การตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้ง
สำหรับรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus*

นางสาวฐิติรัตน์ ลิ่มดุลย์ 5136538933

นายธนิต วิริยะธารากิจ 5136568733

นายธัชพงศ์ ธรรมบรรหาร 5136570933

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Formulation of Honey Cream

for *Staphylococcus aureus* Infected Wound Treatment

Miss Titirat Limdul	5136538933
Mister Tanid Wiriyatharakij	5136568733
Mister Tatchapong Thumbunharn	5136570933

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the requirement

For the Bachelor of Science in Pharmaceutical Science Program

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งสำหรับรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวฐิติรัตน์ ลิ่มดุลย์
	นายธนิต วิริยะธารากิจ
	นายธัชพงศ์ ธรรมบรรหาร
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์ แขนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิภาพร พนาพิศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง อารีรัตน์ ลออปักษา
	อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.อัญญพร ตันศิริคงคล

คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

.....คณบดี

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

.....ประธานแขนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนวย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิภาพร พนาพิศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง อารีรัตน์ ลออปักษา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.อัญญพร ตันศิริคงคล)

โครงการลำดับที่ 2.6

วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) :การตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งสำหรับรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) :Formulation of Honey Cream for *Staphylococcus aureus* Infected Wound Treatment

หัวหน้าโครงการ :นางสาวฐิติรัตน์ ลิ่มดุลย์ 5136538933

นายธนิต วิริยะธารากิจ 5136568733

นายธัชพงศ์ ธรรมบรรหาร 5136570933

อาจารย์ที่ปรึกษา :อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิภาพร พนาพิศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม :รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง อารีรัตน์ ลออปักษา

อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.อัญญพร ตันศิริคงคล

ภาควิชา :วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันได้มีการค้นพบว่า น้ำผึ้งใช้รักษาแผลติดเชื้อที่ผิวหนังได้ ซึ่งเชื้อสาเหตุหลักมักจะเกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) แต่การนำน้ำผึ้งมาใช้โดยตรงก่อให้เกิดความไม่สะดวกแก่ผู้ใช้ได้ เนื่องจากน้ำผึ้งมีลักษณะเหลวและไหลได้ ทั้งยังก่อให้ เกิดความเหนอะหนะบริเวณที่ทา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงศึกษาหาชนิดและปริมาณของน้ำผึ้งจากดอกไม้ต่างๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ เพื่อตั้งเป็นสูตรตำรับครีมซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ สะดวกต่อผู้ใช้ และให้ลักษณะสัมผัสที่ดีเมื่อทาบริเวณผิวหนัง

ในการทดลองหาชนิดของน้ำผึ้งที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี agar diffusion method พบว่าน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงามีขนาดโซนใสแตกต่างจากน้ำกลั่นและมากกว่าน้ำผึ้งจากดอกไม้ชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) จากนั้นได้หาความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ (ค่า MIC) โดยวิธี broth dilution method พบว่าค่า MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไยเท่ากับ 0.2 กรัม/มิลลิลิตร และน้ำผึ้งดอกงาเท่ากับ 0.15 กรัม/มิลลิลิตร จึงได้เลือกน้ำผึ้งดอกงามาพัฒนาเป็นครีมรักษาแผลติดเชื้อบริเวณผิวหนังต่อไป การตั้งตำรับยาพื้นครีมชนิดน้ำมันในน้ำที่เหมาะสมที่มีชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ โดยวิธี beaker method พบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ร้อยละ 4 และ GMS SE ร้อยละ 3, 4 และ 5 ของสูตรตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน มีความคงตัวหลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 สลับกับ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 6 รอบ และเมื่อนำไปพัฒนาเป็นสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งประกอบด้วยน้ำผึ้งดอกงาความเข้มข้น 0.3 กรัม/มิลลิลิตร พบว่าสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE มีความคงตัวหลังผ่านสภาวะเร่ง การนำครีมน้ำผึ้งที่พัฒนาได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ พบว่าครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันเป็น GMS SE ร้อยละ 3 ให้ขนาดโซนใสที่แตกต่างจากยาพื้นครีมอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) และมีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสดีที่สุด

น้ำผึ้งดอกงามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าน้ำผึ้งชนิดอื่นที่ทำการศึกษา และยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 เป็นสารก่ออิมัลชันมีความคงตัวดีในสภาวะเร่ง สามารถบรรจุน้ำผึ้งดอกงาที่ความเข้มข้น 0.3 กรัม/มิลลิลิตร และยังคงมีความคงตัวดี รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เมื่อเทียบกับยาพื้นครีม

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.วิภาพร พนาพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษา, อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.อัญญพร ตันศิริคงคล และรองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง อารีรัตน์ ลออปักษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ ดูแลช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม ได้แก่ คุณวรรณา มหาพสุธานท์, คุณสันติ ห่านศรีวิจิตร และคุณกฤษณา วุฒิยาภรณ์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ได้แก่ คุณเชาว์ ปิดทอง, คุณอริยา ขันบุญ, คุณกัญญาณัฐ ผิวผ่อง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ และคุณนารีรัตน์ เพ็ชร์พิรุณ ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการใช้เครื่องวัดความหนืดที่ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา

ขอขอบคุณเภสัชกรหญิงพัชรวรรณ นิมมานโสภณ ที่ให้คำปรึกษาในการพัฒนาสูตรตำรับยาพื้นครีม

คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ในการพัฒนาและวิจัยทางด้านยาและเครื่องสำอางมากยิ่งขึ้น โดยการวิจัยครั้งนี้จะเป็นการตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งสำหรับรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มาจากน้ำผึ้งซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และการพัฒนาสูตรตำรับเป็นยาครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งที่มีความคงตัวทางกายภาพ เพื่อเป็นการเพิ่มความสะดวกในการใช้ และเป็นการเพิ่มทางเลือกใหม่ในการรักษาแผลติดเชื้อจากแบคทีเรีย ทั้งนี้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการสำหรับการนำไปพัฒนาสารจากธรรมชาติให้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพต่อไป และเป็นส่วนหนึ่งของปริญญานิพนธ์ของนิสิตภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2555

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการพัฒนาสารจากธรรมชาติมาใช้ในทางยาไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดในโครงการปริญญานิพนธ์ คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
กิตติกรรมประกาศ……จ
คำนำ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……ฌ
สารบัญรูป……ฎ
บทที่
1 บทนำ……1
ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย……1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย……3
ขอบเขตของการวิจัย……3
สมมติฐานของการวิจัย……6
วิธีการดำเนินการวิจัย……6
ข้อจำกัดของการวิจัย……7
ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย……8
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……9
3 วัสดุสารเคมีและวิธีการวิจัย……71
วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย……71
วิธีดำเนินการวิจัย……72
1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์
ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923……72
2. การศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง
เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง……75
3. การตั้งสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ
Staphylococcus aureus ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง……77

4. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งกับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar diffusion…….86

4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง……..87

1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923……..87

2. การศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง……..92

3. การตั้งสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง……101

4. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งกับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar diffusion…...115

5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ…….120

เอกสารอ้างอิง……124

ภาคผนวก……..133

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ…….134

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ตามหลักวิทยาศาสตร์……9

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อมาตรฐาน (เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ…….....14

ตารางที่ 3 แสดงโรคและความถี่ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และ เชื้อ *Staphylococcus aureus* (Chiller, 2001: 170-4)…….....29

ตารางที่ 4 แสดงพิษที่ทำให้เกิดโรคต่างๆจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Chiller, 2001: 170-4)……29

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของ saccharide ที่พบในน้ำผึ้ง……..32

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณของสารอื่นๆนอกเหนือจาก saccharide ที่พบในน้ำผึ้ง…….34

ตารางที่ 7 แสดงชนิดและปริมาณของธาตุที่เป็น trace element ต่างๆที่พบได้ในน้ำผึ้ง (Bogdanov, 2008: 677-89)……36

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดวิธี Disk susceptibility testing method ของ NCCLS……..54

ตารางที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดหยดอนุภาควัฏภาคภายใน และลักษณะอิมัลชันที่มองเห็น……...58

ตารางที่ 10 แสดงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม sorbitan fatty acid ester…….63

ตารางที่ 11 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters…….64

ตารางที่ 12 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม fatty acid polyoxyethylene esters……...64

ตารางที่ 13 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม polyoxyethylene ethers……...65

ตารางที่ 14 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ……80

ตารางที่ 15 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ……80

ตารางที่ 16 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ……81

ตารางที่ 17 แสดงสูตรตำรับของครีมน้ำผึ้งที่มีปริมาณน้ำผึ้งจากดอกงา 2 เท่าของค่า MIC…….85

ตารางที่ 18 ขนาดโซนใสของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ……88

ตารางที่ 19 ผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งชนิดและความเข้มข้น 0.03125-1 g/ml……..90

ตารางที่ 20 ผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งชนิดและความเข้มข้นต่างๆ 0.125-0.5 g/ml……..90

ตารางที่ 21 ขนาดโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส.....93

ตารางที่ 22 ขนาดโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส……...94

ตารางที่ 23 ผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC…….97

ตารางที่ 24 ผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC……...99

ตารางที่ 25 ขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน…….116

ตารางที่ 26 ขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน……117

ตารางที่ 27 ขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน…….118

ตารางที่ 28 แสดงสูตรตำรับยาพื้นครีมใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ, GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของตำรับ……...121

ตารางที่ 29 แสดงสูตรตำรับยาครีมที่ผสมน้ำผึ้งที่ผ่านในการทดสอบความคงตัวทางกายภาพและนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953……122

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ผลของน้ำผึ้งชนิดต่างๆต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923โดยใช้สถิติ One way ANOVA……134

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งดอกลำไยโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test…….136

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกงาโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test…….137

ตารางที่ 33 การวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกลำไยโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test……137

ตารางที่ 34 การวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกงาโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test……138

ตารางที่ 35 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่พัฒนาได้โดยใช้ Span®60 และ Tween®60 เป็นสารก่ออิมัลชัน……139

ตารางที่ 36 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่ใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……140

ตารางที่ 37 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่ใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ หลังทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง……...……...141

ตารางที่ 38 แสดงค่าความหนืดของยาพื้นครีมก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง….142

ตารางที่ 39 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งโดยใช้สถิติ independent samples T-test……..143

ตารางที่ 40 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งโดยใช้สถิติ independent samples T-test……143

ตารางที่ 41 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งโดยใช้สถิติ independent samples T-test……144

ตารางที่ 42 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งโดยใช้สถิติ independent samples T-test……144

ตารางที่ 43 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้ง ที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...145

ตารางที่ 44 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้ง ที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC
โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะเร่ง (40 องศาเซลเซียส)……...146
ตารางที่ 45 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้งที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC
โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะเร่ง (45 องศาเซลเซียส)……...147
ตารางที่ 46 แสดงค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง….148
ตารางที่ 47 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ
เป็นสารก่ออิมัลชันก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง
โดยใช้สถิติ independent samples T-test……149
ตารางที่ 48 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ
เป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง
โดยใช้สถิติ independent samples T-test……149
ตารางที่ 49 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ
เป็นสารก่ออิมัลชันก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง
โดยใช้สถิติ independent samples T-test……150
ตารางที่ 50 แสดงค่าความหนืดของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียส
24 ชั่วโมง……...150
ตารางที่ 51 การวิเคราะห์ค่าความหนืดของน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังผ่านความร้อน
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยใช้สถิติ independent samples T-test……..…151
ตารางที่ 52 การวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ
เป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
โดยใช้สถิติ One way ANOVA……...152
ตารางที่ 53 การวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 เป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซน
ใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA……154
ตารางที่ 54 การวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 เป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซน
ใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA……156

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากหนองของผู้ป่วย……11

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีสีทองอมส้ม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นนิวเทรียนท์ (nutrient agar; NA)……11

รูปที่ 3 แสดงรอยโรคของ bullous impetigo (Stulberg, 2002: 119-23)……...17

รูปที่ 4 แสดงรอยโรคของ non-bullous impetigo (Stulberg, 2002: 119-23)……...18

รูปที่ 5 แสดงรอยโรคของโรคไฟลามทุ่ง (Stulberg, 2002: 119-23)……21

รูปที่ 6 แสดงรอยโรคของ cellulitis (Stulberg, 2002: 119-23)……23

รูปที่ 7 แสดงรอยโรคของรูขุมขนอักเสบซึ่งเกิดจากการแช่อ่างน้ำร้อนที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Stulberg, 2002: 119-23)……24

รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความลึกของชั้นผิวหนังกับโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง (Rajan, 2012: 57-66)……28

รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลglucose, น้ำตาลfructose และน้ำตาลsucrose……...33

รูปที่ 10 แสดงการเกิด ของ 5-hydroxymethylfurfural (HMF) จากน้ำตาลfructose……35

รูปที่ 11 แสดงลำดับชั้นของผึ้งในอาณานิคมหนึ่งๆ เรียงจากผึ้งตัวผู้ ผึ้งนางพญา และผึ้งงานตามลำดับ……...38

รูปที่ 12 แสดงองค์ประกอบของรังผึ้งจำลอง……...40

รูปที่ 13 แสดงแถบสีอ้างอิงที่ใช้ประเมินสีของครีมน้ำผึ้ง……...77

รูปที่ 14 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ……89

รูปที่ 15 แสดงค่า MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไย……91

รูปที่ 16 แสดงค่า MIC ของน้ำผึ้งดอกงา……91

รูปที่ 17 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส……95

รูปที่ 18 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส……96

รูปที่ 19 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC……98

รูปที่ 20 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC……98

รูปที่ 21 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC……100

รูปที่ 22 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC……100

รูปที่ 23 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®60 และ Tween®60 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...102

รูปที่ 24 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...103

รูปที่ 25 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...103

รูปที่ 26 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...104

รูปที่ 27 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®60 และ Tween®60 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)……..105

รูปที่ 28 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)……..106

รูปที่ 29 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)……..106

รูปที่ 30 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)……..107

รูปที่ 31 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อนและวิธีใช้ความร้อนบางส่วน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)….108

รูปที่ 32 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……108

รูปที่ 33 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……..109

รูปที่ 34 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...109

รูปที่ 35 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……..110

รูปที่ 36 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...110

รูปที่ 37 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน(ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……..111

รูปที่ 38 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)……...111

รูปที่ 39 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน หลังทดสอบสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส)……...113

รูปที่ 40 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆโดยวิธีไม่ใช้ความร้อน หลังทดสอบสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)……...114

รูปที่ 41 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีใช้ความร้อนบางส่วน หลังทดสอบสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 40 (บน) และ 45 (ล่าง) องศาเซลเซียส……...114

รูปที่ 42 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยใช้วิธีใช้ความร้อน หลังทดสอบสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 40 (บน) และ 45 (ล่าง) องศาเซลเซียส……...115

รูปที่ 43 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชัน……..118

รูปที่ 44 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 เป็นสารก่ออิมัลชัน……..119

รูปที่ 45 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 เป็นสารก่ออิมัลชัน……..119

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

แผลติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Streptococcus* (Stulberg, 2002: 119-25) ซึ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามบริเวณผิวหนังของบุคคลทั่วไป ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังได้หลากหลาย และอาการที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละโรคที่เกิดขึ้น(Stevens, 2005: 1373-406) นอกจากนี้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ยังเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในโรงพยาบาลด้วย โดยทำให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนัง เนื้อเยื่อ และอวัยวะ ตลอดจนโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ซึ่งจากโรคแทรกซ้อนนี้เองจะทำให้อาการของโรคที่เป็นมีความรุนแรงขึ้นด้วย (Brewer, 2008: 342-6)

แผลติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่พบได้บ่อยจะเกิดเป็นโรคแผลพุพอง (impetigo) โดยมักเป็นตุ่มหนองตื้นๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบได้บ่อยที่บริเวณใบหน้า แขน และขา ซึ่งการรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังโดยทั่วไปจะเป็นการรักษาโดยให้ยาต้านจุลชีพแบบครอบคลุมเชื้อแกรมบวก เพื่อให้สามารถครอบคลุมเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ที่เป็นเชื้อกลุ่มหลักที่ทำให้เกิดแผลติดเชื้อ และเพื่อยับยั้งความรุนแรงของโรคด้วย ซึ่งในปัจจุบันผลิตภัณฑ์รักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังมีอยู่มากมายหลายชนิดและหลากหลายรูปแบบ เช่น ครีม ขี้ผึ้ง เป็นต้น

