วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 26 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2560

Journal of Health Science
Vol. 26 No. 2, March - April 2017

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอล จากเหง้าขมิ้นขาวป่า

ปฐมาพร ปรึกษากร ภ.บ., ภ.ม., ปร.ด.*
นันทวรรณ เมฆา วท.บ., วท.ม.**
รินทร์ลภัส อรรถเธียรไชย วท.บ., วท.ม.**
ปนัดดา เทพอัคศร วท.บ., วท.ม., ปร.ด.*
** สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*
*** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

บทคัดย่อ การติดเชื้อราที่ผิวหนังเป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในประเทศแถบเขตร้อนชื้น และรักษาได้โดยการใช้ยาต้านเชื้อราที่มีอยู่ในปัจจุบัน แท้จริงแล้วโรคผิวหนังจากเชื้อราสามารถรักษาโดยการใช้สมุนไพรไทยมาทาบริเวณรอยโรคได้เช่นกัน จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าขมิ้นขาวป่ามีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อก่อโรคที่ผิวหนัง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารต้านเชื้อราจากเหง้าขมิ้นขาวป่า โดยการแยกสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราให้บริสุทธิ์ตามหลักการ bioassay-guided separation ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคที่ผิวหนังด้วยวิธี broth microdilution assay พบสารออกฤทธิ์หลักในเหง้าขมิ้นขาวป่าคือ labda-8(17),12-diene-15,16-dial โดยแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์เช่น *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, และ *Microsporum gypseum* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs) 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ที่ MIC 3.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาผลของ labda-8(17),12-diene-15,16-dial ต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ที่เวลาต่างๆ เทียบกับยามาตรฐานที่ MICs พบว่าสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา ในขณะที่ ketoconazole ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันแสดงเพียงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้น สารนี้จึงน่าสนใจสำหรับเป็นสารต้นแบบทางยาต้านเชื้อราหรือนำไปพัฒนาเป็นตำรับยาต้านเชื้อราในรูปแบบต่างๆ ต่อไป

คำสำคัญ: **ขมิ้นขาวป่า, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา, สาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial**

บทนำ

โรคผิวหนังจากเชื้อราเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบมากในประชากรของประเทศแถบเขตร้อนชื้น การติดเชื้อราที่ผิวหนัง ในบริเวณที่อับชื้น หนังศีรษะ เล็บ มือ เท้า และขาหนีบ โดยทั่วไปมีสาเหตุมาจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (dermatophytes) และอาจเกิดจากเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้[1-2] อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยพบว่าการติดเชื้อราที่เล็บและเท้ามีสาเหตุหลักมาจากเชื้อ *Scytalidium dimidiatum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่ใช่กลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (non-dermatophytes)[3] การรักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังโดยทั่วไปสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการใช้ยาต้านเชื้อราที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน แต่ต้องรักษาต่อเนื่องยาวนาน[3-5] การรักษาตามวิธีพื้นบ้านดั้งเดิมของไทยด้วยสมุนไพรเช่น ใบฝรั่ง ใบชุมเห็ดเทศ ขิง และข่า

ทาบริเวณรอยโรคก็สามารถรักษาได้[6] แม้ว่ายังคงมีข้อจำกัดด้านความสะดวกในการนำไปใช้ สมุนไพรเหล่านี้โดยเฉพาะพืชวงศ์ขิงหลายชนิดมีการอ้างถึงสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังและบางชนิดมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อจุลชีพและต้านการอักเสบด้วย[7-10] ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชวงศ์นี้และสรรพคุณในการรักษาโรคที่โดดเด่นทำให้เป็นแหล่งของสมุนไพรที่น่าสนใจสำหรับการวิจัยทางเภสัชพฤกษศาสตร์ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทยที่มีการใช้สำหรับรักษาโรคหรือใช้เป็นอาหารที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดเหง้าขมิ้น-ขาวป่าแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีต่อทั้งเชื้อ *C. albicans* และเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์[11]

