

พฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากหญ้าเกล็ดหอย

Phytochemicals and Their Antibacterial Activity of *Lycopodium nummularifolium*

Blume

ศศิวิดี บุญญะอุทธยาน^{1*}, ณรงค์ศักดิ์ ชัยภัทรกิจ¹, นพพร ทศนา², สมศักดิ์ รุจิรวัดมน², นันทวรรณ ฤกษ์งาม² และ สุพรรณมา เตชะสกุล²
Sasiwadee Boonya-udtayan^{1*}, Narongsak Chaiphattarakit¹, Nopporn Thasana², Somsak Ruchirawat², Nanthawan Ruek-ngam² and Supanna Techasakul²

¹โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

¹Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok 10210, Thailand

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

บทคัดย่อ

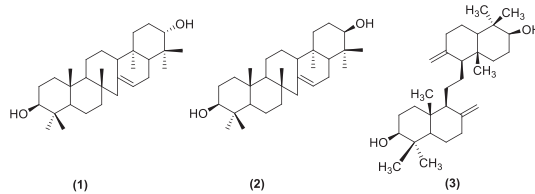
สารในกลุ่มเซอร่าทีน ไตรเทอร์ปีนอยด์ 2 ชนิด และ α -onocerin แยกได้จากสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นหญ้าเกล็ดหอย ซึ่งเป็นเฟิร์นในวงศ์ Lycopodiaceae โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้สามารถวิเคราะห์ได้เป็น serrat-14-ene-3 β ,21 α -diol (1), serrat-14-ene-3 β ,21 β -diol (2) และ α -onocerin (3) โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปีและการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้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

คำสำคัญ: หญ้าเกล็ดหอย เซอร์ราทีน ไตรเทอร์ปีนอยด์ เซอร์ราทีนไดออล แอลฟา-ออนโนเซอร์รีน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Abstract

Two serratene triterpenoids and α -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 β ,21 α -diol (1), serrat-14-ene-3 β ,21 β -diol (2) and α -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 α -onocerin showed moderate activity.





Keywords: *Lycopodium nummularifolium* Blume, Serratene triterpenoids, serratenediol, α -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 วง โดยมีวง 7 เหลี่ยม 1 วง (วง C) และมีหมู่เมทิลชนิดตติยภูมิ 5-7 หมู่ ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (Figure 1)

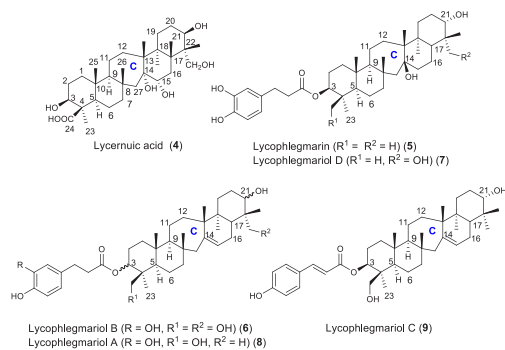


Figure 1. Biologically active serratene triterpenoids

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 μ M ตามลำดับ [10]

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

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทร-มิเตอร์



(NMR) (ใช้ pyridine-d₅ หรือ CDCl₃ 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 (พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช 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) (¹H and ¹³C-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 β ,21 α -diol (1) สารในส่วนย่อย A2B2C2D3E4 และ A2B2C3D1E3F5 เป็น สาร Serrat-14-ene-3 β ,21 β -diol (2) และ สารในส่วน A2B2C3D2E5, A2B2C3D4E1, A2B2C3D4E3 และ A2B2C3D5E3F2 พบว่าเป็นสาร α -onocerin (3) ตามลำดับ (Figure 2)

