ว.วิทย. มข. 43(3) 480-489 (2558) KKU Sci. J. 43(3) 480-489 (2015)

ไตรเทอร์ปีนชนิด lupane และ ceanothane จากเปลือกต้นตะครองที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*

Lupane- and Ceanothane-Type Triterpenes from Stem Barks of *Ziziphus cambodiana* Pierre with Anti-*Helicobacter pylori* Activity

อัจฉรา แสนคำ[1] *ณัฏฐกัลย์ ลมเชย*[1] *จันทร์นรินทร์ นนทะขาม*[3]
มาลัย ทวีโชติภัทร์[2] *และ* *สุนิตย์ สุขสำราญ*[1*]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นตะครอง (*Ziziphus cambodiana* Pierre) สามารถแยกไตรเทอร์ปีนที่มีรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สาร และอนุพันธ์ของฟีโนลิกที่มีรายงานโครงสร้างแล้ว 1 สาร คือ lupeol (**1**) betulin (**2**) betulinic acid (**3**) ceanothic acid (**4**) และ *p*-hydroxybenzoic acid (**5**) การพิสูจน์โครงสร้างของสารได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีโดยใช้เทคนิค NMR เป็นส่วนใหญ่และโดยการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานไว้แล้ว เมื่อนำสารที่แยกได้ในปริมาณมากไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่า ceanothic acid (**4**) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* DMST20165 ดีที่สุด ที่ MIC 16.03 ไมโครโมลาร์ ซึ่งดีกว่ายา amoxicillin 2.6 เท่า และมีฤทธิ์อย่างอ่อนต่อเชื้อ *H. pylori* HP40 ที่ MIC 64.22 ไมโครโมลาร์ รายงานนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ของไตรเทอร์ปีนชนิด lupane และ ceanothane

[1]ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[3]กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400
*Corresponding Author, E-mail: sunit@swu.ac.th

ABSTRACT

From the stem barks of *Ziziphus cambodiana* Pierre, four known triterpenes and one known phenolic derivative were isolated and identified as lupeol (**1**), belulin (**2**), betulinic acid (**3**), ceanothic acid (**4**) and *p*-hydroxybenzoic acid (**5**). Their structures were mainly elucidated by NMR data analysis and by comparison of their spectroscopic data with the reported values. In addition, evaluation for antibacterial activity against *H. pylori* of the major isolated compounds was also investigated. The results from Broth micro dilution method showed that ceanothic acid (**4**) exhibited highest inhibitory activity against *H. pylori* DMST20165 with MIC value of 16.03 μM, which was approximately 2.6 times greater than that of the standard drug amoxicillin, but displayed weak inhibitory activity against *H. pylori* HP40 with MIC value of 64.22 μM. This is the first report of the antibacterial activity against *H. pylori* of lupane- and ceanothane-type triterpenes.

คำสำคัญ: ตะครอง ไตรเทอร์ปีนชนิด lupane และ ceanothane *Helicobacter pylori*

Keywords: *Ziziphus cambodiana*, lupane- and ceanothane-type triterpenes, *Helicobacter pylori*

บทนำ

ตะครองมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ziziphus cambodiana* Pierre อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae เป็นไม้ยืนต้นแบบไม้พุ่มรอเลื้อย มีหนามและดอกเล็ก ๆ ดอกมีสีเขียวโดยเกิดระหว่างก้านใบกับกิ่ง ลักษณะเป็นช่อที่มีแกนใหญ่แกนเดียว ส่วนใหญ่เป็นดอกที่มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน กลีบเลี้ยงของดอกมี 4-5 กลีบ มีผลทรงกลมสีเขียว พืชในสกุล *Ziziphus* มี 58 ชนิด พบในเขตร้อน (Bhattacharyya and Johri, 1998) ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้ 9 หรือ 10 ชนิด (เต็ม, 2544) ได้แก่ พุทราใบเหลี่ยม (*Z. angustifolia* (Miq.) Hatus. Ex Steenis) กำลังเสือโคร่ง (*Z. attopoensis* Pierre) ชินชี่ หรือ ดันรอก หรือ น้าม (*Z. calophylla* Wall.) ตาฉู่แม (*Z. incurve* Roxb.) พุทราจีน (*Z. jujuba* Mill.) พุทรา (*Z. mauritiana* Lam. หรือ *Z. jujube* Lam.) เล็บเหยี่ยว (*Z. oenoplia* Mill. var. *oenoplia*) เล็บแมว (*Z. brunonnaia* Clarke ex Brandis หรือ *Z. oenoplia* Mill. var. *brunoniana* Tardieu) ตะครอง หรือ หนามคอม หรือ หมากกะทันช้าง (*Z. cambodiana* Pierre) และ มะควัด หรือ อ้อยช้าง (*Z. rugosa* Lam.)

