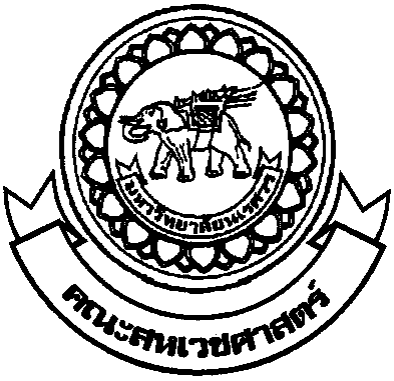


การสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19

Etraction and evaluation of antifungal activity against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai herbal GPO used for Covid-19 patient

นราทิตย์ จันแรง
พีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง
ชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีการศึกษา 2565

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19
ชื่อนิสิต	นายนราทิตย์ จันแรง
	นายพีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง
	นายชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

.....
(ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
(ผศ.ดร. ครรชิต คงรส)
หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์

.....
(รศ.ดร. ศุภวิทู สุขเพ็ง)
คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19
ชื่อนิสิต	นายนราทิตย์ จันแรง นายพีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง นายชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ขอรับรองว่านิสิตผ่านการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ โดยได้มีการปรับปรุงแก้ไขรายงานตามข้อเสนอแนะจากคณะกรรมการแล้ว

ย.ทองศรี
.....
(ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี)
ประธานกรรมการ

.....
(รศ.ดร. กาญจนา อู่สวรรณทิม)
กรรมการ

นภาพร อภิรัฐเมธีกุล
.....
(ดร. นภาพร อภิรัฐเมธีกุล)
กรรมการ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาโครงงานวิชาชีพเทคนิคการแพทย์เรื่อง การสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 ได้ดำเนินการสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ทั้งนี้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนในด้านต่างๆ จากบุคลากรหลายท่าน ทางคณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ ของการวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงาน ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ และให้ความอนุเคราะห์สำหรับเชื้อราในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. กาญจนา อู่สวรรณทิม และ ดร. นภาพร อภิรัฐเมธีกุล เป็นอย่างสูงที่ให้เกียรติมาเป็นคณะกรรมการในการสอบโครงงานในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง และนางสาวชนนิกานต์ ตู้ทอง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ชุดระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ และสถานที่การทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นายกิตติ ปานมณี และนายปาน สถานทุง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ชุดระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ และสถานที่การทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และแนะนำการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

สุดท้ายทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มอบทุนอุดหนุนโครงการพัฒนาคุณภาพวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2565 จำนวน 3,000 บาท

คณะผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่านที่ได้กล่าวนามมาและขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นายนราทิตย์ จันแรง
นายพีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง
นายชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อเชื้อก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19
ชื่อนิสิต นายนราทิตย์ จันแรง
นายพีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง
นายชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์
สาขาวิชา เทคนิคการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ยอดหทัย ทองศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรค Covid-19 ส่งผลกระทบให้ผู้ป่วยบางรายเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อราฉวยโอกาส โรค Covid-19 associated mucormycosis (CAM) และโรค Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) ที่มีความรุนแรงและอันตรายถึงชีวิต ผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมมาถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรค Covid-19 คณะผู้วิจัยจึงทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต่อเชื้อราก่อโรค CAM และ CAPA และทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นละลายด้วยน้ำกลั่น และตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอธิลอะซีเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Mucor* sp. *Aspergillus fumigatus* และเชื้อ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity พบว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าผงฟ้าทะลายโจร สารละลายผงขมิ้นชันด้วยเอธิลอะซิเตทให้ผลดีที่สุดต่อเชื้อ *A. fumigatus* มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อร้อยละ 100 การสกัดสารต้านเชื้อราด้วยวิธี partition method ผลผลิตร้อยละสารสกัดหยาบเมทานอลจากผงขมิ้นชันมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 18.243 และสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรเท่ากับร้อยละ 46.965 เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารกัดหยาบความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี agar disk diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด ค่า inhibition zone เท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร ส่วนผงฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้เพียง 2 สายพันธุ์ การทดสอบคุณสมบัติในการต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมเป็นการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าให้กับสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาทางเลือกแก่ผู้ป่วยโควิด-19 แล้วยังสามารถต้านเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสอันอาจจะพบได้จากการติดเชื้อโควิด-19 ในอนาคตได้อีกด้วย

คำสำคัญ : ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน โรคมิวคอร์ไมโคสิส โรคแอสเปอร์จิลโลสิส

Project Title	Etraction and evaluation of antifungal activity against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai herbal GPO used for Covid-19 patient
By	Narathit Chanraeng
	Peeranut Poorungreang
	Chatchawan Bampenchao
Program Title	Medical Technology
Advisor	Asst. Prof. Yordhathai Thongsri, Ph,D.
Co-advisor	Asst. Prof. Sophit Khanthawong, Ph,D.

Abstract

The affecting of current COVID-19 epidemic in patients complications with COVID-19 associated mucormycosis (CAM) and COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) resulting in fatal and life-threatening. *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) herbal products by the Government Pharmaceutical Organization are use as an alternative treatment for COVID-19 patients while the antifungal activity data still unknown. We aimed to testing the antifungal activity of herbal products against CAM and CAPA pathogenic fungi accompany with suitable solvents extraction of active compounds from both products. A screening antifungal activity test using powder of AP and CL (200 mg/ml) in hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol solvents was conducted with agar toxicity method against five pathogenic fungi including *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. The result of CL powder in ethyl acetate shown better antifungal effect than AP. The most inhibition effect on *A. fumigatus* with the mycelial growth inhibition (MGI) was 100%. The extraction with partition method, % yield of AP with methanol was 18.243% and 46.965% from CL crude extracts. The crude extract (0.6 mg/ml) in 1% DMSO were test for antifungal activity by disc diffusion method. The crude extract from CL could inhibit the mycelial growth of all 5 species of fungi the highest effect was on *A. fumigatus* with an inhibition zone of 12.10 mm. while AP could inhibit the mycelial growth of 2 species. The antifungal properties of AP and CL herbal products here support and added value to Thai medicinal herbs used in alternative treatments for COVID-19 patients whom infected with opportunistic fungi that may be found in COVID-19 patients in the future.

Keywords : *Andrographis paniculata*, *Curcuma longa*, Mucormycosis, Aspergillosis

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	
	ความเป็นมาและความสำคัญเรื่อง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตการวิจัย	3
2	**ทบทวนวรรณกรรม**	4
	โรคโควิด-19	4
	โรค Mucormycosis	13
	โรค Aspergillosis	46
	การรักษาด้วยสมุนไพรทางเลือกต่อเชื้อโควิด-19	58
	การทดสอบความไวของเชื้อราต่อยาต้านจุลชีพ	80
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	85
	แหล่งที่มาของเชื้อ	85
	ผลิตภัณฑ์สมุนไพร	85
	การเพาะเลี้ยงเชื้อ	85
	สารควบคุมคุณภาพ	86
	การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar toxicity	86
	การเตรียมสารสกัด *Andrographis paniculata* และ *Curcuma longa* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	88
	การประยุกต์วิธีทดสอบ antifungal susceptibility test ตามวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A	90
	การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี disc diffusion	90

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการวิจัย**	94
	การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar toxicity	94
	การเตรียมสารสกัดจาก *Andrographis paniculata* และ *Curcuma longa* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	111
	การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี disc diffusion	111
5	**อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย**	127
6	**สรุปผลการวิจัย**	130
เอกสารอ้างอิง		131
ภาคผนวก		140
	ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนการเตรียม	141
	ภาคผนวก ข การเตรียมยาต้านเชื้อจุลชีพ และสารเคมี	145
	ภาคผนวก ค การเตรียมสารสกัด โดยวิธี Partition method	148
	ภาคผนวก ง สารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม	150
	ภาคผนวก จ แบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม	153
ประวัติผู้วิจัย		163

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1	ผู้ป่วย Covid-19 associated mucormycosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา	6
ตาราง 2	ยาต้านเชื้อราสูตรหลักสำหรับ Mucormycosis	41
ตาราง 3	การรักษาอื่น ๆ สำหรับ Mucormycosis (Salvage therapy)	44
ตาราง 4	แสดงการเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยและวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A	90
ตาราง 5	บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. โดยวิธี agar toxicity	95
ตาราง 6	บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp. โดยวิธี agar toxicity	98
ตาราง 7	บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp. โดยวิธี agar toxicity	101
ตาราง 8	บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยวิธี agar toxicity	104
ตาราง 9	บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	107
ตาราง 10	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบโดยวิธี Agar toxicity	109
ตาราง 11	แสดงน้ำหนักสารสกัดหยาบและปริมาณผลผลิตร้อยละสารสกัดหยาบของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรม	111
ตาราง 12	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.	113
ตาราง 13	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ Rhizopus sp. ด้วยวิธี agar well diffusion	114
ตาราง 14	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia sp.*	117

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตาราง 15	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.	119
ตาราง 16	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*	121
ตาราง 17	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	123
ตาราง 18	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การจากองค์การเภสัชกรรมต่อชาที่ใช้ทดสอบโดยวิธี disc diffuision	124
ตาราง 19	สารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม	151
ตาราง 20	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.	154
ตาราง 21	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. โดยวิธี Agar well diffusion	155
ตาราง 22	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.	157
ตาราง 23	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.	158
ตาราง 24	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*	160
ตาราง 25	แสดงแบบบันทึกการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	161

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1	แสดงถึงการแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ทั่วโลกรายงานจาก WHO	4
ภาพ 2	แสดงลักษณะโครงสร้างของยา Remdesivir	8
ภาพ 3	แสดงลักษณะโครงสร้างของยา Favipiravir	9
ภาพ 4	แสดงลักษณะโครงสร้างของยา Chloroquine และ Hydroxychloroquine	10
ภาพ 5	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดสารพันธุกรรม	11
ภาพ 6	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดใช้ไวรัสเป็นพาหะ	12
ภาพ 7	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดส่วนของโปรตีน	13
ภาพ 8	แสดงการสืบพันธุ์ของเชื้อราในไฟลัม Zygomycota	15
ภาพ 9	แสดงลักษณะของเชื้อ *Mucor* sp.	16
ภาพ 10	แสดงลักษณะของเชื้อ *M. circinelloides*	17
ภาพ 11	แสดงลักษณะของเชื้อ *M. ramosissimus*	18
ภาพ 12	แสดงลักษณะของเชื้อ *Rhizopus* sp.	19
ภาพ 13	แสดงลักษณะของเชื้อ *R. arrhizus*	19
ภาพ 14	แสดงลักษณะของเชื้อ *R. rhizopodiformis*	20
ภาพ 15	แสดงลักษณะของเชื้อ *Absidia* sp.	21
ภาพ 16	แสดงลักษณะของเชื้อ *A. Corymbifera*	22
ภาพ 17	แสดงลักษณะรอยโรค Rhinocerebral Mucormycosis	27
ภาพ 18	Computerized tomography (CT) scan ปอดของผู้ป่วยโรค pulmonary mucormycosis	28
ภาพ 19	ภาพแสดงรอยโรคที่ผิวหนังของ Mucormycosis	29
ภาพ 20	CT scan ของกระเพาะอาหารแสดงบริเวณที่เป็นรอยขาดของผนังลำไส้และภาพระหว่างการผ่าตัดในลำไส้เล็ก	30
ภาพ 21	แสดงภาพการย้อม KOH wet mount	33
ภาพ 22	แสดงลักษณะของเชื้อก่อโรค Mucormycosis	36
ภาพ 23	แสดงลักษณะโครงสร้างของ Amphotericin B	38
ภาพ 24	แสดงลักษณะโครงสร้างของ Posaconazole	39

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 26	แสดงลักษณะโครงสร้างของ Defrasirox	40
ภาพ 27	แสดงลักษณะของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	47
ภาพ 28	ภาพเอ็กซ์เรย์ทรวงอกของผู้ป่วยโรค	48
ภาพ 29	แสดงภาพเอ็กซ์เรย์ทรวงอกของผู้ป่วยโรค Extrinsic Allergic Alveolitis	48
ภาพ 30	แสดงผลการสแกนด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ความละเอียดสูงบริเวณหน้าอก	49
ภาพ 31	ผลของ CT scan กลีบด้านบนขวาของปอด และพบเชื้อราอยู่ภายในช่องปอด	50
ภาพ 32	ผลของ CT scan ของผู้ป่วยที่เป็นโรค nervous system aspergillosis	50
ภาพ 33	แสดงลักษณะของรอยโรคที่ผิวหนังหลายจุดบนขาของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกและเมื่อนำไปเพาะเชื้อพบเชื้อ *A. fumigatus* เกิดขึ้น (68)	51
ภาพ 34	การวินิจฉัยโรค otomycosis ด้วย otoscopy	52
ภาพ 35	แสดงรอยโรคที่เล็บนิ้วโป้งเท้าด้านขวามีลักษณะสีดำเกิดจากเชื้อ *A. niger* และผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์	52
ภาพ 36	แสดงลักษณะของเชื้อ *Aspergillus* sp. ในเนื้อเยื่อ ย้อมด้วยสีต่างๆ	54
ภาพ 37	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA	55
ภาพ 38	แสดงลักษณะโครงสร้างของ Voriconazole	57
ภาพ 39	แสดงลักษณะโครงสร้างของ Echinocandins	58
ภาพ 40	แสดงลักษณะส่วนต่างๆ ของ *Andrographis paniculata*	59
ภาพ 41	แสดงลักษณะโครสร้างต่างๆ ของสารในกลุ่มเอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีน	61
ภาพ 42	แสดงลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์	62
ภาพ 43	แสดงกลไกการยับยั้งไวรัสเอชไอวีของฟ้าทะลายโจร	65
ภาพ 44	แสดงกลไกการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ของฟ้าทะลายโจร	67
ภาพ 45	แสดงกลไกการยับยั้งไวรัส SARS-CoV2 ของฟ้าทะลายโจร	69
ภาพ 46	แสดงลักษณะของต้นขมิ้นชัน	70
ภาพ 47	แสดงถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมีต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน	71
ภาพ 48	แสดงถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมีต่างๆ ของสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์	72
ภาพ 49	แสดงกลไกการยับยั้งไวรัส SARS-CoV2 ของขมิ้นชัน	76

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 50	แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อรา 1 สายพันธุ์ด้วยวิธี agar toxicity	87
ภาพ 51	แสดงการสกัดผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี Partition method	89
ภาพ 52	แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar disc diffusion	91
ภาพ 53	แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของชั้น aqueous จากการสกัดผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar disc diffusion	92
ภาพ 54	แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.	96
ภาพ 55	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน	96
ภาพ 56	แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.	99
ภาพ 57	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน	99
ภาพ 58	แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.	102
ภาพ 59	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน	102
ภาพ 60	แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*	105
ภาพ 61	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus flavus* เมื่อทดสอบผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน	105
ภาพ 62	แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	108

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 63	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน	108
ภาพ 64	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar toxicity	110
ภาพ 65	แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วยฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรม ที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	110
ภาพ 66	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.	114
ภาพ 67	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion	116
ภาพ 68	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.	118
ภาพ 69	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.	120
ภาพ 70	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*	122
ภาพ 71	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	124
ภาพ 72	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อราก่อโรคโดยวิธี disc diffusion	125
ภาพ 73	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	125

สัญลักษณ์และคำย่อ

AP	*Andrographis paniculata*
CL	*Curcuma longa*
DI	Deionized water
Hex	Hexane
DCM	Dichloromethane
EtOAc	Ethyl acetate
MeOH	Methanol

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ในปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่หรือที่เรียกว่า SARS-CoV-2 ไวรัสและโรคอุบัติใหม่นี้มีการเริ่มระบาดในเมืองอู่ฮั่นประเทศจีนในเดือนธันวาคมปี 2019 และมีการระบาดใหญ่ไปทั่วส่งผลกระทบแก่หลายประเทศทั่วโลก (1) อีกทั้งผู้ป่วยหลายรายได้รับผลกระทบจากการเป็นโรคเป็นระยะเวลานานทำให้ร่างกายอ่อนแอลง เรียกว่าภาวะ Long Covid โดยภาวะ Long Covid หรือ Post Covid Syndrome คืออาการหลงเหลือหลังการติดเชื้อโควิด-19 ในระยะยาว เนื่องจากในขณะที่ป่วยร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีบางอย่างขึ้นมาไปจับกับโปรตีนเซลล์ของอวัยวะบางส่วนในร่างกายและไปทำลายอวัยวะส่วนต่างๆ บางรายอาจมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงขณะรับการรักษา ซึ่งผลกระทบของ Long Covid สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วร่างกายตั้งแต่ระบบหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร และระบบหัวใจหลอดเลือด โดยภาวะแทรกซ้อนรุนแรงที่พบได้ในผู้ป่วยติดเชื้อโควิด-19 เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราแทรกซ้อน เนื่องจากระบบทางเดินหายใจเสียหายจากโรคโควิด-19 เชื้อส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นเชื้อในกลุ่มของโรคทางเดินหายใจ เช่น เชื้อแบคทีเรีย Mycoplasma pneumoniae เชื้อราในกลุ่ม Aspergillosis และ Candidiasis ซึ่งจะเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้บ่อยในกลุ่มคนที่มีภาวะ Long Covid (2)

มีรายงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อ Mucormycosis ในผู้ป่วยโควิด-19 ที่เพิ่มขึ้นทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย โรค Mucormycosis หรือโรคราดำ (Black fungus) เป็นโรคติดเชื้อราที่ลุกลามอย่างรวดเร็วทางหลอดเลือด (Angio invasive) เป็นภาวะร้ายแรงที่ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยหลายกลุ่ม ซึ่งเชื้อราที่ก่อโรคในกลุ่ม Mucormycosis ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. และ *Absidia* sp. นอกจากนี้ยังอาจส่งผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อราฉวยโอกาสอื่นๆ ได้ เช่น โรค Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) เป็นต้น ที่มีเชื้อก่อโรคหลัก คือ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* โดยสาเหตุหลักที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อราฉวยโอกาส คือ สภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำ (Hypoxia) กลูโคสสูง (Diabetes, New-onset hyperglycemia, Steroid induced hyperglycemia) ภาวะที่เป็นกรด (Metabolic acidosis, Diabetic keto-acidosis) ระดับธาตุเหล็กสูง และการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงจากการกดภูมิคุ้มกันร่วมกับปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ รวมถึงการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน (3, 4)

ในปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสที่จำเพาะสำหรับการรักษาโรคโควิด-19 จึงมีการรักษาด้วยยาที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงมากที่สุด เช่น Remdesivir (GS-5734) Favipiravir (T-705) และ Chloroquine (5) แต่การรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันนั้นอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยได้ อีกทั้งยังมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก จึงมีการนำสมุนไพรธรรมชาติบางชนิดมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคโควิด-19 เช่น ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน เป็นต้น เนื่องจากมีการศึกษาวิจัยพบว่า สมุนไพรบางชนิดมีกลไกต้านไวรัส ป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าเซลล์ ลดการแบ่งตัวไวรัสภายในเซลล์ เพิ่มภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับไวรัส และลดการอักเสบที่ปอดจากการติดเชื้อไวรัสได้ (6, 7) อีกทั้งการรักษาด้วยยาสมุนไพรนั้นให้ผลการรักษาได้ดีใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน มีความปลอดภัยแก่ผู้ใช้มากกว่า และสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นเพราะส่วนใหญ่เป็นพืชซึ่งมีอยู่ทั่วไปทั้งในเมืองและชนบท นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพได้มากมาย และสมุนไพรบางชนิดยังสามารถรักษาโรคบางชนิดได้โดยไม่ต้องใช้ยาแผนปัจจุบันอีกด้วย (8)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสมุนไพรไทยนั้นมีสรรพคุณที่หลากหลายในการรักษาโรคหรืออาการผิดปกติต่างๆ ของร่างกายได้และยังมีการนำสมุนไพรมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคโควิด-19 ซึ่งการนำสารสกัดที่สำคัญจากสมุนไพรมาใช้นั้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้นได้ ทางคณะผู้จัดทำจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสมุนไพรที่นำมาใช้การรักษาโรคติดเชื้อโควิด-19 ต่อเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม Mucormycosis และ Aspergillosis ที่พบในผู้ป่วยโควิด-19 เพื่อเป็นการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าให้กับสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 แล้วยังสามารถต้านเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสอันอาจจะพบได้จากการติดเชื้อโควิด-19 ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 ต่อเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสในกลุ่ม Mucormycosis ซึ่งได้แก่เชื้อ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. และ *Absidia* sp. รวมทั้งเชื้อราก่อโรค Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus*
2. เพื่อทดสอบหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราฉวยโอกาสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ต่อการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราฉวยโอกาส 5 สายพันธุ์ คือ เชื้อราก่อโรคฉวยโอกาสในกลุ่ม Mucormycosis ซึ่งได้แก่เชื้อ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรค Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus*
2. ประเมินผลของตัวทำละลายในการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราฉวยโอกาสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ Hexane Dichloromethane Ethyl acetate และ Methanol

บทที่ 2

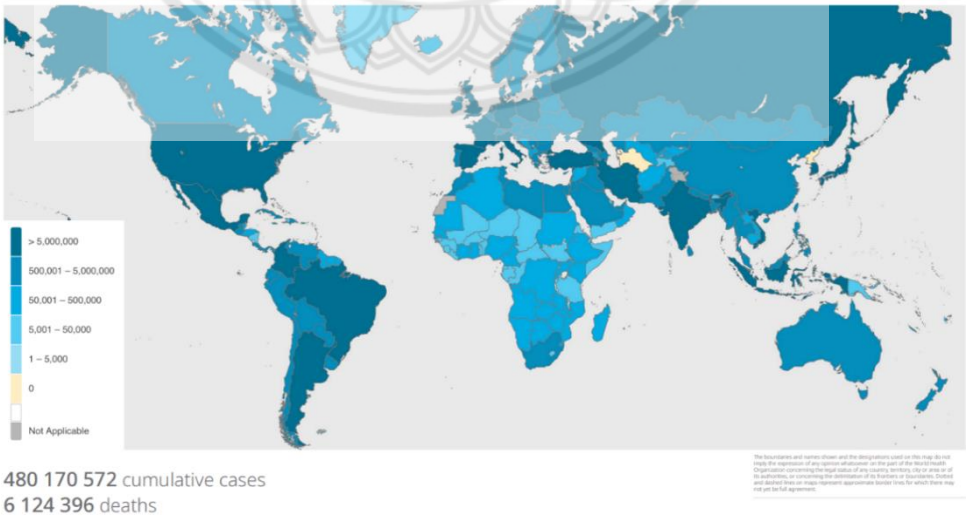
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคโควิด-19

โรคโควิด-19 คือ โรคติดต่อซึ่งเกิดจากไวรัสโคโรนาชนิดที่มีการค้นพบล่าสุด ได้แก่ Severe Acute Respiratory Syndrome Corona virus 2 (SARS-CoV-2) ซึ่งไวรัสและโรคอุบัติใหม่นี้ไม่เป็นที่รู้จักเลยก่อนที่จะมีการระบาดในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีนในเดือนธันวาคมปี 2019 ขณะนี้โรคโควิด-19 มีการระบาดใหญ่ไปทั่ว ส่งผลกระทบแก่หลายประเทศทั่วโลก

2.1.1 การระบาดของโรคโควิด-19

ตั้งแต่พบการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ครั้งแรก การระบาดของโควิด-19 ในปัจจุบันยังจัดเป็นภาวะฉุกเฉินระดับโลก ช่วงสิ้นปี ค.ศ. 2021 มีเชื้อโควิดสายพันธุ์ omicron เกิดขึ้นโดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปทั่วโลกได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มมากกว่า 143 ล้านรายจากทั่วโลกในช่วงสองเดือนแรกของปี ค.ศ. 2022 จากเหตุการณ์การระบาดของเชื้อสายพันธุ์ omicron มีผู้เสียชีวิตจากโรคโควิด-19 ทั่วโลกเกือบ 6 ล้านรายซึ่งเป็นจำนวนที่สูง ดังแสดงในภาพ 1 อีกทั้งผู้ป่วยหลายรายได้รับผลกระทบจากการเป็นโรคเป็นระยะเวลานานทำให้ร่างกายอ่อนแอลง ดังนั้นในปี ค.ศ. 2022 WHO จึงได้ปรับเปลี่ยนกลยุทธ์ในการป้องกันโรคโควิด-19 ที่สำคัญหลายประการ ถ้าหากดำเนินการอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอจะช่วยให้โลกสามารถยุติการระบาดครั้งใหญ่นี้ได้ (9)



ภาพ 1 แสดงถึงการแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ทั่วโลกรายงานจาก WHO (9)

2.1.2 การระบาดของโรค Covid-19 associated mucormycosis (CAM) และ Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)

ปัจจุบันการระบาดครั้งใหญ่ที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันอย่างรุนแรงจากเชื้อ SARS-CoV-2 จากการรักษาด้วยยา corticosteroid ซึ่งสามารถลดอัตราการตายได้ แต่ถ้าดูร่วมกับระดับภูมิคุ้มกันและปัจจัยอื่นๆ ทางคลินิกอาจส่งผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อราฉวยโอกาส เช่น โรค Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA), Candida infections, Covid-19 associated mucormycosis (CAM) เป็นต้น โดยปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อราฉวยโอกาสมีมากมาย เช่น ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เบาหวาน เม็ดเลือดขาวต่ำ มะเร็งทางโลหิต การปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น จากรายงานพบว่ามีผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากจากการสำรวจ 18 ประเทศ ส่วนใหญ่มาจากประเทศอินเดีย สหรัฐอเมริกา ปากีสถาน ฝรั่งเศส อิหร่าน และเม็กซิโก เป็นต้น (4)

2.1.2.1 ประเทศอินเดีย

จากการระบาดของโรคโควิด-19 ที่ร้ายแรงรอบสองในประเทศอินเดีย พบการติดเชื้อราดำขั้นรุนแรงในผู้ป่วยโควิด-19 โดยการติดเชื้อราเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณศีรษะ ลำคอ จมูก และยังพบอาการไซนัสบริเวณกระดูกใบหน้า โดยเชื้อราอาจมีการแพร่กระจายภายในกะโหลกศีรษะ ซึ่งโรคนี้ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในอัตราที่สูงขึ้น เนื่องจากมีการดำเนินโรคไปอย่างรวดเร็วและการวินิจฉัยที่ล่าช้า กระทรวงสาธารณสุขอินเดียจึงได้ประกาศให้โรค Mucormycosis จัดเป็นโรคระบาด โดยพบว่าโรคติดเชื้อราในประเทศอินเดียนี้เชื่อมโยงกับการติดเชื้อโควิด-19 สายพันธุ์ B.1.617.2 (เดลต้า) ซึ่งสามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วทั่วประเทศ (10) และจากรายงานในปี ค.ศ. 2021 พบผู้ป่วยโรค CAM จำนวน 14,872 รายในประเทศอินเดีย (11) นอกจากนี้ยังมีการรายงานผู้ป่วยโรค CAPA โดยมีความชุกและอัตราการเสียชีวิตเท่ากับ 6.4% (74/1161) และ 47.3% (35/74) ตามลำดับ (12)

2.1.2.2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

ในช่วงที่ผ่านมามีรายงานการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยที่เป็นโรค CAM มักพบในผู้ที่มีโรคประจำตัวโรคต่างๆ เช่น เบาหวาน ภาวะเลือดเป็นกรด เป็นต้น ในผู้ป่วยเหล่านี้จะพบอาการทางคลินิกที่บ่อยที่สุดคือ Rhino-orbital mucormycosis ตามด้วย Rhino-orbital-cerebral mucormycosis ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อ SARS CoV-2 (13) ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผู้ป่วย Covid-19 associated mucormycosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา (13)

Age	Sex	Underlying disease	Clinical manifestations
24	Female	Diabetes mellitus, Ketoacidosis, Atypical pneumoniae	Rhino-orbital
35	Male	Uncontrolled type 2 diabetes mellitus	Rhino-orbital-cerabral
52	Female	Overweight, Smoking	Rhino-orbital
35	Male	Uncontrolled diabetes, obesity	Rhino-orbito-cerabral
68	Male	Diabetes mellitus, Dyslipidemia, Mycosis of external auditory canal	Rhino-orbital
51	Female	Diabetes mellitus, Chronic renal insufficiency	Rhino-orbital
33	Female	Uncontrolled diabetes, Asthma	Rhino-orbito-cerabral
49	Male	Immune system compromise	Pulmonary
60	Male	Uncontrolled diabetes, Arterial hypertension, Asthma	Rhino-orbito-cerabral
70	Male	Heart disease, Arterial hypertension	Rhino-orbito-cerabral
61	Male	Heart disease, Lung transplantation	Pulmonary
74	Female	Arterial hypertension, Diabetes mellitus	Rhino-orbital
45	Female	Arterial hypertension, Diabetes mellitus	Rhino-orbital
51	Female	Diabetic type 2 IR, chronic hypertensive, obese, severe Covid-19 pneumonia, severe acute respiratory failure	Rhino-orbital
56	Male	Arterial hypertension, Asthma	Rhino-orbital

2.1.2.3 ประเทศปากีสถาน

Mucormycosis เป็นโรคติดเชื้อราที่มีอัตราการชีวิตมากที่สุดมักเกิดในผู้ป่วยที่ไม่ควบคุมเบาหวานได้ ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคโควิด-19 โดยในประเทศปากีสถานพบผู้ป่วยโรค CAM มีอัตราเสียชีวิตที่สูง ซึ่งการศึกษาเชิงสำรวจนี้จะศึกษาในผู้ป่วยวัยผู้ใหญ่ที่เป็นโรคโควิด-19 ขั้นรุนแรงตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงพฤษภาคมปี ค.ศ. 2021 ที่ศูนย์ดูแลขนาด 700 เตียง ในเมืองการาจี ประเทศปากีสถาน ซึ่งผู้ป่วย CAM จะถูกจัดอยู่ในประเภทติดเชื้อไวรัสโควิด-19 ในระดับรุนแรงตามเกณฑ์อาการทางคลินิกของ WHO โดยผู้ป่วยที่ติดเชื้อโควิด-19 รวม 2839 ราย ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ 280 ราย และพบผู้ป่วย 10 รายถูกระบุว่ามีการติดเชื้อราฉวยโอกาสซึ่งมีอายุเฉลี่ยประมาณ 63 ปี อัตราส่วนชายต่อหญิง เท่ากับ 3:2 (14)

2.1.2.4 ประเทศฝรั่งเศส

โรคโควิด-19 มีความรุนแรงเพิ่มสูงขึ้นจากการติดเชื้อราฉวยโอกาสในกลุ่ม Mucormycosis และ Aspergillosis ซึ่งสามารถทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตที่สูง โดยพบว่าในประเทศฝรั่งเศสมีการรายงานผู้ป่วยโรค CAM จำนวน 17 ราย ซึ่งเป็นจำนวนที่มาก อีกทั้งยังมีการสำรวจอาการทางคลินิก ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และพบว่ามีอัตราการตายที่สูงมากกว่าร้อยละ 75 ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์ (15) นอกจากนี้ยังมีการรายงานผู้ป่วย CAPA จำนวน 11 รายและมีอัตราการเสียชีวิตเท่ากับ 45% (11)

2.1.2.5 ประเทศอิหร่าน

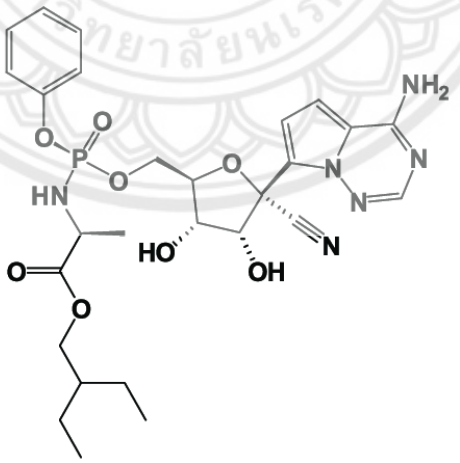
ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงกันยายนปี ค.ศ. 2020 ในประเทศอิหร่านมีการรายงานผู้ป่วยโควิด-19 จำนวน 58 ราย ได้รับการวินิจฉัยเกี่ยวกับโรค mucormycosis เมื่อทำการตรวจพบว่ามีผู้ป่วย 15 ราย รับการยืนยันว่าเป็นโรค CAM ซึ่งมีอายุเฉลี่ยประมาณ 52 ปี และ 66% เป็นเพศชาย ผู้ป่วยทุกรายมีโรคประจำตัว ได้แก่ โรคเบาหวาน และความดันโลหิตสูง โดยเมื่อทำการวินิจฉัยส่องกล้องระหว่างผ่าตัด และการประเมินทางจุลพยาธิวิทยา พบผู้ป่วยเป็นโรค Rhino-orbital mucormycosis (ROM) จำนวน 7 ราย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 47 ในผู้ป่วยโควิด-19 และผู้ป่วยที่เป็นโรค Sino-orbital mucormycosis (SOM) ร้อยละ 33 (16)

2.1.3 การรักษาโรคโควิด-19

ปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสที่เฉพาะสำหรับการรักษาโรคโควิด-19 แต่การรักษาที่เป็นไปได้และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงมากที่สุด คือ ยาเรมเดเซเวียร์ (GS-5734) เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่ต่ำและมีผลการรักษาที่น่าพอใจในโรคซาร์สและเมอร์ส อีกตัวที่แนะนำได้แก่ ยาฟาวิพิราเวียร์ (T-705) และอาจจะพิจารณาใช้ยาคลอโรควินอีกด้วย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้ยายับยั้งเชื้อ SARS-CoV-2 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

2.1.3.1 Remdesivir (GS-5734)

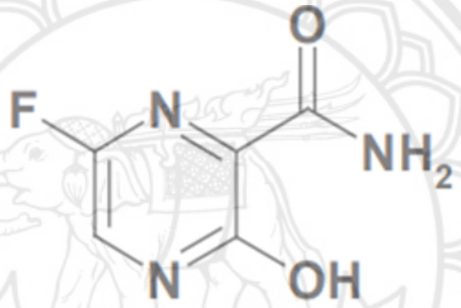
เรมเดเซเวียร์ (Remdesivir) เป็นยาที่จะเข้าไปแย่งจับกับเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ส่งผลให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส จากข้อมูลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายาสามารถยับยั้งกระบวนการ replication ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเมื่อใช้ยากับเชื้อ SARS-CoV ให้ค่า IC50 เท่ากับ 0.069 ไมโครโมลาร์ และเชื้อ MERS-CoV ให้ค่า IC50 เท่ากับ 0.074 ไมโครโมลาร์ ยาเรมเดเซเวียร์มีฤทธิ์ต้านที่ดีส่งผลให้การทำงานของปอดดีขึ้น ปริมาณไวรัสในปอดลดลง และลดพยาธิสภาพของปอด แต่ยาชนิดนี้ยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาในผู้ป่วยโควิด-19 ได้แก่ หายใจล้มเหลว อัลบูมินต่ำ โพแทสเซียมต่ำ เม็ดเลือดแดงต่ำ เกล็ดเลือดต่ำ สีผิวเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ระดับของเอนไซม์ transaminases สูงขึ้น เป็นต้น (17) โดยในการรักษาใช้ยาขนาด 200 มิลลิกรัมในวันแรก และวันถัดไปใช้ยาขนาด 100 มิลลิกรัม รับประทานวันละครั้งเป็นเวลา 9 วัน ซึ่งยาชนิดนี้มีโครสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพ 2



ภาพ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของยา Remdesivir (18)

2.1.3.2 Favipiravir (T-705)

ยาฟาวิพีราเวียร์ (Favipiravir) มีกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของเชื้อไวรัส จากการศึกษายาฟาวิพิราเวียร์มีประสิทธิภาพการรักษาในผู้ป่วยโควิด-19 ที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง โดยยาสามารถกำจัดไวรัสภายหลังจากการรักษา 7 วัน อีกทั้งยังมีส่วนช่วยให้อาการทางคลินิกดีขึ้นอีกด้วย แต่การใช้ยาชนิดนี้ยังคงมีอาการข้างเคียง เช่น เอนไซม์ transaminase เพิ่มสูงขึ้น ท้องเสีย คลื่นไส้ ปวดท้อง น้ำตาลในเลือดสูง และภาวะเกล็ดเลือดต่ำ เป็นต้น (19) โดยส่วนใหญ่ขนาดยาที่ใช้ ได้แก่ 1,600 มิลลิกรัม รับประทานวันละสองครั้งในวันแรก และวันถัดไปใช้ยาขนาด 600 มิลลิกรัม รับประทานวันละสองครั้งเป็นระยะเวลา 6 วัน อย่างไรก็ตามต้องรอการศึกษาพัฒนายาฟาวิพิราเวียร์ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโควิด-19 ซึ่งยาชนิดนี้มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพ 3

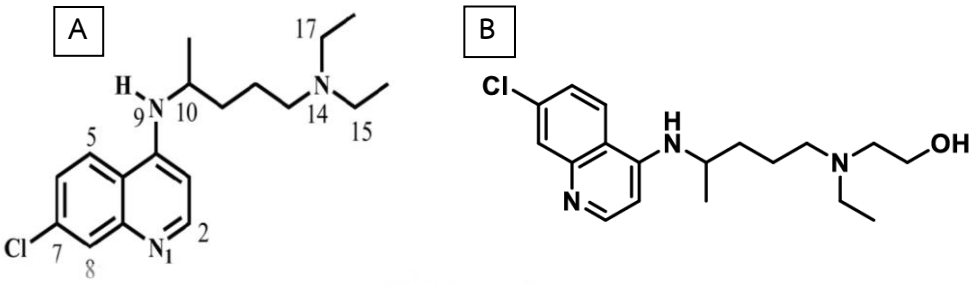


ภาพ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของยา Favipiravir (20)

2.1.3.3 Chloroquine

คลอโรควิน (Chloroquine) เป็นยาต้านมาเลเรียที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส โดยมีการเพิ่มค่า pH ของเอนโดโซมซึ่งจำเป็นสำหรับการรวมตัวกันของไวรัส โดยยาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ที่ค่า EC50 เท่ากับ 1.13 ไมโครโมลาร์ อีกทั้งยาคลอโรควินยังมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มเติมโดยสามารถยับยั้งการผลิตและการปล่อยไซโตไคน์ tumor necrosis factor (TNF) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะการอักเสบของโรคไวรัสหลายชนิด นอกจากนี้ไฮดรอกซีคลอโรควิน (Hydroxychloroquine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่เป็นพิษน้อยกว่าคลอโรควิน สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ภายในหลอดทดลองด้วยค่า EC50 เท่ากับ 4.06 ไมโครโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาคลอโรควิน แต่ผลการศึกษาพบว่ายาชนิดนี้มีผลข้างเคียง เช่น อาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง ภาพซ้อน ผิวแห้ง ชัก กล้ามเนื้ออ่อนแรง กล้ามเนื้ออักเสบ เรื้อรัง นอนไม่หลับ หงุดหงิด โรคจิต ซึมเศร้า วิตกกังวล ก้าวร้าว เป็นต้น (17) โดยขนาดยาคลอโรควินที่ใช้ในการรักษาโรคโควิด-19 คือรับประทานขนาด 500-1,000 มิลลิกรัมต่อวัน

เป็นระยะเวลา 7-10 วัน หรือยาไฮดรอกซีคลอโรควินขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 5-10 วัน ซึ่งยา Chloroquine และ Hydroxychloroquine มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพ 4 (5, 21)



ภาพ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของ (A) ยา Chloroquine
(B) ยา Hydroxychloroquine (22, 23)

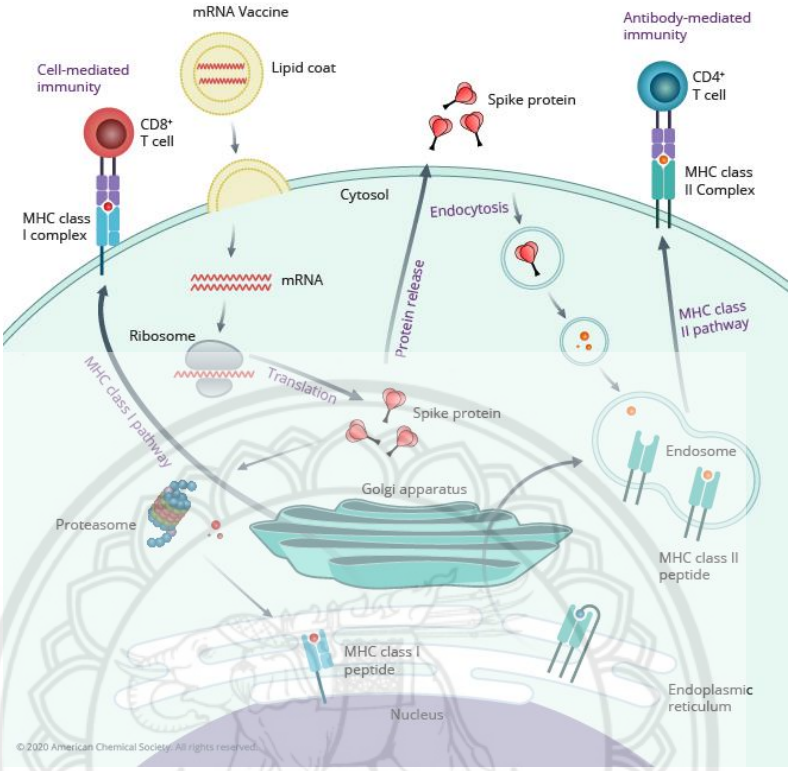
2.1.4 การป้องกันโรคโควิด-19

2.1.4.1 วัคซีน

วัคซีนโควิด-19 มีประสิทธิภาพในการป้องกันไม่ให้ป่วยร้ายแรง ลดอัตราในการเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาและการเสียชีวิต ดังนั้นการฉีดวัคซีนเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการชะลอการแพร่กระจายของ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคโควิด-19 (24) โดยในปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคโควิด-19 แบ่งออกเป็น 4 ประเภทได้แก่

1. วัคซีนชนิดสารพันธุกรรม (mRNA vaccine)

