ศูนย์บริการเอกสารการวิจัยฯ
RP1989/832
Development of the

ภ. 30—22/1/รายงานฉบับที่ 1

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การทดสอบคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย

ศศิธร วสุวัต

พุทธรินทร์ วรรณิสสร

บรรจงจิตร มหินทรเทพ

พ.ท.กฤช กุวานนท์

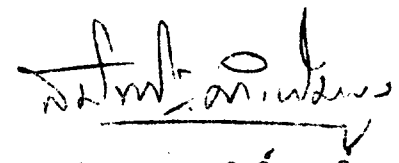
สายพิณ แสงหิรัญ

วท, กรุงเทพ ฯ 2532

ห้ามนำไปพิมพ์เผยแพร่โดยมิได้รับการอนุญาตจาก วท.

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย

ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



(ศาสตราจารย์พิเศษ ดร.สมิทธิ์ คำเพิ่มพูล)

ผู้ว่าการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 30-22

โครงการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยาจากสมุนไพร ระยะที่ 2

โครงการย่อยที่ 1

การทดสอบคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

รายงานฉบับที่ 1

การทดสอบคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย

ศศิธร วสุวัต

พุทธรินทร์ วรรณิสสร

บรรจงจิตร มหินทรเทพ

พ.ท.กฤช กุวานนท์

สายพิณ แสงหิรัญ

วท., กรุงเทพฯ 2532

สารบาญ

	หน้า
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	3
ภาคที่ 1 การทดสอบผลต่อแบคทีเรีย, รา และยีสต์	4
อุปกรณ์และวิธีการ	4
I. การทดสอบหา minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum lethal concentration (MLC)	7
II. การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อ	9
ผลการทดสอบ	11
สรุปผลและวิจารณ์	26
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคที่ 2 การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อ Chlamydia ของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล	
ABSTRACT	31
บทคัดย่อ	32
คำนำ	32
อุปกรณ์การทดลอง	33
วิธีการ	34
ผลการทดลอง	35
คำขอบคุณ	38
เอกสารอ้างอิง	38

สารบาญตาราง

หน้า

ภาคที่ 1 การทดสอบผลต่อแบคทีเรีย, รา และยีสต์

ตารางที่ 1. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ Aerobic bacteria 12

ตารางที่ 2. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ Anaerobic bacteria 13

ตารางที่ 3. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ N. gonorrhoeae 14

ตารางที่ 4. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ C. albicans 15

ตารางที่ 5. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อรา 16

ตารางที่ 6. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ E. coli ATCC 85922 17

ตารางที่ 7. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ S. aureus ATCC 29523 19

ตารางที่ 8. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ P. aeruginosa ATCC 27853 20

ตารางที่ 9. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ C. albicans 974 21

ตารางที่ 10. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ M. gypseum 849 22

ตารางที่ 11. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัส ต่อ T. mentagrophytes 23

ภาคที่ 2 การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อ Chlamydia ของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ C. trachomatis 36

สารบาญรูป

หน้า

รูปที่ 1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด Terpinen-4-ol (o) และ สารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol (●) ต่อการยับยั้งการเจริญของ C. trachomatis. 37

ภาค 1

การทดสอบคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย

ศศิธร วสุวัต

พุทธรินทร์ วรรณิสสร

บรรจงจิตร มหินทรเทพ

สายพิณ แสงหิรัญ

STUDIES ON ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF TERPINEN-4-OL EXTRACTED FROM *ZINGIBER CASSUMUNAR* ROXB.

By Sasithorn Wasuwat, Puttarin Wannissorn, Banjongjit Mahintharathep and Saipin Sanghirun

ABSTRACT

Terpinen-4-ol from fresh rhizome of Zingiber cassumunar Roxb. showed lethal activity against bacteria, yeast and some dermatophytes. N. gonorrhoeae was found to be most sensitive (MIC 700 ug/ml, MLC 1,000 ug/ml) whereas the anaerobic bacteria, yeast and dermatophytes showed similar susceptibility to Terpinen-4-ol (range of MIC 700-2,000 ug/ml, MLC 1,000-2,000 ug/ml). The aerobic bacteria were more resistant than other organisms. It was found that P. aeruginosa ATCC 27853 was the most resistant strain (MIC and MLC 25,000 ug/ml). The data suggested that the antimicrobial activity of extracted Terpinen-4-ol from Phlai was equivalent to that of commercial Terpinen-4-ol, but was lower than that of the antibiotics.

A comparative study of the antiseptic activities of preparations of extracted Terpinen-4-ol, commercial Terpinen-4-ol, Povidone iodine and mixed solution of chloroxylenol and terpineol was also reported. All kinds of stock solution could completely destroy E. coli ATCC 85922, S. aureus ATCC 25923, P. aeruginosa ATCC 27853, C. albicans 974, M. gypseum 849 and T. mentagrophytes within 1 minute. It revealed that dilute preparation of Povidone iodine was the most effective, successively followed by dilute preparation of mixed solution of chloroxylenol and terpineol and dilute preparations of Terpinen-4-ol.

การทดสอบคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย ศศิธร วสุวัติ*, พุทธรินทร์ วรรณิสสร*, บรรจงจิตร มหินทรเทพ*
และ สายพิณ แสงหิรัญ*

บทคัดย่อ

Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลแสดงฤทธิ์เป็นสารฆ่าเชื้อได้ทั้งแบคทีเรีย, รา และยีสต์. พบว่า N. gonorrhoeae เป็นเชื้อที่ไวต่อสารนี้สูงสุด, มีค่า MIC เฉลี่ยประมาณ 700 ไมโครกรัม/มล., MLC ประมาณ 1,000 ไมโครกรัม/มล. ในขณะที่ anaerobic bacteria, ราและยีสต์มีความไวต่อสารนี้ใกล้เคียงกันคือ มีค่า MIC อยู่ในช่วง 700-2,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC เท่ากับ 1,000-2,000 ไมโครกรัม/มล. ส่วน aerobic bacteria มีความต้านทานต่อสารนี้มากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น, มีค่า MIC เฉลี่ย 2,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC อยู่ระหว่าง 2,000-3,000 ไมโครกรัม/มล. โดยที่ P. aeruginosa ATCC 27853 เป็นเชื้อที่มีความต้านทานต่อสารนี้สูงสุด, มีค่า MIC และ MLC เท่ากับ 25,000 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งฤทธิ์การต้านเชื้อของ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลนี้มีความใกล้เคียงกับฤทธิ์ของ Terpinen-4-ol สังเคราะห์ แต่ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ.

จากการทดสอบเปรียบเทียบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อของสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพล, สารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์, สารละลาย Povidone iodine และสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol ต่อเชื้อ E. coli ATCC 85922, S. aureus ATCC 25923, P. aeruginosa ATCC 27853, C. albicans 974, M. gypseum 849 และ T. mentagrophytes พบว่า stock solution ของสารทั้ง 4 ชนิดมีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อดีเท่ากันคือสามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้หมดภายในเวลา 1 นาที. แต่เมื่อนำ stock solution มาเจือจางในน้ำกลั่นพบว่าสารละลายเจือจาง Povidone iodine มีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อดีที่สุด, รองลงมาคือสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol และสารละลายเจือจาง Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิด, โดยที่สารละลายเจือจาง Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อได้ใกล้เคียงกัน.

---

*สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

บทนำ

Terpinen-4-ol เป็น oxygenated monoterpene ที่พบได้ในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด (Janssen et al. 1985; Gallino 1988; Ekundayo 1986). จากการศึกษาของ Eduardo (1962) พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ Melaleuca alternifolia ซึ่งมี Terpinen-4-ol เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 30-35% แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum และ T. gypseum. นอกจากนี้ สารละลายของน้ำมันหอมระเหยนี้ใน 13% isopropyl alcohol ก็มีฤทธิ์เป็นสารฆ่าเชื้ออย่างแรงแต่ไม่ก่อความระคายเคือง. ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Janssen (1985) พบว่า Terpinen-4-ol ในน้ำมันหอมระเหยจากข่า (Alpinia galanga) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, T. concentricum, Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis และ Staphylococcus aureus ได้สูงกว่า α-Pinene, β-Pinene, Limonene, 1,8-Cineol และ α-Terpineol ซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดอื่นในน้ำมันหอมระเหย.

สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (สวภ.) จึงได้เริ่มโครงการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราของ Terpinen-4-ol สกัดจากไพลขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาอุตสาหกรรมยาจาก Terpinen-4-ol ต่อไป.

วัตถุประสงค์

1. ทดสอบฤทธิ์ของ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลในการฆ่าเชื้อหรือหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อโรคผิวหนัง และเชื้อที่ก่อโรคในช่องคลอด ทั้งที่เป็นเชื้อมาตรฐานและเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย, โดยเปรียบเทียบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum lethal concentration (MLC) กับ Terpinen-4-ol ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาดและยามาตรฐานที่ใช้สำหรับเชื้อแต่ละชนิด.

2. ทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อ (antiseptic activity) ที่เวลาต่าง ๆ ของ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลเปรียบเทียบกับ Terpinen-4-ol ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาดและสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด.

การทดสอบ

แบ่งเป็น 2 ภาค คือ :

ภาคที่ 1 ทดสอบผลต่อแบคทีเรีย, รา และยีสต์.

ภาคที่ 2 ทดสอบผลต่อ Chlamydia sp.

ภาคที่ 1 การทดสอบผลต่อแบคทีเรีย, รา และยีสต์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์ทดสอบ

Aerobic bacteria

1. Bacillus subtilis
2. Escherichia coli ATCC 85922
3. E. coli
4. Klebsiella pneumoniae DMS 0555
5. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
6. Proteus vulgaris ATCC 1335
7. P. vulgaris
8. Salmonella typhimurium
9. Shigella boydii
10. Staphylococcus aureus ATCC 29523
11. S. aureus

Anaerobic bacteria

1. Bacteroides fragilis
2. Bacteroides sp.
3. B. melaninogenicus

4. Clostridium perfringens
5. Fusobacterium sp.
6. Peptostreptococcus sp.

2. เชื้อที่ต้องการ CO_2 ในการเจริญ

Neisseria gonorrhoeae

1. Penicillinase-producing strain 5 isolates
2. Non-penicillinase-producing strain 5 isolates

3. เชื้อรา

1. Epidermophyton floccosum 825
2. Microsporum gypseum 849
3. M. gypseum NIH
4. Trichophyton mentagrophytes 973
5. T. mentagrophytes
6. T. rubrum 989
7. T. rubrum

4. เชื้อยีสต์

1. Candida albicans ศิริราช
2. C. albicans NIH
3. C. albicans 974
4. C. albicans 982

5. สารทดสอบ

1. Terpinen-4-ol สกัดจากน้ำมันไพลบริสุทธิ์*
2. Terpinen-4-ol สังเคราะห์บริสุทธิ์ 97% (Aldrich Chemical Co. Wisconsin, U.S.A.)
3. ยามาตรฐาน

   Ampicillin (Amcillin, Dumex)

   Chloramphenicol Sodium succinate (Kemicetine, Farmitalia Carlo Erba)

   Clotrimazole บริสุทธิ์ 99.98%

   Griseofulvin บริสุทธิ์ 100%

   Kanamycin acid sulfate (Kanoxin, Dumex)

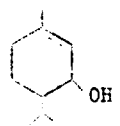
   Metronidazole B.P. (Metrogyl, Unique Pharmaceutical Labs.)

   Penicillin G. Sodium (Pegemex, Dumex)

   Trobamycin sulfate (Nebein, Eli lilly)
4. Chloroxylenol (4-chloro-3, 5-dimethylphenol, Aldrich)
5. Terpineol anhydrous (Fluka, A.G.)
6. Povidone iodine
7. Isopropyl alcohol
8. Tween 80

---

*Terpinen-4-ol 94.6% สกัดจากน้ำมันไพลด้วยวิธี Fractional Distillation มีสูตรเคมี



6. วิธีการ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ:

I. การทดสอบหา minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum lethal concentration (MLC)

การเตรียมเชื้อ

1. Aerobic bacteria

เขี่ยเชื้อใส่ Tryptic soy broth (TSB) pH 7.4, บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง. นำเชื้อมาเทียบความขุ่นกับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 ปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกันมากที่สุดด้วย TSB (สุรพัฒน์ และคณะ 2530).

2. Anaerobic bacteria

เพาะเชื้อบน supplemented blood agar, บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง. เขี่ยเชื้อ 2-3 โคโลนี เพาะใส่ supplemented thioglycolate medium (w/o indicator), บ่มที่ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc-Farland No. 0.5.

3. Neisseria gonorrhoeae

เพาะเชื้อบน chocolate blood agar, บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. ใน candle jar เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง. ทำ suspension ของเชื้อใน TSB แล้วปรับให้มีความขุ่นของ suspension ให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 (Shapiro et al. 1984).

4. รา

เพาะเชื้อบน sabouraud dextrose agar, บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 10 วัน. ทำ suspension ของเชื้อใน normal saline ผสม Tween 80 0.05%, ปรับความขุ่นของ suspension ให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 (Yong Undated).

5. ยีสต์

เพาะเชื้อบน sabouraud dextrose agar, บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. ทำ suspension ของเชื้อใน normal saline, ปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc-Farland No. 0.5 (Lorian 1986).

การเตรียมอาหารทดสอบ

ชั่ง Terpinen-4-ol (สกัด), Terpinen-4-ol (สังเคราะห์) และยามาตรฐานชนิดต่าง ๆ แยกละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ยกเว้น Clotrimazole และ Criseofulvin ที่ต้องละลายใน 70% ethyl alcohol ก่อนแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบตามปริมาตรที่กำหนด). เก็บสารละลายแต่ละชนิดในตู้เย็น (10°ซ.) จนกว่าจะนำมาใช้.

ดูดสารละลายที่เตรียมขึ้นใส่ลงในอาหารวุ้นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ, ผสมอาหารวุ้นและสารละลายให้เข้ากัน, เทลงจานแก้ว (ใช้อาหารทดสอบ 20 มล./จานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10 ซม.), รอจนอาหารแข็ง คว่ำจานลงตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง.

ชนิดของอาหารวุ้นที่ใช้มีดังนี้:

1.	Tryptic soy agar pH 7	สำหรับ	aerobic bacteria
2.	Wilkis Chalgren agar pH 7.2	สำหรับ	anaerobic bacteria
3.	Chocolate agar	สำหรับ	N. gonorrhoeae
4.	Sabouraud dextrose agar pH 7	สำหรับ	ราและยีสต์

ใช้อาหารวุ้นที่ไม่ได้ผสมสารทดสอบเป็นอาหารควบคุม.

การหาค่า MIC และ MLC

ทำตามวิธี optional method (Haley and Collaway 1978) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้: วาง millipore filter (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม.) ที่ปราศจากเชื้อบนผิวหน้าอาหารทดสอบ, หยด

เชื้อที่เตรียมไว้ลงบนแผ่น millipore filter แผ่นละ 3 ul เชื้อละ 2 แผ่น, รอจนเชื้อแห้งจึงกลับจานอาหารทดสอบนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (aerobic bacteria บ่มที่ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, anaerobic bacteria บ่มที่ 37°ซ. ใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, N. gonorrhoeae บ่มที่ 37°ซ. ใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, รา บ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 10 วัน และยีสต์บ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง). เมื่อครบเวลาบ่มบันทึกค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ.

จากนั้นนำแผ่น millipore filter ที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อใส่ลงในอาหารเหลวหลอดละ 1 แผ่น, บ่มต่อในสภาวะที่เหมาะสม, บันทึกค่า MLC. อาหารเหลวที่ใช้แตกต่างตามชนิดของเชื้อทดสอบดังนี้:

1. TSB pH 7.4 สำหรับ aerobic bacteria (Lorian 1986).
2. Wilkins Chalgren broth pH 7.2 สำหรับ anaerobic bacteria (Sutter et al. 1986).
3. Gonococcal broth สำหรับ N. gonorrhoeae (Shapiro et al. 1984).
4. Sabouraud dextrose broth pH 7 สำหรับ รา และยีสต์ (Haley and Collaway 1978).

II. การทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อ

การเตรียมเชื้อ

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อของการทดสอบหา MIC และ MLC เชื้อทดสอบที่ใช้มี 6 ชนิดคือ:

1. Escherichia coli ATCC 85922
2. Staphylococcus aureus ATCC 29523
3. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
4. Candida albicans 974
5. Microsporum gypseum 849
6. Trichophyton mentagrophytes

การเตรียมสารทดสอบ

เตรียม stock solution ของ Terpinen-4-ol (สกัด), Terpinen-4-ol (สังเคราะห์), Povidone iodine และ Chloroxylenol กับ Terpineol ดังสูตรต่อไปนี้:

1. Terpinen-4-ol (สกัด/สังเคราะห์)	10	ก.
Isopropyl alcohol	12	มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	มล.
2. Terpinen-4-ol (สกัด/สังเคราะห์)	13.8	ก.
Isopropyl alcohol	12	มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	มล.
3. Povidone iodine	10	ก.
Isopropyl alcohol	12	มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	มล.
4. Chloroxylenol	4.8	ก.
Terpineol	9	มล.
Isopropyl alcohol	12	มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	มล.

สารละลายควบคุม ประกอบด้วย

Isopropyl alcohol	12	มล.
น้ำกลั่น	88	มล.

ฆ่าเชื้อสารละลายทั้งหมดโดยวิธีการกรอง.

วิธีการทดสอบ

เจือจาง stock solution ของสารทดสอบแต่ละสูตรแบบเท่าตัวด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.15 มก./มล.-10 มก./มล. ดูด stock solution และสารละลายแต่ละ

ระดับความเจือจางใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ 6 หลอด, ความเข้มข้นหลอดละ 5 มล. จากนั้นใส่เชื้อลงในหลอด ๆ ละ 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที, ตรวจนับเชื้อในแต่ละหลอดที่ระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี plate count.

ผลการทดสอบ

1. ผลการทดสอบค่า MIC และ MLC

1.1 Aerobic bacteria. พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีความไวต่อการถูกยับยั้งและทำลายโดย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลได้ใกล้เคียงกัน, มีค่า MIC เฉลี่ยประมาณ 2,000 ไมโครกรัม/มล. และค่า MLC อยู่ในช่วง 2,000-3,000 ไมโครกรัม/มล., ยกเว้น P. aeruginosa ATCC 27853 ที่มีความต้านทานสูงสุด มีค่า MLC สูงถึง 25,000 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวใกล้เคียงกับ Terpinen-4-ol สังเคราะห์. เป็นที่น่าสังเกตว่า Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดมีค่า MIC ใกล้เคียงกับค่า MLC มาก.

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของ Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดต่ำกว่ายามาตรฐานที่ใช้ทดสอบ. จากตารางที่ 1 พบว่า Trobamycin sulfate มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด, รองลงมาคือ Ampicillin, Chloramphenicol และ Terpinen-4-ol ทั้งสองชนิด. สำหรับประสิทธิภาพการทำลายเชื้อพบว่า Trobamycin sulfate ทำลายเชื้อได้ดีที่สุด, รองลงมาได้แก่ Ampicillin, Terpinen-4-ol ทั้งสองชนิดและ Chloramphenicol ตามลำดับ. อนึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของยามาตรฐานที่หาได้กับค่าที่กำหนดไว้ในตารางมาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อต่อยาชนิดต่าง ๆ (เหลืองสกุล 2529) จะเห็นได้ว่าเชื้อทดสอบมีความไวต่อ Trobamycin sulfate แต่ดื้อต่อยา Ampicillin.

1.2 Anaerobic bacteria. Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลและที่ได้จากการสังเคราะห์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อทดสอบใกล้เคียงกัน โดยมีค่า MIC ในช่วง 700-2,000 ไมโครกรัม/มล. และค่า MLC 700-3,500 ไมโครกรัม/มล., แต่ประสิทธิภาพของ Terpinen-4-ol ทั้งสองชนิดยังต่ำกว่า Metronidazole และ Penicillin G. (ตารางที่ 2).

1.3 Neisseria gonorrhoeae. Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการทำลาย gonococci ได้ใกล้เคียงกับ Terpinen-4-ol สังเคราะห์ (MIC =

ตารางที่ 1. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ Aerobic bacteria

เชื้อทดสอบ	MIC/MLC (ไมโครกรัม/มล.)									
	Terpinen-4-ol (สกัด)		Terpinen-4-ol (สังเคราะห์)		Ampicillin		Chloramphenicol		Trobamycin	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
1. B. subtilis	2,000	>50,000	2,000	>50,000	10	30	125	>3,000	0.3	5
2. E. coli ATCC 85922	2,000	2,000	2,000	2,000	30	500	100	>3,000	0.3	0.5
3. E. coli	2,000	2,000	2,000	2,000	500	>1,000	>3,000	>3,000	0.5	3
4. K. pneumoniae DMS 0555	2,000	2,000	2,000	2,000	100	>1,000	125	>3,000	0.3	0.5
5. P. aeruginosa ATCC 27853	25,000	25,000	25,000	>50,000	1,000	>1,000	>3,000	>3,000	0.3	0.5
6. P. vulgaris ATCC 1335	2,000	2,000	2,000	2,000	30	>1,000	250	>3,000	0.5	1
7. P. vulgaris	2,000	2,000	2,000	2,000	10	>1,000	500	>3,000	0.5	3
8. S. typhimurium	2,000	2,000	2,000	3,000	10	70	125	>3,000	0.5	5
9. S. boydii	2,000	4,000	2,000	2,000	10	30	125	>3,000	1	5
10. S. aureus ATCC 29523	2,000	2,000	2,000	3,000	10	80	1,000	>3,000	0.3	3
11. S. aureus	2,000	3,000	2,000	3,000	50	>1,000	2,000	>3,000	0.3	3

ตารางที่ 2. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ Anaerobic bacteria

เชื้อทดสอบ	MIC/MLC (ไมโครกรัม/มล.)							
	Terpinen-4-ol(สกัด)		Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)		Penicillin G		Metronidazole	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
1. Bacteroides sp.	1,000	2,000	1,000	2,000	38.4	>150	2	8
2. B. fragilis	700	2,000	700	2,000	38.4	>150	1	8
3. B. melaninogenicus	700	1,500	1,000	1,500	1.2	4.8	0.1	0.25
4. Clostridium perfringens	2,000	3,000	2,000	3,500	0.3	38.4	0.5	1
5. Fusobacterium sp.	1,000	1,000	1,500	1,500	9.6	19.2	1	4
6. Peptostreptococcus sp.	700	2,000	1,000	2,000	0.3	9.6	1	2

ตารางที่ 3. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ N. gonorrhoeae

เชื้อทดสอบ		MIC/MLC (ไมโครกรัม/มล.)							
		Terpinen-4-ol (สกัด)		Terpinen-4-ol (สังเคราะห์)		Penicillin G		Kanamycin	
		MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
Penicillinase-producing N. gonorrhoeae									
Isolate ที่	1	700	1,000	700	1,000	600	>600	100	300
	2	700	1,000	700	1,000	150	600	150	250
	3	700	1,000	700	1,000	150	600	100	300
	4	700	1,000	700	1,000	30	150	100	250
	5	2,000	3,000	2,000	3,000	60	300	200	500
Non-Penicillinase-producing N. gonorrhoeae									
Isolate ที่	1	700	1,000	700	1,000	0.3	9	10	30
	2	700	1,000	700	1,000	0.3	9	10	30
	3	700	1,000	700	1,000	0.3	9	20	50
	4	700	1,000	700	1,000	0.6	18	20	50
	5	700	1,000	700	1,000	0.6	18	20	50

ตารางที่ 4. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อ C. albicans

เชื้อทดสอบ	MIC/MLC(ไมโครกรัม/มล.)					
	Terpinen-4-ol(สกัด)		Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)		Clotrimazole	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
1. C. albicans ศิริราช	1,000	2,000	1,000	2,000	1.6	2
2. C. albicans NIH	700	2,000	700	4,000	1.6	2
3. C. albicans 974	1,000	2,000	1,000	4,000	1.6	2
4. C. albicans 982	700	2,000	700	4,000	3.175	8