พืชในสกุล *Ziziphus* มีรายงานการใช้เป็นยาสมุนไพร ในประเทศจีนใช้เมล็ดพุทราจีนเป็นยากล่อมประสาท (Cheng et al., 2000) รวมทั้งสารเปปไทด์ที่แยกได้จากผลพุทราจีนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase (Zare-Zardini et al., 2013) นอกจากนี้สารสกัดจากผล *Z. spinachristi* มีฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาท (Waggas and Al-Hasani, 2009) ใช้ใบรักษาแผล รักษาโรคปอด โรคเกี่ยวกับตับ โรคหอบหืด และลดไข้ ส่วนรากใช้ป้องกันการเกิดโรคผิวหนัง และรักษาการปวดท้อง (Adzu et al., 2001; Michel, 2002) ใบของพุทราใช้รักษาโรคตับ โรคหอบหืด และลดไข้ ส่วนรากใช้รักษาบาดแผล และใช้ผลสุก

เป็นยาระบายอ่อน ๆ (Dahiru et al., 2006) ทางการแพทย์อินเดียใช้ต้นมะควัดรักษาโรคท้องร่วง ปวดประจำเดือนและโรคฟัน (Acharya et al., 1988) ในประเทศไทยใช้ส่วนรากและเปลือกต้นของเล็บเหยี่ยวต้มดื่มขับระดูขาว ขับปัสสาวะ แก้มดลูกพิการ แก้ฝีในมดลูกและเบาหวาน ส่วนผลใช้แก้ฝีประคำร้อย (นันทวันและอรนุช, 2542) ในกัมพูชาใช้ลำต้นตะครองแก้ไข้ (Hout et al., 2006)

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบตะครอง พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ quercitrin, isoquercitrin และ quercitrin 3-*O*-*D*-arabinosyl-(1→2)-α-L-rhamnoside มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์นิวรามินิเดส (Li et al., 2007) และในส่วนใบพบสารกลุ่มไตรเทอร์ปีน betulinic acid, alphitolic acid และ colubrinic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง (Arai et al., 2008) กลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาส่วนเปลือกรากพบไตรเทอร์ปีนชนิด lupane และ ceanothane ได้แก่ 3-*O*-vanillylceanothic acid, betulinic acid, alphitolic acid, lupeol, betulinaldehyde, 2-*O*-*E*-*p*-coumaroyl-alphitolic acid, zizyberanalic acid, ceanothic acid และ zizyberenalic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียและเชื้อวัณโรค (Suksamrarn et al., 2006) ไตรเทอร์ปีนดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบได้แก่ *Staphylococcus aureus, S. epidermidis*, *Bacillus pumilus, B. subtilis*, *Escherichia coli, Proteus vulgaris, P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Ochrobactrum anthropi* (Ghosh et al., 2011; Ji et al. 2012; Leal et al., 2010; Rambabu et al., 2011; Chue et al., 2011) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ของสารไตรเทอร์ปีนเหล่านี้

H. pylori เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหาร และโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Chey and Wong, 2007) มีรายงานการพบเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหารของประชากรโลกมากถึง 50 % (Correa and Piazuelo, 2008) และพบได้ในเกือบทุกประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนาพบการติดเชื้อ *H. pylori* สูงถึง 80% ในขณะที่ประเทศพัฒนาแล้วพบการติดเชื้อ 40% (Salih, 2009; Kusters et al., 2006; Perez-Perez et al., 2004) ในประเทศไทยพบการติดเชื้อ *H. pylori* สูงถึง 57% (Deankanob et al., 2006) ในการรักษาซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง (Wang and Huang, 2005) ดังนั้นการเลือกใช้พืชสมุนไพร สารสกัดและ/หรือสารบริสุทธิ์จากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาโรค

การทดลอง

ใช้เปลือกต้นตะครองแห้ง เก็บจาก จ.บุรีรัมย์ เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 และทำการเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้เป็นหลักฐาน (นภาพร, 2001) สถานที่เก็บตัวอย่างพืชแห้ง เก็บไว้ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วิธีการสกัดสารและแยกสาร