วัคซีนกลุ่มนี้จะใช้เทคโนโลยีใหม่สังเคราะห์สารพันธุกรรมเอ็มอาร์เอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส โดยวัคซีนจะทำหน้าที่พา mRNA เข้าเซลล์ และกำกับให้เซลล์ผลิตสารโปรตีนสไปค์ของเชื้อไวรัส ซึ่งโปรตีนนี้จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านเชื้อ ดังแสดงในภาพ 5 ซึ่งวัคซีนที่มีใช้ ได้แก่ วัคซีนของบริษัท Pfizer และ Moderna จากข้อมูลวัคซีนชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ประมาณ 95% ป้องกันการป่วยรุนแรงและป้องกันการเสียชีวิตได้ 100% วัคซีนของบริษัท Pfizer ควรได้รับการฉีด 2 เข็มเข้ากล้ามเนื้อห่างกัน 3 สัปดาห์ ส่วนวัคซีนของบริษัท Moderna ควรได้รับการฉีด 2 เข็มเข้ากล้ามเนื้อห่างกัน 4 สัปดาห์ (25)

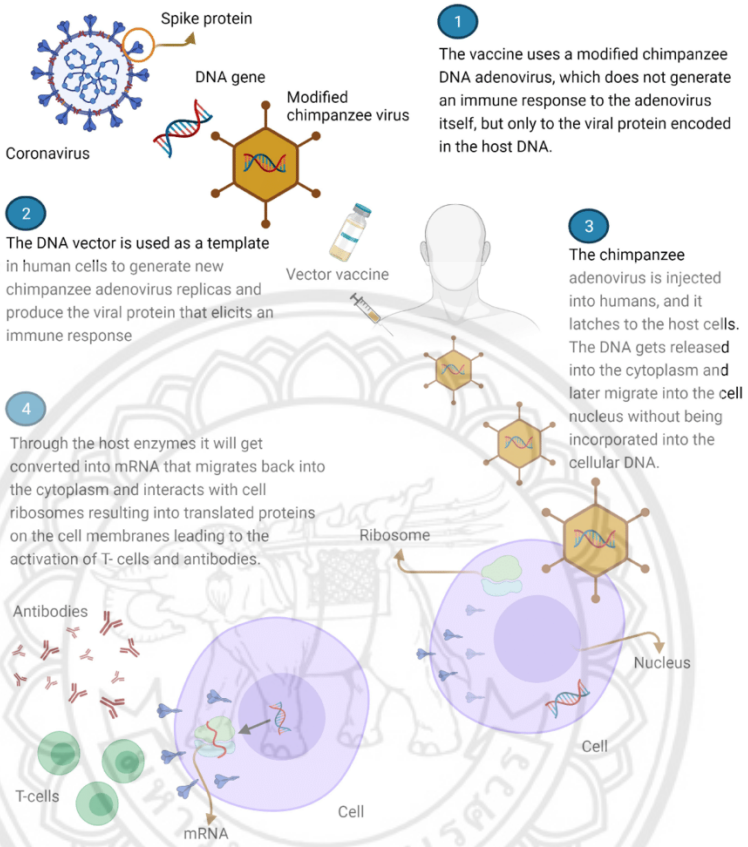


ภาพ 5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดสารพันธุกรรม (26)

2. วัคซีนชนิดใช้ไวรัสเป็นพาหะ (Recombinant viral vector vaccine)

วัคซีนกลุ่มนี้ใช้ไวรัสที่สามารถดัดแต่งพันธุกรรมได้ เช่น ไวรัสอะดีโน (Adenovirus) โดยนำมาดัดแปลงพันธุกรรมให้ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และใส่สารพันธุกรรมของไวรัสโรคโควิด-19 ติดไปด้วย เมื่อนำมาฉีดไวรัสพาหะเหล่านี้จะเลียนแบบการติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งระบบให้สร้างแอนติบอดีต่อไวรัสโรคโควิด-19 ตามสารพันธุกรรมที่ใส่เข้าไป ดังแสดงในภาพ 6 อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะเป็นวัคซีนที่มีไวรัสอะดีโนไม่แบ่งตัว แต่ยังจัดเป็นไวรัสที่มีชีวิต เมื่อเข้าสู่ร่างกาย จึงยังไม่แนะนำให้ใช้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างมาก ซึ่งวัคซีนชนิดนี้ที่ใช้กันแพร่หลายมี 4 แบรนด์ ได้แก่ ไวรัสอะดีโนของชิมแพนซี (Chimpanzee adenovirus) โดยบริษัท Astra Zeneca มีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ 70-80% ป้องกันการเสียชีวิตได้ 100% ไวรัสอะดีโนของมนุษย์สายพันธุ์ 5 (Human adenovirus type 5) โดยบริษัท CanSinoBio มีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ 60%, ไวรัสอะดีโนของมนุษย์สายพันธุ์ 26 (Human adenovirus type 26) โดยบริษัท Johnson and Johnson มีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ

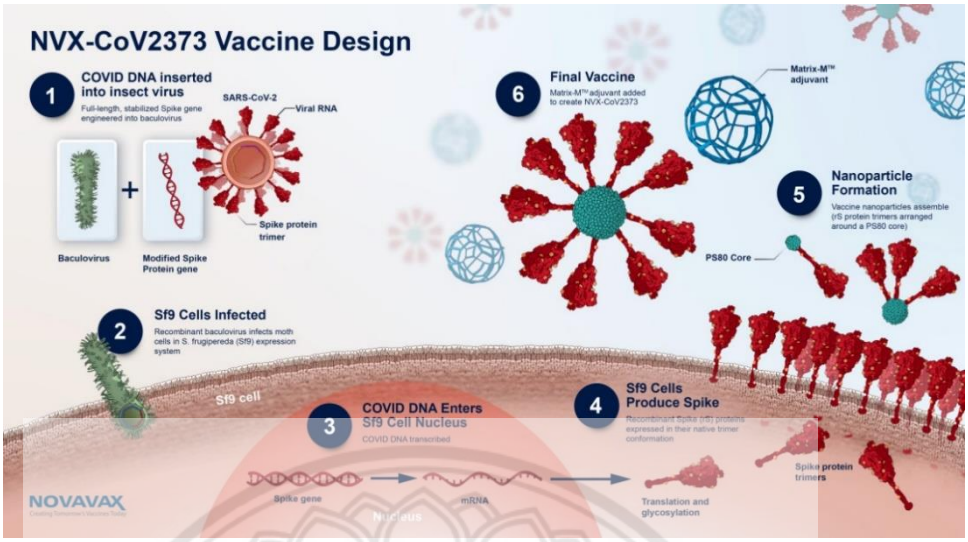
64-72% และ ไวรัสอะดีโนของมนุษย์สายพันธุ์ 5 และ 26 (Human adenovirus type 5 and 26) โดยบริษัท Gamaleya ของรัสเซียมีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ 90% (25)



ภาพ 6 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดใช้ไวรัสเป็นพาหะ (27)

3. วัคซีนที่ทำจากโปรตีนส่วนหนึ่งของเชื้อ (Protein subunit vaccine)

เป็นประเภทวัคซีนที่ทั่วโลกมีความคุ้นเคยมานาน เพราะใช้ในการผลิตวัคซีนหลายชนิด เช่น วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี เป็นต้น ผลิตโดยการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสด้วยระบบ cell culture yeast และ baculovirus เป็นต้น แล้วนำมาผสมกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อฉีดเข้าสู่ร่างกายจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อต้านโปรตีนสไปค์ของไวรัสโรคโควิด-19 ดังแสดงในภาพ 7 วัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบัน คือ วัคซีนแบรนด์ Novavax ซึ่งผลิตจาก baculovirus และใช้ Matrix M เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ 60-90% ป้องกันการเสียชีวิตได้ 100% (25)



ภาพ 7 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของวัคซีนชนิดส่วนของโปรตีน (28)

4. วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine)

วัคซีนกลุ่มนี้ผลิตโดยนำไวรัสโรคโควิด-19 มาเลี้ยงจำนวนมาก และนำมาทำให้เชื้อตาย การฉีดวัคซีนจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสทุกส่วน เหมือนได้รับเชื้อไวรัสโดยตรงแต่ไม่ทำให้เกิดโรค เพราะเชื้อตายแล้วเทคโนโลยีนี้เป็นวิธีที่ใช้กับวัคซีนตับอักเสบเอ โปลิโอชนิดฉีด จึงมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมานาน แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไวรัสต้องใช้ความระมัดระวังมาก ทำให้ผลิตได้ช้าและมีราคาแพง วัคซีนที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ วัคซีนของบริษัท Sinovac มีประสิทธิภาพป้องกันอาการประมาณ 50-70% ป้องกันการเสียชีวิตได้ 100% (25)

2.2 โรค Mucormycosis

โรค Mucormycosis หรือ Zygomycosis เป็นโรคติดเชื้อราฉวยโอกาสที่พบได้ในผู้ป่วยโรคเรื้อรังอื่นๆ สามารถเกิดได้กับหลายอวัยวะของร่างกาย เชื้อราสามารถบุกรุกเข้าเส้นเลือดแดงและเกิดการอุดตัน โรคมีความรุนแรงจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ สามารถพบโรคนี้ได้ทั่วโลก (29) สำหรับเชื้อราชนิดที่เป็นสายจะมี 2 แบบ คือ แบบที่มีผนังกั้นนิวเคลียส ไซโตพลาซึมของแต่ละเซลล์อยู่เป็นสัดส่วนไม่ปะปนกัน และแบบที่ไม่มีผนังกั้นนิวเคลียส ไซโตพลาซึมของแต่ละเซลล์จะปะปนกัน เชื้อราชนิดไม่มีผนังกั้นทางการแพทย์จะจัดอยู่ในไฟลัม Zygomycota ซึ่งเมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างสปอร์ชนิดไซโกสปอร์ (zygospore) และแบบไม่อาศัยเพศจะเป็นการสร้างสปอร์ที่อยู่ในอับสปอร์ (sporangiospores in sporangium) ลักษณะของเชื้อราชนิดนี้ขนาดและสายราจะกว้างกว่าราชนิดที่มีผนังกั้น (5 – 15 ไมโครเมตร) และผนังของสายราบางกว่าด้วย เชื้อราชนิดนี้สายรามักฟู ทำให้มองแยกออกจากสายราชนิดที่มีผนังกั้นได้ง่าย บางกรณีสายราชนิดนี้อาจสร้างผนังกั้นขึ้นได้ เช่น เวลาจะ

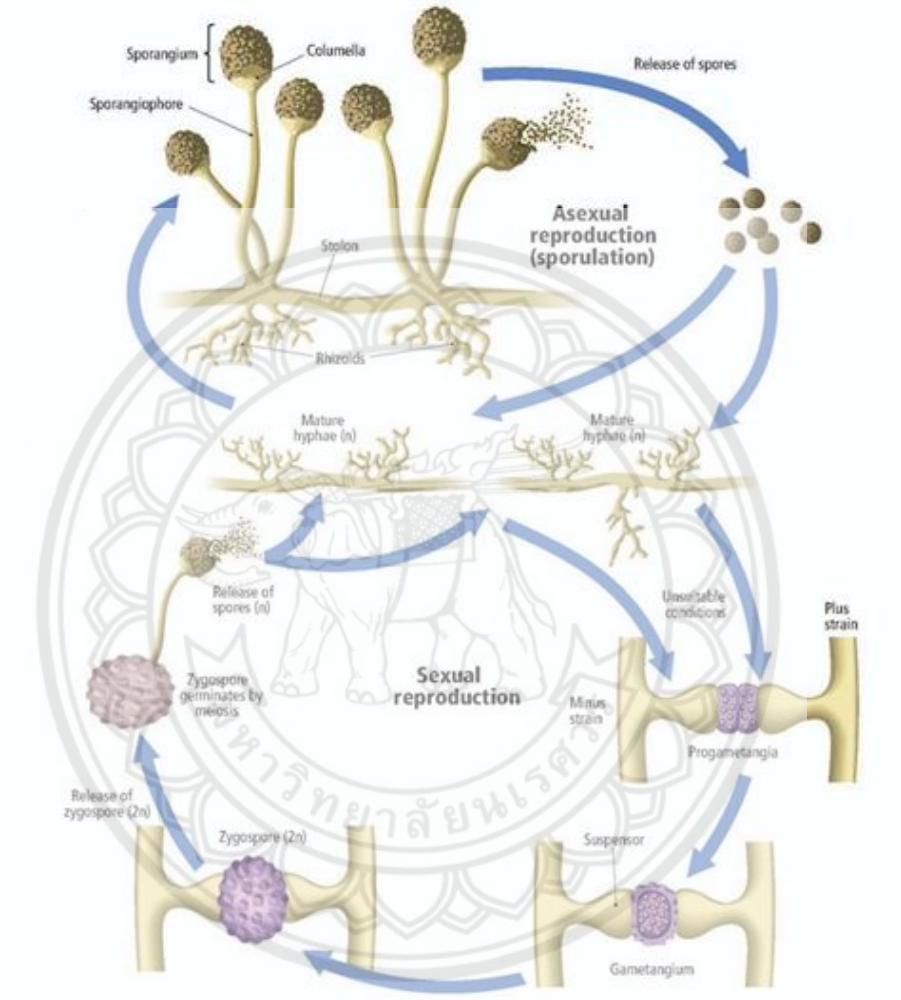
สืบพันธุ์หรือเมื่อสายราฉีกขาด เชื้อราชนิดไม่มีผนังกั้นนี้บางสายพันธุ์ไม่ทนต่อความเย็นและบางสายพันธุ์ไม่ทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 41 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยจะต้องไม่แช่ไว้ในตู้เย็น ไม่เก็บไว้ในที่ร้อน รีบนำส่งห้องปฏิบัติการ และไม่แช่ฟอร์มาลินเพราะฟอร์มาลินจะฆ่าเชื้อราทุกชนิด สำหรับเชื้อราในไฟลัม Zygomycota มีหลายอันดับ (order) แต่ที่มีความสำคัญทางการแพทย์จัดอยู่ใน 2 อันดับ คือ Mucorales และ Entomophthorales (30)

2.2.1 เชื้อก่อโรค

เชื้อราในอันดับ Mucorales มักชอบขึ้นในสารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ จึงมีชื่อเรียกว่า "sugar fungi" พบทั่วไปตามธรรมชาติ กองไม้ ใบหญ้าที่ผุ ดิน ฝุ่นละออง น้ำ ผลไม้ ขนมปังเก่า เครื่องใช้ในบ้าน และโรงพยาบาล โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจทำให้เกิดรอยโรคในปอด บางรายมีการติดเชื้อในช่องจมูก นอกจากนี้เชื้ออาจเข้าทางระบบทางเดินอาหารหรือทางบาดแผลไฟไหม้ โดยผู้ที่ติดเชื้อง่าย คือ คนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง คนที่เป็น ketoacidosis ผู้ป่วยเบาหวาน มะเร็ง ผู้ป่วยบาดแผลไฟไหม้ขั้นรุนแรง ภาวะขาดอาหาร ผู้ป่วยที่รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน เชื้อราอันดับนี้จะเจริญเติบโตได้เร็วที่อุณหภูมิห้อง ส่วนสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนจะขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในส่วนของโคโลนีจะเจริญเติบโตภายใน 2-3 วัน โคโลนีมีลักษณะฟู เชื้อราในอันดับ Mucorales แบ่งออกเป็น 14 วงศ์ (Family) ที่ก่อโรคในคนมักอยู่ในวงศ์ Mucoraceae เป็นส่วนใหญ่ (29, 30)

เชื้อราในอันดับ Mucorales วงศ์ Mucoraceae ชั้น Zygomycetes ประกอบด้วยเชื้อราในสกุล *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Rhizomucor* และ *Apoprysomyces* เชื้อราเหล่านี้เป็นสายราชนิดไม่มีผนังกั้น (non-septate หรือ coenocytic hyphae) อาจพบมีการสร้างผนังกั้นภายในสายราได้บ้าง เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นบางชนิดสามารถสร้างสายราก (rhizoids) ส่วนของสายราที่เชื่อมระหว่าง rhizoids เรียกว่า stolon เชื้อราจะสร้างหน่วยสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) เป็นสปอร์ที่อยู่ในอับ (sporangiospores in sporangium) เกิดอยู่บนก้าน (sporangiophore) ที่ส่วนปลายของก้านจะพองยื่นเข้าไปในอับสปอร์เรียกส่วนนี้ว่า columella

ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual- reproduction) ของเชื้อราในอันดับ Mucorales คือ สร้าง zygospores แบบ heterothallic คือ เกิดจากการรวมตัวของนิวเคลียสที่เหมาะสม (compatible nuclei) จากราต่างสายกัน (29) ดังแสดงในภาพ 8



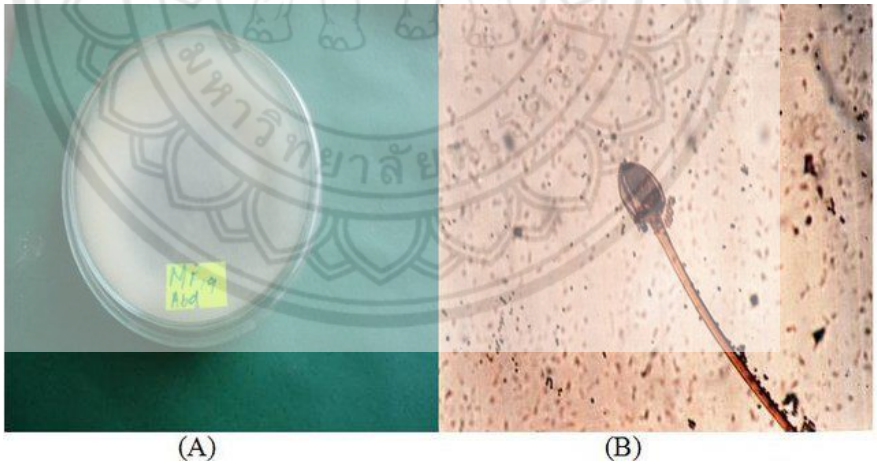
ภาพ 8 แสดงการสืบพันธุ์ของเชื้อราในไฟลัม Zygomycota (31)

2.2.1.1 *Mucor* sp.

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Mucor* sp.

Kingdom	Fungi
Phylum	Zygomycota
Class	Zygomycetes
Family	Mucoraceae
Order	Mucorales
Genus	*Mucor*

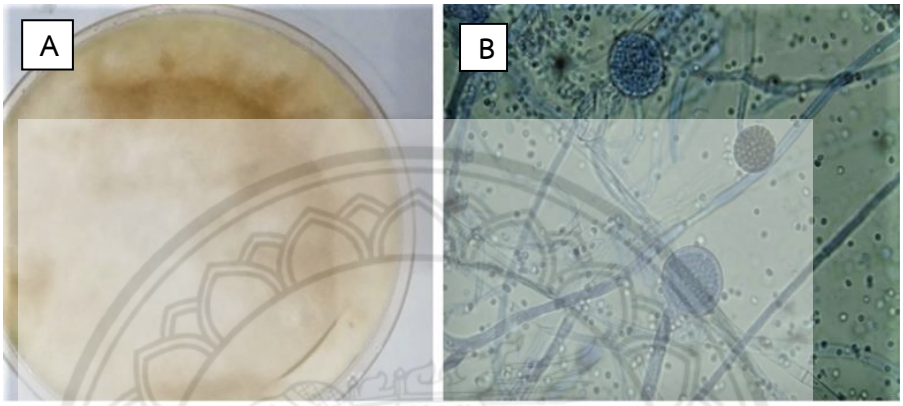
ราที่จัดอยู่ในสกุลนี้มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศ โดยแบบไม่อาศัยเพศจะสร้างก้านชูอับสปอร์ซึ่งไม่ยาว งอกจากสายราชนิดไม่มีผนังกั้น ก้านชูอาจมีอันเดียวหรือหลายอันก็ได้ ตรงปลายก้านชูพองออกเป็น columella และมีอับสปอร์ซึ่งมีรูปร่างกลมหรือรีภายในมีสปอร์รูปกลมหรือรีหลายสปอร์เวลาที่อับสปอร์แตกเปลือกหุ้มสปอร์อาจหลุดออกหมดหรือเหลือบางส่วนติดกับก้านชูอาจพบไคนิเดียป่อง ไม่พบ stolon, rhizoid หรือ apophysis ดังแสดงในภาพ 9 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างไซโกสปอร์โดยปกติจะไม่พบไซโกสปอร์ในเนื้อเยื่อ (30) สำหรับสายพันธุ์ของเชื้อ *Mucor* sp. ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Mucor circinelloides* และ *Mucor ramosissimus*



ภาพ 9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Mucor* sp. (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ (B) Sporangium และ Sporangiophore (32)

1. *Mucor circinelloides*

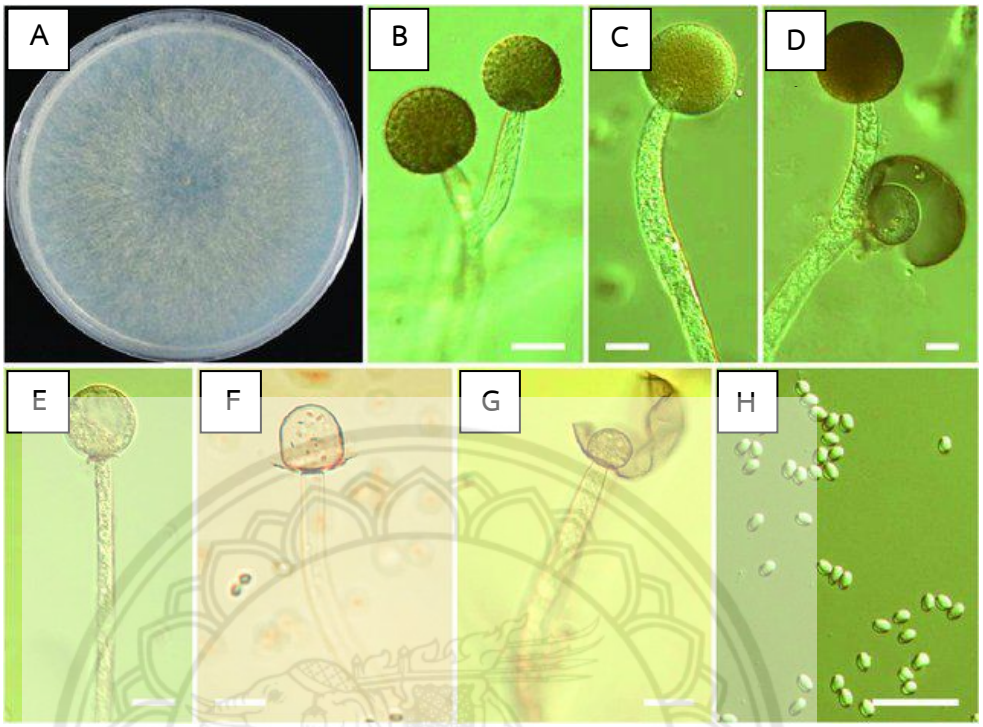
เชื้อราสายพันธุ์นี้โคโลนีด้านหน้ามีสีเทา ด้านหลังมีสีเหลืองหรือสีครีม มีกลิ่นหอม ก้านชูอับสปอร์ มี 2 แบบ คือ แบบยาวที่ปลายมีอับสปอร์ขนาดใหญ่ เมื่อระยะแรกโคโลนีจะมีสีขาวและต่อมาจะมีสีเขียวปนน้ำตาล อีกแบบหนึ่ง คือ ก้านชูอับสปอร์สั้น อับสปอร์มีขนาดเล็กสปอร์รูปรีขนาด 6-7 ไมโครเมตร ไม่พบไซโกสปอร์ (30) ดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 แสดงลักษณะของเชื้อ *M. circinelloides* (A) ลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B) ลักษณะสายราของเชื้อที่ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (33)

2. *Mucor ramosissimus*

เชื้อราสายพันธุ์นี้โคโลนีมีสีเทาอมเหลืองหรือเทาอมเขียวมะกอก ก้านชูแตกแขนงและตั้งตรง อับสปอร์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ได้ถึง 75 ไมโครเมตร เมื่อยังอ่อนจะไม่มี columella สปอร์รูปรี ขนาด 7-8 ไมโครเมตร (30) ดังแสดงในภาพ 11



ภาพ 11 แสดงลักษณะของเชื้อ *M. ramosissimus* (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B-D) ลักษณะของ sporangiospore ที่แตกกิ่งและ sporangia (E-G) Columella ที่เห็น collar (H) sporangiospore (34)

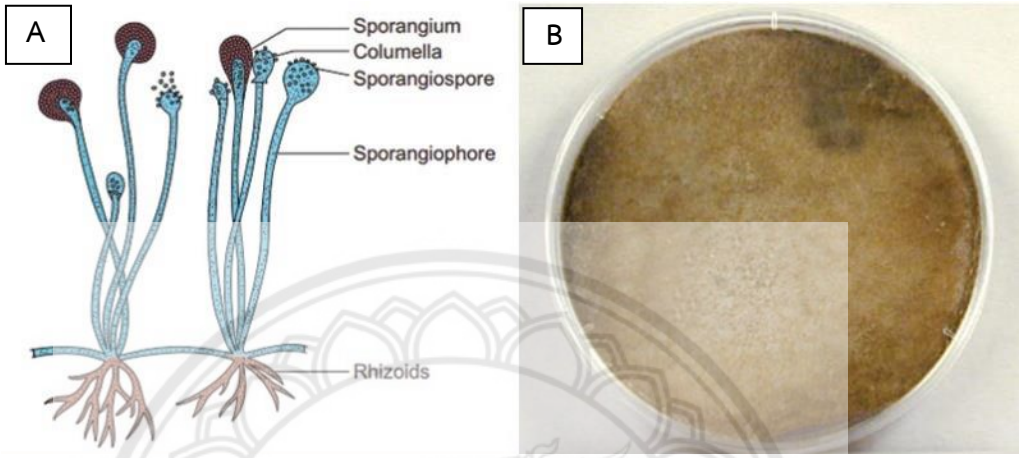
2.2.1.2 ***Rhizopus* sp.**

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Rhizopus* sp.

Kingdom	Fungi
Phylum	Zygomycota
Class	Zygomycetes
Family	Mucoraceae
Order	Mucorales
Genus	*Rhizopus*

เชื้อราที่อยู่ในสกุลนี้จะสร้างก้านชูอับสปอร์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก้านชูอับสปอร์งอกออกจากไรซอยด์ (Rhizoid) ตำแหน่งที่ก้านชูอับสปอร์งอกออกเรียกว่า node ก้านชูอับสปอร์มักเกิดเดี่ยวมีสีขาวหรือสีน้ำตาลบางครั้งก้านชูอับสปอร์อาจงอกออกจากสายราโดยตรง (knot) ตำแหน่งที่งอกไม่พบไรซอยด์ อับสปอร์กลม ฐานแบน columella รูปกลมหรือครึ่งวงกลมไม่มี apophysis

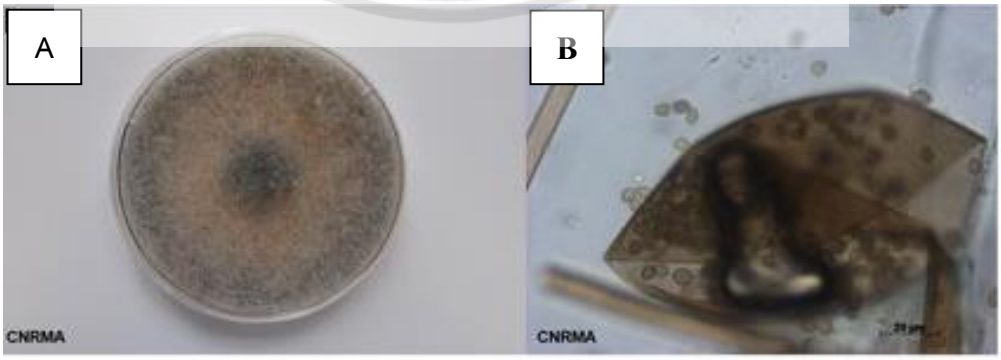
สปอร์รูปร่างกลมหรือรี มีเซลล์เดียวสีน้ำตาลหรือไม่มีสีผิวเรียบหรือขรุขระ ดังแสดงในภาพ 12 ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้างไซโกสปอร์ (30) สำหรับสายพันธุ์ของ เชื้อ *Rhizopus* sp. ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Rhizopus arrhizus* และ *Rhizopus rhizopodiformis*



ภาพ 12 แสดงลักษณะของเชื้อ *Rhizopus* sp.
(A) ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ (B) ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (35)

1. *Rhizopus arrhizus*

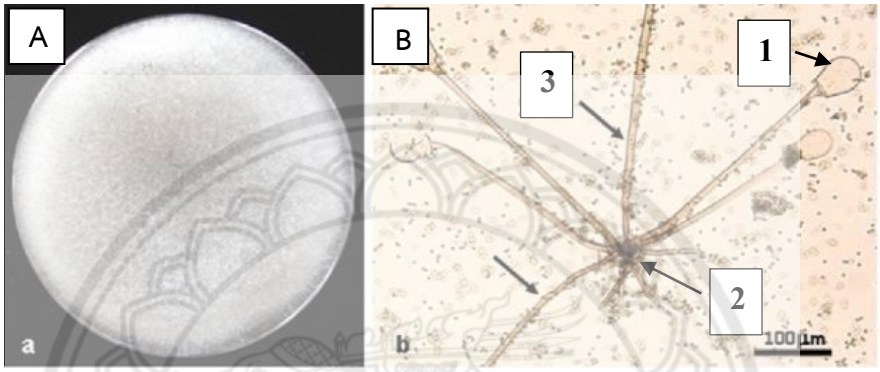
เชื้อราสายพันธุ์นี้เจริญงอกงามเร็วโคโลนีเมื่อเริ่มขึ้นมีสีขาว ต่อมามีสีเหลืองและสีน้ำตาล ก้านชูอับสปอร์เกิดเดี่ยวหรือแตกแขนง ยาวได้ถึง 4 มิลลิเมตร อับสปอร์สีน้ำตาลเข้ม สปอร์รูปรีหรือรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ผิวขรุขระ ขนาด 4-9 x 4-5 ไมโครเมตร ไรซอยด์เจริญไม่ดีนักขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส (30) ดังแสดงในภาพ 13



ภาพ 13 แสดงลักษณะของเชื้อ *R. arrhizus* (A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B) อับสปอร์ (sporangium) และสปอร์ของเชื้อ (sporangiospore) (36)

2. *Rhizopus rhizopodiformis*

เชื้อราสายพันธุ์นี้โคโลนีเมื่อเริ่มขึ้นจะมีสีขาว ต่อมากลายเป็นสีดำ ด้านหลังสีดำ ส่วนไรซอยด์เจริญได้ไม่ดีนัก ก้านรูอับสปอร์มักจะไม่แตกแขนง มีสีน้ำตาล ยาว 0.5-1 มิลลิเมตร อับสปอร์มีสีขาว รูปกลม ต่อมามีสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90-120 ไมโครเมตร columella รูปร่างกลมหรือรูปลูกแพร์ (pyriform) ผิวหน้าของสปอร์เรียบ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 ไมโครเมตร (30) ดังแสดงในภาพ 14



ภาพ 14 แสดงลักษณะของเชื้อ *R. rhizopodiformis* (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B.1) อับสปอร์ (sporangium) (B.2) ราก (rhizoids) (B.3) ก้านชูสปอร์ (sporangiophore) (37)

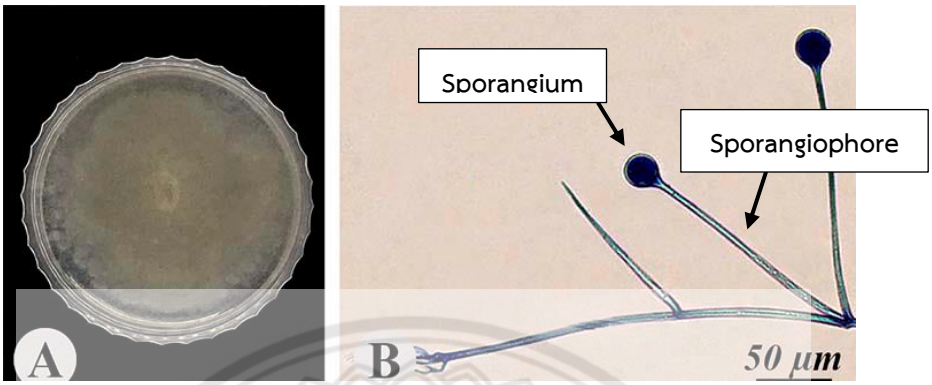
2.2.1.3 *Absidia* sp.

อนุกรมวิธานของเชื้อ Absidia sp.

Kingdom	Fungi
Phylum	Zygomycota
Class	Zygomycetes
Family	Mucoraceae
Order	Mucorales
Genus	*Absidia*

เชื้อราในสกุลนี้สร้างก้านชูอับสปอร์จาก stolon ซึ่งเชื่อมระหว่าง 2 ไรซอยด์ ก้านชูอับสปอร์มักงอกเป็นกลุ่ม 3-5 ก้าน เชื้อที่ก่อโรคในคนบางครั้งก้านชูอับสปอร์งอกจากสายรา ปลายก้านอับสปอร์กางออกเป็นรูปกรวย เพื่อรองรับอับสปอร์รูปลูกแพร์ ปลายก้านชูอับสปอร์จึงทำมุมกับอับสปอร์ เกิดเป็น apophysis สปอร์ผิวเรียบหรือหยาบ ไม่มีสีหรือสีดำ รูปกลมหรือรี

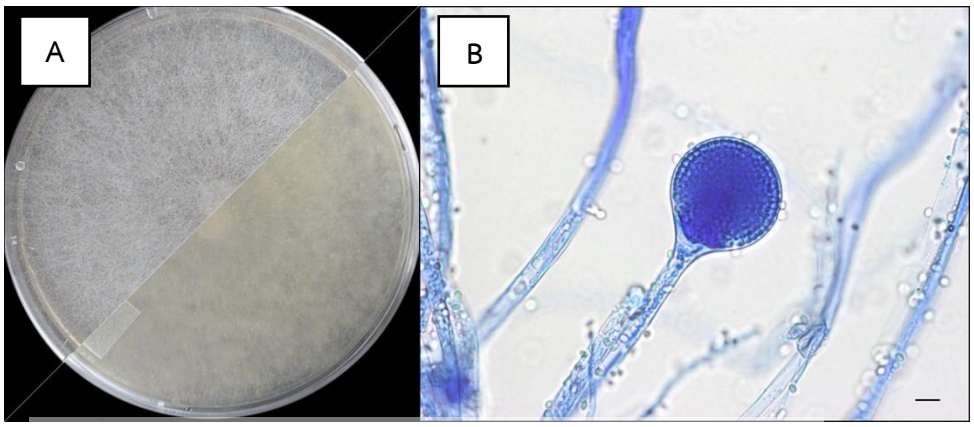
ดังแสดงในภาพ 15 สำหรับสายพันธุ์ของเชื้อสกุล *Absidia* sp. ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Absidia corymbifera*



ภาพ 15 แสดงลักษณะของเชื้อ *Absidia* sp.
(A) ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B) Sporangium และ Sporangiophore (38)

1. *Absidia corymbifera*

เชื้อราสายพันธุ์นี้โคโลนีฟูมีสีเทาเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก้านชูอับสปอร์ยาวถึง 450 ไมโครเมตร กว้าง 4-8 ไมโครเมตร งอกออกจาก stolon และมีการแตกแขนงอับสปอร์ ขนาด 20-25 ไมโครเมตร มีสีเทา columella ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16-17 ไมโครเมตร รูปรี อาจมีหนาม สปอร์เกิดจากการแบ่งตัวภายในคล้ายสกุล *Coccidioides* ในเนื้อเยื่อเมื่อแก่เต็มที่จะมีรูปกลมหรือรีขนาด 2-3 x 3-4 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40-80 ไมโครเมตรผนังหนาและผิวไม่เรียบ ดังแสดงในภาพ 16 สายราที่ยึด zygospore (suspensor cells) มีสีน้ำตาล



ภาพ 16 แสดงลักษณะของเชื้อ *A. Corymbifera*
(A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้านหน้าและด้านหลัง
(B) Sporangium และ Sporangiospore (39)

2.2.2 การก่อโรคและระบาดวิทยา

Mucormycosis พบเกิดขึ้นได้ทั่วไปในทุกประเทศ โดยเชื้อในอันดับ Mucorales เป็นเชื้อที่กระจาย อยู่ทั่วไปตามดิน ในอากาศ หรือปนเปื้อนตามผัก ผลไม้ ขนมปัง คนมักได้รับเชื้อจากการสูดดม โรคไม่มีความสัมพันธ์ กับเชื้อชาติ เพศ และอายุ แต่เกี่ยวข้องกับโรคหรือปัจจัยร่วมที่มาทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดต่ำลง เช่น เบาหวาน ลิวคีเมีย และลิมโฟมา หรือการใช้สารสตีรอยด์และยากดภูมิคุ้มกันของร่างกาย จากรายงานหลายฉบับพบว่าโรคเกิดขึ้นที่ใบหน้าและสมองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ที่ปอด ระบบทางเดินอาหาร และผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ เช่น แผลไฟลวก แผลผ่าตัด รอยฉีดยา ถูกของทิ่มตำ หรือหกล้ม ผิวหนังถลอก (40) โดยปกติซีรั่มของคนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสกุล *Cunninghamella* และ *Absidia* ได้ แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสกุล *Rhizopus* ไม่ได้ เชื้อสกุล *Rhizopus* บางสายพันธุ์กลับเจริญได้ดีในซีรั่ม ลักษณะสำคัญของเชื้ออันดับนี้คือ มีความสามารถในการบุกรุกเข้าหลอดเลือด ทำให้เกิดการอุดตัน การตายของเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง บางครั้งกลุ่มเชื้อราหลุดจากที่เดิม ผ่านไปตามกระแสโลหิต ก่อให้เกิดโรคที่อวัยวะของร่างกายที่ห่างไกลออกไป โรคที่เกิดจากเชื้อราอันดับ Mucorales มีชื่อเรียกว่า Mucormycosis บางตำราเรียกตามชื่อไฟลัมจึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Zygomycosis หรือ Phycomycosis (30)

Mucormycosis เกิดขึ้นในร่างกายได้ที่อวัยวะหลายระบบ ตั้งแต่มีอาการเล็กน้อยที่ผิวหนังจนถึงเป็นชนิดแพร่กระจายทั่วทั้งตัว เชื้อเข้าไปก่อโรคในร่างกายได้โดยถูกหายใจ หรือกินเข้าไป หรือเข้าไปทางแผลบาดเจ็บที่ผิวหนัง อีกประการหนึ่งคือ เมื่อร่างกายมีภูมิต้านทานลดลงโดยสาเหตุใดก็ตามย่อมทำให้เกิดโรคได้ง่าย ปัจจัยที่สำคัญคือ โรคเบาหวานชนิดรุนแรงหรือไม่ได้รับการรักษา โรคเมื่อเกิดขึ้นแล้วส่วนใหญ่มีอาการรุนแรงมากและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต มีอยู่ส่วนน้อยที่เป็นเรื้อรังและอาการไม่มากนัก ซึ่งได้แก่โรคที่เกิดกับผิวหนังในคนปกติ (40)

2.2.2.1 กลไกการเกิดโรค (Pathogenesis) มี 3 กลไก ดังนี้

1. กลไกภูมิคุ้มกันต่อต้านการเกิดโรค Mucormycosis (Host defense against mucormycosis)

เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear และ polymorphonuclear (PMN) ในคนปกติจะทำหน้าที่กำจัดเชื้อรา Mucorales โดยกระบวนการ oxidative metabolites และ cationic peptides defensins ซึ่งกระบวนการนี้ถือว่าเป็นกลไกหลักในการต่อต้านการเกิดโรค mucormycosis ดังนั้นผู้ป่วยที่มีการลดลงหรือสูญเสีย phagocytic function ของเม็ดเลือดขาวจะมีความเสี่ยงต่อการเกิด mucormycosis สูง เช่น ผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวชนิด PMN ต่ำมากๆ ในทางตรงข้ามผู้ป่วยเอดส์ไม่พบว่ามีความเสี่ยงที่จะเกิด mucormycosis เพิ่มขึ้น เนื่องจากผู้ป่วยเอดส์จะขาด T-lymphocyte ในผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและมีภาวะเลือดเป็นกรดซึ่งพบได้ในผู้ป่วย diabetic ketoacidosis (DKA) จะสูญเสีย phagocytic function และกระบวนการ chemotaxis และ intracellular killing ของ PMN นอกจากนี้มีการศึกษาว่าการให้ corticosteroid ในหนูทดลองจะไปลดความสามารถของ broncho-alveolar macrophage ในการป้องกันการเติบโตของสปอร์ของเชื้อรา Skin barrier เป็นส่วนสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อ mucor ที่ผิวหนัง (cutaneous mucormycosis) ผู้ป่วยที่มีบาดแผลที่ผิวหนังไม่ว่าจะเป็นบาดแผลถูกแทง (penetrate) โดยตรง หรือแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก (burn) หรือมีการแตกแยก (disruption) ของผิวหนังจากเหตุใดก็ตามก็มีโอกาสที่เชื้อราที่ปนเปื้อนในดินหรือในน้ำจะเข้าสู่ผิวหนังไปสู่เนื้อเยื่อชั้นลึกต่อไปได้

2. กลไกการกักเก็บธาตุเหล็กกับการเกิดโรค mucormycosis (Iron uptake and mucormycosis pathogenesis)

โดยธาตุเหล็กเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อรา มีหลายกลไกที่เชื้อราสามารถนำเหล็กจาก host มาใช้ได้ในกรณีที่ร่างกายมีภาวะเลือดเป็นกรด (pH 7.30-6.88) เช่น DKA H^+ จะเข้าไปแย่งจับกับ transferrin ทำให้มี free iron ในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น เชื้อราจึงนำเหล็กไปใช้ในการเจริญเติบโตได้มากขึ้น กรณีผู้ป่วยมีภาวะธาตุเหล็กเกิน (iron overload) เช่น ในผู้ป่วย hemodialysis ที่ได้รับ iron chelator deferoxamine นั้น deferoxamine จะทำหน้าที่เป็น

siderophore โดย deferoxamine จะจับกับ ferric iron จาก transferrin และตัวมันเองอีกด้านจะจับกับเชื้อราส่ง iron เข้าสู่เซลล์ของเชื้อรา โดยกระบวนการ active reduction ซึ่งเชื้อ *Rhizopus* sp. สามารถนำเหล็กมาใช้จาก deferoxamine ได้ 8-40 เท่า เมื่อเทียบกับเชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *Candida albicans* ส่วน iron chelator อื่นๆ เช่น deferiprone และ deferaxirox ไม่ได้มีผลเป็น siderophore