ขมิ้นขาวป่า (*Curcuma amada* Roxb.) เป็นสมุนไพรสกุลขมิ้น มีชื่อสามัญคือ mango ginger และมีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่เช่น รางจืด (ราชบุรี) พืชนี้ขึ้นกระจายอยู่ในเขตร้อนชื้นของทวีปเอเชีย แอฟริกา และออสเตรเลีย โดยลำต้นมีความสูงประมาณ 60 - 120 เซนติเมตร ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวสีเขียวทั้งใบ รูปรี ขนาดของใบกว้างประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร ยาวประมาณ 40 - 60 เซนติเมตร ช่อดอกเกิดกลางกลุ่มใบ ใบประดับส่วนยอดสีขาวส่วนปลายมีแต้มสีชมพู ดอกมีกลีบสีขาวกลีบปากสีเหลือง เหง้ามีลักษณะเป็นแขนงสีน้ำตาลอมเหลือง เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 - 4 เซนติเมตร และมีเนื้อในเป็นสีขาวอมเหลือง (ภาพที่ 1) เหง้าของขมิ้นขาวป่าถูกใช้เป็นยาตามตำราอายุรเวชของอินเดียมาอย่างยาวนานเพื่อกระตุ้นความอยากอาหาร แก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ ช่วยระบาย แก้อาเจียน แก้คัน และรักษาโรคผิวหนัง[12] การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีสารประกอบรวมอยู่มากกว่า 130 ชนิด เช่น สารในกลุ่ม volatile oils, curcuminoids, phenolic acids และ terpenoids[13] นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย[12-13] แม้ว่าขมิ้นขาวป่าจะถูกใช้เป็นสมุนไพรสำหรับการรักษาโรคในประเทศอินเดียมาอย่างยาวนาน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีบันทึกที่ชัดเจนเกี่ยวกับการใช้ขมิ้น-ขาวป่าเพื่อการรักษาโรคในประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราในเหง้าขมิ้นขาว-ป่าและแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง

วิธีการศึกษา

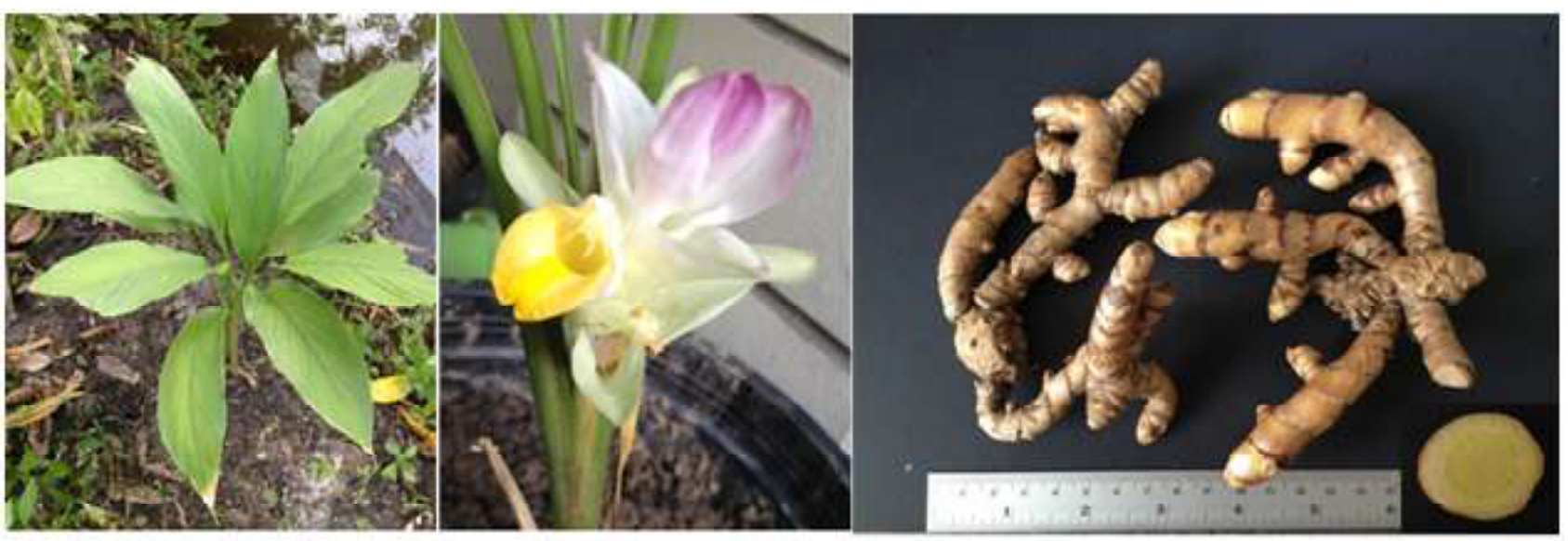
ตัวอย่างสมุนไพร

เหง้าของขมิ้นขาวป่าเก็บจากจังหวัดราชบุรีในเดือนมีนาคม ปี 2557 ตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืชและเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย (Herbarium no. BKF 191141) ที่สำนักงานหอพรรณไม้กรมอุทยาน-แห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช บางเขน กรุงเทพมหานคร

