ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes*) ของสารทรานส์-ออกซิเรสเวอราทรอล และเรสรอซินอลจากแก่นมะหาด

อรพิณ โกมุติบาล[1,*] กัลยาภรณ์ จันตรี[1]
อัยลดา เกตุแก้ว[1] จณิสตา ใจสมุทร[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพฯ
[*]Corresponding author e-mail: orapinkom@gmail.com

บทคัดย่อ

Propionibacterium acnes เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว สิวเป็นโรคผิวหนังที่ติดอันดับ 1 ใน 3 ของประเทศไทย ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากแก่นมะหาด และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จากการแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ ทรานส์-ออกซิเรสเวอราทรอล และเรสรอซินอล สำหรับการพิสูจน์โครงสร้างใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และวิธีเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับสารที่มีผู้รายงานไว้ จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรต และทรานส์-ออกซิเรสเวอราทรอล แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้สูงที่สุด มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.56 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ และเรสรอซินอล แสดงฤทธิ์ที่ต่ำที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 mg/ml และ MBC เท่ากับ 1.56 mg/ml

คำสำคัญ : มะหาด/ ทรานส์-ออกซิเรสเวอราทรอล/ เรสรอซินอล/ *Propionibacterium acnes*

Anti-Acne-Inducing Bacterial Activity (*Propionibacterium acnes*) of *Trans*-Oxyresveratrol and Resorcinol from Heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb.

Orapin Komutiban[1,*] Kanlayapron Chantree[1]
Ailada Katkaew[1] Janissata Jaisamut[1]

[1]Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangkok
[*]Corresponding author e-mail: orapinkom@gmail.com

Abstract

Propionibacterium acnes has been recognized as one of main causative agents in pathogenesis of acne. Acne was one of the top three diseases patients in Thailand. The objective on this study for isolated of chemical constituents from heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. and antibacterial activity against *P. acnes*. *trans*-oxyresveratrol and resorcinol were isolated from crude ethyl acetate extract and elucidated by spectroscopic analyses and by comparison with known compounds. The crude ethyl acetate extract and isolated compounds were evaluated for antibacterial activity against *P. acnes*. Crude ethyl acetate extract and *trans*-oxyresveratrol exhibited the higher antibacterial activity at MIC and MBC value 0.78 mg/ml and 1.56 mg/ml, respectively. Resorcinol showed lower antibacterial activity with MIC 3.125 mg/ml and MBC 1.56 mg/ml.

Keywords: *Artocapus lakoocha* Roxb./ *Propionibacterium acnes*/ *trans*-oxyresveratrol/ resorcinol

บทนำ

สิวเป็นโรคที่พบได้ในคนทั่วไปในทุกช่วงวัย ตั้งแต่วัยรุ่นไปจนถึงผู้ใหญ่ อาจก่อให้เกิดความรำคาญให้แก่ผู้ที่เป็นโรคนี้ สาเหตุของสิวนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความผิดปกติในการสร้างเซลล์ผิวชั้นเคราติน (keratin) ต่อมไขมันผลิตซีบัมมากเกินความจำเป็น เกิดการอักเสบเมื่อถูกการกระตุ้น และเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* (Dreno, 2004; Williams *et al.,* 2012) วิธีทั่วไปที่ใช้ในการรักษาโรคสิว ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น retinoid, tetracycline, erythromycin, macrolide และ clindamycin (Williams *et al.,* 2012) แต่ยาปฏิชีวนะเหล่านี้อาจส่งผลข้างเคียงแก่ผู้ใช้ได้ ปัจจุบันจึงมีแนวคิดในการค้นหาส่วนประกอบจากธรรมชาติ เพื่อที่จะนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ สมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ในการรักษาสิวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น กระเทียม หัวหอมแดง ขมิ้นชัน ว่านหางจระเข้ และเปลือกมังคุด เป็นต้น โดยสมุนไพรเหล่านี้ช่วยในการควบคุมความมันของผิว ช่วยให้เซลล์หลุดลอกจากต่อมท่อไขมัน และระงับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดตุ่มหนองสิว (ญานี, 2549) มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ทดลองและให้ผลว่าสารสกัดจากธรรมชาติมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวได้ ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดจากเปลือกมังคุด (Chomnawang *et al*., 2007) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *P. acnes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวของผลมะเม่า (Thananant & Satnako, 2015) สารสกัดจากดอกและเปลือกแม็กโนเลีย ซึ่งสารที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (Park *et al.,* 2004) เป็นต้น