น้ำผึ้งเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรีย โดยน้ำผึ้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เนื่องจากมีสาร hydrogen peroxide ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลายชนิด (Bang, 2003: 267-73 และ Brudzynski , 2006: 1228-37) ซึ่งปริมาณของ hydrogen peroxide ที่พบในน้ำผึ้งนั้นจะขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ glucose oxidase และระดับของเอนไซม์ catalase ที่มาจากละอองเรณูของดอกไม้ (Weston, 2000: 235-9) โดยเมื่อน้ำผึ้งถูกเจือจางจะเกิดการสร้าง hydrogen peroxide ขึ้น เนื่องจากการเจือจางเป็นการสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของของเอนไซม์ glucose oxidase ในการออกซิไดซ์glucoseให้เปลี่ยนไปเป็น gluconic acid และ hydrogen peroxide (Bang, 2003: 267-73) การทำงานของเอนไซม์ glucose oxidase นั้นจะ

ทำงานได้ดีเมื่อค่า pH อยู่ระหว่าง 5.5-8.0 แต่การทำงานจะลดลงอย่างมากเมื่อค่า pH มีค่าต่ำกว่า 5.5 และจะไม่สามารถทำงานได้เมื่อค่า pH มีค่าเท่ากับ 4 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งยังขึ้นอยู่กับภูมิศาสตร์ ฤดูกาล แหล่งของพืช การเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิต และสภาวะในการเก็บรักษาด้วยซึ่งส่งผลต่อความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้มากถึง 100 เท่า (Molan, 2000: 249-50) นอกจากนี้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียยังขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้รวมทั้งชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วย (Basualdo, 2007: 375-81 และ Badawy, 2004: 1011-122 และ Adeleke, 2006) และได้มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในหนูแรท พบว่าน้ำผึ้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และส่งเสริมการรักษาแผลที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเทียบกับยา silver sulfadiazine (Osman, 2003) ในส่วนของการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยนั้นได้มีการนำมาใช้ในการรักษาแผลผ่าตัด พบว่าทำให้แผลผ่าตัดแคบลง การบวมและการอักเสบของแผลลดลง กลิ่นที่เกิดจากการติดเชื้อหายไปภายใน 1 สัปดาห์ และแผลหายสนิทภายใน 2 สัปดาห์โดยไม่ต้องกลับมาเย็บแผลซ้ำ (Phuapradit, 2002: 121-37)

จากการศึกษาการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีข้อดีคือ ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงในการใช้เหมือนกับยาปฏิชีวนะ สามารถใช้ได้ผลดีต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีประสิทธิภาพในการรักษาแผลได้ดี และสามารถป้องกันหรือลดการเกิดแผลเป็น แต่การนำน้ำผึ้งธรรมชาติมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อโดยตรงยังคงมีข้อจำกัดอยู่คือ ที่อุณหภูมิของผิวหนังนั้นจะทำให้น้ำผึ้งสามารถไหลได้ จึงมีความเสี่ยงที่น้ำผึ้งจะไหลซึมออกมานอกแผลได้ และยังทำให้เกิดความเหนอะหนะในการใช้ ซึ่งส่งผลต่อความร่วมมือในการใช้ของทั้งบุคลากรทางการแพทย์และผู้ป่วยอีกด้วย (Dunford, 2000: 63-8 และ Medihoney, 2001 และ Allen, 2000 และ Molan, 1998: 148-58)

คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงศักยภาพของน้ำผึ้งในการนำมาใช้รักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายในประเทศไทยนั้นมีมาจากดอกไม้หลากหลายชนิดเช่น น้ำผึ้งจากดอกลำไย น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งจากดอกงา เป็นต้น ซึ่งจากที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าแหล่งของพืชนั้นส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากน้ำผึ้งชนิดต่างๆเหล่านี้ เพื่อหาชนิดของน้ำผึ้งและความ

เข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และในประเทศไทยนั้นยังไม่มีการพัฒนานำผึ้งมาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรักษาแผลติดเชื้อแบคทีเรีย และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำผึ้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* เพื่อนำมาใช้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง ซึ่งเป็นการเพิ่มความสะดวกในการใช้งาน และเพิ่มทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยที่มีแผลติดเชื้อจากแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2. ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 คือ ความร้อน

3. พัฒนาสูตรตำรับยาพื้นครีมและครีมน้ำผึ้ง รวมทั้งศึกษาความคงตัวทางกายภาพของครีมน้ำผึ้งในสภาวะเร่ง

4. ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งกับตัวอย่างครีมที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้มุ่งศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของครีมน้ำผึ้ง รวมถึงความรู้สึกสัมผัสที่ดีของครีมน้ำผึ้ง โดยกำหนดขอบเขตของการวิจัยไว้ดังนี้

การวิจัยจะประกอบด้วย ขั้นตอนการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ขั้นตอนการเลือกชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ขั้นตอนการพัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งและศึกษาความคงตัวทางกายภาพของครีมน้ำผึ้งในสภาวะเร่ง ขั้นตอนการทดสอบความคงตัวของครีมน้ำผึ้ง และขั้นตอน

การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งกับตัวอย่างครีมที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ โดยมีตัวแปรที่ศึกษา ดังนี้

<u>ตัวแปรที่ศึกษาตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยข้อที่ 1</u>

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่

1.1 ชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.2 ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2. ตัวแปรตาม คือ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ขนาดของโซนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

<u>ตัวแปรที่ศึกษาตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยข้อที่ 2</u>

1. ตัวแปรอิสระ คือ อุณหภูมิที่ให้แก่น้ำผึ้ง

2. ตัวแปรตาม คือ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ค่าความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

<u>ตัวแปรที่ศึกษาตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยข้อที่ 3</u>

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่

1.1 ชนิดของสารก่ออิมัลชันในสูตรตำรับ

1.2 ปริมาณของสารก่ออิมัลชันในสูตรตำรับ

2. ตัวแปรตาม ได้แก่

2.1 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

2.1.1 สี

2.1.2 กลิ่น

2.1.3 การแยกชั้น

2.1.4 ความหนืด

2.2 ความรู้สึกสัมผัสของผลิตภัณฑ์

2.2.1 การกระจายตัวบนผิว

2.2.2 การเกิดปื้นขาว

2.2.3 ความเหนอะหนะ

2.3 ความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

2.3.1 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

2.3.2 ความรู้สึกสัมผัสของผลิตภัณฑ์

<u>ตัวแปรที่ศึกษาตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยข้อที่ 4</u>

1. ตัวแปรอิสระ คือ ชนิดของครีมที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2. ตัวแปรตาม คือ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ขนาดของโซนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

สมมติฐานของการวิจัย

1. ชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่แตกต่างกัน ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แตกต่างกัน

2. อุณหภูมิมีผลต่อฤทธิ์ของน้ำผึ้งในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3. ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันที่แตกต่างกันมีผลต่อลักษณะทางกายภาพ ความรู้สึกสัมผัส และความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน

4. สูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ไม่แตกต่างจากตัวอย่างครีมที่มียาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านคุณสมบัติของน้ำผึ้งและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 กลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้ง การตั้งตำรับครีมน้ำผึ้งให้มีความคงตัวและการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากการวัดขนาดของโซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำผึ้งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้

3. ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งที่อุณหภูมิต่างๆ

4. ตั้งสูตรตำรับครีมพื้น จากการประเมินลักษณะทางกายภาพ ความคงตัวหลังการผ่านสภาวะเร่ง และความรู้สึกสัมผัสของครีมจากการใช้ชนิดและปริมาณสารก่ออิมัลชันที่แตกต่างกัน

5. พัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้ง และเลือกความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากการประเมินความคงตัวหลังผ่านสภาวะเร่ง

6. ประเมินความคงตัวหลังการผ่านสภาวะเร่ง และความรู้สึกสัมผัสของครีมมีส่วนผสมของน้ำผึ้ง

7. ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งกับตัวอย่างครีมที่มียาปฏิชีวนะ

8. วิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดลอง

ข้อจำกัดของการวิจัย

ข้อจำกัดเรื่องเวลาในการทำการวิจัย เนื่องจากการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ต้องใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถทดสอบความคงตัวที่ใช้ระยะเวลานานกว่านี้ได้ และข้อจำกัดในการใช้เครื่องมือในการทำการวิจัย เนื่องจากการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี heating-cooling cycle นั้นจะต้องทำการศึกษาอย่างน้อยเป็นเวลา 12 วันต่อเนื่องกัน (6 รอบ) แต่เนื่องด้วยระบบการรักษาความปลอดภัยในการใช้งานห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อเนื่องเป็นเวลา 12 วันติดกันได้ และจากเหตุผลเดียวกันนั้นจึงทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาการพัฒนาครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งได้ตามเวลาที่ระบุไว้ในตารางแผนการดำเนินงานได้ด้วยเช่นกัน

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้จากการทำการวิจัยครั้งนี้คือ ได้ทักษะในการทำวิจัยรวมถึงการแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำการวิจัยอย่างเป็นระบบ รวมถึงได้มีการใช้องค์ความรู้ในการทำการวิจัย การวางแผนการวิจัยอย่างเป็นระบบ รวมถึงได้ผลิตภัณฑ์ครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นทางเลือกในการรักษานอกเหนือจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และเป็นการเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์ของน้ำผึ้งซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่หาได้ง่าย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจำแนกเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่สามารถเจริญที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) หรือเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ได้เช่นกัน ลักษณะของโคโลนีเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นจะพบว่ามีรูปร่างกลมขนาดเล็ก รวมกันเป็นกลุ่มๆ คล้ายรูปพวงองุ่น และสามารถเห็นเป็นลักษณะวงกลมสีทองอมเหลืองขนาดใหญ่ได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้อาหาร blood agar เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ β-hemolysis ได้ นอกจากนี้คุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีประโยชน์ต่อการจำแนกออกจากเชื้อในกลุ่ม staphylococci อื่นๆ คือ สามารถให้ผลบวกแก่เอนไซม์ coagulase ได้ เชื้อ *Staphylococcus aureus* นั้นเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์เนื่องจากสามารถก่อโรคได้ทั้งทางระบบผิวหนังและระบบทางเดินหายใจ

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ตามหลักวิทยาศาสตร์

การจำแนกตามหลักวิทยาศาสตร์	
โดเมน (domain)	Bacteria
อาณาจักร (kingdom)	Eubacteria
ไฟลัม (phylum)	Firmicutes
ชั้น (class)	cocci
ลำดับ (order)	Bacillales
วงศ์ (family)	Staphylococcaceae
สกุล (genus)	*Staphylococcus*
สปีชี่ส์ (species)	*Staphylococcus aureus*
ชื่อทวินาม (binomial nomenclature)	*Staphylococcus aureus*

ประวัติและลักษณะตามธรรมชาติของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

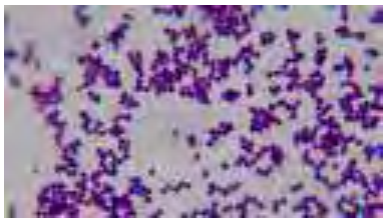
เชื้อในกลุ่ม Staphylococci ถูกสำรวจเป็นครั้งแรกโดย Von Recklinghausen ในปี ค.ศ. 1871 และในปี ค.ศ. 1880 Louis Pasteur ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม cocci จากหนองของผู้ป่วย และได้ทำการปลูกฝีแก่กระต่าย ซึ่งหลังจากนั้น Sir Alexander Ogston ศัลยแพทย์ชาวสก็อตได้เป็นผู้สรุปบทบาทของเชื้อในกลุ่ม cocci ซึ่งพบในฝีและแผลที่มีหนองต่างๆ จากนั้นจึงได้ตั้งชื่อให้กับเชื้อในกลุ่มนี้ว่า *Staphylococcus* โดยคำว่า staphyle มาจากคำในภาษากรีกที่มีความหมายว่าพวงองุ่น มาผสมกับ kokkos ที่มีความหมายว่าเม็ดเล็กๆ เนื่องจากการค้นพบพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผ่านทางกล้องจุลทรรศน์นั้นมีลักษณะคล้ายพวงองุ่นขนาดเล็กๆ นอกจากนี้ Sir Alexander Ogston ยังพบว่าเชื้อในกลุ่ม staphylococci นั้นสามารถพบได้ที่ผิวหนังของคนเป็นปกติได้เช่นกัน ในปี ค.ศ. 1884 Rosenbach ได้ทำการแยกเชื้อ 2 สปีชี่ส์ออกจากกัน และได้ทำการตั้งชื่อเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์เป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus Albus* ซึ่งต่อมาได้มีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งให้ผลทดสอบเอนไซม์ coagulase เป็นลบ และไม่สามารถที่จะเปลี่ยนสีอาหารวุ้น mannitol salt agar (MSA) ให้เป็นสีเหลืองได้เหมือนกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Murray, 2005: 221-236 และ Bannerman, 2003: 384-404)

เชื้อในกลุ่ม Staphylococci อาศัยอยู่ทั่วไปในธรรมชาติโดยส่วนมากที่พบในมนุษย์นั้นจะพบบริเวณผิวหนัง ต่อมต่างๆของผิวหนัง และสามารถพบได้ในสัตว์บางชนิดเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงนกบางชนิดด้วย โดยจะสามารถพบเชื้อในกลุ่มนี้ได้ที่บริเวณเนื้อเยื่อบุผิว โดยปกติแล้วนั้นเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะอาศัยกับโฮสต์แบบอยู่ร่วมกันอย่างสมดุล แต่เมื่อเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ผ่านทางเนื้อเยื่อที่มีบาดแผล การใช้เข็มร่วมกันหรือแม้กระทั่งจากการฝังอุปกรณ์ทางการแพทย์ไว้ในตัวของผู้ป่วย เชื้อที่เคยอาศัยแบบอยู่ร่วมกันอย่างสมดุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้เช่นกัน (Murray, 2005: 221-236)

ลักษณะโคโลนีจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมื่อนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์นั้นจะพบว่าจะมีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมครอน มีรูปร่างคล้ายพวงองุ่น โดยสามารถพบได้ใน

รูปแบบเดี่ยวๆ เป็นคู่ๆ หรือเกาะกลุ่มกันเป็นสายโซ่สายสั้นๆ โดยปกติเชื้อจะไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ แต่ในบางสายพันธุ์จะสามารถที่จะสร้างส่วนที่เป็นแคปซูลได้ การเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 10-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส และค่า pH อยู่ที่ 7.4-7.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยปกติจะทำการบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อจะสามารถเจริญขึ้นมาเป็นโคโลนีให้สามารถสังเกตเห็นได้ (Bannerman, 2003: 384-404)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากหนองของผู้ป่วย

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีสีทองอมส้ม
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* จะสามารถหมักน้ำตาล mannitol และเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดได้ แต่ไม่ทำให้เกิดแก๊สขึ้น โดยกระบวนการหมักจะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยอากาศ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถให้ผลบวกกับเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ urease ได้ สามารถเปลี่ยนสารในกลุ่ม nitrate ไปเป็นสารในกลุ่ม nitrite ได้ แต่ไม่ให้ผลบวกแก่สารประกอบกลุ่ม indole เชื้อยังสามารถผลิตเอนไซม์ phosphatase ในอาหาร nutrient agar ที่มีส่วนผสมของ phenolphthalein diphosphate ได้ และถ้าทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย potassium tellurite สาร tellurite จะสามารถถูกริดิวซ์โดยเชื้อ และทำให้เกิดโคโลนีสีดำของเชื้อขึ้นได้ (Bannerman, 2003: 384-404) นอกจากนี้มีการศึกษาเอนไซม์และสารที่สำคัญที่เชื้อสามารถผลิตได้ พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. เอนไซม์ coagulase เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำให้น้ำเลือดเกิดการแข็งตัวจับกันเป็นก้อนได้ ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการทดสอบเอนไซม์ coagulase นั้นสามารถนำมาช่วยในการคัดกรองหา *Staphylococcus aureus* ได้อย่างรวดเร็ว การทดสอบเอนไซม์ coagulase สามารถทำได้โดยใช้น้ำเลือดของกระต่ายที่เติม ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ลงไปด้วย (Bannerman, 2003: 384-404)

2. เอนไซม์ nuclease ที่สามารถทนความร้อนได้ (TNase) เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่เป็นทั้ง endonucleolytic และ exonucleolytic ซึ่งสามารถตัดสาย RNA และสาย DNA ได้ ในการทดสอบจะสามารถตรวจพบเอนไซม์นี้ได้โดยการนำเชื้อมาทดสอบด้วยวิธี agar diffusion จะพบว่าเชื้อสามารถที่จะย่อยสายดีเอ็นเอที่ผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ หรือสามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ได้โดยการใช้วิธี metachromatic agar diffusion และใช้ DNase toludene blue agar ช่วยในการตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง

3. Acetoin เป็นสารที่สร้างมาจากglucoseหรือ pyruvate ซึ่งเป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสามารถตรวจหา acetoin โดยการใช้วิธี Voges-Proskauer test tube และนำไปบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Bannerman, 2003: 384-404)

การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทางห้องปฏิบัติการ

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2554) ได้กำหนดมาตรฐานการปฏิบัติงานหัวข้อการตรวจวิเคราะห์ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยา ซึ่งระบุการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ไว้ดังนี้

1. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus*

1. pipetteสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำในสัดส่วน 1 ต่อ 10) จำนวน 10 มิลลิลิตร หรือ จำนวนที่เทียบเท่ากับตัวอย่างทดสอบ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น tryptic soy broth (TSB) หรือ casein-peptone lecithin polysorbate broth (CLP) จำนวน 100 มิลลิลิตร หรือจำนวนที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. ทำการต่อเชื้อ (subculture) จากอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 ลงบน mannitol salt agar (MSA) หรือ Baird-Parker Agar (BPA) หรือ Vogel-Johnson Agar (VJA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง

3. ย้อมสีแกรม และเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเชื้อที่พบในตัวอย่างกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานตามตารางที่ 2 ถ้าเชื้อที่พบในตัวอย่างมีลักษณะโคโลนีและสีแกรมเหมือนกับเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน (เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) แสดงว่าตัวอย่างอาจมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* ปนเปื้อนอยู่ด้วย

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อมาตรฐาน (เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	การย้อมสีแกรม
Baird-Parker Agar (BPA)	มีสีดำ ลักษณะเป็นมัน ล้อมรอบด้วยโซนใสขนาด 2-5 มิลลิเมตร	แกรมบวก (ลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มๆ)
Mannitol salt agar (MSA)	มีสีเหลือง ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	แกรมบวก (ลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มๆ)
Vogel-Johnson Agar (VJA)	มีสีดำ ล้อมรอบด้วยโซนสีเหลือง	แกรมบวก (ลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มๆ)

2. การตรวจยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยใช้การทดสอบเอนไซม์ coagulase

1. เขี่ยเชื้อที่สงสัยจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA หรือ BPA หรือ VJA ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Bactident® coagulase (plasma ของกระต่าย) 0.5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าและนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตการจับเป็นก้อนของน้ำเลือดกระต่ายเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง และจนครบ 24 ชั่วโมง โดยถ้ามีการจับเป็นก้อนของน้ำเลือดกระต่ายเกิดขึ้นจากเชื้อที่สงสัยแสดงว่าตัวอย่างนี้มีเชื้อ *Staphylococcus aureus*

2. ทำ positive control ด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* เพื่อเปรียบเทียบผล

3. ทำ negative control ด้วยเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* เพื่อเปรียบเทียบผล

4. กรณีที่ต้องการยืนยันผลเพิ่มเติม สามารถยืนยันผลโดยใช้เครื่องเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดเชื้อจุลินทรีย์อัตโนมัติ (VITEK) ได้

การก่อโรคและการยับยั้งการก่อโรคจากเชื้อ *Staphylococcus aureus*

การก่อโรคของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทางหนึ่งนั้นเกิดจากสารพิษของเชื้อที่ถูกหลั่งออกมา โดยการหลั่งของสารพิษจะขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อด้วย โดยสามารถแบ่งพิษออกมาได้เป็น 3 ประเภทซึ่งสามารถจะก่อโรคได้ มีดังนี้ (Humpreys, 2002: 168-173, Foster, 2004: 1693–6 และ Botach)

1. Pyrogenic toxin super antigens (PTS AgS) เป็นกลุ่มของสารพิษที่มีความสามารถในการเป็น superantigen ที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการ toxic shock syndrome (TSS) ได้ สารพิษในกลุ่มนี้ที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* สร้างขึ้นมาจะเป็นสารที่มีชื่อว่า TSS toxin type-1 (TSST-1) ที่สามารถก่อให้เกิด TSS ได้ และยังมีสารที่เป็น enterotoxins ที่สามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษที่จะมีอาการท้องเสียและอาเจียนเมื่อรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสารพิษนี้เข้าไป

2. Exfoliative toxins เป็นสารพิษที่มีความสามารถในการทำให้ผิวหนังเกิดการหลุดลอกได้ ซึ่งจะทำให้เกิดโรค staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) ขึ้นโดยโรคนี้จะพบได้มากในทารกและเด็กเล็ก

3. Membrane damaging toxins ซึ่งจะประกอบไปด้วย toxin α, toxin β, toxin γ และ panton valentine leukodicin (PVL) โดย PVL นั้นเป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างรุนแรงได้และเกิดโรคปอดบวมชนิดที่มีการตายของเนื้อปอดขึ้น (necrotizing pneumonia) ในส่วนของ toxin α หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า α-hemolysin นั้นจะเป็นสารพิษที่ถูกยับยั้งได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่สามารถกลับมาทำงานได้ใหม่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสนั้นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของสารพิษ (protective inhibitor) จะยังสามารถทำงานได้อยู่ แต่เมื่อสารถูกความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ไปแล้วนั้น จะเกิดการเสื่อมสลายของสารไป จึงสูญเสียการทำหน้าที่ในการยับยั้งสารพิษจึงทำให้สารพิษกลับมาทำงานอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้ สารพิษ β-hemolysin เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย sphingomyelin ซึ่งเป็น sphingolipid ที่พบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์ และพบที่บริเวณ myelin sheath ในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท และเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของแกะแตกได้ ส่วน γ-hemolysin เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้เช่นกัน

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง โดยการติดเชื้อนั้นสามารถเกิดได้ตั้งแต่ในเด็กจนถึงผู้ใหญ่ โดยเฉพาะการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิต้านทานต่ำ เช่น ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องนั้นจะสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อทั้งชั้นตื้นและชั้นลึกที่มีความรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Berger, 1993: 296-300) นอกจากนี้การติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถทำให้เกิดโรคได้หลากหลายชนิดซึ่งขึ้นกับบริเวณที่ติดเชื้อว่าเป็นผิวหนังในระดับความลึกเพียงใด โดยสามารถแบ่งโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยใช้ระดับความลึกของผิวหนังเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาได้เป็น 2 ระดับดังนี้

1. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระดับชั้นหนังกำพร้า

1.1 โรคแผลพุพอง (impetigo) เป็นการติดเชื้อในชั้นหนังกำพร้าที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมักจะเกิดในเด็กโดยเฉพาะเด็กอายุ 2-5 ขวบที่อาศัยอยู่ในบริเวณภูมิประเทศที่มีอากาศร้อนชื้น ซึ่งอากาศร้อนและการรักษาสุขอนามัยของตัวผู้ป่วยที่ไม่ดีเองนั้นเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ การเกิดโรคนั้นสามารถเกิดได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง โดยในผู้ใหญ่มักจะเกิดกับเพศชายมากกว่าเพศหญิง การเกิดโรคจะเกิดจากการที่เมื่อผิวหนังมีแผลเกิดขึ้นจะทำให้ส่วน fibronectin receptor ที่อยู่ภายในผิวหนังปรากฏออกมา โดย fibronectin receptor จะเป็นตัวรับที่เชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใช้ในการเข้าสู่เซลล์ของร่างกาย ซึ่งเชื้อจะใช้ส่วน teichoic acid ในการจับกับ fibronectin receptor ซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายได้ โรคแผลพุพองจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.1.1 Bullous impetigo โดยส่วนใหญ่มักจะเกิดจาก *Staphylococcus aureus* ในประเภท coagulase-positive group II *Staphylococcus aureus* โดยเชื้อจะสร้าง epidermolytic toxin ออกมาซึ่งมีผลทำให้เกิดผิวหนังบริเวณที่สัมผัสกับสารพิษเกิดการตายขึ้นได้ นอกจาก coagulase-positive group II *Staphylococcus aureus* แล้วยังพบเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุของโรคได้อีก เช่น เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จะพบได้ประมาณร้อยละ 20 เป็นต้น (Geria, 2010: 65-70) อาการแสดงของผู้ป่วยจะเกิดถุงน้ำใสในบริเวณผิวหนังที่มีการติดเชื้อซึ่งสามารถแตกได้ง่าย ซึ่งเมื่อแผลแห้งสนิทแล้วจะยังคงเหลือรอยสีน้ำตาลอยู่ และมีลักษณะเป็นขุยๆ บริเวณที่เป็นส่วนใหญ่จะพบที่บริเวณลำคอ ก้นของเด็กที่ใส่ผ้าอ้อม โดยลักษณะของโรคจะแตกต่างจาก non-bullous impetigo ตรงที่ bullous impetigo จะเกิดโรคที่บริเวณเนื้อเยื่อ

บริเวณกระพุ้งแก้มได้ด้วย และมักจะมีการแพร่กระจายของโรคไปมากกว่า non-bullous impetigo ตัวอย่างประชากรที่มีความเสี่ยงที่สามารถจะเป็นโรคนี้ ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์, ผู้ป่วยที่ต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานๆ, ผู้ป่วยที่ต้องมีการเจาะเข็มฉีดยาเข้าเส้นเลือดเป็นระยะเวลานานๆ และโรคนี้ยังสามารถพบได้บ่อยในเด็กอายุต่ำกว่า 2 ขวบ

รูปที่ 3 แสดงรอยโรคของ bullous impetigo (Stulberg, 2002: 119-23)

1.1.2 Non-bullous impetigo (impetigo contagiosa) โดย non-bullous impetigo จะพบได้บ่อยมากกว่า bullous impetigo โดยพบประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลพุพอง (Cole, 2007: 859-64) การเกิดโรค non-bullous impetigo นั้นมักจะเริ่มต้นจากการที่ผิวหนังเกิดการติดเชื้อ *Streptococcus pyogenes* (group A β-hemolytic streptococci; GABHS types 49, 52, 53, 55-57, 59, 61) แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อ *Streptococcus pyogenes* มักจะถูกแทนที่ด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* แทน (พบเพียง 25-40% เท่านั้นที่จะพบเชื้อได้ทั้ง 2 ชนิด) เนื่องมาจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถที่จะสร้าง bacteriocin มากำจัดเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ได้ นอกจาก group A β-hemolytic streptococci จะสามารถก่อให้เกิดโรคนี้ได้แล้วนั้น streptococci กลุ่มอื่นๆยังสามารถก่อให้เกิดโรค non-bullous impetigo ได้เช่นกัน เช่น group B streptococci จะสามารถก่อให้เกิดโรคแผลพุพองได้ในเด็กแรกเกิด เป็นต้น โดยส่วนมากโรค non-bullous impetigo จะมีอาการแสดงโดยเริ่มจากผู้ป่วยมีแผลตุ่มหนองขนาดเล็กก่อนโดยมักจะเกิดที่บริเวณใบหน้าและส่วนแขน ขา (แผลมักจะมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร) หลังจากนั้นเมื่อแผลแห้งแล้วจะตกเป็นสะเก็ดซึ่งจะไม่เกิดเป็นแผลเป็นเกิดขึ้น การ

ติดเชื้อสามารถเกิดได้ทั้งจากการถูกสัตว์กัด ข่วน การถูกสิ่งของมีคมบาด รวมไปถึงโรคอีสุกอีใส (Moulin, 2008)

รูปที่ 4 แสดงรอยโรคของ non-bullous impetigo (Stulberg, 2002: 119-23)

การรักษาโรคแผลพุพองมักจะใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่เป็นสาเหตุการก่อโรค ดังนั้นการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็น β-lactam นั้นจึงเป็นยาทางเลือกแรกที่ใช้ในการรักษาโรคนี้ การใช้จะนิยมใช้ยาในรูปแบบยาทาภายนอก ในกรณีที่เกิดแผลจำนวนมากหรือเป็น bullous impetigo จะใช้ยาในรูปแบบรับประทานร่วมกับยาทาภายนอก นอกจากนี้การรักษาจะต้องมีการดูแลรักษา ทำความสะอาดแผลให้มีความเหมาะสมด้วย

การใช้ยาปฏิชีวนะในรูปแบบยาทาภายนอก มักจะใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลพุพองที่ไม่มีรุนแรงนัก โดยยาปฏิชีวนะจะกำจัดเชื้อในบริเวณแผลที่เป็นและเป็นการช่วยจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อไปยังบุคคลอื่น ยาที่มักจะเลือกใช้ในการรักษามีดังต่อไปนี้

1. Mupirocin เป็นยาในรูปแบบขี้ผึ้ง Scheinfeld (2008) และ Wilkinson (1988) ได้ทำการศึกษาพบว่า mupirocin มีประสิทธิภาพในการรักษาแผลติดเชื้อเหนือกว่า polymyxin B และ neomycin ในรูปแบบยาทาภายนอก และมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับ cephalexin ในรูปแบบยารับประทาน นอกจากนี้ Bass (1997) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ mupirocin เช่นกัน พบว่า mupirocin ในรูปแบบยาทา

ภายนอกและ cephalexin ในรูปแบบยารับประทานมีประสิทธิภาพในการรักษาเหนือกว่า bacitracin ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA นั้นมีอัตราการดื้อต่อ mupirocin ในช่วงร้อยละ 5-10 (Scheinfeld, 2008: 409-415 และ Silverberg, 2008: 211-9) โดยทั่วไปการรักษา non-bullous impetigo ที่มีลักษณะเป็นแผลเดี่ยวๆ มักใช้ยา mupirocin ทาบริเวณที่เป็นวันละ 2-3 ครั้ง เป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน

2. Retapamulin เป็นยาในรูปแบบขี้ผึ้งที่ได้รับการรับรองข้อบ่งใช้จากสำนักงานอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา ให้สามารถใช้ในการรักษาโรคแผลพุพองที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และ MRSA ในเด็กที่อายุมากกว่า 9 เดือน (Koning, 2008: 1077-82 และ Jacobs, 2007: 591-600) โดยใช้ทาวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน ติดต่อกัน retapamulin มีสเปคตรัมครอบคลุมเชื้อที่กว้างกว่า mupirocin (Scheinfeld, 2008: 409-415 และ Jones, 2005: 34-7) โดยสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดได้เช่น เชื้อที่ดื้อต่อยา methicillin, erythromycin, fusidic acid, mupirocin, azithromycin, levofloxacin เป็นต้น (Woodford, 2008: 766-8 และ Boyd, 2006: 107)

3. Fusidic acid เป็นยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย และมักจะเป็นยาทางเลือกแรกในการรักษาโรคแผลพุพองในกลุ่มประเทศยุโรปและประเทศอื่นๆ นอกจากสหรัฐอเมริกาที่ไม่มีการใช้ยานี้ (Drug and Therapeutics Bulletin, 2008: 76-9) ในปัจจุบันพบว่ามีอัตราการดื้อยา fusidic acid สูงถึงร้อยละ 32.5-50 (Denton, 2008: 586-8, O'Neill, 2007: 1505-10 และ Laurent, 2009: 420-1)

4. ยาทาภายนอกชนิดอื่นๆ เช่น clindamycin ในรูปแบบครีมหรือโลชันสามารถใช้ในการรักษาแผลพุพองขั้นรุนแรงที่เกิดจาก MRSA ได้ (Gelmetti, 2008: 187-95) gentamicin ในรูปแบบขี้ผึ้งหรือครีมสามารถใช้ในการรักษาแผลพุพองจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ แต่การใช้ค่อนข้างจำกัดเนื่องจากมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่รุนแรงคือ เป็นพิษต่อหูและไต (Scheinfeld, 2008: 409-415 และ Gelmetti, 2008: 187-95) hydrogen peroxide 1% ในรูปแบบครีมสามารถใช้รักษาโรคแผลพุพองได้เช่นกัน โดยใช้ทาวันละ 2-3 ครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยการใช้อาจทำให้เกิดการแพ้จากสารประกอบภายในสูตรตำรับได้บ้าง (Gelmetti, 2008: 187-95) tetracycline สามารถใช้ในโรคแผลพุพองได้ แต่มีการใช้ที่จำกัด เนื่องจากสามารถก่อให้เกิด photosensitivity ได้ (Gelmetti, 2008: 187-95 และ Kuniyuki, 2005: 788-92) และห้ามใช้ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 8 ขวบ

การใช้ยาปฏิชีวนะในรูปแบบยารับประทาน จะใช้เมื่อเชื้อได้เข้าไปแพร่กระจายผ่านทางระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกายแล้ว ซึ่งทำให้โรคกระจายเป็นวงกว้าง การใช้ยาจึงใช้ยาปฏิชีวนะที่สามารถครอบคลุมเชื้อแกรมบวกได้ดี โดยกลุ่มที่ใช้นั้นจะเป็นยาปฏิชีวนะที่ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase เช่น กลุ่ม cephalosporins, amoxicillin-clavulanate, cloxacillin และ dicloxacillin เป็นต้น ซึ่งในเด็กได้มีการแนะนำให้ใช้ cephalexin เป็นยาทางเลือกแรกในการรักษา โดยถ้าเชื้อสาเหตุเป็น MRSA จะเปลี่ยนไปใช้ยาในกลุ่มอื่นแทน เช่น clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole และ vancomycin เป็นต้น ในกรณีที่ผู้ป่วยแพ้ต่อยาในกลุ่ม penicillins จะเปลี่ยนมาใช้ยา clindamycin และ erythromycin ได้ โดยยา erythromycin ต้องมีการตรวจสอบข้อมูลอัตราการดื้อยาของเชื้อก่อนที่จะเริ่มใช้ เนื่องจากมีอัตราการดื้อยาที่ค่อนข้างสูง

