้ระดูขาว (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.52 ไมยราบ

2.3.1.47 ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. วงศ์ Dipterocarpaceae)

สรรพคุณ เปลือก แก้ท้องร่วง แก้วริดสีดวง ใบ แก้ปวดฟัน รักษาแกมโรค น้ำมัน ขับเสมหะ ขับหนอง แก้วริดสีดวง สมานแผล ขับปัสสาวะ แก้แมงกินฟัน ยางจากต้น ขับปัสสาวะ สมานแผล แก้แมงกินฟัน ห้ามหนอง (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.53 ยางนา

2.3.1.48 ยี่หระ (Cuminum cyminum Linn. วงศ์ Umbelliferae)

สรรพคุณ ใบ บำรุงธาตุ ขับโลหิต แก้เสมหะ แก้ลมเป็นพิษ ผล เจริญอาหาร ฝาดสมาน เมล็ด แก้ปวดท้อง ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.54 ยี่หระ

2.3.1.49 รักเร่ (Dahlia pinnata Cav. วงศ์ Compositae)

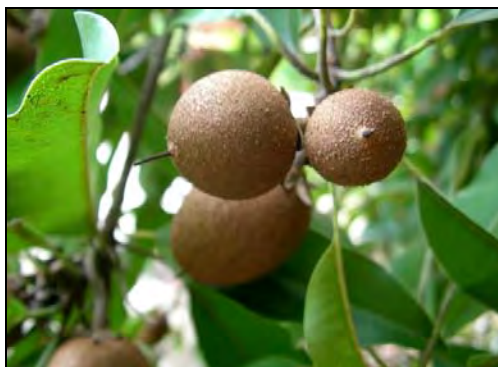
สรรพคุณ น้ำคั้นจากต้น มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะอ่อนๆ สามารถฆ่าเชื้อได้ รากหัวใจกับหมูกินเป็น ยารักษาโรคหัวใจ รักษาอาการไข้ (สุนทรี่, 2540)



รูปที่ 2.55 รักเร่

2.3.1.50 ละมุด (*Manikara zapota* Linn. วงศ์ Sapotaceae)

สรรพคุณ เปลือก แก้ไข้ แก้ท้องเสีย เจริญอาหาร ผล แก้ท้องเดิน แก้บิด เมล็ด ขับปัสสาวะ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543) ภูมิปัญญาท้องถิ่นภาคใต้ ใช้ผลอ่อนมารักษาอาการปวดฟัน



รูปที่ 2.56 ผลอ่อนของละมุด

2.3.1.51 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. วงศ์ Euphorbiaceae)

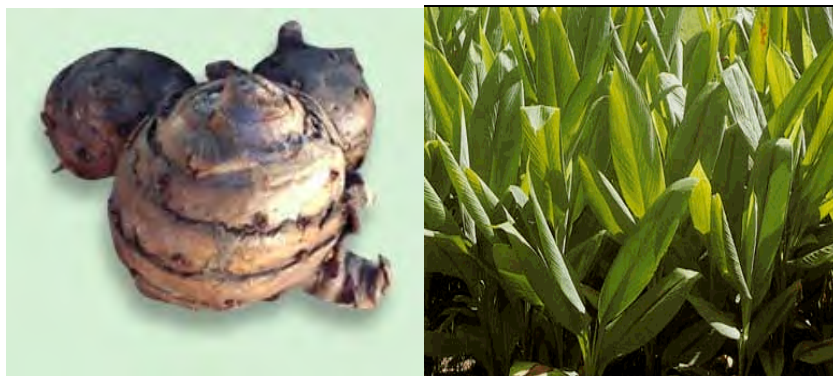
สรรพคุณ แก้ไข้ทุกชนิด ดับพิษร้อน แก้พิษตานซาง แก้โทษน้ำดีพิการ นอนหลับๆตื่นๆสะดุ้งผวา กระตุ้นไตให้ทำงาน แก้ขับเบา แก้กามโรค แก้ดีซ่าน แก้วริดสีดวง แก้โรคท้องมาน แก้ปวดท้อง แก้ไอ ขับระดูขาว ขับปัสสาวะ ลดความดันเลือด รักษาโรคไวรัสตับอักเสบนชนิดบี (นันทวัน และอรนุช บก., 2543; วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.57 ลูกใต้ใบ

2.3.1.52 ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb. วงศ์ Zingiberaceae)

สรรพคุณ ราก แก่ท้องอืดเฟ้อ หัว แก่มดลูกพิการ ทำให้มดลูกเข้าคู่วเร็ว
ขึ้น แก่ริดสีดวงทวาร (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.58 ว่านชักมดลูก

2.3.1.53 สะแกนา (*Combretum quadrangulare* Kurz วงศ์ Combretaceae)

สรรพคุณ ราก ชำพยาธิ แก่น้ำเหลืองเสีย เนื้อไม้ แก่กามโรค ใบ แก่
ปวดเมื่อย รักษาแผล ใบก้าน แก่ไข้ เมล็ด ถ่ายพยาธิ ทั้งห้า แก่พยาธิ ตานขโมย แก่อุจจาระเหม็น
คาว แก่ปวดท้อง (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.59 สะแกนา

2.3.1.54 สะบ้าลิง (*Entada glandulosa* Pierre ex Gagnep. วงศ์

Mimosoideae)

สรรพคุณ ต้มและเปลือก แก้คันศีรษะ เป็นยาพอกรักษาแผล ล้างแผล ขับพยาธิตัวตืดและพยาธิผิวหนัง ผล รักษาโรคผิวหนัง (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.60 สะบ้าลิง

2.3.1.55 สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn. วงศ์ Compositae)

สรรพคุณ แก้ปวดท้อง ท้องขึ้น ใบ สมานแผล ห้ามเลือด แก้อักเสบ ดอก แก้อ่อนในกระหายน้ำ แก้อ่อนเพลีย แก้ไข้ ทั้งต้น แก้บาดทะยัก (วุฒิ, 2540)



รูปที่ 2.61 สาบเสือ

2.3.1.56 เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi* Powell. วงศ์ Myrtaceae)

สรรพคุณ ใบ แก้เคล็ดยอก แก้ปวดท้อง ท้องขึ้นอืดเฟ้อ ขับลม ขับเสมหะ แก้ปวดฟัน แก้ปวดศีรษะ ขับพยาธิ แก้จุกเสียด (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.62 เสม็ดขาว

2.3.1.57 หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour. วงศ์ Stemonaceae)

สรรพคุณ ราก แก้โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรคพยาธิภายใน มะเร็งตับ ต้มสมน้ำ เอาน้ำพอกทำฆ่าหิด เหา แผลงหนอน ศัตรูพืช ต้มกับยาทำให้หัวริดสีดวงให้ฝ่อแห้งไป (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.63 หนอนตายหยาก

2.3.1.58 หมาก (*Areca catechu* Linn. วงศ์ Palmae)

สรรพคุณ ราก แก้ไข้ แก้พิษผุ แก้ท้องเสีย แก้บิด ขับปัสสาวะ อมแก้ปากเปื่อย ใบ ขับพิษ แก้ไข้ แก้คัน แก้ร้อนในกระหายน้ำ ผล แก้ท้องร่วง ขับเหงื่อ แก้บิดมูกเลือด แก้ไข้ สمانแผล แก้ปากเปื่อย แก้แผลน้ำกัด เปลือกผล ขับลม ขับปัสสาวะ เมล็ด ขับปัสสาวะ แก้ท้องเสีย ขับระดู บำรุงประสาท ไล่ ดับพิษร้อน ขับปัสสาวะ แก้ไข้ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.64 หมาก

2.3.1.59 หัสศุณ (*Micromelum minutum* Wight & Arn. วงศ์ Rutaceae)

สรรพคุณ ราก บำรุงธาตุ ขับเลือดลมให้กระจาย ขับผายลม ขับเลือดและหนอง แก้วริดสีดวงจุก แก้วคุดทะราด ต้น ขับลมในลำไส้ แก้วไธ ขับลำไส้ ใบ แก้วไข แก้วจุกเสียด แก้วปวดท้อง แก้วหนีไอ แก้วฟกซ้ำบวม ดอก ขับเสมหะ ฟอกโลหิต น้ำเหลือง ผล ขับลม แก้วจุกเสียด เปลือก แก้วริดสีดวงจุก ทั้ง 5 ขับลม แก้วจุกเสียด แน่นท้อง (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.65 หัสศุณ

2.3.1.60 หญ้าเกล็ดหอยจีน (*Oxalis acetosella* Linn. วงศ์ Oxalidaceae)

สรรพคุณ ทั้งต้น ดับพิษร้อนใน แก้ฝีในคอ แก้อาเจียนเป็นเลือด ตำพอก
เท้าแก้ปวด ถอนพิษ ทำให้เย็น แก้ฝีในคอ แก้ไข้ใน แก้ปวดท้อง แก้หัวร้อน แก้ปวดเมื่อย
รูมาติสซึม แก้อุจจาระปัสสาวะเป็นเลือด แก้เคล็ดขัดยอก แก้เจ็บคอ แก้ปวดฟัน (วุฒิ,
2540)



รูปที่ 2.66 หญ้าเกล็ดหอยจีน

2.3.1.61 อบเชย (*Cinnamomum bejolghota* Sweet วงศ์ Lauraceae)

สรรพคุณ ต้น ดมแก้ดับอักระบ อหารไม่ย่อย แก้ท้องเสีย ลำไส้เล็ก
ทำงานผิดปกติ และขับพยาธิ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)



รูปที่ 2.67 อบเชย

2.3.1.62 อินทนิลน้ำ (*Lagerstroemia speciosa* Pers. วงศ์ Lythraceae)

สรรพคุณ ราก รักษาแผลในปาก เปลือก แก้ท้องเสีย แก้ไข้ ใบ แก้
ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ แก้โรคเบาหวาน ผล แก้ปวดฟัน เมล็ด แก้เบาหวาน (วุฒิ,
2540)



รูปที่ 2.68 อินทนิลน้ำ

2.3.2 ถั่วงอก (Clitoria ternatea Linn. วงศ์ Fabaceae)

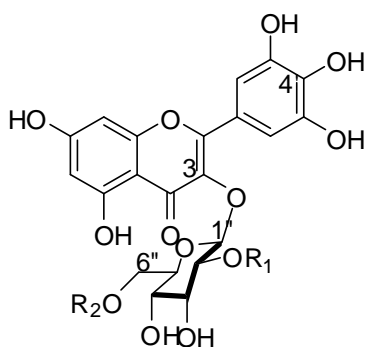
ถั่วงอก เป็นพืชในวงศ์ Fabaceae อยู่ในสกุล *Clitoria* มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Clitoria ternatea* ลักษณะเป็นไม้กอพุ่มขนาดเล็ก ปลายยอดเป็นเถาปลายเลื้อยพัน เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นประมาณ 3.4-3.6 มิลลิเมตร เถาอ่อนมีขนนุ่ม ใบเป็นใบประกอบ ออกตรงข้ามเป็นคู่ ใบย่อยรูปไข่ ดอกเป็นดอกเดี่ยวดอก สีขาวและดอกสีน้ำเงิน (ม่วง) มีทั้งที่เป็นดอกชั้นเดียว และดอกซ้อน ผล เป็นฝัก ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด (นิจิตวี, 2547) ถั่วงอกมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ถั่วงอก (เชียงใหม่) แดงจัน (ภาคเหนือ) สามารถพบได้ทั่วไปตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย



รูปที่ 2.69 ถั่วงอก (*Clitoria ternatea* L.)

อัญชันนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้านทั้งอาหาร ดอกใช้แต่งสีอาหาร เครื่องสำอาง ขนม และยารักษาโรค ตามตำรายาแผนโบราณ ดอกอัญชันเป็นยาบำรุงสายตา แก้อาการตาฟาง ตามัว รักษาอาการผมร่วง แก้ฟกช้ำบวม รากมีรสจืดเย็น สามารถแก้ปวดฟัน บำรุงสายตา ขับปัสสาวะ กินและพอกถอนพิษสุนัขบ้า น้ำคั้นจากใบสดใช้หยอดตา แก้อาการอักเสบ ฝ้าฟาง (นิจศิริ , 2547) และ (นันทวัน และอรนุช บก., 2543)

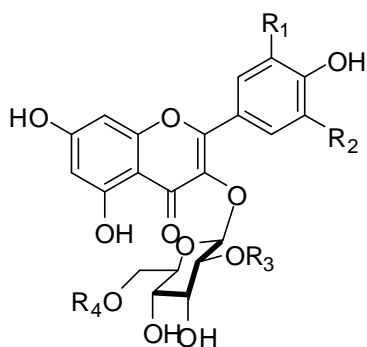
การศึกษาเกี่ยวกับสารที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของอัญชัน ได้แก่ ในดอกพบสารกลุ่ม anthocyanins โดยในปี 1990 และปี 1998 Terahara และคณะ สามารถแยกสาร ternatins (A1-A3, B1-B4, C1-C5, D1-D3 และ preternatins (A3, C4) และพบว่าดอกอ่อนจะมีความหลากหลายของสารมากกว่าในดอกแก่ นอกจากนี้ในปี 2003 Kazuma และคณะ^a ยังพบ flavonol glycosides ที่เป็นสารชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ kaempferol 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside, quercetin 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside และ myricetin 3-O-(2'',6''-di-O- α -rhamnosyl)- β -glucoside นอกเหนือจากสารเดิมอีก 11 ชนิด คือ kaempferol และ quercetin 3-(2^o-rhamnosylrutinoside)s, kaempferol, quercetin และ myricetin 3-neohesperidosides, 3-rutinosides และ 3-glucosides และในปีเดียวกันนั้น Kazuma และคณะ^b ยังศึกษาพบว่า flavonoid ที่พบในดอกอัญชันขึ้นอยู่กับสีของกลีบดอกด้วย โดยพบสารชนิดใหม่ในดอกสีม่วงอ่อน คือ delphinidin 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside ส่วนในดอกสีขาวไม่พบ anthocyanin



- 1 delphinidin 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside
- 2 delphinidin 3-O-(6''-O-malonyl)- β -glucoside
- 3 delphinidin 3-neohesperidoside
- 4, delphinidin 3-O- β -glucoside

	R ₁	R ₂
1	rhamnosyl	malonyl
2	H	malonyl
3	rhamnosyl	H
4	H	H

รูปที่ 2.70 โครงสร้างทางเคมีของ delphinidins

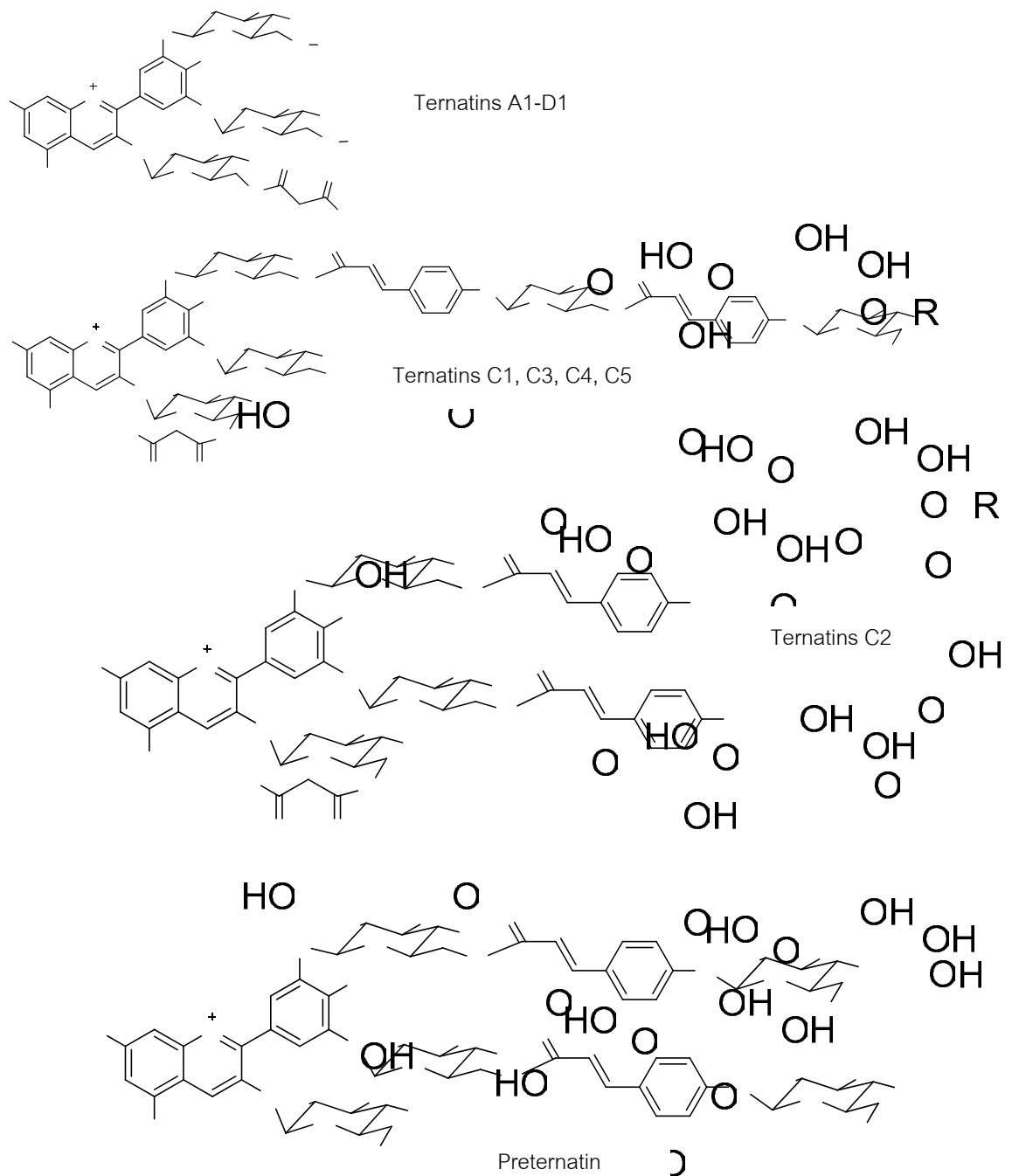


- 1 kaempferol 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside
- 2 quercetin 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside
- 3 myricetin 3-2^G-rhamnosylrutinoside
- 4 quercetin 3-2^G-rhamnosylrutinoside
- 5 kaempferol 3-2^G-rhamnosylrutinoside
- 6 kaempferol 3-neohesperidoside
- 7 quercetin 3-neohesperidoside
- 8 myricetin 3-neohesperidoside
- 9 kaempferol 3-rutinoside
- 10 quercetin 3-rutinoside
- 11 myricetin 3-rutinoside
- 12 kaempferol 3-glucoside
- 13 quercetin 3- glucoside
- 14 myricetin 3-glucoside

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	rhamnosyl	malonyl
2	OH	H	rhamnosyl	malonyl
3	OH	OH	rhamnosyl	rhamnosyl
4	OH	H	rhamnosyl	rhamnosyl
5	H	H	rhamnosyl	rhamnosyl
6	H	H	rhamnosyl	H
7	OH	H	rhamnosyl	H
8	OH	OH	rhamnosyl	H
9	H	H	H	rhamnosyl
10	OH	H	H	rhamnosyl
11	OH	OH	H	rhamnosyl
12	H	H	H	H
13	OH	H	H	H
14	OH	OH	H	H

รูปที่ 2.71 โครงสร้างทางเคมีของ malonylated flavonol glycoside ที่แยกได้จากดอกอัญชัน

สารที่แยกได้จากเมล็ด ในปี 2004 Kelemu และคณะ พบว่าเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อราก่อโรคในพืช เช่น *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae*, *Collectrichum gloeosporioides* นอกจากนี้ยังยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคแบคทีเรียไลบ์ *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ทำลายด้วงถั่วพวก *Zabrotes subfasciatus* และ *Acanthoscelides obtectus*



รูปที่ 2.72 โครงสร้างทางเคมีของ ternatins และ preternatins

สารสกัดส่วนราก มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนราก โดยฉีดสารสกัดจากเมทานอลปริมาณ 200-400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดไข้ในหนูขาว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ 1D และ 2D NMR ได้แก่ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, NOESY, HSQC และ HMBC โดยวิเคราะห์สเปกตรัมของ ^1H -NMR ที่ 400 MHz และ ^{13}C -NMR ที่ 100 MHz สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายเมทานอล-ดี (CD_3OD) โดยวัดค่าเคมีคอลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สำหรับค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมีคอลชิฟท์ของตัวทำละลายโดยที่ CD_3OD อ้างอิงที่ 3.31 (δ) ppm สำหรับ ^1H nuclei และ 49.00 ppm สำหรับ ^{13}C nuclei

3.1.2 เครื่อง Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV-Vis) รุ่น Thermo Electron เตรียมโดยนำสารตัวอย่างมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารตัวอย่างละลายได้ดี แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์นั้นเป็นตัวทำละลายอ้างอิง

3.1.3 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร สารตัวอย่างที่เป็นของแข็งเตรียมโดยบดผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวเตรียมโดยหยดของเหลวลงบนแผ่นวินโดวที่ทำด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.4 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi, Switzerland

3.1.5 เครื่อง Specific Optical Rotation Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ของบริษัท Perkin-Elmer, Germany

3.1.6 เครื่อง Mass Spectrometer (MS) รุ่น microToF ของ Bruker Daltonics, USA สำหรับใช้ในการมวลโมเลกุลของสารประกอบวิเคราะห์ด้วย Atmospheric pressure chemical ionization time of flight (APCI/TOF)

3.1.7 เครื่อง Microplate Reader Spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 และ 570 นาโนเมตร ประมวลผลโดยใช้ software SUNRISE MagellanTM v.4.0 TECA, Austria

3.1.8 ตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (CO₂ Incubator) รุ่น 3121 ของบริษัท Forma Scientific, Japan ใช้เลี้ยง *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

3.1.9 ตู้ฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HRM 242 ของบริษัท Hirayama, Japan

3.1.10 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Biohazard Cabinet Type II) รุ่น BH2000 ของบริษัท Clyde-APAC, Australia

3.2 จุลชีพทดสอบ

3.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* สายพันธุ์ ATCC 25175

3.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus actinomycetemcomitans* สายพันธุ์ ATCC 43718

3.2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ATCC 6633

3.2.4 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923

3.2.5 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC 25922

3.2.6 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853

3.2.7 เชื้อยีสต์ *Candida albicans* สายพันธุ์ ATCC 10231

(เชื้อแบคทีเรีย 3.2.1 และ 3.2.2 ได้รับการอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธีญะกิจไพศาล ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.3 ฟิชสมุนไพรอไทย

ฟิชสมุนไพรอไทยที่ใช้ในงานวิจัยมีสรรพคุณในการฆ่าแบคทีเรีย แก้เหงือกบวม เหงือกอักเสบ แก้กามมะนาด รวมทั้งฆ่าเชื้อโรค และรักษาบาดแผลอ้างอิงสรรพคุณตามหนังสือตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพรอ (เพยาว์, 2529) สมุนไพรอไม้พื้นบ้าน (1)-(5) (นันทวัน และอรุณช บก., 2539, 2541 และ 2543) สารานุกรมสารานุกรมสมุนไพรอไทย: รวมหลักเภสัชกรรมไทยสมุนไพรอ (วุฒิ, 2540) สมุนไพรอไทย ตอนที่ 6 (ก่องกานดา, 2540) สรรพคุณสมุนไพรอ 200 ชนิด (สุนทรี, 2540) และภูมิปัญญาท้องถิ่นภาคใต้ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการวิจัย

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
กะทกรก	<i>Passiflora foetida</i> Linn.	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
กะพังโหม	<i>Paederia foetida</i> Linn.	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
กะเพรา	<i>Ocimum sanctum</i> Linn.	ใบ	ตลาดสดคลองตัน กทม.
กะเม็ง	<i>Eclipta prostrata</i> Linn.	ราก ดอก	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
กระวาน	<i>Amomum testaceum</i> Ridl.	ผล	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
กานพลู	<i>Syzygium caryophyllus</i> Bullock & Harrison	ดอก	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
แก้ว	<i>Murraya paniculata</i> Jack	ใบ	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i> Linn.	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
ขมิ้นอ้อย	<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
ช่อย	<i>Streblus asper</i> Lour.	ทั้งต้น	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
ข่า	<i>Alpinia galanga</i> Linn.	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
ขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
จันทน์เทศ	<i>Myristica fragrans</i> Linn.	ดอก	ร้านขายยาเวชพงค์ กทม.
ช้องแมว	<i>Gmelina philippensis</i> Cham.	ใบ	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬา ฯ
ดาวเรือง	<i>Tagetes erecta</i> Linn.	ช่อดอก	ตลาดนัดจตุจักร กทม.
ดีปลี	<i>Piper chaba</i> Hunt	เถา	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
โตไม่รู้ล้ม	<i>Elephantopus scaber</i> Linn.	ราก	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ต้อยติ่ง	<i>Hygrophila erecta</i> Hochr.	ใบ เมล็ด	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
ตะขาบหิน	<i>Muehlenbeckia platyclada</i> Meissn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ตะเคียนทอง	<i>Hopea odorata</i> Roxb.	เปลือกต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ตะเคียนหิน	<i>Hopea ferrea</i> Laness.	เปลือกต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ตะไคร้	<i>Cymbopogon citrates</i> Stapf	ทั้งต้น	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
ตะลิงปลิง	<i>Averrhoa bilimbi</i> Linn.	ใบ	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
บอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa</i> Miers ex Hook. f. & Thoms.	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
บัวบก	<i>Centella asiatica</i> Linn.	ทั้งต้น	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬา ฯ
ประดู่บ้าน	<i>Pterocarpus indicus</i> Willd	เปลือก	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักกะสัง	<i>Peperomia pellucida</i> H.B.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักขมหนาม	<i>Amaranthus spinosus</i> Linn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักคราด	<i>Spilanthes acmella</i> Murr.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักชี	<i>Coriandrum sativum</i> Linn.	เมล็ด	ตลาดสามย่าน กทม.
ผักเบี้ยใหญ่	<i>Portulaca oleracea</i> Linn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักเป็ดไทย	<i>Alternanthera sessilis</i> DC	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผักเสี้ยนผี	<i>Cleome viscosa</i> Linn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ผกากรอง	<i>Lantana camara</i> Linn.	ราก	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
ฝรั่ง	<i>Psidium guajava</i> Linn.	ใบ	เขตประเวศ กทม.
พิกุล	<i>Mimusops elengi</i> Linn.	เปลือกต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
พลู	<i>Piper betle</i> Linn.	ใบ	ตลาดพระโขนง กทม.
พลูคาว	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	ใบ	อ.เมือง จ.ลำปาง
ไพล	<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงศ์ กทม.
โพ	<i>Ficus religiosa</i> Linn.	เปลือกต้น	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i> Wall. Ex Nees.	ใบ	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
มังคุด	<i>Garcinia mangostana</i> Linn.	เปลือกผล	ร้านขายยาเวชพงศ์ กทม.
มะขามเทศ	<i>Pithecolobium dulce</i> Benth.	เปลือกต้น	อ.ดอนตูม จ.นครปฐม
มะเดื่อปล้อง	<i>Ficus hispida</i> Linn.f.	เปลือกต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
มะม่วงหิมพานต์	<i>Anacardium occidentale</i> Linn.	เปลือกต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
มะระขี้นก	<i>Momordica charantia</i> Linn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ไมยราบ	<i>Mimosa pudica</i> Linn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ยางนา	<i>Dipterocarpus alatus</i> Roxb.	น้ำมัน	จ.สุรินทร์
ยี่หระ	<i>Cuminum cyminum</i> Linn.	เมล็ด	ตลาดสามย่าน กทม.
รักเร่	<i>Dahlia pinnata</i> Cav.	ทั้งต้น	ตลาดนัดจตุจักร กทม.
ละมุด	<i>Manilkara achras</i> Fosberg	ผลอ่อน	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ลูกใต้ใบ	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum & Thonn.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	เหง้า	ร้านขายยาเวชพงศ์ กทม.
สะแกนา	<i>Combretum quadrangulare</i> Kurz	เปลือกต้น	จ.อุยธยา
สะบ้า	<i>Entada glandulosa</i> Pierre ex	เมล็ด	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
สาบเสือ	<i>Eupatorium odoratum</i> Linn.	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
เสม็ดขาว	<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
หนอนตายหยาก	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	ราก	ร้านขายยาเวชพงศ์ กทม.
หมาก	<i>Areca catechu</i> Linn	ผล	ตลาดสดพระโขนง กทม.
หัสศคุณ	<i>Micromelum minutum</i> Wight & Arn.	ใบ	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
หญ้าเกล็ดหอยจีน	<i>Oxalis repens</i> Thunb.	ทั้งต้น	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
อบเชย	<i>Cinnamomum bejolghota</i> Sweet	เปลือกต้น	ตลาดสามย่าน กทม.
อัญชัน	<i>Clitoria ternatea</i> Linn.	ราก ดอก	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี
อินทนิลน้ำ	<i>Legerstroemia speciosa</i> Pers.	ราก	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ

ตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัย มีทั้งตัวอย่างพืชสมุนไพรสด และผงสมุนไพรแห้ง ช่วงระยะเวลาของการเก็บพืชสมุนไพรสดอยู่ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2549 โดยพืชสมุนไพรสดจะต้องอบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร ก่อนจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย

3.4 สารเคมี

3.4.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เฮกเซน เอธิลเอซิเตต เป็นตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (Commercial grade) ซึ่งจะนำไปกลั่นให้บริสุทธิ์ก่อนใช้ทุกครั้ง และใช้ตัวทำละลายคุณภาพห้องปฏิบัติการ (Analytical grade) ในการทดสอบการละลาย และทำเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

3.4.2 สารเคมีชนิดอื่น ๆ

3.4.2.1 ตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ Sephadex™ LH-20 ของบริษัท Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden และซิลิกาเจลชนิด 60 Art.1.09385.9025 (230-400 mesh ASTM) ของบริษัท Merck, Germany

3.4.2.2 ซิลิกาเจลชนิด 60 PF₂₅₄ ซึ่งมียิปซัม (Silica gel containing gypsum) ของบริษัท Merck, Germany สำหรับโคทบน Preparative TLC

ซึ่งน้ำหนักของซิลิกาเจลชนิด 60 PF₂₅₄ ประมาณ 30 กรัม เติมน้ำ 60-70 มิลลิลิตร (ใช้โคทแผ่นกระจกขนาด 20x20 เซนติเมตร จำนวน 4 แผ่น) กวนผสมให้เข้ากัน นำมาเทลงในรางเตรียม TLC ตั้งความหนาของซิลิกาเจลเป็น 0.5 มิลลิเมตร แล้วลากไปตามแผ่นกระจกที่สะอาดที่วางอยู่บนรางเตรียม TLC รอให้ซิลิกาเจลแห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน ก่อนจะนำมาใช้งาน

การตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่นกระจก ใช้การส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นจุดแถบสารที่เกิดขึ้นบนแผ่นกระจกนำไปละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม กรองผ่านสำลีเอาเฉพาะส่วนใส นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จนได้สารที่ต้องการ

3.4.2.3 TLC aluminum sheet ที่มีเฟสคงที่เป็น silica gel 60 F₂₅₄ ของบริษัท Merck, Germany ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร สำหรับเทคนิค TLC

การตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้การส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือนำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่

3.4.2.4 สารเอ็มทีที (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ของบริษัท USB corporation, USA หรือสารไอเอ็นที (INT; *p*-iodonitrotetrazolium violet, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazolium chloride) ของบริษัท Fluka, Austria สำหรับทดสอบความสามารถในการต้านจุลชีพและหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยเทคนิค Microtiter Plate Broth Dilution

3.4.2.5 สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Riedel-deHaën[®], Germany)

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ดูรายละเอียดสูตร การเตรียมในภาคผนวก ก)

3.5.1 อาหาร Trypticase soy broth (TSB) และ Trypticase soy agar (TSA) ยี่ห้อ Himedia, India สำหรับเชื้อ *S. mutans*

3.5.2 อาหาร Brain heart infusion broth (BHIB) และ Brain heart infusion agar (BHIA) ยี่ห้อ Himedia, India สำหรับเชื้อ *A. actinomycetemcomitans*

3.5.3 อาหาร Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA) สำหรับเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa*

3.5.4. อาหาร Yeast malt extract medium broth (YMB) และ Yeast malt extract agar (YMA) สำหรับเชื้อ *C. albicans*

3.6 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย

นำตัวอย่างพืชสมุนไพรไทยตามตารางที่ 3.1 มาสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล โดยใช้ตัวอย่างพืชต่อปริมาณของตัวทำละลาย 1:4 แช่ตัวอย่างพืชในไดคลอโรมีเทน 3 ครั้งๆ ละ 4 ชม. (ครั้งที่ 3 แช่ทิ้งไว้ค้างคืน) โดยระหว่างการแช่จะทำการสั่นด้วยเครื่องสั่นคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath) อย่างน้อย 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนใส จากนั้นระเหยเอาไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดหยาบในตู้เย็น -4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาสกัดด้วยเมทานอลต่อ ทำการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

3.7 การคัดกรองหาสารสกัดยับยั้งจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบด้วยวิธีการแพร่ในอาหารวุ้น (Agar diffusion test) (Jorgensen, Turnidge และ Washington, 1999)

3.7.1 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดยับยั้ง

นำสารสกัดยับยั้งที่ได้จากข้อ 3.6 มาทำเป็นสารละลาย โดยละลายในสารไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ร้อยละ 10 ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่มีการเติมสารทวิน 80 (Tween 80) ร้อยละ 1 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.2 การเตรียมจุลชีพทดสอบ

นำจุลชีพทดสอบแต่ละชนิดจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งตามข้อ 3.5.1 จำนวน 1-2 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ค้างคืนในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. aureus*, *E. coli* และ *C. albican* ส่วน *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* เลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีความขุ่นเป็น 0.05-0.06 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 - 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

3.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดยับยั้ง

นำจุลชีพทดสอบจากข้อ 3.7.2 มากวาด (swab) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง วางทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 20-30 นาที ดูดสารละลายจากสารสกัดยับยั้งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.7.1 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษซับกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางทิ้งไว้ 15-20 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 ไมโครกรัมต่อดิส นำกระดาษซับกลมวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีจุลชีพทดสอบ โดยทำ 3 ซ้ำ ใช้ตัวควบคุมบวก Ampicillin และ Streptomycin สำหรับเชื้อ *S. mutans*, *S. aureus* และ *B. aureus* Ampicillin และ Chloramphenicol สำหรับเชื้อ *A. actinomycetemcomitans*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* Ketoconazole สำหรับเชื้อ *C. albicans* ตัวควบคุมลบเป็นสารละลายสารไดเมทิลซัลโฟไซด์ ร้อยละ 10 ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่มีการเติมสารทวิน 80 จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. aureus*, *E. coli* และ *C. albican* ส่วน *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* เลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบกระดาษซับกลม ถ้ามีวงใสเกิดขึ้นมากกว่า 6 มิลลิเมตร แสดงว่าสารสกัดยับยั้งจากพืชชนิดนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ถ้าหากวงใสมีขนาดกว้างมากกว่าหรือ

3.8 การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทดสอบ นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3.8.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากรากอัญชัน

นำรากอัญชันแห้งน้ำหนัก 160 กรัม มาแช่ในเฮกเซน 2 ครั้งๆ ละ 600 มิลลิลิตร ระเหยเอาเฮกเซนออก แล้วนำมาแช่ต่อในเมทานอล 7 ครั้งๆ ละ 4 ชม. (ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 6 แช่ทิ้งไว้ค้างคืน) ในระหว่างการแช่จะทำการสั่นด้วยอ่างคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath) อย่างน้อย 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที แต่ละครั้งใช้เมทานอล 640 มิลลิลิตร ระเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้สารสกัดหยาบจากรากอัญชันน้ำหนัก 9.63 กรัม

3.8.2 การคัดกรองสารสกัดหยาบจากรากอัญชันโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวบ่งชี้

นำสารสกัดหยาบจากรากอัญชันน้ำหนัก 3.2680 กรัม มาละลายในเมทานอล บรรจุลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่แยกตามขนาดโมเลกุลของสาร ใช้ตัวดูดซับเป็น Sephadex™ LH-20 (น้ำหนัก 40 กรัม ที่มีการทำให้อิ่มตัวด้วยเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95, 4:96 และ 3:97 แล้วเก็บสารที่ชะออกมาเป็นลำดับส่วน ๆ ละ 5 มิลลิลิตร โดยทั้งสามอัตราส่วน ตัวทำละลาย และลำดับส่วนที่แยกได้ แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ลำดับส่วนที่ชะผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ลำดับส่วนที่	ตัวทำละลาย
1-46	ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95
47-88	ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 4:96
89-95	ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 3:97

สุ่มลำดับส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้วิธีเจือจางสารสกัดหยาบในอาหารเหลว (Microtiter Plate Broth Dilution) (Eloff, 1998) โดยดูแต่ละลำดับส่วน ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Speed vac concentrator) ซึ่งน้ำหนักของสารที่ได้ แล้วนำไปผสมกับตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ร้อยละ 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับจุลชีพทดสอบแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น

เตรียมสารละลายชุดควบคุมบวก โดยใช้ Penicilin G, Amplicilin, Streptomycin และ Ketoconazole ให้มีความเข้มข้นเหมือนกับสารละลายแต่ละลำดับส่วน

เตรียมจุลชีพทดสอบ เตรียมตามข้อ 3.7.2

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง โดยทำการทดสอบในถาด 96 หลุม (96 well plate) ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงในถาด 96 หลุม ซึ่งสารที่ใช้มีดังนี้

Blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีจุลชีพแขวนลอยทดสอบ

ตัวควบคุมบวก เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีจุลชีพแขวนลอยทดสอบและยาตามระดับความเข้มข้น

ตัวอย่างทดสอบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีจุลชีพแขวนลอยทดสอบและลำดับส่วนต่างๆ ตามระดับความเข้มข้น ปริมาตรที่ใช้ คือ จุลชีพทดสอบแขวนลอย 50 ไมโครลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแต่ละลำดับส่วน 50 ไมโครลิตร ซึ่งระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างทดสอบเป็น 100, 50 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากนั้นนำถาด 96 หลุมไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. aureus*, *E. coli* และ *C. albican* ส่วน *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมสารละลาย INT 40 ไมโครลิตรต่อหลุม (เตรียมโดยละลายสาร INT ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปอ่านผลด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร หรือเติมสาร MTT 30 ไมโครลิตรต่อหลุม (เตรียมโดยละลายสารละลาย MTT ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วจึงนำไปอ่านผลด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

การแปลผลการทดสอบ วัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกัน ตัวอย่างทดสอบที่พิจารณาว่าสามารถยับยั้งจุลชีพทดสอบได้ จะต้องไม่มีสีเกิดขึ้น

3.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากรากอัญชันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำแต่ละลำดับส่วนที่ผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมดทำ TLC โดยใช้โดยใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แล้วรวบลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำมาแยกองค์ประกอบต่อโดยใช้การละลาย นำแต่ละลำดับส่วนมา

ตารางที่ 3.3 น้ำหนักของสารและลักษณะปรากฏที่เหลือจากการแยกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลาย

ลำดับส่วนที่	ตัวทำละลาย			
	เมทานอล		น้ำ	
	น้ำหนัก (มก.)	ลักษณะปรากฏ	น้ำหนัก (มก.)	ลักษณะปรากฏ
1	-	-	0.7	ผงสีขาว
2	-	-	0.7	ผงสีขาว
3	-	-	0.7	ผงสีขาว
4	-	-	1.4	ผงสีขาว
5	4.1	ตะกอนสีเหลือง	1.3	ผงสีขาว
6	-	-	1.4	ผงสีขาว
7	22.3	ตะกอนสีเหลือง	-	-
8	8.6	ตะกอนสีเหลือง	-	-
9	31.3	ตะกอนสีเหลือง	-	-
10	16.5	ของหนืดสีเหลือง	-	-
11	19.7	ของหนืดสีเหลือง	-	-
12	11.6	ของหนืดสีเหลือง	-	-
13	22.6	ของหนืดสีเหลือง	-	-
14	18.7	ของหนืดสีเหลือง	-	-
15	16.5	ของหนืดสีเหลือง	-	-
16	14.4	ของหนืดสีเหลือง	1.5	ผงสีขาว
17	13.0	ของหนืดสีเหลือง	0.9	ผงสีขาว
18	17.6	ของหนืดสีเหลือง	1.8	ผงสีขาว
19	10.4	ของหนืดสีเหลือง	1.2	ผงสีขาว
20	19.1	ของหนืดสีเหลือง	1.6	ผงสีขาว
21-24	153.3	ของหนืดสีเหลือง	27.5	ผงสีขาว
25	64.4	ของหนืดสีเหลือง	11.6	ผงสีขาว
26-29	243.2	ของหนืดสีเหลือง	9.6	ผงสีขาว
30	16.2	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	2.1	ผงสีขาว
31	14.9	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	1.5	ผงสีขาว
32-34	41.7	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	0.7	ผงสีขาว
35	22.5	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	0.7	ผงสีขาว

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ลำดับส่วนที่	ตัวทำละลาย			
	เมทานอล		น้ำ	
	น้ำหนัก (มก.)	น้ำหนัก (มก.)	น้ำหนัก (มก.)	น้ำหนัก (มก.)
36	31.1	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	-	-
37-40	50.4	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	9.7	ผงสีขาว
41-50	60.6	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	11.6	ผงสีขาว
51	16.3	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	4.8	ผงสีขาว
52	14.9	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	8.9	ผงสีขาว
53	16.0	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	-	-
54	4.0	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	-	-
55	15.3	ตะกอนสีเหลืองดำ	-	-
56	3.3	ตะกอนสีเหลืองดำ	-	-
57	2.5	ตะกอนสีเหลืองดำ	-	-
58	3.9	ตะกอนสีเหลืองดำ	-	-
59	3.2	ตะกอนสีเหลืองดำ	-	-
60-95	20.9	ตะกอนสีเหลืองดำ	17.9	ผงสีขาว

3.10 การแยกบริสุทธิ์ลำดับส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.10.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 1 จากลำดับส่วนที่ 37-40

นำตะกอนสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 60.1 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 37-40 แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95 จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทานอล เอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำหนัก 50.4 มิลลิกรัมมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แยกได้ทั้งหมด 12 แถบ ดังนี้

แถบ (37-40)-1	ค่า $R_f = 0.02$	น้ำหนัก	2.0 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-2	ค่า $R_f = 0.04$	น้ำหนัก	0.7 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-3	ค่า $R_f = 0.07$	น้ำหนัก	0.7 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-4	ค่า $R_f = 0.10$	น้ำหนัก	2.0 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-5	ค่า $R_f = 0.18$	น้ำหนัก	3.0 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-6	ค่า $R_f = 0.25$	น้ำหนัก	5.0 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-7	ค่า $R_f = 0.32$	น้ำหนัก	1.1 มิลลิกรัม

แถบ (37-40)-8	ค่า $R_f = 0.43$	น้ำหนัก	6.2 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-9	ค่า $R_f = 0.53$	น้ำหนัก	20.0 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-10	ค่า $R_f = 0.56$	น้ำหนัก	5.1 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-11	ค่า $R_f = 0.60$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-12	ค่า $R_f = 0.72$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม

นำแถบที่ (37-40)-9 น้ำหนัก 20.0 มิลลิกรัม นำแยกอีกครั้งด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้ระบบเดิมในการแยก แยกได้ 5 แถบ ดังนี้

แถบ (37-40)-9-1	ค่า $R_f = 0.03$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-9-2	ค่า $R_f = 0.06$		
แถบ (37-40)-9-3	ค่า $R_f = 0.32$		
แถบ (37-40)-9-4	ค่า $R_f = 0.56$	น้ำหนัก	16.3 มิลลิกรัม
แถบ (37-40)-9-5	ค่า $R_f = 0.69$	น้ำหนัก	2.6 มิลลิกรัม

แถบที่ (37-40)-9-4 ได้เป็นสาร 1 เป็นสารสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 16.3 มิลลิกรัม ซึ่งมีสมบัติทางเคมีดังนี้

$$[\alpha]_D^{20}: + 35 \text{ (MeOH, } c0.1)$$

$$\lambda_{\max} \text{ (EtOH): } 216 \text{ nm } (\epsilon = 18119), 287 \text{ nm } (\epsilon = 9528), 323 \text{ nm } (\epsilon = 12496)$$

(รูปที่ 1 ค ภาคผนวก ค)

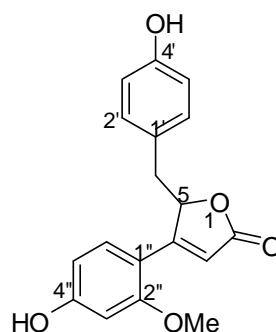
ν_{\max} (neat): 3274 broad (O-H stretching), 3013 (C-H stretching aromatic ring), 2917 และ 2843 (C-H stretching ring), 1713 (C=O stretching), 1600 และ 1508 (C=C-C aromatic ring stretching), 1461 (C-H bending), 1200 (C-O stretching) cm^{-1} (รูปที่ 2 ค ภาคผนวก ค)

δ_H (CD_3OD , 400 MHz.): 7.31 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6''), 6.78 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' และ H-6'), 6.59 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' และ H-5'), 6.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''), 6.50 (1H, dd, $J = 2$ และ 8.4 Hz, H-5''), 6.08 (1H, s, H-3), 5.83 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 4 Hz, H-5), 3.86 (3H, s, OMe), 3.18 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 14.4 Hz, H-5), 2.77 (1H, dd, $J = 5.2$ และ 14.4 Hz, CH_2) ppm (รูปที่ 3 ค ภาคผนวก ค)

δ_C (CD_3OD , 100 MHz.): 175.65 (C-2), 166.04 (C-4), 163.24 (C-4''), 160.01 (C-2''), 155.82 (C-4'), 130.97 (C-6''), 130.40 (C-2' และ C-6'), 125.86 (C-1'), 114.35 (C-3')

MS สเปกตรัม m/z : 313.1071 $[M+H]^+$ (รูปที่ 5ค ภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HSQC, HMBC และ COSY แสดงไว้ในรูปที่ 6ค, 7ค และ 8ค ภาคผนวก ค



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 1

3.10.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 2 จากลำดับส่วนที่ 41-50

นำตะกอนสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 72.9 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 41-50 แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95 จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทานอล เอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำหนัก 60.6 มิลลิกรัมมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แยกได้ทั้งหมด 12 แถบดังนี้

แถบ (41-50)-1	ค่า $R_f = 0.03$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ 941-50)-2	ค่า $R_f = 0.05$	น้ำหนัก	4.2 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-3	ค่า $R_f = 0.08$	น้ำหนัก	7.1 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-4	ค่า $R_f = 0.14$	น้ำหนัก	14.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-5	ค่า $R_f = 0.18$	น้ำหนัก	2.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-6	ค่า $R_f = 0.27$	น้ำหนัก	10.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-7	ค่า $R_f = 0.34$	น้ำหนัก	3.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-8	ค่า $R_f = 0.38$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-9	ค่า $R_f = 0.44$	น้ำหนัก	11.0 มิลลิกรัม
แถบ (41-50)-10	ค่า $R_f = 0.49$	น้ำหนัก	3.0 มิลลิกรัม

แถบ (41-50)-11 ค่า $R_f = 0.55$ น้ำหนัก 0.8 มิลลิกรัม

แถบที่ (41-50)-4 ได้เป็นสาร 2 เป็นสารสีเหลืองน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 14.0 มิลลิกรัม ซึ่งมีสมบัติทางเคมีดังนี้

$[\alpha]_D^{20}$: +10 (MeOH, c0.1)

λ_{max} (EtOH): 224 nm ($\epsilon = 4677$), 286 nm ($\epsilon = 3609$), 327 nm ($\epsilon = 4009$)
(รูปที่ 9ค ภาคผนวก ค)

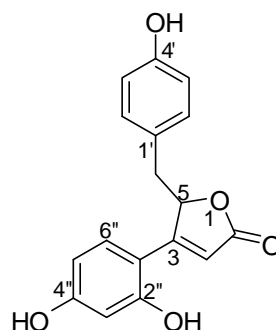
ν_{max} (neat): 3356, 3291 และ 3196 (O-H stretching), 3017 และ 2996 (C-H stretching aromatic ring), 2917 และ 2848 (C-H stretching), 1713 (C=O stretching), 1600 และ 1509 (C=C-C aromatic stretching), 1452 (C-H bending), 1230 (C-O stretching) cm^{-1}
(รูปที่ 10ค ภาคผนวก ค)