3. ปฏิกิริยาของเชื้อรากับเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดเลือด (Fungal-endothelial interactions)

ลักษณะเด่นของ mucormycosis ที่สำคัญคือจะมีการติดเชื้อลุกลามทางหลอดเลือด (angioinvasion) เป็นผลให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด (thrombosis) และเนื้อเยื่อตาย (necrosis) เกิดขึ้น การที่เชื้อจะลุกลามเข้าสู่หลอดเลือดได้นั้นขึ้นกับความสามารถของเชื้อนั้นๆ ว่าจะสามารถกระจายออกจากตำแหน่งติดเชื้อเริ่มต้นเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ ดังนั้นถ้าเชื้อสามารถทำลายและทะลุผ่านเซลล์เยื่อบุผิว (endothelial cell lining) ของผนังหลอดเลือดได้ก็ถือว่าเป็นจุดสำคัญทำให้เกิดการกระจายของเชื้อไปยังตำแหน่งอื่นๆ ของร่างกายได้ตามสมมติฐานนี้

2.2.2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค (Predisposing conditions)

1. ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดและผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก พบว่าผู้ป่วย acute myeloid leukemia (AML) มีอัตราการเกิด mucormycosis ร้อยละ 1-8 ซึ่งสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดอื่น ๆ ผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกเกิด mucormycosis น้อยกว่าผู้ป่วย AML โดยมีอัตราเกิดโรคร้อยละ 0.9-2.0

2. ผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะมีอัตราการเกิด mucormycosis ร้อยละ 0.4-16 ขึ้นกับชนิดอวัยวะที่ปลูกถ่าย เนื่องจากผู้ป่วยจะได้รับยากดภูมิคุ้มกัน และคอร์ติโคสเตียรอยด์ขนาดสูง

3. ผู้ป่วยโรคเบาหวานเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิด mucormycosis พบได้ถึงร้อยละ 36-88 ของผู้ป่วย mucormycosis ผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งร่วมกับมีภาวะ ketoacidosis ยิ่งมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้น

4. ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันคอร์ติโคสเตียรอยด์ระยะยาว มีแนวโน้มเกิด mucormycosis เพิ่มขึ้นจากการทำงานของ macrophages และ neutrophils ลดลง และคอร์ติโคสเตียรอยด์ยังสามารถชักนำให้เกิดเบาหวานด้วย

5. ภาวะธาตุเหล็กเกินและได้ยาขับธาตุเหล็กชนิด deferoxamine มีรายงานว่าร้อยละ 78 ของผู้ป่วย hemodialysis ที่เป็น mucormycosis ได้รับ deferoxamine นอกจากนี้ผู้ที่ได้รับเลือดบ่อยๆ ก็เป็นปัจจัยเสี่ยงเช่นกัน อาการแสดงของ mucormycosis ของผู้ป่วยที่ได้รับ deferoxamine ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 44) เป็นแบบแพร่กระจาย (disseminated form) และมีอัตรา

การตายสูงถึงร้อยละ 80 นับว่าเป็นความโชคดีที่มีการใช้ deferoxamine เพียงช่วงเวลาสั้น ๆ เนื่องจากยาขับธาตุเหล็กชนิดใหม่ ๆ เช่น deferasirox และ deferiprone ไม่ได้เพิ่มความเสี่ยงให้ผู้ป่วยเป็น mucormycosis เพิ่มขึ้น

6. การได้รับยา voriconazole เป็นระยะเวลานาน มีการใช้ยาต้านเชื้อรา *Aspergillus* อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะ voriconazole ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดและผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกพบว่าอัตราการเกิด mucormycosis ในผู้ป่วยกลุ่มนี้เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามมีการศึกษาสองชิ้นที่ศึกษากลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูกที่ได้รับยาป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อราแบบลุกลาม (invasive fungal infection) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ใช้ยา voriconazole กับ fluconazole หรือ itraconazole ผลการศึกษาพบว่าการได้รับ voriconazole ไม่ได้เพิ่มอัตราการเกิด mucormycosis แต่อย่างใด อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่เข้าร่วมงานวิจัยทั้งสองงานวิจัยนั้นมีผู้ที่มีความเสี่ยงน้อยต่อการติดเชื้อราแบบลุกลาม รวมถึงการเกิด mucormycosis ด้วย ดังนั้นจึงยังมีข้อโต้แย้งเกี่ยวกับการให้ voriconazole เนื่องจากยังมีความไม่แน่นอนเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงนี้จึงควรตระหนักว่า mucormycosis อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อราในขณะที่กำลังได้รับยา voriconazole อยู่

7. ผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีหรือเอดส์พบได้น้อยมาก จากการศึกษาย้อนหลังของ Antinori และคณะ ที่ศึกษาผลชันสูตรศพผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคเอดส์ 1,630 ราย ตั้งแต่ พ.ศ. 2527-2545 พบว่า มีเพียง 2 รายที่เป็น mucormycosis จึงสรุปว่าความเสี่ยง ในการเกิด mucormycosis ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีน้อยกว่า ผู้ป่วยกลุ่มภูมิคุ้มกันต่ำอื่นๆ ผู้ป่วย mucormycosis ที่ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการใช้สารเสพติดฉีดเข้าหลอดเลือด

8. ผู้ป่วยที่ไม่มีโรคประจำตัวมักพบในรูปแบบของการติดเชื้อ *mucor* ที่ผิวหนัง (cutaneous mucormycosis) สัมพันธ์กับอุบัติเหตุ (trauma) หรือแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก (burn) มีรายงานเกี่ยวกับการติดเชื้อ mucor โดยการกระทำของแพทย์ เช่น ในการผ่าตัดผู้ป่วยอุบัติเหตุ การใช้ผ้าก๊อสหรือไม้กดลิ้นที่ปนเปื้อน และการใส่สายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลาง

2.2.2.3 อาการทางคลินิก (Clinical manifestations)

ลักษณะสำคัญของโรค mucormycosis คือ การตายของเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีการลุกลามทางหลอดเลือด และเกิดหลอดเลือดอุดตัน (thrombosis) ตามมา อาการทางคลินิกขึ้นกับตำแหน่งที่ติดเชื้อแบ่งเป็น 6 ลักษณะหลักๆ ดังนี้ rhinocerebral form, pulmonary form, cutaneous form, gastrointestinal form, disseminated form และ uncommon rare forms เช่น การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ กระดูกอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ การติดเชื้อที่ไต เป็นต้น ตำแหน่งที่พบ mucormycosis ได้บ่อย คือ ไซนัส (ร้อยละ 39) ปอด (ร้อยละ 24) และผิวหนัง (ร้อยละ 19)

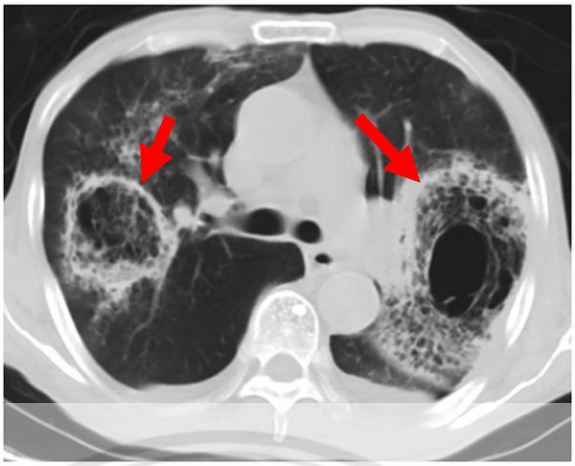
1. การติดเชื้อที่โพรงจมูกแล้วลามไปสมอง (Rhinocerebral form)

เป็นรูปแบบการติดเชื้อที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน การติดเชื้อเริ่มจากหายใจเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไปในโพรงอากาศข้างจมูก (paranasal sinus) การติดเชื้อจะลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงอย่างรวดเร็ว กระจายสู่ด้านล่างไปที่เพดานปากด้านหลังไปที่ sphenoid sinus ลุกลามออกด้านข้างไปที่ cavernous sinus รวมถึงเบ้าตาในกะโหลกศีรษะลุกลามเข้าสู่สมอง บางครั้งพบว่าการลุกลามเข้าหลอดเลือดสมองทำให้เกิดการกระจายเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดได้โดยอาจเกิดหรือไม่เกิด mycotic aneurysm ตามมา อาการแรกที่ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ คือ ไซนัสอักเสบ มีการอักเสบรอบๆ เบ้าตา ปวดเบ้าตาหรือใบหน้า ชาใบหน้าตามมาด้วยตามัว อาการแสดงที่บ่งชี้ถึง mucormycosis มีหลายรูปแบบ เช่น อัมพาตของเส้นประสาทสมองหลายเส้น ปวดใบหน้าและเบ้าตาซีกเดียว เบ้าตาอักเสบ เปลือกตาบวม หนังตาตก ตาโปน การกลอกตาผิดปกติ และตาบอดเฉียบพลัน สิ่งที่เป็นลักษณะสำคัญ (hallmark) ของ rhinocerebral mucormycosis คือ แผลเนื้อตายสีดำบริเวณตั้งแต่เบ้าตาลงมาถึงจมูก อย่างไรก็ตามการไม่พบแผลลักษณะนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าไม่มีโอกาสเป็นโรค mucormycosis อาจมีไข้หรือไม่มีก็ได้ มากกว่าครึ่งของผู้ป่วยไม่มีไข้ตรวจเลือดพบเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น หากไขกระดูกของผู้ป่วยยังทำงานได้ดี การตรวจภาพรังสีคอมพิวเตอร์แบบฉีดสารทึบรังสีใช้ในการบอกขอบเขตการกระจายของ rhinocerebral mucormycosis ได้ดีก่อนผ่าตัด แต่การเห็นการทำลายของกระดูกนั้นแสดงว่าเป็นระยะท้ายของโรคตามหลังจากเนื้อเยื่อที่ตายไปแล้ว ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีประโยชน์ในการดูการกระจาย rhinocerebral mucormycosis ไปยังเยื่อหุ้มสมอง เนื้อสมอง การอุดตันของ cavernous sinus และการอุดตันของหลอดเลือดแดง internal carotid ได้ อย่างไรก็ตามภาพถ่ายทางรังสีนั้นไม่ได้มีลักษณะจำเพาะต่อ rhinocerebral mucormycosis ดังนั้นในผู้ป่วยที่สงสัยภาวะนี้จำเป็นจะต้องผ่าตัดเพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อมาตรวจทางพยาธิวิทยาเสมอ เนื่องจากการดำเนินโรคของ rhinocerebral mucormycosis จะเป็นไปอย่างรวดเร็วมีอัตราการเสียชีวิตสูงถ้าเชื้อราลุกลามเข้าสู่กะโหลกศีรษะ ดังนั้น ผู้ป่วยเบาหวานที่มาด้วยอาการปวดศีรษะและตามัวควรจะต้องตรวจภาพถ่ายทางรังสี และส่องกล้องทางจมูกเพื่อวินิจฉัยแยกโรค mucormycosis ดังแสดงในภาพ 17

ภาพ 17 แสดงลักษณะรอยโรค Rhinocerebral Mucormycosis
(A) ก่อนการรักษาด้วย Amphotericin B
(B) หลังการรักษาด้วย Amphotericin B เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (41)

2. การติดเชื้อที่ปอด (Pulmonary mucormycosis)

ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยมะเร็งที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำจากการได้รับยาเคมีบำบัด ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกและผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะที่เซลล์ของอวัยวะใหม่สร้างภูมิคุ้มกันมาทำลายอวัยวะของร่างกายผู้รับ (graft versus host disease) ผู้ป่วย pulmonary mucormycosis จะมีอัตราการเสียชีวิตสูง (ร้อยละ 76) อาการของการติดเชื้อที่ปอดไม่จำเพาะเจาะจง แยกยากจาก pulmonary aspergillosis ผู้ป่วยมักมาด้วยไข้สูงเรื้อรัง (มากกว่า 38 องศาเซลเซียส) ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ไอแห้งๆ เป็นอาการที่พบได้บ่อย ในขณะที่ไอเป็นเลือด เจ็บหน้าอก หายใจหอบเหนื่อย พบ ได้น้อย รอยโรคในหลอดลมพบได้แต่น้อยมาก หากมีรอยโรคเกิดในหลอดลมสามารถทำให้ทางเดินหายใจส่วนบนอุดกั้น ได้ ทำให้ปอดแฟบ และสามารถลุกลามเข้าสู่หลอดเลือดขั้วปอดเกิดไอเป็นเลือดปริมาณมากตามมาได้ นอกจากนี้สามารถลุกลามเข้าสู่อวัยวะข้างเคียงที่ติดกับปอด เช่น เยื่อหุ้มหัวใจ และผนังทรวงอกได้ ภาพถ่ายรังสีทรวงอกไม่มีลักษณะจำเพาะ และแยกได้ยากจากการติดเชื้อ aspergillosis ลักษณะที่พบได้บ่อย คือ consolidation, nodules, cavitations, atelectasis, effusion, posterior tracheal band thickening, ต่อมน้ำเหลืองบริเวณ hilar หรือ mediastinum โตหรือแม้กระทั่งภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติ ถ้าพบลักษณะ air crescent sign ต้องระวังเนื่องจากคล้ายกับลักษณะที่พบใน pulmonary aspergillosis ดังแสดงในภาพ 18



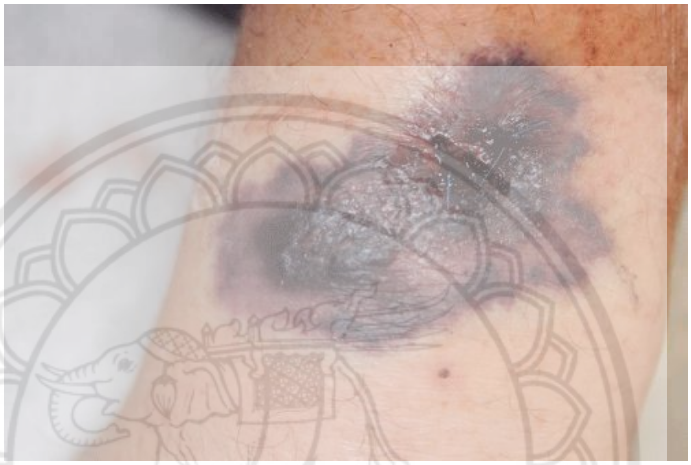
ภาพ 18 Computerized tomography (CT) scan ปอดของผู้ป่วย
โรค pulmonary mucormycosisแสดงการกระจายแบบสมมาตรของเงาคล้ายแก้ว
โดยมีขอบเขตพร่ามัวและเงาทึบเป็นหย่อม (42)

3. การติดเชื้อที่ผิวหนัง (Cutaneous mucormycosis)

โรค Mucormycosis ที่ผิวหนังเกิดขึ้นบ่อยที่รูหูชั้นนอก ลำตัว และแขนขา โรคเป็นได้ทั้งชนิดปฐมภูมิ เกิดจากสปอร์ของเชื้อราเข้าไปในผิวหนังโดยตรง อาจเป็นเหตุให้เกิดการติดเชื้อกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ หรือทุติยภูมิ หรืออาจเป็นชนิดแพร่กระจายที่ผิวหนังทั่วร่างกาย เนื่องจากเชื้อกระจายทางหลอดเลือดจากโรคชนิดปฐมภูมิ การแพร่กระจายโรคจากอวัยวะภายในออกมาสู่ผิวหนังพบได้น้อยมาก รูหูชั้นนอกเป็นส่วนหนึ่งของร่างกายที่เชื้อเข้าไปได้ง่าย ในระยะแรกผิวหนังของหูชั้นนอกเกิดการอักเสบ (otitis external) ก่อนมีอาการคันและมีน้ำเหลืองซึมออกมา ขี้หูมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่สีเทาคล้ำจุกอยู่ เมื่อเอาออกมาแล้วจะเกิดเต็มขึ้นมาใหม่ภายในเวลาไม่กี่วัน ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเชื้อสามารถลุกลามเข้าไปเป็นโรคที่หูชั้นใน โพรงกระดูกใกล้เคียง เยื่อบุสมองและมันสมอง ทำให้เกิดโพรงหนองขึ้นภายใน และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตการติดเชื้อที่ผิวหนังแบ่งได้เป็น 2 แบบตามขอบเขตของการติดเชื้อ คือ Localized cutaneous mucormycosis ตำแหน่งที่ติดเชื้ออยู่เฉพาะผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง และ Deep extension cutaneous mucormycosis เมื่อการติดเชื้อลุกลามสู่กล้ามเนื้อ เส้นเอ็น กระดูก และกระจายสู่อวัยวะต่างๆ ที่อยู่ห่างไกลกับตำแหน่งติดเชื้อ

การติดเชื้อราที่ผิวหนังมักพบในผู้ป่วยเบาหวาน ได้รับอุบัติเหตุ ผู้ที่ใช้ elastic bandage เป็นเวลานาน หรือเป็นผลจากการติดเชื้อภายในร่างกาย ลักษณะทางคลินิกเริ่มแรกอาจเป็นตุ่มพอง ภายในมีน้ำหรือหนอง ต่อมาเกิดเป็นแผลเรื้อรัง หลอดเลือดอุดตัน แผลเน่าดำ บางครั้ง

โรคลึกลงไปถึงชั้นใต้ผิวหนัง บางรายโรคเกิดขึ้นที่ขาต้องตัดขาออก โรคเริ่มที่ผิวหนัง อาจลุกลามก่อโรคอวัยวะภายในได้ บางครั้งพยาธิสภาพที่ผิวหนังอาจเกิดเป็นฝีขึ้นที่คอ หรือขาหนีบคล้ายไส้เลื่อน อาการของการติดเชื้อที่ผิวหนังมีได้หลากหลาย อาการเริ่มต้นอาจค่อยเป็นค่อยไปแบบช้าๆ หรืออาจเป็นรุนแรงทำให้เกิดเนื้อตาย และกระจายเข้าสู่กระแสเลือดอย่างรวดเร็ว ลักษณะจำเพาะของการติดเชื้อที่ผิวหนังคือ บาดแผลเอชการ์ (eschar) สีดำบริเวณรอบๆบาดแผลจะนูนแดง (erythema and induration) ดังแสดงในภาพ 19

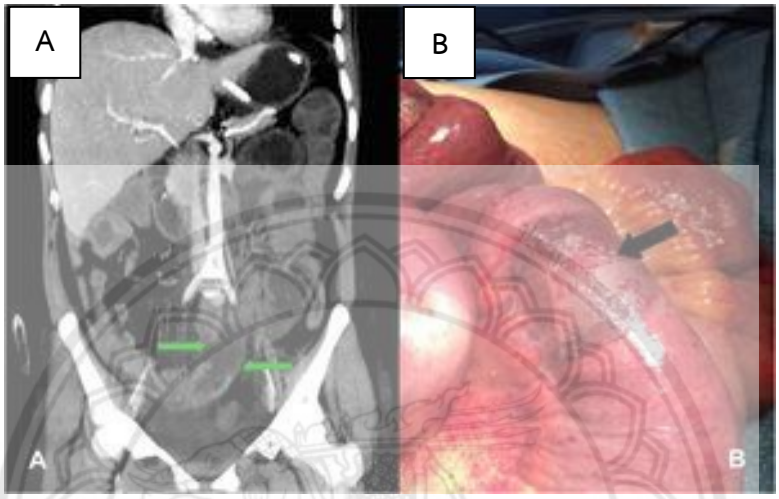


ภาพ 19 ภาพแสดงรอยโรคที่ผิวหนังของ Mucormycosis (43)

4. การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal mucormycosis)

การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารพบได้ไม่บ่อย และแทบจะไม่สามารถวินิจฉัยได้ในขณะที่ผู้ป่วยยังมีชีวิตอยู่ ผู้ป่วยหลายรายได้รับการวินิจฉัยที่ล่าช้าทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 85 มีเพียงร้อยละ 25 เท่านั้นที่ได้รับการวินิจฉัยในขณะยังมีชีวิตอยู่ ผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่พบในทารกคลอดก่อนกำหนด เด็กที่มีภาวะทุพโภชนาการ ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือด เบาหวาน และผู้ที่ใช้คอร์ติโคสเตียรอยด์ เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อราเข้าไป เช่น นมเปรี้ยว ขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ทำจากข้าวโพดหรือการใช้สมุนไพรที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา เป็นต้น ยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดที่ได้รับการตรวจช่องปากด้วยไม้กดลิ้นที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อราก็ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารสามารถเกิดส่วนใดของระบบทางเดินอาหารก็ได้ แต่ที่พบได้บ่อย คือ กระเพาะอาหาร รองลงมาคือลำไส้ใหญ่ และลำไส้เล็กส่วนปลาย อาการมีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ก้อนบริเวณไส้ติ่ง (appendix) ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (cecum) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) หรือกระเพาะอาหารทะลุ หรือเลือดออกทางเดินอาหารส่วนต้นอย่างรุนแรง ในผู้ป่วยทารกคลอดก่อนกำหนด มักมาด้วยลำไส้อักเสบ

เน่าตาย (necrotizing enterocolitis) ในขณะที่ผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวต่ำมักมาด้วยก้อนบริเวณไส้ติ่งหรือลำไส้เล็กส่วนปลาย หรือมีอาการแบบไทฟอยด์ และ ถ่ายอุจจาระเป็นเลือดสด (hematochezia) ได้ การวินิจฉัยส่วนมากมักทำได้ช้าเนื่องจากอาการไม่จำเพาะนอกจากติดเชื้อที่กระเพาะอาหารและลำไส้แล้ว ยังสามารถติดเชื้อได้ที่ ตับ ม้าม หรือตับอ่อนได้ ดังแสดงในภาพ 20



ภาพ 20 CT scan ของกระเพาะอาหารแสดงบริเวณที่เป็นรอยขาดของผนังลำไส้ (A) ภาพระหว่างการผ่าตัดที่มีเส้นรอบวงที่ขาดเลือดจำนวนมากในลำไส้เล็ก (B) (44)

5. การติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (Disseminated mucormycosis)

การติดเชื้อในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งสามารถกระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะห่างไกลอื่น ๆ ได้ อวัยวะที่พบการแพร่กระจายไปได้บ่อย คือ ปอด สมอง ตับ ม้าม หัวใจ การติดเชื้อแบบแพร่กระจายมักสัมพันธ์กับการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร แผลไฟไหม้ แผลที่มีการลุกลามบริเวณกว้างหรือลุกลามเนื้อเยื่อชั้นลึก ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย คือ ผู้ป่วยที่มีภาวะธาตุเหล็กเกินโดยเฉพาะที่ได้รับ deferoxamine ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลน้อยกว่า 100 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร อาการของการติดเชื้อแบบแพร่กระจายมีได้หลากหลายขึ้นกับตำแหน่งที่เชื้อราแพร่กระจายไปและความรุนแรงของการลุกลามเข้าสู่หลอดเลือดและเนื้อเยื่อการทำลายของอวัยวะนั้นๆผู้ป่วยติดเชื้อแบบแพรก่ระจายหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมส่วนใหญ่จะเสียชีวิต

6. รูปแบบการติดเชื้อที่พบไม่บ่อย (Uncommon forms of mucormycosis)

รูปแบบการติดเชื้อที่ไม่พบบ่อย ได้แก่ การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ (endo-carditis) กระดูกอักเสบ (osteomyelitis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) และไตอักเสบ (pyelonephritis)

การใช้สารเสพติดฉีดเข้าหลอดเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ กระดูก อักเสบส่วนใหญ่จากเชื้อเข้าสู่กระดูกโดยตรงหลังอุบัติเหตุหรือเกิดการปนเปื้อนขณะผ่าตัด การกระจายเชื้อมาทางกระแสเลือดทำให้กระดูกอักเสบพบได้น้อยมาก ส่วนเยื่อบุช่องท้องอักเสบพบในผู้ป่วยล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis) การติดเชื้อที่ไตผู้ป่วยมักมาด้วยปัสสาวะเป็นเลือด ปวดเอว ไตวายเฉียบพลันโดยหาสาเหตุอื่นไม่พบ ผู้ป่วยติดเชื้อที่ไตส่วนใหญ่พบในผู้ใช้สารเสพติดฉีดเข้าหลอดเลือด และผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนไตในประเทศกำลังพัฒนา เช่น อินเดีย อียิปต์ ซาอุดิอาระเบีย และคูเวต (40, 45)

2.2.3 การตรวจวินิจฉัยโรค

ระยะเวลาการเริ่มรักษาที่เร็วจะช่วยทำให้ผลของการรักษาดีขึ้น ดังนั้นการวินิจฉัย mucormycosis ที่รวดเร็วและให้การรักษาทันท่วงทีจะช่วยป้องกันการติดเชื้อลุกลามของเนื้อเยื่อและภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ที่ตามมาได้

ข้อดีของการวินิจฉัย mucormycosis ได้ตั้งแต่ระยะแรก

1. ป้องกันการลุกลามเข้าสู่หลอดเลือด
2. ป้องกันการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อปอด สมอง และไซนัสโดยตรง
3. ป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อแพร่กระจาย (dissemination) ไปยังอวัยวะต่างๆ
4. ลดความจำ เป็นที่จะต้องผ่าตัดเนื้อเยื่อเป็นบริเวณกว้าง
5. ลดความจำเป็นที่จะต้องผ่าตัดจนสูญเสียความงาม
6. ลดความเจ็บปวดทรมานจากการลุกลามเข้าสู่เส้นประสาทรับความรู้สึก
7. ทำให้ผลของการรักษาดีขึ้นและอัตรารอดชีวิตมากขึ้น

มีการศึกษาผลของการให้ amphotericin B ในการรักษา mucormycosis ล่าช้าในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือด พบว่ากลุ่มที่ให้การรักษาล่าช้าจะมีอัตราตายเพิ่มเป็น 2 เท่าของกลุ่มที่เริ่มรักษาเร็วที่ 12 สัปดาห์ (ร้อยละ 82.9 เทียบกับร้อยละ 48.9) และยังพบว่าการรักษา mucormycosis ล่าช้าจะเป็นตัวทำนายว่าผลการรักษาที่ได้จะไม่ดี (45)

2.2.3.1 การตรวจด้วยภาพถ่ายทางรังสีเพื่อการวินิจฉัย (Expanding role of diagnostic imaging)

ภาพถ่ายรังสีคอมพิวเตอร์ Computerized Tomography scan (CT scan) สามารถตรวจพบความผิดปกติของรอยโรคในปอดและไซนัสได้ตั้งแต่ต้น ซึ่งมีความไวกว่าภาพถ่ายรังสีปกติ (conventional radiographs) บางครั้งพบก่อนที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการ แต่ข้อจำกัดของการคัดกรองผู้ป่วยโดยภาพถ่ายรังสีคอมพิวเตอร์นั้นคือ ราคาแพง และผู้ป่วยได้รับรังสีสะสมมากกว่า ลักษณะจำเพาะของภาพถ่ายรังสีคอมพิวเตอร์ของการติดเชื้อที่ลุกลามทางหลอดเลือด (*Aspergillus* spp,

Scedosporium spp, *Fusarium* spp, Mucorales และ *P. aeruginosa*) ได้แก่ nodules, halo signs, reverse halo signs, cavities, wedge shaped infiltration หรือ pleural effusion ที่สัมพันธ์กับอาการ pleuritic pain ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะไม่จำเพาะต่อ mucormycosis ดังนั้น ควรพิจารณาร่วมกับความเสี่ยงของผู้ป่วย, อาการ และอาการแสดง ลักษณะทางรังสี ดังแสดงในภาพ 18 จะช่วยเพิ่มความน่าจะเป็นในการวินิจฉัยได้ตั้งแต่ต้น แต่การวินิจฉัยที่เป็นมาตรฐานของ mucormycosis คือ ผลการเพาะเชื้อหรือการตรวจชิ้นเนื้อ (45)

2.3.2 การตรวจจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อโดยตรง น้ำล้างหลอดลม ถุงลมและหลอดลมฝอยและของเหลวที่เก็บได้จากตำแหน่งที่ปลอดเชื้อ (Direct examination of infected tissue, bronchoalveolar lavage fluid and other sterile fluids)

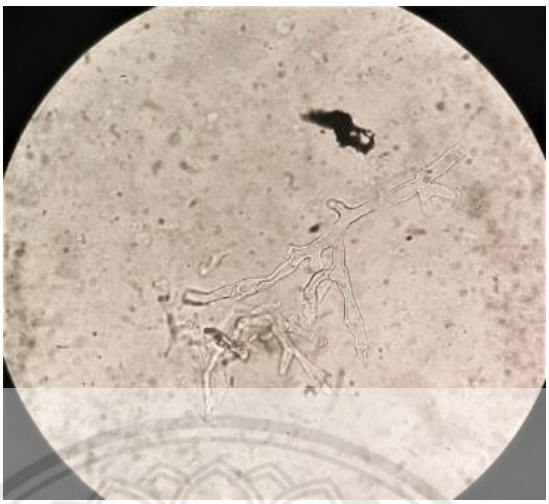
การวินิจฉัยที่เป็นมาตรฐานของ mucormycosis คือ การเห็นสายของเชื้อรา (hyphae) หรือการเพาะเชื้อขึ้นจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ซึ่งจะมีวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ ในการวินิจฉัย mucormycosis ดังนี้

1. การตรวจดูเชื้อราโดยตรง (Direct examination)

จัดเป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อรา โดยสามารถทำได้ข้างเตียงผู้ป่วยทันที และการตรวจวินิจฉัยที่ต้องนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อการระบุชนิดของเชื้อก่อโรค

1.1 10% KOH preparation

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อราที่สามารถทำได้ข้างเตียงผู้ป่วย (bedside diagnosis) ที่นิยมทำคือการย้อม ด้วย potassium hydroxide (KOH) ที่ความเข้มข้น 10 - 40 % โดยสาร KOH นั้นจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นเบสแก่ ทำให้สามารถย่อยสลายเคอราตินและเศษเซลล์ต่างๆ แต่สารนี้ไม่ย่อยสลายเชื้อราในตัวอย่างส่งตรวจ เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรามีส่วนประกอบที่สำคัญเป็นโพลิเมอร์ของไคติน (chitin) และกลูแคน (glucan) ซึ่งประสานกันอยู่ในรูปตาข่ายทำให้มีความแข็งแรงมาก ดังนั้นข้อดีของการตรวจด้วยวิธีนี้คือจะทำให้เห็นตัวเชื้อราได้ชัดเจนขึ้น โดยที่โครงสร้างของเชื้อราไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่วิธีการตรวจด้วย KOH นี้จะไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อราได้ สามารถบอกได้เพียงลักษณะตัวเชื้อที่เห็น คือ septate, non-septate form หรือ yeast forms (46) ดังแสดงในภาพ 21



ภาพ 21 แสดงภาพการย้อม KOH wet mount ลักษณะสายราขนาดใหญ่, non-septate, ribbon-like hyphae with wide-angle หรือ right-angle branching (47)

1.2 การย้อมสีเชื้อรา (fungal staining)

การย้อมสีเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจ จุดประสงค์เพื่อย้อมองค์ประกอบของเชื้อราเมื่อทำการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะทำให้สามารถบ่งชี้โครงสร้าง จำแนกชนิดเชื้อราและวินิจฉัยเชื้อราที่ก่อโรคได้อย่างแม่นยำ ทั้งนี้สีที่ใช้สำหรับย้อมมีหลายชนิด การเลือกชนิดของสีย้อมจึงขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนหรือองค์ประกอบของเซลล์ของเชื้อราที่ต้องการย้อม เช่น การย้อมสีนิวเคลียส การย้อมสีเส้นใย การย้อมสปอร์ หรือการย้อมเพื่อตรวจดูความมีชีวิตของสปอร์ เป็นต้น ตัวอย่างสีที่นิยมใช้ย้อมเชื้อรา ได้แก่ Lactophenol cotton blue ใช้ย้อมจากสิ่งส่งตรวจที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองหรือวุ้นเพาะเลี้ยง การย้อมนี้สามารถยืนยันได้เพียงเนื้อเยื่อดังกล่าวมีการติดเชื้อราจริงและน่าจะเป็นสาราหรือราสาย แต่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อราก่อโรคได้ ดังนั้นถ้าต้องการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราจำเป็นต้องนำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อไป

การย้อมพบเชื้อรา Mucorales โดยตรงจากเสมหะ สารคัดหลั่งจากไซนัส หรือน้ำล้างหลอดลม ถุงลมและหลอดลมฝอยนั้นบ่อยครั้งที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ แต่หากผู้ป่วยมีความเสี่ยงและมีอาการที่น่าสงสัยก็สามารถบอกได้ว่ามีหลักฐานการติดเชื้อ สายเชื้อรา Mucorales มีลักษณะจำเพาะคือเส้นใยราจะกว้างเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-16 ไมครอน เส้นใยไม่มีผนังกั้น ลักษณะคล้ายริบบิ้น แตกกิ่งก้านด้านข้างเป็นตอสั้นๆ ทำมุม 90 องศา ย้อมสีแกรมจะติดสีไม่ดี การย้อม chitin-binding stains เช่น calcofluor หรือ fungi flour หรือ Blanco fluor ใช้สำหรับดูด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ McDermott และคณะ ได้รายงานว่าการย้อมเนื้อเยื่อด้วย calcofluor เป็นวิธีที่รวดเร็วสำหรับใช้ในขณะผ่าตัดว่าสามารถตัดชิ้นเนื้อออกได้หมดหรือไม่ (free margins) (46)

1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการ (fungal culture)

ในบางครั้งปริมาณเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจอาจไม่เพียงพอ หรืออาจมีการปนเปื้อนได้ จึงต้องมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อรา (fungal isolation and propagation) เพื่อให้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการตรวจวินิจฉัยหรือนำไปศึกษาในแนวลึกต่อไป การเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้นจะสามารถดูลักษณะของเชื้อราเบื้องต้นได้ว่า มีลักษณะเป็น yeast หรือ mold มีสีหรือไม่ มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่ ซึ่งสิ่งเหล่านี้นำไปสู่การจำแนกชนิดของเชื้อราได้ค่อนข้างแม่นยำ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้น มีการเลือกใช้สารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ Non-selective medium ซึ่งเป็นอาหารที่สามารถใช้ได้กับการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ใช้กันอยู่บ่อยๆ คือ Sabouraud's dextrose agar (SDA) หรือ Brain heart infusion (BHI) และ Selective medium จัดเป็นอาหารที่จำเพาะและมีการเพิ่มสารบางชนิดเพื่อลดการปนเปื้อน จากเชื้ออื่นๆ โดยสารที่นิยมใส่ในอาหารคือ chloramphenicol เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และ cycloheximide เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราในสิ่งแวดล้อมและเชื้อราที่โตเร็วแต่มักเป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรค เป็นต้น ในบางครั้งอาจมีการเพิ่มสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิด ได้แก่ organic sulfur สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ dermatophytes หรืออาจเพิ่มสีที่ใช้ในการตรวจสอบ เช่น phenol red หรือ methylene blue เป็นต้น (46)

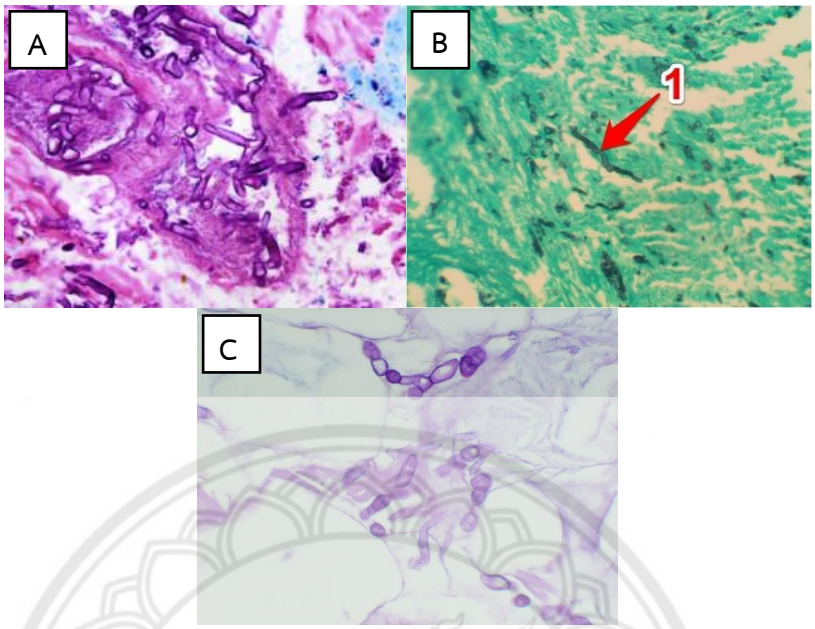
การเพาะเชื้อเพื่อการวินิจฉัย Mucormycosis เป็นการเพาะเชื้อลงใน SDA ที่มีน้ำตาล Dextrose ความเข้มข้นร้อยละ 1-2 Peptone ความเข้มข้นร้อยละ 1 และวุ้น Sabouraud ความเข้มข้นร้อยละ 2-3 อาจผสมยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ไม่ผสม cycloheximide เชื้อราจะเจริญได้อย่างรวดเร็วจนเต็มหลอดหรือจานเพาะเชื้อภายใน 1 สัปดาห์ อาจนำสิ่งส่งตรวจลงเพาะในขนมปังที่ปราศจากเชื้อก็ได้ เชื้ออันดับนี้ตายได้ง่ายเมื่อออกนอกร่างกาย หรือแช่ในตู้เย็น บางครั้งการเพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ตรวจพบได้โดยวิธีทางพยาธิวิทยา การจำแนกสกุลและสายพันธุ์อาศัยคุณสมบัติตามที่กล่าวมาข้างต้น

ภาวะที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสร้างไซโกสปอร์ แต่มักไม่พบเนื่องจากเชื้ออันดับนี้สายรา (+) และ (-) อยู่ต่างโคโลนีกัน (heterothallic fungus) ไซโกสปอร์มักเกิดจากการชักนำ เมื่อปรากฏโคโลนีแล้วถ้านำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบแต่สายราชนิดไม่มีผนังกั้น ทำให้นึกถึง *Saksenaea vasformis* หรือ *Actinoporus elegans* ซึ่งจำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารที่กระตุ้นการ

สร้างสปอร์และตัดวุ้นลงลอยในน้ำกลั่นหรือลงเพาะต่อใน water agar อีกประการหนึ่งเนื่องจากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างสปอร์ได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อาจเลี้ยงเชื้อใน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) จนเชื้อขึ้นแล้วตัดวุ้นลงลอยในน้ำกลั่นที่ผสมสารสกัดจากยีสต์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สปอร์จะเกิดใน 7-10 วัน เชื้อนี้เป็นเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในห้องปฏิบัติการ การตรวจทางพยาธิวิทยาจึงมีความสำคัญ ถ้าเพาะเชื้อขึ้นในครั้งแรกและถ้าเป็นไปได้ ควรขอสิ่งส่งตรวจซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เชื้อที่เพาะขึ้นในครั้งหลังจะต้องเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับเชื้อที่ตรวจเจอในครั้งแรก จึงจะบอกความสำคัญในแง่การก่อโรคได้ (30)

1.4 การตรวจทางพยาธิวิทยา (Histopathological examination)

ผลการวินิจฉัยขึ้นอยู่กับลักษณะทั่วไปของเส้นใยเชื้อรา mucoromycetes ในการตรวจชิ้นเนื้อ (biopsy) หรือ bronchoalveolar lavage (BAL) ของผู้ป่วยที่เป็น pulmonary mucor-mycosis การตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยที่สำคัญมาก เพราะสามารถแยกเชื้อราก่อโรคในตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงที่ปนเปื้อนได้ และสามารถบ่งบอกได้ว่ามีการติดเชื้อในหลอดเลือดหรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อร่วมกับเชื้อราอื่นๆ โดยทั่วไปแล้วเชื้อราสกุล *Mucorales* จะไม่มีสี สายรากว้าง (5–20 ไมโครเมตร) ผนังบาง ลักษณะเส้นใยคล้ายริบบิ้น อาจมีไม่มีผนังกั้นหรือมีผนังกั้น (pauciseptate) และมีการแตกแขนงเป็นมุมฉาก ตรงกันข้ามกับเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. หรือราสายชนิดอื่นๆ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะมีความกว้าง 3-5 ไมโครเมตร มีผนังกั้นและแตกแขนงเป็นมุมแหลม การย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) จะเห็นเฉพาะผนังเซลล์ ไม่เห็นโครงสร้างที่อยู่ภายใน หรือบางครั้งอาจเห็นเส้นใยที่เสื่อมสภาพมาก การย้อมที่สามารถช่วยให้เห็นผนังเชื้อราได้ดี ได้แก่ การย้อมด้วยสี Grocott methenamine-silver (GMS) และการย้อมด้วยสี periodic acid-Schiff (PAS) แต่การย้อมด้วย PAS จะช่วยให้มองเห็นเนื้อเยื่อรอบข้างได้ดีกว่าการย้อมด้วย GMS (48) ดังแสดงในภาพ 22



ภาพ 22 แสดงลักษณะของเชื้อก่อโรค Mucormycosis (A) ย้อมด้วยสี H&E (B) ย้อมด้วยสี GMS (C) ย้อมด้วยสี PAS (49-51)

1.5 การตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry analysis)

ในปัจจุบันยังไม่มีการนำการตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยามาใช้ในการวินิจฉัยเนื่องจากปรากฏว่าเชื้อสกุล *Mucor, Rhizopus, Absidia* มีแอนติเจนร่วมกัน แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) มาทำเป็นแอนติเจนใช้ทดสอบในผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้พบว่าให้ผลบวกเพียงร้อยละ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยานั้นมีความไวและความจำเพาะที่ต่ำ และยังมีการเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กับเชื้อ *Candida albicans, Aspergillus* sp., *Penicilium chrysogenum* (52)

1.6 วิธีการตรวจทางโมเลกุล (Molecular methods)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อราด้วยวิธีอณูพันธุ์วิทยา (molecular technique) ที่นิยมใช้กันปัจจุบัน คือ polymerase chain reaction (PCR) based assay เช่น conventional PCR และ real time PCR โดยจะนิยมตรวจหาความจำเพาะที่บริเวณ highly conserved area ของ เชื้อรา เช่น 18S, 5.8S, Internal transcribed spacer (ITS) วิธี PCR นี้สามารถตรวจวินิจฉัยได้แม้จะมีเชื้อราปริมาณเพียง 1 CFU/ml และสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่การติดเชื้อภายใน 2 - 9 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา (30, 45)