มะหาด มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Artocarpus lakoocha* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae ชื่อท้องถิ่นภาคเหนือ “หาดหนุน” ภาคกลาง “หาด” ส่วนทางภาคใต้ “มะหาดใบใหญ่” เป็นต้น (คมกริช, 2557) ในประเทศไทยใช้สารสกัดจากแก่น ราก เปลือกมะหาดมาต้มกับน้ำกินเพื่อช่วยในการขับถ่ายพยาธิใบไม้ *Haplorchis taichui* นอกจากนี้ยังพบว่ามะหาดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ (Jagtap & Bapat, 2010) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (HSV-1, HSV-2) ที่ก่อเกิดโรคเริม (Chanasa *et al.,* 2008) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ภายในช่องปาก (Teangaisan *et al*., 2014; Pumpaluk *et al.,* 2017) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากแก่นมะหาด พบว่าในแก่นมะหาดมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ oxyresveratrol (2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene) ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มสติวบีน (Tengamnuay *et al.,* 2006; Chuanasa *et al.,* 2008; Povichit *et al.,* 2010) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา

เมธทิซิลิน (MRSA) (Joung *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม 2-arylbenzo furans ได้แก่ prenylated-2-arylbenzo furans-artolakoochol, 4 - hydroxy artolakoochol และ cyclo-artolakoochol (Likhitwitayawuid *et al.*, 2010) สารในกลุ่ม prenylated flavones ได้แก่ 5,7,2′,4′-tetrahydroxy-3-prenyl-6-geranylflavone และ cudraflavone C (Likhitwitayawuid *et al.*, 2010) สารในกลุ่มไตรเทอปีนที่มีผู้เคยรายงานไว้ ได้แก่ lupeol, lupeol acetate และ betulinic acid (Nguyen *et al.*, 2010), friedelin, β-sitostenone และ 1-tricosanoyl-glycerol (Nguyen *et al.*, 2011) จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีผู้รายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญที่แยกได้จากแก่นมะหาด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแยกองค์ประกอบหลักทางเคมีของสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต ที่ได้จากแก่นมะหาด และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นขององค์ประกอบทางเคมี อันจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยทางผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและเภสัชวิทยาต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต ที่ได้จากแก่นมะหาด และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (SHIMADZU รุ่น FT-IR-Tracer 100 ประเทศญี่ปุ่น) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Bruker รุ่น AVANCE 300 ประเทศเยอรมัน) อิเล็กโทสเปรย์-ไอออนไนเซชันแมสสเปกโทรมิเตอร์ (Thermo Finnigan รุ่น LC-Q ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (SHIMADZU รุ่น UV-2400 PC ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) (Precisa รุ่น XR 125SM ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เครื่องให้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Melting point) รุ่น SM11 Stuart® ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องระเหยสารสุญญากาศ รุ่น N-series EYELA ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ไดแก่ แก่นมะหาดบดละเอียด จากจังหวัดอุบลราชธานี เก็บตัวอย่างเมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 ตัวดูดซับสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซิลิกาเจลชนิดหยาบ (ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 มิลลิเมตร) และชนิดละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.063 มิลลิเมตร) (Merck ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) (ซิลิกาเจล 60 F254; Merck ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ตัวทำละลาย

อินทรีย์ต่าง ๆ สาร *p*-anisaldehyde (Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Trypticase soy agar) และชนิด TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) สาร Resazurin indicator (Merck ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

2. การสกัดสารจากแก่นมะหาด

ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 2.3 กิโลกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 10 ลิตร แล้วทำการแช่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตรต ปริมาตร 8 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรต ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

3. การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

แบ่งสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต (15 กรัม) แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว (Quick column chromatography) ขนาด 500 มิลลิลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร โดยบรรจุ silica gel ขนาดกลาง (Silica gel 60; 0.040-0.063 mm, Merck 109385) ใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ CH_2Cl_2 - acetone และ acetone - methanol (100:0) ทำการเพิ่มขั้วทีละ 10% เก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์รวมสารเป็นกลุ่ม ๆ โดยนำมาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV; 254 และ 365 nm) developing reagent บนแผ่น TLC ด้วย *p*-anisaldehyde reagent นำไปให้ความร้อนที่ 80-120 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะปรากฏเป็นสีแตกต่างกัน และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน ได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ดังแสดงแผนผังการสกัดและการแยกสาร ภาพที่ 1

