โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและผลการเสริมฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คัดเลือก

Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Selected Natural Products

ชื่อนิสิต นางสาวบุณยนุช โหลยค้า

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและผลการเสริมฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คัดเลือก

Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Selected Natural Products

โดย

นางสาวบุณยนุช โหลยค้า

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

โครงการ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและผลการเสริมฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คัดเลือก

โดย นางสาวบุณยนุช โหลยค้า

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและผลการเสริมฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คัดเลือก
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวบุณยนุช โหลยค้า เลขประจำตัว 5633097323
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สารที่คัดเลือกมาทดสอบทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ สารที่มีขายทางการค้า 1 สาร ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย 8 สาร สารที่ได้จากการสังเคราะห์ 2 สาร และสารอื่นๆที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 6 สาร ได้ตรวจสอบโครงสร้างสารที่แยกและที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิค ^{1}H NMR สเปกโทรสโกปี สาร 7 ชนิด ได้แก่ 6,8-dibromochrysin, 6,8-diiodochrysin, **α**-mangostin, mansonone G, allyl ether mansonone G, anacardic acid และ usnic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ให้ค่า MIC 0.98-125 μM เมื่อศึกษาผลการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 6,8-dibromochrysin และ 6,8-diiodochrysin กับยาปฏิชีวนะ tetracycline พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กัน เพิ่มประสิทธิภาพของ tetracycline ได้มากขึ้น 8 เท่าในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* นอกจากนี้ได้ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) พบว่าสาร 3 ชนิดให้ผลยับยั้งที่ดี ได้แก่ **α**-mangostin, mansonone G และ usnic acid ด้วยค่า MIC 7.81-125 μM

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, ผลเสริมฤทธิ์, MRSA

Title Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Selected Natural Products

Student name Miss Boonyanut Lhoyka ID 5633097323

Advisor name Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2016

Abstract

This research aims to search for new potent antibacterial agents. Seventeen compounds including one compound from commercial source, eight compounds isolated from plants, two synthetic compounds and six compounds from natural products research unit were collected and tested for antibacterial activity. All isolated and synthesized compounds were elucidated by ^{1}H NMR spectroscopy. Seven compounds namely 6,8-dibromochrysin, 6,8-diiodochrysin, α-mangostin, mansonone G, allyl ether mansonone G, anacardic acid and usnic acid displayed excellent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* with MIC of 0.98-125 μM. In addition, in combination with antibiotic tetracycline, 6,8-dibromochrysin and 6,8-diiodochrysin exhibited potent synergistic effect, 8-fold increase of tetracycline, against *S. aureus*. Furthermore, three compounds namely α-mangostin, mansonone G and usnic acid revealed potent antibacterial activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with MIC 7.81-125 μM.

keyword: antibacterial activity, synergistic effect, MRSA

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการแยกและการสังเคราะห์สารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ผู้วิจัยได้ศึกษาข้อมูล สังเคราะห์ วิเคราะห์ผล และจัดทำรายงานฉบับนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้อ่านและผู้ที่จะทำงานวิจัยต่อไป งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ดังนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ตั้งแต่เริ่มค้นคว้าข้อมูล วิธีการทดลอง รวมถึงวิธีแก้ปัญหา ตลอดจนการเขียนงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์ โครงการนี้จะเกิดขึ้นและสำเร็จไม่ได้หากไม่มีท่าน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี และนางสาวธันยพร วิวรรธน์อภินัย ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้คำแนะนำ ความรู้ และความช่วยเหลือในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ วชิรวงศ์กวิน และอาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน ที่ให้ความกรุณาสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบโครงการนี้ รวมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อผิดพลาด จนรายงานฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ และประสบการณ์ อันมีประโยชน์ตลอด 4 ปี และสามารถนำมาปรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆในห้องปฏิบัติการ WC ที่ให้คำแนะนำ ความรู้ และความช่วยเหลือ รวมถึงพี่ๆเพื่อนๆทุกคนที่เกี่ยวข้องสำหรับความช่วยเหลือในทุกเรื่อง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องสาว และครอบครัว ที่สนับสนุนทุกๆเรื่องในการศึกษา ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปประกอบ	ฌ
สารบัญตารางประกอบ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	1
1.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	4
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	7
2.2 สารเคมี	7
2.3 สารที่ใช้ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	7
2.3.1 สารที่มีขายทางการค้า	7
2.3.2 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย	7
2.3.3 สารที่ได้จากการสังเคราะห์	7
2.3.4 สารอื่นๆที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	7
2.4 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร	8
2.4.1 การแยก α-mangostin (**2**) จากเปลือกมังคุด *Garcinia mangostana* Linn.	8
2.4.2 การแยก embelin (**3**) จากผลพิลังกาสา *Ardisia colorata* Roxb.	8
2.4.3 การแยก mansonone G (**4**) จากเนื้อไม้จันทน์ชะมด *Mansonia gagei* Drumm.	9
2.4.4 การแยก anacardic acid (**5**) และ cardanol (**6**) จากของเหลวที่ได้จากเปลือกผลมะม่วงหิมพานต์ (Cashew nut shell liquid; CNSL) *Anacardium occidentale* Linn.	9
2.4.5 การแยก curcumin (**7**), demethoxycurcumin (**8**) และ bisdemethoxycurcumin (**9**) จากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn.	10

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.5 สารที่มีขายทางการค้าและสารอื่นๆที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	11
2.6 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร	12
2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	12
2.7.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ	12
2.7.2 การคัดกรองหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion	12
2.7.3 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารที่ใช้ทดสอบ โดยวิธี resazurin microtiter plate	13
2.7.4 การศึกษาผลเมื่อใช้สารออกฤทธิ์ 2 ชนิดร่วมกันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี checkerboard dilution	13
2.7.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารบางชนิด	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	
3.1 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้	15
3.1.1 การแยก **α**-mangostin (**2**) จากเปลือกมังคุด *Garcinia mangostana* Linn.	15
3.1.2 การแยก embelin (**3**) จากผลพิลังกาสา *Ardisia colorata* Roxb.	17
3.1.3 การแยก mansonone G (**4**) จากเนื้อไม้จันทน์ชะมด *Mansonia gagei* Drumm.	18
3.1.4 การแยก anacardic acid (**5**) และ cardanol (**6**) จากของเหลวที่ได้จากเปลือกผลมะม่วงหิมพานต์ (Cashew nut shell liquid; CNSL) *Anacardium occidentale* Linn.	19
3.1.5 การแยก curcumin (**7**), demethoxycurcumin (**8**) และ bisdemethoxycurcumin (**9**) จากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn.	22
3.2 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้	26
3.3 สารตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	27
3.4 การคัดกรองหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion	28

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.5 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารที่ใช้ทดสอบ โดยวิธี resazurin microtiter plate	30
3.6 การศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธี checkerboard dilution	31
3.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารบางชนิด	32
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	
4.1 สรุปผลการทดลอง	34
4.2 งานวิจัยในอนาคต	34
เอกสารอ้างอิง	35
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	5
3.1	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **2**	16
3.2	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **3**	17
3.3	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **4**	19
3.4	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **5**	20
3.5	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **6**	21
3.6	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **7**	22
3.7	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **8**	23
3.8	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **9**	23
3.9	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **1a**	25
3.10	^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **1b**	26
3.11	โครงสร้างและชื่อสารที่ใช้ทดสอบ	27
3.12	ผลการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร **1a** หรือ **1b** กับ tetracycline	31

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

3.1 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **2** เทียบกับ **α**-mangostin[10] 16

3.2 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **3** เทียบกับ embelin[11] 18

3.3 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **4** เทียบกับ mansonone G[12] 19

3.4 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **5** และ **6** เทียบกับ anacardic acid[13] และ cardanol[14] 21

3.5 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **7**, **8** และ **9** เทียบกับ curcumin[15], demethoxycurcumin[15] และ bisdemethoxycurcumin[15] 24

3.6 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **1a** และ **1b** เทียบกับ 6,8-dibromochrysin[16] และ 6,8-diiodochrysin[16] 26

3.7 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางขอสารที่นำมาทดสอบ 29

3.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 30

3.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA 32

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียหลายชนิดดำรงชีวิตอยู่บนร่างกายมนุษย์ เช่น อาศัยอยู่บนผิวหนัง ในช่องปากและทางเดินอาหารโดยไม่ก่อให้เกิดโรค เรียกว่า เชื้อประจำถิ่น (normal flora) ช่วยรักษาสภาวะสมดุลและสภาวะแวดล้อมในอวัยวะเหล่านั้น นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโทษแก่ร่างกาย เช่น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และแบคทีเรียในช่องปากที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ เป็นต้น ร่างกายมนุษย์มีวิธีป้องกันไม่ให้ติดเชื้อแบคทีเรียได้หลายทาง ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียก็สามารถพัฒนาตัวเองให้รุกรานเข้าสู่ร่างกายมนุษย์โดยกลไกต่าง ๆ ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหลากหลาย ทำให้เพิ่มทั้งอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายมากขึ้น

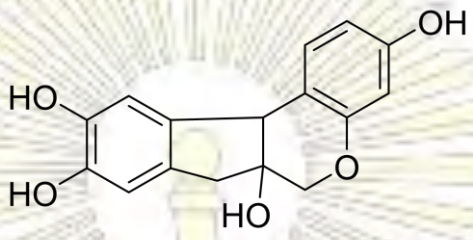
ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ใช้ทั่วไปส่วนใหญ่ได้จากการหมักจุลชีพชนิดหนึ่ง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลชีพอีกกลุ่มหนึ่ง การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่ปัจจุบันพบว่าการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบไปทั่วโลก ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่าง ๆ เพื่อขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จนไม่สามารถพัฒนายาใหม่ ๆขึ้นมาได้ทัน[1]

การหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่น ๆหรือสารสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ หรือใช้แทนยาปฏิชีวนะ เพื่อเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั่วไปและเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจศึกษาและพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีความหลากหลาย ทำให้มีโอกาสแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ นอกจากนี้สารที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ลำต้น กิ่งก้าน ผล ใบ ยาง ดอก เป็นต้น เป็นสารเมแทบอไลต์ชนิดทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มีราคาถูก หาง่าย และส่งผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อย

1.2 การทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

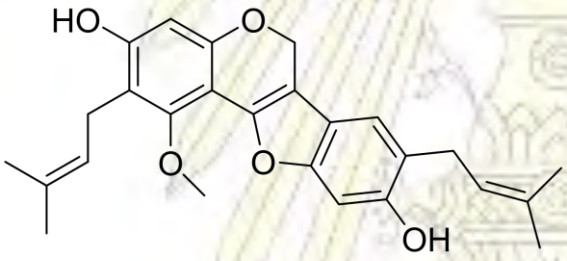
ปัจจุบันมีรายงานผลการทดลองจำนวนมากที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น

ในปี 2004 Xu และ Lee[2] พบว่าสารสำคัญที่ได้จากสิ่งสกัดจากฝาง *Caesalpina sappan* คือ brazilin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะได้ดีมาก โดยเฉพาะ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE) และ multi-drug resistant *Burkholderia cepacia* ให้ค่า MIC 4-32 µg/mLจากผลการวิจัยคาดว่าสารนี้สามารถพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะได้

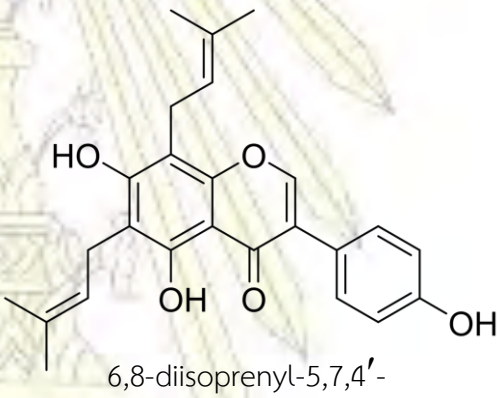


brazilin

ในปี 2005 He และคณะ[3] พบว่าสารสำคัญที่แยกได้จากสิ่งสกัดเอทานอลของรากชะเอมจีน *Glycyrrhiza uralensis* คือ glycyrrhizol A และ 6,8-diisoprenyl-5,7,4′-trihydroxyisoflavone มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ให้ค่า MIC 1 และ 2 µg/mL ตามลำดับ

