

## พฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากหญ้าเกล็ดหอย

### Phytochemicals and Their Antibacterial Activity of *Lycopodium nummularifolium*

Blume

ศศิวิดี บุญญะอุทธยาน<sup>1\*</sup>, ณรงค์ศักดิ์ ชัยภัทรภัก<sup>1</sup>, นพพร ทศนา<sup>2</sup>, สมศักดิ์ รุจิรวัดมน<sup>2</sup>, นันทวรรณ ฤกษ์งาม<sup>2</sup> และ สุพรรณมา เตชะสกุล<sup>2</sup>  
Sasiwadee Boonya-udtayan<sup>1\*</sup>, Narongsak Chaiphattarakit<sup>1</sup>, Nopporn Thasana<sup>2</sup>, Somsak Ruchirawat<sup>2</sup>, Nanthawan Ruek-ngam<sup>2</sup> and Supanna Techasakul<sup>2</sup>

<sup>1</sup>โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2</sup>สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus,

Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup>Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok 10210, Thailand

\*Corresponding author; E-mail: faassdb@ku.ac.th

### บทคัดย่อ

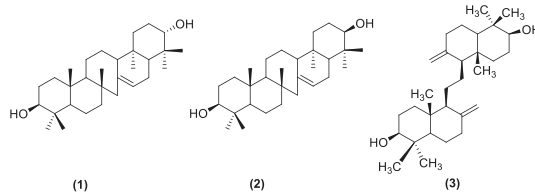
สารในกลุ่มเซอร่าทีน ไตรเทอร์ปีนอยด์ 2 ชนิด และ  $\alpha$ -onocerin แยกได้จากสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าเกล็ดหอย ซึ่งเป็นเฟิร์นในวงศ์ Lycopodiaceae โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้สามารถวิเคราะห์ได้เป็น serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (1), serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol (2) และ  $\alpha$ -onocerin (3) โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปีและการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยสารที่แยกได้นี้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเป็นครั้งแรก โดยพบว่า  $\alpha$ -onocerin (3) เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ในระดับกลาง

**คำสำคัญ:** หญ้าเกล็ดหอย เซอร์ราทีน ไตรเทอร์ปีนอยด์ เซอร์ราทีนไดออล แอลฟา-ออนโนเซอร์รีน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

### Abstract

Two serratene triterpenoids and  $\alpha$ -onocerin were isolated from the extract of the aerial parts of *Lycopodium nummularifolium* Blume, one of club mosses in Lycopodiaceae family. The chemical structures of the isolated compounds were identified as serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (1), serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol (2) and  $\alpha$ -onocerin (3) by using spectroscopic method and comparison with the previous literature. The antibacterial activity of these isolated triterpenoids was first time evaluated and only  $\alpha$ -onocerin showed moderate activity.





**Keywords:** *Lycopodium nummularifolium* Blume, Serratene triterpenoids, serratenediol,  $\alpha$ -onocerin, antibacterial activity

## บทนำ

ระย้าเกล็ดหอย หรือ ยมโดยเกล็ดหอย (*Lycopodium nummularifolium* Blume หรือ *Phlegmariurus nummularifolius* Blume) เป็นเฟิร์นชนิดหนึ่งในวงศ์ Lycopodiaceae ที่พบในประเทศไทย [1-2] จากการศึกษาพบว่าพืชในวงศ์ Lycopodiaceae หลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรค เช่น อาการพอกข้ำและปวดข้อ [3] พืชชนิดนี้เป็นแหล่งที่สำคัญของสารในกลุ่ม ไลโคโพลีเดียม อัลคาลอยด์ (*Lycopodium alkaloids*) [3-7] และ เซอราทีน ไตรเทอร์พีนอยด์ (Serratene triterpenoids) โดย เซอราทีน ไตรเทอร์พีนอยด์ มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงเชื่อมต่อกัน 5 วงโดยมีวง 7 เหลี่ยม 1 วง (วง C) และมีหมู่เมทิลชนิดตติยภูมิ 5-7 หมู่ ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (Figure 1)