นำเปลือกต้นตะครองแห้งที่บดละเอียด (4.7 กก.) มาสกัดด้วย EtOAc (3 ครั้ง ครั้งละ 20 ลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง แต่ละครั้งนาน 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมากรองแยกกากออก สารละลายที่ได้นำไปประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งได้สารสกัดชั้น EtOAc (57.0 กรัม) ส่วนกากนำมาสกัดต่อด้วย MeOH (3 ครั้ง ครั้งละ 20 ลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง แต่ละครั้งนาน 1 สัปดาห์ จากนั้น

นำมากรองแยกกากออก สารละลายที่ได้นำไปประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งได้สารสกัดชั้น MeOH (485.3 กรัม) แบ่งส่วนสกัดชั้น EtOAc (52.6 กรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (CC) ชนิดเร็ว (ใช้ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค 0.040-0.063 มม. ใช้ระบบชะเริ่มต้นด้วย hexane และเพิ่มความเป็นขั้วด้วย CH_2Cl_2, EtOAc และ MeOH) แต่ละส่วนที่เก็บได้รวมให้เป็นกลุ่ม ๆ จากการตรวจสอบด้วย TLC ได้สารกลุ่มหลัก 6 กลุ่ม เมื่อนำสารกลุ่ม 2 (26.6 กรัม) มาแยกต่อด้วย CC (ซิลิกาเจลขนาด 0.040-0.063 มม. ชะด้วย hexane, hexane-CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-MeOH และ MeOH) ได้สาร 7 กลุ่มย่อย (2A-2G) นำสารกลุ่มย่อย 2D (11.9 กรัม) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC อีก 2 ครั้ง ใช้ระบบชะเช่นเดิม ได้สาร 4 กลุ่มย่อย (2D1-2D4) หลังจากนั้นนำสารกลุ่มย่อย 2D1 (3.2 กรัม) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC อีก 2 ครั้ง (ซิลิกาเจลขนาด 0.040-0.063 มม. ชะด้วย hexane, hexane-EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH) ได้สาร 8 กลุ่มย่อย (2D1.1-2D1.8) สารกลุ่มย่อย 2D1.8 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสีพิสูจน์ได้ว่าเป็น betulinic acid (**3**) (0.5 กรัม หรือคิดเป็น 0.01 % ของน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อนำสารกลุ่มย่อย 2D2 (6.8 กรัม) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC อีก 2 ครั้ง (ซิลิกาเจลขนาด 0.040-0.063 มม. ชะด้วย CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH) ได้สาร 7 กลุ่มย่อย (2D2.1-2D2.7) เมื่อนำสารกลุ่มย่อย 2D2.3 (734.3 มก.) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC อีก 2 ครั้ง ใช้ระบบชะเช่นเดิม ได้สาร 6 กลุ่มย่อย (2D2.3.1-2D2.3.6) สารกลุ่มย่อย 2D2.3.3 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี พิสูจน์ได้ว่าเป็น betulin (**2**) (1 มก. หรือคิดเป็น 2×10^{-5} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อนำสารกลุ่มย่อย 2D2.5 (168.4 มก.) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC อีก 3 ครั้ง (ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มม. ชะด้วยระบบชะเช่นเดิม) ได้สาร 3 กลุ่ม (2D2.5.1-2D2.5.3) สารกลุ่มย่อย 2D2.5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี พิสูจน์ได้ว่าเป็น lupeol (**1**) (6.0 มก. หรือคิดเป็น 1.2×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) หลังจากนั้นนำกลุ่มย่อย 2D2.5.2 (30.1 มก.) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 ใช้ระบบชะ MeOH-CH_2Cl_2 (7:3) ได้สาร 4 กลุ่มย่อย (2D2.5.2.1-2D2.5.2.4) สารกลุ่มย่อย 2D2.5.2.2 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี (25.0 มก. หรือคิดเป็น 5.3×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) พิสูจน์ได้ว่าเป็น ceanothic acid (**4**) และกลุ่มย่อย 2D2.5.2.3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวอมเหลือง (1.5 มก. คิดเป็น 3×10^{-5} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) พิสูจน์ได้ว่าเป็น *p*-hydroxybenzoic acid (**5**) สำหรับสารสกัดชั้น MeOH (485.3 กรัม) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ไม่พบว่าให้สีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent จึงไม่ได้ทำการแยกต่อ