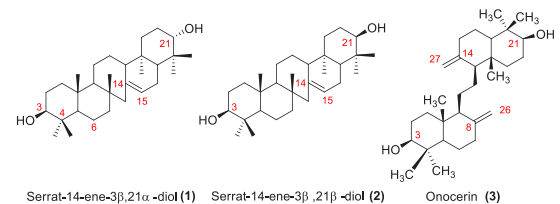


Figure 2. Isolated compounds from *Lycopodium nummularifolium* Blume

Serrat-14-ene-3 β ,21 α -diol หรือ 3 β ,21 α -serratenediol (1) มีลักษณะเป็นของแข็ง ขสัณฐาน สีขาว (white amorphous solid) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 250-252 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล (HRMS) สำหรับสูตรโมเลกุล C₃₀H₅₄NO₂ [M + NH₄]⁺ เท่ากับ 460.4140 m/z สอดคล้องกับการคำนวณ ซึ่งได้ เท่ากับ 460.4144 m/z สำหรับข้อมูล IR พบสัญญาณ หมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ 3377 cm⁻¹ สัญญาณพันธะคู่ (C=C) ที่ 1441 cm⁻¹ สำหรับข้อมูลทาง ¹H และ ¹³C NMR พบว่าสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยรายงาน [10, 13] โดย ¹H NMR ปรากฏสัญญาณหมู่ เมทิล ทั้ง 7 หมู่ ที่ δ 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 δ 3.52 (m, 2CH) และ โปรตอนของ CH ที่ ตำแหน่ง C-15 (CH=) ปรากฏที่ δ 5.48 (br s, 1H)



ในลักษณะเป็นสัญญาณกว้าง อย่างไรก็ตามไม่ปรากฏสัญญาณ -OH ของหมู่ไฮดรอกซี ในส่วนข้อมูล ^{13}C NMR ปรากฏสัญญาณ ครบทั้ง 30 คาร์บอน ซึ่งจากการใช้ข้อมูล Dept 135 ประกอบ พบว่า ประกอบไปด้วย หมู่ เมทิล (CH_3) 7 สัญญาณ หมู่เมทิลีน (CH_2) 10 สัญญาณ และเมโทน์ (CH) 7 สัญญาณ (เป็นสัญญาณของตำแหน่งที่คาร์บอนเกาะกับออกซิเจน 2 สัญญาณ และ 1 สัญญาณที่เป็นของ $\text{CH}=\text{}$) และ 6 สัญญาณที่เหลือเป็นสัญญาณของคาร์บอนชนิดควอเทอร์นารี (quarternary carbon) (Table 1)

Serrat-14-ene-3 β ,21 β -diol หรือ 3 β ,21 β -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 cm^{-1} , สัญญาณพันธะคู่ ($\text{C}=\text{C}$) ที่ 1449 cm^{-1} สำหรับ ^1H NMR ใช้ CDCl_3 และ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย (โดยใช้ CD_3OD 5 หยด) พบสัญญาณ หมู่เมทิล 7 สัญญาณที่ δ 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 δ 3.19 (dd, $J = 11.1, 5.1\text{ Hz}$, 1H) และที่ δ 3.45 (br s, 1H) ซึ่งต่างจากสารหมายเลข 1 โดยพบว่าโปรตอนของสองตำแหน่งนี้ ปรากฏที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ต่างกัน สำหรับสัญญาณของ $\text{CH}=\text{}$ ของ C-15 ปรากฏที่ δ 5.32 (br s, 1H) สำหรับข้อมูล ^{13}C

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

α -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 cm^{-1} และ 1467 cm^{-1} ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) และพันธะคู่ ($\text{C}=\text{C}$) ตามลำดับ ในส่วนของ ^1H NMR แสดงสัญญาณของหมู่เมทิล ที่ δ 0.64 (สัญญาณที่ตำแหน่ง 25 และตำแหน่ง 28) ที่ δ 0.76 (ตำแหน่ง 23 และ 29), δ 0.99 (ตำแหน่ง 24 และ 30) สำหรับ โปรตอนตำแหน่งที่เกาะกับออกซิเจน (ตำแหน่งที่ 3 และ 21) ปรากฏที่ δ 3.25 (dd, $J = 12, 3\text{ Hz}$) และโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน ที่ตำแหน่ง 26 และ 27 พบสัญญาณเป็นแบบซิงเกิลต์ ที่ δ 4.56 (s) and 4.83 (s) สำหรับข้อมูล ^{13}C NMR แสดงสัญญาณเพียง 15 คาร์บอน ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูล HRMS แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลนี้ สมมาตร (Table 1) [14]



