รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

สารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากมะแขว่น *Zanthoxylum limonella* Alston.

Anti-microbial Activity from *Zanthoxylum limonella* Alston.

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554 และคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันโทหญิง สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร ที่กรุณาให้สายพันธุ์จุลินทรีย์ดื้อยาที่แยกได้จากผู้ป่วย ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ได้แก่ ESBL-producing *E. coli* PMK200400209 และ *P. aeruginosa* (MDR) PMK503010109 เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดื้อยาในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจันทร์เพ็ญ ตั้งจิตเจริญกุล ที่ช่วยดำเนินการด้านตรวจวิเคราะห์ต่างๆ

บทคัดย่อ

Zanthoxylum limonella Alston หรือมะแขว่น นิยมใช้ในการปรุงแต่งรสอาหารและยังเป็นสมุนไพรตามภูมิปัญญาท้องถิ่นในประเทศไทย สำหรับการวิจัยนี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยในมะแขว่นตลอดจนส่วนประกอบย่อย และ สามสารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งนี้รวมไปถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วย ซึ่งสามารถแยกส่วนประกอบหลักได้เป็นส่วนประกอบย่อยที่ 1 และ 2 โดยสาร Sabinene เป็นสารหลักที่พบในส่วนประกอบย่อยที่ 1 โดยพบอยู่ถึงร้อยละ 54 และพบในส่วนประกอบย่อยที่ 2 อยู่ร้อยละ 41 ซึ่งเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากงานวิจัยนี้พบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยกเว้นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จากทั้งในน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบย่อยเหล่านี้ และเมื่อได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าจุลินทรีย์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ดีกว่าสาร Sabinene ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารประกอบย่อยต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยนี้สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 9 นาที โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ และยังมีความสามารถในการฆ่าเชื้อดื้อยา methicillin-resistant *S. aureus* และเชื้อดื้อยา extended-spectrum β-lactamase-producing *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 90 นาทีที่ค่าความเข้มข้นเท่ากัน งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ค้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นมีฤทธิ์ต่อเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะด้วย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร รวมไปถึงพัฒนาเพื่อใช้ในด้านการแพทย์เพื่อลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในปัจจุบัน

Abstract

Zanthoxylum limonella Alston is commonly used plant in Thailand for flavoring of foods and in traditional medicine. In this study, we investigated the crude essential oil, the distilled fractions thereof and the three pure major compounds of the oil from *Z. limonella* fruits for antibacterial activities against several bacteria including multi-drug resistant bacteria. The essential oil fractions I and II and sabinene, the major compound of fraction I (54%) and II (41%), showed antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria tested, except *Pseudomonas aeruginosa*. The crude oil showed higher antibacterial activity than sabinene against all tested bacteria, suggesting the presence of potent minor compound(s) with an additive effect, or less potent compound(s) with a synergistic effect among the components of the crude oil. The essential oil showed a potent killing effect, achieving a complete elimination of *S. aureus* and *E. coli* within a 9 min exposure to a two-fold minimal bactericidal concentration level, while the multi-drug resistant bacteria, methicillin-resistant *S. aureus* and the extended-spectrum β-lactamase-producing *E. coli*, were completely eradicated within 90 min at the same dose. This is the first report on the essential oil from *Z. limonella* fruits against multi-drug resistant bacteria. The essential oil has potential uses on food preservation and as an antiseptic for medical use.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
ขอบเขตการวิจัย	4
วิธีดำเนินการวิจัย	5
การเตรียมตัวอย่างพืช	5
การสกัดและแยกส่วนประกอบย่อยในน้ำมันหอมระเหย	5
การวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำมันหอมระเหย	5
เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	6
การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	7
การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC)	7
การศึกษาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อทดสอบ	8
ผลการทดลองและอภิปรายผล	9
เอกสารอ้างอิง	20
Output	22
ประวัติคณะผู้วิจัย	23

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิจัย	6
2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น	10
3 ส่วนประกอบย่อยที่สกัดแยกได้จากน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น	11
4 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย, ส่วนประกอบย่อย 3 ส่วน และ 3 สารหลัก (โดยน้ำหนัก)	13
5 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene จากผลมะแขว่น ต่อเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์รวมทั้งเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์	15

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 GC-chromatogram ของ 3 ส่วนประกอบย่อยในน้ำมันหอมระเหย
จากผลมะแขว่น 12

2 Time-kill curves ของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene
ต่อเชื้อทดสอบ 17

บทนำ

พืชในสกุล Zanthoxylum วงศ์ Rutaceae พบได้ทั่วไปในแถบทวีปเอเชียและอเมริกาเหนือ พืชกลุ่มนี้มีจำนวนมากกว่า 200 ชนิด ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กจนกระทั่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นมักใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ เช่นรักษาอาการปวดท้อง ปวดฟัน ลดไข้ และแก้ท้องเสีย เป็นต้น (Burnette และ Morikawa, 2005) โดยสามารถพบ *Zanthoxylum limonella* Alston ได้ทั่วไปในเขตภาคเหนือของประเทศไทย มีชื่อท้องถิ่นว่า มะแขว่น โดยทั่วไปจะออกดอกเป็นเวลายาวนาน (ระหว่างเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม) มีผลแห้งกลมผิวขรุขระสีน้ำตาล เมื่อแก่ผลจะแตกออก และมีเมล็ดอยู่ภายใน สีดำกลม ผิวเรียบ เป็นมัน มีกลิ่นหอมฉุนคล้ายผักชี มีรสเผ็ดเล็กน้อย ชาวบ้านจึงนิยมใช้ส่วนผลและใบทั้งสดและแห้ง เป็นเครื่องเทศในการปรุงแต่งรสอาหาร ซึ่งจะช่วยให้อาหารมีรสเผ็ดร้อน มีกลิ่นหอม ช่วยให้เจริญอาหารได้ดีขึ้น ในทางการแพทย์ตามภูมิปัญญาไทยยังใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ซึ่งทุกๆ ส่วนของมะแขว่นสามารถนำมาใช้เป็นยาได้ ซึ่งได้แก่ ส่วนราก ลำต้น เปลือก ผล และเมล็ด เป็นต้น โดยในแต่ละส่วนนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน เช่น ส่วนผลนั้นนอกจากจะใช้เป็นเครื่องเทศแล้วยังมีฤทธิ์ไล่ยุง รวมไปถึงใช้รักษาฟันผุได้ (Trongtokit *et al*., 2004) ทั้งยังเป็นส่วนประกอบในยาบำรุงหัวใจ แก้โลหิตเป็นพิษ บำรุงโลหิต บำรุงธาตุ ขับลมในทางเดินอาหาร และแก้วิงเวียนศีรษะ (Rao, 2000) ส่วนเปลือกไม้ ใช้ในการลดไข้ ขับเหงื่อและขับปัสสาวะได้ (Pongboonrord, 1979) ซึ่งมีรายงานว่าพบสารหลายชนิดได้แก่ alkaloid lupeol, rutaecarpine, xanthoxyletin, osthol และ scopoletin จากส่วนเปลือกของลำต้นนี้ (Somanabandhu และคณะ 1992)

สำหรับรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของมะแขว่นยังมีอยู่น้อยมากๆ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุล *Zanthoxylym* เดียวกันแต่ต่างชนิด มีรายงานว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มของเปลือกของ *Z. budranga* มีฤทธิ์แรงมากในการต้านการเจริญของแบคทีเรียและรา และสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของต้นดังกล่าวยังมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งอีกด้วย (Islam และคณะ 2001) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ในสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยของผลไม้หลายชนิดในสกุล Zanthoxylum เช่น ผลแห้งของ *Z. xanthoxyloides* และ *Z. leprieurii* พบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Tatsadjieua และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงฤทธิ์ฆ่าพยาธิตัวแบนจากผลของ *Z. arlatum* อีกด้วย (Mehta และคณะ, 1981)

ปัจจุบันการระบาดของเชื้อก่อโรคที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก (Diekema และคณะ, 2004) มีสาเหตุสำคัญส่วนหนึ่งเกิดจากการที่เชื้อจุลินทรีย์ถูกคุกคามโดยการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อ ทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ สามารถทนทานต่อฤทธิ์ของยาซึ่งเคยใช้ได้ผลมาก่อน ทำให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่อันตรายมากขึ้น และแพงขึ้น หรืออาจถึงขั้นรักษาไม่หายและเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาได้ จึงนับได้ว่าเป็นปัญหาสำคัญในวงการการแพทย์ โดยเชื้อดื้อยา Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) สามารถก่อให้เกิดปัญหาที่พบบ่อยคือ การติดเชื้อในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) นอกจากนี้ยังมีเชื้อดื้อยา extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* ที่สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล (Livermor, 1995) เชื้อดื้อยาทั้งสองสายพันธุ์นี้จึงเป็นปัญหาสำคัญที่มีการแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงจำเป็นที่รัฐจะต้องกำหนดนโยบายควบคุมการใช้ยา และส่งเสริมการใช้ยาให้ถูกต้อง รวมทั้งมีการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาอย่างมีระบบและได้มาตรฐาน รวมทั้งการพัฒนางานวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อดื้อยาดังกล่าว ก็นับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ทั้งนี้เพื่อเป็นการหาสารต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีกลไกการการออกฤทธิ์แตกต่างไปจากยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กันอยู่เดิม (Iinuma และคณะ, 1994)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก ซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ของพืชนานาชนิด เกิดความหลากหลายของพันธุ์พืชชนิดต่างๆ สูง รวมทั้งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่นๆ จึงเป็นข้อได้เปรียบของประเทศในแง่ของการมีแหล่งของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติอยู่มากมาย เนื่องจากพืชสมุนไพรนับได้ว่าเป็นแหล่งธรรมชาติแหล่งใหญ่ที่มีความหลากหลายของสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่ได้มีการค้นพบและนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างมาก ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดใหม่ๆ จากพืชสมุนไพรเหล่านี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ในการแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในปัจจุบันได้ นอกจากนี้การค้นพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆนั้น สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันที่ไม่ได้ผลการรักษาที่ดี และยังเป็นการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพงอีกด้วย ทั้งยังลดความเสี่ยงต่อผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์จากยาที่ใช้กันอยู่ได้เนื่องจากสารที่ได้เป็นสารจากธรรมชาติ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น รวมทั้งส่วนย่อยและสารต่างๆ ในน้ำมันหอมระเหย โดยทำการทดสอบฤทธิ์กับเชื้อทดสอบจำนวนทั้งหมด 7 สายพันธุ์ แบ่งได้เป็น เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *P. aeruginosa* และ *E. coli* เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multi-drug resistant (MDR)) คือ *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA)

ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาสายพันธุ์มาตรฐาน *P. aeruginosa* MDR และ ESBL-producing *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยคือ Sabinene โดยศึกษากับเชื้อทดสอบ *S. aureus* และ *E. coli* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยา และดื้อต่อยาด้วย

ขอบเขตการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช
2. การสกัดและแยกส่วนย่อยในน้ำมันหอมระเหย
3. การวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำมันหอมระเหย
4. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ
5. การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
6. การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)
7. การศึกษาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อทดสอบ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างผลมะแขว่นสดในพื้นที่บริเวณภูเขาของจังหวัดแพร่ ในช่วงเดือนมกราคม-พฤษภาคม พ.ศ.2550 ทำการแบ่งตัวอย่างเพื่อนำไปทำตัวอย่างแห้งและฝากเก็บตัวอย่างดังกล่าวที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เขตจตุจักร กรุงเทพฯ โดยมี voucher specimen คือ BKF No.152276 สำหรับผลสดที่ได้ใช้สำหรับงานวิจัย ได้ทำให้แห้งโดยการตากแห้งในที่ร่มประมาณ 3-4 สัปดาห์

การสกัดและแยกส่วนย่อยในน้ำมันหอมระเหย

ผลมะแขว่นที่แห้งแล้วถูกนำมาบดละเอียดและนำมาสกัดด้วยวิธีการกลั่นแบบ Hydrodistillation ด้วย Clevenger-type apparatus จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทำการกำจัดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปใช้ในการสกัดแยกเป็นส่วนย่อยและนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

การแยกน้ำมันหอมระเหยออกเป็นส่วนย่อยนั้น ทำได้โดยการนำน้ำมันหอมระเหย 100 กรัม มาทำการแยกด้วยคอลัมน์ที่เหมาะสมภายใต้ภาวะสุญญากาศ จากนั้นทำการเก็บรวบรวมน้ำมันในแต่ละส่วนที่มีองค์ประกอบเหมือนกัน โดยดูจากผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ที่มีหน่วยตรวจวัดแบบ FID (FID detector)

การวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำมันหอมระเหย

วิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่สกัดแยกได้ โดยใช้เครื่อง GC-MS Thermo Electron ที่มีคอลัมน์เป็น 70% Cyanopropyl Polysilphenylene-siloxane TR-FAME column (60 m x 0.25 mm ID x 0.5 μm film thickness) ซึ่งต่อเข้ากับ MS โดยตรง โดยใช้แก๊สโฮโดรเจน (ที่อัตราการไหล 1.1 mL/min, H_2) เป็นแก๊สนำพา และในขั้นตอนการแยกน้ำมันหอมระเหยและการติดตามผลในแต่ละส่วนที่แยกได้นั้นได้ใช้เครื่อง GC (gas chromatography) ที่มีหน่วยตรวจวัดชนิด FID (GC-FID detector) คอลัมน์เป็นแบบ CP-sil5 (30 m × 0.25 mm) และใช้แก๊สไนโตรเจน (ที่อัตราการไหล 1 mL/min และ 30 p.s.i., N_2) เป็นแก๊สนำพา ส่วนในการวิเคราะห์ผลขององค์ประกอบต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหยที่แยกได้นั้น ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับมวลสเปกตรัมของสารมาตราฐานที่ทราบองค์ประกอบและได้มีรายงานไว้แล้ว