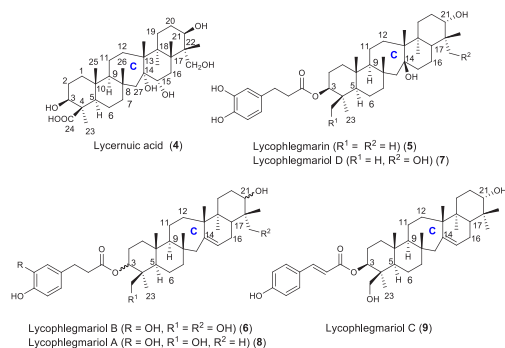


Figure 1. Biologically active serratene triterpenoids

สารในกลุ่ม Serratene triterpenoids หลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีหลายประการ ตัวอย่างเช่น Lycernuic acid C (4) ซึ่งแยกได้จาก *Lycopodium cernuum* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์โพธิเอส [8] นอกจากนี้ยังพบ Lycoplegmarin (5) [9] ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (Hepatoma cells BEL 7402) รว ม ไป ถึง Lycoplegmarol B (6) และ Lycoplegmarol D (7) ที่แยกได้จาก *Lycopodium phlegmaria* L. แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ MOLT-3 (Acute lymphoblastic leukemia) โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ที่ 14.7 และ 30  $\mu$ M ตามลำดับ [10]

จากคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีของสารที่แยกได้จากพืชในกลุ่ม Lycopodiaceae ดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาพิษฤๅษเคมีและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารที่แยกได้จากต้นระย้าเกล็ดหอย (*L. nummularifolium* Blume)

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 1. อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทร-มิเตอร์



(NMR) (ใช้ pyridine-d<sub>5</sub> หรือ CDCl<sub>3</sub> เป็นตัวทำละลาย) เครื่องแมสสเปกโทร-มิเตอร์ (MS) โดยใช้รูปแบบ atmospheric pressure chemical ionization (APCI) เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-light) ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) (ติดตามโดยการย้อมสีด้วย *p*-anisaldehyde stain และให้ความร้อน) ซิลิกาเจลสำหรับโครมาโทกราฟี และตัวทำละลายอินทรีย์ (กลั่นก่อนนำมาใช้)

## 2. การสกัดและการแยก (Extraction and isolation)

พืชสดส่วนเหนือดินของระย้าเกล็ดหอย (*L. nummularifolium* Blume) รวบรวมจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555 (พืชสมุนไพรเอกลักษณ์ของพืช โดย ดร.นพพร ทัศนาศนา, Voucher specimens หมายเลข CRI-Lnu-JJ-Oct 2012) น้ำหนัก 5.15 kg ถูกนำมาแช่ในสารละลายเมทานอล (20 L) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำสารสกัดเมทานอลระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยابน้ำหนัก 421.6 g นำมาเติม 3% สารละลายกรดทาร์ทาริกและเอทิลอะซิเตท จะเกิดการแยกชั้นระหว่างชั้นสารอินทรีย์และชั้นน้ำ สารในชั้นเอทิลอะซิเตทหรือชั้นสารอินทรีย์จะถูกแยกต่อโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี [10]

## 3. การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (Isolation and purification by chromatography)

สารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตทถูกแยกต่อและทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้

ซิลิกาเจล (Silica gel, 70 – 230 mesh) เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) และใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น Hexane/Ethyl acetate มีการเพิ่มขั้วตัวทำละลายอย่างต่อเนื่อง (Gradient elution) (Hexane : Ethylacetate ตั้งแต่ 100 : 0 จนถึง 0 : 100) ใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) ในการติดตามการแยกสาร โดยวัดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และใช้ *p*-anisaldehyde stain กรณีที่สารไม่ดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์โครงสร้างโดยเทคนิค สเปกโทรสโกปี (Spectroscopy technique) ได้แก่ Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR), Mass spectrometry (MS), Infrared spectroscopy (IR) รวมไปถึงวัดสมบัติทางกายภาพ (จุดหลอมเหลว)

