การพัฒนาตำรับไฟโบรอินอิมัลเจล เพื่อการรักษาแผลที่มีการติดเชื้อ

นางสาว ชนิตา ธีระนันทกุล
นาย ดนัย ศิริบรรจงโชค

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

THE DEVELOPMENT OF FIBROIN EMULGEL FOR INFECTIOUS WOUND

MISS CHANITA TEERANANTAKUL
MR. DANAI SIRIBUNJONGCHOKE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การพัฒนาตำรับไฟโบรอินอิมัลเจลเพื่อการรักษาแผลที่มีการติดเชื้อ

ลายเซ็น

.....

(นางสาวชนิตา ธีระนันทกุล)

ลายเซ็น

.....

(นายดนัย ศิริบรรจงโชค)

ลายเซ็น

.....

(รศ.ดร. ปลื้มจิตต์ โรจนพันธ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลายเซ็น

.....

(ผศ.ดร. วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ
การพัฒนาตำรับอิมัลเจลไฟโบรอินเพื่อการรักษาแผลติดเชื้อ

ชนิตา ธีระนันทกุล , ดนัย ศิริบรรจงโชค

อาจารย์ที่ปรึกษา : ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์* , วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์**

*ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ อิมัลเจลไฟโบรอิน, ต้นหญ้าเกล็ดหอย (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.), แผลที่มีการติดเชื้อ

โครงการพิเศษนี้เป็นการพัฒนาตำรับอิมัลเจลไฟโบรอินตำรับเดิมที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลได้เป็นอย่างดี และ ผ่านการทดลองทางคลินิกมาแล้ว ให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ โดยใช้สารสกัดสมุนไพรจากต้นหญ้าเกล็ดหอยที่ช่วยในการต้านเชื้อเหมือนยาปฏิชีวนะ ในขั้นตอนการสกัดสารจากต้นหญ้าเกล็ดหอยใช้ Ethanol 80%เพื่อสกัดสารและใช้ Hexaneเพื่อแยกคลอโรฟิลล์ออก ได้สารสกัดมาทั้งสิ้น 3 ส่วน คือ ส่วนที่สกัดคลอโรฟิลล์ออกแล้ว , ส่วนที่ยังมีคลอโรฟิลล์อยู่ และ ส่วนที่อยู่ในชั้นของ Hexane นำทั้ง 3 ส่วนไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่มักก่อให้เกิดการติดเชื้อที่แผล โดยใช้วิธีเจาะหลุมและวัด Inhibition Zone หาค่า MIC พบว่าสารสกัดส่วนที่ยังมีคลอโรฟิลล์อยู่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด มีค่า MIC 10 mg/ml โดยในการทดลองใช้ Tetracycline เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ นำสารสกัดหญ้าเกล็ดหอยส่วนที่ยังมีคลอโรฟิลล์อยู่มาตั้งตำรับรวมกับตำรับอิมัลเจลไฟโบรอินเดิม โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 3 เท่าของค่าMICได้ตำรับเป็นเนื้อครีมสีเขียว ละเอียดและมีความเหนียวข้นพอสมควร นำตำรับไปทดสอบโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยใช้วิธีเดิม พบว่าตำรับนี้มีส่วนประกอบของ polymer ที่จับสารสกัดไว้ในตำรับ ทำให้ไม่สามารถแพร่เข้าไปออกฤทธิ์ได้ จึงใช้สารละลายอินทรีย์คือ $CaCl_2$: Ethanol : H_2O ในอัตราส่วน 1:2:8 และ Ethanol 80 % เป็นตัวทำละลายก่อนไปทดสอบ ซึ่งเทียบได้กับการนำครีมไปทาให้กระจายไปบนผิว ซึ่งทำให้ตัวยาสามารถสัมผัสกับเซลล์ได้ โดยวัดขนาดzone เปรียบเทียบกับยาที่มีขายในท้องตลาดคือ Bactroban®(Mupirocin) และGaramycin® (Gentamycin) พบว่า ในตัวทำละลายแรก ไม่พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ ส่วนในEthanol พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อเล็กน้อยในตำรับที่ไม่มีสารสกัดไหมเป็นส่วนประกอบ คาดว่าการใส่สารสกัดไหมลงไปจะทำให้เกิดการยึดจับของสารในตำรับที่แตกต่างไป ดังนั้นสารสกัดต้นหญ้าเกล็ดหอยน่าจะเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาแผลติดเชื้อได้ หากมีการนำไปพัฒนาต่อไป

Abstract

The Development of Fibroin Emulgel for Infectious Wound

Chanita Teeranantakul , Danai Siribunjongchoke

Project advisor : Pleumchitt Rojanapanthu* , Wichet Leelamanit**

*Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

** Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : Fibroin emulgel, Ya - klet hoi (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.), Infectious wound

This special project is a development of fibroin emulgel for having an antibacterial activity by using Ya - klet hoi extract which has an antibacterial activity likes antibiotics. Fibroin emulgel formulation have been proved to have a good property in wound healing. Ethanol 80% was used for the first step in the extraction process and followed by the used of hexane to separate the chlorophyll. Three parts of extract , containing chlorophyll part, non-chlorophyll part and hexane part , were obtained and subjected to test the activity against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) , which is the main cause of infectious wound , by using well–diffusion method and MIC detection. The chlorophyll part showed the best activity against *S. aureus* which gave MIC of 10 mg/ml compared to tetracycline as a reference standard. Fibroin emulgel formulation was obtained by using concentration of chlorophyll part at 3 times of MIC. The activity of emulgel was tested against *S. aureus* by 2 methods. Firstly, the previous mention method was used. Secondly, $CaCl_2$: Ethanol : H_2O in ratio of 1:2:8 and ethanol 80% were used to dissolve the emulgel before the test by assuming that the manner is like a spreading of cream on the skin which make the cream be able to contact with the cells. The test was compared with Bactroban® and Garamycin®. The negative result was obtained which assuming that the addition of fibroin into the formulation will make a different binding of substance with the gel base. Anyway, the extract from Ya - klet hoi could be a new choice for the treatment of the infectious wound which needs to be more development.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำจาก ท่านอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร. ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์ และ ท่านอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ผศ.ดร.วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์ , ผศ.คร. จรูญ เลียงชเยศ

นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณ กาญจนา ทิมอ่ำ และ คุณ ดวงใจ ขวัญอ่อน พนักงานวิทยาศาสตร์ภาควิชาเภสัชกรรม ในความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกตลอดการทำโครงการ

ภญ. นิธิมา คารมปราชญ์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเภสัชกรรม และ ภก. ภานุกิจ กันหาจันทร์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและอุปกรณ์ที่เอื้อเฟื้อตลอดการทำโครงการ

ชนิตา ธีระนันทกุล

ดนัย ศิริบรรจงโชค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
วัสดุและอุปกรณ์	13
แผนการวิจัย	15
ผลการทดลอง	23
วิจารณ์ผลการทดลอง	33
ข้อสรุป	35
ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Antimicrobial drug of choice	9
2	ส่วนประกอบของ Amino acid ต่างๆที่มีอยู่ใน Silk fibroin	12
3	การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland Standard)	20
4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน Ethanol 80 %	24
5	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน Hexane	25
6	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน H_2O	26
7	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับต่างๆ	27

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.	4
2	ภาพวาดของ *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.	5
3	Herbariums of *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. SN 217449 และ 217452)	6
4.	โครงสร้างของ fibroin	11
5.	แผนผังแสดงวิธีการสกัดสาร	17
6.	สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย Ethanol 80 %	18
7.	สารสกัดเข้มข้นที่ได้จากการสกัดด้วย Ethanol 80 %	18
8.	สารสกัดเข้มข้นที่ได้ในส่วน H_2O	19
9.	สารสกัดเข้มข้นที่ได้ในส่วน Hexane	19
10.	ตัวอย่างของ plate ที่ใช้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นถึง inhibition zone	22
.11.	ตำรับ Cream base	28
12.	ตำรับ Fibroin emulgel	28
13.	ตำรับ Fibroin emulgel ที่ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย	29
14.	ตำรับ Cream base ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย	29
15.	ผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Cream base	31
16.	ผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Cream baseผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย	31
17.	ภาพจำลองแสดงผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Fibroin emulgel ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย	32

สัญลักษณ์ และ คำย่อ

ซม.	=	เซนติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
ATCC	=	American type culture collection
°C	=	องศาเซลเซียส
cm	=	เซนติเมตร
EtOH	=	Ethanol
Mean	=	ค่าเฉลี่ย
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
mg/ml	=	milligram/milliliter
µg/ml	=	microgram/mililiter
ml	=	มิลลิลิตร
µl	=	ไมโครลิตร
mm	=	มิลลิลิตร
S.aureus	=	*Staphylococcus aureus*
MRSA	=	methicillin resistance *Staphylococcus aureus*

บทนำ

Fibroin เป็นโปรตีนเส้นใย ได้มาจากหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งส่วนนี้มักจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการทอผ้าไหม โดยได้มีการศึกษาทางคลินิกและในสัตว์ทดลองมาแล้วว่าFibroin สามารถช่วยในการสมานแผลได้อย่างดี ทำให้เกิดมีเนื้อเยื่อเจริญที่แผลได้รวดเร็ว จึงมีโครงการที่จะนำมาใช้รักษาแผลเปิด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก และแผลกดทับต่างๆ แต่แผลต่างๆเหล่านี้มักเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ซึ่งสารสกัดไหมไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้

การพัฒนาตำรับ Fibroin emulgel เพื่อการรักษาแผลที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการเดิมจึงได้เกิดขึ้นโดย เน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรไทย คือ ต้นหญ้าเกล็ดหอย ซึ่งการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดต้นหญ้าเกล็ดหอยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ เพื่อกระตุ้นให้เกิดความสนใจในการนำสมุนไพรไทยมาใช้ประโยชน์

Hydrocotyle sibthorpioides Lam. มีชื่อเรียกในประเทศไทยว่า ต้นหญ้าเกล็ดหอย เป็นพืชในวงศ์ Apiaceae(Umbelliferae) ซึ่งใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในหลายประเทศ (ไทย,จีน,ญี่ปุ่น, ฟิลิปินส์,เนปาล และ ปาปัวนิวกินี) ในประเทศไทยใช้ทั้งต้นเพื่อรักษา โรคไซนัสอักเสบ,เจ็บคอ ,ไอ,เป็นไข้,แผลหนอง,แผลน้ำร้อนลวก ฯลฯ

ต้นหญ้าเกล็ดหอย หรือ *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. มีสรรพคุณการเป็นยาคล้ายกับต้น *Centella asiatica* (L.) Urb. หรือในประเทศไทยเรียกว่า ต้นใบบัวบก ใช้รักษาโรคผิวหนัง และ อาการไอได้ โดยในต้นหญ้าเกล็ดหอยมีส่วนประกอบทางเคมีหลายชนิด ที่เป็นส่วนประกอบหลัก สามารถมีฤทธิ์เป็นยาได้ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อไปเพื่อให้เกิดยาใหม่ๆได้

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เนื่องจากเป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ (Pathogenic bacteria) พบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายโรคขึ้นกับตำแหน่งที่ติดเชื้อ โดยปกติพบมากที่บริเวณผิวหนัง โรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ ฝี (bolis) , กุ้งยิง (stye) , เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) , อาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดต้นหญ้าเกล็ดหอย จะใช้วิธีการวัดขนาด inhibition zone เทียบกับ Tetracycline ซึ่งเป็น Alternative drug ที่ใช้กับ *Staphylococcus aureus* Methicillin – resistant และสำหรับตำรับที่มีสารสกัดผสมอยู่จะใช้การวัดขนาดเทียบกับยาที่มีขายในท้องตลาด ซึ่งทีลักษณะเป็นครีมเหมือนกันคือ Bactroban®(Mupirocin) และGaramycin® (Gentamycin) เพื่อเปรียบเทียบการแพร่ของตัวยาไปออกฤทธิ์ต่อเซลล์

ทบทวนวรรณกรรม

Hydrocotyle sibthorpioides Lam.

Hydrocotyle sibthorpioides Lam. จัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae (Umbelliferae) พบมากในแถบทวีปเอเชีย พืชใน genus Hydrocotyle มีอยู่ประมาณ 100 species พบในประเทศไทย 5 species คือ *H. siamica* Craib , Kew Bull., *H.javanica* J.P., *H. chiangdaoensis* Murata , Acta Phytotax., *H. umbellata* L. และ *H. sibthorpioides* Lam.

H. sibthorpioides Lam. เป็นชื่อ species ชนิดเดียวกับ *H. rotundifolia* DC. (1830). *H. benguetensis* Elmer (1909). *H. delicate* Elmer (1909)

Vernacular names : Lawn pennywort (En).

Indonesia : tikim (Jakarta), antanan leutik (West Java), andem (Java)

Malaysia : ulam gunung, pegaga embun.

Philippines : tomtomon (Bontoc), enit (Kalinaga), Kanapa (Igorot)

Thailand : ya-klet hoi (central)

Vietnam : rau m[as] m[ow]

1. Botany

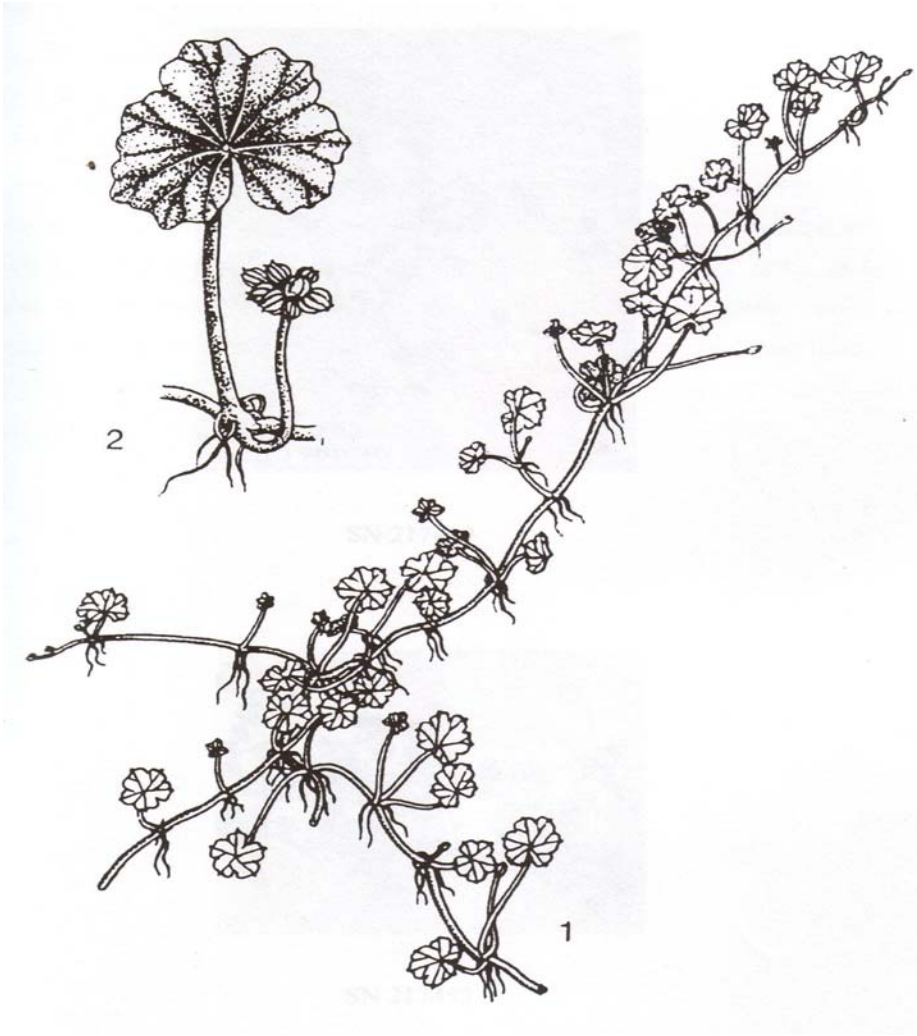
ต้นหญ้าเกล็ดหอย (รูปที่ 1)เป็นพืชแบบ Perennial, prostrate to suberect, polymorphous herb ขนาดลำต้นยาวได้ถึง 50 cm รูปร่างเรียวยาว ลำต้นเป็นแบบ Stoloniferous มีรากงอกที่ข้อของลำต้น มีลักษณะการเรียงของใบเป็นแบบ Alternate; หูใบเป็นแบบ ovate ถึง obovate มีขนาด 1 mm X 1.5 mm; ใบเลี้ยงยาว 6 cm,ที่ฐานใบไม่มี sheathing; ขอบใบเป็นแบบ roundish จนถึง 5-angular รูปร่างเป็น deeply cordate มีความกว้าง 0.3 – 2.5 cm แบ่งเป็น 3 – 5 lobe ผิวใบมีขน หรือ glabrous; Segment crenate to serrate Influorescence an umbel มีดอก 5 – 15 ตอก solitary ดอกติดอยู่ตรงข้ามใบ ; peduncle ยาวได้ถึง 3 cm ; involucral bracts 4-10 ขนาดเล็กมาก อยู่รอบและระหว่างดอก ; ดอกสมบูรณ์เพศ subsessile ; calyx teeth 5,minute or obsolete; กลีบดอกมี5กลีบ รูปร่างแบบ ovate ขนาด 0.7 mm x 0.5mm สีเขียว-ขาว ; disk flat,margin elevated ; เกสรตัวผู้ 5 เรียงแบบ alternate กับ

กลีบดอก;รังไข่อยู่แบบ inferior, style2 ผลเป็นแบบ laterally compressed schizocarp, มี 2 one-seeded mericarps ; mericarp 1-13mm * 0.8mm สีเหลือง-น้ำตาล มีขนสั้นๆหรือglabrous (รูปที่ 2) ; *H. sibthorpioides* Lam.มีรูปร่างของใบที่หลากหลาย และมีขนในทุกส่วนของต้น

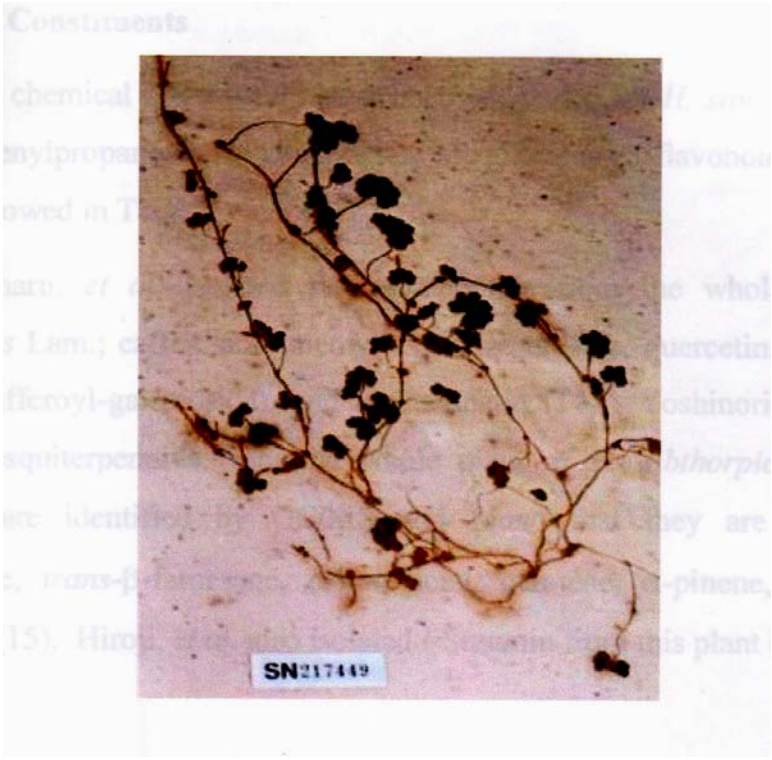
Herbarium ของ *H. sibthorpioides* Lam. อยู่ที่ Bangkok Herbarium (BK) Botanical Section Botany and Weed Science Division Department of Agriculture รหัสอ้างอิงคือ(SN) 217449 และ 217452 (รูปที่3)

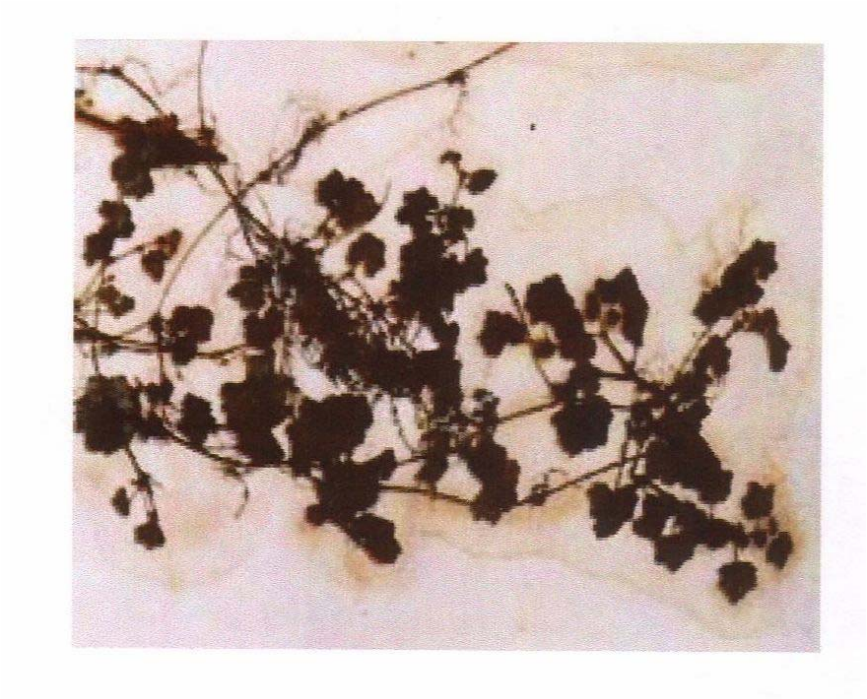
รูปที่ 1 *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.

รูปที่ 2 ภาพวาดของ *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.



รูปที่ 3 Herbariums of *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.
(SN 217449 และ 217452)





Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus หรือ *S. aureus* อยู่ใน family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°c pH 7.4 ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปเชื้อ *S. aureus* สามารถทนต่อสภาวะต่างๆได้ดี เช่น สามารถทนความร้อนได้ถึง 60°c ได้เป็นเวลา 30 นาทีและมีชีวิตอยู่ในที่เย็น 4°c ได้เป็นเวลานานหลายเดือน ซึ่งโดยปกติแล้ว สามารถพบเชื้อนี้ได้ที่บริเวณผิวหนัง และเยื่อเมือกบริเวณลำคอส่วน oropharynx และ nasopharynx

S. aureus เป็นเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ (pathogenic bacteria) ในอวัยวะและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ที่พบมากที่สุดคือ การติดเชื้อที่ผิวหนัง เริ่มต้นจะเป็นการอักเสบเฉพาะที่ ต่อมามีการคั่งของเม็ดเลือดขาว เกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อ กลายเป็นการอักเสบแบบมีหนอง บางครั้งเชื้อสามารถแพร่กระจายไปทางน้ำเหลือง หรือทางกระแสเลือดได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆของร่างกาย ซึ่งโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ ฝี กุ้งยิง หูอักเสบ ผิวหนังหลุดลอก ปอดบวม อาหารเป็นพิษ ลำไส้อักเสบ เป็นต้น

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA เป็นเชื้อ *S.aureus* ที่มีความดื้อต่อยากลุ่ม penicillins (Antimicrobial drug of choice ตารางที่ 1) โดยพบว่า เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่พบได้บ่อย รองลงมาจาก *Escherichia coli* และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก หรือปอดบวม และพบว่า มีอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี 2530 ถึงปี 2539 จาก 1 ราย เป็น 105 ราย ในประเทศอังกฤษ และ เวลส์ สำหรับในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของเชื้อ MRSA ได้ตั้งแต่ร้อยละ2-19 โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีปริมาณเพิ่มสูงมากขึ้นในโรงพยาบาลที่เชื้อ MRSA เป็นเชื้อประจำถิ่น

การติดเชื้อ MRSA มักพบในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยหนัก ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยแผลกดทับ และผู้ป่วยที่ต้องใช้สายสวนปัสสาวะหรือสายให้น้ำเกลือและยาทางหลอดเลือด การติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมักจะรุนแรง ปัจจัยที่ทำให้พบ

การติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมากขึ้น ได้แก่ การที่ผู้ป่วยต้องนอนโรงพยาบาลเป็นเวลานานหลายวัน การใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง การเข้ารับการดูแลในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก การคลุกคลีใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยหลังผ่าตัด และผู้ที่เป็นพาหะมีเชื้อ MRSA ในโพรงจมูก เชื้อ MRSA อาจก่อให้เกิดโรคนอกโรงพยาบาลได้เช่นกัน พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA ที่พบในชุมชน มีความสัมพันธ์กับแบบแผนการใช้ยาปฏิชีวนะ สิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อน หรือในชุมชนที่อยู่อาศัยร่วมกันอย่างแออัด และเกือบทั้งหมดที่พบเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนัง

ตารางที่ 1 Antimicrobial drug of choice

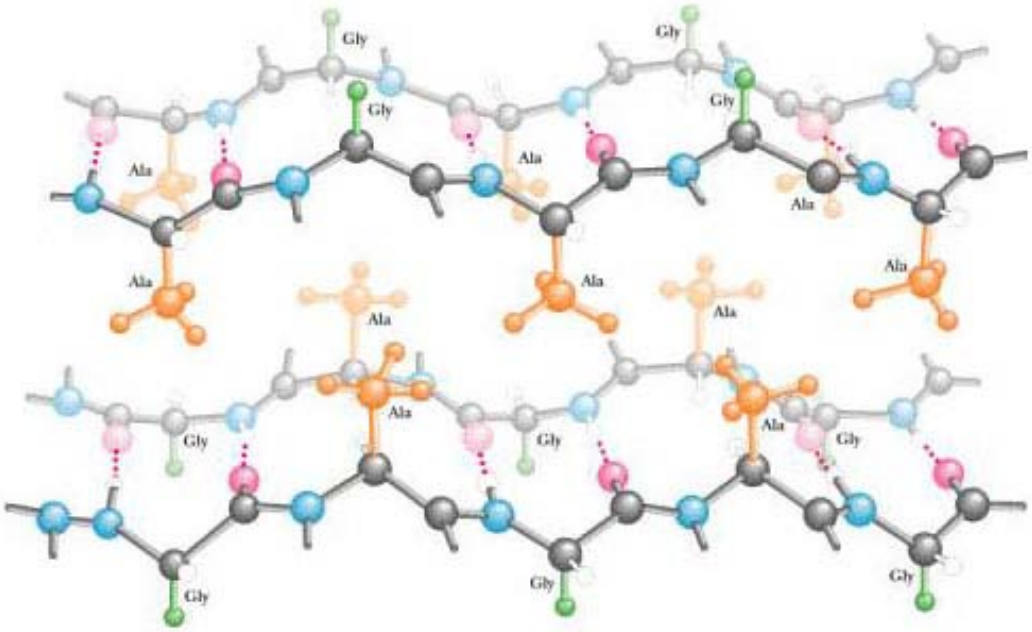
Infecting organism	Drug of choice	Alternative drugs
S.aureus or epidermidis Methicillin - sensitive	A penicillinase resistance – Penicillin	A cephalosporin, vancomycin, amoxicillin/clavulanic acid; ticarcillin/clavulanic acid; piperacillin/tazobactam; ampicillin/sulbactam; imipenam or meropenam; clindamycin; a fluoroquinolone
S.aureus Methicillin - resistant	Vancomycin±gentamycin ±rifampicin	Linezolid; quinupristin/dalfopristin; a fluoroquinolone; tetracycline; trimethoprim-sulfamethoxazole

ดัดแปลงมาจาก Lacy C, Amstrong LL, Ingrim N, Lance LL. Drug Information Handbook. 11th ed. Hudson(Ohio): Lexi-Comp Inc.2003-2004:1632

Silk fibroin

Silk fibroin เป็น เส้นใยโปรตีนที่เป็นโมเลกุลที่ยืดยาวออกไป มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ โดยมีลักษณะโครงสร้างแบบทุติยภูมิเป็นแบบ ß-sheet ซึ่งจากรูปถ่ายจาก X-ray diffraction ของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอน *Bombyx mori* แสดงให้เห็นว่ามันมีลักษณะเป็นสายยาวของ polypeptide และจากการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่าสายยาวของโครงสร้างประกอบด้วย กรดอะมิโนย่อย 6 ตัวต่อกันเป็นลำดับซ้ำกันไป คือ $[-Gly-Ser-Gly-Ala-Giy-Ala-]_n$ ซึ่งลำดับแบบนี้จะทำให้เกิดเป็น ß-sheet โดยโครงสร้างตามที่ได้กล่าวมาจะก่อให้เกิดคุณสมบัติต่างๆ ซึ่ง Silk fibroin จะมีความแข็งแรงแต่จะสามารถยืดขยายได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากการที่จะทำให้เส้นใยยืดออกได้นั้นจะต้องทำให้เกิดการแตกสลายของพันธะโควาเลนท์ก่อน และถึงแม้โครงสร้างส่วนใหญ่ของ Silk fibroin จะประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน 6 ตัวเรียงซ้ำกันไปดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่มันก็ยังประกอบด้วยกรดอะมิโนตัวอื่นๆด้วย เช่น Tyr, Val, Arg และ Asp เป็นต้น

รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ fibroin



ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของ Amino acid ต่างๆที่มีอยู่ใน Silk fibroin

Amino acid	Percent
Glycine	44.6
Serine	12.2
Alanine	29.4
Aspartic acid + Asparagine	1.3
Tyrosine	5.2
Threonine	0.9
Arginine	0.5
Leucine	0.5
Isoleusine	0.7
Valine	2.2
Phynylalanine	0.5
Glutamic acid + Glutamine	1.0
Cystine	0
Methionine	0
Lysine	0.3
Proline	0.3
Hystidine	0.2

วัสดุและอุปกรณ์

เชื้อ

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (Scharlau, Spain)

Brain Heart Infusion agar (Scharlau, Spain)

วัตถุดิบ

ต้นหญ้าเกล็ดหอย (Youvarat, Thailand)

Silk (Saraburi, Thailand)

สารเคมี

Ethanol 95 % (Ayuthaya Spirit Factory, Thailand)

Hexane (J.T.Baker,Inc., USA)

Propylene glycol (Nam Siang Trading Co.,Ltd., Thailand)

Glycerin (Nam Siang Trading Co.,Ltd., Thailand)

Simugel NS (Adiop CO., LTD., Thailand)

Germaben® (Nam Siang Trading Co.,Ltd., Thailand)

Sodium metabisulfite (Univar, Australia)

Tetracycline (Amresco, USA)

Bactroban® (GlaxoSmithkline LTD., Thailand)

Garamycin® (Schering-Plough LTD., Thailand)

Calcium chloride (Carlo Erba reagenti, Italy)

Barium chloride (Carlo Erba reagenti, Italy)

Sulphuric acid (Carlo Erba reagenti, Italy)

Normal saline (Thai nakorn pattana Ltd., Thailand)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

Water bath

Rotary evaporator (Heidoph, Germany)

Analytical balance (SartoriusGMBHtype 2842, Germany)

Precisa Balance (Type 300-9450, D 4000C, Switzerland)

Ultrasonic bath (Cole Pormer, USA)

Vortex mixer (Jurabo Lab, Germany)

Laminar air flow

Autoclave (Sturdy Industrial co.LTD, Taiwan)

Refrigerated Incubator (FOC 225E, Scientifica)

Hot air oven (Memmert, Germany)

Evaporating dish (Pyrex, Germany)

Seperatory funnel (Pyrex, Germany)

Petridish (Petrio)

Culture tube (Pyrex, Germany)

Sterile pipette (Pyrex, Germany)

Micropipette (Labmate)

Sterile cotton (Kendall-Gammatron Ltd., Thailand)

แผนการวิจัย

1. การสกัดสารจากต้นหญ้าเกล็ดหอย ได้ออกมาเป็น 3 ส่วน
    - ส่วนที่สกัดด้วย EtOH 80 %
    - ส่วนที่อยู่ในชั้นของ Hexane
    - ส่วนที่อยู่ในชั้น H_2O
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 P ของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยทั้ง 3 ส่วนเพื่อหาส่วนที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยใช้วิธี well diffusion method เพื่อหาค่า MIC
3. การตั้งตำรับต่างๆ
    - Cream base
    - Fibroin emulgel
    - Cream base + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย
    - Fibroin emulgel + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย
4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 P ของตำรับต่างๆที่ได้เตรียมไว้ โดยใช้วิธี well diffusion method เช่นกัน
5. การทดสอบการยึดเกาะของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยกับ polymer ในตำรับ

วิธีการทดลอง

1.การสกัดสารจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

1.1 ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของต้นหญ้าเกล็ดหอยว่าถูกชนิดหรือไม่ (Identification)

1.2 นำต้นหญ้าเกล็ดหอยมาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นให้ละเอียด

1.3 นำต้นหญ้าเกล็ดหอยที่หั่นเรียบร้อยไปหมักทิ้งไว้ใน EtOH 80 % เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

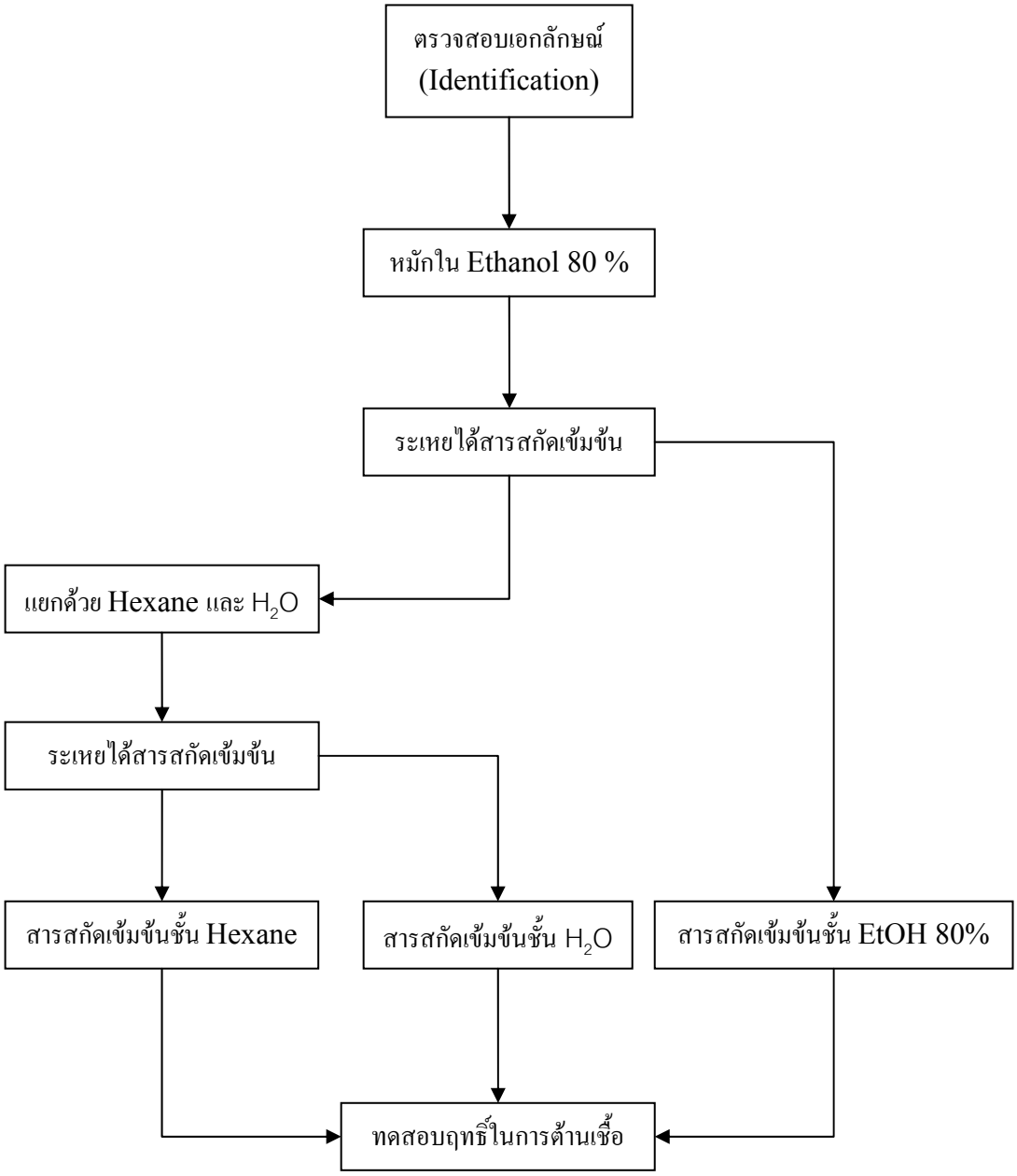
1.4 นำส่วนที่หมักมากรองกากของต้นหญ้าเกล็ดหอยออกไป โดยเก็บส่วนของเหลวไว้

1.5 นำส่วนของเหลวที่ได้มาทำการระเหยที่อุณหภูมิ ไม่เกิน 50 °C จนได้สารสกัดเข้มข้น แล้วแบ่งเก็บไว้ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ

1.6 นำสารสกัดเข้มข้นจากข้อ 1.5 ที่เหลืออีกส่วนหนึ่งมาสกัดต่อ เพื่อแยก chlorophyll ออก โดยใช้ hexane และ H_2O เป็น solvent ที่ใช้ในการแยกด้วย separatory funnel

1.7 นำชั้นของ solvent ทั้ง 2 ส่วนมาทำการระเหยจนได้สารสกัดเข้มข้น แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ

รูปที่ 5 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

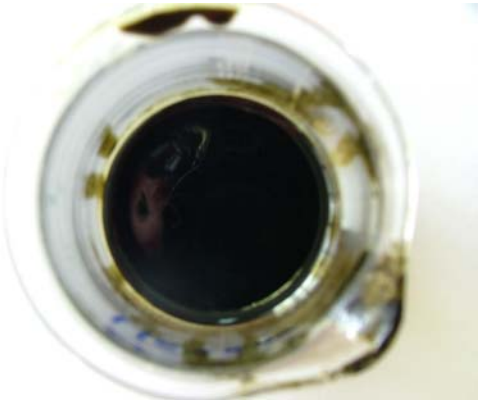


รูปที่ 6 สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย Ethanol 80 %

รูปที่ 7 สารสกัดเข้มข้นที่ได้จากการสกัดด้วย Ethanol 80 %

รูปที่ 8 สารสกัดเข้มข้นที่ได้ในส่วน H_2O

รูปที่ 9 สารสกัดเข้มข้นที่ได้ในส่วน Hexane



2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

2.1.1 ทำการแยก colony ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 P ลงใน Nutrient agar ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

2.1.2 นำเชื้อที่เพาะไว้ในข้อ 2.1.1 มาเจือจางด้วยน้ำที่สะอาดปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มเทียบเท่า McFarland No. 0.5

2.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบ

สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยทั้ง 3 ส่วน คือ ส่วนที่ได้จาก EtOH, ส่วนของ Hexane และส่วนของ H_2O จะถูกนำมาเจือจางในความเข้มข้นต่างๆเพื่อใช้ในการหาค่า MIC

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธี well diffusion method

2.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ลงใน plate ที่เตรียมไว้ โดยทิ้งไว้ ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบดูว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มีการปนเปื้อนของเชื้อหรือไม่

2.3.2 นำไม้พันสำลีจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ โดยกดกับขอบหลอดให้พอหมาด แล้วจึงนำมาถูลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ให้ทั่วทั้ง plate หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 – 10 นาที

2.3.3 นำ plate ที่แห้งแล้วจากข้อ 2.3.2 มาทำการเจาะรูตามความเหมาะสม

2.3.4 นำสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆมาหยอดลงในหลุมที่ทำการเจาะไว้ หลุมละ 100 µl โดยในแต่ละความเข้มข้นจะพิจารณาทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ tetracycline 10 µg/ml เป็น Positive control และมี H_2O, EtOH 80 % และ Hexane เป็น Negative control

ตารางที่ 3 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland Standard)

Tube number	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% $BaCl_2$ (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H_2SO_4(ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density (x10^8 CFU/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

3. การตั้งตำรับ

การตั้งตำรับต่างๆจะอยู่บนพื้นฐานของตำรับ fibroin emulgel แต่เดิม โดยจะมีการเตรียมตำรับใน 4 รูปแบบคือ

3.1 Cream base คือตำรับที่ไม่มีส่วนประกอบของ สารสกัดผง fibroin

3.2 Fibroin emulgel คือตำรับปกติตามส่วนประกอบข้างต้น

3.3 Cream base + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

3.4 Fibroin emulgel + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

หมายเหตุ ตำรับที่มีการเพิ่มสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยเข้าไป จะเติมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยให้มีความเข้มข้นในตำรับเป็น 3 เท่าของค่า MIC ที่ได้

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับต่าง ๆ

ทำการทดสอบด้วยวิธีการที่เหมือนกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย แต่จะมีการเพิ่มตัวสารมาตรฐาน คือ Garamycin® (Gentamycin) และ Bactroban® (Mupirocin) เป็น Positive control

โดยจะมีการทดสอบใน 2 ลักษณะ คือ

- ทดสอบโดยใช้ตัวตำรับโดยตรง
- ทดสอบโดยนำตำรับที่ได้ไปทำการละลายในตัวทำละลายก่อนที่จะนำไปทดสอบ ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้จะมี 2 ชนิดคือ

1.) Ethanol 80 %ซึ่งเป็นตัวทำละลายสารสกัดที่ดี

2.) $CaCl_2$:ethanol:H_2O=1:2:8 mole ซึ่งเป็นตัวทำละลาย fibroin ที่ดี

5. การทดสอบการยึดเกาะของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยกับpolymerในตำรับ

5.1 นำตำรับที่จะทดสอบมาประมาณ 500 mg ใส่ลงในbeakerขนาด 100 ml

5.2 เติม 0.9 % NaCl ลงไป 10 ml แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตร 100 ml

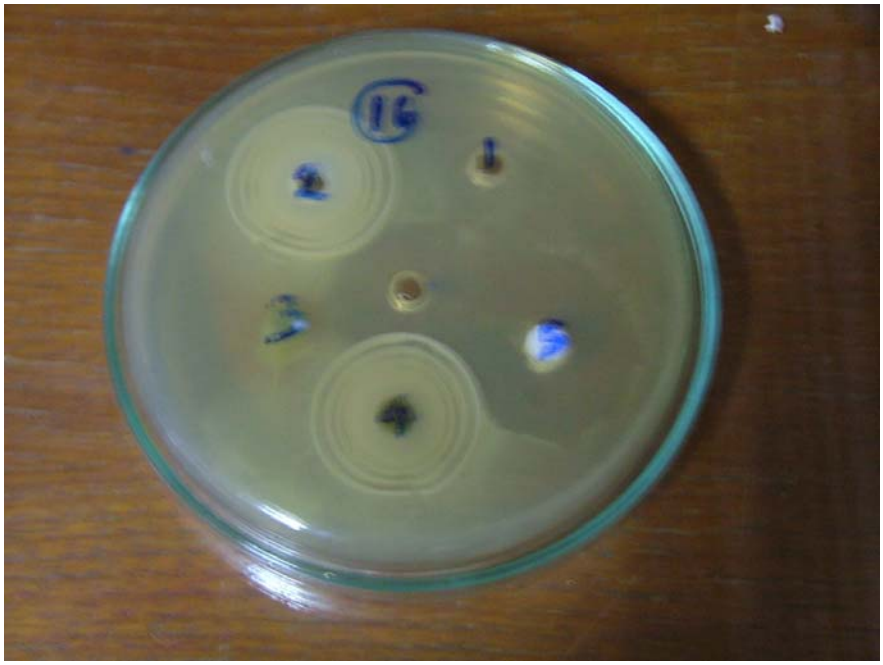
5.3 ใช้แท่งแก้วคนให้ครีมกระจายตัวพอสมควร แล้วในไปใส่ในเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ซึ่งจะทำให้ตัว simugel NS เกิดการแตกตัว

5.4 สังเกตผลที่เกิดขึ้น

โดยจะทำการทดสอบใน 3 ตำรับคือ

- Cream base (control)
- Cream base + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย
- Fibroin emulgel + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างของ plate ที่ใช้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นถึง inhibition zone



ผลการทดลอง

1.ผลการทดลองในขั้นตอนการสกัดสารจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

จากต้นหญ้าเกล็ดหอย 2.5 kg จะได้สารสกัดเข้มข้นประมาณ 5000 ml แล้วจึงแบ่งไปสกัดต่อได้ 3 ส่วนดังนี้

- ส่วนที่สกัดด้วย EtOH 80 % น้ำหนัก 8.41 g จาก 500 ml
- ส่วนที่อยู่ในชั้นของ Hexane น้ำหนัก 6.36 g
- ส่วนที่อยู่ในชั้น H_2O น้ำหนัก 44.50 g

} จาก 4500 ml

2.ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 P ของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

ได้ค่า MIC ดังต่อไปนี้

- ส่วนที่สกัดด้วย EtOH 80 % มีค่า MIC = 10 mg/ml
- ส่วนที่อยู่ในชั้นของ Hexane มีค่า MIC = 80 mg/ml
- ส่วนที่อยู่ในชั้น H_2O มีค่า MIC = 50 mg/ml

จึงนำสารสกัดในส่วนของ Ethanol 80 % มาใช้ในการผสมร่วมกับตำรับ

3.ลักษณะของตำรับต่าง ๆ

จากการสังเกตลักษณะทางภายนอกพบว่า

- Cream base มีเนื้อครีมสีขาว
- Fibroin emulgel มีเนื้อครีมสีเหลืองนวล
- Cream base + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย มีเนื้อครีมสีเขียว
- Fibroin emulgel + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย มีเนื้อครีมสีเขียว ซึ่งเข้มกว่าตำรับ Cream base เล็กน้อย

โดยทุกตำรับมีความหนืดใกล้เคียงกัน แต่ในตำรับที่ใส่สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยจะมีกลิ่นฉุนจากสารสกัด ต่างจากตำรับ Cream base และ Fibroin emulgel ที่ไม่มีกลิ่น

4.ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับต่าง ๆ

พบว่าในทุกๆตำรับไม่พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ ยกเว้นตำรับ cream base ที่ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยและละลายด้วย ethanol 80 % ที่เกิด inhibition zone 11 mm

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน Ethanol 80 %

Extraction of ethanol 80 %	inhibition zone (mm)			
concentration of extraction (mg/ml)	plate1	plate 2	plate 3	average
100	20	20	19	19.66667
90	17	16	-	16.5
80	14	14	-	14
70	13	15	13	13.66667
60	12	12	14	12.66667
50	13	13	12	12.66667
40	11	14	13	12.66667
30	12	12	13	12.33333
20	13	12	12	12.33333
10	12	12	12	12
9	0	0	0	0
8	0	0	0	0
7	0	0	0	0
6	0	0	0	0
5	0	0	0	0
4	0	0	0	0
3	0	0	-	0
2	0	0	-	0
1	0	0	-	0
ethanol 80 % (Negative control)	0	0	0	0
tetracycline 10 µg/ml (Positive control)	24	25	27	25.33333

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน Hexane

Extraction of hexane	inhibition zone (mm)			
concentration of extraction (mg/ml)	plate1	plate 2	plate 3	average
100	10	14	13	12.33333
90	10	13	10	11
80	10	9	8	9
70	0	0	0	0
60	0	0	0	0
50	0	0	0	0
40	0	0	0	0
30	0	0	0	0
20	0	0	0	0
10	0	0	0	0
Hexane (Negative control)	0	0	0	0
tetracycline 10 µg/ml (Positive control)	27	24	25	25.33333

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดในส่วน H_2O

Extraction of H_2O	inhibition zone (mm)			
concentration of extraction (mg/ml)	plate1	plate 2	plate 3	average
50	12	12	13	12.33333
45	0	0	0	0
40	0	0	0	0
35	0	0	0	0
30	0	0	0	0
25	0	0	0	0
20	0	0	0	0
15	0	0	0	0
10	0	0	0	0
5	0	0	0	0
water (Negative control)	0	0	0	0
tetracycline 10 µg/ml (Positive control)	26	26	24	25.33333

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับต่างๆ

Formulation	inhibition zone (mm)			
	plate1	plate 2	plate 3	Average
cream base (Negative control)	0	0	0	0
fibroin emulgel (Negative control)	0	0	0	0
cream base + extraction	0	0	0	0
fibroin emulgel + extraction	0	0	0	0
cream base + extraction + ethanol 80 %	10	12	-	11
fibroin emulgel + extraction + ethanol 80 %	0	0	0	0
cream base + extraction + solvent	0	0	0	0
fibroin emulgel + extraction + solvent	0	0	0	0
Ethanol 80 % (Negative control)	0	0	0	0
tetracycline 10 µg/ml (Positive control)	27	27	28	27.33333
Bactroban® (Positive control)	39	39	40	39.33333
Garamycin® (Positive control)	29	30	30	29.66667

*solvent = $CaCl_2$:ethanol:H_2O=1:2:8 mole

รูปที่ 11 ตำรับ Cream base

รูปที่ 12 ตำรับ Fibroin emulgel

รูปที่ 13 ตำรับ Fibroin emulgel ที่ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

รูปที่ 14 ตำรับ Cream base ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

5. ผลการทดลองการทดสอบการยึดเกาะของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยกับpolymer ในตำรับ

- ในส่วนของ Cream base พบว่ามีลักษณะเป็น colloid สีขาวขุ่น ไม่มีตะกอน

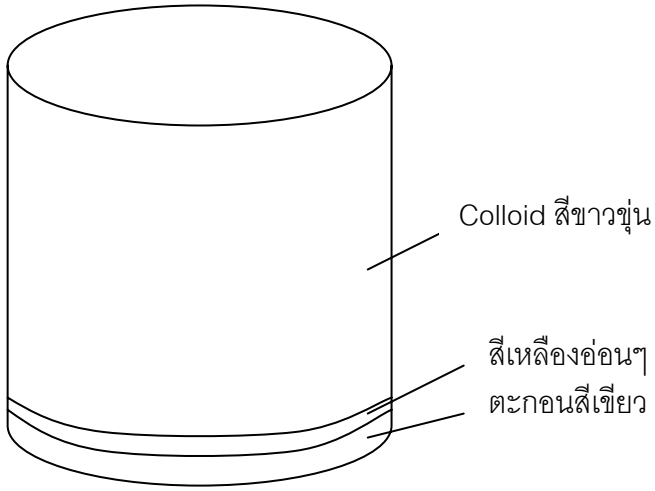
- ในส่วนของ Cream base + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย พบว่ามีลักษณะเป็น colloid สีเขียวขุ่น ไม่มีตะกอน

- ในส่วนของ Fibroin emulgel + สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย พบว่ามีมีลักษณะเป็น colloid สีขาวขุ่น มีตะกอนสีเขียว และเหลืองอ่อนแยกกันอยู่

รูปที่ 15 ผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Cream base

รูปที่ 16 ผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Cream baseผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย

รูปที่ 17 ภาพจำลองแสดงผลการทดสอบการยึดเกาะของสารในตำรับ Fibroin emulgel ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย



วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย จะพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนต่างก็มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้งสิ้น และสารสกัดในส่วนของ Ethanol 80 % มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อดีที่สุดโดยพิจารณาเปรียบเทียบกันระหว่าง ค่า MIC และ inhibition zone ที่เกิดขึ้น แต่ถึงกระนั้นก็ตาม เมื่อนำสารสกัดในส่วนของ Ethanol 80 % ไปเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐาน tetracycline 10 µg/ml จะพบว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ด้อยกว่ามาก

เมื่อนำสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยมาผสมเข้ากับตำรับ Fibroin emulgel แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ผลที่ได้พบว่าตำรับที่ได้นั้นไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* เลยทั้งๆที่ได้ใส่สารสกัดลงไปในตำรับให้มีความเข้มข้นเป็น 3 เท่าของค่า MIC ที่ได้ทำการทดลองไว้ จึงคาดว่าน่าจะเป็นผลจากการที่สารสกัดถูกตัว polymer ในตำรับยึดจับไว้ ทำให้ไม่สามารถปลดปล่อยฤทธิ์ในการต้านเชื้อออกมาได้ หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดลองใช้ตัวทำละลายมาทำการละลายตำรับก่อนที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ โดยคาดหวังว่าจะช่วยให้สารสกัดถูกปลดปล่อยออกมาได้ดีขึ้น ซึ่งเทียบได้กับการนำตำรับยาไปกระจายบนผิวหนัง ทำให้ตัวยาสัมผัสกับเซลล์ได้มากขึ้น แต่ผลที่ได้กลับไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง เพราะมีเพียงแค่ตำรับ Cream base ที่ผสมสารสกัดเข้าไปและละลายด้วย Ethanol 80 % ที่แสดงให้เห็น inhibition zone เพียงเล็กน้อย ซึ่งคาดว่าผลที่เกิดขึ้นนี้น่าจะเป็นไปตามสมมติฐานที่ได้ตั้งไว้ก่อนหน้านี้ ว่าเกิดจากการที่ตัวทำละลายไปละลายสารสกัดออกมาได้บางส่วน แต่ก็ไม่สามารถที่จะทำให้สารสกัดละลายออกมาได้ทั้งหมด เพราะหากคิดในแง่ที่ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่อยู่ในตำรับคิดเป็น 3 เท่าของค่า MIC ดังนั้นหากสารสกัดถูกละลายออกมาหมด ค่าของ inhibition zone ที่ได้ควรจะมีค่ามากกว่าผลการทดลองที่ได้ปรากฏออกมาให้เห็น อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับอีกตำรับที่ใส่สารสกัดลงไปในปริมาณที่เท่ากันคือ ตำรับFibroin emulgel ผลที่ได้กลับไม่พบ inhibition zone เลย แสดงว่า รูปแบบการยึดเกาะของสารสกัดใน 2 ตำรับที่ทำน่าจะมีความแตกต่างกัน

หลังจากนั้นจึงทำการทดลองการยึดเกาะของสารสกัดกับตัว polymer ด้วยการทำให้ตัว polymer ในตำรับเกิดการแตกตัวออกจากกัน แล้วสังเกตผลที่เกิดขึ้น พบว่า ในตำรับ Cream base จะให้ colloid สีขาวขุ่น ไม่มีตะกอน ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ polymer ที่ใส่ในตำรับนั้นมีคุณสมบัติที่สามารถละลายได้ในน้ำหลังจากที่เกิดการแตกตัว และตัว polymer เองนั้นมีสีขาวอยู่แล้ว เมื่อเทียบกับตำรับ Cream base ที่ผสมสารสกัดเข้าไว้ด้วย กลับได้ผลเป็น colloid สีเขียวขุ่น ไม่มี

ตะกอนแสดงว่าถึงตัว polymer จะแตกตัวแล้ว แต่มันก็ยังคงยึดเกาะสารสกัดเอาไว้อยู่ หากนำไปเปรียบเทียบกันตำรับ Fibroin emulgel ที่ผสมสารสกัดเช่นเดียวกันกลับได้ colloid สีขาว แต่มีตะกอนสีเขียวอยู่ในส่วนล่างสุด และมีตะกอนสีเหลืองอ่อนอยู่ในชั้นเหนือขึ้นมา แสดงว่าตัว polymer ไม่ได้ยึดจับตัวสารสกัดไว้ โดยคาดว่าตะกอนสีเขียวที่เห็นน่าจะเป็นตัวสารสกัดที่มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำจึงละลายน้ำได้น้อย และในส่วนของตะกอนสีเหลืองอ่อนก็น่าจะเป็น Fibroin ซึ่งจากผลที่ได้ทำให้เชื่อว่าใน 2 ตำรับมีการยึดเกาะสารสกัดที่แตกต่างกันไป โดยส่วนหนึ่งก็น่าจะเป็นผลจาก Fibroin ที่ผสมอยู่ในตำรับด้วย

ข้อสรุป

จากเดิมที่ตำรับ fibroin emulgel มีฤทธิ์ในการสมานแผลที่ดี แต่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ จึงยังไม่สามารถนำไปทดลองใช้กับแผลติดเชื้อได้ ทำให้เกิดความคิดที่จะนำมาพัฒนาตำรับให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ โดยใช้สารสกัดจากต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ ในที่นี้จึงเลือกที่จะใช้ต้นหญ้าเกล็ดหอยซึ่งมีหลักฐานแดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดี เพราะเชื้อตัวนี้พบว่าเป็นเชื้อหลักที่เป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อของแผลที่เกิดภายนอกร่างกาย

โดยสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยในส่วนของ Ethanol 80 % มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC 10 mg/ml จึงนำสารสกัดในส่วนนี้ไปใช้ในการผสมลงในตำรับ Fibroin emulgel

หลังจากที่ทำการผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยเป็นปริมาณ 3 เท่าของค่า MIC ที่ได้ลงในตำรับ และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P พบว่าไม่ก่อให้เกิด inhibition zone นั้นแสดงให้เห็นว่าตำรับที่ได้ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ อาจมีปัญหามาจากการไม่ละลายของตำรับ จึงทำการทดลองต่อด้วยการใช้ตัวทำละลายในการละลายตำรับก่อนนำไปทดสอบ โดยคาดหวังว่าจะช่วยในการปลดปล่อยสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยออกมาเพื่อที่จะได้เกิดผลในการต้านเชื้อ แต่พบว่าในในทุกๆตำรับ และ ทุกๆตัวทำละลายไม่ก่อให้เกิด inhibition zone ยกเว้นตำรับ Cream base ที่ผสมสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยและละลายด้วย Ethanol 80 % ที่ให้ค่า inhibition zone ที่ 11 mm

ผลที่ได้ทำให้คิดว่า polymer ในตำรับน่าจะมีผลต่อการปลดปล่อยสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย จึงทำการทดลองเพื่อทดสอบการยึดเกาะของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอย กับ polymer ในตำรับ พบว่าลักษณะการยึดเกาะของ polymer กับสารสกัดมีความแตกต่างกันระหว่างตำรับ Cream base และตำรับ Fibroin emulgel โดยตัว Fibroin น่าจะมีผลให้เกิดการยึดเกาะกับสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยที่แตกต่างไป

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยเพียงชนิดเดียวเท่านั้นจึงน่าที่จะมีการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ของสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆด้วย โดยในส่วนของสารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยนั้นควรที่จะทำการสกัดให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อที่จะได้มีความชัดเจนในการระบุถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* ว่าเกิดจากสารตัวใด ซึ่งน่าจะมีผลให้ใช้ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ลดลง อีกทั้งอาจจะส่งผลให้การยึดเกาะกับ polymer ในตำรับเปลี่ยนแปลงไปด้วย

จากผลการทดลองที่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรในการในการทำให้ตำรับ Fibroin emulgel มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* ซึ่งเกิดจาการที่สารสกัดจากต้นหญ้าเกล็ดหอยนั้นถูกยึดเกาะไว้ในตำรับ เป็นผลให้ไม่สามารถที่จะปลดปล่อยฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* ออกมาได้ จึงควรที่จะพัฒนาตำรับต่อไปด้วยการปรับเปลี่ยนส่วนประกอบในตำรับ ทั้งนี้ทั้งนั้นจะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของตำรับที่เปลี่ยนไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1.Sukanya Thamnitsakul . Investigation of active ingredients in Hydrocotyle Sibthorpioides LAM. (วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สหสาขาวิชา Pharmaceutical chemistry and phytochemistry) กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล;2546

2.วีณา กุลอึ้ง.การพัฒนาตำรับไฟโบรอินอิมัลเจลเพื่อการรักษาแผล (วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต) กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล;2548

3. Mandell, Douglas and Bennett's . Principles and Practice of infectious diseases Volume 1 and 2 . 6th ed. . Philadelphia : Elsevier Churchill Livingstone, 2005

4. Lacy C, Amstrong LL, Ingrim N, Lance LL. Drug Information Handbook. 11th ed. Hudson(Ohio): Lexi-Comp Inc.2003-2004:1632

5.กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ . การทดสอบความคงสภาพของยา. กรุงเทพฯ ; 2535

6.ณัฐนันท์ สินชัยพานิช , เบญจา อิทธิมงคล . แนวทางในการศึกษาความคงสภาพของยา . กรุงเทพฯ:เภสัชกรรมสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ; 2542

7.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ และคณะ . เภสัชจุลชีววิทยา . กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ; 2531 : 164 – 170

8.The United States Pharmacopeia . 29th . Rockville , MD: United States Pharmacopeial Convention Inc , 2006

9.เสน่ห์ แก้วนพรัตน์. บทบาทของจุลชีววิทยาในทางเภสัชกรรม . สงขลา : ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรมคณะเภสัชศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์

10.นรีกุล สุระพัฒน์ และคณะ . จุลชีววิทยาทางการแพทย์ . กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร ; 2526