

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ตำรับยาแคปซูลเลื้อขาว และสมุนไพรรในตำรับ

รุจิราลัย พูลทวี*, สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา†, สุวรรณ เสมศรี‡, มธุรส อ่อนไทย†, เสาวลักษณ์ มีศิลป์§, จารุญศรี พุ่มเทียน* ชัชวาลย์ ช่างทำ†¶

* สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

† สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

‡ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

§ คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

¶ ผู้รับผิดชอบบทความ: chatchawan.cha@hcu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ตำรับยาแคปซูลเลื้อขาว (Sua Khaw Capsule) เป็นตำรับยาที่พัฒนามาจากตำรับยาแผนจีนเดิมคือ ยู่ผิงเฟิงसान (Yu Ping Feng San) ซึ่งมีสรรพคุณเสริมพลังลมปราณ เสริมปอดและม้ามให้แข็งแรง บำรุงอิน สืบเนื่องจากการระบาดของโรค COVID-19 ในปี ค.ศ.2019 ซึ่งมีผลกระทบต่อภาวะสุขภาพและชีวิตของประชากรโลกเป็นอย่างมาก คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติจึงได้คิดปรับปรุงพัฒนาตำรับยาแคปซูลเลื้อขาวขึ้น แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านต่าง ๆ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดของยาตำรับนี้และสมุนไพรรที่เป็นส่วนประกอบของตำรับ รวมทั้งการวิเคราะห์คุณภาพของยาเพื่อเตรียมข้อมูลในการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาจากสมุนไพรร

วิธีการศึกษา: นำตำรับยาแคปซูลเลื้อขาว และสมุนไพรรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาแคปซูลเลื้อขาวจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ หวงฉี (*Astragalus membranaceus*), ต่างเชิน (*Codonopsis pilosula*), ไท่จีเชิน (*Pseudostellaria heterophylla*), ป้ายจู๋ (*Atractylodes macrocephala*), ผ่างเฟิง (*Saposhnikovia divaricate*), หนานซาเชิน (*Adenophora tetraphylla*), จินอินฮวา (*Lonicera japonica*), เหลียนเซี่ยว (*Forsythia suspensa*), จื่อซูเย่ (*Perilla frutescens*), ฮั่วเซียง (*Pogostemon cablin*), เลินจู๋ (*Medicated Leaven*) และกานฉ่าว (*Glycyrrhiza uralensis*) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ เอทานอล และน้ำ นำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion รวมทั้งหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งศึกษาความปลอดภัยของยาตำรับนี้โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโดยใช้ Vero cell และตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์และโลหะหนักของตำรับยาแคปซูลเลื้อขาวตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

ผลการศึกษา: สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ (EA) ของสมุนไพรรจีนทั้ง 12 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone diameter, IZD) อยู่ระหว่าง 13.3 – 28.0 มิลลิเมตร (มม.) และมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ในช่วง 0.39 – 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.) โดยสารสกัด EA ของกานฉ่าวมีฤทธิ์แรงที่สุด โดยมี IZD เท่ากับ 28.0 มม. และมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 0.39 มก./มล. และสารสกัด EA ของกานฉ่าวและป้ายจู๋ยังแสดงฤทธิ์ต้าน *C. albicans* ด้วย ส่วนสารสกัด EA ที่ยับยั้ง *E. coli* ด้วยคือสารสกัดของไท่จีเชินและ

จินอินฮวา แต่ฤทธิ์ของสารสกัดเหล่านี้ต่อ *C. albicans* หรือ *E. coli* จะอ่อนกว่าต่อ *S. aureus* ส่วนสารสกัดเอทานอล (ET) ของสมุนไพร 10 ชนิด (ยกเว้นต่างเงินและหนานชาเงิน) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* มี IZD อยู่ระหว่าง 14.0 – 28.3 มม. และมีค่า MIC ในช่วง 0.097 – 12.5 มก./มล. โดยสารสกัด ET ของกานจ้าวแสดงฤทธิ์ได้ดีที่สุด มี IZD เท่ากับ 28.3 มม. และค่า MIC เท่ากับ 0.097 มก./มล. ส่วนสารสกัด EA และ ET ของตำรับยาแคปซูลเสือขาวมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* โดยมี IZD เท่ากับ 16.5 และ 17.5 มม. ตามลำดับ และมีค่า MIC เท่ากันที่ 3.13 มก./มล. ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีเพียงเหลียงเขียว, จือซูเอ่ และจินอินฮวาที่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* สารสกัดทั้งหมดแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero อยู่ในช่วง IC_{50} เท่ากับ 60.70 ถึง $> 1,000$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.) และผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์และโลหะหนักในตำรับยาแคปซูลเสือขาว พบว่าปริมาณสารหนู แคดเมียม และตะกั่ว ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ส่วนผลการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานหลังการฉายรังสี

อภิปรายผล: สารสกัด EA ของสมุนไพรจีนในตำรับยาแคปซูลเสือขาวทุกตัวและสารสกัด ET ของสมุนไพร 10 ใน 12 ตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และสารสกัด EA และ ET ของยาแคปซูลเสือขาวมีค่า MIC ต่อ *S. aureus* เท่ากันที่ 3.13 มก./มล. แสดงว่าตัวทำละลายทั้งสองชนิดสามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดกานจ้าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 0.39 และ 0.097 มก./มล. ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากผลของสารกลุ่มไอโซฟเลโวนอยด์ที่มีมากในรากกานจ้าว ซึ่งตัวทำละลาย ET และ EA สามารถสกัดสารกลุ่มนี้ออกมาได้ดี นอกจากนี้ พบว่าสารสกัด EA ของโทจิเซ็นมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero ค่อนข้างสูง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 60.70 มก./มล. แต่สารสกัด EA ของตำรับยาแคปซูลเสือขาวมีความเป็นพิษลดลง (IC_{50} 314.6 มก./มล.) อาจเนื่องจากการตำรับยามีสัดส่วนของสมุนไพรที่เป็นพิษอยู่น้อย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารสกัดสมุนไพรในตำรับยาแคปซูลเสือขาวด้วย EA มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอล อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่ำกว่ายามาตรฐาน (levofloxacin และ clotrimazole) ที่ใช้เปรียบเทียบ ผลการศึกษาแสดงว่าเป็นสารละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จากตำรับยานี้ นอกจากนี้ พบว่ามีเพียงสารสกัดด้วย EA หรือด้วย ET ของสมุนไพรโทจิเซ็น, กานจ้าว, ป้ายจู, และจินอินฮวาเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* หรือ *C. albicans* ร่วมด้วย แต่ฤทธิ์อ่อนกว่า แม้ว่ายาแคปซูลเสือขาวจะมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ควรทำการศึกษาวิจัยด้านพิษวิทยาเภสัชวิทยา และการวิจัยทางคลินิกในสรรพคุณที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม เพื่อยืนยันความปลอดภัยในคนและประสิทธิผลในการรักษา

คำสำคัญ: ความเป็นพิษต่อเซลล์, ตำรับยาแคปซูลเสือขาว, ตำรับยาป้ายจูเซียนตาน, ตำรับยาขี้ผึ้งเฟิงसान, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Extracts of Suea Khao Capsule Formulation and Its Herbal Components

Rujiralai Poontawee^{*}, Sureporn Homvisasevongsa[†], Suwanna Sensri[‡], Saowaluck Meesin[§], Mathuros Ornthai[†], Jamroonsri Poomtien^{*}, Chatchawan Changtam^{†,¶}

^{*} Division of Biological Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Bang Phli District, Samut Prakarn 10540, Thailand

[†] Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Bang Phli District, Samut Prakarn 10540, Thailand

[‡] Division of Medical Technology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bang Kapi District, Bangkok 10240, Thailand

[§] Faculty of Chinese Medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Bang Phli District, Samut Prakarn 10540, Thailand

[¶] Corresponding author: chatchawan.cha@hcu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: The Sua Khaw Capsule is a formula developed from the original Chinese medicine formula, Yu Ping Feng San. The recent COVID-19 outbreak has significantly impacted the health and lives of the global population. The Faculty of Chinese Medicine, Huachiew Chalermprakiet University therefore developed and improved this herbal medicine formula which has the properties of increasing vital energy, strengthening the lungs and spleen, and nourishing yin. However, it still lacks research support in various fields. Hence, this research aims to study antimicrobial activity and cytotoxicity of different extracts of Sua Khaw capsule formula and its herbal components, and conduct quality assessment of the finished product to prepare data for future herbal medicine registration.

