



## องค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นแตงน้ำ

### Phytochemical Constituents of the Stems from *Amoora cucullata*

ภาษกรณม์ ชีรพงศ์ไพศาล<sup>1</sup> จรัสลักษณ์ เพชรวัง<sup>2</sup> ศรีณยู ไคลคล้าย<sup>1</sup> และ ปรีนุช ชุมแก้ว<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี 84000

<sup>2</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี 84000

Passakorn Teerapongpisan<sup>1</sup> Jaraslak Pechwang<sup>2</sup> Saranyoo Klaiiklay<sup>1</sup> and Parinuch Chumkaew<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, 84000 Thailand.

<sup>2</sup> Department of Agricultural Science and Technology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, 84000 Thailand.

\*Corresponding Author, E-mail: parinuch.c@gmail.com

Received: 5 July 2019 | Revised: 6 September 2019 | Accepted: 19 November 2019

#### บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นแตงน้ำสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้ว ประกอบด้วย สารอนุพันธ์อะพอร์พินแอลคาลอยด์ คือ 6a,7-didehydrobulbocapnine methyl ether (1) และ สารอนุพันธ์โปรโทเบอร์เบอรีนแอลคาลอยด์ คือ 9-demethyloxypalmatine (2) และ 8,13-dioxo-14-hydroxytetrahydropalmatine (3) การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้โดยอาศัยข้อมูล <sup>1</sup>H และ <sup>13</sup>C NMR สเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารประกอบที่มีการรายงานแล้ว การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (ATCC6633), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SK1), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) และ *Escherichia coli* (ATCC25922) ของสารประกอบที่ 1-3 ทำโดยวิธี broth micro dilution ผลการทดสอบพบว่าสารประกอบที่ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงที่สุด และสารประกอบที่ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ต่ำที่สุด โดยค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) ของสารประกอบ 2 ในการยับยั้ง *S. aureus* (ATCC25923) และ *B. subtilis* (ATCC6633) มีค่าเท่ากับ 25.0 µg/mL และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SK1) มีค่าเท่ากับ 50.0 µg/mL.

#### ABSTRACT

Chemical investigation on the stems of *A. cucullata* led to the isolation of one aporphine alkaloid, 6a,7-didehydrobulbocapnine methyl ether (1) and two protoberberine alkaloids, 9-demethyloxypalmatine (2), and 8,13-dioxo-14-hydroxytetrahydropalmatine (3). Their structures were characterized by mainly <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data and compared with previously reported. Compounds 1-3 were also evaluated for antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (ATCC6633), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SK1), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) and *Escherichia coli* (ATCC25922) by broth micro dilution

method. Compound **2** was found to be the most active compound, while compound **3** was the least active. The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) values of compound **2** were 25.0 µg/mL on *S. aureus* (ATCC25923) and *B. subtilis* (ATCC6633), and 50.0 µg/mL on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SK1).

**คำสำคัญ:** แดงน้ำ อะพอรอฟิน โพรโทเบอร์เบริน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

**Keywords:** *Amoora cucullata*, Aporphine, Protoberberine, Antibacterial activity

## บทนำ

ปัญหาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกาย เป็นปัญหาที่สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์และเป็นปัญหาของวงการแพทย์ ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคต่างๆ ในมนุษย์มีความหลากหลายมากขึ้น โดยแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีแนวโน้มในการดื้อยาสูงขึ้น ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ (Miró-Canturri et al., 2019) ดังนั้นการหาสารสำคัญที่มีผลต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง อีกทั้งยังมีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์จากพืชอยู่มากและพบสารสำคัญที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียอยู่หลายชนิด