lupeol (**1**) (6.0 มก.): ของแข็งไม่มีสี mp 198-200°C, R_f 0.86 (30% EtOAc-hexane) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ในเทคนิค TLC ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ_H 4.68 และ 4.56 (2×1H, 2×br s, H-29), 3.19 (1H, dd, J = 10.8 Hz, 5.5 Hz, H-3), 2.36 (1H, dt, J = 11.1 Hz, 5.5 Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24), 0.68 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-5) ^{13}C-NMR (CDCl3, 75 MHz): δ_C 109.0 (C-29), 79.0 (C-3), 55.2 (C-5), 48.0 (C-19), 28.0 (C-23), 27.7 (C-27), 19.5 (C-30), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 15.5 (C-24) และ 14.8 (C-27)

betulin (**2**) (1.0 มก.): ของแข็งไม่มีสี mp 236-237 °C, R_f 0.84 (30% EtOAc-hexane) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ในเทคนิค

TLC ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ_H 4.65 และ 4.55 (2×1H, 2×br s, H-29), 3.77 และ 3.30 (2H, d, *J* = 10.4 Hz, H-28), 3.16 (1H, dd, *J* = 10.5 Hz, 4.6 Hz, H-3), 2.34 (1H, m, H-19), 1.65 (3H, s, H-30), 0.99 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-23), 0.79 (3H, s, H-25), 0.74 (3H, s, H-27), 0.65 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5) ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ_C 109.6 (C-29), 78.9 (C-3), 60.5 (C-28), 55.2 (C-5), 48.7 (C-19), 27.9 (C-23), 16.0 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24) และ 14.6 (C-27)

betulinic acid (**3**) (0.5 กรัม): ของแข็งไม่มีสี mp 280-282°C, R_f 0.76 (30% EtOAc-hexane) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ในเทคนิค TLC ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ_H 4.73 และ 4.60 (2×1H, 2×br s, H-29), 3.19 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.6 Hz, H-3), 2.99 (1H, m, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 0.97 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-24), 0.68 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-5) ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ_C 179.1 (C-28), 109.3 (C-29), 78.7 (C-3), 55.2 (C-5), 48.8 (C-19), 27.7 (C-27), 15.9 (C-25), 15.7 (C-26), 15.1 (C-24) และ 14.5 (C-27)

ceanothic acid (**4**) (25.0 มก.): ของแข็งไม่มีสี mp 327-330°C, R_f 0.48 (30% EtOAc-hexane) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ในเทคนิค TLC ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ_H 4.70 และ 4.57 (2×1H, 2×br s, H-29), 4.14 (1H, s, H-3), 2.91 (1H, m, H-19), 2.52 (1H, s, H-1), 2.22 (1H, m, H-13), 1.66 (3H, s, H-30), 1.51 (1H, m, H-18), 1.10 (3H, s, H-23), 1.07 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-27) ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ_C 109.2 (C-29), 84.6 (C-3), 65.4 (C-1), 49.0 (C-18), 46.8 (C-19), 38.5 (C-13), 30.7 (C-23), 19.1 (C-24), 18.9 (C-30), 18.5 (C-25), 16.2 (C-26) และ 14.5 (C-27)

***p*-hydroxybenzoic acid** (**5**) (1.5 มก.): ของแข็งสีขาวอมเหลือง mp 280-282°C, R_f 0.30 (30% EtOAc-Hexane) ไม่ให้สีกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ในเทคนิค TLC ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ_H 7.93 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3 และ H-3′), 6.85 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-4 และ H-4′) ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ_C 169.0 (C-1), 161.4 (C-5), 132.1 (C-3 และ C-3′), 121.5 (C-2), 115.0 (C-4 และ C-4′)

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *H. pylori*

เชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* สายพันธุ์ HP40 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคลินิกของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดย ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนสายพันธุ์ DMST20165 ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว brain heart infusion agar (BHI) (Hi-Media) ที่มี 10% horse serum (GIBCO invitrogen) ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะมีปริมาณออกซิเจนน้อย เป็นเวลา 4 วัน (microaerobic conditions: 5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) โดยใช้ micro-aerobic Gas Pak (Mitsubishi) แล้วนำมาปรับความขุ่นด้วยอาหารเหลวโดยเทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 เพื่อให้เชื้อมีปริมาณ 1.5×10^{8} CFU/mL แล้วทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียเพื่อให้เชื้อมีปริมาณความเข้มข้นประมาณ