Methods: Sua Khaw Capsules and its 12 herbal components; namely, Huang Qi (*Astragalus membranaceus*), Dang Shen (*Codonopsis pilosula*), Tai Zi Shen (*Pseudostellaria heterophylla*), Bai Zhu (*Atractylodes macrocephala*), Fang Feng (*Saposhnikovia divaricate*), Nan Sha Shen (*Adenophora tetraphylla*), Jin Yin Hua (*Lonicera japonica*), Lian Qiao (*Forsythia suspensa*), Zi Su Ye (*Perilla frutescens*), Huo Xiang (*Pogostemon cablin*), Shen Qu (*Medicated Leaven*), and Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis*) were extracted with 3 types of solvents, i.e., ethyl acetate, ethanol, and water. The crude extracts were then tested for their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* using agar well diffusion method; and extract concentrations that inhibited and killed such microorganisms were also determined. Regarding the safety of this herbal formula, these extracts were tested for cytotoxicity against Vero cells; and microbial and heavy metal contaminations of Sua Khaw capsules were also determined using methods described in the Thai Herbal Pharmacopoeia (THP).

Results: Ethyl acetate (EA) extracts of 12 Chinese herbs and Sua Khaw capsule formula demonstrated inhibitory activity against *S. aureus* with inhibition zone diameters (IZD) ranging from 13.3 – 28.0 mm, with MICs in the range of 0.39 – 12.5 mg/ml. EA extract from Gan Cao showed highest inhibitory activity, with IZD of 28.0 mm and MIC of 0.39 mg/ml. Gan Cao and Bai Zhu EA extracts also showed inhibitory activity against *C. albicans*, while EA extracts of Tai Zi Shen and Jin Yin Hua also inhibited *E. coli*. However, such inhibitory activity was weaker than that against *S. aureus*. Ten ethanol (ET) extracts (except those of Dang Shen and Nan Sha Shen) exhibited inhibitory activity against *S. aureus* with IZDs ranging from 14.0 – 28.3 mm, and MICs of 0.097 – 12.5 mg/ml. Gan Cao ET extract showed the best inhibitory activity, with IZD of 28.3 mm and MIC of 0.097 mg/ml. For Sua Khaw Capsule formula, both EA and ET extracts, demonstrated inhibitory activity against *S. aureus* with IZDs of 16.5 and 17.5 mm, respectively, and equal MICs of 3.13 mg/ml. For the water extracts, only those of Lian Qiao, Su Ye and Jin Yin Hua showed inhibitory activity against *S. aureus*. All extracts showed cytotoxicity against Vero cell cultures with the IC_{50} range of 60.70 μ g/ml to >1,000 μ g/ml. The results of heavy metal contaminations in Sua Khaw capsules showed that the contents of arsenic, cadmium, and lead passed the acceptance levels of THP, while the results of microbiological quality assessment of Sua Khaw capsules passed the acceptance levels of THP after subjected to gamma irradiation.

Discussion: EA extracts of all herbal components and ET extracts of 10 out of 12 herbs exhibited inhibitory activity against *S. aureus*, and the EA and ET extracts of Sua Khaw capsule had equal MICs against *S. aureus* of 3.13 mg/ml, indicating that the two solvents had similar extractive activity efficiency to extract antibacterial compounds. EA and ET extracts of Gan Cao showed the highest inhibitory activity with MIC values of 0.39 and 0.097 mg/ml, respectively. This may be due to a high content of isoflavonoids present in the roots of Gan Cao, which can be well extracted by ET and EA. It was found that the Tai Zi Shen EA extract showed a relatively high toxicity to Vero cell cultures, with IC_{50} of 60.70 μ g/ml, while EA extract of Sua Khaw capsule showed a much lower cytotoxicity (IC_{50} 314.6 μ g/ml). This was partly due to a small proportion of such cytotoxic herb in the herbal formula.

Conclusions and Recommendation: Of all the extracts, EA extracts showed highest inhibitory activity against *S. aureus*, followed by ET extracts; however, all extracts tested showed lower antimicrobial activities than the positive controls (levofloxacin and clotrimazole). Water appeared to be an inappropriate solvent for the extraction of antimicrobial compounds from this herbal formula. Only EA or ET extracts of Tai Zi Shen, Gan Cao, Bai Zhu and Jin Yin Hua also showed inhibitory activity against *E. coli* or *C. albicans* as well, but with lower activity. Although Sua Khaw capsule formula showed low cytotoxicity to Vero cells, more toxicity studies as well as pharmacological and clinical studies should be conducted to support its safe use in humans and therapeutic efficacy.

Keywords: antimicrobial activity, Bai Hu Xian Dan formula, cytotoxicity, Sua Khaw capsule formula, Yu Ping Feng San formula

บทนำและวัตถุประสงค์

จากการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 ในครั้งที่ผ่านมา ทำให้อุปสรรคทางการแพทย์และยารักษามีไม่เพียงพอ ประชาชนคนไทยและทั่วโลก ไม่สามารถเข้าถึงระบบสาธารณสุขของประเทศได้อย่างทั่วถึง จึงต้องพึ่งพาการแพทย์ทางเลือก โดยใช้สมุนไพรไทย หรือสมุนไพรจีนมาร่วมใช้เป็นทางเลือกในการรักษาด้วยตนเองที่บ้าน แต่จากปัญหาที่พบคือ มีการจำหน่ายยาสมุนไพรจีนที่ไม่ได้มาตรฐาน ยาปลอมระบาด และประชาชนส่วนใหญ่ขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ยา

ดังนั้น คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จึงได้คิดพัฒนาตำรับยาแผนจีนขึ้น โดยเห็นว่าตำรับยาที่น่าสนใจคือ “ยวี่ผิงเฟิงส่าน (Yu Ping Feng San)” ซึ่งเป็นตำรับยาในคัมภีร์การแพทย์แผนจีนที่มีการใช้มาอย่างยาวนานมากกว่า 2,000 ปี ได้รับการขนานนามว่าเป็น “จากบังลมหยก” หรือ “เกราะป้องกันภัย” ของปอด เนื่องจากมีการนำมาใช้เป็นตำรับแรกเพื่อเสริมสุขภาพโดยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันการเจ็บป่วยจากปัจจัยก่อโรคนอก^[1] ตำรับดั้งเดิมของยานี้ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ หวงฉี (Huang Qi), ป้ายจู้ (Bai Zhu) และ ผางเฟิง (Fang Feng) โดยนิยมใช้ทั้งในรูปแบบยาตำรับประพาท และยาผงชงน้ำร้อน หวงฉีมีสรรพคุณบำรุงซี่และระงับเหงื่อ ป้ายจู้เป็นตัวยาสเสริม ช่วยให้มีกล้ามเนื้อแข็งแรง บำรุงซี่และเสริมฤทธิ์ของหวงฉีให้แรงขึ้น ผางเฟิงเป็นตัวยาสช่วยและนำพาเป็นส่วนช่วยกระทุ้งไข่วัด จากการกระทบลมภายนอก ในกรณีที่การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแกว่ง ช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันให้เป็นปกติ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาในสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อให้สารสกัดน้ำทางปากหนูถีบจักรติดต่อกัน 4 วัน ช่วย

ให้การไหลเวียนของเลือดดีขึ้น และปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน ในการศึกษาทางคลินิกพบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในอาสาสมัครสุขภาพดี ปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน รักษาอาการหลอดลมอักเสบชนิดเรื้อรัง เยื่อจมูกอักเสบเนื่องจากภูมิแพ้ และบรรเทาอาการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจในเด็ก ด้านความปลอดภัยพบว่าเมื่อให้ยาผงขนาด 100 กรัม/กิโลกรัม แก่หนูถีบจักรใน 24 ชั่วโมง ไม่พบความผิดปกติ แต่เมื่อให้ขนาด 15 กรัม/กิโลกรัม ติดต่อกันนาน 14 วัน พบว่าสัตว์ทดลองมีอาการท้องเสียเล็กน้อย^[1]

ตามทฤษฎีการแพทย์แผนจีน การวินิจฉัยและรักษาโรคมุ่งเน้นการรักษาตามภาวะร่างกาย (syndrome differentiation) ของผู้ป่วยแต่ละราย จากประสบการณ์ทางคลินิกของผู้พัฒนาตำรับพบว่า ในบริบทของประเทศไทย ผู้ป่วยมักมีลักษณะภาวะชื้น (dampness) ร่วมกับภาวะซี่ของปอดพร่อง (lung qi deficiency) ดังนั้น การนำตำรับยา Yu Ping Feng San ซึ่งเป็นตำรับพื้นฐานสำหรับเสริมซี่และเสริมการป้องกันของร่างกายมาใช้ ส่วนประกอบของตำรับยังไม่มีฤทธิ์เพียงพอที่จะขจัดความชื้น และปกป้องร่างกายจากการระบาดของไวรัสโคโรนาในขณะนั้นได้ จึงปรับปรุงตำรับให้สอดคล้องกับลักษณะดังกล่าว จนได้รับการพัฒนาเป็น “ตำรับยาป้ายหูเซียนตาน (Bai Hu Xian Dan)” หรือ “ยาแคปซูลเสือขาว”

