การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก

ณัฏฐา เชิดชูธีรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

DEVELOPMENT OF ORAL PASTE FROM *TERMINALIA CATAPPA* L. LEAVES EXTRACT FOR ORAL CANDIASIS

NATTA CHOEDCHUTIRAKUL

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements

for Master of Thai Traditional Medicine Program in Thai Traditional Pharmacy

Academic Year 2019

Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	**การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง *(Terminalia catappa L.)* สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก**
ชื่อผู้วิจัย	**ณัฏฐา เชิดชูธีรกุล**
สาขาวิชา	**เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เธียร ธีระวรวงศ์**

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ดร.คณกร สว่างเจริญ)

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี หิรัญพานิช ซาโตะ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เธียร ธีระวรวงศ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะ วงศ์ญาณิน)

..... กรรมการและเลขานุการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประไพ ศรีดามา)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชื่อเรื่อง **การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง *(Terminalia catappa* L.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก**

ชื่อผู้วิจัย **ณัฏฐา เชิดชูธีรกุล**

สาขาวิชา **เภสัชกรรมไทย**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร**

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เธียร ธีระวรวงศ์**

ปีการศึกษา **2562**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง 2) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฤทธิ์ฆ่าเชื้อรากลุ่มแคนดิดาของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง และ 3) พัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางสำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก มีวิธีการดังนี้ ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีการสังเกตการเกิดสีและการตกตะกอน และเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา ด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Broth micro dilution และพัฒนาตำรับยาโดยการศึกษาความคงตัวด้วยวิธี Freeze-thaw cycling สถิติที่ใช้ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ One way ANOVA

ผลการวิจัยพบว่า

1. ใบหูกวางจำนวน 100 กรัม เมื่อนำมาสกัดได้สารสกัดหยาบ ได้ผลผลิต ร้อยละ 18.23 พบสารแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบสาร Gallic acid และ Quercetin

2. สารสกัดใบหูกวางมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. glabrata*, *C. kefry* และ *C. krusei* มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเท่ากับ 1.36 ± 0.11, 1.10 ±0.05 และ 1.03±0.30 mm ตามลำดับ และมีค่า MIC โดย *C. glabrata* เท่ากับ 7.81 mg/ml, *C. kefyr* และ *C. tropicalis* เท่ากับ 31.25mg/ml และ *C. albican* และ *C. krusei* มีค่าเท่ากับ 62.50mg/ml ส่วนค่า MFC ของ *C. glabrata* และ *C. kefyr* เท่ากับ 125mg/ml ส่วน *C. albican*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* เท่ากับ >125mg/ml

3. สูตรตำรับยาป้ายปาก Glycerin 7%, Sodium benzoate 0.1%, Gelatin 7 %, Pectin 3% และ Carboxy methyl cellulose 5 % เป็นตำรับที่มีความหนืดและความเป็นกรด-ด่างเหมาะสมมากที่สุด

คำสำคัญ : ใบหูกวาง, องค์ประกอบทางพฤกษเคมี, เชื้อราแคนดิดา, ตำรับยาป้ายปาก

Title **Development of oral paste from *Terminalia catappa* Linn. leaves extract for oral candidiasis**

Author **Natta Choedchutirakul**

Program **Thai Traditional Pharmacy**

Major Advisor **Assistant Professor Dr. Pilanthana Lertsatitthanakorn**

Co- advisor **Assistant Professor Dr. Thien Thiraworawong**

Academic Year **2019**

ABSTRACT

This study objectives were 1) Phytochemical screening of *Terminalia Catappa* Linn. red leaves extract 2) Assayed in addition, antifungal activity of *Terminalia Catappa* Linn. red leaves 3) Development of oral paste from *Terminalia Catappa* Linn. red leaves for oral candiasis. There are methods of phytochemical as observe color changes reaction, precipitation and thin layer chromatography (TLC). The methods of antifungal activity were agar disc diffusion and broth micro dilution. The development of oral paste were find stability by freeze-thaw cycling. The statistics used in data analysis were mean, standard deviation and one way ANOVA.

The results were found that.

1. 100 g. of *Terminalia Catappa* Linn. red leaves extracted would have got crude extract 18.23%, *Terminalia Catappa* Linn. red leaves contained the anthraquinones, terpenoids flavonoids, saponins and tannins. Thin layer chromatography revealed the gallic acid and quercetin in the extract.

2. Antifungal activity study of the extract can against *C. glabrata*, *C. Kefry* and *C. Krusei*, respectively, showed that the mean inhibition zone were 1.36±0.11, 1.10±1.05 and 1.03±0.30 mm respectively. MIC of *C. glabrata* was 7.8mg/ml, *C. kefyr* and *C. tropicalis* were 31.25mg/ml, *C. albican* and *C. krusei* were 62.50mg/ml while the MFC of *C. glabrata* and *C. kefyr* were 125, *C. albican*, *C. krusei* and *C. tropicalis* were >125 mg/ml.

3. The oral paste included with Glycerin 7%, Sodium benzoate 0.1%, Gelatin 7 %, Pectin 3% and Carboxy methyl cellulose 5 % were have viscosity and pH of the most suitably of oral paste.

Keywords : *Terminalia Catappa* Linn., Phytochemicals, *Candida* spp., Oral paste

กิตติกรรมประกาศ

การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดใบหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากศาสตราจารย์ ดร.วงศ์สถิต ฉั่วกุล ที่ได้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของใบหูกวาง และคณะอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิลันธนา เลิศสถิตธรกร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เธียร ธีระวรวงศ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำแนวทางการดำเนินงาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของงานวิจัยนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ได้ให้ความรู้ฝึกสอนปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ อีกทั้งการเอื้ออำนวยสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อเก็บข้อมูลการวิจัย ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้า และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในงานวิจัยชิ้นนี้ที่คอยสนับสนุน เสนอแนะแนวทาง ตลอดจนคอยเป็นกำลังใจเสมอมา

คุณค่าความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจศึกษาค้นคว้าเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา ต่อยอดการใช้สมุนไพรไทยให้เป็นที่ประจักษ์ และก่อให้เกิดประโยชน์แก่สังคมไทย ต่อไป

ณัฏฐา เชิดชูธีรกุล

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
	สมมุติฐานของการวิจัย	4
	ขอบเขตการวิจัย	5
	ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	6
	นิยามศัพท์เฉพาะ	6
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	8
บทที่ 2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	9
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหูกวาง	9
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการสกัดสาร	11
	ความรู้เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีเบื้องต้น	18
	ความรู้เกี่ยวกับเชื้อราแคนดิดา *(Candida* spp.*)*	27
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา	35
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยาป้ายปาก	39
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	43

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 3	**การดำเนินการวิจัย**	49
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	49
	ขั้นตอนการวิจัย	52
	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	58
บทที่ 4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	59
	ผลการตรวจสอบลักษณะใบหูกวางสีแดง	60
	ผลการเตรียมสารสกัดหยาบ	60
	การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	61
	ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	63
	การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.)	67
บทที่ 5	**สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ**	69
	สรุปผลการวิจัย	69
	อภิปรายผล	71
	ข้อเสนอแนะการนำงานวิจัยไปใช้	73
	ข้อเสนอแนะครั้งต่อไป	73
บรรณานุกรม		74
ภาคผนวก		81
	ภาคผนวก ก การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp. จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	82
	ภาคผนวก ข ตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	86
	ภาคผนวก ค หนังสือตอบรับบทความ	88
ประวัติผู้วิจัย		90

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การจำแนกความเข้มข้นของตัวทำละลาย	14
2.2	การแปรผลการทดสอบสารกลุ่ม Tannin และ Phenolic compounds	22
2.3	ชนิดของ *Candida* ที่ก่อโรค Candidiasis	28
2.4	สีโคโลนีของ *Candida* species บน CHROM agar *Candida*	34
3.1	ส่วนประกอบของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	57
4.1	ปริมาณและลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	60
4.2	การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากจากใบหูกวาง	61
4.3	ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp.ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง	63
4.4	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida* spp.	65
4.5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถฆ่าเชื้อ *Candida* spp.	66
4.6	ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางก่อนสภาวะเร่ง	67
4.7	ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางหลังสภาวะเร่ง	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	กรอบแนวคิดในการทำวิจัย	8
2.1	ใบหูกวาง	10
2.2	การหาค่า R_f ของโครมาโทแกรม	27
2.3	เชื้อรา *Candida* ที่มีลักษณะของ Budding yeast และ Pseudohyphae	28
2.4	ลิ้นของผู้ป่วย Oropharyngeal candidiasis พบรอยโรคเป็นปื้นขาวที่ลิ้น	31
2.5	การอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Broth microdilution	38
2.6	ขั้นตอนการหาค่า MIC และ MFC	38
4.1	สารสกัดหยาบใบหูกวาง	60
4.2	โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) สารสกัดใบหูกวาง ภายใต้ (ก) แสงขาว (ข) แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366nm (ค) แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254nm	62
4.3	ผล Disc diffution ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *Candida glabrata*	65
4.4	ค่า MIC ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *Candida* spp.	66
6.1	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. albican*	82
6.2	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*	82
6.3	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Krusei*	83
6.4	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*	83
6.5	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Kefry*	85
6.6	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Krusei*	85
6.7	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*	85
6.8	ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Kefry*	86
6.9	ตำรับยาป้ายปากก่อน Heating cooling cycle	86
6.10	ตำรับยาป้ายปากหลัง Heating cooling cycle	86

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยถือได้ว่าเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรทางธรรมชาติอย่างมากประเทศหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรด้านสมุนไพรที่มีอยู่ในทุกภูมิภาคของประเทศ โดยได้มีการนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในเรื่องของการทำอาหารเพื่อการรับประทานและการนำไปใช้เพื่อการรักษาโรคภัยไข้เจ็บ โดยองค์ความรู้หรือวิธีการใช้สมุนไพรเหล่านั้นได้รับการสืบทอดต่อกันมาจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง ตั้งแต่อดีตโบราณจนถึงปัจจุบัน จึงถือได้ว่าองค์ความรู้เหล่านั้นเป็นมรดกที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง ปัจจุบันความรู้ต่าง ๆ เหล่านั้นเริ่มมีการพิสูจน์ศึกษาเพื่อหาหลักฐานเชิงประจักษ์ของการใช้สมุนไพรในการดูแลสุขภาพ โดยใช้กระบวนการตามหลักวิทยาศาสตร์ด้วยการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร และนำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการและเชิงคลินิกเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่าง ๆ ของสมุนไพร (ธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร, 2559, น.3)

ปัจจุบันการนำสมุนไพรมาพัฒนาต่อยอดเป็นเรื่องที่ได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐอย่างจริงจัง มีการสนับสนุนเชิงนโยบายโดยได้กำหนด แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564 และมีคณะกรรมการนโยบายสมุนไพรแห่งชาติพร้อมคณะอนุกรรมการขับเคลื่อนแผนแม่บท อีกจำนวน 6 คณะ ดำเนินงานแบบบูรณาการร่วมกันระหว่างหน่วยงานภาครัฐ ทั้งสิ้น 9 กระทรวง โดยได้กำหนดวิสัยทัศน์ว่า “สมุนไพรเพื่อความมั่นคงทางสุขภาพและความยั่งยืนของเศรษฐกิจไทย” มีเป้าหมายในการเพิ่มขีดความสามารถของประเทศอย่างครบวงจร ทั้งผลิตผลของสมุนไพร อุตสาหกรรม และการตลาดสมุนไพรในระดับสากล การส่งเสริมการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคและการสร้างเสริมสุขภาพ ตลอดจนการสร้างเสริมความเข้มแข็งของการบริหารและนโยบายภาครัฐ (คณะอนุกรรมการขับเคลื่อนภารกิจของคณะกรรมการนโยบายสมุนไพรแห่งชาติ, 2562, น.1)

เชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.) เป็นเชื้อราประเภทยีสต์ ที่ปกติอาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์โดยไม่ก่อเกิดอันตราย แต่เมื่อร่างกายอ่อนแอ ภูมิต้านทานลดลง เชื้อเหล่านี้มักจะก่อให้เกิดปัญหาตามระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ถือเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยลำดับแรก ๆ และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแทรกซ้อนของผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่มีโรคประจำตัวเรื้อรัง หรือหลังการผ่าตัดช่องท้อง อาการทางคลินิกที่พบบ่อยที่สุดคือ Candidiasis ที่ผิวหนัง Oropharyngeal และ

Vulvovaginitis ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ Candidiasis ได้แก่ เม็ดเลือดขาวต่ำ เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil สูญเสียหน้าที่ และการหยุดการทำงานของเยื่อเมือก และการใส่ท่อภายในหลอดเลือดดำ มีรายงานข้อมูลทางการระบาดวิทยาว่า เชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อราจากโรงพยาบาลมากถึงร้อยละ 75-88 และมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 40 (Christophe & Bougnoux, 2014, p.652-664) โดยเชื้อรากลุ่มแคนดิดาที่สำคัญในการก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุดคือ *Candida albicans* โดยคิดเป็นร้อยละ 63.8 ของการติดเชื้อรากลุ่มแคนดิดาทั้งหมด แต่ปัจจุบันเริ่มมีอุบัติการณ์การติดเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ *Candida albicans* (Non-Albicans Candida: NAC) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีสัดส่วนของเชื้อราชนิด NAC ในหมู่ *Candida* ที่แยกได้จากผู้ป่วย Candidiasis มีจำนวนเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 - 40 และมีข้อมูลรายงานทางคลินิกที่เก็บรวบรวมผลการค้นพบเชื้อราชนิด NAC จากโรงพยาบาลทั่วโลก ได้แก่ เชื้อรา *Candida glabrata* (11.3%) *Candida tropicalis* (7.2%) *Candida parapsilosis* (6.0%) และ *Candida krusei* (2.4%) (Papon, Courdavault, Clastre, & Bennett, 2013, p.1-4)

การรักษาโรคติดเชื้อราแคนดิดาในช่องปาก ปัจจุบันมียารักษาที่มีการนิยมใช้มากที่สุด คือ ยา Gentian violet โดยในการรักษาจะใช้ Gentian violet ในความเข้มข้น 1% มาหยดใส่บริเวณที่มีการติดเชื้อราหรือแผลที่เกิดขึ้นในช่องปาก โดยเป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์ว่าวิธีการรักษานี้เป็นการรักษาเฉพาะสำหรับ Oropharyngeal candidiasis ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี แต่ผลเสียของการใช้ยา Gentian violet ใส่แผลในช่องปากนั้นคือทำให้เกิดรอยด่างในช่องปากอย่างรุนแรง และติดสีม่วงจากยาส่งผลให้ภาพลักษณ์ไม่สวยงาม ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีการทดลองใช้ Gentian violet ในความเข้มข้นที่ระดับลดลง แต่ปัญหาจากการติดสีม่วงไม่ได้ลดลงไปด้วย (Mukherjee, et.al., 2017, p.81-88) นอกจากนี้ยังนิยมใช้ยา Nystatin ในการกลั้วหรืออมไว้ในปาก แต่ยาชนิดนี้มีรสขม จึงไม่เป็นที่พอใจสำหรับผู้ใช้ และเมื่อใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เชื้อดื้อยา และติดเชื้อซ้ำซ้อนได้ (อรนาฎ มาตังคสมบัติ, 2549, น.64-75)

สำหรับองค์ความรู้ด้านการแพทย์แผนไทยสมุนไพรที่มีสรรพคุณ ในการช่วยฆ่าเชื้อโรคและสมานแผลได้เป็นอย่างดี คือสมุนไพรที่มีรสฝาด (อุบลวรรณ สุวรรณภูสิทธิ์ และนิศานาถ แก้ววินัด, 2559, น.29) เนื่องจากสมุนไพรที่มีรสฝาด มีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบ จะจับกับโปรตีนที่สร้างการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อเข้าด้วยกัน จึงใช้เป็นยาสมานแผล เพิ่มเกล็ดเลือดบริเวณแผล และป้องกันการติดเชื้อ (Gowan, 2017, Online) ซึ่งปัจจุบันสมุนไพรรสฝาดหลายชนิดได้มีการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์จนได้ข้อมูลเชิงประจักษ์แล้วว่าสามารถต้านเชื้อราได้ เช่น กระชาย ขมิ้น หัวแห้วหมู เปลือกมังคุด เมล็ดมะรุม ไพล เป็นต้น (วาสินี ธรรมสถิต, สุจิตรา สุคนธมัต และดุษณี ธนะบริพัฒน, 2560, น.1-14) แต่ก็ยังมีสมุนไพรพื้นบ้านที่มีรสฝาดอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้

ทำการศึกษาในเรื่องของฤทธิ์ต้านเชื้อรา เช่น เปลือกต้นโกงกาง ใบบุนนาค ใบพิกุลป่า เปลือกแค สบู่ดำ และใบของต้นหูกวาง (ชวลิต โฆษิตนิธิกุล, 2559, น. 95-103)

หูกวาง (*Terminalia catappa* L.) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีรสฝาด ภูมิปัญญาชาวบ้านมีการใช้ประโยชน์จากใบหูกวางในการเลี้ยงสัตว์ โดยนำเอาใบหูกวางสีแดงแห้งแช่ในขวดหมักปลากัด เพื่อให้ปลากัดมีผิวสีที่สวยงาม ช่วยรักษาแผลบริเวณผิวหนัง และช่วยป้องกันโรคให้ปลามีสุขภาพแข็งแรง (พรพิมล พิมลรัตน์, นิวุฒิ หวังชัย, สุพันธ์ณี สุวรรณภักดี และพัชราวลัย ศรียะศักดิ์, 2560, น.10) หูกวางเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย อยู่ในสกุล Combretaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบหูกวาง จัดเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ ลำต้นเป็นรูปกรวยตั้งตรงและสมมาตร สูง 35 เมตร ยอดเป็นพุ่มหนาแตกกิ่งออกเป็นชั้นๆ ใบมีขนาดใหญ่และยาว เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่กลับ หรือรูปไข่แกมวงรี มีขนาดยาว 15-25 เซนติเมตร กว้าง 10-14 เซนติเมตร โคนใบสอบ มีดอกเพศผู้และเพศเมียในต้นเดียวกัน ดอกเป็นสีขาวขนาด 1 เซนติเมตร ผลเดี่ยว เมื่อสุกเมล็ดข้างในสามารถรับประทานได้ ขนาดยาว 5-7 เซนติเมตร กว้าง 3-5.5 เซนติเมตร (Anand, Divya, & Kotti, 2015, p.93-98) โดยในใบหูกวาง 100 กรัม จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญได้แก่ Flavonoids (4.66 ± 0.91), Tannins (0.86 ± 0.01), Carotene (4.06 ± 0.10), Glycosides (4.52 ± 0.27), Alkaloids (22.40 ± 2.60), Steroids (24.30±2.35), Saponins (6.80 ± 1.09), Phenols (16.70 ± 2.65) และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (18.60 ± 2.41) (Offor, Ugwu, Aja, & Igwenyi, 2015, p.9-11)

การศึกษาข้อมูลฤทธิ์การต้านเชื้อของใบหูกวางนั้นได้มีนักวิจัยดำเนินการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดใบหูกวางสีน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 % ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า มีค่า Inhibition zone เท่ากับ 1.73 ถึง 9.06 mm และ 1.83 ถึง 6.5 mm ตามลำดับ (Allyn, Kusumawati, & Nugroho, 2018, Online) การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วย เอทานอล เมทานอล และน้ำในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด พบว่า สารสกัดใบหูกวางมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เท่านั้น มีค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 10, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (กานต์รวี บำรุงเชาว์เกษม, 2561, น.4-5) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหูกวาง พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*) กลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes* และ *S. epidermidis*) และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นอับชื้น (G1A, G1B, G1F, G6E, G6N, G6S, G4D, G10L, และ G2J) ได้ทั้ง 3 กลุ่ม อยู่ในช่วง 8-14 mm และ 24 mm โดยพบว่าสารสกัดในชั้นน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P.acnes* ได้ดีที่สุด โดยมีโซนการยับยั้งอยู่ที่ 24 mm เชื้อ *E.coli* และ *S. aureus* มีโซนการยับยั้ง

อยู่ในช่วง 10-14 mm เชื้อ *S. epidermidis* มีโซนการยับยั้ง อยู่ในช่วง 11-12 mm เชื้อทำให้เกิดกลิ่นอับโซนการยับยั้งอยู่ในช่วง 9-14 mm (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2561, บทคัดย่อ)

จากความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาดังกล่าว ประกอบกับการทบทวนวรรณกรรม จะเห็นได้ว่ามีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียของใบหูกวางไว้อย่างชัดเจน แต่การเก็บข้อมูลที่สำคัญสำหรับฤทธิ์การต้านเชื้อราชนิดต่าง ๆ ยังไม่พบรายงานผลการวิจัย ทำให้ผู้วิจัยจึงตระหนักถึงความสำคัญและความจำเป็นที่จะนำใบหูกวางสีแดงที่ให้สารแทนนินมากกว่าใบหูกวางสีอื่น (อรัญญา พลพรพิสิฐ, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ, วีณา เคยพุดซา และ ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์, 2549, น.5) เนื่องจากสารแทนนินมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Adnan et al., 2017, Abstract) มาทำการศึกษาวิจัยเรื่อง การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดใบหูกวาง สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์การต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดาจากสารสกัดใบหูกวาง นอกจากนี้ยังสนใจที่จะต่อยอดฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา โดยการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาป้ายปากต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา โดยมุ่งหวังให้ผลการศึกษานี้เป็นทางเลือกเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร และส่งเสริมให้เกิดการผลิตผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรไทยในเชิงพาณิชย์เพื่อการจัดจำหน่ายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางด้วยวิธีสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

3. เพื่อพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) สำหรับ โรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก

สมมุติฐานของการวิจัย

1. สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง มีสารอัลคอลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอนทราควิโนน (Antraquinone) แทนนิน (Tanin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiacglycoside) เป็นองค์ประกอบ

2. สารสกัดหยาบจากใบหูกวางสามารถต้านเชื้อรา *Candida.* spp ได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ด้วยวิธีปฏิกิริยาการเกิดสี ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ได้แก่ อัลคอลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอนทราควิโนน (Antraquinone) แทนนิน (Tanin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiacglycoside) และการทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ได้แก่ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid) และเคอซิติน (Quercitin) และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.)

2. ขอบเขตด้านประชากร

2.1 ใบหูกวางแก่จัดที่มีสีแดง ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561

2.2 เชื้อจุลชีพกลุ่ม *Candida* spp. ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธ์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045

3. ขอบเขตด้านสถานที่ และระยะเวลา

ห้องปฏิบัติการเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา โดยทำการศึกษาในระหว่างเดือน ตุลาคม 2561– พฤษภาคม 2563

4. ขอบเขตด้านตัวแปรที่ศึกษา

4.1 การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ด้วยวิธีการสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี

ตัวแปรต้น ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ตัวแปรตาม ได้แก่ อัลคอลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอนทราควิโนน (Antraquinone) แทนนิน (Tanin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiacglycoside)

ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ปริมาณของสารทดสอบ อุณหภูมิ

4.2 การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ตัวแปรต้น ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ตัวแปรตาม ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid) และ เคอซิติน (Quercitin)

ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ตัวทำละลาย ขนาดของแผ่น TLC อุณหภูมิ

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.)

ตัวแปรต้น ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ตัวแปรตาม ได้แก่ การเจริญเติบโตของเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.)

ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ขนาดของจาน/หลอดเลี้ยงเชื้อ

4.4 ขอบเขตด้านตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อรา

ตัวแปรต้น ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ตัวแปรตาม ได้แก่ คุณภาพของจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางได้แก่ ลักษณะทั่วไป ความเป็นกรด-ด่าง ความคงสภาพ และความหนืดของผลิตภัณฑ์

ตัวแปรควบคุม ได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลา

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของใบหูกวาง

2. ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.)

3. ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์การต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

4. ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่าง ๆ จากใบหูกวาง ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน เพื่อเพิ่มมูลค่าของใบหูกวาง ส่งเสริมการปลูกของเกษตรกรและเพิ่มมูลค่าของผลิตผลจากใบหูกวาง

นิยามศัพท์เฉพาะ

ใบหูกวาง หมายถึง ใบของพืชไม้ยืนต้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Terminalia catappa* Linn. ที่มีใบแก่สีแดงสด ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561

สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากใบหูกวาง ที่ได้จากกระบวนการโดยใช้วิธีการหมัก (Maceration) ด้วยเอทานอล (Ethanol 95 %) และ นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) จนมีลักษณะข้นเหนียว

การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) หมายถึง การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีปฏิกิริยาการเกิดสี และการทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยมีการศึกษาดังนี้

1. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีปฏิกิริยาการเกิดสี โดยทำการทดสอบเพื่อหาสารสำคัญ ได้แก่ อัลคอลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอนทราควิโนน (Antraquinone) แทนนิน (Tanin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiacglycoside)

2. การทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยทำการทดสอบกลุ่มสารมาตรฐาน ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid) และ เคอซิติน (Quercitin)

เชื้อราแคนดิดา หมายถึง เชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง ประเทศไทย ได้แก่ *Candida albican*s ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045

ฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดา หมายถึง การหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.) และการทำลายการดำรงชีวิตไม่ให้ขยายพันธุ์ได้อีก โดยในการวิจัยนี้ใช้วิธี Disc diffusion method และวิธี Broth microdilution โดยแต่ละวิธีมีการศึกษาดังนี้

1. วิธี Disc diffusion method หมายถึง การนำแผ่น Paper disc ที่มีสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.) โดยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราในปริมาณ ที่เหมาะสม เพื่อสังเกตการณ์ยับยั้งเชื้อจาก Zone of inhibition หรือ Clear zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น Paper disc

2. วิธี Broth microdilution หมายถึง การนำสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.) โดยหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเชื้อราในปริมาณ ที่เหมาะสม เพื่อสังเกตการณ์การเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และนำความเข้มข้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจากค่า MIC มาทดสอบโดยการหยดลงบนอาหารแข็ง เพื่อสังเกตการณ์การเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วหาค่า Minimum fungicidal concentration (MFC)

ผลิตภัณฑ์ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ยาป้ายปากที่ได้จากการสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่มีส่วนประกอบของสารสกัดหยาบจากจากใบหูกวางเข้มข้น 125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (12.5%), Glycerin (7%) Sodium benzoate (0.1%), Pectin (5,10,15%), Gelatin (7%), Carboxy methyl cellulose (CMC) (5,10,15%) และ Purified water (63.4, 53.4, 43.4%)

คุณภาพผลิตภัณฑ์ หมายถึง คุณภาพด้านกายภาพได้แก่ ลักษณะทั่วไป ความเป็นกรด-ด่าง ความคงสภาพ และความหนืดของผลิตภัณฑ์

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหูกวาง
2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการสกัดสาร
3. ความรู้เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีเบื้องต้น
4. ความรู้เกี่ยวกับเชื้อราแคนดิดา *(Candida* spp.*)*
5. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา
6. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยาป้ายปาก
7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหูกวาง

1. ข้อมูลทั่วไป (กานต์รวี บำรุงเชาว์เกษม, 2561, น.8-9)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Terminalia catappa* Linn.

วงศ์ : COMBRETACEAE

ชื่อสามัญ (ไทย) : โคน (นราธิวาส), ดัดมือ ตัดมือ (ตรัง), ตาปัง (พิษณุโลก, สตูล), ตาแปห์ (มลายู - นราธิวาส), หลุมปัง (สุราษฎร์ธานี)

ชื่อสามัญ (อังกฤษ) : Singapore Almond, Tropical Almond, Umbrella Tree, Indian almond, Sea almond, Bengal Almond

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หูกวางเป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบขนาดกลาง ความสูงประมาณ 10–35 เมตร ยอดเป็นพุ่มหนา แตกกิ่งออกเป็นชั้นๆ ใบเดี่ยวรูปหอกปลายกว้างแหลมเป็นติ่งสั้นๆ โคนสอบ เนื้อใบหนา ท้องใบมีขนอ่อนๆ มีต่อมเล็กๆ 2 ขอบใบเรียบ ใบมีขนาดกว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 12-25 เซนติเมตร ผลรูปไข่เรียวยาวคล้ายอัลมอนด์ หัวท้ายแหลมเป็นพู สีเขียว แดง เหลือง ใบจะเริ่มผลัดเป็นสีแดงช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน เป็นไม้ทนแสงแดดได้ดี เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนและดินทราย ในประเทศไทยมักพบต้นหูกวางตามชายหาดหรือชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออกเฉียงใต้ (ตราด,ชลบุรี)

ภาคตะวันตกเฉียงใต้ (ประจวบคีรีขันธ์, กาญจนบุรี) และภาคใต้ (นราธิวาส, ตรัง,สุราษฎร์ธานี) (กานต์รวี บำรุงเชาว์เกษม, 2561, น.8-9)

3. ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

ใบหูกวาง ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางสมุนไพร โดยทั้งต้น ใช้เป็นยาสมาน แก้ไข้ท้องร่วง บิด ยาระบาย ขับน้ำนม แก้โรคคุดทะราด ราก ช่วยทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ เปลือก มีรสฝาด ใช้เป็นยาขับลม เป็นยาบำรุงเลือด ช่วยให้ประจำเดือนมาปกติ สมานแผล แก้ท้องเสีย ตกขาว โรคโกโนเรีย ใบ ใช้เป็นยาขับเหงื่อ แก้ทอนซิลอักเสบ แก้ซางในเด็ก โรคไขข้ออักเสบ โรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารและตับ ลดไข้ รักษาอาการปวดตามข้อ และโรคที่เกี่ยวกับข้อกระดูกต่าง ๆ นำมาบดทาพอกแผลลดอาการติดเชื้อ ช่วยสมานแผล ทำให้แผลหายเร็ว เป็นยาขับพยาธิ นำมาต้มอาบ ช่วยรักษาแผล รักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา ผสมน้ำมันจากเนื้อในเมล็ด รักษาโรคเรื้อน น้ำมันจากเมล็ด ใช้ทานวด ช่วยลดอาการปวด อาการฟกช้ำของกล้ามเนื้อ ทาหน้าอก แก้อาการเจ็บหน้าอก ทาไขข้อ และส่วนของร่างกายที่หมดความรู้สึก ผลใช้เป็นยาถ่าย (สราญจิตร อินอ่อน, 2560, น.14-15)

4. สารสำคัญ

องค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง ประกอบด้วย 1-degalloyl-eugeniin, 2,3- (4,4 ', 5,5', 6,6'- hexahydroxy-diphenoyl) - glucose, chebulagic acid, gentisic acid, corilagin, geraniin, granatin B, kaempferol, punicalagin, punicalin, quercetin, tercatain, tergallagin, terflavin A และ terflavin B. เมล็ด ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, ไขมัน, ไฟเบอร์, ธาตุเหล็ก, ascorbic acid, arachidic acid, β-carotene, linoleic acid, myristic acid, oleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, phosphorus, potassium, niacin, riboflavin, thiamin และ น้ำ (Anand, Divya & Kotti, 2558, p.93-98)

ภาพที่ 2.1 ใบหูกวาง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการสกัดสาร

สมุนไพรที่นำมาสกัดอาจอยู่ในรูปพืชสดหรือพืชแห้ง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกสำหรับการสกัดสาร คือการตรวจสอบเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่มีชื่อพ้องกัน อีกทั้งมีลักษณะคล้ายกันซึ่งอาจจะปลอมปนได้ง่าย ก่อนที่จะทำการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร ควรคำนึงถึงวิธีการเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร (Preparation of raw materials) ให้เหมาะสม รวมทั้งชนิด คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารสำคัญและสารอื่น ๆ ที่ต้องการสกัดในพืชสมุนไพร เนื่องจากเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อคุณภาพของสารสกัด และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าสารสกัดให้ได้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.35-38)

1. การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร (Preparation of raw materials)

เป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการเตรียมสารสกัดสมุนไพร เริ่มจากการเก็บพืชตัวอย่างซึ่งต้องคำนึงถึงการตรวจเอกลักษณ์พืช เพื่อให้ได้พืชถูกชนิด และคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อชนิด และปริมาณของสารออกฤทธิ์ เช่น สภาพภูมิอากาศ ชนิดของดิน ความสูงของพื้นดินที่ปลูก อายุ ช่วงเวลาและส่วนของพืชที่เก็บเกี่ยว เป็นต้น ซึ่งสามารถค้นคว้าได้จากเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบเบื้องต้นในการเก็บพืชตัวอย่าง สมุนไพรที่เก็บเกี่ยวได้ จะมีมูลค่าเพิ่มเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูง อีกทั้งไม่มีพืชอื่นหรือสารอื่นปะปน นอกจากนี้ควรมีความสะอาดปราศจากสิ่งปลอมปน ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ หรือสารพิษ สารสกัดจากพืชสดในพืชบางชนิด อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอื่นได้อย่างรวดเร็วในระหว่างการบด หรือการเก็บตัวอย่าง เพื่อยับยั้งการเปลี่ยนนี้ควรแช่พืชตัวอย่าง ในเอทานอล หลังการเก็บเกี่ยวทันที หรือเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution) ลงไปเพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH) ป้องกันไม่ให้องค์ประกอบในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง แต่วิธีการดังกล่าวไม่สะดวก จึงต้องนำเอาตัวอย่างพืชสดมาทำให้แห้งก่อน เพื่อรักษาคุณภาพสมุนไพรให้ดีที่สุดก่อนทำการสกัด และเพื่อป้องกันการบูดเสียจากเชื้อจุลินทรีย์ และยังช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด จึงควรทำให้แห้งทันทีหลังเก็บเกี่ยว และใช้อุณหภูมิต่ำการทำให้แห้งอาจใช้แสงแดดหรือความร้อนจากเครื่องมือช่วย ซึ่งการใช้เครื่องมือช่วยนี้มีข้อดีคือสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ และมีความสม่ำเสมอของการหมุนเวียนของอากาศได้ ก่อนทำการสกัดต้องมีการทำให้สมุนไพรมีขนาดเล็กลง (Comminution) เพื่อให้การสกัดสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในเซลล์พืชได้ผลดี การสกัดจะสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออก และตัวทำละลายเข้าไปสัมผัส และสารละลายออกฤทธิ์ดึงสารสำคัญออกจากเซลล์เนื้อเยื่อพืชได้ง่ายขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ดังนั้นในการสกัดพืชสมุนไพรจึงจำเป็นต้องบดพืชให้เป็นผง เพื่อทำลายผนังเซลล์ และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสตัวทำละลาย การลดขนาดของพืชสมุนไพรควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก เช่นโครงสร้างที่แข็งแรงจำพวก เปลือกต้น รากไม้ เนื้อไม้ ควร

ทำให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่อ่อนนุ่ม เช่น ใบ ดอก ในการบดพืชสมุนไพรไม่ควรบดให้มีขนาดเล็กเกินไป จะทำให้เกิดการอุดตันในเครื่องกรองในกระบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเซลล์แตกมากเกินไป ขนาดที่เหมาะสมนั้นจึงต้องอาศัยผลที่เกิดจากการทดลอง ซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้สารออกฤทธิ์สูงสุด (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.35-38)

2. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร (Preparation herbal extracts)

การสกัด (Extraction) เป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีที่ต้องการออกจากส่วนอื่น ๆ โดยใช้ตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัด (Solvent) ดังนั้นการเตรียมสารสกัดสมุนไพรเบื้องต้น จึงเป็นการละลายองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ออกจากองค์ประกอบที่ไม่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเฉื่อยหรือสารรบกวน (Interfering substances) ด้วยตัวทำละลาย ได้สารสกัดเป็นของผสมหรือเรียกสารสกัดหยาบ (Crude extract) เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบติแตกต่างกัน อีกทั้งสารประกอบเหล่านี้ อาจจับกันอย่างหลวม ๆ ทำให้การละลายของสารแตกต่างกันออกไป ตามคุณสมบัติในการละลายของสารแต่ละชนิด ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะสกัดสารออกฤทธิ์ทุกกลุ่มที่ต้องการได้ ถ้ามีการเลือกตัวทำละลาย และวิธีการสกัดให้เหมาะสมกับชนิดของสารออกฤทธิ์ทุกกลุ่มที่ต้องการสกัด การคัดกรองและติดตามเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจ อาจทำได้โดยการตรวจสอบสารสกัดด้วยวิธีการทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological assay) ของสารสกัดจากสมุนไพร (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.35-38)

3. การเลือกใช้ตัวทำละลาย

3.1 หลักการใหญ่ ๆ ของการเลือใช้กตัวทำละลาย คือพิจารณาจากความมีขั้ว (Polarity) ของตัวทำละลายและสารสำคัญ โดยให้ความเป็นขั้วของสารสกัดที่จะทำละลายนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน (Like Dissolves Like) กับตัวทำละลาย กล่าวคือตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้วเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (Dipole-Dipole) ในทางตรงกันข้ามสารที่ไม่มีขั้วจะดึงดูดกันระหว่างโมเลกุลด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals Force) นอกจากนี้ความมีขั้วจะสัมพันธ์กับค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (Dielectric Constant) ของตัวทำละลาย ซึ่งค่าคงที่อยู่ในช่วง 1-20, 20-50 และมากกว่า 50 เป็นตัวบ่งชี้ว่าตัวทำละลายนั้นไม่มีขั้ว กึ่งมีขั้วและมีขั้วตามลำดับ ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมควรมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาพอสมควร นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่สำคัญในการสกัดคือขนาดอนุภาคของพืช และปริมาณของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็นต้น (วิภาวรรณ นีละพงษ์, บุษบา ผลโยธิน และ วันเชิง สิทธิกิจโยธิน, 2561, น.109-910)

3.2 ตัวทำละลายจะแบ่งออกเป็นสารละลายที่มีขั้ว และสารละลายที่ไม่มีขั้วซึ่งจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการศึกษา ซึ่งสารสำคัญบางชนิดสามารถละลายได้ทั้งตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ (พรทิพ กันภัย, 2557, น.3) ตัวทำละลายที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่

3.2.1 น้ำ เป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก แต่การใช้น้ำเพียงอย่างเดียวในการสกัด มีข้อเสีย คือ ละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้ นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยน้ำออกไปซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อสารสำคัญ จึงไม่นิยมใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลาย แต่จะใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่น เช่น แอลกอฮอล์หรือกรด

3.2.2 แอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ เนื่องจากมีข้อดี คือ มีความจำเพาะในการละลายมากกว่าน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ และหากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นก็จะระเหยได้ง่าย

3.2.3 น้ำผสมแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ การใช้น้ำผสมแอลกอฮอล์ยังป้องกันการแยกตัวของสารสกัดเมื่อทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด

3.2.4 ตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นตัวทำละลายที่สามารถนำมาสกัดพืชได้ เช่น เฮกเซน และ ปิโตเลียมอีเทอร์ ใช้สกัดพืชในขั้นต้น เพื่อขจัดไขมันออกไปก่อนสกัดสารสำคัญ แต่ต้องระเหยตัวทำละลายออกไปจนหมดก่อนแล้วจึงจะสกัดในขั้นตอนต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว เช่น สเตียรอยด์ เทอร์พีนอยด์ เป็นต้น

3.2.5 คลอโรฟอร์มและอีเทอร์ เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วไปจนถึง สารที่มีขั้วปานกลาง

สามารถจำแนกตัวทำละลายที่มีขั้ว และไม่มีขั้วได้ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การจำแนกความเข้มข้นของตัวทำละลาย (วิภาวรรณ นีละพงษ์ และคนอื่นๆ, 2561, น.109-910)

ตัวทำละลาย	จุดเดือด (°C)	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก	ค่าความหนาแน่น (g/ml)
ตัวทำละลายไม่มีขั้ว (Non-Polar Solvent)			
Acetic acid	118	6.2	1.049
Benzene	80	2.3	0.879
n-Butanol	118	18	0.810
Chloroform	61	4.8	1.489
Diethyl Ether	35	4.3	0.713
Ethyl acetate	77	6.0	0.902
Hexane	69	2.0	0.655
Isopropanol	82	18	0.785
n-Propanal	97	20	0.803
Toluene	111	2.4	0.865
Vegetable oil	235	-	0.904
ตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Semi Polar Solvent)			
Acetone	56	21	0.785
Acetonitrile	82	37	0.786
Dimethyl Sulfoxide	189	47	1.095
Ethanol	79	24	0.789
Methanol	65	33	0.791
ตัวทำละลายที่มีขั้ว (Polar Solvent)			
Formic acid	100	58	1.220
Water	100	80	0.998

4. วิธีการสกัดสารสำคัญ

วิธีการสกัดสารสำคัญนั้นมีอยู่หลายวิธีขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่จะทำการสกัด เช่น คุณสมบัติในการละลาย การทนความร้อน ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อกำจัดที่แตกต่างกันออกไป

4.1 มาเซอเรชัน (Maceration)

4.1.1 วิธีการสกัด: การนำตัวอย่างที่ต้องการแช่ลงไปในตัวทำละลาย ทิ้งระยะเวลา 2-4 วัน เพื่อให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายสารสำคัญในตัวอย่างออกมา หรือพืชบางชนิดที่ทิ้งไว้ 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาทำการกรองเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด (วิภาวรรณ นีละพงษ์ และคนอื่นๆ, 2561, น.109-910)

4.1.2 ข้อดี: สารไม่ถูกความร้อน เหมาะกับสารสำคัญที่ไวต่อความร้อน

4.1.3 ข้อจำกัด: ใช้ปริมาณตัวทำละลายจำนวนมาก ต้องกวนหรือเขย่าบ่อยๆ

4.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation)

4.2.1 วิธีการสกัด: เป็นวิธีการสกัดสารแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องชง ที่เรียกว่า Percolator มีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงกระบอกปลายเปิดทั้งสองด้าน ด้านบนจะกว้างและค่อย ๆ สอบลงมา ส่วนปลายจะเปิดปิดได้ โดยนำสมุนไพรมาหมักแช่กับตัวทำละลาย ให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือ สมุนไพร ประมาณ 0.5 เซนติเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มเอาสารสกัดออก คอยเติมตัวทำละลายใหม่ ผ่านลงไปเรื่อย ๆ จนองค์ประกอบที่ต้องการในสมุนไพรละลายออกมาจนหมด (วิภาวรรณ นีละพงษ์ และคนอื่นๆ, 2561, น.109-910)

4.2.2 ข้อดี: สารไม่ถูกความร้อน

4.2.3 ข้อจำกัด: ใช้ปริมาณตัวทำละลายจำนวนมาก

4.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction)

4.3.1 วิธีการสกัด: เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญทำนองเดียวกับ เพอร์โคเลชัน แต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วย โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Soxhlet extractor ในระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ทำได้โดยใช้ความร้อน หลักการคือใส่ตัวทำละลายลงในขวดบรรจุตัวทำละลาย (Boiling Flask) ทำให้ตัวทำละลายระเหยเป็นไอไปตามช่อง Distillation Path ระเหยขึ้นไปสู่ส่วนที่เป็นเครื่อง Condenser แล้วกลั่นตัวลงมาในภาชนะที่บรรจุสมุนไพรไว้ (Extraction thimble) เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับกาลักน้ำ (Siphon Arm) สารสกัดจะไหลกลับลงในขวดที่บรรจุตัวทำละลายด้านล่าง (Boiling flask) ด้วยวิธีการลักน้ำ Boiling Flask นี้จะ ได้รับความร้อนจาก Heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ ใน Boiling Flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ Condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาเป็นสารสกัดใหม่วนเวียนเช่นนี้ จนกระทั่งสารสกัดสมบูรณ์ (วิภาวรรณ นีละพงษ์ และคนอื่น ๆ, 2561, น.109-910)

4.3.2 ข้อดี: ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่เป็นผงบดละเอียด เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและ ใช้น้ำยาสกัดน้อย ไม่สิ้นเปลือง

4.3.3 ข้อจำกัด: การสกัดวิธีนี้ใช้ความร้อน อาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิม และผลของน้ำยาสกัดไม่ดีเท่าที่คาดเอาไว้

4.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Eextraction of volatile oil)

4.4.1 การกลั่น (Distillation)

4.4.1.1 วิธีการสกัด: การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation) การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) และการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation) ใช้น้ำร้อนเป็นตัวควบแน่นไอระเหยของน้ำมันหอมระเหย หรือไอน้ำเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืชสมุนไพร โดยไอน้ำร้อนนี้จะเข้าไปแทรกในเนื้อเยื่อพืชแล้วดึงออกมาเป็นไอน้ำแล้วไปกระทบกับ Condenser จะได้เป็นของเหลวที่มีน้ำปนอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น (วิภาวรรณ นีละพงษ์, และคนอื่น ๆ, 2560, น.109-910)

4.4.1.2 ข้อดี: จัดเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ควบคุมปริมาณน้ำได้ง่ายและใช้ค่าใช้จ่ายน้อย

4.4.1.3 ข้อจำกัด: ไม่เหมาะสำหรับสารที่ไม่ทนความร้อนหรือเปลี่ยนโครงสร้าง/คุณสมบัติเมื่อโดนความร้อน และน้ำมันหอมระเหยที่มีจุดเดือดสูงกว่าน้ำจะไม่สามารถระเหยออกมาได้

4.4.2 การบีบหรือการอัด (Compression)

4.4.2.1 วิธีการสกัด: การบีบที่นิยมคือวิธีเอกคิวเอล (Ecuelle method) โดยเอาสมุนไพรไปบีบบนรางที่มีเข็มแหลม ๆ อยู่ เข็มต้องยาวพอที่จะแทงผ่าน ผนังชั้นนอก (Epidermis) เพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออก น้ำมันจะหยดลงไปในรางซึ่งเก็บน้ำมันได้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.53)

4.4.2.2 ข้อดี: เหมาะสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีกลั่นไม่ได้เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน

4.4.2.3 ข้อจำกัด: ไม่เหมาะสำหรับพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยจำนวนน้อย

4.4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (Enfleurage)

4.4.3.1 วิธีการ: ใช้ไขมัน (Fat) หรือ น้ำมันไม่ระเหย (Fixed oil) ที่ไม่มีกลิ่นเกลี่ยบนถาดไม้ เป็นตัวดูดซับ นำกลีบดอกไม้มาวางเรียง บนตัวดูดซับจนเต็มถาด ตั้งทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกลีบดอกไม้ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนตัวดูดซับดูดซับเอา น้ำมันหอมระเหยมากพอเรียกว่า Pomade แล้วจึงนำ Ethanol มาละลายสารหอมออกจากไขมัน แล้วนำไประเหย

ที่อุณหภูมิต่ำ จะได้ส่วนที่เป็นหัวน้ำหอม เรียกว่า concrete ส่วนที่เป็นไขมันจะเป็นหัวน้ำหอมชนิด absolute (สุชาดา มานอก, 2562, น.86-88)

4.4.3.2 ข้อดี: เหมาะสำหรับดอกไม้ หรือพืชที่ทนความร้อนได้ไม่ดี และพืชที่มีกลิ่นหอม องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงได้ง่าย

4.4.3.3 ข้อจำกัด: ต้นทุนการผลิตสูงกว่าการกลั่น

4.5 การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (Liquid-liquid extraction)

4.5.1 วิธีการ: สกัดสาร จากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกเช่นการแยกกรดออกจากน้ำ เป็นการใช้ตัวทำละลายใหม่ (ส่วนมากจะเป็นน้ำ) ในการสกัดสารออกจากสารละลายซึ่งสารที่สกัดได้ประกอบไปด้วยตัวถูกละลายและตัวทำละลายเดิม (ส่วนมากจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์) ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2562, น.3)

4.5.2 ข้อดี: จะสกัดสารออกมาได้มากกว่า และมีประสิทธิภาพดีกว่า เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้ตัวทำละลายใหม่ทีละน้อย และทำการสกัดหลาย ๆ ครั้ง

4.5.3 ข้อจำกัด: ควรระวังการใช้ตัวทำละลายต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับตัวทำละลายเดิม หรือละลายได้น้อยมาก ต้องละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่าตัวทำละลายเดิมที่อุณหภูมิเดียวกัน ควรมีจุดเดือดต่ำ เพื่อจำกัดการออกจากสารที่สกัดง่าย และตัวทำละลายควรมราคาถูก

4.6 การทำให้สารสกัดเข้มข้น

4.6.1 การระเหย (Free evaporation)

4.6.1.1 วิธีการ: นำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) (สุชาดา มานอก, 2562, น.95)

4.6.1.2 ข้อดี: สามารถทำได้ง่าย และประหยัดเวลา

4.6.1.3 ข้อจำกัด: วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสาร สกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ในการสกัดการระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (Direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย

4.6.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Reduce pressure evaporator)

4.6.2.1 วิธีการ: ใช้การระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำพร้อมลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า rotary evaporator (สุชาดา มานอก, 2562, น.95)

4.6.2.2 ข้อดี: สารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ใช้ระยะเวลาน้อย

4.6.2.3 ข้อจำกัด: ในการกลั่นวิธีนี้ต้องควบคุมแรงดันอย่างสม่ำเสมอ หากแรงดันสูงไปอาจทำให้สารสกัดที่ต้องการกระเด็นเข้าไปในส่วนควบแน่นได้ และใช้เวลาในการกลั่นนาน

4.6.3 การทำให้แห้ง (Freezing)

4.6.3.1 วิธีการ: เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากนำยาสกัดจนแห้ง โดยใช้ความเย็น ซึ่งจะได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (Lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (Spray dryer) (สุชาดา มานอก, 2562, น.95)

4.6.3.2 ข้อดี: วิธีนี้จะช่วยรักษาคุณภาพ และการคืนตัวของวัสดุได้ดีมาก

4.6.3.3 ข้อจำกัด: ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

ความรู้เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

1. ความหมายของสารพฤกษเคมี

คือสารเคมีที่พบในพืชจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามลักษณะความจำเป็นที่พืชสร้างขึ้นได้ เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (อ้อมบุญ วัลลิสุต และปองทิพย์ สิทธิสาร, 2556, น.21) ดังนี้

1.1 สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) เป็นสารเคมีที่พบได้ในพืชชั้นสูงทุกชนิดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมทาโบลิซึ่ม (Metabolism) ที่จำเป็นของพืช เช่น การเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การสะสมอาหารและพลังงาน การสืบพันธุ์ เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มนี้ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน และเอนไซม์

1.2 สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็นสารประกอบที่เกิดจากเมทาบอลิซึ่มของพืช มีขั้นตอนการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ไม่มีความจำเป็นต่อวงจรการดำรงชีวิตของพืช พบได้แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้มักแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน และนำมาใช้ประโยชน์เป็นยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือมีคุณสมบัติเป็นสารพิษ

2. ชนิดของสารพฤกษเคมี

สารทุติยภูมิในพืชสารมารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีและขบวนการชีวสังเคราะห์ของสาร ได้เป็น 4 กลุ่มหลัก (อ้อมบุญ วัลลิสุต และคนอื่น ๆ, 2556, น.27-41) ดังนี้

2.1 อัลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่พบได้มากที่สุดในพืชชั้นสูง พบได้บ้างในพืชชั้นต่ำ เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Organic nitrogen compounds) มีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาครอบคลุมเกือบทุกระบบของร่างกาย ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค และมีจำนวนไม่น้อย

ที่เป็นสารพิษ เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ แก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ ยาลดความดัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาพิษฆ่าแมลง และใช้ในการ ล่าสัตว์ เป็นต้น

2.2 กลุ่มสารฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ โดยทั่วไปโครงสร้างประกอบไปด้วย Aromatic ring ที่มี Hydroxy group อย่างน้อย 1 กลุ่ม ซึ่งอาจอยู่ในรูป -OH อิสระ หรือจับกับสารอื่นในรูปของอีเทอร์ เอสเทอร์ หรือกลัยโคไซด์ก็ได้ ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

2.2.1 ฟีนอลและฟีนอลิกกลัยโคไซด์ (Phenol and phenolic glycosides) สารในกลุ่มนี้มักพบในรูปเอสเทอร์เป็นส่วนใหญ่ กรดฟีนอลิกและอนุพันธ์ที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยาและเภสัชกรรม เช่น กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) ใช้รักษาอาการปวดตามข้อ ใช้แต่งกลิ่นในยา และเครื่องสำอาง

2.2.2 คูมารินส์ (Coumarins) สารกลุ่มนี้ แบ่งการใช้ประโยชน์ออกได้ หลายด้าน เช่น สาร Coumarin ใช้เป็นสารแต่งกลิ่น สาร Satonin เคยใช้เป็นยาขับพยาธิ แต่ปัจจุบันพบว่ามีสารพิษ จึงเลิกใช้สารพวก Furanocoumarins บางตัว เช่น Psoralen และ Bergapten ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังไวต่อแสงใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) และบางชนิดใช้เป็นยาขยาย หลอดเลือดหัวใจ สาร Dicoumarol มีฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

2.2.3 ฟลาโวนอยส์ (Flavonoids) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenolic compounds) พบได้ในธรรมชาติโดยมักพบเป็นเม็ดสี (Pigments) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยเฉพาะในดอกไม้ ในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระ และในรูปกลัยโคไซด์ โดยแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น Rutin ใช้รักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ Quecetin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านไวรัส โดยออกฤทธิ์เป็นทั้ง anti-infective และ Antireplicative ของไวรัสหลายชนิด นอกจากนี้สารในกลุ่ม Flavonoids ยังมีฤทธิ์เป็น antioxidant อีกด้วย เช่น OPC (Oligomer proantho cyanidin) ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในเมล็ดองุ่นและไวน์แดง พืช Buchu ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ส่วนไอโซฟลาโวนส์ใน Clover มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นต้น

2.2.4 แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลิคที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ และสลับซับซ้อน พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งรูปอิสระ และรุปไกลโคไซด์ ประโยชน์ของแทนนิน ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื่องจากแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่ติดหนังสัตว์ได้ ใช้เป็นยาฝาดสมายเช่น Tannin acid ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาทแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น ใช้ในการรักษาแผลไฟไหม้ ทั้งนี้การใช้แทนนินเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ ซึ่งพบว่าในผลหมากมีองค์ประกอบของแทนนินและอัลคาลอยด์ Arecoline ที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในช่องปากและลำคอได้

2.2.5 ควิโนน (Quinones) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วย 1,4-Diketo-cyclohexa-2,5-diene (เรียกว่า Para-quinone) หรือ 1,2-Diketo-cyclohexa-3,5-diene (เรียกว่า Ortho-quinones ควิโนนที่พบในธรรมชาติ มักพบเป็น Benzoquinones, Naphthoquinones และ Anthraquinones เป็นต้น คุณสมบัติทางเคมีของสารจำพวกแอนทราควิโนน มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบไปด้วย 3-Ring system เป็นสารที่มีสีแดง-สีส้ม แต่อาจพบสีเหลือง-สีน้ำตาล ส่วน Aglycone ของแอนทราควิโนนละลายได้ดีในด่าง ให้สีชมพู-แดง ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบาย และยาถ่าย โดยออกฤทธิ์เป็น Stimulant cathartics นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์เป็นสีย้อม ใช้รักษาเชื้อราที่ผิวหนัง และมีรายงานว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อไวรัส Herpes simplex type 1 อีกด้วย

2.3 กลุ่มสารเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) หรือ (Terpenes) เป็นสารกลุ่มไฮโดรคาร์บอนหรือมีออกซิเจนอยู่ด้วยก็ได้ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้าน เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง diterpenes พบในสัตว์ทะเลจำพวกฟองน้ำ เทอร์พีนอยด์ ส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่มีสี (ยกเว้น Carotenoids) พบได้ใน Cytoplasm ของเซลล์ หรือในเนื้อเยื่อพิเศษ น้ำมันหอมระเหย พบได้ในเซลล์ต่อมของผิวใบหรือกลีบดอก ซึ่งจะพบร่วมกับ Carotenoids คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย คือ ขับลม ฆ่าเชื้อโรค แต่งกลิ่น กลบกลิ่น กระตุ้นอวัยวะระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเรียกรวม ๆ ว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยในการบำบัดรักษาว่า สุคนธบำบัด

2.4 ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์(Saponin glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่มีส่วน Aglycone เป็นสาร Steroids หรือ Triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับ ส่วนน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C3 ได้เป็น O-glycoside น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่เป็น Oligosaccharide 1 –5 หน่วย ซาโปนินไกลโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surface active agent) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เป็นยาฝาด ใช้ชะล้างแทนสบู่ได้ เป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็น ใช้เป็นสารเบื่อปลา ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร แต่รับประทานเข้ามาก ๆ จะเกิดการระคายเคืองต่อเมือกของลำไส้เล็ก ทำให้อาเจียนได้ ที่สำคัญที่สุดคือ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาจำพวก Steroid hormone

2.5 กลุ่มสเตอรอยด์ (Steroids) สเตอรอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น Cyclopentano perhydrophenanthrene nucleus เป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญ เนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิดหลายชนิดสารในกลุ่มสเตอรอยด์ที่สำคัญ

2.6 คาร์ดิแอ็กกลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจใช้รักษาโรคหัวใจวาย (Congestive heart failure) ผลในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ Aglycone และจำนวน ของน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะช่วยให้ไกลโคไซด์ละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น มีการนำมาใช้ในการรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติ

3. การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การนำสารตัวอย่างมาทำด้วยวิธีปฏิกิริยาการเกิดสี หรือเกิดการขุ่น (Turbidity) หรือเกิดตะกอนแต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีและต้องใช้ปริมาณน้ำยาตรวจสอบที่เหมาะสมการเกิดปฏิกิริยากับสารพฤกษเคมีที่บ่งบอกว่ามีสารสำคัญนั้น ๆ หรือไม่สามารถทำการทดสอบได้ (สุชาดา มานอก, 2562, น.9-12) ดังนี้

3.1 กลุ่มแอลคาลอยด์

การตรวจสอบอัลคาลอยด์เบื้องต้น มักใช้ทดสอบหาในพืชที่มีอยู่คร่าว ๆ อัลคาลอยด์เกือบทุกชนิดสามารถเกิดตะกอนหรือเกิดการขุ่น หรือเกิดปฏิกิริยา การเปลี่ยนสีกับน้ำยาทดสอบได้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมีของน้ำยาดังกล่าว สามารถตรวจสอบด้วยน้ำยาทดสอบเบื้องต้น ดังนี้

3.1.1 Dragendorff' s reagent	จะเกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีส้ม
3.1.2 Marme's reagent	จะเกิดตะกอนสีขาว
3.1.3 Hager's reagent	จะเกิดตะกอนสีเหลือง
3.1.4 Tannic Acid's reagent	จะเกิดตะกอนสีขาว
3.1.5 Mayer's reagent	จะเกิดตะกอนสีขาวหรือสีเหลือง
3.1.6 Wagner's reagent	จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง

3.2 กลุ่มสาร tannin และ phenolic compound

สามารถใช้น้ำยาทดสอบหลายชนิดโดยสารที่ให้ผลบวกกับน้ำยาเหล่านี้จะถือว่ามีสาร tannin หรือ phenolic compound เป็นองค์ประกอบ สามารถแปรผลได้ ดังตารางที่ 2.2

3.2.1 gelatin solution	จะเกิดตะกอนสีขาวขุ่น
3.2.2 gelatin salt	จะเกิดตะกอนสีขาวขุ่น
3.2.3 1% $FeCl_3$	จะเกิดสีน้ำเงิน - เขียว
3.2.4 bromine water	จะเกิดตะกอนเบาสีขาวอมเหลือง
3.2.5 lime-water	จะเกิดตะกอนสีเหลือบน้ำเงินเทา
3.2.6 Vanillin-HCl	จะเกิดสารละลายสีชมพูหรือสีแดง

ตารางที่ 2.2 การแปลผลการทดสอบสารกลุ่ม Tannin และ Phenolic compound

ผลการทดลอง	การแปรผล
1.1 ผล (-) Gelatin, Gelatin salt	ไม่มี Tannin ไม่มี Polyphenol/ Phenolic
1.2 ไม่ให้สีกับ $FeCl_3$	
2.1 ผล (+) Gelatin, Gelatin salt	มี Condensed tannin
2.2 ให้สีเขียวกับ $FeCl_3$	
2.3 ผล (+) Bromine water, Formalin-HCl, Vanillin-HCl	
2.4 ผล (-) Lime water	
3.1 ผล (+) Gelatin, Gelatin salt	มี Hydrolysable tannin
3.2 ให้สีน้ำเงินดำกับ $FeCl_3$	
3.3 ผล (-) Bromine water, Formalin-HCl, Vanillin-HCl	
4.1 ผล (+) Lime water	
5.1 ผล (+) ทุก Test	มี Tannin ทั้ง 2 ประเภท
5.2 ให้สีน้ำเงินอมเขียวกับ $FeCl_3$	
6.1 ผล (-) Gelatin, Gelatin salt	ไม่มี Tannin มี Phenolic
6.2 ให้สีน้ำเงิน/เขียวกับ $FeCl_3$	

3.3 สารกลุ่ม Flavonoid

มีวิธีการตรวจสอบอยู่หลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายที่สุดคือ วิธี Shinoda test โดยทำปฏิกิริยากับแผ่น Mg และกรด HCl ซึ่งหากได้สีตามนี้จะถือว่ามีสารกลุ่ม Flavonoid เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจำแนกเป็นแต่ละกลุ่มได้ดังนี้

3.3.1 Flavones จะให้สีส้มถึงสีแดง

3.3.2 Flavonols จะให้สีแดงถึงสีแดงเลือดนก

3.3.3 Flavanones จะให้สีแดงเลือดนกถึงสีม่วงชมพูอ่อน

3.3.4 Flavononols ถ้าให้สีเข้มในการทดสอบนี้ ให้ทดสอบซ้ำโดยวิธี Pew test

3.4 สารกลุ่มแอนทราควิโนนกลัยโคไซด์ (Antraquinone glycosides)

มีอนุพันธ์อะลโคนเป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene) ในพืชชั้นสูงจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ แอนทราควิโนนมีคุณสมบัติเปลี่ยนกลับไปกลับมาระหว่างแอนโทรน (anthrone)

และ แอนทรานอล (anthranol) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative) และยาถ่าย (purgative) ในการตรวจสอบหาสารแอนทราควิโนน จะใช้การทดสอบด้วยปฏิกิริยาบอร์นเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) ใช้ทดสอบเฉพาะแอนทราวิโนนไกลโคไซด์ โดยการย่อยสลายไกลโคไซด์ให้เป็นอะไกลโคนด้วยน้ำ ในสภาวะเบส จะได้อะไกลโคนในรูปของน้ำตาล และเกลือโพแทสเซียมหรือโซเดียม เมื่อเติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพื่อออกซิเดชั่นของแอนทราซีน (anthracene) เปลี่ยนเป็น แอนทราควิโนนรูปอิสระ ซึ่งเกลือของอะไกลโคนจะละลายน้ำได้ เมื่อปรับสารละลายให้เป็นกรด ซึ่งสามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ เช่นเบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น จากนั้นนำไปหยดสารละลายเบสจะได้สีแดง ข้อควรระวังของปฏิกิริยานี้คือเกิดผลบวกอำพรางกับเบนโซควิโนน และแนฟโธควิโนน (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.720)

3.5 สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

เทอร์พีนอยด์มีองค์ประกอบเป็น Carbon 5 ตัว ประกอบด้วยพันธะไม่อิ่มตัว (Unsaturated bonds) 2 พันธะ เป็นหน่วยไอโซพรีน (Isoprene units) โครงสร้างจะเชื่อมกันระหว่างหน่วยไอโซพรีนต่อกันแบบหัวไปหาง (Head to tail) ทำให้มีรูปแบบวงแหวนต่าง ๆ กัน จำนวนไอโซพรีนนี้ไว้ใช้จำแนกประเภทของสารประกอบเทอร์พีนอยด์ การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์อาศัยหลักการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบบางชนิด เช่น น้ำยา 2,6-di-tert-butyl-p-cresol in ethanol) หากพบเป็นสีม่วง แสดงว่ามีสารประกอบ Pentacyclic triterpenoids หากใช้น้ำยากรดคลอโรซัลโฟนิกพบเป็นสีแดง แสดงว่ามีสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.725) การทดสอบซาลโควสกิ (Salkowski test) โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม นำไปสกัดด้วยปิโตเลียมอีเธอร์ เช่น Dichloromethane, Chloroform หรือ Hexane ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร สกัด 2-3 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 2 หยดมิลลิลิตร หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อของสารละลายที่ใช้ทดสอบ แสดงว่าพบเทอร์พีนทั่วไป (สมฤทัย พาที, 2560, 21)

3.6 สารกลุ่มซาโปนิน (Saponins)

ใช้วิธีการทดสอบการเกิดฟอง (Froth test) ทดสอบได้โดยการเขย่าแรง ๆ กับน้ำ จะทำให้เกิดฟองรูปหกเหลี่ยม (Hyneycomb froth) ซึ่งอยู่ได้คงทนไม่น้อยกว่า 30 นาที สารอื่นที่อาจทำให้เกิดฟองได้แก่ โปรตีน กรดในพืช (Plant acids) บางชนิด แต่ฟองดังกล่าวไม่คงทน ถ้าเป็นฟองที่เกิดจากโปรตีน เมื่อต้มสารสกัดฟองจะสลายไป ถ้าเป็นฟองที่เกิดจากกรดในพืช ฟองดังกล่าวจะหายไปเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตลงในสารสกัด ถ้าเป็นฟองที่เกิดจากสบู่ เมื่อเติมกรดลงไปฟองก็จะสลายไป (อ้อมบุญ วัลลิสุต และคนอื่น ๆ, 2556, น.41)

3.7 สารกลุ่มคาร์ดิแอ็กไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

เนื่องจากสารกลุ่มนี้ไม่มีน้ำยาเฉพาะสำหรับทดสอบ จึงทำการทดสอบส่วนประกอบโครงสร้างของ คาร์ดิแอ็กไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ซึ่งประกอบไปด้วยการทดสอบดังนี้ สเตียรอยด์ วงแหวนแลกโทนไม่อิ่มตัว และน้ำตาลดีออกซี หากผลการทดสอบปรากฏผลบวกทั้ง 3 ส่วน จึงจะสรุปได้ว่าพบ คาร์ดิแอ็กไกลโคไซด์ วิธีทำการทดสอบโดยทำสารละลายตั้งต้นใช้สำหรับการทดลองดังนี้ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วย ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) 2-3 ครั้ง

3.7.1 ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ โดยใช้การทดสอบ ลีเบอร์แมน (Libermann Test) โดยเติมกรดอะซิติก (Acetic acid glacial) 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายตั้งต้น สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือเขียว แสดงว่าพบ สเตียรอยด์

3.7.2 ส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว นำสารละลายตั้งต้น เติมน้ำยาเคดเด (Kedde's Reagent) 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 5% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5% KOH) 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีม่วง แสดงว่าพบวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว

3.7.3 ส่วนน้ำตาลดีออกซี โดยใช้การทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test) สารละลายตั้งต้น เติมกรดอะซิติก (Acetic acid glacial) 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดแล้วค่อย ๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ไปตามข้างหลอดประมาณ 1-2 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าปรากฏสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อชั้นสารสกัด และกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย, 2556, น.726)

4. การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ด้วย เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Thin-layer chromatography, TLC)

เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี เป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identify) ของพืชหรือสารสกัดที่ต้องการ โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในการเคลื่อนที่ระหว่าง ตัวดูดซับ (Adsorbent) หรือเฟสคงที่ (Stationary phase) และตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ ซึ่งสารจะเคลื่อนผ่านตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับได้น้อย จะเคลื่อนที่แยกตัวออกมาพร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) นอกจากนี้ TLC ยังเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง แต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์ชนิดสาร โดยเปรียบเทียบ R_f ของสารกับสารมาตรฐาน (Authentic sample) ใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่าง

กระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่าง ๆ และยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.163)

4.1 หลักการของ Thin-layer chromatography (TLC) ใช้หลักการแบบดูดซับ คือวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) จะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม (Alumina, Al2O3) หรือซิลิกาเจล (Silica gel, SiO2) เป็นต้น หรือแผ่นพลาสติกบาง ๆ ทั้งนี้อยู่กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) อาจจะเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ มักจะเป็นสาร ที่มีขั้วน้อย เมื่อสารประกอบ A มีการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ ผ่านไปตามความยาวของคอลัมน์หรือแผ่นที่บรรจุเฟสคงที่ A (Mobile) = A (Stationary) จะเกิดการกระจายตัวที่แตกต่างกันทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่แตกต่างกัน ความสามารถการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบของสารบนตัวดูดซับชนิดของแข็งไม่เท่ากันโดยองค์ประกอบที่ถูกดูดซับได้น้อยและเคลื่อนที่ได้เร็ว และแยกตัวออกมาพร้อมกับตัวทำละลาย (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2562, ออนไลน์) หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบว่าสารที่แยกได้เป็นสารกลุ่มใด โดยการใช้น้ำยาตรวจสอบแบบต่าง ๆ ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) ด้วยเทคนิคนี้ทำโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจาก สีและค่า R_f ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน (พอตา ชัยกิจ, 2559, น.13)

4.2 การเลือกใช้ตัวดูดซับ (Stationary phase) ตัวดูดซับ ชนิดของแข็ง มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับการใช้งาน และสารที่จะวิเคราะห์เช่น อะลูมินา (Alumina) ใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด (โดยเฉพาะสารที่เป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นเบสที่อ่อนมาก) เป็นต้น ส่วนมากมักใช้กับสารที่เป็นเบส หรือซิลิกาเจล (Silica gel) นอกจากนั้นตัวดูดซับอื่น ๆ ที่ใช้ได้อีกเช่น แมกนีเซียมคาร์บอเนต ($MgCO_3$) แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) แป้ง (starch) และน้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นต้น โดยจะนำตัวดูดซับเหล่านั้นไปเคลือบเป็นชั้นบาง ๆ บนแผ่นแก้ว แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกเรียบ ตามขนาดและความเหมาะสม ของการใช้งาน (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2562, ออนไลน์)

4.3 การเลือกใช้ตัวทำละลาย (Solvent system) ประสิทธิภาพในการแยกสารจะดีหรือไม่อยู่ที่การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวทำละลายที่เลือกจะมีสภาพขั้วต่ำกว่าวัฏภาคนิ่ง ดังนั้นจึงควรเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันมาหลาย ๆ ชนิด เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล (เรียงลำดับตามจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพขั้วสูง) การใช้กรดคาร์บอกซิลิก เช่น กรดอะซิติกก็สามารถใช้ได้แต่จะใช้ในอัตราส่วนที่ต่ำเพราะกรดมีฤทธิ์กัดกร่อนและมีขั้วสูงมาก เมทิลีนคลอไรด์และคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มีความเป็นพิษจึงควรใช้เท่าที่จำเป็นเท่านั้น (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2562, ออนไลน์)

4.4 การวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร การวิเคราะห์ผลที่ได้จะวัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่โดยเริ่มวัดจากแนวที่ขีดไว้ในแผ่นเป็นจุดเริ่มต้นไปจนถึงจุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง และวัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปเช่นเดียวกัน การวัดระยะทางนี้ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร การแยกสารที่มีสีสามารถมองเห็นลักษณะโครมาโทแกรมได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า แต่ถ้าสารที่แยกไม่มีสีต้องใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการดูระยะทางการเคลื่อนที่ของสารบนโครมาโทแกรม (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2562, ออนไลน์) ดังนี้

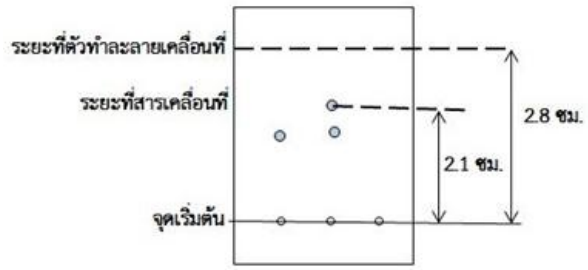
4.4.1 ส่อง UV ที่ λ254 หรือ λ366 วิธีนี้จะสามารถใช้กับ สารที่มีระบบความไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะซึ่งมีส่วนของวงเบนซีนในสูตรโครงสร้างโดยบริเวณที่มีสารจะเป็นเงาทึบแสงหลังจากนำ แผ่น TLC ไปส่อง UV

4.4.2 อบด้วยไอของไอโอดีน (I_2) เตรียมได้โดยการนำเกล็ดไอโอดีนใส่ในภาชนะปิดเรียกว่า iodine chamber บริเวณที่มีสารจะปรากฏวงสีน้ำตาล

4.4.3 สเปรย์ด้วยสารละลายวานิลินในกรด H_2SO_4 (Vanillin reagent) ถ้าสารที่ไม่สามารถมองเห็นดวัย UV แล้ว ส่วนใหญ่จะสามารถมองเห็นได้เมื่อนำโครมาโทแกรมมาสเปรย์ด้วย Vanillin reagent หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 115°C ประมาณ 1-2 นาที ก็จะเกิดสีกับสารนั้นสีที่เกิดขึ้นจะแล้วแต่ชนิดของสารแต่ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าสารประเภท ไหนจะให้สีอะไรกับ Vanillin reagent

อัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้เรียกว่าค่าคงที่อัตราไหล (Rate of flow or R_f) ซึ่งค่า R_f เป็นค่าเฉพาะของแต่ละสาร ดังนั้น สามารถนำค่า R_f ไปวินิจฉัยสารได้ โดยจุดสารผสม เทียบกับสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC เดียวกันถ้าค่า R_f เท่ากัน แสดงว่าอาจจะเป็นสารตัวเดียวกัน ค่า R_f จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวดูดซับ ความหนาของชั้นตัวดูดซับ ชนิดของตัวทำละลายอุณหภูมิและความชื้นในอากาศ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$



$$Rf = \frac{2.1\ cm.}{2.8\ cm.} = 0.75$$

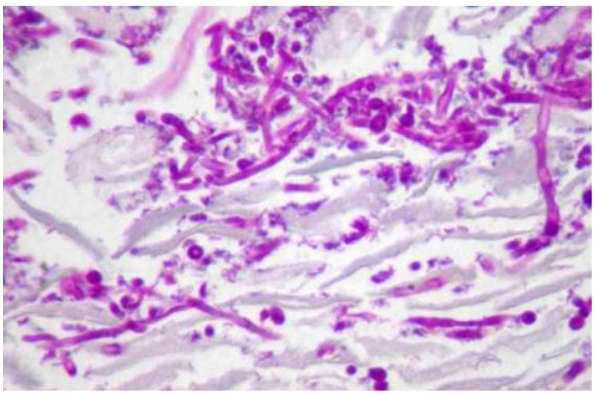
ภาพที่ 2.2 การหาค่า R_f ของโครมาโทแกรม

(E-lifes, 2017, Online)

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเชื้อราแคนดิดา (*Candida* spp.)

1. ลักษณะ

เชื้อรา (*Candida* spp.) จัดเป็นเชื้อราเซลล์เดียว (Unicellular) คือ พวกยีสต์ (Yeast) หรือส่ารา เซลล์เป็นแบบ Eukaryotic cell มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มักจะพบลักษณะเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม รูปไข่ หรือเหมือนผลเลมอน เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและยาวประมาณ 1-4 ไมโครเมตร ยีสท์กลุ่มนี้สามารถขึ้นได้ในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน และภาวะที่มีก๊าซอ๊อกซิเจนลดลง ถ้านำมาเลี้ยงบนวุ้นซาบูไรด์ (Saburaud) ภายใน 2 ชั่วโมง จะปรากฏโคโลนี และภายใน 1 สัปดาห์จะมีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร พื้นผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะซีดขาว ผิวเรียบเป็นเงาหรือแห้ง มีรอยย่นและขุ่นมัว ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มักพบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นสาย นอกจากนี้ *Candida albicans* มีคุณสมบัติของการปรับเปลี่ยนรูปโดยการยืดโครงสร้างคล้ายท่อออกจากเซลล์กลม ทำให้ มีลักษณะคล้ายสายรา มีทั้งสายราแท้และสายราเทียม แต่ลักษณะของสายราดังกล่าวมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจาก True hyphae ที่พบในราสาย คือ มีความกว้างขนาดใหญ่กว่า True hyphae รวมถึงการเจริญและยืดของท่อที่พบใน *Candida albicans* จะใช้ Polarisome แทนส่วนที่เรียกว่า Spitzenkorper จึงเรียกสิ่งที่ยืดลักษณะคล้ายท่อดังกล่าวว่า Pseudohyphae Superficial Candidiasis (Candidosis) การแตกหน่อ (Budding, blasoconidia) เซลล์พ่อแม่หนึ่งเซลล์เกิดเซลล์ลูกได้หลายที่บนเซลล์พ่อ-แม่ (Multi-lateral budding) เชื้อ *Candida albicans* เป็นยีสต์และสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อฉวยโอกาส มักจะเป็นสาเหตุของการ ติดเชื้อราบริเวณอวัยวะที่มีความชื้นสูง ๆ โดยเฉพาะ Mucocutaneous เช่น บริเวณอวัยวะเพศ รอบ ๆ ทวารหนัก และขาหนีบ (พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ตันหยง และนัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ, 2556, น.31-44)



ภาพที่ 2.3 เชื้อรา *Candida* ที่มีลักษณะของ Budding yeast และ Pseudohyphae

(คมสันต์ วรรณไสย, 2558)

2. ประเภท

เชื้อ *Candida* มีประมาณ 200 ชนิด ซึ่งชนิดก่อโรคที่สามารถพบได้บ่อยที่สุดในมนุษย์มีจำนวนแปดชนิด ในขณะที่ *Candida albicans* สามารถถูกพบได้มากที่สุด ความหลากหลายของสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ *Candida Albicans* ที่เกี่ยวข้องในพยาธิวิทยาของมนุษย์ได้เข้ามามีบทบาทเพิ่มขึ้น ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์เหล่านี้ทำให้การระบุสปีชีส์ของเชื้อ จำเป็นสำหรับการตรวจสอบทางระบาดวิทยาและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดรักษาผู้ป่วย เชื้อ *Candida* ชนิดอื่น ๆ ที่ถูกพบมีดังนี้ *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis* และ *Candida lusitaniae* ซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรค Candidiasis (ตาราง2.2) (Medical Diagnostic Laboratories, 2015, Online)

ตารางที่ 2.3 ชนิดของ *Candida* ที่ก่อโรค Candidiasis

Species	Frequency
Candida albicans	50%
Candida glabrata	15% - 30%
Candida parapsilosis	15% - 30%
Candida tropicalis	15% - 30%
Candida krusei	~2%
Candida dubliniensis	~1%
Candida kefyr	~1%
Candida lusitaniae	~1%

2.1 แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candid albicans*) มีลักษณะเซลล์รูปกลมหรือรี มีขนาด 3.5-6.0 x 4.0-8.0 μm ปรากฏสายราแท้และสายราเทียมมีการแตกหน่อระหว่างเซลล์ที่ต่อกัน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 2 ชั่วโมง พบโคโลนีบน HardyCHROM® มีลักษณะสีน้ำเงินเข้ม หรือสีเขียว จัดเป็นสายพันธุ์แคนดิดาที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar จะมีลักษณะค่อนข้างกลม เป็นสีขาวครีม โคนิเดียป่องปรากฏปลายสายราผนังหนาขนาด 8-12 ไมโครเมตร ก่อโรคเชื้อราในช่องปากมากถึง 75% ของประชากรก่อโรคเชื้อราในช่องคลอด และเป็นสาเหตุที่พบมากที่สุดเป็นอันดับสี่ของการติดเชื้อในระบบที่โรงพยาบาลโดยมีอัตราการตายสูงถึง 50% (Mayer, Wilson & Hube, 2013, p.119-128)