1.2 Ecthyma เป็นการติดเชื้อที่เกิดจาก *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนังระดับ ลึกกว่าโรคแผลพุพอง อาการเริ่มแรกนั้นจะมีลักษณะคล้ายแผลพุพอง และจะมีขนาดของรอยโรคค่อนข้างคงที่ไปจนอาจมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขยายมากกว่าเดิมได้ถึง 0.5-3 เซนติเมตร แต่เมื่อโรคหายแล้วนั้นสะเก็ดที่เกิดขึ้นจะมีสีเทาปนเหลืองและมีความหนาของสะเก็ดมากกว่าโรคแผลพุพอง และโรคมักจะหายได้ช้า โรคนี้สามารถพบได้ในผู้ป่วยที่มีการแกะเกาแผลที่เป็น ผู้ป่วยผิวหนังอักเสบ ถูกแมลงกัดต่อย หรือในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำ เช่น ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น โดยโรคสามารถแพร่กระจายได้ง่ายในผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุมชนแออัด หรือผู้ป่วยที่มีไม่รักษาสุขอนามัย บริเวณที่เกิดโรคส่วนใหญ่มักจะเป็นที่บริเวณขา และมักจะทิ้งรอยแผลเป็นเอาไว้เมื่อแผลหายไปแล้ว

การรักษาโรค ecthyma จะขึ้นกับความรุนแรงของแผลที่เป็น โดยในระหว่างการรักษาควรมีการรักษาความสะอาดของแผลอย่างสม่ำเสมอ เช่น ใช้สบู่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียเวลาอาบน้ำ เป็นต้น ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะในรูปแบบยาทาภายนอก เช่น ใช้ยา mupirocinในรูปแบบยาขี้ผึ้งทาบริเวณที่เป็นแผล แต่ถ้าหากแผลที่เป็นมีความลุกลามมากยิ่งขึ้น ผู้ป่วยมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ยาปฏิชีวนะในรูปแบบยารับประทานร่วมด้วยโดยจะต้องรับประทานยาติดต่อกันหลายสัปดาห์ ส่วนมากจะใช้ยาในกลุ่ม penicillins เป็นหลัก เช่น dicloxacillin เป็นต้น นอกจากนี้อาจใช้ยากลุ่มอื่นแทนได้ในกรณีที่ผู้ป่วยแพ้ยาในกลุ่ม penicillins เช่น clindamycin และ erythromycin เป็นต้น และถ้าหากแผลมีการกระจายเป็นวงกว้างมากๆ สามารถใช้ยาในรูปแบบยาฉีดช่วยในการรักษาโรคได้

2. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระดับชั้นหนังแท้

2.1 โรคไฟลามทุ่ง (erysipelas) เป็นการเกิดติดเชื้อที่บริเวณหนังแท้ส่วนบน และบริเวณ upper subcutaneous tissue บริเวณที่เกิดโรคส่วนใหญ่จะเกิดที่ใบหน้า โดยเชื้อที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคนั้นโดยทั่วไปมักจะเกิดจากเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* โรคบางชนิดสามารถที่จะส่งเสริมทำให้เกิดการติดเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ได้เช่น โรคเบาหวาน, nephrotic syndrome, ผู้ป่วยภูมิต้านทานบกพร่อง, โรคบวมน้ำเหลือง (lymphedema) หรือการติดสุราก็สามารถส่งเสริมทำให้เกิดการติดเชื้อได้เช่นกัน (Scheinfeld, 2008: 409-415) โดย Pereira de Godoy (2009) ได้ทำการศึกษาพบว่าโรคไฟลามทุ่งนั้นมักจะเป็นอาการแทรกซ้อนของโรคบวมน้ำเหลืองหลังจากการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม นอกจากนี้โรคไฟลามทุ่งมักจะมีการแพร่กระจายไปตามระบบท่อน้ำเหลืองด้วย อาการที่พบจะเป็นผื่นที่มีลักษณะแดง กดเจ็บ ปวดบวมและร้อน รวมถึงทำให้ต่อมน้ำเหลืองนั้นเกิดการบวมและกดเจ็บ

รูปที่ 5 แสดงรอยโรคของโรคไฟลามทุ่ง (Stulberg, 2002: 119-23)

การรักษาโรคไฟลามทุ่งจะเน้นไปที่การใช้ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อในกลุ่ม *Streptococcus* เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคนี้ มักจะเลือกใช้ยาในกลุ่ม penicillins เป็นยาทางเลือกแรกในการรักษา

(Bishara, 2001: 722-4) การใช้ยาจะใช้ในรูปแบบยารับประทานหรือในรูปแบบยาฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยมีระยะเวลาในการรักษา 10-20 วัน ในกรณีที่ผู้ป่วยแพ้ยาในกลุ่ม penicillins จะสามารถเลือกใช้ยาในกลุ่มอื่นแทนได้ เช่น erythromycin หรือ azithromycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม macrolides ส่วนการให้ยาที่ครอบคลุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่ายังไม่มีความจำเป็น แต่ถ้าหากผู้ป่วยทำการรักษาด้วยยากลุ่ม penicillins แล้วอาการไม่ดีขึ้น ควรที่จะพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะที่ครอบคลุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วย

2.2 Cellulitis เป็นการอักเสบของเนื้อเยื่อชั้นหนังแท้ และชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) ที่ไม่มีการตายของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น อาการที่เกิดขึ้นจะมีอาการบวม กดเจ็บ แดงและร้อน ในบริเวณผิวหนังที่เป็น โดยมักจะเป็นที่บริเวณขา (Ellis Simonsen, 2006:293-9) รอยโรคจะมีความแตกต่างจากโรคไฟลามทุ่งตรงที่บริเวณขอบของรอยโรคนั้นจะไม่มีลักษณะนูนขึ้นมา และไม่เห็นขอบเขตชัดเจนเหมือนโรคไฟลามทุ่ง (Lazzarini, 2005: 383-9) การเกิดโรคนั้นมักจะเกิดจากที่ผิวหนังมีแผลขึ้นเช่น เกิดรอยบาด แมลงสัตว์กัดต่อย เป็นต้น ทำให้เชื้อมีโอกาสที่จะแพร่กระจายลงมาถึงบริเวณส่วนหนังแท้ แต่อย่างไรก็ตามอาการแสดงส่วนใหญ่นั้นมักจะไม่เกิดในบริเวณที่มีบาดแผลเกิดขึ้นอย่างชัดเจน ปัจจัยหลักที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อของโรคนี้นั้นจะเกิดจากปัจจัยของตัวผู้ป่วยเองโดยผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นโรคนี้นั้นจะเป็นผู้ป่วยสูงอายุที่มีโรคประจำตัวเช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือโรคความดันโลหิตสูง รวมถึงผู้ป่วยที่ต้องให้ยาผ่านทางหลอดเลือดดำหรือผ่านทางชั้นไขมันใต้ผิวหนังด้วย ซึ่งผู้ป่วยสูงอายุที่มีโรคประจำตัวเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคเกิดจาก MRSA ส่วนคนที่มีภูมิคุ้มกันตามปกตินั้นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมักจะเป็นเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* และในทารกที่อายุต่ำกว่า 6 เดือนนั้นมักจะเกิดจากเชื้อ Group B *Streptococcus* มากกว่า เนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันในเด็กทารกยังมีการพัฒนาไม่เต็มที่

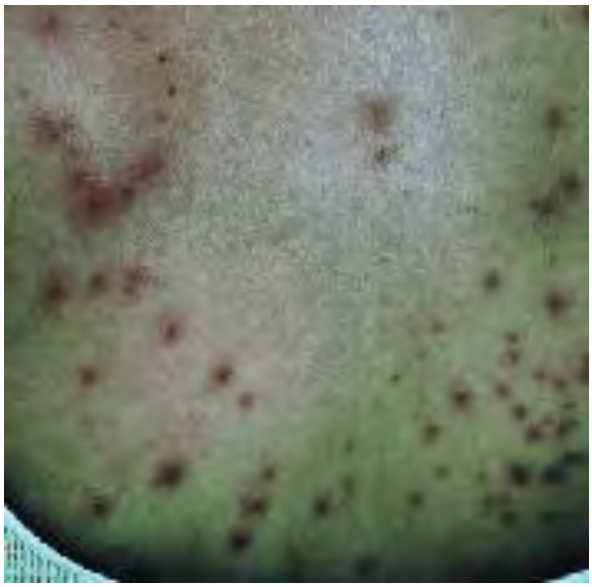
รูปที่ 6 แสดงรอยโรคของ cellulitis (Stulberg, 2002: 119-23)

การรักษา cellulitis จะเน้นไปที่การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ร่วมกับการดูดหนองที่เกิดขึ้นในกรณีที่เกิดฝีร่วมด้วย ผู้ป่วยที่มีอาการของโรคไม่มากนัก (อาการของโรคเป็นแค่เฉพาะที่ และไม่มีอาการทางร่างกาย) สามารถให้การรักษาผู้ป่วยได้โดยไม่จำเป็นต้องให้ผู้ป่วยนอนพักในโรงพยาบาล ระยะเวลาในการรักษา cellulitis ยังไม่แน่ชัด โดย Hepburn (2004) ได้ทำการศึกษาพบว่าการรักษาในระยะเวลาสั้นให้ประสิทธิภาพในการรักษาเท่าเทียมกันกับการรักษาในระยะเวลายาว นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยควรมีการติดตามการตอบสนองต่อยาภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับยาไปว่าอาการของผู้ป่วยดีขึ้นหรือไม่ ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อยาได้ช้า ควรจะมีการให้ยาปฏิชีวนะต่อเนื่องกันไปจนกว่าอาการอักเสบของผู้ป่วยจะหายไป การให้ยาปฏิชีวนะในวันแรกที่ทำการรักษามักจะทำให้อาการผื่นแดงเกิดเพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่พบได้ และควรมีความระมัดระวังในกรณีที่รักษาผู้ป่วยไปแล้วผู้ป่วยมีอาการความดันต่ำ และหัวใจเต้นเร็วขึ้น แสดงถึงว่าเชื้อได้กระจายเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการดูแลเป็นพิเศษมากขึ้น

3. การติดเชื้อในรูปแบบอื่นๆ นอกเหนือจากการติดเชื้อที่ขึ้นกับความลึกของผิวหนัง เช่น

3.1 โรครูขุมขนอักเสบ (folliculitis) เป็นโรคที่เกิดการอักเสบภายในรูขุมขน ทำให้รูขุมขนเกิดเป็นตุ่มหนองขึ้น ซึ่งการอักเสบนั้นสามารถเกิดได้ทั้งที่บริเวณผิวหนังชั้นตื้นและชั้นลึก โดยการอักเสบที่บริเวณผิวหนังชั้นตื้นนั้นสามารถพัฒนาไปทำให้เกิดการติดเชื้อในชั้นในผิวหนังชั้นลึกได้ด้วยซึ่งจะเกิดเป็นลักษณะตุ่มฝีหนองเกิดขึ้น และจะเกิดแผลเป็นเมื่อรอยโรคได้หายไปแล้ว สาเหตุในการเกิดโรคสามารถเกิดได้จากการติดเชื้อ การบาดเจ็บของรูขุมขน หรือเกิดจากการอุดตันของรุขุมขน อาการของ

โรคส่วนใหญ่จะเกิดเป็นตุ่มนูนเล็กๆเกิดขึ้นหลายตุ่ม และจะมีหนองเกิดขึ้นที่บริเวณรูขุมขน โดยโรคจะสามารถเกิดได้กับทุกบริเวณที่มีรูขุมขน โดยมีบริเวณที่พบได้มากคือ บริเวณหน้า หนังศีรษะ ต้นขา รักแร้ และขาหนีบ ซึ่งถ้าหากรอยโรคเกิดขึ้นที่บริเวณหนวดเครา จะเรียกรอยโรคนี้ว่า โรครากหนวดเคราอักเสบ (sycosis barbae) เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 7 แสดงรอยโรคของรูขุมขนอักเสบซึ่งเกิดจากการแช่อ่างน้ำร้อน ที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Stulberg, 2002: 119-23)

การรักษาโรครูขุมขนอักเสบในกรณีที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนอื่นๆเกิดขึ้น จะเน้นไปที่การใช้สบู่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และการให้ผู้ป่วยล้างมือโดยวิธีที่ถูกต้อง แต่ถ้าหากอาการของผู้ป่วยมีลักษณะที่ค่อนข้างรุนแรง การรักษาสามารถให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถครอบคลุมเชื้อแกรมบวก (โดยเฉพาะให้ครอบคลุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* เนื่องจากเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคนี้) ในรูปแบบยาทาภายนอกและหรือยาปฏิชีวนะในรูปแบบยารับประทานร่วมด้วยได้ ยาที่ใช้เป็นหลักในการรักษาคือ dicloxacillin และยาในกลุ่ม cephalosporins ในกรณีที่เชื้อที่ก่อโรคเป็นเชื้อ MRSA จะเปลี่ยนไปใช้ยาชนิดอื่นแทน เช่น clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, minocycline, linezolid เป็นต้น ซึ่งถ้าให้การรักษาไปแล้วอาการของผู้ป่วยไม่ดีขึ้น จะต้องมีการกลับมาพิจารณาการวินิจฉัยโรคใหม่อีกครั้ง

3.2 Paronychia เป็นการติดเชื้อที่บริเวณด้านหน้าหรือขอบของเล็บ โดยอาการของโรคเริ่มแรกจะมีลักษณะเหมือนกับโรค cellulitis แต่โรค paronychia นั้นจะมีการพัฒนาจนกลายเป็นฝีเกิดขึ้น (Marx, 2002: 529-30) ซึ่งอาการของโรคอาจจะเกิดได้ทั้งแบบเฉียบพลัน, กึ่งเฉียบพลัน และเรื้อรัง อาการในระยะเฉียบพลัน มักจะเกิดขึ้นบริเวณมือ ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งผู้ชายและผู้หญิง โดยส่วนมากมักจะเกิดขึ้นกับเด็กและเกิดกับนิ้วมือเพียงนิ้วเดียว (ส่วนใหญ่มักเกิดกับนิ้วโป้ง) อาการมักจะเกิดการบวมแดงและเกิดอาการปวดขึ้นรอบบริเวณขอบเล็บ ในส่วนอาการในระยะเรื้อรังนั้นอาจจะมีการอักเสบของผิวหนังที่บริเวณส่วนของขอบเล็บได้ด้วย สาเหตุในการเกิดโรคนั้นสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การไม่รักษาสุขอนามัยของเล็บ, การกัดเล็บ, การดูดนิ้วมือ เป็นต้น เชื้อที่ก่อโรคในผู้ใหญ่ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Opal, 2008: 667) ส่วนเชื้อที่ก่อโรคในเด็กนั้นมักจะเป็นการติดเชื้อแบบผสมกันของเชื้อในทางเดินบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนจากที่เด็กมีการกัดเล็บและดูดนิ้วมือ

การรักษาในระยะเฉียบพลัน สามารถจะทำได้โดยการแช่น้ำอุ่นในบริเวณที่เป็นวันละ 3-4 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 15-20 นาที ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะในระยะสั้นๆ ติดต่อกัน 5-7 วันโดยสามารถใช้ได้รูปแบบยาทาภายนอกและรูปแบบยารับประทาน ในรูปแบบยาทาภายนอกสามารถใช้ mupirocin, gentamicin, bacitracin/neomycin/polymyxin B ในรูปแบบยาขี้ผึ้ง ทาบริเวณที่เป็นวันละ 2-4 ครั้ง ส่วนในรูปแบบรับประทานจะสามารถแบ่งการใช้ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1. ถ้าหากการติดเชื้อเชื้อก่อโรคภายในช่องปาก(เกิดจากการกัดเล็บ ดูดนิ้วมือ) จะสามารถใช้ยา amoxicillin-clavulanic acid (875 มิลลิกรัม/125 มิลลิกรัม) รับประทานวันละ 2 ครั้ง หรือใช้ยา clindamycin 300-450 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 3 ครั้ง เป็นต้น 2. ถ้าการติดเชื้อไม่ได้เกิดจากเชื้อก่อโรคภายในช่องปาก สามารถใช้ยา doxycycline 100 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 2 ครั้ง หรือ trimethoprim-sulfamethoxazole (160 มิลลิกรัม/800 มิลลิกรัม) 1 DS รับประทานวันละ 2 ครั้ง หรือ cephalexin 500 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 3-4 ครั้ง หรือ dicloxacillin 250 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 4 ครั้ง (Rockwell, 2001: 1113-6 และ Clark, 2003: 2167-76) และถ้าบริเวณที่เป็นมีหนองเกิดขึ้นจะสามารถใช้การผ่าตัดช่วยในการรักษาได้ ส่วนการรักษาในระยะกึ่งเฉียบพลันนั้นไม่มีความจำเป็นต้องใช้การผ่าตัดมาช่วยในการรักษา และการรักษาในระยะเรื้อรังนั้นจะแบ่งออกเป็นการรักษาโดยการใช้ยาและการไม่ใช้ยา การรักษาโดยการไม่ใช้ยานั้นจะเป็นการให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วย โดยผู้ป่วยควรจะต้องทำให้มือตนเองแห้งสม่ำเสมอและควรหลีกเลี่ยงสิ่งที่จะทำให้เกิดการระคายเคืองหรือทำให้เกิดอาการแพ้ ซึ่งการใช้ยาในระยะนี้นั้นจะเปลี่ยนยาทางเลือกแรกที่ใช้ในการรักษาจากยาปฏิชีวนะไปเป็นยาต้านเชื้อราแทน ซึ่งถ้าหากใช้ต้านเชื้อราแล้ว

