ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรจีน ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง

Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese herb extracts against skin pathogenic Microorganisms

อุทัยวรรณ ก๋งเม่ง[1]
วรพรรณี เผ่าทองศุข[2]
worrapannee2000@gmail.com
ศรมน สุทิน[3]
soramon2003@yahoo.com
อรภา ศิลมัฐ[4]
minimynt@hotmail.com
[1] นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[2] อาจารย์ประจำหลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[3] อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[4]อาจารย์ประจำหลักสูตรการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรจีน หวงฉินและเฉินผี ต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคผิวหนัง ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหวงฉินมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*และเชื้อรา *Candida albicans*ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*ส่วนสารสกัดเฉินผีไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทุกชนิดที่นำมาทดสอบ พบว่าสารสกัดหวงฉินออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.39 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดหวงฉินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยมีค่า IC_{50}ไม่แตกต่างกับ BHT (Butylated hydroxyltoluene) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดเฉินผีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรจีนหวงฉินมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรีย และราในผลิตภัณฑ์เช่นเครื่องสำอาง หรือสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อก่อโรคที่ผิวหนังได้

คำสำคัญ : สมุนไพรจีน เชื้อก่อโรคที่ผิวหนัง สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This research studied the antimicrobial activities of three Chinese herbs Huang-Qin and Chenpi against skin disease bacteria and fungi. Results from agar well diffusion showed that Huang-Chin extracts could inhibit growth of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans* but had no effect on *Pseudomonas aeruginosa*. On the other hand, no antimicrobial activity was found in Chenpi. Inhibition activity of Huang-Qinon*Candida albicans* was higher than *Staphylococcus aureus* with the MIC value of 0.39 and 3.125 mg/ml, respectively. Antioxidant test using DPPH radical scavenging assay revealed that IC_{50} activity ofHuang-Qin was equivalent to BHT (Butylated hydroxyltoluene) while the antioxidant activity of Chenpi was substantially low. Results from this study illustrate the potential of Huang-Qin as the antibacterial and antifungal agent in skin care products or skin disease medicine.

Keywords: Chinese herbs, skin infection, antioxidant

บทนำ

โรคผิวหนังเป็นปัญหาด้านสาธารณสุข และส่งผลกระทบต่อประชาชนทุกเพศทุกวัย จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดผิวหนังติดเชื้อมีหลายกลุ่ม เช่น โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น ผิวหนังอักเสบ (impetigo) จากเชื้อ *Staphylococcus aureus*การอักเสบต่อมขน (folliculitis) จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*ไฟลามทุ่งจากเชื้อ *Streptococcus pyogenes*เป็นต้น บางครั้งเชื้อรา เช่น*Candida albicans*ที่ปกติเป็นเชื้อประจำถิ่นในปาก ทางเดินอาหาร และช่องคลอด อาจเป็นสาเหตุของโรคผิวหนังอักเสบ (candidiasis) ในบริเวณที่มีความอับชื้น ตามรอยข้อพับของแขน ขา รักแร้ ขาหนีบ มักพบในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเช่น ทารกแรกเกิด หญิงตั้งครรภ์ ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน อาการทั่วไปของผู้ป่วยโรคผิวหนังพบว่า มีบวมแดง ผื่นแดงคัน ตุ่มน้ำหรือตุ่มหนอง บริเวณผิวหนัง หากไม่มีการรักษาการติดเชื้อสามารถแพร่กระจายจากผิวหนังไปสู่กระแสเลือดเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตได้ปัจจุบันถึงแม้จะมียาทั่วไปสำหรับรักษาโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง แต่มีความท้าทายจากผลข้างเคียงของยา และการดื้อยาของจุลินทรีย์ ตลอดจนค่ายาที่สูงเพิ่มขึ้นจึงได้มีความสนใจไปยังสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีสารทุติยภูมิที่หลากหลายเช่น อัลคาลอยด์ แทนนินโพลีฟีนอล เนื่องจากสารหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อ และสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านการอักเสบ ดังนั้นสมุนไพรจึงไม่ได้มีผลทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อกระบวนการก่อโรคของจุลินทรีย์อีกด้วย (Gupta andBirdi, 2017)

สารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) เป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่พืชสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal

chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์(synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (เจนจิรา และประสงค์, 2554) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นเช่น BHT (butylatedhydroxytoluene)BHA (Butylated hydroxyanisole) และ TBHQ (tertiary butylhydroquinone) เป็นต้น (Pokorny, Yanishlieva and Gordon,2001)และพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิดเช่นสารประกอบฟีนอลลิค (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogencompounds) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) (Velioglu และคณะ 1998) โคเอนไซม์เอนไซม์คิวเทน (Beyer, 1992) เป็นต้นในปัจจุบันได้มีการศึกษาชี้ชัดว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการยับยั้งอันตรายของอนุมูลอิสระ การใช้สมุนไพรจีนเป็นสมุนไพรทางเลือกอีกทางหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรค

ปัจจุบันการประยุกต์ใช้การแพทย์แผนโบราณเช่นการแพทย์แผนจีนที่มีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคกำลังเติบโตเพิ่มขึ้นทั่วโลก สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากยาแผนปัจจุบันที่อาจมีผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา และประสิทธิภาพในการรักษาไม่เพียงพอ ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกระบุว่าในประเทศจีนมีการใช้ตำรับยาสมุนไพรมากถึง 30-50 เปอร์เซ็นต์ของยาที่มีการบริโภคทั้งหมด (WHO, 2000) โดยการแพทย์แผนจีนได้นำสมุนไพรมาเป็นส่วนหนึ่งของการรักษาโดยใช้ในการดูแลสุขภาพ รวมถึงรักษาโรคหลายชนิด เป็นยาแผนโบราณที่มีรูปแบบการใช้เป็นสมุนไพรเดี่ยว ๆ หรือตำรับสมุนไพร โดยมีทั้งการใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน และใช้เป็นส่วนเสริมในการรักษา เช่น การใช้สมุนไพรเฉินผี (*Citrus reticulata* Blanco) บรรเทาอาหารท้องอืด จุกเสียด อาเจียน ท้องเสีย ไอมีเสมหะมาก (หัวเฉียวการแพทย์แผนจีน, 2563)การใช้สมุนไพรหวงฉิน (*Scutellariabaicalensis*) ที่มีสรรพคุณระบายความร้อนในการรักษาโรคตับอักเสบ ท้องร่วง อาเจียน และความดันโลหิตสูง (Zhaoet al, 2019)แต่ถึงแม้ว่าจะมีการใช้สมุนไพร และตำรับสมุนไพรจีนมานานนับพันปี แต่ยังไม่มีข้อมูลมากเพียงพอที่จะทำให้การแพทย์แผนปัจจุบันเกิดความเชื่อถือและยอมรับ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรจีนในงานวิจัยครั้งนี้เพื่อพิสูจน์สมมติฐาน และคัดกรองสมุนไพรจีนเพื่อนำมาใช้ป้องกัน รักษาโรค อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรจีนหวงฉิน และเฉินผี ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรจีนหวงฉิน และเฉินผี

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพต่อเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหนังที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคผิวหนังของสารสกัดจากสมุนไพรจีนเฉินผีและหวงฉิน ในชั้นเอทานอล ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Agar well diffusion
2. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา ด้วยเทคนิค Modified broth microdilution
3. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

กลุ่มตัวอย่างคือสมุนไพรจีนจากคลินิกแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
1. เฉินผี (*Citrus reticulata* Blanco) ส่วนเปลือก
2. หวงฉิน (*Scutellariabaicalensis*) ส่วนราก
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ
1. *Staphylococcus aureus* TISTR 1466
2. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
3. *Streptococcus pyogenes* clinical specimen
4.*Candida albicans* ATCC 10231

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจีน

นำสมุนไพรจีนเฉินผี และหวงฉินมาหั่นและปั่นให้ละเอียด ชั่ง 300 กรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรจีนต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1:6 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อ ครบเวลาจะทำการกรองหยาบด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายสมุนไพรจีนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จะได้สารสกัด (crude extract) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (freeze dry) นำสารสกัดที่ได้มาชั่งเพื่อคำนวณร้อยละของน้ำหนักสารสกัด (% yield) เก็บใส่ในขวดสีชาและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรจีน เฉินผี และหวงฉิน ด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของBalouiri, Sadiki and Koraichi(2016) โดยเตรียมเชื้อทดสอบให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 cells/ml นำเชื้อไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ *Candida albicans* ATCC 10231 และ Brain Heart Infusion agar (BHI) สำหรับเชื้อ *Streptococcus pyogenes* clinical specimenรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง เจาะวุ้นให้เป็นหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดสารสกัดสมุนไพรจีนที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 80เปอร์เซ็นต์DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ levofloxacinเป็นชุดควบคุมผลบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ itraconazole สำหรับเชื้อรา และใช้ 80% DMSO (dimethyl sulfoxide) เป็นชุดควบคุมผลลบ รอจนสารทดสอบซึมเข้าเนื้อวุ้นไปจนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper) วัดขนาดโซนใสหรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ด้าน แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3. การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration: MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC) ของสารสกัดหวงฉิน