เมื่อนำกลุ่มสารทั้ง 10 กลุ่ม และสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต มาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV ที่ความยาวคลื่น 254, 365 nm) และ spray แผ่น TLC ด้วย *p*-anisaldehyde reagent นำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนเกิดสี เปรียบเทียบกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่า

สารกลุ่มที่ 1 (146 มิลลิกรัม ของหนืดสีเหลือง) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารประกอบพวกเทอร์ปีน ซึ่งจะให้ดวงสารสีม่วง และสีเหลืองกับ *p*-anisaldehyde reagent

สารกลุ่มที่ 2 (177.6 มิลลิกรัม ของหนืดสีเหลือง) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารประกอบพวกเทอร์ปีน ซึ่งจะให้ดวงสารสีม่วงและสีเหลืองกับ *p*-anisaldehyde reagent

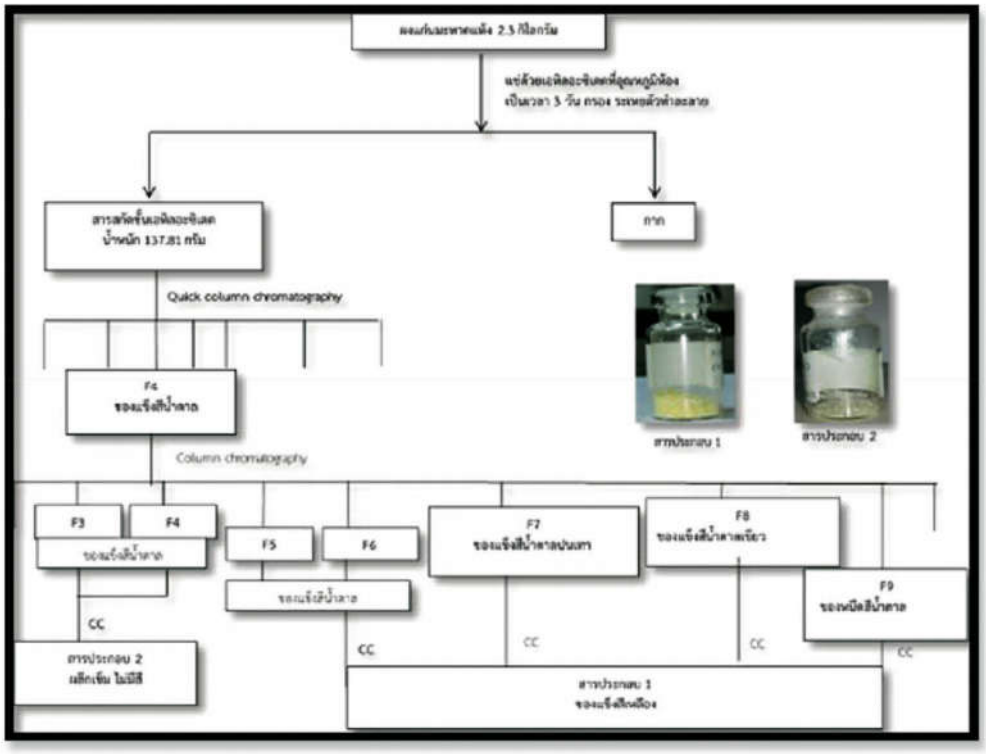
สารกลุ่มที่ 3 (143 มิลลิกรัม ของแข็งสีน้ำตาล) จากการตรวจสอบด้วย

TLC พบว่ามีสารประกอบพวกเทอร์ปีน ซึ่งจะให้ดวงสารสีม่วงกับ *p*-anisaldehyde reagent นอกจากนี้ยังพบดวงสารสีชมพูกับ *p*-anisaldehyde reagent เป็นดวงใหญ่

