



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินตำรับครีมจากสารสกัดชันของชันโรง
Preparation and evaluation of creams from stingless bees propolis extract

โดย

นสภ.บวรลักษณ์	ขจรฤทธิ์	รหัส 55210057
นสภ.สมชนก	ปัญญาภาวิน	รหัส 55210099
นสภ.พรอนันต์	ฉวีประดิษฐ์ภักดิ์	รหัส 55210117

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินตำรับครีมจากสารสกัดชันของชันโรง

Preparation and evaluation of creams from stingless bees propolis extract

โดย

นสภ.บวรลักษณ์	ขจรฤทธิ์	รหัส 55210057
นสภ.สมชนก	ปัญญาภาวิน	รหัส 55210099
นสภ.พรอนันต์	จ้าวประดิษฐ์ภักดิ์	รหัส 55210117

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาความคงตัวของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าการวิจัยการพัฒนาสูตรตำรับครีมจากสารสกัดชั้นของชั้นโรงยังมีอยู่น้อย

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจนำเอาชั้นจากชั้นโรงมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับ โดยสารสกัดชั้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นของจังหวัดจันทบุรี จุดประสงค์เพื่อเพิ่มประโยชน์และคุณค่าของผลิตภัณฑ์ท้องถิ่น ทางคณะผู้วิจัยได้นำเอาชั้นจากชั้นโรงมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับครีมซึ่งมีประโยชน์ทั้งในทางด้านเภสัชกรรม และคณะผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้วิจัยก็ขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

14 ธันวาคม 2559

Senior Project Academic Year 2016

Preparation and evaluation of creams from stingless bees propolis extract

By

1. Miss Bowonlak Kajhonlit ID 55210057
2. Miss Somchanok Panyakawin ID 55210099
3. Mr. Pornanun Chuapaditphun ID 55210117

Advisor

1. Dr. Sumalee Wannachaiyasit
2. Prof. Dr. Sompol Prakongpan
3. Mr. Mikael Laisola

Abstract

The objective of this research was to develop cream formulations containing stingless bee propolis from *Tetragonula pagdeni*. Stingless bee propolis was extracted using ethanol as a solvent. Waxes in the propolis were removed by using liquid-liquid extraction method. The yield of propolis extract was 14.15%. The amount of alpha-mangostin in the extract was examined by using high performance liquid chromatography (HPLC). The amount of alpha-mangostin in the propolis extract was 13.40%. The cream formulations were prepared by using beaker method. The types of emulsifiers were varied and the suitable HLB value of the formulation was determined. The results showed that the most stable formulation was propolis cream which had the HLB value of 10 (CPS5 HLB10). The appearance of CPS5 HLB 10 was yellow, not greasy and it had good spreadability. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus aureus* was determined by using broth microdilution method. The result showed that minimum bactericidal concentration (MBC) of the propolis extract was less than or equal to 11.19 µg/ml. The results showed that the stingless bee propolis extract is a good candidate for being developed as an antibacterial cream.

Major Advisor.....

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การเตรียมและการประเมินตำรับครีมจากสารสกัดชั้นของชันโรง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. นสภ. บวรลักษณ์ ขจรฤทธิ์ | รหัส 55210057 |
| 2. นสภ. สมชนก ปัญญาภาวิน | รหัส 55210099 |
| 3. นสภ. พรอนันต์ ฉั่วประดิษฐ์ภักดิ์ | รหัส 55210117 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

1. ญ.อ.ดร. สุมาลี วรรณาชัยสิทธิ์
2. ภก.ศ.เกียรติคุณ ดร.สมพล ประคองพันธ์
3. Mr. Mikael Laisola

บทคัดย่อ

งานวิจัยฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีสารสกัดชั้นของชันโรงจาก *Tetragonula pagdeni* ชั้นของชันโรงถูกสกัดโดยใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลาย Waxes ที่อยู่ในชั้น ถูกกำจัดออกโดยวิธีการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว สารสกัดที่ได้มีผลผลิตร้อยละเท่ากับ 14.15 วิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลว สมรรถนะสูง (HPLC) ปริมาณสาร Alpha-mangostin สารสกัดชั้น เท่ากับร้อยละ 13.40 การเตรียมครีมใช้วิธี Beaker method ทำการปรับเปลี่ยนชนิดสารทำอิมัลชันและศึกษาค่า HLB ที่เหมาะสมกับสูตรตำรับ ผลการทดลองแสดงว่าสูตรตำรับที่มีความคงตัวมากที่สุด คือ ครีมชั้นที่มี ค่า HLB เท่ากับ 10 (CPS5 HLB10) ลักษณะของครีมมีสีเหลือง ไม่มันและกระจายบนผิวได้ดี การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดชั้นต่อ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution method ผลการทดลองแสดงค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดชั้นมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 11.19 µg/ml ผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดชั้นของชันโรงเป็นสารที่ดีสำหรับพัฒนาเป็นครีมต้านจุลชีพ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูง จากอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ได้แก่ ภาณุ.อ.ดร. สุมาลี วรรณาชัยสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักงานวิจัยและ ภก.ศ.เกียรติคุณ ดร.สมพล ประคองพันธ์ อ. มิกาเอล โลโซลา (Mr. Mikael Laisola) ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำอย่างดีที่เป็นประโยชน์เพื่อให้รายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของคณาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือและให้ข้อมูลต่างๆ ที่เอื้อต่อการทำงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี อนึ่งผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นนั้น ทางคณะผู้วิจัยขออภัยผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

คณะผู้วิจัย

14 ธันวาคม 2559

สารบัญ

	หน้าที่
ปกใน	ก
คำนำ	ข
Abstract	ค
บทคัดย่อ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 กรอบแนวคิด	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ครีม (Creams)	3
2.1.1 ลักษณะของครีม	3

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
2.1.2 ชนิดของยาพื้นของครีม (Cream base)	4
2.1.3 ส่วนประกอบของครีม	5
2.2 ชันโรง	6
2.2.1 ชนิดของชันโรง	6
2.3 ชัน	7
2.3.1 ส่วนประกอบของชัน	7
2.3.2 ฤทธิ์ของชัน	7
2.4 เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.5 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย	15
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	15
3.1.1 สารเคมี	15
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	17
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	17
3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	17
3.2 วิธีการทดลอง	20
3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดชันของชันโรง	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้าที่
3.2.2 การคำนวณร้อยละผลผลิต	20
3.2.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	21
3.2.4 การวิเคราะห์ความคงตัว	22
3.2.5 การพัฒนาสูตรตำรับครีมเบส	23
3.2.6 การพัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีสารสกัดชั้นของชั้นโรง	27
3.2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
4.1 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง	35
4.2 ผลการพัฒนาสูตรตำรับครีม	35
4.3 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	49
4.3.1 Standard curve	49
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นของชั้นโรงด้วยเครื่อง HPLC	50
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับครีมด้วย HPLC	51
4.4 การทดสอบความคงตัว (Stability)	53

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยวิธี Disk diffusion	63
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยวิธี Broth microdilution method	64
4.6.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal inhibitory concentration, MIC และ Minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารมาตรฐาน alpha-mangostin	64
4.6.2 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดชันจากชันโรง	66
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	68
5.1 การสกัดชันจากชันโรง	68
5.2 การพัฒนาสูตรตำรับครีม	68
5.3 การทดสอบความคงตัว (Stability)	69
5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยวิธี Disk diffusion	69
5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration: MIC, Minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin และสารสกัดชันจากชันโรง	70
5.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC)	70
เอกสารอ้างอิง	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับ CBS 1	24
ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับ CBS 2	24
ตารางที่ 3 แสดงสูตรตำรับ CBS 3	25
ตารางที่ 4 แสดงสูตรตำรับ CBS 4	25
ตารางที่ 5 แสดงสูตรตำรับ CBS 5	26
ตารางที่ 6 แสดงสูตรตำรับ CBS 6	26
ตารางที่ 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 และ 12	28
ตารางที่ 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 6 HLB 10 และ 12	29
ตารางที่ 9 แสดงสูตรตำรับครีมเบส CBS 5 HLB 10 (Non-paraben)	30
ตารางที่ 10 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 (Non-paraben)	30
ตารางที่ 11 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO HLB 10	31
ตารางที่ 12 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง	35
ตารางที่ 13 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีมเบส CBS 1 – 6	38
ตารางที่ 14 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5 HLB10, CPS5 HLB12, CPS6 HLB 10 และ CPS6 HLB12	41
ตารางที่ 15 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5	44
ตารางที่ 16 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NAO, CBS5-AO, CPS5-NAO และ CPS5-AO	47
ตารางที่ 17 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NP และ CPS5-NP	49
ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ด้วย HPLC	49
ตารางที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละ Alpha-mangostin จากการวิเคราะห์สารสกัด	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้าที่
ตารางที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NP ที่ HLB 10	51
ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-AO HLB 10	52
ตารางที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NAO HLB 10	52
ตารางที่ 23 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CBS5-AO และ CBS5-NAO ที่ HLB 10	60
ตารางที่ 24 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CPS5-AO และ CPS5-NAO HLB 10	61
ตารางที่ 25 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยวิธี Disk diffusion แสดงผลเป็นขนาดการเกิด Clear zone (Inhibition zone)	63
ตารางที่ 26 แสดงผลค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin และลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตด้วยตาเปล่า	65
ตารางที่ 27 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (สารมาตรฐาน Alpha-mangostin)	66
ตารางที่ 28 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (สารสกัดชั้นของชั้นโรง)	67

สารบัญรูปภาพ

	หน้าที่
รูป 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน	50
รูป 2 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	53
รูป 3 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	53
รูป 4 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	54
รูป 5 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	54
รูป 6 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	55
รูป 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	55
รูป 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	56
รูป 9 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	56
รูป 10 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	57
รูป 11 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	57
รูป 12 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	57
รูป 13 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	58
รูป 14 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	58
รูป 15 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	58
รูป 16 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	59

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้าที่

รูป 17 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C

59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ชันโรงเป็นแมลงชนิดหนึ่งคล้ายผึ้งที่มีขนาดเล็ก แต่ไม่มีเหล็กใน ทำให้ไม่สามารถต่อยได้ ดังนั้นชันโรงจึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้เลี้ยง ส่งผลให้มีความนิยมในการเลี้ยงชันโรงสูงขึ้น โดยพบว่าในหลายประเทศนิยมเลี้ยงชันโรง เช่น บราซิล ฝรั่งเศส มาเลเซีย เป็นต้น สำหรับประเทศไทยถึงแม้การเลี้ยงชันโรงอาจยังไม่แพร่หลาย แต่พบว่ามี การเลี้ยงชันโรงกระจายอยู่ทุกภูมิภาค ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในไทยคือ ชันโรงขนเงิน เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความแข็งแรงและพบการกระจายพันธุ์อย่างกว้างที่สุด (1) โดยทั่วไปเกษตรกรที่เลี้ยงชันโรงจะนิยมนำผลผลิตจากชันโรงคือ น้ำผึ้ง ส่งออกขายเพื่อหารายได้ โดยกระบวนการที่จะทำให้ได้น้ำผึ้งคือ กระบวนการบีบน้ำผึ้งออกจากชันที่ห่อหุ้มอยู่ ซึ่งเมื่อบีบน้ำผึ้งออกมาแล้ว ส่วนที่เหลือซึ่งเป็นชันจะถูกทิ้งไป จึงมีแนวคิดนำชันมาพัฒนาเพื่อให้เกิดประโยชน์ และเพิ่มผลผลิตทางเศรษฐกิจ

ชันหรือพรอพอลิส (Propolis) มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลหรือดำที่ชันโรงสร้างขึ้นมาจากภายในรัง เพื่อที่จะใช้ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้ามาทำอันตรายภายในรังได้ ในปัจจุบันมีหลายการศึกษาที่สนใจเกี่ยวกับชันมากขึ้น และมีการรายงานถึงฤทธิ์ที่ค้นพบว่าชันมีฤทธิ์ดังนี้คือ ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย (2) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (3) ฤทธิ์ในการต้านไวรัส (4) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (5) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (6) จากฤทธิ์ของชันที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้มีหลายงานวิจัยพยายามพัฒนาชันให้อยู่ในรูปแบบเภสัชภัณฑ์ต่างๆ อย่างไรก็ตามพบว่าเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบครีมยังมีการศึกษาวิจัยอยู่น้อย และพบว่าการนำชันมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับในด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียยังไม่แพร่หลาย จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาชันให้อยู่ในรูปแบบตำรับครีมเพื่อใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสูตรตำรับครีมจากชันของชันโรงและการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อนหน้านี้ พบว่าชันมีแนวโน้มในฤทธิ์การต้านแบคทีเรียได้แต่ยังพบปัญหาของตำรับครีมที่ยังไม่มีความคงตัว (7) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาสูตรตำรับครีมของชันให้มีความคงตัว เพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาความคงตัวของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ชั้นที่ใช้ในการวิจัย เป็นชั้นที่ได้จากชั้นโรงขนเงิน (*Tetragonula pagdeni*) ที่เก็บจากจังหวัดจันทบุรี

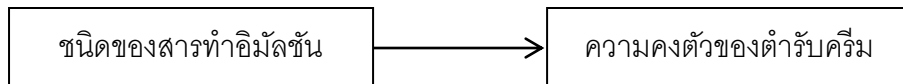
ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