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดหวงฉินให้ผลต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*และ เชื้อรา *Candida albicans* ได้ ส่วนสารสกัดเฉินผีไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ดังนั้นจึงใช้สารสกัดหวงฉินมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป คือการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา(MBC/MFC) ดัดแปลงตามวิธี Balouiri, Sadiki and Koraichi(2016) โดยปิเปตต์อาหารเพาะเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท แบบ 96 หลุม ทำการเจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้น 25-0.049มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์เชื้อทดสอบความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ levofloxacinเป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้อาหารเพาะเชื้อเป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนดหยดสีรีซาซูรินลงในหลุมทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส อีก 2-4 ชั่วโมง อ่านผลทดสอบโดยสังเกตสีของสารผสมในหลุมทดสอบ หากสารสกัดยับยั้งเชื้อทดสอบได้ในหลุมทดสอบยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม แต่หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เซลล์มีการเจริญโดยใช้ออกซิเจนทำให้รีซาซูรินจะถูกรีดิวซ์สารผสมในหลุมจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือไม่มีสี ตรวจสอบและบันทึกผลการทดลอง ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

จากนั้นหาค่า MBC โดยใช้ลูปแตะเชื้อจากหลุมทดสอบมา streak ลงบนอาหารเพาะเชื้อ MHAนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลอง โดยความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏขึ้น บันทึกเป็นค่า MBCหรือ MFC

4. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดหวงฉินและเฉินผี ด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดหวงฉินมาทดสอบโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ Lu, Yuan, Zeng and Chen (2011) เตรียมสารละลายดีพีพีเอช โดยชั่ง DPPH 0.0079 กรัมละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตรทำการทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นประกอบไปด้วย หลอดอ้างอิง 1 หลอด หลอดควบคุม 3 หลอด หลอดอ้างอิงของสารสกัด 1 หลอด และหลอดทดสอบสารสกัด 3 หลอด เติมสารละลาย DPPH ลงไปในสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ ในการหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ สีม่วงของอนุมูลอิสระ (DPPH) จางลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ

(% inhibition) ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT(Butylated hydroxyl toluene) และคำนวณหาค่า (IC_{50})

สูตรคำนวณหา % inhibition = {(C-(S-BS))/C} x 100

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และ BS คือ ค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิงของสารสกัด ค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ถ้าสารสกัดมีค่า IC_{50}น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT แสดงว่ามีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากสมุนไพรจีน

จากการนำสมุนไพรจีนหวงฉิน และเฉินผีมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนสารสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:6 ได้สารสกัดที่มีลักษณะหนืด สีน้ำตาล โดยสมุนไพรจีนเฉินผีมีร้อยละของผลผลิตมากกว่าหวงฉิน โดยมีค่าเท่ากับ 23.35 และ 7.11 ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรจีน 2ชนิด ที่สกัดในชั้นเอทานอล ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2โดยพบว่าสารสกัดหวงฉินออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย*Staphylococcus aureus*และเชื้อรา *Candida albicans*ได้ดีกว่าเชื้อ *Streptococcus pyogenes*ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดเฉินผีไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2

3. ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC) ของสารสกัดหวงฉิน

จากผลการทดสอบ agar well diffusion พบว่าสารสกัดหวงฉินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*และเชื้อรา *Candida albicans* ได้ จึงนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี Modified broth microdilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดหวงฉิน

เชื้อจุลินทรีย์	ค่าเฉลี่ยโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน* ของสารสกัดหวงฉิน	
	ความเข้มข้น 100 mg/ml	ความเข้มข้น 10 mg/ml
Staphylococcus aureus	18.38 ± 1.05	10.95 ± 0.56
Streptococcus pyogenes	14.94 ± 0.55	8.56 ± 0.37
Pseudomonas aeruginosa	-	-
Candida albicans	13.71 ± 1.39	10.33 ± 0.52
80% DMSOเป็นชุดควบคุมผลลบ	-	-

หมายเหตุ * ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

ตารางที่ 3 ผลทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ของสารสกัดหวงฉิน

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของสารสกัดหวงฉิน(mg/ml)	
	MIC	MBC / MFC
Staphylococcus aureus	3.125	6.25
Candida albicans	0.39	1.56

4. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากผลการทดลองที่รายงานเป็นค่า IC_{50} แสดงถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหวงฉินกับสารมาตรฐาน BHT พบว่ามีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และค่า IC_{50}ของสารสกัดสมุนไพรหวงฉินและเฉินผีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

สาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	IC_{50}±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน* (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)
หวงฉิน	0.05	0.050±0.0015
เฉินผี	1-0.5	0.715±0.0028
BHT	0.05	0.054±0.0004

