ว.วิทย. มข. 45(1) 83-94 (2560) KKU Sci. J. 45(1) 83-94 (2017)

การเสริมฤทธิ์ของ Lupeol จากไคร้ (*Glochidion daltonii* Kurz) ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

Synergistic Effect of Lupeol from Kri (*Glochidion daltonii* Kurz) with Tetracycline against Opportunistic Bacteria

วารี เนื่องจำนงค์[1] และ วิสาตรี คงเจริญสุนทร[2*]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand

[*]Corresponding Author, E-mail: wisatrek@yahoo.com, wisatre@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้ (*Glochidion daltonii* Kurz) ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวมีจุดหลอมเหลว 214-215 °C ทำการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลสเปคตรัมกับสารอ้างอิงกลุ่ม triterpene พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้คือ Lupeol เมื่อนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส พบว่า Lupeol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา ยกเว้น เชื้อ *Bacillus subtilis* และเมื่อนำมาศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง Lupeol กับยาเตตราซัยคลิน พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (FICI เท่ากับ 0.27) และพบการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากับ 0.56) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดเพื่อยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ATCC 25922 ในเวลา 6 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อผสม Lupeol ร่วมกับเตตราซัยคลินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแบคทีเรียทดสอบ

ABSTRACT

The isolation of natural products from crude hexane of the leaves of *Glochidion daltonii* Kurz were carried out by chromatographic techniques. One pure compound obtained as white crystal with melting point 214-215 °C. The structure was identified by spectroscopic techniques, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90, and DEPT-135. The comparison between those spectra

and the reference spectra of triterpenoids, confirmed that the pure compounds was Lupeol. Then, Lupeol was evaluated the antibacterial activity against opportunistic bacteria. It was found that Lupeol could inhibit the growth of ten species of opportunistic bacteria, studied in this project, except *Bacillus subtilis.* The Combination of Lupeol with tetracycline, showed synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa* with FICI value of 0.27. Also, partially synergistic effect was found against *Escherichia coli* ATCC 25922 with FICI value of 0.56. The times that could inhibit the growth of *P. aeruginosa* and *E. coli* ATCC 25922 were at the sixth and the fourth hour, respectively, from starting the inoculums of Lupeol with tetracycline.

คำสำคัญ: Lupeol ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย การออกฤทธิ์ร่วม
Keywords: Lupeol, Antibacterial activity, Synergistic effect

บทนำ

ไคร้ (*Glochidion daltonii*) เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น มีสองเพศในต้นเดียว แผ่นใบเป็นรูปหอกหรือรูปไข่ ฐานใบกว้างเป็นรูปลิ่ม ปลายใบแหลม ท้องใบมีสีเทาขาว หลังใบมีสีเทาเขียว พบได้ที่จีน อินเดีย มาเลเซีย เวียดนาม และไทย (Smitinand et al., 2007) ไคร้มีสรรพคุณมากมายตามตำรับยาไทย เช่น ใบ นำมาใช้ปรุงเป็นยา แก้กษัยขับปัสสาวะ แก้ไข้เซื่องซึม อาหารไม่ย่อยแก้หวัดและนอกจากนี้ยอดอ่อนของต้นยังใช้รับประทานได้ (Smitinand et al., 2007; Xiao et al., 2007) ในเวียดนามใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรค เช่น ไข้หวัดใหญ่ โรคบิด ไข้มาลาเรีย โรคไขข้ออักเสบ (Thang et al., 2011) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบใน เปลือกไม้ ใบและผลของไคร้คือ แทนนินและ triterpenoid (Sandhya et al., 2011) พืชอื่นๆ ในสกุลนี้ เช่น *G. coccineum*, *G. eriocarpum*, *G. obliquum* และ *G. puberum* จะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเช่น triterpenoid saponins, flavonoids, lignans, sesquiterpenoids, megastigmane glucosides, alkaloids butenolides และอนุพันธ์ของเบนซินอื่นๆ (Zhang et al., 2012; Laghari et al., 2011) สารสำคัญที่พบ ได้แก่ lupanes สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Kiem et al., 2010; Gallo and Sarachine, 2009) และ นอกจากนี้สารสกัดจากใบของ *G. daltonii* และ *G. zeylanicum* มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งตับ โดยยับยั้งกลไก apoptosis (Machana et al., 2011; Sharma et al., 2011) lupane และ triterpenoids 3 ชนิด จากใบ และเปลือกของ *Maytenus cuzcoina* และใบของ *M. chiapensis* มีฤทธิ์ต้านอักเสบ สามารถลดปริมาณ Nitric Oxide และลดการผลิต prostaglandin E2 ในเซลล์ macrophages ของหนู และมีฤทธิ์ด้านอื่นมากมาย (Reyes et al., 2006; Siddique and Saleem, 2011) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำไคร้มาศึกษาแยกหาสารบริสุทธิ์ เพื่อนำไปเป็นประโยชน์ทางการแพทย์และด้านอื่นๆ ต่อไป