δ_H (CD_3OD , 400 MHz.): 7.28 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6''), 6.85 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' และ H-6'), 6.61 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' และ H-5'), 6.41 (1H, dd, $J = 7.6$ และ 2.4 Hz, H-5''), 6.39 (1H, s, H-3''), 6.10 (1H, s, H-3), 5.92 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 4 Hz, H-4), 3.25 (1H, dd, $J = 4$ และ 14.8 Hz, H-6) และ 2.81 (1H, dd, $J = 5.6$ และ 14 Hz, H-5) ppm (รูปที่ 11ค ภาคผนวก ค)

δ_C (CD_3OD , 100 MHz.): 175.60 (C-2), 167.20 (C-4), 158.50 (C-2''), 155.40 (C-4'), 130.74 (C-6''), 130.10 (C-2' และ C-6'), 126.10 (C-1'), 114.33 (C-3' และ C-5'), 109.01 (C-5''), 126.10 (C-1''), 102.71 (C-3''), 101.70 (C-3), 84.10 (C-5) และ 38.30 (C- CH_2) ppm (รูปที่ 12ค ภาคผนวก ค)

MS สเปกตรัม m/z : 299.0926 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (รูปที่ 13ค ภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ HSQC, HMBC, COSY และ TOCSY แสดงไว้ในรูป 14ค, 15ค, 16ค และ 17ค ภาคผนวก ค



รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2

3.10.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสาร 3 จากลำดับส่วนที่ 32-34 และ 36

นำตะกอนสีเหลืองน้ำหนัก 42.9 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 32-34 แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95 จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทานอล เอาเฉพาะส่วนที่ละลาย น้ำหนัก 41.7 มิลลิกรัมมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แยกได้ทั้งหมด 12 แถบดังนี้

แถบ (32-34)-1	ค่า $R_f = 0.02$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-2	ค่า $R_f = 0.08$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-3	ค่า $R_f = 0.09$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-4	ค่า $R_f = 0.13$	น้ำหนัก	7.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-5	ค่า $R_f = 0.16$	น้ำหนัก	8.1 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-6	ค่า $R_f = 0.28$	น้ำหนัก	1.2 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-7	ค่า $R_f = 0.39$	น้ำหนัก	3.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-8	ค่า $R_f = 0.42$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-9	ค่า $R_f = 0.46$	น้ำหนัก	3.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-10	ค่า $R_f = 0.53$	น้ำหนัก	12.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-11	ค่า $R_f = 0.56$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-12	ค่า $R_f = 0.68$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม

นำแถบที่ (32-34)-10 น้ำหนัก 12.0 มิลลิกรัม มาแยกด้วย preparative TLC อีกครั้งโดยใช้ระบบการแยกเดิม แยกได้ 2 แถบ ดังนี้

แถบ (32-34)-10-1	ค่า $R_f = 0.25$	น้ำหนัก	0.7 มิลลิกรัม
แถบ (32-34)-10-2	ค่า $R_f = 0.37$	น้ำหนัก	9.0 มิลลิกรัม เป็นสารไม่มีสี

และนำตะกอนสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 31.1 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 36 มาแยกด้วยวิธีเดียวกัน แยกได้ 12 แถบดังนี้

แถบ (36)-1	ค่า $R_f = 0.02$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-2	ค่า $R_f = 0.06$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (36)-3	ค่า $R_f = 0.12$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม
แถบ (36)-4	ค่า $R_f = 0.14$	น้ำหนัก	2.0 มิลลิกรัม

แถบ (36)-5	ค่า $R_f = 0.19$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-6	ค่า $R_f = 0.23$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-7	ค่า $R_f = 0.34$	น้ำหนัก	2.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-8	ค่า $R_f = 0.42$	น้ำหนัก	5.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-9	ค่า $R_f = 0.46$	น้ำหนัก	6.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-10	ค่า $R_f = 0.51$	น้ำหนัก	7.0 มิลลิกรัม เป็นสารไม่มีสี
แถบ (36)-11	ค่า $R_f = 0.55$	น้ำหนัก	1.0 มิลลิกรัม
แถบ (36)-12	ค่า $R_f = 0.64$	น้ำหนัก	0.5 มิลลิกรัม

นำแถบที่ แถบ (32-34)-10-2 สารไม่มีสี น้ำหนัก 9.0 มิลลิกรัม และแถบที่ (36)-10 สารไม่มีสี น้ำหนัก 7.0 มิลลิกรัม มารวมกันเนื่องจากสารทั้งสองมีสเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$ เหมือนกัน ได้เป็นสาร 3 เป็นสารไม่มีสี น้ำหนัก 16.0 มิลลิกรัม ซึ่งมีสมบัติทางเคมีดังนี้

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20}: + 22 \text{ (MeOH, } c0.1)$$

λ_{max} (EtOH): 220 nm ($\epsilon = 6744$), 287 nm ($\epsilon = 5251$), 323 nm ($\epsilon = 6189$)
(รูปที่ 18ค ภาคผนวก ค)

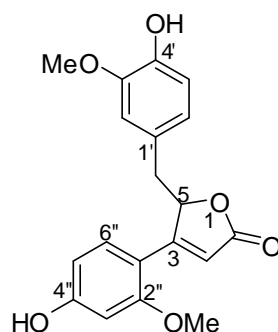
ν_{max} (neat): 3313 broad (O-H stretching), 3009 (C-H stretching aromatic ring) 2956, 2913 และ 2843 (C-H stretching), 1717 (C=O stretching), 1596 และ 1513 (C=C-C stretching), 1200 (C-O stretching) cm^{-1} (รูปที่19ค ภาคผนวก ค)

δ_{H} (CD_3OD , 400 MHz.): 7.24 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6''), 6.49 (1H, dd, $J = 2$ และ 8.4 Hz, H-5'), 6.45 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''), 6.42 (1H, dd, $J = 2$ และ 8.4 Hz, H-5''), 6.34 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 6.00 (1H, s, H-3), 5.84 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 4 Hz, H-5), 3.77 (3H, s, OMe''), 3.56 (3H, s, OMe'), 3.12 (2H, dd, $J = 5.6$ และ 14.4 Hz, H-5), 2.77 (1H, dd, $J = 4$ และ 14.8 Hz, H-6) ppm (รูปที่ 20ค ภาคผนวก ค)

δ_{C} (CD_3OD , 100 MHz.): 175.0 (C-2), 166.0 (C-4), 163.0 (C-4''), 160 (C-2''), 147.0 (C-3'), 145.0 (C-4'), 129.0 (C-6''), 126.15 (C-1'), 114.30 (C-5'), 112.90 (C-2'), 112.0 (C-3), 110.0 (C-6'), 108.0 (C-5''), 99.14 (C-3''), 83.87 (C-5), 54.69 (OMe-3'), 54.50 (OMe-2''), 38.15 (C-CH₂) ppm (รูปที่ 21ค ภาคผนวก ค)

MS สเปกตรัม m/z : 434.1176 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (รูปที่ 22ค ภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HSQC, HMBC, COSY และ TOCSY แสดงไว้ในรูป 23ค, 24ค, 25ค และ 26ค ภาคผนวก ค



รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3

3.11 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ใช้วิธีเจือจางสารสกัดหยาบในอาหารเหลว (Microtiter Plate Broth Dilution) โดยใช้น้ำหนักของสารที่แยกได้ นำไปผสมกับตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ร้อยละ 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับเชื้อทดสอบแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นแรกเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้ได้ระดับความเข้มข้นเป็น 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002 และ 0.000002 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารแต่ละความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีจุลชีพแขวนลอยทดสอบ 50 ไมโครลิตร จะได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารในถาด 96 หลุม เป็น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 และ 0.000001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายชุดควบคุมบวก โดยใช้ Chlorhexidine, Penicillin G, Ampicillin, Streptomycin และ Ketoconazole ให้มีความเข้มข้นเหมือนกับสารละลายแต่ละลำดับส่วน

เตรียมจุลชีพทดสอบ เตรียมตามข้อ 3.7.2

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง โดยทำการทดสอบในถาด 96 หลุม (96 well plate) วิธีการทดสอบเหมือนข้อ 3.8.2

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

4.1 การคัดกรองหาสารสกัดยับยั้งจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion test

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย 63 ชนิด ที่มีสรรพคุณแก้ปวดฟัน แก้เหงือกบวม เหงือกอักเสบ แก้วร่ามะนาด ใช้ภายในช่องปาก รวมทั้งฆ่าเชื้อโรค และรักษาบาดแผลนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล นำสารสกัดหยาบปริมาณ 500 ไมโครกรัมต่อดิส มาทดสอบการต้านจุลชีพกับเชื้อทดสอบ 7 ชนิด วัดผลจากการดูวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ ดิส ถ้ามีวงใสเกิดขึ้นมากกว่า 6 มิลลิเมตร แสดงว่าสารสกัดยับยั้งจากพืชชนิดนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ถ้าหากวงใสมีขนาดกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร แสดงว่าสารสกัดยับยั้งจากพืชชนิดนั้นสามารถต้านเชื้อทดสอบได้ดี ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดยับยั้งจากพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ

พืช	ส่วนที่ใช้	วงใสที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)*						
		SM	AA	EC	SA	PA	BS	CA
Amplicilin (10 µg/ML)		29	14	14	25	17	21	-
Streptomycin (20 µg/ML)		15	-	-	24	-	13	-
Chloramphenicol (30 µg/ML)		-	29	21	-	19	-	-
Ketoconazole (30 µg/ML)		-	-	-	-	-	-	15
Chlorhexidine (0.2%)		20	17	11	12	11	12	11
กะทกรก	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
กะพังโหม	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
กะเพรา	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
กะเม็ง	ราก	0	0	0	(8.6, 0)	0	0	0
	ดอก	0	0	0	0	0	0	0
กระวาน	ผล	0	0	0	0	0	0	0
กานพลู	ดอก	0	(6.6, 0)	(9.6, 0)	(0, 9.3)	(0, 10.3)	(11, 0)	0
แก้ว	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
ขมิ้นชัน	เหง้า	0	0	0	0	0	0	0
ขมิ้นอ้อย	เหง้า	0	0	0	0	0	0	0
ข่อย	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

พืช	ส่วนที่ใช้	วงใส่ที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)*						
		SM	AA	EC	SA	PA	BS	CA
ข่า	เหง้า	0	0	0	0	0	0	0
ขิง	เหง้า	0	0	0	0	0	0	0
จันทร์เทศ	ดอก	0	0	0	0	0	0	0
ขี้เหล็ก	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
ดาวเรือง	ช่อดอก	0	0	0	0	0	0	0
ดีปลี	เถา	0	0	0	0	0	0	0
โศภน	ราก	0	0	0	0	0	0	0
ต้อยติ่ง	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
	เมล็ด	0	0	0	0	0	0	0
ตะขาคอก	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ตะเคียนทอง	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0
ตะเคียนหิน	เปลือกต้น	0	0	0	(7.3, 0)	0	0	0
ตะไคร้	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ตะลิงปลิง	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
บอระเพ็ด	ใบ	0	(7, 7.3)	0	0	0	0	0
บัวบก	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ประดู่	เปลือก	0	0	0	(11, 0)	0	0	0
ผักกะสัง	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ผักขมหนาม	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ผักคราด	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ผักชี	เมล็ด	0	0	0	0	0	0	0
ผักเบี้ยใหญ่	ทั้งต้น	0	0	0	(9, 0)	0	(10, 0)	0
ผักเป็ดไทย	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ผักเสี้ยนผี	ทั้งต้น	0	0	0	(0, 9.6)	0	0	0
ผกากรอง	ราก	0	(7, 0)	0	0	0	0	0
ฝรั่ง	ใบ	0	(7, 0)	0	0	0	0	0
พิกุล	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0
พลู	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
พลูคาว	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
โพ	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0
ฟ้าทะลายโจร	ใบ	0	0	0	(9.6, 8.3)	0	(8, 0)	(0, 9.3)
มังคุด	เปลือกผล	0	0	0	0	0	0	0
มะขามเทศ	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0
มะเดื่อปล้อง	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

พืช	ส่วนที่ใช้	วงใสที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)*						
		SM	AA	EC	SA	PA	BS	CA
มะม่วงหิมพานต์	เปลือกต้น	(0, 7)	0	0	0	0	0	0
มะระขี้นก	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	(0, 9)	0
ไผ่รวบ	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
ยางนา	น้ำมัน	0	0	0	0	0	0	0
ยี่ห่วย	เมล็ด	0	0	0	0	0	(0, 8.6)	(0, 10.3)
รักเร่	ทั้งต้น	0	(0, 8.3)	0	0	0	0	0
ละมุด	ผลอ่อน	0	0	0	0	0	0	0
ลูกใต้ใบ	ทั้งต้น	0	(7, 8)	0	(11, 0)	0	0	0
ว่านชักมดลูก	เหง้า	0	0	0	8 [†]	0	(7.6, 0)	0
สะแกนา	เปลือกต้น	0	0	0	0	0	0	0
สะบ้า	เมล็ด	0	0	0	0	0	0	0
สาบเสือ	ใบ	0	0	0	(8, 0)	0	(10.6, 0)	0
เสม็ดขาว	ใบ	(6.5, 0)	(7.5, 0)	0	(7, 0)	0	(11, 0)	0
หญ้าเกิ้ล็ดหอยเงิน	ทั้งต้น	0	0	0	0	0	0	0
หนอนตายหยาก	ราก	0	0	0	0	0	0	0
หมาก	ผล	0	0	0	0	0	0	0
หัสคุณ	ใบ	0	0	0	0	0	0	0
อบเชย	เปลือกต้น	0	(8.6, 0)	(10, 0)	(10, 0)	(12, 0)	(9, 0)	0
อัญชัน	ราก	0	(0, 12)	0	(15.6, 15)	0	(0, 13)	0
	ดอก	0	0	0	0	0	0	0
อินทนิลน้ำ	ราก	0	0	0	(0, 8.6)	0	0	0

* จุลชีพทดสอบ 7 ชนิด *S. mutans* (SM), *A. actinomycetemcomitans* (AA), *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA), *P. aeruginosa* (PA), *B. subtilis* (BS) และ *C. albicans* (CA); ค่าวงใสที่แสดงไว้ 0 หมายถึงสารสกัดหยาบจากทั้งส่วนเมทานอลและไดคลอโรมีเทน ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทดสอบ, (ก, ข) หมายถึงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (ก) และของเมทานอล (ข) ที่สามารถยับยั้งจุลชีพทดสอบ มีตัวเลขใดตัวหนึ่งเป็น 0 แสดงว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยทำตัวทำละลายนั้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทดสอบ; - หมายถึง ไม่ได้ใช้ชนิดนี้ทดสอบกับเชื้อ

วงใสที่วัดเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรวม paper disc

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* พบว่ามีสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อข้างต้นอย่างน้อย 1 ชนิด โดยสารสกัดหยาบจากเปลือกมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเมทานอล และใบเสม็ดขาวที่สกัดด้วยไดคลอโร

นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพกับเชื้ออีก 5 ชนิด คือ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *C. albicans* ซึ่งเป็นจุลชีพทดสอบทั่วไปที่ใช้ในการประเมิน หรือคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากพืช โดยสารสกัดหยาบจากดอกกานพลูและเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้ง *E. coli* สารสกัดหยาบจากรากกะเม็ง เปลือกต้นตะเคียนหิน ต้นผักเบี้ยใหญ่ ใบฟ้าทะลายโจร ต้นลูกใต้ใบ เหง้าของว่านชักมดลูก ใบสาบเสือ ใบเสม็ดขาว เปลือกอบเชย รากอัญชันที่สกัดไดคลอโรมีเทน สามารถยับยั้ง *S. aureus* มีวงใสเป็น 8.6, 7.3, 9, 9.6, 11, 8, 8, 7, 10 และ 15.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ รวมทั้งสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลจากดอกกานพลู ต้นผักเสี้ยนผี ใบฟ้าทะลายโจร รากอัญชัน และรากอินทนิลน้ำที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นกัน โดยมีวงใสเป็น 9.3, 9.6, 8.3, 15 และ 8.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ *P. aeruginosa* พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยสามารถต้านฤทธิ์ได้ มีวงใสเป็น 12 มิลลิเมตร ในขณะที่ *B. subtilis* มีสารสกัดหยาบจากพืช 10 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อชนิดนี้ คือ สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากดอกกานพลู ผักเบี้ยใหญ่ ใบฟ้าทะลายโจร ว่านชักมดลูก ใบสาบเสือ ใบเสม็ดขาว เปลือกอบเชย มีวงใสเป็น 11, 10, 8, 7.6, 10.6, 11 และ 9 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีมะระขี้นก เมล็ดยี่ห่วยและรากอัญชันที่สกัดด้วยเมทานอลที่สามารถยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* มีวงใสเป็น 9, 8.6 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *C. albicans* พบว่ามีเพียงใบฟ้าทะลายโจรและเมล็ดยี่ห่วยที่สกัดด้วยเมทานอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อชนิดนี้ได้ มีวงใสเป็น 9.3 และ 10.3 มิลลิเมตร

จากการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Akinpelu ในปี 2001 พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 60 สามารถยับยั้งจุลชีพทดสอบได้ ด้วยวิธีการแพร่ผ่านในอาหารวุ้น พบว่ามีวงใสต่อ *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Shigella dysenteria*, *Streptococcus faecalis* และ *P. aeruginosa* เป็น 18, 16, 18, 18, 31, 20 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับและมีค่า MIC ต่อเชื้อข้างต้นเป็น 0.313, 0.313, 0.625, 0.313, 0.313, 0.625 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดของลำต้นลูกใต้ใบจากเอทานอลร้อยละ 80 นำมาศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบด้วยวิธี broth microdilution พบว่ามีค่า MIC ต่อ *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*,

จากผลการวิจัยทำให้สามารถคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยเพื่อนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยพิจารณาจากสารสกัดหยาบของพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพทดสอบ 2 ที่สนใจ คือ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ซึ่งในตอนแรกที่ทำการศึกษาคัดเลือกใช้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากใบของเสม็ดขาว นำไปผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วเอาแต่ละลำดับส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งผลของการทดสอบที่ได้พบว่าแต่ละลำดับส่วนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพทดสอบได้ อาจจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ในใบเสม็ดขาวเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สามารถระเหยออกไปทำให้เมื่อแยกในขั้นตอนต่อไป ปริมาณลดลง ทพให้ความสามารถในการฆ่าเชื้อลดลง รวมทั้งการที่มีสารหลายๆ ชนิดอยู่รวมกัน อาจจะทำให้ฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของสารสูงๆ จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพทดสอบได้ รวมทั้งวงใสที่เกิดจากสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบเสม็ดต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* มีขนาดเพียง 6.5 และ 7.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Kim และคณะ, 2005)

พืชที่นำมาศึกษาต่อไปคือสารสกัดเมทานอลจากรากอัญชัน ซึ่งมีวงใสต่อ *A. actinomycetemcomitans* สูงถึง 12 มิลลิเมตร รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *B. subtilis* มีวงใสขนาด 15.6 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งจุลชีพทดสอบทั้งหมดสารสกัดเมทานอลจากรากอัญชันยับยั้งได้ดีที่สุด และวงใสที่เกิดขึ้นมีขนาดใกล้เคียงวงใสที่เกิดจาก Ampicillin จึงเลือกพืชชนิดนี้มาทำการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

4.2 การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบและนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

จากการแยกสารสกัดหยาบจากรากอัญชันปริมาณ 3.268 กรัม ด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมธานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 5:95, 4:96 และ 3:97 สามารถแยกสารได้ 95 ลำดับส่วน สุ่มลำดับส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี และฤทธิ์ทางชีวภาพของแต่ละลำดับส่วน

ลำดับส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะปรากฏ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	1	ตะกอนสีขาว	AA (100), SA (100), BS (100)
2	1	ตะกอนสีขาว	
3	1	ตะกอนสีขาว	
4	1.8	ตะกอนสีเหลืองอ่อน	AA (100)
5	5.5	ตะกอนสีเหลืองอ่อน	
6	1.4	ตะกอนสีเหลืองอ่อน	
7	22.3	ตะกอนสีเหลือง	AA (100), SA (100)
8	8.6	ตะกอนสีเหลือง	
9	31.3	ตะกอนสีเหลือง	
10	16.7	ของหนืดสีเหลือง	AA (100), SM (100), SA (100), BS (100)
11	19.7	ของหนืดสีเหลือง	
12	11.6	ของหนืดสีเหลือง	
13	22.6	ของหนืดสีเหลือง	AA (100), SM (100), SA (50)
14	18.8	ของหนืดสีเหลือง	
15	17.2	ของหนืดสีเหลือง	
16	15.9	ของหนืดสีเหลือง	AA (100), SM (50), SA (50)
17	14.2	ของหนืดสีเหลือง	
18	20.0	ของหนืดสีเหลือง	
19	12.4	ของหนืดสีเหลือง	AA (100), SM (100), SA (50)
20	21.1	ของหนืดสีเหลือง	
21-24	182.0	ของหนืดสีเหลือง	22 AA (100), SA (50)
25	80.0	ของหนืดสีเหลือง	AA (100), SA (50), EC (100), CA (100)
26-29	253.8	ของหนืดสีเหลือง	28 AA (100), SM (100), SA (50), PA (100), EC (100)
30	18.7	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
31	17.1	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	AA (100), SA (50), PA (100)
32-34	42.9	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	34 AA(100), SA(50), PA(100)
35	23.3	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
36	31.1	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
37-40	60.1	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	37 AA (100), SM (10), SA (50) 40 AA (100), SA (50), PA (100), EC (50)
41-50	72.9	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	43 AA (100), SM (100), SA (50), EC (50) 46 SA (50), 49 AA (10), SM (50), SA (100)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะปรากฏ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
51	21.9	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
52	24.7	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	AA (10), SM (100), PA (100), EC (100)
53	16.6	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
54	4	ตะกอนสีเหลืองน้ำตาล	
55	16.4	ตะกอนสีเหลืองดำ	AA (10), SM (100)
56	4	ตะกอนสีเหลืองดำ	
57	3.3	ตะกอนสีเหลืองดำ	
58	4.4	ตะกอนสีเหลืองดำ	AA (10), SA (100)
59	3.2	ตะกอนสีเหลืองดำ	
60-95	38.8	ตะกอนสีเหลืองดำ	61, 64 AA (10), SM (100) 70 AA (10) 73, 76 AA (10), SA (100), PA (100) 79 AA (50), SM (100), SA (100), PA (100), BS (100) 82, 85 AA (10), SA (100), PA (100) 88, 91 AA (10), SA (100), EC (100), CA (100) 95 AA (10), SA (100)

*จุลชีพทดสอบ 7 ชนิด *S. mutans* (SM), *A. actinomycetemcomitans* (AA), *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA), *P. aeruginosa* (PA), *B. subtilis* (BS) และ *C. albicans* (CA); ค่าตัวเลขใน () ที่ตามหลังจุลชีพทดสอบเป็นความเข้มข้นของลำดับส่วนที่ใช้; ตัวเลขที่อยู่หน้าจุลชีพทดสอบเป็นลำดับส่วนที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนทำการรวมลำดับส่วน

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธีสอบวิเคราะห์ด้วยสาร INT และ MTT โดยวัดความมีชีวิตของจุลชีพทดสอบจากระดับของเอนไซม์ซักซิเนสดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) โดยแบคทีเรียจะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซน (formazan) โดยสีของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซนจะมีความเข้มมาก เมื่อจำนวนจุลชีพมีปริมาณมาก ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นด้วย จึงสามารถนำไปใช้วัดความสามารถของสารในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ การแปลผลทำได้ง่ายกว่าการอ่านค่าการดูดกลืนแสงเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจจะมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นจากการตกตะกอนของเซลล์แบคทีเรีย สีของสารสกัดที่มีผลทำให้ค่าที่อ่านได้น้อยหรือมากกว่าความเป็นจริง รวมทั้งวิธีการทำโดยใช้เกลือเตตระโซเลียมก็ง่าย ใช้เวลาไม่นาน และให้ผลค่อนข้างถูกต้อง (Eloff, 1998)

MTT ให้สีน้ำเงินวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ส่วน INT ให้สีม่วงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร จากผลการทดลองที่ได้ มีลำดับส่วนที่ 16, 37 และ 49 สามารถ