2.2 แคนดิดา ลูสิแทนีย (*Candida lusitaniae*) มีลักษณะเซลล์รูปไข่ คล้าย *C. tropicalis* และ *C. parapsilosis* แต่ขนาดเซลล์เล็กกว่า สายราเทียมที่เกิดขึ้นบางกว่า สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิ 30°C มีอุบัติการดื้อยา amphotericin B สูง ซึ่งเชื้อสกุลแคนดิดา ส่วนมากแล้วไม่ดื้อต่อยานี้ เป็นเชื้อราประจำถิ่นสามารถพบได้บ่อยในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น สามารถก่อโรคในร่างกายได้แก่ระบบปัสสาวะ หลอดลม กระแสเลือด ของเหลวในช่องท้อง ไต ช่องคลอด และผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจส่วนบน และทางเดินปัสสาวะซึ่งตรวจพบได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล และสามารถก่อโรคทางผิวหนังและช่องคลอดได้เพียงเล็กน้อย (Wawrysiuk, Rechberger, Futyma & Miotla, 2018, p.94–96)

2.3 แคนดิดา ครูซิไอ (*Candida krusei*) ชื่อเดิมคือ *C. pseudot tropicalis* มีลักษณะเซลล์รูปไข่ ลักษณะยาวเหมือนเมล็ดข้าว รีหรือ สี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 2-2-56 x 4.3-1 5.2 pm. สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงสุด 43-45°C โคโลนีบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) มีพื้นผิวด้านหยาบมีสีเหลือง สีขาว โคโลนีบน CHROMagar *Candida*® (Becton Dickins on, Heidelberg, Germany) ปรากฏโคโลนี หนาทึบ สีขาวอมม่วง ขอบสีขาวชัดเจน เชื้อ *C. krusei* ถูกพบได้ในแหล่งธรรมชาติ เช่น อากาศ ผลไม้ แหล่งน้ำเสีย หญ้าหมัก ดิน อาหาร รวมถึงผลิตภัณฑ์จากนม และเนื้อสัตว์ ผักดอง น้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำเชื่อม ไวน์ เป็นต้น ลักษณะการก่อโรคยังไม่ปรากฏเด่นชัด เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสทั่วไป พบในการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะในภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคช่องคลอดอักเสบจากเชื้อรา พบร่วมกับการติดเชื้อในกระแสเลือด การใส่ท่อภายในหลอดเลือด การติดเชื้อที่จอประสาทตา การติดเชื้อ *Candida krusei* มีเพิ่มขึ้นในปีที่ผ่านมาเป็นผลมาจากการดื้อยา Fluconazole, Azole ซึ่งเป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Guzel, Aydin, Meral & Kalkanci, 2013, Online)

2.4 แคนดิดา พาแรพซิโลซีส (*Candida parapsilosis*) มีลักษณะเซลล์กลมรูปไข่ ทรงกระบอก บางเซลล์ยาว อยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม สร้างสายราเทียม โคโลนีบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) มีสีขาวครีม เงา ผิวด้านหน้าโคโลนีเรียบหรือย่น *C. parapsilosis* ไม่มี Truehyphae ที่อยู่ในในรูปแบบ Pseudohypha สามารถพบได้ทั่วไปบนผิวหนังของมนุษย์ สามารถพบ *C. parapsilosis* เจริญเติบโตได้บ่อยทางการใส่สายอาหาร และใส่ท่อภายในหลอดเลือด สำหรับการแพร่กระจายของ Nosocomial ตามที่จับรถเข็น และพบตามสภาพแวดล้อมของโรงพยาบาล (Tóth, et.al., 2019, น.1-38)

2.5 แคนดิดา ทรอปปิคาลีส (*Candida tropicalis*) มีลักษณะเซลล์รูปกลมไข่ มีขนาด 4-8 x 5-11 µm โคโลนีบน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) มีสีขาวครีม ลักษณะเรียบผิวด้านหน้าโคโลนีเรียบ เมื่อบ่มเชื้อบนอาหาร CHROMagar Candida® ที่ 35°C 96 ชั่วโมง พบโคโลนีมีสีน้ำเงินเข้ม สร้างสายราเทียม บางครั้งสร้างสายราแท้ ไม่สร้างโคนิเดียป่องมีความสามารถในการก่อโรคเป็นที่สองรองจาก *C. albicans*, *C. tropicalis* สามารถตรวจพบเชื้อ *C. tropicalis* ในผู้ป่วย HIV ได้ 14.1% พบในผู้ป่วยมะเร็งในช่องปากได้ 42.8% และพบเชื้อจากผู้ป่วยติดเชื้อจากช่องคลอดได้ 26.4 % และมีความดื้อต่อยา Fluconazole 8% และดื้อยา Ketoconazole, Itraconazole และ Fluocytosine ถึง 4% (Zuza-Alves, Silva-Rocha, Futyma, Miotla, 2017, Online)

2.6 แคนดิดา เคอฟรี (*Candida Kefyr*) ถูกพบได้ในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ พบในระบบไหลเวียนโลหิต ระบบปัสสาวะ หลอดอาหาร ปากมดลูกและช่องคลอด ส่วนมากจะพบในประชากรที่ไม่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการศึกษาทางคลินิกแสดงให้เห็นถึงอัตราความชุกของ *Candida Kefyr* ค่อนข้างต่ำ ซึ่งในสหรัฐอเมริกา พบประมาณ 0.5% และสามารถพบได้มากในยุโรป (Medical Diagnostic Laboratories, 2015, Online)

2.7 แคนดิดา กราบาต้า (*Candida glabrata*) มีการกระจายตัวบน Sabouraud dextrose agar และเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42°C ใช้ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง ในการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ เชื้อราชนิดนี้มีโคโลนีขนาดเล็ก เป็นสีขาวครีมเรียบเนียนมันวาว หากเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic medium จะเห็นโคโลนีเป็นสีชมพูอมม่วง เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นเซลล์แบบ Blastoconidia คือเซลล์จะมีขนาดเล็กเพียง 1-4 µm นอกจากนี้ยังมีอัตราการติดเชื้อ *C. glabrata* เพิ่มสูงขึ้น ตอบสนองต่อยาต้านจุลชีพลดลง ได้แก่ ยาแอคไคโนแคนดิน และยาฟลูโคนาโซล และสามารถก่อให้การติดเชื้อในกระแสเลือดได้ อีกทั้งยังมีส่วนทำให้เกิดการตายในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อในกระแสเลือดจำนวนร้อยละ 21 มีรายงานล่าสุดเกี่ยวกับการก่อโรคของ *Candida glabrata* จะก่อให้เกิดการติดเชื้อ ได้แก่ กระจกตา, โรคติดเชื้อของเยื่อบุหัวใจ ลิ้นหัวใจ และหลอดเลือด, ช่องคลอด อักเสบ และช่องปาก (Rodrigues, Silva, Henriques, 2013, p.673-688)

3. โรคที่เกิดจากเชื้อราแคนดิดา

3.1 กลไกการก่อโรคของเชื้อรา *Candida* spp.

เชื้อตัวนี้เป็น Normal flora มีความสามารถในการยึดเกาะกับ Host tissue, สร้าง Secretory aspartyl proteases และ Phospholipase enzymes ได้ และสามารถเปลี่ยนรูปจาก yeast hyphae ได้ ส่วนมากจะพบการเจริญของเชื้อในบริเวณของผิวหนัง และเล็บที่มีความอับชื้นสูง ๆ โดยเฉพาะ Mucocutaneous เช่น บริเวณอวัยวะเพศ รอบ ๆ ทวารหนัก ขาหนีบ ซึ่งเชื้อตัวนี้เป็น Normal flora ของผิวหนัง ช่องปาก ช่อง คลอด และพบได้ในอุจจาระปกติ เชื้อที่พบบ่อยที่สุดคือ *Candida albicans* (คมสันต์ วรรณไสย, 2558, น.3-5)

ภาพที่ 2.4 ลิ้นของผู้ป่วย Oropharyngeal candidiasis พบรอยโรคเป็นปื้นขาวที่ลิ้น

(คมสันต์ วรรณไสย, 2558)

3.2 การก่อโรคของเชื้อ *Candida* spp. ในระบบต่าง ๆ

3.2.1 โรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก (Candidiasis of oral cavity) เนื่องจากเนื้อเยื่อในช่องปากมีสภาพเปียกชื้นและเป็นที่รวมของชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยกัน เมื่อร่างกายมีภูมิต้านทานต่อเชื้อน้อยลง เชื้อต่าง ๆโดยเฉพาะเชื้อรา สกุลแคนดิดาจะสามารถก่อให้เกิดโรคเชื้อราภายในช่องปาก และลำคอได้ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Thrush หรือ Oropharyngeal candidiasis เชื้อราในหลอดอาหาร เรียกว่า Esophageal candidiasis ผู้ที่มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อราในช่องปากและลำคอ ได้แก่ ทารกที่มีอายุน้อยกว่า 1 เดือน หรือที่คลอดจากมารดาที่มี Symptomatic vaginal candidiasis ระยะเวลาที่อยู่ในโรงพยาบาลหลังคลอดนาน หรือการรับทารกไว้ใน Intensive care nursery ทารกที่มี HIV-positive mothers ผู้ที่ติดเชื้อ เอชไอวี/เอดส์ ผู้ที่สวมใส่ฟันปลอม ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ที่ใช้ยาปฏิชีวนะหรือ Corticosteroids ในผู้ป่วยโรคหอบหืด ผู้ที่มีปากแห้งหรือรับประทานยาที่ทำให้ปากแห้ง ผู้ที่สูบบุหรี่ อีกทั้งยังสามารถพบได้ในผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีได้อีกด้วย (Pankhurst, 2013, p.1304) Oral thrush จะมีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวออกเทาคล้ายตะกอนนมบนเยื่อบุช่องปาก เมื่อขูดด้วยไม้กดลิ้นเบา ๆ จะเปิดเห็น Raw surface สีแดงหรือมีเลือดออก

การตรวจ KOH preparation จะพบ Mycelial forms หรือ Pseudohyphae และ Ovoid yeast forms หากพบเฉพาะ Yeast forms จะไม่ถือว่าเป็นผลบวกการส่งเพาะเชื้อได้ผลบวกไม่ช่วยในการวินิจฉัย เนื่องจากเป็น Normal flora ในผู้ป่วยที่มีมุมปากอักเสบหรือ angular cheilitis สามารถเกิดการติดเชื้อ *Candida* ซ้ำซ้อนที่เรียกว่า perleche ได้ การรักษา Oral thrush ในเด็กเล็กให้ Oralnystatinsuspension จำนวน 1 แสนยูนิต วันละ 4 ครั้งเด็กโตให้ 2 แสนยูนิต วันละ 4 ครั้ง หรือให้ Miconazole oral gel ทาวันละ 4 ครั้ง การใช้ Gentian violet ทาในปากเช่นในอดีตมีการใช้น้อยลงเนื่องจากยังไม่ได้ข้อสรุปเรื่อง Potential carcinogenicity สำหรับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง สามารถให้ยารับประทาน Fluconazole หรือ Itraconazole (ปาจรีย์ ฑิตธิวงษ์, 2561, น. 80-81)

3.2.2 โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนัง (Cutaneous candidiasis) บริเวณรอยพับ เช่น ขาหนีบ ง่ามก้น รักแร้ ใต้ราวนม ซอกนิ้วมือ นิ้วเท้า โดยเฉพาะในเด็ก คนอ้วน ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ได้ยาเสตียรอยด์ แม่บ้านที่ทำหน้าที่ในการซักล้าง ผิวหนังจะแดง บวม มีตุ่มหนองหรือตุ่มแดงกระจายรอบ ๆ ผื่นในลักษณะ Satellite lesions ร่วมกับมีขุยรอบ ๆ ตุ่มแดง ในลักษณะที่เรียกว่า Rings of scale มักพบที่คอ รักแร้ขาหนีบ ก้น อวัยวะเพศ มักมีอาการคันร่วมด้วย หากเป็นที่ Diaper area จะแสบและเจ็บปวดเวลาขับถ่าย เมื่อขูดขุยหรือตุ่มหนองไปตรวจ KOH Preparation จะพบ Pseudohyphae และ Budding yeasts การวินิจฉัยแยกโรคผื่นบริเวณ Diaper area ได้แก่ Contact dermatitis, Psoriasis ในทารกก็พบเป็นผื่นแดงในบริเวณ Diaper area ได้หากทารกมีไข้ผิวหนังแดงและมีผิวหนังลอกบริเวณขาหนีบ และคอ ควรนึกถึง Staphylococcal scalded skinsyndrome การรักษา Cutaneous candidiasis แนะนำให้ลดความอับชื้นบนผิวหนังอยู่ในที่อากาศเย็นสบาย เปลี่ยนผ้าอ้อมทารกบ่อยๆ ทายากลุ่ม Imidazoles วันละ 2 ครั้ง นาน 2–4 สัปดาห์ เช่น Ketoconazole, Clotrimazole, Econazole และสามารถใช้ Protective barrier ointments เช่น Zinc paste, Petrolatum ทาในบริเวณที่สัมผัสผ้าอ้อม (ปาจรีย์ ฑิตธิวงษ์, 2561, น.80-81)

3.2.3 โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อบุชนิดเรื้อรัง (Chronic mucocutaneous candidiasis) โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อบุมักเกิดที่ผิวหนังชั้นนอกสุดและเยื่อเมือกเท่านั้น มักพบที่ผิวหนังบริเวณรอยพับ ในผู้ป่วยบางรายมีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น โรคต่อมไร้ท่อพันธุกรรม เชื้อแคนดิดาจะลุกลามไปได้ทั่วร่างกาย เช่น ที่ลำตัว ศีรษะ ช่องปาก ลิ้น อวัยวะเพศ และเล็บ เกิดเป็นกลุ่มอาการเรียกว่า โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อบุชนิดเรื้อรัง (Chronic mucocutaneous candidiasis) ซึ่งพบได้ในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี และบางรายโรคมีอาการรุนแรงมากจนทำให้เสียชีวิตได้ เริ่มแรกลักษณะทางคลินิกจะเป็นตุ่มน้ำหนองเม็ดเล็ก ๆ สีแดงเกิดขึ้นหลายตุ่มรวมกันอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ซึ่งมีอาการเจ็บ ๆ คัน ๆ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะแตกออกแล้วรวมกันเป็นแผ่นฝ้าปนกับสะเก็ดสีเหลือง ผิวหนังรอบ ๆ แผ่นฝ้าจะมีอาการอักเสบ โรคค่อย ๆ ขยายตัวออกไปโดยรอบ

ผิวหนังที่เป็นโรคยกตัวเป็นแผ่นนูนขึ้นมา และมีสะเก็ดสีเหลืองปิดอยู่คล้ายเพลี้ยเกาะ เรียกว่า Crusty granuloma เมื่อใช้ปากคีบดึงสะเก็ดออกมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อแคนดิดาจำนวนมาก ถ้าโรคเกิดที่หนังศีรษะสามารถทำให้ผมร่วงได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยยังมีไข้ต่ำ ๆ เบื่ออาหาร ผอมแห้ง มีอาการขาดอาหารและโลหิตจาง ตับ ม้าม และต่อมน้ำหลืองขยายใหญ่สามารถคลำได้ เม็ดเลือดขาวมีจำนวนสูงขึ้น เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเร็วขึ้น บางรายเกิดโรคที่อวัยวะภายในได้ (Vázquez-González, Perusquía-Ortiz, Hundeiker, & Bonifaz, 2013, p.381-394)

3.2.4 โรคแคนดิดาบริเวณอวัยวะเพศ (Candidiasis of the genitalia) พบได้บ่อยในอวัยวะเพศหญิง จะมีตกขาว (Vaginal thrush) ลักษณะเป็นเมือกข้นสีขาวมีกลิ่นเปรี้ยวและมีอาการคันรุนแรง เยื่อบุภายในช่องคลอดจะมีลักษณะเปื่อยยุ่ย เป็นแผ่นฝ้าสีขาว มีบาดแผลขนาดเล็ก ๆ บางรายที่มีอาการหนักแล้วจะพบเมือกขาวจะไหลออกมานอกช่องคลอดลุกลามไปถึงทวารหนักและขาหนีบ นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นที่ก่อให้เกิดโรคแคนดิดาที่อวัยวะเพศ ได้แก่ หญิงตั้งครรภ์ และการร่วมเพศ อวัยวะเพศของผู้ชายก็อาจเกิดโรคจากเชื้อแคนดิดาได้ (*Candida balanitis*) ผู้ป่วยจะมีอาการแสบและคัน บริเวณอวัยวะเพศ และอาจพบการอักเสบของทางเดินปัสสาวะเกิดร่วมด้วย จะพบเมือกใส หรือสีขาวขุ่นเมื่อปัสสาวะในตอนเช้า ลักษณะทางคลินิกที่พบจะเกิดตุ่มมีลักษณะเป็นจุดสีแดงเล็ก ๆ กระจายรอบบริเวณด้านบนของปลายองคชาติ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะแตกออกกลายเป็นฝ้าสีขาว เปื่อยยุ่ยอยู่เต็มผิวหนังองคชาติ หลังจากที่ฝ้าเหล่านี้หลุดออกจะเห็นผิวเนื้อมีสีแดงสด (Jeanmonod & Jeanmonod, 2020, Online)

3.2.5 โรคแคนดิดาตามระบบ (Systemic candidiasis) ในภาวะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วยเด็ก ผู้ป่วยโรคมะเร็ง อาจเกิดโรคติดชื้อแคนดิดาร่วมกับโรคอื่น ๆ ได้ การวิเคราะห์ข้อมูลจากการตรวจที่โรงพยาบาลศิริราช 16,219 ราย ภายในเวลา 21 ปีระหว่าง พ.ศ. 2502-2522 ปรากฏว่ามีโรคติดชื้อราตามระบบ 165 ราย คิดเป็นร้อยละ 1 เชื้อที่พบได้บ่อย คือ แอสเปอร์จิลลัส แคนดีดา และคริปโตค็อคคัส คิดเป็นร้อยละ 37.29, 35.03 และ 12.99 ตามลำดับ ระบบต่าง ๆ ที่มักเกิดโรคติดชื้อแคนดิดา (ลัดดาวัลย์ ยืนยาว และสุภัสสร วันสุทะ, 2561,1-20) ได้แก่

3.2.5.1 ระบบทางเดินปัสสาวะพบได้ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยโรคแคนดิดาตามระบบ มักพบในผู้ป่วยที่มีสายสวนคาท่อปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ แล้วเชื้อลุกลามขึ้นไปก่อโรคที่ไต บางรายเชื้อกระจายไปตามหลอดเลือด ทำให้มีอาการไข้และหนาวสั่น

3.2.5.2 ระบบหัวใจ เกิดการอักเสบที่กล้ามเนื้อหัวใจ ผนังหรือเยื่อหุ้มหัวใจ มีอาการคล้ายกับที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น มีไข้ เสียงหัวใจเต้นผิดปกติ หัวใจล้มเหลว ซีด ม้ามโต มักพบในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหัวใจ โดยเฉพาะการเปลี่ยนลิ้นหัวใจ ผู้ป่วยที่มีสายสวนคาอยู่ได้รับน้ำเกลือทางหลอดเลือดดำเป็นเวลานาน หรือผู้ป่วยติดยาเสพติดชนิดฉีดยาเข้าหลอดเลือดดำ

3.2.5.3 ระบบประสาท อาจก่อให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบเกิดฝีชนิดต่าง ๆ ขึ้นในสมองเชื่อว่าเกิดจากการกระจายเชื้อตามหลอดเลือด หรือเชื้อเข้าโดยตรง เช่น การเจาะหลัง หรือได้รับการผ่าตัดระบบประสาท

3.2.5.4 ระบบทางดินอาหาร ก่อให้เกิดการอักเสบในกระเพาะและหลอดอาหาร ทำให้ผู้ป่วยเจ็บเวลากลืน อาหารไม่ย่อย เป็นโรคแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยโรคเอดส์

3.2.5.5 นอกจากนี้เชื้อแคนดิดา สามารถก่อโรคที่อวัยวะภายในได้ทุกที่ เช่น กระดูก ในลูกตา (Endophthalmitis) และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia)

3.3 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

จากตำแหน่งที่เป็นโรค ทำการขูดหรือป้ายมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลักการตรวจสด สิ่งส่งตรวจในสารละลาย Potassium hydroxide (KOH) 10-30% หรือการย้อมแกรมจะทำให้เห็นลักษณะรูปร่างของ *Candida albicans* หรือ *Candida* spp. อื่น ๆ ได้ชัดเจน และโคโลนีที่เพาะได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาทดสอบการสร้าง Germ tube และการสร้างสีโคโลนีบน CHROMagar *Candida* เพื่อวินิจฉัยและรายงานผล *Candida* แบบ Presumptive identification (มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ และสุรางค์ เดชศิริเลิศ, 2561, น.207-209)

ตารางที่ 2.4 สีโคโลนีของ *Candida* species บน CHROM agar *Candida*

***Candida* species**	**สีโคโลนีบน CHROM agar *Candida***
Candida albicans	bright green/ dark green
Candida dubliniensis	dark green/ bright green
Candida tropicalis	dull greenish blue
Candida krusei	rose -colored
Candida parapsilosis	pale purplish pink
Candida glabrata	pale purplish pink
Candida guilliermondii	Light purple
Candida famata	dull greenish blue/ bright green

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Ins ทดสอบได้ 2 วิธีคือ Cinical and Laboratory Instirure (CLS) วิธีทดสอบได้แก่

1. Disc diffusion method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเชิงคุณภาพที่พัฒนาขึ้นโดย Kirby - Bauer method ในปีค.ศ. 1966 และได้รับการรับรองว่าเป็นวิธีมาตรฐานโดยทำให้ตัวยาจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจใช้แผ่นยาเป็นกระดาษกรองรูปกลม (Filter paper disk) หรือเป็นเม็ดยาหรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่ยาลงไป เพื่อให้ยาซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่ที่มีความเข้มข้นต่ำ เพื่อยับยั้งการเจริญของบนผิวหน้าของอาหารแข็ง ซึ่งความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพจะลดลงตามระยะห่างจากแผ่นกระดาษ โดยหลังจากบ่มเชื้อในสภาวะที่หมาะสมจะนำออกมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมใสที่เกิดจากเชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (Clear zone หรือ Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ผลที่ได้จะมีค่าสอดคล้องกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (Minimal inhibitory concentration: MIC) วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Dissdiffusion method) (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556, น.434-436)

1.1 วิธีการทดสอบ

1.1.1 อาหารที่ใช้ในการทดสอบ (Test medium) อาหารมาตรฐานที่นิยมใช้สำหรับทดสอบความไวต่อสารต้านเชื้อจุลชีพคือ Mueller-Hinton agar (MHA) เนื่องจากพีเอชและสารดังกล่าวมีผลต่อฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพบางชนิด อาหารต้านเชื้อชนิดนี้จึงมีการควบคุมค่าต่าง ๆ ที่เหมาะสม ได้แก่ค่า pH เป็นกลางอยู่ระหว่า 7.2-7.4 และมีการควบคุมปริมาณไทมิดิน (Thymidine) ให้ปริมาณน้อยมากหรือไม่มีเลย ควบคุมประจุบวก Cation ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{+}) และแมกนีเซียม (Mg^{+})ไม่เกิน 25 มิลลิกรัม/ลิตร และ12.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในการใช้ทดสอบเชื้อเมื่อใส่ในภาชนะทดสอบต้องกำหนดความหนาของอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 มิลลิเมตร สำหรับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ต้องใช้ปริมาตรเท่ากับ 25 มิลลิลิตร ในจานอาหารที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตรต้องใช้ปริมาณอาหารประมาณ 60 มิลลิลิตร

1.1.2 ปริมาณเชื้อทดสอบ (Inoculum size) การเตรียมเชื้อทำได้ 2 วิธีคือ การเพาะเชื้อในอาหารเหลวและบ่มเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง (Growth method) หรือเขี่ยเชื้อจากโคโลนีหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง มาใส่ในน้ำเกลือ (Normal saline) (Direct colony suspension) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้ทั้ง 2 วิธีมาใช้เครื่องวัดความขุ่นของเชื้อ (Bench-top nephelometer) เพื่อให้

ได้เชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 Colony forming unit/ml (CFU/ml) หรือปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFerland standard (เตรียมโดยใช้แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) ร้อยละ 1.175 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสม Sulphuric acid ร้อยละ 1 จำนวน 99.5 มิลลิลิตร) หรือ) และนำมาใช้ภายในเวลา 15 นาที

1.1.3 วิธีเพาะเชื้อและบ่มเชื้อ (Inoculation and incubation) โดยจุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อในน้ำเกลือปกติที่มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 Mcfarland standard บิดสำลีกับผนังหลอดอาหารพอหมาดๆ และนำไปป้าย บนผิวหน้าอาหาร MAH (Mueller-Hlinton agar) ถี่ ๆ เพื่อให้เชื้อกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอ โดยป้ายเป็น 3 ระนาบ ซึ่งจะทำมุมกันประมาณ 60 องศา วางทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้นนำแผ่นที่มีสารต้านจุลชีพที่พักทิ้งไว้จนสารซึมเข้าไปดีแล้วมาวางบนจานอาหาร และเพื่อป้องกันการซ้อนทับของวงใสที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ จึงต้องกำหนดขนาดจานอาหารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร สามารถวางแผ่นสารต้านจุลชีพได้ไม่เกินจำนวน 12 แผ่น และจานอาหารที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สามารถวางได้ไม่เกิน 6 แผ่น ใช้ Forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นสารต้านเชื้อจุลชีพวางบนผิวหน้าอาหารแล้วกดเบา ๆ เพื่อให้แผ่นสารแนบสนิทไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยคีบครั้งละ 1 แผ่น จากนั้นนำไปบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35± 2 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ภายในเวลา 15 นาที แล้วรายงานผล

1.1.4 แผ่นสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial disk) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลักษณะเป็นแผ่นกระดาษกรองรูปกลม สีขาว รายละเอียดบนแผ่นสารต้านจุลชีพประกอบด้วยชื่อย่อ ปริมาณยา และควรเก็บในกล่องที่มีสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หรือ 6 เดือน

1.2 รายงานผล โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญด้วยไม้บรรทัดหรือคาลิเพอร์ เป็นหน่วยมิลลิเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในตารางแปลผลมาตรฐาน (Standard interpretive chart) ใน CLSI guidelinc (Zone diameter interpretive standard) โดยรายงานผลเชิงคุณภาพไว (Susceptible, S) ไวปานกลาง (Intermediate, I) หรือ ดื้อ (Resistant, R)