ตำรับยาแคปซูลเสือขาวที่ปรับปรุงใหม่นี้ ประกอบด้วยสมุนไพรจีนทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ หวงฉี (Huang Qi), ไทจีเชิน (Tai Zi Shen) และเสินจู่ (Shen Qu) ในอัตราส่วนอย่างละ 11%; เหลียนเฉียว (Lian Qiao), ผางเฟิง (Fang Feng), ต่างเชิน (Dang Shen), จื่อซูเย่ (Zi Su Ye), หนานซาเชิน (Nan Sha

Shen), ป้ายจู (Bai Zhu), ฮั่วเซียง (Huo Xiang) และ จินอินฮวา (Jing Yin Hua) ในอัตราส่วนอย่างละ 7.70% และ กานฉ่าว (Gan Cao) 3.80% ยาตำรับนี้มีสรรพคุณ เสริมพลังลมปราณ เสริมปอดและม้าม ให้แข็งแรง บำรุงยีน เสริมสร้างธาตุน้ำ ขับลมและพิษร้อน โดยผลิตเป็นยาแคปซูล และจำหน่ายให้กับผู้ป่วยในคลินิกการแพทย์แผนจีน ของคณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติเท่านั้น

สรรพคุณของสมุนไพรในตำรับยาแคปซูลเสียขาวและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยาแคปซูลเสียขาว มีสรรพคุณทางยาตามศาสตร์การแพทย์แผนจีน และงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

1. Lian Qiao (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) ส่วนที่ใช้คือผล มีฤทธิ์เย็นเล็กน้อย สรรพคุณลดร้อนขจัดพิษ ลดบวมสลายก้อน กระจายขับลมร้อน ใช้ในการรักษาฝีอักเสบต่างๆ อาการทางระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากปัจจัยลมร้อนภายนอกกระทบปอด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยับยั้งไวรัส influenza A ได้^[2]

2. Fang Feng (*Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk.) ส่วนที่ใช้คือราก มีรสเผ็ดและหวาน อุ่นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณกระเพาะปัสสาวะ ตับ และม้าม กระจายลมเพื่อขับกระจายสาเหตุก่อโรคที่ส่วนนอกของร่างกาย ขับความชื้น ระงับปวด ระงับการชัก มีสารสำคัญมากกว่า 100 ชนิด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antioxidant, antiproliferative, antitumor, immunoregulatory, antiallergic, anticoagulant และ blood circulation-promoting^[3]

3. Dang Shen (*Codonopsis pilosula*

(Franch.) Nannf.) ส่วนที่ใช้คือราก มีรสหวาน ฤทธิ์กลาง ออกฤทธิ์ตามเส้นลมปราณของปอด และม้าม ช่วยบำรุงกำลัง บำรุงเลือด แก้อาการอ่อนเพลีย และเสริมการทำงานของปอด สารสำคัญที่มีผลต่อการป้องกันและรักษาโรค COVID-19 เช่น สารกลุ่ม polysaccharides^[4]

4. Tai Zi Shen (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax) ส่วนที่ใช้คือราก รสหวานและขมเล็กน้อย สุกุม เข้าสู่เส้นลมปราณม้ามและปอด บำรุงชี่และเสริมม้าม และทำให้ปอดชุ่มชื้น มีรายงานว่า สารสำคัญในสมุนไพรนี้สามารถเพิ่มความอดทนในการออกกำลังกาย และช่วยป้องกันผลต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในหนูที่ออกกำลังกายอย่างหนักได้^[5]

5) Zi Su Ye (*Perilla frutescens* (L.) Britton) ส่วนที่ใช้คือใบ มีฤทธิ์อุ่น เข้าสู่เส้นลมปราณปอด และม้าม สรรพคุณขจัดลมเย็น รักษาอาการที่มีสาเหตุจากสิ่งก่อโรคนอก ช่วยเสริมการไหลเวียนของชี่ มีรายงานว่า สารสกัดจาก Zi Su Ye สามารถยับยั้งไวรัส SARS-CoV-2 ที่ค่า EC₅₀ 0.12 mg/ml และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดลองด้วย^[6]

6. Huang Qi (*Astragalus membranaceus* Fisch. ex Bunge หรือ *Astragalus mongholicus* Bunge) ส่วนที่ใช้คือราก มีรสหวาน อุ่นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณปอดและม้าม สรรพคุณ บำรุงชี่ ระงับเหื่อ ขับปัสสาวะ ลดอาการบวม และพบว่า มีฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันโรค COVID-19 ฤทธิ์ในการต้านไวรัสไข้เลือดออก (dengue virus) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ^[4,7-8]

7. Shen Qu หรือเรียกว่า Medicated Leaven (ML) ประกอบด้วยสมุนไพรจีน 6 ชนิด ได้แก่ *Artemisia annua*, *Xanthium sibiricum*, *Polygonum*

hydropiper, ถั่ว adzuki, เมล็ดแอปริคอต และ แป้ง มีรสหวานซ่า ฤทธิ์อุ่นเข้าสู่เส้นลมปราณม้าม และกระเพาะอาหาร มีสรรพคุณเสริมการทำงานของ ม้าม ช่วยย่อยอาหาร มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ด้าน แบคทีเรียหลายชนิดในระบบทางเดินอาหารและ ลำไส้^[9-11]

8. Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.) ส่วนที่ใช้คือราก และลำต้นใต้ดิน มีรสหวาน ฤทธิ์สมดุลง เข้าสู่เส้นลมปราณปอด หัวใจ ม้าม และ กระเพาะอาหาร ช่วยบำรุงลมปราณ เสริมความ แข็งแรงของม้าม ขับเสมหะ แก้ไอ แก้ปวด สารสำคัญ ในรากมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ^[12,13] ด้านเชื้อแบคทีเรีย^[14] ด้านเชื้อรา *Candida*^[15] นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ด้าน มะเร็งและต้านไวรัส^[16]

9. Nan Sha Shen (*Adenophora tetraphylla* Fisch. ex B.D.Jacks.) ส่วนที่ใช้คือราก มีรสหวาน ฤทธิ์เย็นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณปอด และ กระเพาะอาหาร ช่วยเสริมสร้างอิน ลดความร้อนใน ปอดและกระเพาะอาหาร สลายเสมหะ และบำรุงซี่ มี ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และเป็นยาที่ใช้บรรเทาอาการไอ และโรคที่เกี่ยวข้องกับปอด^[17]

10. Bai Zhu (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) ส่วนที่ใช้คือลำต้นใต้ดิน รสหวานปนขม ฤทธิ์ อุณหภูมิเย็น เข้าสู่เส้นลมปราณม้าม และกระเพาะอาหาร ช่วย เสริมการทำงานของม้ามและบำรุงซี่ ขจัดความชื้นทาง บัสดาวะ ระงับเห็บเหา มีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ ด้านอักเสบ^[18]

11. Huo Xiang (*Pogostemon cablin* (Blan- co) Benth.) ส่วนที่ใช้ คือ ส่วนเหนือดิน มีรสซ่า ฤทธิ์ อุณหภูมิเย็น เข้าสู่เส้นลมปราณม้าม กระเพาะอาหาร และปอด ด้านการอาเจียน ขจัดความร้อน ใช้ในกลุ่ม

อาการความชื้นติดขัดบริเวณม้ามและกระเพาะอาหาร เช่น อาการท้องอืด จุกแน่นท้อง คลื่นไส้ มีฤทธิ์ทาง ชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ฆ่าแมลง^[19]

12) Jin Yin Hua (*Lonicera japonica* Thunb.) ส่วนที่ใช้คือ ดอกตูมหรือดอกแรกแย้ม มี รสหวาน ฤทธิ์เย็น เข้าสู่เส้นลมปราณปอด หัวใจ และ กระเพาะอาหาร มีสรรพคุณลดร้อน ขจัดพิษ กระจาย ขับลมร้อน ใช้ในการรักษาผื่นอักเสบต่าง ๆ อาการ ทางระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากปัจจัยลมร้อน ภายนอกกระทบปอด มีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระทั้งการศึกษาใน หลอดทดลองและสัตว์ทดลอง รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียและไวรัส^[20]