สารบริสุทธิ์หลัก 3 ชนิดในน้ำมันหอมระเหย

สารบริสุทธิ์หลัก 3 ชนิดในน้ำมันหอมระเหยคือ sabinene terpinen-4ol และ limonene ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ sabinene และ terpinen-4ol ถูกแยกจากน้ำมันไพล โดยแยกด้วยเทคนิค column chromatography ใช้ silica gel เป็น stationary phase ทำการแยกสารด้วยตัวทำละลายโดยการไล่ขั้วของสาร ทำการเก็บรวบรวมส่วนย่อย และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละส่วนย่อยด้วย thin layer chromatography (TLC) รวมส่วนย่อยที่มี spot สารที่เหมือนกันบนแผ่น TLC แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ จะนำสารที่ระเหยตัวทำละลายออกนี้ไปลงคอลัมน์ซ้ำเพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์อีก จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ระเหยตัวทำละลายไปแล้ว ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และชนิดของสารด้วย Gas chromatography (GC) เทียบกราฟของสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ sabinene และ terpinen-4ol ว่าเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่โดยพิจารณาจากค่า retention time โดยใช้สภาวะของเครื่องในการฉีดสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เช่นเดียวกับของสารมาตรฐาน สำหรับ limonene บริสุทธิ์ซื้อ Sigma Aldrich, USA (Fluka, CAS Number 5989-27-5)

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบจำนวน 7 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multi-drug resistant (MDR)) จำนวน 2 สายพันธุ์ซึ่งถูกแยกได้จากผู้ป่วยโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันโทหญิงสุดาลักษณ์ ธัญญาหาร สำหรับนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ESBL-producing *E. coli* PMK200400209 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2552 โดยเชื้อดื้อยาสายพันธุ์นี้สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ได้แก่ Ampicillin, Cephalothin, Cefuroxime, 3^{th}-4^{th} Cephalosporin, Amoxicillin-clavulanic acid, Ertapenem, Gentamicin, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Colistin, Quinolones และ Fluoroquinolones แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Cefoxitin, Piperacillin tazobactam, Amikacin, Netilmicin, Imipenem, Meropenem และ Tigecycline นอกจากนี้ยังมีเชื้อดื้อยา *P. aeruginosa* (MDR) PMK503010109 ซึ่งถูกแยกได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ในเดือนมกราคม พ.ศ.2552 โดยเชื้อดื้อยาสายพันธุ์นี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม Beta-lactam ทุกชนิด, Aminoglycosides, Quinolones และ Fluoroquinolones แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Colistin

ตารางที่ 1 เชื้อทดสอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

เชื้อทดสอบ	สายพันธุ์	แหล่งที่มา
แบคทีเรียแกรมบวก		
B. subtilis	ATCC 6633	TISTR[1]
S. aureus (MSSA)	ATCC 25923	DMST[2]
S. aureus (MRSA)	ATCC 43300	DMST
แบคทีเรียแกรมลบ		
E. coli	ATCC 25922	DMST
ESBL-producing *E. coli* (clinical isolated strain)	PMK200400209	S. Thunyaharn[3]
P. aeruginosa	ATCC 27853	DMST
P. aeruginosa (clinical isolated MDR strain)	PMK50301010	S. Thunyaharn[3]

[1]TISTR, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

[2]DMTS, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย

MSSA, Methicillin sensitive *S. aureus*; MRSA, Methicillin-resistant *S. aureus*; MDR, multi-drug resistant

[3] แยกโดยพันโทหญิง สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า

การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ทำการคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยใช้วิธี Paper disc diffusion ตามที่ระบุใน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ปี 2005 ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้ ปรับความเข้มข้นของเชื้อทดสอบด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเปรียบเทียบได้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1.0 x 10^8 CFU/mL จากนั้นปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น 100 µl ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร และทำการเกลี่ยกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเตรียม filter paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ 10 µl วางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยให้มีชุดควบคุมผลลบเป็น 1% (v/v) Tween 80 และชุดควบคุมผลบวกเป็น Penicillin G (10 U/disc) และ Chloramphenicol (30 µg/disc) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ในหน่วยมิลลิเมตร

การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) หรือค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) หรือค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยใช้วิธี Broth microdilution ในการหาค่าดังกล่าวของน้ำมันหอมระเหย ส่วนย่อยและสารที่แยกได้จากน้ำมันหอมระเหย ซึ่งอ้างอิงวิธีการทดลองตาม CLSI ปี 2007 โดยมีรายละเอียดของวิธีการทดลอง ดังนี้ ทำการเตรียมสารที่ต้องการทดสอบโดยละลายด้วย 1% (v/v) Tween 80 ให้ได้ค่าความเข้มข้นที่มากที่สุด จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารลงเป็นลำดับ และเติมสารลงใน 96-well microtiter plate โดยกำหนดให้แต่ละหลุมมีสารออกฤทธิ์ปริมาตร 20 µl และเชื้อทดสอบที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 CFU/mL ปริมาตร 20 µl และอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 60 µl โดยในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากันคือ 100 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหาค่า MIC ด้วยวิธีการ total plate counts หาค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ สำหรับการหาค่า MBC ทำได้โดยการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากหลุมที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ ปริมาตร 10 µl นำมาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร MHA ใหม่อีกครั้งและนำไปบ่ม ค่า MBC เป็นค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือที่ค่าความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อได้ โดยมีชุดควบคุมผลการทดลองบวกเป็น Chloramphenicol และมีชุดควบคุมผลการทดลองลบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ไม่มีเชื้อและ Tween 80 ที่ไม่มีสารออกฤทธิ์ ทำการทดลองในแต่ละเชื้อทดสอบจำนวน 3 ครั้ง และทำการทดลองในแต่ละครั้งแบบ 3 ซ้ำ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อทดสอบ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อโดยติดตามจากระยะเวลาในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยใช้วิธี Time-kill analysis ตามที่ระบุใน CLSI ปี 1999 ซึ่งสามารถติดตามประสิทธิภาพของสารจากจำนวนของเชื้อทดสอบที่รอดชีวิตหลังจากที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มีสารออกฤทธิ์ในช่วงเวลาต่างๆ โดยการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสาร Sabinene โดยมีวิธีการทดลองดังนี้ ทำการเตรียมน้ำมันหอมระเหย และ Sabinene ที่ละลายใน 1% (v/v) Tween 80 ให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารเป็น 1 เท่า 2 เท่า และ 4 เท่าของค่า MBC ที่หาได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB จากนั้นทำการเติมเชื้อทดสอบให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 10^6 CFU/mL และกำหนดให้มีชุดควบคุมผลการทดลองเป็นหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ, เชื้อทดสอบและ 1% (v/v) Tween 80 แต่ที่ไม่มีสารออกฤทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการแบ่งเก็บตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้คือ 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ในกรณีที่สารออกฤทธิ์สามารถฆ่าเชื้อได้เร็ว ควรทำแบ่งเก็บตัวอย่างที่ 3, 6, 9, 12, 15 และ 30 นาทีด้วย สำหรับวิธีการหาจำนวนของเชื้อทดสอบที่รอดชีวิตนั้น ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างที่แบ่งเก็บไว้ด้วยสารละลาย

0.85% (w/v) NaCl ทำการปิเปต 100 µl เพื่อนำมาเกลี่ยกระจายให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ CFU/mL นำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟ Time-kill curves เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อทดสอบที่รอดชีวิต (log_{10}CFU/mL) กับระยะเวลา (นาที) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและอภิปรายผล

น้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นแห้งถูกสกัดแยกได้จากการกลั่นแบบ hydrodistillation (12% (w/w)) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วย GC-MS analysis พบสารทั้งหมด 26 ชนิด โดยสารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสารประกอบ monoterpenes ร้อยละ 88.3 (w/w) รองลงมาคือ oxygenated monoterpenes และ sesquiterpenes ร้อยละ 8.3 และ 1.4 (w/w) ตามลำดับ โดยในสารประกอบเหล่านี้พบสารหลักเป็นสาร sabinene ร้อยละ 43 และสาร limonene ร้อยละ 39 นอกจากนี้ยังมีสาร terpinen-4-ol ร้อยละ 5.4 ดังแสดงผลในตารางที่ 2 ซึ่งสารส่วนใหญ่ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากการทดลองนี้ คล้ายกับผลการทดลองจากงานวิจัยก่อนนี้ ซึ่งพบสาร 33 ชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นสาร limonene ร้อยละ 31.1 สาร terpinen-4-ol ร้อยละ 13.9 และสาร sabinene ร้อยละ 9.13 ตามลำดับ (Ittipanichpong และคณะ, 2002)

หลังจากการสกัดแยกส่วนย่อยจากน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 มิลลิลิตรได้เป็น 3 ส่วนย่อยดังนี้ ส่วนย่อยที่ 1 (ช่วงอุณหภูมิ 55 – 90 องศาเซลเซียส) ส่วนย่อยที่ 2 (ช่วงอุณหภูมิ 90 – 115 องศาเซลเซียส) และส่วนย่อยที่ 3 (อุณหภูมิสูงกว่า 115 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 3) โดยหลังจากสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำให้ได้น้ำหนักรวมของสารทั้งหมด 82.1 กรัม พบว่าส่วนย่อยที่ 2 มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนประกอบอื่น โดยมีปริมาณมากกว่าครึ่งหนึ่งของทั้งหมด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย GC-FID analysis พบว่าส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ประกอบด้วยสาร sabinene เป็นส่วนใหญ่ (พบในส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ถึงร้อยละ 53 และ 41 ตามลำดับ) รองลงมาเป็นสาร limonene (พบในส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ถึงร้อยละ 13 และ 18 ตามลำดับ) แต่ในส่วนย่อยที่ 3 จะพบสารส่วนใหญ่เป็นสาร limonene ร้อยละ 25 สาร terpinen-4-ol ร้อยละ 19 และสาร sabinene ร้อยละ 17 ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 1)

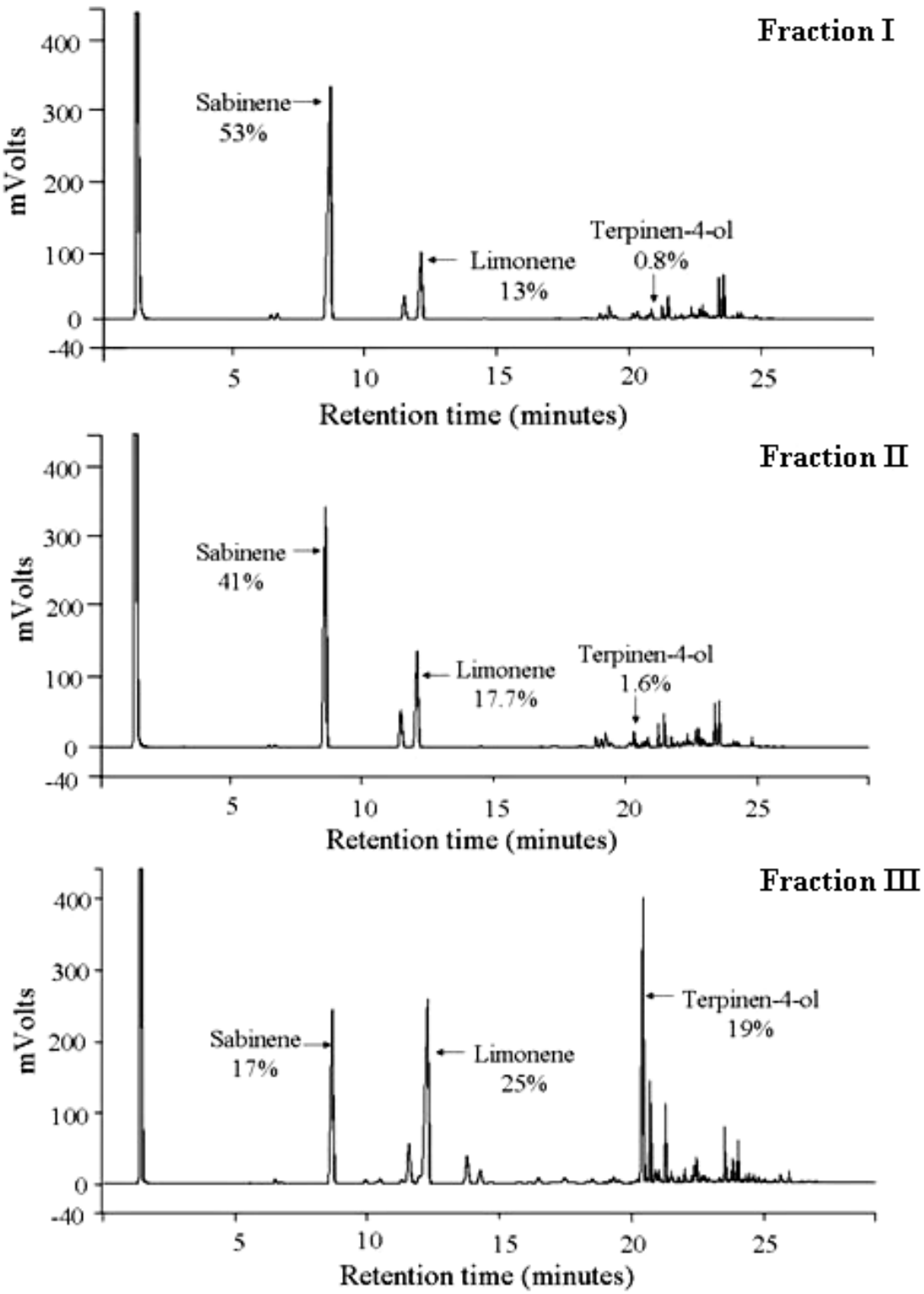
ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น

สาร	Rt* (นาที)	ร้อยละ
1. α- pinene	6.13	0.97
2. sabinene	7.54	42.73
3. α-phellandrene	7.90	0.70
4. limonene	8.22	39.05
5. β-trans-ocimene	8.46	0.12
6. 3-carene	8.81	2.70
7. terpinolene	9.13	0.35
8. β-cymene	9.47	1.18
9. β-pinene	12.13	0.54
10. linalool	12.38	0.12
11. cyclopentene	12.72	0.09
12. 5-isopropyl-2-methyl bicyclo-[3.1.0]-hexan-2ol	13.18	0.40
13. β-caryophyllene	13.56	0.27
14. terpinen-4-ol	13.70	5.40
15. thujol	14.24	0.10
16. α-caryophyllene	14.33	0.17
17. cis-p-meth-2,8-dienol	14.41	0.09
18. α-terpineol	14.57	0.98
19. cis-geraniol	14.90	0.36
20. trans-carveol	15.22	0.19
21. cis-carveol	15.80	0.29
22. cedr-8-en-15-ol	16.23	0.43
23. (S)-carvone	16.35	0.33
24. cuminaldehyde	16.71	0.04
25. spathulenol	20.16	0.52
26. dictamine	40.64	1.84

* Rt: Retention time (เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่าน column)

ตารางที่ 3 ส่วนย่อยที่สกัดแยกได้จากน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น

ส่วนย่อย (ช่วงอุณหภูมิ)	**น้ำหนัก (กรัม)**	**ปริมาณ (% (w/w))**
ส่วนย่อยที่ 1 (55 – 90 ºC)	16.0	18.2
ส่วนย่อยที่ 2 (90 – 115 ºC)	43.9	50.1
ส่วนย่อยที่ 3 (สูงกว่า 115 ºC)	22.2	25.3