* ค่า IC50 แสดงแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (Standard deviation, SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ในยุคจีนโบราณตำรับสมุนไพรจีนตำรับหนึ่งมักประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิดอาจมากถึง 15-20 ชนิด และส่วนใหญ่มักเตรียมด้วยน้ำซึ่งเรียกว่าการต้มสกัด (decoction) ซึ่งสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับจะมีความสำคัญเฉพาะตัว และอาจมีผลต่อกันด้วยจึงไม่ทราบว่าฤทธิ์ที่เกิดขึ้นเกิดจากสมุนไพรชนิดใดอาจเป็นผลร่วมกันของสมุนไพรหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรจีน 2 ชนิดคือ หวงฉิน และ เฉินผี การศึกษาขั้นแรกแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหวงฉินมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*และ *Streptococcus pyogenes*แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง *Candida albicans* ได้อีกด้วย ในขณะที่สารสกัดเฉินผีไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด

หวงฉินเป็นสมุนไพรที่เติบโตในเขตอบอุ่น และบนภูเขาเขตร้อน (ที่ระดับความสูงประมาณ 1,300–3000 ม.) พบได้ในประเทศจีน ไซบีเรีย มองโกเลีย เกาหลีเหนือ และญี่ปุ่นเป็นต้น และได้ถูกนำมาใช้มาเป็นเวลาหลายพันปีในประเทศจีน และประเทศเพื่อนบ้านซึ่งพบบันทึกในตำรายาจีนโบราณ ในการศึกษาวิจัยพบว่าสมุนไพรหวงฉินมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์มากมายหลายชนิด เช่นฟลาโวนอยด์diterpenes โพลีฟีนอล กรดอะมิโน น้ำมันหอมระเหย เสตียรอล กรดเบนโซอิก เป็นต้น โดยจะพบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก โดยเฉพาะในรากแห้งพบฟลาโวนอยด์มากกว่า 110 ชนิด ได้แก่ baicalin, baicalein, wogonoside และ wogonin เป็นต้น ในการศึกษาด้านเภสัชวิทยาพบว่าหวงฉินมีฤทธิ์ที่หลากหลายเช่น ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ต้านมะเร็ง และป้องกันตับ และประสาท เป็นต้น (Song et al,2020)

มีรายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดของหวงฉินที่สกัดด้วยน้ำร้อนเดียวกับเดียวกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้การต้มสกัด พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย*Staphylococcus aureus*มีค่า MIC เท่ากับ 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Li et al, 2015) ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอล95 เปอร์เซนต์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ที่มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรไทย 9 ชนิด ที่สกัดเอทานอลความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสมุนไพรไทย 9 ชนิด คือ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) จันทน์แปดกลีบ (*Illicium verum Hook*.f.) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L.) ฝาง (*Caesalpinia sappan* L.) พริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*Burm.f.) ยี่หร่า (*Cuminum cyminum* L.) สมอไทย (*Terminalia chebula*Retz.varchebula) และอบเชย (*Cinnamomum* spp.) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 32-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงฤทธิ์ด้อยกว่าสารสกัดหวงฉินจากการทดลองนี้เช่นกัน ยกเว้นจันทน์แดง (*Dracaena loureirin* Gagnep.) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดีกว่า โดยมีค่า MICเท่ากับ2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วัชรินทร์, 2559)ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans*ของสารสกัดหวงฉินที่สกัดด้วยเอทานอล95 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ในการทดลองนี้ มีค่า MIC เท่ากับ 0.3906 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอลที่มีรายงานค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Trinhet al, 2018) เมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรไทยใบพลู (*Piper betle* Linn.) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MICเท่ากับ 3.125 (ทิฐิมา กัลยาภรณ์ และ อรพิณ, 2559) แสดงว่าสารสกัดหวงฉินออกฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดนี้ได้ดีกว่าใบพลูจากงานวิจัยนี้ไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*แต่มีรายงานวิจัยพบสารสกัดหวงฉินสามารถลดการสร้างสารพิษ exotoxin A และยับยั้งการอักเสบจากการติดเชื้อชนิดนี้ได้ (Song et al, 2020)จากผลงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหวง

ฉินด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบบกว้างโดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2015)อธิบายว่าอาจเกิดจากความแตกต่างของส่วนของผนังเซลล์ โดยแบคทีเรียแกรมลบจะมีส่วน outer membrane และ periplasmic space ที่ไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีความทนต่อสารสกัดหวงฉินได้ดีกว่า