อาการไม่ดีขึ้นจะสามารถกลับมาใช้ยาปฏิชีวนะหรือการผ่าตัดช่วยในการรักษาได้ โดยยาต้านเชื้อราที่ใช้จะใช้ในรูปแบบยาทาภายนอกโดยสามารถใช้ ciclopirox ในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน clotrimazole, econazole และ nystatin ในรูปแบบครีม ทาบริเวณที่เป็นวันละ 2-4 ครั้ง

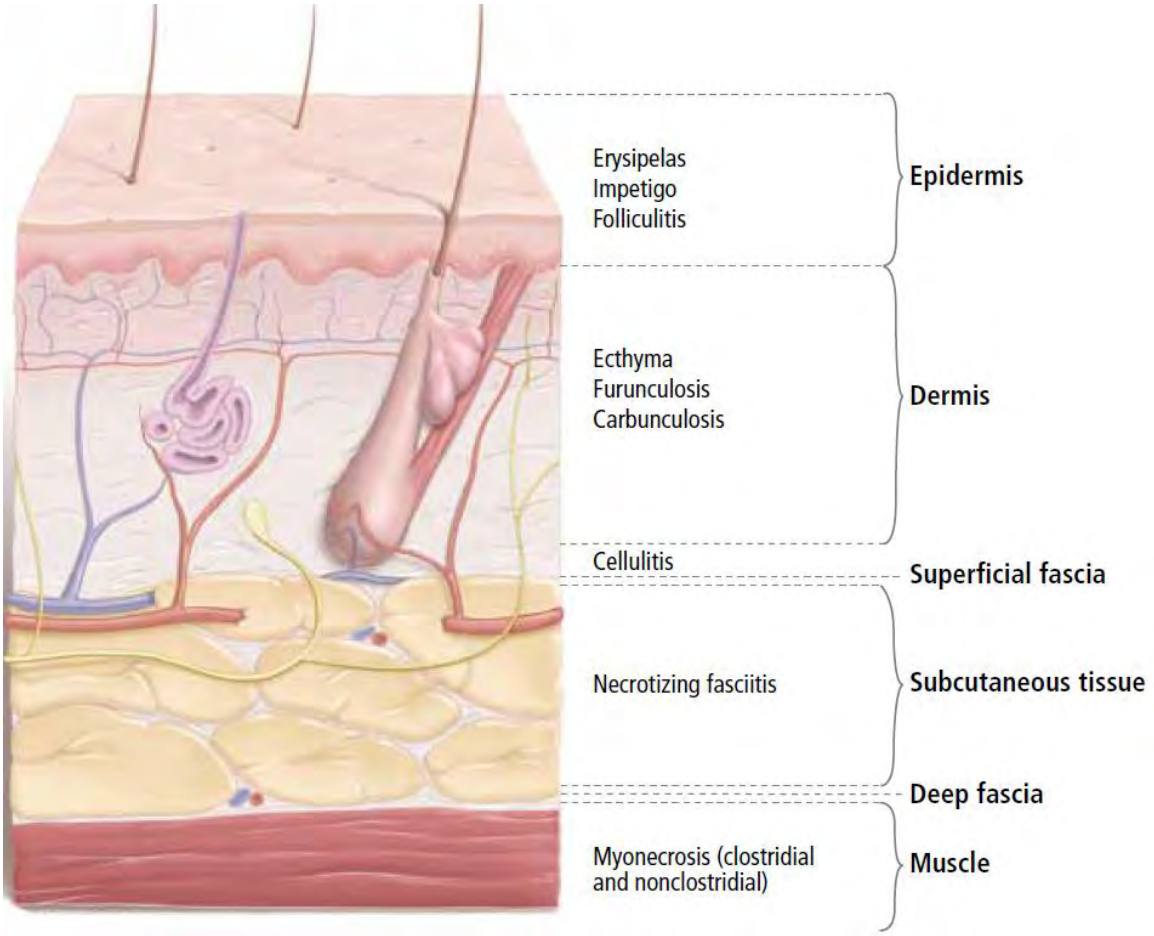
3.3 Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) เป็นภาวะการอักเสบของผิวหนังที่ทำให้เกิดผื่นแดงร่วมกับการมีสะเก็ดหลุดลอกทั่วร่างกายกระจายมากกว่าร้อยละ 90 ของพื้นที่ผิวหนังทั่วร่างกายการเกิดโรคเกิดจากสารพิษของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารพิษที่สร้างขึ้นมานั้นมีอยู่ด้วยกัน 2 ประเภทคือ epidermolytic toxin A (ET-A)และ epidermolytic toxin B (ET-B) (Ladhani, 2001: 2050-4) โดยสารพิษเหล่านี้จะทำให้ผิวหนังชั้นกำพร้าเกิดการแยกตัวออก กลไกของสารพิษคือจะทำหน้าที่เป็น serine protease ไปย่อยโปรตีน desmoglein 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยควบคุมให้เซลล์ผิวหนังยึดติดกัน ที่ตำแหน่งหลังกรดกลูตามิก (glutamic acid) ลำดับที่ 381 ระหว่าง domain ที่ 3 และ 4 โดยจากการศึกษามักจะพบ ET-B ในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรค SSSS มากกว่า ET-A ทำให้เชื้อสามารถเข้าไปเจริญภายใต้ชั้นผิวหนังได้มากขึ้น เกิดเป็นตุ่มน้ำใสในผิวหนังชั้นตื้นและผิวหลุดลอกตามมาซึ่งทำให้เกิดผื่นแดงที่เจ็บปวดในบริเวณกว้างขึ้น (Amagai, 2003: 244-52, Anzai, 2006: 2139-41 และ Hanakawa 2004: 747-50) อาการเริ่มต้นของโรคจะเริ่มจากที่มีผื่นแดงนูนเล็กๆเกิดขึ้นก่อน หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนไปของสีผิว เกิดลักษณะเป็นถุงน้ำใสกระจายไปทั่วร่างกาย โดยลักษณะพิเศษของโรคคือผิวหนังในชั้นหนังกำพร้าจะมีลักษณะย่นๆคล้ายกระดาษ และผิวหนังชั้นหนังกำพร้าจะหลุดลอกออกมาทำให้เกิดการสูญเสียความชื้นจากผิวหนังออกไป ซึ่งในผู้ใหญ่ที่เป็นนั้นมักจะมีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดปอดบวมตามมา ทำให้การดำเนินไปของโรคแย่ลง

การรักษาจะต้องทำการส่งต่อผู้ป่วยไปยังโรงพยาบาล ซึ่งในขั้นการนำส่งโรงพยาบาลนั้น ผู้ป่วยควรที่จะได้รับยาลดไข้และควรได้รับสารน้ำทางหลอดเลือดดำเพื่อรักษาสมดุลน้ำ และเมื่อผู้ป่วยทำการรักษาที่โรงพยาบาลนั้น จะต้องได้รับสารน้ำทางหลอดเลือดดำเช่นกัน และให้ยาปฏิชีวนะทางหลอดเลือดดำ ที่สามารถครอบคลุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ รวมถึงต้องมีการดูแลแผลที่เป็นอย่างเหมาะสมด้วย

3.4 Toxic shock syndrome (TSS) เป็นอาการที่มีความรุนแรงที่ส่งผลทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ โดยเชื้อที่ทำให้เกิดอาการจะเป็นเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเกิดโรคจะเกิดจากสารพิษ 2 ชนิด คือ TSS toxin type-1 (TSST-1) และ staphylococcal enterotoxin

B ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกิดจาก TSST-1 เป็นหลัก โดยสารพิษจะซึมผ่านเข้าไปในร่างกาย และจะถูกระบบภูมิคุ้มกันตรวจพบว่ามีลักษณะคล้ายกับเป็น superantigen โดย superantigen จะมีความสามารถพิเศษแตกต่างจาก antigen ธรรมดา คือ superantigen ไม่จำเป็นต้องผ่าน antigen-presenting cells ก่อนที่จะถูกนำเสนอที่บริเวณผิวร่วมกับ class II major histocompatibility complex (MHC) แต่สามารถที่จะจับกับ class II MHC ได้โดยตรง เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน superantigen- class II MHC ไปกระตุ้นตัวรับของ T-cell ทำให้เกิดการหลั่ง cytokine ออกมาเป็นจำนวนมาก จากที่ TSST-1 มีลักษณะคล้าย superantigen จึงทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานของ T-cell ได้โดยการที่ TSST-1 สามารถจับได้ทั้ง class II MHC ของ antigen-presenting cells และ ตัวรับของ T-cell ซึ่งทำให้สามารถเลี่ยงการที่ต้องผ่าน antigen-presenting cells ได้ ดังนั้นจึงสามารถกระตุ้นการทำงานของ T-cell จำนวนมากได้ ซึ่งจากที่แอนติเจนปกติจะกระตุ้น T-cell ได้ร้อยละ 0.01-0.1 ของจำนวน T-cell ทั้งหมด แต่ TSST-1 จะสามารถกระตุ้น T-cell ได้ถึงร้อยละ 5-30 ดังนั้นจึงทำให้เกิดการหลั่ง cytokine เป็นจำนวนมากจนทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อก เสียชีวิตได้โดยอาการจะพบว่ามีไข้สูง ผื่นแดงไปจนถึงความดันโลหิตต่ำจนไม่ตอบสนองต่อการให้ยาทางหลอดเลือดดำ การทำงานของอวัยวะต่างๆเสียไป เช่น การทำงานของไตมีค่า blood urea nitrogen (BUN) หรือค่า creatinine ในกระแสเลือดสูงกว่าระดับปกติอย่างน้อย 2 เท่า, ระบบประสาท ทำให้การรับรู้เปลี่ยนไป และระบบทางเดินอาหารเกิดการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น (สูญเสียอย่างน้อย 3 ระบบขึ้นไป) และเกิดผิวหนังหลุดลอกขึ้นได้ภายใน 1-2 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อ ซึ่งส่วนมากจะเกิดที่บริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า ดังนั้นก่อนที่จะทำการรักษาจึงต้องหาบริเวณที่เกิดการติดเชื้อให้เจอเสียก่อน

การรักษาผู้ป่วยจะต้องได้รับสารน้ำทางหลอดดำที่เพียงพอเพื่อรักษาสมดุลน้ำของร่างกายร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะที่สามารถครอบคลุมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยการใช้ยารักษาจะใช้ยาปฏิชีวนะที่สามารถทนต่อเอนไซม์ β-lactamase ได้ในขนาดยาที่สูง เช่น nafcillin, oxacillin, 1st generation cephalosporins เป็นต้น โดยควรให้ยาติดต่อกันนาน 10-14 วัน ในกรณีที่ผู้ป่วยแพ้ยาในกลุ่ม penicillins สามารถเปลี่ยนไปยา vancomycin รักษาแทนได้



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความลึกของชั้นผิวหนังกับโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง

(Rajan, 2012: 57-66)

ตารางที่ 3 แสดงโรคและความถี่ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus pyogenes* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Chiller, 2001: 170-4)

Infections	***S. aureus***	***S. pyogenes***
Epidermal		
Impedigo	+++	++
Ecthyma	+	+++
Dermal		
Erysipelas	+	+++
Cellulitis	+++	++
Necrotizing fasciitis	+	++
Follicular		
Folliculitis	+++	+
Furunculosis	+++	+
Carbunculosis	+++	+
Other		
Paronychia	+++	+

ตารางที่ 4 แสดงพิษที่ทำให้เกิดโรคต่างๆจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Chiller, 2001: 170-4)

Disease	**Toxin**
Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS)	Exfoliative toxin A และ Exfoliative toxin B
Bullous impetigo	Exfoliative toxin A และ Exfoliative toxin B
Toxic shock syndrome (TSS)	TSST-1

ประวัติของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้งได้มีการนำมาใช้ทั้งทางยาและอาหารอย่างแพร่หลายตั้งแต่ในยุคสมัยโบราณกาล ได้มีการจารึกอ้างอิงถึงการใช้น้ำผึ้งตั้งแต่ในยุคสมัยของสุมาเรียนเมื่อ 2000-2100 ปีก่อนคริสตกาล โดยจารึกลงบนแผ่นศิลาซึ่งกล่าวถึงการนำน้ำผึ้งไปใช้ในทางยา หลังจากนั้นในยุคกรีกโบราณ (เมื่อ 322-384 ปีก่อนคริสตกาล) นักปรัชญานาม Aristotle ได้บันทึกถึงน้ำผึ้งว่าสามารถนำมาใช้ในการรักษาอาการเจ็บตาและบาดแผลต่างๆได้ เป็นต้น จากที่คนในสมัยโบราณมีความเชื่อว่าน้ำผึ้งนั้นเป็นสารที่มีประโยชน์ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสามารถนำมาใช้เป็นยาได้ ดังนั้นในสมัยโบราณจึงได้มีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในทางยาอย่างแพร่หลายเช่น ใช้ในการรักษาแผลและโรคที่เกิดภายในลำไส้ (Bogdanov, 2008: 667-89) และช่วยทำให้บาดแผลสามารถหายได้เร็วขึ้นด้วย (Van den Berg, 2008: 172-8) นอกจากนี้ยังได้มีการกล่าวถึงการใช้น้ำผึ้งในคัมภีร์อัลกุรอานอีกด้วย จนมาถึงในปัจจุบันน้ำผึ้งยังคงเป็นยาพื้นบ้านที่มีการใช้กันเมื่อยาแผนปัจจุบันนั้นไม่สามารถให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ โดยได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของน้ำผึ้งเพิ่มเติมโดยบุคลากรทางการแพทย์ในสาขาต่างๆ เพื่อที่จะนำน้ำผึ้งมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร แผลกดทับ รวมถึงแผลบริเวณผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อด้วย (Jones, 2001: 1-4) ซึ่งมีการตีพิมพ์รายงานความสำเร็จในการนำน้ำผึ้งมาใช้เป็นยาในการรักษาอาการต่างๆรวมถึงการใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากการผ่าตัดด้วย

คุณสมบัติทางกายภาพและส่วนประกอบของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้งมีรสหวานโดยธรรมชาติ ผลิตมาจากผึ้งซึ่งได้จากการนำน้ำหวานจากเกสรดอกไม้น้ำผึ้งหรือจากสารคัดหลั่งของแมลงที่ดูดสารอาหารจากต้นไม้ ซึ่งเรียกน้ำผึ้งที่ได้จากแมลงเหล่านี้ว่า honey dew โดยน้ำผึ้งจะประกอบไปด้วยน้ำตาลหลากหลายชนิด แต่โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นน้ำตาล glucose และน้ำตาลfructoseเป็นหลัก นอกจากน้ำตาลแล้วยังมีส่วนประกอบของกรดอินทรีย์ เอนไซม์ และอนุภาคของแข็งต่างๆที่ได้จากพืชที่ผึ้งไปทำการเก็บน้ำหวานมา ลักษณะภายนอกของน้ำผึ้งจะมีสีที่แตกต่างกันไปตั้งแต่ไม่มีสีจนถึงสีน้ำตาลเข้ม โดยลักษณะสถานะอาจจะอยู่ในรูปที่เป็นของเหลวที่ไหลได้ ของเหลวที่มีความข้นสูง หรือในรูปของแข็ง กลิ่นของน้ำผึ้งจะขึ้นกับชนิดของพืชที่ผึ้งเก็บน้ำหวานมา ดังนั้นการตรวจสอบเอกลักษณ์ของน้ำผึ้งจึงสามารถทำได้โดยการประเมินทางรูป เช่น สี, กลิ่น, รสชาติ และรูปแบบการตกผลึกของน้ำผึ้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำค่าการนำไฟฟ้าจำเพาะ