การแยกบริสุทธิ์สารต้านเชื้อรา

การแยกสารดำเนินการตามหลักการ bioassay-guided separation โดยนำเหง้าขมิ้นขาวป่าแห้ง (300

ภาพที่ 1 ต้น ดอก เหง้า และภาพตัดขวางของเหง้าขมิ้นขาวป่า



กรัม) มาสกัดโดยการหมักด้วยเอทานอล 6 ลิตรเป็นเวลา 1 วัน ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วระเหยสารสกัดเอทานอลที่ได้ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ 19.1 กรัม จากนั้นสกัดแยกด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ คือเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท ระเหยสารละลายในแต่ละชั้น ได้สารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และชั้นน้ำ น้ำหนัก 11.7, 1.0, 0.1, และ 3.1 กรัมตามลำดับ นำสารสกัดในชั้นเฮกเซน (11.7กรัม) มาแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้คอลัมน์ชนิดซิลิกาเจล (SiO_2 G60, 70 - 230 mesh) และใช้ตัวทำละลายชนิดผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท (100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1 และ 0:1) แยกสารผสมตามระดับความมีขั้วได้เป็น 12 ส่วน นำส่วนที่มีฤทธิ์ดีสุดคือส่วนที่ 6 (1.25 กรัม) มาแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้คอลัมน์ชนิด Sephadex LH20 และใช้ระบบตัวทำละลายเป็นเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท (1:1) ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ 3 ส่วน นำส่วนที่ 2 (690 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ในลำดับสุดท้ายด้วย preparative HPLC (GROM-SIL 100 Si NP-1, 20 mmi.d. x 250 mm, 10 μm particle size) และใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตทที่อัตราส่วน 9:1 อัตราเร็ว 5 mL/min จากส่วนที่ 2 น้ำหนัก 400 มิลลิกรัมได้สาร 1 ที่มีลักษณะเป็นสารกึ่งเหลวไม่มีสีน้ำหนัก 243 มิลลิกรัม (retention time 30 min)

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

การศึกษาโครงสร้างเคมีของสาร 1 ที่แยกบริสุทธิ์ได้ทำโดยการตรวจวิเคราะห์ MS, ^{1}H NMR, และ ^{13}C NMR spectroscopies แล้วนำข้อมูลของน้ำหนักโมเลกุลและ NMR สเปคตรัมจาก DEPT, HMQC, HMBC, และ COSY มาใช้เพื่อประกอบการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี labda-8(17),12-diene-15,16-dial (1) : สูตรโมเลกุล $C_{20}H_{30}O_2$ ESI-MS: m/z 303 $[M+H]^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 0.72 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.88 (3H, s), 1.10 (1H, m) 1.12 (1H, m), 1.13 (1H, m), 1.22 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.52 (2H, m), 1.70 (1H, m), 1.72 (1H, m), 1.90 (1H, m), 2.02 (2H, m), 2.40 (2H, m), 3.42 (2H, dd: 11.9, 16.9 Hz), 4.36 (1H, s), 4.86 (1H, s), 6.76 (1H, t: 6.6 Hz), 9.40 (1H, s), 9.63 (1H, s)

เชื้อจุลชีพ

เชื้อราที่ใช้ศึกษาได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วยเชื้อยีสต์ 1 ชนิด คือ *Candida albicans* DMST 5815 และเชื้อราแบบมีเส้นใย 4 ชนิด คือ *Trichophyton rubrum* DMST 30263, *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735, *Microsporum gypseum* DMST 21146, และ *Scytalidium dimidiatum* DMST 51665 โดยทำการเพาะเลี้ยงบน sabouraud dextrose agar slants และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยนอาหารใหม่อย่างน้อยทุก 2 สัปดาห์ การเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบทำโดยเจือจางเชื้อแต่ละชนิดใน 0.85% sodium chloride (NaCl) เพื่อให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 1 - 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 McFarland standard สำหรับ *C. albicans* และ 1 McFarland standard สำหรับเชื้อราแบบมีเส้นใย จากนั้นเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร RPMI-MOPS [RPMI 1640 medium, without sodium bicarbonate ที่มีส่วนประกอบของ 2 mM L-glutamine และ 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS)] ในอัตราส่วน 1:500 และ 1:50 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี Broth microdilution assay