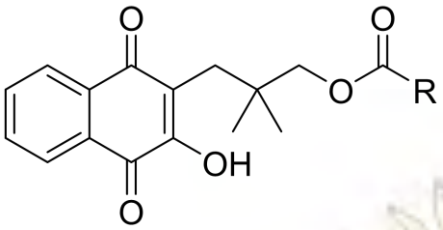


glycyrrhizol A

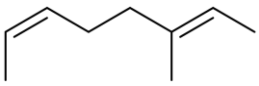


6,8-diisoprenyl-5,7,4′-trihydroxyisoflavone

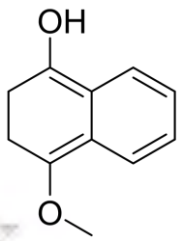
ในปี 2006 Siripong และคณะ[4] พบว่าสิ่งสกัดเฮกเซนและคลอโรฟอร์มของใบและรากทองพันชั่ง *Rhinacanthus nasutus* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อแยกสิ่งสกัดดังกล่าว ได้สารสำคัญ 3 ชนิด คือ Rhinacanthins-C, -N และ -Q สารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย β-hemolytic streptococci, enterococci และ staphylococci ได้ดีเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ gentamicin



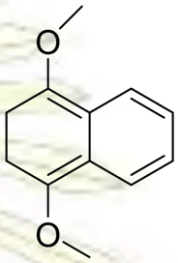
Rhinacanthins-C R =



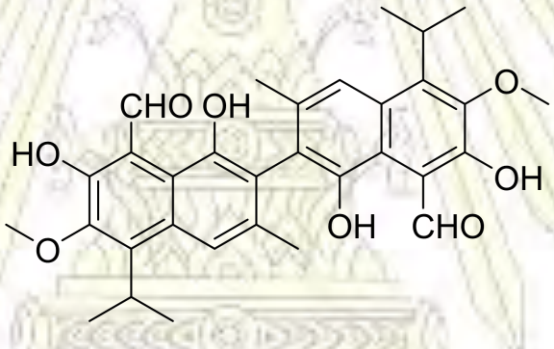
Rhinacanthins-N R =



Rhinacanthins-Q R =

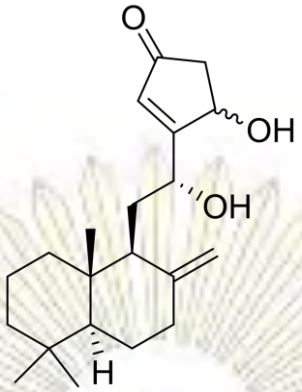


ในปี 2008 Boonsri และคณะ[5] พบว่าเมื่อแยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของแก่นไม้ต้นโพทะเล *Thespesia populnea* พบสาร (+)-6,6′-methoxygossypol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ให้ค่า MIC 1.17, 2.34 และ 4.69 µg/mL ตามลำดับ



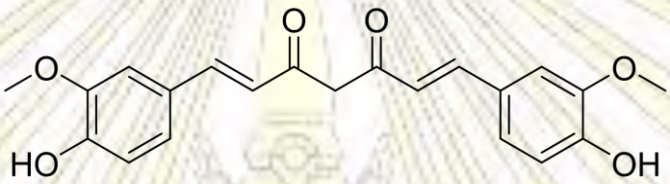
(+)-6,6′-methoxygossypol

ในปี 2015 Corlay และคณะ[6] พบว่าสารสำคัญจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของใบต้นตีนนกเขา *Vitex vestita* คือ vitexolide A มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 46 ชนิด MIC 6-96 µM



vitexolide A

ในปี 2016 Betts และคณะ[7] ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันเมื่อใช้ curcumin ผสมกับยาปฏิชีวนะ polymyxin B พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (multidrug resistant; MDR)

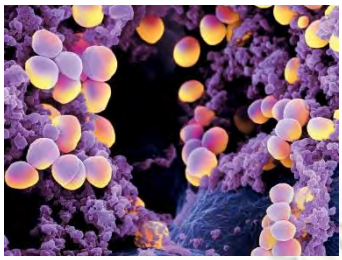


curcumin

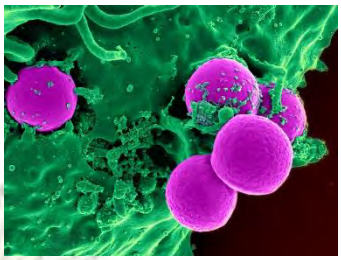
จากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีมาก สามารถพัฒนาไปเป็นยาปฏิชีวนะได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและหาสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดี และศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergism) ของสารเมื่อผสมกับยาปฏิชีวนะเพื่อเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย การออกฤทธิ์เสริมกัน คือการใช้สารร่วมกันในสัดส่วนที่พอเหมาะ นอกจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแบบทวีคูณ ยังเป็นการลดปริมาณการใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือลดปริมาณการใช้สารทั้งสองชนิดลง ซึ่งจะส่งผลต่อสุขภาพของผู้ป่วย ลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาและลดต้นทุนการผลิต

1.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

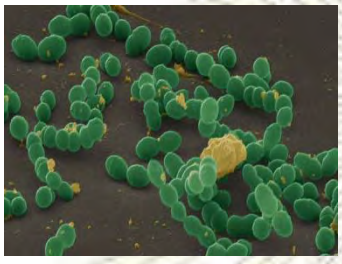
แบคทีเรียที่เลือกมาศึกษามี 4 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง 1 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Streptococcus sobrinus* KCCM 11898[8] และแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา 1 ชนิด คือ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ดัง**รูปที่ 1.1**



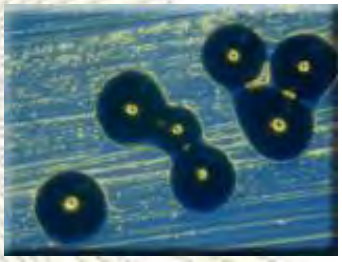
S. aureus



MRSA



S. mutans



S. sobrinus

รูปที่ 1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างทรงกลม สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่แม้จะมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย แต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์

เชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อบนผิวหนังโดยเฉพาะโรคฝีหนอง นอกจากนี้ยังพบได้ทั่วไปตามร่างกายคน เชื้อ *S. aureus* ที่พบในโรงพยาบาลมักก่อให้เกิดโรคในลักษณะเชื้อฉวยโอกาส เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยที่อ่อนแอ หรือมีบาดแผล และก่อให้เกิดโรคได้

Streptococcus mutans (*S. mutans*) และ *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*)

S. mutans เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างทรงกลม เจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน *S. sobrinus* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างทรงกลม เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์

เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดพบได้ทั่วไปในช่องปากโดยเฉพาะที่ผิวฟัน และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ฟันผุ พบได้บ่อยในวัยเด็กและวัยรุ่น ก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิล์มที่ผิวฟัน นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดยังสามารถสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลและทนกรดได้ดี กรดที่เชื้อสร้างขึ้นภายในช่องปากจะไปสลายผิวฟันเป็นผลให้เกิดฟันผุตามมา

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

เป็นสายพันธุ์หนึ่งของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่สามารถทนหรือดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเมทิซิลินได้ ทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรง รักษาหายได้ยาก เนื่องจากการดื้อยา และทำให้มีอัตราเสี่ยงต่อ

การเสียชีวิตสูง ดังนั้นในการรักษาอาจจะต้องใช้ยาที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น fosfomycin หรือ vancomycin ซึ่งอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย[9]

งานวิจัยนี้คัดเลือกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์อย่างสุ่มจำนวน 17 ชนิด มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* KCCM 11898 และเลือกสารที่ให้ฤทธิ์เบื้องต้นน่าสนใจไปศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันเมื่อผสมกับยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 นอกจากนี้ยังศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา MRSA ด้วย

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.4.1 หาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สนใจ

1.4.2 ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ

1.4.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา MRSA

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชั่งสารด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล ยี่ห้อ PRECISION รุ่น XT 200A, ทินแลร์โครมาโทกราฟี (TLC) ใช้แผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (Merck Kieselgel 60 PF_{254}), คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุซิลิกาเจล N_0 7734, เครื่องระเหยแบบหมุน ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-114, เครื่องกรองสุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-35, ^1H NMR สเปกตรัมบันทึกด้วยเครื่อง Bruker Advance II 400 MHz Spectrometer และ Varian model Mercury +400 Spectrometer ที่ความถี่ 400 MHz ใช้ chloroform-d ($CDCl_3$) และ deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d_6) เป็นตัวทำละลาย และ tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง

2.2 สารเคมี

สารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ ซื้อมาจากบริษัท Merck, Sigma-Aldrich และ Fluka ซึ่งนำมาใช้โดยตรง ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีก

2.3 สารที่ใช้ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม

2.3.1 สารที่มีขายทางการค้า 1 สาร ได้แก่ chrysin (**1**)

2.3.2 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย 8 สาร ได้แก่ α-mangostin (**2**), embelin (**3**), mansonone G (**4**), anacardic acid (**5**), cardanol (**6**), curcumin (**7**), demethoxycurcumin (**8**) และ bisdemethoxycurcumin (**9**)

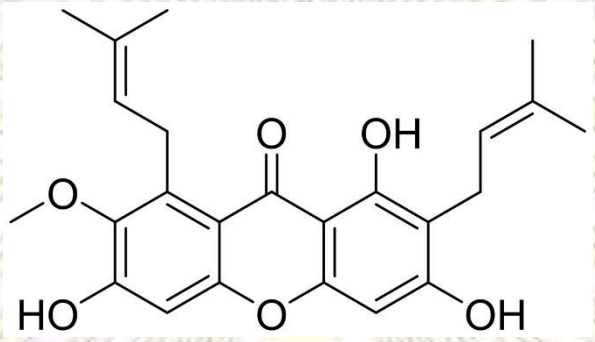
2.3.3 สารที่ได้จากการสังเคราะห์ 2 สาร ได้แก่ 6,8-dibromochrysin (**1a**) และ 6,8-diiodochrysin (**1b**)

2.3.4 สารอื่นๆที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 6 สาร ได้แก่ octyl ether mansonone G (**4a**), allyl ether mansonone G (**4b**), berberine (**10**), usnic acid (**11**), atranorin (**12**) และ methyl β-orcinolcarboxylate (**13**)

2.4 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

2.4.1 การแยก α-mangostin (2) จากเปลือกมังคุด *Garcinia mangostana* Linn.

แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตของเปลือกมังคุด 5.0 กรัม ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทน และ 5% เอทิลแอซีเทตในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ แยกสารได้ทั้งหมด 6 ส่วนย่อย (A_1-A_6) ตรวจส่วนย่อยด้วย TLC พบว่าส่วนย่อย A_3 และ A_4 เป็น α-mangostin (**2**) ปริมาณรวม 3.10 กรัม

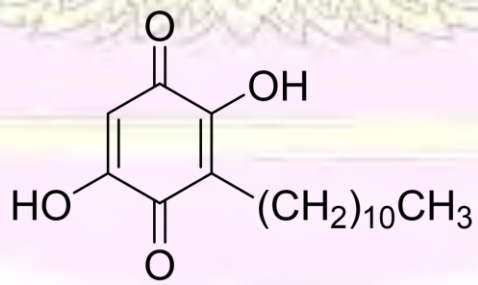


สาร **2**

α-mangostin (**2**): ของแข็งสีเหลือง (62% คิดเทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตที่นำมาแยก), R_f 0.56 (ไดคลอโรมีเทน-เอทิลแอซีเทต; 9-1), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 13.79 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.33-5.27 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.72 (s, 3H)

2.4.2 การแยก embelin (3) จากผลพิลังกาสา *Ardisia colorata* Roxb.

สกัดผลพิลังกาที่บดละเอียด 1,000 กรัม ด้วยเฮกเซนโดยใช้เครื่องมือ soxhlet ระเหยสิ่งสกัดเฮกเซนที่ได้ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนให้มีปริมาตรของสารละลายลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ได้ตะกอนสีส้ม กรองตะกอน ตกผลึกตะกอนด้วยเมทานอล จะได้ embelin (**3**) 7.03 กรัม

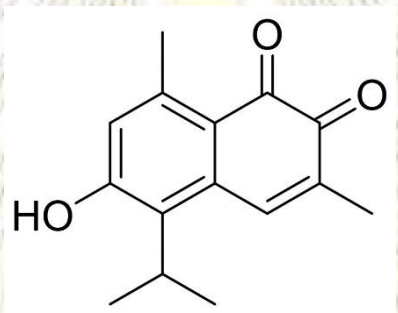


สาร **3**

embelin (**3**): ของแข็งสีส้ม (0.7% คิดเทียบจากผลพิลังกาสาที่นำมาสกัด), R_f 0.35 (โพรพานอล-แอมโมเนีย; 7-3), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm): 7.71 (s, 2H), 6.03 (s, 1H), 2.47 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.28 (m, 16H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H)

2.4.3 การแยก mansonone G (4) จากเนื้อไม้จันทน์ชะมด *Mansonia gagei* Drumm.