ตารางที่ 5. ค่า MIC และ MLC ของสารทดสอบต่อรา

เชื้อทดสอบ	MIC/MLC(ไมโครกรัม/มล.)							
	Terpinen-4-ol(สกัด)		Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)		Clotrimazole		Griseofulain	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
1. E. floccosum 825	700	2,000	700	2,000	2	3	3	4
2. M. gypseum 849	1,000	3,000	1,000	3,000	2	3	5	10
3. M. gypseum NIH	700	3,000	700	3,000	2.5	3	5	15
4. T. mentagrophytes 973	700	3,000	700	3,000	2	3	3	15
5. T. mentagrophytes	700	3,000	700	3,000	3	3	3	20
6. T. rubrum 989	1,000	2,000	1,000	2,000	2	4	3	4
7. T. rubrum	700	2,000	700	2,000	1	4	3	5

700-2,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC = 1,000-3,000 ไมโครกรัม/มล.) แต่ฤทธิ์ดังกล่าวต่ำกว่ายามาตรฐาน. จากตารางที่ 3 พบว่ากลุ่ม Penicillinase producing strains มีความต้านทานต่อ Kanamycin sulfate และ Penicillin G. มากกว่ากลุ่ม Non-penicillinase producing strains ซึ่งเห็นได้จากค่า MIC และ MLC ที่สูงกว่ามาก. แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าฤทธิ์ของ Terpinen-4-ol ทั้งสองชนิดต่อ gonococci ทั้ง 2 กลุ่มใกล้เคียงกัน.

1.4 ราและยีสต์. จากตารางที่ 4 และ 5 พบว่า Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ Terpinen-4-ol ที่ได้จากการสังเคราะห์, มีค่า MIC = 700-1,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC = 700-4,000 ไมโครกรัม/มล. แต่ประสิทธิภาพดังกล่าวยังต่ำกว่ายามาตรฐานอยู่มาก.

2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อ

ความเข้มข้นของ stock solution Povidone iodine และ stock solution Chloroxylenol กับ Terpineol ที่กำหนดไว้ในการทดสอบนี้เตรียมขึ้นตามความเข้มข้นที่ระบุไว้บนฉลากของน้ำยาฆ่าเชื้อ Betadine และ Dettol. ส่วนความเข้มข้นของสารละลาย Terpinen-4-ol นั้นกำหนดให้เท่ากับความเข้มข้นของสารละลาย 2 ชนิดแรกเพื่อเป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นยาฆ่าเชื้อ (antiseptic activity) ของสารแต่ละชนิด. ผลการทดสอบพบว่า stock solution ของสารทดสอบทุกชนิดสามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 1 นาที, แต่เมื่อนำ stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดมาเจือจางในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าสารละลายเจือจางของ Povidone iodine มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดีที่สุด สามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 1 นาที แม้จะเจือจางลงถึง 1:640 เท่า (ตารางที่ 6-11).

สำหรับฤทธิ์การฆ่าเชื้อของสารละลายเจือจางของสารทดสอบตัวอื่น ๆ จะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อทดสอบดังต่อไปนี้:

1. ฤทธิ์ต่อ E. coli ATCC 85922. พบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 มก./มล. ภายในเวลา 1 นาที สารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol เริ่มมีผลลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าสารละลายของ Terpinen-4-ol อีก 2 ชนิด และสามารถฆ่าเชื้อได้หมดเมื่อบ่มต่อไปจนครบ 3 นาที. สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดนั้นต้องใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นอีกเท่าตัว (1.2 มก./มล.) จึงเริ่มมีผลลดจำนวนเชื้อซึ่งประสิทธิภาพการลดเชื้อนี้จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่บ่ม, และเมื่อเปรียบเทียบ

ตารางที่ 6. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ E. coli ATCC 85922

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้ / มล. ณ ระยะเวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	5.8×10^4	5.7×10^4	5.5×10^4
0.3	5.6×10^4	5.4×10^4	5.4×10^4
0.6	5.9×10^4	5.4×10^4	5.7×10^4
1.2	3.8×10^4	1.2×10^4	9.8×10^3
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	5.8×10^4	5.6×10^4	5.9×10^4
0.3	5.6×10^4	5.7×10^4	5.7×10^4
0.6	5.6×10^4	5.7×10^4	5.5×10^4
1.2	5.6×10^4	5.7×10^4	2.9×10^4
2.5	280	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	5.8×10^4	5.7×10^4	5.6×10^4
0.3	5.6×10^4	5.7×10^4	5.8×10^4
0.6	7.6×10^3	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 5.9×10^4 โคโลนี/มล.

2. ที่ความเข้มข้น 0.15-10 มก./มล. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ แต่ในกรณีของ stock solution สารละลายควบคุมมีผลลดจำนวนเชื้อจาก 5.9×10^4 เหลือ 3.7×10^3 โคโลนี/มล. ภายใน 5 นาที

ตารางที่ 7. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ S. aureus ATCC 29523

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้/มล. ณ เวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	5×10^4	5.4×10^4	5.3×10^4
0.3	5.4×10^4	5.7×10^4	5.6×10^4
0.6	5.7×10^4	5.2×10^4	5.6×10^4
1.2	2.2×10^3	3.2×10^4	2.3×10^4
2.5	1.8×10^3	10	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	5.2×10^4	5.7×10^4	5.1×10^4
0.3	5.4×10^4	5.2×10^4	5.1×10^4
0.6	5.6×10^4	5.6×10^4	5.7×10^4
1.2	5.2×10^3	5.5×10^3	5.4×10^3
2.5	6×10^3	2×10^3	1.1×10^3
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	5.2×10^4	5.4×10^4	5.1×10^4
0.3	5×10^4	5.1×10^4	5.2×10^4
0.6	5.6×10^4	5.3×10^4	5.5×10^4
1.2	1.96×10^4	5.6×10^3	700
2.5	10	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 5.1×10^4 โคโลนี/มล.

2. ที่ความเข้มข้น 0.15-10 มก./มล. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ แต่ในกรณีของ stock solution สารละลายควบคุมมีผลลดจำนวนเชื้อจาก 5.1×10^4 เหลือ 6.7×10^3 โคโลนี/มล. ภายใน 5 นาที

ตารางที่ 8. ผลความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ P. aeruginosa ATCC 27853

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้/มล. ณ เวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	4.2×10^4	4×10^4	4.1×10^4
0.3	4.2×10^4	4.7×10^4	4.5×10^4
0.6	4.3×10^4	4.4×10^4	4.6×10^4
1.2	4.5×10^4	4.3×10^4	4.5×10^4
2.5	4.1×10^3	305	90
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	4.3×10^4	4.4×10^4	4.6×10^4
0.3	4.8×10^4	4.1×10^4	4.4×10^4
0.6	4.2×10^4	4.3×10^4	4.5×10^4
1.2	4.5×10^4	4.2×10^4	4.3×10^4
2.5	3.9×10^3	200	50
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	4.1×10^4	4×10^4	4.2×10^4
0.3	4.5×10^4	4.1×10^4	4×10^4
0.6	4.5×10^4	4.5×10^4	4.9×10^3
1.2	4.2×10^4	4×10^4	3.3×10^3
2.5	900	70	40
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 4.6×10^4 โคโลนี/มล.

2. ที่ความเข้มข้น 0.15-10 มก./มล. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ แต่ในกรณีของ stock solution สารละลายควบคุมมีผลลดจำนวนเชื้อจาก 4.6×10^4 เหลือ 5.7×10^3 โคโลนี/มล. ภายใน 5 นาที

ตารางที่ 9.- ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ C. albicans 974

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้/มล. ณ ระยะเวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	3.9×10^3	3.9×10^3	3.7×10^3
0.3	3.6×10^3	4×10^3	3.9×10^3
0.6	3.9×10^3	3.8×10^3	3.8×10^3
1.2	3.8×10^3	4×10^3	4.1×10^3
2.5	3.6×10^3	3.2×10^3	2.8×10^3
5	220	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	4×10^3	3.9×10^3	3.8×10^3
0.3	3.9×10^3	3.9×10^3	3.5×10^3
0.6	3.8×10^3	3.9×10^3	4×10^3
1.2	4×10^3	3.8×10^3	3.9×10^3
2.5	3.8×10^3	4×10^3	4.1×10^3
5	310	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	3.8×10^3	3.8×10^3	3.9×10^3
0.3	3.7×10^3	4×10^3	3.3×10^3
0.6	3.9×10^3	3.6×10^3	3.8×10^3
1.2	4×10^3	3.6×10^3	3.4×10^3
2.5	30	10	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 3.8×10^3 โคโลนี/มล.