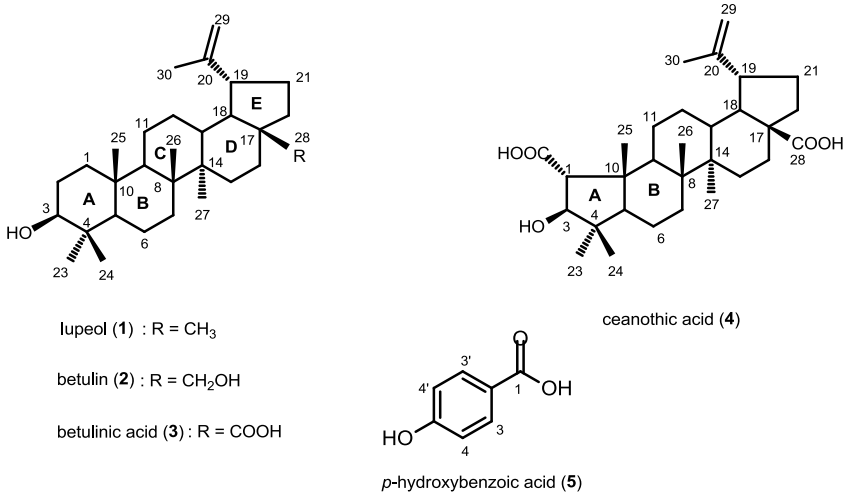
0.5×10^6 CFU/mL การทดสอบฤทธิ์ใช้วิธี Broth micro dilution (NCCLS, 1997; Wangchuk et al., 2011) เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียเทียบกับยาปฏิชีวนะ โดยนำสารตัวอย่างละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck) และเจือจางด้วยอาหารแบบลำดับสอง (serial two fold dilutions) ที่ผสม 10% horse serum แล้วเติมลงในถาดปลอดเชื้อ 96-well plate โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้วลงในสารตัวอย่างเจือจางแล้วในปริมาตรที่เท่ากัน (50 ไมโครกรัม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) โดยดูจากความขุ่นของอาหารเหลวทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) ใช้ยาปฏิชีวนะ amoxicillin (องค์การเภสัชกรรมประเทศไทย) เป็นสารควบคุม (positive control)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อนำสารสกัดชั้น EtOAc และชั้น MeOH ของเปลือกต้นตะครองมาตรวจสอบองค์ประกอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดชั้น EtOAc ปรากฏเป็นสีม่วงกับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ซึ่งแสดงถึงการมีสารไตรเทอร์ปีนในสารสกัด ส่วนสารสกัดชั้น MeOH ไม่พบสารไตรเทอร์ปีนจึงไม่ได้ทำการแยกต่อ เมื่อใช้เทคนิค CC แยกสารสกัดชั้น EtOAc สามารถแยกสารบริสุทธิ์ในกลุ่มไตรเทอร์ปีนได้สาร **1-4** นอกจากนี้ยังพบสารฟีโนลิก *p*-hydroxybenzoic acid (**5**) (รูปที่ 1) จากข้อมูล ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) และ ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) ของสาร **1** แสดงคุณลักษณะของ lupane triterpene คือมีหมู่ isopropenyl โดยพบสัญญาณ singlet 3 แห่งที่ δ_H 4.68 4.56 (δ_C 109.0) ของ H-29 และ 1.68 (δ_C 19.5) ของ methyl-30 พบสัญญาณ doublet of doublets (J = 10.8, 5.5 Hz) ที่ δ_H 3.19 (δ_C 79.0) ของ carbinol proton H-3 และพบ methyl singlet 6 แห่ง แห่งละ 3 โปรตอนที่ δ_H 0.76 (δ_C 15.5), 0.79 (δ_C 18.0), 0.83 (δ_C 16.1), 0.94 (δ_C 27.7), 0.97 (δ_C 28.0) และ 1.03 (δ_C 16.0) ppm ที่วงของไตรเทอร์ปีน นอกจากนี้พบโปรตอน methine และ methylene อีกจำนวนหนึ่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR ของสาร **1** พบว่าสอดคล้องกับ lupeol ที่มีรายงานไว้แล้ว (Panseeta and Suksamrarn, 2553) และเมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร **1** กับ authentic lupeol พบว่าเท่ากัน จึงสรุปว่าสาร **1** มีโครงสร้างเป็น lupeol สำหรับสาร **2** เป็นสารที่พบในปริมาณน้อยมาก จากข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR พบว่าสาร **2** เป็น lupane triterpene เช่นกัน แต่ต่างจากสาร **1** ที่สาร **2** พบสัญญาณ doublet ของ methylene alcohol H-28 2 แห่งที่ δ_H 3.77 และ 3.30 (J = 10.4 Hz) (δ_C 60.5) และพบสัญญาณ methyl singlet เพียง 5 แห่ง ที่ δ_H 0.74 (δ_C 15.3), 0.79 (δ_C 15.9), 0.94 (δ_C 14.6), 0.97 (δ_C 27.9) และ 0.99 (δ_C 16.0) ppm เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR ของสาร **2** พบว่าสอดคล้องกับ betulin ที่มีรายงานไว้แล้ว (Panseeta, 2009) สาร **3** เป็นสารที่พบในปริมาณมากที่สุด จากข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR พบว่าสาร **3** มีข้อมูลคล้ายกับสาร **2** มาก ต่างกันที่สาร **3** ไม่พบสัญญาณของ methylene alcohol แต่พบ carboxylic acid carbon δ_C 179.1 เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR ของสาร **3** พบว่าสอดคล้องกับ betulinic acid ที่มีรายงานไว้แล้ว (Panseeta and Suksamrarn, 2553) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบค่า R_f ด้วยเทคนิค TLC พบว่า