- ตัวแปรต้น คือ ชนิดของสารทำอิมัลชัน
- ตัวแปรตาม คือ ความคงตัวของตำรับครีม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรงที่เป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวดี

1.5 กรอบแนวคิด



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาวิจัยจำแนกได้ดังนี้

- 2.1 ครีม (Creams)
- 2.2 ชันโรง (Stingless bees)
- 2.3 ชัน (Propolis)
- 2.4 เชื้อ *Staphylococcus aureus*
- 2.5 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

2.1 ครีม (Creams) (8)

ครีมเป็นยาเตรียมลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ใช้ภายนอก สำหรับทาหรือฉีดยา เช่นเดียวกับยาขี้ผึ้ง แต่ครีมจะเหนียวนุ่มกว่ายาขี้ผึ้ง ชนิดของครีม โดยทั่วไปสามารถแบ่งชนิดของครีมตามประโยชน์การใช้ คือ

1. ครีมที่ใช้เป็นยา (Medicated creams) ประกอบด้วยตัวยาสำคัญในยาพื้นของครีม ใช้เป็นประโยชน์ในการบำบัดรักษาโรคผิวหนัง เช่น Hydrocortisone creams
2. ครีมที่ใช้เป็นเครื่องสำอาง (Cosmetic creams) ในปัจจุบันนิยมใช้กันมาก มีกลิ่นหอม เรียกชื่อต่างๆ กันตามประโยชน์ที่นำไปใช้ เช่น Cleansing cream, Foundation cream, Nourishing cream และ Emollient cream เป็นต้น

2.1.1 ลักษณะของครีม

สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ระบบ ตามลักษณะวิญญูภาคภายในและนอกของตำรับ คือ

1) Water in oil (W/O) emulsion

วัฏภาคภายในเป็นระบบน้ำกระจายตัวอยู่วัฏภาคภายนอกที่เป็นน้ำมัน เช่น cold cream

2) Oil in water (O/W) emulsion

วัฏภาคภายในเป็นระบบน้ำมันกระจายตัวอยู่วัฏภาคภายนอกที่เป็นน้ำ ตำรับนี้จึงสามารถล้างออกได้ง่าย เนื่องจากวัฏภาคภายนอกที่เป็นน้ำ เช่น Stearic acid base cream และ Mineral oil base cream

2.1.2 ชนิดของยาพื้นของครีม (Cream base)

ยาพื้นของครีมที่นิยมใช้มี 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ

1) Mineral oil base cream

มี Mineral oil ในความเข้มข้นที่สูง เป็นอิมัลชันชนิด O/W นิยมใช้ในฤดูหนาว เพราะทำให้ผิวอ่อนนุ่มและป้องกันไม่ให้ผิวแห้งแตก

2) Stearic acid base cream หรือ Vanishing cream

เป็นอิมัลชันชนิด O/W ซึ่งมีสบู่เป็นตัวทำอิมัลชัน สบู่ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรด Stearic acid กับด่าง เช่น Triethanolamine, Sodium hydroxide, Potassium hydroxide เป็นต้น ครีมชนิดนี้เมื่อทาผิวจะกระจายตัวได้ดี และเมื่อถูบได้ไม่นานๆ เนื้อครีมขาวจะหายไปหมด เหลือแต่ครีมบางๆ คลุมผิว ทำให้ผิวนุ่มและเนียน

3) Cold cream

เป็นอิมัลชันชนิด W/O มีจำนวนน้ำน้อยกว่าร้อยละ 45 และมีสารทำอิมัลชัน คือ Sodium cerotate ซึ่งเกิดจาก Borax ทำปฏิกิริยากับ Cerotic acid ใน Beeswax ยาพื้นชนิดนี้ทำให้ผิวอ่อนนุ่มและเย็น

2.1.3 ส่วนประกอบของครีม

วิฏภาคของน้ำและน้ำมันนั้นจะไม่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ แต่อาศัยสารช่วยทำให้ทั้ง 2 วิฏภาคเป็นเนื้อเดียวกันเกิดเป็น Emulsion ที่มีความคงตัวได้ คือ สารทำอิมัลชัน (Emulsifying agent) และนอกจากนี้ยังมีสารอื่นในตำรับครีม เช่น Antioxidant, Preservative, Flavoring agent และ Coloring agent เป็นต้น

Emulsifying agent เป็นสารที่ช่วยให้วิฏภาคน้ำและน้ำมันรวมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการลดแรงตึงผิวของของเหลว โดยช่วยทำให้เกิดเป็น Emulsion ที่มีความคงตัวและป้องกันไม่ให้ Emulsion แยกเป็นชั้น ซึ่งโมเลกุลของ Emulsifying agent มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมันเป็นฟิล์มหุ้ม

ประเภทของ Emulsifying agent ได้แก่ สารอิมัลชัน (Emulsifying agent) ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น Lecithin, Hydrocolloid, Gum และ Whey เป็นต้น และ Emulsifying agent ที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น Diglyceride และ Monoglyceride เป็นต้น

การเลือกใช้ Emulsifying agent จะพิจารณาจากสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน (Hydrophile-lipophile balance, HLB) ซึ่งเป็นอัตราส่วนโดยน้ำหนักของมวลโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) กับมวลโมเลกุลทั้งหมด คูณด้วย 20 (Griffin's method) มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 20 เป็นค่าที่ใช้กำหนดการนำมาใช้งานของ Emulsifying agent

สารที่มีค่า HLB เท่ากับ 0 คือสารที่โมเลกุลมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ทั้งหมดและไม่ละลายในน้ำ และสารที่มีค่า HLB เท่ากับ 20 คือสารที่โมเลกุลมีส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ทั้งหมดและละลายในน้ำ นั่นคือเมื่อค่า HLB สูงขึ้น คือสารที่โมเลกุลจะมีส่วนที่ชอบน้ำมากขึ้น กระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น

- ค่า HLB ตั้งแต่ 1-3 เป็น Antifoaming
- ค่า HLB ตั้งแต่ 3-8 เป็น Emulsifying agents ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsifier)
- ค่า HLB ตั้งแต่ 7-10 เป็น Wetting agents
- ค่า HLB ตั้งแต่ 8-16 เป็น Emulsifying agents ชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsifier)
- ค่า HLB ตั้งแต่ 13-15 เป็น Detergents

- ค่า HLB ตั้งแต่ 10-18 เป็น Solubilizes

Sorbitan monolaurate หรือ Span 20 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{34}O_6$, น้ำหนักโมเลกุล 346.00 g/mol, ชื่อทางเคมี Sorbitan monododecanoate, หมายเลขซีไอเอส [1338-39-2], ลักษณะภายนอก ของเหลวสีเหลืองเหนียวข้น, ค่าความเป็นกรด ≤ 7.00 , ความถ่วงจำเพาะ 1.01 g/cm^3 , ค่าเอสแอลบี 8.60, ค่าไฮดรอกซิล 159–169, จุดไหลเท $16-20^\circ\text{C}$, ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 159–169, ค่าแรงตึงผิว 28.00 mN/n , ค่าความหนืด $3900-4900 \text{ mPa s}$, ปริมาณน้ำในสารเคมี $\leq 0.50 \%$ (9)

Sorbitan monostearate หรือ Span 60 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_{24}H_{46}O_6$, น้ำหนักโมเลกุล 431.00 g/mol, ชื่อทางเคมี Sorbitan monooctadecanoate, หมายเลขซีไอเอส [1338-41-6], ลักษณะภายนอก ครีมแข็ง, ค่าความเป็นกรด 5–10, ค่าเอสแอลบี 4.70, ค่าไฮดรอกซิล 235–260, จุดหลอมเหลว $53-57^\circ\text{C}$, ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 147–157, ค่าแรงตึงผิว 46.00 mN/n , ปริมาณน้ำในสารเคมี $\leq 1.00 \%$ (9)

Sorbitan monooleate หรือ Span 80 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_{24}H_{44}O_6$, น้ำหนักโมเลกุล 429.00 g/mol, ชื่อทางเคมี (Z)-Sorbitan mono-9-octadecenoate, หมายเลขซีไอเอส [1338-43-8], ลักษณะภายนอก ของเหลวสีเหลืองเหนียวข้น, ค่าความเป็นกรด ≤ 8.00 , ความถ่วงจำเพาะ 1.01 g/cm^3 , ค่าเอสแอลบี 4.30, ค่าไฮดรอกซิล 193–209, จุดไหลเท -12.00°C , ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 149–160, ค่าแรงตึงผิว 30.00 mN/n , ค่าความหนืด $970-1080 \text{ mPa s}$, ปริมาณน้ำในสารเคมี $\leq 0.50\%$ (9)

Tween 20 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ ชื่อทางเคมี Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate, สูตรโมเลกุล $C_{58}H_{114}O_{26}$, น้ำหนักโมเลกุล 1128 g/mol, หมายเลขซีไอเอส [9005-64-5], ลักษณะภายนอก ของเหลวสีเหลืองเหนียวข้น, ค่าเอสแอลบี 16.7, ความถ่วงจำเพาะ 1.1 g/cm^3 , ค่าความหนืด 400 mPa s , ค่าการละลาย ละลายในเอทานอลและน้ำแต่ไม่ละลายในมิเนอร์ลอลอย, ค่าความเป็นกรด 2.0 %, ค่าไฮดรอกซิล 96–108, ค่าความชื้นในสารเคมี $\leq 3.0\%$, ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 40–50

Tween 60 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ ชื่อทางเคมี Polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate, สูตรโมเลกุล $C_{64}H_{126}O_{26}$, น้ำหนักโมเลกุล 1312 g/mol,

หมายเลขซีเอส [9005-67-8], ลักษณะภายนอก ของเหลวสีเหลืองเหนียวข้น, ค่าเอชแอลบี 14.9, ความถ่วงจำเพาะ 1.1, ค่าความหนืด 600 mPa s, ค่าการละลายละลายในเอทานอลและน้ำแต่ไม่ละลายในมิเนรอลออย, ค่าแรงตึงผิว 42.5 mN/m, ค่าความเป็นกรด 2.0 %, ค่าไฮดรอกซิล 81–96, ค่าความชื้นในสารเคมี $\leq 3.0\%$, ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 45–55

Tween 80 มีคุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ ชื่อทางเคมี Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate, $C_{64}H_{124}O_{26}$ น้ำหนักโมเลกุล 1310 g/mol, หมายเลขซีเอส [9005-65-6], ลักษณะภายนอก ของเหลวสีเหลืองเหนียวข้น, ค่าเอชแอลบี 15.0, ความถ่วงจำเพาะ 1.08, ค่าความหนืด 425 mPa s, ค่าการละลายละลายในเอทานอลและน้ำแต่ไม่ละลายในมิเนรอลออย, ค่าแรงตึงผิว 42.5 mN/m, ค่าความเป็นกรด 2.0 %, ค่าไฮดรอกซิล 65–80, ค่าความชื้นในสารเคมี $\leq 3.0\%$, ค่าซาฟอนนิฟิเคชัน 45–55

ZOHAR GLST SE หรือ Self-emulsifiable glyceryl monostearate คุณสมบัติทางด้านเคมีดังนี้ HLB 3.8, จุดหลอมเหลว 55-60 °C

2.2 ชันโรง

ชันโรงเป็นแมลงขนาดเล็กที่อยู่ในวงศ์ Apidae มีพฤติกรรมเก็บน้ำหวานจากดอกไม้และละอองเกสรมาเป็นอาหารเช่นเดียวกับผึ้ง แต่ชันโรงไม่มีเหล็กใน จึงไม่ต่อยให้รู้สึกเจ็บปวด ทั่วโลกมีชันโรงมากกว่า 400 ชนิด ในทวีปอเมริกาใต้และทวีปเอเชีย สำหรับประเทศไทยพบเพียง 32 ชนิด และสามารถพบได้ทุกภาค

แต่ละภาคมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคเหนือเรียกชันโรงที่มีขนาดเล็กกว่า แมลงขี้ผึ้งหรือตัวขี้ผึ้งนี้ ภาคใต้เรียก อุง หรืออุงแมงโลง แต่ชนิดที่มีขนาดใหญ่ภาคเหนือเรียก ขี้ยา ส่วนภาคใต้เรียกว่า อุงหมี สำหรับภาคตะวันตกเรียก ตัวตุ้งตึง หรือตัวตึง ภาคตะวันออกเรียก ชำมะโรงหรือแมลงอีโลม ส่วนคำว่าชันโรง คาดว่าเรียกตามพฤติกรรมการเก็บชันของแมลงชนิดนี้ (1)

2.2.1 ชนิดของชันโรง

ในธรรมชาติสามารถพบปากทางเข้ารังชันโรง ซึ่งมีชันโรงงานคอยเฝ้าป้องกันศัตรูเข้ารัง โดยสารที่นำมาใช้สร้างรังหลักเกิดจากไขมันโรงผสมกับยางไม้ที่เรียกว่า ซีรูเมน (Cerumen) เราสามารถพบรังชันโรงได้ ทั้งในที่โล่งแจ้งเช่นเดียวกับการทำรังของผึ้งหลวง โพรงที่อยู่บนดิน เช่น โพรงต้นไม้ ตามรอยแตกแยกของหิน และโพรงใต้ดิน เช่น โพรงในรังปลวกหรือรังมด โดยมีลักษณะปากทางเข้ารังอยู่ 2 แบบ คือ รูปท่อ และรูปแตร