แม้ว่าสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีการศึกษาวิจัยมา บ้างก็ตาม แต่การนำมาทำเป็นตำรับยาใหม่และปรับรูปแบบการบริโภคเป็นแบบแคปซูลยาผงนั้น ยังไม่มีการ ศึกษาในด้านต่าง ๆ ทั้งด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเป็น พิษ และคุณภาพของยา ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการ ศึกษาฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์โดยเลือกทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรม บวก แกรมลบ และเชื้อราก่อโรคตามลำดับ ทดสอบ ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cells ของ ตำรับยาและตัวยาในแคปซูลสีขาว รวมทั้งวิเคราะห์ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนักของตำรับ ยาแคปซูลสีขาวตามมาตรฐานของตำรามาตรฐาน ยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) เพื่อเตรียมความพร้อมในการขอขึ้นทะเบียนเป็น ผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทยาแผนจีน

ระเบียบวิธีศึกษา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 ตำรับยาแคปซูลเสือขาวและสมุนไพรมะเขือเทศ

สมุนไพรมะเขือเทศ 12 ชนิด ชื่อจากบริษัท กุญแจลิ้ม อิม จำกัด กรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นคลินิกการแพทย์แผนจีน มีการจำหน่ายและรักษาด้วยสมุนไพรมะเขือเทศ - จีน มากกว่า 100 ปี ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญด้านสมุนไพรมะเขือเทศและเป็นผู้นำเข้าสมุนไพรมะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเสือขาว ได้นำสมุนไพรมะเขือเทศ 12 ชนิด บดเป็นผงละเอียด และบรรจุลงในแคปซูล มีลักษณะเป็นแคปซูลใส ภายในบรรจุผงยาสีน้ำตาลอ่อน บรรจุภัณฑ์เป็นขวดพลาสติกสีขาว บรรจุขวดละ 80 เม็ด ระบุวันที่ผลิต 25/11/2565 และวันหมดอายุ 25/11/2568 ผลิตโดย บริษัท หมอ นพพร กรู๊ป จำกัด โดยสมุนไพรมะเขือเทศ 12 ชนิด และตำรับยาแคปซูลเสือขาวที่นำมาศึกษาวิจัยเป็นรุ่นผลิต (Batch) เดียวกัน

1.2 สารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศและสารสกัดตำรับยาแคปซูลเสือขาว

นำสมุนไพรมะเขือเทศ 12 ชนิด และตำรับยาแคปซูลเสือขาว มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลเอซิเตต เอทานอล (95%) และน้ำกลั่น การสกัดด้วยเอทิลเอซิเตตและเอทานอล เริ่มจากนำสมุนไพรมะเขือเทศแต่ละชนิดมาชั่ง (ประมาณ 100 - 350 กรัม) และเติมตัวทำละลายในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแยกกาก และนำส่วนสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)

ได้สารสกัดหยาบเข้มข้นซึ่งหาปริมาณน้ำหนักและเก็บในตู้เย็น ($4 - 5^{\circ}\text{C}$)

สำหรับสารสกัดน้ำ เตรียมโดยซึ่งสมุนไพรมะเขือเทศ 1 ส่วนเติมน้ำ 2 ส่วน และต้มน้ำจนน้ำลดลงครึ่งหนึ่ง แล้วต้มต่อด้วยไฟอ่อนอีก 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลาย แล้วนำมารองอีก ครั้งได้สารสกัดเข้มข้น นำไปแช่ตู้แข็งที่อุณหภูมิ -20°C และนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried) ซึ่งปริมาณส่วนสกัดหยาบที่ได้ และเก็บในตู้เย็น ($4 - 5^{\circ}\text{C}$) เพื่อเตรียมทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

1) เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบของสมุนไพรมะเขือเทศและตำรับยา โดยสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเตต และสารสกัดด้วยเอทานอลละลายด้วย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดด้วยน้ำละลายด้วยน้ำ RO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.) และกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

2) การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method (ดัดแปลงจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015)^[21]

2.1) เพาะเชื้อแบคทีเรียที่เรียทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC8739 และ *S. aureus* ATCC6538 ลงบน Tryptone Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์ *C. albicans* ATCC10231 เพาะบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2) เตรียมเซลล์แขวนลอยจุลินทรีย์ (cell suspension) ในสารละลาย 0.85% NaCl และปรับให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 และ 10^7 เซลล์/มล. สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ

2.3 ใช้ไม้พินปลายสามี่จุ่มเซลล์แขวนลอย จุลินทรีย์เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) จำนวน 3 แถว และใช้ Cork borer No.4 เจาะรูให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (มม.) จำนวน 3 หลุม

2.4) เติมสารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร (มคล.) ลงในแต่ละหลุม โดยใช้ 100% DMSO เป็นสารควบคุมลบ (negative control) สำหรับสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเทตและเอทานอลละลาย และใช้น้ำ RO ปราศจากเชื้อสำหรับสารสกัดน้ำ และใช้ levofloxacin disc (5 มคก./disc) และ clotrimazole (10 มคก./disc) เป็นสารควบคุมบวก (positive control) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ (ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

2.5) บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone diameter, IZD) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (มม.) รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD)

3. วิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration; MBC/MFC) ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution assay
(ดัดแปลงจาก Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) 2016)^[22]

3.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 - 2.2 โดยปรับให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 และ 10^4 เซลล์/มล. สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ

3.2 เจือจางสารสกัดสมุนไพรแบบ 2-fold serial dilution ใน 96-well microtiter plate สำหรับแบคทีเรียใช้ Mueller Hinton Broth (MHB) และยีสต์ใช้ Sabouraud Dextrose Broth ที่เติม 0.02% Tween-80 (SDB-T) จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในหลุมที่ 1 - 10 เท่ากับ 100 - 0.195 มก./มล. หลุมที่ 11 คือ ยาปฏิชีวนะ levofloxacin และ ketoconazole สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ และหลุมที่ 12 คือ อาหารเพาะเชื้อ MHB และ SDB-T สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ (ทุกหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 50 มคล.)

3.3 เติมเชื้อทดสอบปริมาตร 50 มคล. ลงในทุกหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสี resazurin ความเข้มข้น 0.018% ปริมาตร 30 มคล. ลงในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ อีก 3 ชั่วโมง อ่านผลจากการเปลี่ยนสีของ resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู โดยอ่านค่า MIC จากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดหลุมที่ยังคงเป็นสีน้ำเงิน

3.5 หาค่า MBC / MFC ต่อเนื่อง โดยดูดเชื้อในแต่ละหลุมปริมาตร 10 มคล. ลงบนจานอาหารเพาะเชื้อแข็ง MHA และ SDA สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง อ่านค่า MBC จากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนจาน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ด้วยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (10%

FBS), 10 mM HEPES, 100 ยูนิต/มล. penicillin, 100 มก./มล. streptomycin โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 5×10^3 เซลล์/หลุม ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารสกัดตำรับยาเลื่อขาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่วนชุดควบคุม (vehicle control) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์ dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยมีความเข้มข้นของ DMSO ไม่ควรเกิน 1% และนำไปบ่มที่ตู้ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48

ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติม [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT dye] (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05%) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการคว่ำ microtiter plate เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ และ MTT ส่วนเกินที่อยู่ในหลุมออกให้หมด และให้เหลือแต่เพียงผลึก formazan ที่ก้นหลุมเท่านั้น จากนั้นเติม DMSO เพื่อทำการละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 620 nm นำค่าที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD ของหลุมทดสอบ}}{\text{OD ของหลุม vehicle control}} \times 100$$

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ % cell viability เมื่อเพาะเลี้ยงในมีเดียที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำมาสร้างเป็นเส้นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % cell viability กับความเข้มข้นของสารสกัด แล้วหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (half-maximal inhibitory concentration หรือ IC₅₀) จากกราฟ

5. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (microbial contamination) ของผลิตภัณฑ์แคปซูลเลื่อขาว

ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์แคปซูลเลื่อขาว โดยอ้างอิงประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐาน ค่าความบริสุทธิ์หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพสำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง พ.ศ.2564 เพื่อให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ.2562

โดยใช้วิธีการทดสอบตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ฉบับปี พ.ศ. 2563 (Thai Herbal Pharmacopoeia 2021)^[23]

6. การวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนักในตำรับยาแคปซูลเลื่อขาว