2.2.4 การรักษาโรค Mucormycosis

การรักษา mucormycosis มี 4 ประการ ได้แก่

1. วินิจฉัยให้ได้อย่างรวดเร็ว การให้ยาต้านเชื้อราภายใน 5 วันหลังการวินิจฉัย พบว่าช่วยลดอัตราการเสียชีวิต เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ยาต้านเชื้อราหลัง 6 วัน หลังการวินิจฉัย (ร้อยละ 83 เทียบกับ ร้อยละ 49) ดังนั้นการวินิจฉัยให้ได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ต้นเป็นจุดสำคัญในการเริ่มให้ยาต้านเชื้อราที่เหมาะสม

2. รักษาโรคประจำตัวของผู้ป่วยที่เป็นปัจจัยโน้มนำ ให้เกิดโรค mucormycosis ถ้าเป็นไปได้ เช่น การลดหรือ หยุดใช้ยากดภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะคอร์ติโคสเตียรอยด์ รักษาผู้ป่วย DKA ให้มีภาวะน้ำตาลเป็นปกติและรักษาสมดุลกรด ด่างในเลือดให้เป็นปกติอย่างรวดเร็ว

3. การผ่าตัดเนื้อตายออก เนื่องจาก mucormycosis ทำให้หลอดเลือดอุดตันและเกิดเนื้อตายตามมา เป็น ผลให้ยาฆ่าเชื้อราเข้าสู่เนื้อเยื่อนั้นไม่ได้ ดังนั้นการตัดเอาเนื้อตายออกจึงเป็นสิ่งสำคัญในการกำจัด mucormycosis ให้หมดไป

4. ให้ยาต้านเชื้อราอย่างถูกต้องและรวดเร็ว (45)

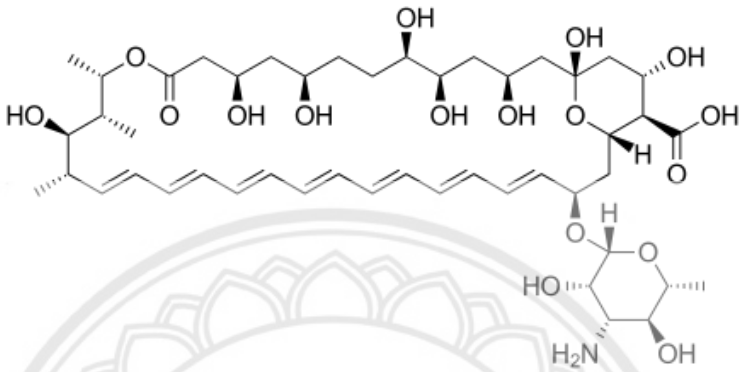
2.2.4.1 ยาต้านเชื้อราสำหรับ Mucormycosis (Antifungal agent for mucor-mycosis)

1. กลุ่มโพลิอีน (Polyenes)

Polyene เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์โดยการจับกับ ergosterol ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเชื้อราบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นรู เกิดการเคลื่อนที่ของสารประกอบภายในเซลล์ของเชื้อราออกสู่ภายนอกเชื้อราจึงไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ ได้แก่ Amphotericin B deoxycholate (AmB) และ Lipid formulation of AmB (LFABs) Amphotericin B เป็นยาปฏิชีวนะต้านเชื้อราที่ผลิตได้จาก Streptomyces nodosus เป็นยาซึ่งมีอาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญคือพิษต่อไตซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดยาที่ใช้ การปรับขนาดยาเพิ่มขึ้นทำได้ยากจึงมีการผลิตยาในรูปแบบลิพิดซึ่งมีหลายรูปแบบ (เช่น liposomal amphotericin B และ amphotericin B lipid complex หรือ amphotericin B sodium cholesteryl sulfate) ขึ้น เพื่อลดผลข้างเคียง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิษต่อไตและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะให้ยาโดยฤทธิ์ต้านเชื้อราไม่ด้อยลง รูปแบบยาที่จัดเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ คือ liposomal amphotericin B เรียกย่อๆ ว่า LAmB (53)

Amphotericin B ออกฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยจับกับสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งยาสามารถจับได้ทั้งสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์และเชื้อรา แต่จับกับเออโกสเตอรอลซึ่งเป็นสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราได้ดีกว่าคอเลสเตอรอลซึ่งเป็นสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์มนุษย์ จึงทำให้

นำ Amphotericin B มาใช้ทางคลินิกได้ การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ เป็นเหตุให้สูญเสียโพแทสเซียมและสารต่าง ๆ ในเซลล์ อาการไม่พึงประสงค์บางประการของ Amphotericin B เช่น การสูญเสียอิเล็กโทรไลต์และพิษต่อไตอาจอธิบายได้ จากคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ข้างต้นของยา โดยจะมีโครงสร้างของยา Amphotericin B ดังแสดงในภาพ 23 (54)



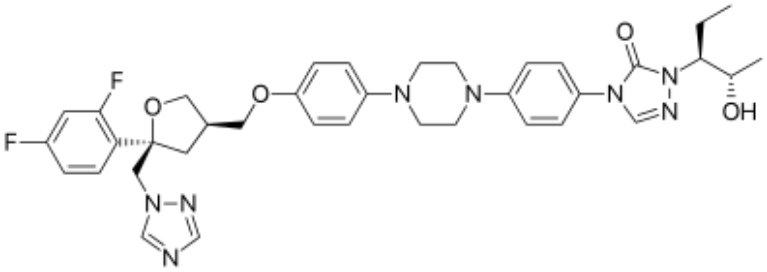
ภาพ 23 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Amphotericin B (55)

2. กลุ่มเอโซล (Azoles)

เป็นกลุ่มยาที่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ 14α-sterol demethylase ซึ่งมีผลในการสร้าง ergosterol ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่เยื่อหุ้มเซลล์ และยังมีผลต่อ 14α- sterol demethylsterol ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ATPase ทำให้การทำงานของ electron transports เปลี่ยนแปลงไป เชื้อราจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ได้แก่ Posaconazole (53)

Posaconazole เป็น broad-spectrum triazole antifungal สำหรับรักษาและป้องกันการติดเชื้อรา *Aspergillus* และ *Candida* ผลิตเป็นยา (Noxafil) ในรูปแบบยาเม็ดชนิดที่เป็น delayed-release tablet (100 มิลลิกรัม) ยาน้ำแขวนตะกอน (40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และยาฉีด (300 มิลลิกรัม ให้แบบ infusion) ขนาดรับประทานในกรณียาเม็ดคือ 300 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง (โดยวันแรกรับประทาน 300 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง) ส่วนยาน้ำแขวนตะกอนให้รับประทาน 200 มิลลิกรัม วันละ 3-4 ครั้ง (รวมเป็น 600-800 มิลลิกรัม/วัน) ชนิดยาเม็ดมี bioavailability มากกว่าชนิดยาน้ำแขวนตะกอน การใช้ยาชนิดเม็ดและชนิดยาน้ำแขวนตะกอนจึงไม่อาจทดแทนกันโดยจำนวนมิลลิกรัมที่เท่ากัน หากมีการสั่งใช้ยาชนิดเม็ดแต่จ่ายชนิดยาน้ำแขวนตะกอนแทนโดยไม่มีการปรับขนาดและวิธีรับประทาน (กล่าวคือขนาดและวิธีรับประทานเป็นของชนิดเม็ด) อาจให้ประสิทธิผลไม่เพียงพอในการรักษาการติดเชื้อรา ในทางกลับกันหากมีการสั่งใช้ชนิดยาน้ำแขวนตะกอนแต่จ่ายชนิดเม็ดแทนโดยไม่มีการปรับขนาดและวิธีรับประทาน (กล่าวคือขนาดและวิธี

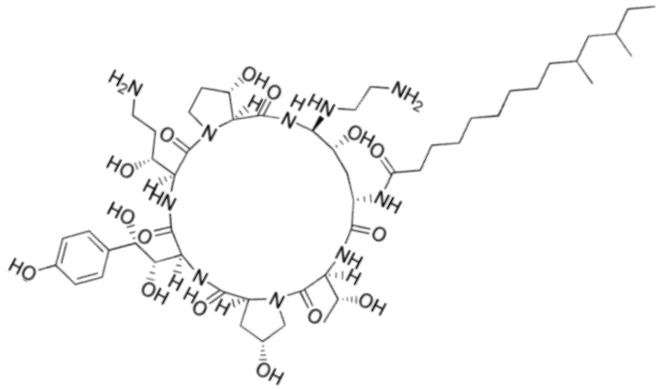
รับประทานเป็นของยาน้ำแขวนตะกอน) อาจได้รับยามากเกินไปจนเกิดอาการพิษได้โดยมีโครงสร้างของยา Posaconazole (56) ดังแสดงในภาพ 24



ภาพ 24 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Posaconazole (57)

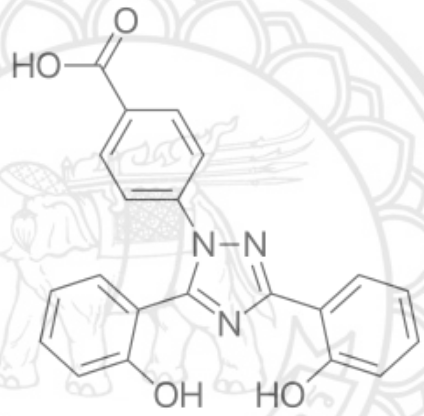
2.2.4.2 การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราแบบสูตรผสม (Combination antifungal therapy for mucormycosis)

Echinocandins ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ β-(1,3)-glucan synthase ที่เชื้อราใช้ในการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เชื้อรามีความเปราะบางและถูกทำลายได้ง่ายขึ้นตัวอย่างยากลุ่มนี้ได้แก่ Caspofungin Micafungin และ Anidulafungin ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อรา Aspergillosis และ Candidiasis ของอวัยวะภายในที่ดื้อต่อ Amphotericin B และ Azoles ยากลุ่มนี้ไม่มีรูปกิน ต้องหยดเข้าทางหลอดเลือดดำเท่านั้น มีการศึกษาย้อนหลังถึงการให้ LFAB ร่วมกับ Caspofungin ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานที่เป็น mucormycosis แบบติดเชื้อโพรงจมูกลุกลามสู่สมอง เปรียบเทียบกับการให้ยากลุ่มโพลิอีนเพียงอย่างเดียว พบว่ากลุ่มที่ให้ยาสองชนิด (LFAB ร่วมกับ caspofungin) มีผลการรักษาที่เหนือกว่ากลุ่มที่ให้โพลิอีนเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (odds ratio 10.9, p = 0.02) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่เป็นแบบ prospective randomized trial เพื่อยืนยันผลการศึกษานี้ โดยมีโครงสร้างของยา Caspofungin ดังแสดงในภาพ 25 (45)



ภาพ 25 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Caspofungin (58)

Iron chelation therapy การใช้ deferoxamine เป็นยาขับธาตุเหล็กนั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด mucormycosis ดังที่ได้กล่าวในกลไกการเกิดโรค แต่ปัจจุบันมียาขับเหล็กชนิดใหม่ ๆ ที่ Mucorales ไม่สามารถนำเหล็กมาใช้ได้ deferasirox เป็นยาขับเหล็กที่ได้รับการอนุมัติจาก USFDA ให้ใช้รักษาภาวะเหล็กเกินในกลุ่มผู้ป่วยโลหิตจางที่ต้องได้รับเลือดบ่อย ๆ การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า deferasirox สามารถเป็น fungicidal ได้ ที่ MIC90 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในผู้ป่วยที่ได้รับ deferasirox 20 มก./กก./วัน จะมีระดับยาในซีรัมมากกว่า 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นถ้าเป็นไปได้ควรที่จะรักษาระดับยาในซีรัมให้เกินระดับ MICs ของ Mucorales ยา deferasirox มีรูปแบบเป็นยารับประทานเท่านั้น ดังนั้นผู้ป่วยที่มีปัญหาด้านการดูดซึมจึงไม่ควรรักษาด้วยยาชนิดนี้ โดยจะมีโครงสร้างของยา Defrasirox ดังแสดงในภาพ 26 (45)



ภาพ 26 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Defrasirox (59)

Other adjunctive therapies การให้ proinflammatory cytokines เช่น interferon-gamma และ granulocyte macrophage colony-stimulating factor เพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวในการต่อต้าน mucormycosis แต่ยังไม่มีข้อกำหนดให้ใช้ recombinant cytokines เป็นการรักษาแรกสำหรับ mucormycosis (45)

2.4.3 ยาต้านเชื้อราที่เป็นยาหลักสำหรับ Mucormycosis (Primary antifungal therapy)

ยาหลัก ได้แก่ ยากลุ่มโพลิอีน ยกเว้นผู้ป่วยปฏิเสธการรักษาด้วยโพลิอีนหรือมีการติดเชื้อที่ไม่รุนแรงในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติที่สามารถผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกได้หมด เช่น ผู้ป่วยติดเชื้อผิวหนังที่ลึกไม่เกินชั้นเยื่อพังผืด (fascia) การให้ยาแบบผสมผสาน (combination therapy) เป็นการรักษาหลักยังไม่มีข้อบ่งชี้ชัดเจน ชนิดและขนาดของยาในการรักษา mucormycosis รวมถึงข้อดีและข้อเสียของการให้ยา ดังแสดงในตาราง 2 (45)

ตาราง 2 ยาต้านเชื้อราสูตรหลักสำหรับ Mucormycosis (45)

ยา	ขนาดยาที่แนะนำ	ข้อดีและการศึกษาที่มีสนับสนุน	ข้อเสีย
การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราที่เป็นยาหลัก (Primary antifungal therapy)			
AmpB	1-1.5 มก./กก./วัน	มีการใช้ในทางคลินิกมานานถึง 150 ปี ราคาไม่แพงเป็นยาชนิดเดียวที่ได้ขึ้นทะเบียนตำรับยาอนุญาตให้ใช้ในการรักษา mucormycosis	ผลข้างเคียงจากยาสูงและยาเข้าถึงระบบประสาทและสมองได้ไม่ดี
LAmB	5–10 มก./กก./วัน	มีพิษต่อไตน้อยกว่า AmpB ยาเข้าถึงระบบประสาทและสมองได้ ดีกว่า AmpB และ ABLC149 การศึกษาในหนูทดลองและการ ทบทวนผล การใช้ยาทางคลินิกย้อนหลังพบว่าผลการรักษาดีกว่าเมื่อเทียบกับ AmpB	ราคาแพง

ตาราง 2 ยาต้านเชื้อราสูตรหลักสำหรับ Mucormycosis (ต่อ)

ABLC	5–7.5 มก./กก./วัน	มีพิษต่อไตน้อยกว่า AmpB การศึกษาในหนูทดลองและการ ทบทวนผลการใช้ยาทางคลินิกย้อนหลัง พบว่าจะได้ผลดีถ้าใช้ยาร่วมกับ echinocandins	มีพิษต่อไตมากกว่า LAmB15 มีประสิทธิภาพในการรักษาน้อย ถ้าใช้เป็นยาตัวเดียวในการรักษา (monotherapy) โดยเฉพาะใช้ในการ รักษาอาการติดเชื้อในสมอง
การรักษาด้วยยาสูตรผสม (Primary combination therapy)			
Caspofungin ร่วมกับ lipid polyene	70 มก.ทางหลอดเลือดดำครั้งแรก แล้วให้ 50 มก./วัน นาน มากกว่าหรือเท่ากับ 2 สัปดาห์ สำหรับในเด็ก ให้ 50 มก./พื้นที่ผิวร่างกาย ทางหลอดเลือดดำ	สามารถมีฤทธิ์เสริมกันได้ จากการศึกษาในหนูทดลองที่เป็น mucormycosis แบบแพร่กระจาย มีการเก็บข้อมูลทางคลินิกย้อนหลัง พบว่าผลการรักษาด้วย caspofungin-lipid polyene ในผู้ป่วยติดเชื้อโพรงจมูกลุกลาม เข้าสู่สมอง ได้ผลเหนือกว่าผู้ป่วย ที่ได้ยากลุ่ม lipid polyene เพียงอย่างเดียว	ข้อมูลการใช้ทางคลินิกยังมีน้อยมาก

ตาราง 2 ยาต้านเชื้อราสูตรหลักสำหรับ Mucormycosis (ต่อ)

Micafungin หรือ anidulafungin ร่วมกับ lipid polyene	100 มก./วัน นาน ≥2 สัปดาห์ micafungin 4 มก./กก./วัน สำหรับเด็ก micafungin 10 มก./กก./วัน สำหรับทารกน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน anidulafungin 1.5 มก./กก./วัน สำหรับเด็ก	การศึกษาในหนูทดลองที่เป็น mucormycosis แบบแพร่กระจาย พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กับ LAmB ได้	ไม่มีข้อมูลการใช้ทางคลินิก
Deferasirox ร่วมกับ lipid polyene	20 มก./กก. รับประทานวันละ ครั้ง นาน 2–4 สัปดาห์	สามารถมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา mucor ได้ในหลอดทดลอง เสริมฤทธิ์กันกับ LAmB ในการทดลองในหนูที่ติดเชื้อ mucor แบบแพร่ กระจาย	มีเฉพาะรูปแบบยารับประทานเท่านั้น และยังไม่มีข้อมูลการใช้ทางคลินิก

2.4.4 การรักษาอื่นๆ (Salvage therapy)

Deferasirox หรือ Posaconazole อาจเป็นยาทางเลือกเมื่อการรักษาด้วยยากลุ่มโพลิอีนไม่ได้ผลหรือผู้ป่วยทนต่อยากลุ่มโพลิอีนไม่ได้

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) อาจพิจารณาให้ในผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลต่ำ ไปจนกระทั่งหายจากภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ ส่วนการให้ granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) หรือ interferon-gamma อาจให้เพื่อกระตุ้นระบบปฏิกิริยาการต่อต้านเชื้อของผู้ป่วยที่ไม่ได้มีเม็ดเลือดขาวต่ำแต่ภาวะการติดเชื้อไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลัก ดังแสดงในตาราง 3 (45)

ตาราง 3 การรักษาอื่น ๆ สำหรับ Mucormycosis (Salvage therapy) (45)

ยา	ขนาดยาที่แนะนำ	ข้อดีและการศึกษาที่มีสนับสนุน	ข้อเสีย
Posaconazole ร่วมกับ lipid polyenes หรือให้เดี่ยวๆ	200 มก. รับประทาน 4 ครั้ง/ วัน หรือ 400 มก. รับประทาน 2 ครั้ง/วัน	มีการศึกษาย้อนหลังถึงการให้ Posaconazole แบบรับประทานพบว่าอัตราการรักษาประสบผลสำเร็จร้อยละ 60-70	การศึกษาในหนูทดลองพบว่าการให้ Posaconazole เดี่ยวๆ มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการรักษาด้วยยากลุ่ม โพลิอีนการให้ร่วมกับ LFAB ไม่ได้เหนือกว่าการให้ LFAB เดี่ยวๆ
Deferasirox ร่วมกับ lipid polyenes	20 มก./กก. รับประทานวันละ 1 ครั้ง นาน 2-4 สัปดาห์	มีรายงานผู้ป่วยได้รับยา deferasirox รับประทานประสบความสำเร็จในการรักษา	ยังขาดข้อมูลที่มีการตีพิมพ์
Granulocyte transfusions (สำหรับผู้ป่วยที่เม็ดเลือด ขาวชนิดนิวโตรฟิลต่ำเป็น ระยะเวลานาน)	~109 เซลล์/กก.	นิวโตรฟิล และ ABLC ออกฤทธิ์เสริมกันในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ มีรายงานผู้ป่วยได้รับ granulocyte transfusions สนับสนุน	ยังขาดข้อมูลทางคลินิกเกี่ยวกับภาวะแทรกซ้อนของการให้ granulocyte และ การเกิด alloimmunization

ตาราง 3 การรักษาอื่น ๆ สำหรับ Mucormycosis (Salvage therapy) (45)

Recombinant cytokines G-CSF, GM-CSF, or IFN-g	ขนาดยา G-CSF 5 ไมโครกรัม/กก./วัน GM-CSF 100–250 ไมโครกรัม/พื้นที่ผิวร่างกาย (ตร.ม.) IFN-g 50 ไมโครกรัม/พื้นที่ ผิวร่างกาย (ตร.ม.) สำหรับผู้ป่วยที่มีพื้นที่ผิวกาย ≥ 0.5 ตร.ม. และ 1.5 ไมโครกรัม/ กก.สำหรับผู้ป่วยที่มีพื้นที่ ผิวกาย < 0.5 ตร.ม.	การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถกระตุ้นการตอบสนองของนิวโตรฟิลต่อเชื้อ Rhizopus ในทางคลินิกพบเป็นเพียงผู้ป่วยที่มีการรายงาน	ยังขาดข้อมูลทางคลินิก

หมายเหตุ ABLC, amphotericin B lipid complex; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; IFN, interferon

2.4.5 ระยะเวลาในการให้ยาต้านเชื้อรา

การให้ยาต้านเชื้อราใน mucormycosis จะใช้เวลานานเท่าไรยังไม่มีข้อกำหนดแน่ชัด ขึ้นกับผู้ป่วยแต่ละราย โดยทั่วไปจะให้ยาไปจนกระทั่งอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อหายไป การตรวจภาพถ่ายทางรังสีพบว่ารอยโรคหายไปหรือไม่เพิ่มขึ้นในระหว่างติดตามการรักษาและโรคประจำตัวของผู้ป่วยหายจากภาวะภูมิคุ้มกันต่ำแล้ว สำหรับผู้ป่วยที่ต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันอยู่ จำเป็นต้องให้ยาต้านเชื้อราต่อเนื่องเพื่อป้องกันการติดเชื้อ (secondary prophylaxis) ยาที่ใช้เป็น secondary prophylaxis คือ Posaconazole ในผู้ป่วยที่ต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นครั้งคราว เช่น ผู้ที่ได้รับยาเคมีบำบัดเป็นรอบ ๆ อาจให้ secondary prophylaxis เฉพาะช่วงที่เม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิลต่ำไปจนกระทั่งไม่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (45)

2.3 Aspergillosis

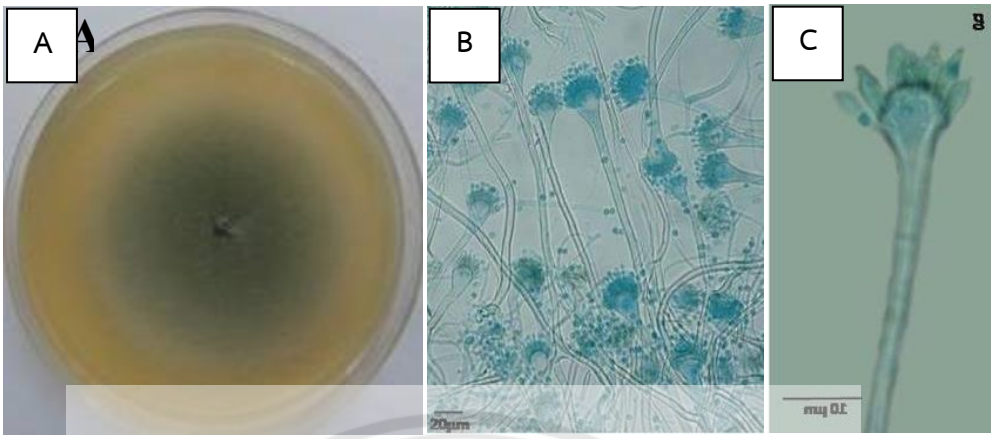
Aspergillosis เป็นโรคทางเชื้อราสามารถทำให้เกิดโรคในร่างกายได้หลายระบบเช่น หู ตา จมูกและปอด การติดเชื้อราชนิดนี้สามารถลุกลามไปถึงกระดูก สมอง และเยื่อหุ้มสมองได้ เชื้อสกุลนี้มีมากกว่า 185 ชนิด ซึ่งประมาณ 20 ชนิดได้รับการรายงานว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อฉวยโอกาสในมนุษย์ เช่น *A. flavus* และ *A. fumigatus* ซึ่งจัดเป็นเชื้อสกุล *Aspergillus* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด เป็นต้น (60)

2.3.1 เชื้อก่อโรค

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Eurotiomycetes
Family	Trichocomaceae
Genus	*Aspergillus*

โคโลนีของเชื้อราสกุลนี้สามารถเจริญเติบได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องจนถึง 45 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ถึง 7 เซนติเมตร โคโลนีมีลักษณะแบนนุ่มหรือเป็นผงด้านหน้าของโคโลนีมีสีขาวเมื่อเจริญเติบโตขึ้นจะกลายเป็นสีเขียว สีเขียวสีน้ำเงิน หรือสีเขียวควันที่มีขอบสีขาว คุณสมบัติของเชื้อ *A. fumigatus* จัดเป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น (septate hypha) สายราไม่มีสี มีก้าน conidiophore งอกตรงจากสายรา ตำแหน่งที่ก้านงอกจากสายรา เรียกว่า foot cell มีขนาดใหญ่กว่าสายราและมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านซูจะพองออกเป็นกระเปาะ (vesicle) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-30 ไมโครเมตร บนรอบๆ กระเปาะจะพบ phialide ชั้นเดียว (uniseriate) หรือสองชั้น (biseriate) ปลายของ phialide เป็นที่เกิดของ conidia ซึ่งมีเซลล์เดียว กลม ผิวเรียบ หรือขรุขระคล้ายหนามเวลาที่ conidia ตัวอ่อนเกิดจะดัน conidia ตัวแก่ออกไปจึงเกิด conidia เป็นสาย (basipetal chain) (30, 61) ดังแสดงในภาพ 27



ภาพ 27 แสดงลักษณะของเชื้อ *A. fumigatus*
(A) ลักษณะโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (B) Conidiophores
(C) Vesicle and phialides (62)

2.3.2 การก่อโรค อาการของโรค และระบาดวิทยา

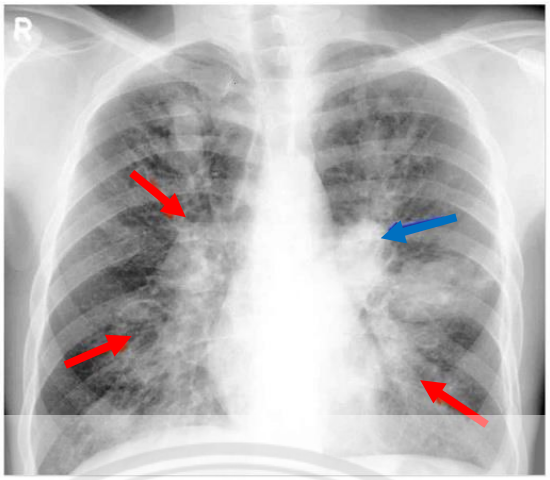
เชื้อราในสกุล *Aspergillus* พบได้บ่อยที่สุดตามสิ่งแวดล้อมทั่วโลก โดยคนจะได้รับเชื้อจากการสูดดม conidia และสายราซึ่งปลิวอยู่ตามธรรมชาติ สปีชีส์ของเชื้อสกุลนี้ที่มีความรุนแรงการก่อโรคมากที่สุดคือ *A. fumigatus* รองลงมาได้แก่ *A. niger*, *A. flavus*, และ *A. terreus* สามารถก่อโรคได้กว้างขวาง โดยโรคที่เกิดขึ้นเรียกว่า Aspergillosis อาการมีตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงรุนแรง

2.3.2.1 ก่อโรคที่ปอด (Pulmonary Aspergillosis)

เกิดจากการสูดดมเชื้อเข้าไปจนทำให้ร่างกายเกิดปฏิกิริยาภูมิไวเกินชนิดที่ 1 (hypersensitivity type 1) โดยผู้ป่วยจะมีอาการหอบหืด (bronchial asthma) นอกจากนี้บางรายมีปฏิกิริยาตอบสนองของเนื้อเยื่อที่ปอดซึ่งแบ่งได้เป็น 4 แบบ ได้แก่

1. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA)

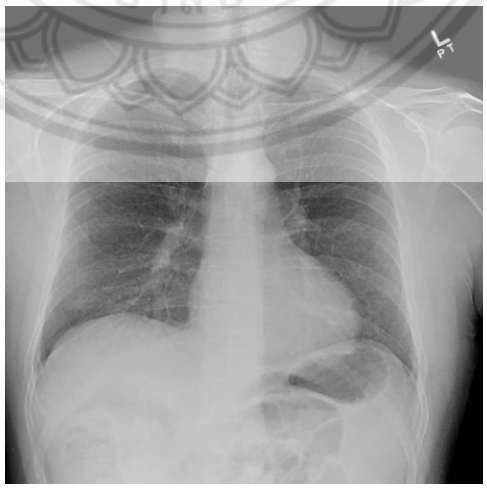
เกิดจากปฏิกิริยาภูมิไวเกินของร่างกายต่อเชื้อที่อยู่ตามหลอดลม โดยเชื้อจะไม่บุกรุกเข้าเนื้อเยื่อของปอดโรค ABPA นี้จะทำให้เยื่อบุหลอดลมเกิดการอักเสบแดง ผู้ป่วยจะมีอาการหอบ ไอ มีเสมหะปนเลือด และปฏิกิริยาภูมิไวเกินเกิดขึ้นทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 โดยยโรค ABPA แบ่งออกเป็นห้าระยะ คือ acute, remission, exacerbation, corticosteroid-dependent asthma และ fibrotic lung disease ภาพรังสีทรวงอกของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ดังแสดงในภาพ 28 (63)



ภาพ 28 ภาพเอ็กซ์เรย์ทรวงอกของผู้ป่วยโรค ABPA แสดงให้เห็นความทึบของปอดด้านซ้าย (ลูกศรสีน้ำเงิน) พบลักษณะ transient pulmonary infiltration (ลูกศรสีแดง) ซึ่งพบได้ในปอดทั้งสองข้าง ระยะของโรคอยู่ในระดับ acute และ remission (63)

2. Extrinsic allergic alveolitis (Hypersensitivity pneumonitis)

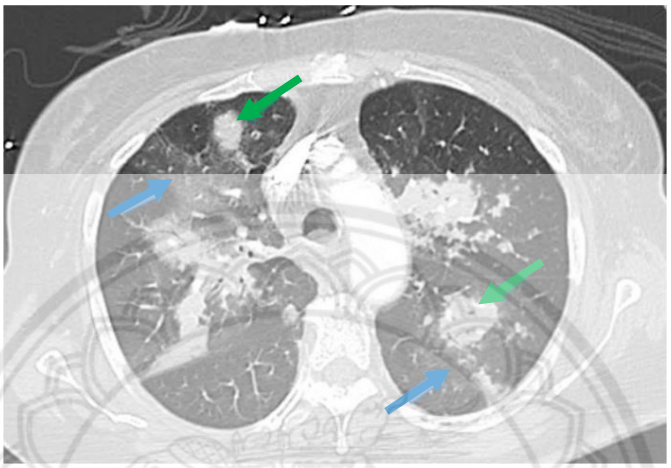
พบได้ในคนที่สูดดม conidia และสายราของเชื้อเข้าไปมากๆ เช่น คนงานในโรงกลั่นสุราซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อน ได้แก่ *A. clavatus* โดยจะปนเปื้อนอยู่ในข้าวบาร์เลย์ อาการของโรคจะเกิดขึ้นประมาณ 1 ชั่วโมง ภายหลังจากการสูดดม ผู้ป่วยจะมีอาการไอ หอบ มีไข้ หนาวสั่น โดยภาพถ่ายรังสีปอดจะพบลักษณะ diffuse interstitial infiltrate ดังแสดงในภาพ 29



ภาพ 29 แสดงภาพเอ็กซ์เรย์ทรวงอกของผู้ป่วยโรค Extrinsic Allergic Alveolitis (64)

3. Invasive bronchopulmonary aspergillosis

เกิดจากการสูดดมชื้อซึ่งเชื้อจะเข้าไปอยู่ในหลอดลม ทำให้เกิดการบุกรุกเข้าหลอดเลือดและเนื้อเยื่อในปอด มักเกิดภายหลังโรคปอดอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และการผ่าตัดปอด ดังแสดงในภาพ 30 (65)



ภาพ 30 แสดงผลการสแกนด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ความละเอียดสูงบริเวณหน้าอก แสดงให้เห็นส่วนทึบของปอด (ลูกศรสีน้ำเงิน) และพบการแทรกซึมของก้อนในปอด (ลูกศรสีเขียว) (65)

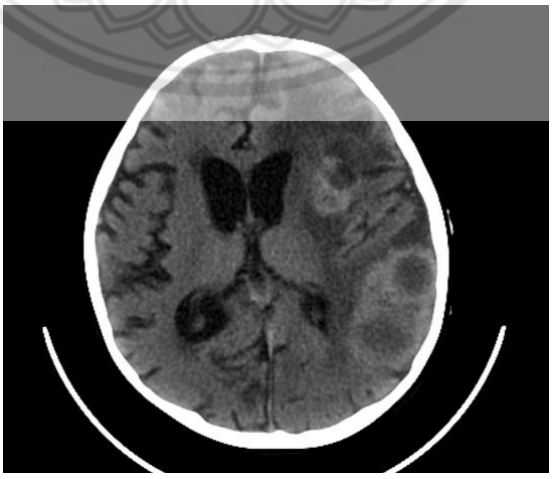
4. Aspergilloma

มักเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีโพรงในปอด เช่น วัณโรคปอด โรคถุงลมโป่งพอง โดยเชื้อจะเข้าไปอยู่ในโพรงและร่างกายมักไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อ เรียกกลุ่มเชื้อราที่เข้าไปอยู่ในโพรงว่า fungus ball เมื่อวินิจฉัยโรคด้วยผล CT scan ของปอดจะพบก้อนมวลลักษณะกลมหรือรีภายในโพรงปอด ดังแสดงในภาพ 31 บริเวณข้างๆของก้อนจะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว เรียกว่า Monod sign ซึ่งมีความแตกต่างจากผู้ป่วยที่เป็นโรค Invasive bronchopulmonary aspergillosis

ภาพ 31 ผลของ CT scan แสดงช่องขนาดใหญ่ในกลีบด้านบนขวาของปอด และพบเชื้อราอยู่ภายในช่องปอด (66)

2.2.2 ก่อโรคที่ระบบประสาท (Nervous system aspergillosis)

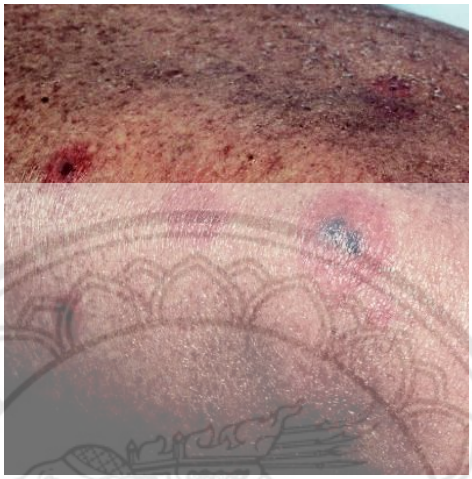
เป็นผลจากการติดเชื้อที่ปอดแล้วเชื้อกระจายเข้ากระแสเลือดหรือเชื้อบุกรุกจากตาจมูก โดยผู้ป่วยจะมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ ชัก และความดันในลูกตาเพิ่มขึ้น ถ้าอยู่ในระบบประสาทเชื้อจะบุกเข้าไปในผนังของหลอดเลือดทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดลิ่มเลือดอุดตันนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย เลือดออก อีกทั้งยังทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อและฝีในสมองเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพ 32



ภาพ 32 ผลของ CT scan ของผู้ป่วยที่เป็นโรค nervous system aspergillosis (67)

2.2.3 ก่อโรคที่ผิวหนัง (Cutaneous aspergillosis)

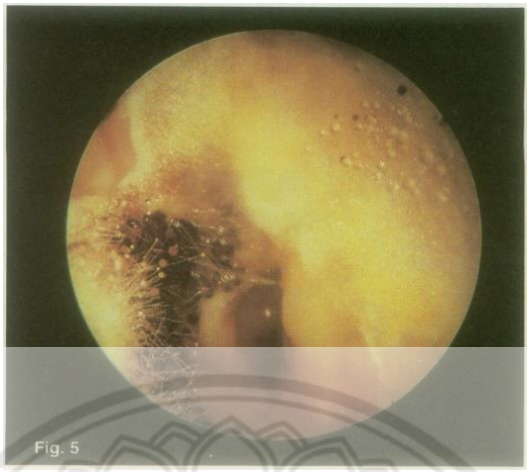
โรคที่ผิวหนังเกิดจากการกระจายตัวของเชื้อเข้ากระแสเลือดหรือในภาวะที่ผิวหนังเกิดความเสียหาย เช่น ถูกไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ลักษณะทางคลินิกอาจเป็นตุ่ม ก้อนที่ผิวหนัง ผิวหนังหนา สีคล้ำ ดังแสดงในภาพ 33



ภาพ 33 แสดงลักษณะของรอยโรคที่ผิวหนังหลายจุดบนขาของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกและเมื่อนำไปเพาะเชื้อพบเชื้อ *A. fumigatus* เกิดขึ้น (68)

2.2.4 ก่อโรคที่บริเวณ จมูก หู

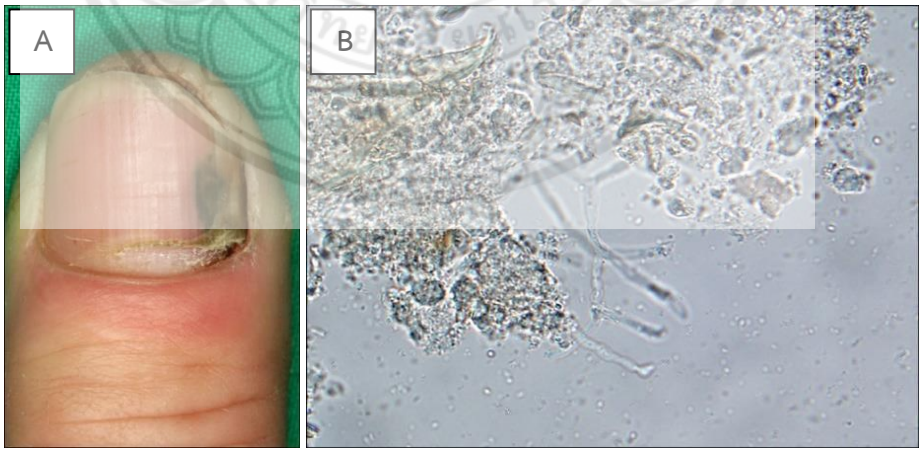
โพรงอากาศบริเวณจมูกมักพบเชื้อ *Aspergillus* และทำให้เกิดการอักเสบ ในส่วนคนที่ชอบแคะหูอาจก่อให้เกิดโรค Aspergillus Otomycosis ซึ่งผู้ป่วยมักมีอาการ ปวด หรือคันในหู โดยการวินิจฉัยทางคลินิกของโรค otomycosis ควรดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยังดูโครงสร้างของเชื้อราจากการทำ KOH preparation, calcofluor white or blankophor wet mounts โดยโรคที่เกิดจากเชื้อ *A. niger* จะพบเห็นเส้นใย septate hyphae ถุงและสปอร์สีดำจำนวนมาก ดังแสดงในภาพ 34



ภาพ 34 การวินิจฉัยโรค otomycosis ด้วย otoscopy
แสดงลักษณะของเชื้อ *A. niger* ภายในหู (69)

2.2.5 ก่อโรคที่เล็บ (Onychomycosis)

เกิดจากเชื้อ *Aspergillus* ลักษณะทางคลินิกเล็บจะมีสีน้ำตาลหรือดำ อาจพบจุดขาว ยุ่ย ผิวหนังข้างๆ เล็บจะไม่พบความผิดปกติ ถ้าขูดมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบสายรามีผนังกั้น (30) ดังแสดงในภาพ 35



ภาพ 35 แสดงรอยโรคที่เล็บนิ้วโป้งเท้าด้านขวามีลักษณะสีดำเกิดจากเชื้อ *A. niger* (A)
ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการขูดแล้วไปทำ KOH preparation (B) (70)

2.3.3 การตรวจวินิจฉัยโรค

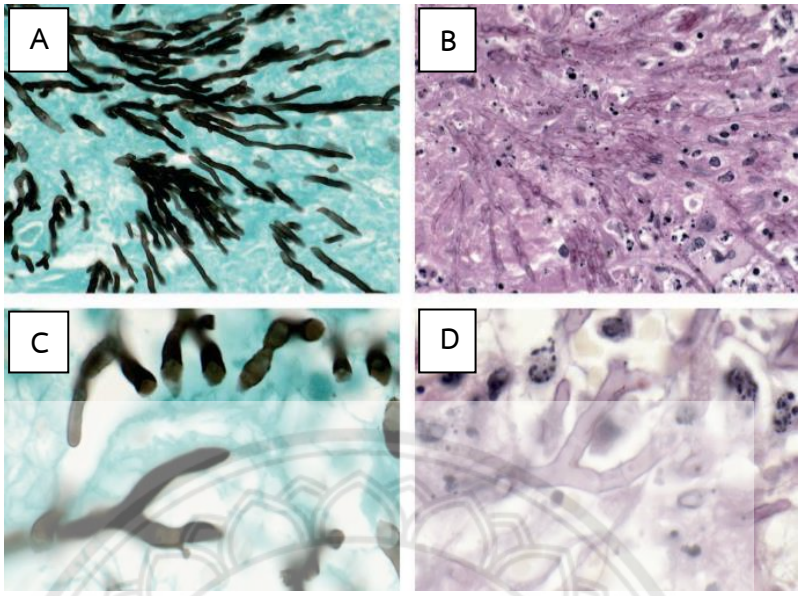
เนื่องจากเชื้อราฉวยโอกาสสายพันธุ์นี้มักพบได้ตามธรรมชาติ อาจปนเปื้อนในระหว่างการเก็บสิ่งส่งตรวจหรือการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิกจึงมีความสำคัญ ถ้าตรวจพบทั้งทางจุลชีววิทยาและพยาธิวิทยาสามารถบอกได้ว่าเกิดโรคจากเชื้อราฉวยโอกาส แต่ถ้าไม่สามารถตรวจพบทางพยาธิวิทยา จำเป็นต้องให้ส่งสิ่งส่งมาตรวจซ้ำอีกอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งต้องแยกได้เชื้อสายพันธุ์เดียวกันจึงจะถือว่าเกิดโรคจากเชื้อราฉวยโอกาส

2.3.3.1 การตรวจหาเชื้อโดยตรง (Direct examination)