สำหรับชันโรงที่สามารถเลี้ยงและให้ผลผลิตมี 4 ชนิด คือ ชันโรงปากแตรสั้น (*Lepidotrigona terminata* Smith) ชันโรงปากแตรยาว (*Lepidotrigona ventralis* Schwarz) ชันโรงถั่วย คำ (*Tetragonula laeviceps* Smith) และชันโรงขนเงิน (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) ทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะเฉพาะตัวคล้ายกัน มักอาศัยในโพรงธรรมชาติเหนือดิน เช่น โพรงต้นไม้ อาคารบ้านเรือน ต่างกันที่ปากทางเข้ารัง ซึ่งเป็นท่อสั้นหรือยาว หรือรูปแตร รวมถึงรูปแบบการเรียงตัวของถ้วยตัวอ่อนและถ้วยอาหาร ซึ่งมีทั้งแบบกลุ่มและแบบแผ่ซ้อน โดยชันโรงขนเงินเป็นชนิดที่แข็งแรงและมีการกระจายพันธุ์ที่กว้างที่สุด จึงนิยมเลี้ยงกันมากที่สุด

2.3 ชัน

ชันจัดเป็นสารเรซิน ซึ่งถูกรวบรวมไว้ตามกิ่งต่างๆ ของต้นไม้ เช่น ตาใบ และเปลือกต้นไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นพอลาร์ (Poplar) และต้นสน ชันโรงใช้ประโยชน์จากชันรวมถึงขี้ผึ้ง

เพื่อที่จะทำเป็นโครงสร้างของรังผึ้ง ชั้นมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial) ซึ่งช่วยปกคลุมหรือปิดทับให้เกรงผึ้ง

2.3.1 ส่วนประกอบของชั้น

ส่วนประกอบของชั้น ได้แก่ สารจำพวกเรซินร้อยละ 50 สารจำพวกไขร้อยละ 30 สารจำพวกน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 สารจำพวกละอองจากเกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และที่เหลือร้อยละ 5 จะเป็นพวกแร่ธาตุและสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น สารประกอบฟีนอลิก, สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (10)

2.3.2 ฤทธิ์ของชั้น

1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สำหรับฤทธิ์ของชั้นในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสัมพันธ์กับการที่ชั้นมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ คือ ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น Xanthine oxidase, Protein kinase C, Ascorbic acid oxidase, Cyclooxygenase, Lipoxxygenase, Na^+/K^+ ATPase และ cAMP phosphodiesterase ทำให้ยับยั้งการสร้างพวก ROS species ซึ่งเป็นพวกอนุมูลอิสระได้ (6, 11, 12)

2) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-Inflammation)

มีการศึกษาเกี่ยวกับชั้นในเรื่องฤทธิ์การต้านอักเสบ โดยพบว่าสัมพันธ์กับการที่ชั้นต่อสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของเซลล์ได้ (13)

3) ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (Antimicrobial)

(1) ฤทธิ์การต้านเชื้อรา (Antifungal)

ในปัจจุบันได้มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของชั้นต่อการยับยั้งเชื้อรา โดยผลของแต่ละการศึกษาอาจแตกต่างกันไป ตามแหล่งที่มา แต่ส่วนใหญ่จะพบว่ามีรายงานฤทธิ์ของชั้นต่อการต้านเชื้อรา *Candida albicans* โดยการไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากเชื้อ *Candida albicans* ยังมี

การรายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้ออื่น เช่น *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* เป็นต้น

(2) ฤทธิ์การต้านไวรัส (Antiviral)

มีการศึกษาพบฤทธิ์ในการต้านไวรัสของชันต่อไวรัสพวก Avian influenza virus และ Herpes simplex virus type 1 (3, 14)

(3) ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของชัน ซึ่งพบว่าชันสามารถต้านเชื้อได้ แต่จะมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียได้มากกว่าแบคทีเรียและจากการศึกษาหลายงานวิจัย พบว่าการที่ชันสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้นั้นเกิดจากการที่ชันมีกลไกด้านการเคลื่อนไหวของเชื้อและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามพบว่าฤทธิ์ที่แสดงยังเป็นเพียงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Bacteriostatic) แต่กรณีที่จะแสดงฤทธิ์ทำให้เชื้อแบคทีเรียตาย (Bactericidal) พบว่าต้องมีการใช้ความเข้มข้นที่สูง โดยเชื้อที่มีการรายงานว่าสามารถถูกยับยั้งได้นั้น พบว่ามี *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterococcus faecalis* อย่างไรก็ตามพบว่า การที่ชันได้มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การยับยั้งเชื้อแตกต่างกันไป แต่จะพบว่ามีเชื้อชนิดหนึ่งที่ไม่ว่าจะนำชันที่สกัดด้วย Ethanol มาจากแหล่งใดก็ตาม ต่างก็ให้ผลในการยับยั้งเชื้อชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน โดยเชื่อดังกล่าวคือ *Staphylococcus aureus* (15, 16)

2.4 เชื้อ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus เป็นจุลินทรีย์ใน Family micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติยอมติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม (0.5-1.0 ไมครอน) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เชลล์) *Staphylococcus* ไม่เคลื่อนที่ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบนูน มีสีครีม เหลือง ส้ม (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอนอยต์ในเชลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ)

Staphylococcus aureus สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 °C โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30-37 °C ทนความร้อนที่ 60 °C นาน 30 นาที สามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิมากกว่า 10 °C ค่า pH ที่สามารถเจริญได้ในช่วง 4.0-10.0 สามารถทนเกลือที่ความเข้มข้น 18-20% *Staphylococcus aureus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝีหนอง รวมถึงในดินฝุ่นละออง (7)

2.5 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

S Castaldo และ F Capasso (2002) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Propolis an old remedy used in modern medicine” เกี่ยวกับองค์ประกอบสารสำคัญที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งพบว่าในสารสกัดของชันนั้นประกอบด้วย Flavonoids, Phenolic acids และ Esters ต่างๆ โดยมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และรา ฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ ฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันของร่างกาย และฤทธิ์ลดความดันโลหิตและไขมันในเลือด (17)

F M Oliveira, Y M Fonseca, O D Freitas และ M J V Fonseca (2007) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development of topical functionalized formulations added with propolis extract stability cutaneous absorption and in vivo studies” ผู้วิจัยมีความสนใจเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้องการพัฒนาสูตรตำรับให้มีความคงตัวทั้งทางกายภาพ และทางเคมี รวมถึงการดูดซึมผ่านผิวหนังที่มีประสิทธิภาพ ในการศึกษาพบว่าความคงตัวของตำรับจะมีการควบคุมอุณหภูมิและร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ คือ 25 ± 2 °C, 70% RH และ 25 ± 2 °C, 70% RH เป็นเวลาทั้งสิ้น 360 วัน ตำรับครีมและเจลมีความคงตัวตลอดการศึกษา (18)

F M Oliveira และคณะ (2012) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of western maharashtra india” ผู้วิจัยสนใจเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดชันจากชันโรงของประเทศอินเดีย พบว่ามีสารประกอบในสารสกัดทั้งหมด 24 ชนิด ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดจะมีผลต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* รวมถึงผู้วิจัยทำการศึกษาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วงของความเข้มข้นเท่ากับ 14.8 µg/mL ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (19)

M Y Ibrahim และคณะ (2016) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Alpha-mangostin from *Garcinia mangostana* linn an updated review of its pharmacological properties” โดยทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Alpha-mangostin ผลการศึกษาพบว่า Alpha-mangostin มีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (20)

M Velikova และคณะ (2000) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae” การศึกษาฤทธิ์ของชันในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยได้นำชัน มาจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันทั้งจากประเทศบราซิล กรีซ ตุรกี แอลจีเรีย และโปรตุเกส ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ชันที่สกัดจาก Absolute ethanol มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone อยู่ในช่วง 18.7-21.7mm (21)

M M J Soriano, M J Contreras และ E S Flores (2001) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development of a cream from a self-emulsifying base and moisturizing actives” ได้ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาการตั้งตำรับยาครีม ในการเป็น Self-emulsifying base และ Moisturizing actives พบว่าสูตรตำรับครีมที่ประกอบด้วย Self-emulsifying base 25.0 g, Phenonip™ 0.4 g, Glycerine 3.0 g, Lactil™ 5.0 g, Rosemary honey 7.0 g และ Distilled water qs to 100 g มีการพัฒนาการเตรียมตำรับให้มีความคงตัวของ Droplet และ คงความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี (22)

A Gupta และ P B Myrdal (2004) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development of a perillyl alcohol topical cream formulation” ได้ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาการตั้งตำรับยาครีมทา Perillyl alcohol พบว่าสูตรตำรับสารสำคัญที่ประกอบด้วย R-(+)-Perillyl alcohol 0.3% w/w, White petrolatum USP 0.8% w/w, Lanolin alcohol NF 0.8% w/w, Polyoxypropylene-2-myristyl ether propionate 4.2% w/w, Mineral oil (light) NF 8.3% w/w, Triethanolamine USP 1.0% w/w, Glycerin USP 3.3% w/w, Stearic acid USP 16.7% w/w, Isopropyl palmitate 12.5% w/w, Distilled water USP 51.49% w/w พบว่าตำรับดังกล่าวสามารถคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมีตลอดการศึกษาเป็นระยะเวลา 10 เดือน (23)

F M Oliveira, Y M Fonseca, O D Freitas และ M J V Fonseca (2007) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies” ได้มีการศึกษาการเตรียมตำรับครีมจาก

ชั้นของชั้นโรงแรงในแ่งมุ่มของฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เตรียมโดยการนำเอา Emulsifying agents คือ Polawax® (Cetosteryl alcohol และ Polyoxyethylene derived of a fatty acid ester of sorbitan 2OE) ซึ่งแสดงถึงความคงตัวของตำรับทั้งด้านกายภาพและทางด้านเคมีตลอดการศึกษา และตำรับครีมนี้ยังสามารถทำให้ตัวยาสำคัญซึมผ่านผิวหนังได้เป็นอย่างดี จึงมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับได้มากขึ้น (18)

S Smaouia, H Ben Hlimab, I B Chobbac และ A Kadric (2013) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters” ได้ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาการตั้งตำรับยาครีม พบว่าสูตรตำรับครีมที่ประกอบด้วย Benzophenone-3 5.0g และ 7.0g, Ethylhexyl methoxycinnamate 10.0g และ 7.0 g, Titanium dioxide 5g และ 6 g, Cetearyl alcohol 3.5g และ 3.5 g, Glycerol monostearate 3.5g และ 3.5 g, Cetearth-25 1.0g และ 1.0 g, Isopropyl palmitate 1.5 และ 1.5 g, Caprylic/capric triglyceride 1.5 และ 1.5 g, Polyethylene glycol 1.0 และ 1.0 g, Ethyl paraben 0.5 และ 0.5 g และ Distillate water 67.5 และ 67.5 g ทั้งสองตำรับยังคงมีคุณสมบัติความคงตัวตลอดการศึกษาเป็นระยะเวลา 30 วัน (24)

A P Mishra, S Sakla, L Milella และ P Tiwari (2014) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Formulation and evaluation of herbal antioxidant face cream of *Nardostachys jatamansi* collected from Indian Himalayan region” ได้มีการศึกษาการเตรียมตำรับครีมจาก *Nardostachys jatamansi* ในแ่งมุ่มของฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสูตรตำรับครีมที่ประกอบด้วย Ethanol extract 0.500 g, Stearic acid 1.000-1.200 g, Triethanolamine 0.160-0.165 g, Rose water 0.400 g, Paraffin oil 0.300 g, Moisturizer conditioner 1.200 g, Cetyl alcohol 0.100 g, Methyl paraben 0.018 g, Propyl paraben 0.002 g, Ethylene diamine tetraacetic acid 0.010 g และ Water Qs (Quantity sufficient) พบว่าตำรับครีมมีความคงตัวและสามารถเก็บไว้โดยไม่แยกชั้นวัฏภาคน้ำกับน้ำมัน (25)

ธนันธวัช และคณะ (2015) ได้ทำการพัฒนาสารสกัดชั้นที่ได้จากชั้นโรงแรงมาเตรียมอยู่ในรูปแบบตำรับครีม โดยได้นำชั้นมาจากจังหวัดจันทบุรี และนำมาสกัดในสารละลาย Ethanol นอกจากนี้ภายในงานวิจัยยังได้มีการทดสอบฤทธิ์ของชั้นต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งจากผลการวิจัยในงานดังกล่าวพบว่า ชั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ แต่ในส่วนของการพัฒนาสูตรตำรับครีมพบว่า ครีมที่เตรียมยังขาด

ความคงตัว โดยเมื่อนำไปเก็บที่สภาวะเร่ง ครีมจะมีลักษณะสีที่เข้มขึ้น จากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังพบการแยกชั้นของตำรับครีมเกิดขึ้น (7)