แบคทีเรียฉวยโอกาสที่สำคัญทางการแพทย์สามารถก่อโรคในร่างกายที่อ่อนแอได้หลายระบบ ซึ่งในภาวะปกติจะไม่ก่อโรคในคนที่ร่างกายมีภูมิต้านทานโรค

ปกติ แต่จะก่อโรคเฉพาะในคนที่ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคต่ำ หรือบกพร่องเท่านั้น (Dellit, 2007) เชื้อแบคทีเรียที่มักก่อโรคในโรงพยาบาล ได้แก่ *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* และ *Pseudomonas aeruginosa* การติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มักจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนเมื่ออยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจ การระบาดวิทยาของการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้ พบว่า มีการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาจำนวนมาก (Sheng et al., 2005) สาเหตุของการติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้สูงขึ้น มาจากการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ดื้อต่อฤทธิ์ยาเพื่อความอยู่รอด และผลจากการใช้ยาต้านจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลาย ทำให้จุลินทรีย์ดื้อต่อยาหลายกลุ่ม ได้แก่ เพนิซิลลิน แอมพิซิลลิน โพลีมิกซิน สเตรปโตมัยซิน เตตราซัยคลิน เป็นต้น (Mah and O'Toole., 2001) ทำให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะอนุพันธุ์ที่แรงขึ้นไป จึงก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ผู้ป่วยเกิดการแพ้ยา ระบบร่างกายเสียสมดุล เนื่องจากยาปฏิชีวนะไปทำลายเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ จากปัญหาเหล่านี้ทำให้เราต้องพัฒนายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เพื่อทดแทนยาตัวเก่าที่รักษาไม่ได้ผล ซึ่งทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น สูญเสียรายได้จำนวนมหาศาลในระดับชาติ (Hemaiswarya et al., 2008) ดังนั้นการนำสารบริสุทธิ์จากไคร้มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากสารสกัดธรรมชาติ หาได้ง่าย ราคาถูก กว่าการสังเคราะห์ทางเคมี นอกจากนี้อาจนำไคร้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานวิจัยเชิงลึกเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบของไคร้ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์กับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน และการผสมสารบริสุทธิ์จากไคร้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ได้แก่ *A. baumannii, B. subtilis, B. cereus, E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia, P. mirabilis, P. vulgaris,* MRSA และ *S. aureus* ยกเว้นเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา และ *P. aeruginosa* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (รหัส 1-375/04-2013) ซึ่งผ่านการยืนยันโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีด้วย API 20 NE System

2. การแยกสารบริสุทธิ์

นำใบของไคร้ (BKF147874) ซึ่งเก็บเมื่อเดือน มิถุนายน 2556 จากจังหวัดเชียงรายโดยได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานฯ สัตว์ป่าและพันธ์พืชกรุงเทพมหานครมาทำให้แห้งและบดละเอียดน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ทำการสกัดแบบเย็นด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนน้ำหนัก 16.5 กรัม ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นแบบ gradient elution ระหว่างเอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน โดยเริ่มต้นจากเฮกเซน 100 % และค่อยๆ เพิ่มความมี

ขั้วขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 100 % เอทิลอะซิเตท และตามด้วยเมทานอลเป็นลำดับสุดท้าย สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 fraction เมื่อนำทุก fraction มาทดสอบด้วย TLC พบว่าทุก fraction ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จนได้สารบริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR

3. การเตรียมสารละลาย (stock solution) ของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะ

เตรียม Master stock ของสารบริสุทธิ์ (มวลโมเลกุล เท่ากับ 426 กรัมต่อโมล) เข้มข้น 1 โมลาร์ ด้วยสารละลาย 95% Dimethyl sulfoxide (DMSO) นำไปกรองให้ปราศจากเชื้อโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall Corporation, U.S.A.) จากนั้นเจือจางลงที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คือ 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เตรียม Master stock ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินที่มีมวลโมเลกุล 371.40 และ 444.435 ตามลำดับให้ได้ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเตรียมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 2048, 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ โดยการเจือจางความเข้มข้นลดลงสองเท่าด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมสารละลายของสารบริสุทธิ์

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Minimal Inhibition Concentration (MIC) ของสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Broth dilution susceptibility test (Clinical and standard Institute, 2006)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA, Merck, Germany) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5 x 10^8 CFU/ml) เติมเชื้อแบคทีเรียที่เทียบความขุ่นแล้วจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Germany) MHB 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารบริสุทธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 2 - 2048 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมลงในอาหาร MHB หลอดเดิม แล้วบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการทดลองสามซ้ำทุกความเข้มข้น นำเชื้อที่ผสมสารบริสุทธิ์มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้น 1:10^{-1}, 1:10^{-2}, 1:10^{-3} เป็นต้น (Serial Dilution) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย โดยนำเชื้อที่เจือจางแล้วทุกความเข้มข้น จำนวน 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร NA ที่เตรียมไว้โดยใช้ sterile spreader เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร นำแบคทีเรียไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA มานับจำนวนโคโลนี แล้วหาค่าจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ในหน่วย Colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) (Clinical and standard Institute, 2006)

5. การตรวจสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะ

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการทดสอบในข้อ 4 เทียบเชื้อให้ได้ความเข้มข้น McFarland No. 0.5 นำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากับอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA, Merck, Germany) ปริมาตร 19 มิลลิลิตร รอจนอาหารแห้ง แล้วจึงเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ที่เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ DMSO หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้เป็นชุดควบคุม จากนั้นผสมยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์

ปริมาตร 20 ไมโครลิตร รวมกันกับสารบริสุทธิ์ปริมาตรเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 2048 ไมโครโมลาร์ ก่อนหยอดในหลุม แล้วหยอดสารที่ผสมแล้วในหลุมปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร ทำเช่นเดียวกันโดยผสมยาปฏิชีวนะ 1024, 512, 256, 128 และ 64 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารบริสุทธิ์ ตามรูปแบบของ checkerboard assay (Chung et al., 2011) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารบริสุทธิ์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ไปทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) เป็นเซนติเมตร และทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ นำไปบันทึกผลการทดลอง และหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC และ การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI หรือ (Fractional Inhibitory Concentration Index)

การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Chung et al., 2011) การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI คือค่าที่ใช้บอกประสิทธิภาพร่วมเมื่อใช้สารบริสุทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เช่น เสริมฤทธิ์กัน หรือต้านฤทธิ์กัน เป็นต้น ซึ่งดูจากค่า FICI ระหว่างค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ กับค่า FIC ของสารบริสุทธิ์ โดยคำนวณได้ดังนี้

1. FIC ของยาปฏิชีวนะ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

2. FIC ของสารบริสุทธิ์ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว

3. FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ+FIC ของสารบริสุทธิ์

แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI ได้ดังนี้

เมื่อ FICI ≤ 0.5 หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)

0.5 < FICI < 1 หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)

FICI = 1 หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)

1 < FICI ≤ 4 หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)

FICI > 4 หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

6. การศึกษาผลของสารบริสุทธิ์ผสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ต่อหน่วยเวลา (Time-Kill Assay)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและปรับเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นนำเชื้อที่เทียบความเข้มข้นแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับอาหาร MHB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำเชื้อแบคทีเรียมาผสมกับ สารบริสุทธิ์ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะความเข้มข้นที่เหมาะสม (ไม่ได้แสดงผล preliminary test จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อหน่วยเวลาต่อไป) และปฏิชีวนะความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับชุดควบคุม ได้แก่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สารบริสุทธิ์ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ และยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำหลอดทดสอบทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อถึงช่วงเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำออกมาเจือจาง (Serial Dilution) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย แล้วหาค่าจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ในหน่วย Colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า $\log_{10}$