2. ที่ความเข้มข้น 0.15-10 มก./มล. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ แต่ในกรณีของ stock solution สารละลายควบคุมมีผลลดจำนวนเชื้อจาก 3.8×10^3 โคโลนี/มล. เหลือ 2.7×10^3 โคโลนี/มล. ภายในเวลา 5 นาที.

ตารางที่ 10. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ M. gypseum 849

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้/มล. ณ เวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	3.7×10^3	3.6×10^3	3.5×10^3
0.3	3.4×10^3	3.2×10^3	3.3×10^3
0.6	3.3×10^3	3.2×10^3	3.3×10^3
1.2	3.1×10^3	3.2×10^3	3.3×10^3
2.5	3.2×10^3	3.4×10^3	3.3×10^3
5	300	10	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	3.5×10^3	3.4×10^3	3.2×10^3
0.3	3.2×10^3	3.4×10^3	3.4×10^3
0.6	3×10^3	3.2×10^3	3×10^3
1.2	3.1×10^3	3.1×10^3	3.1×10^3
2.5	3.4×10^3	3.3×10^3	3.2×10^3
5	480	30	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	3.4×10^3	3.4×10^3	3.3×10^3
0.3	3.2×10^3	3.2×10^3	3.4×10^3
0.6	3.2×10^3	3.4×10^3	3.3×10^3
1.2	1.6×10^3	1.3×10^3	500
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 3.55×10^3 โคโลนี/มล.

2. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ

ตารางที่ 11. ผลของความเข้มข้นของสารทดสอบและระยะเวลาสัมผัสต่อ T. mentagrophytes

ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	จำนวนโคโลนีที่นับได้/มล. ณ เวลาต่าง ๆ		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที
Terpinen-4-ol(สกัด)			
0.15	3.5×10^3	3.4×10^3	3.6×10^3
0.3	3.5×10^3	3.6×10^3	3.7×10^3
0.6	3.6×10^3	3.5×10^3	3.6×10^3
1.2	3.7×10^3	3.5×10^3	3.7×10^3
2.5	3×10^3	2.9×10^3	2.4×10^3
5	80	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Terpinen-4-ol(สังเคราะห์)			
0.15	3.7×10^3	3.6×10^3	3.6×10^3
0.3	3.6×10^3	3.5×10^3	3.6×10^3
0.6	3.7×10^3	3.4×10^3	3.7×10^3
1.2	3.5×10^3	3.6×10^3	3.6×10^3
2.5	3.8×10^3	3.7×10^3	3.6×10^3
5	100	10	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Chloroxylenol+Terpineol			
0.15	3.7×10^3	3.5×10^3	3.7×10^3
0.3	3.5×10^3	3.7×10^3	3.6×10^3
0.6	2.5×10^3	1.8×10^3	1.3×10^3
1.2	600	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0
Povidone iodine			
0.15	0	0	0
0.3	0	0	0
0.6	0	0	0
1.2	0	0	0
2.5	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0
stock solution	0	0	0

หมายเหตุ 1. จำนวนเชื้อตั้งต้น = 3.7×10^3 โคโลนี/มล.

2. สารละลายควบคุมไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ

จากตารางที่ 6 พบว่าสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์การฆ่าเชื้อดีกว่าสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ โดยที่สารละลาย Terpinen-4-ol ที่ได้จากการสกัดสามารถทำลายเชื้อได้หมดเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2.5 มก./มล. ภายในเวลา 1 นาที ในขณะที่สารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ต้องใช้เวลาถึง 3 นาที.

2. ฤทธิ์ต่อ S. aureus ATCC 29523. ในช่วงความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.15-0.6 มก./มล.) สารละลายทดสอบทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ. แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 1.2 มก./มล. สารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลและสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol เริ่มมีผลลดจำนวนเชื้อ, ส่วนสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ยังไม่มีผลลดจำนวนเชื้อ. จากตารางที่ 7 พบว่าสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีที่สุด, รองลงมาคือสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลและ Terpinen-4-ol สังเคราะห์ตามลำดับ. โดยที่สารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol ฆ่าเชื้อได้หมดที่ความเข้มข้น 2.5 มก./มล. ภายในเวลา 3 นาที, ในขณะที่สารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลต้องบ่มนานถึง 5 นาที, ส่วนสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ต้องใช้ความเข้มข้นสูงเป็นเท่าตัว (5 มก./มล.) จึงสามารถฆ่าเชื้อได้หมด.

3. ฤทธิ์ต่อ P. aeruginosa ATCC 27853. ที่ความเข้มข้น 0.15-0.6 มก./มล. ฤทธิ์โดยทั่วไปของสารละลายทดสอบทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อนี้จะคล้ายกับฤทธิ์ต่อ S. aureus ATCC 29523. เมื่อความเข้มข้นสูงเป็น 1.2 มก./มล. มีเพียงสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol เท่านั้นที่สามารถลดจำนวนเชื้อทดสอบลงได้, สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดต้องเพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 2.5 มก./มล. จึงออกฤทธิ์ลดจำนวนเชื้อได้. จากตารางที่ 8 พบว่าสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol ออกฤทธิ์ลดจำนวนเชื้อดีกว่าสารละลายทดสอบทั้ง 2 ชนิด, และสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลเล็กน้อย. อย่างไรก็ตามสารละลายทั้ง 3 ชนิดฆ่าเชื้อได้หมดที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ภายในเวลา 1 นาที (ตารางที่ 8).

4. ฤทธิ์ต่อ C. albicans 974. ที่ความเข้มข้น 1.2 มก./มล. สารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol เริ่มมีผลลดเชื้อได้บ้างเล็กน้อยตั้งแต่ 5 นาทีเป็นต้นไป, โดยจะมีผลลดได้มากเมื่อความเข้มข้นสูงถึง 2.5 มก./มล. และสามารถฆ่าเชื้อได้หมดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 5 นาที. สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลลดเชื้อได้เมื่อใช้ความเข้มข้น 2.5 มก./มล. ตั้งแต่ 1 นาที ในขณะที่ความเข้มข้นนี้สารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ยังไม่มีผล

ลดจำนวนเชื้อ. อย่างไรก็ตามสารละลายทั้ง 2 ชนิดสามารถฆ่าเชื้อได้หมดที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ภายในเวลา 3 นาที (ตารางที่ 9).

5. ฤทธิ์ต่อ M. gypseum. ช่วงความเข้มข้น 0.15-0.6 มก./มล. สารละลายทดสอบทั้ง 3 ชนิดมีผลลดจำนวนเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย, แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มเป็น 1.2 มก./มล. สารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol จะสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ซึ่งประสิทธิภาพการทำลายเชื้อสูงขึ้นตามเวลาที่บ่มโดยสามารถฆ่าเชื้อได้หมดที่ความเข้มข้น 2.5 มก./มล. ภายในเวลา 1 นาที. สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดจะเริ่มลดจำนวนเชื้อได้เมื่อความเข้มข้นสูงถึง 5 มก./มล. ตั้งแต่เวลา 1 นาทีเป็นต้นไป และสามารถฆ่าเชื้อได้หมดที่เวลา 5 นาที (ตารางที่ 10).

6. ฤทธิ์ต่อ T. mentagrophytes. สารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดีกว่าสารละลาย Terpinen-4-ol อีก 2 ชนิด, โดยสารละลายผสมนี้เริ่มมีผลลดจำนวนเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 0.6 มก./มล. ตั้งแต่เวลา 1 นาทีเป็นต้นไป. จากตารางที่ 11 สังเกตได้ว่าเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจำนวนเชื้อจะลดลงมากขึ้นด้วย โดยสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol สามารถฆ่าเชื้อได้หมดที่ความเข้มข้น 1.2 มก./มล. ภายในเวลา 3 นาที. สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดนั้นพบว่า Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ดีกว่า Terpinen-4-ol สังเคราะห์เล็กน้อย. ความเข้มข้นของสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลที่เริ่มมีผลลดจำนวนเชื้อคือที่ 2.5 มก./มล. ตั้งแต่เวลา 1 นาทีเป็นต้นไป ในขณะที่สารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 5 มก./มล. จึงมีผลลดจำนวนเชื้อ. ส่วนความเข้มข้นและเวลาที่สารละลายทั้ง 2 ชนิดสามารถฆ่าเชื้อได้หมดคือ 5 มก./มล. ภายใน 3 นาที สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพล และ 5 มก./มล. ภายใน 5 นาที สำหรับสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์.