ข้อดีของเทคนิคนี้คือมีความไวในการตรวจได้เร็วกว่าวิธีเพาะเชื้อ ข้อเสียคือไม่สามารถแยกแยะเชื้อราเส้นใยอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจส่งผลต่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจะถูกการทดสอบด้วยวิธี wet mount ที่มีหรือไม่มีการเติม 10%KOH ซึ่งสารตัวนี้จะช่วยในการมองเห็นองค์ประกอบของ hyphae โดยจะทำการย่อยโปรตีนบางส่วนที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อรา หลังจากนั้นจึงทำการสเมียร์บนสไลด์ และย้อมสีต่างๆ โดยลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Aspergillus* sp. จะพบผนังกั้นเรียว (slender septate hyphae) และเส้นใยที่แตกแขนงสองขั้วเชิงมุม (dichotomous branching)

1. การย้อมสีเชื้อรา (Fungal stains)

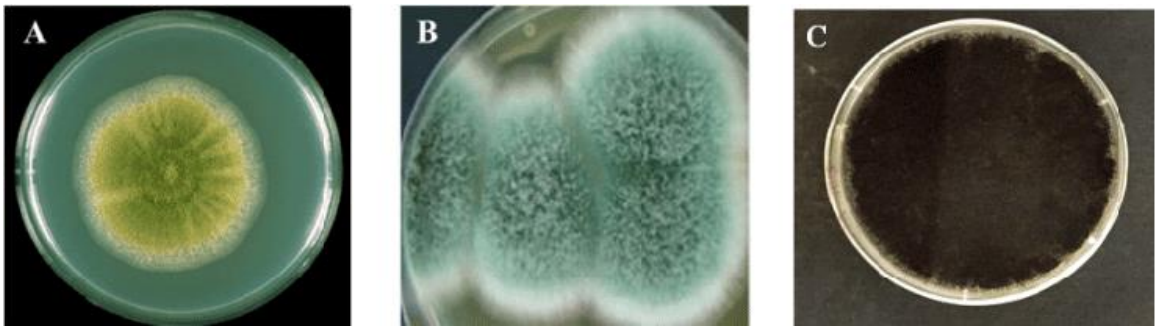
จุดประสงค์เพื่อย้อมดูองค์ประกอบของเชื้อราเมื่อทำการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การเลือกชนิดของสีย้อมจึงขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนหรือองค์ประกอบของเซลล์ของเชื้อราที่ต้องการย้อม ซึ่งการย้อมสีเชื้อรา *Aspergillus* จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อจากบริเวณพยาธิสภาพจะใช้สิ่งส่งตรวจเป็นชิ้นเนื้อที่ไม่ได้แช่ฟอร์มาลิน และไม่แช่เย็น โดยสีย้อมที่นิยมใช้ เช่น Gomori methenamine silver (GMS) และ Periodic Acid-Schiff (PAS) ซึ่งจะช่วยดูการเรียงตัวของสายราในเนื้อเยื่อ ดังแสดงในภาพ 36



ภาพ 36 แสดงลักษณะของเชื้อ *Aspergillus* sp. ในเนื้อเยื่อ ย้อมด้วย Gomori methenamine silver (GMS) (A) ย้อมด้วย Periodic Acid-Schiff (PAS) (B) ลักษณะเส้นใยที่แตกแขนงสองข้างเชิงมุม (dichotomous branching) (C,D) (71)

2.3.3.2 การเพาะเชื้อ (Culture)

เชื้อ *Aspergillus* sp. สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อราชนิดนี้แตกต่างจากเชื้อราสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถโตได้ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะของแข็งและของเหลว เช่น Blood agar Chocolate agar และ Brain heart infusion broth เป็นต้น แต่นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อรา ได้แก่ Sabouraud dextrose agar (SDA) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อรา SDA มีการเติมยาปฏิชีวนะเข้าไป เช่น Chloramphenicol หรือ Gentamicin เป็นต้น เนื่องจากจะช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน อีกทั้งยังมีการใส่ยา Cycloheximide ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ปนเปื้อนอีกด้วย อย่างไรก็ตามในบางครั้งยา Cycloheximide อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้เช่นกัน การวินิจฉัยเชื้อทางห้องปฏิบัติการสามารถดูลักษณะโคโลนีของเชื้อรา เช่น รูปร่าง สี เป็นต้น อีกทั้งยังมีการวินิจฉัยจากการดูรูปร่างสัณฐานของโคนีเดียและ ontogeny ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการเตรียมสไลด์เชื้อรา ซึ่งจะพบลักษณะที่จำเพาะของแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในภาพ 37



ภาพ 37 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA

(A) *A. flavus* (B) *A. fumigatus* (C) *A. niger* (72)

2.3.3.3 การทดสอบทางน้ำเหลือง (Serological techniques)

จะใช้การตรวจหา Galactomannan (Galactomannan assay) โดย Galactomannan เป็น heteropolysaccharide ที่ทนความร้อน มีอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นต้น โดยองค์ประกอบของ Galactomannan จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสกุลและสายพันธุ์ของเชื้อซึ่งมีชุดทดสอบ 2 วิธีสำหรับการตรวจ galactomannan ได้แก่ Pastorex kit และ Platelia ELISA โดยขณะนี้นิยมใช้ชุดตรวจ Platelia ELISA เพราะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัย อย่างไรก็ตามการทดสอบ Galactomannan ยังไม่นิยมใช้ในทางการแพทย์ระดับสากล

2.3.3.4 Antibodies directed toward Aspergillus sp.

จำเป็นต้องมีการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะเพื่อวินิจฉัยโรคปอดเรื้อรังจากเชื้อแอสเปอร์จิลลัส (chronic pulmonary aspergillosis) แต่การตรวจหาแอนติบอดีไม่ถือว่ามีประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยการบุกรุกเฉียบพลันโรคแอสเปอร์จิลโลสิส (acute invasive aspergillosis) ภายหลังการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามีการสร้างแอนติบอดีในผู้ป่วย 15 รายที่มีการบุกรุกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. โดยการตรวจหาแอนติบอดีสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคแอสเปอร์จิลโลสิสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Aspergillus* sp. มีวิธีต่างๆจำนวนมาก เช่นimmunodiffusion, counter immunoelectrophoretic, complement fixation, ELISA, particle hemagglutination, indirect immunofluorescence และวิธี radio immunoassay เป็นต้น

2.3.3.5 การตรวจหาสารพันธุกรรม (Nucleic acid tests)

การวินิจฉัยโรค Aspergillosis ด้วยเทคโนโลยี PCR มีการใช้สิ่งส่งตรวจจากการศึกษาต่างๆ เช่นเซรั่ม พลาสมา เลือดครบส่วน BAL และเนื้อเยื่อ เป็นต้น สำหรับการตรวจหา DNA ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. มีการใช้ Quantitative PCR แสดงผลผลิตของดีเอ็นเอจากซีรัม พลาสมา และเม็ดเลือดขาวมีคล้ายคลึงกัน ในขณะที่ Qualitative PCR แสดงให้เห็นสัญญาณ PCR จากเลือดครบส่วนดีกว่าพลาสม่า และไม่นิยมใช้พลาสม่าที่ใส่สารกันเลือดแข็งต่างๆ เช่น sodium citrate, heparin เป็นต้น เพราะจะไปยับยั้งกระบวกการ PCR (73)

2.3.4 การรักษาโรค Aspergillosis

การรักษาด้วยยาต้านเชื้อราในระยะแรกของโรคมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วย ในขณะที่การผ่าตัดมีบทบาทสำคัญในโรคที่อันตราย ดังนั้นการพิจารณาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยา Triazoles, Liposomal, Amphotericin B และ Echinocandins ที่ใช้ในการรักษาโรคอย่างเคร่งครัด

2.3.4.1 Amphotericin B

ให้ยาทางหลอดเลือดดำ (Intravenous : IV) โดยยา Amphotericin B จะเข้าไปจับกับ ergosterol ในผนังของเชื้อราทำให้เกิดรูพรุนและทำให้เชื้อราตาย ยาชนิดนี้ใช้รักษาโรคทางเชื้อราหลายชนิด เช่น Invasive aspergillosis, Mucormycosis, Cryptococcal meningitis และ Candidiasis เป็นต้น ซึ่งผลการทดสอบและผลลัพธ์ทางคลินิกในผู้ป่วยที่เป็นโรค Invasive aspergillosis (IA) พบว่าผู้ป่วยจำนวน 29 ราย มีผู้ป่วย 6 รายที่รอดชีวิตมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) น้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ผู้ป่วย 22 ถึง 23 รายที่เสียชีวิตมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

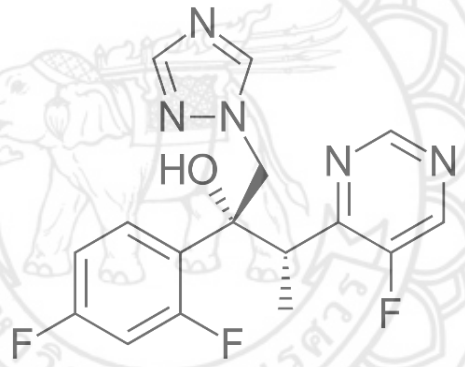
2.3.4.2 Azoles

1. ยา Triazoles

สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ ergosterol ในผนังเซลล์ของเชื้อราที่นำไปสู่การตายของเชื้อรา ซึ่งยา Triazoles รุ่นใหม่หลายตัว โดยเฉพาะ Voriconazole และ Isavuconazole เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการรักษา แม้ว่าจะมีรายงานพบการระบาดของเชื้อ *Aspergillus* ที่ดื้อต่อ Azoles จากหลายส่วนของโลก แต่อัตราการดื้อยายังคงอยู่ในระดับต่ำไม่ได้ส่งผลต่อการเลือกใช้ยาต้านเชื้อรา เภสัชจลนศาสตร์ของยาชนิดนี้สามารถใช้รักษาได้อย่างกว้างขวาง

2. ยา Voriconazole

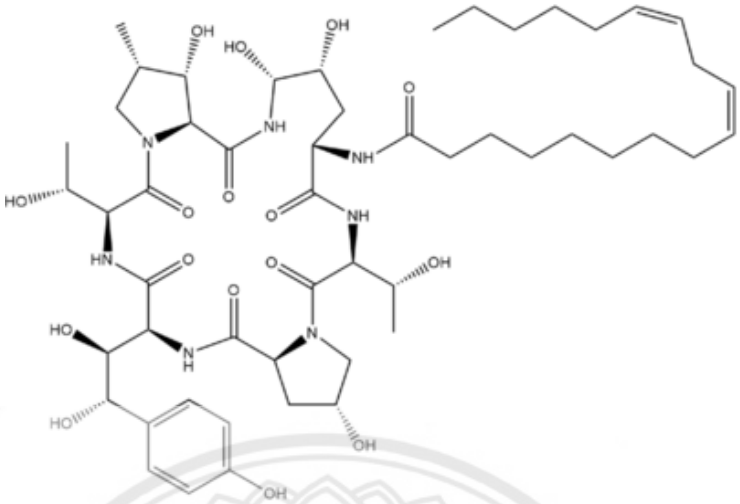
จะให้ยาเป็นเม็ดหรือทางหลอดเลือดดำ (IV) ซึ่งได้รับการยอมรับสำหรับการรักษาในโรค IA, Candidiasis, Scedosporiosis และ Furasiosis โดยการทดลองในผู้ป่วยที่เป็นโรค IA ได้พบว่าผู้ป่วยได้รับยา Voriconazole ผ่านทางหลอดเลือดดำ จำนวน 144 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับยาamphotericin B deoxycholate ผ่านทางหลอดเลือดดำ จำนวน 133 ราย ผลลัพธ์คือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา Voriconazole มีการตอบสนองที่ดีร้อยละ 20.8 และมีการตอบสนองบางส่วนร้อยละ 31.9 ซึ่งเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา Amphotericin B พบว่ามีการตอบสนองที่ดีร้อยละ 16.5 และมีการตอบสนองบางส่วนร้อยละ 15 จากผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 70.8 ในผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา Voriconazole เทียบกับผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา Amphotericin B ร้อยละ 57.9 โดยยา Voriconazole มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพ 38



ภาพ 38 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Voriconazole (74)

2.3.4.3 Echinocandins

ยา Echinocandins สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ β-1,3-glucan ในผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งใช้ในการรักษาโรค Invasive aspergillosis (IA) โดยยา Echinocandins มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพ 39 (75)



ภาพ 39 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Echinocandins (76)

2.3.4.4 การผ่าตัด

ในกรณีที่ก้อนเชื้อราในปอดของผู้ป่วยส่งผลให้เกิดอาการรุนแรงอย่างการเสียเลือด แพทย์อาจใช้วิธีผ่าตัดเพื่อกำจัดก้อนเชื้อรา หรือฉีดสารบางชนิดทางสายยางที่ผ่านหลอดเลือดไปที่โพรงปอดเพื่อให้ไปแข็งตัวและอุดเส้นเลือด (Embolization) บริเวณที่เลือดออก แต่วิธีดังกล่าวอาจช่วยได้เพียงชั่วคราวและผู้ป่วยอาจมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำอีก

2.4 การรักษาด้วยสมุนไพรทางเลือกต่อเชื้อโควิด-19

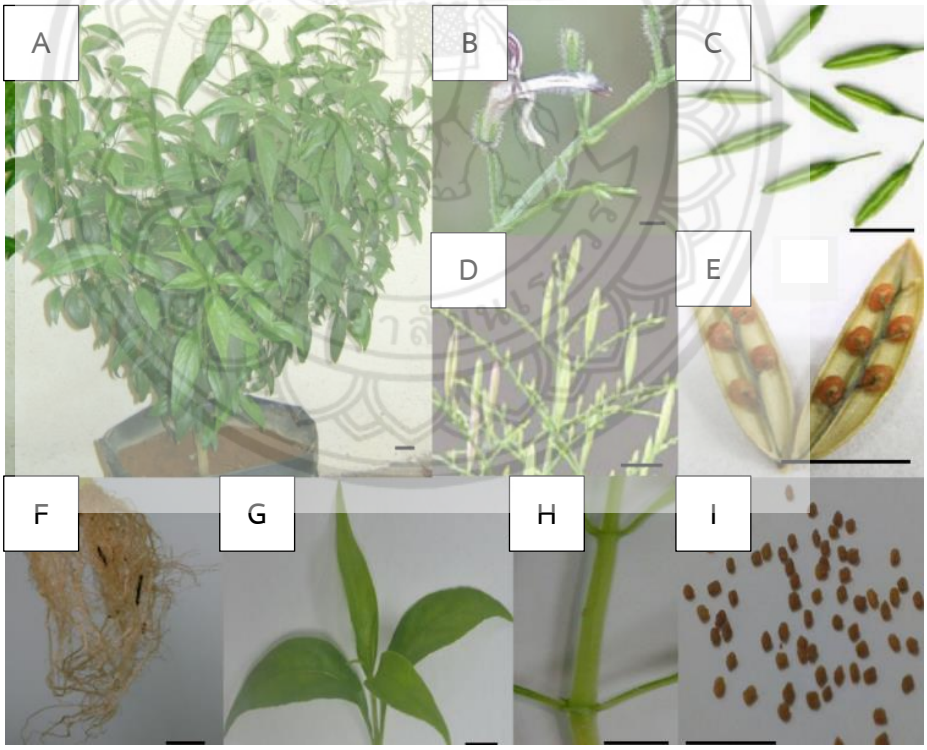
2.4.1 ฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เป็นพืชที่มีการใช้รักษาโรคมาเป็นเวลานานมาก เป็นที่ยอมรับในแถบเอเชีย ในตำรายาของประเทศอินเดีย อายุรเวท (Ayurveda) ซึ่งเรียกฟ้าทะลายโจรว่า Kalmegh และของประเทศจีน (Chinese Traditional Medicines) ที่เรียกว่าชวนชินเลียน (Chuan Xin Lian) ฟ้าทะลายโจรเป็นยาที่มีอยู่ในรายชื่อในบัญชียาหลักของประเทศไทย สรรพคุณที่ระบุยาหลัก คือ บรรเทาอาการของไข้หวัด เช่น เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ส่วนรูปแบบยาเตรียมที่ระบุในบัญชียาหลักคือ ยาแคปซูล ยาเม็ด และยาลูกกลอน ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่ขมมาก เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นเจ้าแห่งความขม (King of Bitters) ส่วนที่นำมาใช้ในการรับประทานนั้นใน Indian Pharmacopoeia กำหนดให้เป็นใบและยอดอ่อนแห้ง ส่วน USP (United States Pharmacopoeia) กำหนดให้เป็นใบและลำต้นแห้ง ในขณะที่ตำรายาของประเทศจีน และ WHO (World Health

Organization) คือ ส่วนเหนือดิน ซึ่งหากใช้ต้นแก่อาจมีปัญหาเนื่องจากมีดอกและผลติดมาด้วย ซึ่งในผลมีปริมาณสารที่เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพสมุนไพรต่ำกว่าส่วนอื่นๆ

2.4.1.1 ลักษณะของฟ้าทะลายโจรและการกระจายตัวในธรรมชาติ

ฟ้าทะลายโจรมีถิ่นกำเนิดจากอินเดีย และศรีลังกา พบได้ทั่วๆ ไปในแถบเอเชียเป็นพืชที่ขึ้นง่ายกระจายพันธุ์ได้ดี ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงคู่ ลำต้นเป็นเหลี่ยมตั้งตรงขนาด 15-100 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นพุ่ม ใบเดี่ยวออกตรงกันข้าม ดอกออกเป็นช่อ แยกแขนงออกที่ซอกใบและปลายกิ่ง ดอกย่อยมีสีขาว กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ส่วนปลายกลีบแยกเป็น 2 ปาก ปากบนมี 3 กลีบ แต้มแถบสีม่วงแดง ปากล่างมี 2 กลีบ เกสรเพศผู้มี 2 เกสร ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอก ข้างในมีเมล็ดรูปไข่สีน้ำตาล ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่มีการปลูกในเชิงเกษตร ปัจจุบันถือเป็นพืชเศรษฐกิจและมีการปลูกเสริมกับพืชอื่นๆ มีเกษตรชุมชนหลายจังหวัดในประเทศไทยที่สามารถปลูกฟ้าทะลายโจรที่มีปริมาณสารสำคัญสูงมาก อย่างไรก็ตาม อายุพืช ฤดูกาล การตากแห้ง มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในฟ้าทะลายโจร ดังแสดงในภาพ 40 (77)



ภาพ 40 แสดงลักษณะส่วนต่างๆ ของ *A. paniculata* (A) ใบ, (B) ดอก, (C) ผล, (D,E) ผล, (F) ราก, (G) ใบ, (H) ลำต้น, (I) เมล็ด (78)

2.4.1.2 องค์ประกอบทางเคมีในฟ้าทะลายโจร

เมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาสกัดและแยกองค์ประกอบออกจากกัน และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และฤทธิ์ทางชีววิทยา พบว่าสารสำคัญที่แยกได้มีสรรพคุณแตกต่างกันไปจากการศึกษาทางพฤกษเคมี พบว่า ฟ้าทะลายโจรมีสารอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ เอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีน (ent-Labdane Diterpene) และ ฟลาโวนอยด์และโพลิฟีนอล

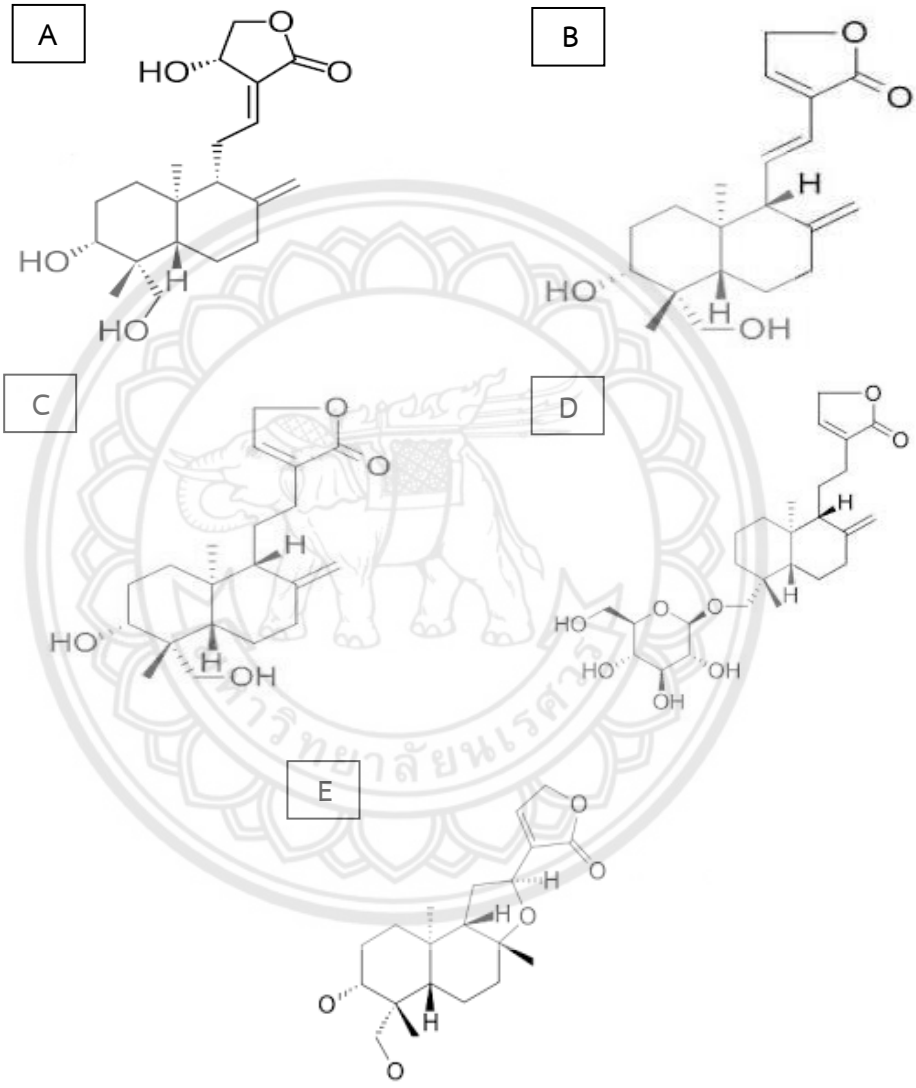
1. สารกลุ่มเอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีน (ent-Labdane Diterpene)

สารกลุ่มเอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีนในฟ้าทะลายโจรเป็นสารที่ไม่พบในพืชชนิดอื่น เป็นกลุ่มสารที่มีการแยกสกัดและนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยามากที่สุด สารสำคัญที่พบมากที่สุด คือ แอนโดรกราโฟลายด์ (Andrographolide, Androg) ซึ่งเป็นสารที่มีรสขม

Andrographolide เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์ปีน โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยคาร์บอน 20 อะตอม จับกันเป็นวง 2 วง มีการใช้คาร์บอนร่วมกัน 2 อะตอมที่เรียกว่า "แลปเดน" บนวงทั้งสองมีทิศทางจำเพาะ ซึ่งเป็น enantiomer ตัวหนึ่งของแลปเดน จึงเรียกว่า ent-labdane คาร์บอนตำแหน่งที่ 13-16 ของแอนโดรกราโฟลายด์เชื่อมกันเป็นวงของเอสเตอร์ ที่เรียกว่า แกมม่าแลคโตน (Y-lactone) สาร Androg มีพันธะคู่ อยู่ 2 คู่ คือ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 8 กับ 12 และมีหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง 16 มีกลุ่มไฮดรอกซีอิสระ 3 กลุ่ม ที่ตำแหน่ง C-3 (secondary OH) ที่ตำแหน่ง C-19 (primary OH) และที่ตำแหน่ง C-14 (allylic OH) สารกลุ่มเอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีนในฟ้าทะลายโจรที่แยกและมีการรายงานเป็นประจำ ได้แก่ 14-Deoxy-11,12-didehydro-andrographolide (14-DDA) , 14-deoxyandrographolide (14- DA), Neoandrographolide, Andrographolide และ isoandrographolide เป็นต้น ดังแสดงในภาพ 41 โดยอนุพันธุ์ธรรมชาติอื่นๆ ที่แยกได้ของสารในกลุ่มเอนท์-แลปเดนมีอีกหลายชนิด แต่พบในปริมาณที่น้อยมาก เช่น มีรายงานการพบ 19-norandrographolides A-C จากการสกัดฟ้าทะลายโจร 10 กิโลกรัม และได้สารทั้งสามชนิดเพียงชนิดละ 12, 5 และ 3 มิลลิกรัม ตามลำดับ

สูตรโครงสร้างของสารมีความสำคัญต่อการละลาย การถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย การออกฤทธิ์ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการรักษา ความมีพิษ และการขับถ่าย การละลาย บอกความสามารถในการดูดซึมของสารเข้าสู่ระบบการหมุนเวียนของร่างกาย ซึ่งการตรวจและทำนายการดูดซึมหรือการกระจายตัวของยา จะดูที่ค่าการละลายระหว่าง octanol และ buffer pH 7.4 (ค่า partition) เอนท์-แลปเดนเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในแอลกอฮอล์

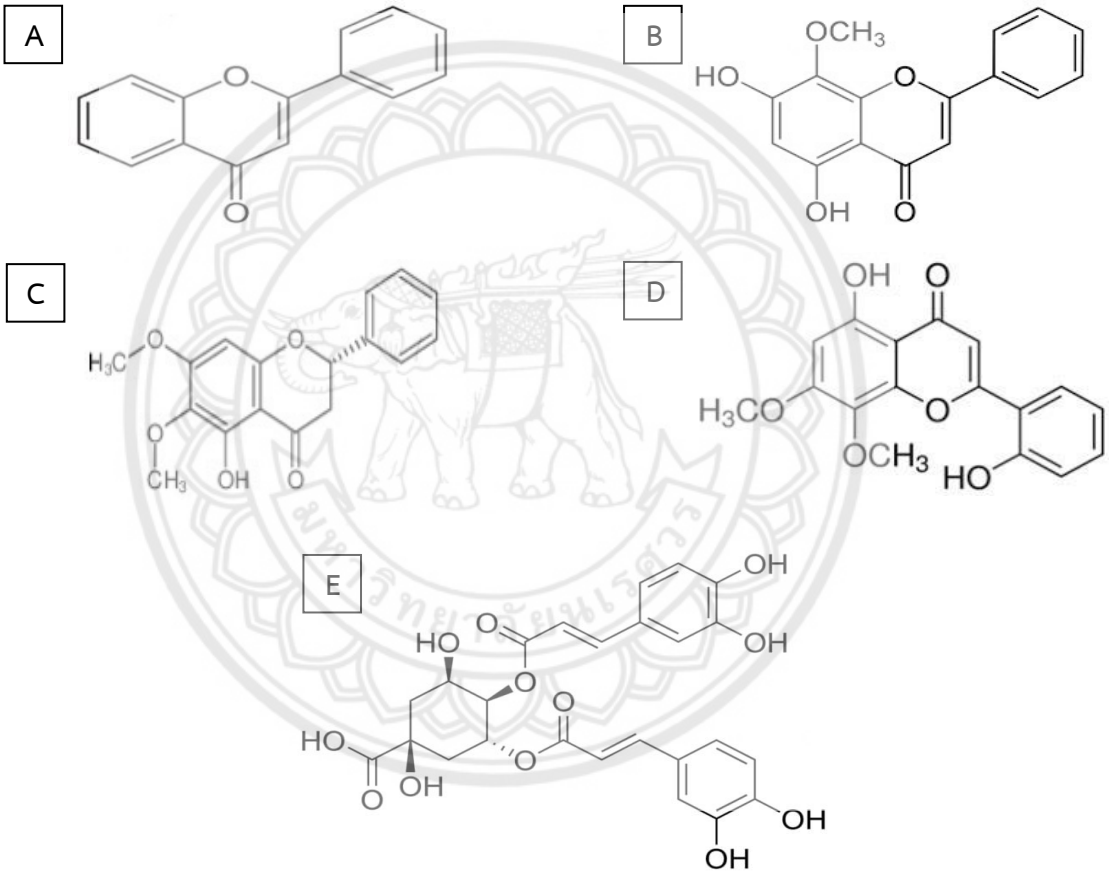
ประเทศจีนได้มีการปรับปรุงโครงสร้างของ Androg เพื่อให้ละลายน้ำได้ โดยปรับสูตรโครงสร้างที่ตำแหน่ง OH ให้เป็นเกลือซัลเฟต ซัลโฟเนต หรือการเชื่อมจับกับกรดออร์แกนิค 2 ปลาย (dicarboxylic acid) เช่น กรดซัคซินิค (succinic acid) กรดมาเลอิค (maleic acid) แล้วทำให้ปลายกรดด้านที่อิสระเป็นเกลือซึ่งจะละลายน้ำได้และใช้เป็นยาฉีด (77)



ภาพ 41 แสดงลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของสารในกลุ่มเอนท์-แลปเดนไดเทอร์ปีน
(A) andrographolide (B) 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide
(C) 14-deoxyandrographolide (D) neoandrographolide
(E) isoandrographolide (78)

2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สามารถพบได้ในพืชชนิดอื่นๆ ตัวอย่างของสารเหล่านี้ที่พบในฟ้าทะลายโจร ได้แก่ 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone (7-O-methywogonin), 5-hydroxy-7,8,2,5 tetramethoxyflavone, 5-hydroxy-2,3,7,8-tetramethoxyflavone, 5-hydroxy-7,8,2trimethoxyflavone, 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (onysilin), 4,5,7-trihydroxyflavone และ 3,4 dicaffeoylquinic acid (polyphenol) ดังแสดงในภาพ 42 (77)



ภาพ 42 แสดงลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์
(A) flavone (B) wogonin (C) onysilin (D) skullcapflavone,
(E) 3,4-Dicaffeoylquinic acid (78)

2.4.1.3 สรรพคุณของฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจรมีสรรพคุณช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย ช่วยแก้อาการไข้ทั่วๆไป ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง รวมไปถึงช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวให้จับกินเชื้อโรคได้ดียิ่งขึ้น สำหรับโรคหรือภาวะอื่น เช่น รักษาอาการเจ็บคอ ไอ ต่อมทอนซิลบวม หลอดลมอักเสบ และอาการแพ้ ป้องกันโรคหัวใจและโรคเบาหวาน แมลงกัด โรคตับ โรคไข้เมดิเตอร์เรเนียน ลดไข้ บรรเทาอาการในระบบย่อยอาหาร (ท้องเสียแบบไม่ติดเชื้อ ท้องผูก แก๊ซในกระเพาะอาหารมาก ปวดท้อง) โรคเกี่ยวกับตับ (ภาวะตับโต ดีซ่าน ตับอักเสบจากการใช้ยา) การติดเชื้อ (โรคเรื้อน โรคปอดบวม วัณโรค โรค หนองใน การติดเชื้อเอชไอวีหรือโรคเอดส์) หรืออาการทางผิวหนังอื่น ๆ ซึ่งการวิจัยและค้นคว้าข้อมูลบางส่วน ที่เชื่อว่าฟ้าทะลายโจรอาจมีส่วนช่วยโรคเหล่านี้ ทั้งนี้สรรพคุณของฟ้าทะลายโจรต่อโรคหวัดมีการศึกษาค่อนข้างมาก การค้นคว้าส่วนใหญ่พบ หลักฐานที่มีความน่าเชื่อถือและระบุประสิทธิภาพของการรักษาอยู่ในระดับที่อาจเป็นไปได้ จึงคาดว่าฟ้าทะลายโจรอาจมีส่วนช่วยบรรเทาอาการจากโรคหวัดสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง และค่อนข้างปลอดภัยในการรับประทาน เนื่องจากจากการศึกษาไม่พบผลข้างเคียง ซึ่งอาจเป็นอีกตัวเลือกเสริมของการรักษาโรคหวัดทั่วไป

2.4.1.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ฟ้าทะลายโจรธรรมชาติและกึ่งสังเคราะห์

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ฟ้าทะลายโจรธรรมชาติและกึ่งสังเคราะห์นั้นนิยมที่จะนำฤทธิ์ที่ทราบอยู่หรือฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องของฟ้าทะลายโจรมาเป็นหลักในการทดสอบ เช่น แก้ปวด แก้ไข้ และเนื่องจากความเจริญในปัจจุบันได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารจนถึงระดับโมเลกุลและความเชื่อมโยงของโรคในระดับโมเลกุลทำให้มีการทดสอบฤทธิ์ที่หลากหลายมากขึ้น

1. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สรรพคุณหนึ่งของฟ้าทะลายโจรคือรักษาการติดเชื้อได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่ามีฤทธิ์ไม่แรงมาก ซึ่งเป็นไปได้ที่สารในฟ้าทะลายโจรสามารถไปลดอาการจากการติดเชื้อมากกว่าที่จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นิยมทำการทดสอบกับเชื้อในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการทดสอบกับเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะบางตัวเพื่อใช้เป็นยาทดแทน จากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อพบว่าสาร 26 ชนิดที่แยกได้จากฟ้าทะลายโจรบางชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Candida sake* และ *Aspergillus niger* ยกเว้นมีสารอยู่ 4 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้แก่ Andrograpanin, 14-DDA, 14-deoxy-12-hydroxyandrographolide และ isoandrographolide เมื่อใช้สารที่มี

ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 7-8 มิลลิเมตร และพบว่า Androg, 14-DDA ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* และ *S. aureus* แต่หากเติมกลุ่ม acetyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 14 จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 12.25 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านได้ดีกว่า จากการปรับสูตรโครงสร้างด้วยปฏิริยาทางเคมีได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ Androg โดยเติมกลุ่ม acyl- ที่ตำแหน่งที่ 14 ของ Androg โดยใช้สาร vinyl esters และเอนไซม์ candida antarctica lipase B (Novozymes 435) ได้เป็นสาร 14-acetyl-, 14-butyryl-, 14octanoyl-, 14-lauroyl- และ 14-stearoyl- เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์พบว่าอนุพันธ์ที่มีสายสั้น คือ 14-butyryl ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน 14-acetyl ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ที่ความเข้มข้น 5.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะเดียวกันการแทนที่ด้วยกลุ่มที่เป็นสายยาว เช่น octanoyl-, lauroyl- และ stearoyl ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

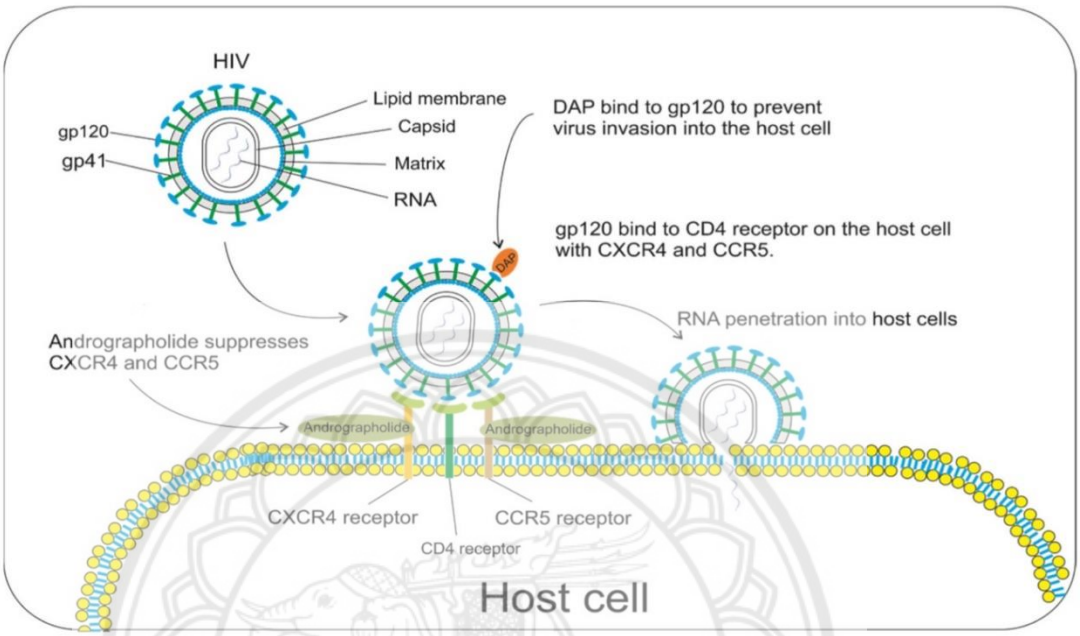
2. ฤทธิ์ต้านไวรัส

อนุพันธ์ธรรมชาติของฟ้าทะลายโจรที่ให้ผลต้านไวรัสมีหลายตัว เช่น Androg, 14-DDA ตัวอย่างไวรัสที่ไวต่อ Androg ได้แก่ เชื้อเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus; HIV) ส่วนไวรัสที่ไวต่อ 14-DDA ได้แก่ ไวรัสเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C) และไวรัสบางสายพันธุ์ใน family Flaviviridae โดยสาร 14-DDA มีข้อดีกว่าฟ้าทะลายโจรคือมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่า

2.1 ฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี (Anti-human Immunodeficiency Virus)

HIV เป็นไวรัสชนิด RNA ที่มีเอนเวลโลป (envelope) และ glycoprotein 120 (env gp120 คือ ไกลโคโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 120 กิโลดาลตัน ที่ปุ่มบนเอนเวลโลปของ HIV) การติดเชื้อเกิดจาก env gp120 ของ HIV ไปจับกับ CD4 โมเลกุล บนผิวของ Th cell (เรียกว่า $CD4^+$ T cell เป็น lymphocytes ชนิด helper cell ที่ผิวมี CD4 molecule) ทำให้ไวรัสแทรกเข้าเซลล์ได้ และเมื่อถูกเชื้อ HIV จับจำนวน $CD4^+$ T cell จะลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง มีการนำ Androg มาทดลองในคนปกติและผู้ป่วยติดเชื้อ HIV โดยใช้ $CD4^+$ T-cell และปริมาณ RNA ของ HIV-1 ในพลาสมา เป็นตัวชี้วัด การให้รับประทาน Androg เป็นระยะเวลาทั้งหมด 9 สัปดาห์ โดยมีขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ขนาดละ 3 สัปดาห์ต่อเนื่องกัน พบว่าระดับ $CD4^+$ T-cell สูงขึ้นจาก 405 เซลล์/มิลลิลิตร ไปเป็น 501 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากได้รับยาขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และไม่พบว่าระดับ RNA ของ HIV-1 ในพลาสมาเปลี่ยนแปลงไป จากผลการทดลองสันนิษฐานได้ว่า Androg อาจยับยั้งเอชไอวีโดยการไปรบกวน วัฏจักรเซลล์ของ

lymphocytes ทำให้ HIV จับกับ T-cell ไม่ได้ ทำให้มี $CD4^+$ T-cell เพิ่มปริมาณขึ้น (77) ดังแสดงในภาพ 43



ภาพ 43 แสดงกลไกการยับยั้งไวรัสเอชไอวีของฟ้าทะลายโจร (79)

2.2 ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ ชนิด 1 (Anti-Herpes simplex virus type 1)

ไวรัสเฮอร์ปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 (Herpes simplex virus type 1; HSV-1) เป็นไวรัสชนิด DNA พบว่ามีโครงสร้างประกอบด้วย core, DNA, เยื่อหุ้มนิวเคลียส และเอนเวลโลป โดยไวรัสก่อให้เกิดโรคเริมที่ริมฝีปาก จากการศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ธรรมชาติที่แยกได้จากฟ้าทะลายโจรพบว่าสารที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดต่อการต้านเชื้อนี้ คือ neoandrographolide ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 7.97 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วน Androg และ 14-DDA ให้ฤทธิ์ลดลงมา ให้ค่า 8.28 และ 11.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี (Anti-Hepatitis B Virus)

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus; HBV) เป็นไวรัสชนิด DNA สายคู่ มีโครงสร้างประกอบด้วย เอนเวลโลป 2 ชั้น, ไลโปโปรตีน และไกลโคโปรตีน ไวรัสเจริญเติบโตได้ดีในตับ ไต ตับอ่อน และเม็ดเลือดขาว ที่ผิวเปลือกมีโปรตีน hepatitis B surface antigen (HBsAg) และมีโปรตีนที่เป็นแกนกลาง และจะถูก protease ของเซลล์เจ้าบ้านย่อยจะได้ hepatitis B e antigen

(HBeAg) แอนติเจนทั้งสองสามารถตรวจพบในเลือดผู้ป่วย HBV ทำให้เกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับการปรับสูตรโครงสร้างของ Androg, 14-DDA และ 14-DA ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งแตกต่างกันไป แล้วเชื่อมต่อกับกรดชนิดต่างๆ ทั้ง heterocyclic, aromatic และที่เป็นสายสั้นๆ ที่ตำแหน่ง C-19 ได้สารทั้งสิ้น 48 อนุพันธ์ แล้วนำมาทดสอบหาฤทธิ์ต้าน HBV โดยตรง HBsAg และ HBeA และฤทธิ์ต้านการถ่ายแบบของ HBV พบว่าสาร 19-2-carbonylthiophene เป็นตัวที่ลดปริมาณ HBsAg และ HBeAg และหยุดการสร้าง DNA ที่ IC_{50} 121,19.7 และ 23.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีความจำเพาะในการต้านเชื้อ (Selective index: SI) ถึง 20.3, 125 และ 104.9 ตามลำดับ ส่วน 3-hydroxy-19-(3,4',5'-trimethoxy-cinnamoy-14-DDA ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ HBV ให้ค่า IC_{50} = 10.3 ไมโครโมลาร์ มีค่า SI เป็น 165.1 แต่ไม่ยับยั้งการหลั่ง HBsAg ส่วน Androg และ 14-DDA มีฤทธิ์ต้านการ replication ที่ความเข้มข้น 54.1 และ 22.6 ไมโครโมลาร์ และมีค่า SI เป็น 3.7 และ 8.7 จากการทดลองได้มีการสร้างสมมุติฐานความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ดังนี้ conjugated double bond ระหว่าง C-11 และ C-14 หรือระหว่าง C-12 และ C-15 และกลุ่ม heterocyclic aromatic ที่ตำแหน่ง C-19 จะเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อ HBV

2.4 ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบซี (Anti-Hepatitis C Virus)