2. Broth dilution method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเชิงปริมาณโดยการเจือจางสารต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กันในอาหารเหลว และเติมเชื้อลงไป ภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพนั้นสามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อได้อาหารเหลวนั้นจะใส ถ้ายับยั้งไม่ได้อาหารเหลวนั้นจะขุ่น วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือการเจือจางยาในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลา เครื่องมือและแรงงานในการทำมาก แต่ผลการทดลองที่ได้แน่นอนกว่า (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และคนอื่น ๆ, 2556, p.443-444)

2.1 วิธีการทดสอบ Broth dilution จำแนกได้ 2 วิธี

2.1.1 Broth macro dilution (Tube dilution) Test วิธีนี้จะทดสอบในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลว 1-2 มิลลิลิตร

2.1.2 Broth micro dilution test วิธีทดสอบในถาดหลุมพอลิสไทรีนขนาดเล็ก (Polysterene microtiter tray) ที่มีหลุมทดลอง 80-100 หลุม (ส่วนใหญ่ 96 หลุม) ใช้อาหารเหลว 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม โดยเจือจางสารต้านจุลชีพแบบ 2 เท่า Two – fold serial dilution) ในอาหารเหลว Muller-Hinton broth จากมากไปน้อยในหลุมทดลองแต่ละหลุมหรือหลอดทดลอง และเติมเชื้อที่ทำการปรับขนาดแล้วเติมลงในอาหารเหลวที่มีสารต้านจุลชีพเจือจางอยู่แล้ว ในปริมาตรที่เท่ากันจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อในหลุมแต่ละหลุมหรือหลอดทดลอง เท่ากับ 0.5x 10^5 CFU/ml แล้วนำถาดหลุมหรือหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง แล้วรายงานผล

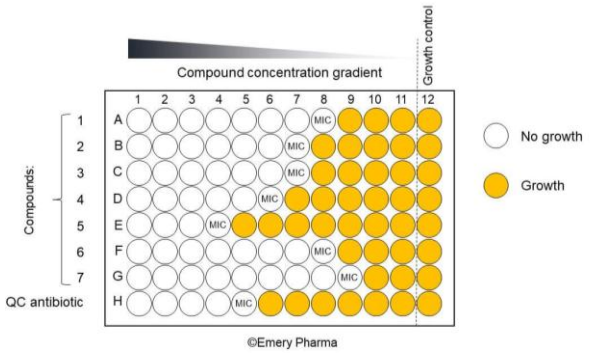
2.2 การรายงานผล จะรายงานผลในเชิงปริมาณ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ โดยดูความใสในหลุมทดลองหรือหลอดด้วยสายตา รายงานผลเป็นค่า MIC มีหน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) และรายงานผลในเชิงคุณภาพโดยนำค่า MIC ไปเปรียบเทียบในตาราง CLSI guideline โดยรายงาพผลเชิงคุณภาพไว (Susceptible, S) ไวปานกลาง (Intermediate, I) หรือ ดื้อ (Resistant, R)

3. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum inhibitory concentration, MIC)

ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) เป็นระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีความเจือจางสูงสุดหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ มี 2 วิธี (ยุพิน ทันวิจิตรพันธ์, 2558, น.22)

3.1 Direct plate assay technique เป็นวิธีการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์และค่า MIC โดยเตรียมสารให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้นทีละ 2 เท่า (Two-fold dilution) และใช้เทคนิคการให้สารซึมซ่านจากสิ่งรองรับที่อยู่บนหรือในอาหารวุ้นที่เพาะเชื้อไว้ ตรวจสอบความเจือจางสุดท้ายที่ให้ค่าวงใสซึ่งจะเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.2 Tube dilution turbidimetric technique เป็นวิธีการตรวจสอบหาสารยับยั้งจุลินทรีย์และค่า MIC โดยเตรียมสารให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้นทีละ 2 เท่า ในหลอดทดลองโดยเทคนิคการเจือจางสารทดสอบในอาหารเหลว และตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวหลังการบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยความเจือจางสุดท้ายที่เชื้อไม่สามารถเจริญ คือ ค่า MIC

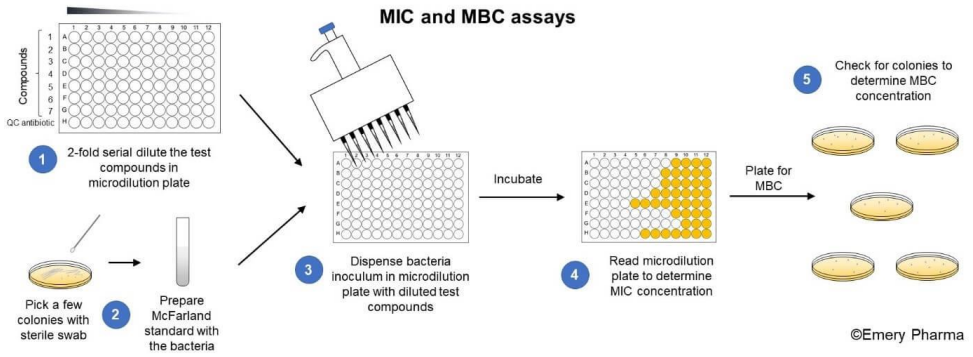


ภาพที่ 2.5 การอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Broth microdilution

(Emerypharma, 2020, Online)

4. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (Minimum fungicidal concentration, MFC)

จากเทคนิคในการหาค่า MIC ดังกล่าวสามารถทดสอบและเปรียบเทียบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบสารใด ๆ ที่คาดว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแล้วยังสามารถศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการฆ่าเชื้อรา (MFC) ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.9 % สามารถประเมินจากความ เข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) โดยการนำอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ MIC ขึ้นไป มาตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารวุ้น ความเข้มข้นใดที่ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลง 99.9 % จากเชื้อเริ่มต้น คือ ค่า MFC (ยุพิน ทัศนวิจิตรพันธ์, 2558, น.23)



ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการหาค่า MIC และ MFC

(Emerypharma, 2020, Online)

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยาป้ายปาก

โดยทั่วไปรูปแบบยาที่เหมาะสำหรับใช้ภายในช่องปาก (Buccal administration) จะต้องไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง และมีลักษณะยืดหยุ่นได้แก่พวก Hydrogel ซึ่งเป็น Hydrophilic Matrices ซึ่งเกิดการพองตัวเมื่ออยู่ในน้ำ มีลักษณะเป็น Crosslinked ที่ไม่ละลายใน Medium และจะดูดซับน้ำเท่านั้น เมื่อ Hydrogel มีลักษณะเป็น Metrix บรรจุอยู่ภายใน มีการดูดซับน้ำจะเกิดการคลายตัว เกิดเป็นช่องให้ยาผ่านออกมาได้ สำหรับการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ในสภาพของเยื่อบุในช่องปากควรรักษาความเข้มข้นของคอร์ติโคสเตียรอยด์ในเยื่อบุแก้มด้วยการดูดซึมของระบบน้อยที่สุด ซึ่งสามารถทำได้โดยการรวมตัวของยาในรูปแบบยาพิเศษ ปริมาณของการดูดซึมยาขึ้นอยู่กับเวลาของการเปิดรับยาที่เยื่อบุแก้ม รูปแบบยาที่ใช้สำหรับยังเยื่อบุในช่องปาก ได้แก่ น้ำยาบ้วนปากทิงเจอร์ และขี้ผึ้ง ซึ่งน้ำยาบ้วนปากมีช่วงเวลาที่ปลดปล่อยสารสำคัญภายในช่องปากที่สั้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับยารูปแบบอื่น โดยการเติมพอลิเมอร์ชนิดเหนียว สามารถเพิ่มความเข้มข้นของตำรับ ให้สามารถยึดเกาะ และเพิ่มเวลาในการสัมผัสเยื่อบุผิวได้นานขึ้น โดย Mucoadhesive ที่เป็นโพลิเมอร์ชนิดที่ได้จากธรรมชาติ กึ่งสังเคราะห์ หรือโพลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งมีคุณสมบัติยึดเกาะกับ Mucous membrane ของร่างกายได้ ที่นิยมนำมาใช้ในตำรับยาที่ใช้ในช่องปาก ได้แก่ Hydroxypropyl cellulose, Carbopol, Sodium carboxymethyl cellulose, Gelatin และPectin (Hamishehkar, Nokhodchi, Ghanbarzadeh, & Kouhsoltani, 2015, p.277-282)

1. คุณสมบัติของยาป้ายปาก

ยาป้ายปากต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องมีความหนืดและสามารถติดที่เนื้อเยื่อได้เป็นระยะเวลานาน เพื่อให้สารสำคัญหรือตัวยาค่อย ๆ ออกฤทธิ์บริเวณที่ต้องการ ซึ่งการเพิ่มความหนืดของตำรับยา เป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้เพื่อคงสภาพของตำรับไว้ได้นาน ลดอัตราการตกตะกอนของยาโดยเพิ่มความหนืดของตัวกลาง ซึ่งทั่วไปสารช่วยบางชนิดก็สามารถช่วยเพิ่มความหนืดของตำรับได้แต่ต้องใช้ในปริมาณที่สูง และให้ความหนืดไม่คงที่ เช่น น้ำตาลหรือกลีเซอรีน ขณะที่สารให้ความหนืดได้ดีในระดับความเข้มข้นน้อยกว่า และให้การไหลแบบ Pseudoplastic flow เป็นการไหลแบบที่มีความหนืดลดลงเมื่อมีความเค้นเพิ่มขึ้น ได้แก่ สารกลุ่ม พอลิเมอร์ ซึ่งโดยทั่วไปจะเน้นตำรับที่มีตัวกลางของเหลวเป็นน้ำ โมเลกุลพอลิเมอร์สามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำ (Hydration) ซึ่งอากเกิดเป็นแบบพันธไฮโรเจน (Hydrogen bond) นอกจากนี้ยังสามารถกักโมเลกุลของน้ำไว้ได้เรียกว่า Hydrocolloid ค่าความหนืดของสารละลายที่วัดได้จะไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับวิธีและสภาวะที่แตกต่างกัน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลยังมีผลต่อสมบัติในการเพิ่มความหนืดด้วย สารเพิ่มความหนืดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ กลุ่มพอร์ลิเมอร์จากธรรมชาติ และอนุพันธ์เซลลูโลส (สถาพร นิ่มกุลรัตน์, 2548, น. 85-91)

1.1 ในกลุ่มพอร์ลิเมอร์จากธรรมชาติ (Natural polymer) เป็นของเหลวที่ไหลออกมาจากเปลือกไม้เมื่อแตก หรือเป็นแผล และจะแข็งตัวเป็นก้อน เมื่อสัมผัสกับอากาศ (Exudate) เช่น สารสกัดจากสาหร่ายทะเล (Seaweed) หรือสกัดจากเมล็ดพืช สามารถแบ่งได้หลายประเภท ได้แก่

1.1.1 Acacia (Gum Arabic) เป็นส่วยผสมของเกลือแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียมของ Arabic acid ละลายได้ทั้งน้ำร้อนและเย็น ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นกรด มีความหนืด 5-9 และจุลินทรีย์สามารถทำให้ความหนืดลดลงได้ นิยมใช้เป็นสารช่วยแขวนตะกอน เนื่องจากให้ความหนืดต่ำ ใช้เป็นสารทำอิมัลชั่น (Emulsifier) เนื่องจากมีสมบัติลดแรงตึงผิวได้

1.1.2 Tragacanth ได้จากพืช Genus Astragalus มีทั้งส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ให้ความหนืดสูงสุดเมื่อละลายในน้ำเย็น คงสภาพที่ช่วง pH กว้าง แต่ทนต่อแอลกอฮอล์ได้เพียงเล็กน้อย และจุลินทรีย์สามารถทำลายตัวได้ง่าย

1.1.3 Pectin เป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่แยกได้จากเปลือกของผลไม้พวกส้ม แอปเปิ้ล มีสมบัติละลายน้ำได้ มี pH เป็นกรด ก่อนละลายควรทำให้เปียกด้วยแอลกอฮอล์ หรือกลีเซอรีน เพื่อป้องกันการเกาะเป็นก้อน และช่วยเก็บน้ำไว้ได้ดี เป็นสารทำให้เกิดเจลสำหรับตัวยาที่เป็นกรด

1.1.4 Xanthan gum นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ประกอบด้วย Mannose Glucose และ Glucuronic acid ละลายได้ในน้ำ ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ คงสภาพได้ดีที่ pH ต่ำ

1.2 อนุพันธ์ของเซลลูโลส (Cellulose derivative) มีสมบัติไม่ละลายน้ำ มี pH อยู่ในช่วง 3-11 แต่จะเกิด Acid degradation ได้เมื่อ pH ต่ำกว่า 3 สามารถทนความร้อนได้ดี โครงสร้างหลักประกอบด้วย Anhydroglucose unit มี substituent group ต่าง ๆ มาแทนที่ Hydroxyl group ในโครงสร้าง ทำให้เกิดการลดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Cellulose chain ลง และทำให้เกิด Hydration ได้ง่ายขึ้น ได้แก่

1.2.1 Carboxy methyl cellulose sodium (CMC) อยู่ในรูปเกลือ Sodium ของ Cellulose มีประจุลบ ละลายได้ทั้งน้ำร้อนและน้ำเย็น แต่ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ คงสภาพดีที่ pH 5-10 ทนต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า Gum ที่ได้จากธรรมชาติ ทนความร้อนสูง สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนหรือเกิดเจลขึ้นได้

1.2.2 Methyl cellulose (MC) เป็น Ionic polymer จึงไม่มีประจุในโครงสร้าง ละลายได้ดีในน้ำเย็น ไม่ละลายน้ำร้อน การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดของ MC ลดลง และกลายเป็นเจลได้สามารถผันกลับได้เมื่ออุณหภูมิลดลง

1.2.3 Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) เป็น Ionic polymer ให้ความหนืดที่แตกต่างกัน สามารถเกิดเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิสูง เป็นสารเพิ่มความหนืดที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว และใช้เป็นสารก่อฟิล์มในการเคลือบยาเม็ด

1.2.4 Ethyl cellulose (EC) เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ มีการใช้น้อย จะใช้เพิ่มความหนืดในสารละลายของแอลกอฮอล์และนิยมใช้เป็นสารก่อฟิล์มที่ช่วยกันน้ำได้

2. คุณลักษณะของของยาป้ายปากที่ต้องการ

การตั้งสูตรตำรับยาป้ายปาก จะมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ สารเพิ่มความหนืดและความคงตัว สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ สารแต่งกลิ่น สารแต่งรส ซึ่งยาป้ายปากที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ (เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์, 2556, น.11-15)

2.1 ต้องมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน

2.2 ไม่ระคายเคืองต่อเยื่อบุในช่องปาก

2.3 มีค่า pH เท่ากับ 5-9.5 เนื่องจากหากมีค่า pH ต่ำกว่า 5 จะมีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งจะละลายแร่ธาตุออกจากผิวเคลือบฟัน และหากค่า pH สูงกว่า 9.5 จะมีฤทธิ์เป็นด่างมากจนทำลายเซลล์เยื่อบุผิวในช่องปากได้

2.4 มีรสชาติเหมาะสมไม่รุนแรง

3. สารประกอบของผลิตภัณฑ์ยาป้ายปาก

3.1 กลีเซอรีน (Glycerin) มีหน้าที่ Antimicrobial preservative, Humectant, Plasticizer, Solubilizer, Sweetening agent และ Tonicity agent กลีเซอรีนถูกนำมาใช้ในตำรับยาต่าง ๆ ได้แก่ ยารับประทาน ยาใช้กับหู ยาใช้กับตา ยาใช้ภายนอก และยาฉีด เป็นต้น ในขนาดที่รับประทานได้จะเป็นยาระบายอ่อน ๆ หากรับประทานในปริมาณมากจะทำให้ปวดหัว กระหายน้ำ คลื่นไส้ มีภาวะน้ำตาลสูงได้ แต่หากนำมาใช้เป็น Excipient หรือ Food additive กลีเซอรีนจะไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง โดยปริมาณที่ใช้ในตำรับคือ 5-20% (สำหรับตำรับยาป้ายปาก) (เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์, 2556, น.11-15)

3.2 โซเดียม เบนโซเอต (Sodium Benzoate) เป็นเกลือโซเดียม ของกรดเบนโซอิก มีความสามารถในการละลายในน้ำหรือแอลกอฮอล์ มีสูตรทางเคมีคือ $NaC_7H_5O_2$ มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ ในสภาวะที่เป็นกรด จึงนิยมถูกนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังมีการใช้โซเดียมเบนโซเอตในน้ำยาบ้วนปากที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบและยาแก้ไอชนิดน้ำเชื่อมอีกด้วย

3.3 น้ำ (Water) มักใช้เป็นกระสายยา (Vehicle) ของยาหลายชนิด เนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญของ Physiological fliud ในร่างกายมนุษย์ จึงเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์และไม่เป็นอันตราย น้ำที่ใช้ในการเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจะเป็นน้ำกลั่น ได้จากการทำ Ion-exchange treatment

4. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Stability test)

สารละลายน้ำที่มีความคงตัวต้องใส มีสี และกลิ่นเหมือนตอนเริ่มผลิต ตลอดอายุของผลิตภัณฑ์ สิ่งที่แสดงความไม่คงตัวของเครื่องสำอางในรูปแบบสารละลาย (Solution) คือ การขุ่นและการเกิดการเจริญของเชื้อ หรือเกิดก๊าซจากปฏิกิริยาเคมี ในการศึกษาความคงตัวของสารละลายนั้นแบ่งออกเป็นกาประเมินทางกายภาพ และทางเคมี โดยมีขั้นตอน ดังนี้ (เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์, 2556, น.15-16)

4.1 การศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง (Accelerated studies) เป็นการศึกษาเพื่อที่จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือฟิสิกส์ของผลิตภัณฑ์ โดยการเก็บตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงกว่าความเป็นจริง มีวัตถุประสงค์ในการที่จะหาตัวแปรทางจลนศาสตร์เพื่อที่จะทำนายระยะเวลาของการสิ้นอายุของผลิตภัณฑ์โดยประมาณ การใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง มี 2 ลักษณะ คือ

4.1.1 ทดสอบโดยวิธี Heating cooling cycle โดยเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 24-48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบทั้งสิ้น 5-8 รอบ แล้วนำมาประเมินผล โดยศึกษาความคงตัวทางเคมีโดยพิจารณาจาก ความใส สี และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ก่อนและหลังสภาวะเร่ง (Heating cooling cycle)

4.1.2 ทดสอบโดยวิธี Freeze and thaw cycle โดยการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในช่องแช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 5-8 รอบ แล้วนำมาประเมินผล

4.1.3 การเร่งโดยแสง ซึ่งพลังงานแสงอาจเร่งให้เกิดการ ซีดจาง การเปลี่ยนสี กลิ่น หรือเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งสารบางชนิดในตำรับอาจสลายตัวโดยแสงทำให้มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม

4.1.4 การเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก โดยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation method) หรือการเขย่า (Shake) สามารถทดสอบโดยวิธีใช้การปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วิธีนี้จะเร่งการเกิดตะกอนของสารในตำรับหรือไม่

4.2 การศึกษาความคงสภาพแบบระยะยาว (Long term studies) เป็นการศึกษาความคงสภาพเพื่อที่จะยืนยันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยเก็บยาตามสภาวะที่ระบุไว้บนฉลาก แล้วจึงเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบ เมื่อเริ่มต้น และทุก ๆ 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 เดือน และทุกปีจนกว่าจะเกินวันสิ้นอายุในสภาวะต่าง ๆ เพื่อหาความหมาะสมในการเก็บผลิตภัณฑ์ เช่น อุณหภูมิ 4, 15, 30 และ 45°C

4.3 อุณหภูมิห้อง (Room temperature) ประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 31°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70% ดังนั้นถ้ามีห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นได้ ก็ควรกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 30+/-2°C และความชื้นสัมพัทธ์ 70+/-5%

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กนกวรรณ วงศ์เดช ฐิตาพร ช่างเรือ และเอนก ภู่ทอง (2561, น.1394-1401) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida* spp. ของ Cinnamaldehyde ร่วมกับ Fluconazole ในหลอดทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งราของซินนามอลดีไฮด์ (Cinnamaldehyde) ร่วมกับยาฟลูโคนาโซล (Fluconazole) ต่อ *Candida* spp. ในหลอดทดลอง โดยทดสอบหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของ Cinnamaldehyde และ Fluconazole ต่อ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของ Cinnamaldehyde ร่วมกับ Fluconazole ด้วย Chequerboard microtiter technique จากการศึกษาพบว่าค่า MIC ของ Fluconazole ต่อ*C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ*C. albicans* U821/10 เท่ากับ 128, 128, 1 และ 0.25 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่ Cinnamaldehyde สามารถยับยั้ง *Candida* ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 125 µg/ml จากการทดสอบด้วย Chequerboard microtiter technique พบว่า Cinnamaldehyde ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ (Indifferent) ของ Fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 แต่กับ *C. tropicalis* U624/10 พบว่า Cinnamaldehyde ต้านฤทธิ์ (Antagonistic activity) ของ Fluconazole ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า Cinnamaldehyde ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ Fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. ในหลอดทดลอง

กานต์รวี บำรุงเชาว์เกษม (2561, น.3-4) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดใบหูกวางโดยใช้ใบหูกวางที่มีสีแตกต่างกัน ดังนี้ ใบหูกวางสีเขียว ใบหูกวางสีเหลือง และใบหูกวางสีแดงหมักใน อะซีโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดใบหูกวางสีเหลือง ที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซีโตน มีปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 852.14±3.35 และ 515.10±0.30 มิลลิกรัม สมมูลเคอร์เซตินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่า ใบหูกวางสีเขียวที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* เท่ากันที่ 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใบหูกวางสีเหลืองและสีแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด มีค่า MIC เท่ากันคือ 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากันที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MBC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ศิวพงษ์ โกสิงห์, ภัทรียา พลซา, กัลย์กนิต พิสมยรมย์, พรพิมล แสงจันทร์ และ สุพัฒน์ พลซา (2561, น. 85-91) ใบหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn.) มาทดสอบฤทธิ์ยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ก่อโรคในปลากัด โดยนำน้ำสกัดใบหูกวางมาทำให้เป็นผง และทดสอบการยับยั้งเชื้อ

ด้วยการใช้กระดาษกรองปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีระดับความเข้มข้น 600, 900, 1,200 และ 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีค่า Inhibition zone เท่ากับ 1.0.±0.0, 1.0±0.0, 1.5±0.5 และ 2.5±0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลากัดตาย เริ่มต้นที่ 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสูงสุดเท่ากับ 2,155 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,789 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC50 96 hrs)

ซูฮัยลา สะมะแอ, เบญจวรรณ พูนธนานิวัฒน์กุล, โรสนานี เหมตระกูลวงศ์ และพโนมล ชมโฉม (2560, น.1-5) ได้ศึกษาผลของสารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษต่อ *Candida albicans* ที่ก่อโรคผิวหนัง ในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี Agar Well Diffusion method นำมาหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี Broth Dilution Test และหาค่า Minimal Fungicidal Concentration (MFC) พบว่า สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากพิกัดตรีกาฬพิษมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* โดยมีค่า Inhibition zone เท่ากับ 19.67 ± 0.58 mm มีค่า MIC เท่ากับ 4 mg/ml และค่า MFC เท่ากับ 256 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบพิกัดตรีกาฬพิษกับยามาตรฐาน พบว่า ค่า MIC สารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษมีค่ามากกว่า 2 เท่าของยามาตรฐาน Ketoconazole และมีค่าเท่ากันกับยามาตรฐาน Salicylic Acid ส่วนค่า MFC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา พบว่าสารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษมีค่ามากกว่า 4 เท่าของยามาตรฐาน Ketoconazole และมากกว่า 8 เท่าของยามาตรฐาน Salicylic Acid พิกัดตรีกาฬพิษเป็นชื่อของตำรับสมุนไพรไทยแต่ดั้งเดิม โดยพิกัดตรีกาฬพิษมีความหมายว่าจำนวนตัวยาแก้พิษตามกาล 3 อย่าง ได้แก่ รากกะเพราแดง หัวกระชาย และเหง้าข่า สรรพคุณของพิกัดตรีกาฬพิษ คือ บำรุงธาตุ แก้ไข้สันนิบาต แก้เสมหะ และโลหิต แก้พิษตานซาง บำรุงกำหนัด จากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ดังนั้นสารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษควรจะเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการพัฒนาไปเป็นตำรับยา และเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคผิวหนังในอนาคต

วัชริยา ภูรีวิโรจนกุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน (2560, ออนไลน์) การศึกษาสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ, 70%เอทิลแอลกอฮอล์ และ 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila, Edwardsiella tarda, Enterobacter sp, Plesiomonas shigelloides, Pseudomonas sp., Streptococcus sp.* และ *Staphylococcus sp*. ที่พบในปลากัด ทดสอบโดยวิธี Paper disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) พบว่าสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ และ70% เอทิลแอลกอฮอล์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าการใช้ 95%เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลาย การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ, 70%เอทิลแอลกอฮอล์ และ

95% เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) มีค่าเท่ากับ 375-750, 375 และ 375-750 ppm ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) มีค่า 1,500-3,000, 1,500 และ 1,500-3,000 ppm ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางที่ทำให้ลูกปลากัดตายครึ่งหนึ่ง (LC50) ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 2,200, 750 และ 880 ppm ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดใบหูกวางเนื่องจากสามารถยับยั้ง และกำจัดแบคทีเรียได้ดีและมีค่าความเป็นพิษต่อลูกปลากัดต่ำ

วิณากร ที่รัก (2558, บทคัดย่อ) ศึกษาการใช้ใบหูกวางในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารเลี้ยงกุ้ง สังเกตุการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกราม ทดลองโดยการนำกุ้งก้ามกรามที่ผ่านการอนุบาลมาแล้ว มาสุ่มแบบสมบูรณ์ จำนวน 420 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว คละเพศ เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนในถังขนาด 500 ลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางที่ 0.5, 1 และ 2 % และกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารเพียงอย่างเดียว พบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับสารอาหารผสมสารสกัดหยาบใบหูกวางในระดับ 1 % มีค่าอัตราน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการรอดตาย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ได้ดีที่สุด

พรทิพ กันภัย (2557, น.1) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิงบางชนิด โดยเก็บตัวอย่างพืชวงศ์ขิง ในจังหวัดกาญจนบุรีจำนวน 4 ชนิดคือ Zingiber sp., Zingiberalpiniasp., Zingiber zerumbet L.Smith. และ Boesenbergiasp. จากนั้นนำส่วนเหง้าสดไปสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ นำส่วนของเหง้าที่ผ่านการอบแห้ง และบดละเอียดสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Salmanella typhimurium*, *Serratia marcescen* และเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Broth dilution ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายพรานมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อดีที่สุด สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ*Serratia marcescen* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56, 3.12, 3.12, 1.56 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับและมีค่า MBC เท่ากับ 3.12, 6.25, 6.25, 3.12 และ 12.50 mg/ml ตามลำดับ และต้านเชื้อราได้ทั้ง 3 ชนิดคือ *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56, 1.56 และ 0.39 mg/ml ตามลำดับ มีค่า MBC เท่ากับ 3.12, 3.12 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ

ธนิยา หมวดเชียงคะ, บุญนิตย์ ทวีบูรณ์, รัตติพร กายเพชร และสร้อยศิริ ทวีบูรณ (2556, น.177-183) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของวานิลลิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก ของสารแต่งกลิ่นวานิลลา ต่อเชื้อราในช่องปาก คือ แคนดิดา อัลบิแคนส์, แคนดิดา ครูซิไอ, แคนดิดา พาแรพซิโลซิส, และ แคนดิดา กลาบราตา พบว่า สารละลายวานิลลินที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 500-625 มิลลิโมลาร์ ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาได้ โดยมี ขนาดของขอบเขตการยับยั้งเชื้อแตกต่างกัน ตั้งแต่ 8-25 มิลลิเมตร ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่สามารถยับยั้งเชื้อแคนดิดาสปีชีส์ต่างๆ มีค่าตั้งแต่ 3.91-15.63 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อแคนดิดามีค่า 7.81 และ 31.25 มิลลิโมลาร์

Arjariya, Nema & Tiwari (2013, p.596-601) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบผลกระทบทางพิษวิทยาต่อสารสกัดด้วยน้ำของใบ *Terminalia Cattappa* Linn. ในหนู ซึ่ง *Terminalia catappa* Linn. เป็นพืชที่มีการนำใบมาใช้เป็นยาพื้นบ้านกันอย่างแพร่หลาย ในการรักษาโรคผิวหนัง, ไวรัสตับอักเสบ, โรคอักเสบ, โรคเบาหวาน และโรคอื่น ๆ การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบและประเมินความปลอดภัยของสารสกัดด้วยน้ำของใบหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn) โดยการพิจารณาความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นในหนู จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางพบว่ามีความปลอดภัยจากการรับประทานในขนาด 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ตามแนวทาง OECD ฉบับที่ 423 โดยการสังเกตพฤติกรรมทั่วไป สัญญาณการสั่นสะเทือนของร่างกาย ผลข้างเคียงและอัตราการตาย จากการทำการทดสอบในระยะเวลา 14 วัน จากการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังสารสกัดด้วยน้ำของใบหูกวาง (*Terminalia Catappa* Linn) ให้หนูรับประทานในขนาด 100, 200 และ 400 มก./กก. สัปดาห์ละครั้ง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ นำไปหาค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีและทางโลหิตวิทยา หลังจากสัปดาห์ที่ 6 พบว่าไม่มีความเป็นพิษ และไม่มีอัตราการตายในขนาด 2,000 มก./กก. b.w ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับการรักษาอย่างมีนัยสำคัญในระดับของพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา ตับและไตเช่น SGOT SGPT คอเลสเตอรอล Creatinine ยูเรีย กรดยูริค โปรตีนและกลูโคส แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของใบหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn) ไม่มีความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญ ใบหูกวาง (*Terminalia Catappa* Linn) มีความปลอดภัยในวงกว้างสำหรับการใช้ประโยชน์จากสารสกัดด้วยน้ำของ *Terminalia catappa* Linn ใบไม้ทางการแพทย์แผนโบราณ

จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล (2554, น.7-18) ได้ศึกษา ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ ในท้องถิ่นภาคใต้ของไทย ทั้งที่เป็นสารสำคัญจากผลยอสุก และจากการสกัดผงยอและแผ่นยอด้วยเอทานอล 80% จากผลห่าม เมื่อศึกษาโดยวิธี Agar well diffusion และวิธี Broth microdilution พบว่าสารสำคัญจากผลยอ

ทุกรูปแบบที่มีระดับความเข้มข้น 120 หรือ 240 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา ให้ค่าบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อราอยู่ในช่วง 14.0+0.0 ถึง 20.0+0.0 มม. และ 18.0+0.0 ถึง 23.5+0.5 มม. ตามลำดับ เมื่อศึกษาโดยวิธี Agar well diffusion ซึ่งให้ค่าบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อราใกล้เคียงกับยาเคมีต้านเชื้อรา Amphotericin B (10 มคก./มล), Ketoconazole (15 มคก./มล.), Nystatin (50 มคก./มล.) และ Fluconazole (25 มคก./มล.) สำหรับการทดสอบโดยวิธี Broth microdilution พบว่า สารสำคัญที่ได้จากผลยอทุกรูปแบบสามารถฆ่าเชื้อรา *C. albicans* ทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา โดยมีระดับความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถทำลายเชื้อราอยู่ในช่วง 0.94 ถึง 15.00 มก./มล. นอกจากนี้ยังพบว่า สารสำคัญที่ได้จากผลยอแสดงฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีต้านเชื้อรา Amphotericin B ในการต้านเชื้อรา *C. albicans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสำคัญที่ได้จากผลยอไปใช้ร่วมกับยาเคมีต้านเชื้อราเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคติดเชื้อราในคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และจิราพร โรจน์ทินกร (2550, น.3-4) นำสารสกัดใบหูกวางมาทดสอบการรอดตายของกุ้งต่อเชื้อแบคทีเรีย *A.hydrophila* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยจัดกลุ่มดังนี้ 1. ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อ 2. ชุดควบคุมใส่เชื้อ 3. ชุดควบคุมใส่เชื้อแช่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline 0.01 ppt 4. ชุดทดลองใส่เชื้อและแช่รักษาด้วยสารสกัดสมุนไพรซึ่งใช้ใบหูกวางสกัดด้วย 50%Ethanol ที่ระดับความเข้มข้นที่ 5, 10 และ 40 ppt สังเกตการณ์รอดตายทุกชั่วโมง ผลพบว่าสารสกัดใบหูกวาง สามารถรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งได้ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กุ้งรอดตายทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง และสามารถควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าชุดควบคุมใส่เชื้อและใส่ Oxytetracycline 0.01 ppt

อรัญญา พลพรพิสิฐ, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ, วีณา เคยพุดซา และณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ (2549, น.5) นำใบหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn.) มาทดสอบการรักษาโรคในปลากัด (Betta splendens) และปลาหางนกยูง (Poecilia reticulata) เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพชนิดของสารออกฤทธิ์ และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง และประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผล และโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง โดยนำใบหูกวางมาสกัดด้วยน้ำ เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C จะได้สารละลายใสสีน้ำตาลเหมือนสีชา กลิ่นชา รสฝาด มีปริมาณสารสกัดด้วยน้ำทั้งหมด 15.15 % ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมด 11.53 % พบองค์ประกอบสำคัญทางเคมีจากใบหูกวางแต่ละสี ดังนี้ กรดแทนนิค, รูติน, ไอโซเคอร์ซิตริน, ทองแดง, และสังกะสี พบว่าใบหูกวางสีแดงมีองค์ประกอบต่าง ๆ ในสัดส่วนที่มากกว่าใบหูกวางสีเหลือง น้ำสกัดใบหูกวางมีความเป็นพิษของต่อปลากัดและปลาหางนกยูงที่ระดับความเข้มข้น 6,760 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็ม

ตามลำดับ ใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม สามารถนำมาใช้ในการสมานแผลปลากัดและปลาหางนกยูงที่มีบาดแผลที่ผิวหนังเพียงเล็กน้อยได้ และการใช้น้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 50 -200 พีพีเอ็ม ช่วยทำให้ปลากัดและปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในห้องปฏิบัติการมีอัตรารอดเพิ่มขึ้นแต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อที่มีในตัวปลาหางนกยูงทั้งหมด การใช้ใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 – 3,000 พีพีเอ็มร่วมกับเกลือแกงที่ความเข้มข้น 0.5 – 1 % เพื่อรักษาแผลและลดการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่เกิดการระบาดขึ้นในฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงช่วยลดอัตราการตายได้มากกว่าการไม่ใช้หรือการใช้ใบหูกวางเพียงชนิดเดียว

Kloucek, Polesny, Svobodova, vlkova & Kokoska et. Al. (2005, p.309-312) รายงานว่าใบหูกวางสกัดด้วย 80% Ethanol มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ 9 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *B.subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *S. pyogenes* ATCC 19615 และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า MIC เท่ากับ 2, 4, 8, 1, 0.25, 16, 16, 8 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี

Chen, Li, Liu, & Lin (2000, p.115-122) ทำการสกัดสารจากใบหูกวาง พบสารประกอบส่วนใหญ่เป็นพวก Tannin ชื่อว่า Punicalagin เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษต่อพันธุกรรม เนื่องจากเป็นสารประกอบที่ต้านอนุมูลอิสระได้ และพบสารพวก Methylene chloride และ Methanol ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อราได้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาเรื่อง การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดใบหูกวาง สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

ใบหูกวางแก่จัดที่มีสีแดง ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 โดยผ่านการตรวจสอบชนิดของสมุนไพรโดยนักพฤกษศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญ ศ.ดร.วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล

เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อจุลชีพกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256, และ*Candida tropicalis* TISTR 5045

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องชั่งดิจิตอล (ME802E, Mettler Toledo, Switzerland)

1.2 เครื่องเขย่าผสมสาร (GEMMY VRN-360, BIOTECHNICAL CO.,LTD, Taiwan)

1.3 เครื่องดูดสุญญากาศ (Rocker 300, Taiwan)

1.4 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, Hei-VAP Advantage, Heidolph, Germany)

1.5 กระบวกตวง (Cylinder ขนาด 10, 100, 250, 500 ml) (Pyrex, UK)

1.6 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask 250 ml) (Pyrex, Germany)

1.7 บีกเกอร์ (Beaker ขนาด 50, 100, 250, 500, 1,000 ml) (Pyrex, Germany)

1.8 Buchner funnel (Neutral, China)

1.9 กระดาษกรอง (Filter paper No. 110 mm., Whatman, UK.)

1.10 ขวดสีชา 250, 1,000 ml (Duran, Germany)

1.11 Aluminum foil (Diamond, Lab valley, Thailand)

1.12 Parafilm (Bemis, USA.)

1.13 หลอดหยดสาร (Dropper) (MIT Technology Co.,LTD., Thailand)

1.14 หม้อต้มไอน้ำ (Water bath) (Memmert, Germany)

1.15 หลอดทดลอง (Test tube) (Pyrex, Germany)

1.16 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack) (MIT Technology Co.LTD., Thailand)

1.17 ปิเปต (Graduated pipette) (HBG, Germany)

1.18 Capillary tube (Hirschmann, Germany)

1.19 แผ่น TLC Silica gel (Merck, Germany)

1.20 UV cabinet (Uvitec, England)

1.21 กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Paper disc) (Whatman Ltd., UK.)

1.22 Micropipette ขนาด 10-100 µl และ 100-1000 µl (Eppendorf, Germany)

1.23 Auto pipette tip (AXYGEN, USA.)

1.24 96 well microplate (Nunc: Corning.NY, USA)

1.25 ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (Sterile swab) เบอร์ M (Thai gauze, Thailand)

1.26 ปากคีบ (Forceps) (Lab valley, Thailand)

1.27 Eppendorf ขนาด 1.5 ml (Doctor Calibration CO.,LTD, Germany)

1.28 Parafilm (Bemis, USA.)

1.29 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) (Memmert, Germany)

1.30 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert, Germany)

1.31 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) (ES-315, TOMY, Japan)

1.32 Hotplate stirrer (IKA Group Germany)

1.33 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (S2 Seven2Go Mettler , Switzerland)

1.34 เครื่องวัดความหนืด (Bppkfield viscometer model) (DRAWELL, China)

2. สารเคมี

2.1 เอทานอล (99%Ethanol, analytical grade, Merck, Germany)

2.2 กรดซัลฟิวริก (10%H_2SO_4) (Merck, Germany)

2.3 คลอโรฟอร์ม ($CHCL_3$) (RCI Labscan, Thailand)

2.4 แอมโมเนีย (10%NH_3) (Merck, Germany)

2.5 ไดคลอโรมีเทน (CH_2CL_2) (Honeywell, USA.)

2.6 ลวดแมกนีเซียม (American Scientific, USA.)

2.7 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) (Merck, Germany)

2.8 เฟอริกคลอไรด์ (1%$FeCL_3$) (Merck, Germany)

2.9 กรดแกลเซียลอะซีติก (Glacial acitic acid) (Quality Reagent Chemical: QREC, New Zealand)

2.10 เฮกเซน (Hexane) (RCI Labscan, Thailand)

2.11 กรดฟอมิก (Formic acid) (Quality Reagent Chemical: QREC, New Zealand)

2.12 เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) (Merck, Germany)

2.13 น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorffs regent) ประกอบด้วย

2.13.1 Bismuth (III) nitrate (Sigma-Aldrich Pte Ltd, UK)

2.13.2 Potassium iodide (Sigma-Aldrich Pte Ltd, UK)

2.13.3 กรดแกลเซียลอะซีติก (Glacial acitic acid) (Quality Reagent Chemical: QREC, New Zealand)

2.14 น้ำยาเคดเด (Kedde's reagent) ประกอบด้วย

2.14.1 3,5-dinitrobenzoic acid (Merck, Germany)

2.14.2 Ethanol (Merck, Germany)

2.14.3 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5%KOH) (Merck, Germany)

2.15 Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco, USA.)

2.16 Sabouraud dextrose agar (SDA) (Oxoid, UK.)

2.17 Mcfarland standard 0.5 ประกอบด้วย

2.17.1 Sulfuric acid (Merck, Germany)

2.17.2 Barium chloride (Merck, Germany)

2.18 โซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl) (Merck, Germany)

2.19 Glycerin (Hong Huat, Thailand)

2.20 Sodium benzoate (Hong Huat, Thailand)

2.21 Pectin (Krungthepchemi, Thailand)

2.22 Gelatin (McGarrett, Thailand)

2.23 Carboxy methyl cellulose (CMC) (Krungthepchemi, Thailand)

ขั้นตอนการวิจัย

1. การศึกษาก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบใบหูกวาง

1.1.1 เก็บตัวอย่างใบหูกวางที่ผ่านการตรวจสอบชนิดของสมุนไพรโดยนักพฤกษศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญ ศ.ดร.วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล

1.1.2 นำตัวอย่างใบหูกวางมาคัดแยกสิ่งปลอมปน เลือกใบที่มีสีแดง ล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปเข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

1.1.3 นำใบหูกวางมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1×1 เซนติเมตร

1.1.4 ชั่งน้ำหนักใบหูกวางแห้ง จำนวน 100 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างใบหูกวางที่ได้มาสกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนตัวอย่างสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:20) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Rotator ด้วยความเร็ว 150 rpm เขย่าติดต่อกัน 7 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 3 วัน กรองสารละลายและวัดปริมาตร ทำการสกัดซ้ำทั้งหมด 3 รอบ

1.1.5 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ กรองโดยใช้ Buchner funnel และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 110 mm เมื่อทำการสกัดครบ 3 รอบ ชั่งน้ำหนักสารละลายที่ได้

1.1.6 นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45°C หลังจากระเหยตัวทำละลายออกจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว เรียกว่าสารสกัดหยาบ (Crude extract)

1.1.7 นำสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง มาคำนวณหา % Yield ของใบหูกวาง ดังสูตร และเก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาทดสอบต่อไป สูตรการหาปริมาณสารสกัด (% Yield of Crude Extract)

$$\%\text{Yield of Crude Extract} = \frac{\text{weight of recovered extract (g)} \times 100}{\text{wight of dry plant (g)}}$$

1.2 การตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยจะตรวจสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยมีวิธีการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสี/การเกิดตะกอน (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2556, น.306) ดังนี้

1.2.1 การตรวจสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthaquinones glycoside)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออกแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.725)

1.2.2 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 2 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อชั้นคลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์ (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.725)

1.2.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 50% 3 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เติมลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้มประมาณ 5 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลง หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) 3-4 หยด เขย่า สังเกตสีที่ปรากฏ หากเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์ (พอตา ชัยกิจ และคนอื่น ๆ, 2559, น. 33)

1.2.4 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที นำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 1 นาที ถ้าปรากฏฟองและมีความคงตัวเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน (พอตา ชัยกิจ และคนอื่น ๆ, 2559, น. 33)

1.2.5 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังไอน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบแทนนิน (พอตา ชัยกิจ และคนอื่น ๆ, 2559, น. 33)

1.2.6 การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 2% กรดซัลฟิวริก (2% H_2SO_4) 15 มิลลิลิตร ต้มและคนด้วยแท่งแก้ว 2-3 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลง

ที่อุณหภูมิห้อง หยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) 3 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์ (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.726)

1.2.7 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

เนื่องจากสารกลุ่มนี้ไม่มีน้ำยาเฉพาะสำหรับทดสอบ จึงทำการทดสอบส่วนประกอบโครงสร้างของ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ซึ่งประกอบไปด้วยการทดสอบดังนี้ สเตียรอยด์ วงแหวนแลกโทนไม่อิ่มตัว และน้ำตาลดีออกซี หากผลการทดสอบปรากฏผลบวกทั้ง 3 ส่วน จึงจะสรุปได้ว่าพบ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ วิธีทำการทดสอบโดยทำสารละลายตั้งต้นใช้สำหรับการทดลองดังนี้ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วย ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.726)

1.2.7.1 ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ โดยใช้การทดสอบ ลีเบอร์แมน (Libermann test) โดยเติมกรดอะซิติก (Acetic acid glacial) 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 1 มิลลิลตร ลงไปในสารละลายตั้งต้น สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.726)

1.2.7.2 ส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว นำสารละลายตั้งต้น เติมน้ำยาเคดเด (Kedde's reagent) 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 5% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5% KOH) 1-2 หยด สังเกตสีที่เกดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีม่วง แสดงว่าพบวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.726)

1.2.7.3 ส่วนน้ำตาลดีออกซี โดยใช้การทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani test) สารละลายตั้งต้น เติมกรดอะซิติก (Acetic acid glacial) 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดแล้วค่อย ๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ไปตามข้างหลอดประมาณ 1-2 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าปรากฏสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อชั้นสารสกัด และกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี (ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคนอื่น ๆ, 2556, น.726)

1.3 การตรวจสอบสารสำคัญ ด้วยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) (อุดมเดชา พลเยี่ยม, 2556, น.35-36)

การแยกสารด้วยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ต้องหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ดังนี้

1.3.1 เตรียมสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง 5 มิลลิกรัม นำมาผสมสารละลายที่มีขั้ว คือ เอทานอล 90% เพื่อสกัดสารที่มีขั้วออกมา ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex

1.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยนำสาร Gallic acid 0.2 มิลลิกรัม และสาร Quercetin 0.2 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 90% อย่างละ 1 มิลลิลิตร

1.3.3 เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ผสมระหว่าง Hexane 30 ส่วน Ethy acetate 15 ส่วน และ Fomic acid 5 ส่วน จากนั้นเทลงในบีกเกอร์ให้มีความสูงจากก้นบีกเกอร์ ประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาทีใช้เพื่อให้บรรยากาศในบีกเกอร์อิ่มตัว

1.3.4 เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาด 5.5 เซนติเมตร × 6 เซนติเมตร ขีดเส้นเพื่อกำหนดตำแหน่งที่ต้องการ Spot สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยกำหนดให้ห่างจากปลายล่างขอบแผ่น TLC ขึ้นมา 1 เซนติเมตร แล้วจุด (Spot) 6 ตำแหน่ง ในแต่ละจุดห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลายไว้ (Solvent front) ห่างจากขอบ 1 เซนติเมตร

1.3.5 ใช้หลอดรูเล็ก (Capillary tube) นำสารสกัดในข้อที่ 1.3.1 มา 5 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน จุดลงบนแผ่น TLC บริเวณตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วนำไปตั้งในบีกเกอร์ที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายพร้อมกับปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับ Solvent front ที่กำหนดไว้ จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากบีกเกอร์ ปล่อยไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

1.3.6 นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร

1.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Candida* spp.

1.4.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และคนอื่น ๆ, 2556, น.434-436)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256, และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาตร 3 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นก่อนนำเชื้อมาทดสอบต้องปรับเชื้อทดสอบให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ Mcfarland standard 0.5 ด้วย 0.85% NaCl เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *Candida* spp. โดยวิธี Disc diffusion (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และคนอื่น ๆ, 2556, น.434-436)

1.4.2.1 ขั้นเตรียม Petri dish อาหารเลี้ยงเชื้อ นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swap) จุ่มลงในเชื้อที่ปรับค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ Mcfarland standard 0.5 แล้วกดไม้พันสำลีให้หมาด ๆ กับข้างหลอด แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) โดยลากเส้นผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากให้ถี่ ๆ ทั่วผิวหน้า หมุนจานอาหารเลี้ยง

เชื้อ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง ก่อนจะใช้ไม้พันสำลีปาดขอบด้านในโดยรอบของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1-2 นาที

1.4.2.2 ขั้นเตรียมแผ่น Paper disc นำสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ได้มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 500 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย คือเอทานอล 95 % และปรับความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ คือ 250 mg/ml, 125 mg/ml และ 62.5 mg/ml นำไปทดสอบโดยการหยดสารสกัดหยาบจากใบหูกวางปริมาณ 20 µl/disc ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

1.4.2.3 ขั้นการวาง Paper disc นำแผ่นดิสก์ที่หยดสารสกัดหยาบจากใบหูกวางโดยใช้ ปากคีบ (Forceps) ปราศจากเชื้อคีบแผ่นดิสก์วาง และกดเบา ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ให้ส่วนที่แบนแนบสนิทกับผิวหน้าวุ้นเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กระดาษกรองที่หยดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control) จากนั้นนำเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและบันทึกผลการทดลอง

1.4.2.4 การอ่านผล นำ Petri dish ที่ทดสอบหลังบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาอ่านค่าโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Inhibition zone) ทั้งแนวตั้งและแนวนอน โดยวัดจากขอบโซนด้านข้างไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง ให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ Paper disc บันทึกเป็นหน่วยมิลลิเมตร ขอบโซนที่วัดได้ต้องเป็นวงใสชัดเจน ถ้ามีเชื้อบาง ๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จากนั้นนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไปทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อ (Minimum concentration inhibitor: MIC) ด้วยวิธี Micro broth dilution

1.4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี Micro broth dilution (ยุพิน ทัศนวิจิตรพันธ์, 2558, น.34-37)

1.4.3.1 เติมอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth (SDB) ช่องละ 50 µl ใน 96-well plate จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยลดความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้แบบ 2- fold serial dilution จากความเข้มข้นที่เติมในช่องแรกเริ่มต้นที่ 500 mg/ml ซึ่งจะทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารสกัดหยาบจากใบหูกวางแถวที่ 1 ลงในช่องถัดไปปริมาณ 50 µl และเจือจางไปเรื่อย ๆ จนถึงช่องที่ 12 ให้ดูดสารทิ้งปริมาตร 50 µl จากนั้นเติมเชื้อปริมาตร 50 µl ลงทุกหลุม แต่ละความเจือจางทำ 5 ซ้ำ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดในอัตราส่วนความเข้มข้นตั้งแต่ 250 – 0.12 mg/ml จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและบันทึกผลการทดลอง

1.4.3.2 การอ่านผล ให้อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ (MIC) โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่เกิดการเจริญของเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหลุมนั้นจะถือเป็นค่า MIC

1.4.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal fungicidal concentration; MFC) โดยวิธี Spot test (ยุพิน ทัศนวิจิตรพันธ์, 2558, น.34-37)

1.4.4.1 นำสารละลายในหลุมทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจากการทดสอบหาค่า MIC มา Spot ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ปริมาตร 10 µl จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและบันทึกผลการทดลอง

1.4.4.2 การอ่านผล ให้อ่านจากการเจริญเติบโตของเชื้อบริเวณที่ Spot ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (ลดจำนวนเชื้อลงได้ 99%) แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ ถือเป็นค่า MFC

2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาป้ายปาก

2.1 การตั้งตำรับยาป้ายปากใบหูกวาง

การตั้งตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยมีส่วนประกอบหลักดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ส่วนประกอบ	% W/W			หน้าที่ของสารในตำรับ
	ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3	
Glycerin	7	7	7	Humectant
Sodium benzoate	0.1	0.1	0.1	Preservative
Gelatin	7	3	5	Stiffening agent
Pectin	3	7	5	Stiffening agent
Carboxy Methyl Cellulose	5	1	3	Stiffening agent
Terminalia catappa Linn. extract	12.5	12.5	12.5	Active ingredient
Purified water	65.4	69.4	67.4	vehicle
Total	**100**	**100**	**100**	**-**

2.1.1 วิธีเตรียม

2.1.1.1 ชั่ง Gelatin และ Pectin และ Purified water ตามน้ำหนักที่กำหนด ผสมลงในบีกเกอร์ คนให้ละลาย นำไปตั้งบน Hot plate คนเรื่อย ๆ จนได้สารที่มีลักษณะใส

2.1.1.2 ชั่ง Carboxy methyl cellulose ตามน้ำหนักที่กำหนด นำไปโปรยใส่ในบีกเกอร์ ข้อ 2.1.1.1 ขณะอุ่น ๆ คนเรื่อย ๆ จนได้สารที่เป็นเนื้อเดียวกัน

2.1.1.3 ชั่ง Sodium benzoate, Glycerin และสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ตามสัดส่วนที่กำหนด ผสมลงในโกร่ง

2.1.1.4 นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมลงในโกร่งขณะอุ่น คนผสมให้เข้ากันช้า ๆ

2.2 การทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์

การประเมินลักษณะทางกายภาพ โดยนำตำรับยาป้ายปากที่เตรียมขึ้น มาประเมินลักษณะทางกายภาพ และทดสอบด้วยวิธี Heating cooling cycle โดยประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพเบื้องต้น คือ สี กลิ่น ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.2.1 ชั่งตำรับยาป้ายปากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่เตรียมขึ้นปริมาณ 30 กรัม ใส่ในภาชนะ จำนวน 3 ตัวอย่าง (บันทึกน้ำหนักในแต่ละตัวอย่าง) บันทึกลักษณะทางกายภาพได้แก่ สี กลิ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งวัดด้วย pH meter และวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer โดยวัด 3 ซ้ำ

2.2.2 นำตำรับยาป้ายปากที่คัดเลือกไว้มาทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยวิธี Heating cooling cycle จำนวน 5 cycle โดยเก็บไว้ในตู้อบ (Hot air oven) อุณหภูมิ 4±2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 45±2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำเช่นนี้ทั้งหมด 5 รอบ และนำไปประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปาก อีกครั้ง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC) โดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

2. การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistical for the Social Sciences (SPSS, free trial Version)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลการหาคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ด้วยวิธีสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography, TLC) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) และพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก โดยสมุนไพรที่ใช้เป็นใบหูกวางที่เก็บจากเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อจุลชีพกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธ์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256, และ*Candida tropicalis* TISTR 5045 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการแจกแจงความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) และสถิติการทดสอบด้วยวิธี One way ANOVA นำเสนอผลของการวิจัยตามลำดับดังนี้

1. ผลการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

2. ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางด้วยวิธีสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography, TLC)

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

4. การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก

ผลการตรวจสอบลักษณะใบหูกวางสีแดง

จากการเก็บใบหูกวางแก่จัดที่มีสีแดง ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 ได้รับการยืนยันตรวจสอบลักษณะใบหูกวางสีแดงโดยนักพฤกษศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญ ศ.ดร.วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล ซึ่งยืนยันว่าเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Terminalia catappa* L.