สรุปผลและวิจารณ์

Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, รา และยีสต์. จากผลการทดสอบหาค่า MIC และ MLC พบว่า N. gonorrhoeae เป็นกลุ่มเชื้อที่ไวต่อสารนี้มากที่สุด, มีค่า MIC เฉลี่ยประมาณ 700 ไมโครกรัม/มล. และ MLC ประมาณ 1,000 ไมโครกรัม/มล., ในขณะที่ anaerobic bacteria, ราและยีสต์มีความไวต่อสารนี้ใกล้เคียงกัน (MIC อยู่ในช่วง 700-2,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC = 1,000-3,000 ไมโครกรัม/มล.). ส่วน aerobic bacteria เป็นกลุ่มเชื้อที่มีความต้านทานต่อ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น, มีค่า MIC เฉลี่ย 2,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC = 2,000-3,000 ไมโครกรัม/มล., โดยเฉพาะ P. aeruginosa ATCC 27853 จัดเป็นเชื้อที่มีความต้านทานสูงสุดมีค่า MIC 25,000 ไมโครกรัม/มล. และ MLC 25,000 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งผลของสารต่อเชื้อนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Janssen และ Scheffer (1985) ที่พบว่า P. aeruginosa เป็นเชื้อที่มีความต้านทานต่อ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันข่ามากกว่าเชื้อทดสอบตัวอื่น.

เมื่อพิจารณาจากค่า MIC และ MLC แล้วพบว่า ค่า MLC มีค่าใกล้เคียงกับค่า MIC มากหรือสูงกว่าไม่เกิน 2 เท่า, แสดงว่า Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าเชื้อ (microbiocidal agent) มากกว่าที่จะเป็นแค่สารยับยั้งการเจริญของเชื้อ (microstatic agent) (Lorian 1986). ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ค่า MLC ของ Terpinen-4-ol ต่อ aerobic bacteria ต่ำกว่าค่า MLC ของ Chloramphenical ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง. กลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้ออาจเนื่องมาจาก Terpinen-4-ol ไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์, ทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในเซลล์, ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลง และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์หรือมีผลต่อการซึมผ่านของผนังเซลล์อันเนื่องมาจาก Terpinen-4-ol ไปจับอยู่รอบ ๆ เซลล์ ซึ่งกลไกเหล่านี้เป็นกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยโดยทั่ว ๆ ไป (Syed et al. 1980).

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อทดสอบของ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลกับสารทดสอบชนิดอื่น พบว่า Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อใกล้เคียงกับ Terpinen-4-ol สังเคราะห์ แต่ฤทธิ์การต้านเชื้อดังกล่าวยังต่ำกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นยามาตรฐานเพื่อทดสอบเปรียบเทียบอยู่มาก.

สำหรับผลการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อ สรุปได้ว่า stock solution ของสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด มีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อได้ใกล้เคียงกันคือสามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 1 นาที, แต่สารละลายเจือจางของ stock solution ทั้ง 4 ชนิดกลับมีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแตกต่างกันออกไป. พบว่าสารละลายเจือจางของ Povidone iodine มีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อได้ดีที่สุด, รองลงมาคือสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol, และสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิด. ในกรณีของสารละลาย Terpinen-4-ol นั้น เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นในระดับที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อหมดภายในเวลา 1 นาที พบว่าสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลแสดงฤทธิ์ลดจำนวนเชื้อทดสอบส่วนใหญ่ได้ดีกว่าสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์เล็กน้อย, ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารเจือปนที่มีใน Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันซึ่งมีอยู่ถึง 5%.

เมื่อพิจารณาในแง่ความไวของเชื้อต่อสารทดสอบ พบว่าเชื้อทดสอบทุกชนิดไวต่อ Povidone iodine มากที่สุด. สำหรับความไวของเชื้อทดสอบต่อสารอีก 3 ชนิด พบว่าแบคทีเรียและยีสต์มีความไวต่อสารละลาย Terpinen-4-ol ทั้ง 2 ชนิดมากกว่าเชื้อรา, โดย E. coli ATCC 85922 เป็นเชื้อที่ไวกว่า S. aureus ATCC 29523 และ P. aeruginosa ATCC 27853., เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อทดสอบส่วนใหญ่ (ยกเว้น P. aeruginosa ATCC 27853) มีความไวต่อสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลมากกว่าสารละลาย Terpinen-4-ol สังเคราะห์. ในกรณีของสารละลายผสม Chloroxylenol กับ Terpineol พบว่า E. coli ATCC 85922 มีความไวต่อสารละลายนี้สูงสุด, รองลงมาคือ T. mentagrophytes, M. gypseum 894, S. aureus ATCC 25923, C. albicans 974 และ P. aeruginosa ATCC 27853.

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายเจือจางของสารทดสอบแต่ละชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายในเวลา 1 นาที เป็นดังนี้:

ความเข้มข้นของสารละลายทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อหมดภายใน 1 นาที (มก./มล.)

เชื้อทดสอบ	Terpinen-4-ol (สกัด)	Terpinen-4-ol (สังเคราะห์)	Chloroxylenol +Terpineol	Povidone iodine
1.*E. coli* ATCC 85922	2.5	5	1.2	0.15
2.*S. aureus* ATCC 29523	5	5	5	0.15
3.*P. aeruginosa* ATCC 27853	5	5	5	0.15
4.*C. albicans* 974	10	10	5	0.15
5.*M. gypseum* 894	10	10	2.5	0.15
6.*T. mentagrophytes*	10	10	2.5	0.15

จากผลการทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อของ Terpinen-4-ol พบว่าแม้ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลจะมีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อต่ำกว่า Povidone iodine อยู่ถึง 30 เท่า และต่ำกว่า Chloroxylenol กับ Terpineol อยู่ 2-4 เท่า, แต่สารนี้มีแนวโน้มที่สามารถจะพัฒนาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากสารละลาย Terpinen-4-ol ที่สกัดจากน้ำมันไพลสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราที่ก่อโรคทางผิวหนัง และก่อการติดเชื้อในช่องคลอดได้.

เอกสารอ้างอิง

สุรพัฒน์, นรีกุล; วิวัฒน์, จันทร์เพ็ญ; วุฒิไกร, ปรีชา; สุภเวชย์, สุวณี และ เทพชัยศรี, ประมวญ 2530. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. หน้า 38-49. (สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร : กรุงเทพฯ.)

เหลืองสกุล, สุมาลี 2529. บทปฏิบัติการแบคทีเรียทางการแพทย์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, หน้า 141-150. (กรุงเทพฯ.)

Ekundayo, Olusegum 1986. Essential oils. VIII. Volatile constituents of the leaves of Ocimum viridae. Planta Medica 3 : 200-201.

Gallino, Marrissa 1988. Essential oil from Tanacutum vulgare, growing spontaneously in "Tierra del Fuego" (Argentina). Planta Medica 54(2) : 182.

Haley, Leonor D. and Collaway, Carey S. 1978. Techniques for drug susceptibility test in Laboratory methods in medical mycology. Hew Publication No. (CDC) 79-8361 : 173-186.

Jafee, Harold W., Biddle, James W., Thornsberry, Clyde, Johnson, Robert E., Kaufman, Richard E., Reynolds, Gladys H. and Wiesnes, Paul J. 1976. National gonorrhoeae therapy monitoring study. In vitro antibiotic susceptibility and its correlation with treatment results. N. Eng. J. of Med. 294(1) : 5-9.

Janssen A.M. and Scheffer J.J.C. 1985. Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of Alpinia galanga. Planta Medica. 6 : 507-511.

Lorian, Victor 1986. Antibiotics in laboratory medicine 2nd, 93-150. (Williams and Wilkins : Baltimore.).