แดงน้ำ (*Amoora cucullata*) เป็นพืชในวงศ์กระต่อน (Meliaceae) ซึ่งสามารถพบได้ในป่าชายเลนบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และมหาสมุทรอินเดีย คนในท้องถิ่นนิยมนำไปใช้รักษาอาการท้องร่วง และรักษาไขกระดูก (Boonyapraphat et al., 1998) ใบสามารถลดอาการอักเสบ รักษาโรคผิวหนัง โรคหัวใจ และโรคท้องร่วง (Basak et al., 1996; Das et al., 2005) อีกทั้งยังเป็นพืชสมุนไพรหนึ่งที่ใช้ในงานวิจัยของไทยอย่างต่อเนื่อง

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการพบว่ามีสารประกอบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มเทอพินอยด์ (Ahmed et al., 2010), สเตอรอยด์ (Rahman et al., 2005), ฟลาโวนอยด์ และอนุพันธ์ บีสเอไมด์ (Abdelfatta et al., 2010) จากส่วนเปลือกและใบ และยังพบว่าส่วนสกัดหยาบจากใบและลำต้นของแดงน้ำมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารที่นำสนใจ คือ *Escherichia coli* (Ferdoushi et al., 2012) อีกทั้งสารประกอบที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของแดงน้ำยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น 3-hydroxyrocagloic acid ที่แยกได้จากผล แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิด NCI-H187 อยู่ในลำดับที่ดี (Chumkaew et al.,

2006) นอกจากนี้พบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบแดงน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดี (Ahmed et al., 2006) และ amocurine C ที่แยกได้จากราก (Chumkaew et al., 2019) แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อยู่ในลำดับที่ดี อย่างไรก็ตามลำต้นแดงน้ำมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยมาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คณะวิจัยได้เลือกทำการศึกษาในส่วนลำต้นของแดงน้ำและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรค

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. เครื่องมือและสารเคมี

Infrared spectra: บันทึกด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer (Perkin-Elmer 1750, USA) มีหน่วยเป็น wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )

Ultraviolet spectra: บันทึกด้วยเครื่อง UV-160A spectrophotometer (SHIMADZU, Japan) มีหน่วยความยาวคลื่นเป็นนาโนเมตร และบันทึกค่า  $\lambda_{\text{max}}$

Nuclear magnetic resonance spectra: บันทึกด้วยเครื่อง NMR (Varian UNITY INOVA, USA) ที่ 500 MHz โดยใช้ Chloroform (Merck, Germany) เป็นสารอ้างอิงบอกสัญญาณ เรโซแนนซ์ด้วยสัญญาณของ chemical shift parameter ( $\delta$ , ppm)

เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ: ใช้เครื่อง Rotary evaporator (Buchi R-300, Switzerland)

โครมาโทกราฟี: คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดาใช้ ซิลิกาเจล (Merck, Germany) ชนิด 100 (70-230 Mesh ASTM) หรือ Sephadex LH-20 (Merck, Germany) เป็นตัวดูดซับ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และโครมาโทกราฟีแบบแผ่นหนา ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Germany)

ตัวทำละลาย: ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและเก็บที่จุดเดือดของตัวทำละลายนั่นๆ

## 2. ตัวอย่างพืช

ลำต้นแดงน้ำจากเขตป่าชายเลน อำเภอนอม จังหวัด นครศรีธรรมราช ในเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2553 โดยยืนยัน และตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ไม้จากหมายเลข WU-0145 ของพิพิธภัณฑ์พืช คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช ประเทศไทย

## 3. การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์

นำส่วนลำต้นแดงน้ำ (420.4 g) ที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มา สกัดแบบต่อเนื่องด้วยอะซีโตน จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองและระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้อากาศความดัน ได้ส่วนสกัดหยาบอะซีโตน (18.0 g) และ นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟีโดยซิลิกาเจลซึ่งใช้ ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะและเพิ่มความเข้มข้นด้วยเอทิลอะซีเตต ได้ ส่วนย่อยทั้งหมด 15 ส่วนย่อย (F1-F15) นำส่วนย่อย F2 (132.0 มิลลิกรัม) แยกต่อด้วยพีเพอไรทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 40% เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน เป็นตัวชะได้สารประกอบที่ 1 (50.4 mg) นำส่วนย่อย F9 (108.0 mg) แยกต่อด้วยพีเพอไรทีฟ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 50% เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน เป็นตัวชะได้สารประกอบที่ 2 (11.5 mg) จากนั้นนำส่วนย่อย F11 (228.8 มิลลิกรัม) แยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 12 ส่วน (F11A-F11L) นำส่วนย่อย F11A (128.8 mg) แยกต่อด้วยพีเพอไรทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 20% อะซีโตน-เฮกเซนเป็นตัวชะได้ สารประกอบที่ 3 (13.0 mg) นำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติก-เรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR

### 6a,7-Didehydrobulbocapnine methyl ether

(1): ของหนีดสีน้ำตาล, UV (MeOH, nm)  $\lambda_{\text{max}}$  305, 385. IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1606, 1487.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.62 (1H, d, H-9), 6.99 (1H, d,  $J = 9.0$ , H-8), 6.86 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, s, H-7), 6.16 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 3.97 (3H, s, 10- $\text{OCH}_3$ ), 3.95 (3H, s, 11- $\text{OCH}_3$ ), 3.32 (2H, t,  $J = 6.0$ , H-5), 3.18 (2H, t,  $J = 6.0$ , H-4), 3.10 (3H, s, 6- $\text{NCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR

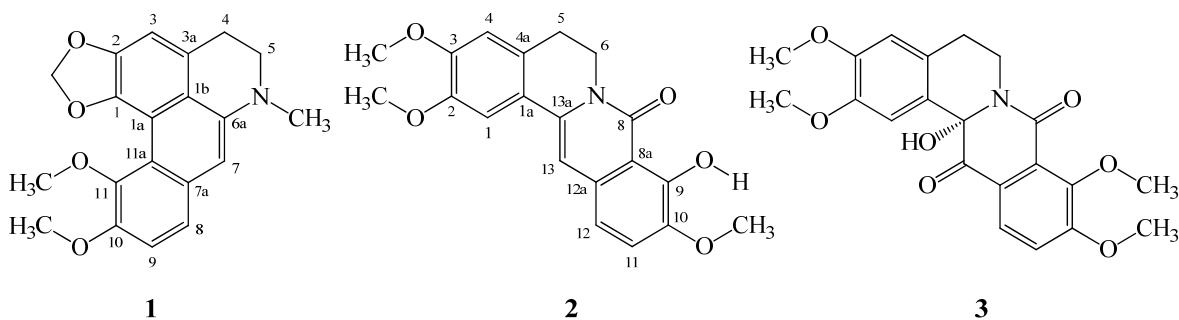
(125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 141.5 (C-1), 117.3 (C-1a), 127.5 (C-1b), 144.0 (C-2), 106.7 (C-3), 118.2 (C-3a), 30.7 (C-4), 50.5 (C-5), 145.1 (C-6a), 93.7 (C-7), 129.4 (C-7a), 108.4 (C-8), 123.3 (C-9), 150.1 (C-10), 141.4 (C-11), 100.7 (1,2- $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 40.4 (6- $\text{NCH}_3$ ), 56.1 (10- $\text{OCH}_3$ ), 60.4 (11- $\text{OCH}_3$ ).

### 9-demethyloxypalmatine (2): ของหนีดสีเหลือง,

UV (MeOH, nm)  $\lambda_{\text{max}}$  266, 386. IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3433, 1710, 1585, 1515.  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.32 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-11), 7.29 (1H, s, H-1), 7.04 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-12), 6.90 (1H, s, H-13), 6.77 (1H, s, H-4), 4.32 (2H, t, H-6), 4.02 (3H, s, 2- $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (3H, s, 10- $\text{OCH}_3$ ), 3.97 (3H, s, 3- $\text{OCH}_3$ ), 2.98 (2H, t,  $J = 6.0$ , H-5), 13.20 (9-OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 107.5 (C-1), 122.0 (C-1a), 148.5 (C-2), 150.1 (C-3), 110.4 (C-4), 127.9 (C-4a), 28.5 (C-5), 39.2 (C-6), 165.4 (C-8), 110.9 (C-8a), 150.3 (C-9), 144.8 (C-10), 119.0 (C-11), 115.1 (C-12), 130.5 (C-12a), 103.1 (C-13), 134.5 (C-13a), 56.2 (2- $\text{OCH}_3$ ), 56.0 (3- $\text{OCH}_3$ ), 56.6 (10- $\text{OCH}_3$ ).