ผลการเตรียมสารสกัดหยาบ

จากการสกัดสารสำคัญจากใบหูกวาง โดยนำใบหูกวางที่แก่จัด มีสีแดง ล้างทำความสะอาด นำมาตากแดด และอบให้แห้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ได้ปริมาณ 100 กรัม นำมาสกัดด้วยวิธีการหมักแช่ (Maceration) ด้วยเอทานอล 95 % ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำสารละลายที่ได้ กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 110 เก็บ Filtrate ที่กรองได้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำกากใบหูกวางมาสกัดซ้ำรวมทั้งหมด 3 ครั้งด้วยวิธีนี้ รวม Filtrate หรือสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (Ethanol extract) ปริมาตร 18.23 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิต (%Yield) คือ ร้อยละ 18.23 ดังตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง เป็นสารสกัดของแข็งกึ่งเหลว หนืดข้น สีน้ำตาลแดงเข้ม ดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณและลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

สารสกัด	น้ำหนักสมุนไพรแห้ง (g)	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (g)	%Yield of crude extract (%)	ลักษณะของสารสกัดหยาบ
ใบหูกวางสีแดง	100	18.23	18.23	สารกึ่งแข็งกึ่งเหลวลักษณะหนืดข้น มีสีน้ำตาลแดงเข้ม

ภาพที่ 4.1 สารสกัดหยาบใบหูกวางสีแดง

ผลการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

1. ทดสอบด้วยวิธีการสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี โดยทดสอบหาสารสำคัญ 7 กลุ่ม ได้แก่อัลคอลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอนทราควิโนน (Antraquinone) แทนนิน (Tanin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiacglycoside) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน จากการตรวจสอบดังกล่าว พบสารพฤกษเคมี 5 ชนิด จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ได้แก่ แอนทราควิโนน (Antraquinone) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) และแทนนิน (Tanin) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง
แอนทราควิโนน	+
เทอร์พีนอยด์	+
ฟลาโวนอยด์	+
ซาโปนิน	+
แทนนิน	+
แอลคาลอยด์	-
คาดิแอกไกลโคไซด์	-

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ, + หมายถึง ตรวจสอบพบ

2. ทดสอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

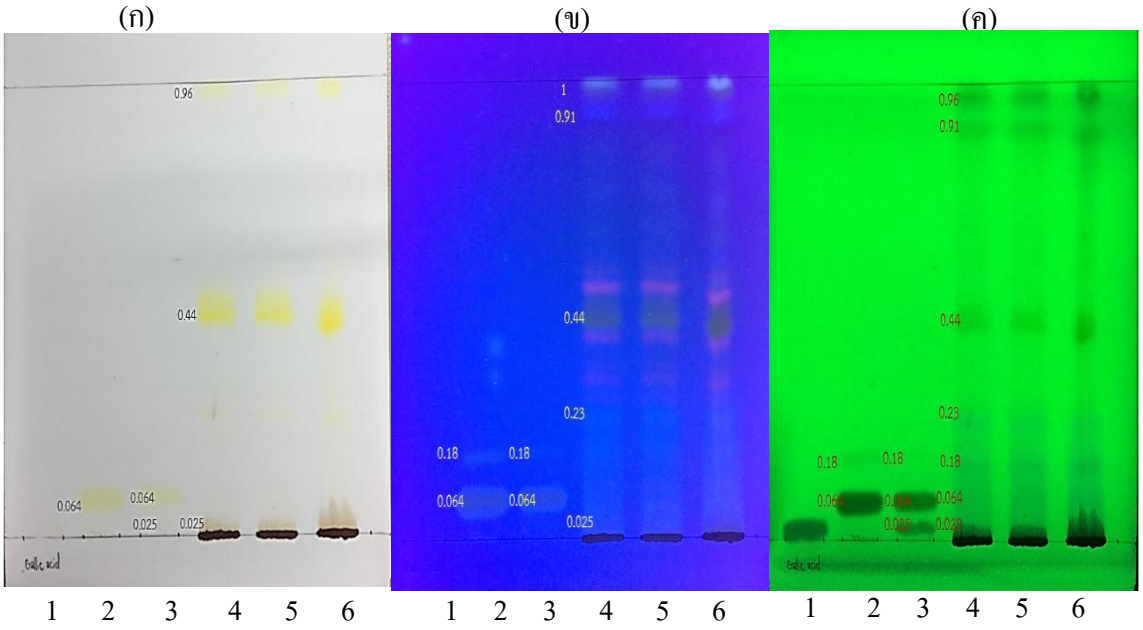
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางผ่านการสกัดแบบหมักด้วยเอทานอล 95% โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารมารตรฐาน Gallic acid และ Quercetin โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Ethyl acetate และ Formic acid ในอัตราส่วน 30:15:5 โดยปริมาตรตามลำดับ ส่องภายใต้แสงขาว และแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm แสดงผลดังภาพที่ 4.2 ดังนี้

ส่วนสารมาตรฐาน Gallic acid พบว่าเมื่อส่องภายใต้แสงสีขาวและส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm. พบค่า R_f1 ตำแหน่งที่ 0.025 ไม่พบตำแหน่งเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 nm

สารมาตรฐาน Quercetin พบว่าเมื่อส่องภายใต้แสงสีขาว พบค่า R_f1 ตำแหน่งที่ 0.064 ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm พบค่า R_f2 ตำแหน่งที่ 0.064 และ 0.18

สารมาตรฐานผสมระหว่าง Gallic acid และ Quercetin พบว่าเมื่อส่องภายใต้แสงสีขาว พบค่า R_f2 ตำแหน่งที่ 0.025, 0.064 ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm พบค่า R_f 3 ตำแหน่งที่ 0.025, 0.064, 0.18 และเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 nm พบค่า R_f 2 ตำแหน่งที่ 0.064, 0.18

สารสกัดหยาบจากใบหูกวางเมื่อส่องภายใต้แสงสีขาว พบค่า R_f3 ตำแหน่งที่ 0.025 (Gallic acid), 0.44 และ 0.96 ตามลำดับ ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 nm พบค่า R_f 5 ตำแหน่งที่ 0.025 (Gallic acid), 0.23, 0.44, 0.91 และ 1 ตามลำดับ และเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm พบค่า R_f 7 ตำแหน่งที่ 0.025 (Gallic acid), 0.064 (Quercetin), 0.18, 0.23, 0.44, 0.91 และ 0.96 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ภายใต้ (ก) แสงขาว (ข) แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 nm (ค) แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm

หมายเหตุ 1 คือ สารมาตรฐาน Gallic acid

2 คือ สารมาตรฐาน Quercetin

3 คือ สารผสมของมาตรฐาน Gallic acid และ Quercetin

4,5,6 คือ สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp. โดยวิธี Disc diffusion

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในตัวทำละลาย เอทานอล 95% โดยใช้วิธี Disc diffusion วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Anova ด้วยโปรแกรม Statistical for the Social Sciences (SPSS, free trial Version)

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp.ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

เชื้อ / ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ (Zone of inhibition)			
	62.5 mg/ml	**125 mg/ml**	**250 mg/ml**	**500 mg/ml**
C. albican ATCC 90028	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]
C. glabrata TISTR5006	0.81±0.04* [a]	1.01±0.10* [a]	1.04±0.06* [a, b]	1.36±0.11* [a, b]
C. kefry TISTR 5270	0.00±0.00* [a]	0.00±0.00* [a]	0.00±0.00* [a]	1.10±1.05* [a, b]
C. krusei TISTR 5256	0.00±0.00* [a]	0.00±0.00* [a]	0.50±0.44* [a, b]	1.03±0.30* [a, b]
C. tropicalis TISTR 5045	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]
Negative control 95% Ethanol	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

*p-value $\leq$ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อเชื้อชนิดเดียว

[a] p-value $\leq$ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นเดียวต่อเชื้อต่างชนิด

[b] p-value $\leq$ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นระดับเดียวกันต่อเชื้อต่างชนิดกันเป็นรายคู่ ระหว่าง *C. glabrata*, *C. kefry* และ*C. krusei*

จากตารางที่ 4.3 พบว่า การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. albican* ATCC 90028 ด้วยสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006 ด้วยสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 62.5 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 0.81±0.04 mm ในระดับความเข้มข้น 125 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.01±0.10 mm ในระดับความเข้มข้น 250 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด

1.04±0.06 mm และในระดับความเข้มข้น 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.36±0.11 mm เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่า ขนาดของโซนการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. kefry* TISTR 5270 ด้วยสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.10±1.05 mm แต่ในระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่า ขนาดของโซนการยับยั้งเชื้อ *C. kefry* TISTR 5270 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. krusei* TISTR 5256 ด้วยสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 250 mg/ml พบโซนการยับยั้งไม่สมบูรณ์ขนาด 0.50±0.44 mm ในระดับความเข้มข้น 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งไม่สมบูรณ์ขนาด 1.03±0.30 mm และในระดับความเข้มข้น 62.5, 125 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละระดับความเข้มข้น พบว่า ขนาดของโซนการยับยั้งไม่สมบูรณ์ของเชื้อ *C. krusei* TISTR 5256 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ด้วยสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

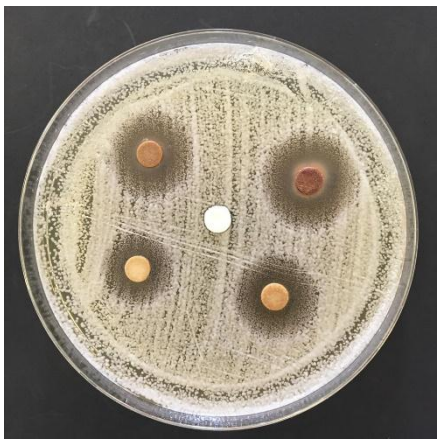
การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ Negative control 95% Ethanol ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 62.5 และ 125 mg/ml ต่อเชื้อทั้ง 5 ชนิด พบว่า *C. glabrata* TISTR5006 มีค่าเฉลี่ยวงใสที่แตกต่างต่อเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ส่วนเชื้อชนิดอื่นไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 250 mg/ml ต่อเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006 และ*C. krusei* TISTR 5256 พบว่ามีค่าเฉลี่ยวงใสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/ml ต่อเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006, *C. kefry* TISTR 5270 และ*C. krusei* TISTR 5256 พบว่าในเชื้อทั้ง 3 ชนิด มีค่าเฉลี่ยวงใสที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

เมื่อเปรียบเทียบรายคู่ระหว่างสารสัดหยาบจากใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/ml ต่อเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006, *C. kefry* TISTR 5270 และ*C. krusei* TISTR 5256 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบรายคู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05



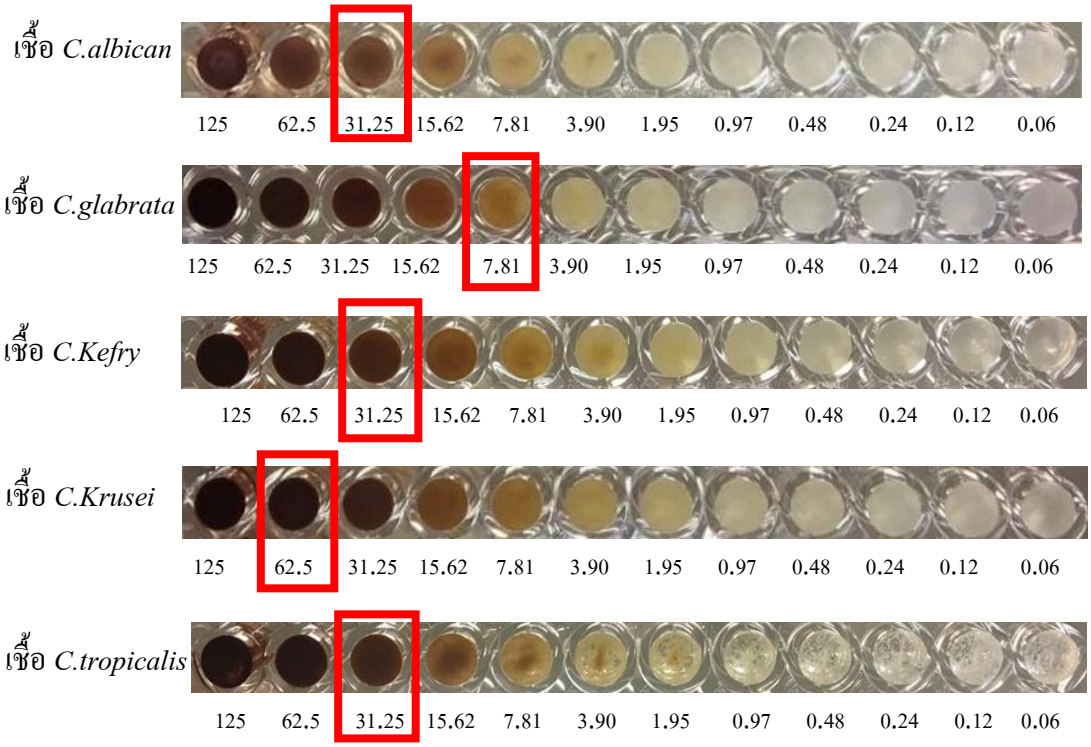
ภาพที่ 4.3 ผล Disc diffution ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *Candida glabrata*

2. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibitory concentration; MIC)

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida* spp.

สารสกัด	ช่วงระดับความเข้มข้นค่า MIC ของสารสกัด (mg/ml)				
	C. albican	***C. glabrata***	***C. kefyr***	***C. krusei***	***C. tropicalis***
ใบหูกวาง	62.50	7.81	31.25	62.50	31.25

จากตารางที่ 4.4 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ได้จากการสกัดด้วย เอทานอล 95% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา *C. albican* และ *C. krusei* โดยมีค่า MIC เท่ากัน เท่ากับ 62.50 mg/ml และสามารถยับยั้งเชื้อ *C. glabrata, C. kefyr, และ C. tropicalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81, 31.25 และ 31.25mg/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *Candida* spp.

3. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum fungicidal concentration; MFC) โดยวิธี Spot test

ตารางที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ที่สามารถฆ่าเชื้อ *Candida* spp.

สารสกัด	ช่วงระดับความเข้มข้นค่า MFC ของสารสกัด (mg/ml)				
	C. albican	***C. glabrata***	***C. kefyr***	***C. krusei***	***C. tropicalis***
ใบหูกวาง	>125	125	125	>125	>125

จากตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ด้วยเอทานอล 95% เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Spot test พบว่าสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (MFC) *C. glabrata* และ *C. kefyr* มีค่าเท่ากันเท่ากับ 125mg/ml และ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (MFC) *C. albican*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* เท่ากับ >125mg/ml ดังภาพที่ 4.5

การพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.)

การตั้งตำรับยาป้ายปาก และสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ทำการเตรียมยาดังกล่าวด้วยวิธี Beaker method พบว่า ตำรับยาที่พัฒนาขึ้นประกอบไปด้วย Glycerin 7%, Sodium benzoate 7%, Gelatin7,3,5%, Pectin 3,7,5%, Carboxy methyl cellulose 5,1,3%, Crud extract 12.5% และ Purified water 65.4,69.4,67.4% ตำรับที่ 1,2,3 ตามลำดับ และนำไปตรวจสอบ ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ดังตาราง 4.6

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางก่อนสภาวะเร่ง

ตำรับ	pH	cP	สี	กลิ่น	ลักษณะ
1	4.14±0.04	Non detect	น้ำตาลแดงออกเหลือง	กลิ่นหอมเย็น	เหนียว จับตัวเป็นก้อนเนื้อหยาบ
2	3.31±0.03	Non detect	น้ำตาลแดงเข้ม	กลิ่นหอมเย็น	เนื้อหยาบเล็กน้อย จับเป็นก้อนเล็กน้อย
3	3.28±0.01	57.67±11.78	น้ำตาลแดง	กลิ่นหอมเย็น	เนื้อเนียนละเอียด

จากตาราง 4.6 จะพบว่า ยาป้ายปากตำรับที่ 1, 2 และ 3 อยู่ในช่วงความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.14±0.04, 3.31±0.03 และ 3.28±0.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความปลอดภัยกับเยื่อบุในช่องปากมนุษย์ การทดสอบค่าความหนืดของตำรับที่ 3 มีค่าเท่ากับ 57.67±11.78 และตำรับที่ 1 และ 2 ไม่แสดงผลค่าความหนืดจากการวัดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer สีของตำรับที่ 1 เป็นสีน้ำตาลแดงออกเหลือง สีของตำรับที่ 2 เป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม สีของตำรับที่ 3 เป็นสีน้ำตาลแดง ทั้ง 3 ตำรับมีกลิ่น หอมเย็น ลักษณะเนื้อยาของตำรับที่ 1 เหนียว จับตัวเป็นก้อนเนื้อหยาบ ลักษณะเนื้อยาของตำรับที่ 2 เนื้อหยาบเล็กน้อย จับเป็นก้อนเล็กน้อย ลักษณะเนื้อยาของตำรับที่ 3 เนื้อเนียนละเอียด

ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางหลังสภาวะเร่ง

ตำรับ	pH	cP	สี	กลิ่น	ลักษณะ
1	4.26±0.05	Non detect	น้ำตาลแดงออกเหลือง	มีกลิ่นใบไม้แห้ง เย็น	เหนียว จับตัวเป็นก้อนเนื้อหยาบ
2	3.40±0.03	Non detect	น้ำตาลเหลืองเข้ม	กลิ่นใบไม้แห้ง เย็น	เนื้อหยาบเล็กน้อย จับเป็นก้อนเล็กน้อย
3	3.31±0.01	37.63±0.50	น้ำตาลออกเหลือง	กลิ่นใบไม้แห้ง เย็น	เนื้อเนียนละเอียด

จากตาราง 4.7 จะพบว่า เมื่อนำตำรับผ่านสภาวะเร่ง โดยวิธี Heating cooling cycle จำนวน 5 Cycle และนำมาวัดค่าความคงตัวของผลิตภัณฑ์ พบว่าตำรับยาป้ายปากตำรับที่ 1, 2 และ 3 อยู่ในช่วงความเป็นกรด-เบส (pH) มีค่าเท่ากับ 4.26±0.05, 3.40±0.03 และ 3.31±0.01 ตามลำดับ การทดสอบค่าความหนืดหลังทำสภาวะเร่งของตำรับที่ 3 มีค่าเท่ากับ 37.63±0.50 และตำรับที่ 1 และ 2 ไม่แสดงผลค่าความหนืดจากการวัดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer ลักษณะสีและกลิ่นของทั้ง 3 ตำรับ หลังสภาวะเร่งมีการเปลี่ยนแปลงของสีที่อ่อนลง และมีกลิ่นใบไม้แห้งชัดเจนขึ้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อสัมผัส

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วิจัยการพัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปากฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ในการต้านเชื้อรา *Candida* spp. มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง 2) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฤทธิ์ฆ่าเชื้อรากลุ่มแคนดิดาของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง และ 3) พัฒนาตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยใช้ใบหูกวางแก่จัดที่มีสีแดง ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 และใช้เชื้อจุลชีพกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธ์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* TISTR 5006, *Candida kefyr* TISTR 5270, *Candida krusei* TISTR 5256, และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 มีวิธีการศึกษาคือ เตรียมสารสกัดหยาบด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% และระเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45°C และนำสารสกัดหยาบมาศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีการสังเกตการเกิดสีและการตกตะกอน และเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา ด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Broth micro dilution และพัฒนาตำรับยาโดยการศึกษาความคงตัวด้วยวิธี Freeze-thaw cycling สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ One way ANOVA โดยผลที่ได้จากการศึกษาได้นำมาสรุปผล อภิปรายผล และมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

สรุปผลการวิจัย

ใบหูกวางจำนวน 100 กรัม ในงานวิจัยนี้เมื่อนำมาสกัดได้สารสกัดหยาบ คิดเป็นร้อยละผลผลิต (%Yield) คือ ร้อยละ 18.23 โดยเมื่อทำการศึกษาตามวัตถุประสงค์ ได้ข้อสรุปผลการวิจัยที่ตามลำดับ ดังนี้

1. สารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง พบว่าวิธีสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสีและตกตะกอนจากผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ 7 กลุ่ม พบว่าพบสารสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนน (Antraquinone) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) และแทนนิน (Tanin) และศึกษาด้วยเทคนิค Thin layer

chromatography (TLC) จากผลการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากใบหูกวางเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid และ Quercetin พบว่าในตัวทำละลาย Hexane, Ethyl acetate และ Formic acid สามารถพบสาร Gallic acid และ Quercetin จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง พบว่า

2.1 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Disc diffusion พบว่า การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. glabrata* TISTR5006 สารสกัดใบหูกวางในระดับความเข้มข้น 62.5 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 0.81±0.04 mm ในระดับความเข้มข้น 125 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.01±0.10 mm ในระดับความเข้มข้น 250 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.04±0.06 mm และในระดับความเข้มข้น 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.36±0.11 mm ในระดับความเข้นข้นที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. kefry* TISTR 5270 สารสกัดใบหูกวาง ในระดับความเข้มข้น 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 1.10±1.05 mm. แต่ในระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. krusei* TISTR 5256 สารสกัดหยาบจากใบหูกวางในระดับความเข้มข้น 250 และ 500 mg/ml พบโซนการยับยั้งขนาด 0.50±0.44 และ 1.03±0.30 mm. และในระดับความเข้มข้น 62.5 และ125 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ ส่วนการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *C. albican* ATCC 90028 และเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 สารสกัดหยาบจากใบหูกวางในระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 mg/ml ไม่พบโซนการยับยั้งเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบรายคู่ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*, *C. kefry* และ *C. krusei* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

2.2 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Micro broth dilution พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ได้จากการสกัดด้วย เอทานอล 95% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา *C. albican* และ *C. krusei* โดยมีค่า MIC เท่ากัน เท่ากับ 62.50 mg/ml และสามารถยับยั้งเชื้อ *C. glabrata, C. kefyr, และ C. tropicalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81, 31.25 และ 31.25 mg/ml ตามลำดับ

2.3 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบหูกวางในการฆ่าเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Micro broth dilution พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา *C. glabrata* และ *C. kefyr* มีค่าเท่ากันเท่ากับ 125 mg/ml และ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา *C. albican*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* เท่ากับ >125 mg/ml

3. ผลิตภัณฑ์ยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่เหมาะสม ควรมีส่วนประกอบคือ Glycerin 7% Sodium benzoate 0.1% Gelatin 7 % Pectin 3% และ Carboxy methyl cellulose 5 % สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง 12.5% และน้ำกลั่น 65.4% เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะกับการป้ายปากมากที่สุด และ pH มีความเป็นกรดน้อยที่สุด

อภิปรายผล

ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง มีสารสำคัญ ได้แก่ แอนทราควิโนน (Antraquinone) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) ฟลาโวนอยด์ (Flovonoid) ซาโปนิน (Saponin) และแทนนิน (Tanin) และพบสาร Gallic acid และ Quercetin สอดคล้องกับงานวิจัยของ นงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง (2559, บทคัดย่อ) ซึ่งทำการศึกษาสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน และพบว่าสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน คูมาริน และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยวิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวางจะมีฤทธิ์การต้านเชื้อราแคนดิดา 3 ชนิด ได้แก่ *C. glabrata* โดยเริ่มมีฤทธิ์ต้านเชื้อราตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 62.5 mg/ml เชื้อ *C. krusei* เริ่มมีฤทธิ์ต้านเชื้อราตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 250 mg/ml และ *C. kefry* เริ่มต้านตั้งแต่ระดับความเข้มข้นระดับความเข้มข้น 500 mg/ml ซึ่งอธิบายได้ว่า ในสารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีสารแทนนิน ซึ่งคุณสมบัติของสารแทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพชนิดแบคทีเรียและรายีสต์ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในการสร้าง DNA, RNA (Adnan et al., 2017, Abstract) จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์กลุ่มแคนดิดาได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lim S. H., Darah I., & Jain K. (2006, p. 59–65). ที่ทำการศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารแทนนินจากเปลือกต้นโกงกาง ที่พบว่า เปลือกต้นโกงกางมีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบหลัก และมีฤทธิ์ต้านเชื้อรายีสต์ อีกทั้งเมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ พบว่าผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *Candida albican* มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป และสอดคล้องกับสรรพคุณของใบหูกวาง จากภูมิปัญญาการแพทย์แผยไทยที่ระบุไว้ว่านำใบหูกวางมาต้มอาบ จะช่วยรักษาแผลรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ กรทิพย์ ภทัรธนากร และคนอื่น ๆ (2557, น. 151-154) ที่ทำการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นและการต้านจุลชีพของสารสกัดเปลือกต้นมะขามป้อมต้านเชื้อแคนดิดาในช่องปาก พบว่า สารสกัดเปลือกต้นมะขามป้อมที่

สกัดด้วยเอทานอล 95% มีสารฟีนอลิก และแทนนิน เป็นองค์ประกอบ และมีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อรา *C. albican* ได้ที่ความเข้มข้น 125 mg/ml

โดยเมื่อพิจารณาจากสารสกัดใบหูกวางที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. glabrata*, *C. kefry* และ *C. krusei* มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเท่ากับ 1.36 ± 0.11, 1.10 ±0.05 และ 1.03±0.30 mm ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐานในการรักษาโรค Oral candidiasis คือ Nystatin ที่ใช้ขนาด 0.1 mg เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *C. albican* จะทำให้เกิดขนาดโซนยับยั้ง 16.33±0.58 mm (สุจิตรา ยาหอม และรุ่งฤดี ทิวทอง, 2562, น.459-467) จากผลการศึกษานี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้ใบหูกวางทดแทนยารักษามาตรฐานได้หรือไม่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp. ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง โดยวิธี Micro broth dilution พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราแคนดิดาทั้ง 5 ชนิด โดยสามารถต้านเชื้อรา *C. glabrata* ได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 7.81 mg/ml รองลงมาคือเชื้อ *C. kefyr, และ C. tropicalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 และ *C. albican* และ *C. krusei* มีค่า MIC เท่ากับ 62.50 mg/ml อธิบายได้ว่าเนื่องจาก วิธี Micro broth dilution ทำให้สารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีโอกาศที่จะสามารถสัมผัสกับพื้นที่ผิวของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น จึงมีผลทำให้สารสกัดใบหูกวางสามารถออกฤทธิ์ได้เพิ่มมากขึ้น (ยุพิน ทันวิจิตรพันธ์, 2558, น.22) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณัฐกานต์ วงศ์สีสม และคนอื่น ๆ (2557, น.3-15) ที่ทำการศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นที่พบว่า เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion ส่วนน้ำมันหอมระเหยของเมล็ดมะแขว่นไม่มีผลยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* แต่เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution พบว่า ส่วนน้ำมันหอมระเหยของเมล็ดมะแขว่น พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 425.00 mg/mL