แช่เนื้อไม้จันทน์ชะมดที่บดละเอียด 5 กิโลกรัม ในเอทิลแอซีเทตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน กรองและระเหยตัวทำละลายออก สกัดซ้ำด้วยเอทิลแอซีเทต ได้สิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตสีน้ำตาลดำ 260 กรัม (5.2% yield) แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตจำนวน 260 กรัม ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสมเอทิลแอซีเทตในเฮกเซน (20%) จากนั้น (25-80%), เอทิลแอซีเทต (100%), เมทานอลในเอทิลแอซีเทต (5-10%) และเมทานอล (100%) ตามลำดับ เก็บส่วนย่อย ๆละ 500 มิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (**B_1-B_9**) ตรวจแต่ละส่วนย่อยด้วย TLC พบว่าส่วนย่อย **B_3** และ **B_4** เป็น mansonone G (**4**) ปริมาณรวม 8.9 กรัม



สาร **4**

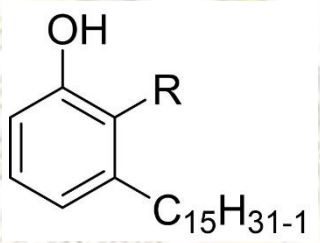
mansonone G (**4**): ของแข็งสีน้ำตาลแดง (3.4% คิดเทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต), R_f 0.19 (เฮกเซน-เอทิลแอซีเทต; 7-3), ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) 10.73 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.63-3.56 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H)

2.4.4 การแยก anacardic acid (5) และ cardanol (6) จากของเหลวที่ได้จากเปลือกผลมะม่วงหิมพานต์ (Cashew nut shell liquid; CNSL) *Anacardium occidentale* Linn.

ละลาย CNSL 50 กรัม ใน 5% เมทานอล 300 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 25 กรัม คนต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะได้ตะกอน calcium anacardate ตรวจสอบด้วย TLC เพื่อยืนยันว่าไม่มี CNSL เหลืออยู่ กรองตะกอน calcium anacardate และล้างตะกอนด้วยเมทานอลเย็น 200 มิลลิลิตร ภายใต้เครื่องระเหยสุญญากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บสารละลายเมทานอลที่ได้จากการกรองไปแยก cardanol (**6**) ต่อไป

ละลาย calcium anacardate 50 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติม 33-35% กรดไฮโดรคลอริก 45 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดสารละลายด้วยเอทิลแอซีเทต 150 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น กำจัดน้ำออกด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต ระเหยให้แห้งจะได้ของผสม anacardic acid (**5**) 26.9 กรัม

ระเหยเมทานอลที่ได้จากการกรอง calcium anacardate ให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ สกัดสารที่ได้ด้วยเอทิลแอซีเทต 150 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำชั้นสารอินทรีย์มาทำให้แห้งด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต ทำสารสกัดให้เข้มข้น โดยวิธีระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ แยกสารที่ได้ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ จะได้ cardanol (**6**) 0.85 กรัม



สาร **5**: R = COOH

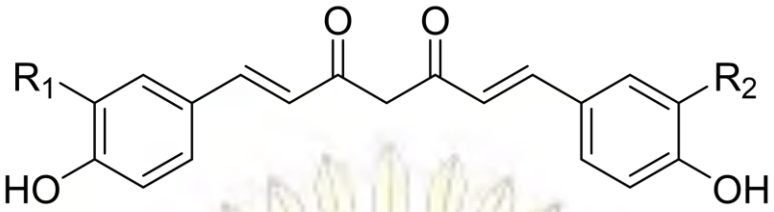
สาร **6**: R = H

anacardic acid (**5**): ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง (53.8% คิดเทียบจาก CNSL), R_f 0.88 (เฮกเซน-ไดเอทิลอีเทอร์; 3-2), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.88-4.98, 3.02-0.88

cardanol (**6**): ของเหลวหนืดสีเหลือง (1.7% คิดเทียบจาก CNSL), R_f 0.75 (เฮกเซน-ไดเอทิลอีเทอร์; 3-2), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.87-4.97, 2.84-0.86

2.4.5 การแยก curcumin (7), demethoxycurcumin (8) และ bisdemethoxycurcumin (9) จากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn.

แช่ผงขมิ้นชัน 5 กิโลกรัมด้วยเฮกเซน เอทิลแอซีเทต และเมทานอล ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ทำสิ่งสกัดให้เข้มข้น โดยวิธีระเหยภายใต้ความดันต่ำ จะได้สิ่งสกัดเฮกเซน 350 กรัม สิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต 1000 กรัม และสิ่งสกัดเมทานอล 410 กรัม แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต 100 กรัม ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์แบบเร็ว เริ่มชะด้วยเฮกเซนในเอทิลแอซีเทต (30%) ทำซ้ำ 3 ครั้ง ค่อยๆเพิ่มขั้วตัวทำละลายด้วยเอทิลแอซีเทต เก็บส่วนย่อยได้ 7 ส่วน (C_1-C_7) แยกส่วนย่อย C_3 ซ้ำ โดยชะคอลัมน์ด้วย ไดคลอโรมีเทนในเมทานอล (3%) จะได้ curcumin (**7**) 3.02 กรัม , demethoxycurcumin (**8**) 0.64 กรัม และ bisdemethoxycurcumin (**9**) 0.32 กรัม



สาร **7:** $R_1 = R_2 = OCH_3$

สาร **8:** $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$

สาร **9:** $R_1 = R_2 = H$

curcumin (**7**): ของแข็งสีส้ม (3.0% คิดเทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต), R_f 0.52 (ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล; 9.5-0.5), ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) 9.69 (s, 2H), 7.55 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 3.84 (s, 6H)

demethoxycurcumin (**8**): ของแข็งสีส้ม (0.6% คิดเทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต), R_f 0.40 (ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล; 9.5-0.5), ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) 10.09 (s, 2H), 7.56 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 16 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 3.83 (s, 3H)

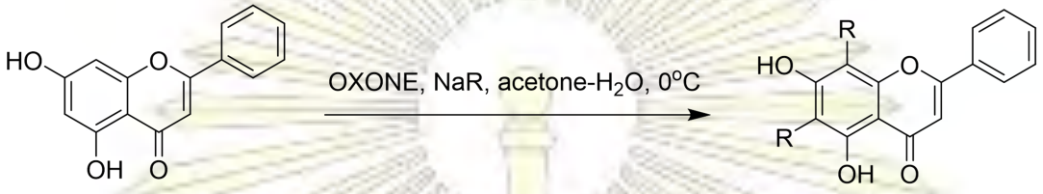
bisdemethoxycurcumin (**9**): ของแข็งสีส้ม (0.3% คิดเทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต), R_f 0.33 (ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล; 9.5-0.5), ^{1}H NMR (400 MHz DMSO-d_6) δ_H (ppm) 10.11 (s, 2H), 7.56 (d, *J* = 12 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 16 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 6.03 (s, 2H)

2.5 สารที่มีขายทางการค้าและสารอื่นๆที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เลือกสารที่มีขายทางการค้าที่สนใจ 1 สาร คือ chrysin (**1**) และสารที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 6 สาร ได้แก่ berberine (**10**) แยกได้จากแห้ม *Coscinium fenestratum* Colebr., usnic acid (**11**) แยกได้จากไลเคน *Usnea aciculifera*, atranorin (**12**) และ methyl β-orcinolcarboxylate (**13**) แยกได้จากไลเคน *Usnea barbata*, octyl ether mansonone G (**4a**) และ allyl ether mansonone G (**4b**) ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ mansonone G (**4**)

2.6 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

สังเคราะห์อนุพันธ์ของ chrysin (**1**) โดยละลาย chrysin 5 mmol และ sodium halide (NaBr หรือ NaI) 11 mmol ด้วยตัวทำละลายผสมแอซีโทน-น้ำ (5:1) 30 mL ทำให้เย็นแล้วค่อยๆ เติมสารละลาย OXONE 11 mmol ในน้ำ 20 mL อย่างช้าๆ คนสารละลายเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง กำจัดธาตุแฮโลเจนที่เหลือจากปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว $Na_2S_2O_3$ ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยน้ำ แล้วตกผลึกด้วยเมทานอล



1 **1a**: R = Br **1b**: R = I

6,8-dibromochrysin (**1a**): ของแข็งสีเขียวอ่อน (80% คิดเทียบจาก chrysin), R_f 0.76 (คลอโรฟอร์ม-เมทานอล; 20-1), ^{1}H NMR (400 MHz DMSO-d_6) δ_H (ppm) 13.65 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 7.07 (s, 1H)

6,8-diiodochrysin (**1b**): ของแข็งสีเหลืองอ่อน (77% คิดเทียบจาก chrysin), R_f 0.74 (คลอโรฟอร์ม-เมทานอล; 20-1), ^{1}H NMR (400 MHz DMSO-d_6) δ_H (ppm) 8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 3H), 7.17 (s, 1H)

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2.7.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง 1 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Streptococcus sobrinus* KCCM 11898 และแบคทีเรียดื้อยา 1 ชนิด คือ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลว Muller-Hinton broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นแบคทีเรียให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 CFU/mL) ด้วย normal saline แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $5x10^5$ CFU/mL

2.7.2 การคัดกรองหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion

เลือกสารที่สนใจ 17 ชนิด มาคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* KCCM 11898 โดยวิธี agar well diffusion

เทอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น Muller-Hinton agar ลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นใช้ที่เจาะปลอดเชื้อเจาะลงไปในวุ้นเพื่อทำหลุมสำหรับใส่สาร นำไม้ที่พันด้วยสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในแบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยง ทาลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปิเปตสารที่มีความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดลองซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง ตรวจผลโดยวัดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญ

การอ่านผล: วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้นทั้งแนวตั้งและแนวนอน นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ถ้าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นมีค่า < 6 มิลลิเมตร สารไม่มีฤทธิ์ยับยั้งกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ, 6.1-8.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้น้อย, 8.1-10.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ปานกลาง, 10.1-13.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดี, 13.1-15.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีมาก และ >15 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด

2.7.3 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารที่ใช้ทดสอบ โดยวิธี resazurin microtiter plate

คัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดจากข้อ 2.7.2 โดยพิจารณาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นมากกว่า 15 มิลลิเมตร จาก 2 ใน 3 ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ นำสารที่ผ่านเกณฑ์มาละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และอาหารเหลว Muller-Hinton broth ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 µM เจือจางโดยวิธี 2-fold dilution ด้วยอาหารเหลวลงใน 96 well plate ใส่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม resazurin ปริมาตร 30 µL ลงแต่ละหลุม นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าหลุมควบคุมบวกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของหลุมที่ resazurin ไม่เปลี่ยนสีหรือเป็นสีน้ำเงิน คือค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

หลังจากได้ค่า MIC ของสาร ทำการปิเปตสารละลายเชื้อในแต่ละหลุม ที่มีความเข้มข้นมากกว่า MIC ขึ้นไป มาทาบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารวุ้น Muller-Hinton agar นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยความเข้มข้นของสารบนจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญ คือค่า minimum bactericidal concentration (MBC)

2.7.4 การศึกษาผลเมื่อใช้สารออกฤทธิ์ 2 ชนิดร่วมกันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี checkerboard dilution

เลือกสารที่สนใจ คือ 6,8-dibromochrysin (**1a**) และ 6,8-diiodochrysin (**1b**) มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracycline ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923

ละลายสารตัวแรกใน DMSO และอาหารเหลว Muller-Hinton broth ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 500 μM เจือจางโดยวิธี 2-fold dilution ด้วยอาหารเหลวลงใน 96 well plate ในแต่ละแถว (แนวแกน X) ของ plate สารอีกชนิดหนึ่งทำเช่นเดียวกับตัวแรกแต่ทำลงใน 96 well plate ตามแนวคอลัมน์ (แนวแกน Y) จากนั้นใส่เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม resazurin ปริมาตร 30 μL ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าหลุมควบคุมบวกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วดูค่า MIC ที่ได้

2.7.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารบางชนิด

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ทั่วไป ได้แก่ 6,8-dibromochrysin (**1a**), 6,8-diiodochrysin (**1b**), α-mangostin (**2**), mansonone G (**4**), anacardic acid (**5**), bisdemethoxycurcumin (**9**) และ usnic acid (**11**) มาหาค่า MIC และค่า MBC ด้วยวิธี resazurin microtiter plate เช่นเดียวกับข้อ 2.7.3