สาร **3** มีความเป็นขั้วมากกว่าสาร **2** และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า R_f ของ authentic betulinic acid พบว่าเท่ากัน ดังนั้นสาร **3** จึงมีโครงสร้างเป็น betulinic acid โดยทั่วไป betulinic acid เป็นไตรเทอร์ปีนหลักที่พบในปริมาณมากในพืชสกุล *Ziziphus* สำหรับสาร **4** เป็นสารที่แยกได้ในปริมาณมากเป็นอันดับสอง จากข้อมูล ^{1}H-NMR มีหมู่ isopropenyl เช่นเดียวกับสาร **3** แต่ต่างกันที่สาร **4** พบสัญญาณแบบ singlet 2 แห่ง ที่ δ_H 4.14 (δ_C 84.6) และ 2.52 (δ_C 65.4) ของ carbinol proton ของ H-3 และ H-1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวง A ใน ceanothane triterpene อีกทั้งยังพบสัญญาณของ methyl singlet 5 แห่ง ที่ δ_H 0.91 (δ_C 14.5), 0.94 (δ_C 16.2), 0.95 (δ_C 19.1), 1.07 (δ_C 18.5) และ 1.10 (δ_C 30.7) ppm เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR ของสาร **4** พบว่าสอดคล้องกับของ ceanothic acid ที่มีรายงานไว้แล้ว (พนมวรรณ, 2547) และจากการตรวจสอบค่า R_f ด้วยเทคนิค TLC พบว่าสาร **4** มีความเป็นขั้วมากกว่าสาร **3** และเมื่อเปรียบเทียบกับ authentic ceanothic acid พบว่ามีค่า R_f เท่ากัน ดังนั้นสาร **4** จึงมีโครงสร้างเป็น ceanothic acid ซึ่งเป็น ceanothane triterpene ส่วนสาร **5** เป็นสารที่พบในปริมาณน้อยมาก ข้อมูล ^{1}H-NMR ของสารนี้พบสัญญาณแบบ doublet 2 แห่ง ที่ δ_H 7.93 (J = 8.6 Hz) และ 6.85 (J = 8.6 Hz) ซึ่งเป็นของ aromatic proton ในระบบ AX ของ H-3/H-3′ และ H-4/H-4′ ตามลำดับ ข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT สเปคตรัม ประกอบด้วย 5 สัญญาณของ 7 คาร์บอนอะตอม สัญญาณที่ δ_C 169.0 เป็น C-1 ของ carboxylic acid สัญญาณ quaternary carbon ของ C-5 และ C-2 ปรากฏที่ δ_C 161.4 และ 121.5 ppm ตามลำดับ ส่วนสัญญาณของ aromatic methine carbon ที่ δ_C 132.1 และ 115.0 เป็นของ C-3/C-3′ และ C-4/C-4′ ตามลำดับ จากข้อมูล NMR สาร **5** น่าจะเป็นฟีโนลิกที่มีหมู่แทนที่แบบ *para* ทำให้มีสมมาตรในวง เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C-NMR ของสาร **5** พบว่าสอดคล้องกับสาร *p*-hydroxybenzoic acid ที่มีรายงายไว้แล้ว (Yayli et al., 2003) รายงานวิจัยก่อนหน้านี้เคยพบสาร **1**-**4** ในพืช *Ziziphus* หลายชนิด เช่นจากเปลือกรากตะครอง (Suksamrarn et al., 2006) รากพุทรา (Panseeta, 2009) เปลือกรากมะควัด (เจษฎา, 2548) และรากเล็บแมว (ณัฐชัย, 2545) ส่วน *p*-hydroxybenzoic acid (**5**) เคยพบในพืชวงศ์ *Ziziphus* หลายชนิดเช่น พบในส่วนผลและเมล็ดของพุทรา (Memon et al., 2012) และในผลของพุทราจีน (Siriamornpun et al., 2015) แต่ยังไม่มีรายงานการพบในต้นตะครอง