การเลือกลำดับส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ เลือกจากลำดับส่วนที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพทดสอบที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งลำดับส่วนที่เลือกคือ ลำดับส่วนที่ 37-40, 41-50 และลำดับส่วนที่ 32-34 และ 36

4.3 การแยกสารสกัดหยาบจากรากอัญชันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์

นำแต่ละลำดับส่วนที่ผ่าน Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมดทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แล้วรวบลำดับส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อโดยใช้การทำละลาย สามารถแยกได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 ละลายในเมทานอล และส่วนที่ 2 ละลายในน้ำ จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่ 1 จากลำดับส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาแยกต่อด้วย Preparative TLC

4.3.1 การแยกสารสกัดหยาบจากรากอัญชันให้บริสุทธิ์

สาร 1 เป็นตะกอนสีเหลืองน้ำตาล แยกได้ลำดับส่วนที่ 37-40 ที่แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95 จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทานอล เขาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำหนัก 50.4 มิลลิกรัมมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 แยกได้ทั้งหมด 12 แถบ น้ำหนัก 9 น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม นำแยกอีกครั้งโดยใช้ระบบเดิม ได้สารสีเหลืองน้ำตาล 16.3 มิลลิกรัม

สาร 2 นำตะกอนสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 72.9 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 41-50 แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 5:95 จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทานอล เขาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำหนัก 60.6 มิลลิกรัมมาแยกต่อด้วยเทคนิค preparative TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:9 ได้แถบที่ 4 น้ำหนัก 14 มิลลิกรัม เป็นสารสีเหลืองน้ำตาลเข้ม

สาร 3 นำตะกอนสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 42.4 มิลลิกรัม ที่ได้จากลำดับส่วนที่ 32-34 แยกด้วย Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลใน

4.3.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สาร 1 เป็นสารสีเหลืองสามารถละลายได้ในเมทานอล

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 2ค (ภาคผนวก ค) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3274 broad (O-H stretching), 3013 (C-H stretching aromatic ring), 2917 และ 2843 (C-H stretching ring), 1713 (C=O stretching), 1600 และ 1508 (C=C-C aromatic ring stretching), 1461 (C-H bending), 1200 (C-O stretching) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 1

เลขคลื่น (cm^{-1})	ลักษณะ
3274 broad	O-H stretching
3013	(C-H stretching aromatic ring)
2917 และ 2843	C-H stretching
1713	C=O stretching
1600 และ 1508	C=C-C stretching
1461	C-H bending
1200	C-O stretching

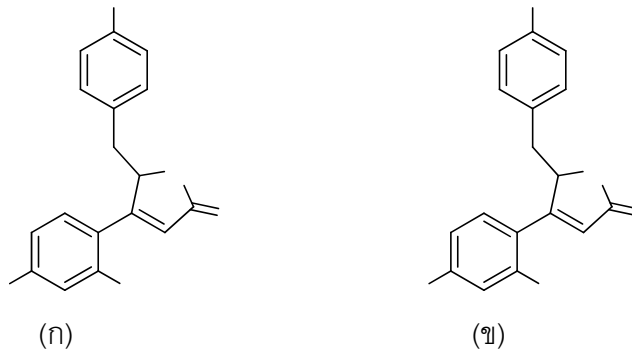
จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณของโปรตอนดังนี้ แอโรมาติกโปรตอนที่ δ_{H} 7.31, 6.78, 6.59, 6.53 และ 6.50 ppm โอลิฟินิกโปรตอนที่ δ_{H} 6.08 ppm สองโปรตอนที่ต่อกับคาร์บอน sp^3 ที่ δ_{H} 3.18 และ 2.77 ppm หนึ่งโปรตอนที่ต่อกับคาร์บอน sp^3 ที่ต่ออยู่กับออกซิเจนที่ δ_{H} 5.83 ppm และเมทอกซีโปรตอนที่ δ_{H} 3.86 ppm

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 1 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนดังนี้ คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_{C} 175.65 ppm คาร์บอน sp^2 ที่ δ_{C} 163.24,

ข้อมูลของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 4.4

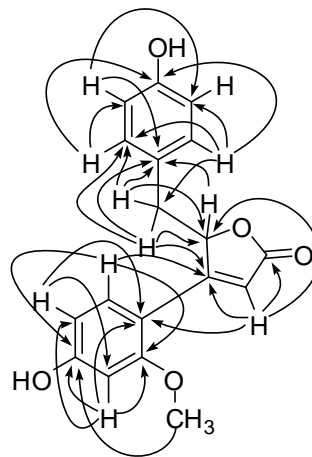
จากข้อมูล HSQC และ HMBC สามารถหาการเชื่อมต่อของอะตอมในโมเลกุลดัง
แสดงในรูป 4.1 และความสัมพันธ์ของ HMBC ดังแสดงไว้ในรูป 4.2

จากข้อมูลแมสเปกโตรรม (APCI/TOF MS spectrum) ของสาร 1 พบว่าสารนี้มีมวล
โมเลกุล m/z : 313.1071 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสาร 1 คือ $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$ และมีมวล
โมเลกุลจากการคำนวณ 313.1076

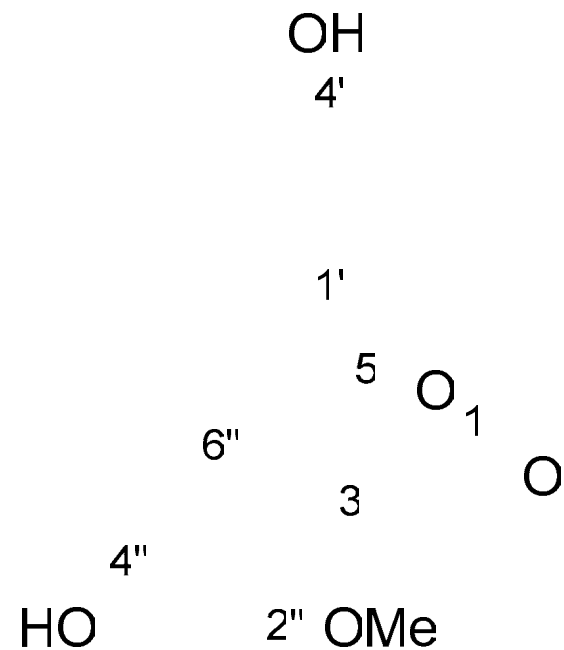


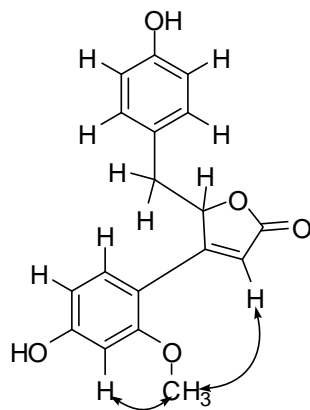
รูปที่ 4.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร

(ก) สาร 1 (ข) puerol B



รูปที่ 4.2 HMBC ของสาร 1





รูปที่ 4.3 NOE ของสาร 1

จากข้อมูล NOE ของสาร 1 พบว่า Nuclear overhauser effect (NOE) ของเมทอกซีโปรตอนกับโพลีฟีนิกโปรตอน (δ_H 6.08 ppm) และแอโรมาติกโปรตอน (δ_H 6.53 ppm) และแสดงสาร 1 มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.1 (ก)

จากโครงสร้างที่วิเคราะห์ได้ทำให้ทราบว่าสาร 1 มีโครงสร้างคล้ายกับ puerol B (รูปที่ 4.1ข) ซึ่งเคยมีรายงานการค้นพบในปี 1993 พบมี 2 ชนิด คือ (-)-puerol B $[\alpha]_D$: -76.2 (acetone, c0.5) และ (+)-puerol B $[\alpha]_D$: +68.2 (MeOH, c0.38) โดยทั้งสองชนิดพบในรากของถั่วคุดชู (*Pueraria lobata*) (Nohara และคณะ, 1993) หลังจากนั้นในปี 2006 Kim และคณะสามารถแยก (\pm)-puerol B ได้จากรากของถั่วคุดชูได้อีกเช่นกัน และได้นำไปใช้ต้าน Advance glycation end product (AGEs) พบว่าสามารถยับยั้งได้โดยมีค่า IC_{50} เป็น 28.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวัดค่า optical rotation ของสาร 1 มีค่า $[\alpha]_D^{20}$: + 35 (methanol, c0.1) ทำให้ทราบว่าตำแหน่งของไครัลเซนเตอร์อยู่ที่ตำแหน่ง C5 และทำให้ทราบว่าสารมีโครงสร้างคล้ายกับ (+)-puerol B

และจากข้อมูลของค่า optical rotation และ NOE สอดคล้องกันว่าสาร 1 ไม่ใช่ (+)-puerol B แต่สาร 1 คือ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one ซึ่งเป็นสารใหม่

ตารางที่ 4.4 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 1 (ใน CD₃OD)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_C)	¹ H-NMR(δ_H)	gHMBC (H to C)
2	175.65	-	-
3	111.73	6.08 (1H, s)	C-2, C-4, C-5 และ C-1''
4	166.04	-	-
5	84.14	5.83 (1H, dd, $J=4.4$ และ 4 Hz),	C-1'
CH ₂	38.09	3.18 (1H, dd, $J=3.6$ และ 14.4Hz) 2.77 (1H, dd, $J=5.2$ และ 14.4 Hz)	C-4 และ C-5 C-1' และ C-2'
1'	125.86	-	-
2'	130.40	6.78 (1H,d, $J = 8.8$ Hz)	C-3' และ C-4'
3'	114.35	6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	C-1' และ C-5'
4'	155.82	-	-
5'	114.35	6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	-
6'	130.40	6.78 (1H,d, $J = 8.8$ Hz)	C-4' และ C-5'
1''	110.18	-	-
2''	160.01	-	-
2''-OMe	54.54	3.86 (3H, s)	-
3''	99.19	6.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	C-2'' และ C-4''
4''	163.24	-	-
5''	108.37	6.50 (1H, dd, $J = 2$ และ $J = 8.4$),	C-1'', C-3'' และ C-4''
6''	130.97	7.31 (1H,d, $J = 8.8$ Hz)	C-4, C-2'' และ C-4''

และทำการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 1 และ puerol B ดังแสดงในตารางที่ 4.5 คาร์บอน sp² ตำแหน่ง 2'', 3'' มี δ_C ที่แตกต่างกันมาก รวมทั้งตำแหน่งคาร์บอนิลคาร์บอนที่ตำแหน่ง 2 ด้วย ส่วนที่เห็นได้ชัดคือ ที่ตำแหน่ง OMe ของสารทั้ง 2 ตัว ที่อยู่บนตำแหน่ง 2'' สำหรับสาร 1 และอยู่บนตำแหน่ง 4'' สำหรับ puerol B

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 และ puerol B ^(a, b)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})		$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	
	สาร 1	puerol B	สาร 1	puerol B
2	175.65	172.8	-	-
3	111.73	112.2	6.08 (1H, s)	6.21 (1H, s)
4	166.04	164.7	-	-
5	84.14	82.6	5.83 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 4 Hz)	5.90 (1H, ddd, $J = 1, 4$ และ 7 Hz)
CH ₂	38.09	38.2	3.18 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 14.4 Hz), 2.77 (1H, dd, $J = 5.2$ และ 14.4 Hz)	2.76 (1H, dd, $J = 7$ และ 14 Hz), 3.25 (1H, dd, $J = 4$ และ 14 Hz)
1'	125.86	125.9	-	-
2'	130.40	130.1	6.78 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	6.90 (1H, d, $J = 8$ Hz)
3'	114.35	114.6	6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.69 (1H, d, $J = 8$ Hz)
4'	155.82	155.8	-	-
5'	114.35	114.6	6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.69 (1H, d, $J = 8$ Hz)
6'	130.40	130.1	6.78 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	6.90 (1H, d, $J = 8$ Hz)
1''	110.18	110.6	-	-
2''	160.01	157.9	-	-
2''-OMe	54.54	-	3.86 (3H, s)	-
3''	99.19	101.4	6.53 (1H, d, $J = 2$ Hz)	6.66 (1H, d, $J = 2$ Hz)
4''	163.24	162.4	6.78 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	6.90 (1H, d, $J = 8$ Hz)
4''-OMe	-	55.2	-	3.84(3H, s)
5''	108.37	106.2	6.50 (1H, dd, $J = 2$ และ 8.4 Hz)	6.59 (1H, dd, $J = 2$ และ 8 Hz)
6''	130.97	130.8	7.31 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	7.46 (1H, d, $J = 2$ Hz)

^a ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับสาร 1 คือ ละลายใน methanol-d₄ สำหรับ puerol B ละลายใน DMSO-d₆

^b ค่าเคมีคอลลีพท์ของ puerol B อ้างอิงจาก (Nohara และคณะ, 1993)

สาร 2 เป็นสารสีเหลืองน้ำตาล สามารถละลายได้ในเมทานอล $[\alpha]_D^{20} = +10$ (MeOH, c0.1)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 10ค (ภาคผนวก ค) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3356, 3291 และ 3196 (O-H stretching), 3017 และ 2996 (C-H stretching aromatic ring), 2917 และ 2848 (C-H stretching), 1713 (C=O stretching), 1600 และ 1509 (C=C-C aromatic stretching), 1452 (C-H bending), 1230 (C-O stretching) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 2

เลขคลื่น (cm^{-1})	ลักษณะ
3356, 3219 และ 3196	O-H stretching
3017 และ 2996	(C-H stretching aromatic ring)
2917 และ 2848	C-H stretching
1713	C=O stretching
1600 และ 1509	C=C-C aromatic stretching
1452	C-H bending
1230	C-O stretching

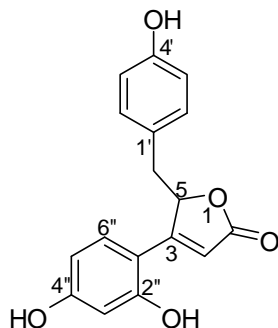
จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณโปรตอน ดังนี้ แอโรมาติกโปรตอนที่ δ_{H} 7.27, 6.85, 6.61, 6.40 และ 6.39 ppm โอลีนิกโปรตอนที่ δ_{H} 6.10 ppm สองโปรตอนที่ติดกับคาร์บอน sp^3 ที่ δ_{H} 2.80, 2.75 ppm และหนึ่งโปรตอนที่ติดกับคาร์บอน sp^3 ที่ต่ออยู่กับออกซิเจนที่ δ_{H} 5.92 ppm

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนดังนี้ คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_{C} 176.00 ppm คาร์บอน sp^2 ที่ δ_{C} 163.00, 158.60, 155.802, 130.74, 130.38, 126.28, 114.32, 109.01 และ 102.71 ppm คาร์บอน sp^3 ที่ δ_{C} 38.32 ppm และคาร์บอน sp^3 ที่ต่อกับที่ออกซิเจนที่ δ_{C} 84.42 ppm

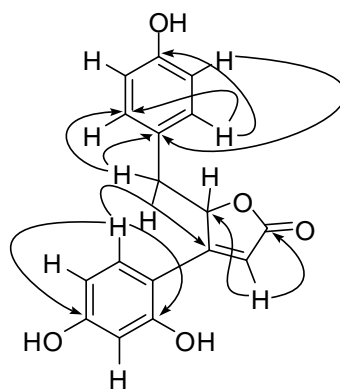
ข้อมูลของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 4.7

จากข้อมูล HSQC และ HMBC สามารถหาการเชื่อมต่อของอะตอมในโมเลกุลดังแสดงในรูป 4.4 และความสัมพันธ์ของ HMBC ดังแสดงไว้ในรูป 4.5 ทำให้ทราบว่าสาร 2 คือ (+)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one ซึ่งเป็นสารใหม่

จากข้อมูลแมสเปกตรัม (APCI/TOF ms spectrum) ของสาร 2 พบว่าสารนี้มีมวลโมเลกุล m/z : 299.0926 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสาร 2 คือ $C_{17}H_{14}O_5$ มวลโมเลกุลจากการคำนวณ 299.0920



รูปที่ 4.4 โครงสร้างทางเคมีของสาร 2



รูปที่ 4.5 HMBC ของสาร 2

ตารางที่ 4.7 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 2 (ใน CD₃OD)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ _C)	¹ H-NMR(δ _H)	HMBC (H to C)
2	175.60	-	C-2 และ C-5
3	101.70	6.10 (1H, s)	-
4	167.20	-	-
5	84.10	5.92 (1H, dd, <i>J</i> = 4.4 และ 4 Hz)	-
CH ₂	38.30	2.81 (1H, dd, <i>J</i> = 5.6 และ 14 Hz), 3.25 (1H, dd, <i>J</i> = 4 และ 14.8 Hz)	C-1' และ C-2' C-5
1'	126.10	-	-
2'	130.10	6.85 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	-
3'	114.33	6.61 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	-
4'	155.40	-	-
5'	114.33	6.61 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	C-1'
6'	130.10	6.85 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	C-2'
1''	126.10	-	-
2''	158.50	-	-
3''	102.71	6.40 (1H, s)	-
4''	162.50	-	-
5''	109.01	6.41 (1H, dd, <i>J</i> = 7.6 และ 2.4 Hz)	-
6''	130.74	7.28 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	C-4, C-1'' และ C-4''

สาร 3 เป็นสารไม่มีสี สามารถละลายได้ในเมทานอล [α]_D²⁰ = + 22 (MeOH, c0.1)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังรูปที่ 19c (ภาคผนวก ค) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3313 broad (O-H stretching), 3009 (C-H stretching aromatic ring) 2956, 2913 และ 2843 (C-H stretching), 1717 (C=O stretching), 1596 และ 1513 (C=C-C stretching), 1200 (C-O stretching) cm⁻¹ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร 3

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	ลักษณะ
3313 broad	O-H stretching
3009	(C-H stretching aromatic ring)
2956, 2913 และ 2843	C-H stretching
1717	C=O stretching
1596 และ 1513	C=C-C stretching
1200	C-O stretching

จากข้อมูล ¹H-NMR ของสาร 3 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 20 ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณของโปรตอนดังนี้ แอโรมาติกโปรตอนที่มี δ_H 7.24, 6.49, 6.45, 6.42 และ 6.34 ppm โอลีนิกโปรตอนที่มี δ_H 6.00 ppm สองโปรตอนที่อยู่กับคาร์บอน sp³ ที่มี δ_H 3.12, 2.77 ppm หนึ่งโปรตอนที่อยู่กับคาร์บอน sp³ ที่อยู่ติดกับออกซิเจนที่มี δ_H 5.84 ppm และสองเมทอกซีโปรตอนที่มี δ_H 3.77, 3.56 ppm

จากข้อมูล ¹³C-NMR ของสาร 3 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 21 ค ภาคผนวก ค ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนดังนี้ คาร์บอนิลคาร์บอนที่มี δ_C 175.0 ppm คาร์บอน sp² ที่มี δ_C 166.0, 163.0, 174.0, 145.0, 129.0, 126.15, 114.30, 112.00, 108.00 และ 99.14 ppm คาร์บอน sp³ ที่มี δ_C 38.15 ppm คาร์บอน sp³ ที่อยู่ติดกับออกซิเจนที่มี δ_C 83.87 ppm และเมทอกซีคาร์บอนที่มี δ_C 160 และ 46.50 ppm

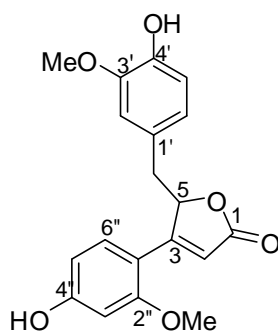
ข้อมูลของ ¹H-NMR และ ¹³C-NMR แสดงในตารางที่ 4.9

จากข้อมูล HSQC และ HMBC สามารถหาการเชื่อมต่อของอะตอมในโมเลกุลดังแสดงในรูป 4.6 และความสัมพันธ์ของ HMBC ดังแสดงไว้ในรูป 4.7

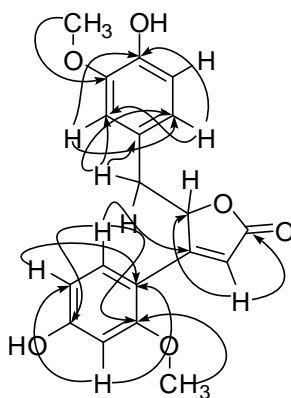
สเตอริโอเคมีของสาร 3 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ทำให้ทราบว่าไม่มีเมทอกซีคาร์บอนที่ตำแหน่ง C-2"

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (APCI/TOF ms spectrum) ของสาร 3 พบว่าสารนี้มีมวลโมเลกุล MS สเปกตรัม m/z: 434.1176 [M+H]⁺ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสาร 3 คือ C₁₉H₁₈O₆ มวลโมเลกุลจากการคำนวณ 343.1181

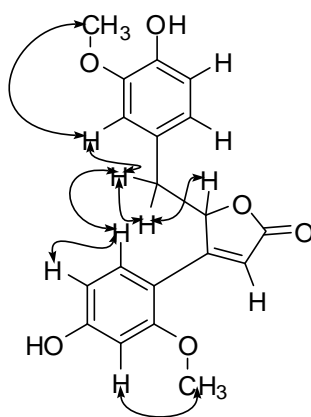
จากการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าสาร 3 คือ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)furan-2(5H)-one ซึ่งเป็นสารใหม่



รูปที่ 4.6 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3



รูปที่ 4.7 HMBC ของสาร 3



รูปที่ 4.8 NOE ของสาร 3

ตารางที่ 4.9 ข้อมูล 1D และ 2D ของสาร 3 (ใน CD₃OD)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ _c)	¹ H-NMR(δ _H)	HMBC (H to C)
2	175	-	-
3	112.00	6.00 (1H, s)	C-2, C-4 และ C-5
4	166.00	-	-
5	83.87	5.84 (1H, dd, J = 4.4 และ 4 Hz)	-
CH ₂	38.15	3.12 (2H, dd, J = 5.6 และ 14.4 Hz), 2.79 (1H, dd, J = 4 และ 14.8 Hz)	C-1', C-2' และ C-6'
1'	126.15	-	-
2'	112.90	6.34 (1H, d, J = 8.8 Hz)	C-4' และ C-6'
3'	147.00	-	-
3'-OMe	54.54	3.56 (3H, s, OMe')	C-3'
4'	145.00	-	-
5'	114.30	6.49 (1H, dd, J = 2 และ 8.4 Hz)	C-3'
6'	122.00	6.29 (1H, d, J = 8.4 Hz)	C-2' และ C-4'
1''	110.00	-	-
2''	160.00	-	-
2''-OMe	54.50	3.77 (3H, s)	C-2''
3''	99.14	6.45 (1H, d, J = 8.4 Hz)	C-1'' และ C-5''
4''	163.00	-	-
5''	108.00	6.42 (1H, dd, J = 2 และ 8.4 Hz)	C-1''
6''	129.00	7.24 (1H, d, J = 8.8 Hz)	C-1'' และ C-1''

4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง โดยทำการทดสอบในถาด 96 หลุม (96 well plate) วิธีการทดสอบเหมือนข้อ 3.8.2 โดยให้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารในถาด 96 หลุม เป็น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 และ 0.000001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ที่ยับยั้งจุลชีพทดสอบ

สาร	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)*						
	¹ SM	AA	EC	SA	PA	BS	CA
สาร 1	0.001 (0.003)	50 (160.092)	0.1 (0.320)	>50 >(160.092)	0.1 (0.320)	0.01 (0.032)	1 (0.321)
สาร 2	0.01 (0.033)	0.001 (0.003)	0.1 (0.335)	>50 (167.622)	1 (3.352)	0.01 (0.035)	1 (3.352)
สาร 3	>50 >(146.053)	0.001 (0.003)	>50 >(146.054)	0.01 (0.029)	10 (29.211)	0.001 (0.003)	>50 >(146.053)
คลอเฮกซิดีน	0.0001 (1.97×10 ⁴)	1 (1.978)	10 (19.784)	1 (1.978)	10 (19.784)	1 (1.978)	10 (19.784)
คีโทโคนาโซล	-	-	-	-	-	-	50 (94.091)
แอมพลีซิลิน	0.1 (0.286)	-	-	0.01 (0.029)	10 (28.653)	1 (2.865)	-
สเตรปโต- มัยซิน	50 (86.059)	0.01 (0.017)	0.01 (0.017)	1 (1.721)	-	50 (86.058)	-
เพนนิซิลิน	50 (128.707)	0.001 (0.003)	50 (128.707)	10 (25.741)	50 (128.707)	50 (128.706)	-
คลอแรมฟี- นिकอล	-	0.001 (0.003)	10 (30.960)	-	50 (154.799)	-	-