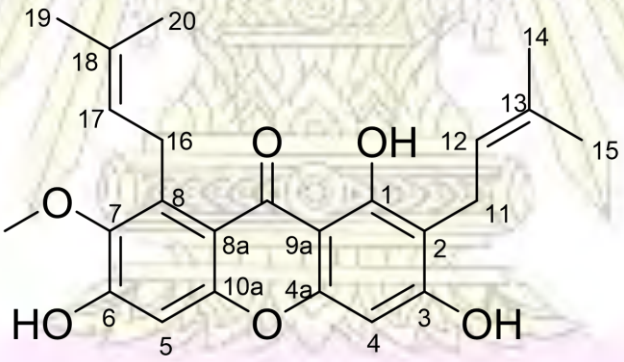
บทที่ 3
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มาจากทั้งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ และศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันเมื่อใช้สารดังกล่าวผสมกับยาปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้มี 4 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง 1 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปาก 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Streptococcus sobrinus* KCCM 11898 และแบคทีเรียดื้อยา 1 ชนิด คือ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

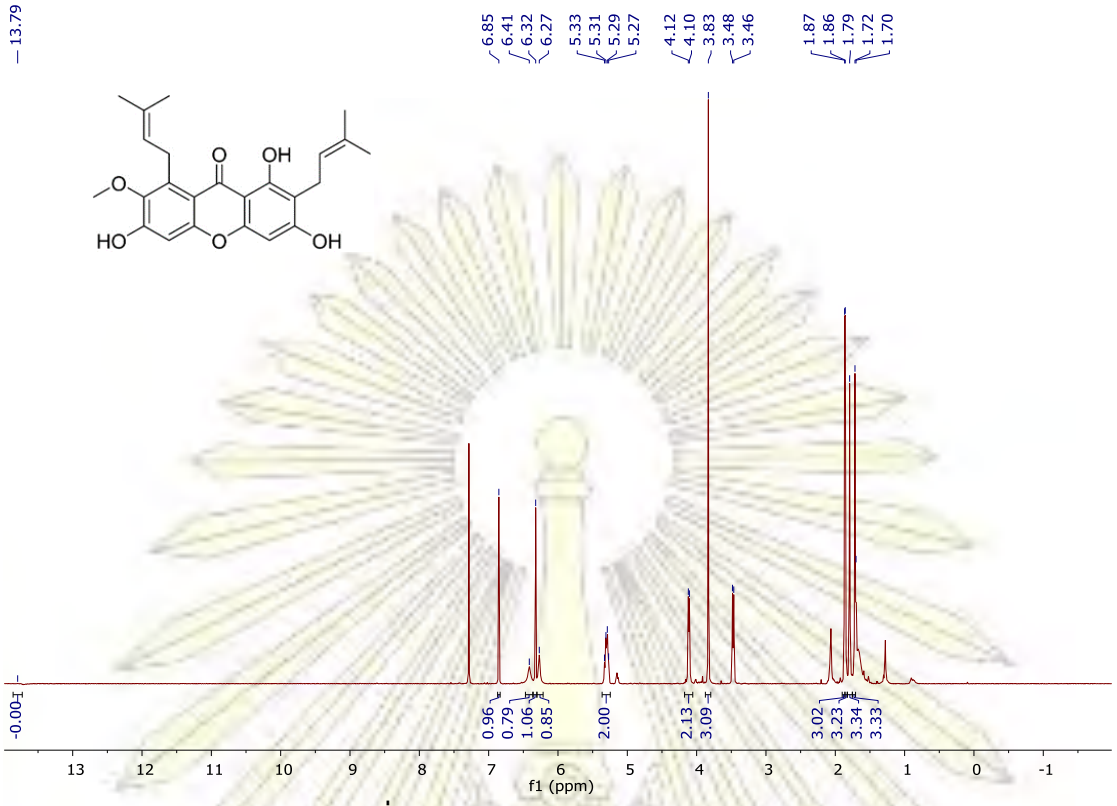
3.1 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้

3.1.1 การแยก α-mangostin (2) จากเปลือกมังคุด *Garcinia mangostana* Linn.

แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตของเปลือกมังคุดด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ได้ของแข็งสีเหลือง คิดเป็น 62% yield เทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตที่นำมาแยก เมื่อนำมาตรวจสอบโครงสร้างสารด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.1** และพิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.1** ยืนยันได้ว่าสาร **2** คือ α-mangostin



สาร **2**



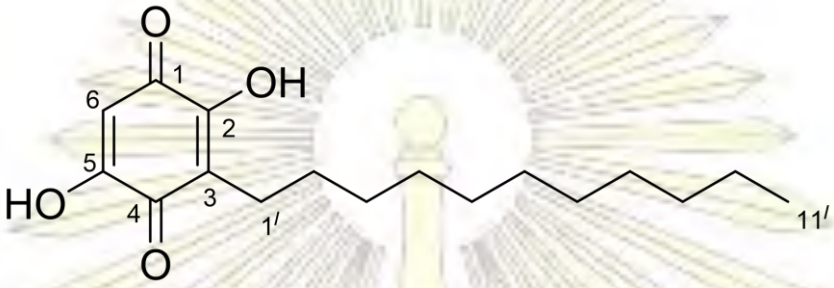
รูปที่ 3.1 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **2**

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **2** เทียบกับ α-mangostin[10]

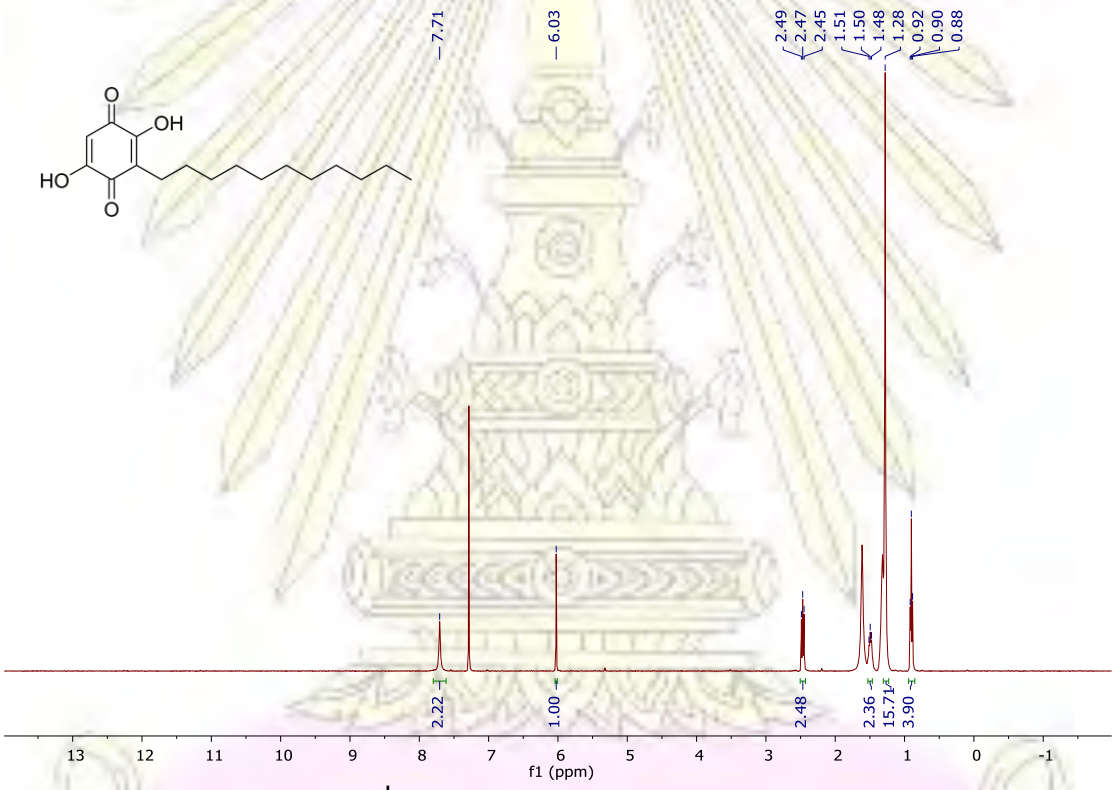
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	2	α-mangostin[10]
1-OH	13.79 (s, 1H)	13.72 (s, 1H)
3-OH	6.27 (s, 1H)	-
4	6.32 (s, 1H)	6.25 (s, 1H)
5	6.85 (s, 1H)	6.72 (s, 1H)
6-OH	6.41 (s, 1H)	-
7-OCH_3	3.83 (s, 3H)	-
11	3.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H)	3.37 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H)
12	5.33-5.27 (m, 1H)	5.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H)
14	1.72 (s, 3H)	1.68 (s, 3H)
15	1.87 (s, 3H)	1.84 (s, 3H)
16	4.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H)	4.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H)
17	5.33-5.27 (m, 1H)	5.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H)
19	1.79 (s, 3H)	1.71 (s, 3H)
20	1.86 (s, 3H)	1.82 (s, 3H)

3.1.2 การแยก embelin (3) จากผลพิลังกาสา *Ardisia colorata* Roxb.

นำตะกอนสีส้มที่แยกตัวออกมาระหว่างการสกัดผลพิลังกาสาด้วยเฮกเซน มาตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ของแข็งสีส้ม คิดเป็น 0.7% yield เทียบจากผลพิลังกาสา เมื่อนำมาตรวจสอบโครงสร้างสารด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.2** และพิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.2** ยืนยันได้ว่าสาร **3** คือ embelin



สาร **3**



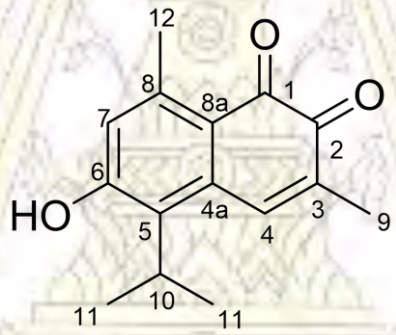
รูปที่ 3.2 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **3**

ตารางที่ 3.2 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **3** เทียบกับ embelin[11]

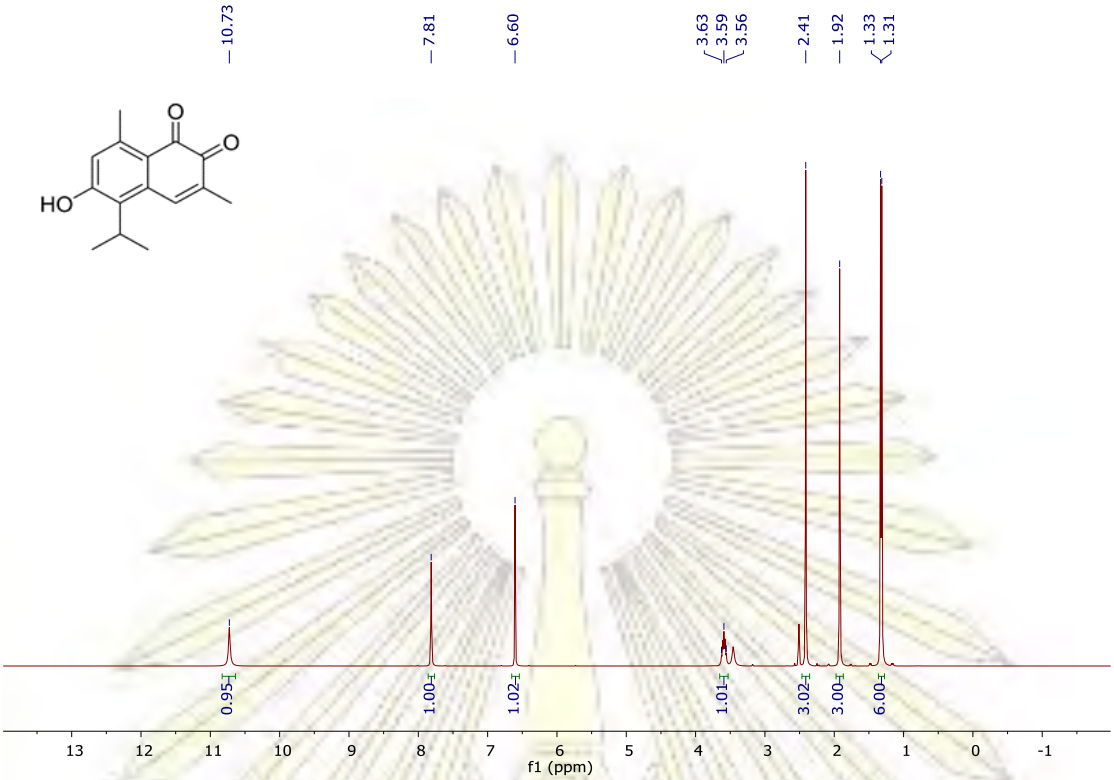
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	3	embelin[11]
2-OH, 5-OH	7.71 (s, 2H)	7.68 (s, 1H)
6	6.03 (s, 1H)	6.00 (s, 1H)
1′	2.47 (t, *J* = 8 Hz, 2H)	2.44 (t, *J* = 8 Hz, 2H)
2′	1.50 (m, 2H)	1.47 (m, 2H)
3′-10′	1.28 (m, 16H)	1.25-1.29 (m, 16H)
11′	0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H)	0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)

3.1.3 การแยก mansonone G (4) จากเนื้อไม้จันทน์ชะมด *Mansonia gagei* Drumm.

แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตของเนื้อไม้จันทน์ชะมดด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ได้ของแข็งสีน้ำตาลแดง คิดเป็น 3.4% yield เทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต เมื่อนำมาตรวจสอบโครงสร้างสารด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.3** และพิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.3** ยืนยันได้ว่าสาร **4** คือ mansonone G



สาร **4**



รูปที่ 3.3 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **4**

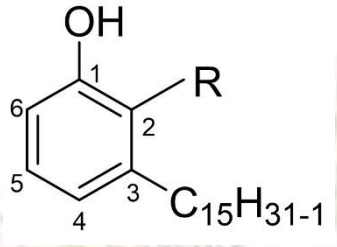
ตารางที่ 3.3 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **4** เทียบกับ mansonone G[12]

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	4	mansonone G[12]
4-H	7.81 (s, 1H)	7.87 (s, 1H)
6-OH	10.73 (s, 1H)	-
7-H	6.60 (s, 1H)	6.64 (s, 1H)
9-H	1.92 (s, 3H)	1.95 (s, 3H)
10-H	3.63-3.56 (m, 1H)	3.63 (m, 1H)
11-H	1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H)	1.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H)
13-H	2.41 (s, 3H)	2.45 (s, 3H)

3.1.4 การแยก anacardic acid (5) และ cardanol (6) จากของเหลวที่ได้จากเปลือกผลมะม่วงหิมพานต์ (Cashew nut shell liquid; CNSL) *Anacardium occidentale* Linn.

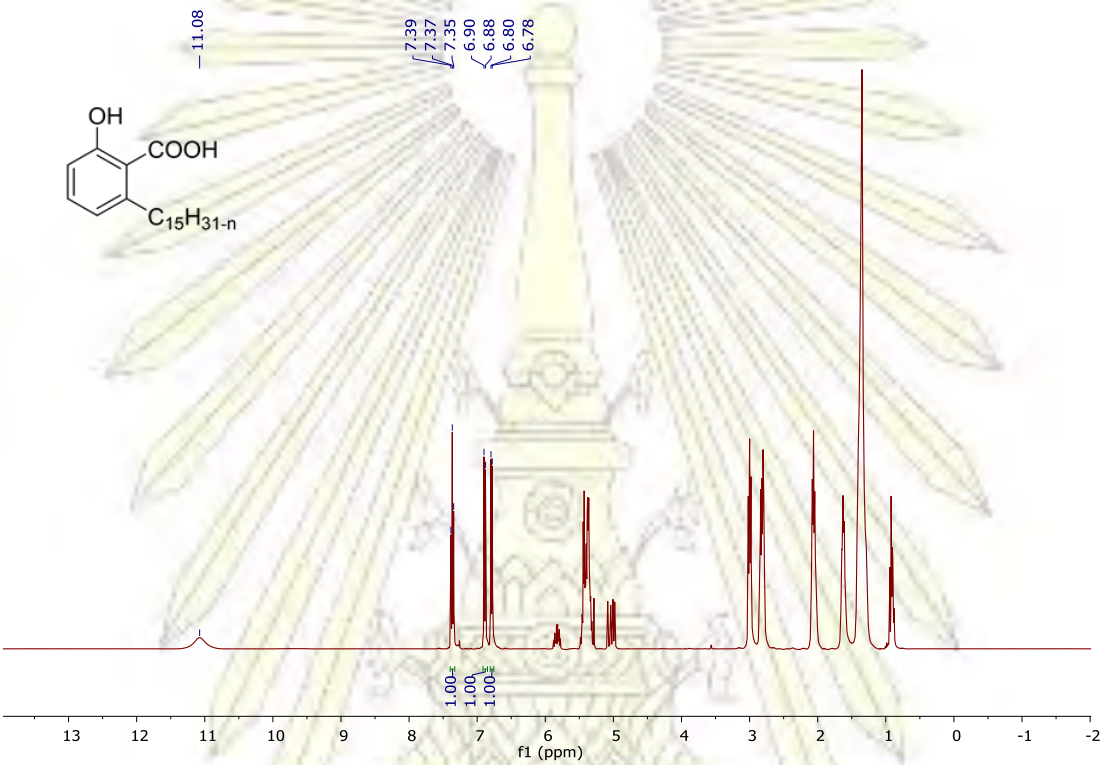
แยก CNSL ตามวิธีการที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.4.4 จะได้สาร **5** เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง คิดเป็น 53.8% yield เทียบจาก CNSL และสาร **6** เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็น 1.7% yield เทียบจาก CNSL เมื่อนำสารทั้งสองมาตรวจสอบโครงสร้างด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.4**

และ **3.5** พิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.4** ยืนยันได้ว่า สาร **5** และ **6** คือ anacardic acid และ cardanol ตามลำดับ

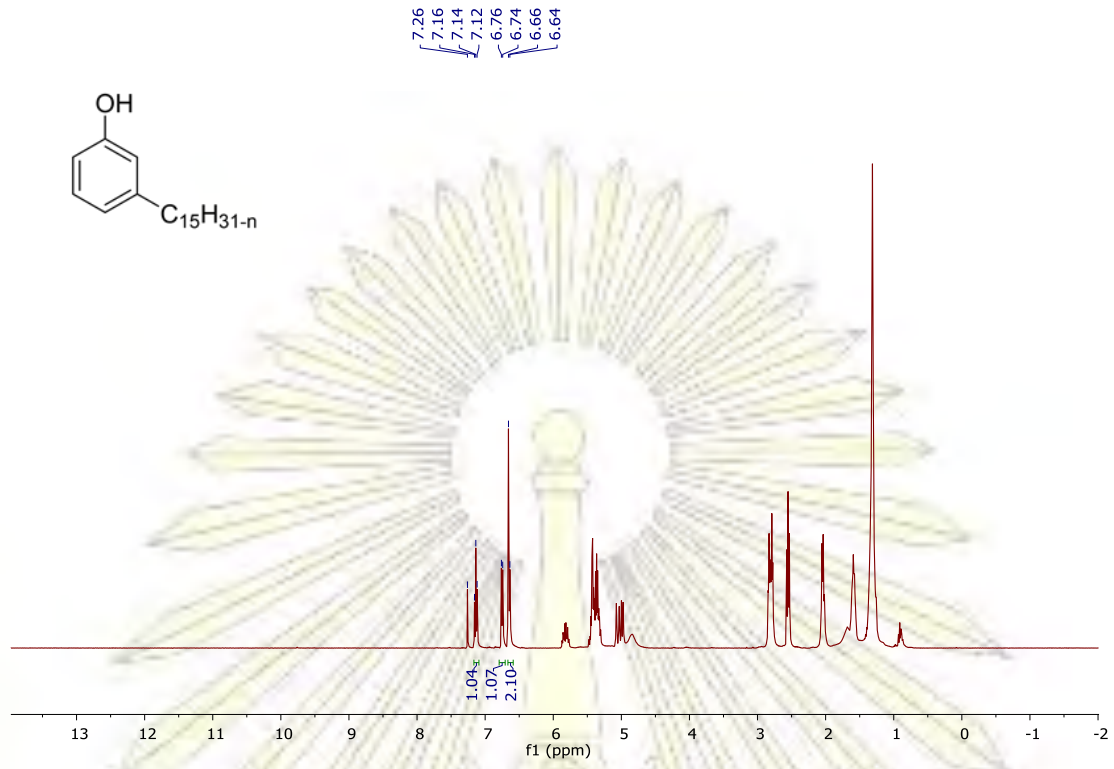


สาร **5**: R = COOH

สาร **6**: R = H



รูปที่ 3.4 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **5**



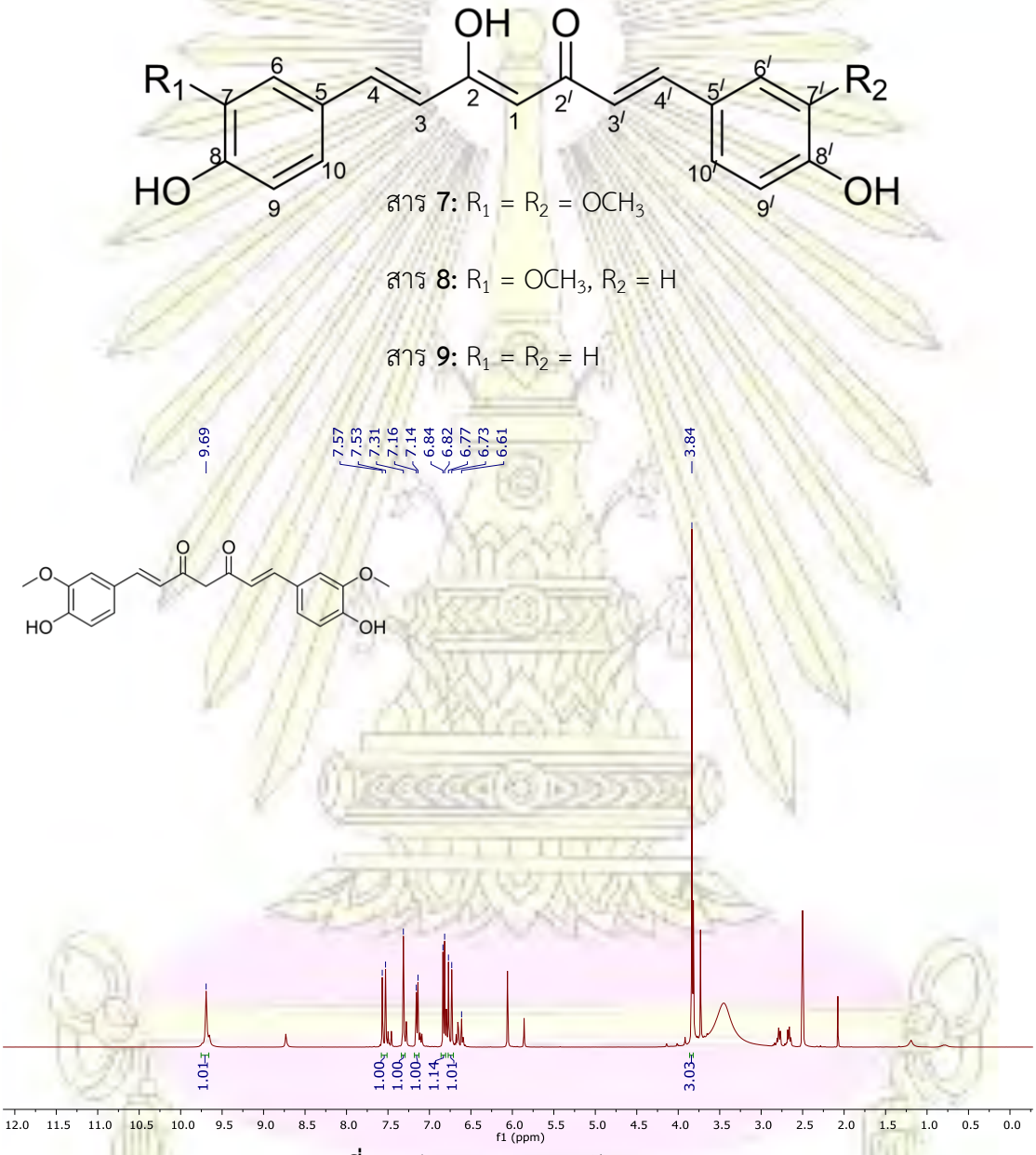
รูปที่ 3.5 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **6**

ตารางที่ 3.4 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **5** และ **6** เทียบกับ anacardic acid[13] และ cardanol[14]