Table 1. ¹H and ¹³C NMR of isolated triterpenoids and α-onocerin from *L. nummularifolium* Blume

Compounds ¹	Chemical shift (ppm)	
	δ _H	δ _C
1 ^{2, [10, 13]}	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, <i>J</i> = 15.3, 6.0 Hz, 1H), 3.61(br.s 1H), 5.48(br s, 1H)	13.7(CH ₃), 15.4(CH ₃), 16.0(CH ₃), 16.3(CH ₃), 19.3(CH ₂), 20.1(CH ₃), 24.6(CH ₂), 25.5(CH ₂), 27.5(CH ₂), 28.2(CH ₃), 28.4(CH ₂), 28.5(CH ₂), 28.7(CH ₃), 36.4(quaternary C), 37.4(quaternary C), 37.5(CH ₂), 38.4(quaternary C), 39.0(CH ₂), 39.4(quaternary C), 39.6(quaternary C), 45.5(CH ₂), 50.0(CH), 56.0(CH), 56.4(CH ₂), 57.5(CH), 62.9(CH), 77.9(CH), 78.2(CH), 122.7(CH), 138.7(quaternary C)
2 ^{3, [13]}	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, <i>J</i> = 11.1, 5.1 Hz, 1H), 3.45(br s, 1H), 5.32(br s, 1H)	13.3(CH ₃), 15.4(CH ₃), 15.7(CH ₃), 18.9(CH ₂), 19.8(CH ₃), 21.8(CH ₃), 24.0(CH ₂), 25.2(CH ₂), 25.4(CH ₂), 27.2(CH ₂), 27.5(CH ₂), 27.7(CH ₃), 28.1(CH ₃), 31.2(CH ₂), 35.9(quaternary C), 37.1(CH), 37.4(quaternary C), 38.2(quaternary C), 38.6(CH ₂), 39.0(quaternary C), 43.4(CH), 45.2(CH ₂), 55.7(CH), 56.2(CH ₂), 56.8(CH), 62.9(CH), 76.2(CH), 78.8(CH), 122.1(CH), 138.5(quaternary C)
3 ^{3, [14]}	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, <i>J</i> = 11.7, 4.5 Hz, 2H), 4.56(s, 1H), 4.83(s, 1H)	14.5(2CH ₃), 15.4(2CH ₃), 22.6(2CH ₂), 24.1(2CH ₂), 28.0(2CH ₂), 28.3(2CH ₃), 37.0(2CH ₂), 38.3(2CH ₂), 39.1(2quaternary C), 39.3(2quaternary C), 54.7(2CH), 57.6(2CH), 78.9(2CH), 106.7(2CH ₂), 148.4(2quaternary C)

¹ วัดที่ความถี่ 300 และ 75 MHz สำหรับ ¹H และ ¹³C NMR ตามลำดับ

² ใช้ Pyridine-*d*₅ เป็นตัวทำละลาย, ³ ใช้ CDCl₃ และ CD₃OD (5 หยด) เป็นตัวทำละลาย



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

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

Compounds	Minimum inhibitory concentration (μ 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 β ,21 α -diol (1), serrat-14-ene-3 β ,21 β -diol (2) และ α -onocerin (3) โดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่มีการรายงานพฤษเคมีและฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารในกลุ่มของ serratene triterpenoids (1-2) และ α -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 α -onocerin. *Planta Med.* 66: 299-302.