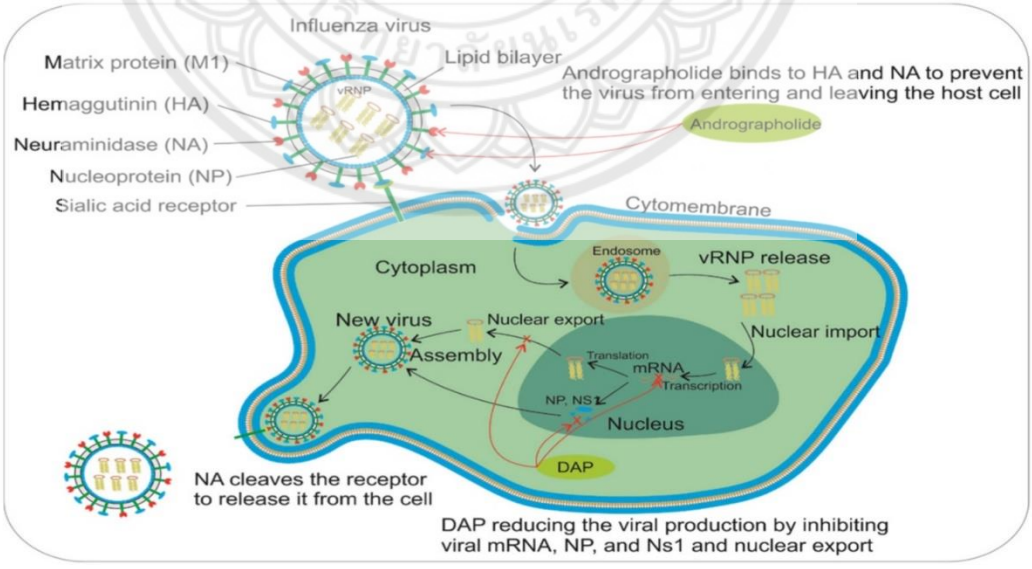
ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus; HCV) เป็นไวรัสชนิด RNA ที่มีเอนเวลโลป โดย RNA genome ของ HCV ถอดรหัสให้โปรตีนพรีเคอร์เซอร์สายยาว ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านและของไวรัส (cellular และ viral proteases) ได้โปรตีน 10 ชนิด แบ่งได้สองกลุ่มคือ structural proteins ได้แก่ C, E1, E2 และ p7 และ nonstructural protein 6 ตัว คือ NS2, NS3, NS4A, N54B ,NS5A และ NS5B ซึ่งเชื้อ HCV เป็นสาเหตุของโรค liver fibrosis, cirrhosis portal hypertension, hepatic failure และ hepatocellular carcinoma (HCC) ปัจจุบันมีการรักษาโดยใช้ pegylated interferon-alpha ร่วมกับยาต้านเชื้อ HCV คือ Ribavirin และมีการใช้เกลือsuccinate ของ 14-DDA เพื่อต้านเชื้อ hepatitis C โดยมีการนำสาร Androg ทดสอบฤทธิ์ต้าน HCV รวมไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ โดยพบว่า Androg ไปกระตุ้น nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) ที่ไปกระตุ้นการสร้าง XO- 1 ซึ่งมีผลในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ และเนื้อเยื่อถูกทำลายด้วยการถูกออกซิไดซ์ และ Androg ยังหยุดการแพร่ขยายของเซลล์มะเร็ง (cancer cell migration)

2.5 ฤทธิ์ต้านไวรัสฮิวแมนแปบปิโลมา 16 (Anti-Human Papilloma Virus)

ฮิวแมนแปบปิโลมาไวรัส 16 (HPV 16) เป็นไวรัสชนิด DNA สายคู่ ไม่มีเอนเวลโลปเจริญได้ในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเซลล์ผิวหนังหรือเซลล์เยื่อบุผิว จีโนมของ HPV มี early proteins อยู่ 6 ชนิด (E1, E2, E4, E5, E6 และ E7) และ late protein อยู่ 2 ชนิด (L1 & L2) โปรตีน E6 และ E7สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์เจ้าบ้านได้ จึงเรียกว่าออองโคโปรตีน (oncoprotein) สามารถก่อให้เกิดมะเร็งที่ปากมดลูก โดยปกติเซลล์เจ้าบ้านจะมีโปรตีนที่กดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ 2 ชนิด คือ p53 (protein 53) และ pRb (retinoblastoma protein) แต่หาก E6 ของ HPV16เข้าไปจับกับ P53 ทำให้ p53 ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้เซลล์เจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่วน E7 จะจับกับ pRb ดังนั้นเชื้อ HPV 16 จะไปทำให้โปรตีนทั้งสองไม่ทำงาน ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและขยายตัวไปได้อย่างรวดเร็วและเป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกในที่สุด การหาสารที่สามารถทำให้ p53 กลับมาทำงานได้อีก ก็เป็นช่องทางหนึ่งในการหายาในการรักษามะเร็งปากมดลูก

2.6 ฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Anti-Influenza Viruses)

14-R-alpha-Lipoylandrographolide ต้านเชื้อ avian influenza A (H9N2 และ H5N1) และ human influenzas (H1N1) โดยยับยั้งเชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โดยการไปรบกวน viral haemagglutinin ทำให้ไวรัสไม่สามารถจับกับ receptor บนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (77) ดังแสดงในภาพ 44



ภาพ 44 แสดงกลไกการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ของฟ้าทะลายโจร (79)

2.7 ฤทธิ์ต้านไวรัส SARS-CoV2

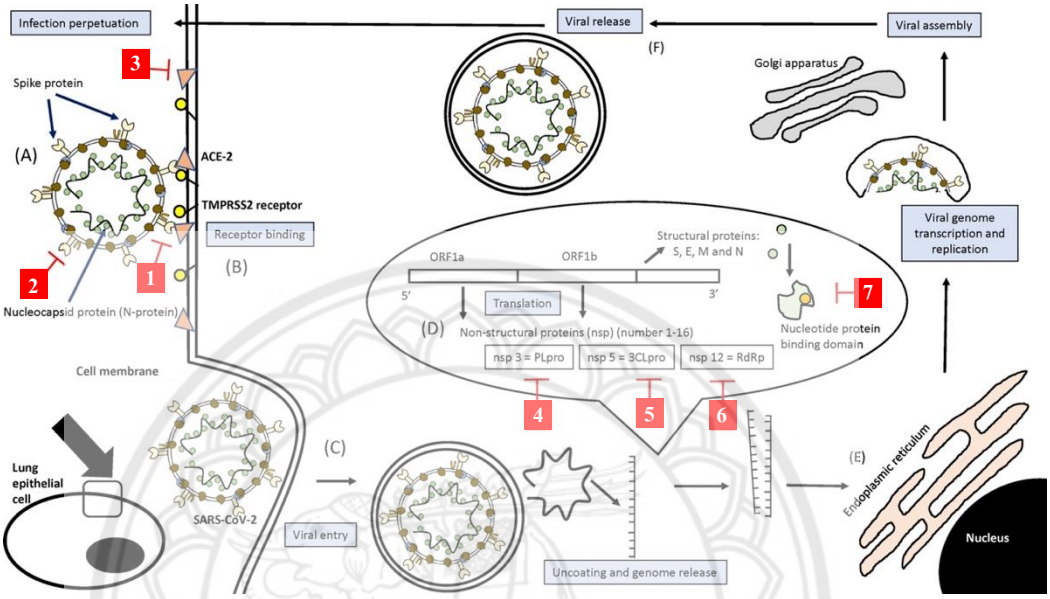
ในช่วงที่มีการระบาดของโรคไวรัสโควิด-19 ครั้งแรกที่เมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ในปลายปี พ.ศ. 2562 ทั่วโลกได้มีการเร่งวิจัยยาและวัคซีนอย่างเร่งด่วนและนำมาใช้แบบฉุกเฉิน ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อผลิตวัคซีนที่ใช้เวลาน้อยที่สุดในประวัติศาสตร์ ขณะเดียวกันก็มีการศึกษาวิจัยยาต้านเชื้อไวรัสที่เคยดำเนินการมาแล้วมาศึกษาวิจัยใหม่ ตัวอย่างยาเหล่านี้ ได้แก่ Remdesivir และ Favipiravir ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้ง Viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) สำหรับสมุนไพรก็เช่นกัน มีการศึกษาสมุนไพรเป็นจำนวนมาก แต่สมุนไพรที่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบมากที่สุด คือ ฟ้าทะลายโจร ในช่วงปี พ.ศ. 2563 มีนักวิจัยเป็นจำนวนมากให้ความสนใจฟ้าทะลายโจร การศึกษาวิจัยมีหลายรูปแบบ โดยอาศัยแนวความคิดด้าน Computational chemistry การสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลต่างๆ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในฟ้าทะลายโจรและการทดสอบความเป็นจริงในหลอดทดลอง

หลังจากการศึกษาโดยการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางเคมี (Molecular modeling) โดยนักวิจัยหลายคณะได้มีการสรุปรายงานการศึกษาต่างๆ โดยการสร้างไดอะแกรมเพื่อเสนอว่าตำแหน่งซึ่งสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรจะออกฤทธิ์ได้ ดังแสดงในภาพ 45 ซึ่งสารสำคัญในฟ้าทะลายโจรคือ Andrographolide ได้มีการศึกษา Andrographolide และอนุพันธ์พบว่ามีศักยภาพในการออกฤทธิ์ได้ที่ตำแหน่งต่างๆ จากการศึกษาด้าน Computational chemistry ได้แก่

1. Spike protein-ACE2-complex
2. Spike protein
3. Host-cell ACE-2
4. PL protease
5. Main protease
6. RdRp
7. Nucleotide protein binding domain

กลไกและตำแหน่งออกฤทธิ์ที่มีข้อมูลสนับสนุนโดยการศึกษาในหลอดทดลอง คือ การออกฤทธิ์ยับยั้ง Main protease โดยทำการวิจัยทั้ง Molecular docking พบว่า Andrographolide และอนุพันธ์มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ Main protease และยืนยันโดยการศึกษาวิจัยการยับยั้งเอนไซม์ Main protease ในหลอดทดลอง ส่วนตำแหน่งอื่นๆ เป็นการศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ที่ยังไม่มีหลักฐานสนับสนุนเพิ่มเติม รวมทั้งการพบว่า AP1 AP3 AP4 และ AP6

สามารถออกฤทธิ์ได้ที่ Main protease, Papain-like protease, RdRp และ Spike protein โดยพยากรณ์ว่า AP4 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าชนิดอื่นๆ แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานในหลอดทดลองสนับสนุนเพียงพอ (6)



ภาพ 45 แสดงกลไกการยับยั้งไวรัส SARS-CoV2 ของฟ้าทะลายโจร

(1) spike protein-ACE-2 complex (2) spike protein (3) host cell ACE-2 receptor (4) PLpro (5) 3CLpro (6) RdRp (7) nucleotide protein binding domain (80)

2.4.2 ขมิ้นชัน

พืชสมุนไพรขมิ้นชัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. อยู่ในวงศ์ (family) Zingiberaceae สกุล (genus) Curcuma มีชื่อพ้องคือ *C. domestica Valeton* และ *Ammonum curcuma Jacq* ขมิ้นชันอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 3 วิตามินซี วิตามินอี ธาตุแคลเซียม ธาตุฟอสฟอรัส ธาตุเหล็ก และเกลือแร่ต่าง ๆ รวมไปถึงเส้นใย คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เป็นต้น และขมิ้นชันมีสรรพคุณทางยาที่รักษาอาการและโรคต่าง ๆ ได้หลายชนิด มีประวัติในการนำมาใช้ในการรักษามากกว่า 5,000 ปี สำหรับขมิ้นชันที่จะนำมาใช้ประโยชน์นั้น การเก็บเกี่ยวไม่ควรเก็บในระยะที่ขมิ้นเริ่มแตกหน่อ เพราะจะทำให้สารที่มีประโยชน์อย่างเคอร์คูมินในขมิ้นมีน้อย ส่วนเหง้าที่เก็บมาต้องมีอายุอย่างน้อย 9-12 เดือน และต้องไม่เก็บไว้นานเกินไป และไม่ให้ถูกแสงแดด เพราะน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นจะหมดไปเสียก่อน

2.4.2.1 ลักษณะของขมิ้นชันและการกระจายตัวในธรรมชาติ

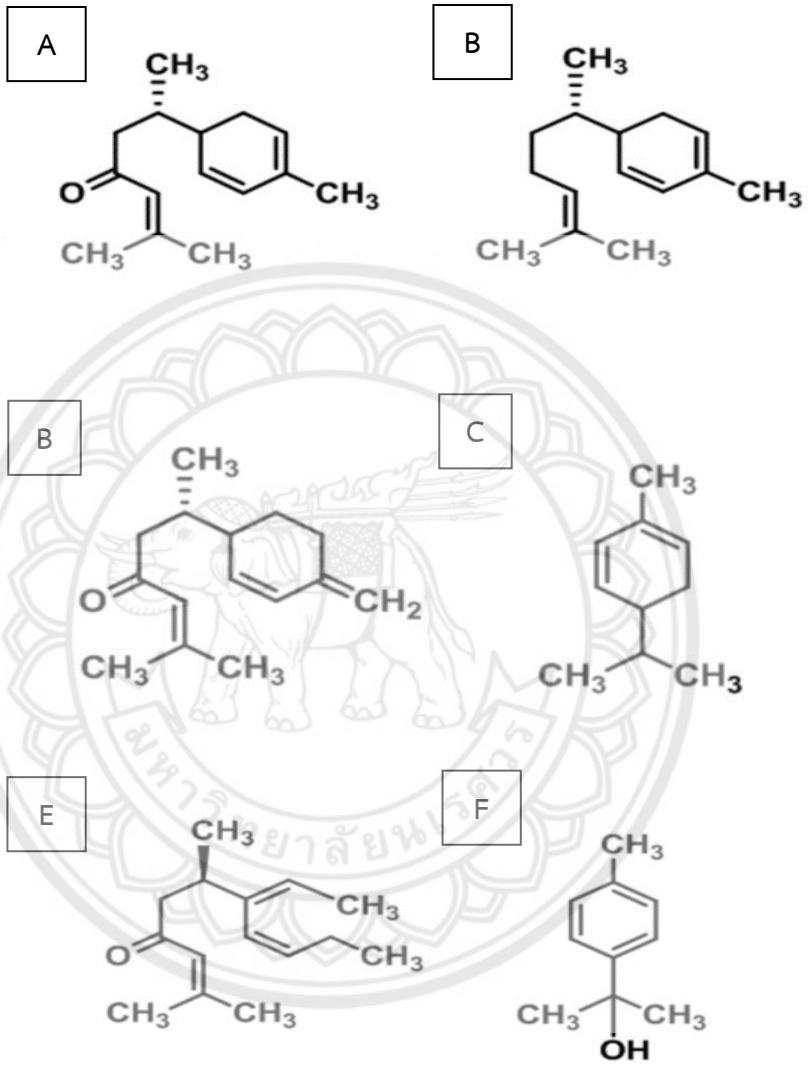
พืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชล้มลูกอายุหลายปี ขึ้นเป็นกอสูงไม่เกิน 1 เมตร ลำต้นใต้ดิน เหง้าหรือหัวรูปยาวรี แตกแขนงมาก เป็น secondary rhizomes (แง่ง) รูปร่างคล้ายนิ้วมือ เมื่อหักเหง้าเนื้อภายในมีสีเหลืองหรือสีส้มปนน้ำตาล มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวใบออกเป็นรัศมีติดผิวดิน รูปหอกแกมขอบขนานขอบใบเรียบกว้าง 8-15 ซม. ยาว 30-40 ซม. ก้านใบยาวเท่าแผ่นใบดอกออกเป็นช่อ แทงขึ้นมาจากส่วนยอดของลำต้นใต้ดิน ก้านช่อดอกยาว 10- 15 เซนติเมตร มีใบประดับสีขาวหรือสีเขียวอ่อน รูปหอก เรียงซ้อนกัน ใบประดับ 1 ใบ มี 2 ดอก ใบด้านนอกมีขน กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็ก สีขาว เชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ ปลายด้านหนึ่งแยกออก กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมกันเป็นหลอดปลายแยกเป็น 3 ส่วน เกสรตัวผู้คล้ายกลีบดอก อับเรณูอยู่ใกล้ปลายท่อเกสรตัวเมียเล็กยาว ยอดเกสรตัวเมียรูปปากแตร รังไข่มี 3 ช่อง (locale) แต่ละช่องมีใบอ่อน 2 ใบ ผลค่อนข้างกลมมี 3 พู เมล็ดมีเยื่อหุ้มเมล็ด (81) ดังแสดงในภาพ 46

ภาพ 46 แสดงลักษณะของต้นขมิ้นชัน (A), เหง้า (B) (82)

2.4.2.2 องค์ประกอบทางเคมีในขมิ้นชัน

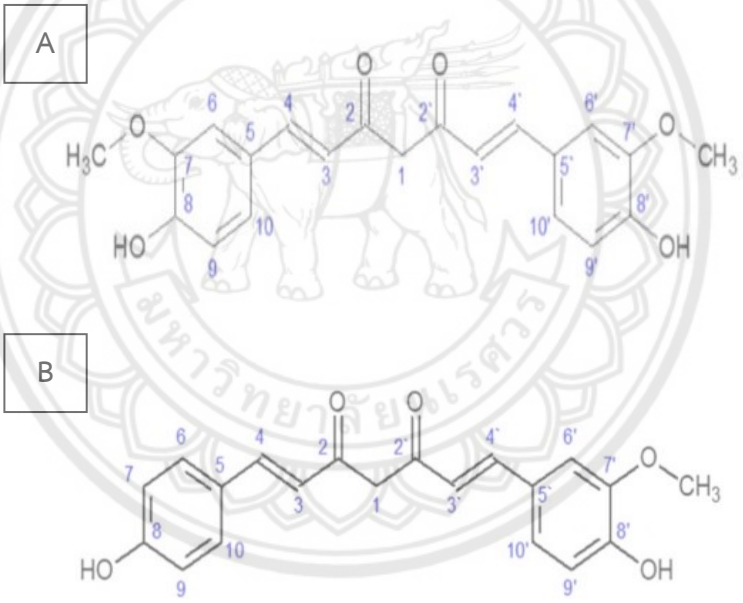
ขมิ้นชันมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญอยู่ 2 กลุ่ม คือ น้ำมันหอมระเหย (Essentials oil) มีสีเหลืองอ่อน โดย ส่วนใหญ่พบที่ราก (root) รองลงมาคือ เหง้า (rhizome) ใบ (leaf) และ ดอก (flower) สารที่พบมากจากเหง้าและ รากคือ ar-turmerone สารที่พบมากในใบคือ alpha-phellandrene และสารที่พบมากจากดอกคือ p-cymene-8-ol นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ อีก หลายชนิด พบว่าสารส่วนใหญ่ที่พบในดอกและใบของขมิ้นชันเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีน (monoterpene ; โครงสร้างมีจำนวนคาร์บอน 10 คาร์บอน) และน้ำมันหอมระเหยที่พบ จากรากและเหง้าส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (sesquiterpene) นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆ อีกเช่น Alpha-pinene, Beta-pinene, myrcene, Alpha-terpinene, p-cymene, 1,8-cineol, linalool, ar-curcumene, Alpha-zingiberene, Beta-bisabolene,

Alpha-turmerone, Beta-turmerone, curcuphenol ดังแสดงในภาพ 47 ซึ่งแต่ละพื้นที่ที่ปลูกขมิ้นชันจะมีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกัน และพบว่าเหง้าสดจะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าเหง้าแห้ง



ภาพ 47 แสดงถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมีต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน
(A) Alpha-Tumerone (B) Alpha-Zingiberene (C) Beta-Tumerone
(D) Alpha-Phellandrene (E) Ar-Tumerone (F) p-Cymen-8-ol (81)

สารอีกกลุ่มที่พบมากจากเหง้าของขมิ้นชัน คือ สารเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) เป็นสารสีเหลืองส้ม ซึ่ง แต่ละพื้นที่ที่ปลูกขมิ้นชันจะมีปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์แตกต่างกัน และพบว่าเหง้าสดมีปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ มากกว่าเหง้าแห้งเช่นเดียวกัน โดยเหง้าสดจะมีปริมาณ เคอร์คิวมินอยด์ประมาณ 7.94-15.32 เปอร์เซ็นต์ และเหง้าแห้งจะมีปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ประมาณ 3.81-8.66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบเคอร์คิวมินอยด์ได้ในพืชชนิดอื่น เช่น *C. xanthorhiza* Roxb., *C. wenyujin*, *C. sichuanensis*, *C. aeruginosa* Roxb. ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกในประเทศจีนแต่ละแหล่งที่พบจะมีปริมาณเคอร์คิวมินอยด์แตกต่างกัน สารเคอร์คิวมินอยด์ส่วนใหญ่ที่พบมี 3 ชนิด สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้โดยกระบวนการเทคนิค โครมาโตกราฟี คือ เคอร์คิวมิน (Curcumin) พบมากที่สุด รองลงมาคือ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Desmethoxycurcumin) และ บีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Bisdemethoxycurcumin) ดังแสดงในภาพ 48



ภาพ 48 แสดงถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมีต่างๆ ของสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์
(A) Curcumin (B) Demethoxycurcumin (83)

2.4.2.3 สรรพคุณของขมิ้นชัน

ใช้เหง้าขมิ้นชันทั้งสดและแห้งเป็นยาบำรุงธาตุ ฟอกโลหิต ทำเป็นผงผสมน้ำหรือเหง้าสดฝนน้ำทา รักษาโรคผิวหนังผื่นคัน ใช้หุงกับน้ำมันมะพร้าว ทาเป็นยาสมานแผล ปั้นเป็นลูกกลอนรับประทาน 2-3 เม็ด วันละ 4 ครั้ง หลังอาหารและก่อนนอน แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ขมิ้นชันสดใช้แก้ท้องร่วง โดยนำมาตำให้แหลกเติมน้ำปูนใส และคั้นน้ำดื่ม ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยพรีคลินิกพบว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดคอลเลสเตอรอลในเลือด ลดการบีบตัวของลำไส้ ต้านฮีสทามีน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง ยับยั้งการเป็นพิษต่อตับ ขับน้ำดี และใช้รักษาบาดแผลภายนอก จากการศึกษาทางคลินิกในคนพบว่ามีฤทธิ์ลดอาการจุกเสียด แน่นท้อง ลดการอักเสบ รักษาอาการท้องเสีย ลดความเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยทาลัสซีเมีย รักษาสิว ข้อควรระวังในการใช้งานขมิ้นชันก็คือคนที่มีอาการแพ้ขมิ้นชัน จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดหัวนอนไม่หลับ การใช้ขมิ้นชันเป็นยาแก้โรคกระเพาะก็คือใช้อย่างระมัดระวังเนื่องจากถ้าใช้ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดแผลในกระเพาะได้ และข้อควรระวังที่สำคัญของการใช้ขมิ้นชันคือการใช้ขมิ้นชันร่วมกับยาต้านแข็งตัวของเลือดเนื่องจากจะทำให้มีฤทธิ์เสริมกัน ทำให้เลือดแข็งตัวช้าและอาจหยุดไหลยาก (81)

2.4.2.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน (Biological activity of *C. longa*)

การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชันในช่วง 20 ปี ที่ผ่านมามีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่มากกว่า 6,000เรื่อง เช่น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน สารบริสุทธิ์เคอร์คิวมินอยด์ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ กับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ(antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer activity) ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (anti-protozoa activity) และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ (anti-Alzheimer activity) ปัจจุบันมีการนำขมิ้นชันไปศึกษาด้านการเกษตรมากขึ้น เช่น นำผงขมิ้นชันไปผสมในอาหารเลี้ยงสุกรและไก่ เพื่อเพิ่ม คุณภาพการผลิต เป็นต้น

1. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

มีงานวิจัยหลายเรื่องที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชันทั้งสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ แอลกอฮอล์ น้ำ รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คิวมินอยด์ ที่แยกได้จากขมิ้นชันพบว่า สามารถแสดงฤทธิ์ลดการอักเสบได้ และเมื่อนำสารเคอร์คิวมินมาทดสอบเทียบกับยามาตรฐาน phenylbutazone พบว่ามีฤทธิ์พอๆกัน ในกรณีการอักเสบเฉียบพลัน (model of acute inflammation) ส่วนกรณีการอักเสบเรื้อรัง (model of

chronic inflammation) มีฤทธิ์เพียงครึ่งเดียวเท่านั้น แต่ฤทธิ์ทำให้เกิดแผลน้อยกว่า phenylbutazone นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินแสดง ความเป็นพิษน้อยกว่ายามาตรฐานด้วย

2. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial activity)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิดในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (dermatophytes) โมลด์ (molds) และยีสต์ (yeasts) ของน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คิวมิน ที่แยกได้จากขมิ้นชันพบว่า น้ำมันหอมระเหย แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้งสามชนิด ส่วนสารเคอร์คิวมินยับยั้งได้เฉพาะยีสต์ ต่อมา Nagi และคณะ ได้รายงานว่าส่วนสกัด น้ำมันหอมระเหยจากชั้นเอทิลอะซีเตต และเฮกเซนของขมิ้นชันสามารถแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus cereus, B. coagulans, B. subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนสกัดอื่น เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน เคอร์คิวมิน และสารผสมระหว่างสารสกัดเมทานอลจากเหง้า ขมิ้นชันกับเหง้าขิงในอัตราส่วน 1:1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร *Helicobacter pyroli* ในสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ ที่ระดับความเข้มข้นสารต่ำสุดที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง (Minimum inhibition concentration; MIC) ที่ระดับ 6.25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ต้านสารอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity)

การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือด หัวใจ ต้อกระจก การทำงานที่ผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์ ส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจาก สารอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จาก Metabolism ของร่างกาย หรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ควันบุหรี่ ความเครียด ยาบางชนิด มลพิษต่าง ๆ โดยปกติในร่างกายของเรามีสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase ที่สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมากเกินไป จนร่างกายไม่สามารถกำจัดให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะก็จะทำให้เกิด โรคขึ้นได้ ดังนั้น เราจึงควรได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ จากอาหารเข้าไปเพื่อช่วยรักษาสมดุลของร่างกาย ปัจจุบัน ผู้บริโภคให้ความสนใจและใส่ใจเรื่องอาหารเพื่อสุขภาพ มากขึ้น ดังนั้น ส่วนผสมของอาหารที่จะผสมลงไปจึงเป็นสิ่งจำเป็นโดยเฉพาะถ้าเป็นสิ่งที่มาจากธรรมชาติ เช่น สมุนไพร ที่มีสรรพคุณต่าง ๆจะยิ่งเพิ่มมูลค่าของอาหารมากขึ้น และ ทำให้ผู้บริโภคมั่นใจว่าปลอดภัย รวมทั้งยังรักษาโรคได้

จากการศึกษาค้นคว้าวิจัยฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ ผงแห้งพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae จำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วย ขมิ้นชัน (*C. longa*) ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) อาวแดง (*C. angustifolia*) ว่านนางคำ (*C. aromatica*) ขมิ้นขาวป่า (*C. amada*) พบว่าขมิ้นชัน

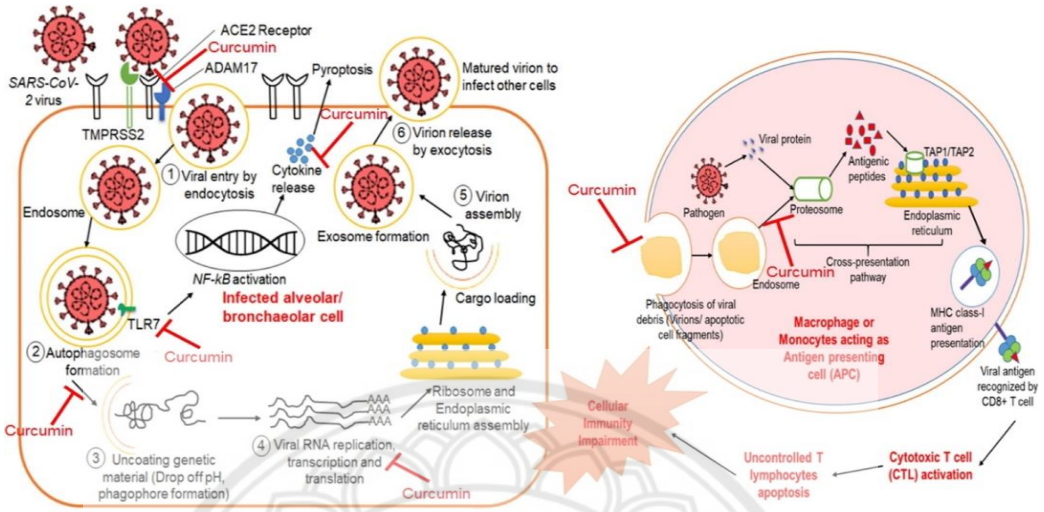
แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด รองลงมาคือ ขมิ้นอ้อย อาวแดง ว่านนางคำ และขมิ้นขาวป่า ตามลำดับ ผลที่เกิดขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของสารเคอร์คิวมิน และสารฟีนอลในพืช แต่ละชนิดนั้น คือ ขมิ้นชันมีสารเคอร์คิวมินและสารฟีนอลมากที่สุด จึงทำให้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด

4. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer activity)

จากการศึกษาทดสอบสารเคอร์คิวมินกับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกที่ผิว พบว่าสารเคอร์คิวมินสามารถลดการเกิดเนื้องอกของหนูได้ ซึ่งมีงานวิจัย สนับสนุนว่าอาจเกิดจากสารเคอร์คิวมินไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ต่อมามีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน ทั้งในระดับเซลล์ทดลอง (*In vitro*) และสัตว์ทดลอง (*In vivo)* พบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งทั้งสองการทดลองในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (81)

5. ฤทธิ์ต้านไวรัส SARS-CoV2

สารเคอร์คูมิน (curcumin) ที่พบมากในขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีฤทธิ์ต้าน การอักเสบ (anti-inflammatory) ได้ดี จึงน่าจะมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการปกป้องและซ่อมแซมเซลล์และอวัยวะของร่างกายที่ติดเชื้อโควิด-19 ได้ โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าโรคโควิด-19 เกิดจากการ ติดเชื้อโคโรน่าไวรัสชนิด SARS-CoV-2 จะทำให้เกิด พยาธิสรีรวิทยามากมาย เช่น การทำลายปอด และการทำลายอวัยวะอื่นอีกหลายอวัยวะ ซึ่งอาจเกิดขึ้นจาก การอักเสบอย่างรุนแรง และทำให้เกิดพายุไซโทไคน์ (Cytokine storm) ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์คูมิน ที่อาจช่วยในการรักษาโรคโควิด-19 ซึ่งพบหลักฐานว่า สารเคอร์คูมินอาจลดการเข้าเซลล์ของเชื้อไวรัส การเพิ่มจำนวนของไวรัส การป้องกันละการซ่อมแซมเซลล์และอวัยวะหลายชนิด ที่เสียหายจากการติดเชื้อไวรัส และการป้องกันความผิดปกติต่างๆ ที่เกิดจากภาวะพายุไซโทไคน์ (Cytokine storm) ดังแสดงในภาพ 49 การศึกษาพบว่า สารเคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านไวรัส (antiviral) ฤทธิ์แก้ปวด (anti nociceptive) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti- inflammatory) ฤทธิ์ลดไข้ (antipyretic) อาจมีผลที่ดีต่อการรักษาโรคโควิด-19 ได้ นอกจากนี้ ยังพบกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซีส (antiapoptotic) ฤทธิ์ต้านการเกิดพังผืด (antifibrotic) และยับยั้งสารในกล่มไซโทไคน์ที่ทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้นที่เกิดจากการติดเชื้อได้ดี (84)



ภาพ 49 แสดงกลไกการยับยั้งไวรัส SARS-CoV2 ของขมิ้นชัน (85)

2.4.3 งานวิจัยการใช้สารสกัดจากสมุนไพรธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ในปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อราจะเป็นการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะซึ่งมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่ได้รับยาจึงได้มีนักวิจัยหลาย ๆ ท่านที่ได้สนใจทำการศึกษาเพื่อหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรค ซึ่งในบรรดาสมุนไพรนั้นขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราอย่างแพร่หลาย

สำหรับขมิ้นชันนั้นได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อราก่อโรคหลากหลายสายพันธุ์ โดยการศึกษาในปี ค.ศ.2006 ของ อารินี ชัชวาลชลธีระ และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ในหลอดทดลองของสารสกัดขมิ้นชันซึ่งสกัดด้วยเอทานอล ด้วยวิธี broth dilution technique โดยมีคีโตโคนาโซลเป็นตัวควบคุม ผลการทดลองพบว่า สารสกัดขมิ้นชันสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ 42.09±15.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. Mentagrophytes* ได้เป็นระยะเวลา 20 วัน (8) ต่อมาในปี ค.ศ.2013 Flávio Dias Ferreir และคณะที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราและฤทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากน้ำมันหอมระเหย *Curcuma longa L.* ที่สกัดด้วยวิธี GC/MS ทดสอบด้วยวิธี agar toxicity method ต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นระบุว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *C. longa* สามารถยับยั้ง *A. flavus* Link aflatoxin production ได้ โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 0.01% ถึง 5.0% v/v และความเข้มข้นของ curcumin เท่ากับ 0.01-

0.5% v/v แล้วทำการวัดการสร้างสปอร์ ความมีชีวิตของสปอร์ และสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีกว่า curcumin ในเชื้อ *A. flavus* โดยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ น้ำมันหอมระเหยจาก *C. longa* ที่ 0.10% สามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของ *A. flavus* ได้ และผลการยับยั้งนี้มีประสิทธิภาพมากกว่าในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.5% การใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถยับยั้งการงอกและการสร้างสปอร์ของเชื้อได้ 100% เมื่อนำเชื้อ *A. flavus* ที่ทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Scanning electron microscopy (SEM) พบว่าเกิดความเสียหายต่อผนังของสายราและก้านชูอับสปอร์ จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหย *C. longa* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี ทำให้อาจถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคในพืชต่อไป (86) เช่นเดียวกับการศึกษาในปี ค.ศ.2020 ของ Chuku, E.C และคณะ ที่ได้ทำศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดธรรมชาติที่สกัดจาก *C. longa, Zingiber officinale และ Citrus limon* เปรียบเทียบกับสารเคมีต้านเชื้อรา Mancozeb ต่อเชื้อ *Rhizopus stolonifer* ด้วยวิธี agar toxicity method เช่นเดียวกัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในการทดสอบ และใช้สารสกัดเข้มข้นจาก *C. longa, Z. officinale* และ *C. limon* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 50, 75 และ 100% และสารเคมีต้านเชื้อรา Mancozeb ความเข้มข้น 0.002% เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากพืชกับสารเคมีต้านเชื้อรา Mancozeb พบว่าสารสกัดจากพืชมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่แตกต่างกัน สารสกัดจาก *Z. officinale* ที่ความเข้มข้น 100% มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสายราของ *R. stolonifer* เท่ากับ 58.96% ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่น แต่ต่ำกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Mancozeb ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสายราได้เท่ากับ 73.31% ($P \leq 0.05$) สารสกัดจาก *C. longa* และ *C. limon* มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ต่ำกว่าตั้งแต่ 45.01% ถึง 56.98% และ 9.57% ถึง 18.73% ตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ Mancozeb ($P \leq 0.05$) การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสารสกัดและจำนวนวันที่บ่ม สารสกัดจากใบพืชสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราของเชื้อโรคในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังจากผ่านไป 3 วัน จากการศึกษาในตัวอย่างพืชจำลองโดยใช้ สปอร์ของเชื้อ *R. stolonifer* ในหัวมันฝรั่งไอริชที่สด มีสุขภาพดี และผ่านการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวแล้ว ทำการใส่สปอร์ 6.4 x 10^4 /มล. และทดสอบด้วยสารสกัดจาก *C. longa, Z. officinale* และ *C. limon* หลังจากใส่เชื้อ 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชทุกชนิดมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อความรุนแรงของโรคในตัวอย่างพืชจำลองที่มีเชื้อ *R. stolonifer* โดยสารสกัดจาก *Z. officinale* ที่ความเข้มข้น 100% สามารถการลดการเน่าที่เกิดจาก *R. stolonifer* ได้ดีที่สุดด้วยคะแนนความรุนแรงที่ 0.33 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับ mancozeb ซึ่งมีคะแนนความรุนแรงที่ 0.67

แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากกลุ่มควบคุมเชิงบวก (3.33) และมีการสูญเสียน้ำหนักที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างวิธีการรักษาต่างๆ ที่นำมาใช้ (87) และจากการศึกษาในปี ค.ศ.2021 ของ DB Kolhe และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพในหลอดทดลองของสารสกัดจากพืชและสารเคมีในการต้านเชื้อราด้วยวิธี agar toxicity method เช่นเดียวกับอีกสองการศึกษาต่อเชื้อรา *R. stolonifer* ที่ก่อโรคใน sapota ซึ่งจะใช้สารสกัดจากพืช ได้แก่ Ginger, Turmeric (*C. Longa*), Neem, Garlic, Nilgiri, Onion and Tulsi เปรียบเทียบกับสารเคมี ได้แก่ กรดบอริก แคลเซียมคลอไรด์ โซเดียมไบคาร์บอเนต และโพแทสเซียมคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากพืชมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายราของ *R. stolonifer* ได้ สารสกัดจาก Garlic มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราได้สูงที่สุด (86%) ตามด้วย Nilgiri oil (85.15%) สารสกัดจาก Turmeric (79.37%) สารสกัดจาก Onion (67.18%) และสารสกัดจากใบของ Tulsi (62.71%) และสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายราได้น้อยที่สุด คือ สารสกัดจากใบของ Neem (54.60%) และสารสกัดจาก Ginger (52.41%) จากสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ แคลเซียมคลอไรด์และกรดบอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของสายราของ *R. stolonifer* และสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยที่สุด คือ โพแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมไบคาร์บอเนต (88)

สำหรับฟ้าทะลายโจรนั้นที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านไวรัสได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราอย่างแพร่หลาย โดยจากการศึกษาในปี ค.ศ.2020 ของ Robinson, V.K และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของ *Andrographis paniculata* ต่อเชื้อราที่แยกได้จาก *Citrullus colocynthis* โดยจะใช้สารที่สกัดจากใบของฟ้าทะลายโจรสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา ทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method โดยจะใช้ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบต่อเชื้อรา *A. flavus, R. arrhizu, A. niger* และ *Mucor* sp. ที่แยกได้จากเมล็ดเมลอน ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรมีขนาด inhibition zone ต่อเชื้อ *A. niger* เท่ากับ 16.50±0.71, 13.50±0.71, 10.50±0.71 และ 0.00±0.00 มิลลิเมตร มีขนาด inhibition zone ต่อเชื้อ *A. flavus* เท่ากับ 33.50±0.71, 21.50±0.71, 19.50±0.71 และ 0.00±0.00 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *R. arrhizu* และ *Mucor* sp. พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อได้ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้นจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่สูงขึ้น (89) เช่นเดียวกับการศึกษาในปี ค.ศ.2022 ของ Sharika Farhana โดยได้ทำการศึกษาประเมินศักยภาพสารต้านจุลินทรีย์จากการสกัดรากของฟ้าทะลายโจร ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในทางการแพทย์เพื่อต่อต้านเชื้อโรคแบบดั้งเดิม โดยทำการทดสอบการต้านเชื้อต่อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์

และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ใช้ตัวทำละลายในการสกัดทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ซึ่งทดสอบด้วยวิธี agar-well diffusion method เช่นเดียวกัน ผลการทดสอบพบว่าสารที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้ inhibition zone เท่ากับ 45 มิลลิเมตร ในขณะที่สารที่สกัดด้วยเอทานอล และเอทิลอะซิเตทผลปรากฏว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Shigella flagella* และ *Enterobacter faecalis* ได้ inhibition zone เท่ากับ 42 มิลลิเมตร และ 38 มิลลิเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการต้านเชื้อราของสารที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *Candida albicans* ได้ inhibition zone เท่ากับ 38 มิลลิเมตร และ 38 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรากฟ้าทะลายโจรโดยวิธี Gas Chromatography Mass Spectrophotometer (GC-MS) พบว่ามี Methyl palmitate เป็นองค์ประกอบหลักถึง 56.732% (90)

จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพได้มากมายจึงเป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 โดยองค์การเภสัชกรรม กระทรวงสาธารณะสุขของประเทศไทย ได้นำสมุนไพรสองชนิดนี้มาผลิตในรูปแบบแคปซูลเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด-19 แต่ยังไม่สามารถบ่งชี้คุณสมบัติในการต้านเชื้อราในกลุ่ม Mucormycosis และ Aspergillosis ที่อาจพบโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโควิด-19 ได้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงสนใจทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่ม Mucormycosis และ Aspergillosis ของผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อเป็นการต่อยอดและเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา ที่นอกจากจะช่วยเสริมภูมิคุ้มกันต่อต้านโรคโควิด-19 ให้กับผู้ป่วยแล้วนั้น ยังสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราฉวยโอกาสอันอาจจะพบได้จากการติดเชื้อโควิด-19 ได้อีกด้วย

2.5 การทดสอบความไวของเชื้อราต่อยาต้านจุลชีพ

2.5.1 การทดสอบความไวของยาต้านเชื้อราตาม Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guideline (Antifungal susceptibility test for filamentous fungi)

CLSI ประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดวิธีการทดสอบความสามารถของสารด้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานไว้ขั้นตอนการปฏิบัติขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลชีพ (รวมถึงเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหา) อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบอุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อตลอดจนการอ่านผลและการแปลผล

2.5.1.1 Broth dilution method (CLSI M38-A2)

1. Broth microdilution method

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

คือ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ผสมกับ L-glutamine โดยไม่มีส่วนผสมของ sodium bicarbonate และอาหารเลี้ยง เชื้อควรมี pH ที่เป็นด่างหรือเป็นกลาง ส่วนสารที่ใช้ปรับค่า pH คือ morpholine sulfonic acid (MOPS)

1.2 การเตรียมยาสำหรับที่ใช้ในการทดสอบ

ยามาตรฐานที่นำมาใช้ในการทดสอบเป็นยาที่มาจากบริษัท โดยยาที่ใช้ทาหรือรับประทาน ยาที่อยู่ในรูปแบบผงน้ำกลั่น ยาที่เตรียมสามารถนำมาใช้ทดสอบภายใน 30 นาทีภายหลังจากการเตรียมยา โดยยาอาจจะเก็บได้อย่างน้อย 6 เดือน ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส ข้อแนะนำควรใช้ให้หมดในคราวเดียว