## 4. การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นไปตามวิธีของ NCCLS [7] โดยใช้ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella Flexneri*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบสารตัวอย่างถูกทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0.39 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) [11-12]



## ผลการศึกษาและอภิปรายผล

สารสกัดหยาบที่ได้จากการแช่พืชสดตัวอย่าง ใน สารละลายเมทานอล เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (421.6 g) ถูกนำมาสกัด ด้วย 3% สารละลาย กรดทาร์ทริก และตัวละลายเอทิลอะซิเตท เพื่อแยก ส่วนที่เป็นไลโคโพลีเดียมอัลคาลอยด์ออก โดยสารที่ สนใจ ซึ่งได้แก่ serratene triterpenoids จะอยู่ในชั้น ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ทั้งนี้ได้สารสกัดหยาบในชั้น เอทิลอะซิเตท น้ำหนัก 167.11 g

สารสกัดจากชั้นเอทิลอะซิเตท (167.11 g) ถูก นำมาแยกต่อ และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โคร มาโทกราฟี (แบ่งสารสำหรับแยกประมาณ 10 g) และ ทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (EtOAc : hexane (5 - 100%)) ในครั้งแรกของการแยก ได้สารออกมาเป็น 3 ส่วนหลัก ได้แก่ A1, A2 และ A3 ในแต่ละส่วนถูกนำมาแยกต่อ โดย A1 ได้ส่วนย่อยอีก 12 ส่วน ได้แก่ A1B1 - A1B12 ส่วนของ A2 แยกได้ ส่วนย่อยอีก 2 ส่วน ได้แก่ A2B1-A2B2 และในส่วน A3 แยกได้อีก 9 ส่วน ได้แก่ A3B1 - A3B9 ตามลำดับ รวมทุกส่วนได้ทั้งหมด 23 ส่วน

สารที่แยกได้ ทั้ง 23 ส่วน (A1B1 - A1B12, A2B1-A2B2, และ A3B1 - A3B9) ถูกนำมาทำให้ บริสุทธิ์เพิ่มเติม (ได้ส่วนย่อยเป็นส่วน C, D, E, F ตามลำดับ) โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (EtOAc : hexane (5 - 100%)) สารที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ ถูกนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ พิสูจน์ เอกลักษณ์และวิเคราะห์โครงสร้าง โดยเทคนิคสเปก โทรสโกปี (Spectroscopy technique)

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและงานวิจัยก่อน หน้า [10, 13-14] สนับสนุนว่าสารใน ส่วนของ

A2B2C3D2E2, A2B2C3D4E2 และ A3B2C2D2 เป็น สาร Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (1) สารในส่วนย่อย A2B2C2D3E4 และ A2B2C3D1E3F5 เป็น สาร Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol (2) และ สารใน ส่วน A2B2C3D2E5, A2B2C3D4E1, A2B2C3D4E3 และ A2B2C3D5E3F2 พบว่าเป็นสาร  $\alpha$ -onocerin (3) ตามลำดับ (Figure 2)