### 8,13-dioxo-14-hydroxytetrahydropal-matine

(3): ของหนีดไม่มีสี, UV (MeOH, nm)  $\lambda_{\text{max}}$  259, 280, 312. IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3403, 1707, 1670, 1595, 1518.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.36 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-12), 7.02 (1H, d,  $J = 8.5$ , H-11), 6.86 (1H, s, H-1), 6.64 (1H, s, H-4), 4.20 (1H, m, H-6), 3.96 (3H, s, 9- $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (3H, s, 3- $\text{OCH}_3$ ), 3.83 (3H, s, 10- $\text{OCH}_3$ ), 3.76 (3H, s, 2- $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (1H, m, H-6), 3.37 (1H, m, H-5), 3.24 (1H, m, H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 111.9 (C-1), 132.7 (C-1a), 147.7 (C-2), 152.7 (C-3), 112.1 (C-4), 127.7 (C-4a), 31.5 (C-5), 37.9 (C-6), 166.2 (C-8), 135.8 (C-8a), 146.3 (C-9), 154.1 (C-10), 116.3 (C-11), 118.8 (C-12), 122.6 (C-12a), 201.8 (C-13), 90.8 (C-13a), 56.0 (2- $\text{OCH}_3$ ), 55.9 (3- $\text{OCH}_3$ ), 62.3 (9- $\text{OCH}_3$ ), 56.4 (10- $\text{OCH}_3$ ).



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบที่ 1-3

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) *Bacillus subtilis* (ATCC6633) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SK1) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) และ *Escherichia coli* (ATCC25922) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใช้วิธี broth micro dilution ใน 96 well culture plates (Inui et al., 2012)

การเตรียมแบคทีเรียทำโดย เลี้ยงแบคทีเรียบน Mueller-Hinton Agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจำนวน 1-2 โคลนีสกลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Mueller-Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนแบคทีเรียเจริญถึงช่วงกลางของ log phase จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland standard ( $10^8$  CFU/mL) จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ด้วย MHB

เตรียมตัวอย่างสารทดสอบ โดยนำสารตัวอย่างมาเจือจางแบบ two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 800 ถึง 1.56  $\mu\text{g/mL}$  ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ลงในหลุมไมโครเพลท จากนั้นเติมแบคทีเรียที่เจือจางแล้วปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย 0.015% resazurin ปริมาตร 30  $\mu\text{L}$  ลงในทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2-4 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี โดยหลุมที่มีสีน้ำเงินแสดงว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ส่วนหลุมที่เปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรียได้เป็นค่า MIC (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) และใช้ยา

ปฏิชีวนะคลอแรม เฟนิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 0.781  $\mu\text{g/mL}$  เป็นชุดควบคุมผลบวก

#### ผลการวิจัยและวิจารณ์

##### 1. การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารประกอบ

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นแดงน้ำ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้ว โดยแบ่งเป็นสารประกอบอะพอร์พินแอลคาลอยด์ จำนวน 1 ชนิด และโพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ 2 ชนิด โครงสร้างทางเคมีของสาร ทั้ง 3 ชนิดวิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาแล้ว