จำนวนเซลล์ (CFU/ml) คำนวณและหาค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญ (The effectiveness antibacterial activity; EAA) (Sedlarik, et al., 2010) และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า $\log_{10}$ จำนวนเซลล์ (CFU/ml)

7. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบสารบริสุทธิ์กับยาปฏิชีวนะด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบการใช้สารบริสุทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS version 15

ผลการวิจัย

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้ ทำโดยนำใบไคร้ ที่แห้งและบดละเอียด น้ำหนัก 1 กิโลกรัมมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนน้ำหนัก 16.5 กรัม เมื่อทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าจากการแยก fraction ที่ 2 ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวทำละลาย 20% เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซนสามารถแยกได้ 3 fraction fraction ที่ 2.1-2.3 fraction ที่ 2.1 เกิดเป็นของแข็งสีขาว เมื่อนำมาทดสอบด้วย TLC พบว่าของแข็งที่ได้เป็นสารบริสุทธิ์จึงทำการตกผลึกใหม่ด้วยเฮกเซน ได้ผลึกสีขาวรูปเข็มหนัก 0.3313 กรัม มีจุดหลอมเหลว 214-215 องศาเซลเซียส นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 โดยเปรียบเทียบกับค่าในบทความวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว (Laghari et al., 2011; Saleem, 2009)

การสำรวจประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution assay พบว่าสารบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *A. baumannii* MRSA, *P. mirabilis* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากัน คือ 128 ไมโครโมลาร์ รองลงมาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* *K. pneumoniae* และ *P. vulgaris* มีค่า MIC เท่ากับ 512 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน พบว่า สารบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ (MIC อยู่ระหว่าง 128-512 ไมโครโมลาร์) และมีประสิทธิภาพดีกว่าแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ตารางที่ 1

ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะด้วยวิธี agar diffusion assay พบว่าเมื่อทดลองใช้สารบริสุทธิ์ร่วมกับยาแอมพิซิลลินไม่ให้ผลการออกฤทธิ์ (ไม่ได้แสดงผล) แต่สามารถออกฤทธิ์ร่วมกับเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสที่ดื้อยาและไม่ดื้อยา คือ *E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาและสายพันธุ์ไม่ดื้อยา โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ได้เมื่อผสมสารบริสุทธิ์ ร่วมกับยาเตตราซัยคลินเท่ากับ 128 ไมโครโมลาร์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยาได้ดีขึ้นโดยใช้สารบริสุทธิ์ร่วมกับยาเตตราซัยคลินเท่ากับ 16 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ร่วมกับเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา (ตารางที่ 2) โดยแสดงผลการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากับ 0.56) และเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา (FICI เท่ากับ 0.27) (ตารางที่ 3) ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ เมื่อผสมเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพสูงขึ้น (สามารถลดค่า

MIC ของยาเตตราซัยคลินได้ลดลง 2-4 เท่า เมื่อใช้ยาเตตรา-ซัยคลินเพียงชนิดเดียว) และออกฤทธิ์ร่วมกันได้ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* (สามารถลดค่า MIC ของยาเตตรา-ซัยคลินลงอย่างน้อย 2-4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2) แต่เมื่อผสมกับแอมพิซิลลินกลับไม่ให้ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกัน (ไม่พบค่า MIC combination จึงไม่แสดงผลการวิจัย) ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบในขั้นต่อไป คือ การหาจุดเวลาที่เหมาะสมของยา เตตราซัยคลินและสารบริสุทธิ์ ในการออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา) เพื่อจะอธิบายให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ สามารถลดปริมาณการใช้ยาเตตราซัยคลิน (ซึ่งก่อให้เกิดผลดีเนื่องจากยาเตตราซัยคลินละลายได้น้อยในร่างกาย และเมื่อใช้โดสสูงจะมีผลข้างเคียงต่อร่างกาย)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียฉวยโอกาส

กลุ่มแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (ไมโครโมลาร์)		
		สารบริสุทธิ์	แอมพิซิลลิน	เตตราซัยคลิน
แกรมบวก	*B. cereus*	512	128	128
	B. subtilis	>2048	>2048	512
	MRSA	128	128	128
	S. aureus	128	128	128
	A. baumannii	128	>2048	128
แกรมลบ	*E. coli* ATCC 25922	2048	>2048	256
	K. pneumoniae	512	128	1024
	P. mirabilis	128	512	128
	P. vulgaris	512	1024	512
	P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	1024	>2048	64