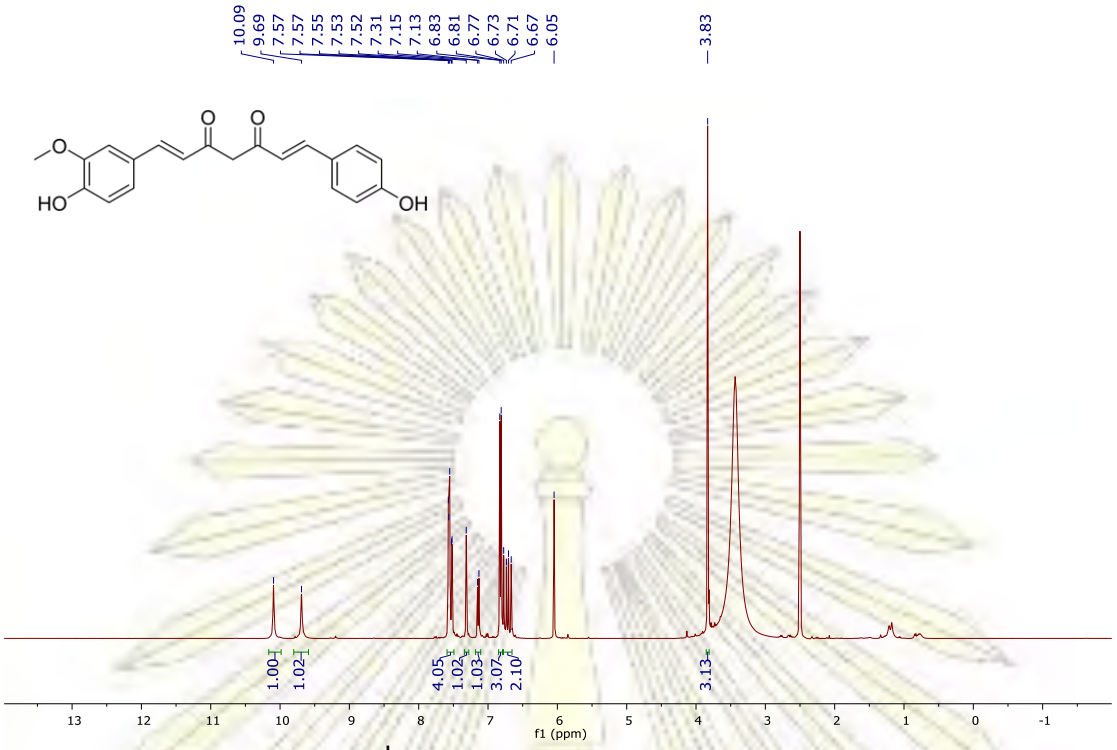
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)			
	5	anacardic acid[13]	**6**	cardanol[14]
4	6.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)	6.79 (d, 1H)	6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H)	6.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H)
5	7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H)	7.36 (t, 1H)	7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H)	7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H)
6	6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H)	6.88 (d, 1H)	6.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)	6.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)
-C**H**=CH_2 และ -CH=C**H**$_2$ บนสายแอลคิล	5.88-4.98	5.82-5.03	5.87-4.97	5.50-5.30
H บนสายแอลคิล	3.02-0.88	2.98-0.86	2.84-0.86	2.60-0.80

3.1.5 การแยก curcumin (7), demethoxycurcumin (8) และ bisdemethoxycurcumin (9) จากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn.

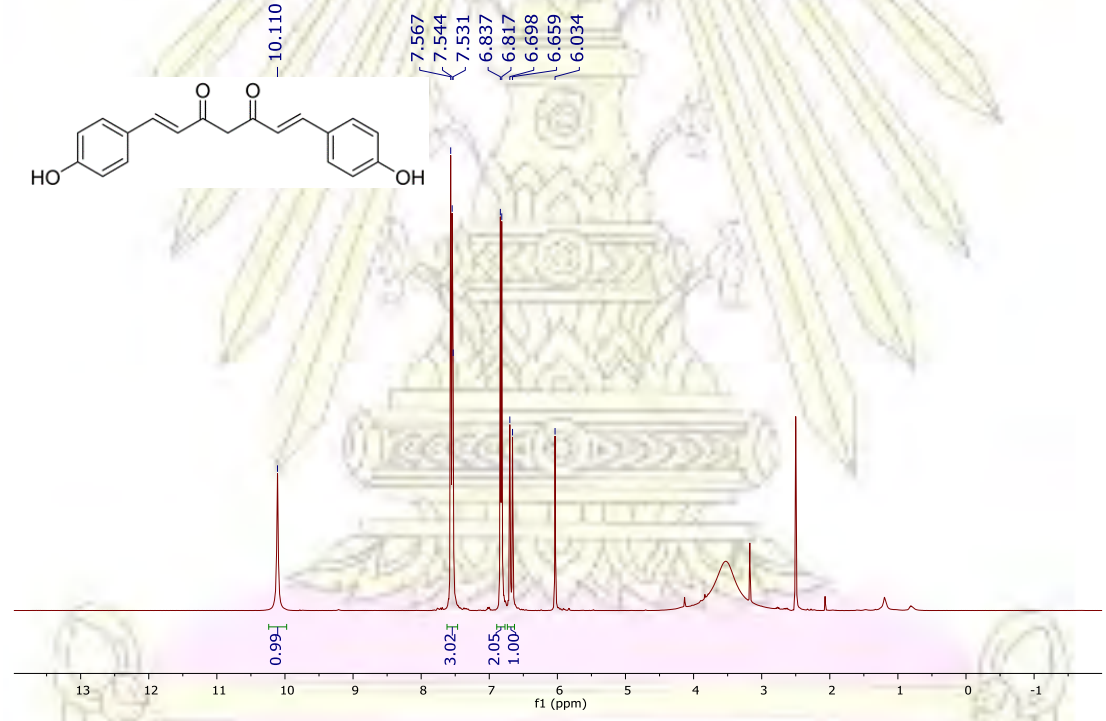
แยกสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทตของขมิ้นชัน 100 กรัม ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์แบบเร็ว จะได้สาร **7** สาร **8** และสาร **9** เป็นของแข็งสีส้ม คิดเป็น 3.0, 0.6 และ 0.3% yield ตามลำดับ เทียบจากสิ่งสกัดเอทิลแอซีเทต เมื่อนำมาตรวจสอบโครงสร้างของสารทั้งสามด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.6, 3.7** และ **3.8** พิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.5** ยืนยันได้ว่าสาร **7**, **8** และ **9** คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ



รูปที่ 3.6 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **7**



รูปที่ 3.7 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **8**



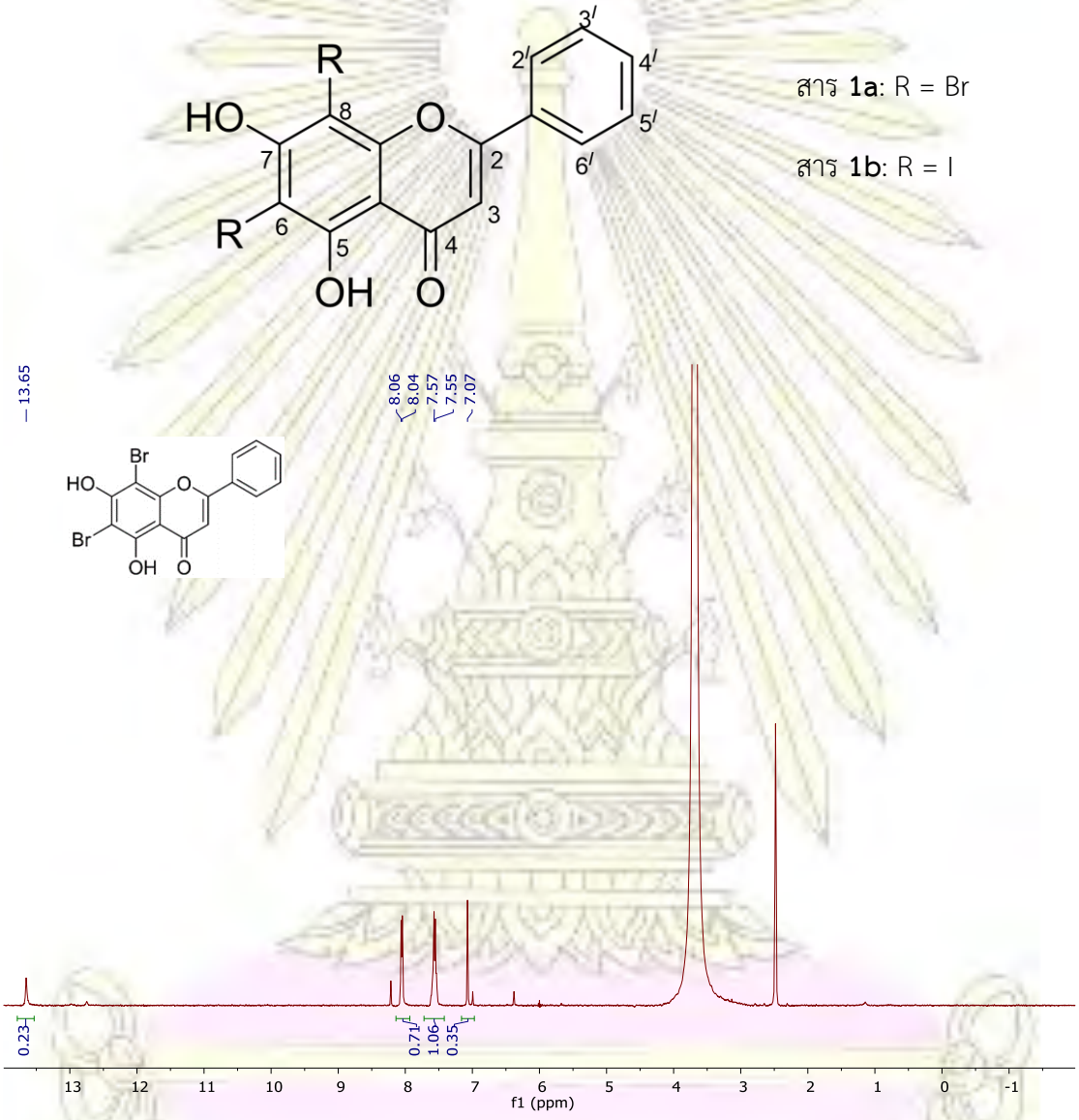
รูปที่ 3.8 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **9**

ตารางที่ 3.5 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **7**, **8** และ **9** เทียบกับ curcumin[15], demethoxycurcumin[15] และ bisdemethoxycurcumin[15]

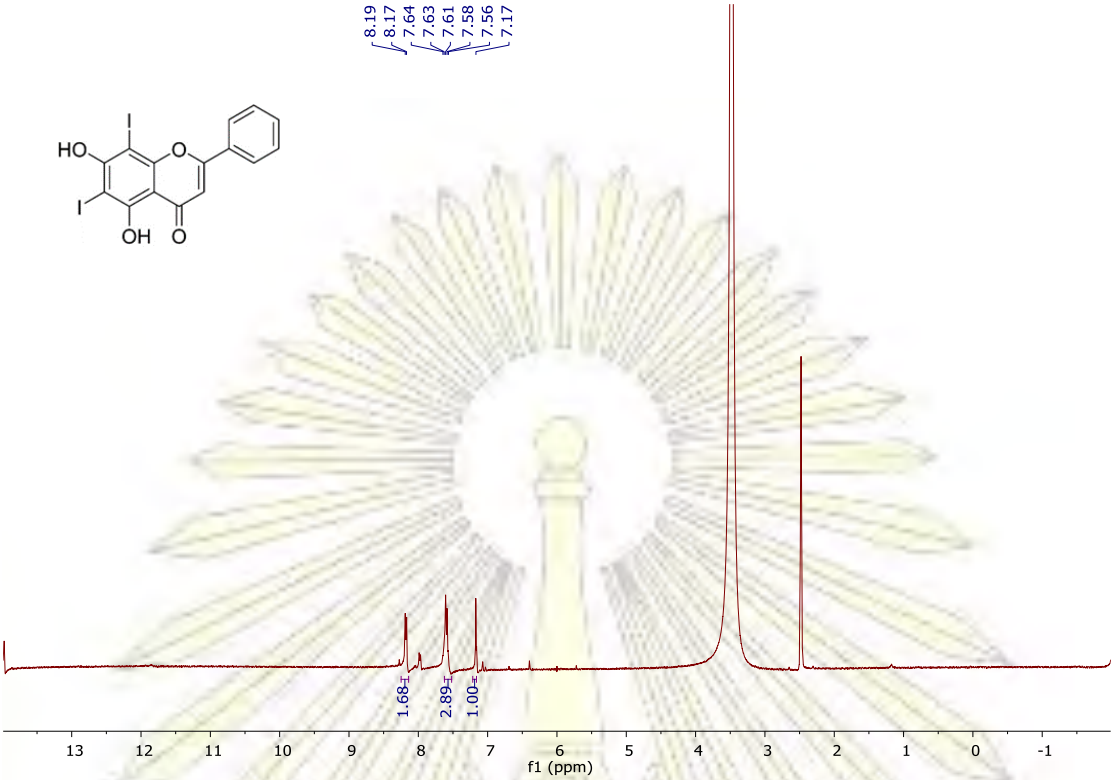
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)					
	7	curcumin[15]	**8**	demethoxycurcumin[15]	**9**	bisdemethoxycurcumin[15]
1	6.61 (s, 1H)	6.60 (s, 1H)	6.05 (s, 1H)	5.97 (s, 1H)	6.03 (s, 1H)	6.03 (s, 1H)
2-OH	-	16.41 (s, 1H)	-	-	-	16.40 (s, 1H)
3,3′	7.55 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H)	7.57 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	7.55 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	7.60 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	7.55 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	7.56 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H)
4,4′	6.75 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H)	6.75 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	6.75 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 16 Hz, 1H)	6.69 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 16 Hz, 1H)	7.55 (d, *J* = 16 Hz, 2H)	7.56 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H)
6,6′	7.31 (s, 2H)	7.32 (d, *J* = 2 Hz, 2H)	7.31 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.34 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	6.83 (d, *J* = 8 Hz, 2H)	6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H)
7,7′	-	-	7.56 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.56 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.56 (d, *J* = 12 Hz, 2H)	7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H)
8,8′-OH	9.69 (s, 2H)	9.64 (s, 2H)	10.09 (s, 2H)	-	10.11 (s, 2H)	10.03 (s, 2H)
9,9′	6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H)	6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H)	7.56 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.56 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.56 (d, *J* = 12 Hz, 2H)	7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H)
10,10′	7.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H)	7.16 (dd, *J* = 2, 8.1 Hz, 2H)	7.14 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	7.27 (d, *J* = 8, 1.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8 Hz, 1H)	6.83 (d, *J* = 8 Hz, 2H)	6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H)
OCH_3	3.84 (s, 6H)	3.85 (s, 6H)	3.83 (s, 3H)	3.92 (s, 3H)	-	-