ภาพที่ 1 GC-chromatogram **ของ** 3 **ส่วนย่อยในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น**

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย, ส่วนย่อยทั้ง 3 ส่วน และ 3 สารหลักที่พบเป็นส่วนใหญ่คือ สาร sabinene, สาร limonene และสาร terpinen-4-ol ซึ่งใช้วิธี paper disk diffusion ในการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารทดสอบเป็น 5 มิลลิกรัม/disc (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย, ส่วนย่อย 3 ส่วนและ 3 สารหลัก[a] (โดยน้ำหนัก)

เชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)[b]								
	น้ำมันหอมระเหย	ส่วนประกอบย่อย1	ส่วนประกอบย่อย2	ส่วนประกอบย่อย3	Sabinene	Limonene	Terpinen-4-ol	Pen G	Chloram
B. subtilis (ATCC 6633)	18.9 ± 0.5	21.3 ± 0.5	20.0 ± 0.4	14.3 ± 0.3	14.8 ± 0.5	NA	11.1 ± 0.4	28.0 ± 1.8	31.7 ± 0.4
S. aureus (MSSA)	29.5 ± 0.7	24.4 ± 0.5	24.1 ± 0.6	13.7 ± 0.4	18.0 ± 0.5	NA	10.5 ± 0.5	32.8 ± 0.3	22.0 ± 0.5
E. coli (ATCC 25922)	19.1 ± 0.4	17.3 ± 0.4	13.7 ± 0.6	8.3 ± 0.2	12.1 ± 1.0	NA	6.7 ± 0.4	NA	21.3 ± 0.7
P. aeruginosa (ATCC 27853)	7.7 ± 0.6	9.3 ± 0.5	8.3 ± 0.3	8.2 ± 0.2	7.2 ± 0.4	NA	NA	NA	15.2 ± 0.5

[a]ความเข้มข้นของแต่ละสาร 5 มิลลิกรัม/disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร), ชุดควบคุมผลบวกใช้ยาปฏิชีวนะ penicillin G ความเข้มข้น 10 U/ disc และยาปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้น 30 μg / disc

[b]ผลการทดลองแสดงข้อมูลจากค่า mean ± 1 SD, ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง และทดลองในแต่ละครั้งแบบ 3 ซ้ำ

Pen G = Penicillin G; Chloram = Chloramphenicol; NA = ไม่พบฤทธิ์ (6 มิลลิเมตร)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่แรงของส่วนย่อยที่ 1 และ 2 (กล่าวคือให้ส่วนใสของ inhibition zone มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร) เมื่อทดสอบกับเชื้อทดสอบสายพันธุ์ methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) *B. subtilis* และ *E. coli* แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งน้ำมันหอมระเหยและส่วนย่อยดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบ *P. aeruginosa* น้อย เห็นได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone น้อยกว่า 10 มิลลิเมตร และจากการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone พบว่าส่วนย่อยที่ 1 และ 2 มีขนาดใกล้เคียงกับของน้ำมันหอมระเหย ในขณะที่ส่วนย่อยที่ 3 พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ลดลง กล่าวคือมีฤทธิ์ปานกลางต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และ MSSA และมีฤทธิ์อ่อนต่อเชื้อทดสอบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* จากผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงให้

เห็นว่าสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบอยู่ในส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ซึ่งสารที่พบเป็นส่วนใหญ่ คือสาร sabinene (ร้อยละ 54 และ 41 ในส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) จึงสามารถกล่าวได้ว่าสาร sabinene เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์(ตารางที่ 3 และ 4)

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยกำหนดน้ำหนักของแต่ละสารให้เท่ากัน พบว่าสาร sabinene มีฤทธิ์น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยและส่วนย่อยที่ 1 และ 2 ส่วนสาร terpinen-4-ol มีฤทธิ์อ่อนถึงปานกลางต่อเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป และไม่มีฤทธิ์ต่อ *P. aeruginosa* ในขณะที่สาร limonene ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบใดๆ เลย สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยและส่วนย่อยที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารหลักเดี่ยวๆ แต่ละชนิด (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กันของสารต่างๆที่มีอยู่ร่วมกันในน้ำมันหอมระเหย นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ sabinene สาร terpinen-4-ol และส่วนผสมระหว่าง sabinene และ terpinen-4-ol ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าสารบริสุทธิ์ sabinene สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่วนผสมระหว่าง sabinene และ terpinen-4-ol ในอัตราส่วนต่างๆ เช่น 9:1, 3:1, 1:1 และ 1:3 (v/v) แสดงให้เห็นว่าในส่วนผสมของทั้ง 2 สารดังกล่าวไม่มีการเสริมฤทธิ์กันของสาร (ไม่แสดงข้อมูล) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างส่วนผสมของ sabinene กับสารในกลุ่มไฮไดรคาร์บอนต่างๆ ในอัตราส่วนเป็น 9:1 (v/v) เช่น สาร α-terpinene สาร limonene สาร eugenol และสาร safrole ซึ่งเป็นสารที่ทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*) แต่ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของสารผสมเหล่านี้เช่นกัน (ไม่แสดงข้อมูล) จากผลการทดลองเหล่านี้จึงชี้เห็นว่าสาร sabinene เป็นสารหลักในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่าสาร terpen-4-ol และสารในกลุ่มไฮไดรคาร์บอนต่างๆ ซึ่งในการเสริมฤทธิ์กันของสารออกฤทธิ์ต่างๆ นั้น Nakatsu *et al*. เคยรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากต้น Thyme ซึ่งพบว่าส่วนของน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าฤทธิ์ของสารเดี่ยวทั้ง 6 สารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย (Nakatsu และคณะ, 2000)

จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย และสาร sabinene ที่สกัดได้จากผลมะแขว่นต่อเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี microdilution susceptibility assay เพื่อหาค่า MIC และ MBC ของสารทดสอบต่างๆ โดยมียาปฏิชีวนะ Chloramphenicol เป็นชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene จากผลมะแขว่น ต่อเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์รวมทั้งเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์

เชื้อทดสอบ	น้ำมันหอมระเหย (g/L)		Sabinene (g/L)		Chloramphenicol (g/L)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. aureus (ATCC 25923; MSSA)	0.25	2.0	4.22	16.88	0.00625	0.0125
S. aureus (ATCC 43300; MRSA)	0.50	2.0	4.22	16.88	0.01250	0.050
E. coli (ATCC 25922)	0.50	2.0	4.22	16.88	0.00313	0.025
E. coli (ESBL-producing)	1.0	2.0	4.22	16.88	0.00313	0.050
P. aeruginosa (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA	0.001	0.200
P. aerugionsa (MDR)	NA	NA	NA	NA	0.001	0.200