1.3 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อมาละลายใน 0.85% NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 3-5 นาทีหรือ vortex 15 วินาที เพื่อให้สายราแตกออกแล้วนำไปวัดความขุ่นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้จะเป็นค่าความขุ่นที่บ่งบอกปริมาณของเชื้อราที่ใช้ทดสอบ ซึ่งปริมาณเชื้อราสายแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบจะแตกต่างกัน

1.4 วิธีการทดสอบ

ทำการเจือจางความเข้มข้นยาแบบ 10-fold dilution ลงใน multiwall microdilution trays แล้วนำเชื้อใส่ในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลาในการบ่มจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อที่นำมาทดสอบ หลังจากนั้นอ่านผลการทดสอบโดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

2. Broth macrodilututionmethod

จะคล้ายกับวิธี microdilution แต่ไม่นิยมทำเนื่องจากต้องใช้เชื้อและยาที่ทดสอบปริมาณมาก และ Agar dilution methods เป็นวิธีการทดสอบโดยต้องเจือจางน้ำยาแบบ 10-fold dilution ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบคือ molten agar จากนั้นนำยาที่ต้องการทดสอบเติมลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับสารละลายเชื้อราที่ต้องการทดสอบลงไป แต่วิธีมาตรฐาน (standard methods) ไม่นิยมใช้ เนื่องจากปริมาณของเชื้อราที่ใช้จะแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง

2.5.1.2 Disc dilution method (CLSI M51-A)

ใช้วิธี Disc diffusion Method เป็นวิธีการที่ใช้ในการประเมินยา Amphotericin B, ยา Posaconazole, ยา Caspofungin, ยา Itraconazole และยา Voriconazole ที่ใช้ในการรักษาเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Nondermatophyte filamentous fungi โดย CLSI guideline M51-A สำหรับใช้ทดสอบความไวต่อยา Caspofungin, ยา Amphotericin B และยา Triazole ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบคล้ายกับคู่มือ M44-A2 ที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาสำหรับเชื้อยีสต์ แต่การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ในการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อราสายไม่ต้องเพิ่มแคลเซียม (calcium) หรือแมกนีเซียม (magnesium) ลงไป ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบสามารถดูได้จาก CLSI M38-A2 ถ้าเป็นเชื้อ moraceous mold, *Aspergillus* sp. และราสายชนิดอื่นๆ จะ incubate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Fusarium* spp. จะ incubate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เห็นโคโลนีของเชื้อราแผ่ออก ถ้าเชื้อไวต่อยาที่ใช้ทดสอบจะเกิด inhibition zone ขึ้น จากนั้นให้วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ในส่วนที่แคบที่สุดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

2.5.2 Agar diffusion method

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ Disc diffusion method เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ สามารถบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่สามารถทราบค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) หรือ Minimal lethal concentration (MLC) ได้ ไม่เหมาะสำหรับการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อจุลชีพที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper filter)

ที่เตรียมไว้ก่อนแล้วซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปบ่มเพาะให้เชื้อเจริญ หลังจากนั้นอ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีของเชื้อรอบๆ แผ่น disc ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองความสามารถในการต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่นขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสมุนไพร (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper disc หรืออาจเรียกว่า disc sensitivity test) หรืออาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ (91) ซึ่งจะแบ่งย่อยได้อีก 2 วิธี ดังนี้

2.5.2.1 Agar well diffusion assay

เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (culture broth) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อต่อเชื้ออินดิเคเตอร์ ทำได้โดยการนำจานอาหาร Nutrient agar มาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมกับเชื้อที่จะใช้ทดสอบหรือเชื้ออินดิเคเตอร์ ปริมาตรอาหาร มิลลิลิตร ซึ่งมีเชื้ออินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 1.4×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้แข็ง เจาะหลุมวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.8 มิลลิเมตร ห่างกันประมาณหลุมละ 3 เซนติเมตร เติม culture broth ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า ลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมกับเชื้ออินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งที่เกิดขึ้น (92)

2.5.2.2 Disc diffusion assay

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสกัดสมุนไพร และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสมุนไพรด้วย หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole – plate diffusion) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดสารละลายสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอน การแปลผลของวิธีนี้สามารถบอกได้เพียงว่าสมุนไพรที่ความเข้มข้นนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของ inhibition zone เท่านั้น

และอาจใช้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานได้ (92)

2.5.2.3 วิธีการทำ Agar diffusion test (disc diffusion test และ hole–plate diffusion)

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลววัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่วจุมกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสกัดสมุนไพร และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุมควบคุม คือ กระดาษ กรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสมุนไพรด้วย หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole – plate diffusion) แลวหยดสารละลายสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอน

2.5.3 วิธีการอ่านผลและแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

2.5.3.1 Minimal inhibitory concentration (MIC)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL) หรือหน่วยสากลต่อมิลลิลิตร (IU/mL) คำว่า MIC สามารถใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อชนิดนี้ต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด หรือความไวของเชื้อหลายชนิดต่อยาหนึ่งชนิด รวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาหรือการแปลผลของยาต่อเชื้อจุลชีพ ทดสอบเพื่อหาค่า MIC ของยา ควรทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นยาลดลงทุก 2 เท่า (two-fold serial dilution)

2.5.3.2 Minimal fungicidal concentration (MFC)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อจุลชีพอาจใช้คำที่จำเพาะเจาะจง คือ minimal bactericidal concentration (MBC) แต่ถ้าเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อราอาจใช้คำว่า minimal fungicidal concentration (MFC) ยาต้านเชื้อจุลชีพที่มีฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อจุลชีพ (microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน โดยมีค่าไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น และ MLC/MIC น้อยกว่าเท่ากับ 4

ซึ่งวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านเชื้อจุลชีพมีหลายวิธีหากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและเชื้อราสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ คือ dilution susceptibility test และ agar diffusion test การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะ

ของงาน เช่น งานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำ งานที่นานๆ ทำครั้ง หรืองานที่ต้องรู้ค่า MBC ยกตัวอย่างงานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้งและแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ใช้ทดสอบน้อย จะนิยมใช้วิธี agar diffusion test เพื่อตัดปัญหาในการเตรียมและเก็บสารละลายของยาที่ต้องใช้ใน dilution test ขณะที่งานที่ต้องการรู้ค่า MBC ของยาต้านเชื้อจุลชีพจะนิยมใช้วิธี broth dilution test ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้าหรือต้องการสารอาหารอื่นในการเจริญเติบโต (fastidious dilution test) จะนิยมใช้วิธี broth dilution test ขณะที่เชื้อที่ต้องเจริญบนเลือดหรือไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) มักใช้วิธี agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ควรเลือกใช้วิธี dilution test จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีเชื่อทดสอบจำนวนมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำวิธี agar dilution test เป็นต้นชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาแพร่กระจาย (diffuse) ใน agar medium ไม่ดีจะนิยมหาค่า MIC ด้วยวิธี dilution test เป็นต้น จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อยจะนิยมทำ agar diffusion test เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้ว อาจต้องพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจส่งผลต่อการทดสอบ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (medium) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีจะต้องยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากขณะที่มีเชื้อเจริญ ไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของยา มีส่วนผสมที่ปรากฏใน broth และ agar medium เหมือนกัน (ยกเว้นสารช่วยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง) และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อชนิดที่ต้องการทดสอบสามารเจริญได้ อาหารเลี้ยงนิยมใช้ ได้แก่ Mueller Hinton (MH) broth (agar) ถ้าทดสอบเชื้อที่เจริญยากนิยมใช้ Brain heart infusion broth (agar) หรือ Trypticase soy broth (agar) ส่วนในการทดสอบเชื้อรา อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของราและชนิดของยาที่ทดสอบ ถ้าเป็นราชั้นสูงจะใช้ Sabouraud dextrose broth (agar) Tryptic soy broth (agar) Potato dextrose agar ขณะที่ราชั้นต่ำจะใช้ Glucose yeast extract broth (agar) เป็นต้น (91)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งที่มาของเชื้อ

การทำวิจัยในครั้งนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อราทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ซึ่งเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.2 ผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด ได้แก่

ฟ้าทะลายโจรแคปซูล (*Andrographis paniculata*) ยาแผนโบราณ เลขทะเบียนที่ G468/41 บริษัท ผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด เลขที่ 130/149 หมู่ 3 ต.วังจุฬา อ.วังน้อย จ.พระนครศรีอยุธยา 13170 เบอร์โทรศัพท์: 035-721445-7, 063-2049077-8 ภายใต้ลิขสิทธิ์ขององค์การเภสัชกรรม

ขมิ้นชันแคปซูล (*Curcuma longa*) ยาแผนโบราณ เลขทะเบียนที่ G447/41 บริษัท ผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด เลขที่ 130/149 หมู่ 3 ต.วังจุฬา อ.วังน้อย จ.พระนครศรีอยุธยา 13170 เบอร์โทรศัพท์: 035-721445-7, 063-2049077-8 ภายใต้ลิขสิทธิ์ขององค์การเภสัชกรรม

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. โศภิศ คันธวงศ์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud dextrose agar (SDA) slant และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน เพื่อเก็บเป็น stock เชื้อสำหรับการทดสอบ เมื่อเชื้อเจริญจึงนำมา subculture โดยใช้ fungus needle เขี่ยเชื้อลงบนจานอาหาร SDA plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน สามารถนำไปใช้ทดสอบต่อไป

การเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบ Antifungal susceptibility test จะทำการ subculture เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDA plate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3-5 วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้วจะทำการตัดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงและเป็นการควบคุมปริมาณของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

3.4 สารควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบในการศึกษานี้ใช้ตัวควบคุมคุณภาพสองแบบ คือ

1. ตัวทำละลายชนิดควบคุม ได้แก่ สารละลาย เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) เป็นตัวควบคุมคุณภาพเพื่อยืนยันว่าฤทธิ์ที่ได้จากการทดสอบมาจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรจริง ไม่ได้มาจากฤทธิ์ของตัวทำละลาย
2. ตัวควบคุมชนิดที่สอง คือ ยาต้านเชื้อรา ใช้ยา Amphotericin B (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ยา Itraconazole (ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นตัวแทนของยาต้านเชื้อราที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar toxicity

3.5.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน

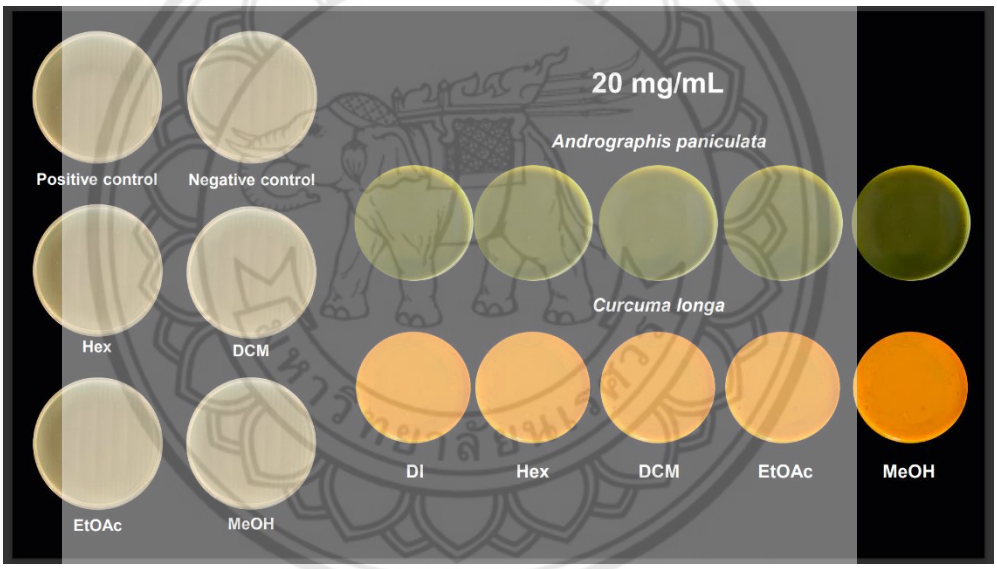
ผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้จะอยู่ในรูปแบบผงบรรจุในแคปซูล โดยก่อนจะทำการทดสอบจะนำผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันปริมาณ 400 มิลลิกรัม ซึ่งอ้างอิงมาจากปริมาณของฟ้าทะลายโจรใน 1 แคปซูลมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar toxicity

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar toxicity ทำได้โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDA แบ่งลงใน screw cap tube ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาพักไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar toxicity method

นำสารละลายฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในข้อ 3.4.1. มาผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.2. จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบที่มีปริมาตรสุทธิ 20 มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) เป็นสารละลายควบคุม (solvent control) และใช้ยา Amphotericin B เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำการวางเชื้อราที่ต้องการทดสอบลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าเชื้อในจาน negative control จะเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพ 50



ภาพ 50 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อรา 1 สายพันธุ์ด้วยวิธี agar toxicity

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

3.5.4 การอ่านผลและแปลผลการทดสอบ

1) การคำนวณความเข้มข้นในการทดสอบ

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันมีค่าเท่ากับ 200 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถคำนวณความเข้มข้นได้ ดังนี้

วิธีทำ จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$(200\ mg/ml)(2\ ml) = C_2(20\ ml)$

$C_2 = 20\ mg/ml$

ดังนั้น ความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 20 mg/ml

2) การแปลผลการทดสอบ

การอ่านผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar toxicity อ่านผลเป็นค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ และการแปลผลเป็นการแปลผลจากการเปรียบเทียบค่าอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition rate (MGI) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$MGI = \frac{DC - DT}{DC} \times 100$$

DC = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อบนจานควบคุม

DT = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อบนจานทดสอบ

3.6 การเตรียมสารสกัดจาก *Andrographis paniculata* และ *Curcuma longa* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

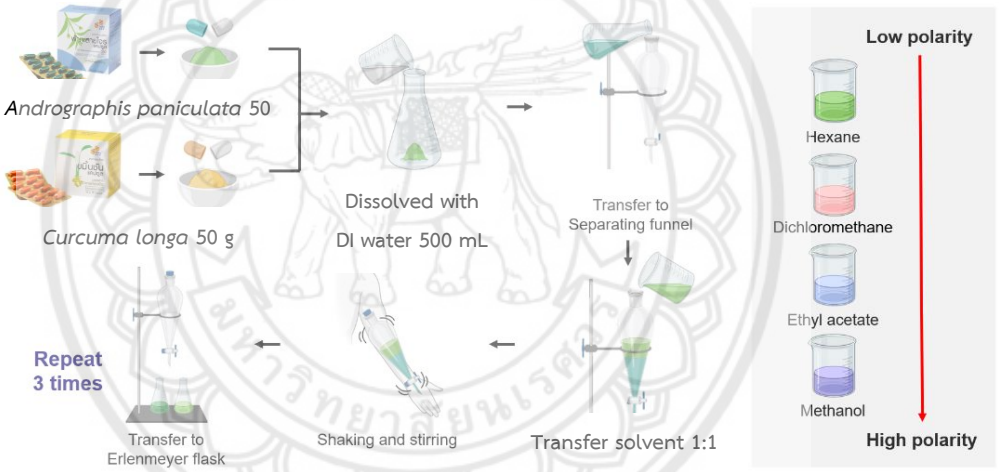
นำผงสมุนไพรจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 50 กรัม/500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธี partition method โดยใช้กรวยแยก (separatory funnel) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วที่แตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) ในอัตราส่วน 1:1 ทำการสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพ 51 จากนั้นนำชั้นของสารละลายที่สกัดได้ทำการกรองด้วยสำลีและ sodium thiosulfate anhydrous ชั้นของสารสกัดอินทรีย์ที่ได้แต่ละชนิดจะถูกนำไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

(ความเร็ว 80 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) เมื่อได้สารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมแล้วนำไปคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละ (% yield) จากสูตร

$$\%yield = \frac{W1}{W2} \times 100$$

W1 = ปริมาณสารที่ได้ W2 = ปริมาณสารเริ่มต้น

จากนั้นนำผงสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 0.6 กรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ 1%DMSO เป็นตัวทำละลายเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



ภาพ 51 แสดงการสกัดผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม ด้วยวิธี Partition method

3.7 การประยุกต์วิธีทดสอบ antifungal susceptibility test ตามวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรานั้นไม่มีวิธีการทดสอบที่จำเพาะ จึงใช้หลักการทดสอบด้วยวิธี agar diffusion ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานในการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 แสดงการเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยและวิธีมาตรฐาน CLSI M51-A

	การดำเนินงานวิจัย	วิธีมาตรฐาน CLSI M51-A
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Sabouraud dextrose agar	Mueller-Hinton agar
ปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	Mycelial block ขนาด 6 มิลลิเมตร	Non germinated conidial หรือ sporangiospore จำนวน $0.4x10^5$ ถึง $5x10^6$ CFU/mL
การ inoculate เชื้อ	นำ Mycelial block วางบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ	ใช้ swab จุ่มเชื้อจากนั้นป้ายลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
จำนวน disk/plate	ทดสอบ 6 disc ต่อ 1 plate 90 มิลลิเมตร	ไม่เกิน 1 disc ทดสอบต่อ plate ขนาด 100 มิลลิเมตร
อุณหภูมิที่ใช้ incubate	25 องศาเซลเซียส	35±2 องศาเซลเซียส

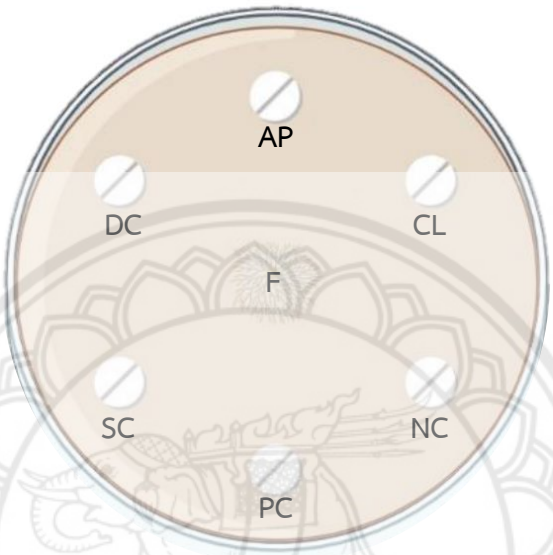
3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี disc diffusion method

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการทดสอบดังขั้นตอนต่อไปนี้

1) วางแผ่น sterile blank disc บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA จำนวน 5 disc และวางยา Itraconazole เป็น positive control : PC

2) เติมสารสกัดที่เตรียมได้ในข้อ 3.6 โดยเป็นสารสกัดฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata* extract : AP) ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดขมิ้นชัน (*C. longa* extract : CL) ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีสารละลายควบคุมคือ 1%DMSO (DMSO control : DC)

น้ำกลั่น (negative control : NC) และเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในหลุมตัวทำละลายควบคุม (solvent control : SC) ลงบนแผ่น sterile disc โดยแต่ละ disc จะเติมสารละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบวางลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บริเวณ F ดังแสดงในภาพ 52

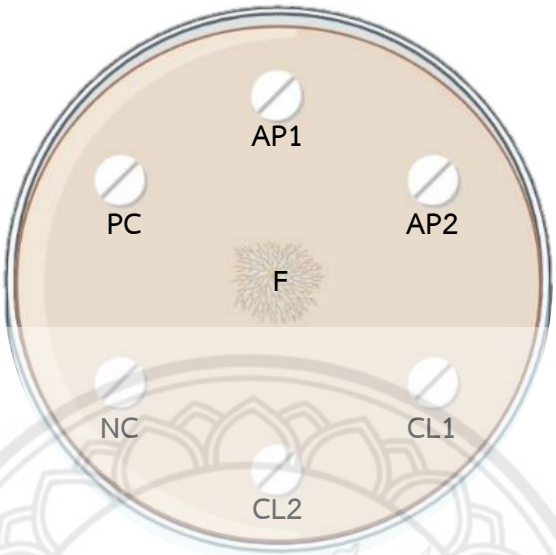


ภาพ 52 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar disc diffusion

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*,
NC ; Negative control คือ Deionized water, PC ; Positive control คือ Itraconazole,
SC ; Solvent control ได้แก่ Hexane Dichloromethane Ethyl acetate และ Methanol, DC ; 1%DMSO control,
F ; เชื้อทดสอบ คือ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus*

3) ในส่วนของชั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัด นำมาทดสอบโดยนำชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรทั้ง 2 ส่วน (*A. paniculata* : AP) สารสกัดขมิ้นชัน ทั้ง 2 ส่วน (*C. longa* extract : CL) และน้ำกลั่น (negative control : NC) ลงบนแผ่น sterile blank disc โดยแต่ละ disk จะเติมสารชนิดต่างๆ ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบวางลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บริเวณ F ดังแสดงใน

4) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านและบันทึกค่า inhibition zone รอบหลุมที่ใช้ทดสอบทุกวันจนกว่าเชื้อเจริญถึง negative control บักทึกผลเป็นค่า inhibition zone หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm)



ภาพ 53 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของชั้น aqueous จากการสกัดผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี agar disc diffusion

หมายเหตุ : AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane,
AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol,
CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane,
CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol
NC ; Negative control คือ Deionized water, PC ; Positive control คือ Itraconazole,
F ; เชื้อทดสอบ คือ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus*

3.8.1 การอ่านผลและแปลผลการทดสอบ

1) การคำนวณปริมาณเนื้อสารในการทดสอบ

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันมีค่าเท่ากับ 0.6 กรัม/มิลลิลิตร เมื่อเติมสารปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น sterile disc จะมีเนื้อสารอยู่บน disc สามารถคำนวณได้ ดังนี้

วิธีทำ สารปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มีเนื้อสารเท่ากับ 600 มิลลิกรัม
สารปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีเนื้อสารเท่ากับ (600x20)/1000 มิลลิกรัม
ดังนั้น สารปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีเนื้อสารเท่ากับ 12 มิลลิกรัม

จากความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันมีค่าเท่ากับ 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเติมสารปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น sterile disc จะมีเนื้อสารอยู่บน sterile disc จำนวน 12 มิลลิกรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นจะมีเนื้อสารที่อยู่บน

แผ่น sterile disc ที่วางไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 12 มิลลิกรัมต่อ 20 มิลลิลิตร หรือ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การแปลผลการทดสอบ

การอ่านผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี disk diffusion method อ่านผลเป็นค่า inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมเทียบกับค่า inhibition zone ของตัวควบคุมคือ คือ 1%DMSO (DMSO control) น้ำกลั่น (negative control) ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent control) และยา Itraconazole ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (positive control) ซึ่งเป็นตัวแทนของยาต้านเชื้อรา โดยจะแปลผลการทดสอบได้ ดังนี้

- Active หากพบ inhibition zone รอบ disk ทดสอบ
- Non active หากไม่พบ inhibition zone รอบ disk ทดสอบ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิสจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. และ *Mucor* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ซึ่งทำการละลายผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยน้ำกลั่นและตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol และทดสอบด้วยวิธี agar toxicity ซึ่งให้ผลการทดสอบ ดังนี้

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.

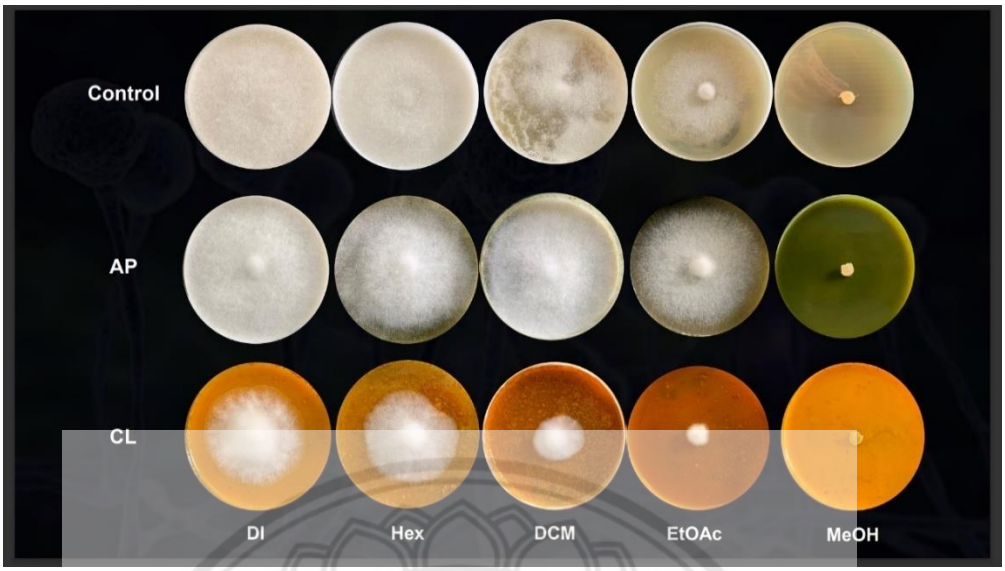
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ดังแสดงในภาพ 54 พบว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ใช้เวลา 2 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ negative control ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition (MGI) ดังแสดงในตาราง 5 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ทั้งที่ละลายด้วยน้ำกลั่นและในตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ ethyl acetate ในขณะที่ผงฟ้าทะลายโจรที่ละลายด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้เลย การทดสอบของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลาย methanol ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบ พบว่า ผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ดีกว่าผงฟ้าทะลายโจร และมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยมีอัตราการยับยั้งที่ 79.90 % ดังแสดงในภาพ 55

ตาราง 5 บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. โดยวิธี agar toxicity

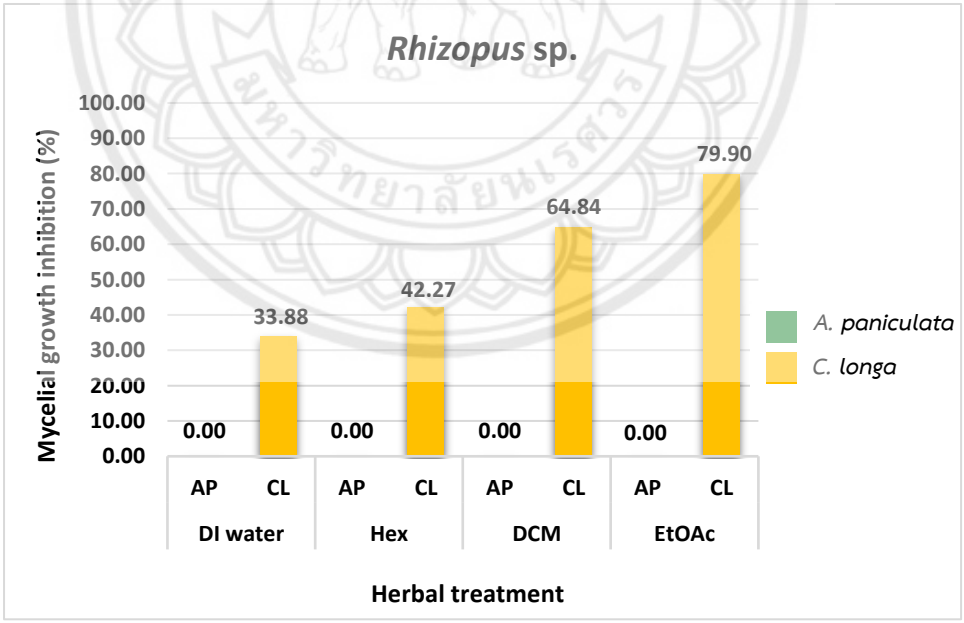
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	*Rhizopus* sp.						
		Test		Negative control		Positive control		MGI (%)
		D1	D2	D1	D2	D1	D2	
DI water	AP	38.30	84.50	51.30	84.50	NG	61.78	0.00
	CL	17.76	55.87					33.88
Hexane	AP	25.90	84.50	57.20	84.50			0.00
	CL	17.64	48.78					42.27
Dichloro-methane	AP	35.73	84.50	31.38	84.50			0.00
	CL	NG	29.71					64.84
Ethyl acetate	AP	NG	66.55	NG	62.38			0.00
	CL	NG	12.54					79.90
Methanol	AP	NG	NG	NG	NG			N/A
	CL	NG	NG					N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, MGI : Mycelial growth inhibition, D1-D2 ; วันที่ทำการบันทึกผล, N/A ; หาค่าไม่ได้



ภาพ 54 แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 55 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.

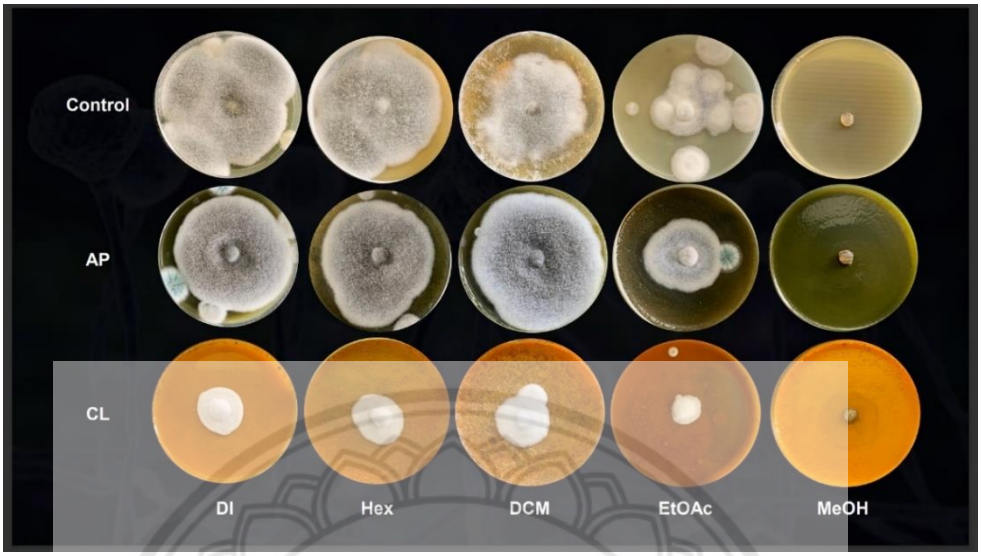
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp. ดังแสดงในภาพ 56 พบว่าเชื้อ *Absidia* sp.ใช้เวลา 5 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ negative control ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition (MGI) ดังแสดงในตาราง 6 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้ทั้งที่ละลายด้วยน้ำกลั่นและในตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ ethyl acetate แต่ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้เฉพาะที่ละลายในตัวทำละลาย hexane ส่วนการทดสอบของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลาย methanol ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบพบว่า ผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยผงขมิ้นชันมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้ดีที่สุดในการทดสอบที่ละลายในน้ำกลั่น ซึ่งมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 58.32 % เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่าตัวทำละลายชนิด hexane ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด โดยมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 56.08 % และผงฟ้าทะลายโจรมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย hexane ซึ่งมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ 4.01 % ดังแสดงในภาพ 57

ตาราง 6 บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp. โดยวิธี agar toxicity

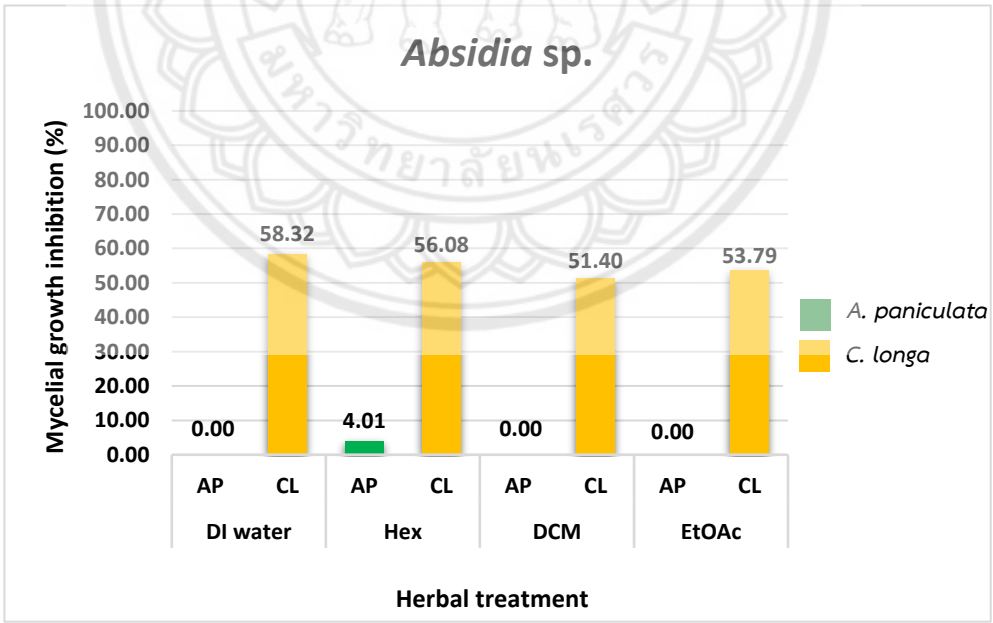
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	*Absidia* sp.															
		Test					Negative control					Positive control					*MGI* (%)
		D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5	
DI	AP	NG	23.58	42.20	58.85	71.30	NG	21.54	45.02	59.69	66.89	NG	18.79	84.50	84.50	84.50	0.00
	CL	NG	11.04	17.94	21.74	27.88											58.32
Hex	AP	NG	20.84	42.62	54.60	61.81	NG	22.98	40.19	69.26	64.39						4.01
	CL	NG	14.33	20.25	24.43	28.28											56.08
DCM	AP	NG	27.31	44.81	61.71	71.38	NG	24.00	37.84	50.24	60.29						0.00
	CL	NG	11.24	18.60	24.66	29.30											51.40
EtOAc	AP	NG	NG	18.69	30.03	41.27	NG	NG	15.83	36.98	39.10						0.00
	CL	NG	NG	10.81	11.17	18.07											53.79
MeOH	AP	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG						N/A
	CL	NG	NG	NG	NG	NG											N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, MGI : Mycelial growth inhibition, D1-D5 ; วันที่ทำการบันทึกผล, N/A ; หาค่าไม่ได้



ภาพ 56 แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 57 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.

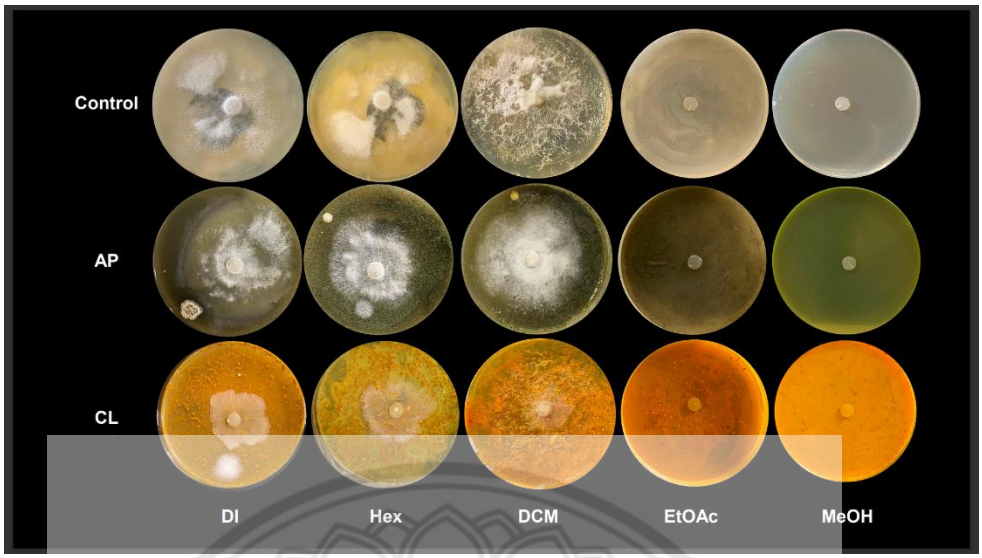
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp. ดังแสดงในภาพ 58 พบว่าเชื้อ *Mucor* sp. ใช้เวลา 8 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ negative control ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition (MGI) ดังแสดงในตาราง 7 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้เฉพาะที่ละลายด้วยน้ำกลั่นและในตัวทำละลาย hexane และ dichloromethane ส่วนการทดสอบของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลาย ethyl acetate และ methanol ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบพบว่า ผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยผงขมิ้นชันมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้ดีที่สุดในการทดสอบที่ละลายด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ซึ่งมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 73.75 % และผงฟ้าทะลายโจรมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้ดีที่สุดในการทดสอบที่ละลายด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ซึ่งมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ 38.06 % ดังแสดงในภาพ 59

ตาราง 7 บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp. โดยวิธี agar toxicity

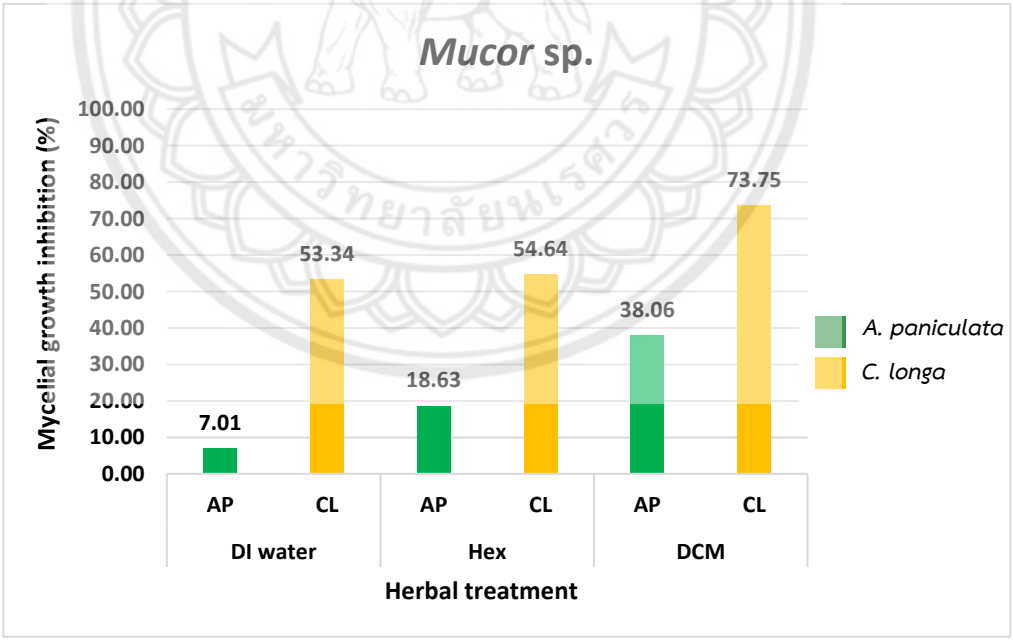
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	*Mucor* sp.																								MGI (%)
		Test								Negative control								Positive control								
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
DI	AP	13.25	32.04	46.22	57.37	59.15	64.06	68.58	78.58	9.39	19.83	30.67	42.30	52.38	63.52	71.75	84.5									7.01
	CL	NG	16.85	25.91	32.27	35.26	35.99	39.30	39.43																	53.34
Hex	AP	10.44	26.05	37.58	48.43	55.81	57.80	60.38	68.76	10.85	25.13	38.08	49.45	60.79	70.42	84.5	84.5									18.63
	CL	NG	15.25	25.82	31.34	33.51	36.91	37.82	38.33																	54.64
DCM	AP	NG	NG	NG	NG	16.48	35.88	46.25	52.34	NG	NG	NG	NG	35.36	56.78	84.5	84.5	26.76	20.71	14.38	7.09	3.73	0	0	0	38.06
	CL	NG	NG	NG	NG	NG	13.36	18.44	22.18																	73.75
EtOAc	AP	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG									N/A
	CL	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG																	N/A
MeOH	AP	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG									N/A
	CL	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG																	N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, MGI : Mycelial growth inhibition, D1-D8 ; วันที่ทำการบันทึกผล, N/A ; หาค่าไม่ได้



ภาพ 58 แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 59 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

4.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*

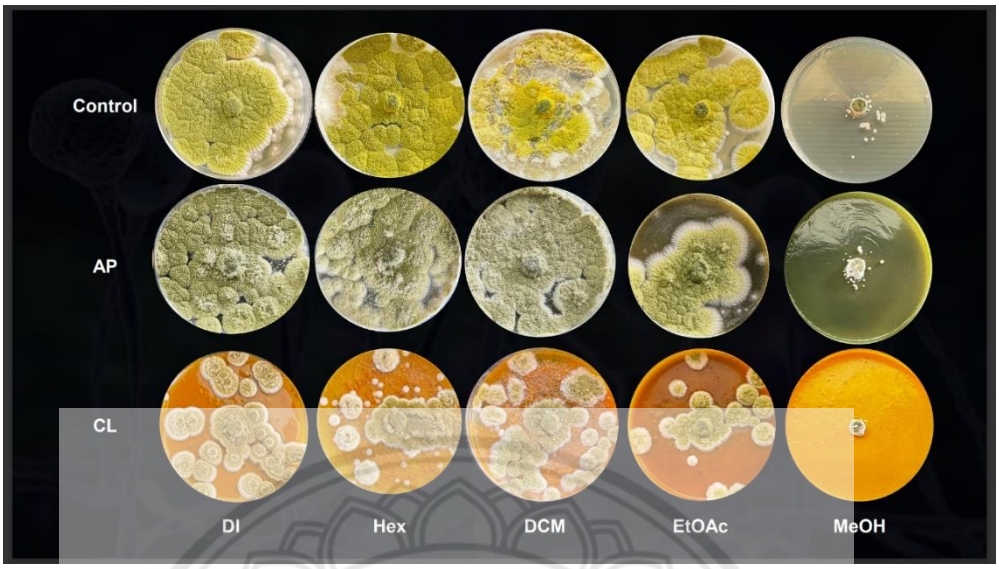
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *A. flavus* ดังแสดงในภาพ 60 พบว่าเชื้อ *A. flavus* ใช้เวลา 5 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ negative control ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition (MGI) ดังแสดงในตาราง 8 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ทั้งที่ละลายด้วยน้ำกลั่นและในตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ ethyl acetate ในขณะที่ผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้เฉพาะในตัวทำละลาย ethyl acetate ส่วนการทดสอบของผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลาย methanol ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบพบว่า ผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชันมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate โดยมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 71.08 % และผงฟ้าทะลายโจรมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate ซึ่งมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 11.03 % ดังแสดงในภาพ 61

ตาราง 8 บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยวิธี agar toxicity