Murray, Patrick R. and Niles, Ann C. 1983. Inoculumn preparation for anaerobic susceptibility tests. J. Clinical Microbial 18(3) : 733-734.

Pena, Eduardo F. 1962. Malaleuca Alternifolia oil, its use for trichomonal vaginitis and other vaginal infections. Obstetrics & Gynecology. 19 (6) : 793-795.

Shapiro, Martin A., Heifetz Carl L. and Sesnie, Josephine C. 1984. Comparison of microdilution and agar dilution procedures for testing antibiotic susceptibility of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbial. 20(4) : 828-830.

Sutter V.L., Citron D.M. and Finegold S.M. 1986. Anaerobic Bacteriological Manual. 131 pp. (Star Publishing company : London).

Syed, Meena; Harif, M.; Chaudhary, F.M. and Bhatty, M.K. 1980. Antimicrobial activity of the essential oils of the Umbelliferae family part 1. Pakistan. J. Sci. Ind. Res. 29(3) : 183-188.

Yong, Celia N. (Undated). Sensitivity patterns to griseofulvin of Trichophyton rubrum and other ringworm fungi. 226-233.

ภาค 2

การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อ Chlamydia ของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย

บรรจงจิตร มหินทรเทพ

พุทธรินทร์ วรรณิสสร

พ.ท.กฤช กุวานนท์

ศศิธร วสุวัต

STUDIES ON ANTICHLAMYDIAL ACTIVITY OF TERPINEN-4-OL EXTRACTED FROM *Zingiber cassumunar* ROXB.

By Banjongjit Mahintharathep, Puttarin Wannissorn,
Lt. Col. Krit Kuvanont and Sasithorn Wasuwat

ABSTRACT

The in vitro activities of extracted Terpinen-4-ol from Phlai, Zingiber cassumunar Roxb., synthetic Terpinen-4-ol, Tetracycline and Vancomycin against four strains, E, L-2, CS-104 and OB-4L, of C. trachomatis in Mc Coy culture were studied. Extracted Terpinen-4-ol was found to be similar in activity to synthetic Terpinen-4-ol (MIC and MBC, 200-400 µg/ml), whereas Tetracycline showed the most effective activity (MIC, MBC 0.03-0.12 µg/ml). Vancomycin was less active against all the studied strains (MIC, MBC > 800 ug/ml).

การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อ Chlamydia ของสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล

โดย บรรจงจิตร มหินทรเทพ*, พุทธรินทร์ วรรณิสสร*, พ.ท. กฤช กุวานนท์+
และ ศศิธร วสุวัต*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของ Terpinen-4-ol ที่สกัดจากไพล ต่อเชื้อ C. trachomatis 4 ตัวอย่างคือ E, L-2, CS-104 และ OB-42 ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อใน Mc Coy cell โดยเปรียบเทียบผลกับสารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol และยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ Tetracycline และ Vancomycin, พบว่าสารสกัดและสารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน, คือมีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 200-400 ไมโครกรัม/มล. ส่วนค่า MIC และ MBC ของ Tetracycline มีค่าระหว่าง 0.03-0.12 ไมโครกรัม/มล., และของ Vancomycin มีค่ามากกว่า 800 ไมโครกรัม/มล.

คำนำ

Chlamydia เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง รูปร่างกลมรี, มีขนาดตั้งแต่ 0.2-1.8 ไมโครเมตร, ผนังเซลล์มีลักษณะคล้ายผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียแกรมลบ, ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องเลี้ยงในเซลล์ที่มีชีวิต เพราะไม่สามารถสังเคราะห์พลังงานเองได้ ต้องอาศัยจาก host cell (นรีกุล และคณะ 2530; Buchanan และ Gibbons 1974). C. trachomatis เป็นสาเหตุของโรคตาอักเสบ (trachoma และ inclusion conjunctivitis) และกามโรค (Lymphogranuloma venereum). เชื้อกลุ่มนี้มี inclusion body เป็นสารพวก glycogen ที่สามารถ

---

*สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
+กองวิจัย, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

ย้อมติดสีน้ำตาลเหลืองของไอโอดีนได้. ยาที่นิยมใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ C. trachomatis ในปัจจุบันได้แก่ Tetracycline, Doxycycline และ Erythromycin (Stamm และ Suchland 1986; Ridgway และคณะ 1983) เป็นต้น, ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยาที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ. สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, วท.จึงได้จัดทำโครงการวิจัยร่วมกับสถาบันวิจัย-วิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร เพื่อทดลองนำสาร Terpinen-4-ol ที่สกัดได้จากสมุนไพรไพล(Zingiber cassumunar Roxb.) มาทดสอบกับเชื้อดังกล่าว. เนื่องจากสาร Terpinen-4-ol นี้มีรายงานพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, T. concentrichum, Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis และ Staphylococcus aureus (Janssen และ Scheffer 1985).

การศึกษาครั้งนี้ ได้ทดลองหาประสิทธิภาพของสาร Terpinen-4-ol ต่อเชื้อ C. trachomatis โดยเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ Tetracycline ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง และ Vancomycin ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำ (Ridgway และคณะ 1978).

อุปกรณ์การทดลอง

1. Mc Coy cell เป็นเซลล์เนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ Chlamydia.
2. เชื้อทดสอบ ได้แก่ :
   - C. trachomatis E (reference strain)
   - C. trachomatis L-2 (reference strain)
   - C. trachomatis CS-104 แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการปากมดลูกอักเสบ
   - C. trachomatis OB-42 แยกได้จากสตรีมีครรภ์ที่มีอาการปากมดลูกอักเสบ
3. อาหาร อาหารที่ใช้ทดสอบ (ดัดแปลงจาก ชนินทร และคณะ 2529) มีดังนี้:
   - GM (growth medium) เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยง Mc Coy cell ประกอบด้วย M 199 (GIBCO LAB), fetal bovine serum 10% และ sodium bicarbonate 20 มิลลิโมลา
   - GMG คือ GM ที่เติม glucose 0.5% (นน./ปริมาตร)
   - GMGC คือ GM ที่เติม glucose 0.5% และ cycloheximide 1 ไมโครกรัม/มล.

4. สารทดสอบ ได้แก่:

- สารสกัด Terpinen-4-ol จากไพล มีความบริสุทธิ์ 95%
- สารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol (Aldrich Chemical Company, Inc.) มีความบริสุทธิ์ 97%
- Tetracycline
- Vancomycin

วิธีการ

1. การศึกษาผลของ Terpinen-4-ol ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Chlamydia

เตรียมสารละลาย Terpinen-4-ol ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัม/มล., สารละลาย Tetracycline ความเข้มข้น 0.0075, 0.015, 0.03, 0.06 และ 0.12 ไมโครกรัม/มล. และสารละลาย Vancomycin ความเข้มข้น 200, 400 และ 800 ไมโครกรัม/มล. ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผสม Cycloheximide.

บ่มเลี้ยงเซลล์ที่มี Chlamydia แฝงอยู่ด้วยสารละลายของสารทดสอบที่เตรียมไว้ในความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 35°ซ. เป็นเวลา 3 วัน, ตรวจนับจำนวน inclusion ในหลุมด้วยการย้อมสี iodine.

2. การศึกษาผลของ Terpinen-4-ol ต่อการทำลายเชื้อ Chlamydia

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม Cycloheximide เป็นตัวทำละลายสำหรับการเตรียมสารละลายทดสอบแทนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผสม Cycloheximide.

หลังจากบ่มครบ 3 วัน จึงย่อยเซลล์ในแต่ละหลุมนำไปเพาะในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ถาดใหม่ที่มีเซลล์เนื้อเยื่อ Mc Coy เจริญอยู่.

บ่มเลี้ยงเซลล์ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ถาดใหม่ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผสม Cycloheximide ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 35°ซ. เป็นเวลา 3 วัน, ตรวจนับจำนวน inclusion ที่มีด้วยการย้อมสี iodine.

เตรียมเซลล์เนื้อเยื่อ Mc Coy อายุ 24 ชม. ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยใช้สารละลาย Mc Coy เซลล์ความเข้มข้น 4×10^5 เซลล์/มล. หลุมละ 1 มล. เพาะเลี้ยงเชื้อ C. trachomatis สายพันธุ์ต่าง ๆ ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ (Ripa 1977).