เมื่อนำสาร **1** **3** และ **4** ที่มีปริมาณมากพอมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *H. pylori* พบว่าสาร **1** และ **3** ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ส่วน ceanothic acid (**4**) มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ *H. pylori* DMST20165 ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC ที่ 16.03 ไมโครโมลาร์ ซึ่งดีกว่ายาปฏิชีวนะ amoxicillin (MIC 42.7 ไมโครโมลาร์) ถึง 2.6 เท่า แต่แสดงฤทธิ์อย่างอ่อนต่อเชื้อ *H. pylori* HP40 (MIC 64.22 ไมโครโมลาร์) จากข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงว่าวง A ซึ่งเป็นวง 5 เหลี่ยม และมีหมู่ carboxylic acid ที่ C-1 ของไตรเทอร์ปีนชนิด ceanothane ในสาร **4** น่าจะมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ส่วนสาร **1** และ **3** ซึ่งเป็นไตรเทอร์ปีนชนิด lupane ไม่แสดงฤทธิ์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิด สำหรับสาร **2** และ **5** ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้เนื่องจากแยกได้ในปริมาณน้อยมาก รายงานนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานฤทธิ์การยับยั้ง *H. pylori* ของสารไตรเทอร์ปีน



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **1-5**

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นรายงานครั้งแรกของฤทธิ์การยับยั้ง *H. pylori* ของไตรเทอร์ปีน ceanothic acid (4) ซึ่งแสดงค่า MIC ที่ดีกว่ายาปฏิชีวนะ amoxiciline 2.6 เท่า สารไตรเทอร์ปีนกลุ่มนี้พบได้ในพืชสกุล *Ziziphus* รวมทั้งตะครอง จึงเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับสมุนไพรไทย และเพิ่มทางเลือกใช้พืชสมุนไพรจากธรรมชาติในการป้องกันและรักษาโรค

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุน จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) และคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และแบคทีเรียในการทดสอบเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

เจษฎา เนตรสว่างวิชา. (2548) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกรากมะควัด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ. หน้า 1-106.

ณัฐชัย อุ่นใจ. (2545) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บแมว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.กรุงเทพฯ. หน้า 1-166.

เต็ม สมิตินันท์. (2544) ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย ฉบับบแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544 กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

นันทวัน บุณยะประภัสร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2542) สมุนไพรพื้นบ้าน. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ประชาชน.

พนมวรรณ ปานสีทา. (2547) องค์ประกอบจากเปลือกรากตะครอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ. หน้า 1-73.

Acharya, S.B., Tripathi, Y.C. and Pandey, V.B. (1988). Some pharmacological studies on *Zizyphus rugosa* saponin, Indian Journal of Pharmacology 20(2): 200-202.

Adzu, B., Amos, S., Wambebe, C. and Gamaniel, K. (2001). Antinociceptive activity of *Ziziphus spina-christi* root bark extract. Fitoterapia 72: 344-350.

Arai, M.A., Tateno, C., Hosoya, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T. and Ishibashi, M. (2008). Hedgehog/GLI-mediated transcriptional

inhibitors from *Zizyphus cambodiana*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16(21): 9420-9424.

Bhattachachryya, B. and Johri, B.M. (1998). Flowering plants: Taxonomy and phylogeny. New Delhi: Narosa Publishing House. 326-328.

Cheng, G., Bai, Y., Zhao, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., Ma, L., Liaoc, N. and Xu, X. (2000). Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill *var. spinosa*. Tetrahedron 56(45): 8915-8920.

Chey, W.D. and Wong, B.C.Y. (2007). American college of gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. American Journal of Gastroenterology 102(8): 1808-1825.

Chue, K.-T., Chang, M.-S. and Ten, L.N. (2011). Synthesis and antibacterial activity of betulonic acid amides with piperazine derivatives. Chemistry of Natural Compounds 47(5): 759-763.

Correa, P. and Piazuelo, M.B. (2008). Natural history of *Helicobacter pylori* infection. Digestive and Liver Disease 40: 490-496.