* จุลชีพทดสอบ 7 ชนิด *S. mutans* (SM), *A. actinomycetemcomitans* (AA), *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA), *P. aeruginosa* (PA), *B. subtilis* (BS) และ *C. albicans* (CA); ค่าใน () เป็นหน่วยของความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นไมโครโมลาร์ (μM); - ไม่ได้ใช้ยานี้กับเชื้อทดสอบ

การวัดค่า MIC ด้วยวิธีการวัดสีของผลึกฟออร์มาแซนที่แบคทีเรียเปลี่ยนมาจากเกลือเตตระโซเดียม เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว วัดผลได้ค่อนข้างง่าย และใช้เวลาไม่นาน แต่การใช้วิธีการนี้อาจจะมีข้อจำกัดของความแม่นยำหลายประการ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดผลึกฟออร์มาแซนของจุลชีพแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน การวัดผลในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสม และความเข้มข้นของสารที่ใช้ถ้ามีมากหรือน้อยเกินไปอาจจะทำให้ค่าที่วัดออกมา มีความผิดพลาดได้ อาจจะ (Grare, 2008)

จากตารางพบว่าสาร 1 สามารถยับยั้งการเจริญของต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* โดยมีค่า MIC เป็น 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) และ 50 (160.092 ไมโครโมลาร์)

สาร 2 มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* เป็น 0.01 (0.033 ไมโครโมลาร์) และ 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลก็เป็นทำนองเดียวกับสาร 1

สาร 3 มีค่า MIC ต่อ *A. actinomycetemcumitans* เป็น 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ได้ที่ความเข้มข้นของสารเป็น 50 (146.053 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเป็นไปตามทำนองเดียวกันกับลำดับส่วนที่แยกออกมาจาก Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของสารที่แยกมาได้จาก คลอเฮกซิดีนที่มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* เป็น 1.97×10^4 และ 1.978 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ กับ สาร 1 ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* เป็น 0.003 และ 160.092 ไมโครโมลาร์ สาร 2 ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* เป็น 0.033 และ 0.003 ไมโครโมลาร์ และสาร 3 ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcumitans* มากกว่า 146.053 และ 0.003 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสาร 2 และ สาร 3 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบได้มากกว่าคลอเฮกซิดีน ดังนั้นสาร 2 และ สาร 3 จึงเป็นสารที่มีศักยภาพในการนำมาป้องกันโรคปริทันต์อักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. actinomycetemcumitans*

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

พืชสมุนไพรไทย 63 ชนิดมาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งชนิด *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อักเสบด้วยวิธี agar diffusion พบว่ามีสารสกัดยับยั้งจากพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างน้อย 1 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากดอกทานตะวัน สารสกัดจากใบขมิ้นชัน สารสกัดจากรากผักกาดขาว สารสกัดจากใบฝรั่ง สารสกัดจากเปลือกต้นมะม่วงหิมพานต์ สารสกัดจากต้นรักแร้ สารสกัดจากลูกใต้ใบ สารสกัดจากใบเสมาข้าว สารสกัดจากเปลือกอบเชย และสารสกัดจากรากอัญชัน

สารสกัดจากรากอัญชันที่สกัดด้วยเมทานอล ถูกเลือกนำมาศึกษาต่อเนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 12 มิลลิเมตร เมื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ Sephadex™ LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ preparative TLC ได้สารใหม่ 3 ชนิด คือ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one, (+)-4-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(4-hydroxybenzyl)furan-2(5H)-one และ (+)-4-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)furan-2(5H)-one

นำสารทั้ง 3 ชนิดที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* ด้วยวิธี broth microdilution พบว่า 1 สามารถยับยั้งการเจริญต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยมีค่า MIC เป็น 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) และ 50 (160.092 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาร 2 มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans* เป็น 0.01 (0.033 ไมโครโมลาร์) และ 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสาร 3 มีค่า MIC ต่อ *A. actinomycetemcomitans* เป็น 0.001 (0.003 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นของสารเป็น 50 (146.053 ไมโครโมลาร์) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารที่แยกออกมากับคลอเฮกซิดีน พบว่า สาร 2 และ สาร 3 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบได้มากกว่าคลอเฮกซิดีน ดังนั้นสาร 2 และสาร 3 จึงเป็นสารที่มีศักยภาพในการนำมาป้องกันโรคปริทันต์อักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. actinomycetemcomitans*

งานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้น หากต้องการพัฒนาศักยภาพของสาร โดยนำสารที่แยกได้ไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในช่องปาก เช่น ผสมในยาสีฟัน หรือน้ำยาบ้วนปาก จะต้องทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารที่มีต่อเซลล์ภายในช่องปาก เช่น เซลล์เหงือก (Gingival fibroblast) เป็นต้น นอกจากนี้ยังจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถของสารในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นคราบจุลินทรีย์ รวมทั้งผลทางคลินิก

นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้และทราบว่ามีความยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ แต่ยังไม่มีการแยกองค์ประกอบออกมาศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ ถ้าหากมีการแยกสารจากพืชข้างต้น จะทำให้ได้สารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ก่องกานดา ชยามภฤต. 2540. สมุนไพรไทย ตอนที่ 6. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: ไดมอนด์พรีนติ้ง จำกัด
- คณะกรรมการทันตสุขภาพแห่งชาติ, กองทันตสาธารณสุข.2545. รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2544. กรุงเทพมหานคร: สามเจริญพาณิชย์.
- เต็ม สมิตินันท์.2540. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ชื่อพฤกษศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง. กรุงเทพมหานคร: หจก.พันธ์พิบบลิตซิ่ง บางเขน.
- นันทวัน และอรนุช บก.. 2539. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (1). พิมพ์ครั้งที่ 1 .กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.
- นันทวัน และอรนุช บก.. 2541. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2). พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.
- นันทวัน และอรนุช บก.. 2543. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (4). พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.
- นันทวัน และอรนุช บก.. 2543. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (5). พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.
- นิจศิริ เรืองรังษี. 2547. สมุนไพรไทย เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทฐานการพิมพ์ จำกัด.
- พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2529. ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์การพิมพ์พลชัย.
- พดุมอาจารย์พุกโยคะ รัตนรังสี สุวัตร์ ตั้งจิตเรเจริญ และปริญญา อุทิศชลาพันธ์.2541. เพชรน้ำเอก กล้วยอดตำรับยาสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สุวีริยาสาส์น.
- วีณา จิรัจฉรียากุล, บรรณาธิการ.2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ นันทวัน และอรนุช บก..
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพรไทย: รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- สุนทรี สิงหนุตตรา. 2540. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ดอกเบี๋ย.
- ศักดิ์ชาย พันธุ์แสง. 2546. สูตรตำรายาหมัศจรรย์เวชศาสตร์โบราณ. กรุงเทพมหานคร: อินฟอรมีเดีย บั๊คส์.

ภาษาอังกฤษ

- Academy report. 2001. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis and other clinical conditions. J Periodontol. 72: 1790-8000.
- Akinpelu, D.A. 2001. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia. 72: 286-287.
- Borghetti, A., Mottout, P. and ., Mottout, C.1987. How much root planning is necessary to remove the cementum from the root surface? Int J Periodontol Res Dent. 4: 23-28.
- Brown, M.R.W. and Gilbert, P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. J Appl Bacteriol. 74: 87S-97S.
- Burne, R. A.1998. Oral streptococci products of their environment. J Den Res. 77: 445-452.
- Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H. and Hwang, J. K. 2006. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 13: 261-266.
- Clarkson, B. H. 1991. Caries prevention-fluoride. Adv Dent Res. 5: 41-45.
- Emilson, C. G. 1994. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. J dent Res. 73 (3): 682-691.
- Eloff, J. N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 64: 711-713.
- Ferretti, J. J. and Ward, M. 1976. Susceptibility of *Streptococcus mutans* to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother.10: 274-276.
- Fives-Taylor, P. M., Meyer, D. H., Mintz, K. P. and Brissette, C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 2000. 20: 136-167.
- Grare, M. *et al*. 2008. Tetrazolium salts for MIC determination in microplate: why? Which salt to select? How? J Microbiol Methods. 75: 156-159.
- Gibbons, R. J. 1989. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res. 68: 750-760.
- Hamada, S. and Slade, H. D. 1980. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44(2): 331-384.

- Hamada, S., Kiga, T. and Ooshima, T. 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res. 63(3): 407-411.
- Hardie, J. M. 1992. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. Br Den J. 172: 271-278.
- Houte, J. V. 1982. Bacteria adherence and dental plaque formation. Infection. 10: 252-260.
- Islam, B., Khan, S. N. and Khan, A. U. 2007. Dental caries: from infection to prevention. Med Sci Monit. 13(11): 196-203.
- Jian, H., Li, C., David, H., Wenyan, H. and Qing-Yi, L. 2006. Antibacterial Compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. J Nat Prod. 69: 121-124.
- Jones, C. G. 1997. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol 2000. 15: 55-62.
- Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. and Washington, J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. (eds) Manual of clinical microbiology (7th). Washington DC, ASM Press.
- Katsura, H., Tsukiyama, R., Suzuki, A. and Kobayashi, M. 2001. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. Antimicrob Agents Chemother. 45: 3009-3013.
- Kazuma, K., Noda, N. and Suzuki, M. 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. Phytochemistry. 62: 229-237.
- Kazuma, K., Noda, N. and Suzuki, M. 2003. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. Phytochemistry. 64: 1133-1139.
- Kelemu, S., Cardona, C. and Segura, G. 2004. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. Plant Physiol Biochem. 42: 867-873.
- Khare, C. P. 2004. Indian herbal remedies rational western therapy, ayurvedic and other traditional usage, botany. 1st ed. Heidenberg: Springer-Verlag Berlin Heidenberg. p.153-154.
- Kim, J. H., Liu, K. H., Yoon, Y., Sornnuwat, Y., Kitirattrakarn, T., Anantachoke, C. 2005. Essential leaf oils from *Melaleuca cajuputi*. Acta horticulturae. 680: 65-82.

- Kim, J. M., Lee, Y. M., Lee, G. Y., Jang, D. S., Bae, K. H. and Kim, J. S. 2006. Constituents of the roots of *Pueraria lobata* inhibit formation of advanced glycation end products (AGEs). Arch Pharm Res. 10: 821-825.
- Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E. and Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria district. J Ethnopharmacol. 99: 309-312.
- Li, M and Xu, Z. 2008. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. Arch Pharm Res. 31(5): 640-644.
- Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev. 50(4): 353-380.
- Mandel, I. D. 1988. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. Periodontol 2000. 15: 488-498.
- Marsh, P. D. 1992. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res. 71: 1431-1438.
- Matthijs, S. and Adriaens, P.A. 2002. Chlorhexidine vanish:review. J Clin Periodontol. 29: 1-8.
- Nagata, H., Inagaki, Y., Yamamoto, Y., Maeda, K., Kataoka, K., Osawa, K. and Shizukuishi, S. 2006. Inhibitory effect of macrocapals on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontopathic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 21: 159-163.
- Noara, T., Kinjo, J., Furusawa, J., Sakai, Y., Inoue, M., Shirataki, Y., Ishibashi, Y., Yokoe, I. and Komatsu, M. 1993. But-2-enolides from *Pueraria lobata* and revised structures of puerosides A, B and sophoroside A. Phytochemistry. 33: 1207-1210.
- NØrskov-Lauritsen, N., Bruun, B. and Killan M. 2005. Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 55: 449-456.
- NØrskov-Lauritsen, N. and Killan M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophirus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen.nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophirus*

- comb. nov., and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 56: 2135-2146.
- Parimaladevi, B., Boominathan, R. and Mandal, S. C. 2003. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Clitoria ternatea* root. Fitoterapia. 74: 345-349.
- Parimaladevi, B., Boominathan, R. and Mandal S.C. 2004. Evaluation of antipyretic potential of *Clitoria ternatea* L. extract in rats. Phytomedicine. 11: 323-326.
- Park, K. M., You, J. S., Lee, H. Y., Beak, N. I. and Hwang, J. K. 2003. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. J Ethnopharmacol. 84: 181-185.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J.A. and Dewhirst, F.E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral site. Periodontol 2000. 42: 80-87.
- Samaranayake, L. P. 2006. Essential microbiology of dentistry. 3rd ed. China: Harcourt Publishers Limited.
- Silverstone, L. M., Johnson, N.W., Hardie, J.M. and Williams, R.A.D. 1981. Dental caries: aetiology, pathology and prevention. London: Macmillan Press Ltd.
- Slot, J. 1986. Bacterial specificity in adult periodontitis. J Clin Periodontol. 13: 912-917.
- Slots, J., and Ting, M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 20: 82-121.
- Slots, J and Jorgensen, M.G. 2000. Efficient antimicrobial treatment in periodontal maintenance care. J Am Dent Assoc. 131: 1293- 1304.
- Slot, J. and Ting, M. 2002. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontol 2000. 28: 106-176.
- Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 28: 12-55.
- Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. 2005. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 38: 135-187.
- Sudhakar, M., Rao, Ch.V., Rao, P.M. and Raju, D.B. 2006. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. Fitoterapia. 77: 47-49.

- Takahisa, I. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol. 74: 111-118
- Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y. 1990^a. Structure of ternatin A2, one of *Clitoria ternatea* flower anthocyanins having unsymmetrical side chains. Heterocycles. 31(10): 1773-1776.
- Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y. 1990^b. Acylated anthocyanins of *Clitoria ternatea* flowers and their acyl moieties. Phytochemistry. 29(3): 949-953.
- Terahara, N., Toki, K., Saito, N., Honda, T., Matsui, T. and Osajima, Y. 1998. Eight new anthocyanins, ternatins C1-C5 and D3 and preternatins A3 and C4 from young *Clitoria ternatea* flowers. J Nat Prod. 61: 1361-1367.
- Theilade, E. 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J Clin Periodontol. 13: 905-911.
- Wiat C., Mogana, S., Khalifah, S., Mahan, M., Ismail, S., Buckle, M., Narayana A. K. and Sulaiman M. 2004. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of perak, peninsular Malaysia. Fitoterapia. 75: 68-73.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Trypticase Soy Broth (TSB), Trypticase Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion Broth (BHIB) และ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) เตรียมตามคำแนะนำของบริษัท โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

อาหาร Nutrient Broth (NB) เตรียมตามสูตร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

อาหาร Nutrient Agar (NA) เตรียมตามสูตร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

อาหาร Yeast-Malt Extract Medium Broth (YMB) เตรียมตามสูตร

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

อาหาร Yeast-Malt Extract Medium Agar (YMA)

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

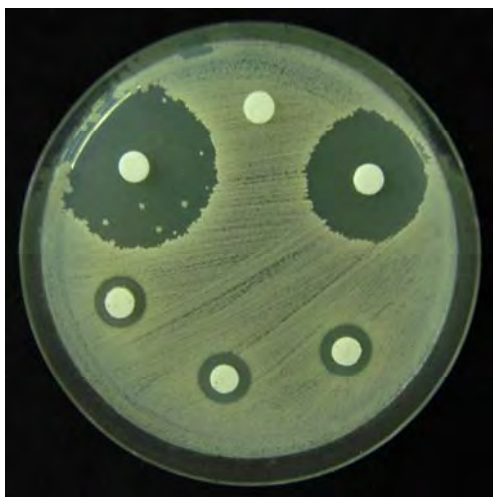
นำไปทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลชีพทดสอบ

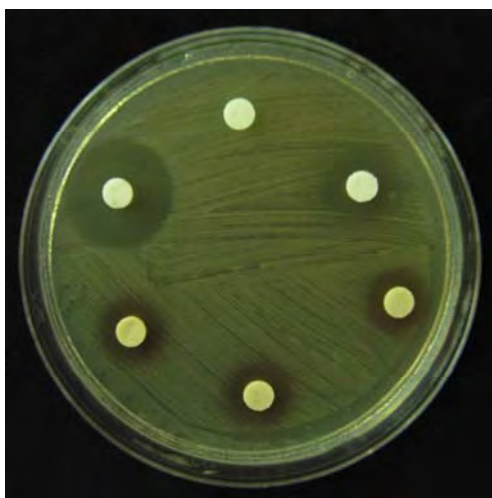
สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง หลังจากฆ่าเชื้อโรคแล้ว นำไปเทบนจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร ให้ได้ความลึกประมาณ 4-5 มิลลิเมตร (ปริมาณประมาณ 25 มิลลิลิตร) รอจนแห้ง หากยังไม่ใช้ให้นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้งานต้องนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อมาวางที่อุณหภูมิห้องและรอจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

ภาคผนวก ข

ภาพแสดงวงใสที่เกิดขึ้นของสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *A. actinomycetemcomitans*

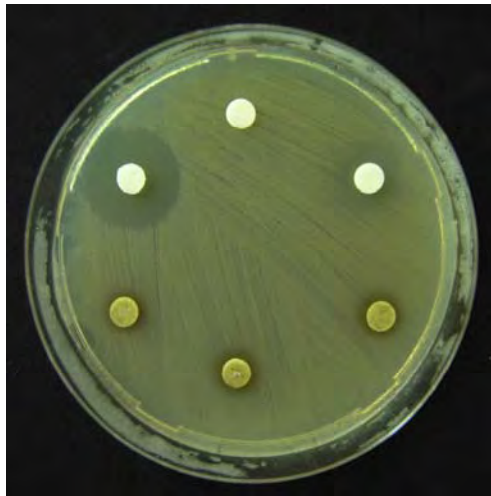


รูปที่ 1 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับรากอัญชัน

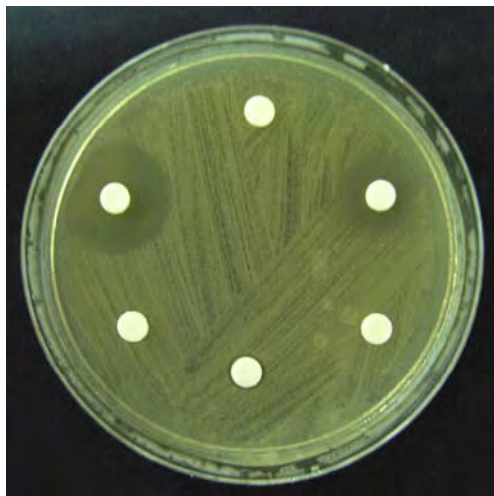


รูปที่ 2 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับลูกใต้ใบที่สกัดด้วยไดคลอโร

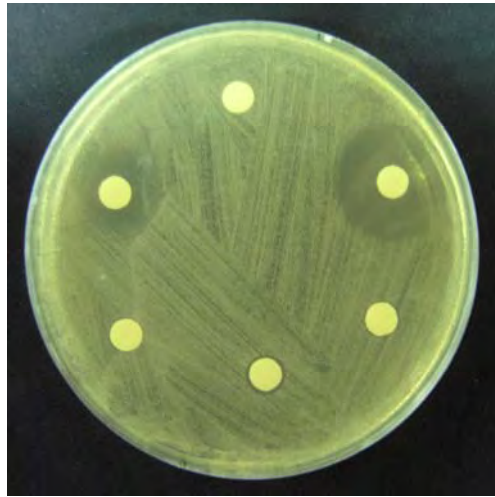
มีเทน



รูปที่ 3 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับลูกใต้ใบที่สกัดด้วยเมทานอล



รูปที่ 4 ข วงใสของ *S. mutans* กับเปลือกมะม่วงหิมพานต์



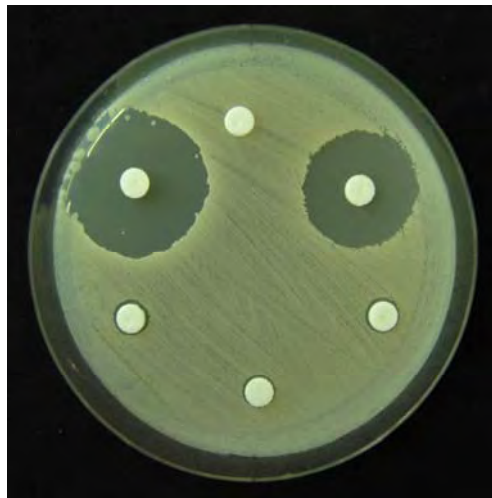
รูปที่ 5 ข วงใสของ *S. mutans* กับไบโसेมีดขาว



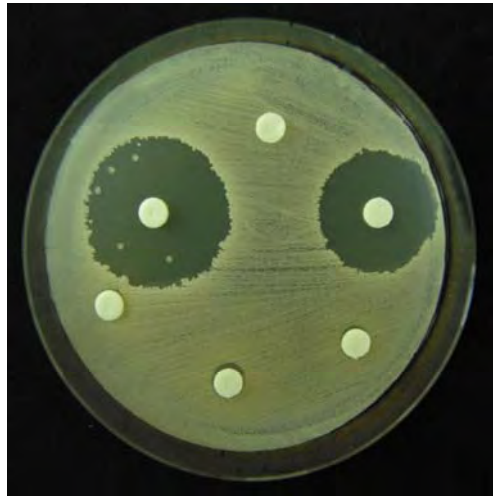
รูปที่ 6 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับดอกกานพลู



รูปที่ 7x วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับรากกพการอง



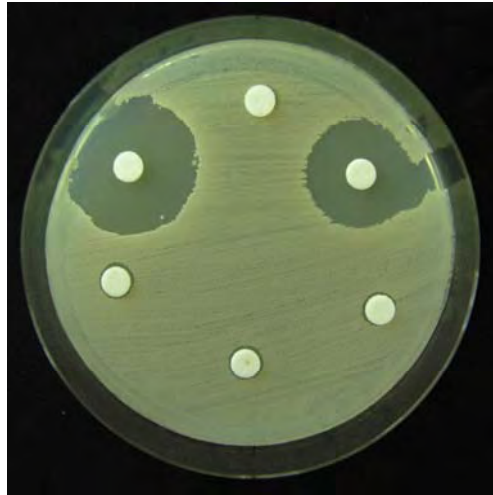
รูปที่ 8x วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับใบฝรั่ง



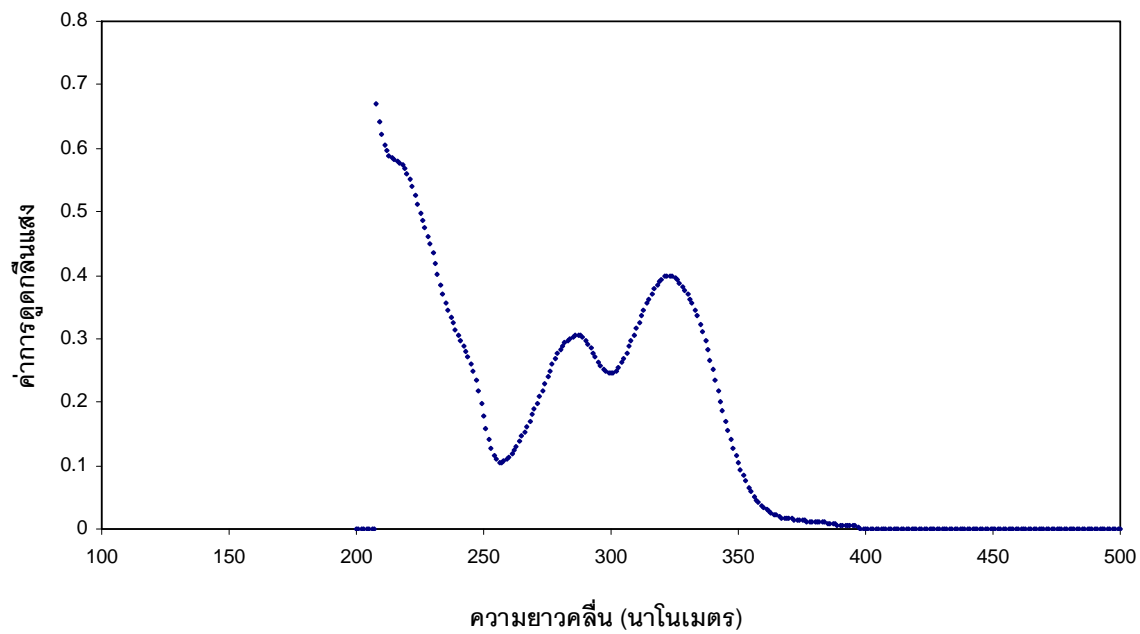
รูปที่ 9 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับไบบอระเพ็ดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน



รูปที่ 10 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับใบเสม็ดขาว

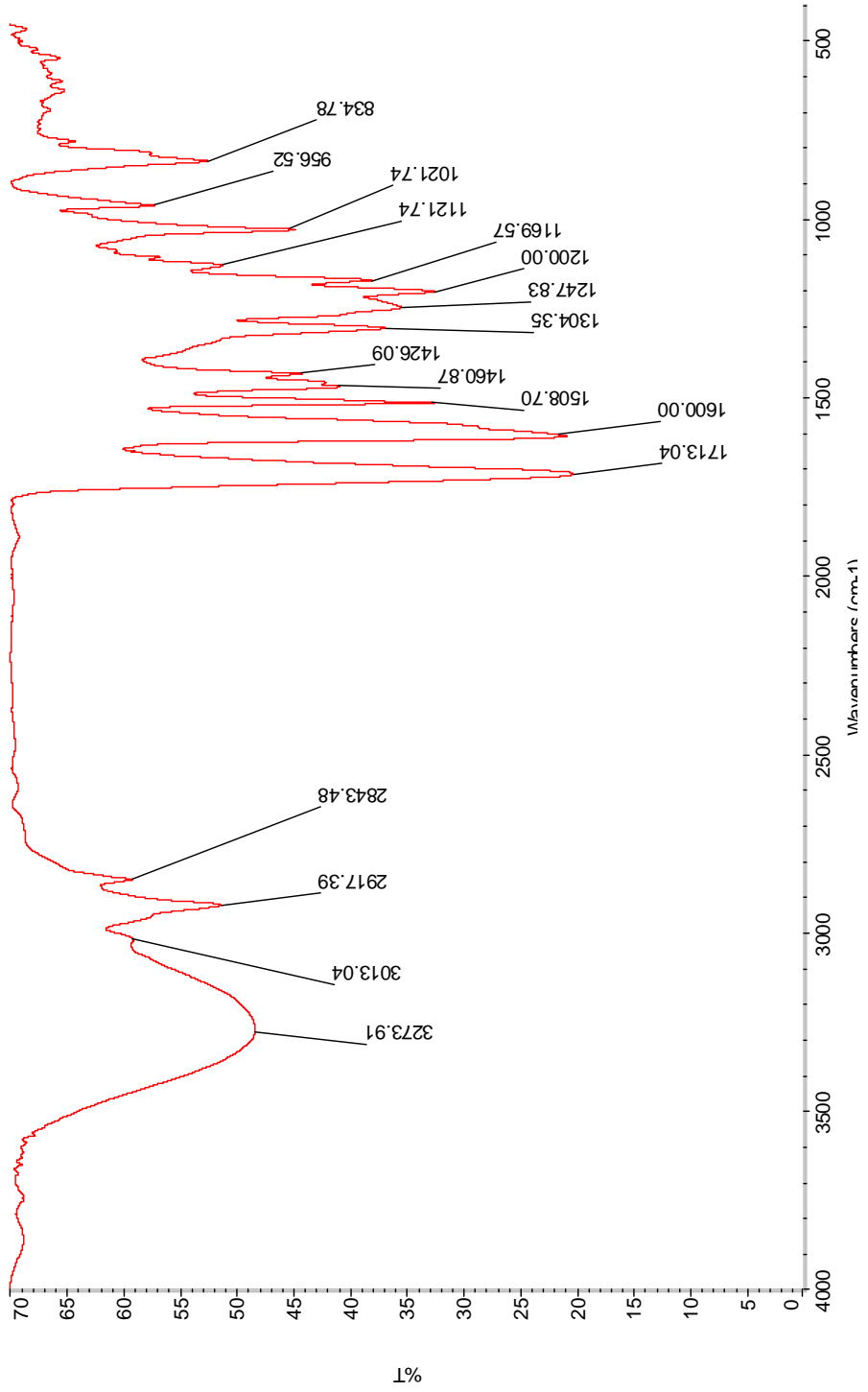


รูปที่ 11 ข วงใสของ *A. actinomycetemcomitans* กับไบบอระเพ็ดที่สกัดด้วยเมทานอล

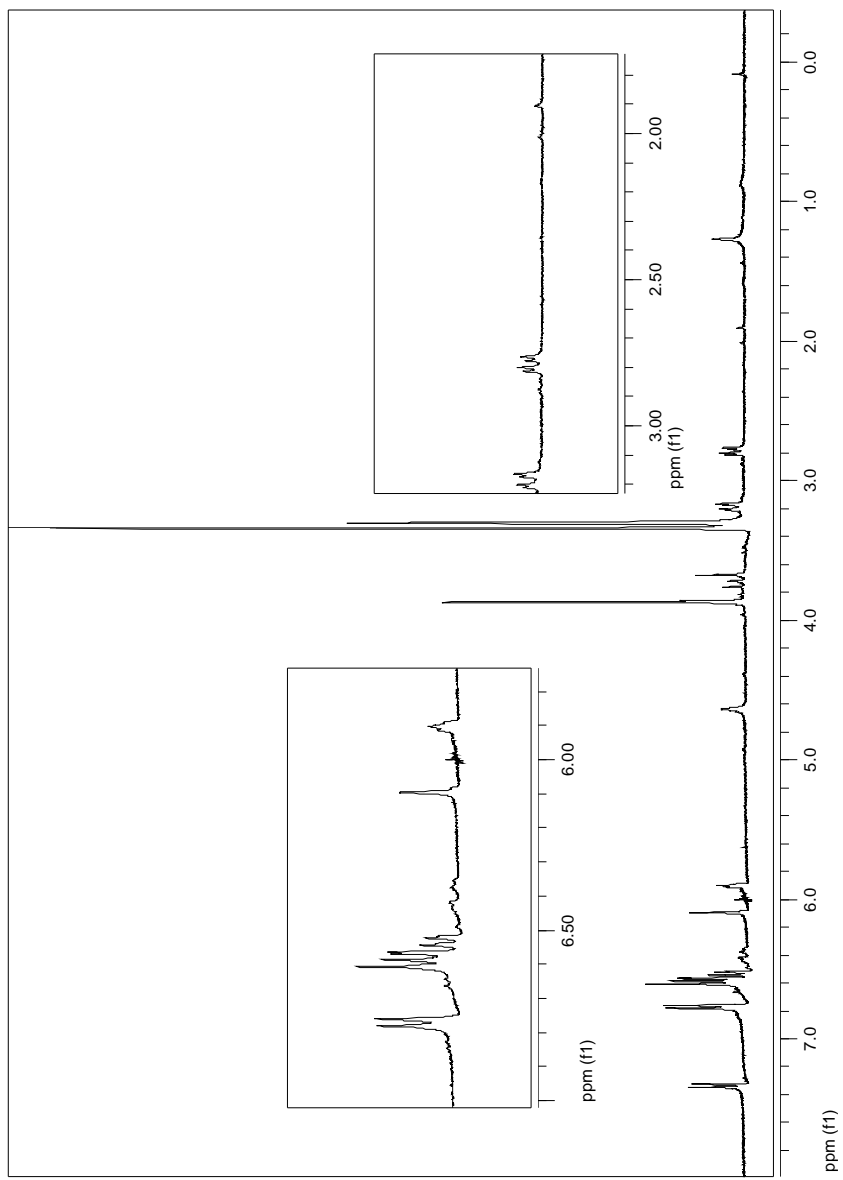


รูปที่ 1ค ยูวี สเปกตรัมของสาร 1

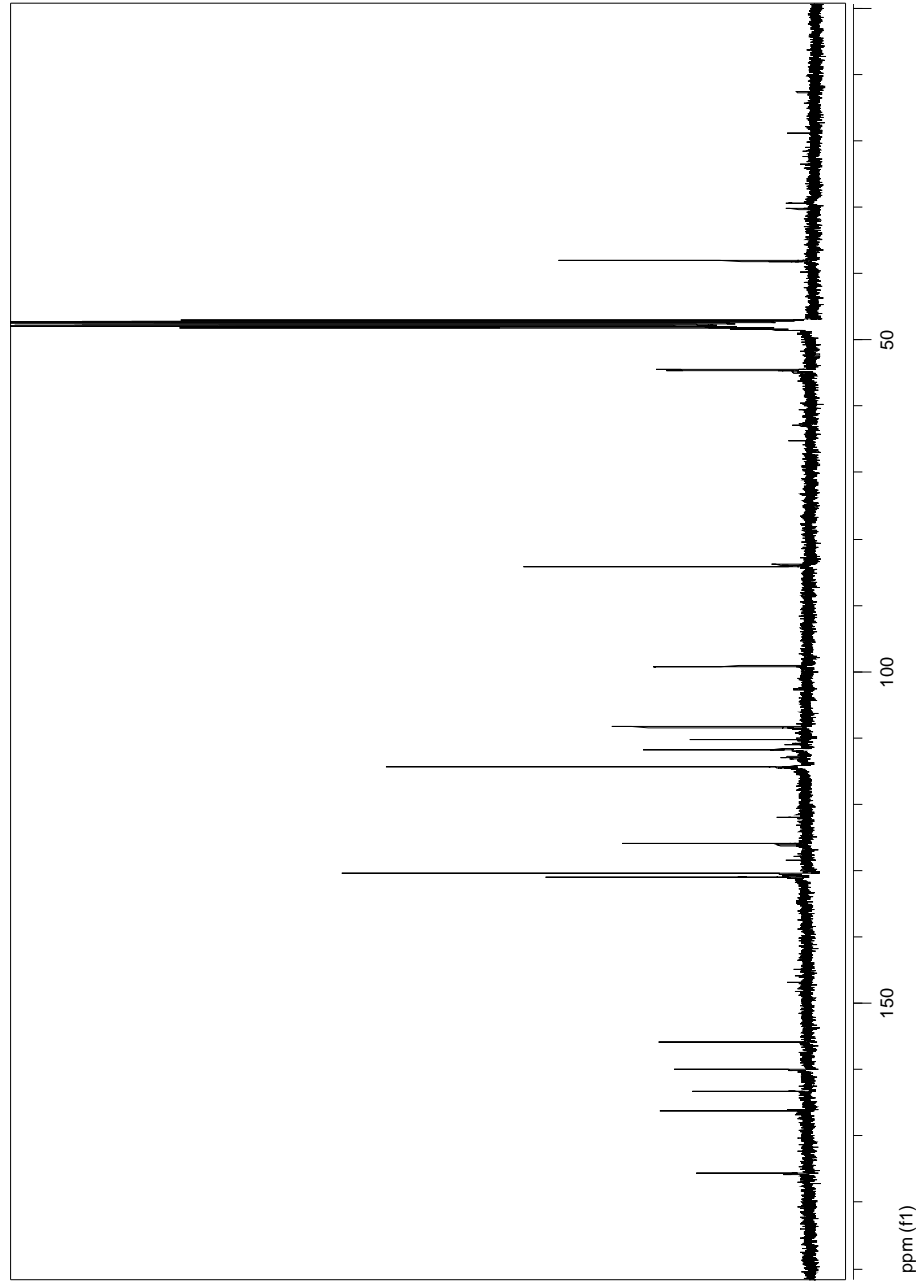
(ในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



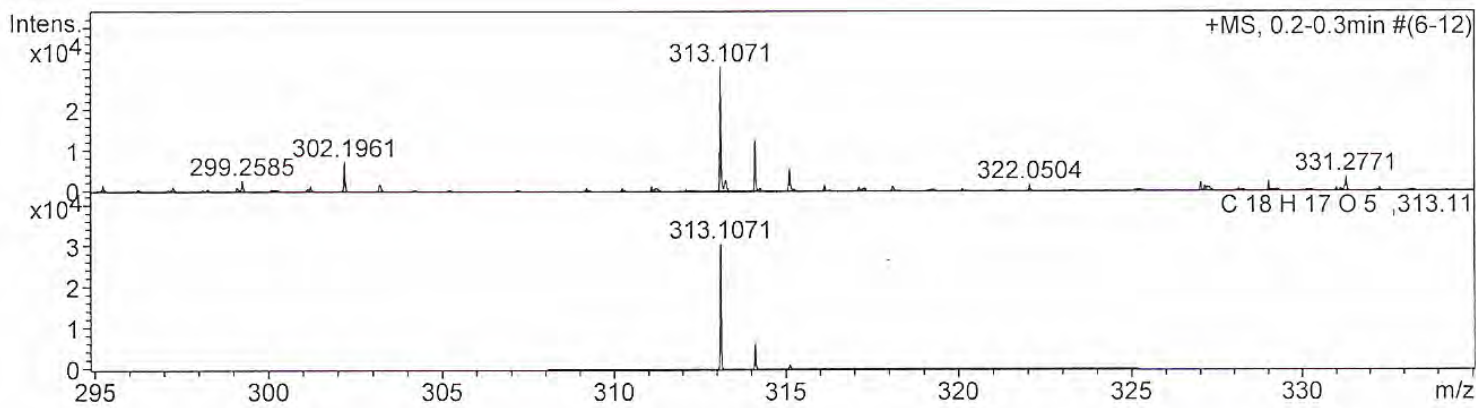
รูปที่ 2 ค IR สเปกตรัมของสาร 1



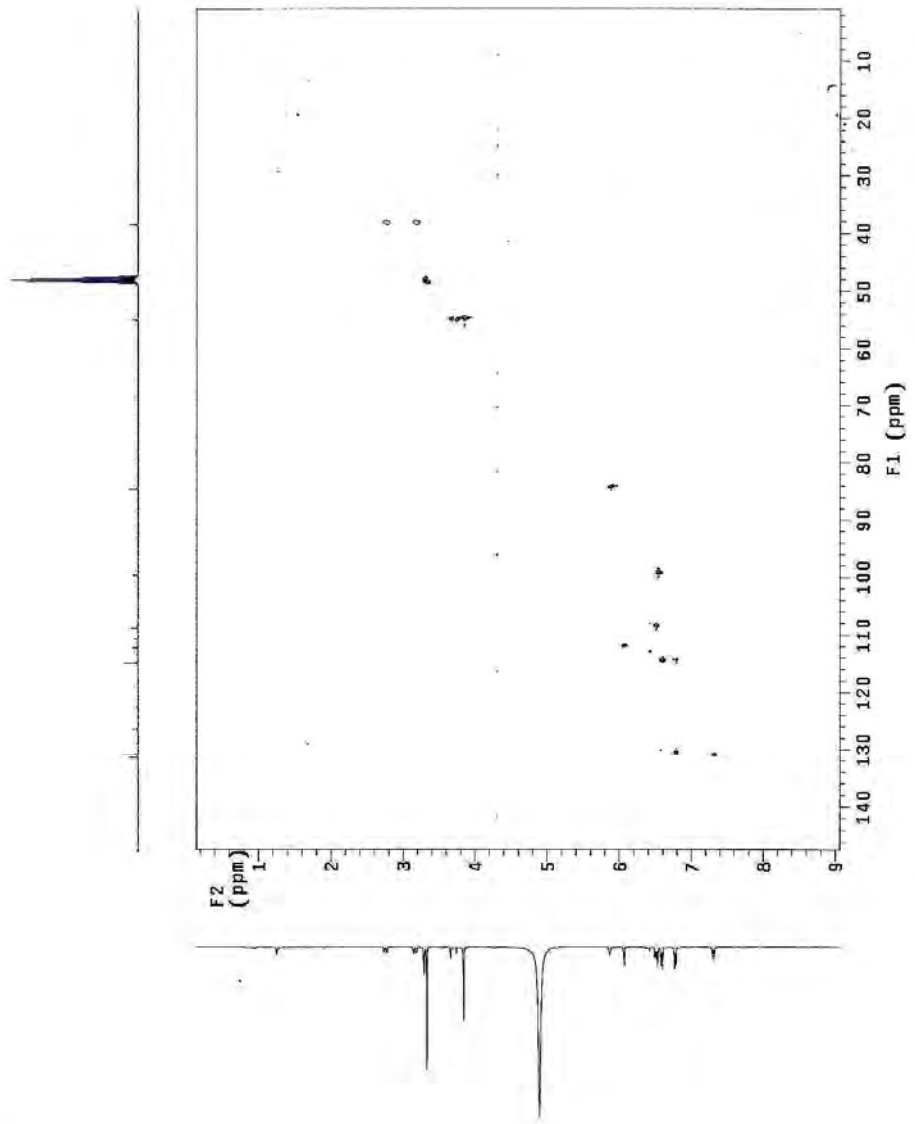
รูปที่ 3ค $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 1



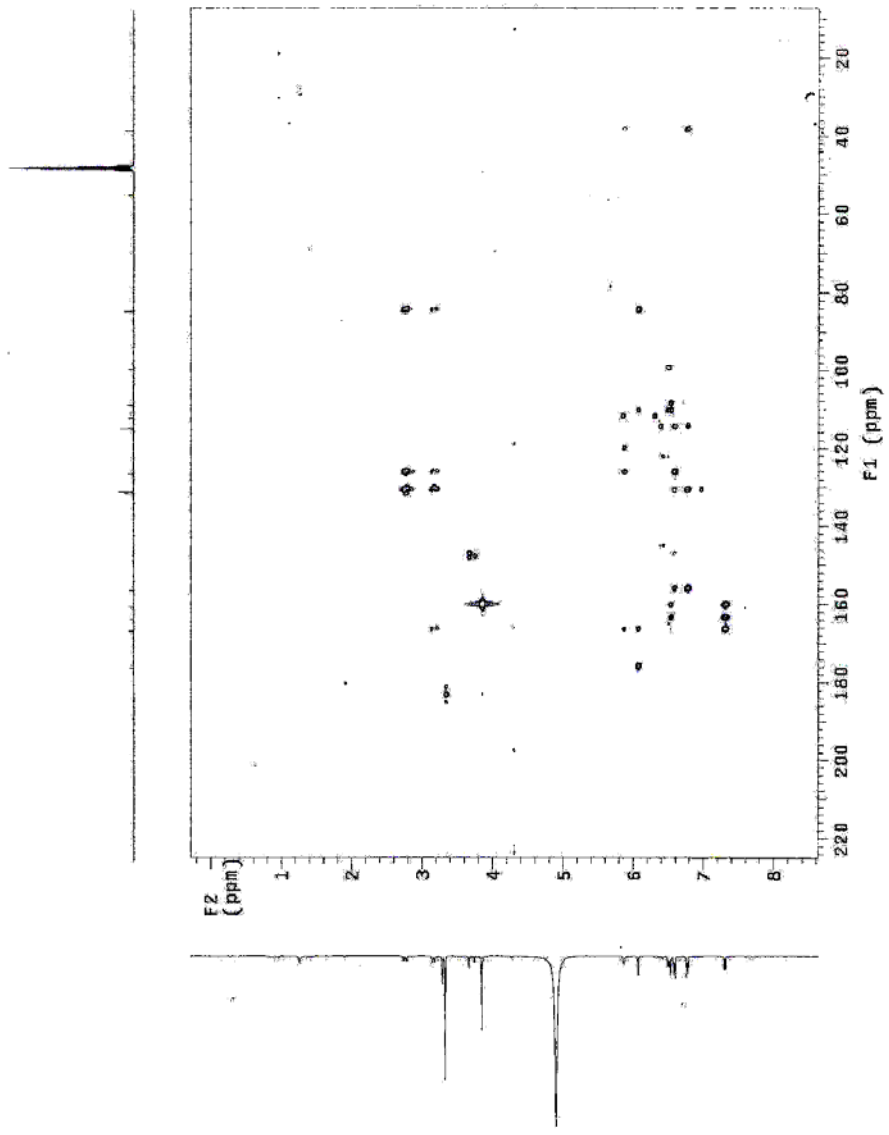
รูปที่ 4ค $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 1