วนิดา อ่วมเจริญ และชามา พานแก้ว (2016) ได้ทำการศึกษาสารสกัดชั้นที่ได้จากชั้นโรง *Tetragonula pagdeni* ในฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเชื้อแกรมบวก และเชื้อแกรมลบที่ใช้คือ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ตามลำดับ โดยได้นำ ชันมาจาก 4 แหล่งที่แตกต่างกันในประเทศไทย คือ อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี อำเภอเกล้ง จังหวัดระยอง และอำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง ซึ่งมีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์จากชันที่นำมาทั้ง 4 แหล่ง ทั้งนี้เนื่องจากคาดว่าสารทั้งสองมีผลต่อฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยผลการวิจัยที่ได้พบว่า ชันที่นำมาจาก อำเภอเมืองระยอง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อทั้งแกรมบวกและแกรมลบ(26)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

1. ชันของชนโรงขนเงิน (*Tetragonula pegdeni*) จากสวนมังคุด จังหวัดจันทบุรี
2. Chloramphenicol
3. Ethanol absolute (Carlo Erba Reagents[®] Italy)
4. Ethanol absolute (QREC[®] New Zealand)
5. Methanol absolute (Labscan[®] Thailand)
6. n-Hexane (EMSURE[®] Germany)
7. SPAN 20
8. SPAN 60
9. SPAN 80
10. TWEEN 20
11. TWEEN 60
12. TWEEN 80

13. Isopropyl myristate
14. Jojoba oil
15. Mineral oil
16. Cetyl alcohol 95%
17. Stearyl alcohol
18. Spermaceti
19. Propylene glycol
20. Butylated hydroxytoluene
21. Glycerin
22. Vaseline
23. Paraben (Methyl paraben 10%, Propyl paraben 2% in propylene glycol)
24. Zohar GLST SE[®] (self-emulsifiable glyceryl monostearate)
25. pH 4.01 Calibration pH solvent
26. pH 7.00 Calibration pH solvent
27. pH 9.21 Calibration pH solvent
28. Potassium chloride
29. Methylene blue 1%
30. Methanol for HPLC (VWR Chemical[®] European Community)
31. Formic acid 85% (QREC[®] New Zealand)
32. Sterile water for irrigation (GHP[®] Thailand)

33. McFarland Turbidity Standard 0.5 (Thermo scientific[®] China)

34. Dimethyl sulfoxide (Carlo Erba Reagents[®] Italy)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (DMST8840)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soya broth (CM0129 500g OXOID[®] England)

2. Mueller-hinton agar (CM0337 OXOID[®] England)

3. Mueller-hinton broth (CM0405 OXOID[®] England)

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Analytical Balance New Classic MS ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo[®] The United States of America)

2. Analytical Balance New Classic MS ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo[®] The United States of America)

3. Centrifuge Sorvall Legend X1R (Thermofisher[®] The United States of America)

4. Centrifuge tube 50mL

5. Rotary evaporator Rotavapor R-210 (Buchi[®] Switzerland)

6. Recirculating Chiller F-100 (Buchi[®] Switzerland)

7. Heating Bath B-491 (Buchi[®] Switzerland)

8. Vacuum Controller V-850 (Buchi[®] Switzerland)

9. Vacuum Pump V-700 (Buchi[®] Switzerland)

10. Round bottom flask

11. Aluminum foil

12. Funnel 70 mL

13. Measuring cylinder 10 mL
14. Measuring cylinder 25 mL
15. Measuring cylinder 50 mL
16. Measuring cylinder 100 mL
17. Measuring cylinder 1000 mL
18. Fume Hood FH-45 (SK Powerable[®] Thailand)
19. Separatory funnel 500 mL
20. Hot Plate
21. Beaker 50 mL
22. Beaker 100 mL
23. Beaker 150 mL
24. Beaker 250 mL
25. Beaker 600 mL
26. Beaker 1000 mL
27. Glass stirring rod 7"
28. Thermometer 0-100 °C
29. Crucible Tongs
30. Watch glass Ø 6 cm
31. Watch glass Ø 10 cm
32. Dropper
33. ขวดแก้ว 50 cc
34. Water bath
35. ช้อนเขาสีดำ
36. ช้อนอลูมิเนียม
37. Centrifuge MPW-260R (MPW[®] Germany)
38. Microcentrifuge tube 1.5 mL
39. pH Meter SevenMulti (Mettler Toledo[®] The United States of America)
40. Microscope Eclipse E200 (Nikon[®] Thailand)
41. Ultrasonic Cleaner Digital 100 L (Wiseclean[®] Germany)

42. Membrane filter Nylon 0.2 um diameter 47 mm (Whatman[®] UK)
43. Forceps
44. HPLC pressure bottle system Duran glass bottle 1 L
45. Syringe 3mL
46. Syringe 5mL
47. ชุดกรองสูญญากาศ
48. Volumetric flask 5 mL
49. Volumetric flask 10 mL
50. Volumetric flask 25 mL
51. Micropipette 2-20 uL Finnpiptette F1 (Thermo scientific[®] China)
52. Micropipette 100-1000 uL Finnpiptette F1 (Thermo scientific[®] China)
53. Micropipette 1-10 mL Finnpiptette F1 (Thermo scientific[®] China)
54. Micropipette 30-300 uL Finnpiptette F2 (Thermo scientific[®] China)
55. Micropipette tips 0.5-20 uL
56. Micropipette tips 20-300 uL
57. Micropipette tips 100-1000 uL
58. Syringe filter Nylon 13 mm 0.22 um with luer lock 13 mm (Lubitech[®] China)
59. HPLC Vial 1.5 mL
60. High-performance liquid chromatography 1260 Infinity (Agilent technologies[®] Malaysia)
61. Column HPLC Hypersil BDS C18 column (Thermo scientific[®] China)
62. Biological Safety cabinets BCS Class II AC2-4G8 (ESCO[®] The United States of America)
63. Incubator Model RI-115 (Binder-Redline[®] Germany)
64. 96 Well plate
65. Test tube 10 mL
66. Test tube 13 mL
67. Test tube holder

68. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert[®])
69. ตู้เย็น (Panasonic ecoseries)
70. ตู้ึ่งฆ่าเชื้อ (HICLAVE HVA-84 Autoclave)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดชั้นของชั้นโรง

1. นำชั้นจากชั้นโรงไปชั่งน้ำหนัก 450 g พร้อมจดบันทึกน้ำหนัก
2. สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol 99.9% ปริมาตร 1,160 mL
3. นำสารแขวนตะกอนไปเขย่าด้วยเครื่อง Sonicator ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ
4. นำชั้นไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ที่อุณหภูมิ 20 °C อัตราความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง
5. นำสารละลายชั้นที่ปั่นแยกตะกอนแล้วไประเหยตัวทำละลาย Ethanol ออกจากสารสกัดด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C ความดัน 200 mbar
6. กำจัด Wax โดยใช้สารละลาย Methanol และ Hexane และเก็บชั้นสารละลายใน Methanol
7. นำสารสกัดจากชั้น Methanol มาระเหย Methanol ออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C และสภาวะความดัน 140 mbar

3.2.2 การคำนวณร้อยละผลผลิต

ผลผลิตร้อยละ = (น้ำหนักของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรงหลังระเหยตัวทำละลาย/น้ำหนักของชั้นจากของชั้นโรงในตอนแรกก่อนการสกัด)×100

3.2.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลว สมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

1) สภาวะ HPLC

สภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Alpha-mangostin รวมถึงการทวนสอบเครื่องมือมีรายละเอียดดังนี้

Stationary Phase

Column: C-18 BDS Hypersil 250x4.6 mm, Particle size 5 μ m

Guard column: C-18

Mobile phase

Gradient elution A: B

A: Methanol

B: 0.2% formic acid in water

- Time 0 min A 75% B 25%, Flow 1 ml/min
- Time 10 min A 90% B 10%, Flow 1 ml/min
- Time 15 min A 100% B 0%, Flow 1 ml/min
- Time 25 min A 100% B 0%, Flow 1 ml/min
- Time 35 min A 75% B 25%, Flow 1 ml/min

UV detector: 245 nm

Injection volume: 10 μ l

Retention time: 21.1 minutes

2) การทำ Standard curve ของ Alphamangostin

สร้างกราฟ Standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และความเข้มข้นของ Alpha-mangostin โดยเตรียมสารละลายใน Methanol ความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.045 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.09 mg/mL, 0.18 mg/mL, และ 0.24 mg/mL

การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่าง นำสารสกัดชั้นของชั้นโรงละลายในตัวทำละลาย Methanol กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 μ m จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ Alpha-mangostin ด้วย HPLC วิเคราะห์ 3 ครั้ง หาปริมาณ Alpha-

mangostin จากสมการที่ได้จาก Standard curve และหาร้อยละของ Alpha-mangostin ในสารสกัด ดังสมการ

ร้อยละของ Alpha-mangostin = (ความเข้มข้นของ Alpha-mangostin/ความเข้มข้นของสารสกัด)×100

3) วิเคราะห์ปริมาณ Alpha-mangostin ของสูตรตำรับครีม

ชั่งสูตรตำรับครีมที่มีสารสกัดชั้นของชั้นโรง 0.5 g ใส่ลงใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรโดยตัวทำละลาย Methanol นำสารละลายมา Sonicate เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (Centifuge) นำส่วนที่เป็นสารละลายใสมากรองผ่าน membrane ขนาด 0.22 µm จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Alpha-mangostin ของสูตรตำรับครีม ด้วยเครื่อง HPLC

3.2.4 การวิเคราะห์ความคงตัว

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับครีม โดยคงสภาวะการจัดเก็บใน 2 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH เป็นระยะเวลา 30 วัน และที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH เป็นระยะเวลา 30 วัน (18)

1) ความคงสภาพทางเคมี

- (1) วัด pH ของตำรับครีม โดยวัดวันที่ 0 วันที่ 15 และวันที่ 30
- (2) วิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงในตำรับครีม โดยวิเคราะห์วันที่ 0 วันที่ 15 และวันที่ 30

2) ความคงสภาพทางกายภาพ

- (1) สังเกตลักษณะภายนอกของครีม เช่น ลักษณะของเนื้อครีม สี การแยกชั้น สถานะของครีม เป็นต้น
- (2) วิเคราะห์ความคงตัวของตำรับครีมด้วยเครื่อง Centrifuge โดยนำตัวอย่างครีม 1.5 g ไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราความเร็วรอบ 4,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที โดยวิเคราะห์ในวันที่ 1 หลังเตรียมตำรับ

3.2.5 การพัฒนาสูตรตำรับครีมเบส (27, 28)

การพัฒนาสูตรยาพื้นหรือครีมเบส จะมีการปรับเปลี่ยนสูตรทำอิมัลชัน เพื่อให้ได้สูตรยาพื้นที่มีความคงตัวและเหมาะสมมากที่สุด ก่อนที่จะใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรงลงไป โดยมีการปรับเปลี่ยนอิมัลชันดังนี้คือ

Span 80 กับ Tween 80 (CBS1) ดังตารางที่ 1

Span 60 กับ Tween 60 (CBS2) ดังตารางที่ 2

Span 60 กับ Tween 20 (CBS3) ดังตารางที่ 3

Zohar GLST SE กับ Tween 80 (CBS4) ดังตารางที่ 4

Zohar GLST SE กับ Tween 60 (CBS5) ดังตารางที่ 5

Zohar GLST SE กับ Tween 20 (CBS6) ดังตารางที่ 6

โดยมีวิธีเตรียมคือ

การเตรียม Phase oil

ผสมสารที่เป็น Phase oil เรียงลำดับตามจุดหลอมเหลวจากมากไปน้อยเรียงตามลำดับ ลงในปิกเกอร์และตั้งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70°C

การเตรียม Phase water

เติมน้ำกลั่นตามปริมาตรในตำรับลงในปิกเกอร์ ใส่สารอื่นในตำรับลงในปิกเกอร์ และตั้งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 72°C

การเตรียม O/W Emulsion

เทสารจากปิกเกอร์ Water phase ลงใน Oil phase และใช้แท่งแก้วคนจนได้เป็นเนื้อครีมและตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับ CBS 1

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 1	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
Span 80	4.18
Phase water	
Water	56.50
Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 80	2.82

ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับ CBS 2

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 2	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
Span 60	2.89
Phase water	
Water	56.50

Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 60	4.11

ตารางที่ 3 แสดงสูตรตำรับ CBS 3

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 3	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Joboba oil	5.00
Span 60	3.51
Phase water	
Water	56.50
Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 20	3.49

ตารางที่ 4 แสดงสูตรตำรับ CBS 4

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 4	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Joboba oil	5.00

Zohar GLST SE	3.17
Phase water	
Water	56.50
Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 80	3.82

ตารางที่ 5 แสดงสูตรตำรับ CBS 5

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 5	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Joboba oil	5.00
Zohar GLST SE	3.13
Phase water	
Water	56.50
Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 60	3.87

ตารางที่ 6 แสดงสูตรตำรับ CBS 6

สูตรตำรับครีมฟัน CBS 6	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00

Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
Zohar GLST SE	3.75
Phase water	
Water	56.50
Propylene glycol	10.00
Paraben	0.50
Tween 20	3.25

หมายเหตุ : ปริมาณ สารทำอิมัลชัน ในตำรับรวมกันเท่ากับ 7 %

นำตำรับครีมพื้นที่คงตัวมาพัฒนาต่อ โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรงลงไป

3.2.6 การพัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีสารสกัดชั้นของชั้นโรง