ส่งตัวอย่างยาแคปซูลเลื่อขาวไปวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด (สาขาฉะเชิงเทรา) โดยทำตัวอย่างผงตำรับยาแคปซูลเลื่อขาวให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างทั่วถึง ผ่านกระบวนการ acid digestion โดยใช้เครื่อง microwave digester และนำไปหาปริมาณตะกั่ว (Pb), แคดเมียม (Cd) และสารหนู (As) ด้วยเทคนิค inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) ตามวิธีทดสอบอ้างอิง In-house method TE-CH-193 based on AOAC (2019) 2015.01^[24]

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาแคปซูลเสือขาวและสารสกัดตำรับยาเสือขาวด้วยวิธี agar well diffusion method

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ (EA) ของสมุนไพร 2 ชนิด คือ Tai Zi Shen และ Jin Yin Hua แสดงผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* โดยมีค่า IZD ใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 12.60 ± 0.50 ถึง 13.00 ± 0.80 มม. และสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* โดยมี IZD อยู่ระหว่าง 13.30 ± 0.30 ถึง 28.00 ± 1.20 มม. สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดคือสารสกัด Gan Cao มี IZD เท่ากับ 28.00 ± 1.20 มม. รองลงมาคือสารสกัด Jin Yin Hua มี IZD เท่ากับ 18.30 ± 0.50 มม. สารสกัด Gan Cao และ Bai Zhu มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* มี IZD ใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 15.3 ± 0.3 ถึง 16.8 ± 1.4 มม. (Table 1)

สารสกัดเอทานอล (ET) ของสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ Lian Qiao, Fang Feng, Tai Zi Shen,

Zi Su Ye, Huang Qi, Shen Qu, Gan Cao, Bai Zhu, Huo Xiang, Jin Yin Hua และตำรับยาแคปซูลเสือขาว (SK) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ได้ดี โดยมี IZD อยู่ระหว่าง 14.00 ± 0.30 ถึง 28.3 ± 1.30 มม. สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด คือ Gan Cao มี IZD เท่ากับ 28.30 ± 1.30 มม. รองลงมา คือ Huo Xiang มี IZD เท่ากับ 23.00 ± 0.40 มม. และมีสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ Lian Qiao, Gan Cao และ Jin Yin Hua มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* แสดง IZD ใกล้เคียงกันมีค่าอยู่ระหว่าง 14.00 ± 0.50 ถึง 15.80 ± 0.30 มม. (Table 1)

สารสกัดสมุนไพรน้ำของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ Lian Qiao, Su Ye และ Jin Yin Hua มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* โดยมี IZD อยู่ระหว่าง 12.80 ± 0.60 ถึง 16.00 ± 0.90 มม. สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด คือ สารสกัด Lian Qiao มี IZD เท่ากับ 16.00 ± 0.90 มม.

สำหรับสารสกัดตำรับยาเสือขาวที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (EA) และเอทานอล (ET) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* เท่านั้น โดยมี IZD เท่ากับ 16.5 ± 0.8 และ 17.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ

Table 1 Antimicrobial activity of herbal extracts against selected microorganisms using agar well diffusion method.

Herbal extracts	Inhibition zone diameter (mm.) (mean $\pm$ SD)								
	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>C. albicans</i>		
	EA	ET	H ₂ O	EA	ET	H ₂ O	EA	ET	H ₂ O
<i>F. suspensa</i>	-	-	-	14.3 $\pm$ 0.6	16.8 $\pm$ 0.5	16.0 $\pm$ 0.9	-	14.0 $\pm$ 0.5	-
<i>S. divaricata</i>	-	-	-	16.0 $\pm$ 0	16.4 $\pm$ 0.5	-	-	-	-
<i>C. pilosula</i>	-	-	-	14.4 $\pm$ 0.5	-	-	-	-	-
<i>P. heterophylla</i>	13.0 $\pm$ 0.8	-	-	16.6 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.3	-	-	-	-
<i>P. frutescens</i>	-	-	-	17.0 $\pm$ 1.1	18.0 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 0.6	-	-	-
<i>A. membranaceus</i>	-	-	-	17.5 $\pm$ 0.6	17.4 $\pm$ 0.4	-	-	-	-
Medicated	-	-	-	16.9 $\pm$ 0.5	18.8 $\pm$ 1.5	-	-	-	-
Leaven (ML)									
<i>G. uralensis</i>	-	-	-	28.0 $\pm$ 1.2	28.3 $\pm$ 1.3	-	15.3 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.3	-
<i>A. tetraphylla</i>	-	-	-	13.3 $\pm$ 0.3	-	-	-	-	-
<i>A. macrocephala</i>	-	-	-	17.6 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 0.4	-	16.8 $\pm$ 1.4	-	-
<i>P. cablin</i>	-	-	-	14.9 $\pm$ 0.5	23.0 $\pm$ 0.4	-	-	-	-
<i>L. japonica</i>	12.6 $\pm$ 0.5	-	-	18.3 $\pm$ 0.5	20.3 $\pm$ 0.6	13.6 $\pm$ 1.1	-	15.5 $\pm$ 1.0	-
Sua khaw (SK)	-	-	-	16.5 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 0.5	-	-	-	-
Positive ^a control	37.6 $\pm$ 1.0	37.3 $\pm$ 0.5	36.6 $\pm$ 0.8	39.6 $\pm$ 1.4	36.1 $\pm$ 0.9	35.2 $\pm$ 1.1	24.9 $\pm$ 1.2	23.3 $\pm$ 1.4	20.1 $\pm$ 1.1
Negative ^b control	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notes: ^a Positive control: Levofloxacin (5 μ g/disc) for *E. coli* and *S. aureus*; Clotrimazole (10 μ g/disc) for *C. albicans*.

^b Negative control: 100% DMSO for ethyl acetate (EA) and ethanol (ET) extracts; sterile water for aqueous (H₂O) extract

(-) indicates no inhibition zone

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC/MFC) ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาเสือขาวและสารสกัดตำรับยาเสือขาว

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากวิธี agar well diffusion method มาหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC พบว่าสารสกัดเอทิลเอซิเทต (EA) ทั้ง 13 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.39 - 6.25 มก./มล. และ MBC อยู่ระหว่าง 0.78 - 12.50 มก./มล. และ

สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้มีเพียง 2 ชนิด คือ Tai Zi Shen และ Jin Yin Hua มีค่า MIC เท่ากับ 25 และ 12.50 มก./มล. และ MBC ที่ความเข้มข้น 25 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* มี 2 ชนิด คือ Gan Cao และ Bai Zhu มีค่า MIC 25 และ 1.56 มก./มล. และ MFC 25 และ 3.13 มก./มล. ตามลำดับ

สารสกัดด้วยเอทานอล (ET) ของสมุนไพร 10 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.097 - 12.50 มก./มล. และ MBC อยู่ระหว่าง 1.56 - 25 มก./มล. มีสารสกัด Lian Qiao

Gan Cao และ Jin Yin Hua มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* มีค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้น 25 มก./มล. เท่ากัน ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ มี 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรีย *S. aureus* ได้แก่ Lian Qiao, Su Ye และ Jin Yin Hua มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 25, 100 และ 100 มก./มล. ตามลำดับ (Table 2)

สำหรับสารสกัดตำรับยาเลื่อขาวที่สกัดด้วย เอทิลเอซิเทต (EA) และเอทานอล (ET) มีฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 มก./มล. ตามลำดับ และแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่ค่า MBC เท่ากับ 3.13 และ 25 มก./มล. ตามลำดับ

Table 2 MIC, MBC, and MFC values of ethyl acetate (EA), ethanol (ET), and aqueous (H₂O) herbal extracts against *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*

Herbal extracts	MIC, MBC and MFC (mg/ml)																		
	<i>E. coli</i>						<i>S. aureus</i>						<i>C. albicans</i>						
	EA		ET		H ₂ O		EA		ET		H ₂ O		EA		ET		H ₂ O		
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	
<i>F. suspensa</i>							6.25	12.5	12.5	25	25	25				25	25		
<i>S. divaricata</i>							1.56	6.25	1.56	1.56									
<i>C. pilosula</i>							3.13	6.25											
<i>P. heterophylla</i>	25	25					3.13	12.5	6.25	12.5									
<i>P. frutescens</i>							6.25	12.5	6.25	12.5	100	100							
<i>A. membranaceus</i>							1.56	6.25	6.25	25									
Medicated							1.56	3.13	1.56	3.125									
Leaven (ML)																			
<i>G. uralensis</i>							0.39	0.78	0.097	3.125			25	25	25	25			
<i>A. tetraphylla</i>							12.5	12.5											
<i>A. macrocephala</i>							1.56	3.13	3.13	6.25			1.56	3.13					
<i>P. cablin</i>							3.13	3.13	12.5	25									
<i>L. japonica</i>	12.5	12.5					3.13	6.25	3.13	12.5	100	100			25	25			
Sua Khaw (SK)							3.13	3.13	6.25	25									

