Published Online: 26 JUL 2023

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Cutibacterium acnes* และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรจีนซานหวง

Comparative Efficiency on Anti-*Cutibacterium acnes* and Anti-Inflammation of Sanhuang Chinese Herbs

คณิฏฐ์ษา จิรัฐิติกาล

อีเมล: 6251701255@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.มยุรมาศ วิไล

อีเมล: mayuramas@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การศึกษาโดยอิสระนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น องค์ประกอบเคมีที่สำคัญ การทดสอบและเปรียบเทียบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* คุณสมบัติการต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรจีน *Scutellariae baicalensis* Georgi (SBG) ส่วนราก, *Coptis chinensis* Franch. (CCF) ส่วนราก และ *Phellodendri chinensis* Schneid. (PCS) ส่วนเปลือกไม้ สกัดสารโดยวิธีการต้มในน้ำด้วยเครื่องต้มยาแรงดัน มี %yield เท่ากับ 27.22, 12.23 และ 7.27 ตามลำดับ จากการตรวจพฤกษเคมีเบื้องต้นและวิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF พบว่าสารพฤกษเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบ SBG คือฟลาโวนอยด์และแอนทราควิโนน ส่วน CCF และ PCS เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์และเทอร์พีนอยด์ ผลการวิจัยและเปรียบเทียบเชิงสถิติ การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบ CCF และ PCS มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 122.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบ SBG มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.0039 และ 0.0078 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัดทั้ง 3 ชนิดยับยั้ง Nitric oxide ได้ โดยสารสกัดหยาบ SBG ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการยับยั้งการอักเสบเนื่องจากเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์โดยวิธี MTT assay แล้วไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

คำสำคัญ: คิวติแบคทีเรียม แอคเน่, หวงฉิน, หวงเหลียน, หวงป้อ, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเชื้อสิว

Abstract

The objective of this independent study was to identify basic phytochemical groups, secondary metabolites, and comparison anti-*C. acnes*, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of Sanhuang Chinese herbal extracts: *Scutellariae baicalensis* Georgi (SBG) root, *Coptis chinensis* Franch. (CCF) root and *Phellodendri chinensis* Schneid. (PCS) bark. The decoction under pressure was used for the extraction process in this study. The % yield of SBG, CCF, and PCS crude extracts were 27.22, 12.23, and 7.27, respectively. The preliminary phytochemical determination and LC-MS/MS-QTOF analysis indicated that the major compounds found in SBG crude extract were flavonoids and anthraquinones, while CCF and PCS crude extracts were alkaloids and terpenoids. The statistical comparisons on *C. acnes* Inhibitory activity by using broth microdilution showed that the MIC and MBC values of CCF and PCS crude extracts were 122.07 µg/mL, while SBG crude extract showed 0.0039 and 0.0078 µg/mL, respectively. All 3 extracts exhibited anti-inflammatory activity by reduction of inflammatory mediator, nitric oxide. SBG crude extract at a concentration of 200 µg/mL is most suitable for inflammatory inhibition because it did not induce cytotoxicity in MTT assay.

Keywords: *Cutibacterium acnes*, *Scutellariae baicalensis* Georgi. (Huang Qin), *Coptis chinensis* Franch. (Huang Lian), *Phellodendri chinensis* Schneid. (Huang Bo), Anti-inflammation, Anti-*C. acnes*