เตรียมสูตรตำรับครีมที่มีสารสกัดชั้นของชั้นโรง โดยปรับเปลี่ยนค่า HLB ของตำรับ เพื่อหาค่า HLB ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สูตรตำรับครีมของสารสกัดชั้นของชั้นโรงมีความคงตัว โดยสูตรที่เตรียมมีดังนี้คือ

Zohar GLST SE กับ Tween 60 (CPS5) ใส่สารสกัดชั้น ที่ HLB 10 ดังตารางที่ 7

Zohar GLST SE กับ Tween 60 (CPS5) ใส่สารสกัดชั้น ที่ HLB 12 ดังตารางที่ 7

Zohar GLST SE กับ Tween 20 (CPS6) ใส่สารสกัดชั้น ที่ HLB 10 ดังตารางที่ 8

Zohar GLST SE กับ Tween 20 (CPS6) ใส่สารสกัดชั้น ที่ HLB 12 ดังตารางที่ 8

โดยมีวิธีเตรียมคือ

การเตรียม Phase oil

ผสมสารที่เป็น Phase oil เรียงลำดับตามจุดหลอมเหลวจากมากไปน้อยเรียงตามลำดับ ลงในปิกเกอร์และตั้งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70°C

การเตรียม Phase water

เติมน้ำกลั่นตามปริมาณในตำรับลงในปิกเกอร์ ใส่สารอื่นในตำรับลงในปิกเกอร์ และตั้งให้ร้อนที่อุณหภูมิ 72°C (27, 28)

การเตรียม O/W Emulsion

เทสารจากปิกเกอร์ Water phase ลงใน Oil phase และใช้แท่งแก้วคนจนได้เป็นเนื้อครีมและตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 และ 12

CPS5	ร้อยละในตำรับ	
	HLB 10	HLB 12
Phase oil		
Spermaceti	4.00	4.00
Stearyl alcohol	5.00	5.00
Cetyl alcohol	3.00	3.00
Vaseline	5.00	5.00
IPM	4.00	4.00
Jojoba oil	5.00	5.00
Propolis extract	5.00	5.00
Zohar GLST SE	3.65	2.16
Phase water		
Water	51.50	51.50
Propylene glycol	10.00	10.00
Paraben	0.50	0.50
Tween 60	3.35	4.84

ตารางที่ 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 6 HLB 10 และ 12

CPS6	ร้อยละในตำรับ	
	HLB 10	HLB 12
Phase oil		
Spermaceti	4.00	4.00
Stearyl alcohol	5.00	5.00
Cetyl alcohol	3.00	3.00
Vaseline	5.00	5.00
IPM	4.00	4.00
Jojoba oil	5.00	5.00
Propolis extract	5.00	5.00
Zohar GLST SE	4.19	2.94
Phase water		
Water	51.5	51.5
Propylene glycol	10.00	10.00
Paraben	0.50	0.50
Tween 20	2.81	4.06

นำตำรับที่ได้และคงตัวที่สุดมาพัฒนาต่อและคำนวณปรับ HLB มีค่า 9, 9.5, 10.5 และ 11 สำหรับการทดสอบเชื่อจะต้องมีการปรับสูตรโดยไม่เติม paraben ลงไป เพื่อให้ผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงถูกรบกวนจากการมีสารอนมในตำรับ ดังนั้นจึงมีการเตรียมสูตรดังนี้ คือ

CBS 5 ไม่ใส่ Paraben (CBS5-NP) ที่ HLB10 ดังตารางที่ 9

CPS 5 ไม่ใส่ Paraben (CPS5- NP) ที่ HLB10 ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 9 แสดงสูตรตำรับครีมเบส CBS 5 HLB 10 (Non-paraben)

CBS5-NP	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
Zohar GLST SE	3.65
Phase water	
Water	57.00
Propylene glycol	10.00
Tween 60	3.35

ตารางที่ 10 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 (Non-paraben)

CPS5-NP	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
Propolis extract	5.00
Zohar GLST SE	3.65
Phase water	
Water	52.00

Propylene glycol	10.00
Tween 60	3.35

ในการทดสอบความคงตัวจะมีการเตรียมสูตรตำรับครีมจากสารสกัดชั้นของชั้นโรงที่ใส่สาร Antioxidant (Butylated hydroxytoluene; BHT) ซึ่งมีการเตรียมสูตรตำรับ CPS5-AO ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO HLB 10

CPS5-AO	ร้อยละในตำรับ
Phase oil	
Spermaceti	4.00
Stearyl alcohol	5.00
Cetyl alcohol	3.00
Vaseline	5.00
IPM	4.00
Jojoba oil	5.00
BHT	0.10
Propolis extract	5.00
Zohar GLST SE	3.65
Phase water	
Water	51.40
Propylene glycol	10.00
Tween60	3.35

3.2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (29, 30)

1) การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

อุปกรณ์และเครื่องแก้วทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) 121 °C 15 นาที

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด ได้แก่ Mueller Hinton Agar, Mueller Hinton Broth, Tryptic Soy Broth

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดคือ เทผงอาหาร โดยชั่งน้ำหนักตามฉลาก นำมาผสมในน้ำกลั่น และทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3) การเตรียมเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใน Tryptic Soy Broth และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C

4) การทำ Disk diffusion เพื่อศึกษา Inhibition zone

นำ Plate ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar ไปทำให้แห้ง ใน Laminar flow cabinet จากนั้น Swab เชื้อ *Staphylococcus aureus* (10^8 CFU/mL) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร หยดสารละลายของ Alpha-mangostin และสารสกัดชั้นของชั้นโรงที่ความเข้มข้นต่างๆที่ละลายด้วย 100% DMSO ปริมาณ 20 μ l ใส่ในแผ่นกรอง นำไปอบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วจึงวางบน Plate บ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C บันทึกวัดผล Inhibition zone (mm.) และสรุปผล โดยการทดลองแบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม

Positive control: แผ่นยา Oxacillin (1 μ g), Tetracycline (30 μ g)

Negative control: Methanol 100%, Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

ชุดทดลอง, แผ่น Diskเปล่า (Blank)

Alpha-mangostin: ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.250 และ 12.500 mg/mL โดยมีตัวทำละลายเป็น 100% DMSO

สารสกัดชั้นของชั้นโรง: ที่ความเข้มข้น 0.045, 0.090, 0.180, และ 0.360 mg/mL โดยมีตัวทำละลายเป็น 100% DMSO

5) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum bactericidal concentration; MBC) ของสารสกัด โดยใช้ Broth microdilution method

เตรียมสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.015, 0.03, 0.06, 0.096, 0.12, 0.24, 0.48, และ 0.96 mg/mL ใน Methanol จากนั้น ปิเปต 7.5 μ L ลงใน 96 Well plate และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth 242.5 μ L และเชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L (ปริมาตรสุทธิ 300 μ L) ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ Alpha-mangostin เป็น 0.375, 0.750, 1.500, 2.400, 3.000, 6.000, 12.000, และ 24.000 μ g/mL ตามลำดับ

เตรียมสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.119, 0.2238, 0.4476, 0.7162, 0.8953, 1.7906, 3.5812, และ 7.1623 mg/mL ใน Methanol จากนั้นปิเปต 7.5 μ L ลงใน 96 Well plate และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth 242.5 μ L และเชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L (ปริมาตรสุทธิ 300 μ L) ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.7978, 5.5955, 11.1911, 17.9058, 22.3822, 44.7644, 89.5288, และ 179.0575 μ g/mL ตามลำดับ

สำหรับชุดควบคุม (Control) ปิเปตสารลงใน 96 Well plate ตามรายละเอียด ดังนี้

ชุดการศึกษา Standard alpha-mangostin

Positive control

- Mueller Hinton Broth 242.5 μ L + Methanol 7.5 μ L
- + เชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L
- Mueller Hinton Broth 242.5 μ L + Water 7.5 μ L
- + เชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L

Negative control

- Mueller Hinton Broth 292.5 μ L + Methanol 7.5 μ L

- Mueller Hinton Broth 292.5 μ L + Methanol 7.5 μ L

ชุดการศึกษาสารสกัดจากชันโรง

Positive control

- Mueller Hinton Broth 242.5 μ L + Methanol 7.5 μ L +

เชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L

- Mueller Hinton Broth 242.5 μ L + Water 7.5 μ L +

เชื้อ *Staphylococcus aureus* 50 μ L

Negative control

- Mueller Hinton Broth 292.5 μ L + Methanol 7.5 μ L

- Mueller Hinton Broth 292.5 μ L + Methanol 7.5 μ L

จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น นำ 96-Well Plate ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm หากสารละลายมีความใสจะนำ Loop จุ่มสารละลายเพื่อนำไป Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar จากนั้นนำ Plate ไปบ่มในเครื่อง Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

3.2.8) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ Friedman และ Wilcoxon

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง

ตารางที่ 12 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง

น้ำหนักชั้นก่อน สกัด (g)	น้ำหนักชั้นหลัง สกัด (g)	% Yield	% Alpha-mangostin ในสารสกัด
898.40	127.13	14.15	13.40

4.2 ผลการพัฒนาสูตรตำรับครีม

การพัฒนาสูตรตำรับครีม

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 1 HLB 10.69

มีการใช้คู่สารทำอิมัลชันคือ คู่ Span 80 กับ Tween 80

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol
4. Vaseline
5. IPM
6. Jojoba oil
7. Span 80

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 80

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 2 HLB 10.69

ส่วนประกอบเหมือนสูตร CBS1 แต่เปลี่ยนคู่ทำอิมัลชันเป็น Span 60 กับ Tween 60

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol
4. Vaseline
5. IPM
6. Jojoba oil
7. Span 60

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 60

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 3 HLB 10.69

ส่วนประกอบเหมือนสูตร CBS1 แต่เปลี่ยนคู่ทำอิมัลชันเป็น Span 60 กับ Tween 20

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol
4. Vaseline
5. IPM
6. Jojoba oil
7. Span 60

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 20

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 4 HLB 10.69

ส่วนประกอบเหมือนสูตร CBS1 แต่เปลี่ยนคู่ทำอิมัลชันเป็น Zohar GLST SE กับ

Tween 80

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol
4. Vaseline

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 80

5. IPM
6. Jojoba oil
7. Zohar GLST SE

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 5 HLB 10.69

ส่วนประกอบเหมือนสูตร CBS1 แต่เปลี่ยนคู่ทำอิมัลชันเป็น Zohar GLST SE กับ

Tween 60

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	

สูตรตำรับครีมพื้น CBS 6 HLB 10.69

ส่วนประกอบเหมือนสูตร CBS1 แต่เปลี่ยนคู่ทำอิมัลชันเป็น Zohar GLST SE กับ

Tween 20

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 20
4. Vaseline	
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีมเบส CBS 1 – 6

การพัฒนาสูตรตำรับ			
สูตรตำรับครีมพื้น	HLB	ลักษณะทางกายภาพ	ผลหลังปั่นเหวี่ยง
CBS 1	10.69	เนื้อครีมสีขาว นิ่ม แต่กระจายบนผิวไม่ดี	เกิดการแยกชั้น
CBS 2	10.69	เนื้อครีมสีขาว แข็ง แต่มั่นเกินไป ไม่เหมาะนำมาทาผิว	ไม่เกิดการแยกชั้น
CBS 3	10.69	เนื้อครีมสีขาว ไม่มัน เนื้อแข็ง แต่กระจายบนผิวไม่ดี	เกิดการแยกชั้น
CBS 4	10.69	เนื้อครีมสีขาว แต่มั่นเกินไป ไม่เหมาะนำมาทาผิว	ไม่เกิดการแยกชั้น
CBS 5	10.69	เนื้อครีมสีขาว แข็ง ไม่มัน เข้าผิวดี	ไม่เกิดการแยกชั้น
CBS 6	10.69	เนื้อครีมสีขาว นิ่ม ไม่มัน เข้าผิวดี	ไม่เกิดการแยกชั้น

*เลือกสูตร CBS5 กับ CBS6 มาพัฒนาต่อ โดยทดลองใส่สารสกัดชั้นของชั้นรองลงไนครีมพื้น รวมถึงปรับค่า HLB ซึ่งแต่ละสูตรจะปรับค่าเป็น HLB10 กับ HLB12

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 10

สูตรตำรับนี้ถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 12

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 12

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS6 HLB 10

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS6 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 20
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS6 HLB 12

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS6 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 12

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 20
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

ตารางที่ 14 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5 HLB10, CPS5 HLB12, CPS6 HLB 10 และ CPS6 HLB12

การพัฒนาสูตรตำรับ			
สูตรตำรับครีม	HLB	ลักษณะทางกายภาพ	ผลหลังการปั่นเหวี่ยง
CPS5	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชัน ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี	ไม่เกิดการแยกชั้น
CPS5	12	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชัน ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี แต่เนื้อไม่เนียน มัน	เกิดการแยกชั้น
CPS6	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชัน ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี แต่เนื้อไม่เนียน	เกิดการแยกชั้น
CPS6	12	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชัน ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี แต่เนื้อไม่เนียน มัน	เกิดการแยกชั้น