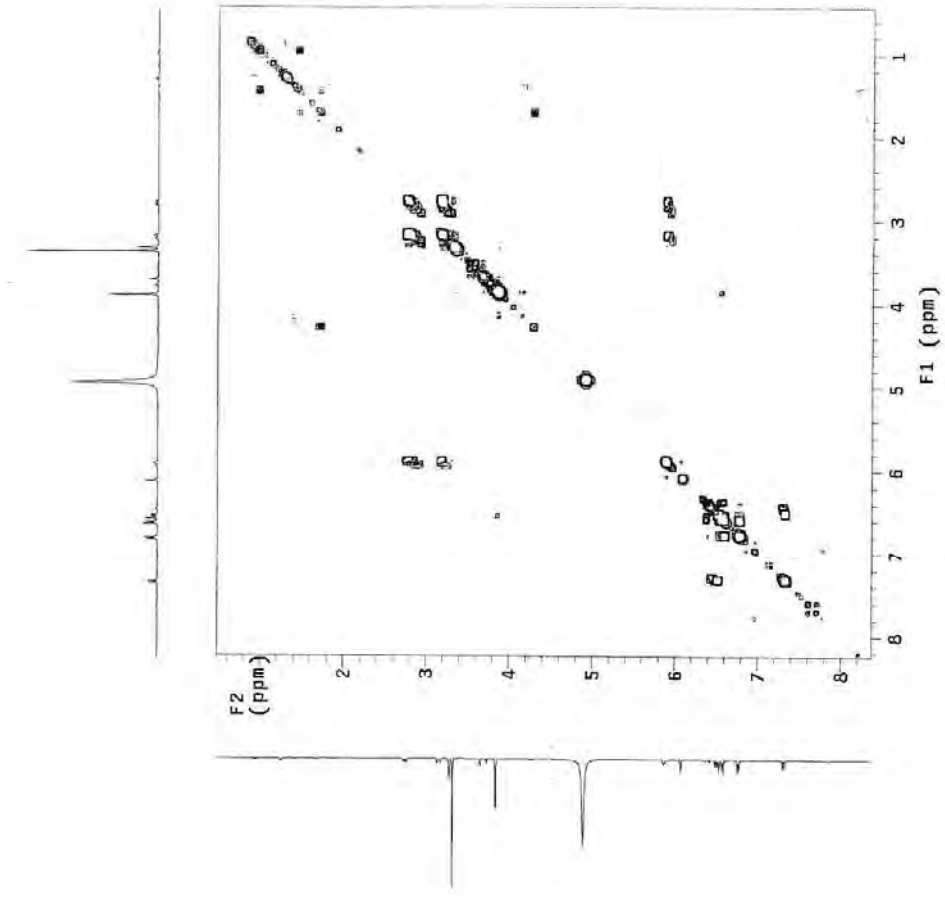
รูปที่ 5ค MS สเปกตรัมของสาร 1



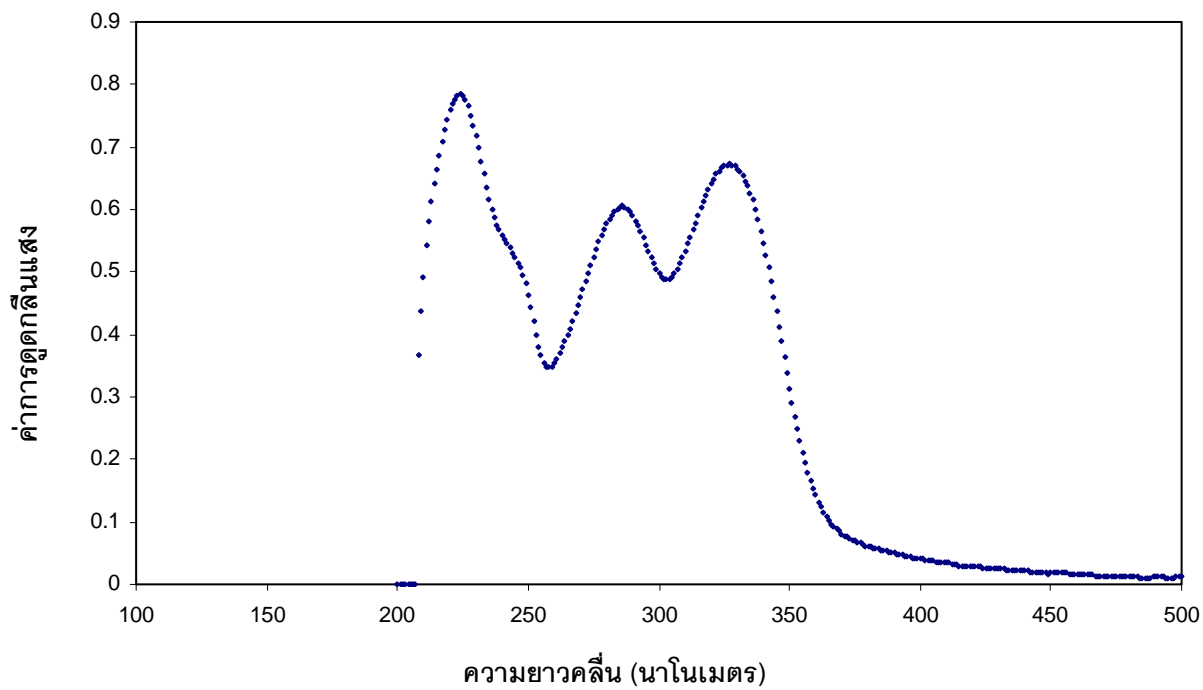
รูปที่ 6ค HSQC สเปกตรัมของสาร 1



รูปที่ 7ค HMBC สเปกตรัมของสาร 1

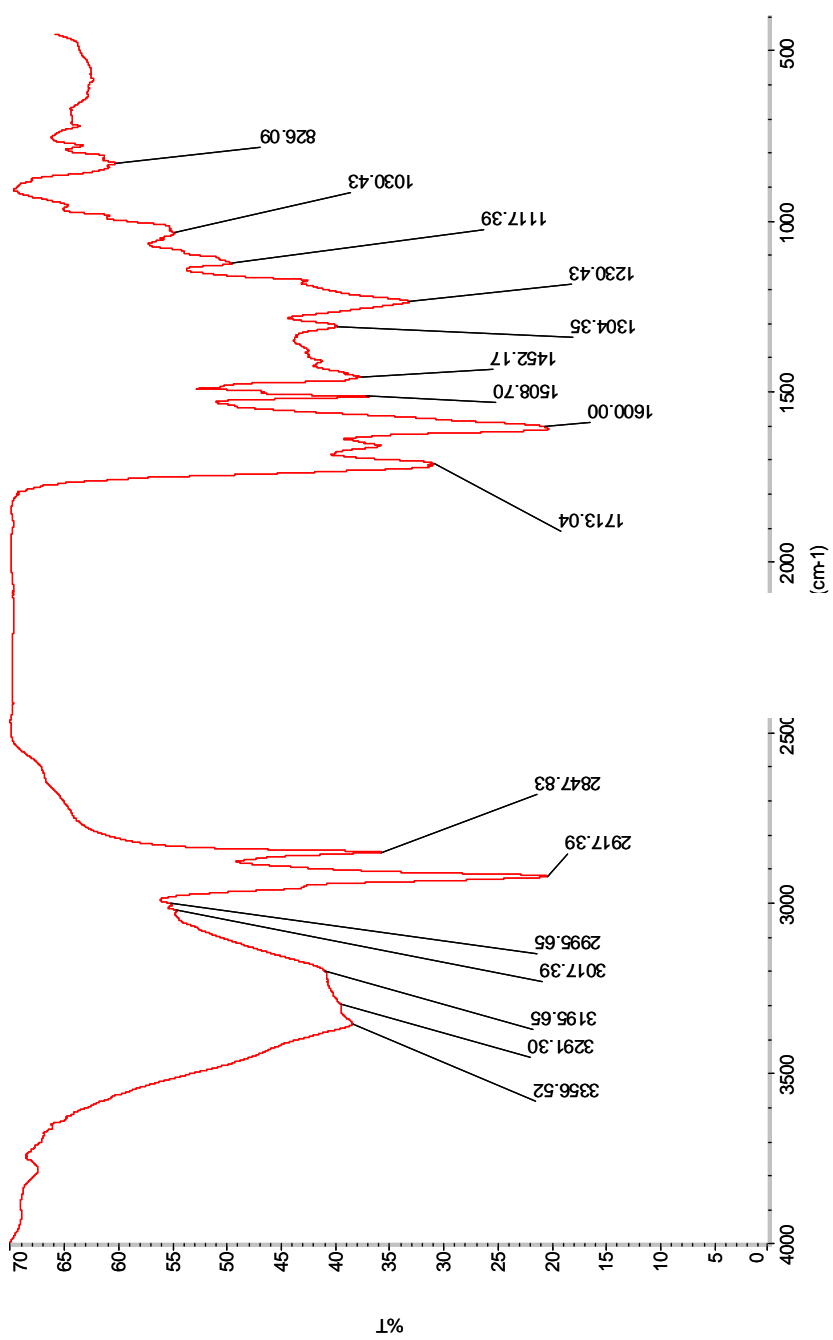


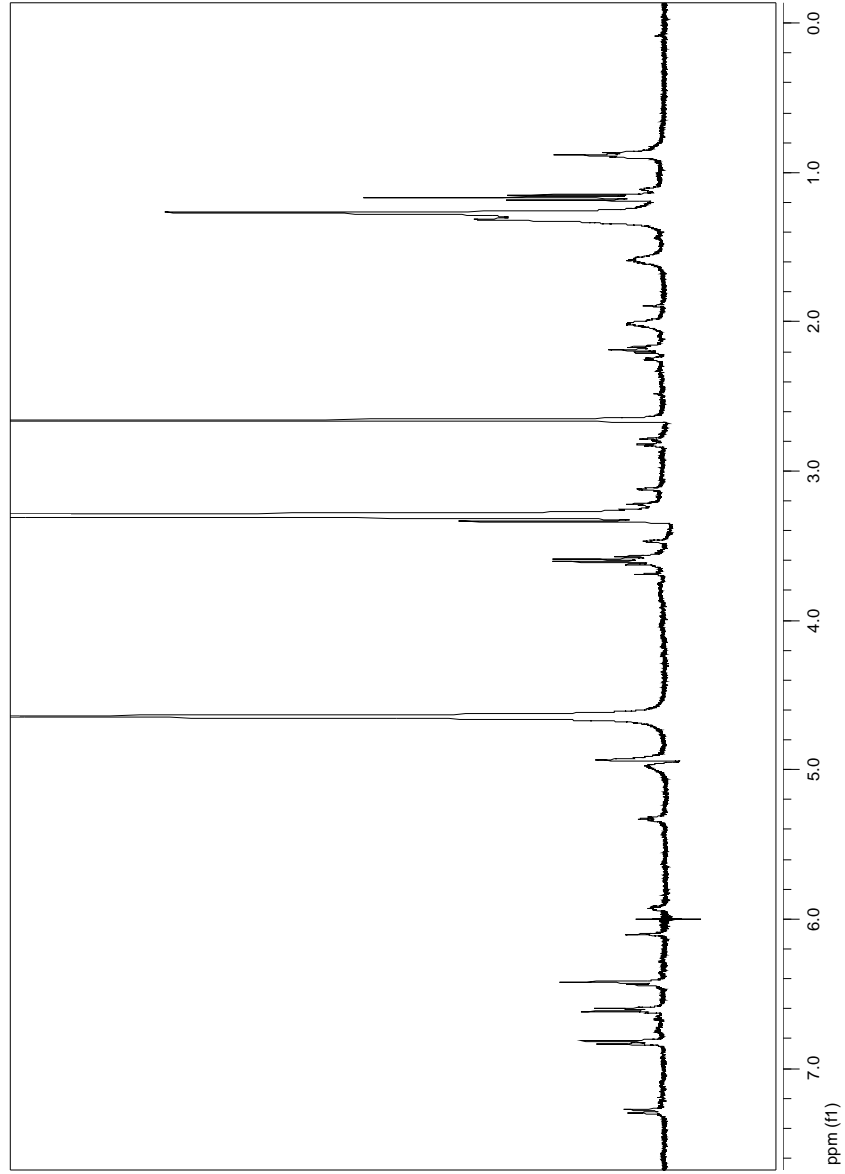
รูปที่ 8ค COSY สเปกตรัมของสาร 1



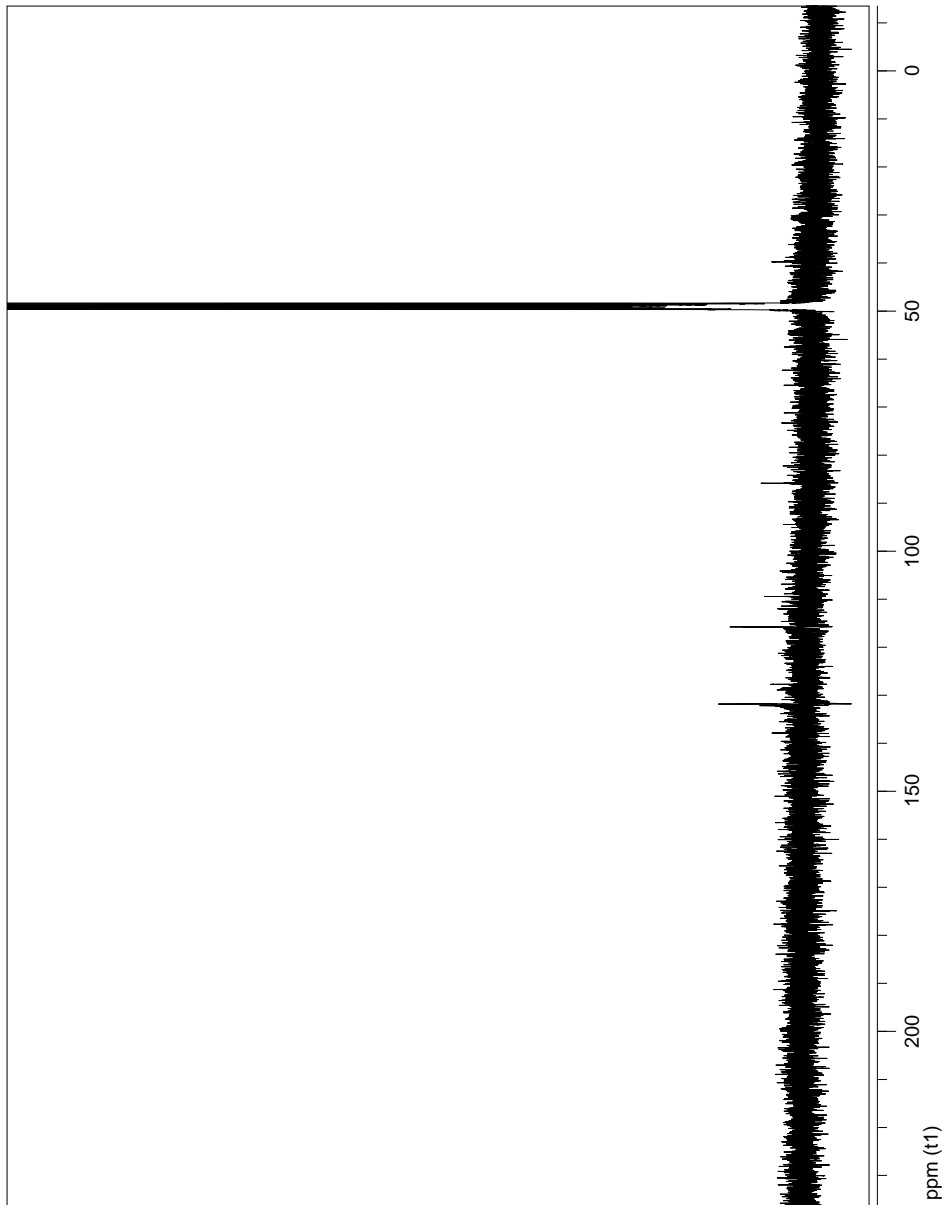
รูปที่ 9ค ยูวี สเปกตรัมของสาร 2

(ในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

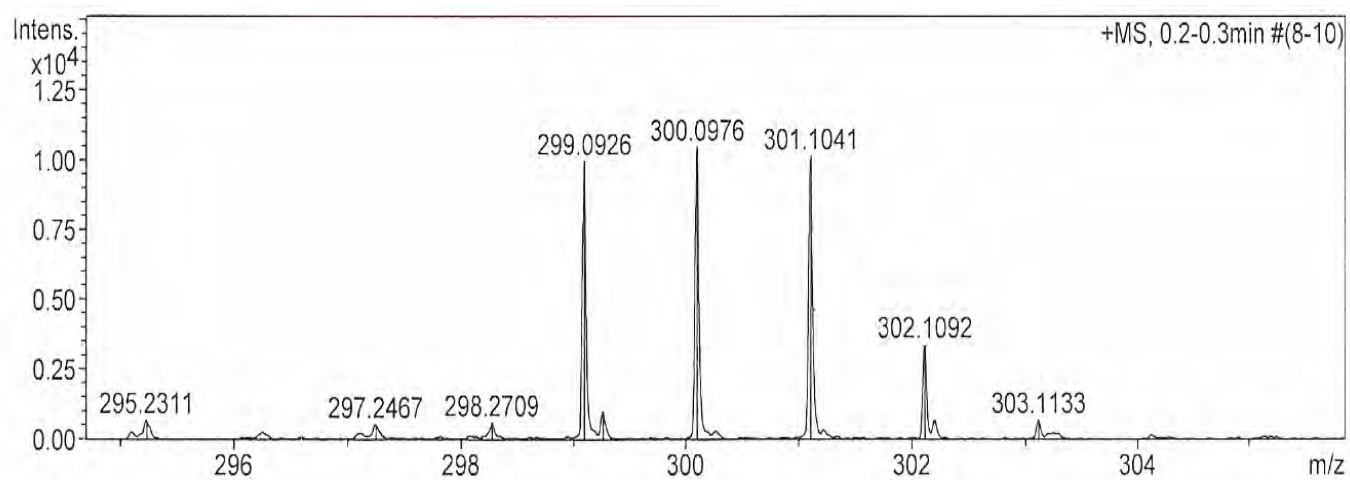




รูปที่ 11ค $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 2



รูปที่ 12 ค $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 2



รูปที่ 13ค MS สเปกตรัมของสาร 2

/export/home/cpuser/vnmr/sys/data

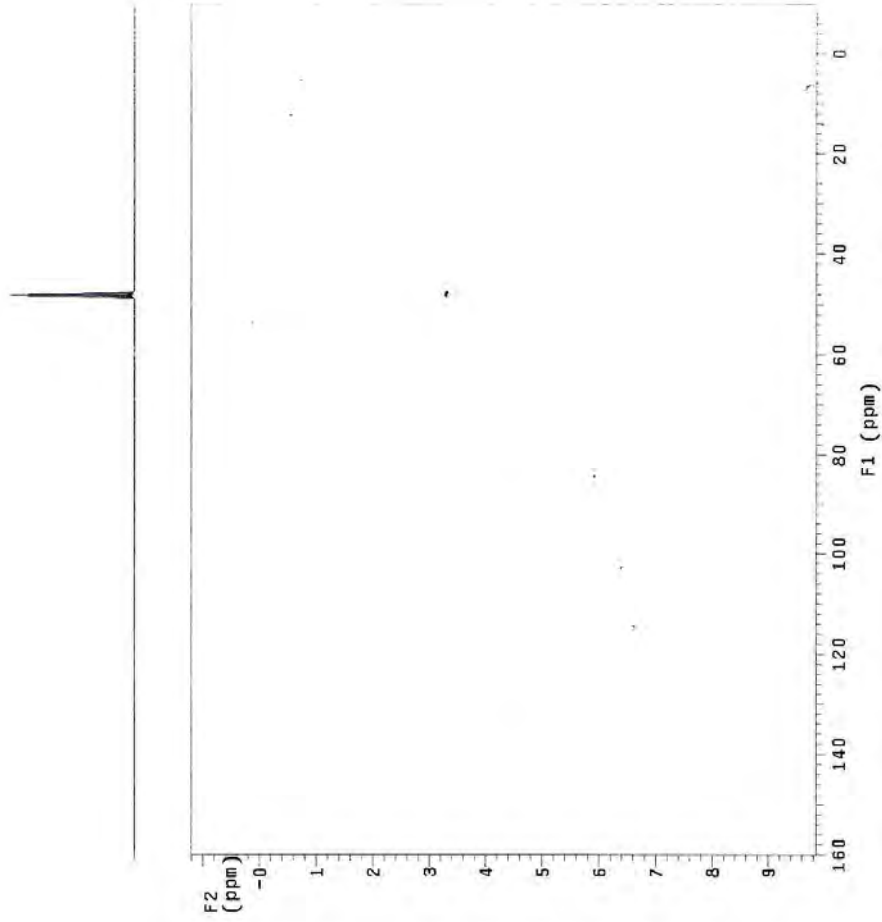
Sample directory:
f0402_2008-05-02

File: ghsqc_01

Pulse Sequence: ghsqc

Solvent: CD300

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6324.8 Hz
ZU width 17094.0 Hz
4 repetitions
2 F2 positions
OBSERVE H1 500.8838132 MHz
DECOUPLE C13 100.5533265 MHz
Power 54.00
on during acquisition
off during delay
coupling delay
0.000 sec
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.022 sec
F1 size 1024 x 1024
Total time 36 min



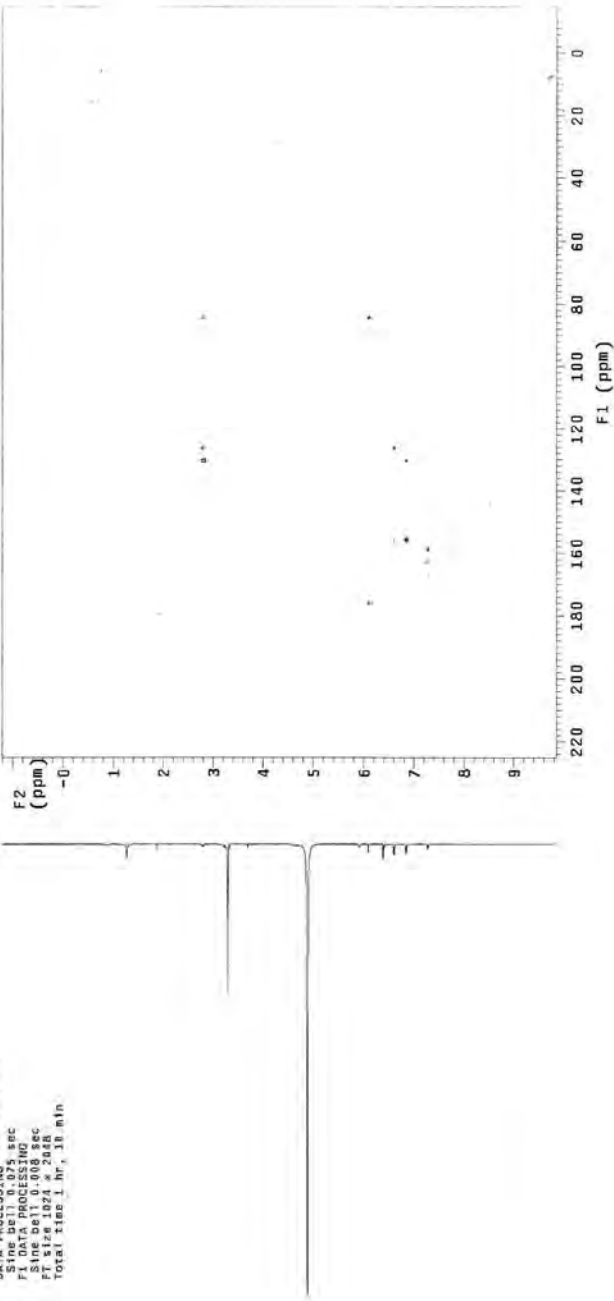
รูปที่ 14ค HSQC สเปกตรัมของสาร 2

415DA-1

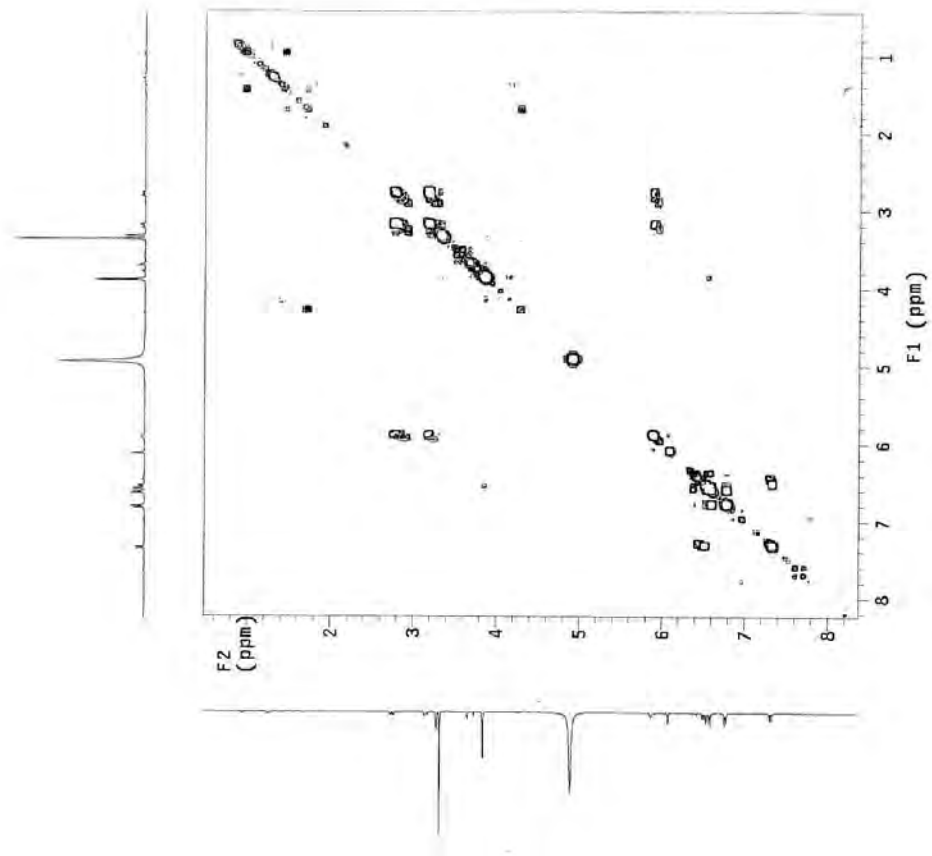
Data Collected on:
Date: 01/11/00
Archive directory:
/export/home/cpuser/vmr-sys/data
Sample directory:
01/11/00
File: gHMC_01

Pulse Sequence: gHMC
Solvent: CDCl₃

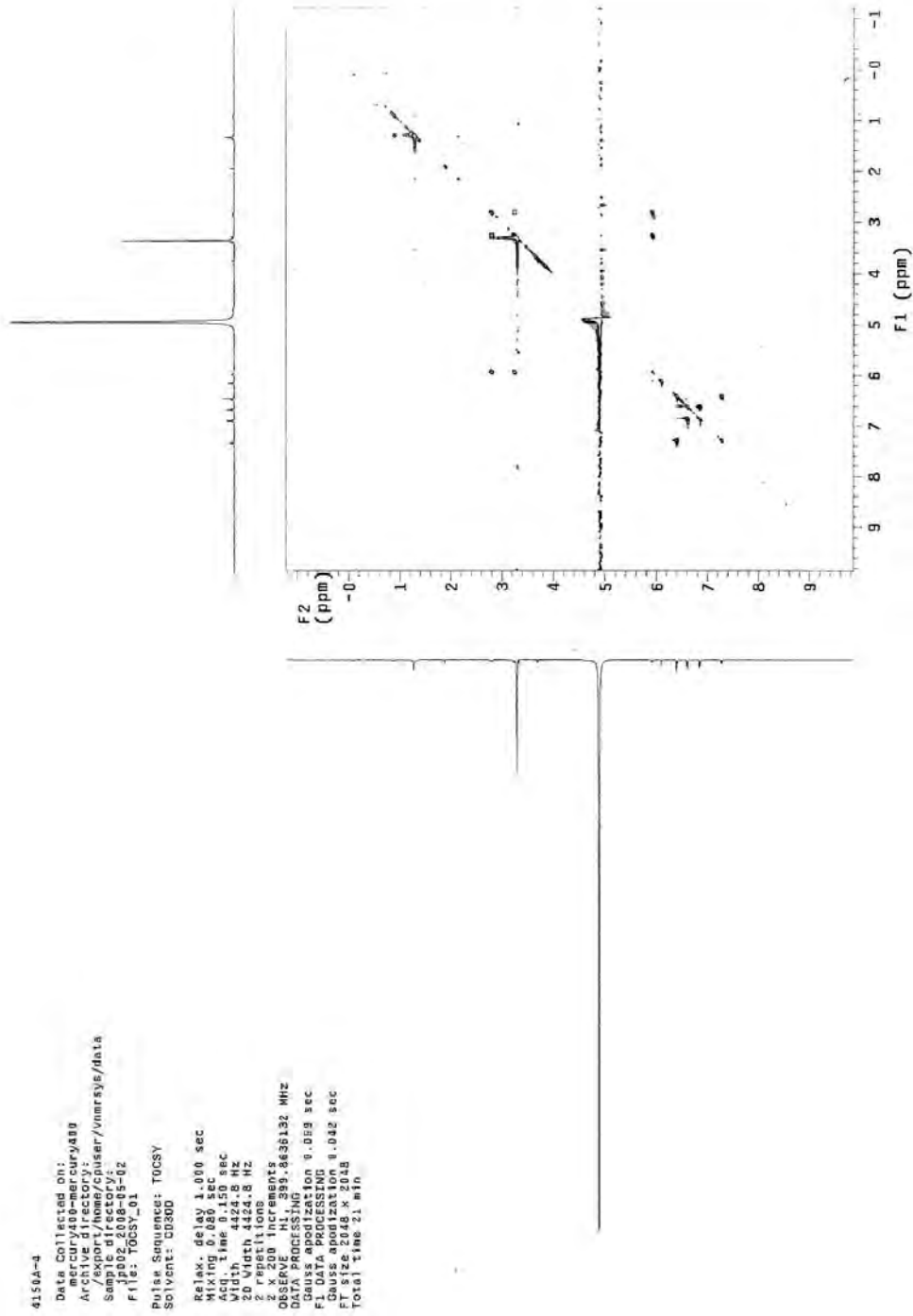
Relax. delay 1.888 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 422.8 Hz
F2 offset 1.8 Hz
& repetitions
400 increments
OBSERVED F2: 99.8636132 MHz
F1 offset 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
Sine delay 0.008 sec
Total time 1 hr, 38 min



