

ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากกากเมล็ดชาและเมล็ดชา

Antifungal activity of tea seed cake and tea seed extract *

(รายงานเบื้องต้น)

ประภา เลานไพบุลย์**
บียะรัตน์ โตสุขวงศ์**

Aqueous extract of tea seed cake or tea seed was tested for antifungal activity in agar plate. From the size of inhibition zone against T. mentagrophytes the antifungal activity of aqueous extract from 1 gm of tea seed cake is equivalent to 1 mg of griseofulvin, The crude extract had antifungal activity with all other cultures of dermatophytes, i.e. T. rubrum, T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. gypseum, M. audouinii, M. canis and E. floccosum. Partial purification was carried out by solvent extraction. It was not extractable with chloroform-ethanol, but extractable with n-butanol. Analysis with TLC showed two bands of activity.

ปี 1966 Akito Hashizume และ Yajivo Sakato (1) รายงานเกี่ยวกับใบและรากของต้นชาที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ประกอบกับคณะผู้จัดทำการวิจัยพบว่า กากเมล็ด

ชา (Tea seed cake) ซึ่งมีขายตามร้านขายยาสมุนไพรจีน ที่เรียกแก้ไวก้อนนั้น มีคนนำมาใช้สระผมและแช่เล็บมือเล็บเท้าที่เป็น โรคเชื้อราได้ผลดี ซึ่งกากเมล็ดชาก็เมล็ดชาที่ได้สกัด

* ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช สาขาแพทยศาสตร์

** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอาน้ำมันชาออกไปนำมาตากให้แห้ง มีมากทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นดินที่ปลูกต้นชากันมากเป็นอุตสาหกรรมทำชาจีนและเมี่ยง (ของว่างของคนพื้นเมือง) ฉะนั้นกากเมล็ดชาและเมล็ดชาก็เป็นวัตถุคิบบที่จะนำมาใช้ได้ ถ้าหากการค้นคว้าพบว่าในกากเมล็ดชาและเมล็ดชานั้นมีสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้

วัสดุและวิธีการ

1. ทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อราจากสารสกัดจากกากเมล็ดชาและเมล็ดชา

วัสดุ

เชื้อรา *Dermatophytes* เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังในคนและสัตว์ เช่น โรคกลาก โรคเชื้อราที่ขึ้นตามเล็บมือ เล็บเท้า ศีรษะ เป็นต้น (2,3) *Dermatophytes* ที่นำมาใช้ในการวิจัยมีดังนี้

T. rubrum, *T. mentagrophytes*

T. tonsurans, *M. gypseum*

M. audouinii, *M. canis*,

E. floccosum

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราชนิดต่าง ๆ

ใช้ Sabouraud's media ซึ่งเตรียมตามวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป (4)

สารสกัดจากกากเมล็ดชาและเมล็ดชา crude aqueous extract บดกากเมล็ดชา 100

กรัม ต้มกับน้ำกลั่น 150 มล. ให้เดือดนาน 30 นาที กรองได้น้ำกรองหรือ crude aqueous extract ระเหยให้ปริมาตรเหลือ 100 มล. แล้วนำมาทำเจือจางระดับต่าง ๆ คือ 100 มก. 10 มก. 1 มก. และ 0.1 มก. ต่อ 0.1 มล.

เมล็ดชาสดซึ่งมีชื่อ *Camellia Sinensis* (5) ทำวิธีเดียวกัน โดยใช้เปลือกนอกสุกเปลือกในที่หุ้มเมล็ดในและเมล็ดในสุก

ยามาตรฐาน Griseofulvin

เตรียม stock solution ละลาย 100 มก. griseofulvin ใน 10 มล. acetone

Working solution เจือจาง stock solution ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มล.

วิธีการ ผสมเชื้อราแต่ละชนิดลงใน agar media แล้วเทลง Sabouraud's agar plate ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ให้แห้งตัว เจาะรูบน agar plate นั้น ๆ หยด crude aqueous extract ของกากเมล็ดชา เมล็ดชา (เปลือกนอกสุก, เปลือกหุ้มเมล็ด และเมล็ดใน) และ standard griseofulvin ลงในรูที่เจาะไว้ ตามระดับเจือจางต่าง ๆ เก็บ plate เลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ประมาณ 48-72 ชั่วโมง แล้วนำมาวัด zone of inhibition เปรียบเทียบกัน

ผล

น้ำกรองจากกากเมล็ดชามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราพวก Dermatophytes ดังผลที่แสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่ามีฤทธิ์สูง ต่อเชื้อ *T. rubrum* และ *T. mentagrophytes* แต่มีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำต่อเชื้อ *M. canis*

