

Research article

การพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรจากคัมภีร์การแพทย์แผนไทย
Development of Chitosan Patch Containing Herbal Extract
from Traditional Thai Medicine Scripture

เกษชญา โชติพูล*, รัชนี หมั่นรัก, ชยานนท์ เซาวนวุฒิกุล
Ketchada Chotpool*, Ratchanee Muenrak, Chayanon Chaowuttikul

หลักสูตรการแพทย์แผนไทย วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์
Thai Traditional Medicine Program, College of Integrative Medicine,
Dhurakij Pundit University

*Corresponding author, e-mail: ketchada.cho@dpu.ac.th

Received: 28 April 2023; Revised: 22 April 2024; Accepted: 3 May 2024

บทคัดย่อ

บทนำ: ตำรับสมุนไพรที่มีสรรพคุณพอกแก้พิษฝี มีความน่าสนใจในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และพัฒนาในรูปแบบที่ง่ายต่อการใช้งาน **วัตถุประสงค์:** เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร **วิธีการศึกษา:** สารสกัดตำรับเตรียมจากสมุนไพร 4 ชนิด คือ ผลสมอพิเภก เนื้อไม้กระพังอาด ผลมะคำดีควาย และเหง้าทองดี แช่สกัดด้วย 95% เอทานอล แล้วนำไปตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Acetic acid (15 : 15 : 1 : 4 : 1) และทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Inhibition zone, MIC และ MBC **ผลการศึกษา:** การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC พบว่าสารสกัดมีแถบที่ R_f เท่ากับ 55 ตรงกับ R_f ของ Gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า มีความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 7.74 ± 0.20 มิลลิเมตร โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การศึกษาพัฒนาสูตรแผ่นแปะที่ดีที่สุดจากการประเมินคุณสมบัติทางพบว่า สูตรที่ดีที่สุดประกอบด้วยไคโตซาน 1.25 กรัม ซอร์บิทอล 10 กรัม และผสมสารสกัดเป็น 2 เท่าของค่า MBC ได้แผ่นแปะที่มีคุณสมบัติที่ยอมรับได้ **บทสรุป:** สารสกัดตำรับมี Gallic acid เป็นสารสำคัญ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งสามารถนำสารสกัดไปพัฒนาแผ่นแปะเพื่อนำไปใช้ในการแพทย์ต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดสมุนไพร, ไคโตซาน, คัมภีร์การแพทย์แผนไทย, โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง, ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Background: Herbal remedies with abscess-poultice properties are interesting to test for antibacterial activity and development in an easy-to-use form. **Objectives:** This study aimed to determine the chemical identity of the herbal remedy extract using Thin layer chromatography (TLC), tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and developed a chitosan patch containing an herbal extract. **Methods:** The remedy extract was prepared from 4 species, namely, *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb., *Strychnos lucida* R. Br., *Sapindus rarak* DC and *Gloriosa superba* Linn. All crude drugs were extracted with 95% ethanol by maceration method and then examined the TLC chemical identity with the mobile phase system; Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Acetic acid (15 : 15 : 1 : 4 : 1) and evaluated for antibacterial activity with inhibition zone, MIC, and MBC methods. **Results:** TLC chemical identity

testing revealed that the extract had a band with an R_f at 55, matching the R_f of Gallic acid standard. The *S. aureus* antibacterial activity testing showed an inhibition zone of 7.74 ± 0.20 millimeters, MIC and MBC of 12.5 and 25 milligrams per milliliter, respectively. The study developed the best patch formula based on the evaluation of its properties. The best formula consists of 1.25 grams of chitosan, 10 grams of sorbitol, and the extract is mixed twice the MBC value, resulting in a patch with acceptable properties. **Conclusions:** Gallic acid is the principal compound in the remedy extract, which has antibacterial properties against *S. aureus*. The extract can be utilized to develop patches for further medical use.

Keywords: Herbal extract, Chitosan, Traditional Thai scriptures, Thin-layer chromatography, Antibacterial activity

บทนำ (Introduction)

ฝี เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณผิวหนังที่ไม่รุนแรง ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่สามารถพบได้ในทางเดินอาหาร โพรงจมูก และผิวหนังแต่เมื่อใดก็ตามที่ร่างกายอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง เชื้อชนิดนี้ก็สามารถก่อโรคได้ โดยก่อโรคตั้งแต่ระดับไม่รุนแรงจนกระทั่งก่อโรคระดับรุนแรง เช่น ปอดอักเสบ ข้ออักเสบ และติดเชื้อในกระแสเลือด¹ นอกจากนี้ยังมีการรายงานการติดเชื้อซ้ำซ้อนหลายชนิดทำให้การรักษายากขึ้นรวมถึงมีโอกาเสียชีวิตได้สูงเนื่องจากเชื้อเหล่านี้มักไม่มียาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการต้านเชื้อหรือเป็นยาที่มีผลข้างเคียงสูง² ซึ่งในปัจจุบันสมุนไพรถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง สารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดสามารถใช้ในการรักษาโรคได้โดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในร่างกาย³ หลายประเทศทั่วโลกจึงเริ่มให้ความสำคัญกับสมุนไพรอย่างมากโดยเฉพาะอุตสาหกรรมยาต้านจุลชีพที่ตระหนักถึงปัญหาเชื้อดื้อยาที่เพิ่มขึ้น จึงมีการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์มากขึ้นเพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพง อีกทั้งยาที่ได้จากสมุนไพรยังช่วยแก้ปัญหาเรื่องการดื้อยาของเชื้อก่อโรคบางชนิดได้⁴

คัมภีร์ไพจิตรมหาวงศ์เป็นคัมภีร์ทางการแพทย์แผนไทยซึ่งอธิบายเกี่ยวกับลักษณะของฝีประเภทต่าง ๆ ว่าเป็นเม็ดยอดเดียวเกิดภายนอกร่างกายอยู่ในตำแหน่งต่างกับบริเวณด้านหน้าและด้านหลังของร่างกาย ยังกล่าวถึงการเกิดฝีในเดือนต่าง ๆ ทั้ง 12 เดือน และตำรับยาที่ใช้รักษาโรคฝีหลายตำรับตำรับยาพอกแก้พิษฝีในคัมภีร์ไพจิตรมหาวงศ์มีอยู่ 5 ตำรับซึ่งตำรับที่ 5 ประกอบด้วยสมุนไพรที่ยังคงหาได้ในปัจจุบัน

คือ รากสมอพิเภก (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.) รากกระพังอาดหรือพญามือเหล็ก (*Strychnos lucida* R. Br.) รากมะคำติควาย (*Sapindus rarak* DC) และหัวทองดึง (*Gloriosa superba* Linn.)⁵ จากการศึกษาข้อมูลสารพฤกษเคมีที่พบในสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด พบว่าสมอพิเภกมีสารกลุ่มแทนนิน (Tannins) ได้แก่ Chebulagic acid, Ellagic acid และ Gallic acid เป็นต้น กระพังอาดมีสาร Brucine, Polyneuridine และ Mucosine B เป็นต้น ทองดึงมีสาร Colchicine, Gloriosine, Superbicine, Benzoic acid, Salicylic acid และ Sterols เป็นต้น มะคำติควายมีสาร Hederagenin, Sapindoside B และ Emarginoside B เป็นต้น⁶ จากรายงานการวิจัยในระดับหลอดทดลอง พบว่าสารกลุ่มแทนนินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinases) ด้านการอักเสบ ช่วยลดน้ำตาลในเลือด รวมถึงยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลได้ ตลอดจนช่วยปกป้องกระบวนการทำลายตับในระดับสัตว์ทดลอง มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง เช่น เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งเต้านม⁷ หากพิจารณาตามหลักโครงสร้างยาไทยในยาหนึ่งตำรับประกอบด้วย ตำรายาตรง คือ ตำยาที่เข้าไปกระทำกับโรคโดยตรง ตำยาช่วย คือ ตำยาที่ใช้รักษาโรคแทรกหรือหลายโรครวมกัน ตำยาประกอบ คือ ตำยาที่ช่วยป้องกันโรคตามหรือคุมฤทธิ์ด้วยอื่น ตำยาชูกำลัง บรุงและแต่งสี คือ ตำยาที่ทำให้ยารับประทานง่ายขึ้น⁸ เมื่อวิเคราะห์ตำรับยาพอกแก้พิษฝีในคัมภีร์ที่ 5 พบว่า ตำยาตรงเป็นสมุนไพรที่มีรสฝาด สรรพคุณสมานแผล ตำยาช่วยเป็นสมุนไพรที่มีรสเมาเบื่อ สรรพคุณ แก้พิษ และตำยาประกอบเป็นสมุนไพรที่มีรสร้อน สรรพคุณ ขับลม จากข้อมูลสนับสนุนดังกล่าวตำรับยานานที่ 5 จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นแผ่นแปะโคโคซาน

โคโคซานจัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์และเป็นอนุพันธ์ของไคตินทั้งไคตินและโคโคซานสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ยับยั้งแบคทีเรียและมีสารต้านอนุมูลอิสระ ไคตินสามารถพบได้ในธรรมชาติทั่วไปโดยมากจะพบในสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในโพลีเมอร์โทโพดา เช่น กุ้ง กุ้งปู เป็นต้น ไคโคซานจะละลายได้ดีในกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพานิก และกรดแลคติก สารละลายโคโคซานจะมีความเหนียวใสสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ จากคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีการนำโคโคซานมาประยุกต์ใช้ทำวัสดุปิดแผลทางการแพทย์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาแบบผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบสำหรับใช้ภายนอกโดยอาศัยการนำส่งยาผ่านผิวหนัง เช่น ขี้ผึ้ง ครีม เจล แผ่นแปะ เป็นต้น แต่มักมีข้อจำกัดในเรื่องการควบคุมปริมาณยาของผลิตภัณฑ์ขี้ผึ้ง ครีม เจล ในขณะที่แผ่นแปะผิวหนังเป็นรูปแบบที่สามารถควบคุมปริมาณยาที่นำส่งได้แน่นอนกว่า⁹⁻¹⁰

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจสมุนไพรในตำรับที่ 5 ในคัมภีร์ไพจิตรมหาวงศ์ แต่ใช้ส่วนของสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถหาซื้อได้ตามร้านขายสมุนไพรไทยและนำสารสกัดมาพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ให้อยู่ในรูปแบบแผ่นแปะที่สะดวกต่อการใช้งาน เป็นทางเลือกในการรักษาโดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในร่างกาย

วิธีการศึกษา (Method)

1. วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพร

ตำรับสมุนไพรประกอบด้วยผลสมอพิเภก เนื้อไม้กระพังอาด ผลมะคำดีควาย และเหง้าตองดิง (รูปที่ 1) ซึ่งจากร้านขายสมุนไพรไทย นำมาทำความสะอาด อบให้แห้ง แล้วบดหยาบ นำผงสมุนไพรแต่ละชนิดอย่างละ 200 กรัมมาผสมกัน แล้วนำไปสกัดสารด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร แยกสกัดไว้ 7 วัน โดยทำการคนทุกวัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษ Whatman™ No.1 และนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วระเหยต่อด้วยฆากระบะบน Water bath จนแห้ง คำนวณหาร้อยละของสารสกัด (% yield) ที่ได้ (ร้อยละของสารสกัด = (น้ำหนักของสารสกัด/น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) × 100) นำสารสกัดตำรับที่ได้เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography)

เตรียมสารสกัดตำรับ 0.2 กรัม ละลายด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่ง Gallic acid 1 มิลลิกรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ micropipette หยด (Spot) สารสกัดและสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC ขนาด 3×10 เซนติเมตร โดยกำหนดให้ห่างจากปลายล่างขอบแผ่น TLC ขึ้นมา 1 เซนติเมตร ในแต่ละจุดห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ด้านบนของแผ่น TLC plate ขีดระดับตัวทำละลายไว้ (Solvent front) ห่างจากขอบ 1 เซนติเมตร เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Acetic acid อัตราส่วน 15 : 15 : 1 : 4 : 1 จากนั้นเทลงใน TLC chamber นำกระดาษกรองใส่และปิดฝาทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ภายใน TLC chamber อิ่มตัวไปด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ นำแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ไปตั้งใน TLC chamber ที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายพร้อมกับปิดฝาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับ Solvent front ที่กำหนดไว้ จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC chamber ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง ตรวจสอบแถบสารสำคัญที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC โดยมองด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV chamber บันทึกภาพแล้วคำนวณค่า R_f ของสารสกัดและสารมาตรฐาน โดยใช้สูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}} \times 100$$

3. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ของสารสกัดสมุนไพรและ Ampicillin ด้วยวิธี Agar well diffusion

ดัดแปลงตามวิธีการของ CLSI M2-A9 (2006)¹¹ โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร TSB ภายใต้สภาวะแบบใช้อากาศ ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะนำเชื้อมาปรับปริมาณให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (1-2 ×10⁸ CFU ต่อ มิลลิลิตร) ด้วยอาหาร TSB

เตรียม Stock solution ของสารสกัดตำรับ โดยละลายสารสกัดใน 95% เอทานอล ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร เตรียม Stock solution ของ Positive control โดยเจือจางยา Ampicillin ใน DI water ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และเตรียม Stock solution ของ Negative control โดยใช้ 95% เอทานอล และ DI water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมจานอาหารทดสอบปริมาตร 20 มิลลิลิตร วางไว้ให้แห้งตัวที่อุณหภูมิห้องป้ายหัวเชื้อทดสอบลงในแต่ละจานอาหารทดสอบ เจาะเนื้อวุ้นอาหารให้เกิดเป็นรูตรงกลางและเติมสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และ Ampicillin ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเพาะจานอาหารทดสอบ ทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้กับกลุ่มควบคุม ได้แก่ 95% เอทานอล (กลุ่มควบคุมของสารสกัด), DI water (กลุ่มควบคุมของ Ampicillin) และอาหารทดสอบ TSB ตรวจสอบและบันทึกผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย อ่านผลความแรงต้านเชื้อทดสอบของสารสกัด โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์

4. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Agar dilution method

ดัดแปลงตามวิธีของ CLSI M7-A9 (2006)¹² โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร TSB ภายใต้สภาวะแบบใช้อากาศ ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะนำเชื้อมาปรับปริมาณให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard (1-2 ×10⁸ CFU ต่อ มิลลิลิตร) ด้วยอาหาร TSB

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารทดสอบ TSA และสารสกัดตำรับให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 800 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบจำนวน 3 ความเข้มข้น เท่ากับ 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร วางไว้ให้อาหาร

ทดสอบในจานอาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม ปริมาตรกลุ่มละ 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วยอาหารทดสอบ TSA และ 95% เอทานอล (กลุ่มควบคุมของสารสกัด) และอาหารทดสอบ TSA การทดสอบทำซ้ำ 3 ซ้ำต่อตัวอย่างทดสอบ

ทำ Spot inoculation บนจานอาหารทดสอบโดยปิเปตต์หัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร แตะบนผิวหน้าของอาหารทดสอบ (ปริมาณเชื้อสุดท้ายในการอาหารทดสอบ เท่ากับ 1×10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร) ปลอຍให้สารละลายเชื้อที่ผิวหน้าอาหารขึ้นแข็งซึ่มลงไปหมดในแต่ละจานอาหารทดสอบ ป้มเพาะจานอาหารทดสอบ ทำ 3 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ตรวจสอบและบันทึกผลทดสอบ หากไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

5. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) โดยวิธี Agar dilution method

ดัดแปลงตามวิธีของ CLSI M7-A9 (2006)¹² โดยคัดเลือกจานอาหารทดสอบที่ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบเจาะจานอาหารทดสอบบริเวณที่ตรวจไม่พบการเจริญของจานอาหารดังกล่าวด้วย Cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และวางจานอาหารดังกล่าวบนเมมเบรนชนิดไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งอยู่บนจานอาหารทดสอบที่มีอาหาร TSA ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ป้มเพาะจานอาหารทดสอบที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ตรวจผลการไม่พบการเจริญของเชื้อดังกล่าวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

6. การเตรียมแผ่นแปะโคโตซานสูตรต้นแบบ

นำผงโคโตซานขนาด 30 mesh มาทำการทดลองโดยใช้น้ำหนักของผงโคโตซาน 1, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2 กรัม ละลายใน 1% กรดอะซิติก (Acetic acid) และ 1% กรดแลคติก (Lactic acid) นำไปปั่นโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) จนโคโตซานที่ได้เป็นสารละลายใส ทดสอบค่า pH ด้วย pH-indicator strips และปรับค่า pH ด้วย Triethanolamine นำไปทำการทดลองผสมกับซอร์บิทอล (Sorbitol) จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงใน petri dish นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บใน desiccator เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนโคโตซานแห้งและศึกษาลักษณะภายนอกของฟิล์มที่ได้ สี กลิ่น ความเหนียว ความสม่ำเสมอของเนื้อแผ่นแปะ เลือกสูตรที่ดีที่สุดเป็นสูตรต้นแบบ และทดสอบคุณสมบัติต่อไป

7. การพัฒนาแผ่นแปะโคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร

นำสารละลายโคโตซานสูตรที่ดีที่สุดผสมกับสารสกัดตำรับที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด

ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ลงใน petri dish ทดสอบค่า pH ด้วย pH-indicator strips นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเก็บใน desiccator เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนโคโตซานแห้ง ทดสอบลักษณะทางกายภาพ โดยศึกษาลักษณะภายนอกของแผ่นแปะที่ได้ สี กลิ่น ความเหนียว ความสม่ำเสมอของเนื้อแผ่นแปะ และศึกษาการยึดติดของแผ่นแปะโคโตซานโดยใช้จำนวน 5 แผ่น แปะไว้ด้านในของบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำไว้ แล้วนำบีกเกอร์ไปปั่นโดยใช้เครื่อง (Magnetic stirrer) จับนเวลาที่แผ่นแปะเกาะอยู่จนหลุดออกจากบีกเกอร์

ผลการศึกษา (Results)

สารสกัดตำรับที่ได้มีลักษณะขุ่นหนืดสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 2) ปริมาณของสารสกัด คิดเป็นร้อยละ 7.74 (% yield) การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography) โดยใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Acetic acid อัตราส่วน 15 : 15 : 1 : 4 : 1 แล้วมองด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 3) พบว่าสารสกัดมีแถบที่ R_f เท่ากับ 55 ซึ่งตรงกับ R_f ของ Gallic acid

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 เปรียบเทียบกับยา Ampicillin ด้วยวิธี Agar well diffusion พบการสร้างโซนใสต้านเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อหลอด) โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ 7.74 ± 0.20 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1 และรูปที่ 4A) พบการสร้างโซนใสต้านเชื้อแบคทีเรียของ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 100 ไมโครกรัมต่อหลอด) โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ 42.29 มิลลิเมตร และไม่พบการสร้างโซนใสในกลุ่มควบคุมทั้งสอง (ตารางที่ 1 และรูปที่ 4C, 4B และ 4D ตามลำดับ)

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) โดยวิธี Agar dilution method พบว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารทดสอบ TSA ที่มีความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัด 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารทดสอบ TSA ที่มีความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัด 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5A) และพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารทดสอบ TSA ที่มีเอทานอลซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5B) ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหารทดสอบ TSA ที่มีตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตรบนเมมเบรนชนิดในลอนที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งอยู่บนจานอาหาร TSA (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6A) แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนจานอาหารทดสอบ TSA ที่มีตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 6B) ดังนั้นสารสกัดตำรับมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ผลการพัฒนาแผ่นแปะจากไคโตซานสูตรต้นแบบทั้งหมด 20 สูตร (ตารางที่ 3) โดยนำผงไคโตซานละลายในกรดอะซิติกและกรดแลคติก ผสมกับซอร์บิทอล (Sorbitol) ในสัดส่วนต่างกัน นำไปอบและเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) พบว่าการพัฒนาแผ่นแปะจากไคโตซานสูตรต้นแบบทุกสูตรที่ยังไม่ผสมสารสกัดให้แผ่นแปะสีใส เนื้อแผ่นแปะมีความสม่ำเสมอ ไม่มีกลิ่นกรด สูตรที่ดีที่สุดคือสูตรที่ 5 ซึ่งเตรียมจากไคโตซาน 1.25 กรัม ที่ละลายอยู่ใน 1% กรดอะซิติกและ 1% กรดแลคติก นำมาปริมาณ 5 กรัม ผสมกับซอร์บิทอล 10 กรัม ได้เนื้อแผ่นแปะมีความสม่ำเสมอและมีความยืดหยุ่นดี ไม่แข็งเกินไป (รูปที่ 7) เมื่อผสมสารสกัดตำรับที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสูตรต้นแบบสูตรที่ 5 ให้แผ่นแปะสีน้ำตาลอ่อนใส เนื้อแผ่นแปะมีความสม่ำเสมอ และมีความยืดหยุ่นดี ไม่มีกลิ่นกรด (รูปที่ 8) ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบและแผ่นแปะที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับ พบว่าค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ของน้ำหนักแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบมีค่าเท่ากับ 0.092 ± 0.020 กรัม ซึ่งน้อยกว่าแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับมีค่าเท่ากับ 0.122 ± 0.020 กรัม การทดสอบเวลาการยืดยึดของทั้งสองสูตร พบว่าแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัด มีเวลาในการยืดยึดน้อยกว่าแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นตำรับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 16 นาที และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

อภิปรายผล (Discussion)

ในการศึกษาการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ผู้วิจัยได้ดัดแปลงวิธีกาเคมีเคลื่อนที่จากงานวิจัยก่อนหน้า¹³ ที่ได้ศึกษาการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของเครื่องยาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบางของเครื่องยาไทยจำนวน 30 ชนิด โดยเลือกใช้วิธีกาเคมีเคลื่อนที่ของสมอไทย คือ Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid แต่เนื่องจากสารละลายนี้แยกแถบของสารสกัดได้ไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงเติม Acetic acid เพื่อให้การแยกสารสกัดได้ชัดเจนขึ้น ได้วิธีกาเคมีเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ Toluene : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Acetic acid อัตราส่วน 15 : 15 : 1 : 4 : 1 ปรากฏแถบและมีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐาน Gallic acid นอกจากนี้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย¹⁴ มีการจัดทำโครมาโทกราฟีแบบผิวบางของผลสมอพิเภก โดยใช้วิธีกาเคมีเคลื่อนที่ คือ Toluene : Ethyl acetate : Anhydrous formic acid อัตราส่วน 10 : 9 : 2

เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ปรากฏแถบและมีค่า R_f ที่ 47-50 ดังนั้นในสารสกัดตำรับนี้มีสาร Gallic acid เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus*¹⁵ จากงานวิจัยก่อนหน้าได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 9144 ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเมทานอลของผลสมอพิเภกที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม มีความกว้างของบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) เท่ากับ 28 และ 30 มิลลิเมตร ตามลำดับ และการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ด้วยวิธี Broth dilution พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเมทานอลของผลสมอพิเภกสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 300 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ¹⁶ ซึ่งในงานวิจัยนี้ สารสกัดตำรับมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นกัน

การพัฒนาตำรับแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบทุกสูตรที่ยังไม่ใส่สารสกัดตำรับจำนวน 20 สูตร ประกอบด้วยไคโตซานและซอร์บิทอล ละลายใน 1% กรดอะซิติกและ 1% กรดแลคติก เมื่อศึกษาลักษณะภายนอกของฟิล์มที่ได้ สี กลิ่น ความเหนียว ความสม่ำเสมอของเนื้อแผ่นแปะ พบว่าสูตรแผ่นแปะที่ดีที่สุดคือ สูตรที่เตรียมจากไคโตซาน 1.25 กรัม ที่ละลายอยู่ใน 1% กรดอะซิติกและ 1% กรดแลคติก นำมาปริมาณ 5 กรัม ผสมกับซอร์บิทอล 10 กรัม ลักษณะของแผ่นแปะมีสีใส บาง ยืดหยุ่นดี เนื้อแผ่นแปะมีความสม่ำเสมอ ไม่มีกลิ่นกรด จึงเลือกสูตรนี้มาพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานที่ผสมสารสกัดตำรับที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็น 2 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ (MBC) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า¹⁷ ได้ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยแผ่นแปะจากตำรับยาทาแก้พิษฝี ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้มีค่าเป็น 2 เท่าของค่า MBC การทดสอบทางกายภาพของแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบและแผ่นแปะไคโตที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของน้ำหนักแผ่นแปะทั้ง 2 สูตร มีค่าต่างกันเล็กน้อย แต่เมื่อนำไปทดสอบการยืดยึดของแผ่นแปะ พบว่าแผ่นแปะไคโตซานที่ผสมสารสกัดตำรับ มีค่าเฉลี่ยการยืดยึดน้อยกว่า คือ 16 นาที ต่างจากสูตรต้นแบบของแผ่นแปะไคโตซานที่ให้ค่าเฉลี่ยการยืดยึดอยู่ที่ 2 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเมื่อผสมสารสกัดในสูตรต้นแบบส่งผลให้ความยืดหยุ่นของแผ่นแปะลดลง มีความแข็งมากขึ้น

บทสรุป (Conclusion)

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร ประกอบด้วย ผลสมอพิเภก เนื้อไม้กระพังอาด ผลมะคำดีควาย และเหง้าดอกตัง สกัดด้วย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่สกัด (Maceration) นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid พบว่า มีค่า hR_f เท่ากันที่ 55 และทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ด้วยวิธี Agar well diffusion และ Agar dilution method พบว่ามีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ 7.74 ± 0.20 มิลลิเมตร และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การเตรียมแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบโดยการผสมไคโตซานกับซอร์บิทอลที่มีความเข้มข้นต่างกัน เพื่อศึกษาสูตรต้นแบบที่ดีที่สุดจากการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ความสม่ำเสมอของเนื้อแผ่นแปะ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนัก และการยืดเกาะของแผ่นแปะไคโตซาน พบว่าสูตรที่ดีที่สุดซึ่งประกอบด้วยไคโตซาน 1.25 กรัม ซอร์บิทอล 10 กรัม ผสมสารสกัดตำรับที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MBC จะได้แผ่นแปะที่มีสีน้ำตาลอ่อน ใส เนื้อแผ่นแปะมีความสม่ำเสมอ และมีความยืดหยุ่นดี ไม่มีกลิ่นกรด ซึ่งเหมาะนำสารสกัดไปพัฒนาแผ่นแปะเพื่อนำไปใช้ในการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo HS, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018;562:532-537. doi:10.1038/s41586-018-0616-y
2. อารยา ข้อคำ. ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*. 2563;27(2):125-139.
3. วันทนีย์ สว่างอารมณ์, พาฝัน จันทร์เล็ก. การเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*. *วารสารก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์*. 2555;55(12):47-57.
4. วชิรพันธ์ รังสิยานุรัตน์, พิชรี กัมมาระเจษฎากุล, อิศยา จันทรวินยานุชิต. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. *วารสาร มฉก. วิชาการ*. 2559;19(38):35-48.
5. ปณิดา ถนอมวงศ์. *คู่มือประกอบการเรียนเวชกรรมไทย เล่ม 2*. บริษัท วิชั่น พรินท์ส จำกัด: 2559.

6. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. *คู่มือการกำหนดพื้นที่ส่งเสริมการปลูกสมุนไพรเพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมไทย*. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก: 2558.
7. พิมพ์สุนัน เจริญบุญศรี. เภสัชจลนศาสตร์ของสารกลุ่มแทนนิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*. 2562;28(1):1-14.
8. กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. *ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม*. กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข: 2541.
9. สุริดา คงทอง. ไคติน-ไคโตซาน (Chitin-Chitosan). *วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา*. 2552;3(1):1-7.
10. ไพรัช วงศ์ยุทธไกร, โอภาส สุขหวาน, สุริดา คงทอง. การผลิตแผ่นซับหน้ามันจากไคโตซานแบบแผ่นฟิล์มและแผ่นกระดาษ. *วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา*. 2552;3(1):25-31.
11. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard - 9th ed*. CLSI document M2-A9. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: 2006.
12. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - 7th ed*. CLSI document M7-A7. Clinical Laboratory Standards Institute, Villanova, PA: 2006.
13. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธ์, ประไพ วงศ์สินคงมัน. ทีแอลซี : วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก: 2551.
14. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. *Thai Herbal Pharmacopoeia 2021, Volume II*. Keawjawjom printing & publishing Suan Sunandha Rajabhat university: 2017.
15. Pu SB, Ma ZJ, Wang Q. Anti-*Staphylococcus aureus* evaluation of gallic acid by isothermal microcalorimetry and principle component analysis. *J Therm Anal Calorim*. 2019;136:1425-1432. doi:10.1007/s10973-018-7726-5

16. Elizabeth KM. Antimicrobial activity of *Terminalia bellerica*. *Indian J Clin Biochem*. 2005;20:150-153. doi: 10.1007/BF02867416
17. วาลูกา พลายงาม, ชลิตา สมโภชน์, นันทปภัสร นทีพิทักษ์. ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลและแผ่นแปะจากตำรับยาทาแก้พิษฝีต่อการต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*. *การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยรังสิต*. มหาวิทยาลัยรังสิต; 2561. 29-37. จาก: <https://rsucon.rsu.ac.th/proceeding/article/4>

การอ้างอิง

เกศขุภา โขติพูล, รัชนี หมื่นรัก, ชยานนท์ เขาวนวุฒิกุล. การพัฒนาแผ่นแปะไคโตซานที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรจากคัมภีร์การแพทย์แผนไทย. *วารสารวิชาการราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์*. 2567; 6(3): 129-139. <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jcra/article/view/262690>

Chotpool K., Muenrak R., Chaowuttikul C. Development of Chitosan Patch Containing Herbal Extract from Traditional Thai Medicine Scripture. *J Chulabhorn Royal Acad*. 2024; 6(3): 129-139. <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jcra/article/view/262690>

Online Access

<https://he02.tci-thaijo.org/index.php/jcra/article/view/262690>



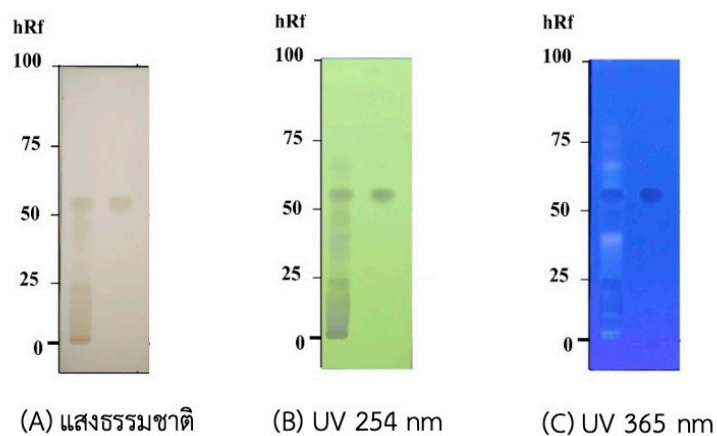
รูปภาพและตาราง (Figures and Tables)



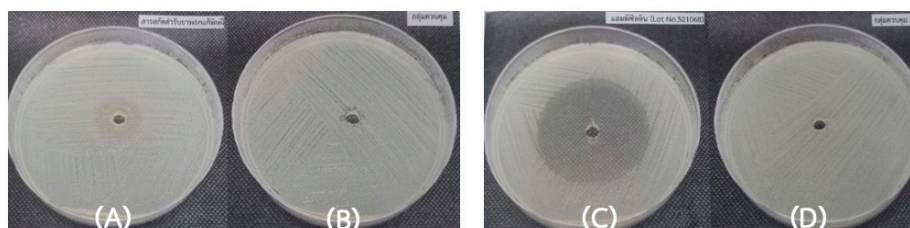
รูปที่ 1 ลักษณะส่วนที่ใช้ของสมุนไพรในตำรับ



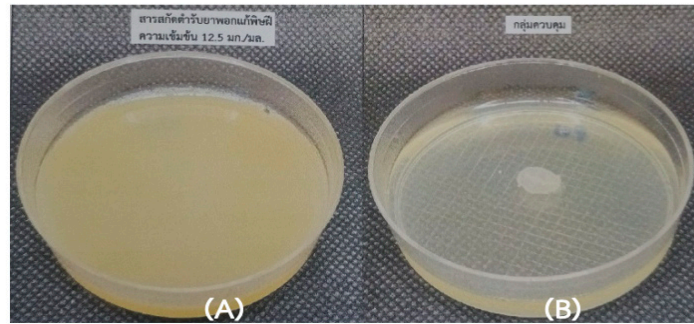
รูปที่ 2 ลักษณะของสารสกัด



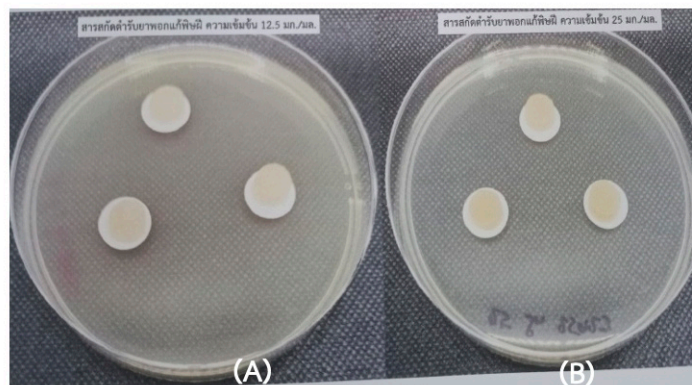
รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารสกัดตำรับเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid



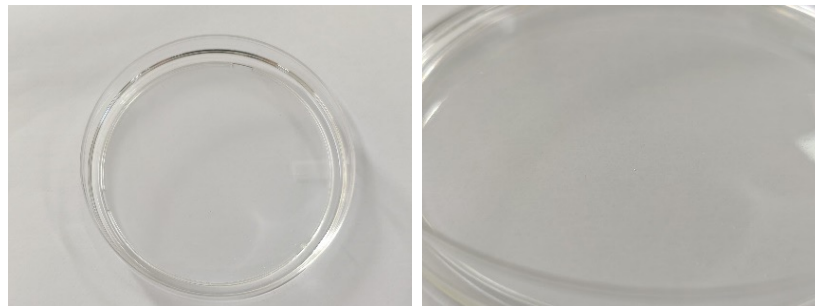
รูปที่ 4 บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) ของเชื้อ *S. aureus*
(A) สารสกัดตำรับ, (B) 95% เอทานอล, (C) Ampicillin และ (D) DI water



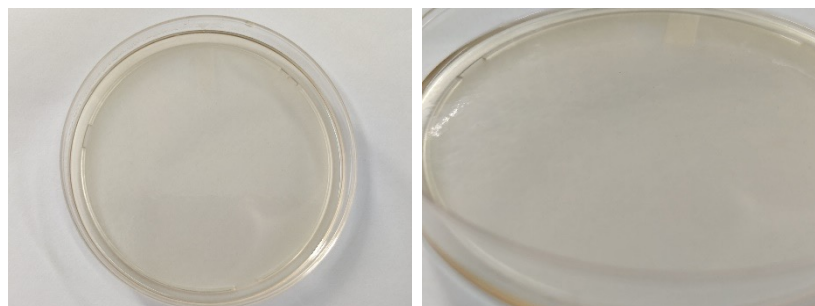
รูปที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC)
(A) สารสกัดตำรับ และ (B) 95% เอทานอล



รูปที่ 6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) บนเมมเบรนชนิดไนลอน
(A) สารสกัดตำรับที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
(B) สารสกัดตำรับที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 7 ลักษณะของแผ่นเพาะโคไตซานสูตรที่ 5



รูปที่ 8 ลักษณะของแผ่นเพาะที่ผสมสารสกัดสมุนไพร

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 ของสารสกัด ด้วยวิธี Agar well diffusion

ตัวอย่างทดสอบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง ± SD (mm)
สารสกัดสมุนไพร	7.74 ± 0.20 mm
Ampicillin (Positive control)	42.29 mm
95% เอทานอล (Negative control)	ไม่เกิด Clear zone
DI water (Negative control)	ไม่เกิด Clear zone

หมายเหตุ: ความกว้างของบริเวณการยับยั้งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อน

ตารางที่ 2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 ในอาหารทดสอบ TSA ที่มีตัวอย่างสารสกัด

ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	การพบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	
	บนอาหาร TSA	บนวุ้นอาหาร TSA ที่มีค่าความเข้มข้นที่ คัดเลือกจากผลทดสอบหาค่า MIC
6.25	G	NT
12.5	NG	G
25	NG	NG
กลุ่มควบคุม A	G	NT
กลุ่มควบคุม B	G	NT

หมายเหตุ: G หมายถึง พบการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารทดสอบ

NG หมายถึง ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารทดสอบ

NT หมายถึง ไม่ทำการทดสอบ

กลุ่มควบคุม A หมายถึง จานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี 95% เอทานอล

กลุ่มควบคุม B หมายถึง จานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3 สูตรแผ่นแปะไคโตซานต้นแบบ

สูตรที่	ปริมาณของไคโตซานที่ละลายอยู่ใน 1% กรดอะซิ ติกและ 1% กรดแลคติก (กรัม)	ปริมาณสารละลาย ไคโตซานที่ใช้ตั้งตำรับ (กรัม)	ปริมาณ ซอร์บิทอล (กรัม)
1	1.00	5.00	10.00
2	1.00	5.00	20.00
3	1.00	10.00	10.00
4	1.00	10.00	20.00
5	1.25	5.00	10.00
6	1.25	5.00	20.00
7	1.25	10.00	10.00
8	1.25	10.00	20.00
9	1.50	5.00	10.00
10	1.50	5.00	20.00
11	1.50	10.00	10.00
12	1.50	10.00	20.00

สูตรที่	ปริมาณของไคโตซานที่ละลายอยู่ใน 1% กรดอะซิติกและ 1% กรดแลคติก (กรัม)	ปริมาณสารละลายไคโตซานที่ใช้ตั้งตำรับ (กรัม)	ปริมาณซอร์บิทอล (กรัม)
13	1.75	5.00	10.00
14	1.75	5.00	20.00
15	1.75	10.00	10.00
16	1.75	10.00	20.00
17	2.00	5.00	10.00
18	2.00	5.00	20.00
19	2.00	10.00	10.00
20	2.00	10.00	20.00

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบ

สูตรที่	สี	กลิ่น	ความเหนียวและการยืดหยุ่น	ความสม่ำเสมอของเนื้อแผ่นแปะ
1-4	ใส	ไม่มีกลิ่นกรด	บาง, เปราะง่าย	มีความสม่ำเสมอ
5-8	ใส	ไม่มีกลิ่นกรด	บาง, ยืดหยุ่นดี	มีความสม่ำเสมอ
9-12	ใส	ไม่มีกลิ่นกรด	หนา, ยืดหยุ่น	มีความสม่ำเสมอ
13-16	ใส	ไม่มีกลิ่นกรด	แข็ง, เปราะ	มีความสม่ำเสมอ
17-20	ใส	ไม่มีกลิ่นกรด	แข็ง, เปราะ	มีความสม่ำเสมอ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบคุณสมบัติระยะเวลาในการยัดติระหว่างแผ่นแปะไคโตซานสูตรต้นแบบและสูตรผสมสารสกัด

สูตร	ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ของน้ำหนัก)	S.D.	เวลาในการยัดติ
สูตรต้นแบบ	0.092 กรัม	0.02	2 ชั่วโมง
สูตรผสมสารสกัด	0.122 กรัม	0.02	16 นาที