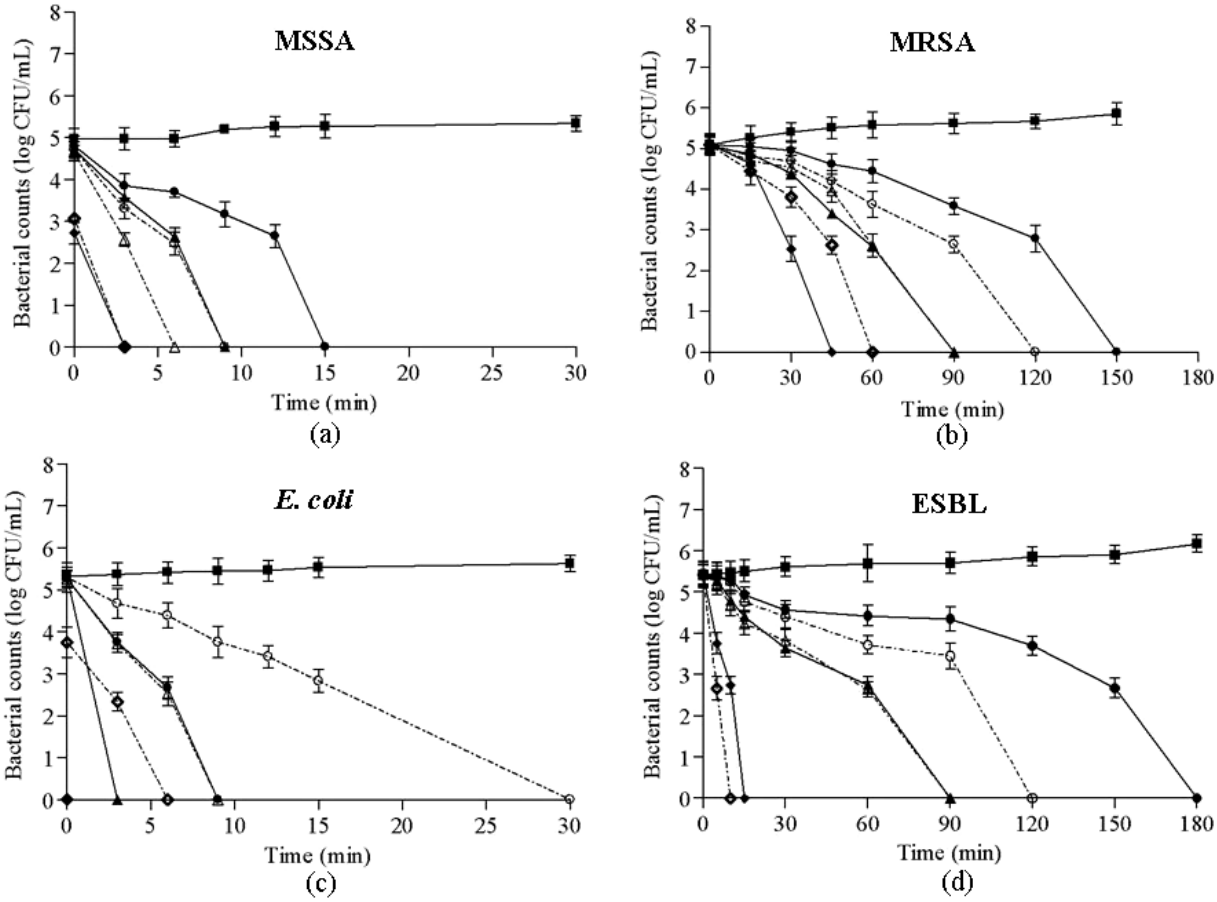
NA = ไม่พบฤทธิ์

MIC และ MBC แสดงค่าจากการทดลอง 3 ครั้ง และทดลองในแต่ละครั้งแบบ 3 ซ้ำ

น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* (MSSA) < MRSA = *E. coli* < ESBL-producing *E. coli* และมีค่า MBC ต่อเชื้อดังกล่าวเป็น 2 g/l เท่ากัน แต่ในทางตรงกันข้ามน้ำมันหอมระเหยนี้ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยที่ค่าความเข้มข้นสูงยังไม่สามารถฆ่า *P. aeruginosa* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ สำหรับสาร sabinene พบว่ามีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ MSSA MRSA *E. coli* และ ESBL-producing *E. coli* ในแต่ละเชื้อเท่ากันคือ 4.22 และ 16.88 g/l ตามลำดับ และไม่พบฤทธิ์ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์เช่นกัน ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่าสารบริสุทธิ์ sabinene แม้จะใช้ความเข้มข้นของสาร sabinene สูงก็ตาม แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กันของสารต่างๆ ในน้ำมันหอมระเหย

ถึงแม้ว่าค่า MIC และ MBC จะสามารถบ่งบอกถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene จากผลมะแขว่นได้ แต่ข้อมูลที่ได้ยังไม่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสาร เช่น เวลาที่สารใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาถึงเวลาที่สารใช้ในการฆ่าเชื้อโดยติดตามการลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มีสาร ซึ่งผลที่ได้จะสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพ รวมทั้งความเร็วของสารทดสอบในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Brady และคณะ, 2006) โดยผลการทดลองในการหาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene ต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่มี

ความไวต่อยาปฏิชีวนะ (MSSA and *E. coli*) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (MRSA and ESBL-producing *E. coli*) แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดง Time-kill curves ของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene ต่อเชื้อทดสอบ (a) MSSA (b) MRSA (c) *E. coli* และ (d) ESBL-producing *E. coli* โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมีดังนี้: ●= MBC; ▲= 2 × MBC; ◆= 4 × MBC (2, 4 และ 8 g/L, ตามลำดับ); สำหรับความเข้มข้นของสาร sabinene มีดังนี้: ○= MBC; △= 2 × MBC และ ◇= 4 × MBC (16.9, 33.8 และ 67.6 g/L, ตามลำดับ) ■ =ชุดควบคุมผลลบ โดยผลการทดลองแสดงข้อมูลจากค่า mean ± 1 SD ซึ่งได้จากการทดลอง 3 ครั้ง และทดลองในแต่ละครั้งแบบ 3 ซ้ำ

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของสาร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene เป็น 2 เท่าและ 4 เท่าของค่า MBC ตามลำดับ ทำให้สารมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น เห็นได้จากจำนวนที่ลดลงของเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตจากการถูกเลี้ยงในภาวะที่มีสารดังกล่าว

ทั้งน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ MSSA และ *E. coli* ได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* โดยที่ความเข้มข้นของสารเท่ากันคือ 4 เท่าของค่า MBC จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหย (8 g/L) และสาร sabinene (67.6 g/L) ทำให้เชื้อทดสอบ MSSA, *E. coli*, ESBL-producing *E. coli* และ MRSA ตายได้

ภายในเวลา 3, 6, 15 และ 60 นาที ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้นของสารเท่ากันคือ 2 เท่าของค่า MBC จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหย (4 g/L) และสาร sabinene (33.8 g/L) สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ MSSA และ *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 10 นาที และสามารถฆ่าเชื้อ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 90 นาที แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของสารเป็น 1 เท่าของค่า MBC นั้น น้ำมันหอมระเหยสามารถฆ่า MSSA และ *E. coli* ได้ภายในเวลา 15 และ 9 นาที ตามลำดับ ส่วนเชื้อ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* ถูกฆ่าโดยสาร sabinene และน้ำมันหอมระเหยได้ภายในเวลา 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene ต่อเชื้อสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะจะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน กล่าวคือสาร sabinene สามารถฆ่าเชื้อ MSSA ได้เร็วกว่าเชื้อ *E. coli* ภายในเวลา 10 นาทีแรก แต่น้ำมันหอมระเหยกลับมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าเชื้อ MSSA ภายในเวลา 10 นาที ตรงกันข้ามกับผลของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene ต่อเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* ที่มีรูปแบบเหมือนกันคือ ในทุกค่าความเข้มข้นสามารถฆ่าเชื้อดังกล่าวได้น้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ MSSA และ *E. coli* ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้โดย May *et al.* ที่ค้นพบว่าน้ำมันจากต้นชา (Tea tree oil) นั้นก็มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมีประสิทธิภาพต่อเชื้อสายพันธุ์ MSSA มากกว่า MRSA (May และคณะ, 2000) โดยน้ำมันจากใบชานี้สามารถฆ่าเชื้อ MSSA ได้ภายใน 30 นาที ในขณะที่สามารถฆ่า MRSA ได้ภายใน 6 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 5 g/L เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นนั้น มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ MSSA และ MRSA ได้ดีกว่าน้ำมันจากต้นชาดังกล่าว เนื่องจากที่ความเข้มข้นแค่เพียง 4 g/L ก็สามารถฆ่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ภายในเวลา 10 นาทีและ 90 นาที ตามลำดับ