3.2 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

สังเคราะห์อนุพันธ์ของ chrysin (**1**) โดยเติมแฮโลเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และ 8 เมื่อทำปฏิกิริยากับ NaBr/OXONE ได้สาร **1a** เป็นของแข็งสีเขียวอ่อน คิดเป็น 80% yield เทียบจาก chrysin และเมื่อทำปฏิกิริยากับ NaI/OXONE ได้สาร **1b** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน คิดเป็น 77% yield เทียบจาก chrysin เมื่อนำมาตรวจสอบโครงสร้างสารด้วย ^{1}H NMR ได้สเปกตรัมดัง**รูปที่ 3.9** และ **3.10** พิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับเอกสารอ้างอิงใน**ตารางที่ 3.6** ยืนยันได้ว่าสาร **1a** และ **1b** คือ 6,8-dibromochrysin และ 6,8-diiodochrysin ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **1a**



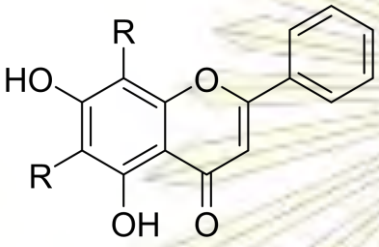
รูปที่ 3.10 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **1b**

ตารางที่ 3.6 การเปรียบเทียบสัญญาณ ^{1}H NMR ของสาร **1a** และ **1b** เทียบกับ 6,8-dibromochrysin[16] และ 6,8-diiodochrysin[16]

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)			
	1a	6,8-dibromochrysin[16]	**1b**	6,8-diiodochrysin[16]
3	7.07 (s, 1H)	7.21 (s, 1H)	7.17 (s, 1H)	7.08 (s, 1H)
5-OH	13.65 (s, 1H)	13.75 (s, 1H)	-	13.89 (s, 1H)
7-OH	-	11.77 (s, 1H)	-	-
2′, 6′	8.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H)	8.12-8.16 (d, 2H)	8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H)	8.08-8.12 (m, *J* = 6.8 Hz, 2H)
3′, 4′, 5′	7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H)	7.60-7.64 (t, 3H)	7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 3H)	7.48-7.53 (m, 3H)

3.3 สารตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

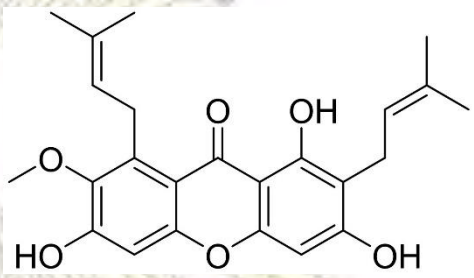
เลือกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์รวม 17 สาร แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ สารที่มีขายทางการค้า 1 สาร สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย 8 สาร สารที่ได้จากการสังเคราะห์ 2 สาร และสารที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 6 สาร เพื่อนำมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รายละเอียดได้รวบรวมไว้ใน**รูปที่ 3.11**



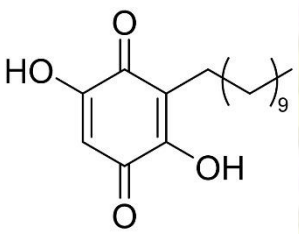
1: R = H (chrysin)

1a: R = Br (6,8-dibromochrysin)

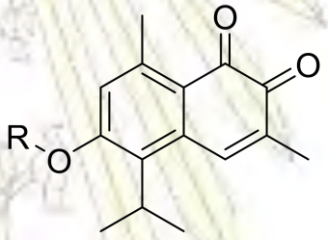
1b: R = I (6,8-diiodochrysin)



2: α-mangostin



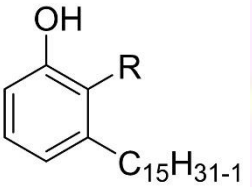
3: embelin



4: R = H (mansonone G)

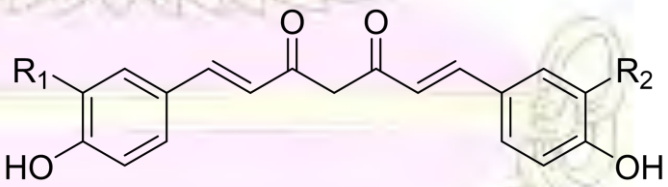
4a: R = C_8H_9 (octyl ether mansonone G)

4b: R = allyl (allyl ether mansonone G)



5: R = COOH (anacardic acid)

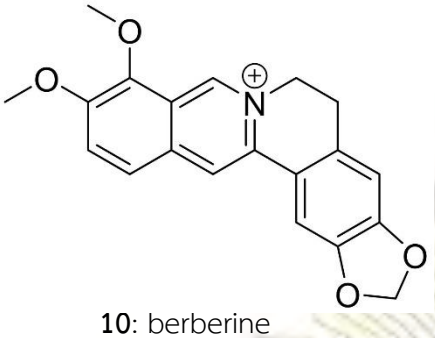
6: R = H (cardanol)



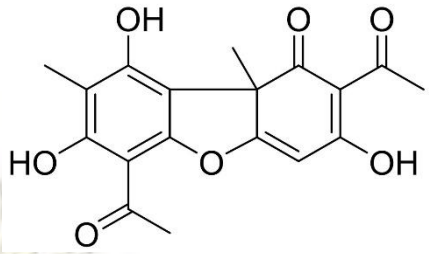
7: $R_1 = R_2 = OCH_3$ (curcumin)

8: $R_1 = OCH_3$, R_2 = H (demethoxycurcumin)

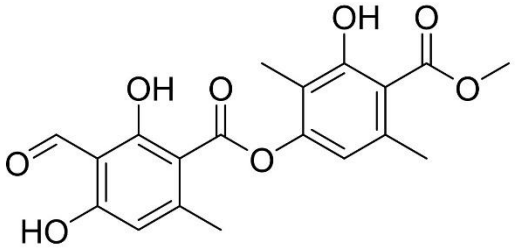
9: $R_1 = R_2$ = H (bisdemethoxycurcumin)



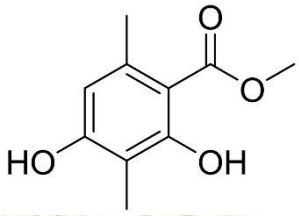
10: berberine



11: usnic acid



12: atranorin



13: methyl β-orcinolcarboxylate

รูปที่ 3.11 โครงสร้างและชื่อสารที่ใช้ทดสอบ

3.4 การคัดกรองหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion

นำสารที่คัดเลือกมาคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* KCCM 11898 โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.7**

จากผลการทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้นของสารทดสอบ 1 mM ผู้วิจัยใช้เกณฑ์การคัดเลือกสารที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 15 มิลลิเมตรขึ้นไป จาก 2 ใน 3 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.7 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของสารที่นำมาทดสอบ

สาร (1 mM)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง ± SD (มม.)		
	S. aureus ATCC 25923	*S. sobrinus* KCCM 11898	*S. mutans* ATCC 25175
1	11.00±0.82	13.67±0.94	15.33±0.47
1a	18.42±0.04	22.25±0.25	20.75±0.25
1b	20.67±0.47	18.67±0.47	18.67±1.25
2	18.87±2.38	23.37±0.26	22.95±0.56
3	11.58±0.20	12.58±1.29	17.00±0.53
4	16.33±0.78	16.04±0.42	17.92±1.03
4a	17.75±2.00	19.50±1.32	23.67±0.88
4b	15.17±0.19	18.33±0.79	19.67±0.63
5	14.92±1.40	17.37±0.08	17.83±1.17
6	11.92±1.64	9.75±1.98	11.20±0.70
7	13.25±0.72	10.91±1.40	11.58±1.01
8	10.83±0.75	11.42±0.26	11.58±1.67
9	13.25±1.14	18.12±0.08	17.00±1.13
10	9.67±0.84	10.75±0.38	11.17±0.75
11	28.75±1.70	27.92±1.50	28.92±1.51
12	9.33±0.19	9.92±1.65	11.00±0.00
13	8.16±0.45	11.50±1.04	11.12±0.07

ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

acetone คือ negative control และ chloramphenicol คือ positive control

การอ่านผล: ถ้าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้นมีค่า < 6 มิลลิเมตร สารไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ใช้ทดสอบ, 6.1-8.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้น้อย, 8.1-10.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ปานกลาง, 10.1-13.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดี, 13.1-15.0 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีมาก และ >15 สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด

สารที่นำมาทดสอบ 17 ชนิด มีสารผ่านเกณฑ์การคัดเลือกเบื้องต้น 9 ชนิด ได้แก่ 6,8-dibromochrysin (**1a**), 6,8-diiodochrysin (**1b**), α-mangostin (**2**), mansonone G (**4**), octyl ether mansonone G (**4a**), allyl ether mansonone G (**4b**) anacardic acid (**5**), bisdemethoxycurcumin (**9**) และ usnic acid (**11**) จากผลการทดสอบสารทั้ง 9 ชนิด ถูกเลือกไปหาค่า MIC และ MBC ในขั้นต่อไป

3.5 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารที่ใช้ทดสอบ โดยวิธี resazurin microtiter plate

นำสารทั้ง 9 ชนิดที่ผ่านเกณฑ์คัดเลือกจากข้อ 3.4 มาหาค่า MIC และ MBC ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.9**

ตารางที่ 3.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

สาร	*S. aureus* ATCC 25923		*S. sobrinus* KCCM 11898		*S. mutans* ATCC 25175	
	MIC (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBC (μM)	MIC (μM)	MBC (μM)
1a	31.25	250	62.5	250	62.5	250
1b	31.25	250	62.5	250	62.5	250
2	7.81	125	0.98	7.81	0.98	7.81
4	125	>1000	15.62	125	15.62	125
4a	250	>1000	250	>1000	250	>1000
4b	125	500	15.62	125	15.62	125
5	31.25	125	7.81	31.25	7.81	15
9	500	>1000	500	>1000	500	>1000
11	7.81	125	3.91	31.25	3.91	31.25

จากการทดลองหาค่า MIC พบว่าให้ผลไปแนวทางเดียวกับในขั้นการคัดกรองข้อ **3.4** สารทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดี แต่มีสาร 7 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 *S. sobrinus* KCCM 11898 และ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ดีที่สุด ได้แก่ 6,8-dibromochrysin (**1a**), 6,8-diiodochrysin (**1b**), α-mangostin (**2**), mansonone G (**4**), allyl ether mansonone G (**4b**), anacardic acid (**5**) และ usnic acid (**11**) ให้ค่า MIC 0.98-125 μM

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่า ไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาร **1a** และ **1b** มาก่อน จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สาร **1a** และ **1b** มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus S. sobrinus* และ *S. mutans* ได้ดีมาก สำหรับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆของสารทั้งสองชนิดดังกล่าวพบว่า มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง prostaglandin E_2 (PGE_2) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS)[16] มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง SGC-7901 ได้ดีกว่าเซลล์ HT-29[17] และพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อทดสอบด้วยวิธี carrageenan induced mice paw edema[18]

สาร **2** เคยมีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดและการทำงานเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ของ *S. mutans* UA159[19] และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี ให้ค่า MIC 0.78-1.56 μg/mL[20] ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาคือสาร **2** มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีมากที่สุด