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตาม National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guideline[14-15] โดยเตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในอาหาร RPMI-MOPS ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา เตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 96-well culture plate ชนิด flat bottom สำหรับการ

ทดสอบเชื้อยีสต์ และใช้ plate ชนิด U-shape wells สำหรับการทดสอบเชื้อราแบบมีเส้นใย ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิด 2 ซ้ำ ใช้ ketoconazole เป็น positive control และ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็น negative control จากนั้นใส่เชื้อที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มถาดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อยีสต์และ 48-120 ชั่วโมงสำหรับเชื้อราแบบมีเส้นใย หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยงอ่านผลการทดสอบโดยดูความขุ่นเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อรา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราในหลุม

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารต้านเชื้อราต่อหน่วยเวลา

การศึกษา time – kill curve ของสารต้านเชื้อราทำโดยเตรียมสารต้านเชื้อราใน อาหาร RPMI-MOPS ให้มีความเข้มข้นของสารต้านเชื้อราเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษาปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมเชื้อ *C. albicans* ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางเชื้อที่ได้ด้วย RPMI-MOPS ในอัตราส่วน 1 : 500 ผสมเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารต้านเชื้อราที่เตรียมไว้ ใช้ DMSO เป็น negative control แล้วบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 ,18, 21, และ 24 นำตัวอย่างเพาะเลี้ยงที่เก็บได้มาทำการเจือจางแล้ว spread ลงบนอาหาร sabouraud dextrose agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนของเชื้อที่เหลืออยู่

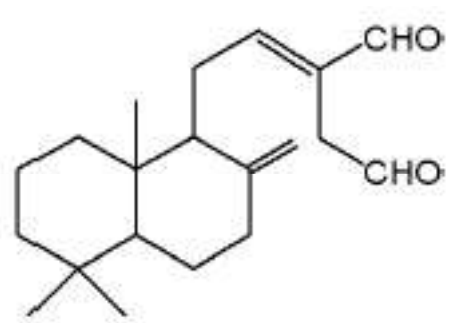
ผลการศึกษา

สารสกัดเอทานอลจากเหง้าขมิ้นขาวป่าถูกนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีใช้คอลัมน์ชนิดซิลิกาเจล ตามด้วยการแยกสารตามขนาดโมเลกุลโดยใช้คอลัมน์ชนิด Sephadex LH20 และแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายโดยใช้ preparative HPLC ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา 1 ชนิด มีลักษณะเป็นสารกึ่งเหลวไม่มีสี เป็นสารออกฤทธิ์หลักในเหง้าขมิ้นขาวป่า เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคทางสเปคโตรสโคปีพบว่าเป็นสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial (ภาพที่ 2)

สาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ *C. albicans* ที่ MIC 3.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต้านเชื้อราแบบมีเส้นใย *S. dimidiatum* ที่ MIC 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ที่ทดสอบคือ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *M. gypseum* ที่ MICs 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

การศึกษาผลของสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial ต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อหน่วยเวลาเพื่อแสดง time – kill curve ของสารเปรียบเทียบกับ ketoconazole พบว่าสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) คือ 3.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal activity) โดยสามารถฆ่าเชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดสอบ ในขณะที่ ketoconazole แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (fungistatic activity) เท่านั้น (ภาพที่ 3)