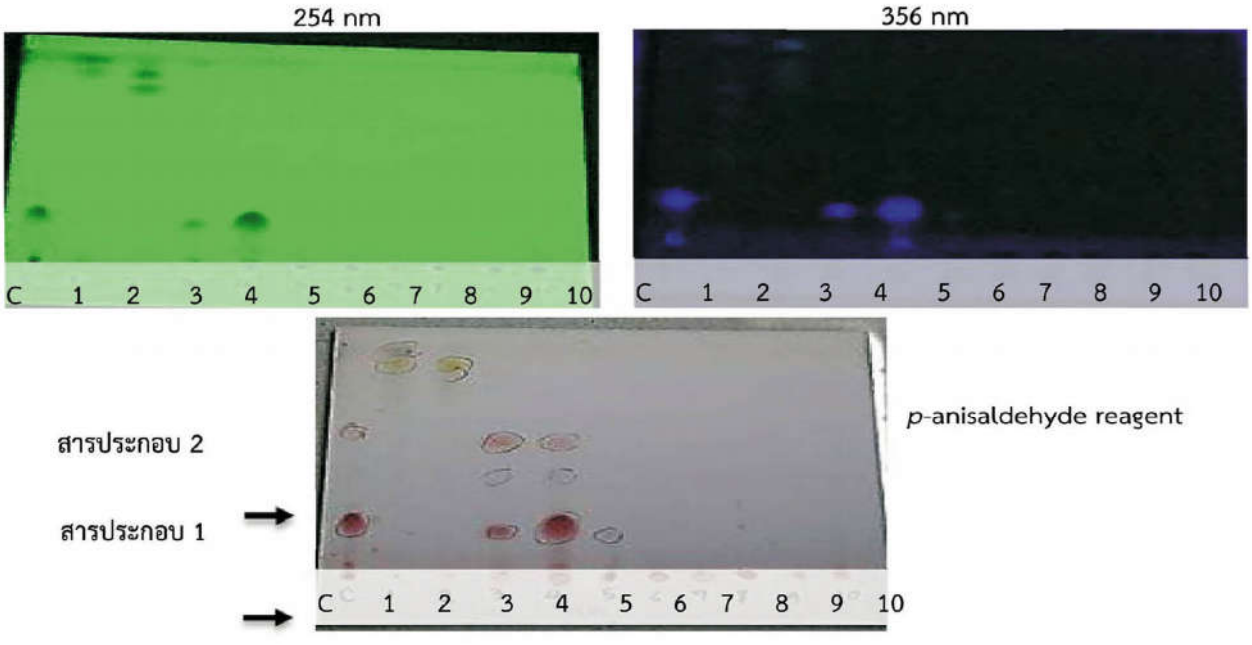
สารกลุ่มที่ 4 ซึ่งมีปริมาณสารมากที่สุด (11.05 กรัม) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวปนกับของแข็งสีน้ำตาล ที่ได้จากการชะด้วยระบบ acetone-CH_2Cl_2 (30:60) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าจะให้ดวงสารสีชมพูกับ *p*-anisaldehyde reagent เป็นดวงที่ใหญ่และมีความเข้มมากที่สุด เมื่อนำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด เลือกใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ CH_2Cl_2 - methanol การเพิ่มขั้วทีละ 0.5% สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ คือ **สารประกอบ 1** มีลักษณะของแข็งสีเหลือง หนัก 6.25 กรัม มีจุดหลอมเหลว 194-195 องศาเซลเซียส มีค่า R_f 0.34 (15% methanol-CH_2Cl_2) นอกจากนี้จากการตรวจสอบด้วย TLC ยังพบว่าสารที่ให้ดวงสารสีส้มกับ *p*-anisaldehyde reagent เป็นดวงที่มีขนาดใหญ่และมีความเข้มรองลงมา มีความเป็นขั้วน้อยกว่า มีลักษณะเป็นของหนืดปนของแข็งสีน้ำตาล (373.7 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด เลือกใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ hexane - acetone การเพิ่มขั้วทีละ 0.5% สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้อีกหนึ่งชนิดคือ **สารประกอบ 2** มีลักษณะผลึกรูปเข็ม ใสไม่มีสี หนัก 70.9 มิลลิกรัม มีจุดหลอมเหลว 109-110 องศาเซลเซียส มีค่า R_f 0.55 (15% methanol-CH_2Cl_2)

สารกลุ่มที่ 5 (0.89 กรัม ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารประกอบพวกฟีนอลิกโดยจะดวงสารสีชมพู แต่มีปริมาณน้อยกว่าสารในกลุ่มที่ 4 นอกจากนี้ยังพบดวงสารที่ให้สีน้ำตาลกับ *p*-anisaldehyde reagent และมีความเป็นขั้วมากกว่า