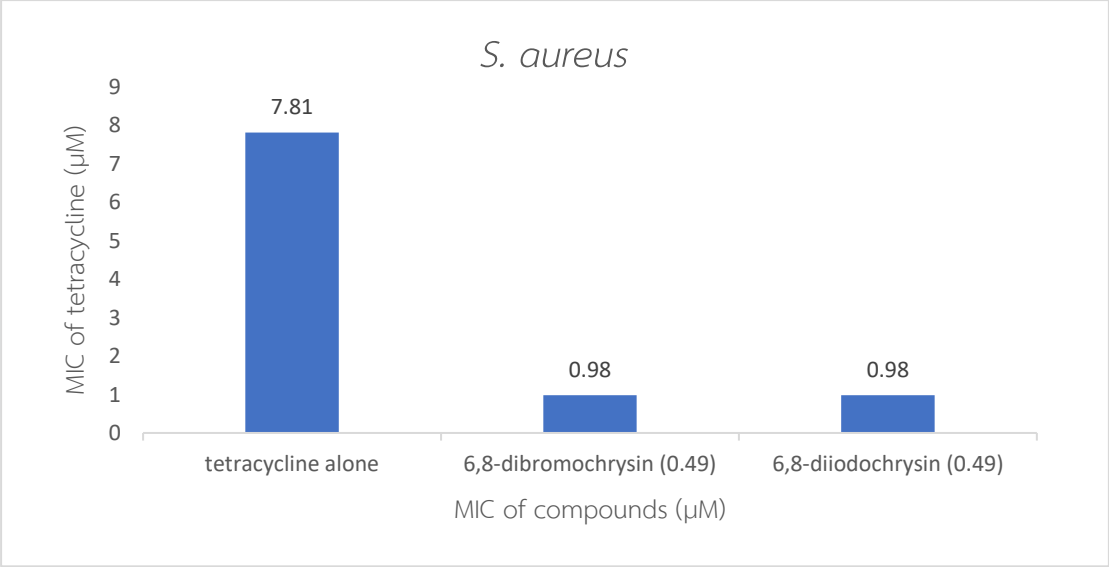
จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่ากลุ่มวิจัยของเราเคยรายงานในปี 2016 ว่า allyl และ prenyl ether ของ mansonone G (**4**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีกว่า mansonone G มากถึง 64 เท่า และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. sobrinus*, *S. mutans*, *P. acnes* และ *S. typhi* ได้ดีอีกด้วย[21] ให้ผลสอดคล้องกับสาร **4** และ **4b**

สาร **5** มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*, *S. aureus* และ MRSA[22]

สาร **11** เป็นสารธรรมชาติที่ไลเคนสร้างขึ้น มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีมาก โดยยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และ DNA ของแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. aureus* ให้ค่า MIC 0.5-1 μg/mL แต่ไม่ว่องไวต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *V. harveyi* ให้ค่า MIC 20 μg/mL[23] ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ยืนยันได้ว่าสาร **11** มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. sobrinus* และ *S. mutans* ได้ดีมาก

3.6 การศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยวิธี checkerboard dilution

ได้เลือกสาร **1a** และ **1b** ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีมาศึกษาผลของการออกฤทธิ์ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะ tetracycline ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 ผลการทดลองแสดงไว้ใน**รูปที่ 3.12**



รูปที่ 3.12 ผลการออกฤทธิ์ร่วมกัน ระหว่างสาร **1a** หรือ **1b** กับ tetracycline

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาร 6,8-dibromochrysin (**1a**) และ 6,8-diiodochrysin (**1b**) ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกสารทั้งสองมาศึกษาผลการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร **1a** และ **1b** กับยาปฏิชีวนะ tetracycline ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยยาปฏิชีวนะ teracycline, 6,8-dibromochrysin (**1a**) และ 6,8-diiodochrysin (**1b**) ให้ค่า MIC 7.81, 31.25 และ 31.25 μM ตามลำดับ แต่เมื่อผสมสาร **1a** หรือ **1b** ร่วมกับ tetracycline พบว่าสาร **1a** หรือ **1b** แสดงค่า MIC 0.49 μM และ tetracycline แสดงค่า MIC 0.98 μM ซึ่งพบว่าเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของ tetracycline ได้มากขึ้นถึง 8 เท่า ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่า สาร **1a** และ **1b** ให้ผลเสริมฤทธิ์กันเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracycline

3.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

การทดลองนี้ทำร่วมกับผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี และนางสาวธันยพร วิวรรธน์อภินัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยคัดเลือกสาร 7 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดี ได้แก่ 6,8-dibromochrysin (**1a**), 6,8-diiodochrysin (**1b**), α-mangostin (**2**), mansonone G (**4**), anacardic acid (**5**), bisdemethoxycurcumin (**9**) และ usnic acid (**11**) มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA โดยวิธี resazurin microtiter plate ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่ 3.10**

ตารางที่ 3.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA

สาร	MRSA	
	MIC (μM)	MBC (μM)
1a	250	>1000
1b	250	1000
2	7.81	7.81
4	15.62	>1000
5	250	250
9	500	>1000
11	125	500

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด คือ α-mangostin (**2**) ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า α-mangostin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ให้ค่า MIC 1.56 μg/mL[20] รองลงมา คือ anacardic acid (**2**) มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า $C_{15:3}$-anacardic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ให้ค่า MIC 6.25 μg/mL เมื่อนำ C_{15}-anacardic acid ไปผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะ methicillin ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้มากถึง 32 เท่า[24] ในกรณีของ 6,8-dibromochrysin (**1a**), 6,8- diiodochrysin (**1b**), mansonone G (**4**) และ bisdemethoxycurcumin (**9**) ไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA มาก่อนจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าให้ผลการทดสอบในระดับปานกลางถึงดี แต่มีฤทธิ์ไม่ดีในการฆ่าเชื้อ MRSA สำหรับ usnic acid (**11**) มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารนี้ให้ผลเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ gentamicin[25]

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

ได้คัดเลือกสาร 17 ชนิด เป็นสารที่มีขายทางการค้า 1 สาร ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย 8 สาร สารที่ได้จากการสังเคราะห์ 2 สาร และสารที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 6 สาร ตรวจสอบโครงสร้างสารที่แยกและที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิค ^{1}H NMR สเปกโทรสโกปี นำสารทั้ง 17 ชนิด ไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. mutans* และ *S. sobrinus* พบว่ามีสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดี 7 ชนิด ได้แก่ 6,8- dibromochrysin, 6,8- diiodochrysin, α- mangostin, mansonone G, allyl ether mansonone G, anacardic acid และ usnic acid แสดงค่า MIC 0.98-125 μM สารสองชนิดแรกยังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาก่อน

ได้นำสารทั้งสองชนิดดังกล่าว (6,8-dibromochrysin และ 6,8-diiodochrysin) ไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracycline เพื่อใช้ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่าเมื่อผสมสาร 6,8-dibromochrysin หรือ 6,8-diiodochrysin 0.49 μM ร่วมกับ tetracycline 0.98 μM ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน โดยใช้ปริมาณ tetracycline ลดลงได้มากถึง 8 เท่า

นอกจากนี้ได้นำสาร 7 ชนิด ได้แก่ 6,8-dibromochrysin, 6,8-diiodochrysin, α-mangostin, mansonone G, anacardic acid, bisdemethoxycurcumin และ usnic acid ไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA พบว่ามีสาร α-mangostin, mansonone G และ usnic acid ให้ผลยับยั้งเชื้อที่ดี แสดงค่า MIC 7.81-125 μM จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่า 6,8-dibromochrysin, 6,8-diiodochrysin, mansonone G และ bisdemethoxycurcumin ไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA มาก่อน

4.2 งานวิจัยในอนาคต

สังเคราะห์อนุพันธ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกจากพันธุ์ไม้ไทย ศึกษาเพิ่มเติมเรื่องการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น นำสารไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นรวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารอ้างอิง

1. Luvira, V. Overveiw of antibiotic resistance. *Songkla. Med. J*. **2006**, *24*, 453-459.
2. Xu, H.X.; Lee, S.F. The antibacterial principle of *Caesalpina sappan*. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 647-651.
3. He, J.; Chen, L.; Heber, D.; Shi, W.; Lu, Y.Q. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *J. Nat. Prod*. **2006**, *69*, 121-124.
4. Siripong, P.; Wongseri, V.; Piyaviriyakul, S.; Yahaufai, J.; Chanpai, R.; Kanokmedakul, K. Antibacterial potential of *Rhinacanthus nasutus* against clinically isolated bacteria from Thai cancer patients. *Mahidol University J. Pharm. Sciences*. **2006**, *33*, 15-22.
5. Boonsri, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Kanjana, O.A. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Thespesia populnea*. *J. Nat. Prod*. **2008**, *71*, 1173-1177.
6. Corlay, N.; Bornet, L.M.; Leborgne, E.; Blanchard, F.; Cachet, X.; Bignon, J.; Roussi, F.; Butel, J.M.; Awang, K.; Litaudon, M. Antibacterial labdane diterpenoids from *Vitex vestita*. *J. Nat. Prod*. **2015**, *78*, 1348-1356.
7. Betts, W.J.; Sharili, S.A.; Ragione, M.L.R.; Wareham, W.D. *In vitro* antibacterial activity of curcumin-polymyxin B combinations against multidrug-resistant bacteria associated with traumatic wound infections. *J. Nat. Prod*. **2016**, *79*, 1702-1706.
8. Baron, S. Medical microbiology, ed. 4th. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, **1996**.
9. Siriwong, N.; Chukeatirote, E. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Songkla. Med. J.* **2009**, *27*, 347-358.
10. Ghazali, S.; Lian, G.; Ghani, K. Chemical constituent from roots of *Garcinia mangostana* Linn. *Int. J. Chem*. **2010**, *2*, 134-142.
11. Feresin, E.G.; Tapia, A.; Sortino, M.; Zacchino, S.; Arias, R.A.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; Hirschmann, S.G. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J. Ethnopharmacol*. **2003**, *88*, 241-247.

12.Sengab, B.A.; Elgindi, R.M.; Mansour, A.M. Sesquiterpenes quinones from *Thespesia populnea* and their biological studies. *J. Pharmacogn. Phytochem*. **2013**, *2*, 136-139.

13.Philip, Y.N.J.; Francisco, D.C.J.; Dey, S.E.; Buchweishaija, J.; Mkayula, L.L.; Ye, L. Isolation of anacardic acid from natural cashew nut shell liquid (CNSL) using supercritical carbondioxide. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, *56*, 9350-9354.

14.Hoang, S.A.; Tran, H.T.; Nguyen, N.H.; Vu, S.H.; Vo, P.T.; Phan, C.; Nguyen, V.T. Synthesis of oxime from a renewable resource for metal extraction. *Korean J. Chem.Eng*. **2015**, *32*, 1598-1605.

15.Jayaprakasha, K.G.; Rao, J.M.L.; Sakarian, K.K. Improved HPLC method for the the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, *50*, 3668-3672.

16.Park, H.; Dao, T.T.; Kim, P.H. Synthesis and inhibition of PGE_2 production of 6,8-disubstituted chrysin derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. **2005**, *40*, 943-948.

17.Zheng, X.; Meng, D.W.; Xu, Y.Y.; Cao, G.J.; Qing, L.F. Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2003**, *13*, 881-884.

18.Do, H.T.; Vo, N.P.; Tran, D.T. Synthesis and comparison of anti-inflammatory activity of chrysin derivatives. 13rd international electronic conference on synthetic organic chemistry (ECSOC-13), 1-30 November 2009.

19.Phuong, T.; Nguyen, M.; Marquls, E. Antimicrobial actions of α-mangostin against oral streptococci. *Can. J. Microbiol*. **2011**, *57*, 217-225.

20.Koh, J.J.; Qiu, S.; Zou, H.; Lakshminarayanan, R.; Li, J.; Zhou, X.; Tang, C.; Saraswathi, P.; Verma, C.; Tan, T.H.D.; Tan, L.A.; Liu, S.; Beuerman, W.R. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta*. **2013**, *1828*, 834-844.

21.Hairani, R.; Mongkol, R.; Chavasiri, W. Allyl and prenyl ethers of mansonone G, new potential semisynthetic antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2016**, *26*, 5300-5303.

22.Kubo, I.; Nihei, I.K.; Tsujimoto, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agric. Food Chem*. **2003**, *51*, 7624-7628.

23. Dorszynska, M.M.; Wegrzyn, G.; Krzeminska, G.B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiol. Lett*. **2014**, *353*, 57-62.

24. Muroi, H.; Nihei, K.; Tsujimoto, K.; Kubo, I. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem*. **2004**, 583-587.

25. Segatore, B.; Bellio, P.; Setacci, D.; Brisdelli, F.; Piovano, M.; Garbarino, A.J.; Nicoletti, M.; Amicosante, G.; Perilli, M.; Celenza, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and Δ*E* model methods. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 341-347.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวบุณยนุช โหลยค้า เกิดเมื่อวันที่ 7 มีนาคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสุคนธีรวิทย์ จังหวัดนครปฐม เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 8/4 หมู่ 7 ตำบลท่าตลาด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73110 อีเมล qwan.boonyanut@gmail.com