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารบริสุทธิ์ และยาปฏิชีวนะ เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดเดียวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ดื้อยาและไม่ดื้อยา

แบคทีเรีย	MIC (ไมโครโมลาร์) เตตราซัยคลิน	MIC (ไมโครโมลาร์) combination เตตราซัยคลิน+ สารบริสุทธิ์	MIC (ไมโครโมลาร์) สารบริสุทธิ์	FIC (ไมโครโมลาร์) เตตราซัยคลิน	FIC (ไมโครโมลาร์) สารบริสุทธิ์	FICI (ไมโครโมลาร์)	แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม
E. coli ATCC 25922	256	128	2048	0.50	0.063	0.56	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	64	16	1024	0.25	0.016	0.27	เสริมฤทธิ์กัน
P. aeruginosa ดื้อยา	>2048	-	>2048	-	-	-	-

แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI ได้ดังนี้

เมื่อ	FICI ≤ 0.5	หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)
	0.5 < FICI < 1	หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic)
	FICI = 1	หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)
	1 < FICI ≤ 4	หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent)
	FICI > 4	หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (antagonistic)

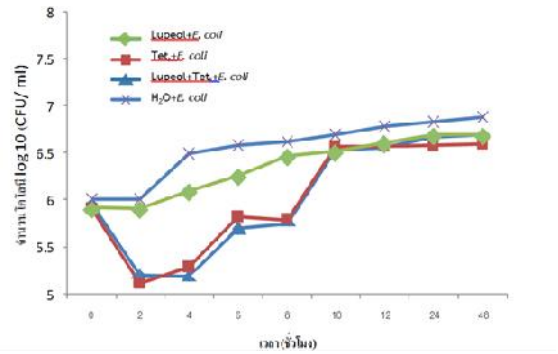
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ณ จุดเวลาที่เหมาะสมของสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	**เวลาที่เหมาะสมของการยับยั้งการเจริญของสารบริสุทธิ์**	
	สารบริสุทธิ์ + ยาเตตราซัยคลิน	**ค่า EAA**
E. coli ATCC 25922	4	95.10±1.73
P. aeruginosa ไม่ดื้อยา	6	54.90±27.80

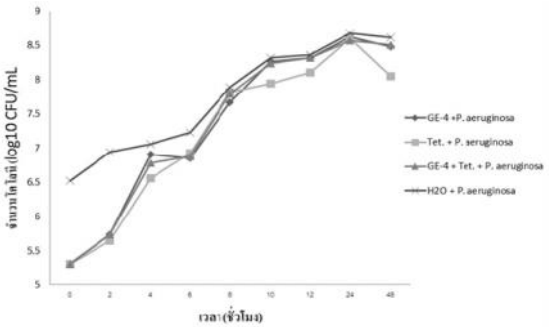
ผลของการทดสอบ Time-kill assay พบว่า เมื่อเลือกใช้สารบริสุทธิ์ เท่ากับ 16xMIC ของสารบริสุทธิ์ (2048 ไมโครโมลาร์/128 ไมโครโมลาร์ จากตารางที่ 1 และ 2) และเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน เท่ากับ 2xMIC (256 ไมโครโมลาร์/128 ไมโครโมลาร์ จากตารางที่ 1และ 2) ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 โดยปริมาณของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (จำนวนโคโลนีลดลงจากเวลาเริ่มต้นร้อยละ 95.10) และยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 1 และตารางที่ 3) เช่นเดียวกับการทดสอบ Time-kill assay ของเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา พบว่า เมื่อเลือกใช้สารบริสุทธิ์ เท่ากับ 64xMIC (1024 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ 4xMIC (64 ไมโครโมลาร์/16 ไมโครโมลาร์) (ตารางที่ 1 และ 2) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 6 (จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจะลดลงร้อยละ 54.90) และมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8) (รูปที่ 2 และตารางที่ 3)