สารประกอบอะพอร์พินแอลคาลอยด์ 1 แสดงแถบการดูดกลืนแสงยูวีที่ 230 และ 390 nm ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของอะพอร์พินแอลคาลอยด์ (Chen-Loung et al., 1976) สำหรับสัญญาณ IR จะแสดงแถบการสั่นของพันธะของวงแหวนอะโรมาติกในช่วง 1607 และ 1487  $\text{cm}^{-1}$  สำหรับ  $^1\text{H}$  NMR ปรากฏสัญญาณของ tetrahydroaporphinoid alkaloid (Dong et al., 2018) ซึ่งประกอบด้วย *N*-methyl proton ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.10 aromatic proton ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.86 (H-3) *ortho*-coupled aromatic proton 2 สัญญาณ ที่  $\delta_{\text{H}}$  8.62 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-9) และ 6.99 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-8) coupled methylene proton 2 สัญญาณ ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.32 (t,  $J = 6.0$  Hz, H-5) และ 3.18 (t,  $J = 6.0$  Hz, H-4) ของ isoquinoline moiety methine proton ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.82 (H-7) อีกทั้งสเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ methoxy ที่  $\delta_{\text{H}}$  3.97 ( $\text{OCH}_3$ -10) และ 3.95 ( $\text{OCH}_3$ -11) methylenedioxy proton ที่  $\delta_{\text{H}}$  6.16 สำหรับข้อมูลจาก  $^{13}\text{C}$  NMR ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ โดยเป็นสัญญาณของ methylenedioxy

ที่  $\delta_c$  100.7 methylene carbon 2 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  50.5 และ 30.7 methine carbon 3 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  123.3 108.4 และ 106.7 quaternary carbon 10 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  150.1 145.1 144.0 141.5 141.4 129.4 127.5 118.5 118.2 และ 117.3 methoxy carbon 2 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  60.4 และ 56.1 และ *N*-methyl carbon ที่  $\delta_c$  40.4 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 6a,7-didehydrobulbocapnine methyl ether (Gerecke et al., 1976)

สารประกอบไพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ 2 แสดงแถบการดูดกลืนแสงยูวีที่ 259 280 และ 386 nm สำหรับสัญญาณ IR จะแสดงแถบการสั่นของของหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีในช่วง 3433  $\text{cm}^{-1}$  หมู่คาร์บอนิลในช่วง 1710  $\text{cm}^{-1}$  และพันธะของวงแหวนอะโรมาติกในช่วง 1585 และ 1515  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นลักษณะของสารกลุ่มไพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ (Promchai et al., 2016) สำหรับ  $^1\text{H}$  NMR ปรากฏสัญญาณของ tetrahydropalmatine alkaloid (Verpoorte et al., 1981) ซึ่งประกอบด้วย *ortho*-coupled aromatic ที่  $\delta_H$  7.32 (d,  $J$  = 8.5 Hz, H-11) และ 7.04 (d,  $J$  = 8.5 Hz, H-12) aromatic proton 3 สัญญาณ ที่  $\delta_H$  6.77 6.90 และ 7.29 coupled methylene proton 2 สัญญาณ ที่  $\delta_H$  2.98 (t,  $J$  = 6.0 Hz, H-5) และ 4.32 (t,  $J$  = 6.0 Hz, H-6) ของ isoquinoline moiety และ methine proton ที่  $\delta_H$  6.90 (H-13) ซึ่งลักษณะของสัญญาณเหมือนกับอนุพันธ์ oxypalmatine (Pinho et al., 1992) แต่มีการแทนที่หมู่ methoxy ด้วย hydroxy group ที่  $\delta_H$  13.20 สำหรับข้อมูลจาก  $^{13}\text{C}$  NMR ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ โดยเป็นสัญญาณของ amide carbonyl ที่  $\delta_c$  165.4 methylene carbon 2 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  39.2 และ 28.5 methine carbon 5 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  119.0 115.1 110.4 107.5 และ 103.1 quaternary carbon 9 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  150.3 150.1 148.5 144.8 134.5 130.5 127.9 122.0 และ 110.9 methoxy carbon 3 สัญญาณ ที่  $\delta_c$  56.6 56.2 และ 56.0 เรโซแนนซ์ของ amide carbonyl ที่  $\delta_c$  165.4 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 9-demethyloxypalmatine (Lyu et al., 2018)

สารประกอบไพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ 3 แสดงแถบการดูดกลืนแสงยูวีที่ 266 และ 386 nm สำหรับสัญญาณ IR จะแสดงแถบการสั่นของของหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีในช่วง 3403

$\text{cm}^{-1}$  หมู่คาร์บอนิลในช่วง 1670 และ 1707  $\text{cm}^{-1}$  และพันธะของวงแหวนอะโรมาติกในช่วง 1595 และ 1518  $\text{cm}^{-1}$  ปรากฏสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR คล้ายกับไพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ 2 สารประกอบ 3 แสดงสัญญาณของเรโซแนนซ์ coupled methylene ที่ 4.20 หรือ 3.59 (1H, m) และ 3.37 หรือ 3.24 (1H, m) อีกทั้งสเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ methoxy 4 สัญญาณ ที่  $\delta_H$  3.96 (OCH<sub>3</sub>-9) 3.88 (OCH<sub>3</sub>-3) 3.83 (OCH<sub>3</sub>-10) และ 3.76 (OCH<sub>3</sub>-2) แต่ไม่แสดงสัญญาณ methine ที่ตำแหน่ง H-13 และ H-13a สำหรับข้อมูลจาก  $^{13}\text{C}$  NMR มีการแสดงสัญญาณของคาร์บอน 21 สัญญาณ และ amide carbonyl ที่  $\delta_c$  165.4 และ 201.8 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 8,13-dioxo-14-hydroxytetrahydropalmatine (Huang et al., 2018)

สารประกอบที่ 1 ซึ่งแยกได้จากพืชชนิดนี้ ไม่เคยมีรายงานว่าเคยพบจากธรรมชาติมาก่อน จึงถือเป็นการค้นพบสารผลิตภัณฑ์นี้ครั้งแรกจากธรรมชาติ อีกทั้งสารประกอบที่ 1-3 ถูกแยกได้จากพืชจีนัส *Amoora* เป็นครั้งแรก (Xu et al., 2019)

## 2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

จากการนำสารประกอบอะพอร์พินแอลคาลอยด์ 1 และ สารประกอบไพโรโทเบอร์ปรีนแอลคาลอยด์ 2-3 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* (ATCC25923), *B. subtilis* (ATCC6633), MRSA (SK1), *P. aeruginosa* (ATCC27853) และ *E. coli* (ATCC25922) พบว่าสารประกอบที่ 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* *B. subtilis* และ MRSA โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) สารประกอบที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *B. subtilis* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ในการยับยั้ง MRSA มีค่า MIC เท่ากับ 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ส่วนสารประกอบที่ 3 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ได้เมื่อทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ดังตารางที่ 1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารประกอบที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งโดยปกติแล้วแบคทีเรียแกรมลบจะทนต่อยาหรือสารยับยั้งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Paz et al., 1995; Vlietinck et al., 1995) ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์

แบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมลบจะมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ค่อนข้างซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบถูกห่อหุ้มด้วยเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งประกอบด้วยชั้นของลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ส่งผลในการจำกัดการแพร่ผ่านของสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ อีกทั้งยังมีช่องว่างเพอริพลาสมิก (periplasmic space) ซึ่งมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาจากภายนอกเซลล์ ช่วยป้องกันการเข้าสู่เซลล์ของสารยับยั้ง รวมถึงโมเลกุลของยาปฏิชีวนะ (Duffy and Power, 2001) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างของ

ผนังเซลล์ในลักษณะดังกล่าว จึงทำให้สารยับยั้งสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่า (Westh et al., 2004)

สารประกอบที่ 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุดและที่น่าสนใจคือ สารประกอบที่ 2 และ 3 เป็นสารอนุพันธ์ชนิดเดียวกันและมีความคล้ายคลึงกันทางด้านโครงสร้าง แต่ในทางตรงข้ามกลับไม่พบว่าสารประกอบที่ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่ 2 และ 3 พบว่า การแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 9 ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ควบคุมการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 10 ด้วยหมู่เมทอกซี (OCH<sub>3</sub>) จะส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่เคยมีมาก่อนหน้านี้แล้ว (Qing et al., 2017)