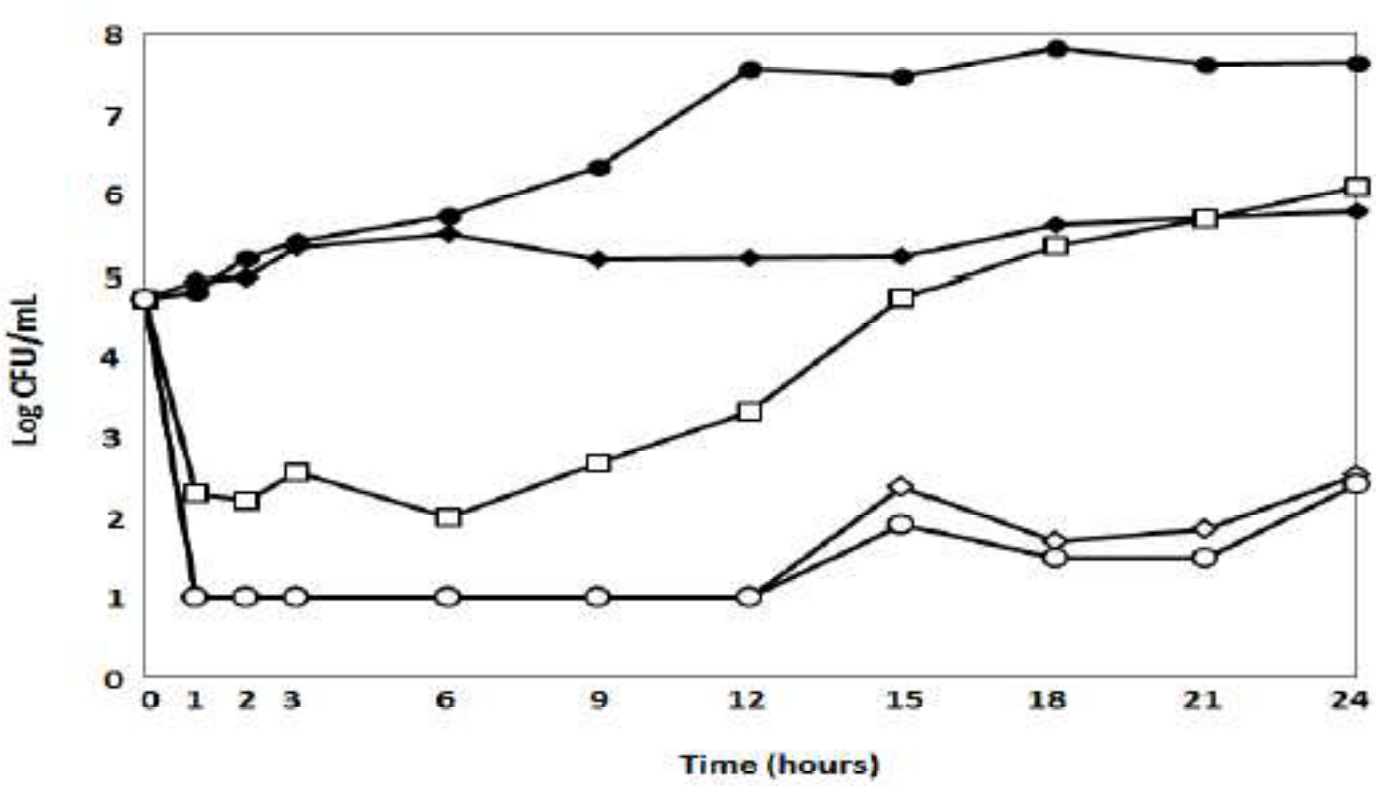
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ labda-8(17),12-diene-15,16-dial



ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราของ labda-8(17),12-diene-15,16-dial

ชนิดของเชื้อรา	ความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ (MICs, µg/mL)	
	labda-8(17),12-diene-15,16-dial	ketoconazole
Yeast :		
C. albicans	3.13	100.00
Dermatophytes:		
T. rubrum	0.39	0.31
T. mentagrophytes	0.39	1.56
M. gypseum	0.39	1.25
Non-dermatophyte :		
S. dimidiatum	50.00	100.00

ภาพที่ 3 time-kill curves ของ labda-8(17),12-diene-15,16-dial ต่อเชื้อ *C. albicans* เปรียบเทียบกับ ketoconazole



หมายเหตุ: ● แทน control
□ แทนความเข้มข้นของ labda-8(17),12-diene-15,16-dialที่ MIC (3.13 µg/mL)
◇ แทนความเข้มข้นของ labda-8(17),12-diene-15,16-dialที่ 2 เท่าของ MIC (6.25 µg/mL)
○ แทนความเข้มข้นของ labda-8(17),12-diene-15,16-dialที่ 4 เท่าของ MIC (12.50 µg/mL)
◆ แทนความเข้มข้นของ ketoconazole ที่ MIC (100 µg/mL)