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

สิว เป็นโรคที่พบได้บ่อย โดย 80-90% ในช่วงของวัยรุ่นทั่วโลกเป็นสิว (Goldberg, 2011) สำหรับประเทศไทยจากสถิติผู้ป่วยของสถาบันโรคผิวหนัง ปีพ.ศ. 2561 มีผู้ป่วยมารักษาเรื่องสิวมากเป็นอับดับ 1 (สถาบันโรคผิวหนัง, 2562) สิวมักเกิดที่บริเวณใบหน้า อก และหลัง โดยมีลักษณะเป็นผด (Comedone) ตุ่มนูนแดง (Papule) ตุ่มหนอง (Pustule) หรือเป็นก้อนอักเสบใต้ผิวหนัง (Cyst) และมักทิ้งรอยคล้ำ (เพ็ญพรรณ วัฒนไกร, 2559) ปัจจุบันนี้ผู้บริโภคมีความสนใจในผลิตภัณฑ์สุขภาพและเครื่องสำอางที่มีสารสกัดจากธรรมชาติมากขึ้น (โพสต์ทูเดย์, 2561) ผู้วิจัยในฐานะเป็นแพทย์แผนจีน เฉพาะทางด้านโรคผิวหนัง จึงสนใจนำสมุนไพรจีนที่ใช้บ่อยในการรักษาสิวทางคลินิก 3 ชนิด ได้แก่ *Scutellariae baicalensis* Georgi. (SBG) ส่วนราก, *Coptis chinensis* Franch. (CCF) ส่วนราก และ *Phellodendri chinensis* Schneid. (PCS) ส่วนเปลือกไม้ ซึ่งมีชื่อเรียกรวมว่า “ซานหวง”

(สีเหลือง 3 ชนิด) เนื่องจากยานี้มีสรรพคุณคล้ายกันในทางคลินิก คือ ขับร้อน กำจัดชื้น ระบายไฟ แก้พิษ (Teng, 2014) ซึ่งเป็นปัจจัยของการเกิดสิวตามทฤษฎีแพทย์แผนจีน โดยปัจจุบันสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้มีการวิจัยว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว (Lee et al., 2014) แต่เนื่องจากมีสรรพคุณที่ออกฤทธิ์คนละอวัยวะ และมีราคาที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก รวมถึงในการวิจัยอื่นๆไม่ได้ต้มแบบใช้หม้อแรงดัน ซึ่งเป็นวิธีการต้มที่ในปัจจุบันคลินิกหรือโรงพยาบาลแพทย์แผนจีนในไทยและทั่วโลกใช้อย่างแพร่หลาย เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเมื่อวัดด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สามารถสกัดสารได้มีประสิทธิภาพกว่าการต้มแบบดั้งเดิม (Zhang, L., & Gao, Y.,2019) จึงสนใจนำวิธีการสกัดโดยวิธีต้มแบบใช้หม้อแรงดัน มาศึกษาสารสกัดและเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา รวมถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ฤทธิ์ต้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์แผนจีนได้ในวงกว้าง รวมถึงประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. นำสมุนไพรจีนแบบแห้ง SBG, CCF และ PCS ชนิดละ 1 กิโลกรัม มาสกัดตามวิธีอ้างอิงจากการต้มยาใช้ภายนอกในคลินิกการประกอบโรคศิลปะ สาขาการแพทย์แผนจีนหัวเฉียว โดยใช้หม้อต้มแรงดัน 2 รอบ ต้มระเหยและนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)

2. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น คือ อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, แอนทราควิโนน, คูมาริน, ซาโปนิน, แทนนิน, เทอร์พีนอยด์, สเตียรอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Shaikh et al., 2020)

3. หาชนิดของสารสำคัญที่มีในสารสกัด ด้วย Liquid Chromatography และ Mass Spectrometer ชนิด Triple Quadrupole (LC-MS/MS-QTOF) ด้วยเครื่อง Agilent Technologies 6200 series TOF/6500 series Q-TOF B.08.00

4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการต้านเชื้อ *C. acnes* ทั้ง MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth microdilution test ทำการทดสอบตามวิธีมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 29th ed.

5. ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Nitric Oxide (NO) และทดสอบความเป็นพิษ โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) และใช้สถิติ ANOVA ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลวิจัย (Results)

การเตรียมสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 1 % yield และลักษณะของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด

สารสกัด	น้ำหนักสารก่อนทำแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารหลังทำ Freeze drying (กรัม)	%yield	ลักษณะภายนอกหลังทำ Freeze drying	รูป
SBG ส่วนราก	1,000	272.18	27.22	ของแข็งเกล็ดสีน้ำตาล	
CCF ส่วนราก	1,000	122.32	12.23	ของแข็งเกล็ดสีดำเงา	
PCS ส่วนเปลือกไม้	1,000	72.68	7.27	ของแข็งก้อนสีน้ำตาล	

ตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

กลุ่มพฤกษเคมี	วิธีการทดสอบ	การเปลี่ยนแปลง	SBG	CCF	PCS
อัลคาลอยด์	Dragendorff	เกิดตะกอนสีส้มแดง	+	+	+
ฟลาโวนอยด์	Shinod's	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม	+	+	+
แอนทราควิโนน	Borntrager's	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู	+	+	+
คูมาริน	NaOH	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม	-	+	-
ซาโปนิน	Foam	เกิดฟองถาวร	+	-	-
แทนนิน	$FeCl_3$	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ	+	+	-
เทอร์พีนอยด์	Salkowski	ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น	+	+	+
สเตียรอยด์	Liebermann-Burchardt	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว	-	-	-
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	Kellar-Kiliani	ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้น	+	-	+

หมายเหตุ + : เกิดการเปลี่ยนแปลงตามวิธีทดสอบ

- : ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตามวิธีทดสอบ

จากตารางแสดงให้เห็นว่าพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 8 กลุ่มคือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสารในกลุ่มสเตียรอยด์ โดยพบอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน และ เทอร์พีนอยด์ ในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด

Published Online: 26 JUL 2023

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย LC-MS/MS-QTOF

ตารางที่ 3 สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากส่วนรากของ SBG และ CCF, และส่วนเปลือกไม้ของ PCS วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF

No	Proposed Compounds	Molecular Formula	RT (min)	Ionization ESI (+/-)	Molecular Weight	Theoretical (m/z)	Observed (m/z)	Mass Error (ppm)	MS/MS Product Ions	Herbs
1	Centaurein	$C_{24}H_{26}O_{13}$	16.286	$(M+H)^+$	522.1370	523.1446	523.1445	0.31	361, 301, 127	SBG
2	Chrysin-7-O-β-Dglucuronide	$C_{21}H_{20}O_{11}$	17.057	$(M+H)^+$	430.0905	431.0973	431.0978	-1.18	255	SBG
3	Genistein	$C_{15}H_{12}O_6$	16.907	$(M+H)^+$	270.0531	271.0601	271.0604	-0.95	169, 68	SBG
4	Genkwanin	$C_{16}H_{12}O_5$	18.826	$(M-H)^-$	284.0684	283.0612	283.0612	0.11	268, 110	SBG
5	Scutellarein 4'-methyl ether	$C_{16}H_{14}O_7$	18.135	$(M+H)^+$	300.0635	301.0707	301.0708	-0.42	286, 183	SBG
6	Lutiolin	$C_{17}H_{14}O_8$	16.799	$(M+H)^+$	346.0691	347.0761	347.0764	-0.71	142	SBG
7	Baicalein	$C_{15}H_{12}O_6$	18.188	$(M+H)^+$	270.0531	271.0601	271.0604	-1.08	123	SBG
8	Oroxindin	$C_{22}H_{22}O_{12}$	17.090	$(M+H)^+$	460.1031	461.1078	461.1104	-5.48	285	SBG
9	Oroxylin A	$C_{16}H_{14}O_6$	18.963	$(M+H)^+$	284.0687	285.0757	285.076	-0.74	270, 168	SBG
10	Tricin 5-glucoside	$C_{23}H_{24}O_{12}$	16.062	$(M+H)^+$	492.1270	493.1341	493.1343	-0.44	331, 71	SBG
11	Biochanin A	$C_{18}H_{18}O_6$	18.420	$(M+H)^+$	312.1000	313.1071	313.1073	-0.82	153	SBG
12	Genistin	$C_{21}H_{22}O_{11}$	16.653	$(M+H)^+$	432.1062	433.1129	433.1135	-1.29	271	SBG
13	Glycitein	$C_{16}H_{14}O_6$	16.816	$(M+H)^+$	284.0687	285.0757	285.076	-0.90	241	SBG
14	Diosmetin	$C_{16}H_{14}O_7$	17.879	$(M+H)^+$	300.0638	301.0707	301.0711	-1.38	286, 184	SBG
15	Baicalin	$C_{21}H_{20}O_{12}$	17.541	$(M+H)^+$	446.0853	447.0922	447.0925	-0.78	271	SBG