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารประกอบ 1-3

สารประกอบ	MIC (µg/mL)				
	<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	<i>B. subtilis</i> (ATCC6633)	MRSA (SK1)	<i>E. coli</i> (ATCC25922)	<i>P. auroginosa</i> (ATCC27853)
1	100	100	100	>200	>200
2	25	25	50	>200	>200
3	>200	>200	>200	>200	>200
Chloramphenicol	0.78125	0.78125	0.78125	0.78125	0.78125

>200 µg/mL = inactive.

## สรุปผลการวิจัย

สารประกอบทั้ง 3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบอะซีโตนจากลำต้นแดงน้ำ และตรวจสอบโครงสร้างได้เป็นสารอนุพันธ์อะพรอพินแอลคาลอยด์ คือ 6a,7-didehydrobulbocapnine methyl ether (1) และ สารอนุพันธ์ไพโรโทเบอร์บิรินแอลคาลอยด์ คือ 9-demethyloxypalmatine (2) และ 8,13-dioxo-14-hydroxytetrahydropalmatine (3) ซึ่งเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารประกอบที่มีการรายงานแล้วด้วย <sup>1</sup>H และ <sup>13</sup>C NMR งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากลำต้นแดงน้ำ พบว่าสารประกอบที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่สารประกอบที่ 3 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับต่ำหรือไม่แสดงฤทธิ์เลยต่อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบเหล่านี้พิสูจน์ให้เห็นว่าสามารถใช้พืชในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ทำการทดสอบกับแบคทีเรียในสายพันธุ์อื่นๆ

เพื่อวัดศักยภาพสำหรับพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัยและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือในงานวิจัยและความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการดำเนินการวิจัยจนคณะผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

Abdelfattah, M.S., Toume, K., Ahmed, F., Sadhu, S.K. and Ishibashi, M. (2010). Cucullamide, a new putrescine bisamide