ผลการทดลอง

การศึกษาผลของสาร Terpinen-4-ol ต่อการยับยั้งการเจริญและการทำลายเชื้อ Chlamydia

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญและการทำลายเชื้อ C. trachomatis ของสาร Terpinen-4-ol เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ Tetracycline และ Vancomycin พบว่า Tetracycline มีประสิทธิภาพสูงที่สุด, รองลงมาคือ Terpinen-4-ol. ส่วน Vancomycin มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 1.

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด Terpinen-4-ol สามารถยับยั้งการเจริญของ C. trachomatis E ได้ดีกว่าสารสังเคราะห์เล็กน้อย (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องจากในสารสกัด Terpinen-4-ol มีสารปนเปื้อนอื่นที่มีพิษต่อเชื้อ.

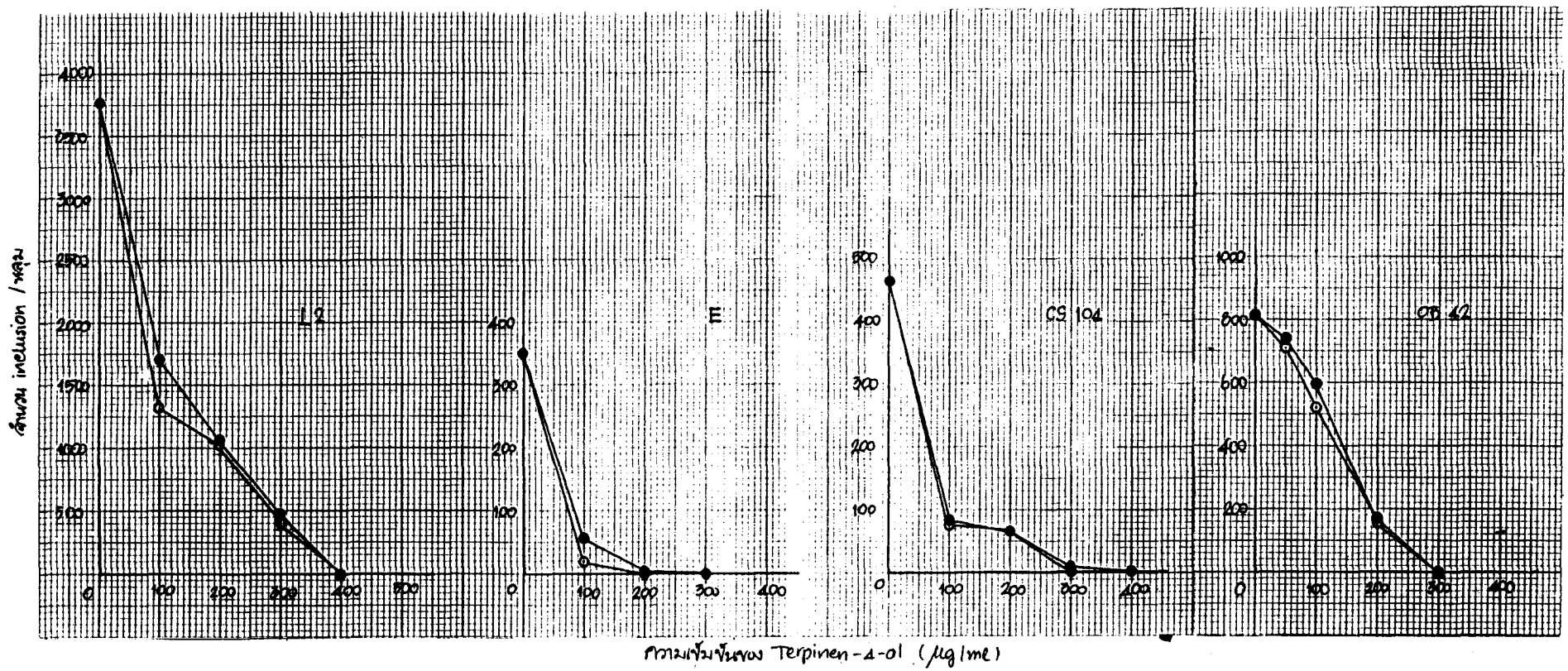
สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาผลของสาร Terpinen-4-ol ต่อเชื้อ C. trachomatis 4 ตัวอย่างคือ E, L2, CS104 และ OB42 พบว่าสารสกัด Terpinen-4-ol จากไพลมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol คือมีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 200-400 ไมโครกรัม/มล. ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ Tetracycline มีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 0.03-0.12 ไมโครกรัม/มล., และ Vancomycin มีค่ามากกว่า 800 ไมโครกรัม/มล. การที่ค่า MIC และ MBC ของ Terpinen-4-ol สูงนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการละลายของ Terpinen-4-ol มีจำกัด ทำให้ปริมาณสารที่สัมผัสเซลล์น้อยกว่าที่ควร.

กลไกการทำลายเชื้อ C. trachomatis โดย Terpinen-4-ol ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเนื่องจากสารนี้มีผลโดยตรงต่อเชื้อ หรือเกิดจากการที่สารมีผลทำให้ Mc Coy cell มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป, หรือมีผลทั้งสองอย่างร่วมกัน.

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ C. trachomatis

C. trachomatis	MIC (ไมโครกรัม/มล.)				MBC (ไมโครกรัม/มล.)			
	สารสกัด Terpinen-4-ol	สารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol	Tetracycline	Vancomycin	สารสกัด Terpinen-4-ol	สารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol	Tetracycline	Vancomycin
E	200	300	0.03	>800	200	300	0.03	>800
L2	400	400	0.06	>800	400	400	0.06	>800
CS104	300	400	0.06	>800	300	400	0.06	>800
OB42	300	300	0.06	>800	300	300	0.12	>800



รูปที่ 1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด Terpinen-4-ol (o) และสารสังเคราะห์ Terpinen-4-ol (●) ต่อการยับยั้งการเจริญของ C. trachomatis.

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินงานวิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อองค์กรและคณะบุคคลต่อไปนี้:

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) และผู้ว่าการ ดร.สมิทธ์ คำเพิ่มพูล ที่อนุมัติให้ดำเนินงานวิจัยตามโครงการได้.

2. สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนดำเนินการส่วนหนึ่งสำหรับการทำงานวิจัย.

3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก (สวพ.) และผู้อำนวยการ พลอากาศตรี สหัส นาคะศิริ ที่อนุมัติให้ใช้สถานที่เพื่อดำเนินการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ สวพ. ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานอย่างดียิ่ง.

เอกสารอ้างอิง

สุวงศ์, ชนินทร; สิงหราช, ปรีชา; กุวานนท์, กฤช; โตรักษา, กัลยาณี และ เครือรัตน์, มนู. 2529. การแยกเชื้อ Chlamydia trachomatis จากผู้ป่วยชายที่มีอาการท่อปัสสาวะอักเสบโดยใช้ Mc Coy cell. วิทยาสารเสนารักษ์ 39(2):81-89.

สุระพัฒน์, นรีกุล; วิวัฒน์, จันทร์เพ็ญ; พุทธาวุฒิไกร, ปรีชา; สุภเวชย์, สุวณี และ เทพชัยศรี, ประมวญ. 2530. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, กรุงเทพฯ. 287 หน้า

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1268 p.

Janssen, A.M. and Scheffer, J.J.C. 1985. Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of Alpinia galanga. Planta Medica. 6:507-511.

Ridgway, G.L., Owen, J.M. and Oriel, J.D. 1978. The antimicrobial susceptibility of Chlamydia trachomatis in cell culture. British Journal of Venereal Diseases.. 54:103-106.

Ridgway, G.L., Mumtaz, G., Gabriel, G. and Oriel, J.D. 1983. The activity of miokamycin (MOM) against Chlamydia trachomatis and mycoplasmas in vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 12:511-514.

Ripa, K.T. and Mardh, P.A. 1977. Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide treated Mc Coy cells. J. Clin Microbiol. 6:328-31.

Stamm, W.E. and Suchland, R. 1986. Antimicrobial activity of U-70138F (paldimycin), roxithromycin (RU 965), and ofloxacin (ORF 18489) against Chlamydia trachomatis in cell culture. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 30(5):806-807.