วิจารณ์ผลการวิจัย

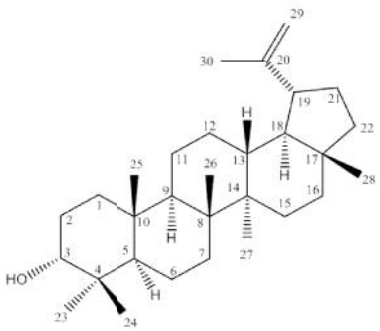
จากข้อมูลทางสเปคโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ พบว่า ^{13}C NMR แสดงจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 30 คาร์บอน ซึ่งคาดว่าเป็นในสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปคโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์กับเอกสารอ้างอิงต่างๆ พบว่าข้อมูลทางสเปคโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ที่ได้มีข้อมูลใกล้เคียงกับ Lupeol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3



รูปที่ 1 ผลของสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน (Tet.) ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วย เวลา (Time kill assay)



รูปที่ 2 ผลของสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน (Tet.) ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาต่อหน่วยเวลา



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ Lupeol

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR ^{13}C NMR และจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์กับ Lupeol จากเอกสารอ้างอิง (Laghari, et al., 2011) พบว่าเหมือนกันทุกประการและทำการยืนยันสูตรโครงสร้างด้วย DEPT-90 และ DEPT-135 ดังนั้นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบไคร้คือ Lupeol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3

Lupeol มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ และให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียดีกว่ายาแอมพิซิลลิน แต่ให้ผลยับยั้งต่ำกว่ายาเตตราซัยคลิน Lupeol เป็นสารกลุ่ม terpene ซึ่งมีรายงานพิสูจน์ให้เห็นว่าสารกลุ่มนี้สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *S. aureus* ATCC 25922 (425 ไมโครโมลาร์) แต่ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้น้อยกว่า (425 ไมโครโมลาร์) (Gallo and Sarachine, 2009) ผลของการยับยั้งของ Lupeol อาจเกิดจากไปยับยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหรือไปรบกวนการผ่านเข้าออกของไอออนหรือไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids bilayer) หรือส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์และดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (Solomakos et al., 2008) หรือ Lupeol ออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารกลุ่ม triterpenoid ที่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ DNA และการสังเคราะห์ macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Chung et al., 2011)

เมื่อนำ Lupeol มาผสมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อศึกษากลไกการทำงานร่วมกัน เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาเตตราซัยคลินที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน และเพื่อลดการใช้ยาเตตราซัยคลินซึ่งถ้าใช้โดสสูงจะมีผลกระทบต่อร่างกายผู้ใช้ งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า Lupeol เมื่อผสมกับยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มดื้อยาสูง ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ได้ดียิ่งขึ้น เพราะสามารถลดค่า MIC ของการใช้เตตราซัยคลินลงมากกว่า 2-4 เท่าของค่า MIC เดิม (แต่ Lupeol ไม่สามารถออกฤทธิ์ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน) แสดงให้เห็นว่า Lupeol ส่งเสริมให้การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะดีขึ้นกว่าใช้ยาปฏิชีวนะเพียงตัวเดียว Lupeol อาจช่วยเพิ่มการดูดซึมยาเข้าเซลล์ หรือนำพายาปฏิชีวนะเข้าเซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น จึงควรทดสอบประสิทธิภาพการซึมผ่านของ Lupeol เข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ด้วย Nitrocefin assay ในขั้นต่อไป (Eumkeb and Chukrathok, 2013) หรือทดสอบการช่วยนำพา Lupeol ต่อยาปฏิชีวนะระหว่างที่เซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค flow cytometry

จากการนำ Lupeol ที่ได้จากใบไคร้ มาทดสอบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดทำงานวิจัย อย่างไรก็ตามควรศึกษากลไกของ Lupeol ในการต้านแบคทีเรีย หรือนำไปศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่นๆ ของไคร้ เช่น ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อไวรัส งานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้โดยนำ Lupeol ที่สกัดจากใบไคร้ไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมความงามกลุ่มถนอมผิว หรือลดการอักเสบจากติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง ผสมในผลิตภัณฑ์กลุ่มคอลลอยด์ (colloid) เพื่อทดแทนการใช้ หรือลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ถนอมผิวจากต่างประเทศ และเป็นการสร้างรายได้ให้กับชุมชน หรือนำไปเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ในอนาคตอาจจะนำไปใช้แทนหรือควบคู่กับยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลในปัจจุบัน เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของใบไคร้ด้วยพบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดลักษณะเป็นผลึกสีขาวรูปเข็มสีขาว และนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR พบว่าเป็น Lupeol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และให้ผลการทดสอบฤทธิ์ค่อนข้างดีกว่ายาแอมพิซิลลิน แต่ให้ผลน้อยกว่ายาเตตราซัยคลิน และเมื่อนำ