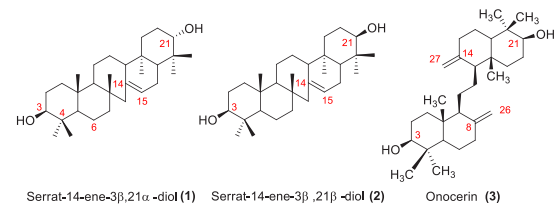


Figure 2. Isolated compounds from *Lycopodium nummularifolium* Blume

Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol หรือ 3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -serratenediol (1) มีลักษณะเป็นของแข็ง อสีนฐาน สีขาว (white amorphous solid) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 250-252 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล (HRMS) สำหรับสูตรโมเลกุล C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>2</sub> [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> เท่ากับ 460.4140 m/z สอดคล้องกับการคำนวณ ซึ่งได้เท่ากับ 460.4144 m/z สำหรับข้อมูล IR พบสัญญาณ หมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ 3377 cm<sup>-1</sup> สัญญาณพันธะคู่ (C=C) ที่ 1441 cm<sup>-1</sup> สำหรับข้อมูลทาง <sup>1</sup>H และ <sup>13</sup>C NMR พบว่าสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยรายงาน [10, 13] โดย <sup>1</sup>H NMR ปรากฏสัญญาณหมู่ เมทิล ทั้ง 7 หมู่ ที่  $\delta$  0.79 (s), 0.88 (s), 0.95 (s), 1.07 (s), 1.11 (s), 1.20 (s) and 1.25 (s) สัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง C-3 และ C-21 ปรากฏซ้อนกัน ให้สัญญาณเป็น มัลติเพลตที่  $\delta$  3.52 (m, 2CH) และ โปรตอนของ CH ที่ ตำแหน่ง C-15 (CH=) ปรากฏที่  $\delta$  5.48 (br s, 1H)



ในลักษณะเป็นสัญญาณกว้าง อย่างไรก็ตามไม่ปรากฏสัญญาณ -OH ของหมู่ไฮดรอกซี ในส่วนข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR ปรากฏสัญญาณ ครบทั้ง 30 คาร์บอน ซึ่งจากการใช้ข้อมูล Dept 135 ประกอบ พบว่า ประกอบไปด้วย หมู่ เมทิล ( $\text{CH}_3$ ) 7 สัญญาณ หมู่เมทิลีน ( $\text{CH}_2$ ) 10 สัญญาณ และเมโทน์ ( $\text{CH}$ ) 7 สัญญาณ (เป็นสัญญาณของตำแหน่งที่คาร์บอนเกาะกับออกซิเจน 2 สัญญาณ และ 1 สัญญาณที่เป็นของ  $\text{CH}=\text{}$ ) และ 6 สัญญาณที่เหลือเป็นสัญญาณของคาร์บอนชนิดควอเทอร์นารี (quarternary carbon) (Table 1)

Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol หรือ 3 $\beta$ ,21 $\beta$ -serratenediol (2) แยกออกมาได้ อยู่ในรูปของของแข็งอสัณฐาน สีขาว (white amorphous solid) มีจุดหลอมเหลวมากกว่า 300 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล (HRMS) สำหรับ  $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{NO}_2$  [ $\text{M} + \text{NH}_4$ ] $^+$  เท่ากับ 460.4155 m/z สอดคล้องกับการคำนวณ ซึ่งได้เท่ากับ 460.4144 m/z สำหรับ ข้อมูล IR พบสัญญาณไฮดรอกซี (-OH) ที่  $3490\text{ cm}^{-1}$ , สัญญาณพันธะคู่ ( $\text{C}=\text{C}$ ) ที่  $1449\text{ cm}^{-1}$  สำหรับ  $^1\text{H}$  NMR ใช้  $\text{CDCl}_3$  และ  $\text{CD}_3\text{OD}$  เป็นตัวทำละลาย (โดยใช้  $\text{CD}_3\text{OD}$  5 หยด) พบสัญญาณ หมู่เมทิล 7 สัญญาณที่  $\delta$  0.69 (s), 0.77 (s), 0.80 (s), 0.84 (s), 0.89 (s), 0.93 (s), 0.97 (s) สำหรับ สัญญาณของโปรตอนที่ C-3 และ C-21 ขึ้นที่  $\delta$  3.19 (dd,  $J = 11.1, 5.1\text{ Hz}$ , 1H) และที่  $\delta$  3.45 (br s, 1H) ซึ่งต่างจากสารหมายเลข 1 โดยพบว่าโปรตอนของสองตำแหน่งนี้ ปรากฏที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ต่างกัน สำหรับสัญญาณของ  $\text{CH}=\text{}$  ของ C-15 ปรากฏที่  $\delta$  5.32 (br s, 1H) สำหรับข้อมูล  $^{13}\text{C}$