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene นี้พบว่ามีความคล้ายกันมากในแต่ละค่าของจำนวนเท่า MBC (ภาพที่ 2) แต่อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยก็มีค่า MBC ที่ต่ำกว่าสาร sabinene 8 เท่า (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียดีกว่าสาร sabinene ในทุกเชื้อทดสอบ ส่วนเชื้อ MSSA ที่ถูกฆ่าโดยสาร sabinene ได้เร็วกว่าเชื้อ *E. coli* อาจเป็นผลมาจากสาร sabinene มีความสามารถในการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเกาะจับกับองค์ประกอบภายในเซลล์ของเชื้อ MSSA ได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli* นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังค้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* ได้ดีกว่าสาร sabinene อีกด้วย แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารย่อยต่างๆที่มีอยู่เป็นส่วนน้อยในองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย หรืออาจเป็นการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารหลักและสารย่อยอื่นๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหย

งานวิจัยนี้ได้ค้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น และสาร sabinene ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยนี้ มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาและดื้อต่อยาปฏิชีวนะครอบคลุมทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ โดยประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยและสาร sabinene ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของสาร ทั้งนี้จากผลการทดลองที่ได้ค่า MIC MBC และระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของสาร ล้วนสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารบริสุทธิ์ sabinene และด้วยประสิทธิภาพที่ดีของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ MRSA และ ESBL-producing *E. coli* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร รวมไปถึงการนำน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์เพื่อลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาซึ่งนับได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Brady A., Loughlin R., Gilpin D., Kearney P., Tunney M., *In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and -sensitive Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms.* J. Med. Microbiol., 55, 1375-1380 (2006).

Burnette, R. & Morikawa, B. Zanthoxylum propagation study in Northern Thailand. (2005)

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline M26A*. CLSI, Wayne, PA, USA (1999).

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Preference Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility test Approved standards M2-A7*: *Eleventh Informational Supplement M100-S15.* CLSI, Wayne, PA, USA (2005).

Clinical and Laboratory Standard Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement*. CLSI, Wayne, PA, USA (2007).

Diekema D.J., Dodgson K.J., Sigurdardottir B., Pfaller M.A., *Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need*. J. Clin. Microbiol., 42, 2879-283 (2004).

Iinuma M., Tsuchiya H., Sato M., Yokoyama J., Ohyama M., Ohkawa Y., Tanaka T., Fujiwara S., Fujii T., *Flavanones with potent antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J. Pharm. Pharmacol., 46, 892-95 (1994).

Islam, A., Sayeed, A., Bhuiyan, M.S.A., Mosaddik, M.A., Astaq Modal Khan, G.R.M.

Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. *Fitoterapia, 72:* 428-430. (2001).

Ittipanichpong C., Ruangrungsi N., Pattanaautsahakit C., *Chemical compositions and pharmacological effect of essential oil from the fruit of Zanthoxylum limonella*. J. Med. Assoc. Thai., 85, 344-353 (2002).

Livermor D.M., *Beta-Lactamase in laboratory and clinical resistance*. Clin. Microbiol. Rev., 8, 557-584 (1995).

May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L., *Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates.* J. Antimicrob. Chemoth., 45, 639-43 (2000).

Mehta M.B., Kharya M.D., Srivastava R., *Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of Zanthoxylum alatum Roxb*. Indian Perfume, 25, 19-21 (1981).

Nakatsu T., Lupo A.T., Chinn J.W., Kang R., *Biological activity of essential oils and their constituents.* In: Studies in Nutural products chemistry. Atta-ur-Rahman, ed. Elsevier Science B.V., 571-631 (2000).

Rao, L.J.M. Quality of essential oils and processed materials of selected spices and

herbs. , *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22:* 808-816. (2000).

Somanabundhu, A., Ruangrungsi, N., Lange, G.L., Organ, M.G. Constituents of the stem bark

of *Zanthoxylum limonella. Journal of Science Society Thailand, 18*: 181-185. (1992).

Tatsadjieua L.N., Essia Nganga J.J., Ngassouma M.B., Etoab F.X., *Antibacterial and antifungal activity of Xylopia aethiopica, Monodora myristica, Zanthoxylum xanthoxyloides and Zanthoxylum leprieurii from Cameroon*. Fitotherapia, 74, 469-472 (2003).

Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Krisadaphong, P. & Apiwathnasorn, C. Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors. (2004).

Output

Tangjitjaroenkun, J., Chavasiri, W.*, Thunyaharn, S., **Yompakdee, C.*** Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. Manuscript submitted to Journal of Essential Oil Research.

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นาง ชุลี ยมภักดี

   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs Chulee Yompakdee
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ A-4
3. ที่อยู่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02 2185070, 022185085 โทรสาร 02 2527576

   e-mail: chulee.y@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

สถาบันการศึกษา	สาขาวิชา	ปีที่การศึกษา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	วท. บ.(เทคนิคการแพทย์)	2524- 2528
มหาวิทยาลัยมหิดล	วท. ม.(จุลชีววิทยา)	2528- 2531
Osaka University	Ph.D (Fermentation Technology)	2536- 2539
Roswell Park Cancer Institute	Post doctoral fellow in Cancer Genetics	2543-2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   จุลชีววิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับยีสต์ ชีววิทยาโมเลกุล การประยุกต์ใช้ยีสต์ในงานเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

Boonkerd, S., **Yompakdee, C.**, Miyakawa, T. and Chavasiri, W. 2011. Screening of Thai medicinal plants for inhibitor of Ca^{2+} signaling using a yeast cell growth-based assay. RJPBCS. 2(2): 549-557.

Wangkangwan W, Boonkerd S, Chavasiri W, Sukapirom K, Pattanapanyasat K, Kongkathip N, Miyakawa T, **Yompakdee C**. (2009) Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* is an inhibitor of Ca^{2+}-signal-mediated cell-cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(7):1679-1682.

Mickle K L, Ramanathan S, Oliva A, Chaudari A, **Yompakdee C**, Scott D, Rosebrock A, Leatherwood J and Huberman J. (2007). Checkpoint- Independence of Most DNA Replication Origins in fission yeast. BMC Molecular Biology 8:112

Yompakdee C and Huberman JA (2004). Enforcement of Late Replication Origin Firing by Clusters of Short G-rich DNA Sequences. J Biol Chem. 279(40):42337-42344.

Yompakdee C, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996). A putative membrane protein, Pho88p, involved in inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 251 : 580-590

Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996). A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 171: 41-47

Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, **Yompakdee C**, Harashima S, Oshima Y (1996). Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 29 : 344-351

Ogawa N, Noguchi K, Sawai H, Yamashita Y, **Yompakdee C**, Oshima Y (1995). Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of P_i signals in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 15 : 997-1004.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายวรินทร ชวศิริ
   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Warinthorn Chavasiri
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็คโทรนิกส์ (e-mail)
   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2218-7625 โทรสาร 0-2218-7598 ไปรษณีย์อิเล็คโทรนิกส์ (e-mail): warintho@yahoo.com
4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์	ตรี	เคมี	2528
จุฬาลงกรณ์	โท	เคมีอินทรีย์	2531
Texas A&M Univ.	เอก	เคมี	2536

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เคมีสังเคราะห์ เคมีการเกษตร

ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004 ถึงปัจจุบัน

1. Adisakwattana, S.; Sookkongwaree, K.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Ngamrojnavanich, N. Chavasiri, W.; Deesamer, S.; Yibchok-anun, S. “Structure-Activity Relationships of *trans*-Cinnamic Acid Derivatives on α-Glucosidase Inhibition” *Bioorg. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2893-2896. [JIF (2007) = 2.604]
2. Rungprom, W.; Chavasiri, W.; Kokpol, U.; Kotze, A.; Garson, M.J. “Bioactive Chromodorolide Diterpenes from an Aplysillid Sponge” *Mar. Drugs*, **2004**, *3*, 101-107. [JIF (2007) = 1.103]
3. Munbungjong, W.; Lee, E.H.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. “Indium-mediated Mild and Efficient One-pot Synthesis of Alkyl Phenyl Selenides” *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8769-8771. [JIF (2007) = 2.615]

4. Kang, D.H.; Joo, T.Y.; Hwa, E.; Chaysripongkul, S.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "A Mild and Efficient Reaction for Conversion of Carboxylic Acids into Acid Bromides with Ethyl Tribromoacetate/triphenylphosphine under Acid-free Conditions" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5693-5696. [JIF (2007) = 2.615]
5. Morimoto, M.; Ohta, Y.; Ihara, T.; Arima, K.; Fukumoto, H.; Chavasiri, W.; Komai, K. "Insect Antifeedants in the Thailand Plant Extracts against the Common Cutworm, *Spodoptera litura*, and a Subterranean Termite, *Reticulitermes speratus*" *Jpn J Environ Entomol Zool.*, **2006**, *17*, 1-7.
6. Pleumpanupat, W.; Chavasiri, W. "An Efficient Method for Chlorination of Alcohols Using PPh_3/Cl_3CCONH_2" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6821-6823. [JIF (2007) = 2.615]
7. Morimoto, M.; Fukumoto, H.; Hiratani, M.; Chavasiri, W.; Komai, K. Insect Antifeedants, Pterocarpans and Pterocarpol, In Heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2006**, *70*, 1864-1868. [JIF (2007) = 1.247]
8. Chantarasriwong, O.; Jang, D.O.; Chavasiri, W. "A Practical and Efficient Method for the Preparation of Sulfonamides Utilizing Cl_3CCN/PPh_3" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7489-7492. [JIF (2007) = 2.615]
9. Intaranongpai, J.; Chavasiri, W.; Gritsanapa, W. "Anti-head Lice Component of *Annona squamosa* Seed" *Southeast Asain J. Trop. Med. Public Health*, **2006**, *37*, 532-535.
10. Pluempanupat, W.; Chantarasriwong, O.; Taboonpong, P.; Jang, D.O.; Chavasiri, W. "Reactivity of Chlorinating Agents for the Chlorination of Alcohols and Carboxylic Acids: A Comparative Study" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 223-226. [JIF (2007) = 2.615]
11. Kang, D.H.; Joo, T.Y.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "Radical Mediated Direct Conversion of Aldehydes into Acid Bromides" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 285-287. [JIF (2007) = 2.615]
12. Buranaprasertsuk, P.; Tangsakol, Y.; Chavasiri, W. "Epoxidation of Alkenes Catalyzed by Cobalt(II) Calix[4]pyrrole" *Catal. Commun.* **2007**, *8* 310-314. [JIF (2007) = 2.394]
13. Jarupinthusophon, S.; Thong-in, U.; Chavasiri, W. "Catalytic Oxidative Cleavage of Terminal Olefins by Chromium(III) Stearate" *J. Mol. Cat. A, Chem.* **2007**, *270*, 289-294. [JIF (2007) = 2.707]
14. Aungsupravate, O.; Kangwansupamonkon, W.; Chavasiri, W.; Kiatkamjornwong, S. "Synthesis and Properties of Solvent Absoptive Methyl Methacrylate-Divinylbenzene

Copolymer Beads" *Polymer Engineering & Science*, **2007**, *47*, 447-459. [JIF (2007) = 1.272]

15. Deesamer, S.; Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Douillard, S.; Barbier, P.; Vidal, N.; Combes, S.; Finet, J.-P. "Synthesis and Biological Evaluation of Isoflavone Analogues from *Dalbergia oliveri* Gamble" *Tetrahedron,* **2007**, *63*, 12986-12993. [JIF (2007) = 2.869]
16. Pleumpanupat, W.; Adasakwattana, S.; Yibchok-Anun, S.; Chavasiri, W. "Synthesis of *N*-Phenylphthalimides Derivatives as α-Glucosidase Inhibitor" *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30,* 1501-1506. [JIF (2007) = 1.085]
17. Tongkate, P., Pluempanupat, W., Chavasiri, W. "Hexabromoacetone and ethyl tribromoacetate: a highly efficient reagent for bromination of alcohol" *Tetrahedron Lett.,* **2008**, *49,* 1146-1148. [JIF (2007) = 2.615]
18. Chang, J.W.W.; Chee, S.; Mak, S.; Buranaprasertsuk, P.; Chan, P.W.H.; Chavasiri, W. "Copper-catalyzed Ullmann coupling under ligand and additive free conditions. Part I: *O*-arylation of phenols with aryl halides" *Tetrahedron Lett.,* **2008**, *49,* 2018-2022. [JIF (2007) = 2.615]
19. Buranaprasertsuk, P.; Chang, J.W.W.; Chan, P.W.H.; Chavasiri, W. "Copper-catalyzed Ullmann coupling under ligand and additive free conditions. Part II: *S*-arylation of thiols with aryl iodides" *Tetrahedron Lett.,* **2008**, *49,* 2023-2025. [JIF (2007) = 2.615]
20. Chantarasriwong, O.; Jang, D.O.; Chavasiri, W. "Cl_3CCONH_2/PPh_3: Versatile Reagent for the Synthesis of Esters" *Synth Comm.,* **2008**, *38*, 2845-2856. [JIF (2007) = 0.977]
21. Munbunjong, W.; Lee, E.H.; Ngernmaneerat, P.; Kim, S.J.; Singh, G.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "Indium-mediated Cleavage of Diphenyl Diselenide and Diphenyl Disulfide: Efficient One-pot Synthesis of Unsymmetrical Diorganyl Selenides, Sulfides, and Selenoesters", *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2467-2471. [JIF (2007) = 2.869]
22. Pongkittiphan, V.; Theodorakis, E.A.; Chavasiri, W. "Hexachloroethane: a highly efficient reagent for the synthesis of chlorosilanes from hydrosilanes" *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 5080-5082. [JIF (2007) = 2.615]