Published Online: 26 JUL 2023

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No	Proposed Compounds	Molecular Formula	RT (min)	Ionization ESI (+/-)	Molecular Weight	Theoretical (m/z)	Observed (m/z)	Mass Error (ppm)	MS/MS Product Ions	Herbs
16	Hyperoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	9.076	$(M+H)^+$	464.0955	465.1028	465.1024	0.82	303, 145, 85	SBG
17	Kaempferol 3- glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{12}$	15.147	$(M+H)^+$	462.0799	463.0903	463.0871	6.78	287, 169, 85	SBG
18	Emodin	$C_{14}H_{10}O_4$	17.938	$(M+HCOO)^-$	270.0528	269.0455	269.0456	-0.04	269, 197	SBG
19	Chelidonine (+)	$C_{20}H_{19}NO_5$	11.388	$(M+H)^+$	353.1264	354.1336	354.1336	0.00	269	CCF
20	Trigonelline	$C_7H_8NO_2$	1.318	M^+	138.0559	138.0550	138.0552	-1.69	81	CCF
21	(DL)-Tetrahydropalmatine	$C_{21}H_{25}NO_4$	15.793	$(M+H)^+$	355.1791	356.1856	356.1863	-1.96	311, 206, 58	CCF, PCS
22	(S)-Tetrahydropalmatine	$C_{21}H_{25}NO_4$	16.350	$(M+H)^+$	355.1787	356.1856	356.1859	-0.85	192	PCS
23	Embelin	C17 H26 O4	19.082	(M-H)-	294.1831	293.1758	293.1758	0.18	193	CCF, PCS
24	Triptophenolide	C20 H24 O3	19.542	(M-H)-	312.1756	311.1686	311.1683	1.01	183	CCF
25	Alantolactone	C15 H22 O3	19.912	(M-H)-	232.1458	231.1391	231.1386	2.09	117	PCS

หมายเหตุ compound was identified in positive and negative mode [M + H]+/[M − H]− modes. * = proposed compound was identified in more than one sample. RT = retention time.

พบว่าสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่พบในสารสกัดส่วนรากของ SBG นั้นเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (สารลำดับที่ 1-17) แอนทราควิโนน (สารลำดับที่ 18) ส่วนสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่พบในสารสกัดส่วนรากของ CCF และส่วนเปลือกไม้ของ PCS เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (สารลำดับที่ 19-23) และเทอร์พีนอยด์ (สารลำดับที่ 24-25)

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการต้านเชื้อ *C. acnes*

ตารางที่ 4 ผลทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อ *C. acnes*

สารสกัด	MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	MBC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
SBG (ส่วนราก)	3,910.00	7,810.00
CCF (ส่วนราก)	122.07	122.07
PCS (ส่วนเปลือกไม้)	122.07	122.07
Vancomycin	0.06	0.06