จากผลการเตรียมตำรับพบว่าสูตร CPS5 HLB 10 เหมาะสมในการนำมาพัฒนาต่อเนื่องจากเนื้อครีมมีสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชัน ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี รวมถึงหลังปั่นเหวี่ยงครีมไม่เกิดการแยกชั้น จากนั้นคำนวณปรับ HLB เป็น 9, 9.5, 10.5, 11 ตามลำดับ

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 9

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชันของชันโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 9 ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 60

- | | |
|---------------------|------------|
| 4. Vaseline | 4. Paraben |
| 5. IPM | |
| 6. Jojoba oil | |
| 7. Zohar GLST SE | |
| 8. Propolis extract | |

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 9.5

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 9.5

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

- | | |
|---------------------|---------------------|
| Phase oil | Phase water |
| 1. Spermaceti | 1. Water |
| 2. Stearyl alcohol | 2. Propylene glycol |
| 3. Cetyl alcohol | 3. Tween 60 |
| 4. Vaseline | 4. Paraben |
| 5. IPM | |
| 6. Jojoba oil | |
| 7. Zohar GLST SE | |
| 8. Propolis extract | |

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 10.5

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 10.5

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

- | | |
|--------------------|---------------------|
| Phase oil | Phase water |
| 1. Spermaceti | 1. Water |
| 2. Stearyl alcohol | 2. Propylene glycol |
| 3. Cetyl alcohol | 3. Tween 60 |
| 4. Vaseline | 4. Paraben |
| 5. IPM | |

6. Jojoba oil
7. Zohar GLST SE
8. Propolis extract

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5 HLB 11

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 11

ลักษณะทางกายภาพ

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil

1. Spermaceti
2. Stearyl alcohol
3. Cetyl alcohol
4. Vaseline
5. IPM
6. Jojoba oil
7. Zohar GLST SE
8. Propolis extract

Phase water

1. Water
2. Propylene glycol
3. Tween 60
4. Paraben

ตารางที่ 15 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5

การพัฒนาสูตรตำรับ			
สูตรตำรับครีม	HLB	ลักษณะทางกายภาพ	ผลหลังการปั่นเหวี่ยง
CPS5	9	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ของสารสกัดชั้น เนื้อเนยข้น แข็ง	เกิดการแยกชั้น
CPS5	9.5	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ของสารสกัดชั้น ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี แต่มีมันเล็กน้อย	ไม่เกิดการแยกชั้น
CPS5	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ของสารสกัดชั้น ทาแล้ว กระจายเข้าผิวดี	ไม่เกิดการแยกชั้น
CPS5	10.5	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ของสารสกัดชั้น ทาแล้ว กระจายเข้าผิวดี แต่เนื้อ ครีมจะเกินไป	เกิดการแยกชั้น
CPS5	11	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ของสารสกัดชั้น ทาแล้ว กระจายเข้าผิวดี แต่เนื้อ ครีมจะและมันเกินไป	เกิดการแยกชั้น

จากผลการปรับเปลี่ยนค่า HLB พบว่าตำรับครีม CPS5 HLB 10 มีลักษณะทางกายภาพที่น่าพึงพอใจที่สุด โดยเนื้อครีมมีสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชั้น ทาแล้วกระจายเข้าผิวดี รวมถึงผลจากการปั่นเหวี่ยงไม่พบการแยกชั้น จึงเลือกเป็นตำรับที่ใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับตำรับ CPS5 HLB 10 ที่นำมาใช้ทดสอบต่อไป จะนำมาทดสอบความคงตัว โดยจะเปรียบเทียบระหว่างสูตรที่ได้ Antioxidant (AO) กับสูตรที่ไม่ได้ Antioxidant (NAO) ซึ่งสูตรตำรับที่เตรียมมีดังนี้คือ

สูตรครีมเบส CBS5 ไม่ใส่ Antioxidant (CBS5-NAO) ที่ HLB 10

สูตรครีมชั้น CPS5 ไม่ใส่ Antioxidant (CPS5- NAO) ที่ HLB 10

สูตรครีมเบส CBS5 ใส่ antioxidant (CBS5- AO) ที่ HLB 10

สูตรครีมชั้น CPS5 ใส่ antioxidant (CPS5- AO) ที่ HLB 10

สูตรตำรับครีม CBS5-NAO (HLB 10)

สูตรตำรับ CBS5 ที่ปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	

สูตรตำรับครีม CBS5-AO (HLB 10)

สูตรตำรับ CBS5 ที่ปรับค่า HLB เท่ากับ 10 และใส่สาร Antioxidant

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. BHT	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO (HLB 10)

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรง และปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO (HLB 10)

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นโรงและใส่สาร Antioxidant

รวมถึงปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	4. Paraben
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	
9. BHT	

ตารางที่ 16 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NAO, CBS5-AO, CPS5-NAO และ CPS5-AO

การพัฒนาสูตรตำรับ			
สูตรตำรับครีม	HLB	ลักษณะทางกายภาพ	ผลหลังการปั่นเหวี่ยง
ยาพื้น (CBS5-NAO)	10	เนื้อครีมสีขาว ทาผิวแล้วไม่มัน กระจายบนผิวดี	เนื้อครีมแยกเล็กน้อย
ยาพื้น (CBS5-AO)	10	เนื้อครีมสีขาว ทาผิวแล้วไม่มัน กระจายบนผิวดี	เนื้อครีมแยกเล็กน้อย
ครีมชั้น (CPS5-NAO)	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ทาผิวแล้วไม่มัน กระจายบนผิวดี	เนื้อครีมแยกเล็กน้อย
ครีมชั้น (CPS5-AO)	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น ทาผิวแล้วไม่มัน กระจายบนผิวดี	เนื้อครีมแยกเล็กน้อย

โดยจากตารางที่ 16 พบว่าครีมพื้นทั้ง CBS5-NAO และ CBS5-AO เนื้อครีมที่เตรียมได้มีสีขาว ทาผิวแล้วไม่มัน กระจายผิวดี ในขณะที่ครีมจากสารสกัดชั้นของชั้นโรงทั้ง CPS5-NAO และ CPS5-AO เนื้อครีมจะมีสีเหลือง มีกลิ่นของสารสกัดชั้น ทาผิวแล้วไม่มัน รวมถึงกระจายบนผิวดี

สำหรับการทดสอบเชื้อจะต้องมีการปรับสูตรโดยไม่เติม paraben ลงไป เพื่อไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงถูกรบกวนจากการมีสารถนอมในตำรับ ดังนั้นจึงมีการเตรียมสูตรดังนี้ คือ

CBS5 ไม่ใส่ Paraben (CBS5-NP) ที่ HLB10

CPS5 ไม่ใส่ Paraben (CPS5- NP) ที่ HLB10

สูตรตำรับยาพื้น CBS5-NP HLB 10

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 แต่ไม่ได้ Paraben และปรับค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	

สูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NP HLB 10

สูตรตำรับถูกพัฒนาจาก CBS5 โดยใส่สารสกัดชั้นของชันโรง แต่ไม่ได้ Paraben และปรับ

ค่า HLB เท่ากับ 10

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

Phase oil	Phase water
1. Spermaceti	1. Water
2. Stearyl alcohol	2. Propylene glycol
3. Cetyl alcohol	3. Tween 60
4. Vaseline	
5. IPM	
6. Jojoba oil	
7. Zohar GLST SE	
8. Propolis extract	

ตารางที่ 17 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NP และ CPS5-NP

การพัฒนาสูตรตำรับ			
สูตรตำรับครีม	HLB	ลักษณะทางกายภาพ	หลังการปั่นเหวี่ยง
ยาพื้น (CBS5-NP)	10	เนื้อครีมสีขาว เนียน ไม่มัน กระจายผิวดี	เกิดการแยกชั้น เล็กน้อย
ครีมชั้น (CPS5-NP)	10	เนื้อครีมสีเหลือง มีกลิ่น มันเล็กน้อย กระจายผิวดี	เกิดการแยกชั้น เล็กน้อย

4.3 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

4.3.1 Standard curve

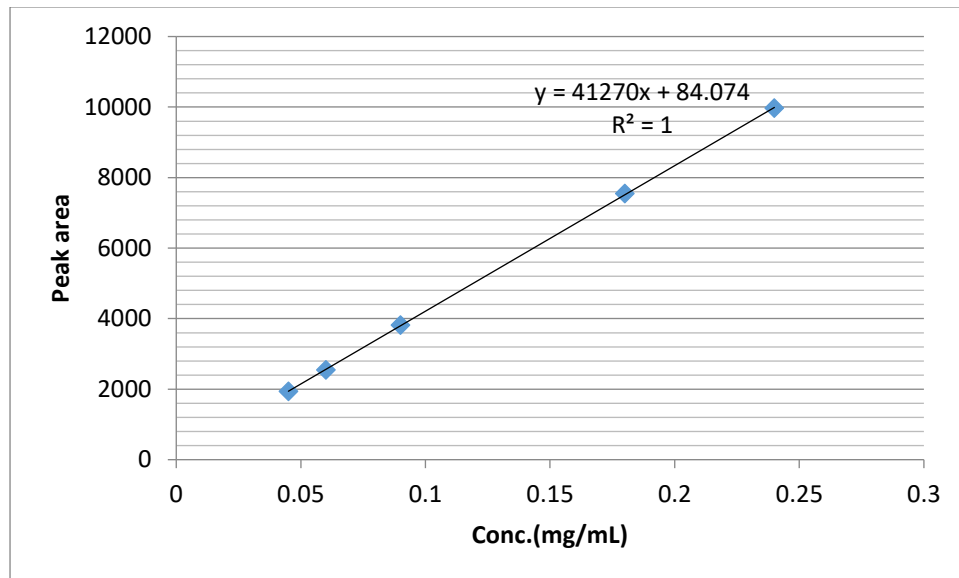
ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ด้วย HPLC

Concentration (mg/mL)	Peak area
0.045	1932.95
0.060	2544.24
0.090	3816.81
0.180	7541.66
0.240	9965.83

สมการที่ได้จากกราฟของสารมาตรฐาน คือ $y = 41270x + 84.074$ โดยมีค่า $R^2 = 1$

รูป 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Alpha-mangostin (Standard curve)



4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นของ ชั้นโรงด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นของชั้นโรงที่ความเข้มข้น 61.74 mg/mL ด้วยเครื่อง HPLC จะแสดงผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละ Alpha-mangostin จากการวิเคราะห์สารสกัด

Sample	Peak area	ความเข้มข้น ที่คำนวณได้	Dilution factor	ความเข้มข้น Alpha-mangostin ที่แท้จริง (mg/mL)	ร้อยละ Alpha- mangostin	ค่าเฉลี่ย ร้อยละ Alpha- mangostin
1	7827.25	0.187622	44	8.26	13.37	13.40
2	7862.91	0.188486	44	8.29	13.43	
3	7833.30	0.187769	44	8.26	13.38	
4	7845.95	0.188076	44	8.28	13.40	

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับครีม ด้วย HPLC

1) สูตรตำรับ CPS5-NP ที่ HLB 10

เตรียมสูตรตำรับ CPS5-NP ที่ HLB 10 ที่ความเข้มข้น 50.40 mg/mL นำมา
วิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ในตำรับ โดยเครื่อง HPLC ซึ่งรายงาน
ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NP ที่
HLB 10

CPS5-NP ที่ HLB 10					
Peak area	ความ เข้มข้นที่ วิเคราะห์ได้ (mg/mL)	Dilution factor	ความเข้มข้นจริง ของ Alpha- mangostin (mg/mL)	ร้อยละ Alpha- mangostin ในสารสกัดชั้น	ร้อยละ Alpha- mangostin ในตำรับ
7463.20801	0.178801	2	0.357603	14.19059	0.7095
7465.71289	0.178862	2	0.357724	14.1954	0.7098
7372.85596	0.176612	2	0.353224	14.0168	0.7008
ค่าเฉลี่ย				14.1343	0.7067

1) สูตรตำรับ CPS5-AO HLB 10

เตรียมสูตรตำรับ CPS5-AO ที่ HLB 10 ที่ความเข้มข้น 50.09 mg/mL นำมา
วิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ในตำรับ โดยเครื่อง HPLC ซึ่ง
รายงานดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-AO HLB 10

	CPS5-AO HLB 10				
Peak area	ความเข้มข้น ที่วิเคราะห์ได้ (mg/mL)	Dilution factor	ความเข้มข้นจริง ของ Alpha- mangostin (mg/mL)	ร้อยละ Alpha- mangostin ใน สารสกัดชั้น	ร้อยละ Alpha- mangostin ในตำรับ
8602.147	0.2064	2	0.4128	16.48223	0.8241
8429.192	0.2022	2	0.4044	16.1476	0.8074
8710.132	0.2090	2	0.41803	16.6912	0.8346
	ค่าเฉลี่ย			16.4403	0.8220

2) สูตรตำรับ CPS5-NAO HLB 10

เตรียมสูตรตำรับ CPS5-NAO ที่ HLB 10 ที่ความเข้มข้น 50.15 mg/mL นำมาวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในตำรับ โดยเครื่อง HPLC แสดงผลดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NAO HLB 10

	CPS5-NAO ที่ HLB10				
Peak area	ความเข้มข้นที่ วิเคราะห์ได้ (mg/mL)	Dilution factor	ความเข้มข้น จริงของ Alpha- mangostin (mg/mL)	ร้อยละ Alpha- mangostin ใน สารสกัดชั้น	ร้อยละ Alpha- mangostin ในตำรับ
9226.606	0.22153	2	0.44306	17.66937	0.883469
9148.984	0.219649	2	0.4393	17.51935	0.875968
9078.563	0.217943	2	0.4359	17.38325	0.869163
	ค่าเฉลี่ย			17.524	0.8762