Dahiru, D., Sini, J.M. and John-Africa, L. (2006). Antidiarrhoeal activity of *Ziziphus maritiana* root extract in rodent. African Journal of Biotechnology 5 (10): 941-945.

Deankanob, W., Chomvarin, C., Hahnvajanawong, C., Intapan, P. M., Wongwajana, S., Mairiang, P., Kularbkaew, C. and Sangchan, A. (2006). Enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients and volunteer blood donors. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 37: 958-965.

Ghosh, P., Chakrabortya, P. and Basak, G. (2011). Antibacterial, antifungal and phytotoxic screening of some prepared derivatives of triterpenoids in comparison to their respective bromo-keto precursors. Der Pharmacia Sinica 2(4): 1-8.

Hout, S., Chea, A., Bun, S.S., Elias, R., Gasquet, M., Timon-David, P., Balansard, G. and Azas, N. (2006). Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. Journal of Ethnopharmacology 107: 12-18.

Ji, C.-J., Zeng, G.-Z., Han, J., He, W.-J., Zhang, Y.-M. and Tan, N.-H. (2012). Zizimauritic acids A-C, three novel nortriterpenes from *Ziziphus mauritiana.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22(20): 6377-6380.

Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M. and Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology Reviews. 19: 449-490.

Leal, I.C.R., dos Santos, K.R.N., Júnior, I.I., Ceva Antunes, O.A., Porzel, A., Wessjohann, L. and Kuster, R.M. (2010). Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro*–an anti-*Staphylococcal* evaluation. Planta Medica 76(1): 47-52.

Li, X., Ohtsuki, T., Shindo, S., Sato, M., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T. and Ishibashi, M. (2007). Mangiferin identified in a screening study guided by neuraminidase inhibitory activity. Planta Medica 73(11): 1195-1196.

Memon, A.A., Memon, N., Luthria, D.L., Pitafi, A. A. and Bhanger, M.I. (2012). Phenolic acids composition of fruit extracts of Ber (*Ziziphus mauritiana* L., *var.* Golo Lemai). Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry 13(2): 123-128.

Michel, A. (2002). Tree, shrub and liana of west African zone. Paris: Margraf Publishers GMBH. pp. 440.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grows aerobically. Approved standards: M7-A4 and supplement tables M100-S7, 4th ed. Wayne: NCCLS.

Panseeta, P. (2009). Cyclopeptide alkaloids and triterpenoids from *Ziziphus mauritiana*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ: 1-149.

Panseeta, P. and Suksamrarn, P. (2553). Triterpenes from the root of Thai *Ziziphus mauritiana*. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). ปีที่ 2 ฉบับที่ 4: 106-118.

Perez-Perez, G.I., Rothenbacher, D. and Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 9: 1-6.

Rambabu, P., Venkata Ramana, K. and Ganapaty, S. (2011). Isolation and characterization of triterpenes from *Ziziphus glabrata.* International Journal of Chemical Sciences 9(3): 1014-1024.

Salih, B.A. (2009). *Helicobacter pylori* infection in developing countries: the burden for how long? Saudi. Journal of Gastroenterology 15(3): 201-207.

Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N. and Barusrux, S. (2015). Bioactive compounds and health implications are better for green *jujub*e fruit than for ripe fruit. Journal of Functional Foods 12: 246-255.

Suksamrarn, S., Panseeta, P., Kunchanawatta, S., Distaporn, T., Ruktasing, S. and Suksamrarn, A. (2006). Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 54(4): 535-537.

Wang, Y.-C. and Huang, T.-L. (2005). Screening of anti-*Helicobacterpylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS. Immunology & Medical Microbiology 43(2): 295-300.

Waggas, A.M. and Al-Hasani, R.H. (2009). Effect of sidr (*Zizyphus spina-christi*) fruit extract on the central nervous system in male albino rats. American-Eurasian Journal of Scientific Research 4(4): 263-267.

Wangchuk, P., Keller, P.A., Pyne, S.G., Taweechotipat, M., Tonsomboon, A., Rattanajak, R. and Kamchonwongpaisan, S. (2011). Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of phytochemicals and biological activities. Journal of Ethnopharmacology 137: 730-742.

Yayli, N., Yildirim, N., Usta, A., ¨Ozkurt, S. and AKG¨UN, V. (2003). Chemical constituents of *Campanula lactiflora.* Turkish Journal of Chemistry 27: 749-755.

Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hashemi, A., ebrahimi, L. and Fesahat, F. (2013). Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peotide from *Ziziphus jujuba* fruits. American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias 28(7): 702-709.

❑❑❑❑❑