สารกลุ่มที่ 6-10 (2.07 กรัม ของหนืดสีน้ำตาลส้ม) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าพบดวงสารที่ให้สีน้ำตาลกับ *p*-anisaldehyde reagent ซึ่งน่าจะเป็นสารประกอบพวกน้ำตาลที่มีความเป็นขั้วมาก



ภาพที่ 1 แผนผังรวมการแยกสารจากสารสกัดมะหาดชั้นเอทิลอะซิเตต ด้วยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟี



ภาพที่ 2 ลักษณะที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดชั้นเอทิลขอะซิเตรต (C) และสารกลุ่มสาร 1-10 เมื่อทำการส่องภายใต้แสงยูวี (254 และ 365 nm) และหลังให้ความร้อนกับ *p*-anisaldehyde reagent ในระบบการแยก 5% MeOH/CH_2Cl_2

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes*)

4.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* DMST14916 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (5 มิลลิลิตร) นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียทดสอบความขุ่นให้เทียบเท่ากับสารละลาย McFarland No.0.5

นำสารที่ต้องการทดสอบมาละลายด้วย 10% DMSO ทำการกรองผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบลงใน 96 well plate โดยสารกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต สารกลุ่มที่ 1-10 และ *trans*-oxy-resveratrol (**1**) ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาร resorcinol (**2**) ที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของสารแบบ 2-fold serial dilution เติม Normal saline ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงทุกหลุม จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และ Resazurin indicator ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการเจริญของแบคทีเรีย โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ในหลุมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งหลุมนั้นจะเป็นสีฟ้า

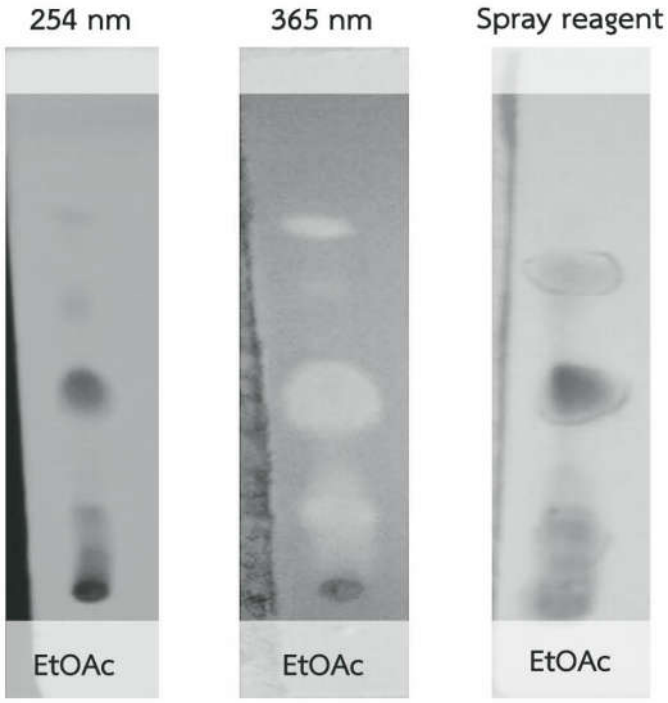
4.2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC)

นำหลุมทดสอบจากการทดลองที่ 4.1 ที่ไม่สามารถเห็นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมาทำการทดสอบ โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ (Streak plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยใช้ loop แตะสารละลายในหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ นำมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง TSA จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การอ่านค่าที่ได้โดยใช้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด รายงานผลเป็นค่า MBC หรือค่าต้องไม่มีการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแสดงว่าสามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.99%

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล

จากการสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) เอทิลอะซิเตรต พบว่าได้สารสกัดหยาบปริมาณ 137.81 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 5.95 % กรัม/กรัมพืชแห้ง

นำสารสกัดมาทำการตรวจสอบหากลุ่มสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตจะให้ดวงสารขนาดใหญ่สีส้มอมชมพู มีความเข้มมากกับ *p*-anisaldehyde reagent ซึ่งน่าจะเป็นสารองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบดวงสารขนาดใหญ่แต่มีความเข้มรองลงมา เป็นดวงสารสีส้มและมีความเป็นขั้วน้อยกว่าดวงสารสีชมพู กับ *p*-anisaldehyde reagent โดยดวงสารทั้งสองดวงน่าจะเป็นสารประกอบพวกฟีนอลิก (Sherma & Fried, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 3