4.4 การทดสอบความคงตัว (Stability)

ผลทดสอบความคงตัว เมื่อเก็บในสภาวะ 30 °C และ 40 °C, 75 ± 5% RH เป็นเวลา 15 และ 30 วัน ดังรูปที่ 2-9

รูป 2 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 3 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 4 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 5 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 6 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 9 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



ผลทดสอบความคงตัว เมื่อเก็บในสภาวะ 30 °C และ 40 °C, 75 ± 5% RH เป็นเวลา 15 และ 30 วัน ดังรูปที่ 10-17

รูป 10 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 11 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 12 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 13 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 14 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 15 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C



รูป 16 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



รูป 17 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C



ตารางที่ 23 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CBS5-AO และ CBS5-NAO ที่ HLB 10

ตำรับ	ความคงสภาพ	DAY 0	DAY 15		DAY 30	
			30 °C	40 °C	30 °C	40 °C
CBS5-NAO	pH	7.70	7.51	7.8	8.67	7.23
	สี	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว
	สถานะ	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง
	การแยกชั้น	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก
CBS5-AO	pH	7.78	7.71	7.70	7.69	7.73
	สี	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว
	สถานะ	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง
	การแยกชั้น	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก	ไม่แยก

ตารางที่ 24 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CPS5-AO และ CPS5-NAO HLB 10

ตำรับ	ความคงตัว	DAY 0	DAY 15		DAY 30		DAY 46	
			30 °C	40 °C	30 °C	40 °C	30 °C	40 °C
CPS5-NAO	ปริมาณสาร (ร้อยละ alpha-mangostin ในตำรับครีมชั้น)	0.8762± 0.0062	0.8497± 0.0026	0.8810±0.0061	0.9139 ±0.0045	0.8601±0.0033	0.8814± 0.0036	0.9267± 0.0037
	pH	7.02	6.98	6.53	5.62	4.86	-	-
	สี	เหลือง	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย
	สถานะ	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง
	การแยกชั้น	ไม่แยก	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย
CPS5-AO	ปริมาณสาร (ร้อยละ alpha-mangostin ในตำรับครีมชั้น)	0.8220± 0.0119	0.8170± 0.0019	0.7474±0.0049	0.8158 ±0.0096	0.8365±0.0633	0.7912± 0.0028	0.8635± 0.0050
	pH	7.10	6.18	7.43	5.49	4.95	-	-
	สี	เหลือง	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย	เหลือง	สีเหลืองมีของเหลวสี น้ำตาลเล็กน้อย
	สถานะ	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง	กึ่งแข็ง
	การแยกชั้น	ไม่แยก	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย	ไม่แยก	แยกเล็กน้อย

การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสูตรตำรับครีม CBS-NAO และ CBS-AO ที่ HLB 10 ในวันที่ 0, 15 และ 30 ได้ผลการทดลองดังนี้

ตำรับครีม CBS-NAO ค่า pH ของตำรับครีมมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ในด้านสถานะลักษณะของตำรับครีม มีสีขาว ลักษณะกึ่งแข็งและไม่มีการแยกชั้นทั้งในสภาวะ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

ตำรับครีม CBS-AO ค่า pH ของตำรับครีมมีคงที่ในช่วง $7.69 - 7.78$ ลักษณะของตำรับครีม มีสีขาว ลักษณะกึ่งแข็งและไม่มีการแยกชั้นทั้งในสภาวะ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$

การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสูตรตำรับครีม CPS-NAO และ CPS-AO ที่ HLB 10 ในวันที่ 0 ตำรับครีม CPS5-NAO และ CPS5-AO มีค่า pH ของตำรับเท่ากับ 7.02 และ 7.10 ตามลำดับ และสถานะของตำรับทั้งสองมีเนื้อครีมสีเหลือง ลักษณะกึ่งแข็ง ไม่พบการแยกชั้น

ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสูตรตำรับครีม CPS-NAO และ CPS-AO ที่ HLB 10 ในวันที่ 15, 30 และ 46 ทั้งตำรับครีม CPS5-NAO และ CPS5-AO พบว่าค่า pH ของตำรับครีม ลดลง ลักษณะของตำรับพบว่าตำรับทั้งสองตำรับ ที่สภาวะ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เนื้อครีมมีเหลือง ลักษณะกึ่งแข็ง และไม่พบการแยกชั้นของตำรับครีม และที่สภาวะ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ พบว่าทั้งสองตำรับเนื้อครีมมีสีเหลือง ลักษณะกึ่งแข็ง และมีของเหลวสีน้ำตาลแยกตัวออกมาเล็กน้อย

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในตำรับครีมชั้นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%\text{RH}$ และอุณหภูมิ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%\text{RH}$ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับครีมชั้น CPS5-NAO และ CPS-AO ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเป็นดังนี้

สำหรับสูตรตำรับ CPS5-NAO ที่ 30°C พบว่า วันที่วิเคราะห์แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับ CPS5-NAO ที่ 30°C แตกต่างกัน โดยในวันที่ 15 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับลดลงจากวันที่ 0 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 30 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 วันที่ 15 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 46 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และวันที่ 15 แต่ลดลงจากวันที่ 30

สำหรับสูตรตำรับ CPS5-NAO ที่ 40°C พบว่า วันที่วิเคราะห์แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับ CPS5-NAO ที่ 40°C แตกต่างกัน โดยในวันที่ 15 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 30 ค่าเฉลี่ยของ

ร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับลดลงจากวันที่ 0 และวันที่ 15 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 46 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 วันที่ 15 และวันที่ 30

สำหรับสูตรตำรับ CPS5-AO ที่ 30 °C พบว่า วันที่วิเคราะห์แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับ CPS5-AO ที่ 30 °C ไม่แตกต่างกัน

สำหรับสูตรตำรับ CPS5-AO ที่ 40 °C พบว่า วันที่วิเคราะห์แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับ CPS5-AO ที่ 40 °C แตกต่างกัน โดยโดยในวันที่ 15 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในตำรับลดลงจากวันที่ 0 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 30 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 วันที่ 15 ผลการวิเคราะห์ในวันที่ 46 ค่าเฉลี่ยของร้อยละ Alpha-mangostin ในสารสกัดชั้นเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และวันที่ 15 และวันที่ 30

จากผลการทดลอง พบว่า Alpha-mangostin ซึ่งเป็นสารสำคัญในสูตรตำรับ CPS5-NAO และตำรับ CPS5-AO ที่เก็บไว้ในสภาวะ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%\text{RH}$ และ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%\text{RH}$ มีความคงตัว ผลของลักษณะทางกายภาพของทั้งสองสูตรตำรับที่เก็บในสภาวะ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ พบว่ามีความคงตัวทางกายภาพ ส่วนตำรับที่เก็บในสภาวะ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%\text{RH}$ พบว่ามีของเหลวสีน้ำตาลแยกตัวออกมาเล็กน้อย

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disk diffusion

ตารางที่ 25 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disk diffusion แสดงผลเป็นขนาดการเกิด Clear zone (Inhibition zone)

Disk ที่ทดสอบ	Average diameter of inhibition zone (mm)
Negative control - Blank (n=4)	6.00±0.00
Negative control - MeOH (n=7)	6.00±0.00
Negative control - DMSO (n=8)	6.00±0.00
Positive control - Oxacillin (n=4)	27.67±0.89
Positive control	24.17±0.72

- Tetracycline (n=4)	
สารสกัดชั้น 0.045 mg/mL (n=8)	8.46±0.51
สารสกัดชั้น 0.090 mg/mL (n=8)	9.21±0.51
สารสกัดชั้น 0.180 mg/mL (n=8)	9.29±0.62
สารสกัดชั้น 0.360 mg/mL (n=8)	9.96±0.55
Alpha-mangostin 3.125 mg (n=7)	9.24±0.44
Alpha-mangostin 6.250 mg (n=7)	9.38±0.50
Alpha-mangostin 12.500 mg (n=7)	9.62±0.50

* หมายถึง disk ยาแผ่นมี diameter เท่ากับ 6.00 mm

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Broth microdilution method

4.6.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal inhibitory concentration, MIC และ Minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารมาตรฐาน alpha-mangostin

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารมาตรฐาน alpha-mangostin ที่ความเข้มข้น 0.375, 0.750, 1.500, 2.400, 3.000, 6.000, 12.000, และ 24.000 µg/mL เมื่อป้อนเพาะเชื้อกับสารละลายมาตรฐานและที่ 570 nm ได้ผลตามตารางที่ 26 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Microplate reader (29),(30)

ตารางที่ 26 แสดงผลค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin และลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตด้วยตาเปล่า

ความเข้มข้นของ Alpha-mangostin ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง	ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตด้วยตา
24.000	0.079	ใส
12.000	0.058	ใส
6.000	0.051	ใส
3.000	0.057	ใส
2.400	0.049	ใส
1.500	0.058	ใส
0.750	0.276	ขุ่น
0.375	0.259	ขุ่น
Negative control	0.041	ใส
Positive control	0.338	ขุ่น
Chloramphenical	0.055	ใส

พบว่า Alpha-mangostin ที่ความเข้มข้น 24.000, 12.000, 6.000, 3.000, 2.400, และ 1.500 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ความเข้มข้น 0.750 และ 0.375 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าจากการสังเกตด้วยตาสารละลายจะมีลักษณะขุ่นและมีการดูดกลืนแสงสูง แสดงถึงมีการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่วนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ Negative control พบว่าได้เท่ากับ 0.041 แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนใน Plate ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของ Positive control พบว่า 0.338 แสดงว่ามีเชื้อเจริญเติบโตใน Plate และค่าการดูดกลืนแสงของ Chloramphenical พบว่า 0.055 แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโต จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าค่า MIC ของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin มีค่าเท่ากับ 1.5 $\mu\text{g/mL}$

เมื่อนำ Loop ที่จุ่มแต่ละหลุมของความเข้มข้นใน 96 well plate ที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อไป Streak บนอาหาร Mueller Hinton Agar ใหม่และติดตามผลการเจริญเติบโตของเชื้อได้ผลดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (สารมาตรฐาน Alpha-mangostin)

ความเข้มข้นของ alpha-mangostin ($\mu\text{g/mL}$)	เชื้อขึ้น	เชื้อไม่ขึ้น
24.000		✓
12.000		✓
6.000		✓
3.000		✓
2.400		✓
1.500		✓

จากตารางพบว่าทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบไม่มีเชื้อขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่า MBC ของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin มีค่าเท่ากับ 1.5 $\mu\text{g/mL}$

4.6.2 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดชันจากชันโรง

ความเข้มข้นของ สารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ความเข้มข้นของ alpha-mangostin ในสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง	ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตด้วยตา
179.06	24.000	0.042	ใส
89.53	12.000	0.064	ใส
44.76	6.000	0.056	ใส
22.38	3.000	0.067	ใส
17.91	2.400	0.062	ใส
11.19	1.500	0.058	ใส
5.60	0.750	0.042	ใส
2.80	0.375	0.044	ใส
	Negative control	0.041	ใส

	Positive control	0.338	ขุ่น
	Chloramphenical	0.055	ใส

ตารางที่ 28 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (สารสกัดชั้นของชั้นโรง)

ความเข้มข้นของ propolis (µg/mL)	ความเข้มข้นของ alpha-mangostin (µg/mL)	เชื้อขึ้น	เชื้อไม่ขึ้น
179.06	24.000		✓
89.53	12.000		✓
44.76	6.000		✓
22.38	3.000		✓
17.91	2.400		✓
11.19	1.500		✓

จากตารางพบว่าทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบไม่มีเชื้อขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่า MBC ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 11.19 µg/mL

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การสกัดชันของชันโรง

เมื่อนำชันของชันโรงขนเงิน (*Tetragonula pagdeni*) มาสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) โดยตัวทำละลายที่ใช้ คือ Ethanol จำนวน 3 ครั้ง ได้สารแขวนลอยมีลักษณะสีน้ำตาลขุ่น มีตะกอนจำนวนมาก จากนั้นนำสารแขวนลอยไปทำให้ตกตะกอนด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) เพื่อกำจัดตะกอน ทำให้ได้สารละลายใสแยกออกมา จากนั้นนำส่วนสารละลายใสไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้ Rotary evaporator ซึ่งจะได้สารสกัดชันที่มีลักษณะสีน้ำตาลขุ่นเหนียวแต่เนื่องจากสารสกัดมี Wax ผสมปริมาณมาก จึงนำไปสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction เพื่อกำจัด Wax ออกจากสารสกัดชันของชันโรง โดยนำสารสกัดชันไปละลายในตัวทำละลาย Methanol และสกัด Wax ออกด้วยตัวทำละลาย Hexane ซึ่งการสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction อาศัยหลักการแยกสารตามความสามารถในการละลาย เนื่องจาก Wax เป็นสารที่ไม่มีขั้ว จะละลายไปอยู่ในชั้น Hexane จึงสามารถกำจัด Wax ออกจากสารสกัดได้ในขณะที่สารสำคัญเช่น Alpha-mangostin จะละลายอยู่ในชั้น Methanol จากนั้นนำชั้น Methanol ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งจนได้เป็นสารสกัดแห้ง (Dry extract) ซึ่งสารสกัดชันแห้งที่ได้คิดเป็นผลผลิตร้อยละ (%yield) เท่ากับ 14.15 เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณ Alpha-mangostin โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ได้เท่ากับร้อยละ 13.40