ฤทธิ์การฆ่าเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Broth microdilution พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวางมีฤทธิ์การฆ่าเชื้อรา *C. glabrata* และ *C. kefyr* โดยมีค่า MFC เท่ากับ 125mg/ml ส่วนเชื้อรา *C. albican*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* มีค่า MFC เท่ากับ >125mg/ml อธิบายได้ว่า จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง ด้วยวิธี Micro broth dilution พบว่ามีฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *C. glabrata* และ *C. kefyr* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล (2554, น.7-18.) ที่ทำการศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ แล้วพบว่า เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธี Micro broth dilution พบว่าสารสกัดผลยอสามารถต้านเชื้อรา *Candida albican* ที่ระดับความเข้มข้น 120 mg/ml มีผลสอดคล้องกับค่า MFC ที่ระดับ 0.94-15 และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Didem D.O., Berrin O., Selda O. & Fatma E. (2010, p. 496-504) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเชื้อราและไวรัส

ของฟลาโวนอยด์บางชนิด โดยพบว่า Quercetin-3-O-rutinosides มีผลในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *C. krusei*

นอกจากนี้งานวิจัยยังพบว่า การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาป้ายจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่เหมาะสม ควรมีส่วนประกอบคือ Glycerin 7% Sodium benzoate 0.1% Gelatin 7 % Pectin 3% และ Carboxy Methyl Cellulose 5 % สารสกัดหยาบจากใบหูกวาง 12.5% และน้ำกลั่น 65.4% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hamishehkar, Nokhodchi, Ghanbarzadeh & Kouhsoltani (2015, p. 277-282) ได้ทำการศึกษาตำรับยาป้ายปากอักเสบจากสารโพลิเมอร์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติยึดเกาะกับเนื้อเยื่อในช่องปาก พบว่า ตำรับยาในช่องปากถูกเตรียมด้วยสารไฮโดรคอลลอยด์สามชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ Gelatin, Pectin และ Sodium carboxymethylcellulose ในอัตราส่วน 3.3%, 6.6% และ 30% เป็นตำรับที่มีความคงตัว ยึดเกาะเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะการนำงานวิจัยไปใช้

จากผลการวิจัยนี้สามารถบอกคุณภาพวิเคราะห์ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วยวิธีการหมักในเอทานอล 95% จึงเป็นแนวทางเลือกใช้สมุนไพรในการบรรเทาอาการ Oral candidiasis และเป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ในการต้านเชื้อรา *Candida* spp. บางชนิดได้

ข้อเสนอแนะครั้งต่อไป

จากผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์นี้สามารถบอกค่าความคงตัวทางกายภาพของตำรับยาป้ายปากจากสารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่มีความเหมาะสมเบื้องต้นเท่านั้น แต่ค่า pH ยังมีความเป็นกรดอ่อนๆ จึงควรพัฒนาต่อยอดให้ลดความเป็นกรดลง ควรนำไปทดสอบหาความคงตัวทางเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา และศึกษาปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัดซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. ต่อไป

บรรณานุกรม

กนกวรรณ วงศ์เดช, ฐิตาพร ช่างเรือ และเอนก ภู่ทอง. (2561). ฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida* spp. ของ Cinnamaldehyde ร่วมกับ Fluconazole ในหลอดทดลอง. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, *26*(8), 1394-1401.

กรทิพย์ ภัทรธนากร, จินนภา บุญเฉลียว, ศุภกิจ ชัยเพชร์, สคุนธ์ทิพย์ สีแสด, สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์ และพรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ. (2557). การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดเปลือกต้นมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) สำหรับโรคติดเชื้อแคนดิดาในช่องปาก. **การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013, Pharmacy Profession: Moving Forward to ASEAN Harmonization**" ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 16-17 กุมภาพันธ์ 2556, 151-154

กานต์รวี บำรุงเชาว์เกษม. (2561). **ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดใบหูกวาง**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

คณะอนุกรรมการขับเคลื่อนภารกิจของคณะกรรมการนโยบายสมุนไพรแห่งชาติ. (2562). **สมุดปกขาว การพัฒนาสมุนไพรภายใต้กรอบการพัฒนาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีของประเทศไทย เพื่อเศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียนและเศรษฐกิจสีเขียว**. (พิมพ์ครั้งที่ 1). นนทบุรี : กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข.

คมสันต์ วรรณไสย. (2558). **เอกสารประกอบการบรรยาย กระบวนวิชา Fundamental Medical Sciences 2 เรื่อง Pathology of common fungal infections**. เชียงใหม่ : ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จีราภรณ์ สุวรรณชาตรี, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (2554). ฤทธิ์ต้าน*Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ. **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด**, *23*(1), 7-18.

ชวลิต โฆษิตนิธิกุล. (2559). การพัฒนาสมุนไพรไทย. **วารสารการจัดการป่าไม้**, *10*(20). 95-103.

ซูฮัยลา สะมะแอ, เบญจวรรณ พูนธนานิวัฒน์กุล, โรสนานี เหมตระกูลวงศ์ และพโนมล ชมโฉม. (2560). ผลของสารสกัดพิกัดตรีกาฬพิษต่อเชื้อ *Candida albicans* ที่ก่อโรคผิวหนัง. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ครั้งที่ 1**. เชียงราย : สำนักวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

ณัฐกานต์ วงศ์สีสม, จามจุรี จินะตา, บุษบา มะโนแสน, จิรรัชต์ กันทะปู้, สุรีพร วันควร และสุภาวดี ศรีแย้ม. (2557). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ**. *37*(1). 3-15.

ธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร. (2559). **ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชียโคไลที่ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชกรรมไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

ธนิยา หมวดเชียงคะ, บุญนิตย์ ทวีบูรณ์, รัตติพร กายเพชร และสร้อยศิริ ทวีบูรณ. (2556). ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราในช่องปาก ของวานิลลิน. **วารสารทันตแพทย์ศาสตร์มหิดล**, *33*(3), 177-183.

นงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง. (2559). **การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปาจรีย์ ฑิตธิวงษ์. (2561). **Dermatology Fungal Skin Infections**. สมาคมกุมารแพทย์แห่งประเทศไทย. ค้นเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2563. จาก http://www.thaipediatrics.org/Media/media-20180403103621.pdf

พรทิพ กันภัย. (2557). **การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิงบางชนิดในเขตจังหวัดกาญจนบุรี**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี.

พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ตันหยง และนัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ. (2556). เชื้อราทางการแพทย์. **Journal of Medicine and Health Sciences**, *20*(2), 31-44.

พรพิมล พิมลรัตน์, นิวุฒิ หวังชัย, สุพันธ์ณี สุวรรณภักดี และพัชราวลัย ศรียะศักดิ์. (2560). **เอกสารประกอบการอบรมสารสกัดแทนนินจากใบหูกวาง วิธีการเตรียมอย่างง่าย และการประยุกต์ใช้ในปลาสวยงาม**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.

พอตา ชัยกิจ. (2559). **การทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของชุมเห็ดเทศ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา.

เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์. (2556). **การพัฒนาและการประเมินผลของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบแก้ว**. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ และสุรางค์ เดชศิริเลิศ. (2561). **คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป**. กรุงเทพฯ :กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ยุพิน ทัศนวิจิตรพันธ์. (2558). **ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากสะค้านและสะค้านแดง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2556). **Herbal Extracts : Preparation and Isolation of Active Constituents by using Chromatographic Techniques**. (พิมพ์ครั้งที่ 2). สมุทรปราการ : โครงการสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

ลัดดาวัลย์ ยืนยาว และ สุภัสสร วันสุทะ. (2561). ฤทธิ์ต้านแคนดิดา อัลบิแคนส์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก. **วารสารหมอยาไทยวิจัย**. *4(*2), 1-20.

วัชริยา ภูรีวิโรจนกุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน. (2560). **ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด**. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ค้นเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2562. จาก http://www.lib.ku.ac.th/kuconf/kc4404014.pdf

วาสินี ธรรมสถิต, สุจิตรา สุคนธมัต และดุษณี ธนะบริพัฒน. (2560). การคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา *Phytopthora* sp. ที่แยกจากทุเรียนในจังหวัดจันทบุรีและจังหวัดชุมพร. **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง**, *26*(2), 1-14.

วิณากร ที่รัก. (2558). **ผลของสารสกัดหยาบใบหูกวางต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งก้ามกรามในระบบน้ำหมุนเวียน**. สงขลา : เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

วิภาวรรณ นีละพงษ์, บุษบา ผลโยธิน และวันเชิง สิทธิกิจโยธิน. (2561). การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย : การสกัดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลาย. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**, *28*(4), 109-910.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. **วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น**, *41*(3), 723-730.

ศิริลักษณ์ นามวงษ์. (2561). **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหูกวาง**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

ศิวพงษ์ โกสิงห์, ภัทรียา พลซา, กัลย์กนิต พิสมยรมย์, พรพิมล แสงจันทร์ และ สุพัฒน์ พลซา. (2561). การใช้สารสกัดใบหูกวางชนิดผงเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลากัด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**, *49*(3), 85-91.

สถาพร นิ่มกุลรัตน์. (2548). **สารเพิ่มความหนืด** (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ : สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมฤทัย พาที. (2560). **องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของเนระพูสีไทย**. วิทยศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา.

สราญจิตร อินอ่อน. (2560). **ความสัมพันธ์ของสีใบหูกวางกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**. เชียงราย : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

สุจิตรา ยาหอม และรุ่งฤดี ทิวทอง. (2562). ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบใบเพกา. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.**, *47*(3), น.459-467

สุชาดา มานอก. (2562). **ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ขั้นสูง**. (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

อรนาฏ มาตังคสมบัติ. (2549). โรคราแคนดิดาในช่องปาก ตอนที่ 2: แนวทางการรักษาในปัจจุบัน. **วารสารทันต**, *56*(1), น.64-75

อรัญญา พลพรพิสิฐ, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ, วีณา เคยพุดซา และณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์. (2549). **การใช้ใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) เพื่อรักษาโรคในปลากัด (Betta splendens) และปลาหางนกยูง (Poeciliareticulate)**. กรุงเทพฯ : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางทะเลโตเกียว. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2562). **การวิเคราะห์หาองค์ประกอบและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผสมโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นเคลือบ (TLC)** เอกสารประกอบการสอนบทปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 1. นครปฐม : สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2562). **การทดลองเรื่อง การแยกของผสมระหว่างกรดเบนโซอิกและการบูรให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบ liquid-liquid extraction** เอกสารประกอบการสอนบท ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. นครปฐม : สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

อ้อมบุญ วัลลิสุต และ ปองทิพย์ สิทธิสาร. (2556). **หลักการวิเคราะห์พฤกษเคมีในสมุนไพรด้วยเทคนิคทีแอลซี และทีแอลซีสมรรถนะสูง**. กรุงเพทยฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และจิราพร โรจน์ทินกร. (2550). ประสิทธิภาพของสารสกัด สมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในกุ้งก้ามกราม. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง**, *1*(2), 3.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2556). **แบคทีเรียทางการแพทย์**. (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุบลวรรณ สุวรรณภูสิทธิ์ และ นิศานาถ แก้ววินัด. (2559). **คู่มือภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการดูแลสุขภาพ**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Adnan, S.N.A., N. Ibrahim, & W.A. Yaacob. (2017). Disruption of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* protein synthesis by tannins. **GERMS**, *7*(4), 186-192.

Allyn, O.Q., Kusumawati, E., & Nugroho, R.A. (2018). **Antimicrobial activity of *Terminalia catappa* brown leaf extracts against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**. Retrieved 1 May 2020. From https://f1000research.com/articles/7-1406

Anand, A.V., Divya, N., & Kotti, P.P. (2015). An updated review of *Terminalia catappa*. **Pharmacogn Rev**, *9*(18), 93–98.

Arjariya. S., Nema, N., & Tiwari, S. (2013). Investigate the toxicological effect on aqueous extract of *Terminalia catappa* Linn. In rat. In International, **Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, *2*(5), 596-601.

Chen, P., Li, J.H., Liu, T.Y., & Lin, T.C. (2000). Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Journal Science Direct Cancer Letters**, *152*(2), 115-122.

Christophe, D.E., & Bougnoux, M.E. (2014). **Human Fungal Infections**. Retrieved 6 December 2020. From https://research.pasteur.fr/en/team/fungal-biology-and-pathogenicity/

E-lifes. (2017). **Thin layer chromatography, TLC**. Retrieved 3 May 2020. From. http://elife-news.blogspot.com/2017/06/thin-layer-chromatography-tlc.html?view=classic

Emerypharma. (2020). **Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)** Assay Retrieved 14 March 2020. From https://emerypharma.com /biology/minimum-inhibitory-concentration/

Gowan, M. (2017). **Astringent herbs – The use of tannins in medicine**. Retrieved 20 January 2020. From https://www.nhpassist.com/blog/astringent-herbs/

Guzel, A.B., Aydin, M., Meral, M., Kalkancı, A. (2013). Clinical Characteristics of Turkish Women with *Candida krusei* Vaginitis and Antifungal Susceptibility of the *C. krusei* Isolates. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, *1-7*, DOI: 10.1155/2013/698736

Hamishehkar. H., Nokhodchi. A, Ghanbarzadeh. S., & Kouhsoltani. M. (2015). Triamcinolone Acetonide Oromucoadhesive Paste for Treatment of Aphthous Stomatitis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, *5*(2), 277-282.

Jeanmonod. R., & Jeanmonod. D. (2020). **Vaginal Candidiasis (Vulvovaginal Candidiasis). National Center for Biotechnology Information**. Retrieved 3 May 2020. From https://www.ncbi.nlm.nih. gov/books/NBK459317/

Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E. & Kokoska, L. (2005, April). Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. **Journal of Ethnopharmacology**, *99*(2), 309-312.

Lim S. H., Darah I., & Jain K. (2006). Antimicrobial activities of tannins extracted from Rhizophora apiculata barks. J. **Trop. Forest Sci**, *18*(1), 59–65.

Mayer, F.L., Wilson. D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, *4*(2), 119–128.

Medical Diagnostic Laboratories, L.L.C.. (2015). ***Candida* species**. Retrieved 20 September 2020. From https://www.mdlab.com/forms/TechBulletin/Candida.pdf

Mukherjee, P.K., Chen, H., Patton, L.L., Evans, S., Lee, A., Kumwenda, J., Hakim, J., Masheto, G., Sawe, F., Pho, M.T., Freedberg, K.A., Shiboski, C.H., Ghannoum, M.A., & Salata, R.A. (2017). Topical gentian violet compared to nystatin oral suspension for the treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-1 Infected participants. **AIDS**, *31*(1), 81–88.

Offor, C.E., Ugwu, P.C.O., Aja, P.M., & Igwenyi I.O. (2015). Proximate and Phytochemical Analyses of *Terminalia Catappa* Leaves. **European Journal of Applied Sciences**, *7*(1), 09-11.

Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R.J. (2013). Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLOS Pathogens**, *9*(9), 1-4.

Rodrigues, C.F., Silva, S., & Henriques, M. (2013). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology**, *33*(5), 673-688

Didem D.O., Berrin O., Selda O. & Fatma E. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiol Res**, *165*(6), 496–504.

Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H.M., Gabaldon, T., Bliss, J.M., Nosanchuk, J.D., Turner, S.A., Butler, G., Vágvölgyi, C., & Gácser, A. (2019). *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, *32*(2), 11-18.

Vázquez-González, D., Perusquía-Ortiz, A.M., Hundeiker, M., & Bonifaz, A. (2013). Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, *11*(5), 381-394.

Wawrysiuk, S., Rechberger, T., Futyma, K., & Miotla, P. (2018). *Candida lusitaniae* – a case report of an intraperitoneal infection. **Prz Menopauzalny**, *17*(2), 94–96.

Zuza-Alves, D.L., Silva-Rocha, W.P., & Chaves, G.M. (2017). An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. Front Microbiol. **Front Microbiol**, *8*(1927), doi: 10.3389/fmicb.2017.01927

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp.
ของสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง

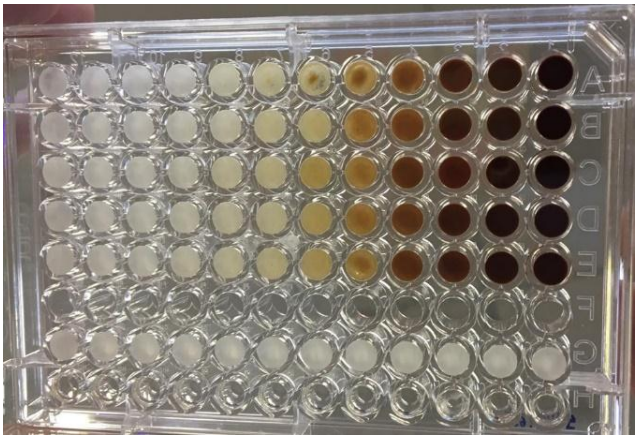
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp. ด้วยวิธี Disc Diffusion

ภาพที่ 6.1 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. albican*

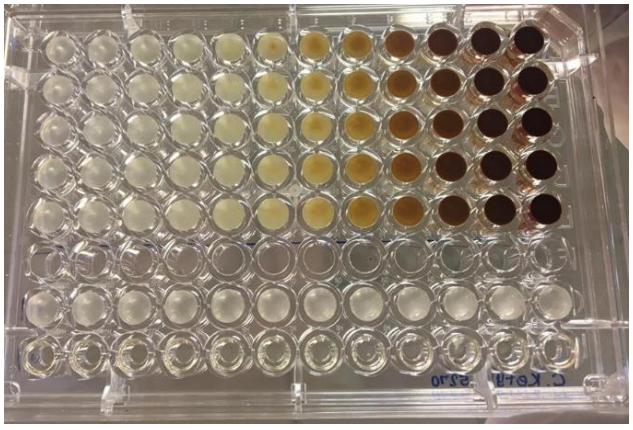
ภาพที่ 6.2 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*

ภาพที่ 6.3 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Krusei*

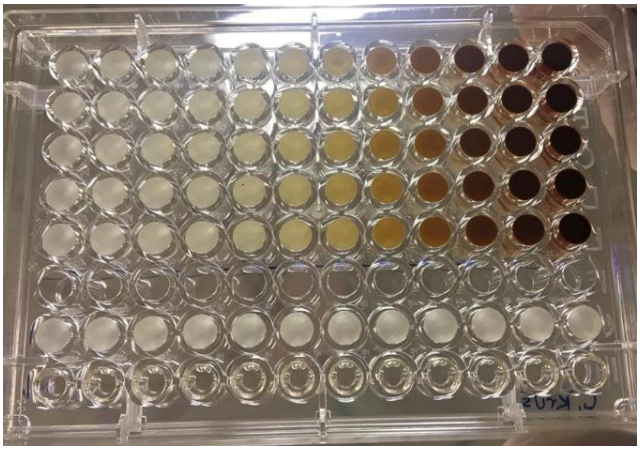
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp. ด้วยวิธี Broth microdilution



ภาพที่ 6.4 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*

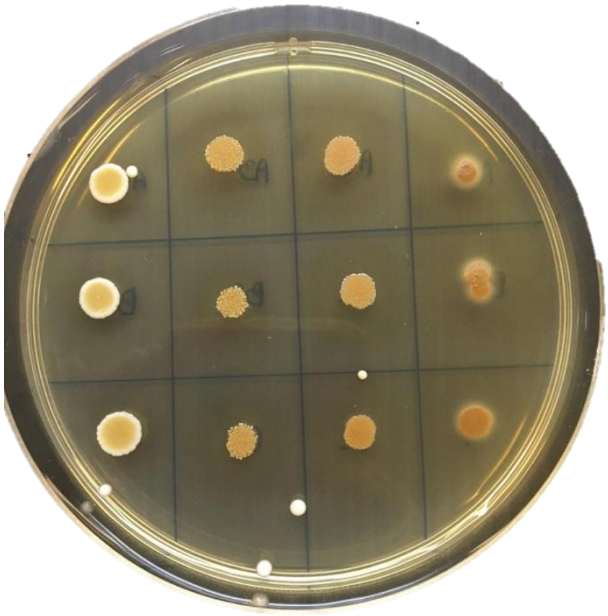


ภาพที่ 6.5 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Kefry*

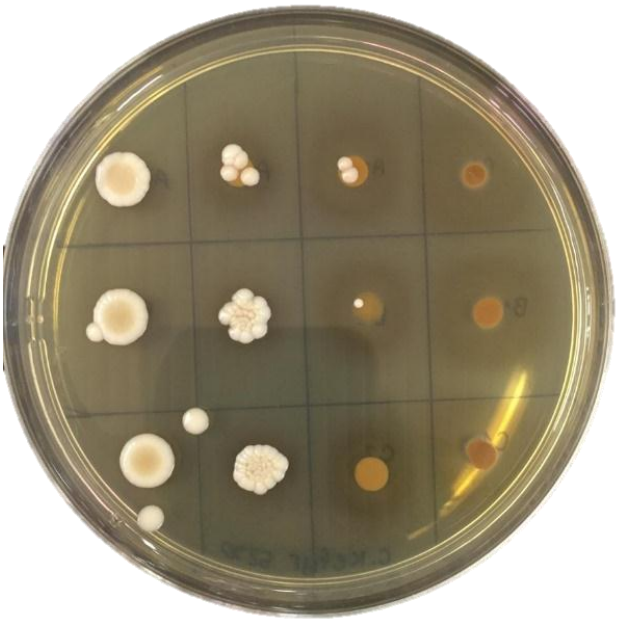


ภาพที่ 6.6 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Krusei*

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida* spp. ด้วยวิธี Broth microdilution (Spot test)

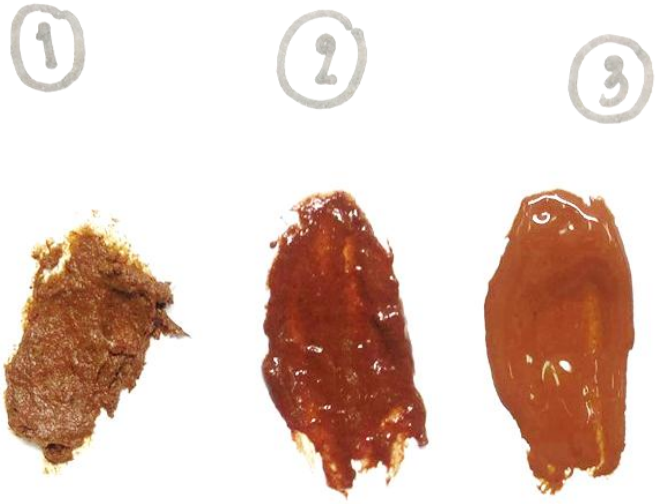


ภาพที่ 6.7 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. glabrata*



ภาพที่ 6.8 ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อ *C. Kefry*

ภาคผนวก ข
ตำรับยาป้ายปาก
จากสารสกัดหยาบจากใบหูกวาง



ภาพที่ 6.9 ตำรับยาป้ายปากก่อน Heating cooling cycle

ภาพที่ 6.10 ตำรับยาป้ายปากหลัง Heating cooling cycle

ภาคผนวก ค
หนังสือตอบรับบทความ

วารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและ
การสาธารณสุขภาคใต้
๖๔ ถนนรามวิถี อำเภอเมือง
จังหวัดสงขลา ๙๐๐๐๐

๑๖ กรกฎาคม ๒๕๖๓

เรื่อง การตอบรับลงตีพิมพ์บทความวิจัย

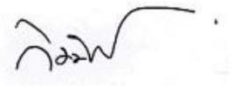
เรียน คุณณัฏฐา เชิดชูธีรกุล

ตามที่ ท่านได้ส่งบทความวิจัย เรื่อง “องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านเชื้อรา Candida spp. ของสารสกัดใบหูกวางสีแดง” โดยมีผู้นิพนธ์บทความวิชาการ คือ ๑) คุณณัฏฐา เชิดชูธีรกุล, ๒) คุณเธียร ธีระวรวงศ์ และ ๓) คุณปิลันธนา เลิศสถิตธนกร เพื่อลงตีพิมพ์เผยแพร่บทความ ในวารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้ โดยเป็นวารสาร ที่ผ่าน Peer reviewers และผ่านการรับรองคุณภาพ ของ TCI อยู่ในฐานข้อมูล TCI กลุ่มที่ ๑ นั้น

ในการนี้ กองบรรณาธิการวารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้ ได้พิจารณาแล้วยินดีรับบทความวิจัยดังกล่าว ลงตีพิมพ์เผยแพรในวารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้ ปีที่ ๙ ฉบับที่ ๑ (มกราคม – เมษายน ๒๕๖๕)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ



(ดร.กิตติพร เนาว์สุวรรณ)
บรรณาธิการ
วารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้

วารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสารธารณสุขภาคใต้
กลุ่มวิจัยและบริการวิชาการ
โทร. ๐ ๗๔๓๑ ๑๘๙๐ – ๑ ต่อ ๔๑๒
โทรสาร. ๐ ๗๔๓๑ ๒๕๖๒
www.bcnsk.ac.th
e – mail : sc.net.journal@gmail.com

หมายเหตุ: หนังสือรับรองฉบับนี้จะสมบูรณ์ต่อการรับรองของบทความวิชาการ/วิจัย จนกว่าบทความจะได้รับการแก้ไขตามขั้นตอนของวารสารและลงตีพิมพ์ในวารสารเครือข่ายวิทยาลัยพยาบาลและการสาธารณสุขภาคใต้

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวณัฏฐา เชิดชูธีรกุล
วันเดือนปีเกิด	6 ธันวาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	348-350 หมู่ที่ 8 ตำบลเขาพระ อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี รหัสไปรษณีย์ 11150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2549 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมต้นและปลายโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี พท.บ.(แพทย์แผนไทยบัณฑิต) วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดชลบุรี สมทบกับมหาวิทยาลัยบูรพา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ปฏิบัติงานด้านการเรียนการสอน (แพทย์แผนไทย)