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero Cell ของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาเลื้อขาว และสารสกัดตำรับยาเลื้อขาว

สำหรับสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (EA) พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้เซลล์ Vero ตายร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าระหว่าง 60.70 ± 10.96 ถึง 596.50 ± 11.01 มก./มล. โดย Tai Zi Shen มีความเป็นพิษมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 60.70 ± 10.96 มก./มล. รองลงมา คือ Lian Qiao, Gan Cao, Huo Xiang, Bai Zhu, Su Ye, Shen Qu และตำรับยาแคปซูลเลื้อขาว (SK) โดยมีค่า IC_{50} 117.00 ± 6.37 , 121.90 ± 0.46 , 126.60 ± 2.95 , 188.00 ± 3.36 , 194.00 ± 4.79 , 227.09 ± 6.48 และ 314.60 ± 10.20 มก./

มล. ตามลำดับ (Table 3)

สำหรับสารสกัดเอทานอล (ET) พบว่ามีค่า IC_{50} 181.70 ± 9.30 ถึง $>1,000$ มก./มล. โดย Huo Xiang มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero มากที่สุดที่ IC_{50} 181.70 ± 9.30 มก./มล. รองลงมา คือ Shen Qu, Zi Su Ye และตำรับยาแคปซูลเลื้อขาว (SK) ที่ระดับความเข้มข้น 386.80 ± 6.34 , 437.90 ± 8.030 และ 688.30 ± 2.94 มก./มล. ตามลำดับ (Table 3) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ พบว่ามีเพียง Lian Qiao เท่านั้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่ IC_{50} 723.60 ± 7.60 มก./มล. ส่วนสารสกัดอื่นแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่ $IC_{50} >1,000 \pm 0.00$ มก./มล. (Table 3)

Table 3 Cytotoxicity of extracts of Sua Khaw formulation and its herbal components against Vero cells

Herbal extract	Cytotoxicity (IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$) (mean $\pm$ SD)		
	EA	ET	H ₂ O
<i>F. suspensa</i>	117.0 ± 6.37	595.9 ± 12.55	723.6 ± 7.60
<i>S. divaricate</i>	441.8 ± 5.88	443.5 ± 12.90	$>1,000 \pm 0.00$
<i>C. pilosula</i>	596.5 ± 11.01	$>1,000 \pm 0.00$	$>1,000 \pm 0.00$
<i>P. heterophylla</i>	60.7 ± 10.96	$>1,000 \pm 0.00$	$>1,000 \pm 0.00$
<i>P. frutescens</i>	194.0 ± 4.79	437.9 ± 8.03	$>1,000 \pm 0.00$
<i>A. membranaceus</i>	371.4 ± 11.05	534.8 ± 12.29	$>1,000 \pm 0.00$
Medicated Leaven (ML)	227.9 ± 6.48	386.8 ± 6.34	$>1,000 \pm 0.00$
<i>G. uralensis</i>	121.9 ± 0.46	$>1,000 \pm 0.00$	$>1,000 \pm 0.00$
<i>A. tetraphylla</i>	396.3 ± 12.01	635.5 ± 9.90	$>1,000 \pm 0.00$
<i>A. macrocephala</i>	188.0 ± 3.36	476.5 ± 11.09	$>1,000 \pm 0.00$
<i>P. cablin</i>	126.6 ± 2.95	181.7 ± 9.30	$>1,000 \pm 0.00$
<i>L. japonica</i>	361.9 ± 9.52	$>1,000 \pm 0.00$	$>1,000 \pm 0.00$
Sua Khaw (SK)	314.6 ± 10.2	688.3 ± 2.94	$>1,000 \pm 0.00$

6. ผลการตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเสือขาว

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเสือขาวมาตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ พบว่ามีเชื้อ *Clostridium* spp. ไม่เป็นตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (acceptance criteria) ของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai

Herbal Pharmacopoeia 2021)^[23] จึงนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการฉายรังสีที่ศูนย์ฉายรังสีสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) และนำผลิตภัณฑ์ที่ฉายรังสีแกมมาแล้วมาตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์อีกครั้ง พบว่าผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมด (Table 4)

Table 4 Results of microbiological quality assessment of Sua Khaw capsule

Test parameter	Acceptance criteria ^[23]	Test results		
		No irradiation	Post-irradiation	
1. Total Aerobic Microbial Count; TAMC (CFU/g)	NMT 5×10^5 CFU/g	3.6×10^5 CFU/g	< 10 CFU/g	passed
2. Total Yeast and Mold Count; TYMC (CFU/g)	NMT 5×10^4 CFU/g	< 10 CFU/g	< 10 CFU/g	passed
3. Specified microorganisms				
3.1 Bile-tolerant Gram-negative bacteria (CFU/g)	NMT 10^2 PN/g	< 10 PN/g	< 10 PN/g	passed
3.2 <i>Salmonella</i> spp. in 25 g	Absent	Absent	Absent	passed
3.3 <i>Escherichia coli</i> in 1 g	Absent	Absent	Absent	passed
3.4 <i>Clostridium</i> spp. in 1 g	Absent	Detected	Absent	passed

NMT = not more than

7. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในสมุนไพรตำรับยาแคปซูลเสือขาว

จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องเกณฑ์มาตรฐาน ค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพสำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจัดแจ้ง พ.ศ. 2564^[25] กำหนดปริมาณสารหนู (arsenic), แคดเมียม (cadmium) และตะกั่ว (Lead) ในตำรับ

ผลิตภัณฑ์สมุนไพรต้องไม่เกิน 5, 0.30 และ 10 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผงยาแคปซูลเสือขาวพบโลหะหนักดังกล่าวในปริมาณไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด (Table 5) จึงผ่านเกณฑ์การปนเปื้อนโลหะหนักตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2564^[25] และผ่านเกณฑ์ของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ที่กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสารหนูไม่เกิน 4 ppm ด้วยเช่นกัน^[23]

Table 5 Heavy metal contents in Sua Khaw capsule

	Standard criteria ^[25]	Standard criteria ^[23]	Results (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Arsenic (As)	NMT 5 ppm	NMT 4 ppm	2.917	0.003	0.015
Cadmium (Cd)	NMT 0.3 ppm	NMT 0.3 ppm	0.234	0.003	0.010
Lead (Pb)	NMT 10 ppm	NMT 10 ppm	0.848	0.005	0.015

NMT = Not more than, LOD = Limit of detection, LOQ Limit of quantitation

อภิปรายผล

จากการนำสารสกัดตำรับยาเลื้อขาวและสมุนไพรในตำรับ ประกอบด้วยส่วนสกัดด้วยเอทิล-เอซิเทต เอทานอล และน้ำทั้งหมด 39 ตัวอย่างมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งคุณภาพของผลิตภัณฑ์แคปซูลเลื้อขาว พบว่า ในภาพรวมสารสกัดที่นำมาทดสอบแสดงฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าต้าน *E. coli* และ *C. albicans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราตามลำดับ และสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุดและยับยั้งเฉพาะ *S. aureus* เท่านั้น โดยสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเทตของตำรับยาเลื้อขาวและของตัวยาสมุนไพรทั้ง 12 ชนิดแสดงทั้งฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* (Table 1 และ Table 2) ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลของตำรับยาเลื้อขาวและของตัวยาสมุนไพร 10 ชนิด ยกเว้น Dang Shen (*C. pilosula*) และ Nan Sha Shen (*A. tetraphylla*) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion (Table 1) และแสดงทั้งฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC, MBC ใน microtiter plate (Table 2)

ในทางตรงข้าม สารสกัดด้วยน้ำของตำรับยา

เลื้อขาวและของตัวยาสมุนไพรส่วนมากในตำรับไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามชนิด แสดงว่าสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของตัวยาสมุนไพรส่วนมากไม่ละลายในน้ำ หรือละลายในน้ำได้น้อย ยกเว้น สารสกัดด้วยน้ำของ Lian Qiao (*F. suspensa*), Zi Su Ye (*P. frutescens*) และ Jin Yin Hua (*L. japonica*) เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *S. aureus* ได้ใน agar well diffusion test อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดด้วยน้ำจัดว่าอ่อนมากหรือไม่มีฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยา เพราะเป็นค่าที่สูงเกินกว่าจะเป็นค่าระดับยาในเลือดที่ออกฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ได้จากการให้ยาขนาดปกติ นอกจากนี้ ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดด้วยน้ำของ Zi Su Ye และ Jin Yin Hua มีค่าเท่ากับ 100 มก./มล. บ่งชี้ว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในระดับค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ สารสกัดหยาบความเข้มข้นสูงอาจยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยอ้อมผ่านกลไกทางกายภาพและเคมีอื่นร่วมด้วย เช่น ความแตกต่างของความดันออสโมติกในเซลล์ของจุลินทรีย์และในอาหารเพาะเชื้อ อาจทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายและน้ำหรือสารในเซลล์รั่วออกจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์