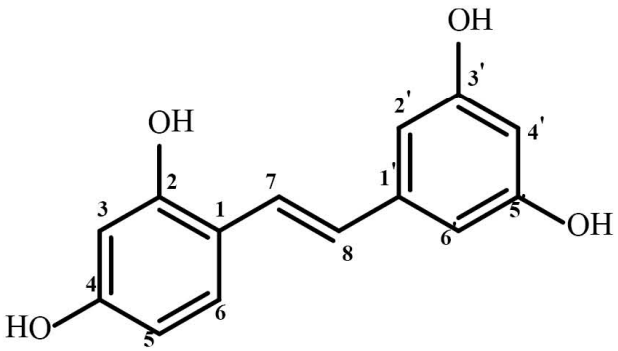
ภาพที่ 3 การตรวจสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC เมื่อทำการส่องภายใต้แสงยูวี (254 และ 365 nm) และหลังให้ความร้อนกับ *p*-anisaldehyde reagent ของสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต ในระบบการแยก 5% MeOH/CH_2Cl_2

จากการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ **สารประกอบ 1** ปริมาณเท่ากับ 6.25 กรัม คิดเป็น 56.56% ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลัก โดยจะให้ดวงสารสีชมพูกับ *p*-anisaldehyde reagent และ**สารประกอบ 2** ได้ปริมาณเท่ากับ 70.9 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.64% ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบรองลงมา โดยจะให้ดวงสารสีส้มกับ *p*-anisaldehyde reagent และมีความเป็นขั้วน้อยกว่าสารประกอบ 1 เมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ทำการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโทรสโกปี พบว่า

สารประกอบ 1 UV (λ_{max} ; MeOH; nm) 239 และ 219 ((Soekamto, et al.,2005); IR (KBr) (ν; cm^{-1}) 3176, 1589, 1516 และ 974; ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR (δ; ppm; DMSO-d_6): ข้อมูล ^{1}H-NMR พบสัญญาณ δ (ppm) 6.06 (1H, brt, *J* = 2.0 Hz, H-4'), 6.24 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.31 Hz, H-5), 6.32 (1H, d, *J* = 2.31 Hz, H-3), 6.32 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-8), 7.15 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-7), 7.33 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6) สัญญาณโปรตอนของหมู่ hydroxy ที่ δ_H (ppm) 9.15, 9.38, 9.58 จากข้อมูล ^{13}C-NMR พบ12 สัญญาณ ให้สัญญาณตรงกันที่ δ_C 127.03 (C-6), 124.66 (C-8), 123.26 (C-7), 107.15 (C-5), 103.97 (C-2', C-6'), 102.64 (C-3), 101.35 (C-4') ซึ่งจัดเป็น methine carbon ทั้งหมด 8 คาร์บอน เป็น quaternary carbon ทั้งหมด 6 คาร์บอน ที่ δ_C 115.31 (C-1), 139.93 (C-1'), 157.96 (C-4), 155.87 (C-2), 158.33 (C-5',C-3'); ESIMS m/z 245 $[M+H]^+$

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ**สารประกอบ 1** ตรงกับ *trans*-oxyresveratrol หรือ *trans*-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene ที่มีผู้เคยรายงานการพบเป็นสารองค์ประกอบหลักในมะหาด (Likhitwitayawuid *et al.*, 2001) ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 4

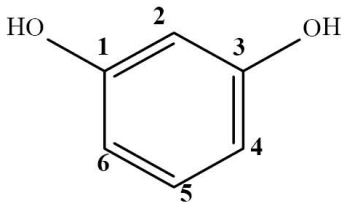


ภาพที่ 4 โครงสร้างของสาร *trans*-oxyresveratrol (**1**)