จากการเปรียบเทียบ zone of inhibition ในเชื้อ *T. mentagrophytes* น้ำสกัดจากเมล็ดชา 1 กรัม มีฤทธิ์เทียบเท่ากับของ griseofulvin 1 มิลลิกรัม และจากการทดลอง กับเมล็ดชาสด พบว่าสารสกัดจากเมล็ดในสุกเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เปลือกนอกสุก และเปลือกในที่หุ้มเมล็ดไม่มีฤทธิ์

2. การทดลองหาวิธีการสกัด Antifungal agent จากกากเมล็ดชา

วิธีการ

การทดลองหาวิธีสกัดกากเมล็ดชา ได้แสดงไว้ในแผนผังที่ 1 ซึ่งมี 4 ขั้นตอน กล่าวคือ

- ขั้นที่ 1 ต้มกับน้ำ
- ขั้นที่ 2 สกัดด้วย 95% ethanol
- ขั้นที่ 3 สกัดด้วย chloroform และ
- ขั้นที่ 4 สกัดด้วย n-butanol และเอา

ผลจากการสกัดทุกขั้นตอนไปทดสอบหา activity กับเชื้อ *T. mentagrophytes*

ผล

ในขั้นที่ 1 น้ำกรองที่ได้จากการต้ม มี activity ประมาณ 90% ของ activity ทั้งหมด กากที่ได้จากการต้มไปหนึ่ง นำไปต้มใหม่ และมี activity น้อยมาก

ในขั้นที่ 2 สกัดด้วย 95% ethanol มี activity อยู่ในน้ำกรอง ตะกอนไม่มี activity

ในขั้นที่ 3 สกัดด้วย chloroform activity อยู่ใน aqueous phase chloroform phase ไม่มี activity

ในขั้นที่ 4 สกัดด้วย n-butanol มี activity ใน butanol phase ประมาณ 60% ที่เหลืออยู่ใน aqueous phase ถ้าสกัดด้วย n-butanol 3 หน activity จะอยู่ใน butanol phase เกือบหมด

3. แยกสารที่สกัดด้วย n-butanol ด้วย Thin layer chromatography (6)

เอาสารสกัดที่อยู่ใน n-butanol มาแยกด้วย silica gel plate โดยใช้ n-butanol : MeOH (4 : 1v/v) เป็นตัวละลาย ตรวจสอบผลการแยกโดยใช้ 20% H_2SO_4 และแบ่ง TLC plate เป็นส่วน ๆ ห่างกัน 1 ซม. ชูคแต่ละส่วนออกมาใส่ centrifuge tube ละลายในน้ำกลั่นปั่นและหา activity

ผล

รูปที่ 1 แสดงผลการแยกของ thin layer chromatography จากการพ่นด้วย 20% H₂SO₄ พบแถบสีต่าง ๆ ประมาณ 5 แถบ จากการหา activity พบว่ามี activity สูงใน 2 fractions ที่มีสีม่วงและน้ำตาล

สรุป

1. สารสกัดจากกากเมล็ดชาและเมล็ดชามีฤทธิ์ต้านเชื้อราพวก Dermatophytes ได้
2. สารสกัดจากกากเมล็ดชาและเมล็ดชานาน 10% ในน้ำมีความแรงในการออกฤทธิ์ (potency) ต้านเชื้อราได้เท่ากับ 0.001% ของ griseofulvin

3. สารสกัดนี้ไม่ละลายใน chloroform แต่ละลายได้ดีใน n-butanol (aqueous solution)

4. มีสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในสารสกัดจากเมล็ดชาประมาณ 2 components โดยสังเกตจากผลการทดลองของ TLC

ขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

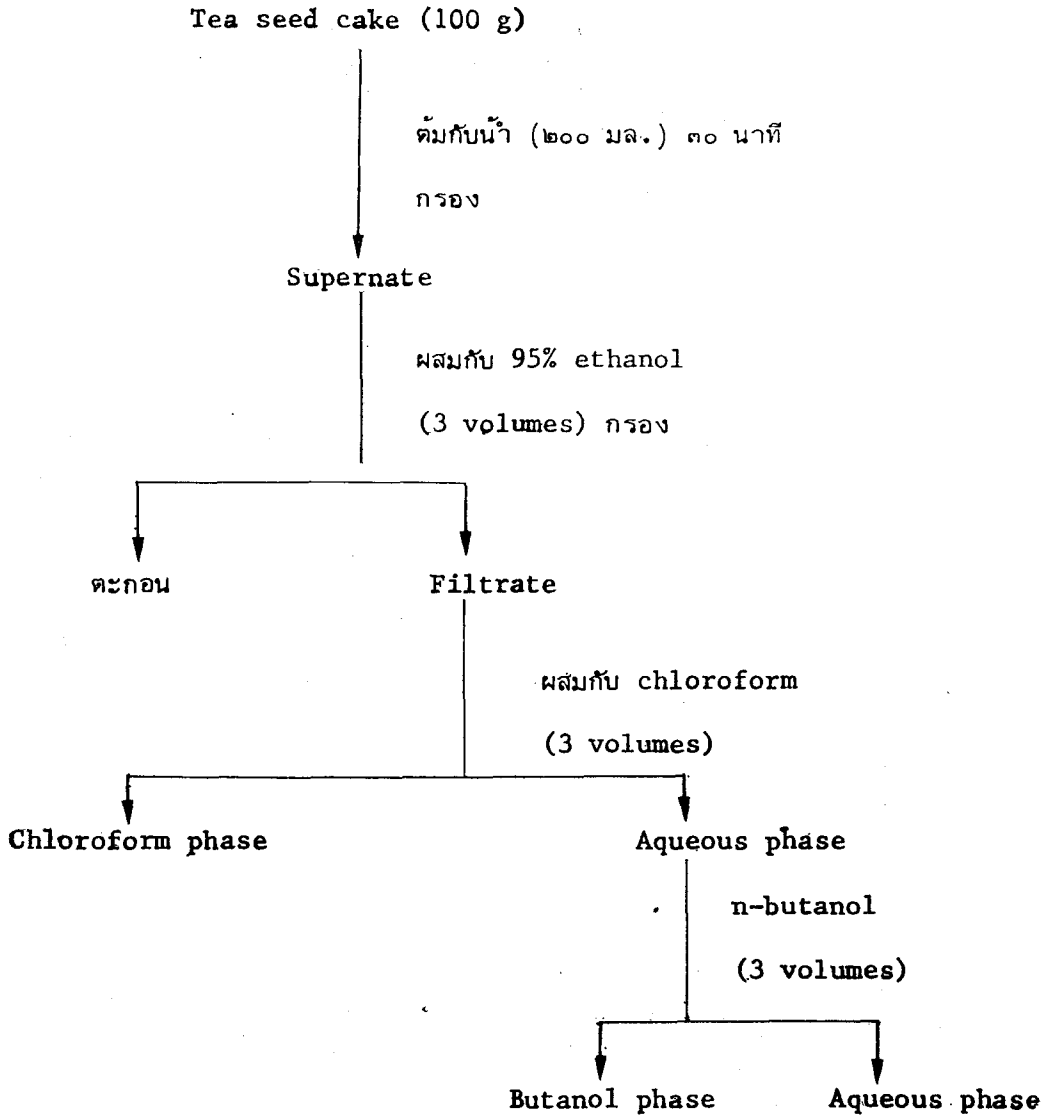
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ กวี ภูไพบูลย์ แห่งหน่วยตรวจเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำตลอดจนแบ่งเชื้อราให้มาทำการวิจัย