Lupeol มาทดสอบร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยา และออกฤทธิ์ร่วมกันได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และ 6 ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (NRPM) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสข้อเสนอโครงการคือ 2558A10802004 และขอบคุณหน่วยงานสนับสนุน ได้แก่ ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี จังหวัดชลบุรี และสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานฯสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพมหานครที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือสารเคมี เชื้อแบคทีเรียและต้นไม้ในการทำวิจัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

Chung, P.Y., Navaratnam, P. and Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 10(25): 1-6.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne, PA.

Dellit, T.H., Owens, R.C., McGowan, J.E., Gerding, D.N., Weinstein, R.A. and Burke, J.P. (2007). Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. Antimicrobial Stewardship Guidelines 44(2): 159 – 177.

Eumkeb, G. and Chukrathok, S. (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. Phytomedicine 20(3-4): 262-9.

Gallo, M.B. and Sarachine, M.J. (2009). Biological activities of lupeol. International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences 39 (special issue1): 46-66.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K. and Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15(8): 639-652.

Kiem, P.V., Thu, V.K., Minh, C.V. and Yen, P.H. (2010). A new flavan glucoside from *Glochidion eriocarpum*. Journal of Chemistry 48(1): 125-131.

Laghari, A.H., Memona, S., Nelofarb, A. and Khan, K.M. (2011). *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol. Industrial Crops and Products 34: 1141– 1145.

Mah, T.C. and O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology 19(1): 34-39.

Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B. and Thitimetharoch, T. (2011). Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. Chinese Medicine 6: 39-46.

Reyes, C.P., Nunez, M.J., Jimenez, I.A., Busserolles, J., Alcaraz, M.J. and Bazzocchi, I.L. (2006). Activity of lupine triterpenoids from Maytenus species as inhibitors of nitric oxide

and prostaglandin E_2. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14: 1573-1579.

Sandhya, S., Chaitanya, R.S.N.A.K.K., David, B. and Aradhana. (2011). Microscopical and Physicochemical studies of *Glochidion velutinum* leaf. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences 2: 91-106.

Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. Cancer Letters 285(2): 109-115.

Sedlarik, V., Galya, T., Sedlarikova, J., Valasek, P. and Saha, P. (2010). The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly (vinyl alcohol)/silver nitrate films. Polymer Degradation and Stability 95: 399–404.

Siddique, H.R. and Saleem, M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. Life Sciences 88: 285-293.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiology 25: 120-127.

Sharma, J.V.C., Pitchaiah, G., Rao, J.V., Kumer, H.S. and Vikram. (2011). In -*Vitro* Anticancer activity of methanolic extract of roots of *Glochidion zeylanicum* (Gaertn.). International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences 2(2): 760-764.

Smitinand, T., Larsen, K. and Santisuk, T. (2007). Flora of Thailand. Vol. 8 part 2. Bangkok: Forest Herbarium, Royal Forest Department.

Thang, T.D., Kuo, P.C., Yu, C.S., Shen, Y.C., Hoa, L.T.M., Kuo, Y.H., Yang, M.L., Wu, T.S. and Thanh, T.V. (2011). Chemical constituents of the leaves of *Glochidion obliquum* and their bioactivity. Archives of Pharmacal Research 3: 383-389.

Sheng, W.H., Chie, W.C., Chen, Y.C., Hung, C.C., Wang, J.T. and Chang, S.C. (2005). Impact of nosocomial infections on medical costs, hospital stay, and outcome in hospitalized patients. Journal of the Formosan Medical Association 104(5): 318–326.

Xiao, H.T., Hao, X.Y., Yang, X.W., Lu, Y., Zhang, Y., Gao, S., He, H.P. and Hao, X.J. (2007). Bisabolane-type sesquiterpenoids from the Rhizomes of *Glochidion coccineum*. Helvetica Chimica ACAT 90: 164-170.

Zhang, X., Chen, J. and Gao, K. (2012). Chemical constituents from *Glochidion wrightii* Benth. Biochemical Systematics and Ecology 45: 7-11.

❑❑❑❑❑