สารประกอบ 2 UV (λ_{max} ; MeOH; nm) 283 และ 206; IR (KBr) (ν; cm^{-1}) 3207, 1589 และ 1608; ^{1}H-NMR และ^{13}C-NMR (δ; ppm; $CDCl_3$+DMSO-d_6): ข้อมูล ^{1}H-NMR พบสัญญาณ δ (ppm) 6.21 (1H, dd, *J* = 2 Hz, H-2), 6.27 (2H, d, *J* = 2 Hz, H-4, H-6), 6.86 (1H, t, *J* = 2 Hz, H-5) สัญญาณโปรตอนของหมู่ hydroxy ที่ δ_H (ppm) 8.54 จำนวน 2 โปรตอน จากข้อมูล ^{13}C NMR พบ 4 สัญญาณ แสดงเป็น 6 คาร์บอน เมื่อนำมาวิเคราะห์ประเภทคาร์บอน ที่ δ_C 129.20 (C-5), 106.26

(C-4, C-6), 102.49 (C-2) ซึ่งจัดเป็น methine carbon ทั้งหมด 4 คาร์บอน เป็น quaternary carbon ที่ δ_C 157.83 (C-1, C-3) จำนวน 2 คาร์บอน; ESIMS m/z 111 $[M+H]^+$

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ**สารประกอบ 2** ตรงกับ resorcinol หรือ 1,3-benzenediol **(2)** (Rej *et al.,* 2005) ซึ่งยังไม่มีผู้รายงานการพบสารนี้จากแก่นมะหาด ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างของสาร resorcinol

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต แสดงค่า MIC เท่ากับ 1.56 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 0.78 mg/ml

เมื่อนำกลุ่มสารทั้ง 10 กลุ่ม ที่แยกได้จากสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ดังแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในตารางที่ 1

จากตารางพบว่าสารสกัดในกลุ่มที่ 1 ซึ่งจากการทดสอบด้วย TLC (ภาพที่ 2) พบว่าเป็นสารประกอบเทอร์ปีน สารกลุ่ม 9 และ 10 ซึ่งจากการทดสอบด้วย TLC (ภาพที่ 2) พบว่าเป็นสารประกอบน้ำตาล แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อได้น้อยที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 6.25 mg/ml ส่วนสารกลุ่มที่ 3-5 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด MIC เท่ากับ 1.56 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 0.78 mg/ml และจากการทดสอบกลุ่มสารด้วย TLC (ภาพที่ 3) พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักจะเป็นพวกสารประกอบฟีนอลิก

ตารางที่ 1 ผลค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งได้ (MIC) และที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ของกลุ่มสารที่แยกจากสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต

กลุ่มสาร	ค่า MIC (mg/ml)	ค่า MBC (mg/ml)
1	12.5	6.25
2	6.25	3.125
3	1.56	0.78
4	1.56	0.78
5	1.56	0.78
6	3.125	1.56
7	6.25	3.125
8	6.25	3.125
9	12.5	6.25
10	12.5	6.25
control (normal saline)	-	-

เมื่อนำสารบริสุทธิ์สามารถแยกได้ 2 ชนิด คือ *trans*-oxyresveratrol และ resorcinol เมื่อนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะแสดงผลในรูปค่า MBC ดังผลการทดสอบฤทธิ์ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งได้ (MIC) และที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์	ค่า MIC (mg/ml)	ค่า MBC (mg/ml)
trans-oxyresveratrol (**1**)	1.56	0.78
resorcinol (**2**)	3.125	1.56

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ใน 96 well plate พบว่า *trans*-oxyresveratrol แสดงผลการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด แสดงค่า MIC เท่ากับ 1.56 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 0.78 mg/ml ส่วน resorcinol แสดงผลการยับยั้งเชื้อที่น้อยที่สุด แสดงค่า MIC เท่ากับ 3.125 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 1.56 mg/ml ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกันมาก

นัก แสดงให้เห็นว่าสารประกอบพวกฟีนอลิกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ดี

จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดเอทิลอะซิเตรต และสาร *trans*-oxyresveratrol แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการแยกสารให้บริสุทธิ์ พบว่าสารองค์ประกอบหลักของสารสกัดคือ *trans*-oxyresveratrol พบในปริมาณมากที่สุด ซึ่งเป็นผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีค่าเท่ากัน ส่วนสาร resorcinol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้น้อยประมาณ 1 เท่า ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังพบในปริมาณที่น้อยกว่าในสารสกัด ซึ่งไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรตซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นสารประกอบพวกฟีนอลิก สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการป้องการการเกิดสิวได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่แบคทีเรียไม่แตกต่างจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตรต โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ *trans*-oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลัก คิดเป็น 56.56% และสารองค์ประกอบรองคือ resorcinol คิดเป็น 0.64% โดยทำการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดสิว *(P. acnes)* พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรต และ *trans*-oxyresveratrol แสดงปริสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ที่เท่ากันและดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าสาร resorcinol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าสามารถนำสารสกัดหยาบที่ได้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์การเกิดสิวได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในการทดสอบฤทธิ์ ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีเคมี ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือในการทำวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