(specific conductivity) และองค์ประกอบของน้ำตาลในน้ำผึ้งมาใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของน้ำผึ้งได้เช่นกัน

น้ำผึ้งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะมีค่าความหนาแน่นอยู่ระหว่าง 1.38-1.45 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีค่าความหนืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อยู่ระหว่าง 256.0-1816.9 ปาสคาล/วินาที ส่วนค่า pH มีค่าอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 (White, 1975: 157-206) ซึ่งลักษณะทางกายภาพดังกล่าวของน้ำผึ้งนั้นจะขึ้นกับแหล่งที่มาของน้ำผึ้งด้วยว่ามาจากเกสรดอกไม้ชนิดใด รวมถึงอุณหภูมิในการทำการทดสอบ ปริมาณของ dextrin, trisaccharide, น้ำ และโปรตีนในน้ำผึ้งด้วย มีการศึกษาพบว่าน้ำผึ้งจะมีความหนืดลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และการศึกษาถึงการไหลของน้ำผึ้งพบว่าน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนสูงจะมีความสามารถในการไหลเป็นแบบ thixotropy ได้ การตกผลึกเป็นอีกปฏิกิริยาหนึ่งซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในน้ำผึ้ง โดยพบว่าน้ำผึ้งที่มีปริมาณน้ำตาลและปริมาณ glucose ที่สูงหรือมีปริมาณ dextrin ต่ำ สามารถเกิดการตกผลึกของน้ำผึ้งได้ง่าย และพบว่าปัจจัยหลักที่ส่งเสริมให้เกิดการตกผลึกของน้ำผึ้งนั้นคือ อุณหภูมิ โดยพบว่าที่อุณหภูมิที่ 13-17 องศาเซลเซียส นั้นจะมีอัตราการตกผลึกของน้ำผึ้งสูงที่สุด ดังนั้นอุณหภูมิที่เก็บน้ำผึ้งจึงมีส่วนสำคัญต่อความคงตัวของน้ำผึ้ง

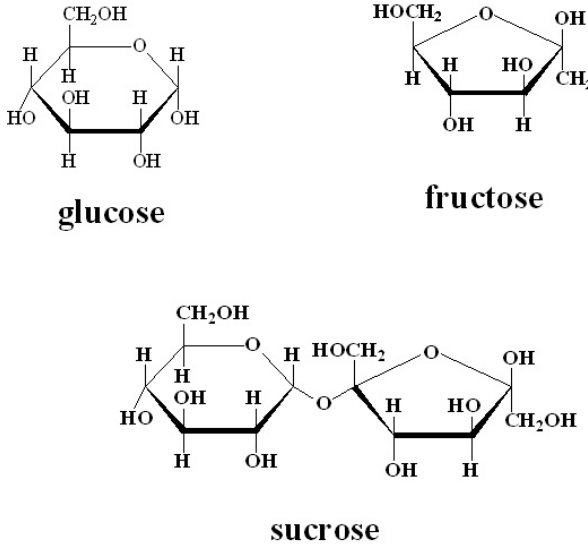
องค์ประกอบของน้ำผึ้งประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ดังนี้

1. Saccharide ปริมาณน้ำตาลของน้ำผึ้งจะขึ้นกับปริมาณ saccharide ในน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งและการวิเคราะห์ละอองเรณูที่อยู่ในน้ำผึ้งจะสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งได้ โดยพบว่าน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ที่มีปริมาณน้ำตาล fructose หรือน้ำตาล glucose ที่สูงจะทำให้ปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งสูงตามไปด้วย และจากการศึกษาพบว่าปริมาณน้ำตาล sucrose ในน้ำผึ้งส่วนใหญ่จะมีค่ามากกว่าร้อยละ 1% ของปริมาณ saccharide ทั้งหมดที่พบในน้ำผึ้ง และปริมาณของน้ำตาล maltose มักจะมีค่าสูงกว่าน้ำตาล sucrose ถึง 3 เท่า ส่วนปริมาณ oligosaccharides ที่พบมักจะมีค่าประมาณ 2%

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของ saccharide ที่พบในน้ำผึ้ง

ชนิดของ saccharide	**ปริมาณ (%)**
D-Fructose	35.7–41.7
D-Glucose	29.7–34.9
Maltose	1.6–3.8
Isomaltose	0.3–0.9
Turanose	0.9–1.7
Sucrose	0.4–1.4
Trehalose	0.6–1.1
Erlose	0.2–0.9
Maltotriose	0.04–0.14
Melecitose	0.25–1.1
Raffinose	0–0.4

ที่มาของน้ำตาล glucose และน้ำตาล fructose จะมาจากน้ำหวานของเกสรดอกไม้อยู่แล้ว และจากปฏิกิริยา hydrolysis ของน้ำตาล sucrose รวมถึงน้ำตาลชนิดอื่นๆที่พบได้ในน้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังสามารถพบน้ำตาลในกลุ่ม disaccharides และ trisaccharides กลุ่มอื่นๆได้ด้วย ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ในน้ำผึ้ง น้ำผึ้งยังสามารถพบ dextrin ได้สูงถึง 3-10% โดยพบว่า dextrin ที่พบในน้ำผึ้งนั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า dextrin ที่พบภายในแป้ง และไม่สามารถเปลี่ยนสีของไอโอดีนจากสีน้ำตาลเป็นสีน้ำเงินได้เหมือนกับ dextrin ที่พบภายในแป้ง รวมถึงไม่เกิดการตกตะกอนเมื่อใส่แอลกอฮอล์ลงไปด้วย



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาล glucose, น้ำตาล fructose และน้ำตาล sucrose

2. ส่วนประกอบอื่นๆ มีดังนี้

2.1 โปรตีนและกรดอะมิโน จากตารางที่ 6 ได้แสดงถึงปริมาณของโปรตีนและกรดอะมิโนที่พบในน้ำผึ้ง พบว่าน้ำผึ้งมีปริมาณกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 27-875 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม โดยกรดอะมิโนหลักที่พบจะเป็นกรดอะมิโน proline ซึ่งมีประมาณ 49% ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในน้ำผึ้ง (Bosi, 1978: 152) ส่วนโปรตีนที่พบในน้ำผึ้งนั้นจะเป็นพวกเอนไซม์เป็นส่วนใหญ่ โดยมีเอนไซม์ invertase (β-fructohydrolase-D-fructofuranoside), maltase (β-glucohydrolase-D-glucoside), α-amylase, β-amylase, glucose oxidase, catalase, และ phosphatase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะ glycosidic ของน้ำตาล sucrose และน้ำตาล maltose (Takenaka, 1980: 13) เอนไซม์ maltase จะสามารถเปลี่ยนน้ำตาล maltose ให้ไปเป็นน้ำตาล erlose และน้ำตาล maltotriose ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อไป ส่วนเอนไซม์ α-amylase และ β-amylase จะไฮโดรไลซ์พันธะ glycosidic ที่ตำแหน่ง α -1,4 ซึ่งเอนไซม์ α-amylase ยังสามารถ ไฮโดรไลซ์พันธะ glycosidic ที่ตำแหน่ง α -1,4 ของ polysaccharide ได้ ซึ่งทำให้เกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้หลายชนิด ส่วน β-amylase จะสามารถไฮโดรไลซ์น้ำตาล amylose ให้เป็นน้ำตาล maltose ได้

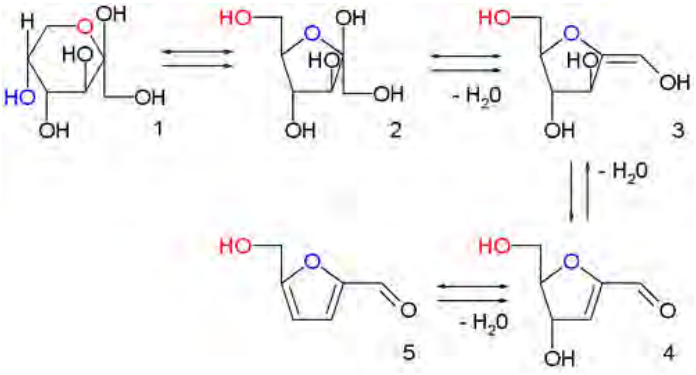
ตารางที่ 6 แสดงปริมาณของสารอื่นๆนอกเหนือจาก saccharide ที่พบในน้ำผึ้ง

ชนิดของสารที่พบ	ปริมาณ
ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	50–1000
Proline (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	20–300
กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	30–700
กรดต่างๆ (gluconic, citric, lactic, malic, succinic, butyric, propionic และอื่นๆ) (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	10–300
แร่ธาตุต่างๆ (แมงกานีส, โคบอลต์, เหล็ก และธาตุอื่นๆ) (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	70–900
Essential oils (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	30–200
สี dyes (carotenoids, anthocyanines, flavones) (ไมโครกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	1.5–180
วิตามิน และสารสำคัญอื่นๆ (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)	0–0.1

เอนไซม์ amylase ในน้ำผึ้งนั้นไม่ได้แตกต่างจากเอนไซม์ amylase จากที่พบในแหล่งอื่น โดยเอนไซม์จะมีการทำงานเพิ่มขึ้นได้โดยอนุภาคคลอไรด์ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.01 M ของอนุภาคคลอไรด์จะทำให้การทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ถึง 170% เอนไซม์ amylase ในน้ำผึ้งจะทำงานดีที่สุดในค่า pH ประมาณ 5.4 ซึ่งตรงข้ามกับเอนไซม์ amylase ในน้ำลายของมนุษย์ที่จะมีการทำงานดีที่สุดที่ค่า pH ประมาณ 7.0

เอนไซม์ invertase และ เอนไซม์ amylase จะมีการทำงานที่ลดลงเมื่อเก็บน้ำผึ้งเป็นระยะเวลานานๆ รวมถึงการให้ความร้อนจะทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีการทำงานลดลงได้เช่นกัน โดยมีการศึกษาพบว่าเมื่อเก็บน้ำผึ้งไว้เป็นเวลา 1 ปี ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์ invertase และ เอนไซม์ amylase มีการทำงานลดลง 30-50% และประมาณ 10% ตามลำดับ โดยมีการประเมินโดยการหาค่าระดับของ 5-hydroxymethylfurfural (HMF) (White, 1980: 29) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา dehydration ของน้ำตาล glucose และน้ำตาล fructose ซึ่งการให้ความร้อนที่มากเกินไปแก่น้ำผึ้งจะทำให้ HMF มีระดับที่สูงขึ้นโดยเฉลี่ย 1.20– 20 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม ในน้ำตาล sucrose ที่ผลิตจากการไฮโดรไลซ์ด้วย citric acid จะมีปริมาณ HMF สูงถึง 170-650 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม

ดังนั้นการใช้ค่า HMF จึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบน้ำผึ้งที่มีการการปลอมปนจากการใส่น้ำตาล sucrose ซึ่งผลิตจากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดได้ โดยน้ำผึ้งที่มีระดับค่าของ HMF สูงเกิน 20 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าน้ำผึ้งนั้นมีการปลอมปนโดยใส่น้ำตาล sucrose ซึ่งผลิตจากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดลงไป



รูปที่ 10 แสดงการเกิด ของ 5-hydroxymethylfurfural (HMF) จากน้ำตาล fructose

2.2 กรดอินทรีย์ต่างๆ กรดอินทรีย์ที่พบในน้ำผึ้งจะมีส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของน้ำผึ้งเป็นอย่างมาก ซึ่งทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำผึ้งมีความเอกลักษณ์ และส่งผลทำให้น้ำผึ้งส่วนใหญ่มีค่าpH ค่อนไปทางที่เป็นกรด คือมีค่าน้อยกว่า 7 ซึ่งส่วนใหญ่น้ำผึ้งจะมีค่าเอชอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 (Simpson, 1975: 10) โดยกรดอินทรีย์ที่พบในน้ำผึ้งประกอบไปด้วย butyric acid, acetic acid, formic acid, lactic acid, succinic acid, folic acid, malic acid, citric acid และ gluconic acid โดยจะพบ citric acid และ gluconic acid เป็นส่วนใหญ่ gluconic acid จะเป็นกรดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาล D-glucopyranose ด้วยเอนไซม์ glucose oxidase ซึ่งทำให้เกิดเป็น glucolactone หลังจากนั้นจะถูกไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็วได้เป็น gluconic acid (White, 1963: 57) ซึ่งจากปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้เองจะทำให้เกิดการสร้าง hydrogen peroxide ขึ้น ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี การหาปริมาณของกรดภายในน้ำผึ้งนั้นสามารถทำได้โดยการไทเทรชัน และคำนวณปริมาณของกรดออกมาในรูปของมิลลิอิคิวาเลนซ์ต่อกิโลกรัม (Bogdanov, 1997: 1-59) นอกจากนี้น้ำผึ้งยังมีความเป็นบัฟเฟอร์ในตัวด้วย

ดังนั้นค่า pH จึงไม่เปลี่ยนไปมากนักเมื่อเติมกรดหรือด่างในปริมาณน้อยลงไป โดยค่าความจุบัฟเฟอร์ของน้ำผึ้งจะขึ้นกับปริมาณของฟอสเฟส, คาร์บอเนต และกรดอินทรีย์อื่นๆที่พบในน้ำผึ้ง

2.3 แร่ธาตุต่างๆ มีการศึกษาโดยใช้เทคนิคต่างๆ พบว่าน้ำผึ้งมีแร่ธาตุอยู่เป็นส่วนประกอบมากมายหลายชนิด เช่น โพแทสเซียม, แมกนีเซียม, โซเดียม, แคลเซียม, ฟอสฟอรัส, เหล็ก, แมงกานีส, โคบอลต์ และทองแดง เป็นต้น โดยพบว่าโพแทสเซียมจะเป็นแร่ธาตุส่วนใหญ่ที่พบในน้ำผึ้ง (McLellan, 1975: 57) นอกจากนี้กรดอินทรีย์ กรดอินทรีย์ และกรดอะมิโน เมื่อเกิดการแตกตัวเป็นประจุเกิดขึ้น จะสามารถนำมาใช้ในการวัดหาค่าการนำไฟฟ้าของน้ำผึ้งได้โดยทั่วไปน้ำผึ้งจะมีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ระหว่าง 0.09-1.4 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (Bogdanov, 1990: 108)

2.4 สี dye และสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ สี dye ของน้ำผึ้งจะประกอบไปด้วยสารในกลุ่ม carotenoids, flavones และ anthocyanines ซึ่งน้ำผึ้งในแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของสารดังกล่าวแตกต่างกันไป ในส่วนที่เป็นวิตามินนั้นจะพบว่าน้ำผึ้งมีส่วนประกอบของวิตามินอยู่เพียงเล็กน้อย ซึ่งพบได้เฉพาะในน้ำผึ้งบางชนิด เช่น น้ำผึ้งชนิด honeydew จะประกอบไปด้วยวิตามินเอ, วิตามินบี 2, วิตามินซี และวิตามินบี 6 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบสารประกอบแอโรมาติกในน้ำผึ้งถึง 80 ชนิดด้วยกัน โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่ม carboxylic acid, aldehyde, ketone, alcohol, hydrocarbon และ phenol ซึ่งสารเหล่านี้มีส่วนสำคัญต่อรสชาติและกลิ่นของน้ำผึ้งเช่นกัน

ตารางที่ 7 แสดงชนิดและปริมาณของธาตุที่เป็น trace element ต่างๆที่พบได้ในน้ำผึ้ง

(Bogdanov, 2008: 677-89)

ชนิดของธาตุ	**ปริมาณที่พบ (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)**
Aluminium (Al)	0.01-2.4
Arsenic (As)	0.014-0.026
Barium (Ba)	0.01-0.08
Boron (B)	0.05-0.3
Bromine (Br)	0.4-1.3
Cadmium (Cd)	0-0.001
Chlorine (Cl)	0.4-56

ชนิดของธาตุ	ปริมาณที่พบ (มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม)
Cobalt (Co)	0.1-0.35
Fluoride (F)	0.4-1.34
Iodine (I)	10-100
Lead (Pb)	0.001-0.03
Lithium (Li)	0.225-1.56
Molybdenum (Mo)	0-0.004
Nickel (Ni)	0-0.051
Rubidium (Rb)	0.040-3.5
Silicium (Si)	0.05-24
Strontium (Sr)	0.04-0.35
Sulfur (S)	0.7-26
Vanadium (V)	0-0.013
Zirconium (Zr)	0.05-0.08

การเลี้ยงผึ้งและการเก็บน้ำผึ้ง

ผึ้งเป็นสัตว์กินพืชเพียงอย่างเดียว โดยแหล่งโปรตีนของผึ้งจะได้มาจากละอองเรณูของดอกไม้ และแหล่งคาร์โบไฮเดรตจะได้มาจากน้ำหวานของดอกไม้ โดยสังคมของผึ้งนั้นจะมีการอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และจะมีการทำหน้าที่ของผึ้งแต่ละลำดับชั้นที่แตกต่างกันไป ผึ้งมีการแบ่งลำดับชั้นออกเป็น 3 ลำดับดังนี้

1. ผึ้งตัวผู้ ในอาณานิคมหนึ่งๆของผึ้งจะมีผึ้งตัวผู้ได้ตั้งแต่ 0-500 ตัว โดยระหว่างช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อนผึ้งตัวผู้จะทำการบินจากรังของตนไปผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญาจากอาณานิคมอื่นๆ

2. ผึ้งนางพญา เป็นผึ้งเพศเมียที่สามารถสร้างไข่จึงมีความสามารถในการเจริญพันธุ์ได้ โดยเมื่อผึ้งนางพญาตายหรือหายสาบสูญไป ผึ้งงานจะทำการคัดเลือกตัวอ่อนของผึ้งงานขึ้นมาและทำการเลี้ยงด้วยนมผึ้ง (royal jelly) และตัวอ่อนนี้เองจะพัฒนาไปเป็นผึ้งนางพญาต่อไป ดังนั้นความแตกต่างระหว่างผึ้งงานและผึ้งนางพญาจะอยู่ที่คุณภาพของอาหารที่ได้รับเมื่อเป็นตัวอ่อน โดยทั่วไปในอาณานิคมหนึ่งๆ

จะมีผึ้งนางพญาเพียงตัวเดียว นอกจากนี้ผึ้งนางพญายังมีบทบาทในการควบคุมพฤติกรรมของผึ้งโดยผ่านทางฟีโรโมน (pheromone) ที่ผลิตขึ้นมาด้วย ผึ้งนางพญาจะทำการวางไข่ที่บริเวณช่องว่างของรังผึ้งที่ถูกสร้างขึ้นจากผึ้งงาน และทำการเลี้ยงตัวอ่อนขึ้นมา โดยการเจริญของตัวอ่อนจะแบ่งออกเป็น 4 ขั้น คือ 1. ไข่ 2. ตัวอ่อน 3. ดักแด้ และ 4. ตัวเต็มวัย

3. ผึ้งงาน เป็นผึ้งเพศเมียที่ไม่มีความสามารถในการเจริญพันธุ์ที่ทำหน้าที่ทั่วๆไปภายในอาณานิคม โดยอาณานิคมหนึ่งๆนั้นจะมีผึ้งงานอยู่ประมาณ 2,000-60,000 ตัว ผึ้งงานเมื่อเจริญขึ้นมาจะสามารถทำงานได้ทันที โดยจะทำหน้าที่ตั้งแต่การทำความสะอาดรัง ให้อาหารตัวอ่อน รับละอองเรณูและน้ำหวานจากผึ้งที่หาอาหารมา ไปจนถึงการปกป้องรังจากผู้บุกรุก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้รังของอาณานิคมสามารถอยู่รอดต่อไปได้

ผึ้งตัวผู้ ผึ้งนางพญา ผึ้งงาน

รูปที่ 11 แสดงลำดับชั้นของผึ้งในอาณานิคมหนึ่งๆ เรียงจากผึ้งตัวผู้ ผึ้งนางพญา และผึ้งงาน ตามลำดับ

การเก็บน้ำผึ้งจะสามารถทำได้เกือบทุกสถานที่ที่มีพืชดอกที่มีละอองเรณูและสามารถผลิตน้ำหวานได้ โดยการเลี้ยงผึ้งควรจะเลี้ยงในสถานที่ที่สามารถบังแสงแดดและลมได้ และควรห่างจากบริเวณชุมชนเพื่อที่จะได้ไม่ไปรบกวนผู้อื่น โดยสถานที่ที่เลี้ยงผึ้งสามารถทำเป็นกล่องที่ทำจากไม้หรือโฟม

อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงผึ้ง จะประกอบไปส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. รังผึ้ง (bee hive) ควรมีการสร้างให้มีลักษณะคล้ายกับรังของผึ้งจริงๆ

2. Bottom board เป็นแผ่นไม้กระดานที่อยู่ชั้นล่างสุด โดยควรวางแผ่นไม้กระดานบนอิฐก้อนหรือบล็อกหินคอนกรีตที่มีความมั่นคงเพื่อไม่ให้รังผึ้งสัมผัสกับพื้น

3. Frame and foundation เป็นกรอบไม้ที่ช่วยอุ้มแผ่น foundation ที่ทำจากขี้ผึ้งซึ่งมีลักษณะเป็น 6 เหลี่ยม (เหมือนช่องของรังผึ้ง) เอาไว้ โดยผึ้งจะใช้แผ่น foundation นี้ในการสร้างรวงผึ้งต่อไป

4. Hive body หรือ brood chamber เป็นกล่องไม้ขนาดใหญ่ที่สามารถรับรวงผึ้งได้ถึง 10 รวง โดยพื้นที่ว่างนี้จะถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนและสะสมน้ำผึ้งเพื่อใช้ภายในรัง โดยปกติจะสร้าง hive body จำนวน 1-2 ชั้น

5. Queen excluder จะวางอยู่ระหว่าง brood chamber และบริเวณที่เก็บน้ำผึ้งของรัง โดยส่วนนี้จะช่วยให้ผึ้งนางพญาอาศัยอยู่ใน brood chamber เพื่อที่จะไม่ให้ตัวอ่อนเจริญในบริเวณที่เก็บน้ำผึ้งของรัง queen excluder ไม่จำเป็นต้องมีได้หากมี hive body จำนวน 2 ชั้น

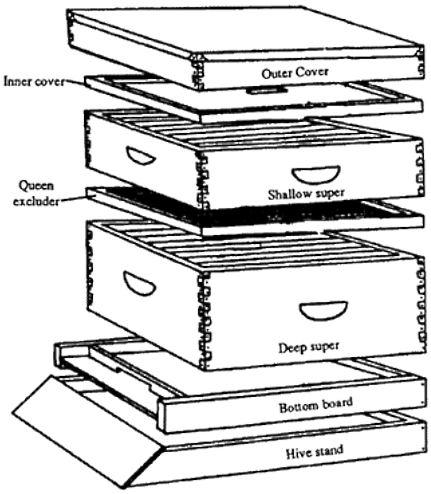
6. Honey supers เป็นกล่องขนาดใหญ่ที่มีลักษณะตื้นๆ โดยจะประกอบไปด้วย frame ของรวงผึ้งที่ผึ้งจะกักเก็บน้ำผึ้งส่วนเกินเอาไว้ ซึ่งน้ำผึ้งส่วนนี้เองจะเป็นส่วนที่จะทำการเก็บไปเป็นผลิตภัณฑ์เมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม

7. Inner cover ช่วยป้องกันไม่ให้ผึ้งสร้างรวงผึ้งติดกับ outer cover

8. Outer cover ช่วยป้องกันรังผึ้งจากสภาพอากาศภายนอก โดยถ้าหากทำจากไม้ควรที่จะทำการทาด้วยสีน้ำมัน โดยอาจนำไปจุ่มด้วย copper naphthenate ก่อนเพื่อช่วยถนอมให้ไม้มีอายุการใช้งานที่นานขึ้น แล้วจึงค่อยทาสี

9. Smoker เป็นอุปกรณ์ที่ช่วยให้ผึ้งสงบ ช่วยลดโอกาสที่ผึ้งจะต่อยผู้เลี้ยงผึ้ง

10. Feeder เป็นอุปกรณ์ป้อนน้ำตาลแก่ผึ้งซึ่งผึ้งจะใช้เป็นอาหารในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง



Elements of a beehive

รูปที่ 12 แสดงองค์ประกอบของรังผึ้งจำลอง

กระบวนการในการเก็บน้ำผึ้ง เริ่มต้นจากที่ช่วงเดือนมกราคมของปี ผึ้งนางพญาจะทำการวางไข่เพื่อผลิตผึ้งงานให้เพียงพอต่องานของรังที่จะมีจำนวนมากขึ้นในฤดูใบไม้ผลิ โดยในช่วงนี้ผู้เลี้ยงผึ้งอาจมีการให้อาหารเสริมแก่ผึ้งในกรณีที่ผึ้งมีอาหารไม่เพียงพอ เช่น การให้น้ำเชื่อมเสริมโดยการผสมน้ำตาลทรายและน้ำในสัดส่วน 1:1 เป็นต้น รวมถึงยาป้องกันโรคของผึ้งด้วย เพื่อให้กระบวนการในการเก็บน้ำผึ้งดำเนินไปได้ด้วยดี เมื่อเข้าสู่ช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์ ผู้เลี้ยงผึ้งจะสามารถเข้าไปสำรวจรังผึ้งเพื่อดูว่าประชากรของผึ้งมีอัตราการเจริญเติบโตเป็นอย่างไร ตรวจสอบผึ้งว่าสามารถจัดการเกี่ยวกับตัวอ่อนได้อย่างเหมาะสมหรือไม่ รวมถึงโรคที่อาจเกิดขึ้นกับผึ้งในรังด้วย ในกรณีที่อาณานิคมของผึ้งมีจำนวนตัวอ่อนน้อยกว่าค่าเฉลี่ยที่ผู้เลี้ยงได้กำหนดค่าไว้ อาจทำการใส่ frame ที่มีตัวอ่อนอยู่เข้าไปเพิ่มเติมได้ และในกรณีที่ผู้เลี้ยงผึ้งมี hive body 2 กล่อง โดยส่วนมากผึ้งและตัวอ่อนจะอาศัยอยู่บริเวณกล่องบนมากกว่ากล่องล่าง ทำให้ผึ้งอาศัยแออัดกันเกินไป หรือจับกันเป็นกลุ่มมากจนเกินไป การแก้ไขสามารถทำได้โดยการสลับเอากล่องบนไปไว้ด้านล่าง และนำกล่องล่างมาไว้ด้านบน ส่วนถ้าเกิดปัญหาการอยู่อย่างแออัดของผึ้งในกรณีที่ผู้เลี้ยงใช้ hive body เพียงกล่องเดียว จะสามารถลดปัญหาได้โดยการนำส่วน honey super มาวางไว้บนส่วน queen excluder ในการเลี้ยงผึ้งนั้นควรที่จะหลีกเลี่ยงไม่ให้ผึ้งเกิดการอยู่อย่างแออัดกันจนเกินไป เนื่องจากจะทำให้ความแข็งแรงของอาณานิคมของผึ้งนั้นลดลงไปมาก

เมื่อเข้าสู่ช่วงเดือนมีนาคม ผู้เลี้ยงผึ้งจะทำการเปลี่ยนผึ้งนางพญา โดยการนำผึ้งนางพญาตัวใหม่เข้าไปในรัง เพื่อทำการสร้างอาณาจักรผึ้งต่อไป โดยผึ้งนางพญาที่มีอายุน้อยจะมีความสามารถในการผลิตไข่ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า และสามารถผลิตฟีโรโมนได้ดีกว่าผึ้งนางพญาตัวเก่า ซึ่งทำให้สามารถกระตุ้นให้ผึ้งงานสามารถออกไปหาอาหารได้ดีกว่า ช่วยลดการอยู่กันอย่างแออัดของผึ้งและช่วยลดการเกิดโรคในผึ้งได้ดีกว่า โดยก่อนที่จะนำผึ้งนางพญาตัวใหม่เข้าไปในรัง จำเป็นจะต้องทำการฆ่าผึ้งนางพญาตัวเก่าก่อน และให้อาณาจักรอยู่ในสภาวะที่ปราศจากผึ้งนางพญาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงค่อยนำผึ้งนางพญาตัวใหม่เข้าไปในรัง โดยถ้าหากผู้เลี้ยงผึ้งสามารถให้อาหารที่เหมาะสมกับผึ้ง มีการควบคุมการเกิดโรคของผึ้งเป็นอย่างดี รวมถึงมีการเปลี่ยนผึ้งนางพญาตัวใหม่เพื่อควบคุมการอยู่อาศัยของผึ้งในรัง จะทำให้อาณานิคมของผึ้งมีความแข็งแรงเพียงพอที่สามารถให้ผู้เลี้ยงผึ้งเก็บน้ำผึ้งได้ ในช่วงเดือนเมษายน ซึ่งในช่วงนี้จะมีการใส่ honey supers เข้าไปเหนือส่วน hive body โดยสามารถใส่ honey supers จำนวนมากเข้าไปได้ เพื่อรองรับจำนวนน้ำผึ้งที่ผึ้งจะผลิตออกมา รวมถึงประชากรผึ้งที่จะมีจำนวนที่มากขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ซึ่งการใส่ honey supers เข้าไปเป็นจำนวนมาก ยังมีประโยชน์ในการกระตุ้นให้ผึ้งออกไปหาอาหารมากขึ้นด้วย ในช่วงนี้ผึ้งจะนำน้ำหวานมาบรรจุใส่ในช่องว่างของ honey supers และเมื่อน้ำหวานระเหยออกไป จนมีปริมาณน้ำในน้ำหวานเหลือเพียง 18% น้ำหวานจะเปลี่ยนเป็นน้ำผึ้งซึ่งพร้อมที่จะทำการเก็บได้

เมื่อเข้าสู่ช่วงปลายฤดูร้อนและช่วงต้นฤดูใบไม้ร่วง จะเป็นช่วงที่จำนวนตัวอ่อนเกิดขึ้นน้อย และน้ำผึ้งที่ผึ้งสามารถเก็บได้มีปริมาณน้อยเช่นกัน ซึ่งตรงข้ามกับช่วงฤดูใบไม้ผลิ ดังนั้นจึงควรมีการรวมกลุ่มผึ้งโดยการทำให้ honey supers เหลือเพียง 1-2 กล่อง เท่านั้น ซึ่งจะเป็นการบังคับให้ผึ้งต้องเก็บน้ำผึ้งเอาไว้ใน hive body โดยพบว่าอาณานิคมของผึ้งจะสามารถมีชีวิตอยู่ในระหว่างฤดูหนาวได้ใน hive body 2 กล่อง หรือ hive body 1 กล่อง และ honey super อย่างน้อย 1 กล่อง และเมื่อผ่านไปถึงช่วงปลายของฤดูใบไม้ร่วงอาณานิคมของผึ้งควรจะมีน้ำหนักอย่างน้อย 45 กิโลกรัม ซึ่งถ้าหากมีน้ำหนักน้อยกว่านี้ จะสามารถแก้ไขได้โดยการให้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูงแก่ผึ้งโดยผสมน้ำตาลทรายและน้ำในสัดส่วน 2:1 ซึ่งเมื่อผ่านช่วงฤดูใบไม้ร่วงไป ผู้เลี้ยงผึ้งจะกลับไปเริ่มต้นวงจรการเลี้ยงผึ้งใหม่ในเดือนมกราคมต่อไป

ประเภทของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้งสามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ โดยจำแนกตามต้นกำเนิด วิธีและกระบวนการในการเก็บน้ำผึ้ง รวมถึงวัตถุประสงค์ในการใช้งานได้ดังนี้

1. จำแนกตามต้นกำเนิดของน้ำผึ้ง สามารถแบ่งน้ำผึ้งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1.1 Blossom honey เป็นน้ำผึ้งที่ได้จากน้ำหวานของดอกไม้เป็นหลัก

1.2 Honeydew honey เป็นน้ำผึ้งที่ได้จากการที่ผึ้งไปเก็บสารคัดหลั่งของแมลงที่เรียกว่า honeydew ซึ่งแมลงดังกล่าวอาศัยอยู่ในจีนัส *Rhynchota* โดยแมลงชนิดนี้จะอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของพืช และทำการดูดน้ำเลี้ยงของพืชเข้าในตัว และหลั่งสารคัดหลั่งออกมาเป็น honeydew น้ำผึ้งประเภทนี้จะมีสีที่หลากหลาย โดยมีตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีดำ ซึ่งน้ำผึ้งประเภทนี้จะมีการผลิตกันมากในประเทศแถบทวีปยุโรปตอนกลางและยุโรปตะวันออก เช่น ประเทศสโลวีเนีย เป็นต้น โดยผู้เลี้ยงผึ้งจะทำการนำผึ้งไปไว้ในป่าเพื่อให้ผึ้งเก็บนำเอา honeydew มาไว้ที่รังของตน หลังจากผู้เลี้ยงผึ้งจึงเก็บ honeydew ที่ผึ้งเก็บไว้ในรังอีกทีหนึ่ง

1.3 Monofloral honey เป็นน้ำผึ้งที่ได้จากการที่ผึ้งออกไปหาอาหารจากพืชชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นหลัก โดยจะมีการตั้งชื่อน้ำผึ้งตามชื่อพืชที่ผึ้งออกไปทำการหาอาหาร ยกตัวอย่างเช่น น้ำผึ้งดอกลำไย น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งดอกงา น้ำผึ้งดอกทานตะวัน เป็นต้น โดยน้ำผึ้งชนิดนี้จะมีราคาแพงกว่า polyfloral honey เนื่องมาจากว่ามักจะมีสีที่สวยงามน่าใช้มากกว่า