ผลการวิจัยที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและ

เอทิลเอซิเทตเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำ 9 ใน 12 ชนิดสมุนไพรไม่มีฤทธิ์ ดังนั้น หากจัดแบ่งสารสำคัญในตำรับและในตัวยาสมุนไพรตามสภาพมีขั้ว (polarity) ซึ่งมีผลต่อสภาพละลายได้ (solubility) ในเอทานอลและเอทิลเอซิเทต ซึ่งเป็น semi-polar solvents แต่ไม่ละลายในน้ำที่สภาพมีขั้วสูง (highly polar) จัดว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ส่วนมากเป็น semi-polar compounds ที่มีสมบัติสภาพมีขั้วเป็น moderately polar ทำให้สามารถแพร่ใน aqueous agar และแสดงโซนยับยั้งต่อ *S. aureus* ได้ ตัวอย่างกลุ่มสาร semi-polar compound ที่น่าจะอยู่ในสารสกัดเอทิลเอซิเทตและเอทานอล เช่น caryophyllene oxide, trans-nerolidol, linalool^[26], caffeic acid และ luteolin^[27]

การศึกษานี้พบว่า Jin Yin Hua (*L. japonica*) เป็นตัวยาเดียวในตำรับที่มีสารสำคัญที่เป็น semi-polar compounds ที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งสามชนิด และสารสกัดทั้งสามชนิดสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman และ Kang (2009)^[26] ซึ่งพบสารสำคัญที่สกัดได้จากดอกและใบในสารสกัดเอทานอลจำนวน 35 ชนิด ได้แก่ trans-nerolidol (16.31%), caryophyllene oxide (11.15%), linalool (8.61%), p-cymene (7.43%), hexadecanoic acid (6.39%), eugenol (6.13%), geraniol (5.01%), trans-linalool oxide (3.75%) เป็นต้น โดยน้ำมันหอมระเหย (essential oil) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 6538 โดยมี IZD เท่ากับ 16.30 ± 0.90 มม. และสารสกัดเอทานอลแสดงโซนยับยั้งเท่ากับ 15.00 ± 1.2 มม. ที่ความเข้มข้น 400 มก./disc และเมื่อนำสารสกัดเอทานอลมาสกัด

ต่อด้วยเอทิลเอซิเทต พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ไม่ต่างกัน โดยมีโซนยับยั้งเท่ากับ 14.20 ± 1.00 มม. และสารสกัดทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเอทานอลไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดดอก Jin Yin Hua (*L. japonica*) ด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น (*S. aureus* และ *P. aeruginosa*) แต่เมื่อนำไปแยกส่วนด้วยเอทิลเอซิเทต (EA fraction) พบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง (broad-spectrum) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, และ *A. brasiliensis* โดยพบสารสำคัญคือ caffeic acid และ luteolin^[27]

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่แรงที่สุดในการศึกษานี้คือ Gan Cao (*G. uralensis*) โดยสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า IZD กว้างที่สุด (ประมาณ 28.3 มม.) และค่า MIC & MBC ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสมุนไพรอื่น (0.097 และ 3.125 มก./มล.) สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล^[15] ที่รายงานว่าสารสกัด Gan Cao ด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. โดยมีขนาด IZD ที่ 13.03 ± 0.83 มม. และมีค่า MIC และ MBC 0.78 และ 1.56 มก./มล. นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Song-Yi Yang (2020)^[28] ซึ่งใช้สารสกัดความเข้มข้น 50 - 200 มก./มล. พบโซนยับยั้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1.13 - 1.40 มม. ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และพบปริมาณสารกลุ่ม polyphenols และ flavonoids เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ตั้งแต่ 13.10 - 17.70 มก./มล. และ 21.7 - 25.0 มก./มล. ตามลำดับอย่างไรก็ตาม บทบาทของ Gao Cao ในการช่วยให้ตำรับยาเลื่อขาว

แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์น่าจะน้อย เพราะมีปริมาณต่ำที่สุดในตำรับยานี้คือเพียงร้อยละ 3.8 ทำให้ค่า IZD, MIC และ MBC ของสารสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลแอลกอฮอล์ของตำรับยาเสือขาวใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของตัวยาสมุนไพรทุกตัวในตำรับ แสดงว่าสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับสมุนไพรเสือขาวอาจมีฤทธิ์ที่เสริมกันและลดฤทธิ์กัน

ความเป็นพิษของสมุนไพรตำรับเสือขาว

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ Vero cells ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ที่แยกได้จากเซลล์เยื่อบุผิวไตปกติของ African green monkey (*Chlorocebus aethiops*) และเป็นเซลล์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารเคมี สารสกัดจากธรรมชาติ หรือยาว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือไม่

จากเกณฑ์การพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบของสมุนไพร (ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา)^[29] สารสกัดหยาบที่มี IC_{50} 30 - 100 มก./มล. จัดว่ามีพิษต่อเซลล์ปานกลาง (moderate cytotoxicity) ขณะที่ IC_{50} 100 - 1,000 มก./มล. จัดว่ามีพิษต่อเซลล์ต่ำ (weak/low cytotoxicity) และถ้า IC_{50} มีค่ามากกว่า 1,000 มก./มล. จะจัดว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-toxic) ในภาพรวม (Table 3) เมื่อจัดลำดับความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero จากมากไปน้อยพบว่าสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ของตำรับยาเสือขาวและตัวยาสมุนไพรในตำรับทุกชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC_{50} 60.7 - 596.5 มก./มล.) มากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50} 181.7 - >1,000 มก./มล.) และสารสกัดด้วยน้ำ 723.6 - >1,000

มก./มล.) ตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาและตัวยาสมุนไพรในตำรับเกือบทั้งหมดไม่มีพิษต่อเซลล์ ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำของ Lian Qiao (*F. suspensa*) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (IC_{50} 723.6 มก./มล.)

สารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ของตำรับยาเสือขาวและตัวยาสมุนไพรเกือบทั้งหมดจัดว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ยกเว้นสารสกัดของ Tai Zi Shen (*P. heterophylla*) ซึ่งมีความเป็นพิษปานกลาง (IC_{50} 60.7 มก./มล.) ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลของตำรับยาเสือขาวและตัวยาสมุนไพร 8 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและ 4 ชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้น จากผลการทดสอบข้างต้น จึงอาจสรุปได้ว่าสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสมุนไพรในตำรับส่วนมากเป็นสารกลุ่มที่ชอบไขมัน (lipophilic) และกลุ่ม semi-polar compounds ซึ่งละลายได้ดีในเอทิลแอลกอฮอล์ และพบได้น้อยในสารสกัดด้วยเอทานอลซึ่งมีขั้วสูงกว่า และไม่พบในสารสกัดด้วยน้ำ

ตำรับยาแคปซูลเสือขาวนี้ตั้งขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานการตั้งตำรับยาสมุนไพรจีน ซึ่งการคัดเลือกตัวยาที่ใช้ร่วมกันจะมีหน้าที่ตัวยาที่สามารถลดพิษของยาสมุนไพรตัวอื่น หรือลดความรุนแรงของสมุนไพรที่ใช้เป็นตัวหลักในตำรับทั้งหมดได้ เช่น Gan Cao (*G. uralensis*) ตามสรรพคุณทางการแพทย์จีนสามารถลดความเป็นพิษ และปรับสมดุลของตำรับได้ จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าตำรับยาเสือขาวค่อนข้างปลอดภัยต่อผู้บริโภคอย่างไรก็ตาม การบริโภคผลิตภัณฑ์นี้มีข้อควรระวังในเด็กสตรีมีครรภ์ ผู้มีโรคประจำตัว และผู้ที่มีประวัติแพ้ยาสมุนไพร ควรปรึกษาแพทย์ก่อนใช้

การตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แคปซูลเสือขาว

จากผลทดสอบหาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเสือขาวที่ตรวจพบแบคทีเรียบางชนิดที่เกินมาตรฐาน คือ *Clostridium* spp. อาจมีสาเหตุหลักมาจากการปนเปื้อนของวัตถุดิบ โดยเฉพาะสมุนไพรที่มาจากดิน หรือในกระบวนการอื่น ๆ ดังนั้น ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ผู้ผลิตต้องมีมาตรการลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว อย่างไรก็ดีตาม เมื่อนำผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลเสือขาวไปผ่านกระบวนการฉายรังสี และประเมินคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาอีกครั้ง พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด เนื่องจากรังสีแกมมาสามารถทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ของเซลล์แบคทีเรียและเอนโดสปอร์ได้ แต่อาจมีผลต่อสารสำคัญบางชนิดในสมุนไพรได้ ดังนั้น ในกระบวนการผลิตทุกขั้นตอนควรต้องมีมาตรฐานกำกับ

การวิเคราะห์หาโลหะหนักในสมุนไพรเสือขาว

เมื่อนำตำรับเสือขาวมาวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิด คือ สารหนู (Arsenic) แคดเมียม (Cadmium) และตะกั่ว (Lead) ด้วยเทคนิค inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) พบสารเหล่านี้ในปริมาณ 2.917, 0.234 และ 0.848 ppm ซึ่งไม่เกินข้อกำหนดมาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อย่างไรก็ดีตาม เพื่อให้ปริมาณโลหะหนักลดลง หรืออยู่ในเกณฑ์มาตรฐานด้านความปลอดภัย ผู้ผลิตต้องควบคุมการผลิตให้ดี ตั้งแต่การเลือกพื้นที่ปลูกที่ได้มาตรฐาน ตรวจสอบปริมาณโลหะหนักในดิน การเก็บเกี่ยวที่ถูกต้อง การล้างทำความสะอาดและภาชนะที่เก็บตามหลักวิธีที่ได้

มาตรฐาน เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนโลหะหนักโดยเฉพาะสมุนไพรที่อยู่ใต้ดิน อีกทั้งต้องมีการสุ่มตรวจก่อนนำไปใช้

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

สารสกัดสมุนไพรในตำรับเสือขาวแต่ละชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *C. albicans* มีเพียงสมุนไพร Lian Qiao, Tai Zi Shen, Gan Cao, Bai Zhu และ Jin Yin Hua ที่แสดงฤทธิ์ได้ และเมื่อเตรียมเป็นตำรับยาแคปซูลแล้ว สารสกัดตำรับยายังสามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ค่อนข้างดี และเบื้องต้นไม่พบความเป็นพิษที่รุนแรงต่อเซลล์เพาะเลี้ยง การปนเปื้อนโลหะหนักอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับสรรพคุณของตำรับยาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองและในคน เพื่อเตรียมข้อมูลประกอบการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาสมุนไพรประเภทยาแผนจีนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่มอบทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีการศึกษา 2564 เพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้

References

1. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. Commonly used Chinese prescription in Thailand complete edition. The Agricultural Co-operative Federation of Thailand Ltd. Bangkok. 2554 (in Thai)
2. Zhao L, Li W, Dai SJ, Liu RX, Xie ZP, Zhang SM, et al. Alkaloids bearing rare skeletons from *Forsythia suspensa*

- with anti-inflammatory and anti-viral activities *in vitro*. *Phytochemistry*. 2021;186:112739.
3. Yang M, Wang CC, Wang WL, Xu JP, Wang J, Zhang CH, Li MH. *Saposhnikovia divaricata*-An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *Chin J Integr Med*. 2020;26(11):873-80.
 4. Zhang JL, Li WX, Li Y, Wong MS, Wang YJ, Zhang Y. Therapeutic options of TCM for organ injuries associated with COVID-19 and the underlying mechanism. *Phytomedicine*. 2021;85: 153297.
 5. Chuanlong Z, Xiaoxia Z. Effects of polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* on exercise endurance capacity and oxidative stress in forced swimming rats. *Sci Res Eassays*. 2011;6(11):2360-65.
 6. Tang WF, Tsai HP, Chang YH, Chang TY, Hsieh CF, Lin CY, et al. Perilla (*Perilla frutescens*) leaf extract inhibits SARS-CoV-2 via direct virus inactivation. *Biomed J*. 2021; 44:293-303.
 7. Law S, Lo C, Han J, Leung AW, Xu C. Traditional Chinese herb, Astragalus: possible for treatment and prevention of COVID-19? *Herba Polonica*. 2020;66(4): 79-84.
 8. Indu P, Arunagirinathan N, Rameshkumar MR, Sangeetha K, Divyadarshini A, Rajarajan S. Antiviral activity of astragaloside II, astragaloside III and astragaloside IV compounds against dengue virus: Computational docking and in vitro studies. *Microb Pathog*. 2021;152.
 9. Fu X, Wang Q, Kuang H, Pinghui J. Mechanism of Chinese medicinal-Medicated leaven for preventing and treating gastrointestinal tract diseases. *Digestion*. 2020;101(6):659-66.
 10. Goswami S, Bhakuni RS, Chinniah A, Pal A, Kar SK, Das PK. Anti-Helicobacter pylori potential of artemisinin and its derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4594-60.
 11. Duffy CF, Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Int J Antimicrob Agent*. 2001;17:27-29.
 12. Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, Lee KT. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2008;584: 175-84.
 13. Thiagarajan P, Chandrasekaran CV, Deepak HB, Agarwal A. Modulation of lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators by an extract of *Glycyrrhiza glabra* and its phytoconstituents. *Inflammopharmacology*. 2011;19(4):235-41.
 14. Suwannakul S, Yuankyong S, Masi K, Nanbunta P, Burirak P. Antibacterial activities of licorice extract on biofilms and planktonic cells of *Staphylococcus aureus*. *Naresuan University Journal: Science and Technology*. 2014;22(1):80-90. (in Thai)
 15. Martins N, Ferreira ICFR, Henriques M, Silva S. *In vitro* anti-candida activity of *Glycyrrhiza glabra* L., *Ind Crop Prod*. 2016;83:81-85.
 16. Simayi Z, Rozi P, Yang X, Ababaikeri G, Maimaitituoheti W, Bao X, Ma S, Askar G, Yadikar N. Isolation, structural characterization, biological activity, and application of Glycyrrhiza polysaccharides: Systematic review. *Int J Bio Macromol*. 2021;183:387-98.
 17. Kuang HX, Shao CJ, Kasai R, Ohtani K, Tian ZK, XU JD, et al. Phenolic glycosides from roots of *Adenophora tetraphylla* collected in Heilongjiang, China. *Chem Pharm Bull*. 1991;39(9):2440-42.
 18. Donga H, Heb L, Huangc M, Dong Y. Anti-inflammatory components isolated from *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Natural Product*. 2008;22(16):1418-27.
 19. Galovičová L, Borotová P, Valková V, ťranová HD, Štefániková J, Vukovic NL, Vukic M, Kačániová M. Biological activity of *Pogostemon cablin* essential oil and its potential use for food preservation. *Agronomy*. 2022;12(387):1-20.
 20. Hsu HF, Hsiao PC, Kuo TC, Chiang ST, Chen SL, Chiou SJ, Ling XH, Liang MT, Cheng WY, Hounq JY. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* Thunb. var. *sempervillosa* Hayata flower bud extracts prepared by water, ethanol and supercritical fluid extraction techniques. *Ind Crop Prod*. 2016;89:543-49.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-twenty-fifth informational supplement. CLSI Document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015.
 22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline-Fourth edition. CLSI document M23-A4. Wayne, PA: CLSI; 2016.
 23. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2021. Vol. II. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2021.

24. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st Edition. AOAC, Washington, DC; 2019.
25. Ministry of Public Health. Notification of the Ministry of Public Health: Standards for purity, quality attributes, and other important quality characteristics of registered, notified, or listed herbal medicinal products B.E. 2564 (2021). Royal Thai Government Gazette. 2021 Dec 1;138(Special Section 294 Ng):6-11.
26. Rahman A, Kang SC. *In vitro* control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. Food Chem. 2009;116:670-75.
27. Lee YS, Lee YJ, Park SN. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* Extracts and Potential as a Plant-Derived Natural Preservative. J Microbiol Biotechnol. 2018;28(11):1814-22.
28. Yang SY, Choi YR, Lee MJ, Kang MK. Antimicrobial effects against oral pathogens and cytotoxicity of *Glycyrrhiza uralensis* extract. Plants. 2020;9:838.
29. Canga I, Vita P, Oliveira AI, Castro MÂ, Pinho C. *In vitro* cytotoxic activity of African plants: a review. Molecules. 2022;27(15):4989.