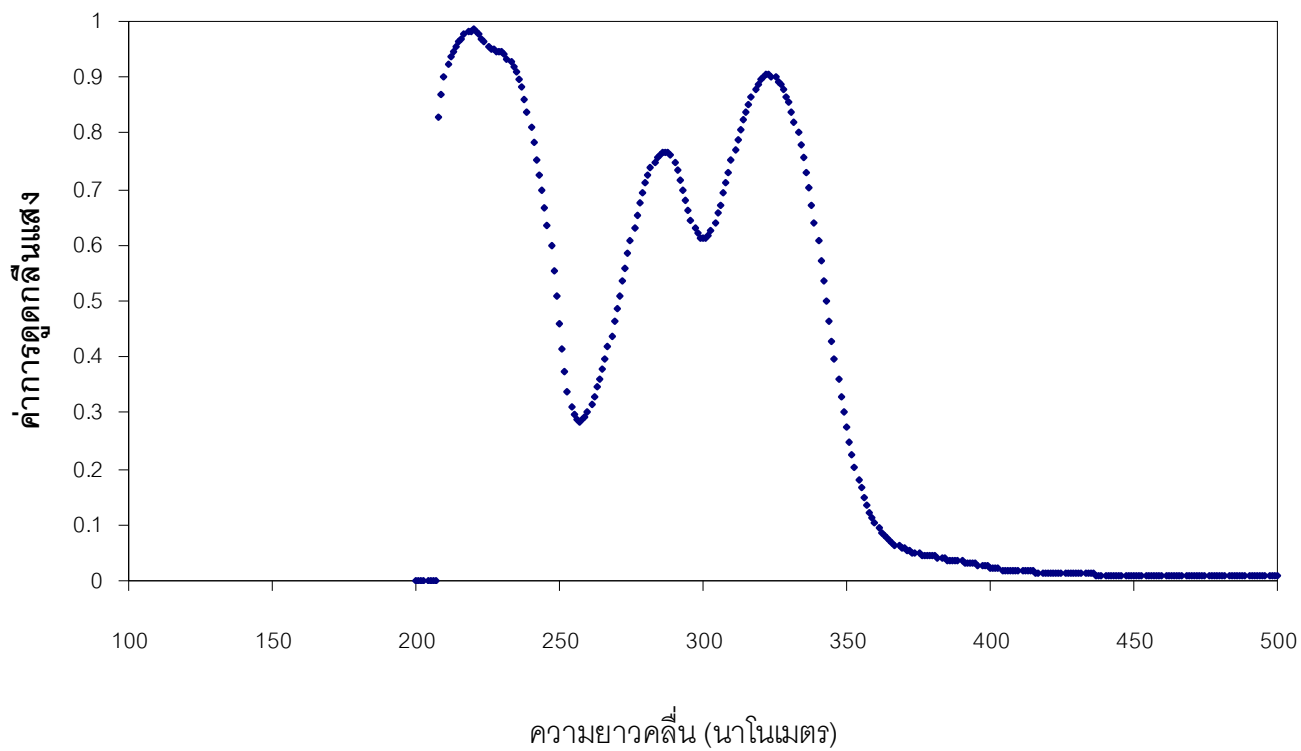
รูปที่ 15ค HMC สเปกตรัมของสาร 2



รูปที่ 16ค COSY สเปกตรัมของสาร 2

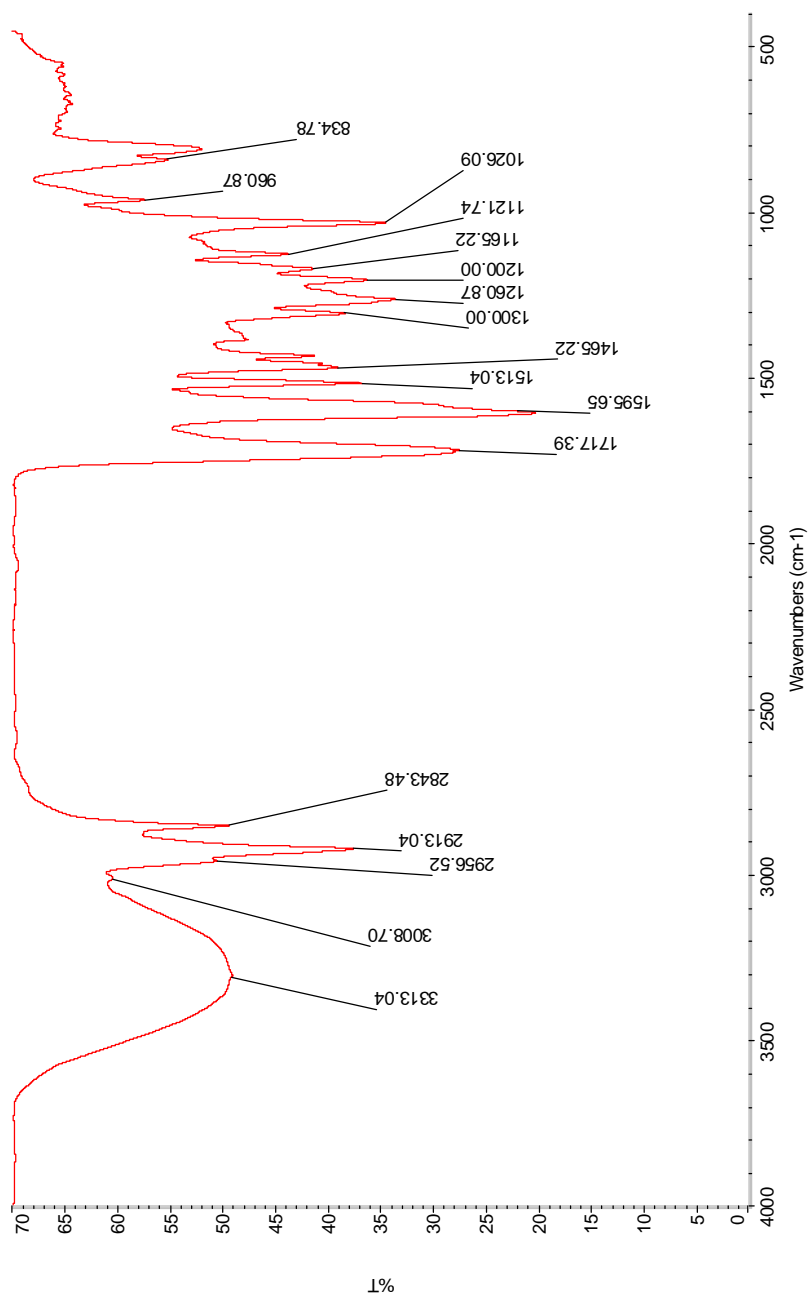


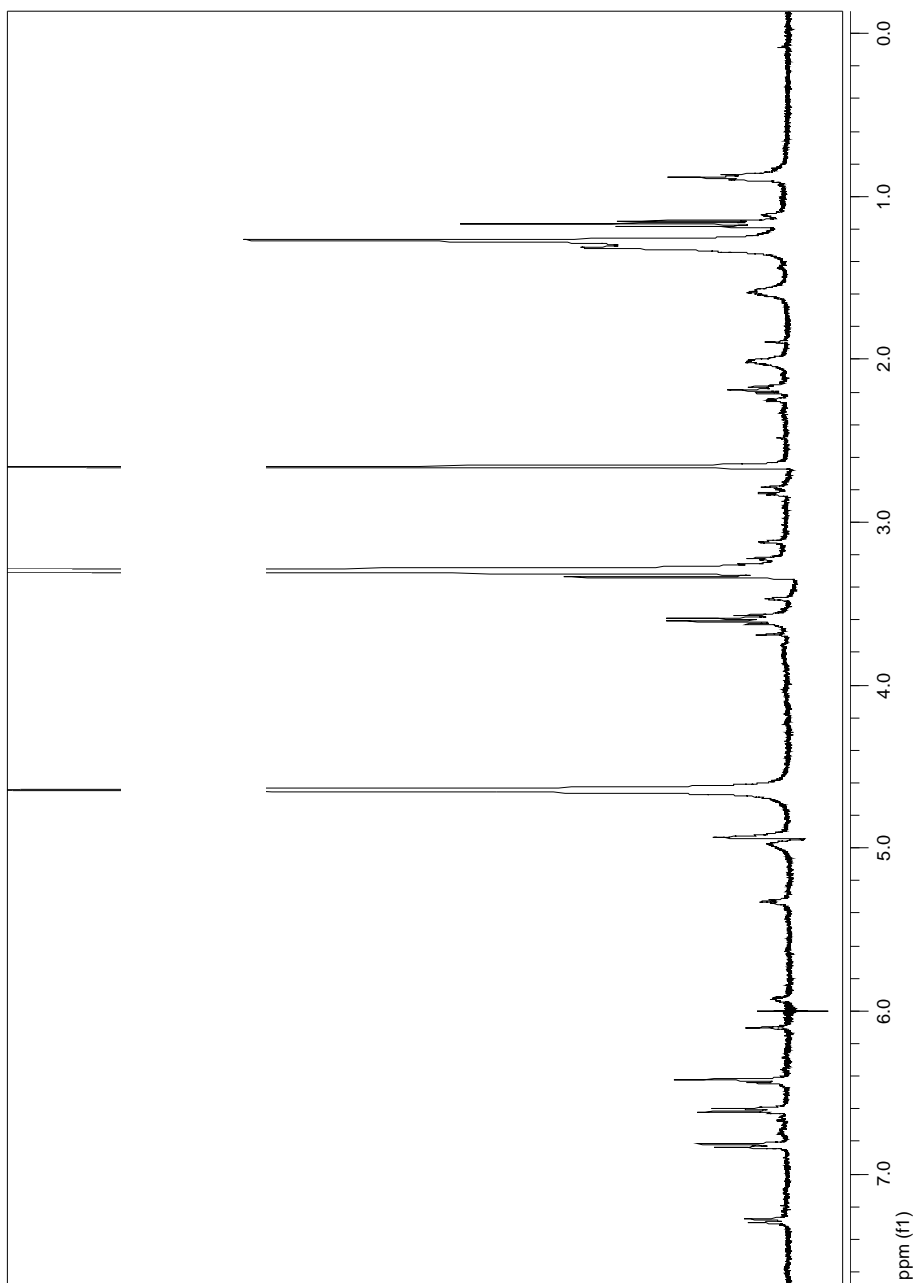
รูปที่ 17ค TOCSY สเปกตรัมของสาร 2



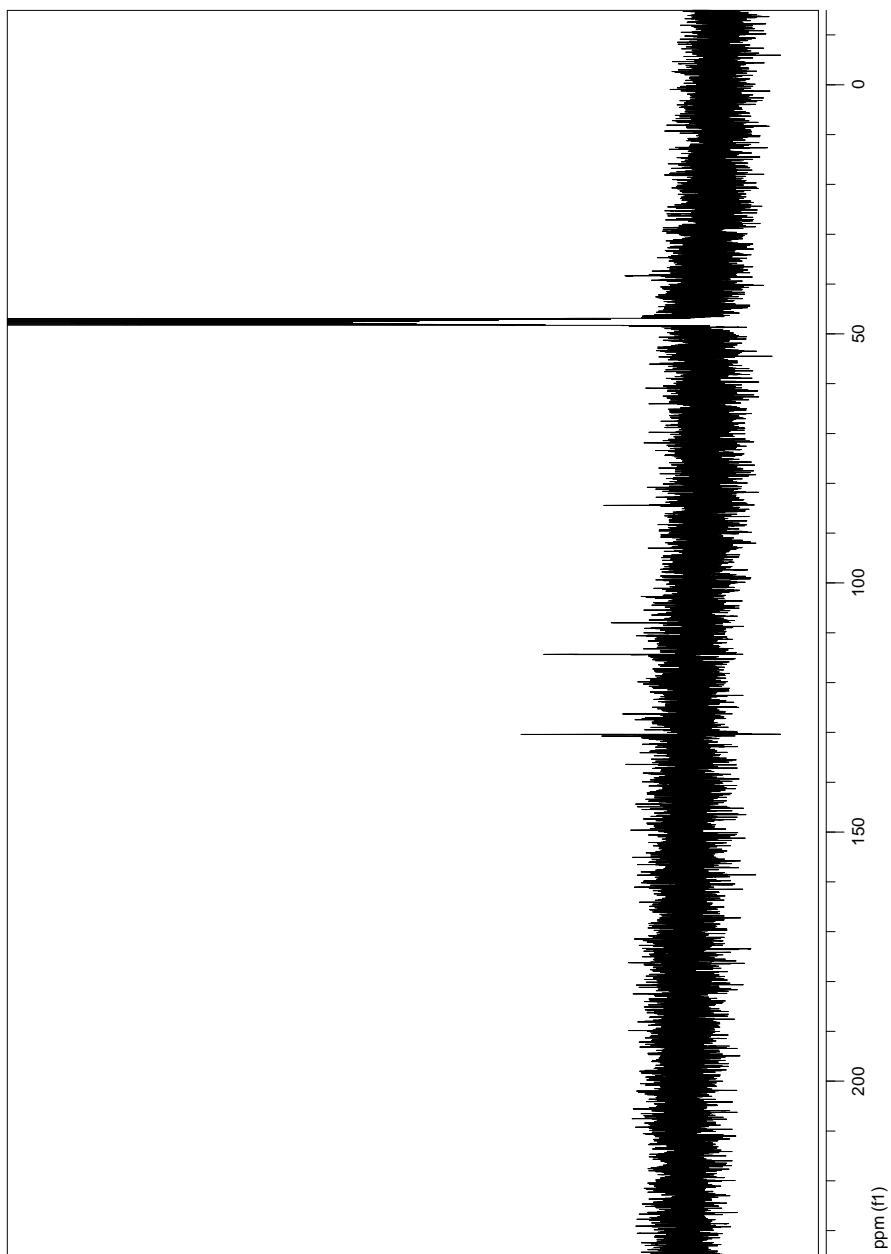
รูปที่ 18ค ยูวีสเปกตรัมของสาร 3

(ในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

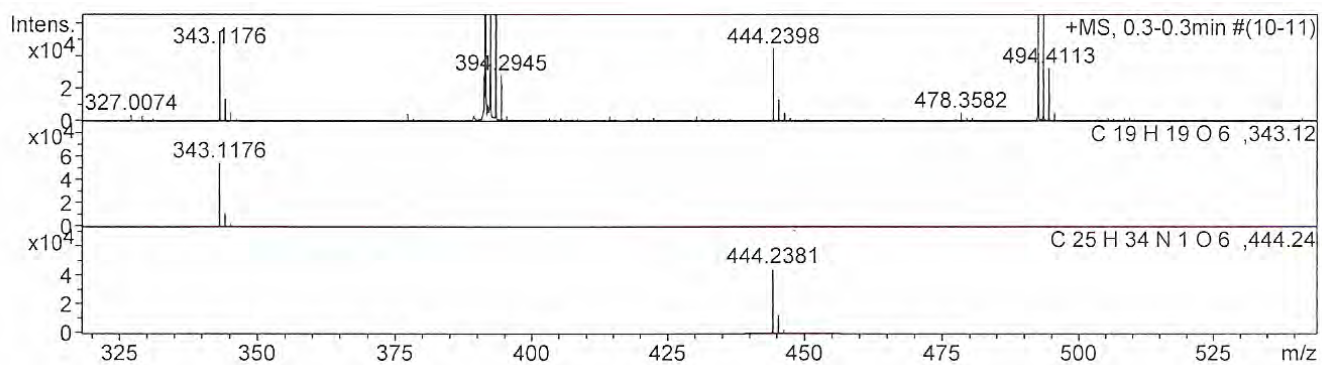




รูปที่ 20ค ¹H-NMR สเตปไตรั้มของสาร 3

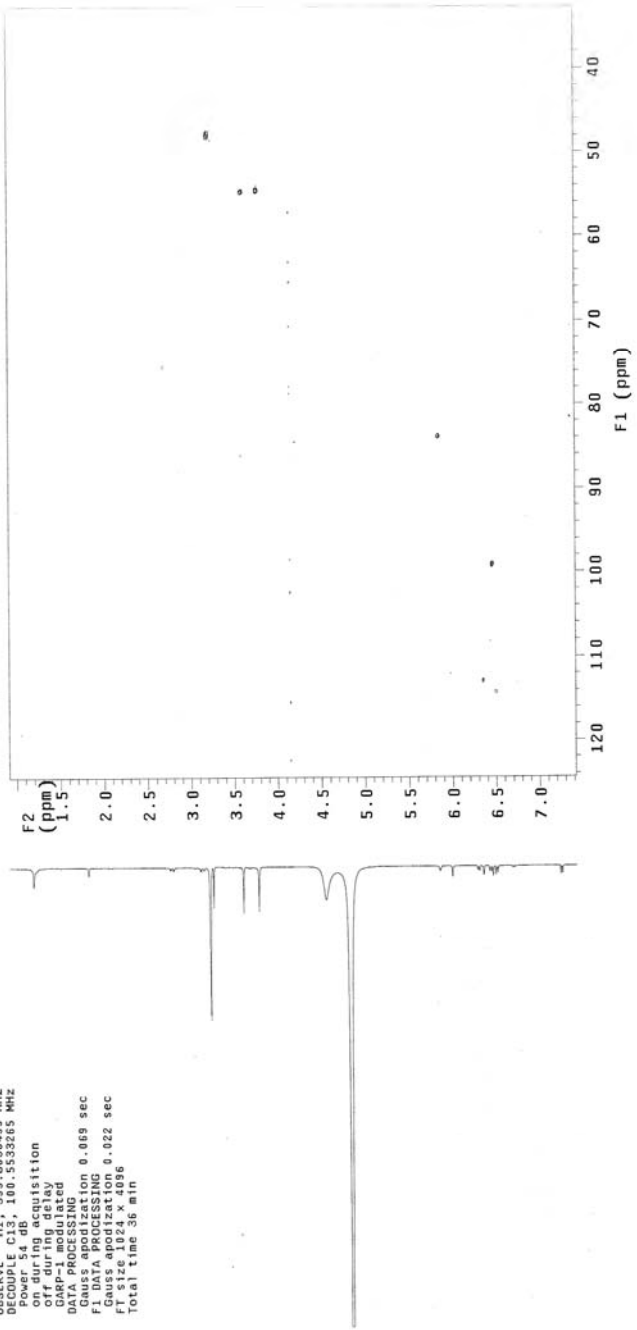


รูปที่ 21ค ¹³C-NMR สเปกตรัมของสาร 3



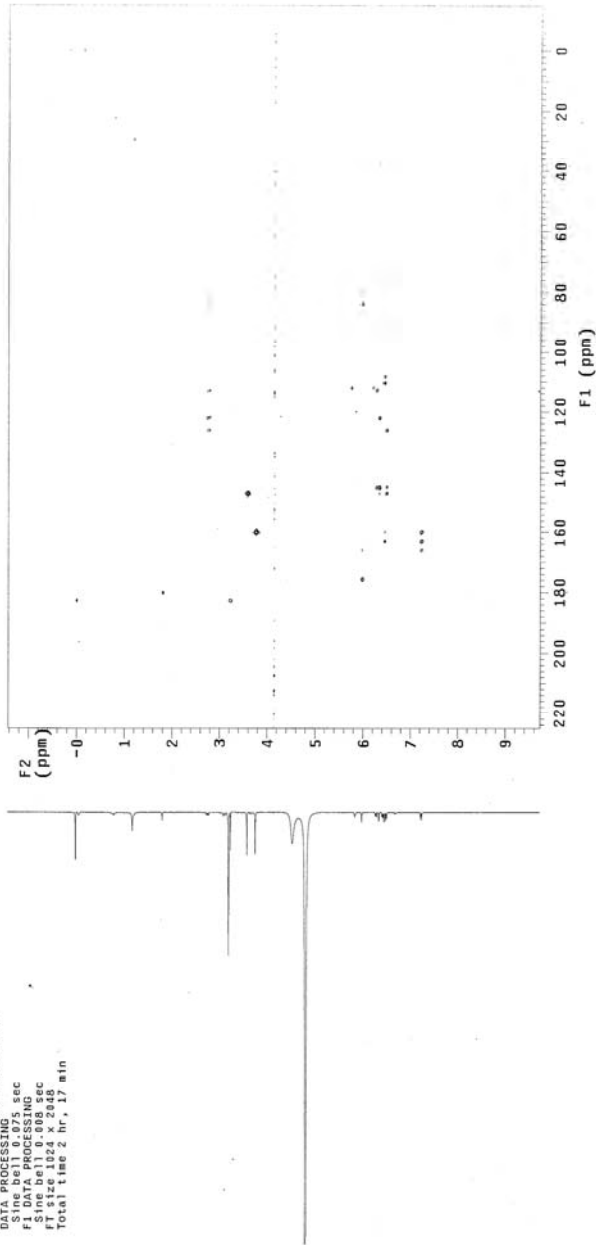
รูปที่ 22ค MS สเปกตรัมของสาร 3

A1
 Data Collected on:
 mrcrcr410-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cbuser/vnmrSYS/data
 Sample: 20160523
 File: gHSQC_01
 Pulse Sequence: gHSQC
 Solvent: CDCl3
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 4464.3 Hz
 ZF channel 91.0 Hz
 2 x 200 increments
 OBSERVE H1, 399.8636189 MHz
 DECOUPLE C13, 100.553265 MHz
 on during acquisition
 off during delay
 DARRP-PRACED-DELTA
 Gauss apodization 0.065 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.022 sec
 F1 time 0.1496
 Total time 36 min



รูปที่ 23ค HSQC สเปกตรัมของสาร 3

A1
 Data Collected on:
 spectrometer: spect
 Archive directory: /export/home/cpuser/vnmrSYS/data
 Sample directory: /export/home/cpuser/vnmrSYS/data
 File: gHMC_01
 Pulse sequence: gHMC
 Solvent: CD300
 Relax. delay: 1.000 sec
 Acq time: 0.150 sec
 Date_UTC: 20080807 10:00:00
 2D Width: 24154.0 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE: 1H
 OBSERVEF1: 500.136499 MHz
 DATA PROCESSING
 F2: 1H
 F1: 13C
 F2 range: 10.000 sec
 F1 range: 10.000 sec
 FT size: 1024 x 2048
 Total time: 2 hr, 17 min



รูปที่ 24ค HMC สเปกตรัมของสาร 3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวผกาวัลย์ มุสิกพงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กันยายน พ.ศ. 2519 ณ จังหวัดพัทลุง สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2541 และเข้าศึกษาต่อ ระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2548 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ระดับ 6 สังกัดคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย