การพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

เอกพล หมั่นพลศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

DEVELOPMENT OF AN HERBAL SHAMPOO FOR THE INHIBILITION OF *MALASSESIA FURFUR*

EKAPOL MONPOLSRI

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements
for Master of Thai Traditional Medicine Program in Thai Traditional Pharmacy
Academic year 2020

Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	**การพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้ง *Malassezia furfur***
ชื่อผู้วิจัย	**เอกพล หมั่นพลศรี**
สาขาวิชา	**เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	**รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.อ้อมบุญ วัลลิสุต**

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

..... (คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย)

(อาจารย์ ดร.คณกร สว่างเจริญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... (ประธานกรรมการ)

(อาจารย์ ดร.ภญ.วรัญญา อรุโณทยานันท์)

อัจฉรา แก้วน้อย
..... (กรรมการ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

อ้อมบุญ วัลลิสุต
..... (กรรมการ)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.อ้อมบุญ วัลลิสุต)

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่
..... (กรรมการ)

(อาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่)

..... (กรรมการและเลขานุการ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัครนันท์ อัศวรัชต์โภคิน)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชื่อเรื่อง **การพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur***
ผู้วิจัย **เอกพล หมั่นพลศรี**
สาขาวิชา **เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.อ้อมบุญ วัลลิสุต**
ปีการศึกษา **2563**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร 2) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร 3) พัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA, $p< 0.05$) และ Least significant difference procedure (LSD)

ผลการวิจัยพบว่า

1. สมุนไพรที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทดสอบ โดยวิธี DPPH assay คือ สารสกัดพิลังกาสา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.028 ± 0.220 mg/ml และเมื่อเทียบกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดจากพิลังกาสา แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า Fe II equivalent สูงที่สุด) คือ มีค่าเท่ากับ 2.44 ± 0.004 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract

2. การศึกษาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู พิลังกาสา และอัคคีทวาร พบว่า สารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1000 mg/ml โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 8, 15 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดแคแสด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เฉลี่ยเท่ากับ 8, 8, และ 10 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดพิลังกาสา และอัคคีทวาร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 7 มิลลิเมตร และสารสกัดกระดูกไก่ดำไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Malassezia furfur*

3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MFC) พบว่า สารสกัดพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 12.5 mg/ml และ 25 mg/ml ตามลำดับ

4. การทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* พบว่า แชมพูสารสกัดพลูทั้ง 3 ตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยของแชมพูผสมสารสกัดพลู ตำรับที่ 2, 3 และ 4 เท่ากับ 7, 8 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการนำไปใช้พัฒนาต่อยอดและการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: *Malassezia furfur* กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู พิลังกาสา อัคคีทวาร

Title	**Development of an herbal shampoo for the Inhibilition of *Malassesia furfur***
Author	**Ekapol Monpolsri**
Program	**Thai Traditional Pharmacy**
Major Advisor	**Assistant Professor Dr.Atchara Keawnoi**
Co-advisor	**Associate Professor Dr.Omboon Vallisuta**
Academic year	**2020**

ABSTRACT

This research on the development of herbal shampoo against *Malassesia furfur* aimed to (1) determine antioxidant activities of five herbal extracts, i.e., *Justicia gendarussa* Burm.f., *Spathodea campanulate* P.Beauv., *Ardisia elliptica* Thunb., *Piper betle* L. and *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb. (2) evaluate antifungal activities against *Malassezia furfur* of the five herbal extracts (3) develop herbal antifungal shampoo against *Malassesia furfur.* The data was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA, $p<0.05$) and Least significant difference procedure (LSD).

The results revealed the followings.

1. The extract that possessed the highest antioxidant activity in DPPH assay was *Ardisia elliptica* Thunb. (IC_{50} 8.028 ± 0.220 mg/ml) and the extract that showed the highest antioxidant activity in FRAP assay with the highest Fe II equivalent was *Ardisia elliptica* Thunb. (2.44 ± 0.004 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract.)

2. According to disc diffusion asssay, *Piper betle* L. extract exhibited the most potent antifungal activity against *Malassezia furfur* with the inhibition zone of 8, 15 and 17 mm at the concentrations of 600, 800 and 1000 mg/ml, respectively. *Spathodea campanulate* P.Beauv. extract displayed moderate activity with the inhibition zone of 8, 8 and 10 mm, respectively followed by *Ardisia elliptica* Thunb. and *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb. extract with average inhibition zone of 7 mm while *Justicia gendarussa* Burm.f. extract had no antifungal activity against *Malassezia furfur.*

3. Antifungal activity assay by Broth microdilution method revealed that *Piper betle* L. extract possessed most potent antifungal activity against *Malassezia furfur* with MIC and MFC of 12.5 mg/ml and 25 mg/ml, respectively.

4. The shampoo containing *Piper betle* extract at the concentration of 1.25%, 3.75% and 6.25% w/w showed antifungal activity against *Malassezia furfur* with inhibition zone of 7, 8 and 8 mm, respectively. The results from this study suggested that herbal extract could be a potential antifungal agent against *Malassezia furfur* and could be further studied and developed to promote the utilization of herbs in the future.

Keywords: *Malassezia furfur*, *Justicia gendarussa* Burm.f., *Spathodea campanulate* P.Beauv., *Piper betle* L., *Ardisia elliptica* Thunb., *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความเมตตาอย่างสูงสุดจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย หัวหน้าภาควิชาการแพทย์แผนไทย และเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.อ้อมบุญ วัลลิสุต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมทั้งสองท่านได้สละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาแนะนำ ติดตามความก้าวหน้าตลอดจนแก้ไขปัญหาต่างๆ ในการดำเนินงาน ซึ่งผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและสำนึกในพระคุณของท่านอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภญ.วรัญญา อรุโณทยานันท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัครนันท์ อัศวรัชต์โภคิน และอาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนวทาง ทำให้ผู้วิจัยได้พัฒนาองค์ความรู้และแนวคิดได้ดียิ่งขึ้นจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณภาควิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่เป็นแหล่งวิทยาการอันทรงคุณค่าและได้เอื้ออำนวยในการใช้สถานที่ดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง ตลอดจนวิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก ซึ่งกรุณาสนับสนุนทุนการศึกษาจนสำเร็จหลักสูตร

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ด้วยความเมตตายิ่ง และคุณพ่อคุณแม่ผู้เป็นกำลังใจสำคัญที่ทำให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกพล หมั่นพลศรี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ฎ
บทที่
1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
สมมติฐานของการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
นิยามศัพท์เฉพาะ 3
กรอบแนวคิดในการวิจัย 4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
เชื้อ *Malassezia furfur* 5
สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย 9
การสกัดสมุนไพร 20
อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ 23
การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ 29
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ 30
การพัฒนาผลิตภัณฑ์แชมพูสมุนไพร 36
มาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (มอก.เอส 12-2561) ของแชมพูสมุนไพร 42
การประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (stability test) 44
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย	50
ขั้นตอนที่ 1 สมุนไพรและส่วนที่ใช้ และจุลชีพที่นำมาทดสอบ	50
ขั้นตอนที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	51
ขั้นตอนที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	53
ขั้นตอนที่ 4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	65
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	66
ตอนที่ 1 ผลสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	67
ตอนที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)	67
ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power (FRAP) assay	71
ตอนที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยวิธี disc diffusion method	72
ตอนที่ 5 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC)	79
ตอนที่ 6 ผลการทดสอบทางเคมีและกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*	80
ตอนที่ 7 ผลการศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ภายใต้สภาวะเร่ง Freeze-thaw cycling method	81
ตอนที่ 8 ผลการทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*	82

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ		86
สรุปผลการวิจัย		86
อภิปรายผลการวิจัย		88
ข้อเสนอแนะ		90
บรรณานุกรม		91
ภาคผนวก		96
ภาคผนวก ก	ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์	97
ภาคผนวก ข	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*	103
ภาคผนวก ค	ผลการตรวจเทียบเคียงชื่อวิทยาศาสตร์และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้	117
ภาคผนวก ง	ใบตอบรับการประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ พ.ศ.2564 ครั้งที่ 2	119
ประวัติผู้วิจัย		121

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	กรอบแนวคิดการวิจัย	4
2.1	กระดูกไก่ดำ (*Justicia gendarussa* Burm.*f.*)	10
2.2	แคแสด (*Spathodea campanulata* P.Beauv.)	12
2.3	พลู (*Piper betle* L.)	14
2.4	พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.)	16
2.5	อัคคีทวาร (*Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb)	18
2.6	การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH Radical กับสารต้านอนุมูลอิสระ	30
3.1	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	55
3.2	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	57
3.3	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power (FRAP) assay	58
3.4	การทดสอบสารสกัดสมุนไพรและยามาตรฐาน Ketoconazole	60
4.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของกระดูกไก่ดำ	68
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของแคแสด	68
4.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของพลู	69
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของพิลังกาสา	69
4.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของอัคคีทวาร	70
4.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate	71
4.7	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดกระดูกไก่ดำที่สกัดด้วยเอทานอล	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดแคแสดที่สกัดด้วยเอทานอล	74
4.9	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดพลูที่สกัดด้วยเอทานอล	75
4.10	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดพิลังกาสาที่สกัดด้วยเอทานอล	76
4.11	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดอัคคีทวารที่สกัดด้วยเอทานอล	77
4.12	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของแชมพูจากสารสกัดพลูก่อนการทดสอบ ภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method	83
4.13	วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของแชมพูจากสารสกัดพลูหลังการทดสอบ ภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method	84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงสูตรพื้นฐานของแชมพู	41
2.2	แสดงสูตรแชมพูสำหรับผมประเภทต่างๆ	42
3.1	แสดงตัวแปรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP	58
3.2	แสดงการทดสอบ หาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution method	62
3.3	แสดงสูตรตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*	64
4.1	แสดงปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรแต่ละชนิด	67
4.2	แสดงแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด	70
4.3	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ด้วยวิธี FRAP assay	72
4.4	แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด	78
4.5	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimum Inhibition Concentration : MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	79
4.6	แสดงสูตรตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*	80
47	แสดงการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิก่อนการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle)	81
4.8	แสดงการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิหลังการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle)	82
4.9	แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของตำรับแชมพูสมุนไพร	85

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อ *Malassezia furfur* เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปบนผิวหนังของคนและสัตว์ และเป็นเชื้อหลักที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเกลื้อน และก่อให้เกิดปัญหารังแค ซึ่งมักเกิดกับบริเวณที่มีไขมันมากๆ ซึ่งถ้าอยู่ในระดับปกติจะไม่ก่อให้เกิดปัญหา แต่บางครั้งเชื้อราเหล่านี้เจริญเติบโตมากกว่าปกติจะทำให้เกิดการระคาย เช่น ศีรษะ ใบหน้า คนที่มีภาวะภมิคุ้มกันต่ำ โดยมีลักษณะเป็นผื่นราบมีขอบชัดเจนและมีขุยบางๆ มักเกิดรอบรูขุมขนแล้วขยายรวมกันเป็นปื้นใหญ่ (Ck thaihealth, 2016) รังแค ในทุกๆ 28 วัน ผิวหนังจะเกิดการผลัดเซลล์ผิว ซึ่งเซลล์ผิวที่ตายจะถูกผลัดออกมา ซึ่งหากถูกกระต้นด้วยสิ่งเร้า เช่น อากาศเย็น มีความชื้นต่ำ โดยเฉพาะหนังศีรษะที่ได้รับสารเคมีจากการทำสีผม น้ำยาดัดผม การใช้ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผมและหนังศีรษะ ซึ่งจะทำให้เซลล์ผิวเกิดการแห้งและผลัดเซลล์ผิวได้เร็วขึ้นกว่าปกติ เซลล์ที่ตายแล้วจะทำให้เกิดการสะสมเป็นก้อนหนาแล้วหลุดลอกออกเป็นเกร็ดสีขาว หรือที่เรียกว่า รังแค ซึ่งสังเกตได้ง่ายจากบริเวณหัวไหล่ ซึ่งหากใส่เสื้อสีทึบ จะสังเกตได้ง่าย การสะสมของรังแคนี้อาจก่อให้เกิดการอุดตันของต่อมน้ำมันหล่อลื่นผมอาจทำให้ผมแห้งมากขึ้น สาเหตุหลักเกิดจากเชื้อรา *Malassezia furfur* ความไม่สมดุลของฮอร์โมน การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์สภาพอากาศ การไม่ค่อยสระผม และความเครียด ในผู้ที่มีปัญหารังแคจะทำให้หนังศีรษะมีความเกิดการอักเสบ มีเชื้อราเจริญเติบโตได้เร็วกว่าปกติ และอาจทำให้เกิดอาการอักเสบของหนังศีรษะ (Pityriasis capitis) ซึ่งหากมีอาการรุนแรงจะเกิดเป็นแผ่นหนา หนังศีรษะแดง พบมากในวัยรุ่น โดยวิธีการแก้ปัญหาควรหลีกเลี่ยงการเกาหนังศีรษะที่รุนแรง การเลือกใช้แชมพูที่อ่อนโยน ไม่ระคายเคืองหนังศีรษะ การใช้แชมพูขจัดรังแคที่เหมาะสม หลีกเลี่ยงการใช้น้ำอุ่นสระผม (พิมลพรรณ พิทยานุกูล, 2555) ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ใช้แก้ปัญหารังแคที่พบในท้องตลาดมักอยู่ในรูปแชมพูซึ่งมีสารออกฤทธิ์เป็นสารสังเคราะห์ เช่น ซิงค์ไพริไทออน (zinc pyrithione) ซีลีเนียม (selenium sulfide) คีโตโคนาโซน (ketoconazole) ดังนั้นการค้นหาหรือพัฒนาเวชภัณฑ์หรือสารทดแทนเพื่อใช้ในการรักษาจึงนับเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจและอยู่ในระหว่างการดำเนินการในวงกว้าง ประกอบกับการที่ประเทศไทยมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ใช้ในทางการแพทย์ การพัฒนาตำรับเวชภัณฑ์จากพืชสมุนไพรที่ผ่านการศึกษาอย่างมีระบบแบบแผน นอกจากจะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการรักษาโรคแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและประโยชน์ใช้ของพืชสมุนไพรไทยอีกด้วย

การวิจัยนี้จึงสนใจนำพืชสมุนไพรที่สามารถหาได้ง่ายทั่วไป และทางการแพทย์แผนไทยตั้งแต่โบราณได้นำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง เช่น กระดูกไก่ดำ *Justicia gendarussa* Burm.f. ใช้ใบ

และทั้งต้น 50 กรัม ต้มในน้ำเดือดอาบเพื่อรักษาโรคผิวหนัง (โชติอนันต์ และคณะ, 2552) แคแสด *Spathodea campanulata* P.Beauv. จะใช้เปลือก ใบ ดอก และผล ในการรักษาเกี่ยวกับโรคผิวหนัง พลู *Piper betle* L. ใช้ส่วนใบรักษากลากเกลื้อนโดยการนำใบสด 3-5 ใบ ล้างให้สะอาด แล้วนำไปโขลกให้ละเอียด ผสมเหล้าโรง คั้นเอาน้ำทาบริเวณที่เป็น และเอากลากพอกวันละ 3 ครั้ง นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ พิลังกาสา *Ardisia elliptica* Thunb. เปลือกต้นใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง โรคเรื้อนได้ และอัคคีทวาร *Rotheca serrata* (l.) ใช้ใบและลำต้น ตำพอกรักษากลาก เกลื้อน โรคเรื้อน (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์, 2560) โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรังแคและโรคผิวหนัง เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ของสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทยของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด และจากนั้นจึงคัดเลือกสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดมาพัฒนาเป็นแชมพูสมุนไพรเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Malassezia furfur* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดรังแค เพื่อเป็นการลดการใช้สารออกฤทธิ์ที่เป็นสารสังเคราะห์และเป็นการเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์ของพืชสมุนไพรไทย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้น กระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร
3. เพื่อพัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

สมมติฐานของการวิจัย

1. สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
2. สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวารมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื่อ *Malassezia furfur*

ขอบเขตของการวิจัย

เนื้อหา

1. ทำการสกัดสารจากใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

2. ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร

3. ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื่อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร

4. ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดมาทำการพัฒนาตำรับแชมพูสมุนไพร

ระยะเวลา

มิถุนายน 2562 - พฤศจิกายน 2563

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร

2. ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื่อ *Malassezia furfur* ของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร

3. ได้แชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Malassezia furfur*

นิยามศัพท์เฉพาะ

Disc diffusion หมายถึง วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ที่ทำให้เห็นการเกิดบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

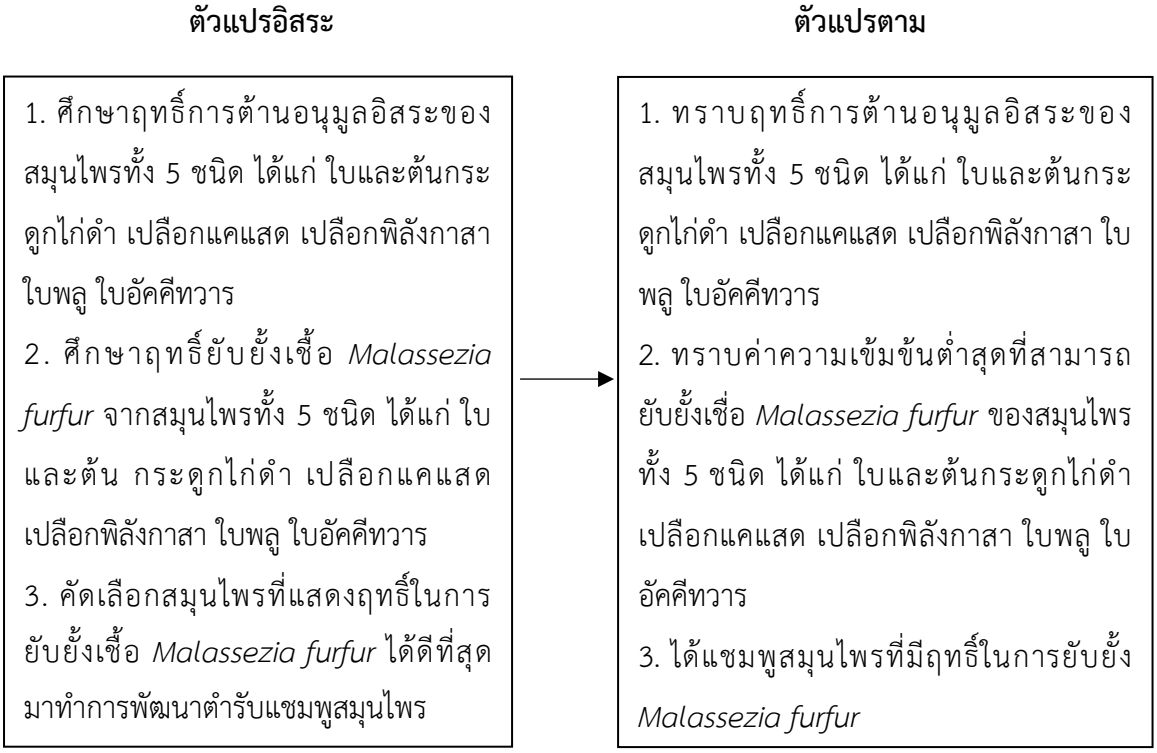
บริเวณยับยั้งเชื้อ inhibition Zone หมายถึง บริเวณที่เป็นวงใสรอบกระดาษกรองที่มีสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆ อยู่ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Malassezia furfur*

micro broth dilution หมายถึง วิธีการหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากการทดสอบใน 96-well plate โดยการเจือจางสารสกัดในความเข้มข้นทีละ 2 เท่า แล้วทดสอบระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibition Concentration; MIC) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) ด้วยวิธีการทดสอบ micro broth dilution

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้ง Malassezia furfur เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้ง *Malassezia furfur* ของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู ใบอัคคีทวาร จากนั้น คัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดนำไปพัฒนาเป็นแชมพูสมุนไพรดังภาพ 1.1



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. เชื้อ *Malassezia furfur*
2. สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย
3. การสกัดสมุนไพร
4. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ
5. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ
6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ
7. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แชมพูสมุนไพร
8. มาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (มอก.เอส 12-2561) ของแชมพูสมุนไพร
9. การประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (stability test)
10. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Malassezia furfur*

Malassezia furfur จัดอยู่ในวงศ์ MALASSEZIACEAE สายพันธุ์ *furfur* เป็นเชื้อราประจำถิ่นที่สามารถเจริญเติบโตอยู่บนผิวหนังของมนุษย์ และสัตว์ เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังต่างๆ เช่น ผิวหนังอักเสบ โรคเกลื้อน และรังแค ซึ่งอาจเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำได้ โดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่พบว่าเกิดจากการเพิ่มปริมาณของเชื้อ และค่า pH บนผิวหนัง เนื่องจากเชื้อไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันเองได้ ทำให้ต้องพึ่งพากรดไขมันจากสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโต ซึ่งได้มาจากกรดไขมันบนผิวหนัง และจำเป็นต้องย่อยสลายไขมันโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นกรดไขมันก่อนจึงจะสามารถนำเข้าไปในเซลล์ได้ โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Malassezia* คือ lipase พบในฐานข้อมูลจีโนมจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์นี้ต่อเชื้อ *Malassezia* ซึ่งเชื้อ *Malassezia furfur* เป็นปัญหาหลักที่ก่อให้เกิดรังแค โดยอาศัยไขมันบนหนังศีรษะ และปัจจัยอื่นๆ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มีปริมาณมากเกินไปจนกลายเป็นแผ่นหนาแล้วลอกออกมาเป็นเกล็ดขาวๆ หลุดลอกออกมาจากหนังศีรษะ พบมากในช่วงฤดูร้อน และสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 4% เป็น 50% โดยจะพบทั้งในเพศหญิงและเพศชายที่มีอายุเฉลี่ย 20-30 ปี ดังนั้นอายุและฮอร์โมนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดย

ฮอร์โมนเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการผลิตไขมันบนผิวหนังมากขึ้น ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี *Malassezia furfur* มักพบบริเวณหนังศีรษะ ใบหน้า หน้าอก ก้น ไหล่ คอ และแผ่นหลัง ทำให้เกิดรอยโรค ซึ่งมีสีคล้ำ แดง หรือต่างไปจากสีผิวเดิม มีขอบเขตของเชื้อชัดเจน และบางครั้งสามารถรวมตัวกันเป็นวงใหญ่ อาจมีอาการคันบ้าง ซึ่งหากสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้เห็นเป็นสีเหลืองอมเขียว (Ck thaihealth, 2016)

1. โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Malassezia furfur*

1.1 โรคเกลื้อน เป็นโรคติดเชื้อราที่ผิวหนัง อาการไม่รุนแรง มักพบบริเวณผิวหนังชั้นนอก ลักษณะเป็นขุย หรือสะเก็ดบางๆ กระจายกันอยู่หรือรวมกันเป็นวงขนาดใหญ่ พบได้บ่อยในกลุ่มวัยหนุ่มสาว และในผู้ที่ใส่เสื้อผ้าที่ชื้น หรือมีเหงื่อออกมาก (วิทยา ศรีดามา, 2550) ซึ่งบางครั้งอาจพบภาวะที่กลับมาเป็นซ้ำ เนื่องจากมีปัจจัยอื่นสนับสนุน เช่น การมีเหงื่อมากกว่าปกติ ภาวะโลหิตจาง วัณโรค การขาดสารอาหาร ซึ่งโรคนี้โอกาสติดต่อจากคนสู่คนได้ยาก ลักษณะอาการของเกลื้อนนั้นจะเป็นผื่นวงกลมขนาด 4-5 มิลลิเมตรสีขาวบ้าง น้ำตาลแกมแดงบ้าง จำนวนหลายๆ วง บางครั้งอาจต่อกันเป็นวงใหญ่ พบบริเวณหลังไหล่ ซอกคอ ในระยะแรกจะเป็นขุยขาวๆ ไม่มีอาการคัน ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี คือ อุณหภูมิที่สูง เหงื่อที่มีมากกว่าปกติ จะทำให้เชื้อเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ยีสต์ nomal flara บนผิวหนังมีการงอกใหม่ของสายราพบได้บริเวณรอยโรค (สุรเกียรติ อาชานานุภาพ, 2553)

1.2 เชื้อราก่อโรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor) เชื้อเกลื้อนจัดอยู่ในยีสต์ จัดเป็นเชื้อราที่มีเซลล์เดียว (unicellular) โคโลนี มีลักษณะคล้ายเนยหรือโคโลนีของแบคทีเรีย ไม่สร้างสายราอากาศ (aerial hypha) ดังนั้นโคโลนีจึงไม่ฟู (cottony) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสายราดูดอาหารทั้งที่เป็นสายราแท้และสายราเทียม (true and pseudohypha) เซลล์ของยีสต์มีรูปร่างกลม รี หรือรูปอื่นๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบไม่ผสมเพศ โดยการแตกหน่อ (blastoconidia) หรือโดยการแบ่งสอง (binary fission) ยีสต์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์จะสืบพันธุ์แบบไม่ผสมเพศ โดยการแตกหน่อ ซึ่งหน่อที่เกิดใหม่ (daughter cell) สามารถติดกับเซลล์พ่อแม่ (parent cell) และแตกหน่อต่อเนื่องกันไปเป็นสาย สายราที่เกิดแบบนี้จะเรียกว่า สายราเทียม ส่วนสายราแท้เกิดจากการสร้างท่องอก (germ tube) ออกจากเซลล์ยีสต์ ซึ่งจะยาวออกเรื่อยๆ และสร้างผนังกั้นการสืบพันธุ์ชนิดผสมเพศของยีสต์สร้างสเปิร์มผสมเพศ 2 ชนิด คือ แอสโคสปอร์ (ascospore) และเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) สีของยีสต์มีได้ต่างๆ กัน เช่น ครีม ส้ม และดำ ยีสต์พบได้ตามธรรมชาติทั่วไป เช่น ที่ผัก ผลไม้ ยีสต์บางสายพันธุ์อาศัยอยู่ตามผิวหนัง ทางเดินอาหารของคน และสัตว์เลือดอุ่น ยีสต์ที่ได้รับการจำแนกแล้วมีประมาณ 400 สายพันธุ์ แต่ที่มีรายงานก่อโรคในคนประมาณ 20 สายพันธุ์ การจำแนกสกุลและสายพันธุ์ของยีสต์อาศัยรูปร่าง คุณสมบัติทางสรีรวิทยาชีวเคมี และบางครั้งต้องอาศัยนิเวศวิทยาเข้ามาประกอบด้วย ระยะ 20 ปีที่ผ่านมาได้มีการหา

ส่วนประกอบของ DNA (deoxyribonucleic acid) ปรากฏว่าช่วยในการจัดการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ได้ 19 จุลสัณฐานวิทยา เส้นสายใยกว้าง 2-4 μm มีผนังกั้นหลุดออกเป็นท่อสั้นๆ โค้งเล็กน้อยอยู่รวมกันเป็นกระจุกกับเซลล์ยีสต์รูปร่างกลม หรือแตกหน่อผนังหนาขนาดกลม 3-8 μm บางครั้งเรียก “spaghetti and meat ball” (สุรเกียรติ อาชานานุภาพ, 2553)

1.3 สาเหตุและพยาธิกำเนิด เชื้อที่ทำให้เกิดโรคคือ *Malassezia furfur* (*Pityrosporum orbiculare, Pityrosporum furfur*) เป็นเชื้อราที่ชอบไขมัน พบได้ทั่วไปบนผิวหนังคนปกติ เช่น ศีรษะ ลำตัว แขน ขา หน้า และบริเวณอื่นๆ จึงถือว่าเชื้อนี้เป็น normal flora ของผิวหนัง การจะเกิดโรคมักเป็น opportunistic infection คือ ต้องมีสาเหตุอื่นประกอบที่ทำให้เชื้อเจริญดี เช่น ในผู้ป่วยที่ได้รับยาคอร์ติโคสเตอรอยด์ รักษาอยู่นานทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังช้าลง กลุ่มที่มีเหงื่อออกมาก คนท้อง ผู้ที่มีโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น วัณโรค เบาหวาน และพันธุกรรม (กองทุนภูมิปัญยาการแพทย์แผนไทยกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2559) สาเหตุทางการแพทย์แผนไทยได้แบ่งเกลื้อนออกเป็น 2 ชนิด คือ เกลื้อนนวลแตง และเกลื้อนดอกหมาก

1.3.1 เกลื้อนนวลแตง เกิดจากกองอาโปธาตุ เกิดจาเสโทเป็นเหตุ เมื่อแรกขึ้นมีสีขาวเป็นนวล และวงแว่นเล็กก็มี แว่นใหญ่ก็มี ผุดเป็นแห่งๆ เรียงรายไปตามผิวเนื้อ ถ้าเสโทออกมากและเกลื้อนนั้นก็ผุดขึ้นมามาก แล้วกระทำให้คันเป็นกำลัง

1.3.2 เกลื้อนดอกหมาก เกิดจากกองวาโยธาตุ เกิดแต่กองอังควาตให้เป็นเหตุ เมื่อแรกเกิด มีสีขาวพร้อย มีลักษณะเป็นช่อๆ กระทำให้คันยิบไปดังตัวไร

1.4 อาการทางคลินิก มีลักษณะเป็นผื่น เริ่มจากเป็นจุดด่างเล็กๆ แล้วเกิดสะเก็ด จากนั้นจะขยายวงรวมกันมีขนาดใหญ่ขึ้น อาจพบการนูนขึ้นของรอยโรค มีขอบเขตวงชัดเจน โดยทั่วไปจะมีสีเหลือง สีน้ำตาล ไปถึงสีน้ำตาลเข้ม สีน้ำตาลแดง และสีขาว บางครั้งในคนเดียวอาจมีหลายสี พบได้ทั่วร่างกายส่วนมากพบที่บริเวณ หน้าอก ท้อง หลัง ไหล่ คอ หน้า แขน ขา ข้อพับเขน รักแร้ และขาหนีบ ส่วนมากไม่มีอาการ บางรายมีอาการคันเล็กน้อย จากการศึกษาเรื่อง hypo pigmented lesion พบว่าเชื้อ *Malassezia furfur* จะย่อย vaccenic และ oleic acid ไปถึง C9 ถึง C11 dicarboxylic acid ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของ dopa tyrosinase reaction ในผื่น hyperpigmented lesion พบว่ามีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น และ melanosome ในบริเวณนี้จะอยู่เดี่ยวๆ และขนาดใหญ่กว่าบริเวณผิวหนังปกติ (กองทุนภูมิปัญยาการแพทย์แผนไทยกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2559) ผื่นที่ขึ้นมีลักษณะเป็นวงกลมเล็กๆ จำนวน หลายวง กระจายทั่วไปในบริเวณที่มีเหงื่อออกมาก ผื่นมักแยก ออกเป็นวงๆ บางครั้งอาจต่อกันเป็นแผ่นขนาดใหญ่ ผื่นมีหลายสี ตั้งแต่สีขาว น้ำตาลจางๆ จนถึงน้ำตาลแดง เห็นเป็นรอยด่าง แบ่งเป็น

1.4.1 เกลื้อนนวลแตง เมื่อแรกขึ้นมีสีขาวเป็นนวล และวงแว่นเล็กก็มี แว่นใหญ่ก็มี ผุด เป็นแห่งๆ เรี่ยรายปตามผิวเนื้อ ถ้าเหงือออกมากจะทำให้มีอาการคันมาก

1.4.2 เกลื้อนดอกหมาก เมื่อแรกเกิดมีสีขาวพร้อย เป็นช่อๆ ถ้ามีเหงื่อออกมากจะทำให้มีอาการคันยิบ คล้ายมีตัวไรไต่

1.5 การรักษา ยาที่ใช้ในการรักษามีหลายชนิด แต่การรักษาจะได้ผลดีจะต้องใช้เวลาในการรักษานานพอ และพยายามหลีกเลี่ยงสาเหตุต่างๆ ที่อาจทำให้กลับมาเป็นใหม่ของโรคสามารถพบได้บ่อย ยาทาที่นิยมใช้ ได้แก่

1.5.1 20% sodium hyposulfite ทาวันละ 1-2 ครั้ง

1.5.2 Keratolytic agent เช่น 3-6% salicylic acid, whitfied's ointment ทาวันละ 1-2 ครั้ง

1.5.3 1% clotrimazole, 2% miconazole,1% econazole, 1% isoconazole, 2% tolnaftate ทาวันละ 1-2 ครั้ง

1.5.4 1% selenium sulfide suspension ทาทิ้งไว้ 1/2-1 ชั่วโมง แล้วล้างออก ทาวันละครั้ง

1.5.5 Zinc pyrithione ทาวันละครั้ง

1.5.6 0.1% retinoic acid cream ทาวันละครั้ง

1.5.7 50% propylene glycol ทาวันละ 2 ครั้ง

เมื่อใช้ยาแล้วควรติดตามดูผลโดยใช้ wood's lamp หรือขูดดูเชื้อ ถ้าทายาครบแต่ สีผิวยังไม่คืนสู่ปกติ เข้าใจว่าสีผิวจะกลับเป็นปกติต้องใช้เวลานานเป็นเดือนๆ และในคนที่เป็นแล้วอาจ เป็นได้อีก การป้องกันการกลับเป็นใหม่ อาจทำได้โดยให้ผู้ป่วยทายาคุมไว้ประมาณ 1 ครั้งต่อ 1-2 สัปดาห์ ในปัจจุบันแพทย์ได้ค้นพบยาฆ่าเชื้อราตัวใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ในกลุ่มของ imidazole ชื่อยา ketoconazole มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราได้อย่างกว้างขวาง โดยทำออกมาในรูปของยาเม็ดรับประทาน นำมาใช้รักษาโรคเกลื้อนได้ผลดี โดยใช้ยาขนาด 200 มิลลิกรัม ต่อวัน นาน 2 สัปดาห์แต่ยาตัวนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก จึงไม่นิยมใช้จะใช้เฉพาะในรายที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาทาเท่านั้น (กองทุนภูมิปัญยาการแพทย์แผนไทยกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2559) การรักษาทางการแพทย์แผนไทยให้เลือกใช้ยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเกลื้อน เช่น ยาสมุนไพรเดี่ยว ได้แก่ กระเทียม ชุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง และยาตำรับ ได้แก่ ยาแก้กลากเกลื้อน

1.6 การปฏิบัติตัวเพื่อป้องกันตนเองและการกลับมาเป็นใหม่ของโรค สามารถปฏิบัติได้ ดังนี้

1.6.1 งดอาหารแสลง เช่น ของหมักดอง อาหารทะเล หน่อไม้ จนกว่าจะรักษาหาย

1.6.2 ควรนำเสื้อผ้ามาต้มฆ่าเชื้อ หรือแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ

1.6.3 หลีกเลี่ยงการสวมใส่เสื้อผ้า หรือรองเท้า ถุงเท้า และที่อับชื้น

1.6.4 ไม่ควรคลุกคลีหรือใช้ของร่วมกับผู้ที่เป็นโรค เช่น เสื้อผ้า ผ้าเช็ดตัว รองเท้า ถุงเท้า หวี แปรงผม และมีดโกนผม เป็นต้น

1.6.5 อาบน้ำฟอกสบู่ทุกวันอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง และเช็ดตัวให้แห้ง ระวังอย่าให้อับชื้น หลีกเลี่ยงการสวมเสื้อผ้าหนาๆ หรืออบเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่อากาศร้อน หรือมีเหงื่อออกง่าย

2. โรคผิวหนังอื่นๆ ที่เกิดจาก *Malassezia furfur*

2.1 Pityrosporum folliculitis จะมีอาการรุนแรงกว่าเกลื้อนธรรมดา มักเกิดในคนอายุน้อย และในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ อาการจะเป็นตุ่มแดง หรือตุ่มหนองตามรูขุมขนขนาด 2-4 มม. พบมากบริเวณหลัง และหน้าอก บางครั้งอาจพบที่ไหล่ ต้นแขน คอ และบริเวณสีข้าง จากการตรวจทางพยาธิจะพบเชื้อเป็น 18 จำนวนมาก รอบๆ รูขุมขน และในชั้น dermis ปากของรูขุมขนจะขยายออก และอุดตันด้วย keratinous debris มี call infiltrate รอบๆ และผนังรูขุมขนที่อยู่ใต้ผิวหนังมักแตกออก

2.2 Seborrheic dermatitis เป็นการอักเสบของผิวหนัง ซึ่งพบมากบริเวณใบหน้า โดยเฉพาะบริเวณสองข้างจมูก หัวคิ้ว และใบหู และพบในบริเวณอื่นๆ ได้ เช่น หน้าอก รักแร้ และขาหนีบ อาการจะเป็นผื่นแดงๆ มีสะเก็ดเป็นขุย มีอาการคัน ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแต่ในผู้ป่วยบางกลุ่มพบว่า เชื้อ *Malassezia furfur* มีส่วนเกี่ยวข้องทาง immunological mechanism และในผู้ป่วยบางกลุ่มยังพบว่ามี ระดับ antibody ต่อ Pityrosporum เพิ่มขึ้นด้วย

2.3 Invasive disease Invasive disease ที่เกิดจาก *Malassezia furfur* ค่อนข้างพบน้อย ที่มีรายงานพบในเด็กคลอดก่อนกำหนด หรือในผู้ใหญ่ที่ได้อาหารทางหลอดเลือดดำ หรือผู้ป่วยที่ความต้านทานต่ำ เชื้อจะติดจาก catheter เข้าไป ทำให้เกิด septicemia อาการมักมี infiltration ในปอด สามารถตรวจพบเชื้อได้จากในเลือด

สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

1. กระดูกไก่ดำ

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Justicia gendarussa* Burm.f. จัดอยู่ในวงศ์ ACANTHACEAE มีชื่อท้องถิ่น เช่น กระดูกดำ (จันทบุรี), ปองดำ แสนทะแมน (ตราด), เฉียงพร้า (สุราษฎรณ์ธานี),

กุลาดำ บัวลาดำ (ภาคเหนือ), เกียงพา เกียงผา เฉียงพร้าบ้าน เฉียงพร้าม่าน เฉียงพร้ามอญ เฉียงพร่าม่าน ผีมอญ สันพร้ามอญ สำมะงาจีน (ภาคกลาง), โอกุด๊ดอึ้งติ้น (จีน), ปั๋วกู่ตาน อูกู่หวางเถิง (จีนกลาง) เป็นต้น กระดูกไก่ดำเป็นพรรณไม้กลางแจ้ง ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปักชำและวิธีการเพาะเมล็ด ขึ้นได้ดีในดินที่ร่วนซุย มักขึ้นเองตามริมลำธารในป่าดงดิบ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงคู่ (Medthai, 2560)

ภาพที่ 2.1 กระดูกไก่ดำ (*Justicia gendarussa* Burm.f.)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ล้มลุกหรือไม้พุ่มขนาดเล็ก มีความสูงของต้นประมาณ 90-100 เซนติเมตร ลำต้นเป็นสีแดงเข้มถึงสีดำหรือเป็นสีม่วง เกลี้ยงมัน ลักษณะของลำต้นและกิ่งเป็นปล้องข้อคล้ายกับกระดูกไก่ โดยมีขนาดข้อของลำต้นยาวประมาณ 2.5-3 นิ้ว ส่วนข้อของปล้องกิ่งยาวประมาณ 1-1.5 นิ้ว ตามลำต้น กิ่งก้าน และใบมีสีแดงเรื่อๆ

ใบ มีลักษณะเป็นรูปใบหอก ปลายใบแหลม โคนใบแหลม ขอบใบเรียบไม่มีหยักใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตรและยาวประมาณ 4-14 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบเงาเป็นสีเขียวเข้ม หน้าใบเป็นสีเขียวสด ส่วนหลังใบเป็นสีเหลืองอมสีเขียว มีเส้นกลางใบเป็นสีแดงอมดำ ส่วนก้านใบสั้น

ดอก ออกเป็นช่อบริเวณส่วนยอดของต้นหรือบริเวณปลายกิ่ง ในช่อหนึ่งๆ จะมีความยาวประมาณ 2-3 นิ้ว ดอกมีลักษณะเป็นหลอดเล็กๆ ปลายดอกแยกออกเป็นกลีบ กลีบดอกเป็นสีขาวอมเขียวแกมสีชมพู โคนกลีบดอกเชื่อมติดกัน ปลายกลีบแยกเป็นกลีบบนและกลีบล่าง กลีบดอกมีลักษณะโค้งงอนเหมือนช้อน ข้างในหลอดดอกมีเกสรเพศผู้ 2 ก้าน โผล่พ้นขึ้นมาจากหลอด

ผล มีลักษณะเป็นฝัก มีความยาวประมาณ 1.3 -1.5 เซนติเมตร

1.3 สรรพคุณของกระดูกไก่ดำ

ใบสด นำมาตำคั้นเอาแต่น้ำมาดื่มเป็นยาแก้อาการปวดศีรษะ ส่วนในมาเลเซียและอินโดนีเซียจะนำใบสดมาตำผสมกับหัวหอมและเมล็ดเทียนแดง แล้วนำมาพอกแก้อาการปวดศีรษะ เป็นยาแก้โรคหืด ยาบำรุงโลหิต ยาแก้ไข้ ลดความร้อน ช่วยขับเลือดข้นในร่างกายให้กระจาย ช่วยกระจายเลือด แก้เลือดคั่งค้างเป็นลิ่มเป็นก้อน ทำให้เลือดที่อุดตันในร่างกายไหลเวียนสะดวก โดยน้ำคั้นจากใบใช้ผสมกับเหล้ากินเป็นยาแก้อาเจียนเป็นเลือด แก้ไอ แก้ท้องเสีย (ราก) ใช้เป็นยาทาแก้อาการปวดท้อง ยาขับปัสสาวะ แก้อาการช้ำใน แก้ปวดบวมตามข้อ ใบนำมาต้มกับนม รับประทานเป็นยาแก้ท้องร่วงอย่างแรง ยาแก้ฝีฝักบัว ทางตอนใต้ของอินเดียมีการใช้ใบของต้นกระดูกไก่ดำเพื่อรักษาโรคติดเชื้อหลายชนิด

รากและใบ นำมาตำผสมกันใช้เป็นยาพอกถอนพิษจากแมลงสัตว์กัดต่อย เช่น พิษงู ผึ้ง ต่อ แตนต่อย เป็นต้น หรือจะใช้กากของใบนำมาพอกแผลบริเวณที่ถูกกัดจะช่วยดูดพิษของอสรพิษได้ หรือจะใช้ใบนำมาขยี้ผสมกับเหล้าขาวเป็นยาทา เมื่อนำมาต้มกับน้ำใช้อาบแก้โรคผิวหนังและผื่นคันตามตัว

ราก เป็นยาทาเด็กที่เป็นเม็ดตุ่มขึ้นตามตัว นำมาตำผสมกับเหล้าหรือน้ำส้มสายชู แล้วนำมาพอกบริเวณที่เป็นช่วยแก้อาการเคล็ดขัดยอก

ทั้งต้น มีรสเผ็ด เป็นยาร้อนเล็กน้อย สรรพคุณเป็นยาขับลมชื้นตามข้อกระดูก ใบสดนำมาตำคั้นเอาแต่น้ำดื่มเป็นยาแก้อัมพาต

1.4 ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของกระดูกไก่ดำ

สารสำคัญที่พบ ได้แก่ สารอัลคาลอยด์, Justicine และน้ำมันระเหยประกอบ ในรากที่นำมาต้มกับน้ำหรือแช่ในแอลกอฮอล์ หรือใช้สกัดด้วยแอลกอฮอล์ เมื่อฉีดเข้าในท้องของหนูทดลองในปริมาณ 1-2 กรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม พบว่าจะทำให้หนูมีอุณหภูมิในร่างกายสูงขึ้น แต่ถ้าหากฉีดเข้าหนูทดลองในปริมาณ 10-20 กรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม จะมีผลทำให้อุณหภูมิในร่างกายของหนูทดลองต่ำลงมาก และมีอาการถ่ายอย่างเฉียบพลันและถึงแก่ความตาย (วิทยา บุญวรพัฒน์, 2554) สารสกัดเมทานอลของใบกระดูกไก่ดำมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (เช่น *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus mutans*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (เช่น *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Proleus mirabilis, Shigella Flexner, Salmonella paratypi A, Salmonella typhimusium*) กระดูกไก่ดำมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ลดปวดสูงมาก ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่มาจากสารสำคัญในกลุ่ม Flavonoids คือ Vitexin และ Apigenin ที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกเดียวกันกับยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) โดยไปยับยั้งเอนไซม์ทั้ง Cyclooxygenase (COX) และ Lipoxygenase

pathways ทำให้มีผลยับยั้งการหลั่งสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบหลายชนิด เช่น Prostaglandins, Histamine, NO, iNOS, MMP-9, Prostaglandins และยังพบว่าสารสกัดกระดูกไก่ดำยังออกฤทธิ์ที่ Opioid receptor ซึ่งเป็นกลไกเดียวกับมอร์ฟีน แต่มีฤทธิ์ลดปวดน้อยกว่ามอร์ฟีนประมาณ 2-5 เท่า นอกจากนี้ยังมีกลไกลลดการอักเสบเหมือนยาสเตียรอยด์ โดยไปยับยั้งหรือ Stabilizing Lysosomal Membrane ไม่ให้สร้างสารพวก Hydrolytic enzyme จากเม็ดเลือดขาวออกมาย่อยเซลล์ และมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่อักเสบ มีฤทธิ์ลดปวดเทียบเท่ายามาตรฐานอย่างแอสไพริน (Aspirin) และยังพบว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการปวดทั้งที่เกิดจากระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย สาร Apigenin ซึ่งพบในใบกระดูกไก่ดำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของมะเร็งต่อมลูกหมากได้ สารสกัดกระดูกไก่ดำมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ในหลอดทดลอง โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Anti-angiogenesis) (Medthai, 2560)

2. แคแสด

2.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Spathodea campanulata* P.Beauv. จัดอยู่ในวงศ์ BIGNONIACEAE มีชื่อท้องถิ่น เช่น แคแดง (กรุงเทพ) ยามแดง และกือนางอ (มลายู-ยะลา) เป็นต้น แคแสดเป็นพืชพื้นเมืองของแอฟริกาตอนใต้ และในภายหลังได้แพร่กระจายไปยังประเทศอื่นๆ ของโลกที่มีอากาศร้อน ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดหรือใช้หน่อ หากปลูกในที่แห้งมากจะผลัดใบ แต่จะไม่พร้อมกันทั้งต้น และถ้าตัดแต่งกิ่งให้แตกเป็นพุ่มกลมจะให้ดอกที่พุ่มกลมตามรูปของเรือนยอดและดูสวยงาม (Medthai, 2560)

ภาพที่ 2.2 แคแสด (*Spathodea campanulata* P.Beauv.)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดกลาง มีความสูงของต้นประมาณ 15-20 เมตร ลักษณะของลำต้นเป็นทรงเรือนยอดพุ่มกลมและค่อนข้างทึบ เปลือกต้นเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีรอยแตกเป็นรวงตามยาว

ใบ เป็นใบผสมแบบขนนก มีใบใบย่อยประมาณ 4-7 คู่ ส่วนปลายเป็นใบเดียว ลักษณะของใบเป็นรูปรี ปลายใบแหลม ขอบเรียบ ผิวใบจับแล้วสากระคายมือ

ดอก ออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ช่อดอกตั้งตรง มีก้านช่อดอกยาว แต่ละช่อจะมีดอกจำนวนมากและจะทยอยกันบานครั้งละ 2-6 ดอก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-9 เซนติเมตร กลีบดอกติดกัน ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูประฆัง คล้ายดอกทิวลิป เป็นสีแสดหรือสีเลือดหมู ดอกแคแสดมีขนาดใหญ่ กลีบดอกหลุดร่วงได้ง่าย โดยจะเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุได้ประมาณ 4-8 ปี และจะออกดอกตลอดทั้งปี แต่จะออกดอกมากในช่วงฤดูหนาว ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคมไปจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ปีหน้า

ผล เป็นฝักคล้ายรูปเรือสีดำ ปลายผลแหลม ผลเมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาล แตกเป็นด้านเดียว ภายในผลมีเมล็ดจำนวนมาก

เมล็ด มีขนาดเล็ก แบน และมีปีก โดยจะออกผลตลอดทั้งปี และจะออกผลมากในช่วงฤดูฝนคือช่วงเดือนมิถุนายนจนถึงเดือนกันยายน

2.3 สรรพคุณของแคแสด

เปลือก ช่วยแก้อาการปวดฟัน ปวดท้อง ใช้ต้มกินเป็นยาบำรุงธาตุในร่างกาย ช่วยแก้บิด แก้ท้องผูกชนิดพรรดึก โรคผิวหนัง และพอกรักษาแผลเรื้อรัง

เปลือก ใบ ดอก และผล ใช้พอกรักษาโรคผิวหนังและแผลเรื้อรังต่างๆ

เปลือก และใบ ช่วยรักษาอาการอาหารไม่ย่อย และแผลในกระเพาะอาหาร

เปลือก และเมล็ด ช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

ใบและดอก ใช้พอกบาดแผล

ใบ เปลือก ราก และผล ช่วยรักษาอาการข้ออักเสบ และกระดูกหัก

ดอก ใช้รักษาแผลเรื้อรัง เปลือกต้น รสเฝื่อน รักษาโรคผิวหนังและแผล เรื้อรัง แก้บิด แก้พรรดึก และบำรุงธาตุ

ตาดอก ประกอบด้วยของเหลวมีรสหวานใช้เป้นยาชูกำลัง

สารสกัดจากเปลือก และดอก ช่วยรักษาโรคมาลาเรีย HIV เบาหวาน อาการบวม ท้องผูก โรคบิด โรคระบบทางเดินอาหาร โรคผิวหนัง บาดแผล ไข้ การอักเสบของท่อปัสสาวะ ตับ และใช้เป็นยาแก่พิษ

ราก ช่วยขับเสมหะ รักษาบาดแผล ขับพยาธิ และแก้ตกเลือด

3. พลู

3.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper betle* L. จัดอยู่ในวงศ์ PIPERCEAE มีชื่อท้องถิ่น เช่น พลูเหลือง, พลูทอง, พลูจีน (ทั่วไป), เปล้าอ้วน, ซีเก๊ะ, ซีเก๊าะ (ภาคใต้), กื่อเจี่ย (จีนแต้จิ๋ว) และจวีเจียง (จีนกลาง) เป็นต้น พลูมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นแถบเอเชียใต้ประเทศอินเดีย ศรีลังกา และบังคลาเทศ ต่อมาจึงมีการแพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ ทั่วทวีปเอเชียและแอฟริกา พลูมีหลายชนิด เช่น พลูจีน พลูเหลือง พลูเขียว และพลูทองหลาง ในประเทศไทยมีแหล่งเพาะปลูกที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี นครนายก นครปฐม กรุงเทพมหานคร มหาสารคาม ขอนแก่น และนครราชสีมา โดยเป็นการปลูกเพื่อบริโภค การค้า และส่งออกต่างประเทศ ขยายพันธุ์ใหม่ด้วยการปักชำกิ่ง โดยใช้กิ่งหรือลำต้นที่มีข้อประมาณ 3-5 ข้อ ปักชำในแปลงปักชำหรือถุงปักชำ เมื่อกิ่งปักชำติดแล้วค่อยย้ายลงปลูกในแปลงปลูก (ผกายมาส อุดมผล, 2553)

ภาพที่ 2.3 พลู (*Piper betle* L.)

3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้เถา ลำต้นเกลี้ยง เลื้อยเกาะต้นไม้อื่น หรือเกาะไม้ค้างด้วยรากที่อยู่ตามข้อ ตรงข้อของเถาจะป่อง มีรากสั้น

ราก เป็นรากใต้ดินแบบระบบรากฝอย โดยมีราก 2 ชนิด คือ รากหาอาหาร และรากยึดเกาะ หรือรากตุ๊กแก มีหน้าที่ในการยึดเกาะวัสดุเพื่อช่วยพยุงลำต้นให้เลื้อยขึ้นที่สูง โดยการแตกออกตามข้อของลำต้น มีรากใต้ดินเป็นรากขนาดใหญ่ และรากแขนงที่แตกออกเป็นวงกว้างตามขนาดทรงพุ่ม

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกสลับกัน ใบมีขนาดใหญ่ บางพันธุ์รูปไข่ กลม กว้าง บางพันธุ์รูปไข่รี โคนใบรูปหัวใจ ปลายใบแหลม เนื้อใบเป็นมัน สีเขียวสดหรือสีเหลืองอมเขียว ก้านใบยาวติดกับลำต้น ใบมีสีเขียวเหลืองถึงเขียวเข้ม ขอบใบเรียบ มีกลิ่นฉุน รสเผ็ด

ดอก มีสีขาวขนาดเล็ก ออกเป็นแท่งกลมบนแกนยาว มีช่อยาวประมาณ 1-3 นิ้ว มีใบประดับเล็กๆ รูปรีหรือกลม

ผล เป็นผลเดียวทรงกลมเล็ก มีเนื้อนุ่มอัดแน่นในช่อ เมื่อสุกมีสีแดง

เมล็ด มีลักษณะกลม ขนาดยาวประมาณ 2.25-2.6 มิลลิเมตร และกว้างประมาณ 2 มิลลิเมตร

3.3 สรรพคุณของพลู

ลำต้น ช่วยแก้โรคมะเร็ง แก้ริดสีดวง และใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ

ราก ช่วยแก้โรคมะเร็ง แก้โลหิตระคนด้วยลมให้ตก วิงเวียนศีรษะ แก้เจ็บคอ ช่วยขับเสมหะ แก้โรคหอบหืด โรคหลอดลมอักเสบ แก้อาการท้องเสีย ช่วยลดไข้ และรักษาโรคริดสีดวง

ใบ มีน้ำมันหอมระเหย มีสีน้ำตาลปนเหลือง และมีกลิ่นฉุน เรียกว่าน้ำมันพลู มีสารไอโซยูจีนอล คาวิคอล และยูจินอล ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค ทำให้ปลายประสาทชาและแก้อาการคันได้ รักษาอาการช้ำบวม รักษาอาการปวดท้อง รักษาอาการไอ เจ็บคอและขับเสมหะ แก้ผื่นคันเนื่องจากลมพิษ โรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน แผลอักเสบ ฝี หนอง และสิว ในประเทศอินเดียมีการใช้น้ำคั้นจากใบพลูสด เพื่อเป็นยาถ่ายพยาธิ ยาระบาย ยาเจริญอาหาร ขับเสมหะ ลดไข้ แก้ปวดศีรษะ ขับลมในท้อง ใบพลูยังมีน้ำย่อยชื่อ ไดแอสเทส ช่วยรักษาอาการท้องอืด เนื่องจากอาหารจำพวกแป้งไม่ย่อย

ดอก ใช้บำรุงธาตุ แก้ธาตุพิการ ช่วยให้เจริญอาหาร และรักษาโรคมะเร็ง

3.4 ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของพลู

พลูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ของสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยน้ำมีผลทำให้เซลล์แตก นอกจากนี้พลูเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หลายชนิด เช่น *Ralstonia sp.*, *Xanthomonas sp.* และ *Erwinia sp*. เป็นต้น โดยองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยน้ำ คือ hydroxychavicol, fatty acid และ hydroxybenzenacetic acid และยังพบว่าสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumonia* และ *E. coli* (Lirio. et al, 2008) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Antifungal activity) เชื้อราได้หลายชนิด เช่น Colletotrichum capsici, Fusarium pallidoroseum, Botryodiplodia theobromae, Altemaria altemate, Penicilium citrinum, Phomopsis caricae-papayae และ Aspergillus niger ซึ่งทดสอบ

โดยใช้วิธี disc diffusion method ของสารสกัดพลูด้วยเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าวได้ดีกว่า prochloraz 2.5 มก./มล. หรือ clorimazole 10 มก.มล (Mohamed, S., et al., 1996) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radlcal scavenging activity) โดยสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอลช่วยยับยั้งการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยรังสีแกมมาในหนู Swiss albino mice และเมื่อทำการป้อนสารสกัดพลูในขนาด 1,5 และ 10 มก./กก. ให้หนูกินทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำตับของหนูมาวิเคราะห์พบว่าไม่มีการเปลี่ยนระดับของ lipid peroxidation และมีผลทำให้ปริมาณของ glutathione เพิ่มขึ้น โดย glutathione มีส่วนสำคัญในกระบวนการ detoxification จะไปควบคุมและรักษาระดับของปฏิกิริยา redox และ thiol homeostasis ในตับ มีผลในการควบคุมการเกิดปฏิกิริยา cellular oxidative และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซน์ superoxide dismutase (SOD) แต่ทำให้การทำงานของเอนไซน์ catalase ลดลง (Choudhary, D.ang and R.K. Kale, 2002)

4. พิลังกาสา

4.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia elliptica* Thunb. จัดอยู่ในวงศ์ PRIMULACEAE มีชื่อท้องถิ่น เช่น ผักจำ ผักจ้ำแดง (เชียงใหม่, เชียงราย), ตีนจำ (เลย), ลังพิสา (ตราด), ทุรังกาสา (ชมพร), ราม (สงขลา), ปือนา (มลายู-นราธิวาส), พิลังกาสา (ทั่วไป) เป็นต้น พิลังกาสาเป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปตั้งแต่หมู่เกาะริวกิวของประเทศญี่ปุ่น และกระจายไปทั่วเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ไปจนถึงอินเดียภาคใต้ พบพรรณไม้ชนิดนี้ได้ตามป่าราบและมีประปรายอยู่ทั่วไป ตามป่าโปร่ง ป่าดิบเขาทั่วไป และที่ราบสูง ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด ชอบดินทรายหรือดินเหนียว แต่ไม่ชอบดินแฉะ (Medthai, 2560)

ภาพที่ 2.4 พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.)

4.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นขนาดย่อม มีความสูงของต้นประมาณ 2-3 เมตร ลำต้นแตกกิ่งก้านสาขาออกรอบต้น

ใบ เป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับกันเป็นคู่ๆ ตามข้อต้น ลักษณะของใบเป็นรูปไข่ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ส่วนขอบใบเรียบไม่มีจัก แผ่นใบเป็นสีเขียวมัน มีลักษณะหนาและใหญ่ ส่วนยอดอ่อนเป็นสีแดง

ดอก ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่งหรือตามส่วนของยอด ดอกเป็นสีเหลืองนวล สีชมพูอมขาว หรือสีขาวแกมชมพู เมื่อดอกบานเต็มที่จะมี 5 แฉก คล้ายรูปดาว

ผล มีลักษณะกลมโต มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ออกเป็นกระจุกมีก้านช่อยาวห้อยย้อยลง และก้านผลยาวเรียงสลับรอบก้านช่อ ผลอ่อนเป็นสีแดง เมื่อแก่หรือสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงดำ

4.3 สรรพคุณของพิลังกาสา

ลำต้น ใช้เป็นยาฆ่าพยาธิผิวหนัง ยารักษาโรคผิวหนัง แก้โรคเรื้อน และกุฏฐัง

ราก ใช้เป็นยาแก้กามโรค หนองใน แก้ลมเป็นพิษ พอกปิดแผล ถอนพิษงูกัด แก้พิษงู ตะขาบ แมงป่อง หรือใช้กาก พอกแผล เอาน้ำกิน

ใบ มีรสร้อน ช่วยแก้อาการไอ แก้ลม ช่วยแก้ปอดพิการ แก้ท้องเสีย และรักษาโรคตับพิการ

ดอก ใช้เป็นยาแก้พยาธิ และยาฆ่าเชื้อโรค

ผล ใช้เป็นยาแก้ไข้ แก้ไข้ในกองอติสารโรคช่วยแก้โรคระดูของสตรี แก้โรคเรื้อน ผลสุกนำมาตากแห้งบดเป็นผงผสมกับน้ำผึ้ง แล้วปั้นเป็นลูกกลอนกิน หรือใช้ผงยา 1 ช้อนโต๊ะ ผสมกับน้ำครึ่งแก้วดื่มช่วยบำรุงโลหิต และช่วยแก้ธาตุพิการ

เมล็ด ช่วยแก้ลมพิษ

4.4 ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของพิลังกาสา

สารสำคัญที่พบ คือ α-amyrin, rapanone มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ช่วยยับยั้ง platelet activating factor receptor binding มีฤทธิ์เหมือนฮีสตามีน ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว ต้านการจับตัวของเกล็ดเลือด รักษามาลาเรีย แก้อาการท้องเสีย แก้เกลื้อน และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ Aspergillus (สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2557)

5 อัคคีทวาร

5.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb จัดอยู่ในวงศ์ LAMIACEAE มีชื่อท้องถิ่น เช่น หลัวสามเกียน (เชียงใหม่), แข้งม้า (เชียงราย), พรายสะเลียง สะเม่าใหญ่ (นครราชสีมา), หมากดูกแฮ้ง (สกลนคร), มักแค้งข่า (ปราจีนบุรี), อัคคี (สุราษฎร์ธานี), ตั่งต่อ ปอสามเกี๋ยน สามสุม (ภาคเหนือ), ตรีชวา อัคคี (ภาคกลาง), พายสะเมา (วาริชภูมิ), ควีโดเยาะ (กะเหรี่ยงเชียงใหม่), ผักห้าส้วย (ไทใหญ่), ลำกร้อล (ลั้วะ), ซานไถหงฮวา ซานตุ้ยเจี่ย (จีนกลาง), ชะรักป่า, แคว้งค่า, ผ้าห้ายห่อคำ, มักก้านต่อ, หมอกนางต๊ะ, หูแวง, ฮังตอ เป็นต้น (Medthai, 2560) อัคคีทวารมีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ประเทศปากีสถาน อินเดีย พม่า จีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย ในประเทศไทยพบขึ้นได้ตามป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณที่เปิดและค่อนข้างชื้น ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 500-1,000 เมตร ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การปักชำการตอนกิ่ง เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วน ชอบความชื้นและแสงแดดปานกลาง (นิจศิริ เรืองรังษี และธวัชชัย มังคละคุปต์, 2547)

ภาพที่ 2.5 อัคคีทวาร (*Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb)

5.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นตั้งตรงและจะแยกเป็นช่อๆ มีความสูงของต้นประมาณ 1-4 เมตร ลำต้นกลมหรือเป็นเหลี่ยมเล็กน้อย เปลือกลำต้นเรียบเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทาเข้ม ตามกิ่งอ่อนและยอดอ่อนเป็นเหลี่ยม เปลือกมีรูสีขาวและมีขนปกคลุม

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้ามกันหรือเรียงซ้อนกันเป็นวง ใบแตกตามข้อ ไม่มีก้านใบ ในแต่ละข้อส่วนมากจะออกเป็น 3 ใบวงเป็นรอบกัน บางข้อมีใบประมาณ 3-4 ใบ ลักษณะของใบเป็นรูปรียาวหรือรูปใบหอก ปลายใบแหลมเป็นติ่งสั้น โคนใบสอบหรือแหลม ส่วนขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยช่วงกลางขอบใบไปจนถึงปลายใบ ใบมีขนาดกว้างประมาณ 4-10 เซนติเมตร และยาวประมาณ 15-28 เซนติเมตร หลังใบเรียบ เป็นสีเขียวเข้มเป็นมัน ส่วนท้องใบเรียบเป็นสีอ่อนกว่า บ้างว่าทั้งใบมีขนปกคลุม เส้นกลางใบเป็นสีเขียวเข้มหรือสีม่วง ก้านใบสั้น

ดอก ออกเป็นช่อ โดยจะออกตามซอกใบและที่ปลายยอด ดอกย่อยเป็นสีม่วงอ่อนเข้ม สีม่วงอ่อนอมสีฟ้า หรือสีชมพูอ่อน กลีบดอกมี 5 กลีบ รูปทรงกระบอก โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดสั้นๆ กลีบดอกแต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน ดอกมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม มีกลีบเลี้ยงลักษณะเป็นรูปไข่กลับ 2 ใบหุ้มอยู่ กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็ก สีชมพูอ่อน ใจกลางของดอกมีเกสรเพศผู้ 4 อัน ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก และใต้เกสรมีขนปกคลุม ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม

ผล เป็นรูปค่อนข้างกลมหรือกลมแป้น ผิวผลเรียบเป็นมัน ผลเมื่ออ่อนเป็นสีเขียว พอแก่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

เมล็ด มีสีดำ 1 เมล็ด ลักษณะของเมล็ดอัคคีทวารเป็นรูปกลมรี

5.3 สรรพคุณของอัคคีทวาร

ลำต้น ฝานเป็นชิ้นบางๆ ตากแห้ง แล้วนำมาต้มกับน้ำกินเป็นยาลด ความดันโลหิต แก้ไข้จับสั่น ใช้เป็นยาแก้ปวดท้อง ด้วยการนำลำต้นมาฝานเป็นชิ้นบางๆ ตากให้แห้งแล้วนำมาต้มกับน้ำกิน ใช้ต้มกับน้ำกินเป็นยาขับปัสสาวะ นำไปตำพอกแก้ฝีหนอง โรคผิวหนัง และนำไปตำพอกแก้อาการฟกช้ำ ปวดบวม ช่วยแก้อาการปวดเมื่อย เนื่องจากลมชื้นเข้าข้อ

ทั้งต้น มีพิษเล็กน้อย ใช้เป็นยาแก้ตับอักเสบ เป็นยาเย็น ใช้เป็นยาขับพิษร้อนถอนพิษไข้ แก้ไข้จับสั่น ใช้เป็นยาแก้ไข้ป่า ด้วยการฝานลำต้นเป็นชิ้นบางๆ ตากให้แห้ง ใช้ต้มกับน้ำกิน ใช้ภายนอกเป็นยาแก้กระดูกร้าว กระดูกแตก ด้วยการใช้ต้นสดนำมาตำพอกบริเวณที่เป็น และนำไปต้มให้หญิงที่เพิ่งคลอดบุตรดื่ม หรือนำมาต้มกับน้ำอาบแก้อาการปวดเมื่อย

ราก ช่วยทำให้เสมหะแห้ง ระบบทางเดินหายใจได้ดี เช่น แก้หอบหืด อาการไอ แก้ไข้ แพ้อากาศ รวมไปถึงริดสีดวงจมูก หรืออาการอักเสบเรื้อรังของโพรงจมูก ใช้เป็นยารักษาสุขภาพของระบบกระเพาะอาหารและลำไส้ จะช่วยในการย่อยอาหาร ขับลม แก้อาการเบื่ออาหาร และแก้ปวดเกร็งท้อง

ราก ต้น นำมาขนาดประมาณ 1-2 องคุลี ฝนกับน้ำปูนใสให้ข้นใช้ทาริดสีดวง เป็นยาเกลื่อนหัวริดสีดวงทวาร และยาเกลื่อนฝี ทารักษาแผลบวม

ใบ ใช้เป็นยาแก้อาการจุกเสียด ใช้ต้มกินแก้ท้องท้องอืด ถ้านำมาลนไฟแล้วนำมาประคบบริเวณหน้าอกจะช่วยแก้อาการเจ็บหน้าอกได้ นำมาต้มกับน้ำรับประทานช่วยแก้อาการเสียดท้อง ใช้ใบแห้งนำมาบดหรือป่นให้เป็นผง โรคในถ่ายไฟ เผาเอาควันใช้ รมหัวริดสีดวงงอกที่ทวารหนักจะช่วยทำให้หัวริดสีดวงทวารยุบฝ่อได้ นำมาโขลกเอาน้ำกินสำหรับคุณแม่มือใหม่ที่เพิ่งคลอดลูก จะทำให้มดลูกเข้าอู่ดีขึ้นและแก้อักเสบ และใช้ตำพอกแก้อาการปวดศีรษะ ปวดศีรษะเรื้อรัง

ใบสด ต้นสด ใช้ตำพอกแก้โรคผิวหนัง แก้กลากเกลื้อน โรคเรื้อน ตำพอกแก้ฝีหนอง โรคผิวหนัง ช่วยดูดหนอง ด้วยการนำใบสดนำมาอังไฟแล้วขยี้ใส่แผลฝีหนองเรื้อรัง หรือรอยแผลจากการถูกแมลงกัดและ ปากนกกระจอก และใช้ตำพอกแก้อาการขัดตามข้อ

ผล เป็นยาแก้โรคเยื่อตาอักเสบ ด้วยการใช้ผลสุกหรือดิบนำมาเคี้ยวค่อยๆ กลืนน้ำกิน ทั้งผลสุกและดิบ นำมาเคี้ยวค่อยๆ กลืนเอาน้ำเป็นยาแก้ไอ ช่วยแก้อาการเจ็บคอ คออักเสบ และแก้ทอนซิลอักเสบ

5.4 ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของอัคคีทวาร

สารสำคัญที่พบ ได้แก่ Oleanolic acid, Queretaroic acid และSerratagenic acid เป็นต้น เมื่อนำสารที่สกัดได้จากทั้งต้นอัคคีทวารมาฉีดให้หนูทดลอง ในปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม โดยฉีดติดต่อกันเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าสามารถช่วยป้องกันอาการภูมิแพ้ที่เกิดจากโปรตีนไข่ขาวได้ เมื่อนำน้ำที่สกัดได้นำมาให้หนูทดลองหรือสุนัขทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งฮีสตามีนที่ทำให้ลำไส้ของสัตว์ทดลองบีบตัวได้ อัคคีทวารมีฤทธิ์ต้านการแพ้ ต้านฮีสตามีน ต้านการบีบตัวของลำไส้ ลดความดัน โลหิต ขับลม ฆ่าเชื้อโรค ส่วนเปลือกรากนั้นมีสาร campesterol และ sitosterol สารสกัดเปลือกรากอัคคีทวารมีฤทธิ์ฆ่าอสุจิ ต้านการแพ้ ต้านการบีบตัวของลำไส้และลดความดันโลหิต (วิทยา บุญวรพัฒน์, 2554)

การสกัดสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืช หมายถึง การใช้สารละลายที่เหมาะสมนำพาสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ออกมาจากพืชสมุนไพรชนิดนั้น ซึ่งอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารจากพืชที่ต้องการสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้การสกัดสาร (คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ, 2556)

1. วิธีการสกัด

1.1 การแช่ (Infusion) คือ กระบวนการสกัดโดยการแช่สมุนไพรด้วยน้ำร้อนหรือน้ำเย็นในช่วงเวลาสั้นๆ สารสกัดที่ได้จะเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีในอุณหภูมิที่ไม่สูงมาก

1.2 การต้ม (Decoction) คือ กระบวนการสกัดสารที่ละลายได้ดีในน้ำ และสามารถทนความร้อนได้ดี โดยการต้มสมุนไพรในน้ำจนเดือดแล้วต้มต่อไปอีกประมาณ 15 นาที แต่ในการผลิต

ในเชิงอุตสาหกรรมการต้มเพื่อให้ได้ตัวยาออกมาอาจต้องใช้ระยะเวลานานขึ้น เช่น การต้มมะขามป้อมหรือตัวยาอื่นๆ ในสูตรยาแก้ไอ เป็นต้น

1.3 การตุ๋น (Digestion) คือ กระบวนการสกัดโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลานานกว่าการต้ม

1.4 การสกัดด้วยน้ำมันร้อน (Hot Oil Extraction) คือ กระบวนการสกัดสารสำคัญที่เป็นน้ำมันร้อน หรือสารที่ละลายได้ดีในน้ำมัน ซึ่งเป็นวิธีการโบราณที่เรียกกันว่า “การเคี่ยวน้ำมัน” เป็นการเคี่ยวด้วยไฟอ่อนๆ ทั้งนี้ควรเลือกใช้น้ำมันที่มีความคงตัว ทนต่อความร้อน และไม่เป็นไข เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

1.5 การหมัก (Maceration) คือ กระบวนการสกัดสาระสำคัญจากพืช โดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด มีการคนหรือเขย่าบ่อยๆ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรอง การสกัดด้วยวิธีการหมักโดยมากจะไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากอาจทำให้สารสกัดเน่าเสียได้ ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักเห่งชาติที่มีการหมักเพื่อสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร จะหมักด้วยแอลกอฮอล์สำหรับยาที่ใช้ภายนอก ส่วนในทางอุตสาหกรรมอาจใช้วิธีการสกัดที่มีความซับซ้อนขึ้น เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง (percolation) การสกัดด้วย soxhlet extractor, liquid – liquid extraction, extraction of volatileoil แบบต่างๆ และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว เป็นต้น

2. การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของพืชสมุนไพรควรมีคุณสมบัติ (คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ, 2556) ดังต่อไปนี้

2.1 เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารสำคัญของพืชหรือสมุนไพรที่ต้องการสกัดได้อย่างเหมาะสม

2.2 ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

2.3 ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด

2.4 ไม่เป็นพิษ

2.5 ราคาไม่แพงมาก

3. การทำสารสกัดให้เข้มข้น

สารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพจะต้องมีสารออกฤทธิ์ที่เข้มข้น เมื่อทำการสกัดสมุนไพรออกมาสารสกัดที่ได้จะมีสารออกฤทธิ์ (Active compounds) ในปริมาณสูง โดยการใช้วิธีการทำสารสกัดให้เข้มข้น (คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ, 2556) ดังนี้

3.1 การระเหยแห้ง (Free Evaporation) โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือเตาไฟฟ้า (hot plate) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีการใช้โดยทั่วไปในโรงพยาบาล แต่ต้องให้มีการถ่ายเทอากาศที่ดี เพราะไอของแอลกอฮอล์ที่ระเหยถ้ามีความเข้มข้นถึงระดับหนึ่งสามารถติดไฟได้

3.2 การระเหยแห้งโดยการกลั่นสุญญากาศ (Distillation in Vacuum) เป็นวิธีการระเหยแห้ง โดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงจนเกือบเป็นสุญญากาศด้วยปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) และปัจจุบันเครื่องมือยังมีการพัฒนาให้สารละลายของสารสกัดหมุนวนอย่างสม่ำเสมอในภาชนะหนึ่ง เพื่อให้การระเหยของตัวทำละลายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยเรียกเครื่องกลั่นระเหยแห้งแบบหมุนนี้ว่า rotary evaporator โดยนิยมใช้กับสารสกัดในตัวทำละลายที่ระเหยง่าย หรือสารสกัดที่ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูง

3.3 การแช่แข็ง (Freeze Dry) เป็นการทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยทำให้สารสกัดแข็งตัวก่อนจะทำให้น้ำค่อยๆ ระเหิดออกไปที่ความดันต่ำใกล้สุญญากาศ

3.4 การอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dry) เป็นการทำให้สารสกัดเข้มข้นหรือแห้งโดยการพ่นละอองของสารสกัดผ่านเครื่องที่ควบคุมความร้อนและความดันบรรยากาศ เพื่อให้สารสกัดแห้งอย่างรวดเร็ว ซึ่งในกระบวนการสกัดสารจากสมุนไพรบางชนิดอาจไม่จำเป็นต้องทำให้สารสกัดมีความเข้มข้น โดยจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการพัฒนาและการนำไปใช้ เช่น การหมักพลูด้วยแอลกอฮอล์ในตำรับทิงเจอร์ พลูจะไม่มีการระเหยแอลกอฮอล์เพื่อทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น เนื่องจากเป็นกระบวนการผลิตยาตามวิธีพื้นบ้าน (การดองยา)

4. ขั้นตอนการเตรียมพืชที่เป็นวัตถุดิบ

ขั้นตอนการเตรียมพืชที่เป็นวัตถุดิบเป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืชสมุนไพร โดยจะต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่นำมาใช้ให้ถูกต้องก่อนที่จะทำการเตรียมวัตถุดิบ (คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ, 2556) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1 ตรวจสอบชนิดและส่วนของพืชที่ใช้ในการสกัด เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เป็นต้น จากนั้นจึงคัดเลือกสิ่งปลอมปนออก

4.2 ทำความสะอาดด้วยการล้าง เพื่อชำระสิ่งปลอมปนต่างๆ ที่ติดมากับพืชโดยที่ไม่สามารถคัดออกด้วยมือเปล่า เช่น เศษดิน หิน และวัชพืช เป็นต้น วิธีการทำความสะอาดขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช การล้างสามารถใช้แรงงานคนหรือใช้เครื่องล้างวัตถุดิบสมุนไพรด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิค และโอโซน ทั้งนี้เครื่องมือที่นำมาใช้อาจต้องพิจารณาจากงบประมาณและสถานที่ผลิต

4.3 การทำให้แห้งที่ถูกวิธีขึ้นกับชนิดและส่วนของพืชนั้นๆ ในพืชบางชนิดควรมีการหั่น การตัด หรือลดขนาดของชิ้นสมุนไพรลง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำให้แห้ง เช่น เหง้าขมิ้นชัน เหง้าไพล ส่วนเหนือดินของฟ้าทะลายโจร เป็นต้น

4.4 การบดและการย่อยเพื่อลดขนาดของสมนุไพร กระบวนการบดสมนุไพรไม่ควรบดจนละเอียดเกิน เพราะจะทำให้กรองเอาสารสกัดยาก เนื่องจากกากสมุนไพรจะปนมากับสารสกัด หากใช้การกรองที่ไม่เหมาะสม และการบดเพื่อลดขนาดสมนุไพรไม่ควรบดจนหยาบเกินไป เพราะจะทำให้พื้นที่ผิวของสมนุไพรน้อยลง ทำให้การสกัดที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

ขนาดของสมุนไพรที่เหมาะสมควรมีขนาดที่สามารถผ่านแร่งเบอร์ 20 หรือน้อยกว่านี้ ในกรณีที่เป็นสมนุไพรสดสามารถใช้วิธีหั่น สับ บด หรือปั่น เพื่อลดขนาดและทำการสกัดโดยการต้ม จะใช้วิธีเหล่านี้ในการลดขนาดสมุนไพรแทนการบด หรือย่อยโดยผ่านแร่ง

อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพเป็นอย่างมาก โดยเป็นตัวการทำให้เกิดโรคที่รุนแรง เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ล้วนแล้วแต่มีสาเหตุมาจากการที่อนุมูลอิสระ (Free radical) เข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย และทำให้เกิดโรคต่างๆ ขึ้น โดยที่อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นในร่างกายของคนเราตลอดเวลา เกิดจากการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เป็นพลังงาน โดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้วยังมีแหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว สภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด และพยาธิสภาพของร่างกาย เช่น การมีไข้ การติดเชื้อ เป็นต้น นอกจากอนุมูลอิสระภายในร่างกายแล้วยังมีแหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย ได้แก่ รังสีโอโซน ควันบุหรี่ อนุภาค อนินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ และมลภาวะต่างๆ ดังนั้นการเสาะแสวงหาสารที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระใหม่ๆ จากธรรมชาติจะสามารถนำไปชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น และจะเป็นการเพิ่มมูลค่า (Value Added) ให้กับสมุนไพรไทยต่อไปในอนาคตอีกด้วย

1. ความหมายของอนุมูลอิสระ

ฮอริ่วิว และ บี (Halliwell and B., 1999) กล่าวว่า อนุมลูอิสระ เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer Orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (Unpaired Electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุล อะตอม หรือสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงจะสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจนกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ โดยที่อนุมูลอิสระมีสมบัติเหมือนสารทั่วๆ ไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่น

สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส (pH) และความชื้น เป็นต้น มาร์แชล โรเบิร์ต ฟลอยด์ และพีโดร บัค คัลเดอรอน (Marcel Roberfroid and Pedro Buc Calderon, 1995) กล่าวว่า อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งที่เป็นประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{\bullet+}$) เช่น อนุมูล Pyridiny ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{\bullet-}$) เช่น อนุมูล Superoxide ($O_2^{\bullet-}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล Peroxyl (ROO หรืออนุมูล Thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น ซึ่งจาก คำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ($Cl^{\bullet}$) และซิลเวอร์อะตอม ($Ag^{\bullet}$) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) และ Superoxide Anion Radical ($O_2^{\bullet-}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

1.1 การแตกของพันธะโควาเลนซ์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

1.2 การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{\bullet-}$$

1.3 การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{\bullet+} + e^{-}$$

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ ในทางชีววิทยาสามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Chlorine Species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxynitrite) (โอภา วัชระคุปต์และคณะ, 2550)

2. ปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ

2.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน สารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เรียกว่า ตัวรีดิวซ์ (Reducer Agent) และสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอน เรียกว่า ตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing Agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้ออกซิเดชันจะเป็น

การเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุล ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องเนื่องจากทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ได้หลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

2.2 ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกว่า ขั้นตอนอินนิทิเอชัน (Initiation Step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อๆ กัน เรียกว่า ขั้นพรอพาเกชัน (Propagation Step) และขั้นสุดท้าย เรียกว่า ขั้นเทอร์มิเนชัน (Termination Step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร (B.J.F. Hudson,1990) ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะพบอนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดต่างๆ เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ ทั้งภายนอกและภายใน

2.2.1 ขั้นตอนแรก (Initiation Step) อนุมูลอิสระเกิดมาจากกลไกต่างๆ กันได้หลายวิธี คือ การแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) หรือการแตกพันธะ เนื่องจากแสง (Photolysis) หรือผลของรังสี (Radiolysis) หรือมาจากปฏิกิริยารีด็อกซ์ (Redox Reaction) ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 4 จัดเป็นกลไกพื้นฐานในการสร้างอนุมูลอิสระจากการแตกพันธะแบบเสมอภาค (Bond Homolysis) (Marcel Roberfroid and Pedro Buc Calderon, 1995) โมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Valence Electron) เป็นจำนวนคู่แล้ว ในทางทฤษฎีสามารถแยกออกจากกันให้ผลลัพธ์เป็นอนุมูลอิสระได้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิปกติ การที่อิเล็กตรอนคู่ในพันธะโควาเลนซ์สามารถแยกจากกันทำให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้น ต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่อ่อนมาก เช่น ไดซัลไฟด์ (Disulfide) และการเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราที่ช้ามาก จึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่าง Bond Homolysis แสดงดังสมการต่อไปนี้

$$ROOR \longrightarrow 2RO^{\bullet}$$

ซึ่งการแตกพันธะของโมเลกุลให้เกิดสารอนุมูลอิสระมีสาเหตุดังนี้

การเกิดโฟโตไลซิส (Photolysis) เป็นการแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสง เช่น แสงอัลตร้าไวโอเลต ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นพบมากในแตกพันธะของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide, H_2O_2) กลายเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลแรดิคัล (Hydroxyl Radical, $HO^{\bullet}$) ในสิ่งมีชีวิตพลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เช่น รงควัตถุและสารแอโรมาติกคาร์บอนบางชนิด หลังดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลนั้นอยู่ในสถานะที่กระตุ้น (Excited State) จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อให้โมเลกุลกลับเข้าสู้สถานะพื้น

(Ground State) เหมือนเดิม และวิธีหนึ่งของการคายพลังงาน คือ การแตกพันธะของโมเลกุลเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว คือ

$$OCl \longrightarrow RO^{\bullet} + Cl^{\bullet}$$

$$(RCOO)_2 \longrightarrow 2RCOO$$

การเกิดเรดิโอไลซิส (Radiolysis) ซึ่งเกิดจากพลังงานจากรังสีชนิดต่างๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ และอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงสามารถทำให้เกิดการแตกพันธะโควาเลนซ์ของโมเลกุลสารได้ โดยเฉพาะโมเลกุลจะให้อนุมูลประจุบวก ($H_2O^{\bullet +}$) และอนุมูลไฮดรอกซิลแรดิคัล ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์สูง ทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากมาย นอกจากนี้รังสียังทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรงจากสารองค์ประกอบเคมีของเซลล์อีกด้วย โดยเฉพาะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งปฏิกิริยานี้นับเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

การเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ปฏิกิริยารีด็อกซ์หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันบางชนิดมีประโยชน์ แต่ปฏิกิริยาออกซิเดชันบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหาย โดยสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ที่สำคัญ คือ โมเลกุลของอนุมูล Superoxide($O_2^{-\bullet}$) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ปฏิกิริยารีด็อกซ์ของไอออนโลหะในร่างกายจัดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเฉพาะไอออน (II) ไอออน (Fe^{2+}) และคอปเปอร์(II) ไอออน(Cu^{2+}) โดยไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ (B.J.F. Hudson, 1990)

2.2.2 ขั้นตอนการขยาย (Propagation Step) เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระมีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อๆ กันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่จะได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา จัดเป็นการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่ (Unpaired Electron) ซึ่งสามารถแบ่งกลไกของปฏิกิริยาในขั้นพรอพาเกชันได้ 3 ชนิด ที่มีความเกี่ยวของกับระบบทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต ดังนี้

การถ่ายทอดอะตอมหรือกลุ่มของอะตอม (Atom or Group Transfer) จัดเป็นกลไกที่เกิดมากที่สุดในลำดับของพรอพาเกชัน โดยปฏิกิริยาจะเกี่ยวของกับการดึงไฮโดรเจน แสดงดังสมการต่อไปนี้

$$Cl^{\bullet} + RH \longrightarrow HCl + R^{\bullet}$$

$$R^{\bullet}_1 + R_2Cl \longrightarrow R_1Cl + R^{\bullet}_2$$

การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron Transfer) มาร์แชล โรเบิร์ตฟลอยด์ และพีโดร บัค คัลเดอรอน (Marcel Roberfroid and Pedro Buc Calderon, 1995) กล่าวว่า เป็น

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระที่เป็นกลางหรือมีประจุลบไปให้โมเลกุลที่ไม่ใช้อนุมูลอิสระ (Non-Radical Molecule) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในสิ่งมีชีวิต (Lipid Peroxidation) การเติมอนุมูลอิสระ (Addition of Radicals) เป็นการเติมกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลต่างๆ แสดงดังสมการต่อไปนี้

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

ตัวอย่างของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไขมัน (Lipid Peroxidation) เฟรนเกล (E.N.Frankel, 1980) ได้แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน แสดงดังสมการต่อไปนี้

Chain initiation :

$$L\text{-}H \longrightarrow L^{\bullet} + \text{radical} - H$$

Chain propagation :

$$L^{\bullet} \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O^{\bullet}$$

$$L\text{-}O\text{-}O^{\bullet} \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O\text{-}H + L^{\bullet}$$

Chain termination :

$$L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow L - L$$

2.2.3 ขั้นสุดท้าย (Termination Step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย กลไกหลัก 3 ชนิด คือ การรวมตัวกันของอนุมลูอิสระ (Homo-linking and Cross-Linking of Radicals) การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ เป็นการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุล โดยการนำอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ของแต่ละโมเลกุลอนุมูลอิสระมาสร้างพันธะกัน ได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ที่มีพันธะรวมกัน หากเป็นการรวมตัวกันระหว่างอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลที่เป็นชนิดเดียวกัน เรียกโมเลกุลสารใหม่ว่า Homodimer แต่ถ้าเป็นการรวมตัวของอนุมูลอิสระต่างชนิดกัน เรียก Heterodimer ซึ่งกลไกนี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรขึ้นมาใหม่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีนกรดนิวคลีอิก และไขมัน เป็นต้น (Marcel Roberfroid and Pedro Buc Calderon, 1995) แสดงดังสมการต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$2ROO^{\bullet} \longrightarrow ROO\text{-}OOR$$

$$R^{\bullet} \longrightarrow R\text{-}R$$

การกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) เป็นการกำจัดเอาขยะและสิ่งที่ไม่จำเป็นออกไป ซึ่งในกรณีนี้เปรียบอนุมูลอิสระได้กับสิ่งที่ไม่ต้องการ การกำจัดออกจะกระทำโดยสารกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า Scavenger หรือสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) เช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งจัดเป็น Radical Scavenger ที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งวิตามินซี วิตามินอี และวิตามินเอ เป็นต้น

การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron Transfer) เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล Superoxide ($O_2^{-\bullet}$) เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ (O_2) เป็นต้น

2.3 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารพวกเอนไซม์ หรือสารอื่นที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเริ่มต้นหรือซับสเตรต (Substrate) สารเริ่มต้นหรือซับสเตรตนี้ คือ สารที่สามารถทำปฏิกิริยาในเซลล์ ซึ่งรวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ แต่ถ้าในบางสภาวะที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมากจนระบบสารต้านอนุมูลอิสระทำงานไม่ทันจะเกิดสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงมาก (Oxidative Stress) จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ เช่น ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายโมเลกุลที่มีพันธะซัลไฮดริลฟ์ (S-H) และเยื่อหุ้มเซลล์ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์ทำให้เกิดความแก่ และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรค เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน และโรคมะเร็ง

การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระเป็นกลไกของระบบต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการทำงานของระบบเอนไซม์หรือไม่ใช่ระบบเอนไซม์ โดยปกติสารต้านอนุมูลอิสระจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ สารที่พบในร่างกายและสารที่พบในอาหาร (อนันต์ สกุลกิม, 2551)

2.4 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด คือ

2.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นจะประกอบไปด้วยสารประกอบจำพวก ฟีโนลิก (Phenolic) สังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ Propyl Gallate, 2-butylated Hydroxyanisole, 3-butylated Hydroxyanisole, Butylated Hhydroxytoluene (BHT) และ Tertiary Butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและการคงตัวสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติโดยทั่วไปแต่มีข้อจำกัด คือ ความปลอดภัยในการบริโภค

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้รับความสนใจ และการพัฒนาค้นคว้าอย่างกว้างขวางมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีแนวความคิดเรื่องสารธรรมชาติและเชื่อในความปลอดภัย โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์และพืชที่มี

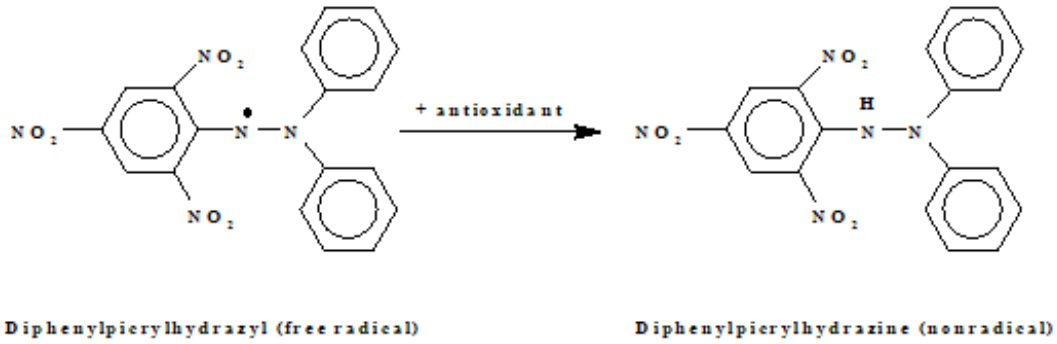
วิตามิน ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี และเบตาแคโรทีน (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) และสารที่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ (Non-Nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะพอลิฟีนอล เช่น แซนโทน และเฟลโวนอยด์ ซึ่งมีองค์ประกอบหลักของหมู่ Aromatic Hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป โดยหมู่ที่ทำหน้าที่ (Functional Group) เหล่านี้มีคุณสมบัติในการดักจับอนุมูลอิสระต่างๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี สำหรับการเลือกใช้แต่ละวิธีนั้นควรใช้เกณฑ์ในการพิจารณาโดยเรียงลำดับความสำคัญดังนี้ ความเฉพาะเจาะจง ความคงตัว ความถูกต้องแม่นยำ ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวิเคราะห์กับอาการหรือโรค นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความยากง่ายในการวิเคราะห์ เครื่องมือที่ใช้ กลไกของปฏิกิริยา และจุดยุติ เป็นต้น โดยรายละเอียดของแต่ละวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี

1. วิธี 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radicals (DPPH)

ฟิลิป มอลินิวซ์ (Philip Molyneux, 2004) ได้กล่าวว่า DPPH คือ อนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2.6 ดังนั้นการศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จึงเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ซึ่งอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลาย โดยในการทดสอบจะให้ DPPH (สีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนดแล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งจะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) จะบ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำการทดสอบ เมื่อไม่นานมานี้ได้มีตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่ถูกแนะนำให้ใช้สำหรับการอธิบายผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH คือ ค่า “Efficient Concentration” หรือค่า EC_{50} (หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกค่า IC_{50}) ซึ่งค่านี้ หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate) หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ 50



ภาพที่ 2.6 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH Radical กับสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : Philip Molyneux, 2004

2. วิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay

ทดสอบตามวิธีของ (Kubola J. and S. Siriamornpun, 2008) โดยทำการเจือจางตัวอย่างสารสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 ให้มีระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง จำนวน 60 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสาร FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ทิ้งไว้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าการต้านออกซิเดชันคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทดสอบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ($FeSo_4.7H_2O$) ในช่วง 100-1000 ไมโครโมล โดยรายงานเป็น (µmol of Fe (II)/1g สารทดสอบ)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (microbiostatic) หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรเป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ในสมุนไพร

1. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ (รวมถึงเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหา) อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อ ตลอดจน

การอ่านและแปรผล ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามแบบแผนอย่างถูกต้องทุกขั้นตอน จึงจะทำให้ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเชื่อถือได้ และทำให้การอ่านและแปรผลถูกต้อง (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

1.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MIC (minimal inhibitory concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (µg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยา หรือแปรผลของยาต่อเชื้อในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ยาควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อยๆ (2-fold serial dilution) (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

1.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ MLC (minimal lethal concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียอาจใช้คำที่จำเพาะเจาะจงกว่า คือ MBC (minimal bactericidal concentration) แต่ถ้าเป็นราอาจใช้คำว่า MFC (minimal fungicidal concentration) ยาต้านจุลชีพที่มีวิถีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย (microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น MLC/MIC≤4) ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและราสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ คือ dilution susceptibility test และ agar diffusion test (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

1.3 การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ

1.3.1 ลักษณะของงาน เช่น งานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำ หรือนานๆ ทำครั้ง งานที่ต้องรู้ค่า MBC ดังตัวอย่างงานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อยจะนิยมใช้ agar diffusion test เพื่อตัดปัญหาต้องเตรียมและเก็บสารละลายของตัวยาที่ต้องใช้ใน dilution test ขณะที่งานที่ต้องการรู้ค่า MBC ของตัวยาจะนิยมใช้ broth dilution test

1.3.2 ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้าหรือเลือกเฟ้นการใช้อาหารมาก (fastidious dilution test) จะนิยมใช้ broth dilution test ขณะที่เชื้อที่ต้องเจริญบนเลือดหรือไม่

ต้องการออกซิเจน (anaerobe) มักใช้ agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ควรเลือก dilution test

1.3.3 จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำ agar dilution test

1.3.4 ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาแพร่กระจาย (diffuse) ใน agar medium ไม่ดีจะนิยมหาค่า MIC ด้วยวิธี dilution test เป็นต้น

1.3.5 จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อยจะนิยมใช้ agar diffusion test

เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้ว อาจต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการทดสอบ เช่น ชนิดของ medium สำหรับ medium ที่ดีควรให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) มาก ขณะที่มีเชื้อเจริญไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของยามีส่วนผสมที่ปรากฏใน broth และ agar medium เหมือนกันยกเว้นสารช่วยให้แข็ง และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อชนิดที่ต้องการทดสอบสามารถเจริญได้ (Alderman D. J. and Smith P., 2001) medium ที่นิยมใช้ ได้แก่ Mueller Hinton (MH) broth (agar) ถ้าทดสอบพวกที่เจริญยากจะนิยมใช้ brain heart infusion broth (agar) หรือ trypticase soy broth (agar) ในการทดสอบเชื้อรา medium ที่ใช้มีหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของรา และชนิดของยาที่ทดสอบ กล่าวคือ ถ้าเป็นราชั้นสูงจะใช้ Sabouraud dextrose broth (agar), tryptic soy broth (agar) และ potato dextrose agar แต่ถ้าเป็นราชั้นต่ำจะใช้ glucose yeast extract broth (agar) เป็นต้น

2. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

2.1 Dilution Susceptibility Test หรือการทดสอบ MIC

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะ สามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้าใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อจะสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูงๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (anaerobe) หลักการของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน โดยจะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นใส่เชื้อลงใน หรือบน medium ที่มีสมุนไพร ภายหลังการบ่มเพาะ ให้ดูค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.2 Broth dilution test

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียด การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสมุนไพรนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการของวิธีนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.3 วิธีการทำ broth dilution test

วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macrodilution หรือ tube test และ microdilution dilution test

2.4 Broth Macrodilution test

การทดสอบในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มล. และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื่อที่ต้องการ

2.5 Broth Microdilution test

การทดสอบใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2-fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 105 CFU/มล.) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า หรือ อาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้ เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น เช่น งานการวิจัยของ Eloff J. N. (1998) ที่ได้ทดลองโดยใช้สาร tetrazolium dye หลายชนิด ได้แก่ tetrazolium red, thiazolyl blue และ p-lodonitrotetrazolium violet (INT) เป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย (biologically active organisms) โดยหากเชื้อมีการเจริญจะสามารถเปลี่ยนสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีได้ ซึ่งพบว่า p-lodonitrotetrazolium violet ให้ผลการวัดการเจริญได้ของเชื้อที่ดีที่สุด ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำได้รวดเร็ว แม่นยำ และเหมาะนำมาใช้ศึกษาสมุนไพร เนื่องจากสามารถลดการรบกวนการอ่านผลเนื่องจากสีและความขุ่นของสมุนไพรบางชนิดได้หากดูความขุ่นด้วยตาเปล่า

2.6 วิธีการทดสอบ microbicidal activity

การทดสอบ MLC จะทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งนิยมทำจาก broth dilution test โดยการ subculture เชื้อจาก broth ที่ไม่มีเชื้อขึ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป streak บน agar plate เพื่อให้เปรียบเทียบได้ชัดขึ้นควรเพาะจากหลอด control ที่ไม่มีสมุนไพรด้วย จากนั้นนำ plate ไปบ่มแล้วดูการเจริญของเชื้อเพื่ออ่าน MLC (MBC หรือ MFC) โดยที่ความเข้มข้น ดังกล่าว

จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นหรือเกือบไม่มีเชื้อขึ้น (99.9% ของเชื้อถูกฆ่า) (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.7 Agar dilution test

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ทำการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MLC ได้ และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า MIC (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.8 วิธีการทำ agar dilution test

นำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45-50 ^{o}C) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ การเตรียมขนาดเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อที่เมื่อแตะลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^{4} ตัวต่อจุด เมื่อแตะเชื้อลงบน agar ทดสอบแล้วต้องทิ้งให้ซึมหมดก่อนคว่ำ plate นำไปบ่มที่ 35-37 ^{o}C นาน 16- 20 ชั่วโมง เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.9 Agar diffusion Test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ อาจไม่ทราบค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการ คือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้มักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว อาจขึ้นอยู่กับ ปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลาย หรือการซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ

สำหรับวัสดุรองรับสมุนไพร (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper disc) หรืออาจเรียกว่า disc sensitivity test หรืออาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

2.10 วิธีการทำ Agar Diffusion Test (disc diffusion test และ hole–plate diffusion)

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสกัดสมุนไพรและวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสมุนไพรด้วย หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole - plate diffusion) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) แล้วหยดสารละลายสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอน การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสมุนไพรที่ ความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื่อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานได้ (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

3. ข้อสังเกต

3.1 สารละลายสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบต้องทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 หรือ 0.45 μm สมุนไพรที่เป็นน้ำมันจะทำให้การอ่านผลยาก

3.2 ก่อนนำ agar plate มาใช้ในการทดสอบ ควรนำ plate ไปทำให้แห้ง ไม่มีหยดน้ำหรือไอน้ำ โดยอาจนำไปวางในตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30–37°C หรือในตู้ laminar flow ไม่เกิน 30 นาที ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อโดยนำไปใส่ตู้บ่มเชื้อ

3.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ควรมาจาก 1 โคโลนีมา streak ให้เจริญบน Mueller–Hinton agar เมื่อเชื้อเจริญแล้วนำมาเตรียมเชื้อให้ได้จำนวน 1-2×10^8 CFU/ml ใน NSS ปลอดเชื้อ แล้วใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื่อขึ้นมา swab ให้ทั่ว agar และตั้งทิ้งไว้ไม่ให้ชื้น ประมาณ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3.4 Standard incubation times โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ช่วงเวลา ได้แก่ 24-28 เซนติเมตร และ 44-48 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจริญของเชื้อ

3.5 การทดสอบด้วยวิธี hole - plate diffusion (Brantner A., Pfeiffer K. and Brantner H., 1994) อาจได้ฤทธิ์ที่สูงกว่า (larger activity) วิธี disc diffusion (Essawi T. and Srour M., 2000) เนื่องจากมีปริมาณของสารที่ทดสอบมากกว่า (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์แชมพูสมุนไพร

แชมพู เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถชำระล้างคราบไข ฝุ่นละออง เหงื่อไคล และสิ่งสกปรกออกจากเส้นผมและหนังศีรษะได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ (พาณี ศิริสะอาด, 2558)

1. คุณสมบัติที่ดีของแชมพู

แชมพูสามารถทำความสะอาดเส้นผม และหนังศีรษะได้อย่างหมดจด เมื่อใช้สระผมไม่ทำให้เส้นผมเหนียว หวียาก เส้นผมหลังสระจะต้องลื่นอ่อนนุ่มเป็นประกาย หรือยืดหยุ่นตัวได้ดี ไม่ทำลายไขมันธรรมชาติของเส้นผม ไม่ทำให้ผมกรอบแห้ง หรือหนังศีรษะแห้งจนเกินไป ขณะสระผมเกิดฟองปริมาณมากและสม่ำเสมอ ฟองคงทนบนเส้นผมในขณะที่มีน้ำมันหรือสกปรกมาก สามารถล้างออกได้ง่ายโดยใช้น้ำธรรมดา และแข็งกระด้าง โดยไม่ทำให้เกิดการแพ้ระคายเคือง ผิวหนังอักเสบ หรือผมร่วง ไม่ทำให้แสบตา และอันตรายต่อเยื่อตา แชมพูมีกลิ่นหอมไม่ก่อความระคายเคือง มีความคงตัวดี สี กลิ่น และความหนืดไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อถูกแสงหรืออุณหภูมิสูง

2. ประเภทของแชมพู

2.1 การจำแนกตามลักษณะทางกายภาพ

2.1.1 แชมพูลักษณะเหลว เป็นที่นิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีลักษณะโปร่งใส มีความหนืดพอสมควร กระจายบนศีรษะได้ดีทำให้สระผมได้ทั่วถึง เกิดฟองเร็วลางออกงาย และไม่เหนอะหนะ เช่น แชมพูเหลวใส โลชั่นแชมพู

2.1.2 แชมพูลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีลักษณะเนื้อแชมพูข้นมาก กระจายบนศีรษะได้ง่าย เช่น แชมพูเจล แชมพูครีม และแชมพูชนิดฟอง

2.1.3 แชมพูชนิดแข็ง รูปแบบไม่ค่อยได้รับความนิยม เนื่องจากไม่สะดวกในการใช้งาน กระจายศีรษะยาก ล้างออกยาก สภาพผมหลังสระมีความเป็นด่าง เมื่อสูดดมจะระคายเคืองเยื่อจมูกเช่น แชมพูผง และเม็ดแชมพูชนิดก้อน

2.2 จำแนกตามลักษณะการใช้งาน

2.2.1 แชมพูสระผมทั่วไป เป็นแชมพูสำหรับสภาพผมธรรมดา ผมมัน และผมแห้ง

2.2.2 แชมพูสำหรับเด็ก เป็นแชมพูที่ใช้สำหรับเด็ก จะมีความอ่อนและความปลอดภัย

2.2.3 แชมพูขจัดรังแค เป็นแชมพูที่ผสมสารช่วยขจัดรังแค

2.2.4 แชมพูปรับสภาพผม เป็นแชมพูที่ผสมครีมนวด

2.2.5 แชมพูย้อมสีผม เป็นแชมพูที่ผสมสารช่วยย้อมสีผม

3. องค์ประกอบของแชมพู (สมจิตต์ บวรวัฒนาโสภณ, 2546)

3.1 ส่วนประกอบหลัก เป็นสารชำระล้าง หรือสารลดแรงตึงผิว ได้แก่

3.1.1 สารชำระล้างชนิดประจุลบ

3.1.2 สารชำระล้างชนิดประจุบวก

3.1.3 สารชำระล้างชนิดไม่มีประจุ

3.1.4 สารชำระล้างชนิดมี 2 ประจุ

3.2 ส่วนประกอบที่อาจผสมเพิ่มเติม ได้แก่

3.2.1 สารปรับสภาพเส้นผม

3.2.2 สารเพิ่มฟอง

3.2.3 สารช่วยทำให้ข้น

3.2.4 สารช่วยทำให้ใส

3.2.5 สารช่วยทำให้ทึบแสง

3.2.6 สารกันการรวมตัวหรือสารซีเควสเตอร์ (sequestering agent)

3.2.7 สารปรับความเป็นกรด-ด่าง

3.2.9 สารกันเสีย

3.2.10 ส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สี น้ำหอม สารขจัดรังแค และสมุนไพร

3.4 คุณสมบัติของสารเคมีแต่ละชนิด

3.4.1 ส่วนประกอบหลัก คือ สารชำระล้างหรือสารลดแรงตึงผิว ทำหน้าที่ทำความสะอาดเส้นผมและหนังศีรษะ ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วงประมาณ 12-25% ขึ้นอยู่กับชนิดของแชมพู เช่น แชมพูสำหรับผิวมันจะมีความเข้มข้นของสารชำระล้างที่สูงกว่าแชมพูสำหรับผมแห้ง ซึ่งสารชำระล้างแบ่งออกได้หลายชนิด แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันดังนี้

3.4.1.1 สารชำระล้างชนิดประจุลบ มีคุณสมบัติที่ดีกว่าชนิดอื่นๆ คือ ทำความสะอาดได้ดีเกิดฟองเร็วและปริมาณฟองมาก ราคาถูก จึงเป็นที่นิยมใช้เป็นสารหลักในแชมพู แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้เส้นผมมีสภาพเป็นประจุลบ หวีเข้าทรงยาก บางชนิดอาจทำให้เกิดการระคายเคือง สารชำระล้างที่ใช้แบ่งตามประเภท ดังนี้

3.4.1.1.1 Lauryl sulfates เช่น sodium lauryl sulfate, triethano-lamine lauryl sulfate และ ammonium lauryl sulfate เป็นองค์ประกอบหลักของแชมพูหลายชนิด เกิดฟองได้ดีทั้งในน้ำอ่อนและกระด้าง มีความสามารถในการชำระล้างได้ดีแต่ทำให้ผมแห้งแข็ง

3.4.1.1.2 Laureth sulfates (lauryl ether sulfate) ให้ฟองดี ชำระล้างได้ดี และทำให้ผมอ่อนนุ่ม และใช้เป็นสารหลักในแชมพูหลายชนิด เช่น sodium laureth sulfate ให้ฟองดี ราคาถูกใช้ในแชมพรรรมดาทั่วไป triethanolamine laureth sulfate ทำให้ข้น

เหนียวได้ยาก ใช้เตรียมแชมพูใส ammonium laureth sulfate ให้ฟองที่ละเอียดดี ละลายน้ำดี และ magnesium laureth sulfate มีความอ่อนโยน ใช้ในแชมพูเด็กได้

3.4.1.1.3 Sarcosines เช่น lauryl sarcosine, sodium lauryl sarcosinate เป็นสารชำระล้างที่ไม่ดีนัก แต่ปรับสภาพเส้นผมได้ดี มักใช้เป็นสารชำระล้างเสริม

3.4.1.1.4 Sulfosuccinates เช่น disodium laureth sulfosuccinate, sodium diethylhexyl sulfosuccinate ให้ฟองที่ดี และมีความอ่อนโยนต่อผิวหนัง

3.4.1.2 สารชำระล้างชนิดประจุบวก สารกลุ่มนี้มีอำนาจการชำระล้างและการเกิดฟองน้อยกว่าชนิดประจุลบ มีข้อเสีย คือ เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและเนื้อเยื่อตา จึงใช้ในความเข้มข้นต่ำมาก ไม่เกินร้อยละ 5 และราคาแพง นอกจากนี้อาจทำให้สิ่งสกปรกเกาะในขณะสระจึงไม่นิยมใช้เป็นสารหลักในแชมพู จะใช้เป็นสารช่วยปรับสภาพเส้นผม ให้ไม่มีประจุลบมากเกินไป ทำให้เส้นผมหวี่ง่าย ไม่ยุ่งเหยิง ที่เป็นที่นิยมใช้ ได้แก่ cationic cellulose ether derivative (Polyquaternium-10, Quaternium-19) Polymer JR® ,cetyl trimethy/ammonium chloride (Cetrimonium chloride) IDehyquart A® และ PEG-15-tallow polyamine [Polyquart H®

3.4.1.3 สารชำระล้างชนิดไม่มีประจุ มีอำนาจการชำระล้างดี เหมาะที่จะเป็นสารหลักในแชมพูได้ แต่ให้ฟองไม่มากเท่าควร จึงใช้เป็นสารเสริมร่วมกับสารชำระล้างชนิดประจุลบ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ polyoxyethylene fatty alcohols และ polyoxymethylene sorbitol esters เช่น polysorbate 20 และ tween 20 สารกลุ่มนี้อาจใช้เป็นสารชำระล้างหลักในแชมพูเด็ก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เป็นสารที่มีความความอ่อนโยนมาก

3.4.1.4 สารชำระล้างชนิดมีสองประจุ เป็นสารที่มีทั้งประจุบวกและลบในโมเลกุลเดียวกัน การแสดงประจุบวกหรือลบขึ้นกับความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย โดยจะเป็นลบในสารละลายด่าง และเป็นบวกในสารละลายกรด กลุ่มของสารเคมีที่จัดอยู่ในสารชำระล้างประเภทนี้ ได้แก่ betaines, sultaines และอนุพันธ์ของ midazolinium ที่นิยมใช้ ได้แก่ cocamidopropyl betaine และ sodium lauraminopragionate สารทั้งสองนี้นิยมใช้ในแชมพูเด็กเนื่องจากไม่ระคายเคืองต่อตา สารชำระล้างในกลุ่มนี้จะให้ฟองปานกลางและทำให้ผมจัดทรงได้ง่าย จึงเหมาะที่จะเป็นสารชำระล้าง สำหรับผมที่เสียหรือผมที่มีขนาดเส้นเล็ก

3.4.2 ส่วนประกอบที่อาจผสมเพิ่มเติม เป็นสารที่ใสเพิ่มในสูตร เพื่อทำให้แชมพูมีลักษณะที่ดีน่าใช้ และมีคุณลักษณะพิเศษแตกต่างกันออกไปตามความต้องการ สารเหล่านี้ ได้แก่

3.4.2.1 สารปรับสภาพเส้นผม (conditioners) มีคุณสมบัติเป็นสารปรับสภาพเส้นผมให้นิ่ม เป็นเงางามไม่หยาบแห้ง เพราะหากใช้สารชำระล้างที่แรงทำให้เส้นผมขาดไขมัน

เปราะและหวีเข้าทรงยาก หน้าที่ของสารพวกนี้ คือ เคลือบเงาแก่เส้นผมและทำให้นุ่ม ไม่หยาบแห้ง ป้องกันการพันกันของเส้นผมจากการหวีลด และการเกิดไฟฟ้าสถิตที่จะทำให้ผม ได้แก่

3.4.2.1.1 สารเคมี ได้แก่ lanolin, fatty acid, collagen, coconut oil, cationic polymers, phosphate esters

3.4.2.1.2 สารชำระล้างประจุบวก ได้แก่ สารธรรมชาติ ไข่แดงหรือผงไข่แห้งและน้ำผึ้ง เคลือบเงาเส้นผมได้ดี ทำให้ผมนุ่มมีน้ำหนัก และพองฟู

3.4.2.2 สารเพิ่มฟอง (foam builder) มีคุณสมบัติเป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดฟองชนาดเล็กที่ละเอียดและหนาแน่น มีปริมาณผ่องมากและเป็นฟองที่คุณภาพดี นุ่มนวล และคงทนอยู่ได้นาน ทำให้เกิดความรู้สึกที่ดีในขณะที่ใช้แชมพู ได้แก่

3.4.2.2.1 สาร Fatty acid alkanolamides ได้แก่ lauric diethanolarnide Lauramide (DEAJ), cocamine diethanolamide หรือ coconut fatty acid diethanolamide Cocamide DEA) Comperlan KD®,Cocamide monoathanolamide (Cocamide MEA), lauric monoethanolamide และ lauric isopropanolamide

3.4.2.2.2 สารกลุ่ม Amine oxides ได้แก่ lauramine oxide และ cocamine oxide

3.4.2.3 สารช่วยทำให้ข้น (thickening agent) มีคุณสมบัติทำให้แชมพูเหนียวข้นขึ้น ไม่หลุดลอดจากมือขณะเทออกมาใช้ ได้แก่

3.4.2.3.1 natural gums, synthetic gums เช่น sodium methyl-cellulose และ hydroxyethylcellulose, carbomer หรือ Carbopol®

3.4.2.3.2 alkanolamides เช่น Cocamide DEA, Lauramide DEA

3.4.2.3.3 เกลือ เช่น เกลือแกง (NaCl) ไม่ควรใช้เกลือที่มากเกินไป เพราะจะทำให้ผลิตภัณฑ์กลับเหลวได้อีก

3.4.2.4 สารชวยทำให้ใส ใช้ในแชมพูแบบใสโดยเพิ่มการละลายของสารต่างๆ ในตำรับแชมพู ทำให้แชมพูใสได้นานในอุณหภูมิกว้าง สารนี้มักเพิ่มฟองแก่แชมพูแต่ขณะเดียวกันทำให้ความหนืดลดลง ได้แก่ ethanol, propylene glycol หรือ (clarifying agent) nonionic surfactant เช่น Tween 20®

3.4.2.5 สารช่วยให้ทึบแสง (opacifier) ใช้เพื่อแต่งผลิตภัณฑ์ให้สวยงาม หรือใช้ในกรณีที่ไม่ต้องการทำให้เป็นแชมพูใสได้ สารประเภทนี้เป็นส่วนสำคัญในแชมพูประเภทครีมหรือโลชั่น ได้แก่

3.4.2.5.1 Fatty acid เช่น stearic acid

3.4.2.5.2 Fatty alcohol เช่น acetyl alcohol, stearyl alcohol

3.4.2.5.3 สารประเภท stearate ester เช่น diethylene glycol monostearate ทำให้เกิดประกายมุก นิยมทำให้เป็น 10% solution ก่อนที่จะเติมลงไป เพื่อช่วยในการกระจายตัวของสารนี้ให้ดีขึ้น

3.4.2.6 สารกันการรวมตัว (sequestering agent) มีคุณสมบัติช่วยป้องกันไม่ให้เกิดเกลือที่ไม่ละลาย ที่เกิดจากการใช้แชมพูในน้ำกระด้าง ซึ่งเกลือเหล่านี้จับบนเส้นผม ทำให้ผมหยาบกระด้าง ไม่เงางาม และป้องกันการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) หรือ polyphoshosphates

3.4.2.7 สารปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH adjuster) นิยมปรับความเป็นกรดด่างของแชมพูให้อยู่ในช่วง pH5.5-6.5 เพื่อให้เข้ากับความเป็นกรดของผิวหนังได้ดี แชมพูที่ใช้ ammonium salt surfactant ต้องปรับให้ pH เป็นกรดเพื่อป้องกันการปลดปล่อย ammonia ได้แก่ citric acid, phosphoric acid และ lactic acid

3.4.2.8 สารแต่งสี (colorant) สีที่ใส่ในแชมพูควรเป็นสีที่ละลายน้ำได้ และเป็นสีที่ปลอดภัย ทนต่อกรด ด่าง แสง และเข้ากับสารอื่นในแชมพูได้ โดยสีตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่ออกตามความในพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง 2535

3.4.2.9 สารแต่งกลิ่น (perfumes) ใช้เพื่อกลบกลิ่นของ shampoo base ที่ไม่ต้องการ หรือเพื่อให้ผู้บริโภคเกิดการยอมรับควรเลือกใช้กลิ่นที่ทนความร้อน ในกรณีที่มีการใช้ความร้อนในการผลิต และควรเป็นกลิ่นหอมอ่อนๆ ให้ความรู้สึกสะอาดและกลิ่นไม่เปลี่ยน แม้ภายหลังการสระผม และถ้ามีปัญหาเรื่องการละลายควรผสมลงกับสารที่ช่วยละลายก่อนเติมลงไปในผลิตภัณฑ์

3.4.2.10 สารกันเสีย (preservatives) สารชำระล้างที่ใช้เป็นสารหลักในแชมพูเป็นอาหารที่ดีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์แชมพูที่จำหน่ายในท้องตลาดสูงมาก ดังนั้นการใช้สารกันเสียจึงจำเป็นมากผู้ผลิตจะต้องศึกษาถึงอิทธิพลที่มีต่อฤทธิ์ของสารกันเสียเป็นอย่างดี เพื่อให้แน่ใจว่าสารกันเสียที่เลือกใช้สามารถป้องกันผลิตภัณฑ์ให้ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากมีเชื้อหลายชนิดที่ดื้อต่อสารกันเสียบางชนิด และสารโมเลกุลใหญ่ในสูตรอาจทำลายฤทธิ์ของสารกันเสีย ภาวะความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อความคงตัวของสารกันเสียบางชนิด ภาชนะพลาสติกที่ใช้บรรจุแชมพูอาจเกิดปฏิกิริยากับสารกันเสีย นอกจากนี้การใช้สารกันเสียหลายตัวร่วมกันเป็นที่นิยม เพราะ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้าง ลดความเป็นพิษจากการใช้สารกันเสียเดี่ยวๆ เพราะลดปริมาณลง ป้องกันการดื้อของเชื้อ

3.4.2.11 สารขจัดรังแค (anti-dandruff agent) ช่วยในการขจัดรังแค ได้แก่ Zinc pyrithione, piroctone olamine และ climbazole สารทั้ง 3 เป็นสารควบคุมที่ต้องแจ้งรายละเอียดต่อ อย.

4. สูตรพื้นฐานของแชมพู

สูตรพื้นฐานของแชมพูมีอยู่หลายประเภท ซึ่งสมารถเลือกให้เหมาะสมกับกลุ่มผู้บริโภค เช่นแชมพูสำหรับผมมัน ผมธรรมดา ผมแห้ง หรือแชมพูสำหรับเด็ก เป็นต้น (สมจิตต์ บวรวัฒนาโสภณ, 2546)

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรพื้นฐานของแชมพู

ส่วนประกอบ	ร้อยละ%	หน้าที่
Sodium laureth sulfate (28%)	40-50	สารชำระล้างชนิดประจุลบ
Alkanolamide (Cocamide DEA)	3	สารเพิ่มฟองและสารเพิ่มความหนืด
Sodium chloride (เกลือแกง)	2	สารเพิ่มความหนืด
Protein hydrolysate (30 %)	2	สารปรับสภาพเส้นผม
น้ำหอม, สี , สารกันเสีย	q.s.	
Citric acid	q.s.	สารปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.5-6.5
น้ำ q.s.	100	

โดยการใช้ Protein hydrolysate เป็นส่วนประกอบอาจทดแทนด้วยสารปรับสภาพเส้นผมอื่นๆ เช่น น้ำมันซิลิโคน หรือสารสกัดสมุนไพร และการปรับ pH ของแชมพู ควรให้มีค่าใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง คือ pH 5.5-6.5 ซึ่งโดยธรรมชาติ ผิวหนังจะมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ ความเป็นกรดของผิวหนังจะช่วยต้านทานการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง

ตารางที่ 2.2 แสดงสูตรแชมพูสำหรับผมประเภทต่างๆ

ส่วนประกอบ (%)	ผมธรรมดา	ใช้ทุกวัน	ผมมัน	ผมแห้ง
Alkyl ether sulfate (28 %) (เช่น sodium laureth sulfate)	45	40	50	40
Amidopropyl betaine (30 %) (เช่น cocamidopropyl betaine)	-	5	-	10
Sulfosuccinic acid ester (30%)	5	5	-	-
Protein hydrolysate (30%)	3	3	5	3
Protein hydrolysate/abietic acid hydrolysate (30%)	-	-	5	-
Alkanolamide	1	1	3	3
Propylene glycol	1	1	1	1
สารสกัดสมุนไพร	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
น้ำ q.s.	100	100	100	100

การแสดงสูตรแชมพูสมุนไพรสำหรับผมประเภทต่างๆ จะมีความแตกต่างกันตามความต้องการของลักษณะเส้นผม โดยจะมีการแบ่งแยกระหว่างผมธรรมดา ผมที่ต้องสระทุกวัน ผมมัน และผมแห้ง เพื่อให้เกิดการเติมเต็มให้กับเส้นผมแต่ละประเภท

มาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (มอก.เอส 12-2561) ของแชมพูสมุนไพร

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ด้านอุตสาหกรรมมีหลายประเภท ทำให้การควบคุมคุณภาพมีความจำเป็นมาก โดยเฉพาะกลุ่มอุตสาหกรรมขนาดเล็ก (SME) ซึ่งเพื่อให้เกิดการควบคุมมาตรฐาน และเสริมอุตสาหกรรมขนาดเล็กได้ กระทรวงอุตสาหกรรมจึงประการศมาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (มอก. เอส 12-2561) แชมพูสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลว ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว ใช้กับเส้นผมเพื่อสามารถขจัดสิ่งสกปรกออกจากเส้นผมและหนังศีรษะผสมสารสกัดจากสมุนไพร โดยลักษณะแชมพูที่ดี ต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ตกตะกอน ไม่มีสิ่งแปลกปลอมไม่ระคายเคืองผิวไม่มีสานปนเปื้อน และมีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ที่ 4.5-8.0 โดยมีการกำหนดคุณลักษณะที่ต้องการ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) ดังนี้

1. ลักษณะทั่วไป

แชมพูต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน ไม่มีสิ่งแปลกปลอม และต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของแชมพู และส่วนประกอบที่ใช้ ต้องผ่านการทดสอบ

2. การระคายเคืองต่อผิวหนัง

ดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (primary irritation index, PII) ต่อผิวหนัง ต้องไม่เกิน 1 การทดสอบ

3. สารปนเปื้อน

3.1 ตะกั่วต้องไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.2 สารหนู (คำนวณเป็น As_2O_3) ต้องไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.3 ปรอท ต้องไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.4 แคดเมียม ต้องไม่เกิน 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบให้ใช้อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ อินดักทีฟลีคัพเพิลพลาสม่า หรือวิธีทดสอบอื่น ที่เทียบเท่า

4. จุลินทรีย์

4.1 จำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ ต้องไม่เกิน 1000 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม หรือ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.2 ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (Pseudomonas aeruginosa) ต้องไม่พบ

4.3 สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ต้องไม่พบ

4.4 แคนดิดา อัลบิแคนส์ (Candida albicans) ต้องไม่พบ 4.4.5 คลอสตริเดียม (Clostridium spp.) ต้องไม่พบ การทดสอบให้ปฏิบัติตาม ISO หรือ BAM (U.S.FDA) หรือ USP หรือวิธีทดสอบอื่นที่เทียบเท่า

5. ความเป็นกรด-ด่าง

ต้องอยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 8.0 การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เทียบเท่า

6. การใช้งาน

ต้องสามารถขจัดสิ่งสกปรกฝุ่นละอองบนเส้นผมและหนังศีรษะได้และทำให้เส้นผมนุ่มสลวยหวี และจัดรูปทรงได้ง่าย

7. ความคงสภาพ

ลักษณะทั่วไปต้องอยู่ในสภาพที่ดีไม่แปรสภาพ หรือเสื่อมคุณภาพ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างต้องแตกต่างจาก เดิมไม่เกิน ± 1.0 และต้องอยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 8.0

การประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (stability test)

การประเมินคุณภาพของยาเตรียมกึ่งแข็ง โดยประเมินความคงตัวของตำรับทั้งทางกายภาพและทางเคมี ตลอดจนวิธีการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งแบบต่างๆ เพื่อกำหนดวันหมดอายุของตำรับ ให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาจำหน่ายเป็นที่ยอมรับ และเชื่อถือตามคุณภาพของคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) ประกอบด้วย

1. การศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง (accelerated studies)

เป็นการศึกษาเพื่อที่จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัว หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมี หรือฟิสิกส์ของผลิตภัณฑ์ โดยการเก็บตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง มีวัตถุประสงค์ในการที่จะหาตัวแปรทางจลนศาสตร์ เพื่อที่จะทำนายระยะเวลาของการสิ้นอายุของผลิตภัณฑ์โดยประมาณ เช่นเร่งด้วยอุณหภูมิ การใช้อุณหภูมิสูงเร่งด้วยอุณหภูมิการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น เร่งด้วยแสง เร่งด้วยความชื้น เร่งด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก เร่งด้วยการเขย่า เร่งด้วยการคว่ำขวด ได้แก่

1.1 การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก ประเมินผลทางกายภาพความคงตัวเบื้องต้น โดยวิธี centrifugation method เพื่อดูว่ามีความคงตัวทางกายของผลิตภัณฑ์ที่เป็นปัจจัย หรือตัวบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงไปของผลิตภัณฑ์ที่ทำให้หมดอายุการใช้งาน

1.2 การศึกษาความคงสภาพแบบการเร่งโดยแสง พลังงานแสงอาจเร่งให้เกิดการซีดจาง การเปลี่ยนสี กลิ่นหรือ เกิดปฏิกิริยาเคมี ตัวทำอิมัลชั่น และน้ำมันบางชนิดในสูตรตำรับอาจสลายตัวโดยแสงทำให้อิมัลชันมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม

1.3 การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (heating cooling cycle) โดยเก็บผลิตภัณฑ์เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบทั้งสิ้น 5-8 รอบ เพื่อทำการประเมินความคงตัวทางเคมี การเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ ตัวยาสำคัญมีการเสื่อมสลายเป็นสารขอบเขตที่กำหนดโดยทั่วไป คือ ร้อยละ 10 เป็นวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์ยารูปแบบกึ่งแข็งเพื่อการประเมินความคงตัวทางกายภาพ

2. การศึกษาความคงสภาพแบบระยะยาว (long term studies)

เป็นการศึกษาความคงสภาพ เพื่อที่จะยืนยันถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาที่นำออกจำหน่าย โดยเก็บผลิตภัณฑ์ยาตามสภาวะที่ระบุไว้บนฉลากแล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบเมื่อเริ่มต้นที่ 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 เดือน และทุกปีจนกว่าจะเกินวันสิ้นอายุในอุณหภูมิต่างๆ เช่น 4, 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เพื่อหาความเหมาะสมในการเก็บผลิตภัณฑ์ยา

3. อุณหภูมิห้อง (room temperature)

ประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 31 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 70 ดังนั้นถ้ามีห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นได้ควรกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70 +/- 5%

4. การศึกษาความคงตัวทางเคมี (Chemical Stability)

พิจารณาจากความคงตัวของสารสำคัญ (active ingredients) เช่น จากร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoid) หรือสาระสำคัญ (active ingredients) ที่ออกฤทธิ์อื่นๆ และการศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยพิจารณาจากขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในความเป็นกรด-ด่าง สี กลิ่น และความหนืดตำรับอิมัลชัน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ (2558) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร โดยนำตัวอย่างพืช 100 กรัม สกัดด้วยเอทานอล แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการทดสอบด้วยวิธี DPPH สมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ มากที่สุด คือ โกฐพุงปลา ผลการวิจัยยังพบว่าสารสกัดทั้งหมด 46 ชนิด ในตำรับยาหอมเทพจิตรนั้นสารสกัดจากดอกกานพลู และโกฐพุงปลาสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด และสารสกัดจากดอกกานพลูที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงอาจเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และคณะ (2561) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรกลุ่มอายุวัฒนะ ซึ่งได้นำสมุนไพร 7 ชนิดมาทดสอบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล พบว่าสมุนไพรที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay คือ สารสกัดของน้ำสมอเทศ มีค่า IC_{50} = 0.013 mg/ml และพบว่าสารสกัดน้ำของสมอพิเภกที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay มีค่า FRAP value สูงสุดเท่ากับ 0.99 ± 0.03 mM Fe^{2+} equivalent/mg นอกจากนี้สารสกัดของสมอพิเภกมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 374.42 ± 0.04 mg GAE/1g

เกศิณี เลิศแสงสุวรรณ และวิภาวี รอดจันทร์ (2551) ได้ศึกษาแชมพูสมุนไพรขจัดรังแคโดยการคัดเลือกสมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดรังแคบนหนังศีรษะ ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน ใบชุมเห็ดเทศ เปลือกมังคุด และตะไคร้ ซึ่งนำไปหมักกับแอลกอฮอลล์ 80% แล้วนำไประเหยตัวทำละลายได้เป็นสารสกัดของสมุนไพรแต่ละชนิด แล้วนำมาตรวจสอบสารสำคัญด้วยวิธี โคมาโตกราฟี พบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีสารประกอบหลาย

ชนิดและส่วนใหญ่มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับตรงกับสารมาตรฐาน นำไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดรังแค โดยวิธี Agar Disc Diffusion เปรียบเทียบกับยาต้านรา คีโตโคนาโซล พบว่ามีเพียงน้ำมันตะไคร้เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากนั้นนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยใช้วิธี Broth Dilution พบว่ามีค่าเท่ากับ 31.25 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นแชมพูสมุนไพร โดยตั้งตำรับให้มีความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 3.15% 6.25% 12.5% 25% และ30% โดยน้ำหนัก พบว่าแชมพูทุกตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้

พลอยพรรณ โชติปทุมวรรณ และศศิการนต์ ปัญญาดี (2552) ได้พัฒนาตำรับแชมพูสมุนไพรขจัดรังแคจากน้ำมันตะไคร้ พบว่าน้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดรังแค โดยมีการหาค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้หอมโดยวิธี broth dilution พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.3 µl/ml และตั้งสูตรแชมพูน้ำมันตะไคร้ที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1% 2% 3% 4% และ5% โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บที่สภาวะปกติ 28-30 °C และสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าแชมพูน้ำมันตะไคร้ที่มีสารสกัดเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักมีความคงตัวดีที่สุด และมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และคณะ (2563) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง โดยใช้สมุนไพร 7 อย่าง คือ กะเพรา ข่าหลวง ตะไคร้หอม ผิวมะกรูด ใบมะกรูด ผิวมะนาว และใบมะนาว ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay และthiobarbituric reactive substances (TBARs) assay ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.116±0.040 mg/ml รองลงมาคือ กะเพรา (IC_{50} = 0.349 ± 0.910 mg/ml) และข่าหลวง (IC_{50} = 0.418 ± 0.100 mg/ml) ตามลำดับ และพบว่าตะไคร้หอมมีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ได้มากที่สุด (IC_{50} = 0.537 ± 1.080 mg/ml) เมื่อทดสอบด้วยวิธี TBARs assay รองลงมาคือ ข่าหลวง (IC_{50} = 0.586 ± 0.700 mg/ml) และกะเพราขาว (IC_{50} = 0.724 ± 0.270 mg/ml) ตามลำดับ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังของน้ำมันหอมระเหย พบว่า ตะไคร้หอม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis* และ *Candida albicans* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.98 mg/ml, 1.95 mg/ml และ 0.06-0.12 mg/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาว ผิวมะกรูด และตะไคร้หอม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ได้ดีที่สุด คือมีค่า MIC เท่ากับ 0.12-0.24 mg/ml, 0.24 mg/ml และ 0.49 mg/ml ตามลำดับ

Vittorio Vinciguerra et al. (2017) ได้ศึกษาองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยของ *O. vulgare* L. EO and *T. vulgaris* EO ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS และจากการทดสอบการต้านเชื้อ *Malassezia furfur* 27ชนิด พบว่าสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีค่า MIC อยู่ที่ 450-900 µg/ml โดย *O. vulgare* L. EO and *T. vulgaris* EO มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เหมือนกัน

Amirhossein Alimohammadian and Negin Maleki (2020) ได้ศึกษาผลของการต้านเชื้อราของมะกอกต่อเชื้อ *Malassezia furfur* โดยพบว่าน้ำมันมะกอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยการทดสอบของสารสกัดมะกอกซึ่งมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* และเมื่อทดสอบโดยเพิ่มสารสกัดมะกอกจากเมทานอลเพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้สามารถยับยั้งได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางขอบเขตในการยับยั้งของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีผลต่อการยับยั้งมากสุด

V. Prabhu et al. (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านรังแคของ *Cassia auriculata* และ *Cassia alata* ที่มีกรดไขมันในการยับยั้ง *Malassezia furfur* ซึ่งพบว่าความอ่อนแอของ *Malassezia furfur* ต่อกรดไขมันมีผลต่อการเกิดรังแค โดยการใช้สารสกัดเอทานอลจากดอก *C. auriculata* และ *C. alata* ในการทดสอบและพัฒนาเป็นแชมพูสมุนไพร จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี GC-MS พบว่า สารสกัดจากดอกของ *C. auriculata* และ *C. alata* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งที่ 50 และ 88 µm ของคลอโรฟอร์ม ตามลำดับ และสารสกัดจากดอกของ *C. auriculata* และ *C. alata* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งที่ 75 และ 70 µm ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แชมพูขจัดรังแคจากดอกของ *Cassia auriculata* และ *Cassia alatathrough* สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* ได้ดี

Madhur Kulkarni et al. (2020) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเจลจากสารสกัดของใบลูกซัด (Fenugreek) ในการยับยั้ง *Malassezia furfur* แล้วนำไปพัฒนาเป็นเจลจากสารสกัดใบลูกซัด เพื่อรักษาโรคผิวหนัง โดยการใช้สารสกัดจากเอทานอลของลูกซัดในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งพบว่ายังสามารถยับยั้งเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้ เช่น *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีปริมาณของสารเฟลโวนอยด์ที่มีมากที่สุด นอกจากนั้นยังมีอัลคาลอยด์ ซาโปนิน คาร์โบไฮเดรต ฟีนอล และโปรตีน ซึ่งจากสูตรของเจลจากลูกซัดใช้สารสกัด 30% และใช้ sodium alginate เป็นสารก่อเจล แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *Malassezia furfur* และทดสอบทางเคมีและกายภาพเป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งไม่พบการระคายเคืองหรือการแพ้ในกระต่ายสายพันธ์นิวซีแลนด์ ดังนั้นสูตรเจลจากสารสกัดของใบลูกซัด จึงสามารถใช้ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* และยังมีความปลอดภัยในการนำไปใช้

Dolih Gozali et al. (2019) ได้ศึกษาแชมพูขจัดรังแคที่มีสารออกฤทธิ์ของสารสกัดกระหล่ำ *Brassica oleracea var capitata* L. ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งพบว่ายิ่งมี

การเพิ่มสารสกัดของกระหล่ำ *Brassica oleracea var capitata* L. มากเท่าไหร่ยิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากยิ่งขึ้น โดยได้ทดสอบทำแชมพูโดยใช้สารกัดในปริมาณ 15% 30% และ 45% แล้วนำไปประเมินสี กลิ่น ความหนืด ค่า pH และความคงตัวของแชมพูเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรที่ใช้สารกัดในปริมาณ 45% มีการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และความหนืดที่ลดลง โดยสรุปได้ว่าแชมพูที่มีส่วนผสมของสารสกัดของกระหล่ำ *Brassica oleracea var capitata* L. ในปริมาณ 15% เป็นสูตรที่ดีที่สุด และสูตรของแชมพูที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 45% ไม่เหมาะกับการนำไปพัฒนาเป็นแชมพู

Blake E. Vest and Kevin Krauland (2020) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ *Malassezia furfur* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม monophyletic genus มักพบบริเวณผิวหนังของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งขึ้นอยู่กับไขมันเป็นองค์ประกอบ และเป็น 80% ของเชื้อราในผิวหนังมนุษย์ โดย *Malassezia furfur* มักพบมากในผู้ที่มีปัญหาความผิดปกติของผิวหนังและมีสาเหตุจากหลายประการเช่น โรคผิวหนังอักเสบ สิวเชื้อรา Ponyriasis versicolor (PV) และยังมีหลักฐานที่ชี้ชัดว่า *Malassezia furfur* อาจนำไปสู่โรคอื่นๆ เช่น โรคภูมิแพ้ผิวหนัง และโรคสะเก็ดเงิน ทั้งนี้การลดจำนวนเชื้อด้วยสารต้านเชื้อรา อาจนำไปสู่การปรับสภาพผิวในผู้ป่วยบางคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งอาจนำไปสู่การฉวยโอกาสและทำให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนังอย่างรุนแรงได้ ซึ่งนักวิจัยได้ค้นพบยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับ PV ในช่วงต้นปีพศ. 2389 และตั้งชื่อว่า *Malassezia furfur* ในปีพ.ศ.2396 ต่อมา *Malassezia furfur* 17 ชนิดได้ถูกแยกออกจากผิวหนังมนุษย์และสัตว์

Kumaresh Pal and Chowdhury Habibur Rahaman (2015) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางพฤกษเคมีที่มีปริมาณฟีนอลิกสารสำคัญ เช่น คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอย รวมทั้งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระดูกไก่ดำ ด้วยวิธี DPPH โดยการสกัดใบกระดูกไก่ดำด้วยตัวทำละลายเมทานอลโดย พบว่า สารสกัดใบกระดูกไก่ดำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 75 µg/ml ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และจะต้องมีการตรวจสอบในทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมเพื่อกำหนดมาตรฐานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Jayashree P. Gadade and Swaroopa A. Pati (2019) ได้ศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของอัคคีทวาร ซึ่งจากการตรวจสอบสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ โดยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล คลอโรฟอร์ม และไอโซอะมิล ซึ่งจากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากรากของอัคคีทวารมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด 34.3 ± 0.05 mg GAE/g FW และยังมีปริมาณสารเฟลโวนอยด์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากเมทานอลของรากมีค่าเท่ากับ 13.8 ± 0.01 mg RE/g FW ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากส่วนของใบและรากด้วยวิธี 2,2 diphenyl-1-picrylhydazyl (DPPH), Ferrous Ion Chelating activity (FICA), Superoxide Anion Scavenging (SOAS), Phosphomolybdenum reduction power (PMo) และ Ferric Reducing antioxidant power (FRAP) assay ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิก (PMo R2 = 0.433 และ FICA, R2 =

0.326 ทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ) ซึ่งในรากมีความสัมพันธ์กับฟีนอลิกทั้งหมด (FICA, R2 = 0.798, DPPH, R2 = 0.717, FRAP, R2 = 0.551, PMo, R2 = 0.500 ค่าทั้งหมดมีนัยสำคัญ) ในใบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณเฟลโวนอยด์ทั้งหมด (PMo, R2 = 0.445 อย่างมีนัยสำคัญ) ในรากมีความสัมพันธ์กับปริมาณเฟลโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ (DPPH, R2 = 0.532, FICA, R2 = 0.840, FRAP, R2 = 0.571)

Angela E. Peter et al. (2016) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดเปลือกแคแสดจากสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ถูกนำมาและผ่านการวิเคราะห์ทางพฤกษเคมีเบื้องต้นดำเนินการโดยโปรโตคอลมาตรฐาน แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของสารประกอบทางชีวเคมีหลายชนิด เช่น ไฟโตสเตอรอล ไตรเทอร์พีน ไกลโคไซด์ ซาโปนิน เฟลโวนอยด์ แทนนิน คาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ และน้ำมัน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสามได้รับการประเมินโดยใช้ DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิล โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวควบคุม สารสกัดเอทานอลและเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 93.6 µg และ 166.0 µg และสารสกัดทั้งสามได้รับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยมี Rifampicin เป็นยามาตรฐาน สารสกัดเอทานอลและเอทิลอะซิเตทแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีต่อจุลชีพทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aerogenosa* และ *Bacillus pumulis & Bacillus subtilis*

จรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด และคณะ (2563) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อ *Malassezia pachydermatis* จากการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยพลูมีส่วนประกอบหลัก คือ eugenol ในสัดส่วนร้อยละ 32.82 ซึ่งน้ำมันหอมระเหยของพลูยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (MIC) เท่ากับ 0.66 µg/ml และมีค่าการยับยั้ง (MFC) อยู่ในช่วง 0.66-1.32 µg/ml มีฤทธิ์ในการทำลายต่อหน่วยเวลาที่ความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC มีฤทธิ์สูงสุด รองลงมา คือ 4 เท่าของค่า MIC ซึ่งทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99 และร้อยละ 90 ที่เวลา 30 นาที ตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นวิจัยเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร แล้วนำมาเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด จากนั้นนำไปพัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยผู้วิจัยดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนที่ 1 สมุนไพรและส่วนที่ใช้ และจุลชีพที่นำมาทดสอบ
2. ขั้นตอนที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
3. ขั้นตอนที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง
4. ขั้นตอนที่ 4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนที่ 1 สมุนไพรและส่วนที่ใช้ และจุลชีพที่นำมาทดสอบ

1. กระดูกไก่ดำ *Justicia gendarussa* Burm.f. วงศ์ ACANTHACEAE ส่วนที่ใช้ คือใบและลำต้น สถานที่เก็บ วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก จังหวัดนนทบุรี ช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม 2563 ผ่านการตรวจ สอบทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช และได้ดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช หมายเลข BK No.082195

2. แคแสด *Spathodea campanulata* P.Beauv. วงศ์ BIGNONIACEAE ส่วนที่ใช้ คือ เปลือก สถานที่เก็บ วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก จังหวัดนนทบุรี ช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม 2563 ผ่านการตรวจ สอบทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช และได้ดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช หมายเลข BK No.082198

3. พิลังกาสา *Ardisia elliptica Thunb.* วงศ์ PRIMULACEAE ส่วนที่ใช้ คือ เปลือก สถานที่เก็บ วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก จังหวัดนนทบุรี ช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม 2563 ผ่านการตรวจ สอบทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช และได้ดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช หมายเลข BK No.082196

4. พลู *Piper betle* L. วงศ์ PIPERCEAE ส่วนที่ใช้ คือ ใบ สถานที่เก็บ กลุ่มสมุนไพรบ้านดงบัง จังหวัดปราจีนบุรี ช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม 2563 ผ่านการตรวจ สอบทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช และได้ดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช หมายเลข BK No.082197

5. อัคคีทวาร *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb. วงศ์ LAMIACEAE ส่วนที่ใช้ คือ ใบ สถานที่เก็บ กลุ่มสมุนไพรบ้านดงบัง จังหวัดปราจีนบุรี ช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม 2563 ผ่านการตรวจ สอบทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช และได้ดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช หมายเลข BK No.082194

6. เชื้อราที่ก่อให้เกิดเกลื้อนและรังแค คือ *Malassezia furfur*

ขั้นตอนที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, SGE, Model: GE-GEN2, Bangkok, Thailand)

1.2 เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum pump, Greentech Plus Co.,Ltd., Model: NANA-103588, Bangkok, Thailand)

1.3 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator with Heating Bath, Model: Hel-VAP (EU), Heidolph, Schwabach, Germany)

1.4 อ่างอังไอน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Constant Temperature Water-bath, Model: WTB 15, Memmert GmbH, Germany)

1.5 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic Analytical Balance, Model: E02140, Ohaus, USA)

1.6 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator, Memmert, Model: IN110, Schwabach, Germany)

1.7 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader, Perkin Elmer®, Emsight 3400, Massachusetts, American)

1.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer, Model: Vortex Genie-2, Becthai Bangkok Equipment & Chemical, Bangkok, Thailand)

1.9 เครื่องบดยาสมุนไพร (Chase Mill, Model: BY730, Chorpiwat, Bangkok, Thailand)

1.10 เครื่องให้ความร้อน (Hotplate with Magnetic Stirrer, Model: Stuart US152, Stuart, USA)

1.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugen, Hettich MIKRO 220R, Andreas Hettich Gmbh & Co. KG, 78532 Tuttlingen, Germany)

1.12 เครื่องเขย่าด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath, DT 255H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Heinrichstraße 3-4 12207 Berlin, Germany)

1.13 เครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโฟโตรมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer, Perkin Elmer®, Lambda 365, Massachusetts, American)

2. อุปกรณ์

2.1 กระดาษกรอง (Whatman®)

2.2 บีกเกอร์ (Beaker) (PYREX®)

2.3 ปากคีบผ่าตัด (Mira)

2.4 จานเพาะเชื้อ (Plate) (Gongdong®)

2.5 หลอดทดลอง (Test tube) (PYREX®)

2.6 สไลด์(slide)

2.7 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.9 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5, และ 10 มิลลิลิตร

2.10 กรวยกรอง (Buchner funnel)

2.11 ขวดรูปชมพู่ (Flask)

2.12 ปากคีบ (Forcep)

2.13 Auto pipette (Eppendorf)

2.14 Autopipette tip (AXYGEN®)

2.15 Microtiter plate 96 wells (Nunc®)

3. สารเคมี

3.1. 20% tween 20 (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.2. 95% ethanol (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.3. 70% alcohol (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.4. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile distilled water)

3.5. 0.85% NaCl (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.6. SABOURAUD-4 % dextrose agar (SDA) (HiMedia®, M&P IMPEX, Bangkok, Thailand)

3.7. SABOURAUD-2 % dextrose broth (SDB) (HiMedia®, M&P IMPEX, Bangkok, Thailand)

3.8. น้ำมันมะกอก (Siribuncha, Bangkok, Thailand))

3.9. Ketoconazole (Kino tablets, B.M.PHARMACY CO.,LTD., Bangkok, Thailand)

3.10 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (SIGMA-ALDRICH, Bangkok, Thailand)

3.11 Ascorbic acid (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.12 FRAP reagent (SIGMA-ALDRICH, Bangkok, Thailand)

3.13 Acetate buffer (SIGMA-ALDRICH, Bangkok, Thailand)

3.14 $FeCl_3.6H_2O$ (SIGMA-ALDRICH, Bangkok, Thailand)

3.15 TPTZ (SIGMA-ALDRICH, Bangkok, Thailand)

3.16 HCl (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.17 Texapon N-70 (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.18 EDTA (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.19 ABC 45% (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.20 Comperlan KD (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.21 Glycerine (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.22 DMDM hydantoin (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

3.23 25% NaCl (Chemipan Corporation, Bangkok, Thailand)

ขั้นตอนที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ชนิดได้แก่

1.1 กระดูกไก่ดำ (ใบและต้นสด) เก็บจากอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี เดือนพฤษภาคม 2563

1.2 แคแสด (เปลือกสด) เก็บจากอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี เดือนพฤษภาคม 2563

1.3 พิลังกาสา (เปลือกสด) เก็บจากอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี เดือนพฤษภาคม 2563

1.4 พลู (ใบสด) เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี เดือนพฤษภาคม 2563

1.5 อัคคีทวาร (ใบสด) เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี เดือนพฤษภาคม 2563

2. การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมัก Maceration ดัดแปลงจากวิธีของ สุณิสา ทองขาว และคณะ (2561)

2.1 นำตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ (ใบและต้นสด) แคแสด (เปลือกสด) พิลังกาสา (เปลือกสด) พลู (ใบสด) และอัคคีทวาร (ใบสด) ล้างให้สะอาดด้วยน้ำสะอาด 3 รอบ และนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (ใบอบที่อุณหภูมิ 45°C และเปลือกอบที่อุณหภูมิ 55°C) จากนั้นนำไปบดหยาบ แล้วหมักกับ 95% เอทานอล ในอัตราส่วนสมุนไพร 200 กรัมต่อ 95% เอทานอล 800 มิลลิลิตร (1:4) เป็นเวลา 7 วัน (เขย่าขวดที่หมักทุกวัน) และนำไปกรองโดยเครื่องดูดสูญญากาศ (vacuum pump)

2.2 นำไปทำให้สารสกัดหยาบเข้มข้น โดยการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 °C ซึ่งเครื่องจะระเหยตัวทำละลายออกจากสารสำคัญ แล้วนำสารสกัดที่ยังคงเหลือตัวทำละลายไประเหยต่อด้วยอ่างอังไอน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 70° C จนได้สารสกัดที่มีน้ำหนักคงที่ หา %yield ดังสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละของสารสกัดที่ได้} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักสมุนไพร}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) ดัดแปลงจากวิธีของ บัณฑวรรณ ธุระพระ และคณะ (2559)

3.1 การทดสอบสารมาตรฐาน Ascorbic acid

3.1.1 เตรียมสารละลาย Methanolic DPPH radical ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 0.0039 g ละลายใน methanol 50 ml ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 ml

3.1.2 เตรียม stock Ascorbic acid ความเข้มข้นที่ 300 µg/ml ชั่ง Ascorbic acid 0.0015 g ละลายใน methanol 5 ml

3.1.3 ทำการเจือจางสารมาตรฐาน Ascorbic acid จากข้อ 3.1.2 ให้ได้ความเข้มข้น 25, 20, 15, 10, 5 µg/ml

3.1.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่เตรียมได้ ในข้อ 3.1.3 มาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate A_1-A_5, B_1-B_5, C_1-C_5 ตามลำดับ แล้วเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว A_1-A_5, B_1-B_5, C_1-C_5 ตามลำดับ

3.1.5 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่เตรียมได้ ในข้อ 3.1.3 มาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate D_1-D_5, E_1-E_5, F_1-F_5 ตามลำดับ แล้วเติม methanol 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว D_1-D_5, E_1-E_5, F_1-F_5 ใช้เป็น blank sample

3.1.6 ปิเปตสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate G_1-G_3 methanol 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว G_1-G_3 ใช้เป็นกลุ่ม control

3.1.7 ปิเปต methanol 200 ไมโครลิตร ลงที่แถว H_1-H_3 ใช้เป็น blank control

3.1.8 นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหา DPPH radical scavenging (%) จากสูตร

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = \frac{[(A_{control} - A_{blank\ control}) - (A_{sample} - A_{blank\ sample})] \times 100}{(A_{control} - A_{blank\ control})}$$

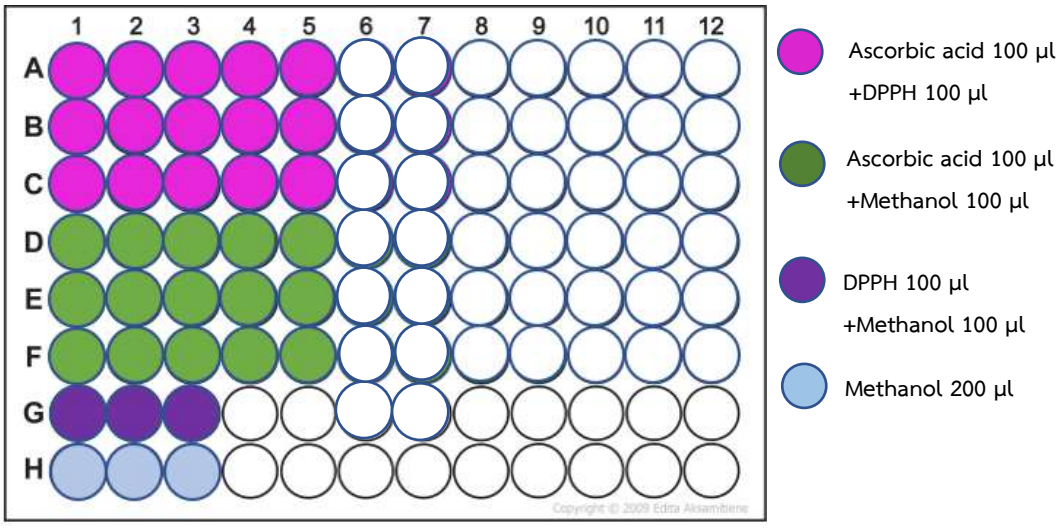
เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ผสมกับ Methanol

$A_{blank\ control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methanol

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับ DPPH

$A_{blank\ sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับ Methanol

3.1.9 นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟ ระหว่าง log ความเข้มข้น กับ DPPH radical scavenging (%) เพื่อหาค่า IC_{50}



ภาพที่ 3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

3.2 การทดสอบสารสกัดสมุนไพร

3.2.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 0.0039 g ละลายใน methanol 50 ml ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 ml

3.2.2 เตรียม stock สารสกัดสมุนไพร โดยมีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ กระดูกไก่ดำ 1,000 µg/ml, แคแสด 1,000 µg/ml, พลู 100 µg/ml, พิลังกาสา 100 µg/ml และอัคคีทวาร 100 µg/ml โดยชั่งสารสกัดสมุนไพรดังนี้ กระดูกไก่ดำ 0.0050 g, แคแสด 0.0050 g, พลู 0.0005 g, พิลังกาสา 0.0005 g และอัคคีทวาร0.0005 g ละลายใน methanol 5 ml

3.2.3 ทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร จากข้อ 3.2.2 ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ กระดูกไก่ดำที่ความเข้มข้น 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 µg/ml, แคแสดที่ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µg/ml, พลูที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 µg/ml, พิลังกาสาที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 µg/ml และอัคคีทวารที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml

3.2.4 ปิเปตสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 มาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate A_1-A_7, B_1-B_7, C_1-C_7 ตามลำดับ แล้วเติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว A_1-A_7, B_1-B_7, C_1-C_7 ตามลำดับ

3.2.5 ปิเปตสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 มาความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate D_1-D_7, E_1-E_7, F_1-F_7 ตามลำดับ แล้วเติม methanol 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว D_1-D_7, E_1-E_7, F_1-F_7 ใช้เป็น blank sample

3.2.6 ปิเปตสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate G_1-G_3 methanol 100 ไมโครลิตร ลงที่แถว G_1-G_3 ใช้เป็นกลุ่ม control

3.2.7 ปิเปต methanol 200 ไมโครลิตร ลงที่แถว H_1-H_3 ใช้เป็น blank control

3.2.8 นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้ 1 plate ต่อสมุนไพร จากนั้นคำนวณหา DPPH radical scavenging (%) จากสูตร

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = \frac{[(A_{control} - A_{blank\ control}) - (A_{sample} - A_{blank\ sample})] \times 100}{(A_{control} - A_{blank\ control})}$$

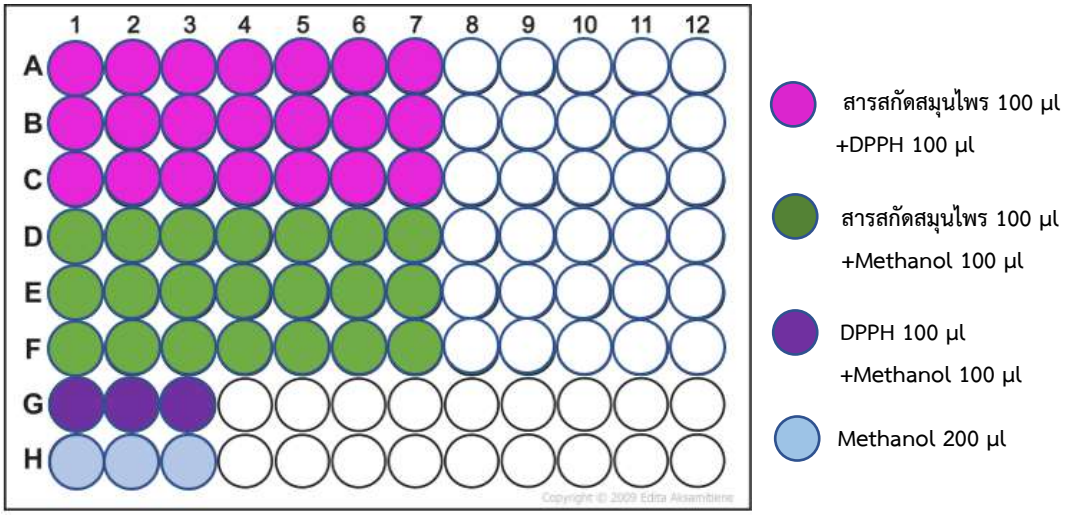
เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ผสมกับ Methanol

$A_{blank\ control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methanol

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับ DPPH

$A_{blank\ sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ผสมกับ Methanol

3.2.9 นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟ ระหว่าง log ความเข้มข้น กับ DPPH radical scavenging (%) เพื่อหาค่า IC_{50}



* แถว 1-7 คือ สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ แถว A, B, C และ D, E, F คือ การทดลอง 3 ซ้ำ

ภาพที่ 3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay ดัดแปลงจากวิธีของ ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และคณะ (2561)

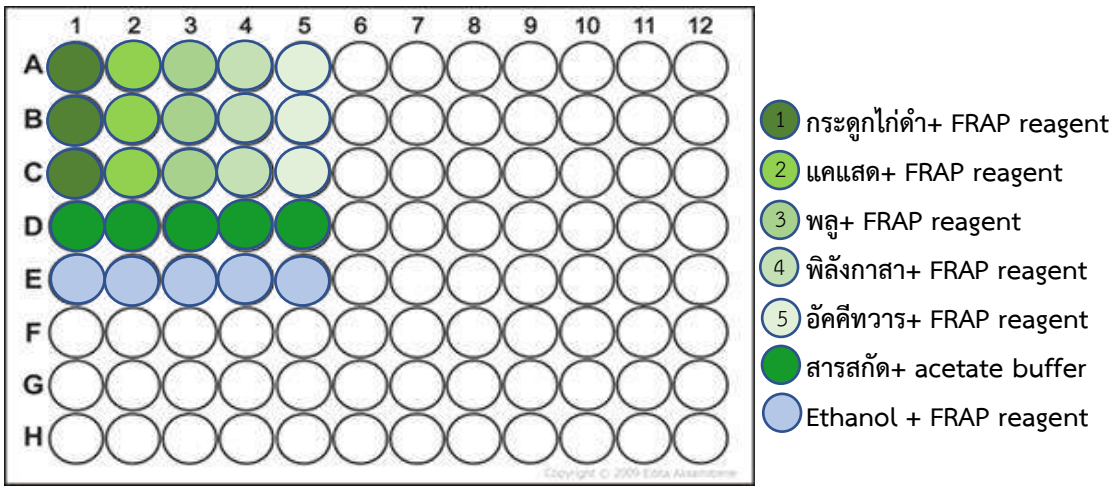
หลักการของสารต้านออกซิเดชัน ที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์ริก [Fe(III)(TPTZ)2] $^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส [Fe(II)(TPTZ)2] $^{2+}$ จากสารละลายสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง ปริมาณของ [Fe(II)(TPTZ)2] $^{2+}$ ที่เกิดขึ้น คือ ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่แสดงผลในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate ($FeSO_4$) เตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 mM acetate buffer pH 3.6 สารละลาย 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ และสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในเอทานอล จากนั้นปิเปตสารตัวอย่างผสมกับ FRAP reagent แสดงส่วนประกอบดังตารางที่ 4.1 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 593 nm (n=3) ตัวอย่างที่เติม acetate buffer เป็น blank และหลอดควบคุม คือ หลอดที่ไม่มีสารสกัด จากนั้นคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสมการ

Absorbance = A – B – C

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวแปรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP

ตัวแปร	ส่วนประกอบ
A (Test sample)	Sample ความเข้มข้น 0.1 mg/ml 20 µl + FRAP reagent 180 µl
B (BlanK)	Sample ความเข้มข้น 0.1 mg/ml 20 µl + acetate buffer 180 µl
C (Control)	Ethanol 20 µl + FRAP reagent 180 µl

จากนั้นคำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate ($FeSO_4$) แสดงค่าในรูปของ มิลลิโมลลาร์สมมูลย์ของ Fe^{2+}/มิลลิกรัมสารสกัด (mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract)



*** แถว A,B,C คือ การทดสอบ 3 ซ้ำ**

ภาพที่ 3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยวิธี disc diffusion method ดัดแปลงจากวิธีของ สุณิสา ทองขาวและคณะ (2561)

5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar ชั่งส่วนผสมที่เป็นผง 65 g ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเขย่าจนเข้ากันดี เอาไปละลายด้วยความร้อนโดยเขย่าภาชนะบ่อยๆ จนกระทั่งเดือดและวุ้นละลายหมด ปิดจุกภาชนะแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C

ความดันไม่เกิน 25 ปอนต์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เอาออกมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 °C ประมาณ 45 นาที จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50 °C จึงจะเอาไปบรรจุในภาชนะเพาะเลี้ยงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด และยามาตรฐาน Ketoconazole โดยวิธี Disc Diffusion Test

5.2.1 การเตรียมเชื้อในการทดสอบ

นำเชื้อ *Malassezia furfur* ที่ใช้ในการทดสอบมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วเอาโคโลนีของเชื้อมาเจือจางในอาหาร Sabouraud Dextrose Broth จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโฟโตรมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.10 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ เท่ากับ 10^5 – 10^7 cell/ml

5.2.2 เตรียมสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลอง

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้มา 800 mg ใส่ขวดไร้เชื้อแล้วเจือจางด้วย 95% Ethanol 1 ml จะได้สารสกัดเข้มข้น 800 mg/ml และทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรู 0.45 µm

5.2.3 เตรียมยามาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง

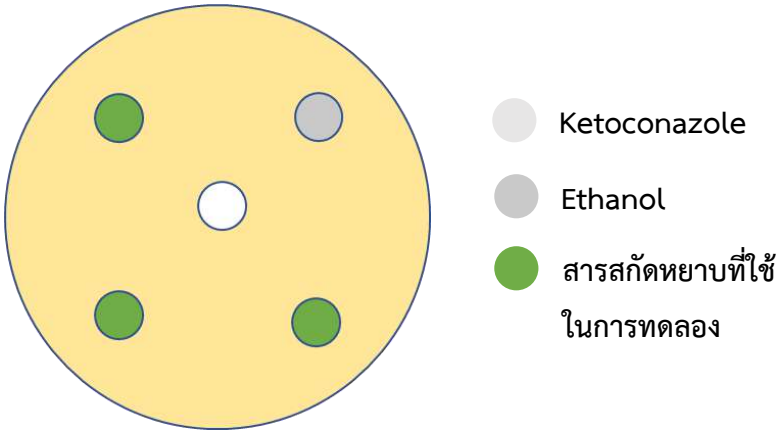
ชั่งน้ำหนักยามาตรฐาน Ketoconazole ที่เตรียมไว้มา 100 mg ใส่ขวดไร้เชื้อ แล้วเจือจางด้วย 95% Ethanol 1 ml จะได้สารสกัดเข้มข้น 100 mg/ml

5.2.4 การทดสอบการยับยั้ง *Malassezia furfur* ของสารสกัดและยามาตรฐาน Ketoconazole

นำไม้พันสำลีชุบเชื้อข้อ 5.2.1 บิดลงหลอดแก้วพอหมาด แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของ Sabouraud Dextrose Agar โดยทำมุม 60 องศา ของ Plate จากนั้นนำสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด 95% Ethanol และยามาตรฐาน Ketoconazole ที่เตรียมไว้ หยดลงไปในแผ่น Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 20 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง แล้วนำ Paper disc มาวางตามตำแหน่งที่กำหนดไม่วางชิดขอบจานมากเกินไป โดยการทดสอบครั้งนี้จะใช้ยามาตรฐาน Ketoconazole เป็นชุดทดลองเชิงบวก (Positive Control) และใช้ 95% Ethanol เป็นชุดทดลองเชิงลบ (Negative Control) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 °C เป็นเวลา 5 วัน

5.2.5 การอ่านผล

อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition โดยใช้ Vernier Caliper วัดใน 3 ทิศทางทำมุมกัน 60 องศา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองและหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 3.4 การทดสอบสารสกัดสมุนไพรและยามาตรฐาน Ketoconazole

6. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth microdilution method ดัดแปลงจากวิธีของ สุณิสา ทองขาวและคณะ (2561)

6.1 การเตรียมเชื้อรา *Malassezia furfur*

การเตรียมเชื้อรา *Malassezia furfur* โดยนำเชื้อรามาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอชดีเอ ชนิดเอียง Sabouraud's dextrose agar (SDA slant) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็งเอสดีเอ ถ่ายเชื้อโดยใช้ลวดถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อมา 1-2 โคโลนี ใส่ในหลอดอาหารเหลวเอสดีบี นำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโฟโตรมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.10 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ เท่ากับ 10^5-10^7 cell/ml

6.2. การเตรียมสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบความเข้มข้นเริ่มต้น โดยชั่งสารสกัดมา 1,600 มิลลิกรัม ละลายใน dimethyl sulfoxide 500 ไมโครลิตร และอาหารเหลวเอสดีบี 1,500 ไมโครลิตร (= 25% DMSO) จะได้ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา MIC ต่อไป

6.3 ขั้นตอนการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth microdilution method

6.3.1 ใช้ 96 well plate ต่อสมุนไพร 1 ชนิด มี 5 แถว 12 คอลัมน์ คือ

แถว A-H โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

6.3.1.1 Negative control (ตัวทำละลาย คือ 25% dimethyl sulfoxide) กำหนดให้เป็นแถวที่ C_1-C_{12}

6.3.1.2 Positive control (กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Ketoconazole) กำหนดให้เป็นแถวที่ A_1-A_6

3.6.1.3 กลุ่มทดลองในความเข้มข้น 12 ความเข้มข้น ของสารสกัด กำหนดให้เป็นแถว D_1-D_{12}, E_1-E_{12}, F_1-F_{12}, G_1-G_{12} และ H_1-H_{12} (ทำซ้ำ 5 ครั้ง)

6.3.2 ทดสอบหาค่า MIC โดยการเจือจางสารสกัดด้วยวิธี 2–fold dilution ด้วยอาหารเหลว (เป็นการเจือจางครั้งละ 2 เท่า) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.097-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 12 ความเข้มข้น ตามตารางที่ 4.2 โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

6.3.2.1 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอสดีบี SDB ที่เตรียมไว้ใส่ใน 96 well plate ทุกหลุมของกลุ่มทดลอง กลุ่ม Positive control และกลุ่ม Negative control หลุมละ 50 ไมโครลิตร

6.3.2.2 ดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมที่ D_1-D_{12}, E_1-E_{12}, F_1-F_{12}, G_1-G_{12} และ H_1-H_{12} โดยจะทำเจือจางสารสกัดด้วยวิธี 2-fold dilution คือ ใช้ micro pipette ผสมอาหารเหลวเอสดีบี SDB และสารสกัดในหลุ่มที่ D_1 ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นและปล่อยลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้สารผสมกัน จากนั้นดูดสารละลายจากหลุม D_1 ออกมา 50 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุ่ม D_2 ผสมสารให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายในหลุ่ม D_2 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุ่ม D_3 ทำซ้ำเช่นนี้ ต่อไปเรื่อยๆ จนถึงหลุมสุดท้าย คือ หลุม D_{12} ผสมสารให้เข้ากันแล้วดูดสารละลาย ในหลุม D_{12} ทิ้งไป 50 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.097-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยในหลุม E_1-E_{12}, F_1-F_{12}, G_1-G_{12} และ H_1-H_{12} ทำเช่นเดียวกับหลุม D_1-D_{12})

6.3.2.3 ดูดตัวทำละลาย คือ 25% dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของกลุ่ม Negative control คือ แถวที่ C_1-C_{12} (ซึ่งมีอาหาร 50 ไมโครลิตร) และทำการเจือจางด้วยวิธี 2-fold dilution ทำเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง

6.3.2.4 นำสารแขวนลอยเชื้อรา *Malassezia furfur* ที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมกลุ่มทดลอง กลุ่ม Positive control (กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Ketoconazole) และกลุ่ม Negative control (ตัวทำละลาย คือ 25% dimethyl sulfoxide) หลุมละ 50 ไมโครลิตร (ต้องเปลี่ยนปิเปตทิปทุกครั้ง) จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วสังเกตผลการทดสอบ

ตารางที่ 3.2 แสดงการทดสอบ หาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution method

No.	Medium added (µl)	Herb solution added	Diluted culture Added (µl)	Final vol. (µl)	Final conc. (mg/ml)
1	50	50 µl.working sol.	50	100	200.00
2	50	50 µl.working No.1	50	100	100.00
3	50	50 µl.working No.2	50	100	50.00
4	50	50 µl.working No.3	50	100	25.00
5	50	50 µl.working No.4	50	100	12.50
6	50	50 µl.working No.5	50	100	6.25
7	50	50 µl.working No.6	50	100	3.125
8	50	50 µl.working No.7	50	100	1.562
9	50	50 µl.working No.8	50	100	0.781
10	50	50 µl.working No.9	50	100	0.391
11	50	50 µl.working No.10	50	100	0.195
12	50	50 µl.working No.11	50	100	0.097

*หมายเหตุ: ปิเปตสารละลาย 50 ไมโครลิตร จากหลุมที่ 12 ทิ้ง

6.3.3 การอ่านค่า

เปรียบเทียบความขุ่นของสารละลายในกลุ่มทดลอง และกลุ่มทดลองซ้ำ กลุ่ม positive control (กลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Ketoconazole) ถ้าสารละลายของกลุ่มทดลอง และกลุ่มทดลองซ้ำขุ่นกว่าสารละลายกลุ่ม positive control ซึ่งมีลักษณะใสแสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Malassezia furfur* ในสารละลายนั้น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดในหลุมทดลองนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Malassezia furfur* ได้ ถือว่าความเข้มข้นของสารสกัดหลุมสุดท้ายที่ใส คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Malassezia furfur* ได้

7. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) ดัดแปลงจากวิธีของ สุณิสา ทองขาวและคณะ (2561)

7.1 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย 10 ไมโครลิตร จาก 96 well plant ในกลุ่มทดลองและกลุ่ม positive control ที่ใช้ในการทดลองหาค่า MIC (หลุมที่ใส) มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอสดีเอ SDA ในจานเพาะเชื้อ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่ม control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วสังเกตผลการทดสอบ

7.2 สังเกตการเจริญของเชื้อรา *Malassezia furfur* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA โดยถือว่าตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MFC) จะไม่มีเชื้อรา *Malassezia furfur* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

8. การตั้งตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

การพัฒนาตำรับแชมพูที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร เป็นการพัฒนาโดยการคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด โดยดูจากค่า MIC จากนั้นจึงนำสารสกัดสมุนไพรมาทำการพัฒนาแชมพูทั้งหมด 3 ตำรับ โดยใช้ส่วนผสมของสารสกัดในความเข้มข้น 1 เท่า 3 เท่า และ 5 เท่าของค่า MIC ในตำรับแชมพูที่ 2, 3 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 เป็นแชมพูพื้นฐาน ซึ่งแสดงส่วนประกอบดังตารางที่ 4.3 จากนั้นนำแชมพูแต่ละตำรับที่พัฒนาได้ไปศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะเร่ง โดยวิธี Heating/cooling cycle นาน 6 รอบ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Malassezia furfur* ทั้งก่อน และหลัง ในการเก็บสภาวะเร่ง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

8.1 คำนวณปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการตั้งตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

8.2 ชั่งน้ำหนักของส่วนประกอบในตำรับตามอัตราส่วนที่กำหนด

8.3 อุ่น DI Water ให้ได้ที่อุณหภูมิ 70 °C

8.4 ละลาย EDTA ใน DI Water ผสมให้เข้ากัน

8.5 เติม Texapon n-70, ABC 45% และ Comperlan KD ลงไปตามลำดับจากนั้นละลายให้เข้ากัน

8.6 นำสารละลายมาลดอุณหภูมิให้เหลือ 45 °C จากนั้นเติม Glycerine และ DMDM hydantoin ตามลำดับ

8.7 เติมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 เท่า 3 เท่า และ 5 เท่า ของ MIC ลงในข้อ 8.6 คนให้เข้ากัน

8.8 เติมสารแต่งสี และกลิ่น

8.9 ปรับความหนืด โดยเติมสารละลาย 25% NaCl

8.10 วัดค่า pH ของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ให้อยู่ในช่วง 5-6

8.11 เก็บแชมพูที่ผสมเรียบร้อยแล้วไว้ในขวดภาชนะ เพื่อใช้สำหรับทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงสูตรตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ส่วนประกอบ/ สารสำคัญ	หน้าที่ของ ส่วนประกอบ	ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ (%w/w)	
		แชมพูสมุนไพร (g)	แชมพูพื้นฐาน
สารสกัดสมุนไพร	Active ingredient	1MIC, 3MIC, 5MIC	-
Texapon N - 70	Primary surfactant	14.4	14.4
EDTA	Chelating agent	3	3
ABC45%	Surfactant	3	3
Comperlan KD	Thickener	2	2
Glycerine	Emollient	10	10
DMDM hydantoin	Preservative	1	1
25% NaCl	Thickener	0.1	0.1
สารแต่งกลิ่น	Peppermint oil	0.5	0.5
DI Water	Solvent	qs.100	qs.100

9. การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ภายใต้สภาวะเร่ง Freeze-thaw cycling method

9.1 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ โดยสังเกตลักษณะเนื้อแชมพู การแยกชั้น การตกตะกอน กลิ่น และทดสอบความหนืด

9.2 ประเมินคุณสมบัติทางเคมี โดยการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง

9.3 ประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่สภาวะเร่ง โดยทำ Heating/cooling cycle โดยการเก็บในสภาวะร้อนสลับเย็น จำนวน 6 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ซึ่งตั้งรอบที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ให้ตั้งอุณหภูมิเป็น 45 °C นาน 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ กำหนด 6 รอบ

10. การทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

การทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยนำแชมพูที่ผสมสารสกัดสมุนไพร 1MIC, 3MIC และ 5MIC ไปละลายด้วยเอทานอล ในอัตราส่วนแชมพูต่อเอทานอล 3:1 แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugen) ได้ของเหลวใส จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อ โดยหยดสารสกัด 20 ไมโครลิตร ลงใน paper disc ใช้ Ketoconazole เป็นสารมาตรฐานโดยหยด 20 ไมโครลิตร ลงใน paper disc ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปวางบนอาหารที่มีเชื้อ *Malassezia furfur* บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้วบันทึกผล

ขั้นตอนที่ 4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA, $p<0.05$) และหาคู่แตกต่าง โดยใช้วิธี least significant difference (LSD)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power (FRAP) assay โดยวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA, $p< 0.05$) และหาคู่แตกต่าง โดยใช้วิธี least significant difference (LSD)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสมุนไพร 5 ชนิด คือ กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู พิลังกาสา และอัคคีทวาร จากนั้นคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดมาพัฒนาเป็นแชมพูสมุนไพร และนำแชมพูสมุนไพรที่พัฒนาได้ไปศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะเร่ง โดยวิธี Heating/cooling cycle นาน 6 รอบ และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ทั้งก่อน และหลัง ในการเก็บสภาวะเร่งแสดงผลรายงานการวิจัยจำแนกออกเป็น 8 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ผลการสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

ตอนที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power (FRAP) assay

ตอนที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยวิธี disc diffusion method

ตอนที่ 5 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC)

ตอนที่ 6 ผลการทดสอบทางเคมีและกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ตอนที่ 7 ผลการศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ภายใต้สภาวะเร่ง Freeze-thaw cycling method

ตอนที่ 8 ผลการทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ตอนที่ 1 ผลการสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

จากการสกัดสมุนไพรโดยวิธี Maceration ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ของสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู พิลังกาสา และอัคคีทวาร แล้วหาร้อยละของสารสกัดที่ได้จากสมุนไพร แสดงผลดังตารางที่ 4.1

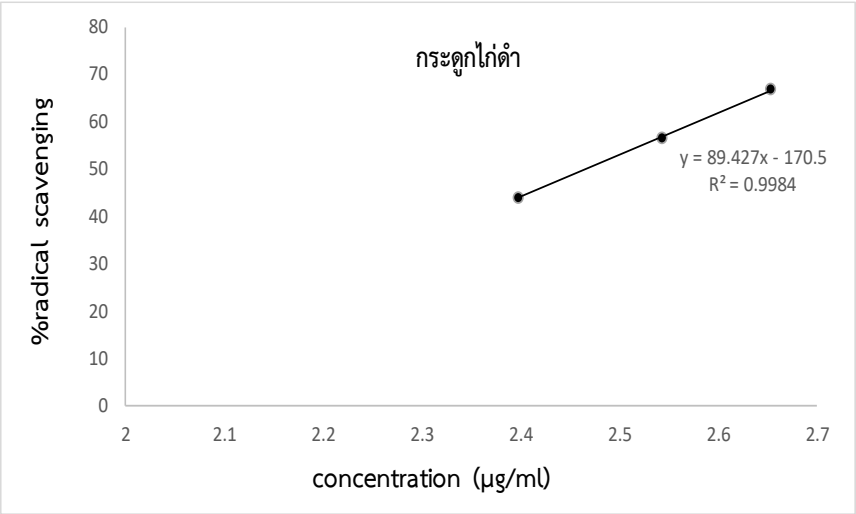
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรแต่ละชนิด

ที่	สมุนไพร	ร้อยละของสารสกัด (%w/w)	ลักษณะสีของสารสกัด
1	กระดูกไก่ดำ	1.36	ดำแกมเขียวเข้ม
2	แคแสด	3.74	ดำแกมเขียวเข้ม
3	พลู	2.57	ดำแกมเขียวเข้ม
4	พิลังกาสา	3.76	น้ำตาลแกมแดง
5	อัคคีทวาร	2.46	ดำแกมเขียวเข้ม

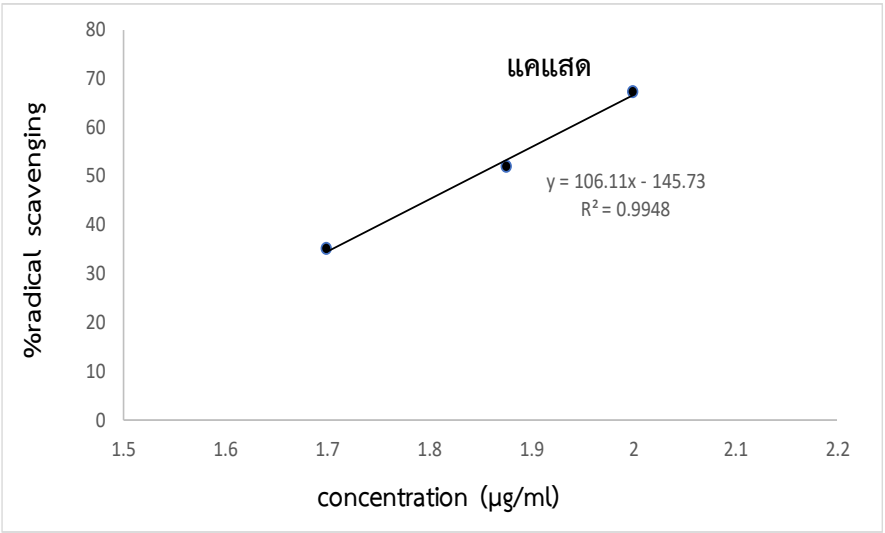
จากตารางที่ 4.1 พบว่า ผลการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอลของสมุนไพร กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู พิลังกาสา และอัคคีทวาร พบว่า สารสกัดจากพิลังกาสามีปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้มากที่สุด คือ ร้อยละ 3.76 โดยน้ำหนักรองลงมา คือ แคแสดร้อยละ 3.74 โดยน้ำหนัก พลูร้อยละ 2.57 โดยน้ำหนัก อัคคีทวารร้อยละ 2.46 โดยน้ำหนัก และกระดูกไก่ดำมีปริมาณสารสกัด เท่ากับร้อยละ 1.36 โดยน้ำหนัก

ตอนที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

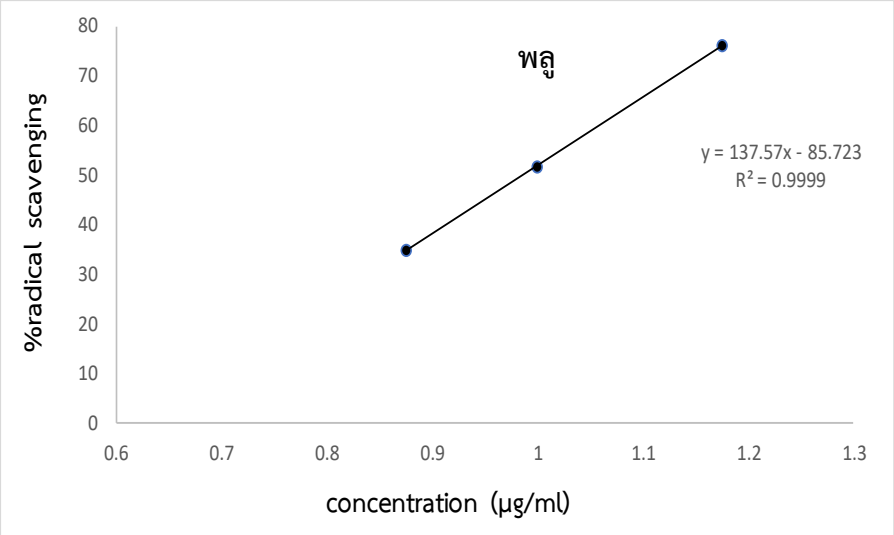
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด โดยนำค่า %radical scavenging ที่ได้ไปพล็อตกราฟกับ log ความเข้มข้นเพื่อหาค่า IC_{50} แสดงผลดังภาพที่ 4.1-4.5 รายละเอียดทั้งหมดแสดงไว้ในภาคผนวก



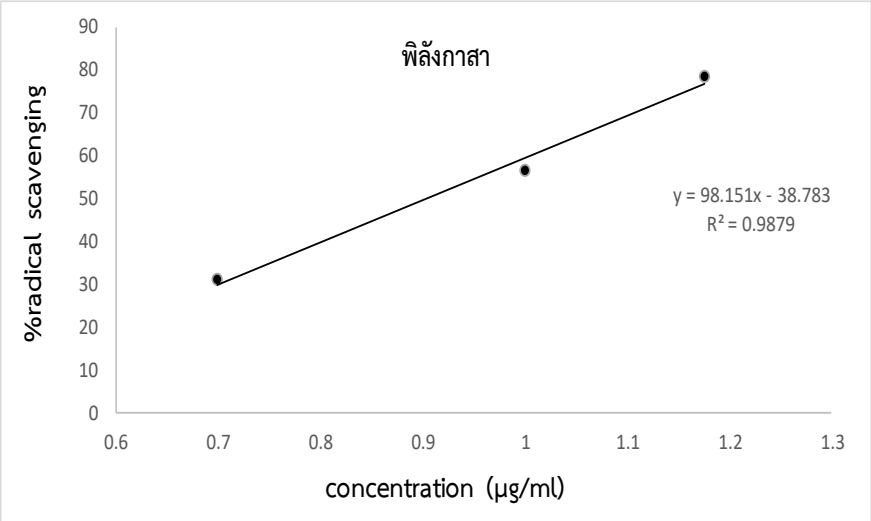
ภาพที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของกระดูกไก่ดำ



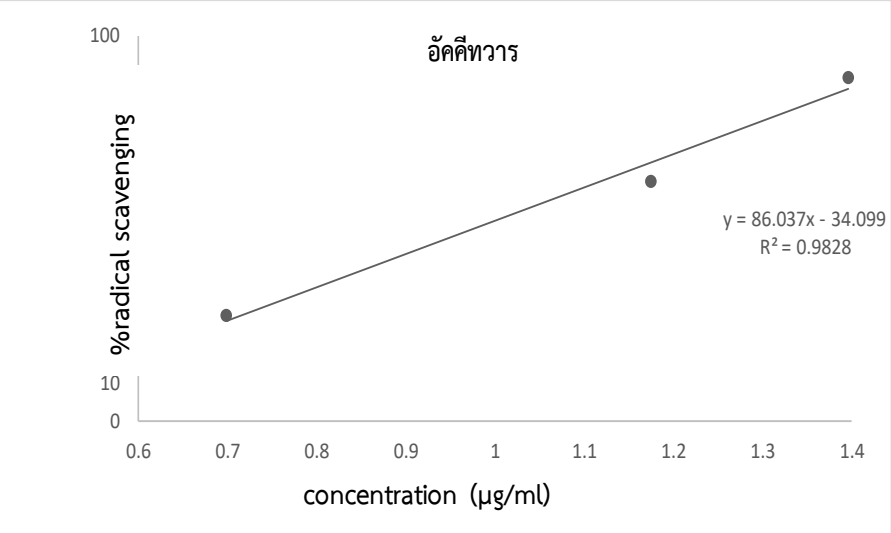
ภาพที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของแคแสด



ภาพที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของพลู



ภาพที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของพิลังกาสา



ภาพที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้นกับ %radical scavenging ของอัคคีทวาร

จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log ความเข้มข้น กับค่า %radical scavenging จากนั้นนำสมการเส้นตรงของกราฟที่ได้มาคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด แสดงผล ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด

สารสกัดสมุนไพร	**IC_{50} (µg/ml), (mean ± S.D., n=3)**			
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ค่าเฉลี่ย**
กระดูกไก่ดำ	301.572	284.179	292.089	292.614 ± 2.187 [e]
แคแสด	74.966	72.853	63.093	70.304 ± 6.334 [d]
พลู	9.370	9.064	9.963	9.466 ± 0.457 [c]
พิลังกาสา	8.264	7.991	7.828	8.028 ± 0.220 [b]
อัคคีทวาร	7.462	9.661	11.836	9.653 ± 2.187 [b,c]
Ascorbic acid	3.643	4.396	4.560	4.200±0.489 [a]

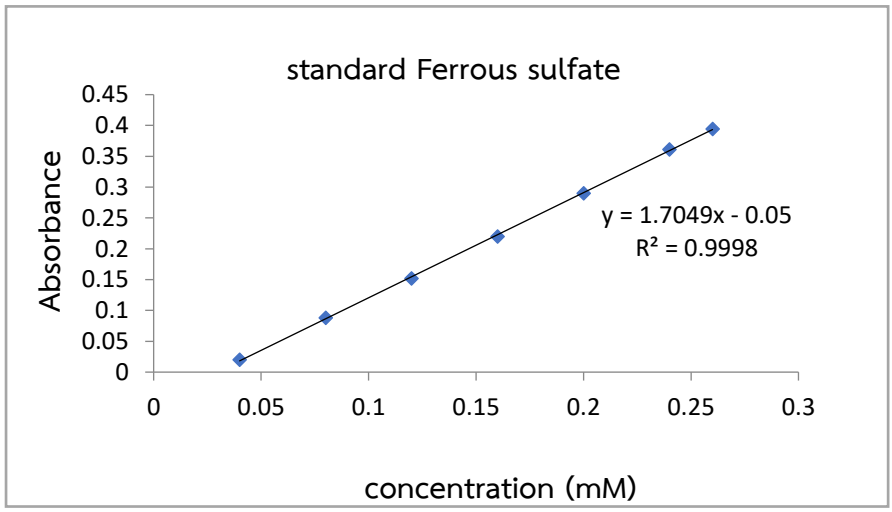
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่าง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากตารางที่ 4.2 พบว่า การหาค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่งของอนุมูลอิสระ DPPH ทั้งหมด (IC_{50}) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ผลการทดสอบพบว่า สารสกัด

แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดพิลังกาสาแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.028 ± 0.220 µg/ml รองลงมา คือ สารสกัดพลู อัคคีทวาร แคแสด และกระดูกไก่ดำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.466 ± 0.457, 9.653 ± 2.187, 70.304 ± 6.334 และ 292.614 ± 2.187 µg/ml ตามลำดับ ส่วน Ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.200±0.489 µg/ml และพบว่า สารสกัดกระดูกไก่ดำ แคแสด และอัคคีทวารมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระแตกต่างจาก Ascorbic acid (4.200±0.489 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตอนที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร โดยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay

จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate และค่าการดูดกลืนแสง ได้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Correlation coefficient ; R^2) มีค่า Correlation coefficient ; (R^2) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง (R^2 มีค่าเข้าใกล้ 1) ดังนั้นสามารถใช้กราฟมาตรฐานนี้ในการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง



ภาพที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ด้วยวิธี FRAP assay

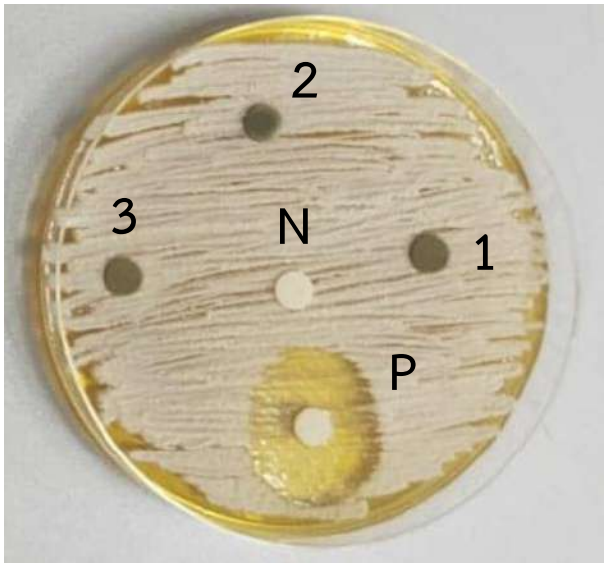
สารสกัดสมุนไพร	FRAP value (mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
กระดูกไก่ดำ	0.252	0.284	0.299	0.278 ± 0.023 [a]
แคแสด	0.290	0.290	0.290	0.290 ± 0.000 [a]
พลู	0.669	0.721	0.748	0.713 ± 0.040 [b]
พิลังกาสา	2.223	2.551	2.551	2.442 ± 0.190 [c]
อัคคีทวาร	1.308	1.355	1.349	1.337± 0.025 [d]

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่าง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากตารางที่ 4.3 พบว่า การทดสอบความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์ริก[Fe(III)(TPTZ)2] $^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส [Fe(II)(TPTZ)2] $^{2+}$ ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดแต่ละชนิดมีความสามารในการให้อิเล็กตรอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดพิลังกาสามีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนสูงที่สุด (ค่า Fe^{2+}equivalent สูงที่สุด) มีค่าเท่ากับ 2.442 ± 0.190 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract แสดงผลดังตารางที่ 4.3 รองลงมา คือ สารสกัดอัคคีทวาร พลู และ แคแสด คือ มีค่าเท่ากับ 1.337 ± 0.025, 0.713 ± 0.040 และ 0.290 ± 0.000 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract ตามลำดับ ส่วนกระดูกไก่ดำมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนน้อยที่สุด (ค่า Fe II equivalent น้อยที่สุด) มีค่าเท่ากับ 0.278 ± 0.023 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract

ตอนที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยวิธี disc diffusion method

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ (ต้นและใบ) แคแสด (เปลือก) พลู (ใบ) พิลังกาสา (เปลือก) และอัคคีทวาร (ใบ) โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1,000 mg/ml พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเฉลี่ย ดังภาพที่ 4.7-4.11 และแสดงผลดังตารางที่ 4.4 ดังนี้



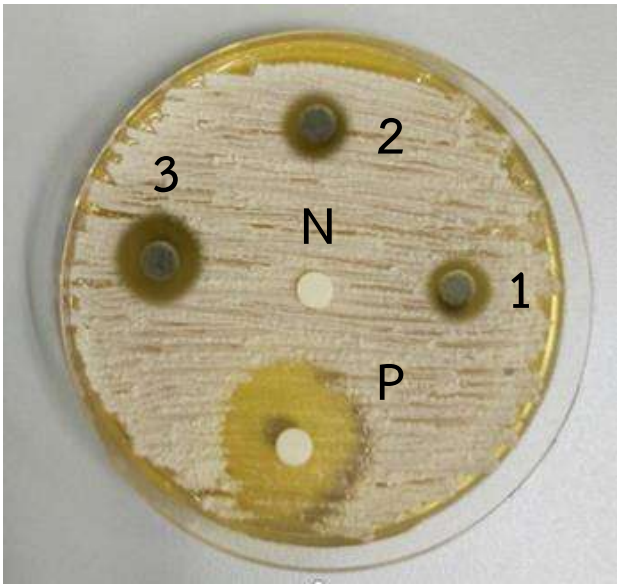
ภาพที่ 4.7 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดกระดูกไก่ดำที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สารสกัดกระดูกไก่ดำ ความเข้มข้น 600 mg/ml

2 = สารสกัดกระดูกไก่ดำ ความเข้มข้น 800 mg/ml

3 = สารสกัดกระดูกไก่ดำ ความเข้มข้น 1,000 mg/ml



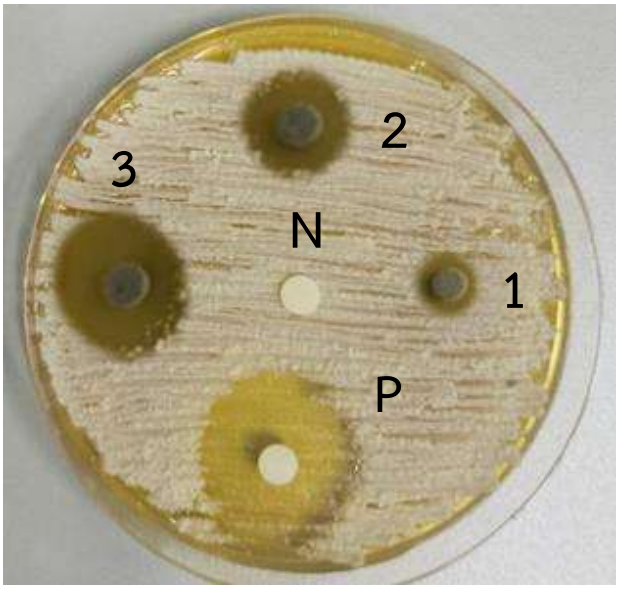
ภาพที่ 4.8 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดแคแสดที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สารสกัดแคแสด ความเข้มข้น 600 mg/ml

2 = สารสกัดแคแสด ความเข้มข้น 800 mg/ml

3 = สารสกัดแคแสด ความเข้มข้น 1,000 mg/ml



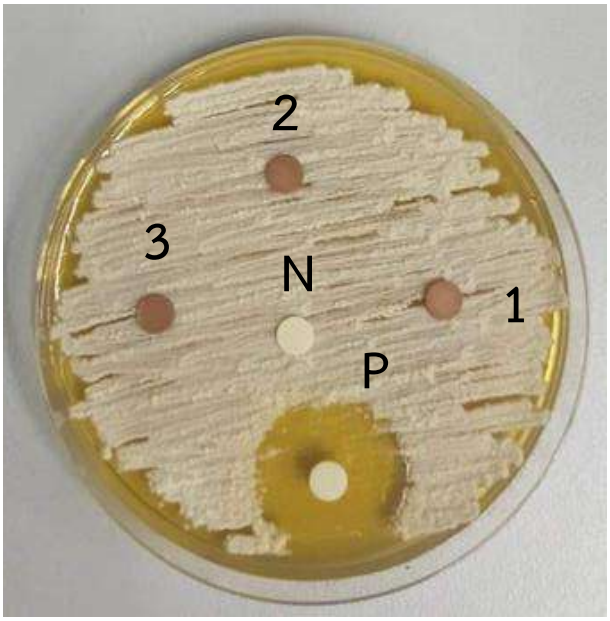
ภาพที่ 4.9 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดพลูที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สารสกัดพลู ความเข้มข้น 600 mg/ml

2 = สารสกัดพลู ความเข้มข้น 800 mg/ml

3 = สารสกัดพลู ความเข้มข้น 1,000 mg/ml



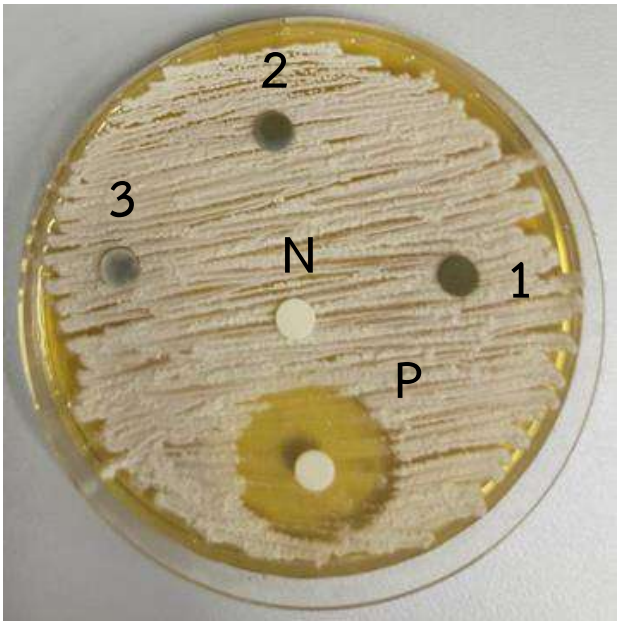
ภาพที่ 4.10 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดพิลังกาสาที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สารสกัดพิลังกาสา ความเข้มข้น 600 mg/ml

2 = สารสกัดพิลังกาสา ความเข้มข้น 800 mg/ml

3 = สารสกัดพิลังกาสา ความเข้มข้น 1,000 mg/ml



ภาพที่ 4.11 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของสารสกัดอัคคีทวารที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สารสกัดอัคคีทวาร ความเข้มข้น 600 mg/ml

2 = สารสกัดอัคคีทวาร ความเข้มข้น 800 mg/ml

3 = สารสกัดอัคคีทวาร ความเข้มข้น 1,000 mg/ml

ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด

สารสกัดสมุนไพร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (mm)		
	ความเข้มข้น 600 mg/ml	ความเข้มข้น 800 mg/ml	ความเข้มข้น 1,000 mg/ml
กระดูกไก่ดำ	6	6	6
แคแสด	8	8	10
พลู	8	15	17
พิลังกาสา	7	7	7
อัคคีทวาร	7	7	7

หมายเหตุ ขนาด disc = 6 มม

Positive Control = Ketoconazole 100 mg/ml มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (mm) เท่ากับ 19 mm

จากตารางที่ 4.4 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ (ต้นและใบ) แคแสด (เปลือก) พลู (ใบ) พิลังกาสา (เปลือก) และอัคคีทวาร (ใบ) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1000 mg/ml โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 8 , 15 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดแคแสด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 8, 8, และ 10 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดพิลังกาสา และอัคคีทวาร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 7 มิลลิเมตร และสารสกัดกระดูกไก่ดำ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งสารสกัดทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้น้อยกว่า Ketoconazole มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 19 มิลลิเมตร

ตอนที่ 5 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) แสดงผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimum Inhibition Concentration : MIC) โดยวิธี Broth microdilution method และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร	**Minimum Inhibition Concentration *Malassezia furfur* (mg/ml)**	**Minimal Fungicidal Concentration *Malassezia furfur* (mg/ml)**
กระดูกไก่ดำ	n.d.	n.d.
แคแสด	50	>200
พลู	12.5	25
พิลังกาสา	100	>200
อัคคีทวาร	200	>200

หมายเหตุ n.d. = not detected

จากตารางที่ 4.5 พบว่า การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยการหาค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากเอทานอล 4 ใน 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากพลู แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือ มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/ml และ MFC เท่ากับ 25 mg/ml รองลงมาคือ แคแสด พิลังกาสา และอัคคีทวาร ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 50, 100, 200 mg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MFC มีค่ามากกว่า 200 mg/ml ทั้ง 3 ชนิด ส่วนกระดูกไก่ดำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในความเข้มข้นที่ทดลอง

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) พบว่า พลูมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ดีที่สุด (MIC) รองลงมา คือ แคแสด พิลังกาสา และอัคคีทวาร

ตอนที่ 6 ผลการทดสอบทางเคมีและกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

จากการพัฒนาตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เป็นการพัฒนาโดยการคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด โดยนำผลจากค่า MIC ซึ่งสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือ สารสกัดพลู โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/ml จากนั้นจึงนำสารสกัดพลูมาทำการพัฒนาแชมพูทั้งหมด 3 ตำรับ โดยใช้ส่วนผสมของสารสกัดในความเข้มข้น 1.25%, 3.75% และ 6.25% w/w ในตำรับแชมพูที่ 2, 3 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 เป็นแชมพูพื้นฐาน ซึ่งแสดงส่วนประกอบของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ที่พัฒนา แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงสูตรตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

ส่วนประกอบ/ สารสำคัญ	หน้าที่ของ ส่วนประกอบ	แชมพูสมุนไพร (g)			
		ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3	ตำรับที่ 4
สารสกัดสมุนไพร	Active ingredient	-	1.25	3.75	6.25
Texapon N - 70	Primary surfactant	14.4	14.4	14.4	14.4
EDTA	Chelating agent	3	3	3	3
ABC45%	Surfactant	3	3	3	3
Comperlan KD	Thickener	2	2	2	2
Glycerine	Emollient	10	10	10	10
DMDM hydantoin	Preservative	1	1	1	1
25% NaCl	Thickener	0.1	0.1	0.1	0.1
สารแต่งกลิ่น	Peppermint oil	0.5	0.5	0.5	0.5
DI Water	Solvent	qs.100	qs.100	qs.100	qs.100

จากตารางที่ 4.6 พบว่า การพัฒนาตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสารสกัดพลู ผลการทดสอบพบว่า เนื้อแชมพูสามารถเข้ากันได้ดี ไม่มีการแยกชั้นกันระหว่างส่วนผสม ไม่มีการตกตะกอน เมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดมากขึ้น มีผลทำให้แชมพูสารสกัดสมุนไพรมีความหนืดลดลง เมื่อเทียบกับแชมพูพื้นฐาน คือ ตำรับที่ 2 มีความหนืด เท่ากับ 4103 cP ตำรับที่ 3 มีความหนืด เท่ากับ 680 cP ตำรับที่ 4 มีค่าความ เท่ากับ 106 cP และแชมพูพื้นฐาน มีความหนืด เท่ากับ 119450 cP และทุกตำรับมีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วง 7.27-7.91 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) แชมพูผสมสมุนไพร คือ ต้องอยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 8.0

ตอนที่ 7 ผลการศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ภายใต้สภาวะเร่ง Freeze-thaw cycling method

จากการทดสอบทางเคมีและกายภาพของแชมพูสมุนไพรทั้งด้านกายภาพและด้านเคมี ทำให้ทราบถึงค่าความต่างที่เกิดจากความเข้มข้น และค่าความหนืดที่แตกต่างกันตามความเข้มข้น แสดงผลดังตารางที่ 4.7 และเมื่อนำไปทดสอบคุณภาพด้วยการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แสดงผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.7 แสดงการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิก่อนการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle)

การทดสอบ	**ตำรับที่ 1 แชมพูพื้นฐาน**	**ตำรับที่ 2 1 MIC**	**ตำรับที่ 3 3 MIC**	**ตำรับที่ 4 5 MIC**
เนื้อแชมพู	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
การตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน
ความหนืด	11950 cP	43730 cP	706 cP	106 cP
สี	สีขาวใส	สีน้ำตาลใส	สีน้ำตาลเข้ม	สีดำน้ำตาล
ค่า pH	7.91	7.66	7.43	7.27

หมายเหตุ cP คือ centipoise เป็นหน่วยของการวัดค่าความหนืด

ตารางที่ 4.8 แสดงการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิหลังการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle)

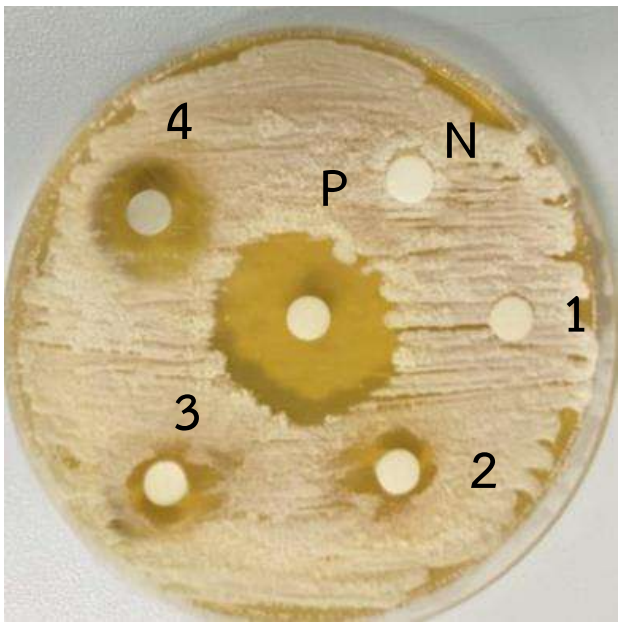
การทดสอบ	ตำรับที่ 1 แชมพูพื้นฐาน	ตำรับที่ 2 1 MIC	ตำรับที่ 3 3 MIC	ตำรับที่ 4 5 MIC
เนื้อแชมพู	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน	เป็นเนื้อเดียวกัน
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
การตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน
ความหนืด	10943 cP	4103 cP	680 cP	101 cP
สี	สีขาวใส	สีน้ำตาลใส	สีน้ำตาลเข้ม	สีดำน้ำตาล
ค่า pH	7.88	7.45	7.41	7.02

หมายเหตุ cP คือ centipoise เป็นหน่วยของการวัดค่าความหนืด

จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 ผลการศึกษาความคงสภาพแบบเร่งด้วยอุณหภูมิการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (Heating/cooling cycle) โดยเก็บตัวอย่างแชมพูผสมสมุนไพรที่ไม่เคยเปิดฝาบรรจุภัณฑ์มาก่อนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำสลับกันจนครบ 6 รอบ จากการทดสอบพบว่า เนื้อแชมพูของทุกตำรับสามารถเข้ากันได้ดี ไม่มีการแยกชั้นกันระหว่างส่วนผสม ไม่มีการตกตะกอน ทั้งก่อนและหลังการเก็บภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method แต่จะมีค่าความหนืด และค่าความเป็นกรด-เบสของแชมพูลดลง โดยมีค่าความเป็นกรด-เบส แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.02 - 0.25 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความคงสภาพของแชมพูถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) แชมพูผสมสมุนไพร โดยค่าความเป็นกรด-ด่างต้องแตกต่างจากเดิมไม่เกิน ± 1.0

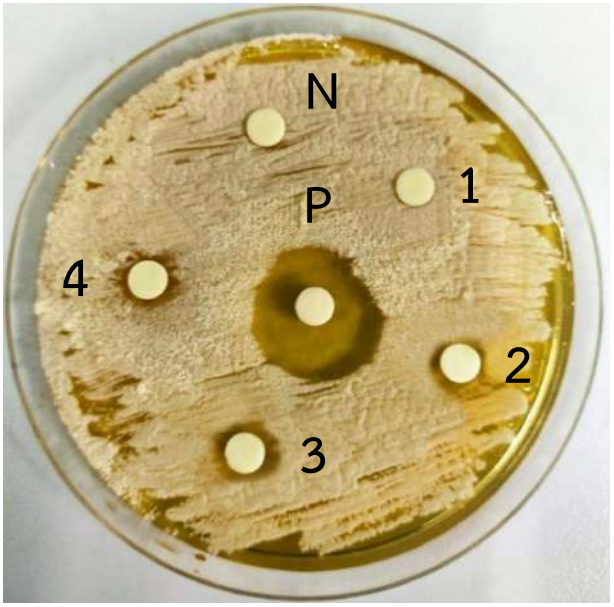
ตอนที่ 8 ผลการทดสอบตำรับแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

จากการทดสอบสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ทำให้ทราบว่าสารสกัดพลูมีคุณสมบัติในการยับยั้งดีที่สุด จึงนำสารสกัดพลูที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ มาเตรียมเป็นแชมพูและทดสอบกับเชื้อ *Malassezia furfur* ทดสอบเทียบกับแชมพูพื้นฐานและยามาตรฐาน Ketoconazole ดังภาพที่ 4.12-4.13 และแสดงผลดังตารางที่ 4.9 ดังนี้



ภาพที่ 4.12 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur*
ของแชมพูจากสารสกัดพลูก่อนการทดสอบ ภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole
1 = สูตรที่ 1 (แชมพูพื้นฐาน)
2 = สูตรที่ 2 (1 MIC)
3 = สูตรที่ 3 (3 MIC)
4 = สูตรที่ 4 (5 MIC)



ภาพที่ 4.13 วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Malassezia furfur* ของแชมพูจากสารสกัดพลูหลังการทดสอบ ภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method

หมายเหตุ N = Negative Control (เอทานอล), P = (Positive Control) Ketoconazole

1 = สูตรที่ 1 (แชมพูพื้นฐาน)

2 = สูตรที่ 2 (1 MIC)

3 = สูตรที่ 2 (3 MIC)

4 = สูตรที่ 3 (5 MIC)

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของตำรับแชมพูสมุนไพร

ตำรับแชมพู	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยก่อนการทดสอบ Heating/cooling cycle	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยหลังการทดสอบ Heating/cooling cycle
ตำรับที่ 1	6 mm	6 mm
ตำรับที่ 2	9 mm	7 mm
ตำรับที่ 3	10 mm	8 mm
ตำรับที่ 4	14 mm	8 mm
Ketoconazole	17 mm	17 mm

หมายเหตุ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc = 6 mm

จากตารางที่ 4.9 พบว่า ผลการทดสอบฤทธิยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ผลการทดสอบพบว่า แชมพูทั้ง 3 ตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เมื่อเทียบกับแชมพูพื้นฐาน โดยตำรับที่ 4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 14 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ตำรับที่ 2 และตำรับที่ 3 คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 9 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำแชมพูทั้ง 4 ตำรับมาทดสอบความคงสภาพของแชมพูสมุนไพรด้วยวิธี Heating/cooling cycle พบว่า แชมพูทั้ง 3 ตำรับมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อลดลง โดยเมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยของแชมพูผสมสารสกัดพลู ตำรับที่ 2, 3 และ 4 ได้ค่าเท่ากับ 7, 8 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยมีวัตถุประสงค์ ดังนี้ (1) เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร (2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร (3) เพื่อพัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ซึ่งใช้ระยะเวลาในการวิจัยในช่วงเดือนมิถุนายน 2562 - เดือนพฤศจิกายน 2563 โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วย วิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยวิธี disc diffusion method และทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution method และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* (Minimal Fungicidal Concentration, MFC) แล้วนำไปพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* และทดสอบความคงตัวทางกายภาพของแชมพูสมุนไพร และทำการทดสอบแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ซึ่งสรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะได้ดังนี้

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยเรื่องการพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ผู้วิจัยนำเสนอสรุปผลการวิจัยเป็นภาพรวมและข้อสรุปผลเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่กำหนดไว้ดังนี้

1. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) พบว่า สารสกัดเอทานอลของพิลังกาสามีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.028 (± 0.220) µg/ml รองลงมาคือ แคแสด อัคคีทวาร และพลู

ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.466 (± 0.457), 9.653 (± 2.187) และ 70.304 (± 6.334) µg/ml ตามลำดับ และกระดูกไก่ดำให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 292.614 (± 2.187) µg/ml

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้น กระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร

เมื่อนำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยวิธีการ disc diffusion method จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ (ต้นและใบ) แคแสด (เปลือก) พลู (ใบ) พิลังกาสา (เปลือก) และอัคคีทวาร (ใบ) พบว่า สารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1000 mg/ml โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 8, 15 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดแคแสด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เฉลี่ยเท่ากับ 8, 8, และ 10 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดพิลังกาสา และอัคคีทวาร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 7 มิลลิเมตร และสารสกัดกระดูกไก่ดำไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Malassezia furfur* และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยการหาค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด โดยวิธี Broth microdilution method พบว่า สารสกัดทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ โดยสารสกัดจากพลู แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือ มีค่า MIC เท่ากับ 12.50 mg/ml และ MFC เท่ากับ 25 mg/ml

3. การพัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

เมื่อนำสารสกัดพลูไปพัฒนาเป็นนบแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดจากค่า MIC แล้วนำมากำหนดสูตรความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในแชมพูและจากผลการทดสอบฤทธิยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* พบว่า แชมพูทั้ง 3 ตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เมื่อเทียบกับ แชมพูพื้นฐาน โดยตำรับที่ 4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 14 มิลลิเมตร

อภิปรายผลการวิจัย

จากการวิจัยเรื่องการพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ผู้วิจัยนำเสนอการอภิปรายผลการวิจัยเป็นภาพรวม และการอภิปรายผลการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่กำหนดไว้ ดังนี้

1. การอภิปรายผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้นกระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) พบว่า สารสกัดเอทานอลของพิลังกาสามีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.028 (± 0.220) µg/ml รองลงมาคือ แคแสด อัคคีทวาร และพลู ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.466 (± 0.457), 9.653 (± 2.187) และ 70.304 (± 6.334) µg/ml ตามลำดับ และกระดูกไก่ดำให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 292.614 (± 2.187) µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumaresh Pal and Chowdhury Habibur Rahaman (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลของกระดูกไก่ดำ ด้วยวิธี DPPH โดยสารสกัดใบกระดูกไก่ดำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 75 µg/ml ซึ่งจากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายต่างชนิดกัน และสภาพแวดล้อมภูมิประเทศ พื้นที่ในการปลูกที่ต่างกัน จะมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay พบว่า สารสกัดที่ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า Fe^{2+} equivalent สูงที่สุด) คือ สารสกัดจากพิลังกาสา มีค่าเท่ากับ 2.44 ± 0.004 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract รองลงมา คือ สารสกัดอัคคีทวาร พลู และ แคแสด คือ มีค่าเท่ากับ 1.337± 0.009 0.713 ± 0.027 และ 0.29 ± 0.016 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract ตามลำดับ ส่วนกระดูกไก่ดำ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด (ค่า Fe^{2+} equivalent น้อยที่สุด) มีค่าเท่ากับ 0.278 ± 0.000 mM Fe^{2+} equivalent/mg crude extract

2. การอภิปรายผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบและต้น กระดูกไก่ดำ เปลือกแคแสด เปลือกพิลังกาสา ใบพลู และใบอัคคีทวาร

เมื่อนำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยวิธีการ disc diffusion method จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ กระดูกไก่ดำ (ต้นและใบ) แคแสด (เปลือก) พลู (ใบ) พิลังกาสา (เปลือก) และอัคคีทวาร (ใบ) พบว่า สารสกัดพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 600, 800 และ 1000 mg/ml โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 8, 15 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดแคแสด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เฉลี่ยเท่ากับ 8, 8, และ 10 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดพิลังกาสา และอัคคี

ทวาร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย (inhibition zone) เท่ากับ 7 มิลลิเมตร และสารสกัดกระดูกไก่ดำไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Malassezia furfur* และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ด้วยการหาค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด โดยวิธี Broth microdilution method พบว่า สารสกัดทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ โดยสารสกัดจากพลู แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือ มีค่า MIC เท่ากับ 12.50 mg/ml และ MFC เท่ากับ 25 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด และคณะ (2563) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อ *Malassezia pachydermatis* จากการศึกษา พบว่า น้ำมันหอมระเหยพลูมีส่วนประกอบหลัก คือ eugenol ในสัดส่วนร้อยละ 32.82 ซึ่งน้ำมันหอมระเหยของพลูยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (MIC) เท่ากับ 0.66 µg/ml และมีค่าการยับยั้ง (MFC) อยู่ในช่วง 0.66-1.32 µg/ml มีฤทธิ์ในการทำลายเทียบกับเวลาที่ความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC มีฤทธิ์สูงสุด รองลงมา คือ 4 เท่าของค่า MIC ซึ่งทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99 และร้อยละ 90 ที่เวลา 30 นาที ตามลำดับ

3. การอภิปรายผลการพัฒนาแชมพูสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

เมื่อนำสารสกัดพลูไปพัฒนาเป็นบแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* โดยการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดจากค่า MIC แล้วนำมากำหนดสูตรความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในแชมพู จากนั้นทำการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของแชมพูสมุนไพรที่พัฒนาได้ด้วยวิธี Heating/cooling cycle พบว่า เนื้อแชมพูของทุกตำรับสามารถเข้ากันได้ดี ไม่มีการแยกชั้นกันระหว่างส่วนผสม ไม่มีการตกตะกอน ทั้งก่อนและหลังการเก็บภายใต้สภาวะเร่ง freeze-thaw cycling method แต่จะมีค่าความหนืด และค่าความเป็นกรด-เบสของแชมพูลดลง โดยมีค่าความเป็นกรด-เบส แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.02-0.25 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความคงสภาพของแชมพูถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) แชมพูผสมสมุนไพร โดยค่าความเป็นกรด-ด่างต้องแตกต่างจากเดิมไม่เกิน ±1.0 และได้กำหนดคุณลักษณะที่ดี จะต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ตกตะกอน มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 4.5-8.0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแชมพูจากสารสกัดพลู ทั้ง 4 ตำรับมีความคงตัวทางกายภาพที่ดี และจากผลการทดสอบฤทธิยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* พบว่าแชมพูทั้ง 3 ตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* เมื่อเทียบกับ แชมพูพื้นฐาน โดยตำรับที่ 4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 14 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ตำรับที่ 2 และตำรับที่ 3 คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 9 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำแชมพูทั้ง 4 ตำรับ มาทดสอบความคงสภาพของแชมพูสมุนไพรด้วยวิธี Heating/cooling cycle พบว่า แชมพูทั้ง 3 ตำรับมี

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อลดลง โดยเมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยของแชมพูผสมสารสกัดพลู ตำรับที่ 2, 3 และ 4 ได้ค่าเท่ากับ 7, 8 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีปัญหา และอุปสรรคในการทำอยู่บ้าง ซึ่งได้มีการแก้ไขปรับปรุง ทั้งนี้ยังคงต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาในงานวิจัยครั้งต่อไป ซึ่งได้สรุปมาดังนี้

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

การเพิ่มสารสกัดของสมุนไพรมีผลต่อค่าความหนืดของแชมพูสมุนไพร จึงควรพิจารณาเพิ่มสัดส่วนสารเพิ่มความหนืดให้เหมาะสมกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อให้เกิดประสิทธิผลที่ดีต่อการยับยั้งเชื้อ อนึ่ง ในการเตรียมสารสกัดที่จะมาใช้ผสมในแชมพูควรนำสารสกัดไปทำให้แห้ง โดยใช้ความเย็น (Freeze dry) เนื่องจากสารสกัดอาจมีตัวทำละลายเอททานอลเหลืออยู่ ซึ่งมีผลต่อความหนืดของแชมพูและเมื่อนำไปทดสอบความคงสภาพของแชมพูทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อลดลงด้วย

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 ควรมีการศึกษาสารสำคัญออกฤทธิ์ที่พบในสารสกัดใบพลูเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรต่อไป

2.2 ควรมีการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบสารสกัดใบพลูที่เหมาะสมเป็นส่วนผสมในแชมพูและไม่มีผลต่อความหนืด เพื่อเพิ่มประสิทธิผลของการนำไปใช้ที่ดียิ่งขึ้น

2.3 ควรศึกษาการใช้ส่วนผสมของสมุนไพร เช่น พิลังกาสาร่วมกับพลู เนื่องจากสารสกัดเปลือกพิลังกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนสารสกัดใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้ง *Malassezia furfur* ได้ดีที่สุด เพื่อเพิ่มประสิทธิผลของแชมพู

บรรณานุกรม

กองทุนภูมิปัญยาการแพทย์แผนไทยกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2559). **คู่มือตรวจรักษาโรคการแพทย์แผนไทยประยุกต์ 1**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

เกศิณี เลิศแสงสุวรรณ และวิภาวี รอดจันทร์. (2551). **แชมพูสมุนไพรขจัดรังแค**. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ. (2556). **คู่มือการผลิตและประกันคุณภาพเภสัชตำรับโรงพยาบาลจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ พุทธศักราช 2555**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

จรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด และคณะ (2563**).** ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อมาลาซีเซียพาไคเดอมาดิส ที่คัดแยกจากรอยโรคผิวหนังอักเสบของสุนัข. **สัตวศาสตร์มหานครสาร**, 15(1), 69-80.

โชติอนันต์ และคณะ. (2552). **รักษาโรคด้วยสมุนไพรใกล้ตัว**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ดวงกมลพับลิเคชั่น.

นิจศิริ เรืองรังษี และธวัชชัย มังคละคุปต์. (2547). **หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ฐานการพิมพ์.

บัณฑวรรณ ธุระพระ และคณะ. (2559). การวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาร**, 11(ฉบับพิเศษ), 80-910.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. **วารสารวิทยาศสาตร์และเทคโนโลยี**, 21(3), 277-288.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551, มิถุนายน). **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ**. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ มช. ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้”, 11-12 มิถุนายน 2551, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ผกายมาส อุดมผล. (2553). **สมุนไพรน่ารู้คู่บ้าน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัทพิมพ์ดีจำกัด.

พลอยพรรณ โชติปทุมวรรณ และศศิการนต์ ปัญญาดี. (2552). **การพัฒนาตำรับแชมพูสมุนไพรขจัดรังแค**. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

พาณี ศิริสะอาด. (2558). **แชมพู**. [ออนไลน์]. ได้จาก https://www.pharmacy.cmu.ac.th/makok.php?id=196 [สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2563].

พิมลพรรณ พิทยานุกุล. (2555). **คันหัว...รังแค...แก้กันอย่างไร**. [ออนไลน์]. ได้จาก pharmacy.mahidol. ac.th/th/khowledge/article/121/คันหัว-เป็นรังแค-แก้กันอย่างไร [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563].

วิทยา บุญวรพัฒน์. (2554). **สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย.

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และคณะ. (2561). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรกลุ่มอายุวัฒนะ. **วารสารเฉลิมกาญจนา**, 5(1), 19-25.

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, สุชาดา มานอก และเพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์. (2563). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง. **KKU Science Journal**, 48(1), 76-85.

สมจิตต์ บวรวัฒนาโสภณ. (2546). แชมพูสระผม. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dss.go.th/images/st-article/cp_10_2546_sucfactant.pdf [สืบค้นเมื่อ 20 พฤษภาคม 2563].

สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. **ก้าวทันโลก**, 15(1), 106-117

สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. (2553). **ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2 : 350 โรคกับการดูแลรักษาและการป้องกัน**. พิมพ์ครั้งที่ 5 ฉบับปรับปรุง. กรุงเทพฯ : โฮลิสติก พับลิสชิ่ง.

สุณิสา ทองขาว และคณะ. (2561, กุมภาพันธ์). **ผลของการสกัดใบลำโพงกาสลักต่อเชื้อ *Trichophyton ssp.* ที่ก่อโรคกลาก.** เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้, 11-12 กุมภาพันธ์ 2561, มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. (2557). **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด "พิลังกาสา"**. [ออนไลน์]. ได้จาก www.rspg.or .th/plants_data/herbs/. [สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2563].

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์. (2560). **สมุนไพรที่ใช้รักษากลาก เกลื้อน**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp [สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2563].

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. (2561). **มาตรฐานอุตสาหกรรม เอส แชมพูผสมสมุนไพร**. [ออนไลน์]. ได้จาก https://www.tisi.go.th/assets/website/pdf/tiss/12-2561.pdf [สืบค้นเมื่อ 17 พฤษภาคม 2563].

อนันต์ สกุลกิม. (2551). อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**, 8(1), 28-33.

โอภา วัชระคุปต์และคณะ. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Alderman D. J. and Smith P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, 196(3-4), 211-243.

Amirhossein Alimohammadian and Negin Maleki. (2020). Antifungal effects of Oleoropine on the *Malassezia FurFur*. **International Journal of Open Medicine and surgery**, 1(1), 61-65.

Angela E. Peter et al. (2016). PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL STUDIES ON THE BARK OF SPATHODEA CAMPANULATA P. BEAUV. **World Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 3(2), 243-251.

B.J.F. Hudson. (1990). **Food Antioxidants**. 1 st ed. New York : ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS LTD.

Blake E. Vest and Kevin Krauland. (2020). **Malassezia Furfur**. 1st ed. Treasure Island: StatPearls Publishing.

Brantner A., Pfeiffer K. and Brantner H. (1994). Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. **Pharmazie**, 49(7), 512–516.

Choudhary, D.ang and R.K. Kale (2002). Antioxidant and non-toxic properties of Piper betle leaf extract: in vitro and in vivo studies. **Phytother Res**, 16(5), 461-466.

Ck thaihealth. (2016). **เกลื้อน pityriasis versicolor**. [ออนไลน์]. ได้จาก https://www. thaihealth. net/h/encyclopedia-10020.html [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศิจกายน 2563].

Dolih Gozali, Risma Rudathillah and Resmi Mustarichie. (2020). Anti-dandruff Shampoo formulation with active substances Ethanol extract of *Brassica oleracea var capitata* L. and its verifying activity against fungus *Malassezia furfur*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, 13(8), 3702-3708.

Eloff J. N. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Med**, 64(8), 711-713.

E.N.Frankel. (1980). Lipid oxidation. **Northern Regional Research Center**, 19(1-2), 1-22.

Essawi T. and Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 70, 343–349.

Halliwell and B. (1999). Antioxidant defense mechanism: From the beginning to the end. **Society Free Radical Biology Medicine**, 31(4), 261-272.

Jayashree P. Gadade and Swaroopa A. Patil. (2019). Phytochemical paradigm, antioxidant status and their correlation in *Rotheca serrata* (L.) Steane and Mabb. **Annals of Phytomedicine: An International Journal**, 8(2), 156-166.

Kubola J. and S. Siriamornpun. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (Momordicacharantia L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry**, 110, 881-890.

Kumaresh Pal and Chowdhury Habibur Rahaman. (2015). PHYTOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT STUDIES OF *JUSTICIA GENDARUSSA* BURM. F. AN ETHNOMEDICINAL PLANT. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 6(8), 3454-3462.

Lirio, L.G. ,M.L. Hermana and M.Q. Fontonilla. (2008). Note Antibacterial Activity of Medicinal Plants from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, 1998.36(5), 357-359.

Madhur Kulkarni, Vishakha Hastak, Vitthal Jadhav and Abhijit A. Date. (2020). Fenugreek Leaf Extract and Its Gel Formulation Show Activity Against *Malassezia furfur*. **ASSAY and Drug Development Technologies**, 18(1), 45-55.

Marcel Roberfroid and Pedro Buc Calderon. (1995). **Free radicals and oxidation phenomena in biological systems**. 1st ed. New York : M. Dekker.

Medthai. (2560). **กระดูกไก่ดำสรรพคุณและประโยชน์ของกระดูกไก่ดำ 22 ข้อ.** [ออนไลน์]. ได้จาก https://medthai.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%94%E0%B8%B9%E0%B8%81%E0%B9%84%E0%B8%81%E0%B9%88%E0%B8%94%E0%B8%B3/ [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563].

Medthai. (2560). **แคแสด สรรพคุณและประโยชน์ต้นแคแสด 7 ข้อ.** [ออนไลน์]. ได้จาก: https://medthai.com/%E0%B9%81%E0%B8%84%E0%B9%81%E0%B8%AA%E0%B8%94/ [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563].

Medthai. (2560). **พิลังกาสา สรรพคุณและประโยชน์ของต้นพิลังกาสา 20 ข้อ.** [ออนไลน์]. ได้จาก https://medthai.com/%E0%B8%9E%E0%B8%B4%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%87%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B8%B2/ [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563].

Medthai. (2560). **อัคคีทวาร สรรพคุณและประโยชน์ของต้นอัคคีทวาร 30 ข้อ.** [ออนไลน์]. ได้จาก https://medthai.com/%E0%B8%AD%E0%B8%B1%E0%B8%84%E0%B8%84%E0%B8%B5%E0%B8%97%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A3/ [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2563].

Mohamed, S., et al. (1996). Antimycotic screening of 58 Malaysia against pathogens. **Pesticds science**, 47(3), 259-264.

Philip Molyneux. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 26(2), 211-219.

Vittorio Vinciguerra, Florencia Rojas, Viviana Tedesco, Gustavo Giusiano and Letizia Angiolella. (2019).Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. **Natural Product Research Formerly Natural Product Letters**, 33(22), 3273-3277.

V. Prabhu, K. Poonkodi, K. Pradeep, S. Buvaneswari, R. Mini, K. Vimaladevi, M. Anusuya and Sibi G. (2020). Antidandruff activity of Cassia auriculata and Cassia alata through fatty acids mediated inhibition of *Malassezia furfur*. **Applied and Natural Science Foundation**, 12(4), 532-540.

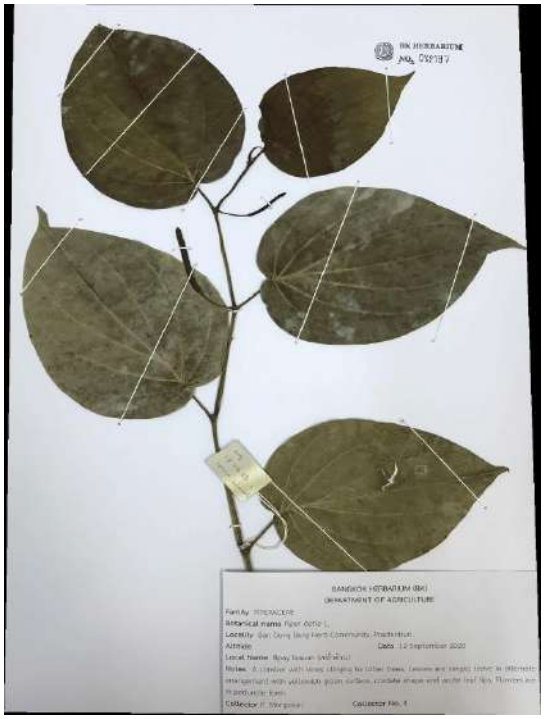
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

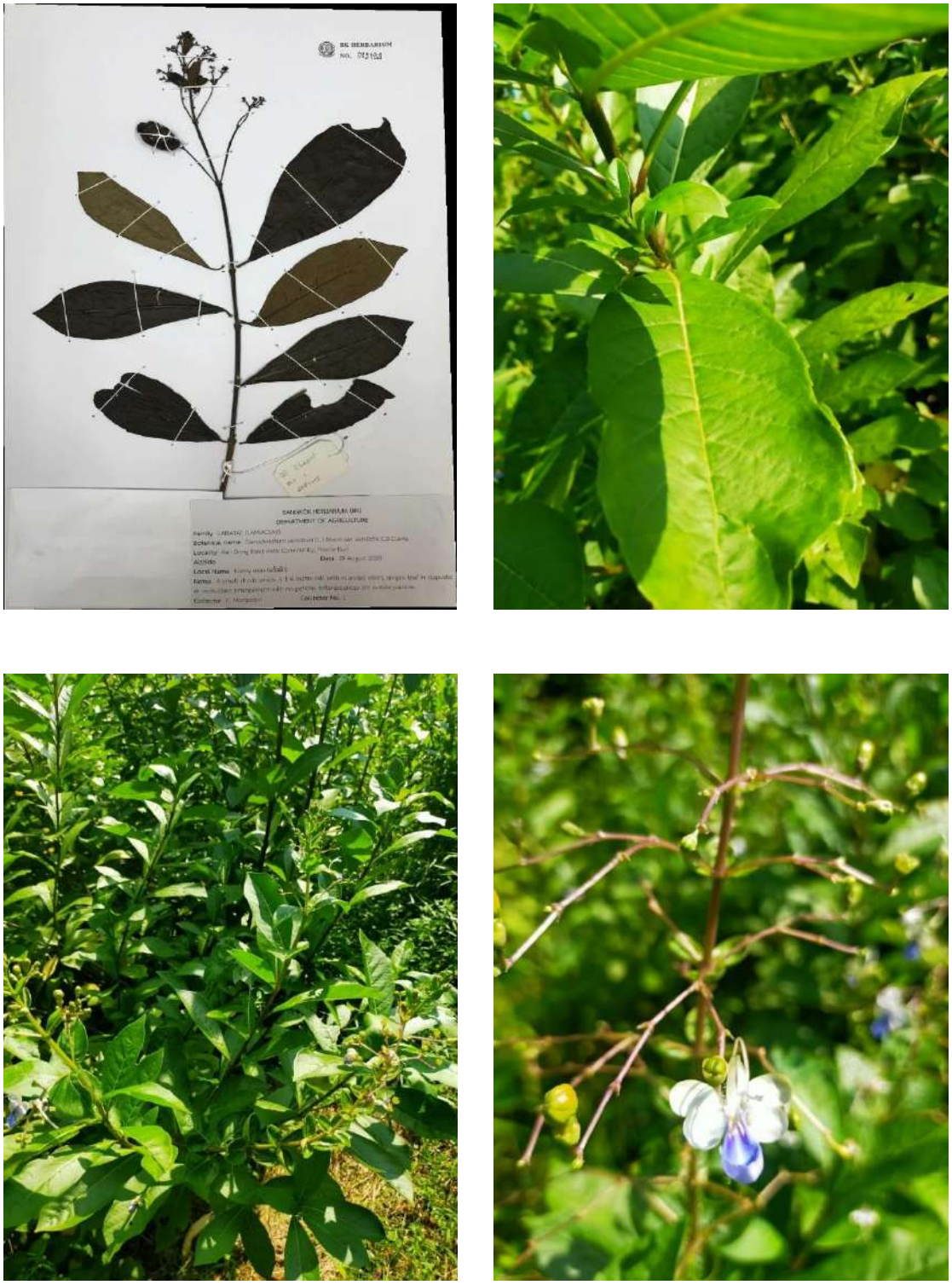
ภาพที่ 1 กระดูกไก่ดำ (*Justicia gendarussa* Burm.*f.*)

ภาพที่ 2 แคแสด (*Spathodea campanulata* P.Beauv.)



ภาพที่ 3 พลู (*Piper betle* L.)

ภาพที่ 4 พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.)



ภาพที่ 5 อัคคีทวาร (*Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb)

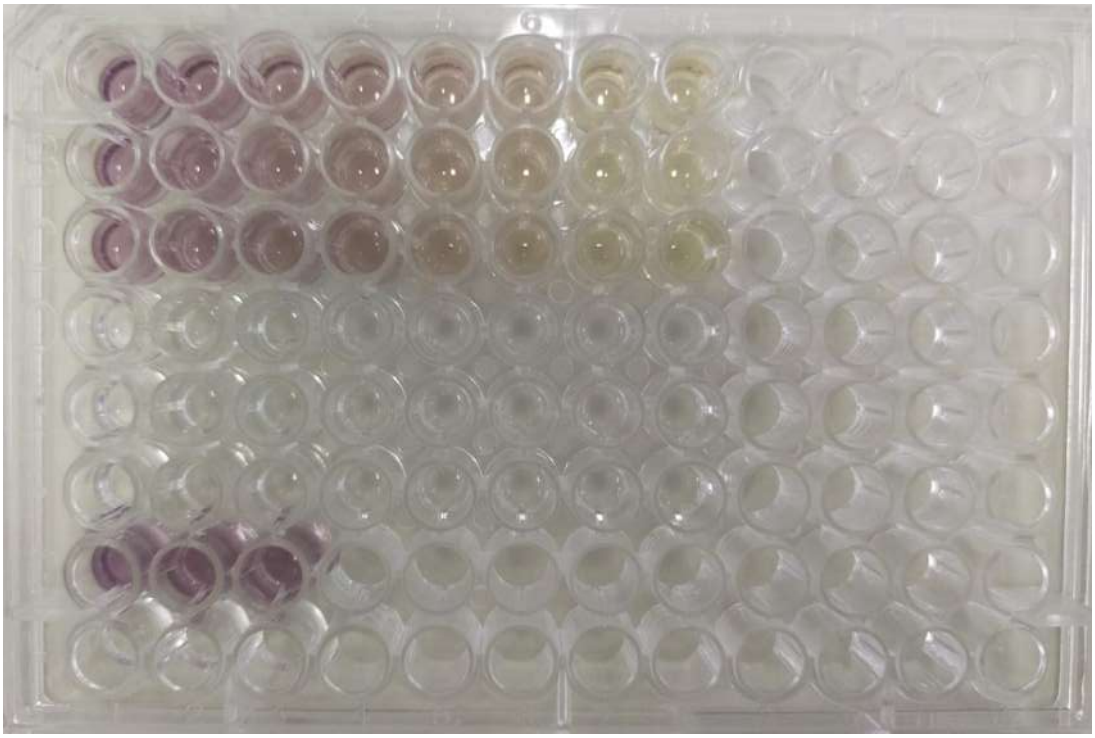
ภาคผนวก ข

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งเชื้อ

Malassezia furfur

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity)



ภาพที่ 6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี โดยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity)

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดกระดูกไก่ดำ ครั้งที่ 1

กระดูกไก่ดำ		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
150	300	0.354	0.353	0.351	0.353	0.069	0.070	0.070	0.070	37.528
200	400	0.351	0.345	0.331	0.342	0.060	0.063	0.062	0.062	38.043
250	500	0.341	0.338	0.330	0.336	0.079	0.081	0.079	0.080	43.341
300	600	0.325	0.320	0.314	0.320	0.093	0.088	0.088	0.090	49.227
350	700	0.308	0.305	0.297	0.303	0.100	0.099	0.099	0.099	54.967
400	800	0.298	0.285	0.277	0.287	0.106	0.109	0.107	0.107	60.412
450	900	0.280	0.272	0.270	0.274	0.115	0.117	0.113	0.115	64.901
control		0.473	0.531	0.480	0.495	0.043	0.038	0.044	0.042	-

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดกระดูกไก่ดำ ครั้งที่ 2

กระดูกไก่ดำ		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
150	300	0.337	0.335	0.326	0.333	0.059	0.058	0.057	0.058	39.854
200	400	0.327	0.320	0.324	0.324	0.067	0.067	0.066	0.067	43.723
250	500	0.334	0.330	0.322	0.329	0.077	0.077	0.078	0.077	44.964
300	600	0.309	0.308	0.302	0.306	0.093	0.084	0.083	0.087	51.898
350	700	0.288	0.287	0.281	0.285	0.092	0.093	0.097	0.094	58.102
400	800	0.275	0.277	0.268	0.273	0.098	0.100	0.097	0.098	61.679
450	900	0.254	0.247	0.249	0.250	0.107	0.108	0.107	0.107	68.759
control		0.490	0.545	0.478	0.504	0.043	0.043	0.057	0.048	-

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดกระดูกไก่ดำ ครั้งที่ 3

กระดูกไก่ดำ		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
150	300	0.369	0.372	0.363	0.368	0.069	0.065	0.059	0.064	37.773
200	400	0.350	0.333	0.337	0.340	0.063	0.061	0.061	0.062	42.964
250	500	0.350	0.354	0.343	0.349	0.076	0.077	0.077	0.077	44.194
300	600	0.327	0.321	0.322	0.323	0.087	0.085	0.085	0.086	51.298
350	700	0.315	0.309	0.306	0.310	0.099	0.095	0.097	0.097	56.352
400	800	0.297	0.295	0.285	0.292	0.104	0.105	0.104	0.104	61.475
450	900	0.282	0.271	0.269	0.274	0.113	0.119	0.115	0.116	67.555
control		0.524	0.534	0.520	0.526	0.038	0.038	0.038	0.038	-

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดแคแสด ครั้งที่ 1

แคแสด		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
25	50	0.460	0.454	0.445	0.453	0.038	0.038	0.038	0.038	27.108
50	100	0.423	0.422	0.417	0.421	0.037	0.038	0.037	0.037	32.670
75	150	0.339	0.325	0.325	0.330	0.037	0.038	0.037	0.037	48.653
100	200	0.260	0.250	0.234	0.248	0.040	0.039	0.042	0.040	63.525
125	250	0.198	0.168	0.115	0.160	0.046	0.042	0.041	0.043	79.391
150	300	0.133	0.104	0.087	0.108	0.039	0.040	0.040	0.040	87.998
175	350	0.103	0.100	0.099	0.101	0.041	0.044	0.042	0.042	89.754
control		0.606	0.617	0.604	0.609	0.040	0.040	0.039	0.040	-

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดแคแสด ครั้งที่ 2

แคแสด		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
25	50	0.463	0.451	0.456	0.457	0.037	0.037	0.037	0.037	26.589
50	100	0.413	0.426	0.423	0.421	0.037	0.037	0.037	0.037	32.886
75	150	0.323	0.333	0.297	0.318	0.037	0.037	0.038	0.037	50.962
100	200	0.265	0.220	0.238	0.241	0.043	0.037	0.038	0.039	64.723
125	250	0.165	0.156	0.159	0.160	0.039	0.039	0.039	0.039	78.834
150	300	0.101	0.137	0.135	0.124	0.041	0.042	0.039	0.041	85.364
175	350	0.098	0.097	0.110	0.102	0.041	0.044	0.040	0.042	89.504
control		0.611	0.620	0.598	0.610	0.038	0.039	0.037	0.038	-

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดแคแสด ครั้งที่ 3

แคแสด		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
25	50	0.394	0.397	0.382	0.391	0.035	0.035	0.037	0.036	22.977
50	100	0.316	0.318	0.309	0.314	0.036	0.037	0.036	0.036	39.740
75	150	0.244	0.244	0.229	0.239	0.036	0.036	0.037	0.036	56.069
100	200	0.171	0.154	0.154	0.160	0.037	0.039	0.037	0.038	73.555
125	250	0.108	0.093	0.089	0.097	0.038	0.039	0.038	0.038	87.355
150	300	0.086	0.086	0.082	0.085	0.039	0.040	0.038	0.039	90.101
175	350	0.087	0.084	0.083	0.085	0.040	0.044	0.040	0.041	90.607
control		0.499	0.508	0.490	0.499	0.037	0.038	0.038	0.038	-

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพลู ครั้งที่ 1

พลู		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.556	0.545	0.540	0.547	0.035	0.035	0.036	0.035	22.278
5	10	0.513	0.505	0.502	0.507	0.036	0.036	0.035	0.036	28.456
7.5	15	0.466	0.466	0.457	0.463	0.036	0.035	0.036	0.036	35.089
10	20	0.351	0.326	0.344	0.340	0.037	0.037	0.036	0.037	53.873
12.5	25	0.268	0.226	0.235	0.243	0.038	0.038	0.040	0.039	68.962
15	30	0.184	0.140	0.142	0.155	0.042	0.039	0.038	0.040	82.430
17.5	35	0.093	0.091	0.091	0.092	0.043	0.047	0.040	0.043	92.658
control		0.697	0.704	0.686	0.696	0.037	0.037	0.038	0.037	-

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพลู ครั้งที่ 2

พลู		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.480	0.483	0.472	0.478	0.040	0.039	0.036	0.038	23.523
5	10	0.467	0.457	0.460	0.461	0.042	0.039	0.039	0.040	26.767
7.5	15	0.425	0.412	0.401	0.413	0.039	0.042	0.043	0.041	35.458
10	20	0.334	0.331	0.318	0.328	0.052	0.042	0.045	0.046	51.101
12.5	25	0.302	0.262	0.258	0.274	0.040	0.041	0.041	0.041	59.444
15	30	0.219	0.196	0.195	0.203	0.042	0.048	0.044	0.045	72.422
17.5	35	0.163	0.115	0.105	0.128	0.046	0.042	0.043	0.044	85.400
control		0.609	0.682	0.589	0.627	0.043	0.044	0.067	0.051	-

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพลู ครั้งที่ 3

พลู		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.532	0.514	0.499	0.515	0.037	0.037	0.037	0.037	22.486
5	10	0.512	0.502	0.471	0.495	0.036	0.037	0.036	0.036	25.622
7.5	15	0.455	0.446	0.435	0.445	0.036	0.038	0.037	0.037	33.784
10	20	0.359	0.350	0.329	0.346	0.039	0.037	0.037	0.038	50.000
12.5	25	0.294	0.274	0.222	0.263	0.041	0.040	0.038	0.040	63.730
15	30	0.233	0.211	0.160	0.201	0.038	0.039	0.039	0.039	73.622
17.5	35	0.153	0.126	0.114	0.131	0.041	0.043	0.041	0.042	85.514
control		0.646	0.672	0.653	0.657	0.039	0.041	0.041	0.040	-

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพิลังกาสา ครั้งที่ 1

พิลังกาสา		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.462	0.454	0.455	0.457	0.037	0.036	0.038	0.037	30.348
7.5	15	0.367	0.370	0.353	0.363	0.036	0.039	0.039	0.038	46.048
10	20	0.325	0.306	0.315	0.315	0.044	0.038	0.035	0.039	54.174
12.5	25	0.256	0.215	0.217	0.229	0.038	0.039	0.038	0.038	68.325
15	30	0.185	0.170	0.172	0.176	0.038	0.039	0.041	0.039	77.391
17.5	35	0.126	0.098	0.100	0.108	0.040	0.037	0.041	0.039	88.612
20	40	0.101	0.082	0.084	0.089	0.040	0.039	0.044	0.041	92.040
control		0.628	0.686	0.623	0.646	0.047	0.038	0.043	0.043	-

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพิลังกาสา ครั้งที่ 2

พิลังกาสา		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.461	0.466	0.468	0.465	0.038	0.038	0.036	0.037	30.385
7.5	15	0.391	0.385	0.384	0.387	0.036	0.035	0.036	0.036	42.865
10	20	0.300	0.307	0.313	0.307	0.036	0.037	0.036	0.036	55.996
12.5	25	0.222	0.234	0.239	0.232	0.041	0.041	0.037	0.040	68.747
15	30	0.149	0.153	0.167	0.156	0.042	0.040	0.036	0.039	80.955
17.5	35	0.103	0.103	0.107	0.104	0.038	0.042	0.038	0.039	89.419
20	40	0.092	0.090	0.089	0.090	0.038	0.038	0.042	0.039	91.698
control		0.651	0.664	0.647	0.654	0.039	0.042	0.038	0.040	-

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดพิลังกาสา ครั้งที่ 3

พิลังกาสา		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.461	0.458	0.456	0.458	0.036	0.035	0.036	0.036	32.047
7.5	15	0.375	0.379	0.377	0.377	0.039	0.038	0.037	0.038	45.498
10	20	0.289	0.295	0.292	0.292	0.037	0.037	0.036	0.037	58.950
12.5	25	0.275	0.280	0.272	0.276	0.037	0.036	0.037	0.037	61.576
15	30	0.186	0.180	0.170	0.179	0.037	0.038	0.037	0.037	77.278
17.5	35	0.106	0.097	0.101	0.101	0.040	0.042	0.039	0.040	90.193
20	40	0.096	0.092	0.090	0.093	0.045	0.048	0.051	0.048	92.819
control		0.665	0.662	0.655	0.661	0.038	0.039	0.039	0.039	-

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดอัคคีทวาร ครั้งที่ 1

อัคคีทวาร		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.405	0.392	0.367	0.388	0.038	0.039	0.040	0.039	36.197
10	20	0.328	0.298	0.292	0.306	0.039	0.040	0.040	0.040	51.310
15	30	0.211	0.175	0.172	0.186	0.041	0.043	0.042	0.042	73.675
20	40	0.118	0.093	0.098	0.103	0.045	0.043	0.043	0.044	89.153
25	50	0.085	0.082	0.085	0.084	0.046	0.046	0.047	0.046	93.114
30	60	0.082	0.080	0.081	0.081	0.046	0.047	0.046	0.046	93.662
35	70	0.080	0.078	0.079	0.079	0.047	0.051	0.047	0.048	94.394
control		0.589	0.594	0.577	0.587	0.039	0.040	0.040	0.040	-

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดอัคคีทวาร ครั้งที่ 2

อัคคีทวาร		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.327	0.323	0.319	0.323	0.039	0.040	0.038	0.039	25.263
10	20	0.288	0.274	0.275	0.279	0.043	0.043	0.040	0.042	37.632
15	30	0.221	0.198	0.197	0.205	0.056	0.054	0.045	0.052	59.561
20	40	0.153	0.145	0.140	0.146	0.073	0.075	0.052	0.067	79.123
25	50	0.104	0.090	0.094	0.096	0.091	0.094	0.055	0.080	95.789
30	60	0.082	0.083	0.091	0.085	0.090	0.065	0.049	0.068	95.439
35	70	0.084	0.086	0.098	0.089	0.098	0.085	0.049	0.077	96.842
control		0.389	0.422	0.448	0.420	0.039	0.040	0.040	0.040	-

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของสารสกัดอัคคีทวาร ครั้งที่ 3

อัคคีทวาร		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
5	10	0.566	0.563	0.526	0.552	0.037	0.039	0.039	0.038	21.026
10	20	0.449	0.456	0.432	0.446	0.039	0.039	0.038	0.039	37.385
15	30	0.334	0.339	0.340	0.338	0.041	0.040	0.040	0.040	54.256
20	40	0.228	0.240	0.236	0.235	0.040	0.041	0.039	0.040	70.051
25	50	0.152	0.164	0.219	0.178	0.042	0.043	0.041	0.042	79.026
30	60	0.091	0.086	0.084	0.087	0.043	0.044	0.042	0.043	93.231
35	70	0.087	0.084	0.088	0.086	0.043	0.044	0.043	0.043	93.385
control		0.641	0.754	0.675	0.690	0.042	0.038	0.040	0.040	-

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของ Ascorbic acid ครั้งที่ 1

Ascorbic acid		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.287	0.327	0.331	0.315	0.036	0.037	0.037	0.037	32.661
5	10	0.170	0.185	0.181	0.179	0.037	0.036	0.036	0.036	65.565
7.5	15	0.065	0.070	0.070	0.068	0.037	0.038	0.036	0.037	92.419
10	20	0.061	0.065	0.064	0.063	0.035	0.036	0.037	0.036	93.387
12.5	25	0.060	0.061	0.071	0.064	0.037	0.039	0.041	0.039	93.952
control		0.463	0.492	0.407	0.454	0.042	0.041	0.039	0.041	-

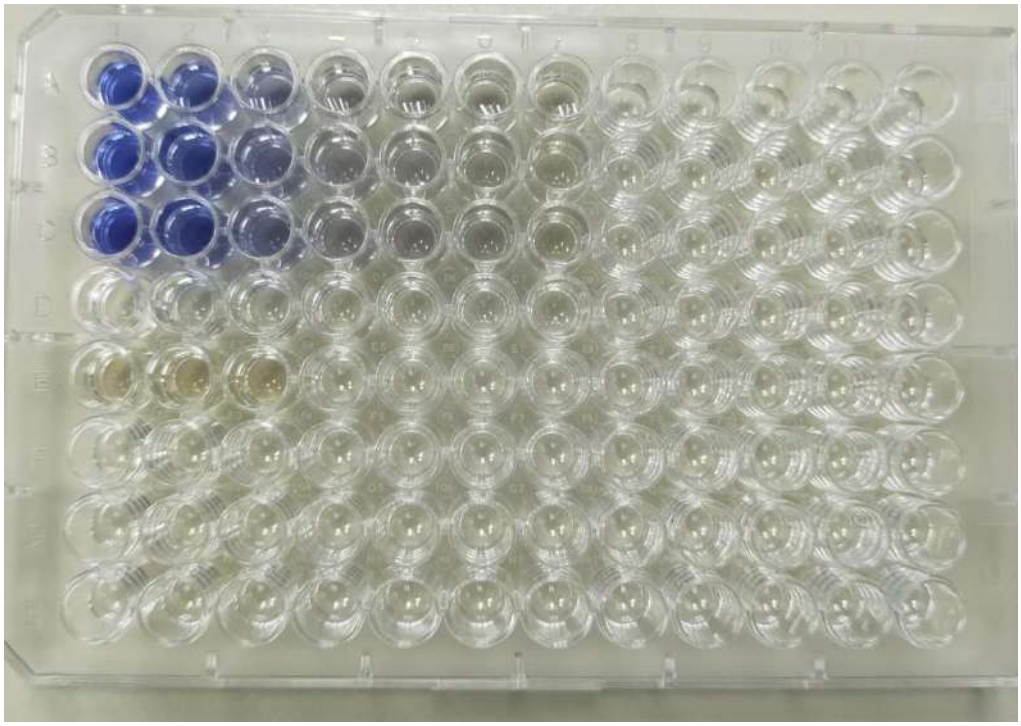
ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของ Ascorbic acid ครั้งที่ 2

Ascorbic acid		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.389	0.458	0.459	0.435	0.040	0.038	0.041	0.040	24.635
5	10	0.265	0.286	0.298	0.283	0.039	0.039	0.040	0.039	53.587
7.5	15	0.194	0.123	0.117	0.145	0.037	0.037	0.038	0.037	79.556
10	20	0.097	0.088	0.088	0.091	0.038	0.040	0.037	0.038	89.968
12.5	25	0.088	0.080	0.082	0.083	0.037	0.039	0.037	0.038	91.302
control		0.550	0.607	0.540	0.566	0.044	0.039	0.039	0.041	-

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงและ % radical scavenging ของ Ascorbic acid ครั้งที่ 3

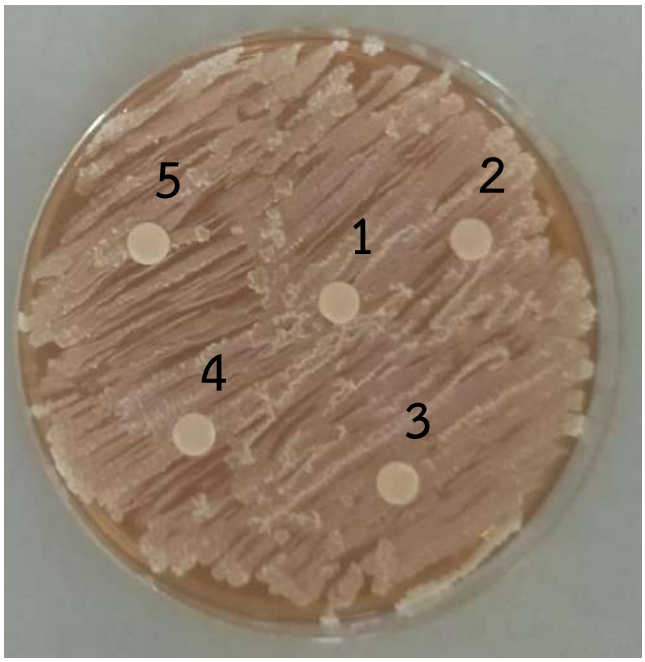
Ascorbic acid		sample				Sample blank				% radical scavenging
Final conc. (µg/ml)	Conc. (µg/ml)	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
2.5	5	0.456	0.464	0.446	0.455	0.037	0.039	0.043	0.040	20.825
5	10	0.293	0.294	0.282	0.290	0.043	0.044	0.051	0.046	53.587
7.5	15	0.132	0.140	0.134	0.135	0.039	0.040	0.039	0.039	81.714
10	20	0.093	0.101	0.092	0.095	0.039	0.038	0.039	0.039	89.206
12.5	25	0.082	0.081	0.078	0.080	0.038	0.038	0.040	0.039	92.063
control		0.550	0.607	0.540	0.566	0.044	0.039	0.039	0.041	-

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร
โดยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay



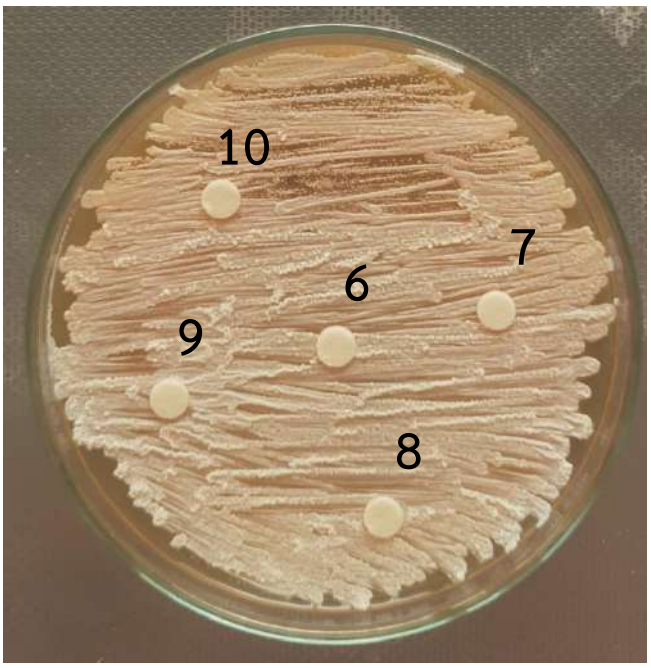
ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ($FeSO_4$)
โดยวิธี Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay

ผลการทดสอบตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*



ภาพที่ 8 ผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

1 = 1% DMSO, 2 = 2% DMSO, 3 = 3% DMSO, 4 = 4% DMSO, 5 = 5% DMSO



ภาพที่ 9 ผลของตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งเชื้อ *Malassezia furfur*

6 = 6% DMSO, 7 = 7% DMSO, 8 = 8% DMSO, 9 = 9% DMSO, 10 = 10% DMSO

ภาคผนวก ค

ผลการตรวจเทียบเคียงชื่อวิทยาศาสตร์

และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้

บัณฑิตวิทยาลัย
รับที่ 38
วันที่ 15 ม.ค. 2564
เวลา

ที่ กษ ๐๙๐๔/๔๓

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

๑๒ มกราคม ๒๕๖๔

เรื่อง แจ้งผลการตรวจเทียบเคียงชื่อวิทยาศาสตร์และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้

เรียน คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

อ้างถึง หนังสือบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ อว. ๐๖๔๓.๑๔/๓๔๔

ลงวันที่ ๑๔ กันยายน ๒๕๖๓

ตามหนังสือที่อ้างถึง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ได้ขอความอนุเคราะห์ตรวจสอบเทียบเคียงชื่อวิทยาศาสตร์และลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพันธุ์พืชของนายเอกพล หมั่นพลศรี นักศึกษาบัณฑิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งได้ทำงานวิจัยเรื่อง "การพัฒนาแชมพูสมุนไพรเพื่อการยับยั้ง *Malassezia furfur*" นั้น

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช ได้ดำเนินการเทียบเคียงชื่อวิทยาศาสตร์ของต้นอัคคีทวาร กระดูกไก่ดำ แคแสด พลู และพิลังกาสา และได้นำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการจัดการพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพเรียบร้อยแล้ว พร้อมทั้งดำเนินการลงทะเบียนหมายเลขตัวอย่างพืช จำนวน ๕ หมายเลข ดังนี้

๑. อัคคีทวาร มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb. อยู่ในวงศ์ Lamiaceae หมายเลขลงทะเบียน BK No. ๐๘๒๑๙๔ (Collector: E. Monpolsri No. ๐๑)

๒. กระดูกไก่ดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Justicia valida* Ridl. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae หมายเลขลงทะเบียน BK No. ๐๘๒๑๙๕ (Collector: E. Monpolsri No. ๐๒)

๓. พิลังกาสา มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ardisia polycephala* Wall. & A.DC. อยู่ในวงศ์ Primulaceae หมายเลขลงทะเบียน BK No. ๐๘๒๑๙๖ (Collector: E. Monpolsri No. ๐๓)

๔. พลู มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper betle* L. อยู่ในวงศ์ Piperaceae หมายเลขลงทะเบียน BK No. ๐๘๒๑๙๗ (Collector: E. Monpolsri No. ๐๔)

๕. แคแสด มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Spathodea campanulata* P. Beauv. อยู่ในวงศ์ Bignoniaceae หมายเลขลงทะเบียน BK No. ๐๘๒๑๙๘ (Collector: E. Monpolsri No. ๐๕)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(นายอนันต์ อักษรศรี)
ผู้อำนวยการสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

เรียน คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
1. เพื่อทราบ
2. เพื่อโปรดพิจารณา มอบหลักสูตร ป.โท เภสัชกรรมไทย
15 ม.ค. 2564

กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช
โทร. ๐ ๒๙๔๐ ๕๖๒๘
โทรสาร ๐ ๒๕๗๘ ๐๑๕๑ ต่อ ๒๔๔

– ตามข้อเสนอแนะ
/เห็นชอบ

(อาจารย์ ดร.คณกร สว่างเจริญ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ใบตอบรับการประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ
และนานาชาติ พ.ศ.2564 ครั้งที่ 2

การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ พ.ศ.๒๕๖๔ ครั้งที่ ๒
"สหวิทยาการเพื่อการพัฒนานวัตกรรมในศตวรรษที่ ๒๑"
(The 2st National and International Conference 2021 on
"Multidisciplinary for Innovation Development in 21st Century")
วันที่ ๑๕ มกราคม ๒๕๖๔ เวลา ๐๙.๐๐-๑๖.๓๐ น.
ณ หอประประชุมใหญ่ อาคาร ๑ ชั้น ๔
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เขตธนบุรี กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ ๐๒-๔๗๓-๗๐๐๐ ต่อ ๑๘๑๔ และ๑๘๑๘
Email : grad@bsru.ac.th

๓ ธันวาคม ๒๕๖๓

เรียน เอกพล หมั่นพลศรี, อัจฉรา แก้วน้อย, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และอ้อมบุญ วัลลิสุต

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานเข้าร่วมนำเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง ฤทธิต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อ Malassezia furfur ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด Antioxidant and Anti Malassezia furfur activity of 5 herbal extracts. ในการประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ พ.ศ.๒๕๖๔ ครั้งที่ ๒ "สหวิทยาการเพื่อการพัฒนานวัตกรรมในศตวรรษที่ ๒๑" (The 2st National and International Conference 2021 on "Multidisciplinary for Innovation Development in 21st Century") ในวันที่ ๑๕ มกราคม ๒๕๖๔ เวลา ๐๙.๐๐-๑๖.๓๐ น. ณ หอประประชุมใหญ่ อาคาร ๑ ชั้น ๔ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เขตธนบุรี กรุงเทพฯ แล้วนั้น

บัดนี้ ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาผลงานได้ตรวจสอบผลงานของท่านเสร็จแล้ว และขอเรียนให้ทราบว่า "**บทความวิจัยของท่านได้ผ่านการพิจารณาให้นำเสนอภาคบรรยายในการประชุมโดยไม่มีข้อแก้ไข**" สามารถชำระเงินค่าลงทะเบียนเพื่อนำเสนอในวันที่ ๑๕ มกราคม ๒๕๖๔ เวลา ๑๓.๐๐ น. เป็นต้นไป ทั้งนี้ท่านสามารถดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่ http://site.bsru.ac.th/conference/

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

(อาจารย์ ดร.คณกร สว่างเจริญ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นายเอกพล หมั่นพลศรี
วัน เดือน ปี เกิด	3 มิถุนายน 2533
สถานที่เกิด	หนองคาย
ที่อยู่ปัจจุบัน	56 หมู่ 1 ตำบลราษฎร์นิยม อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี 11150
ประสบการณ์การทำงาน	อาจารย์ วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก จังหวัดนนทบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลาย จากโรงเรียนหนองคายวิทยาคาร จังหวัดหนองคาย
พ.ศ. 2556	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรการแพทย์แผนไทยบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาร วิทยาเขตสกลนคร
พ.ศ. 2561	เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
E-mail	ekapol.tum@hotmail.com