5.2 การพัฒนาสูตรตำรับครีม

จากการตั้งตำรับยาพื้นโดยปรับเปลี่ยนคู่สารทำอิมัลชันต่างชนิดกัน 6 คู่ คือ คู่ Span 80 กับ Tween 80 (CBS1), Span 60 กับ Tween 60 (CBS2), Span 60 กับ Tween 20 (CBS3), Zohar GLST SE กับ Tween 80 (CBS4), Zohar GLST SE กับ Tween 60 (CBS5), และ Zohar GLST SE กับ Tween 20 (CBS6) จากผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับยาพื้น CBS5 กับ CBS6

เป็นตำรับที่ให้เนื้อครีมที่ดี ไม่แยกชั้น เนื้อครีมสามารถเกาะผิวและสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ผิวดี จึงนำมาพัฒนาต่อ โดยใส่สารสกัดชั้นของชั้นรองลงไป ซึ่งพบว่าเมื่อใส่สารสกัดชั้น คู่มืออิมัลชันของ Zohar GLST SE กับ Tween 60 ทำให้เกิดลักษณะครีมที่ดี เมื่อพิจารณาผลการปั่นเหวี่ยงพบว่า ตำรับครีมชั้น ที่ HLB 10 ไม่เกิดการแยกชั้นและที่ HLB 12 เกิดการแยกชั้นเล็กน้อย ในขณะที่คู่มืออิมัลชัน Zohar GLST SE กับ Tween 20 จะเกิดการแยกชั้นทั้งที่ HLB 10 และ HLB 12 จากนั้นได้ปรับเปลี่ยนค่า HLB เพื่อหาค่า HLB ที่เหมาะสมที่จะทำให้ตำรับมีความคงตัวที่สุด ซึ่งผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับ CPS5 ที่ HLB 10 มีความคงตัวมากที่สุด โดยเนื้อครีมที่ได้มีสีเหลือง ไม่แยกชั้น ผลจากการปั่นเหวี่ยงไม่เกิดการแยกชั้นและเมื่อทาครีมบนผิวพบว่าครีมสามารถกระจายบนผิวได้ดี

5.3 การทดสอบความคงตัว (Stability)

ตำรับครีมที่เก็บรักษาในสภาวะเร่ง อุณหภูมิ 40 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$ RH เป็นเวลา 30 วัน ผลการศึกษาความคงตัวทางเคมี พบว่าปริมาณสาร Alpha-mangostin ในตำรับ CPS5-NAO และตำรับ CPS5-AO มีความคงตัว การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ โดยสังเกตลักษณะภายนอก พบว่า ตำรับ CBS5-NAO และ ตำรับ CBS5-AO เนื้อครีมมีสีขาวและมีสถานะกึ่งแข็งไม่เปลี่ยนแปลง และไม่มีการแยกชั้น ในขณะที่ตำรับ CPS5-NAO และ ตำรับ CPS5-AO เนื้อครีมมีสีเหลือง สถานะกึ่งแข็งไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีของเหลวสีน้ำตาลเล็กน้อยแยกตัวออกมาเมื่อทดลองโดยใช้แท่งแก้วคนผสมครีมพบว่าเนื้อครีม สามารถกลับมาเป็นเนื้อเดียวกันได้ ดังนั้นหากมีการศึกษาเพื่อเพิ่มความคงตัวทางกายภาพของตำรับ อาจทำการทดลองโดย เพิ่มปริมาณสารทำอิมัลชัน เปลี่ยนชนิดของสารทำอิมัลชัน หรือเพิ่มความหนืดให้กับตำรับ

5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disk diffusion

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Disk diffusion ซึ่งทำการทดลองโดยใช้สารละลายมาตรฐาน Alpha-mangostin และสารสกัดชั้นของชั้นรองในตัวทำละลาย 100% DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าทุกความเข้มข้นของทั้งสารละลายมาตรฐาน Alpha-mangostin และสารสกัดชั้นของชั้นรองเกิด Inhibition zone ซึ่ง Inhibition zone มีความกว้างที่แตกต่างกันไปตามความเข้มข้นของสาร โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะพบว่ามี Inhibition zone ที่กว้างขึ้น ในขณะที่ Negative control คือ

100% DMSO พบว่าไม่เกิด Inhibition zone แสดงถึงสภาวะทดสอบที่ใช้ตัวทำละลาย คือ DMSO ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ผลการทดลองของ Positive control ได้แก่ Oxacillin กับ Tetracycline ได้ผล Inhibition zone เท่ากับ 27.67 mm และ 24.17 mm ตามลำดับ โดยค่า Inhibition zone ของ Oxacillin มีค่าอยู่ในช่วง 18-24 mm และ Tetracycline มีค่าอยู่ในช่วง 24-30 mm เมื่อทำการทดสอบกับ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสอดคล้องกับ ผล Susceptibility ของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guideline for antimicrobial susceptibility testing

5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ และฆ่าเชื้อจุลชีพ (Minimum inhibitory concentration: MIC, Minimum bactericidal concentration: MBC) ของ สารมาตรฐาน Alpha-mangostin และสารสกัดชันจากชันโรง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution method จากการทดลองพบว่าสารมาตรฐาน Alpha-mangostin มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 1.5 µg/mL ส่วนผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดชันจากชันโรง ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทดสอบไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำและเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าสารละลายมีลักษณะใส ดังนั้นค่า MBC ของสารสกัดชันจากชันโรง มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 11.19 µg/mL โดยความเข้มข้นของสารสกัดชันดังกล่าวจะมีปริมาณ Alpha-mangostin ในสารสกัด 1.5 µg/mL

5.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากการทำ Standard curve ของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.045 ถึง 0.240 mg/mL โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และ Stationary phase คือ C-18 และ Mobile phase คือ Methanol กับ 0.2% Formic acid ในน้ำ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 245 nm ได้ผลวิเคราะห์ ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (y) และความเข้มข้น mg/mL (x) ดังนี้ $y = 41270x + 84.074$ มีค่า Correlation coefficient (R^2) = 1

เอกสารอ้างอิง

1. จารุจารีต ว. Garden & Farm มาเลเซียฝั่งและชันโรงกัน2559.
2. Massaro CF, Katouli M, Grkovic T, Vu H, Quinn RJ, Heard TA, et al. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*. 2014;95:247-57.
3. Bonvehi JS, Gutierrez AL. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World journal of microbiology & biotechnology*. 2012;28(4):1351-8.
4. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, et al. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24 Suppl 1:S20-8.
5. Salvatore C. The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Discontinued)*. 2010;9(4):263-85.
6. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 2013;19(1):78-101.
7. ธีรภัฏฐ์ เขียวอ่อน, วงศ์สละ น. การพัฒนาสูตรตำรับครีมและเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชันของชันโรง *Tetragonula pegdeni*. มหาวิทยาลัยบูรพา. 2015.
8. Felton L. Reminton: essentials of pharmaceuticals. Philadelphia: Philadelphia college of pharmacy; 2013.
9. J. WAWP. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: The Pharmaceutical Press; 1994.
10. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):114-7.

11. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235-40.
12. Thapakorn C, Nilrattanakoon C, Pimpan D, Vongsak B, N C. In vitro antioxidant activity of electrospun polyvinyl alcohol nanofiber mats containing stingless bees' propolis extracts. *Thai journal of pharmaceutical sciences* 2016;40:61-4.
13. Chirumbolo S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010;9(4):263-85.
14. Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of natural products.* 1992;55(3):294-302.
15. Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and molecular research : GMR.* 2009;8(2):635-40.
16. da Cunha MG, Franchin M, de Carvalho Galvao LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:23.
17. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73(Supplement 1):S1-S6.
18. Marquele-Oliveira F, Fonseca YM, de Freitas O, Fonseca MJ. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. *Int J Pharm.* 2007;342(1-2):40-8.
19. Choudhari MK, Puneekar SA, Ranade RV, Paknikar KM. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(1):363-7.
20. Ibrahim MY, Hashim NM, Mariod AA, Mohan S, Abdulla MA, Abdelwahab SI, et al. α -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: An updated review of its pharmacological properties. *Arabian Journal of Chemistry.* 2016;9(3):317-29.

21. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C*. 2000;55(9-10):790-3.
22. Jimenez Soriano MM, Fresno Contreras MJ, Selles Flores E. Development of a cream from a self-emulsifying base and moisturizing actives. *Farmaco*. 2001;56(5-7):513-22.
23. Gupta A, Myrdal PB. Development of a perillyl alcohol topical cream formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;269(2):373-83.
24. Smaoui S, Ben Hlima H, Ben Chobba I, Kadri A. Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. *Arabian Journal of Chemistry*. 2013.
25. Mishra AP, Saklani S, Milella L, Tiwari P. Formulation and evaluation of herbal antioxidant face cream of *Nardostachys jatamansi* collected from Indian Himalayan region. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4, Supplement 2:S679-S82.
26. Auamcharoen W. Antibacterial activity and phenolic content of propolis from four different areas of Thailand. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2016;37(1):77-82.
27. The hlb system a time-saving guide to emulsifier selection. Wilmington Delaware 19897: ICI Americas Inc; 1980.
28. Wu SZ, Wang G, Lu Z, Li Y, Zhou XL, Chen LTX, et al. Effects of glycerol monostearate and Tween 80 on the physical properties and stability of recombined low-fat dairy cream. *Dairy Science & Technology*. 2016;96(3):377-90.
29. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard. PA, USA: CLSI, Wayne; 2006.
30. Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Hosseini SMJ, Moridi K, Zadegan MG. A Method for Antibiotic Susceptibility Testing: Applicable and Accurate. *Jundishapur J Microb*. 2012;5(1):341-5.

สารบัญตาราง

	หน้าที่
ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับ CBS 1	24
ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับ CBS 2	24
ตารางที่ 3 แสดงสูตรตำรับ CBS 3	25
ตารางที่ 4 แสดงสูตรตำรับ CBS 4	25
ตารางที่ 5 แสดงสูตรตำรับ CBS 5	26
ตารางที่ 6 แสดงสูตรตำรับ CBS 6	26
ตารางที่ 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 และ 12	28
ตารางที่ 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 6 HLB 10 และ 12	29
ตารางที่ 9 แสดงสูตรตำรับครีมเบส CBS 5 HLB 10 (Non-paraben)	30
ตารางที่ 10 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS 5 HLB 10 (Non-paraben)	30
ตารางที่ 11 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO HLB 10	31
ตารางที่ 12 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง	35
ตารางที่ 13 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีมเบส CBS 1 – 6	38
ตารางที่ 14 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5 HLB10, CPS5 HLB12, CPS6 HLB 10 และ CPS6 HLB12	41
ตารางที่ 15 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CPS5	44
ตารางที่ 16 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NAO, CBS5-AO, CPS5-NAO และ CPS5-AO	47
ตารางที่ 17 แสดงลักษณะทางกายภาพของการพัฒนาสูตรตำรับครีม CBS5-NP และ CPS5-NP	49
ตารางที่ 18 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน Alpha-mangostin ด้วย HPLC	49
ตารางที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละ Alpha-mangostin จากการวิเคราะห์สารสกัด	50
ตารางที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NP ที่ HLB 10	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้าที่

ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-AO HLB 10	52
ตารางที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Alpha-mangostin ในสูตรตำรับ CPS5-NAO HLB 10	52
ตารางที่ 23 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CBS5-AO และ CBS5-NAO ที่ HLB 10	60
ตารางที่ 24 บันทึกลักษณะทางกายภาพและเคมีของสูตรตำรับครีม CPS5-AO และ CPS5-NAO HLB 10	61
ตารางที่ 25 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus โดยวิธี Disk diffusion แสดงผลเป็นขนาดการเกิด Clear zone (Inhibition zone)	63
ตารางที่ 26 แสดงผลค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Alpha-mangostin และลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการสังเกตด้วยตาเปล่า	65
ตารางที่ 27 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ Staphylococcus aureus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (สารมาตรฐาน Alpha-mangostin)	66
ตารางที่ 28 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ Staphylococcus aureus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (สารสกัดชั้นของชั้นโรง)	67

สารบัญรูปภาพ

หน้าที่

รูป 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน	50
ผลทดสอบความคงตัว เมื่อเก็บในสภาวะ 30 °C และ 40 °C, 75 ± 5% RH เป็นเวลา 15 และ 30 วัน ดังรูปที่ 2-9	
รูป 2 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	53
รูป 3 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	53
รูป 4 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	54
รูป 5 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	54
รูป 6 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	55
รูป 7 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	55
รูป 8 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	56
รูป 9 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	56
รูป 10 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	57
รูป 11 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	57
รูป 12 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CBS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	57
รูป 13 แสดงสูตรตำรับครีมพื้น CBS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	58
รูป 14 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	58
รูป 15 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C	58
รูป 16 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-NAO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	59
รูป 17 แสดงสูตรตำรับครีมชั้น CPS5-AO หลังการเก็บ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C	59