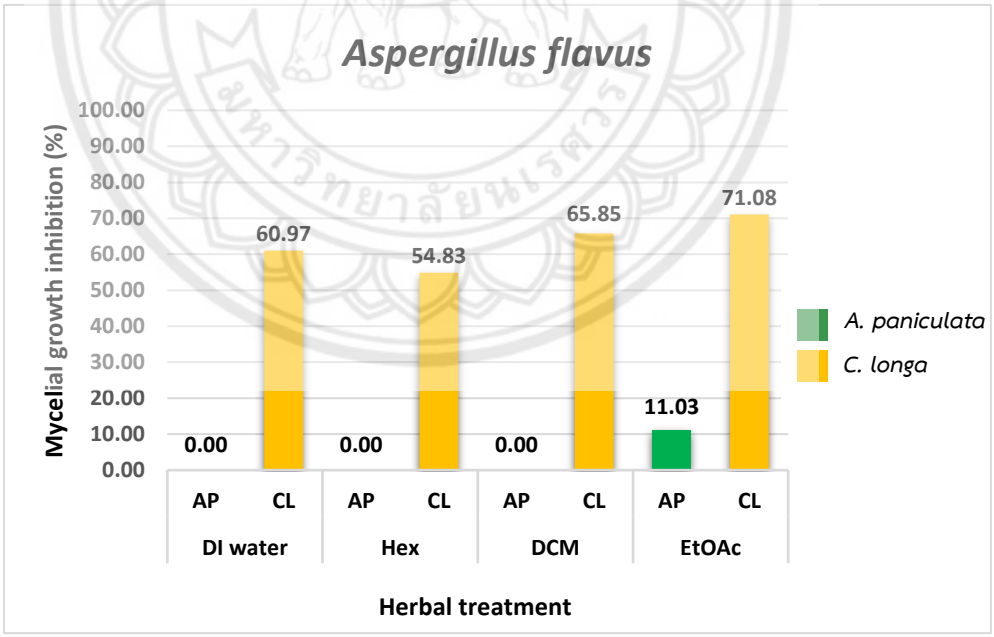
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	*Aspergillus flavus*															
		Test					Negative control					Positive control					MGI (%)
		D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5	
DI	AP	NG	19.32	24.51	84.50	84.50	NG	17.98	40.75	70.66	84.50	NG	18.53	24.98	84.50	84.50	0.00
	CL	NG	15.86	18.67	22.72	32.98											60.97
Hex	AP	NG	16.94	33.01	47.04	84.50	NG	16.54	84.50	84.50	84.50						0.00
	CL	NG	14.89	17.30	25.93	38.17											54.83
DCM	AP	NG	15.65	24.63	84.50	84.50	NG	17.81	25.61	51.39	84.50						0.00
	CL	NG	11.30	16.66	25.13	28.86											65.85
EtOAc	AP	NG	14.30	25.76	71.11	75.18	NG	11.53	19.82	64.14	84.50						11.03
	CL	NG	12.06	17.08	21.94	24.44											71.08
MeOH	AP	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG						N/A
	CL	NG	NG	NG	NG	NG											N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, MGI : Mycelial growth inhibition, D1-D5 ; วันที่ทำการบันทึกผล, N/A ; หาค่าไม่ได้



ภาพ 60 แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 61 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus flavus* เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

4.1.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

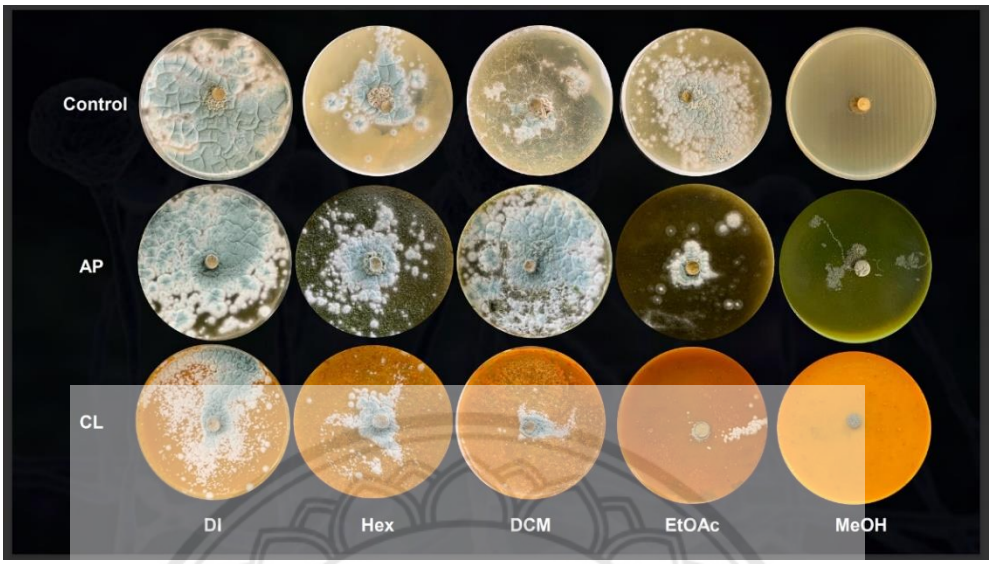
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *A. fumigatus* ดังแสดงในภาพ 62 พบว่าเชื้อ *A. fumigatus* ใช้เวลา 3 วันในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ negative control ซึ่งมีค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อและอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycelial growth inhibition (MGI) ดังแสดงในตาราง 9 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ทั้งที่ละลายด้วยน้ำกลั่นและในตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ ethyl acetate ในขณะที่ผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้เฉพาะในตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ส่วนการทดสอบของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลาย methanol ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบพบว่า ผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร ผงขมิ้นชันมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยมีอัตราการยับยั้งที่ 100 % และฟ้าทะลายโจรมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate โดยมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ 67.21 % ดังแสดงในภาพ 63

ตาราง 9 บันทึกผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยวิธี agar toxicity

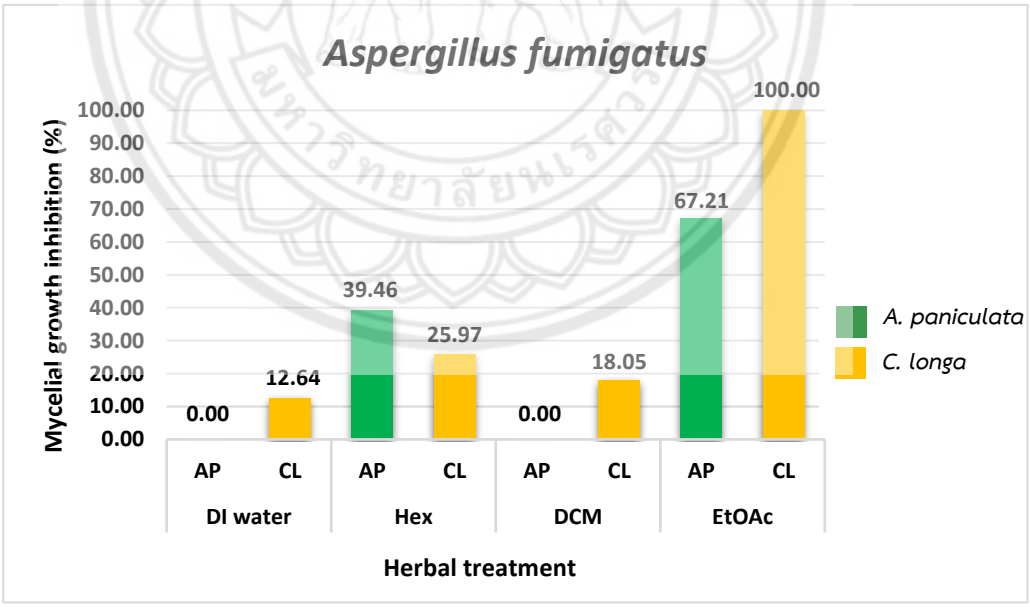
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	*Aspergillus fumigatus*									
		Test			Negative control			Positive control			MGI (%)
		D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	
DI	AP	NG	17.78	84.50	NG	19.30	84.50	NG	24.32	57.91	0.00
	CL	NG	16.86	73.82							12.64
Hex	AP	NG	15.79	33.85	NG	16.04	55.91				39.46
	CL	NG	12.32	41.39							25.97
DCM	AP	NG	30.12	84.50	NG	17.92	32.69				0.00
	CL	NG	12.37	26.79							18.05
EtOAc	AP	NG	NG	23.14	NG	NG	70.56				67.21
	CL	NG	NG	NG							100.00
MeOH	AP	NG	NG	NG	NG	NG	NG				N/A
	CL	NG	NG	NG							N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, MGI : Mycelial growth inhibition, D1-D3 ; วันที่ทำการบันทึกผล, N/A ; หาค่าไม่ได้



ภาพ 62 แสดงผลการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์**สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ** *Aspergillus fumigatus*

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



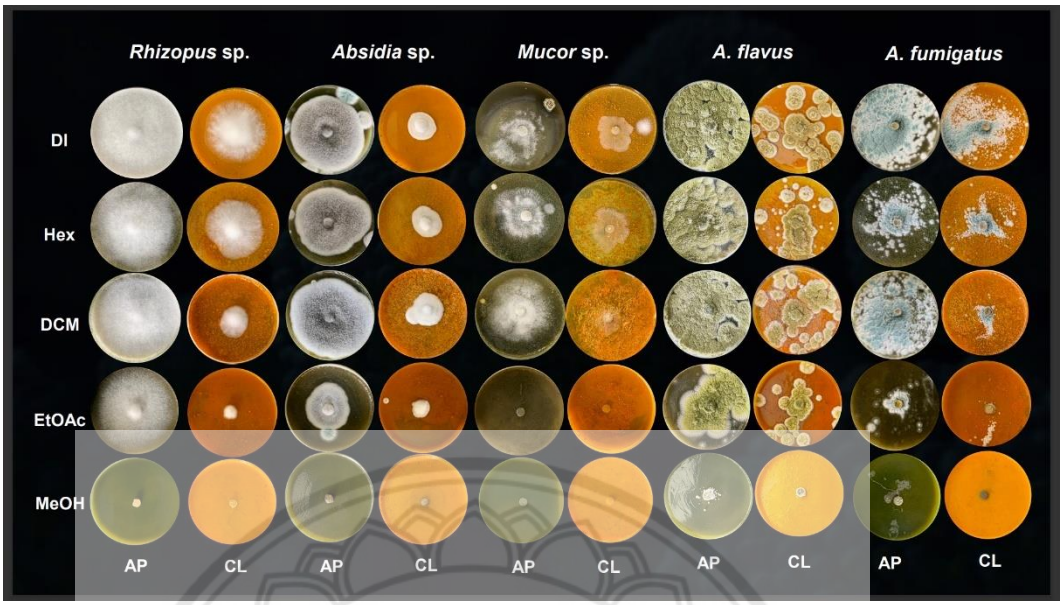
ภาพ 63 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* **เมื่อทดสอบด้วยผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน**

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

ตาราง 10 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบโดยวิธี Agar toxicity

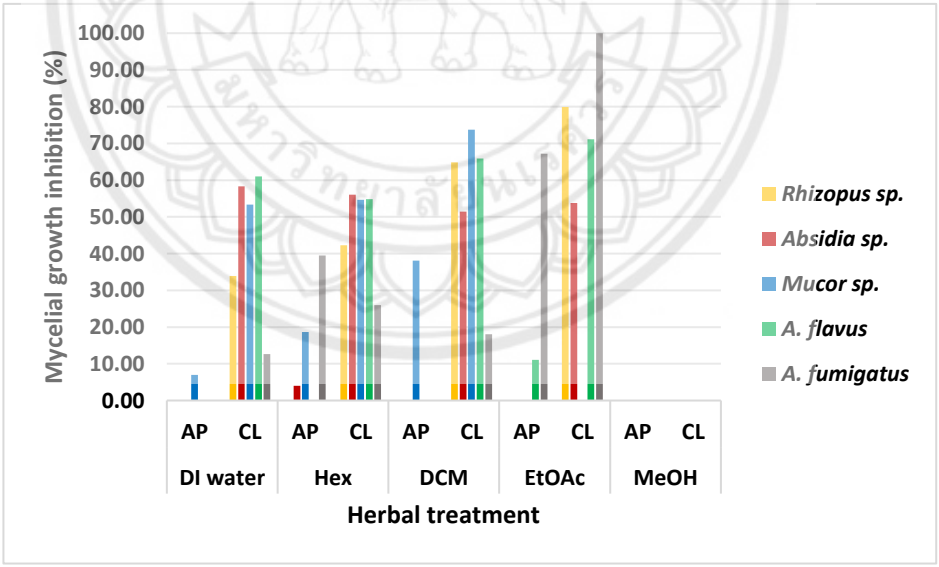
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Mycelial growth inhibition (MGI) (%)				
		Rhizopus sp.	*Absidia* sp.	*Mucor* sp.	*A. flavus*	*A. fumigatus*
DI	AP	0.00	0.00	7.01	0.00	0.00
	CL	33.88	58.32	53.34	60.97	12.64
Hex	AP	0.00	4.01	18.63	0.00	39.46
	CL	42.27	56.08	54.64	54.83	25.97
DCM	AP	0.00	0.00	38.06	0.00	0.00
	CL	64.84	51.40	73.75	65.85	18.05
EtOAc	AP	0.00	0.00	N/A	11.03	67.21
	CL	79.90	53.79	N/A	71.08	100.00
MeOH	AP	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, NG : No growth, N/A : หาค่าไม่ได้



ภาพ 64 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อราก่อโรคโดยวิธี agar toxicity

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 65 แสดงอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

4.2 การเตรียมสารสกัดจาก *Andrographis paniculata* และ *Curcuma longa* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการนำผงสมุนไพรจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมจำนวน 50 กรัม มาสกัดด้วยวิธี partition method ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol นำส่วนสารละลายไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณผลผลิตร้อยละ (% yield) ดังสูตรคำนวนในข้อ 3.6 ได้ค่าดังแสดงในตาราง 11 จากนั้นนำไปเตรียมสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ตาราง 11 แสดงน้ำหนักสารสกัดหยาบและปริมาณผลผลิตร้อยละสารสกัดหยาบของผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรม

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)		ปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบ (%)	
	ฟ้าทะลายโจร	ขมิ้นชัน	ฟ้าทะลายโจร	ขมิ้นชัน
Hexane	0.773	2.363	1.545	4.726
Dichloromethane	1.099	6.278	2.197	12.555
Ethyl acetate	7.152	7.314	14.303	14.628
Methanol	9.122	12.173	18.243	24.345

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมด้วยวิธี disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิสจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. และ *Mucor* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* สกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี agar disc diffusion ให้ผลการทดสอบ ดังนี้

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.

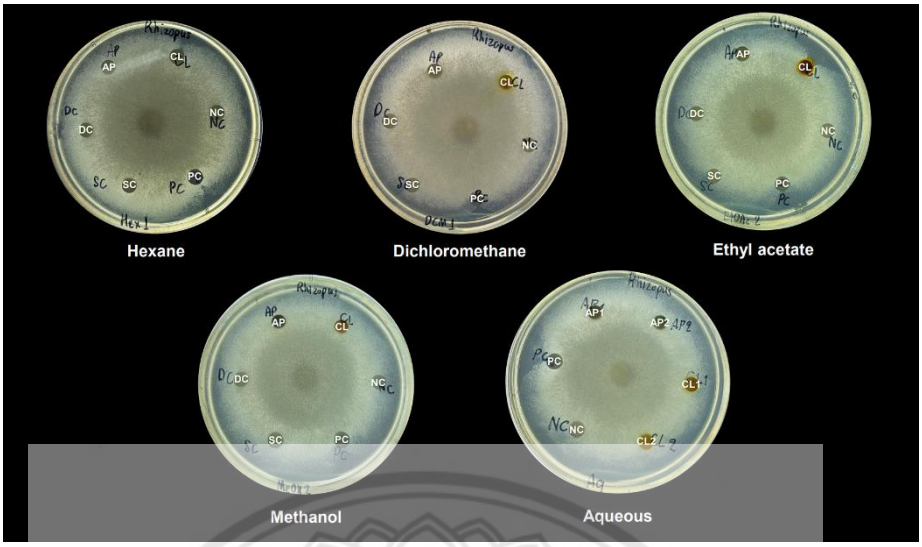
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ดังแสดงในภาพ 66 พบว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ใช้เวลา 1 วันในการเจริญเติบโตจนถึง negative control ซึ่งมีค่า inhibition zone และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 12 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเมื่อสกัดด้วย ตัวทำละลาย hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ แต่ในสารสกัดหยาบ hexane และ ethyl acetate ของผงขมิ้นชันพบว่ามีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้เมื่อเทียบกับ positive control การทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มปริมาณของสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชัน ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เพื่อเพิ่มปริมาณของสารในการทดสอบ ดังแสดงในภาพ 67 พบว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ใช้เวลา 1 วันในการเจริญเติบโตจนถึง negative control ซึ่งมีค่า inhibition zone และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 13 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Rhizopus sp. เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ซึ่งมีค่า inhibition zone เท่ากับ 11.57 และ 5.49 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบ dichloromethane มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้หากเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

สารสกัดหยาบจากผงฟ้าทะลายโจรพบว่าสารสกัดหยาบ ethyl acetate มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ ซึ่งมีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.13 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบ dichloromethane มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้หากเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบใน การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราจากสารในชั้น aqueous ที่เหลือจากการทำ partition พบว่าผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้

ตาราง 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Rhizopus* sp.

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Absidia* sp. (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0*	Inactive
DCM	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
EtOAc	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0*	Inactive
MeOH	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	0	0	0	Inactive
	AP2	0	0	0	Inactive
	CL1	0	0	0	Inactive
	CL2	0	0	0	Inactive
Hex	PC	0	0	0*	Inactive
DCM	PC	0	0	0*	Inactive
EtOAc	PC	0	0	0*	Inactive
MeOH	PC	0	0	0*	Inactive
Aqueous	PC	0	0	0	Inactive

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



ภาพ 66 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ของการทดสอบวันที่ 1

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

ตาราง 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion

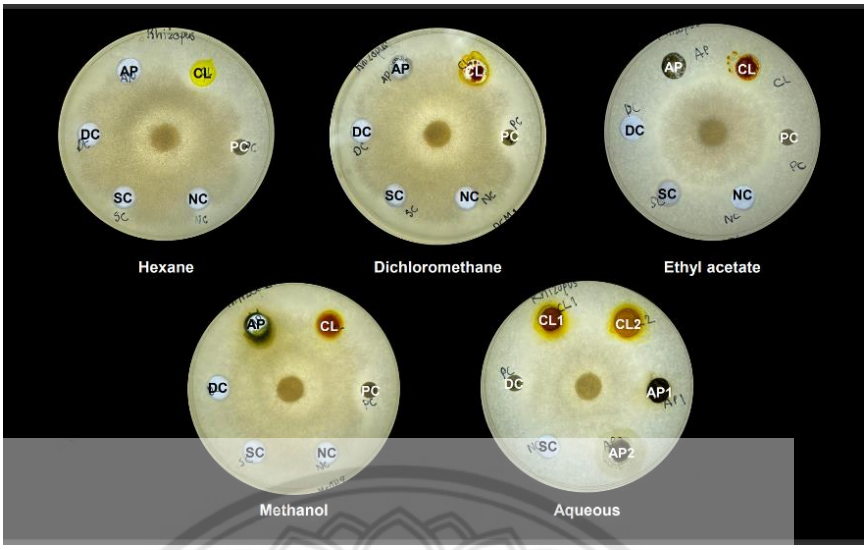
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Absidia* sp. (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	0	0	0	Inactive
	CL	12.18	10.96	11.57	Active
DCM	AP	0	0	0*	Inactive
	CL	0	0	0*	Inactive

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol

ตาราง 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Absidia* sp. (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
EtOAc	AP	12.88	12.88	12.13	Active
	CL	10.98	0	5.49	Active
MeOH	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	0	0	0	Inactive
	AP2	0	0	0	Inactive
	CL1	0	0	0	Inactive
	CL2	0	0	0*	Inactive
Hex	PC	8.26	9.18	8.72	Active
DCM	PC	8.74	8.76	8.75	Active
EtOAc	PC	10.34	8.16	9.25	Active
MeOH	PC	8.66	9.9	9.28	Active
Aqueous	PC	0	7.84	3.92	Active

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



ภาพ 67 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion ของการทดสอบวันที่ 1

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย hexane และ dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย ethyl acetate และ methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย hexane และ dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย ethyl acetate และ methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp.

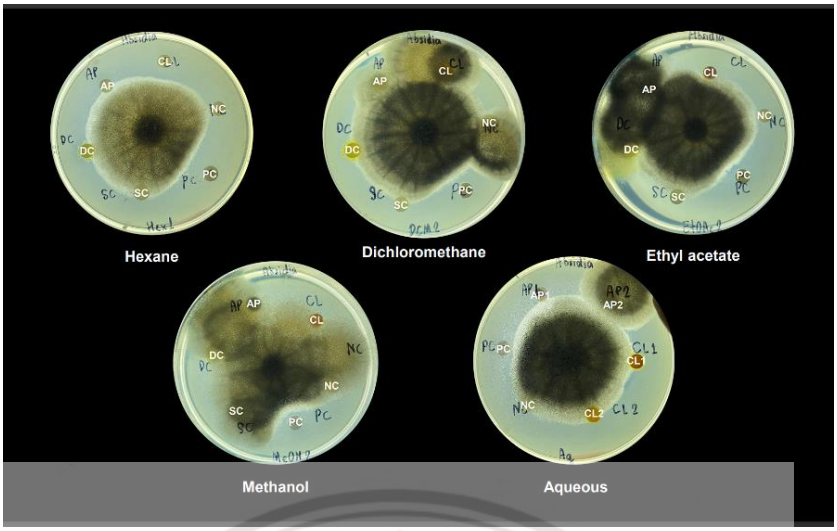
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Absidia* sp. ดังแสดงในภาพ 68 พบว่าเชื้อ Absidia sp. ใช้เวลา 5 วันในการเจริญเติบโตจนถึง negative control ซึ่งมีค่า Inhibition zone และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 14 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้จากสารสกัดหยาบ hexane ซึ่งมีค่า inhibition zone เท่ากับ 8.01 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบ ethyl acetate มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Absidia sp. ได้หากเพิ่มปริมาณของสารหรือเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดหยาบจากผงฟ้าทะลายโจรไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ทั้งในสารสกัดหยาบ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ส่วนผลการทดสอบสารในชั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัดจากผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ ใน aqueous ของ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากการสกัดด้วย hexane และ dichloromethane

ตาราง 14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Absidia* sp.

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Absidia* sp. (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	0	0	0	Inactive
	CL	16.02	0	8.01	Active
DCM	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
EtOAc	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
MeOH	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	13.9	0	6.95	Active
	AP2	0	0	0	Inactive
	CL1	8.26	0	4.13	Active
	CL2	0	0	0	Inactive
Hex	PC	18.04	20.84	19.44	Active
DCM	PC	12.94	9.60	11.27	Active
EtOAc	PC	11.3	9.52	10.41	Active
MeOH	PC	9.52	12.18	10.85	Active
Aqueous	PC	12.68	14.96	13.82	Active

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



ภาพ 68 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Absidia* sp. ของการทดสอบวันที่ 4

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

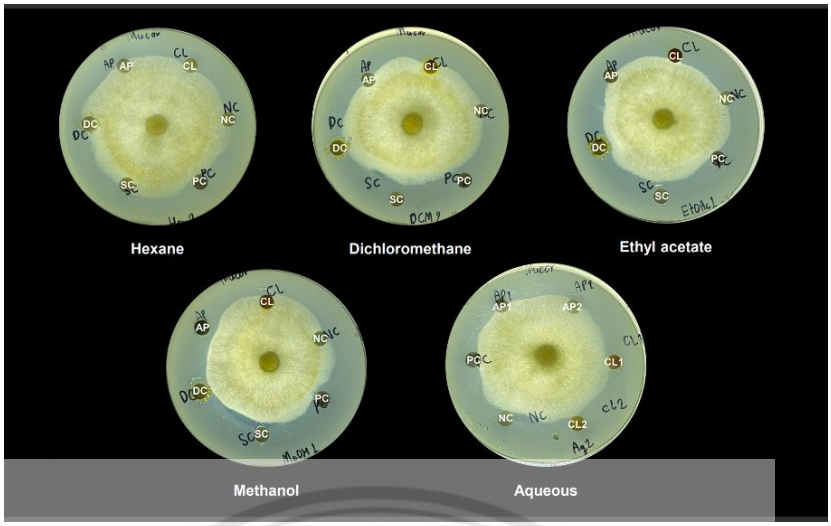
4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp.

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp. ดังแสดงในภาพ 69 พบว่าเชื้อ *Mucor* sp. ใช้เวลา 4 วันในการเจริญเติบโตจนถึง negative control ซึ่งมีค่า Inhibition zone และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 15 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 3.26 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้หากเพิ่มปริมาณของสารหรือเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบในสารสกัดหยาบ hexane และ methanol จากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 6.35 และ 8.95 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบสารสกัดในชั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัดหยาบของผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ได้

ตาราง 15 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Mucor* sp.

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Mucor* sp. (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	12.7	0	6.35	Active
	CL	12.92	0	6.46	Active
DCM	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
EtOAc	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
MeOH	AP	17.9	0	8.95	Active
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	0	0	0	Inactive
	AP2	0	0	0	Inactive
	CL1	0	0	0	Inactive
	CL2	0	0	0	Inactive
Hex	PC	12.76	0	6.38	Active
DCM	PC	0	9.86	4.93	Active
EtOAc	PC	0	9.9	4.95	Active
MeOH	PC	11.38	6.92	9.15	Active
Aqueous	PC	6.02	0	3.01	Active

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



ภาพ 69 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Mucor* sp. ของการทดสอบวันที่ 4

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

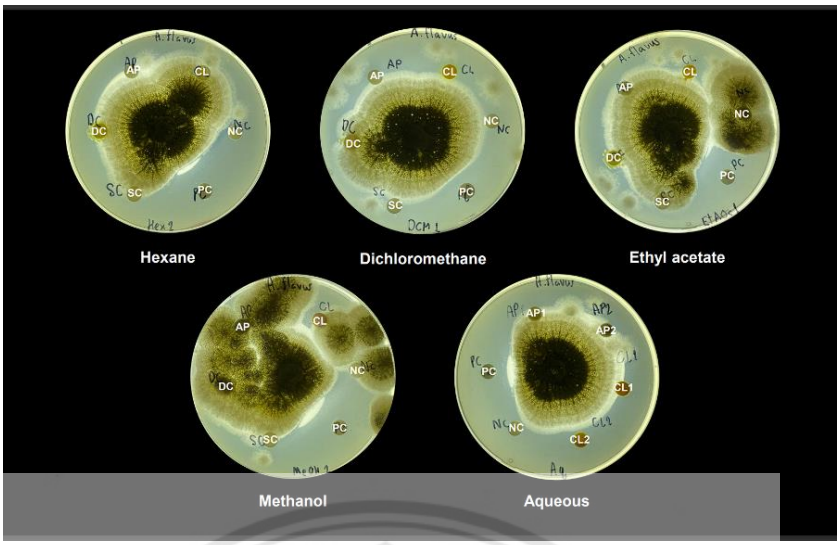
4.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus flavus* ดังแสดงในภาพ 70 พบว่าเชื้อ *Aspergillus flavus* ใช้เวลา 4 วัน ในการเจริญเติบโตจนถึง negative control และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 16 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ hexane และ ethyl acetate จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้มีค่า inhibition zone เท่ากับ 5.30 และ 9.34 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบ ethyl acetate จากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Absidia* sp. ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 8.51 มิลลิเมตร ส่วนการทดสอบสารสกัดในชั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัดหยาบผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้

ตาราง 16 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Aspergillus flavus* (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	0	0	0	Inactive
	CL	10.60	0	5.30	Active
DCM	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
EtOAc	AP	0	17.02	8.51	Active
	CL	8.58	10.10	9.34	Active
MeOH	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	0	0	0	Inactive
	AP2	0	0	0	Inactive
	CL1	0	0	0	Inactive
	CL2	0	0	0	Inactive
Hex	PC	21.58	22.54	22.06	Active
DCM	PC	14.96	20.60	17.78	Active
EtOAc	PC	23.60	22.80	23.20	Active
MeOH	PC	20.02	27.94	23.98	Active
Aqueous	PC	19.92	20.66	20.29	Active

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



ภาพ 70 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Aspergillus flavus* ของการทดสอบวันที่ 5

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

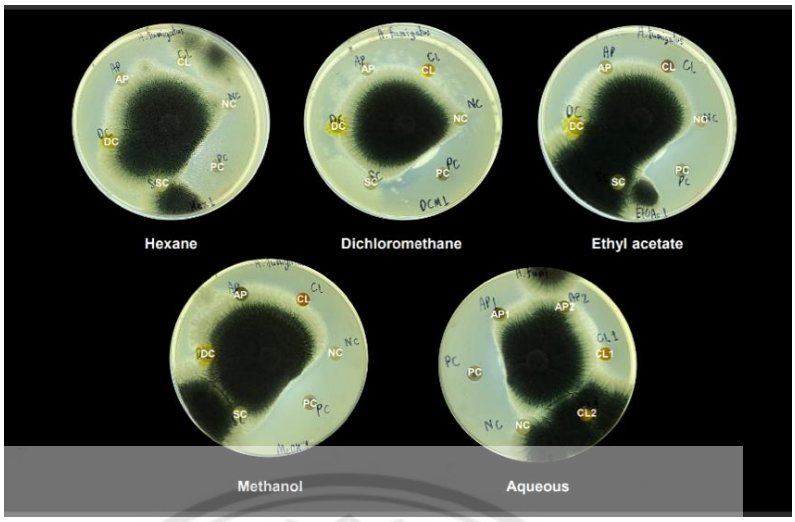
4.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *A. fumigatus* ดังแสดงในภาพ 71 พบว่าเชื้อ A. fumigatus ใช้เวลา 4 และ 5 วันในการเจริญเติบโตจนถึง negative control ซึ่งมีค่า Inhibition zone และการแปลผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 17 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.10 และ 3.49 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบ ethyl acetate มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้หากเพิ่มปริมาณของสารหรือเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบในสารสกัดหยาบจากผงฟ้าทะลายโจรไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้แต่สารสกัดหยาบ hexane และ ethyl acetate มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้หากเพิ่มปริมาณของสารหรือเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบใน การทดสอบสารชั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ใน aqueous ของฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย hexane กับ dichloromethane และ ethyl acetate กับ methanol

ตาราง 17 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone of *Aspergillus fumigatus* (มิลลิเมตร)			แปลผล
		P1	P2	ค่าเฉลี่ย	
Hex	AP	0	0	0	Inactive
	CL	9.30	14.90	12.10	Active
DCM	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	6.98	3.49	Active
EtOAc	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
MeOH	AP	0	0	0	Inactive
	CL	0	0	0	Inactive
Aqueous	AP1	0	15.16	7.58	Active
	AP2	0	16.54	8.27	Active
	CL1	0	0	0	Inactive
	CL2	0	0	0	Inactive
Hex	PC	22.30	21.12	21.71	Active
DCM	PC	22.26	16.50	19.38	Active
EtOAc	PC	22.46	23.82	23.14	Active
MeOH	PC	20.32	25.46	22.89	Active
Aqueous	PC	0	25.36	12.68	Active

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol, PC ; Positive control, NC ; Negative control, SC ; Solvent control, DC ; DMSO control, P1 ; การทดสอบชุดที่ 1, P2 ; การทดสอบชุดที่ 2, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol



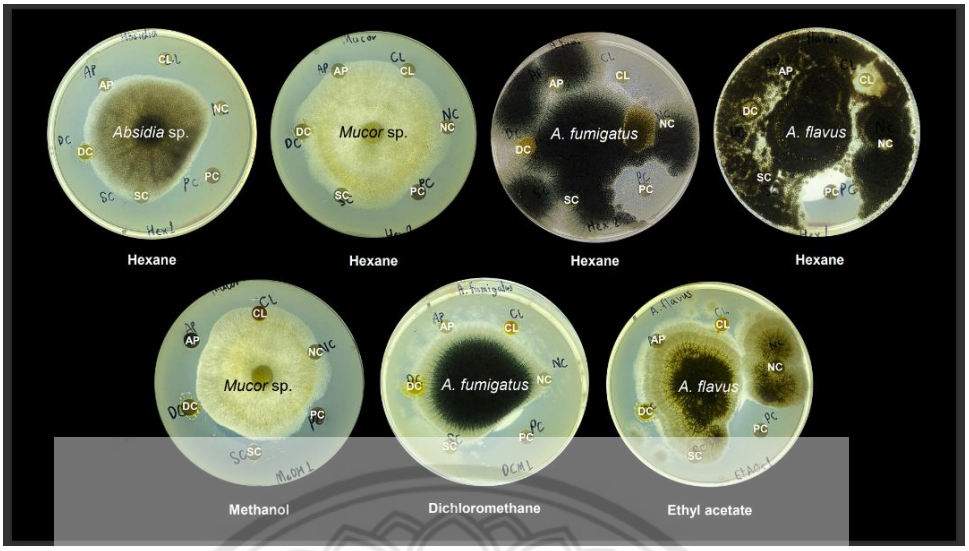
ภาพ 71 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรม ต่อเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ของการทดสอบวันที่ 5

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, AP1 ; ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, AP2 = ชั้น aqueous ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, CL1 = ชั้น aqueous ของสารสกัดขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Hexane และ Dichloromethane, CL2 = ชั้น aqueous ของสารขมิ้นชันจากการสกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol, NC ; Negative control, PC ; Positive control, SC ;Solvent control

ตาราง 18 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากองค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบโดยวิธี disc diffusion

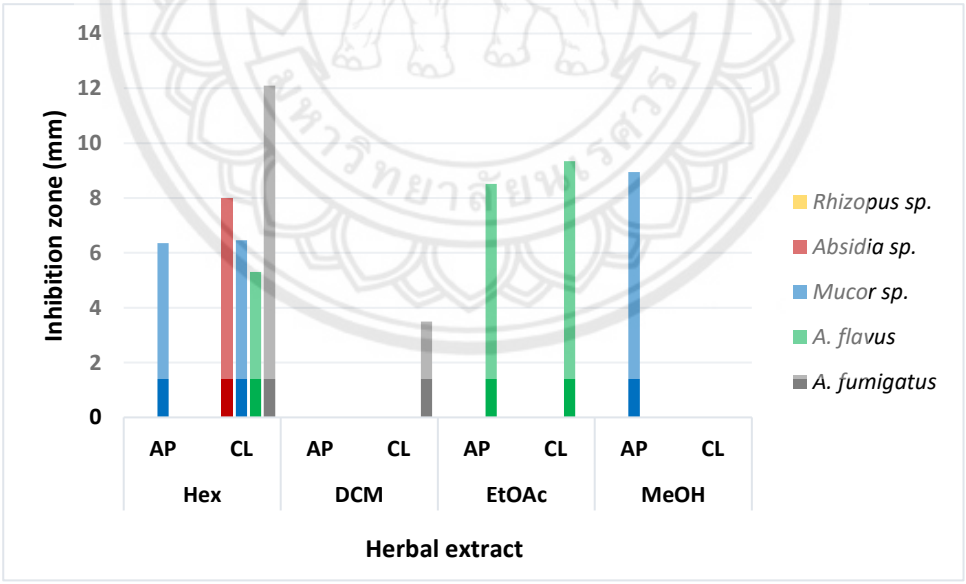
ตัวทำละลาย	สมุนไพร	Inhibition zone (มิลลิเมตร)				
		Rhizopus sp.	*Absidia* sp.	*Mucor* sp.	*A. flavus*	***A. fumigatus***
Hex	AP	0	0	6.35	0	0
	CL	0	8.01	6.46	5.3	12.1
DCM	AP	0	0	0	0	0
	CL	0	0	0	0	3.49
EtOAc	AP	0	0	0	8.51	0
	CL	0	0	0	9.34	0
MeOH	AP	0	0	8.95	0	0
	CL	0	0	0	0	0

หมายเหตุ : AP ; Andrographis paniculata, CL ; Curcuma longa, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 72 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อราก่อโรคโดยวิธี disc diffusion

หมายเหตุ : AP ; Andrographis paniculata, CL ; Curcuma longa, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol



ภาพ 73 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดผงฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันจากองค์การเภสัชกรรมที่สกัดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

หมายเหตุ : AP ; *Andrographis paniculata*, CL ; *Curcuma longa*, DI ; Deionized water, Hex ; Hexane, DCM ; Dichloromethane, EtOAc ; Ethyl acetate, MeOH ; Methanol

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ละลายในน้ำกลั่นและตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิส (Mucormycosis) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิส (Aspergillosis) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity

ผลการทดสอบพบว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่ทดสอบได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยผงขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้เพียง 4 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* ตัวทำละลายที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดของผงขมิ้นชันคือตัวทำละลาย ethyl acetate พบว่าเมื่อนำมาละลายผงขมิ้นชันให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดต่อเชื้อราก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 100 % และผงฟ้าทะลายโจรที่ละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดต่อเชื้อราก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *A. fumigatus* และ *A. flavus* เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 67.21 %

การสกัดสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิส และโรคแอสเปอร์จิลโลสิสด้วยวิธี partition method และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วที่แตกต่างกัน ได้แก่สารละลาย hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol แล้วทำการระเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เมื่อได้สารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้

จากการสกัดสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดหยาบ methanol จากขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุด มีน้ำหนักเท่ากับ 12.173 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับ 24.345 % สอดคล้องกับงานวิจัยของ Popuri และ Pagara ในปี 2013 ที่ศึกษาการสกัดสาร Curcumin จากรากของขมิ้นชันด้วยตัวทำละลาย acetone ethyl acetate ethanol methanol isopropanol และ hexane พบว่าตัวทำละลาย methanol สามารถสกัดสาร Curcumin ที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของขมิ้นชันได้ดีที่สุด แต่เนื่องจาก methanol สามารถละลาย Curcumin ได้ดีและมีจุดเดือดที่สูงจึงทำให้แยกตัวทำละลายออกได้ยาก ดังนั้นสารสกัดหยาบ methanol จึงมีความหนืด ไม่แห้งเหมือนสารสกัดตัวทำละลายอื่นๆ (92)

การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลาย methanol มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้สูงที่สุดเช่นเดียวกันโดยมีน้ำหนักเท่ากับ 9.122 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับ 18.243 % ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Farhana และคณะ ในปี 2022 ได้สกัดสารสำคัญจากรากฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ethanol และ methanol พบว่าตัวทำละลาย methanol มีปริมาณผลผลิตร้อยละสูงที่สุดเท่ากับ 12.6 % (90) และให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kumoro และ Hasan ในปี 2009 ได้สกัดสาร Andrographolide ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของใบฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี standard soxhlet method โดยใช้ตัวทำละลาย hexane petroleum ether ethyl acetate chloroform acetone ethanol และ methanol ซึ่งพบว่าตัวทำละลาย methanol สามารถสกัดสาร Andrographolide จากใบฟ้าทะลายโจรได้ดีที่สุด ได้ปริมาณผลผลิตร้อยละเท่ากับ 38.08 % (93)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ละลายด้วยตัวทำละลาย 1% DMSO ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบ 2 สายพันธุ์

การทดสอบสารสกัดหยาบ hexane จากผงขมิ้นชันให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุดจากเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das และ Bhatnagar ในปี 2020 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยสารสกัดขมิ้นชันและขิง โดยใช้ตัวทำละลาย hexane chloroform ethyl acetate และ methanol ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* พบว่าสารสกัด hexane มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกันโดยใช้ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 47.19 % (94)

การทดสอบสารสกัดหยาบ methanol จากผงฟ้าทะลายโจรให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด จากเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mucor* sp. ดีที่สุด มีค่า inhibition zone เท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chuku และคณะ ในปี 2020 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย ethanol และ methanol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. *A. niger A. flavus* และ *Mucor* sp. พบว่าสารสกัด methanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน (95)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทดสอบได้หากเพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มปริมาณของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบ hexane และ ethyl acetate จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 11.57 และ 5.49 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.13 มิลลิเมตร จึงเป็นการยืนยันได้ว่าหากเพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้ดียิ่งขึ้น โดยฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแปรตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นที่พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด ในขณะที่เมื่อนำผงผลิตภัณฑ์สมุนไพรมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันพบว่าสารละลาย hexane ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นได้มีการผสมตัวทำละลายลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะเป็นสารประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate แต่เมื่อทำการสกัดสารสำคัญให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ตัวทำละลาย hexane สามารถสกัดออกมาได้ดีกว่าจึงทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่า

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการใช้ตัวทำละลายเพียง 4 ชนิดในการสกัดสารสำคัญ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบนั้น aqueous ที่เหลือจากการสกัดยังมีฤทธิ์ใน

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ดังนั้น หากทำการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นเพิ่มเติมอาจจะสามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้มากขึ้น และจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมในครั้งนี้ที่พบว่า มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงสามารถนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปทำการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อที่จะใช้ในการศึกษาหายาต้านเชื้อราที่สกัดได้จากธรรมชาติต่อไปได้ และนอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมนอกจากจะสามารถรักษาผู้ป่วยโควิด-19 ได้แล้ว ยังเป็นการรักษาที่สามารถป้องกันการติดเชื้อราฉวยโอกาสที่อาจเกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยโควิด-19 ได้อีกด้วย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ละลายในน้ำกลั่นและตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ hexane dichloromethane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิส (Mucormycosis) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิส (Aspergillosis) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity เมื่อละลายผงผลิตภัณฑ์สมุนไพร ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นและสารละลายผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่ทดสอบได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร

การสกัดสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโครสิส และโรคแอสเปอร์จิลโลสิสด้วยวิธี partition method พบว่าสารสกัดหยาบ methanol จากผงขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุด มีน้ำหนักเท่ากับ 12.173 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับ 24.345 % รองลงมาคือ ethyl acetate มีน้ำหนักเท่ากับ 7.314 กรัม (14.628 %) และ dichloromethane มีน้ำหนักเท่ากับ 6.278 กรัม (12.555 %) ตามลำดับ การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลาย methanol มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้สูงที่สุดเช่นเดียวกันโดยมีน้ำหนักเท่ากับ 9.122 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับ 18.243 % รองลงมาคือ ethyl acetate มีน้ำหนักเท่ากับ 7.152 กรัม (14.303 %) และ dichloromethane มีน้ำหนักเท่ากับ 1.099 กรัม (2.197 %) ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ละลายด้วยตัวทำละลาย 1%DMSO ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบ hexane จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่ฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เพียง 2 สายพันธุ์