- from *Amoora cucullata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 58: 1116–1118.
- Ahmed, F., Shahid, I.Z., Razzak, M.A., Rahman, M.M., Hoque, T., Rahman, M.T. and Sadhu, S.K. (2006). Free radical scavenging activity of some Mangroves available in Bangladesh. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 6: 58-64.
- Ahmed, F., Toume, K., Sadhu, S.K., Ohtsuki, T., Arai, M.A. and Ishibashi, M. (2010). Constituents of *Amoora cucullata* with TRAIL resistance-overcoming activity. Organic and Biomolecular Chemistry 8(16): 3696–3703.
- Basak, U.C., Das, A.B. and Das, P. (1996). Chlorophylls, carotenoids, proteins and secondary metabolites in leaves of 14 species of mangrove. Bulletin of Marine Science 58: 654-659.
- Boonyapraphat, N. and Chockchaicharaenphorn, C. (1998). Thai medicinal plants. Bangkok: Prachachon Ltd. 2: 157-160.
- Chen-Loung, C., Hou-Min, C. and Cowling, E.B. (1976). Aporphine alkaloids and lignans in heartwood of *Liriodendron tulipifera*. Phytochemistry 15: 547–550.
- Chumkaew, P., Kato, S. and Chantrapromma, K. (2006). Potent cytotoxic rocaglamide derivatives from the fruits of *Amoora cucullata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 54(9): 1344-1346.
- Chumkaew, P., Teerapongpisan, P., Pechwang, J. and Srisawat, T. (2019). New oxoprotoberberine and aporphine alkaloids from the roots of *Amoora cucullata* with their antiproliferative activities. Records of Natural Products 13(6): 491-498.
- Das, A.K., Shahid, I.Z., Ahmed, F., Moniruzzaman, M. and Masud, M.M. (2005). Central nervous system depressant activity of *Amoora cucullata* Roxb. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences 4(1): 37-42.
- Dong, J.W., Li, X.J., Cai, L., Shi, J.Y., Li, Y.F., Yang, C. and Li, Z.J. (2018). Simultaneous determination of alkaloids dicentrine and sinomenine in *Stephania epigeae* by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 160: 330-335.
- Duffy, C.F. and Power, R.F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents 17: 527-529.
- Ferdoushi, A., Sabrim, F., Hasan, M.N., Islam, K.D. and Billah, M.M. (2012). Antibacterial activity of methanolic extracts of the leaves and stem of *Amoora cucullata*. Data Science Journal 6(2): 35-38.
- Gerecke, M., Borer, R. and Brossi, A. (1976). Selective ether cleavage in the aporphine series. Conversion of (S)-bulbocapnine into (S)-corytuberine and (S)-corydine methyl ether. Helvetica Chimica Acta 59: 2551-2557.
- Huang, Q., Chen, J., Zhang, W., Zhou, B., Zhang, C., Gerwick, W.H. and Cao, Z. (2018). Alkaloids from *Corydalis decumbens* suppress neuronal excitability in primary cultures of mouse neocortical neurons. Phytochemistry 150: 85-92.
- Inui, S., Hosoya, T., Shimamura, Y., Masuda, S., Ogawa, T., Kobayashi, H., Shirafuji, K., Moli, R.T., Kozono, I., Shinya, K. and Kumazawa, S. (2012). Solophenols B–D and solomonin: New prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the Solomon islands and their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 11765–11770.
- Lyu, H.N., Zeng, K.W., Cao, N.K., Zhao, M.B., Jiang, Y. and Tu, P.F. (2018). Alkaloids from the stems and rhizomes of *Sinomenium acutum* from the Qinling mountains, China. Phytochemistry 156: 241-249.
- Miró-Canturri, A., Ayerbe-Algaba, R. and Smani, Y. (2019). Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. Frontiers in Microbiology 10(41): 1-12.
- Paz, E.A., Cerdeiras, M.P., Fernandez, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vázquez, A., Vero, S. and Zunino, L. (1995). Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 45: 67-70.
- Pinho, P.M.M., Pinto, M.M.M., Kijjoa, A., Pharadai, K., Diaz, J.G. and Herz, W. (1992). Protoberberine alkaloids from *Coscinium fenestratum*. Phytochemistry 31: 1403-1407.
- Promchai, T., Jaidee, A., Cheenpracha, S., Trisuwan, K., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S., Laphookhieo, S., Pyne, S.G. and Ritthiwigrom, T. (2016). Antimalarial oxoprotoberberine alkaloids from the leaves of *Milium cuneata*. Journal of Natural Products 79: 978–983.
- Qing, Z.X., Yang, P., Tang, Q., Cheng, P., Liu, X.B., Zheng, Y., Liu, Y.S. and Zeng, J.G. (2017). Isoquinoline alkaloids and their antiviral, antibacterial, and antifungal activities

- and structure-activity relationship. *Current Organic Chemistry* 21: 1-15.
- Rahman, M.S., Chowdhury, R., Begum, B., Rahman, K.M. and Rashid, M.A. (2005). Phytochemical studies of *Amoora cucullata*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 203.
- Verpoorte, R., Siwon, J., Tiekens, M.E.M. and Svendsen, A.B. (1981). Studies on Indonesian medicinal plants. V. The alkaloids of *Anamirta cocculus*. *Journal of Natural Products* 44: 221-224.
- Vlietinck, A.J., Van Hoof, L., Totté, J., Lasure, A., Berghe, D.V., Rwangabo, P.C. and Mvukiyumwami, J. (1995). Screening of hundred rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 31-47.
- Westh, H., Zinn, C.S., Rosdahl, V.T. and Sarisa Study Group. (2004). An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microbial Drug Resistance* 10: 169-176.
- Xu, W.H., Su, X.M., Wang, C., Du, F. and Liang, Q. (2019). The genus *Amoora*: A phytochemical and pharmacological review. *Fitoterapia* 137: 1-13.