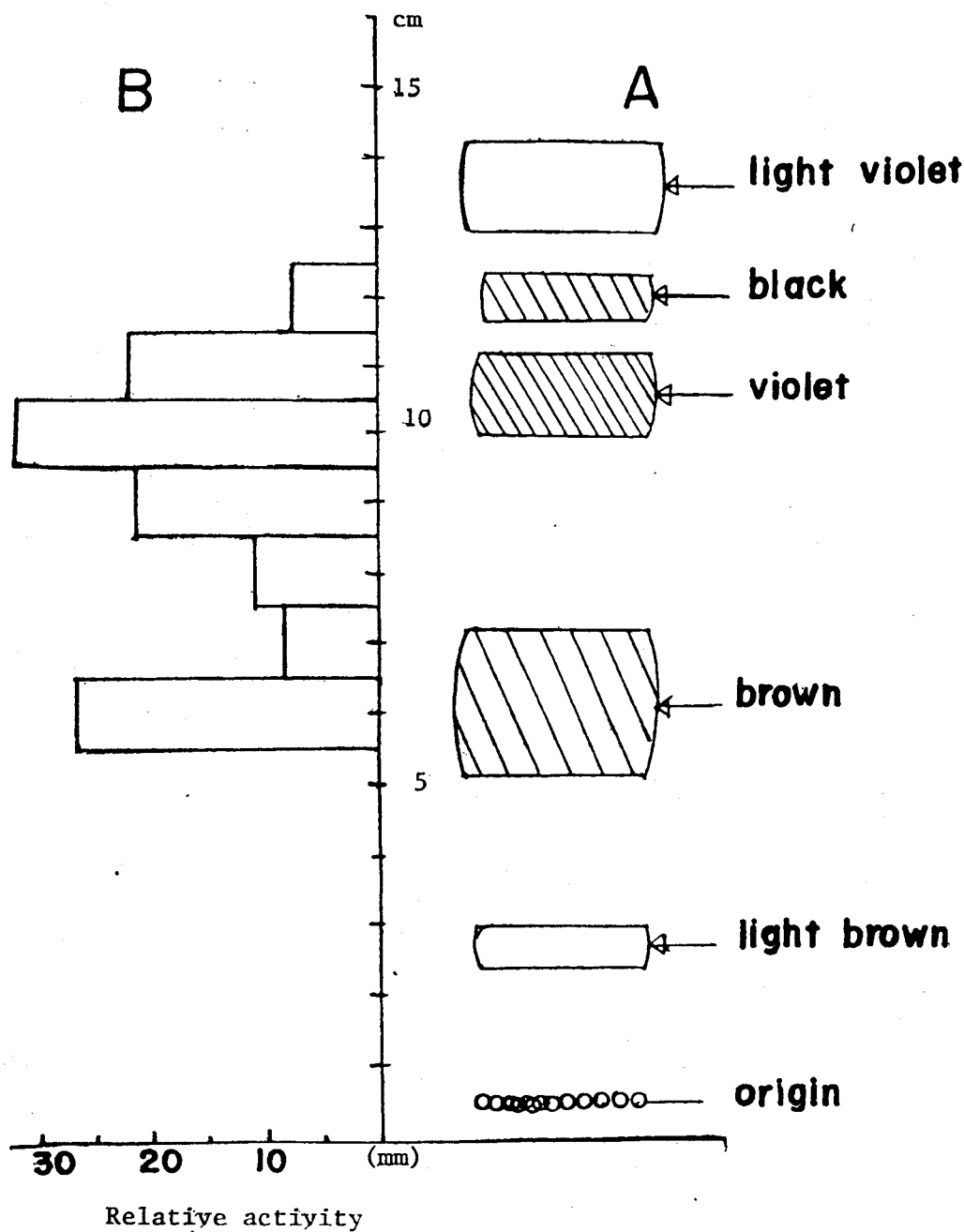
ตารางที่ 1 แสดง Inhibition zone ของสารสกัดจากกากเมล็ดชาต่อเชื้อราชนิดต่าง ๆ

Inhibition Zone of Tea Seed Cake Extract on Various Strains of Dermatophytes

| Fungi | Inhibition Zone (mm) | | |
|-------------------|----------------------|-------|------|
| | 100 mg | 10 mg | 1 mg |
| T. rubrum | 30 | 23 | 10 |
| T. mentagrophytes | 25 | 20 | 10 |
| E. floccosum | 25 | 12 | — |
| M. gypseum | 25 | 18 | — |
| M. audouinii | 25 | 15 | — |
| M. canis | 25 | — | — |

แผนผังที่ 1





แสดง inhibition zone ของแต่ละ fraction ที่แยกด้วย TLC แผ่นเดียวกัน

A. แสดงการแยกของสารสกัดที่อยู่ใน n-butanol โดยวิธี TLC บนแผ่น Silica gelG ซึ่งสเปย์ด้วย 20% H₂SO₄

2. ดร. พิชิต ไทสุโขวงศ์ แห่งคณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ให้ความ
ช่วยเหลือแนะนำในการวิจัยนี้

3. คณะกรรมการวิจัยคณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนให้ทุน
วิจัยรัชดาภิเษกสมโภช สาขาแพทย์ ในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Hashizume A. Chemical abstract. vol 64, 1966, 13019
2. Orlando C, Renoo K. Color atlas of skin disease in Thailand. Bangkok, Thailand: Institute of Dermatology, 1978, 1-46
3. ดำรง พฤษพราย. เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์. กรุงเทพฯ : คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โครงการตำราคณะกรรมการนิสิต, 2521, 88-91
4. Rippon LW. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia, 1974, 544-549
5. Li H L. The Garden Flower of Chian. New York : Ronald Press, 1959, 80-85
6. Smith I. Chromatographic and electrophoresis technique. Great Britain : Pitman Press, 1969, 66-103