NMR ปรากฏสัญญาณ ครบทั้ง 30 คาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลอ้างอิง (Table 1) [13] และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่า สาร 2 เป็น C-21 epimer ของสาร 1

$\alpha$ -onocerin (3) ที่แยกได้มีลักษณะสารเป็นของแข็ง อัสัณฐานสีขาว (white amorphous solid) จุดหลอมเหลว 222 – 224 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล (HRMS) สำหรับ  $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{NO}_2$  [ $\text{M} + \text{NH}_4$ ] $^+$  เท่ากับ 460.4140 m/z เท่ากับการคำนวณ ซึ่งได้เท่ากับ 460.4149 m/z สำหรับข้อมูล IR ปรากฏสัญญาณที่  $3361\text{ cm}^{-1}$  และ  $1467\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) และพันธะคู่ ( $\text{C}=\text{C}$ ) ตามลำดับ ในส่วนของ  $^1\text{H}$  NMR แสดงสัญญาณของหมู่เมทิล ที่  $\delta$  0.64 (สัญญาณที่ตำแหน่ง 25 และตำแหน่ง 28) ที่  $\delta$  0.76 (ตำแหน่ง 23 และ 29),  $\delta$  0.99 (ตำแหน่ง 24 และ 30) สำหรับ โปรตอนตำแหน่งที่เกาะกับออกซิเจน (ตำแหน่งที่ 3 และ 21) ปรากฏที่  $\delta$  3.25 (dd,  $J = 12, 3\text{ Hz}$ ) และโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน ที่ตำแหน่ง 26 และ 27 พบสัญญาณเป็นแบบซิงเกิลต์ ที่  $\delta$  4.56 (s) and 4.83 (s) สำหรับข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR แสดงสัญญาณเพียง 15 คาร์บอน ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูล HRMS แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลนี้ สมมาตร (Table 1) [14]



Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of isolated triterpenoids and  $\alpha$ -onocerin from *L. nummularifolium* Blume