เอกสารอ้างอิง

คมกริช หาสิตะพันธุ์. (2557). มะหาดสมุนไพรทำให้ผิวขาว. **GPO R & D Newsletter.** 21, 1, 7-9.

ญานี พงษ์ไพบูลย์ (2550). **การตั้งสูตรเจลรักษาสิวจากธรรมชาติ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

Chomnawang, M.J., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., & Gritsanapan, W. (2007). Effect of *Garcinia mangostana* on Inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. **Fitoterapia**, 78, 401-408.

Chuanasa, T., Phromjaib, J., Lipipunc, V., Likhitwitayawuida, K., Pramyothind, P., & Shirakib, K. (2008). Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. **Antiviral Res**, 80, 62-70.

Dreno, B. (2004). Acnes: Physical Treatment. **Clinics in Dermatology**, 22, 429-433.

Jagtap, U.B., & Bapat, V.A. (2010). *Artocarpus*: a review of its traditional uses, photo-chemistry and pharmacology. **J. Ethnopharm,** 29, 142-66.

Joung, D.K., Mun, S.H., Choi, S.H., Kang, O.H., Kim, S.B., Lee, Y.S., Zhou, T., Kong, R., Choi, J.G., Shin, D.W., Kim, Y.C., Lee, D.S., & Kwon, D.Y. (2016). Anti -bacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism. **Exp. & Ther. Med**, 12, 1579-1584.

Likhitwitayawuid, K., & Sritularak, B. (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. **J. Nat Prod**, 64, 1457-1459.

Likhitwitayawuid, K., Sritularah, B., Tantrakarnsakul, K., & Lipipun, V. (2010). New 2-arylbenzofurans from the root Bark of *Artocarpus lakoocha*. **Molecules**, 15, 64-76.

Nguyen, C.B., Nguyen, T.H.A., & Tran, V.S. (2010). Study on chemical constituents of *Artocarpus lakoocha* Roxb. I. Lupanes. **Tap Chi Hoa Hoc**, 48(4), 507-510.

Nguyen, C.B., Nguyen, T.H.A., & Tran, V.S. (2011). Study on chemical constituents of *Artocarpus lakoocha* Roxb. II. Triterpene, steroid and a monoglyceride. **Tap Chi Hoa Hoc**, 48(6), 754-757.

Park, J., Lee, J., Jung, E., Park, Y., Kim, K., Park, B., Jung, K., Park, E., Kim, J., & Park, D. (2004). In vitro Antibacterial and Anti-inflammatory Effects of Honokiol and Magnolol against *Propionibacterium sp.* **Eur. J. Pharmacol**, 496, 189-195.

Povichit, N., Phrutivorapongkul, A., Suttajit, M., & Leelapornpisid, P. (2010). Antiglycation and antioxidant Activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. **Meajo Int. J. Sci. Technol**, 4, 454-461.

Pumpaluk, P., Sritularak, B., Likhitwitayawuid, K., & Lapirattanakul, J. (2017). Antibacterial effect of herbal plants against three cariogenic microorganisms. **J. M Dent**, 37(1), 73-82.

Rej, B., Giles, R., Kim, I., Chao, W., Moore, J., & Jung, K. (2005). Dual studies on hydrogen exchange of resorcinol and subsequent kinetic isotope effect. **J. chem. Educ**, 91(8), 1220-1223.

Sherma, J.,& Fried, B. (2003). **Handbook of Thin-Layer Chromatography**. 3th edition, New York: Marcel dekker, Inc.

Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., & Likhitwitayawuid, K. (2006). *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. **Int. J. Cos. Sci**, 28(4), 269-76.

Thananant, H., & Satnako, N. (2015). Antimicrobial activity of Mao berry extract against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*. **RSU National Research Conference**, 184-191.

Williams, H.C., Dellavalle, R.P., & Garner, S. (2012). Acnes vulgaris. **The Lancet**, 379, 361-372.