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรจีน หวงฉินและเฉินผี นอลพบว่าสารสกัดหวงฉิน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับสารมาตรฐาน BHT และจากค่า IC_{50}พบว่าสารสกัดหวงฉิน และสารมาตรฐาน BHT มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 0.050±0.0015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.054±0.0004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนสารสกัดเฉินผีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยมากเมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน BHT เมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรไทยสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระ (*Cajanus cajan*, Fabaceae) และดอกส้มป่อย (*Acacia concinna*, Fabaceae) มีค่า IC_{50}เท่ากับ 0.66±0.003 และ 0.94±0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สุธิรา และประสบอร,2559) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหวงฉินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรไทยทั้งสองชนิด ส่วนสารสกัดสมุนไพรจีนเฉินผีมีฤทธิ์ด้อยกว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระ แต่ดีกว่าสารสกัดดอกส้มป่อย มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กับปริมาณฟินอลิกรวมของสารสกัดหวงฉินเป็นความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) (Zho et al, 2019)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหวงฉินมีศักยภาพในการเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดใหม่เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรค รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเป็นสารกันเสีย เช่นแชมพู ครีมนวดผม ยาสีฟัน ครีมอาบน้ำ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดจุดซ่อนเร้น และผลิตภัณฑ์สำหรับทารก หรือสามารถพัฒนาไปนำไปใช้ทั้งรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว ๆ หรือตำรับสมุนไพร ในการนำไปใช้รักษา ป้องกันการติดเชื้อ หรือเพื่อคงไว้ซึ่งสุขภาพที่ดี ยาแผนปัจจุบัน ในการรักษา ฟื้นฟู และเสริมภูมิต้านทานของร่างกายสำหรับประเทศไทยที่ให้ความสนใจในการรักษาตามแบบฉบับแพทย์แผนจีนมากขึ้นการส่งเสริมให้เกษตรกรในพื้นที่สูงหันมาปลูกสมุนไพรจีนที่มีคุณค่า และมูลค่าสูงจะเป็นโอกาสเพิ่มรายได้ และลดการนำเข้าสมุนไพรจีนได้

เอกสารอ้างอิง

เจนจิรา จิรัมย์และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1(1), 59-70.

ทิฐิมา ภาคภูมิ กัลยาภรณ์ จันตรี และอรพิณ โกมุติบาล. (2559). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลู เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องสำอาง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยสวนดุสิต. 9(1),1-20.

วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2559). ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อกับยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*และ *Escherichia coli* ATCC25922. วารสาร มฉก.วิชาการ. 19(38), 35-48.

สุธิรา มณีฉาย และประสบอร รินทอง. (2559). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 44(1), 142-152.

หัวเฉียวการแพทย์แผนจีน (2563). ข้อมูลสมุนไพรจีน แผนกเภสัชกรรม. สืบค้นเมื่อ 24 ตุลาคม, 2563, จาก https://www.huachiewtcm.com//content/8029/เฉินผี

Balouiri, M., Sadiki, M. andKoraichi S. (2016). Methods for in vitro evaluation antimicrobial activity : Areview. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(2), 71-79.

Beyer R.E. (1992). An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. Journal of Agricultural and Food Chemistry.70(6), 390-403.

Gupta, P.D. and Birdi, T.J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 8(4), 266-275.

Li, W., Sun, H., Zhou, J., Zhang, Y., Liu, L. and Gao Y. (2015). Antibacterial activities, antioxidant contents and antioxidant properties of three traditional Chinese medicinal extracts. A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society. 10(1), 131-137.

Lu, M., Yuan, B., Zeng, M. and Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. Food Research International. 44(2), 530-536.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). Antioxidants in food : practical applications. 380 pp. New York: CRC Press.

Song, J., Long, J., Xie, L. ,Zhang, L., Xie, Q., Chen, H., Deng, M. and Li, X. (2020). Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics, toxicity of *Scutellariabaicalensis* Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review. Chinese Medicine. 15(102), 1-26.

Trinh, H., Yoo, Y., Won, K-H., Ngo, H.T.T., Yang, J-E., Cho, J-G., Lee, S-W., Kim, K-Y. and Velioglu, Y.S., Mazza, G. Gao, L. and Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, 4113-4117

World Health Organization. (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva.

Yi, T-H. (2018). Evaluation of *in-vitro* antimicrobial activity of Artemisia apiacea H. and *Scutellariabaicalensis* G. extracts. Journal of Medical Microbiology. 67(4), 489-495.

Zhao, T., Tang, H., Xie, L., Zheng, Y., Ma, Z., Sun, Q. and Li, X. (2019). *Scutellariabaicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. Journal of pharmacy and Pharmacology. 71(9), 1353-1369.