Compounds <sup>1</sup>	Chemical shift (ppm)	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b> <sup>2, [10, 13]</sup>	0.79(s, 3H), 0.82(m, 2H), 0.88(s, 3H), 0.95(s, 3H), 1.07(s, 3H), 1.11(s, 3H), 1.16(m, 2H), 1.20(s, 3H), 1.25(s, 3H), 1.39(m, 2H), 1.50(m, 2H), 1.73(m, 2H), 1.77(m, 2H), 1.84(m, 2H), 1.90(m, 2H), 1.96(m, 2H), 1.98(m, 1H), 2.02(m, 1H), 2.08(m, 2H), 2.18(m, 1H), 2.33(m, 1H), 3.51(m, $J = 15.3, 6.0$ Hz, 1H), 3.61(br.s 1H), 5.48(br s, 1H)	13.7(CH <sub>3</sub> ), 15.4(CH <sub>3</sub> ), 16.0(CH <sub>3</sub> ), 16.3(CH <sub>3</sub> ), 19.3(CH <sub>2</sub> ), 20.1(CH <sub>3</sub> ), 24.6(CH <sub>2</sub> ), 25.5(CH <sub>2</sub> ), 27.5(CH <sub>2</sub> ), 28.2(CH <sub>3</sub> ), 28.4(CH <sub>2</sub> ), 28.5(CH <sub>2</sub> ), 28.7(CH <sub>3</sub> ), 36.4(quaternary C), 37.4(quaternary C), 37.5(CH <sub>2</sub> ), 38.4(quaternary C), 39.0(CH <sub>2</sub> ), 39.4(quaternary C), 39.6(quaternary C), 45.5(CH <sub>2</sub> ), 50.0(CH), 56.0(CH), 56.4(CH <sub>2</sub> ), 57.5(CH), 62.9(CH), 77.9(CH), 78.2(CH), 122.7(CH), 138.7(quaternary C)
<b>2</b> <sup>3, [13]</sup>	0.69(s, 3H), 0.77(s, 3H), 0.80(s, 3H), 0.84(s, 3H), 0.89(s, 3H), 0.93(s, 3H), 0.97(s, 3H), 1.09(m, 1H), 1.16(m, 1H), 1.21(m, 1H), 1.40(m, 2H), 1.47(m, 2H), 1.60(m, 2H), 1.63(m, 2H), 1.65(m, 2H), 1.72(m, 2H), 1.77(m, 2H), 1.85(m, 2H), 1.95(m, 2H), 2.02(m, 2H), 2.21(m, 1H), 3.19(dd, $J = 11.1, 5.1$ Hz, 1H), 3.45(br s, 1H), 5.32(br s, 1H)	13.3(CH <sub>3</sub> ), 15.4(CH <sub>3</sub> ), 15.7(CH <sub>3</sub> ), 18.9(CH <sub>2</sub> ), 19.8(CH <sub>3</sub> ), 21.8(CH <sub>3</sub> ), 24.0(CH <sub>2</sub> ), 25.2(CH <sub>2</sub> ), 25.4(CH <sub>2</sub> ), 27.2(CH <sub>2</sub> ), 27.5(CH <sub>2</sub> ), 27.7(CH <sub>3</sub> ), 28.1(CH <sub>3</sub> ), 31.2(CH <sub>2</sub> ), 35.9(quaternary C), 37.1(CH), 37.4(quaternary C), 38.2(quaternary C), 38.6(CH <sub>2</sub> ), 39.0(quaternary C), 43.4(CH), 45.2(CH <sub>2</sub> ), 55.7(CH), 56.2(CH <sub>2</sub> ), 56.8(CH), 62.9(CH), 76.2(CH), 78.8(CH), 122.1(CH), 138.5(quaternary C)
<b>3</b> <sup>3, [14]</sup>	0.64(s, 3H), 0.76(s, 3H), 0.84(m, 1H), 0.89(m, 1H), 0.99(s, 3H), 1.08(m, 1H), 1.19(m, 1H), 1.38(m, 1H), 1.44(m, 1H), 1.58(m, 1H), 1.63(m, 1H), 1.68(m, 1H), 1.72(m, 1H), 1.97(m, 1H), 2.39(m, 1H), 3.25(dd, $J = 11.7, 4.5$ Hz, 2H), 4.56(s, 1H), 4.83(s, 1H)	14.5(2CH <sub>3</sub> ), 15.4(2CH <sub>3</sub> ), 22.6(2CH <sub>2</sub> ), 24.1(2CH <sub>2</sub> ), 28.0(2CH <sub>2</sub> ), 28.3(2CH <sub>3</sub> ), 37.0(2CH <sub>2</sub> ), 38.3(2CH <sub>2</sub> ), 39.1(2quaternary C), 39.3(2quaternary C), 54.7(2CH), 57.6(2CH), 78.9(2CH), 106.7(2CH <sub>2</sub> ), 148.4(2quaternary C)

<sup>1</sup> วัดที่ความถี่ 300 และ 75 MHz สำหรับ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ตามลำดับ<sup>2</sup> ใช้ Pyridine- $d_5$  เป็นตัวทำละลาย, <sup>3</sup> ใช้  $\text{CDCl}_3$  และ  $\text{CD}_3\text{OD}$  (5 หยด) เป็นตัวทำละลาย

สารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (1), Serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol (2) และ  $\alpha$ -onocerin (3) ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) เนื่องจากพบว่าสารในกลุ่มนี้ยังไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาก่อน ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า  $\alpha$ -onocerin ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารอื่น ๆ ที่ทดสอบ โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 200  $\mu$ g/mL ต่อเชื้อ *E. Coli*, *S. typhimunium* และ *S. flexen* (แบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งต่างจากสารอื่นที่ทดสอบที่มีค่า MIC > 200  $\mu$ g/mL (Table 2)

Table 2. Antibacterial activity of isolated compounds (Minimum inhibitory concentration, MIC)