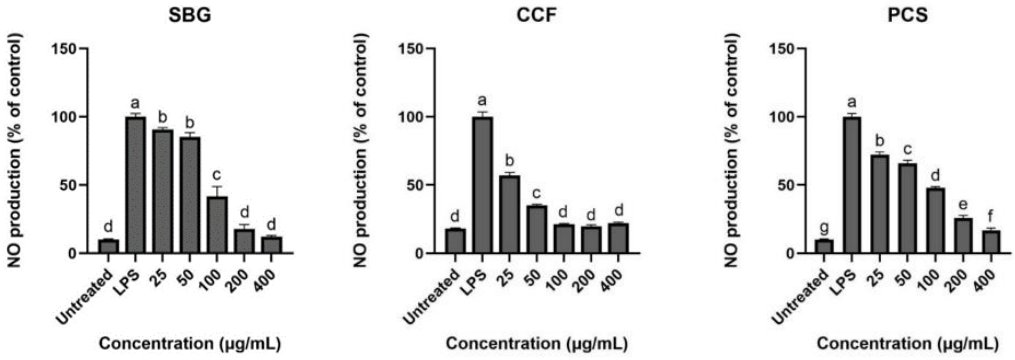
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและความเป็นพิษของเซลล์

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและความเป็นพิษของเซลล์

ความเข้มข้น (μg/mL)	SBG		CCF		PCS	
	NO production	% cell viability	NO production	% cell viability	NO production	% cell viability
25	90.84 ± 1.17^{b}	111.51 ± 15.94^{c,d}	57.24 ± 2.06^{b}	32.45 ± 1.92^{c}	72.17 ± 2.17^{b}	97.07 ± 5.50^{a}
50	85.34 ± 3.08^{b}	192.07 ± 7.05^{a}	35.16 ± 0.82^{c}	28.71 ± 1.81^{c}	66.03 ± 2.15^{c}	67.04 ± 6.06^{b}
100	41.71 ± 7.22^{c}	204.92 ± 17.39^{a}	21.37 ± 0.45^{d}	26.02 ± 2.15^{c}	47.88 ± 1.01^{d}	42.64 ± 3.03^{c}
200	17.92 ± 3.10^{d}	165.49 ± 27.35^{a,b}	19.75 ± 1.21^{d}	24.00 ± 2.30^{c}	25.97 ± 1.86^{e}	38.91 ± 2.98^{c}
400	12.17 ± 0.83^{d}	145.42 ± 10.92 ^{b,c}	22.04 ± 0.82^{d}	42.26 ± 5.49^{b}	16.89 ± 1.58^{f}	39.19 ± 1.99^{c}
LPS	100.00 ± 2.43^{a}	100.00 ± 4.21^{d}	100 ± 3.70^{a}	100.00 ± 11.35^{a}	100.00 ± 2.43^{a}	100.00 ± 4.21^{a}
Untreated	10.13 ± 0.49^{d}		18.13 ± 0.48^{d}		10.13 ± 0.49^{g}	

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษมุมขวาบน: ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ความไม่แตกต่างกันทางสถิติ , ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ จากการใช้ ANOVA test

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ โดยศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้าง NO



ก **ข** **ค**

ภาพที่ 1 ค่าผลผลิต Nitric Oxide (NO production) เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัด (ก) SBG (ข) CCF (ค) PCS (การทดสอบที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 – 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)ข้อมูลแสดงในรูป mean ± S.D., n = 4 (ตัวอักษรบนแท่งกราฟ : ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ความไม่แตกต่างกันทางสถิติ , ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$)

สารสกัด PCS (ภาพที่ 1ค) ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้ง NO ดีที่สุด คือ 83.11% ต่างกับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ

ความเข้มข้นทั้ง 3 สารสกัดที่มีค่าการยับยั้ง NO ได้ดีที่สุดและเทียบเท่ากับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Untreated) คือ สารสกัด SBG (ภาพที่ 1ก) ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารสกัด CCF (ภาพที่ 1ข) ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay

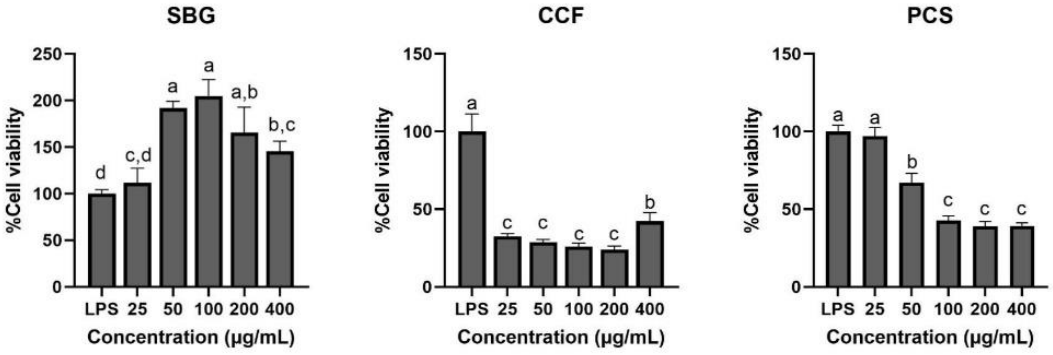
จากการอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 10993-5 เรื่องข้อกำหนดและวิธีการทดสอบสำหรับประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองของอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Iso, I., 2009) ได้แบ่งระดับความเป็นพิษของเซลล์ไว้ดังนี้

% viability ที่สูงกว่า 80% ถือว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์

80%–60% มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับเล็กน้อย

60%–40% มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง

ต่ำกว่า 40% มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับรุนแรง



ก ข ค

ภาพที่ 2 ค่า % cell viability เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัด (ก) SBG (ข) CCF (ค) PCS (25 – 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± S.D., n = 4 (ตัวอักษรบนแท่งกราฟ : ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ความไม่แตกต่างกันทางสถิติ , ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

พบว่าสารสกัด SBG (ภาพที่ 2ก) ทุกความเข้มข้นมี % cell viability สูงกว่า LPS และมีค่ามากกว่า 80% แสดงว่าไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี % cell viability สูงสุด

สารสกัด CCF (ภาพที่ 2ข) ทุกความเข้มข้นมี % cell viability ต่ำกว่า LPS โดยที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี % cell viability สูงสุดอยู่ที่ 42.26 $\pm$ 5.49 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง ความเข้มข้นที่ 25, 50, 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับรุนแรง

สารสกัด PCS (ภาพที่ 2ค) ทุกความเข้มข้นมี % cell viability ต่ำกว่า LPS ซึ่งที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับเล็กน้อย ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง ความเข้มข้นที่ 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับรุนแรง

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

การอภิปรายผล

1. สกัดสารสมุนไพรจีน SBG ส่วนราก, CCF ส่วนราก และ PCS ส่วนเปลือกไม้ โดยวิธีนำมาต้มในเครื่องต้มยาแรงดัน 2 รอบ ระเหย และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มี %yield ดังนี้ SBG เท่ากับ 27.22, CCF เท่ากับ 12.23 และ PCS เท่ากับ 7.27 โดย PCS มี %yield น้อยที่สุดสันนิษฐานว่าเป็นเพราะใช้ส่วนเปลือกไม้ ต่างกับสารสกัดอีกสองชนิดที่ใช้ส่วนราก

2. จากการตรวจพฤกษเคมีเบื้องต้นประกอบกับการวิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF พบว่าสารพฤกษเคมีที่สำคัญของ SBG คือ ฟลาโวนอยด์และแอนทราควิโนน พบสารไบคาเลนและไบคาลิน สอดคล้องกับการวิจัยของ Song et al. (2020) และ Zhou et al. (2016) ที่ใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำและความร้อน ส่วน CCF และ PCS เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์และเทอร์พีนอยด์ โดยข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการวิจัยของ Sun et al. (2019) แต่ในการวิจัยในครั้งนี้ไม่พบเบอร์เบอร์รีน ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่พบมากในสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ผู้วิจัยจึงตั้งข้อสมมติฐานว่าอาจเป็นเพราะในการวิจัยครั้งนี้ใช้เวลาการต้มในอุณหภูมิ 120°C เวลา 60 นาที 2 รอบ ซึ่งใช้เวลาต้มต่อเนื่องในความร้อนสูง ทำให้สารเบอร์เบอร์ลีนที่ไม่ทนความร้อนและแสงสลายไป (Babu et al., 2012)

3. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ด้วยวิธี Broth microdilution พบว่า CCF และ PCS มีค่า MIC และ MBC ดีกว่า SBG ที่มีค่า MIC, MBC เท่ากับ 3,910 และ 7,810 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีค่า เท่ากับ MIC และ MBC เท่ากับ 122.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับการวิจัยของ Kim et al. (2018) ที่ได้นำ CCF ที่สกัดด้วยวิธีการต้ม มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C.acnes* ต่อเนื่องถึง 42 วัน มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.10, 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้มีผล MIC และ MBC ที่ดีกว่า อาจเป็นเพราะวิธีการสกัดสารของวิจัยนี้ใช้วิธีการทำให้สารสกัดเข้มข้น และใช้วิธีการต้มด้วยหม้อต้มยาแรงดัน ซึ่งให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า ตามการวิจัยของ Zhang & Gao (2019)

4. ความเข้มข้นทั้ง 3 สารสกัดที่มีค่าการยับยั้ง NO ได้ดีเทียบเท่ากับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Untreated) คือ สารสกัด SBG ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารสกัด CCF ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด SBG มีไบคาลินและไบคาเลนซึ่งส่วนใหญ่พบในส่วนของราก มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา ROS รวมถึงลดสารชักนำการอักเสบ TNF-α, IL-1β และ IL-6 (Gupta et al., 2022) สารสกัด CCF ค่าการยับยั้ง NO ที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอีก 2 ตัว และยับยั้ง NO ได้ถึง 42.76% ตั้งแต่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Lee et al. (2018) พบว่าสารสกัด CCF สามารถยับยั้งการทำให้เกิด Nitric oxide และ Proinflammatory cytokine ที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อ *C. acnes*

5. สารสกัด SBG ทุกความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยความเข้มข้นที่ 50, 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกลุ่มความเข้มข้นมี % viability สูงที่สุด สอดคล้องกับการวิจัยของ Pan et al. (2021) ที่พบว่าสารสกัด SBG มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และในทางเภสัชวิทยามีความสามารถในการป้องกันความเสียหายของเซลล์และเนื้อเยื่อได้อย่างโดดเด่น

6. เมื่อคำนึงถึงปัจจัยด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ SBG ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการยับยั้งการอักเสบ และสารสกัด PCS เหมาะสมกับการนำไปใช้ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* มากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยครั้งนี้ได้วิจัยการยับยั้งการอักเสบจากค่า NO production ต่อจากนี้สามารถวิจัยการยับยั้งการอักเสบอื่นๆ เช่น NF-κB, IL-1β, IL-6, TNF-α และ PPAR-γ ซึ่งการทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบจะเป็นข้อมูลสำคัญที่ยืนยันถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

2. สามารถวิจัยต่อไปได้ว่าหากนำ SBG ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการยับยั้งการอักเสบ มาใช้ร่วมกับ PCS ที่ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดีที่สุด จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* และยับยั้งการอักเสบอย่างไร เสริมฤทธิ์ หรือต้านฤทธิ์กัน

3. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธีอื่นๆร่วมด้วย

4. ในวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) จึงทำให้ CCF มี % viability ที่ต่ำ สามารถทำการทดลองด้วยเซลล์ชนิดอื่น เพื่อดู % viability ว่าแตกต่างกันหรือไม่