วิจารณ์

ขมิ้นขาวป่าเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น เช่นเดียวกับพืชสกุลขมิ้นชนิดอื่น โดยพืชสกุลนี้พบการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์จากประเทศอินเดียถึงไทย อินโดจีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย และตอนเหนือของออสเตรเลีย เหง้าขมิ้นขาวป่าถูกใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านในกลุ่มชาติพันธุ์ต่าง ๆ ของประเทศอินเดียมาอย่างยาวนาน และมีการใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารของชาวอินเดียในหลายพื้นที่[13] ในประเทศไทย การใช้เหง้าของพืชนี้เป็นสมุนไพรยังคงมีอยู่จำกัด โดยพบการใช้สำหรับแก้พิษและล้างพิษต่างๆในเขตจังหวัดราชบุรีและกาญจน-

บุรี การศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของพืชนี้ ส่วนใหญ่จัดทำในประเทศอินเดีย ในขณะที่เอกสารข้อมูลและรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับพืชนี้ของหลายประเทศในกลุ่มอาเซียนและประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัด

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาสารสกัดเหง้าขมิ้น-ขาวป่าแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีทั้งต่อเชื้อ *C. albicans* และเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์[11] แต่สมุนไพรนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาด้านเภสัชเวทในประเทศไทย ด้วยเหตุนี้เหง้าขมิ้นขาวป่าจึงน่าสนใจสำหรับนำไปศึกษาทางเภสัชพฤกษศาสตร์เพิ่มเติม ในการศึกษานี้ได้นำเหง้า-ขมิ้นขาวป่ามาแยกบริสุทธิ์สารต้านเชื้อราโดยใช้ตัวทำ-ละลายอินทรีย์ในการสกัดแยกสาร และดำเนินการแยกบริสุทธิ์ลำดับถัดไปด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี การสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ตามความมีขั้วของสารและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่า สารออกฤทธิ์สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ในขณะที่สารสกัดที่ละลายในชั้นน้ำไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา และเมื่อนำส่วนที่แสดงฤทธิ์ไปแยกบริสุทธิ์ต่อพบว่า labda-8(17),12-diene-15,16-dial เป็นสารออกฤทธิ์หลักในเหง้าขมิ้นขาวป่า โดยมีปริมาณคิดเป็น 2.19% ของน้ำหนักสารสกัดเอทานอล

Labda-8(17),12-diene-15,16-dial เป็นสารในกลุ่ม labdane-type diterpene dialdehyde โดยมีโครงสร้างส่วน labdane skeleton และ dialdehyde อยู่ในโมเลกุล สารกลุ่มนี้สามารถพบได้ในพืชวงศ์ขิงหลายชนิด เช่น เหง้าข่าคน (*Alpenia speciosa* K. Schum)[16] เมล็ดข่า (*Alpenia galanga* (L.) Willd.)[17] เหง้ามหาหงส์ (*Hedychium coronarium* Koeng)[18] และดอกขิงญี่ปุ่น (Zingiber mioga Roscoe)[19-21] มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายเช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ และต้านเชื้อจุลชีพโดยแสดงฤทธิ์ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์[17, 20] ซึ่งสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ต่อเชื้อยีสต์ *Candida* sp. ที่ MIC 6.25 – 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[17] และพบว่าสารบางชนิดในกลุ่ม labdane-type diterpene dialdehyde เป็นสารหลักที่ให้รสเผ็ดร้อน (pungent) ในดอกขิงญี่ปุ่น[19,21] นอกจากนี้พบว่าสาร labda-8(17),12-diene-15,16-dial มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ด้วยเช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค[22] ปรับระบบภูมิคุ้มกันและบรรเทาปวดสำหรับป้องกันหรือรักษาภาวะภูมิแพ้ต่อตัวเอง[23]

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของ labda-8(17),12-di-ene-15,16-dial ต่อเชื้อกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ 3 ชนิด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคผิวหนังจากเชื้อราคือ *T. rubrum* (เชื้อรากลุ่มที่มักก่อโรคในคน, Anthropophilic species), *T. mentagrophytes* (เชื้อรากลุ่มที่มักก่อโรคในสัตว์, Zoophilic species), และ *M. gypseum* (เชื้อราที่เจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมก่อโรคโดยการติดเชื้อที่รอยถลอกหรือบาดแผลบนผิวหนัง Geophilic species) [1] จากผลการทดสอบพบว่า labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อเดอร์มาโตไฟต์ที่ทำการศึกษาได้ดีใกล้เคียงกับ ketoconazole นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ *C. albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังและเยื่อบุในเด็กเล็กและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง[24] และเชื้อ *S. dimidiatum* เชื้อราในกลุ่มที่ไม่ใช่เดอร์มาโตไฟต์ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อราที่เล็บและเท้าในประเทศไทย[3] ผลการทดสอบพบว่า labda-8(17),12-diene-15,16-dial มีฤทธิ์ต่อเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิดเช่นกัน เมื่อนำ labda-8(17),12-diene-15,16-dial มาศึกษาผลของสารต้านเชื้อราต่อการเจริญของ *C. albicans* พบว่า labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ในขณะที่ keto-conazole ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน แสดงเพียงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อราได้

ในการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า labda-8(17),12-diene-15,16-dial แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคที่ผิวหนังได้ดี นอกจากนี้ ในสารสกัดเหง้าขมิ้นขาวป่ามีรายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ[25-26] ต้านเชื้อแบคทีเรีย[26] ต้านการอักเสบ[27] สมานแผล[28] และบรรเทาปวดได้[29] ด้วยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวทำให้ labda-8(17),12-

diene-15,16-dial และเหง้าขมิ้นขาวป่าน่าสนใจสำหรับเป็นสมุนไพรทางเลือกเพื่อใช้รักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา เนื่องจากในการติดเชื้อราที่ผิวหนังมักพบการอักเสบบริเวณรอยโรคร่วมด้วย ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและบรรเทาปวดนี้อาจทำให้ผลการรักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังของผู้ป่วยดีขึ้น นอกจากนี้ ฤทธิ์ในการสมานแผลและต้านอนุมูลอิสระอาจช่วยในการบำรุงและฟื้นฟูผิวหนังบริเวณรอยโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืชและเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย และขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Luplertlop N, Suwanmanee S. Dertmatophytosis: from bench to bedside. J Trop Med Parasitol 2003;36:75-87.
2. Nenoff P, Kruger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbunl R, Tietz HJ. Mycology- an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. J Dtsch Dermatol Ges 2014;12:749-77.
3. Ungpakorn P. Mycoses in Thailand: current concerns. Jpn J Med Mycol 2005;46:81-6.
4. Gupta AK, Ryder JE, Chow M, Cooper EA. Dermatophytosis; the management of fungal infections. Skinmed 2005;4:305-10.
5. Degreef HJ, DeDoncker PR. Current therapy of dermatophytosis. J Am Acad Dermatol 1994;31:S25-30.
6. สมุนไพรอภัยภูเบศร. สมุนไพรต้านเชื้อรา ปัญหากวนใจยามฝนพรำ [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 12 ส.ค. 2558]. แหล่งข้อมูล: http://www.abhaiherb.com/knowledge/thaiherb/1366
7. Sirirugsa P. Thai Zingiberaceae: species diversity and their uses. Pure Appl Chem 1998;70:1-8.
8. Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigation on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food Chem Toxicol 2008;46:3295-302.
9. Singh R, Chandra R, Bose M, Luthra PM. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. CurrSci 2002;83:737-40.
10. Raji Y, Udoh US, Oluwadara OO, Akinsomisoye OS, Awobajo O, Adeshoga K. Anti-inflammatory and analgesic properties of the rhizome extract of *Zingiber officinale*. Afr J Biomed Res 2002;5:121-4.
11. ปฐมาพร ปรึกษากร, กัญจน์รัชต์ เศรษฐศุภพนา, นันทวรรณ เมฆา, รินทร์ลภัส อรรถเธียรไชย, ปนัดดา เทพอัคศร, อังคณา หิรัญสาลี. ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2559;14:286-95.
12. Policegoudra RS, Aradhya SM, Singh L. Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)- a promising spice for phytochemicals and biological activities. J Biosci 2011;36:739-48.
13. Jatoi SA, Kikuchi A, Gilani SA, Watanabe KN. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb: Zingiberceae). Phytother Res 2007;21:507-16.
14. Polgar PE. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2nd ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
15. The Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.
16. Itokawa H, Morita M, Mihashi S. Labdane and bisnorlabdane type diterpenes from *Alpinia speciosa* K. Schum. Chem Pharm Bull 1980;28:3452-4.
17. Morita M, Itokawa H. Cytotoxic and antifungal diterpenes from the seeds of *Alpinia galangal*. Planta Med 1988;54:117-20.