Compounds	Minimum inhibitory concentration ( $\mu$ g/mL)*				
	<i>E. Coli</i>	<i>S. typhimunium</i>	<i>S. flexen</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
1	>200	>200	>200	>200	>200
2	>200	>200	>200	>200	>200
3	200	200	200	>200	>200

\**E-Coli* = *Escherichai coli* (gram -), *B.cereus* = *Bacillus cereus* (gram +), *S. aureus* = *Staphylococcus aureus* (gram +), *S. typhimunium* = *Salmonella typhimunium* (gram -), *S. flexneri* = *Shigella flexneri* (gram -)

## สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี จากต้นระย้าเกล็ดหอย พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ serrat-14-ene- serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (1), serrat-14-ene-3 $\beta$ ,21 $\beta$ -diol (2) และ  $\alpha$ -onocerin (3) โดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่มีการรายงานพฤษเคมีและฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารในกลุ่มของ serratene triterpenoids (1-2) และ  $\alpha$ -onocerin (3) จากต้นระย้าเกล็ดหอย

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัย มก. จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รหัสโครงการ ร-ม. 31.57, ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี (ศสวท) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเวชสำอาง ตลอดจนทั้งคุณนิตรัตน์ ฉิมน้อย จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สำหรับข้อมูลทางด้านแมสสเปกตรัม

## เอกสารอ้างอิง

1. Tagawa, M. and K. Iwatsuki. 1967. Enumeration of Thai pteridophytes collected during 1965-66. *Southeast Asian Stud.* 5: 23-120.
2. Boonkerd, T., S. Chantanaorapint and W. Khwaiphan. 2008. Pteridophyte diversity in





- the tropical lowland rainforest of Khao Nan national park, Kakhon Si Thammarat province, Thailand. *Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ.* 8: 83-97.
3. Jayaweera. 1981. Medicinal Plants Used in Ceylon (Part III). *The National Science Council of Sri Lanka, Colombo.*
  4. Kitajima, M. and H. Takayama. 2012. *Lycopodium* Alkaloids: Isolation and Asymmetric Synthesis. *Top Curr Chem.* 309: 1-32.
  5. Hirasawa, Y., J. Kobayashi and H. Morita. 2009. The *Lycopodium* Alkaloids. *Heterocycles.* 77(2): 679-729.
  6. Ma, X., Gang, D. R. 2008. In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry.* 69:2022-2028.
  7. Ma, X. and D.R. Gang. 2004. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 21: 752-772.
  8. Zhang, Z., H.N. Elsohly, M.R. Jacob, D.S. Pasco, L.A. Walker and A.M. Clark. 2002. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Lycopodium cernuum*. *J. Nat. Prod.* 65(7): 979-985.
  9. Shi, H., Z. Li and Y. Guo. 2005. A new serratane-type triterpene from *Lycopodium phlegmaria*. *Nat. Prod. Res.* 19(8): 777-781.
  10. Wittayalai, S., S. Sathalalai, S. Thorroad, P. Worawittayanon, S. Ruchirawst and N. Thasana. 2012. Lycophlegmariols A-D: Cytotoxic serratene triterpenoids from the club moss *Lycopodium phlegmaria* L. *Phytochemistry.* 76: 117-123.
  11. Reuk-ngam, N., Chimnoi, N., Khunnawutmanotham, N., and Techasakul, S., 2014. Antimicrobial activity of Coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. *BioMed Research International.* 1-8.
  12. National Committee for Clinical Laboratory Standard. 2003. Method for Broth Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard, M7-A6, Wayne, Pa, USA.
  13. Fang, J.M., W.Y. Tsai and Y.S. Cheng. 1991. Serratene triterpenes from *Pinus armandii* Bark. *Phytochemistry* 30(4): 1333-1336.
  14. Pauli, G.F. 2000. Comprehensive spectroscopic investigation of  $\alpha$ -onocerin. *Planta Med.* 66: 299-302.