5. สามารถนำผลการวิจัยในครั้งนี้ต่อยอดผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบและยับยั้งเชื้อสิวต่อไป ซึ่งผลข้างเคียงน้อยและเป็นอีกตัวเลือกสำหรับผู้บริโภค

รายการอ้างอิง

เพ็ญพรรณ วัฒนไกร. (2559). Acne. ใน วาสนภ วชิรมน, พูลเกียรติ สุชนวณิช (บ.ก.), *10+ โรคผิวหนังต้องรู้* (น.112-125). สาขาวิชาโรคผิวหนัง ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

โพสต์ทูเดย์. (2561). *เทรนด์นาโนเทคโนโลยี เครื่องสำอาง/เวชสำอางสมุนไพรไทย 2561.* https://www.posttoday.com/life/healthy/533619

สถาบันโรคผิวหนัง. (2562). *สถิติโรคผู้ป่วยนอกที่พบตามลำดับ10 อันดับกลุ่มโรค ปีงบประมาณ 2561*. http://inderm.go.th/news/view_pan. php?id_viewp=41

Babu, H. N. R., Thriveni, H. N., & Vasudeva, R. (2012). Influence of drying methods and extraction procedures on the recovery of berberine content in *Coscinium fenestratum*. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2(4), 540-544.

Goldberg, D., & Berlin, A. (2011). *Acne and rosacea: epidemiology, diagnosis and treatment*. CRC Press.

Gupta, S., Buttar, H. S., Kaur, G., & Tuli, H. S. (2022). Baicalein: promising therapeutic applications with special reference to published patents. *Pharmaceutical Patent Analyst*, *11*(1), 23-32.

Iso, I. (2009). 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. *International Organization for Standardization, Geneva*, 34.

Kim, E. H., Jang, Y. A., Kim, S. B., Kim, H. H., & Lee, J. T. (2018). Antimicrobial, antifungal effect and safety verification using BCOP assay of extracts from *Coptis chinensis*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, *61*(3), 297-304.

Lee, J. W., Kang, Y. J., Choi, H. K., & Yoon, Y. G. (2018). Fractionated *Coptis chinensis* extract and its bioactive component suppress *Propionibacterium acnes*-stimulated inflammation in human keratinocytes. *Journal of microbiology and biotechnology*, *28*(6), 839-848.

Lee, J. W., Kang, Y. J., Choi, H. K., & Yoon, Y. G. (2018). Fractionated *Coptis chinensis* extract and its bioactive component suppress *Propionibacterium acnes*-stimulated inflammation in human keratinocytes. *Journal of microbiology and biotechnology*, *28*(6), 839-848.

Pan, L., Cho, K. S., Yi, I., To, C. H., Chen, D. F., & Do, C. W. (2021). Baicalein, baicalin, and wogonin: protective effects against ischemia-induced neurodegeneration in the brain and retina. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*.

Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, *8*(2), 603-608.

Song, J. W., Long, J. Y., Xie, L., Zhang, L. L., Xie, Q. X., Chen, H. J., ... & Li, X. F. (2020). Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics,

toxicity of *Scutellaria baicalensis* Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review. *Chinese Medicine*, 15(1), 1-26.

Sun, Y., Lenon, G. B., & Yang, A. W. H. (2019). *Phellodendri* cortex: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.

Teng, J.(2019). *Chinese Materia Medica (2)*. China: People's Medical Publishing House.

Zhang, L., & Gao, Y.(2019). Comparative Study on HPLC Fingerprint of Sanhuang Decoction Prepared by Traditional Decocting Method and Modern Decocting Machine. *World chinese medicine*,14(10), 2588-2592.

Zhou, X., Choi, P. S., Yang, J. M., Or, P. M., Hoi, P. M., Lee, S. M., . . . Kwan, Y. W. (2016). Chemical and pharmacological evaluations on the extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-Qin) prepared by various extraction methods. *SpringerPlus*, *5*(1), 1-10.