18. Itokawa H, Morita H, Katou I, Takeya K, Cavalheiro AJ, De oliveira RCB, et al. Cytotoxic diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. Planta Med 1988;54:311-5.
19. Abe M, Ozawa Y, Uda Y, Yamada Y, Morimitsu Y, Nakamura Y, et al. Labdane-type diterpene dialdehyde, pungent principle of myoga, *Zingiber mioga* Roscoe. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66:2698-700.
20. Abe M, Ozawa Y, Uda Y, Yamada Y, Morimitsu Y, Nakamura Y, et al. Antimicrobial activities of diterpene dialdehydes, constituents from myoga (*Zingiber mioga* Roscoe), and their quantitative analysis. Biosci Biotechnol Biochem 2004;68:1601-4.
21. Abe M, Ozawa Y, Morimitsu Y, Kubota K. Mioganal, a novel pungent principle in Myoga (*Zingiber mioga* Roscoe) and a quantitative evaluation of its pungency. Biosci Biotechnol Biochem 2008;72;2681-6.
22. Singh S, Kumar JK, Saikai D, Shanker K, Thakur JP, Negi AS, et al. A bioactive labdane diterpenoid from *Curcuma amada* and its semisynthetic analogues as anti-tubercular agents. Eur J Med Chem 2010;45:4379-82.
23. Weidner MS, Peterson MJ, Jacobsen N, inventor; IDA Development A/S, assignee. Certain diterpenes and extracts of concentrates of *Curcuma amada* containing them for use as medicaments. United States Patent US6235287 B1. n.p. 2001.
24. Wanna MR, Dyer JA. Skin infection in pediatric patients. In: Hall JC, Hall BJ, editors. Skin infection: diagnosis and treatment. 1st ed. New York. Cambridge University; 2009. p. 211-32.
25. Jain S, Barik R, Jain A. *In vitro* antioxidant activity of *Curcuma amada* Roxb. Int J Pharm Sci Res 2013;4:717-20.
26. Policegoudra RS, Abiraj K, Gowda DC, Aradhya SM. Isolation and characterization of antioxidant and antibacterial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. J Chromatogr B 2007;852:40-8.
27. Mujumdar AM, Naik DG, Dandge CN, Puntambekar HM. Antiinflammatory activity of *Curcuma amada* Roxb. in albino rats. Indian J Pharmacol 2002;32:375-7.
28. Jaiswal S, Singh SV, Singh B, Sing HN. Plants used for tissue healing of animals. Nat Prod Rad 2004;3:284-92.
29. Hossain CF, Al-amin M, Rahman KMM, Sarker A, Alam MM, Chowdhury H, et al. Analgesic principle from *Curcuma amada*. J Ethnopharmacol 2015;163:273-7.

Abstract: Antifungal Activities of Ethanolic Extract from the Rhizomes of Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.)

Patamaporn Pruksakorn, B.Pharm., M.Pharm., Ph.D. *; Nanthawan Mekha, B.Sc., M.Sc. **; Rinrapas Autthateinchai, B.Sc., M.Sc.; Panadda Dhepakson, B.Sc., M. Sc., Ph.D.***

** Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi; ** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi*

Journal of Health Science 2017;26:438-46.

Fungal skin infections are common disorders in tropical countries, and can be cured with presently available antifungal drugs. Indeed, dermatophytosis can be treated with various Thai medicinal plants containing antifungal substances by topical applying on the lesions. The objective of this study was to investigate antifungal substance from mango ginger rhizome. The extract was isolated by bioassay-guided separation using chromatographic techniques and tested antifungal activity using broth microdilution assay. Labda-8(17),12-diene-15,16-dial was isolated as a main active substance which exhibited anti-dermatophytic activities against *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* , and *Microsporum gypseum* at minimum inhibitory concentration (MIC) values 0.39 µg/mL and exhibited anti-yeast activity against *Candida albicans* with MIC 3.13 µg/mL. The effect of labda-8(17),12-diene-15,16-dialat MIC against *C. albicans* in time-kill curve study revealed that labda-8(17),12-diene-15,16-dial showed fungicidal activity. On the other hand, ketoconazole showed fungistatic activity. Therefore, this antifungal substance would be a promising agent to develop as an antifungal drug in various dosage forms.

Key words: **mango ginger, *Curcuma amada* Roxb., antifungal, fungicidal, labda-8(17),12-diene-15,16-dial**