1.4 Multifloral honey หรือ polyfloral honey เป็นน้ำผึ้งที่เกิดจากพืชหลากหลายชนิด ซึ่งไม่มีพืชชนิดใดเป็นชนิดหลักที่ผึ้งได้ทำการออกไปทำการหาอาหาร ยกตัวอย่างเช่น น้ำผึ้งดอกไม้ป่า เป็นต้น

2. จำแนกตามวิธีและกระบวนการในการเก็บน้ำผึ้ง สามารถแบ่งน้ำผึ้งออกได้เป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

2.1 Comb honey เป็นรังผึ้งที่ผ่านการแบ่งเป็นชิ้นๆและมีน้ำผึ้งอยู่ภายใน ซึ่งน้ำผึ้งประเภทนี้นั้นผู้เลี้ยงผึ้งจะไม่ได้ทำการแยกเอาน้ำผึ้งและขี้ผึ้งออกจากกัน น้ำผึ้งในส่วนนี้แม้จะไม่ได้แยกออกจากขี้ผึ้ง แต่สามารถที่จะนำมารับประทานได้เช่นกัน เนื่องจากผู้บริโภคมีความมั่นใจว่าน้ำผึ้งประเภทนี้ไม่ได้ผ่านการปนเปื้อนด้วยกระบวนการต่างๆในการผลิต จึงทำให้น้ำผึ้งประเภทนี้มักจะมีราคาสูง ข้อดีน้ำผึ้ง

ประเภทนี้คือ เป็นรูปแบบน้ำผึ้งที่เก็บได้ง่ายที่สุดและสามารถเตรียมในการจำหน่ายได้ง่ายกว่าน้ำผึ้งในรูปแบบอื่น

2.2 Strained honey เป็นน้ำผึ้งที่ได้จากกรองรังผึ้ง เพื่อแยกส่วนน้ำผึ้งและขี้ผึ้งออกจากกัน

2.3 Chunk honey เป็นน้ำผึ้งที่บรรจุในเหยือกที่มีส่วนของรังผึ้งผสมอยู่ด้วย เพื่อให้ดูน่าใช้มากขึ้น โดยน้ำผึ้งที่บรรจุนั้นจะมีลักษณะใส และมีสีที่อ่อนมาก และจะไม่เกิดการตกผลึกเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานานๆ น้ำผึ้งส่วนใหญ่ที่นำมาทำเป็นน้ำผึ้งประเภทนี้นั้นมักจะเป็นน้ำผึ้งจากต้น *Acacia* และ *Robinia pseudoacacia* ซึ่งน้ำผึ้งประเภทนี้ควรจะต้องมีการเลือกใช้น้ำผึ้งจากชนิดพืชให้เหมาะสม และต้องมีบรรจุภัณฑ์ที่ดี เพื่อให้ได้ราคาที่เหมาะสม

2.4 Extracted honey เป็นน้ำผึ้งที่ได้จากนำรังผึ้งไปผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge

2.5 Pressed honey เป็นน้ำผึ้งที่ผ่านการสกัดโดยกระบวนการกดทับรังผึ้งให้น้ำผึ้งออกมา ซึ่งอาจจะผ่านความร้อนระดับปานกลางร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้

2.6 Crystallised หรือ granulated honey เป็นน้ำผึ้งที่ผ่านการกรองแล้วมีการตกผลึกของน้ำผึ้งเกิดขึ้น

2.7 Creamed honey เป็นน้ำผึ้งที่ผ่านการกรองและถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกขึ้น หลังจากนั้นจึงคนให้เข้ากัน ทำให้เกิดน้ำผึ้งที่มีความนุ่มซึ่งเป็นรูปแบบเฉพาะ โดยในระดับอุตสาหกรรมจะมีการทำน้ำผึ้งประเภทนี้โดยผ่านวิธีของ Dyce (Dyce, 1975) โดยการทำจะใช้น้ำผึ้งที่ผ่านการกรองแล้วมาทำให้เกิดการตกผลึกประมาณ 20% มาผสมกับน้ำผึ้งธรรมดา และมีการควบคุมให้ผลึกเกิดขึ้นต่อไปที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ซึ่งกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอของน้ำผึ้งให้มากขึ้น นอกจากนี้วิธีนี้จะไม่ส่งผลต่อลักษณะที่แท้จริงของน้ำผึ้งด้วย เนื่องจากจะไม่มีการเติมสารเจือปนอื่นๆเข้ามา หรือนำสารแปลกปลอมต่างๆออกไปจากน้ำผึ้งที่ผ่านกระบวนการนี้

3. จำแนกตามวัตถุประสงค์ในการใช้งานสามารถแบ่งน้ำผึ้งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

3.1 Table honey เป็นน้ำผึ้งที่ผลิตขึ้นมาเพื่อให้ผู้บริโภคใช้งาน ไม่ว่าจะเป็นการรับประทานโดยตรง การใช้เป็นสารเพิ่มความหวานในเครื่องดื่มต่างๆ หรือการปรุงอาหาร

3.2 Industrial หรือ bakers' honey เป็นน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านเกณฑ์ในการเป็น table honey ทั้งหมด เช่น ในน้ำผึ้งประเภทนี้อาจมีค่า HMF ที่สูงเกินกว่า 40 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม ซึ่งโดยปกติแล้วนั้น น้ำผึ้งที่มีระดับค่าของ HMF ระดับสูงเกิน 20 มิลลิกรัมต่อน้ำผึ้ง 100 กรัม จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าน้ำผึ้งนั้น มีการปลอมปนโดยใส่น้ำตาลsucroseซึ่งผลิตจากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดลงไปด้วย ซึ่งจะทำให้น้ำผึ้งประเภทนี้ ไม่ผ่านข้อบังคับตามกฎหมายบางข้อในการเป็น table honey ได้ ดังนั้นน้ำผึ้งประเภทนี้มักมีคุณภาพที่ต่ำกว่า table honey แต่ถึงกระนั้นยังสามารถที่จะนำน้ำผึ้งประเภทนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆได้ เช่น การทำขนมเบเกอรี่, ลูกกวาด, ซีเรียล, ซอสปรุงรส รวมไปถึงอุตสาหกรรมยาด้วย โดยพบว่า bakers' honey มีส่วนแบ่งการตลาดเป็นร้อยละ 20 ของตลาดน้ำผึ้งทั่วโลก ในระดับอุตสาหกรรมอาจมีการใช้สารแทนความหวานชนิดอื่นเป็นสารทดแทนน้ำผึ้งได้ เช่น น้ำตาลทราย, invert sugar, corn syrup เป็นต้น แต่น้ำผึ้งชนิดนี้ก็ยังคงได้รับความนิยมเนื่องมาจากว่าผู้ผลิตสามารถกล่าวอ้างได้ว่า สินค้าที่ผลิตนั้นมีส่วนผสมของน้ำผึ้งธรรมชาติซึ่งทำให้ดึงดูดผู้บริโภคได้มากขึ้น

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

น้ำผึ้งได้ถูกนำมาใช้เป็นยาทางเลือกหนึ่งในการรักษาแผลติดเชื้อมาตั้งแต่ในสมัยโบราณกาล (Molan, 1992: 5-28) โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงน้ำผึ้ง manuka (*Leptospermum scoparium*) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆในมนุษย์ได้หลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Lusby, 2005: 464-67 และ Visavadia, 2006: 38-41) นอกจากนี้ในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการพบว่าน้ำผึ้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), β-haemolytic streptococci และ vancomycin-resistant enterococci (VRE) ได้อีกด้วย (Allen, 2000: 10-13 และ Kingsley, 2001) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนั้นจะแตกต่างกันไปในน้ำผึ้งแต่ละชนิด ดังนั้นการแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งจะแสดงออกมาในรูปของ inhibine number ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าเมื่อน้ำผึ้งผ่านการเจือจางไปแล้วกี่เท่าจะยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้อยู่ โดยการเจือจางจะทำการเจือจางทีละ 5% และทำตั้งแต่ 5-25% (Sykes, 1965)

จากการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำผึ้งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะสามารถแบ่งกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำผึ้งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 6 กลไก ดังนี้

1. Hydrogen peroxide ในช่วงปีทศวรรษ 1960 ได้มีการศึกษาพบว่า hydrogen peroxide นั้นเป็นสารประกอบหลักที่ทำให้น้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Molan, 1992: 5-28, Adcock, 1962: 38-40 และ White, 1963: 57-70) โดยกลไกการออกฤทธิ์จะเกิดมาจากเอนไซม์ glucose oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเมทาบอไลท์สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตได้ถูกใส่เข้ามาในน้ำหวานโดยผึ้ง หลังจากนั้นเอนไซม์จะทำงานโดยการเปลี่ยนน้ำตาลglucoseไปเป็นhydrogen peroxide และ gluconic acid ภายใต้สภาวะที่ต้องมีออกซิเจน (Adcock, 1962: 38-40 และ White, 1963: 57-70) โดยเชื่อว่า hydrogen peroxide มีหน้าที่ในการป้องกันการเสื่อมของน้ำผึ้งในช่วงก่อนที่ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผึ้งจะสูงมากพอที่จะทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตไม่ได้ ในระหว่างการบ่มของน้ำผึ้งให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงมากพอนั้น เอนไซม์ glucose oxidase จะยังไม่ถูกกระตุ้นให้ทำงานจนกว่าจะเกิดการเจือจางน้ำผึ้งก่อน โดยมีการศึกษาพบว่า จะสามารถเกิด hydrogen peroxide ได้มากที่สุดในน้ำผึ้งที่ผ่านการเจือจางที่ 50-70% และจะเกิดน้อยลงมากเมื่อน้ำผึ้งมีการเจือจางมากกว่า 70% เนื่องจากเอนไซม์ glucose oxidase จะสามารถจับกับน้ำตาลglucoseที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาได้ลดลง (White, 1963: 57-70) การเจือจางน้ำผึ้งจะทำให้เกิด hydrogen peroxide ซึ่งจะค่อยๆถูกปลดปล่อยออกมาแต่ไม่ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง การตรวจวัดหาปริมาณ hydrogen peroxide สามารถทำได้โดยการหาปริมาณเอนไซม์ catalase ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสะเทินกับ hydrogen peroxideปัจจัยที่ส่งผลทำให้ปริมาณของ hydrogen peroxide ลดลงได้อย่างมากคือ ความร้อนและแสงสว่าง ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucose oxidase ทำให้ปฏิกิริยาที่จะทำให้เกิด hydrogen peroxide ถูกยับยั้งไปด้วยนั่นเอง รวมไปถึงการเสื่อมสลายของ hydrogen peroxideสามารถส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย (Schepartz, 1966: 167-76 และ Huidobro, 2005: 800-4)

2. Methylglyoxal นอกจาก hydrogen peroxide ซึ่งเป็นสารหลักที่ทำให้น้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้แล้วนั้น ยังมีการศึกษาพบว่าน้ำผึ้งบางชนิดยังคงสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ แม้ว่าจะไม่มี hydrogen peroxide เป็นสารออกฤทธิ์ก็ตาม (Molan, 1992: 5-28 และ Allen, 1991: 817-22) น้ำผึ้ง manuka เป็นตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยสารในกลุ่มที่ไม่ใช่ hydrogen peroxide โดยน้ำผึ้งชนิดนี้ผลิตมาจากน้ำหวานของต้น manuka (*Leptospermum scoparium*) ซึ่งเป็นต้นไม้ประจำถิ่นของประเทศนิวซีแลนด์ พบว่าน้ำผึ้ง manuka นั้นมีสาร methylglyoxal (MGO) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณที่สูงมากกว่าน้ำผึ้งชนิดอื่นๆ (Adams, 2008: 651-9 และ

Mavric, 2008: 483-9) โดยทั่วไปนั้น MGO จะถูกสร้างขึ้นเมื่อน้ำตาลผ่านกระบวนการให้ความร้อน หรือเกิดจากการเก็บอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตไว้เป็นระยะเวลานานๆ (Weigel, 2004: 147-51) แต่การเกิด MGO ในน้ำผึ้ง manuka นั้นจะเกิดโดยการเปลี่ยน dihydroxyacetone (DHA) ซึ่งมีปริมาณสูงในน้ำหวานของดอกต้น manuka แทนการเกิดแบบทั่วไป (Adams, 2008: 651-9) ปฏิกิริยาในการเปลี่ยน DHA เป็น MGO นั้นไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์แต่จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆเมื่อเก็บน้ำผึ้งไว้เป็นระยะเวลานานๆ แต่ยังไม่มีการศึกษาใดหาเหตุผลได้ว่าทำไมน้ำหวานของดอกต้น manuka จึงมี DHA ในปริมาณสูง และ DHA ที่พบนั้นถูกสร้างได้อย่างไร ปริมาณ MGO ที่พบในอาหารจะมีปริมาณ 3-47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแตกต่างจากปริมาณ MGO ที่พบได้ในน้ำผึ้ง manuka ที่จะมีปริมาณสูงถึง 38-1541 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Molan, 1992: 5-28, Lusby, 2005: 464-67 และ Stephens, 2010: 78-86) ดังนั้น MGO จึงเป็นสารหลักที่ทำให้น้ำผึ้ง manuka มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Adams, 2008: 651-9) โดยมีการศึกษาของ Kwakman (2011) พบว่าเมื่อทำการกำจัดฤทธิ์ของ MGO ออกจากน้ำผึ้ง manuka จะทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* หายไป

3. Bee defensin-1 หรือ royalisin จัดเป็นเปปไทด์ชนิดหนึ่งที่พบในระบบโลหิตและน้ำเหลืองของผึ้ง และพบได้ในนมผึ้งซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่ผึ้งนางพญาใช้เลี้ยงตัวอ่อนด้วย โดยจะมีปริมาณที่แตกต่างกันไปในน้ำผึ้งแต่ละชนิด (Casteels-Josson, 1994: 28569-75 และ Fujiwara, 1990: 11333–7) โดยมีการศึกษาของ Kwakman (2010) พบว่าเปปไทด์ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกเท่านั้น เช่นเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ซึ่งนอกจาก bee defensin-1 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แล้ว ยังมีเปปไทด์อีก 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เช่นกัน คือ hemenoptecin, apidaecin และ abaecin ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 4 ชนิดนั้นจะมีสเปคตรัมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ทำให้น้ำผึ้งมีสเปคตรัมที่ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มใหญ่ๆได้กว้างมาก และ Kwakman (2011) ได้ทำการศึกษาพบว่า bee defensin-1 จะสามารถพบได้ในน้ำผึ้งบางชนิดเท่านั้น

4. สารประกอบกลุ่มอื่นๆ มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการนำน้ำผึ้งไปผ่านปฏิกิริยาสะเทินฤทธิ์ของ hydrogen peroxide และทำให้โปรตีนในน้ำผึ้งเสียสภาพไป พบว่าน้ำผึ้งยังสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus stearothermophilis* ได้

แต่พบว่าน้ำผึ้งไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นๆอีกหลายชนิดได้ เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อ MGO ดังนั้นจึงเป็นข้อสังเกตว่าน้ำผึ้งน่าจะมีสารประกอบกลุ่มอื่นๆนอกเหนือจาก hydrogen peroxide, MGO และ bee defensin-1 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Mundo, 2004: 1-8) มีการคาดการณ์ว่าสารประกอบในกลุ่ม phenolic จะเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความในสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่การศึกษายังคงไม่ชัดเจน เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อแยกสารประกอบดังกล่าวออกเป็นสารเดี่ยวๆแล้วนั้นพบว่ามีฤทธิ์ที่ค่อนข้างต่ำ (Molan, 1992: 5-28) จึงมีการคาดการณ์ว่าถ้าสารประกอบเหล่านี้อยู่ร่วมกันในน้ำผึ้งจะทำให้น้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มากกว่าที่จะแยกสารเหล่านี้ออกมาเป็นสารเดี่ยวๆ

5. ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำผึ้ง เนื่องจากน้ำผึ้งมีค่าpHที่เป็นกรดคือมีค่าระหว่าง 3.2-4.5 ซึ่งค่า pH ดังกล่าวมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด โดยดูจากค่า pH ที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ ซึ่งถ้าค่า pH มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับค่านี้ก็จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียนั้นๆได้ ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ *Escherichia coli* ค่า pH 4.3, เชื้อกลุ่ม *Salmonella* ค่า pH 4.0, เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ค่า pH 4.4, เชื้อ *Streptococcus pyogenes* ค่า pH 4.5 และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ค่า pH 4.2 เป็นต้น จึงทำให้น้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ ดังนั้นน้ำผึ้งก่อนที่จะถูกนำไปเจือจางค่าความเป็นกรดของน้ำผึ้งจึงมีส่วนสำคัญต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

6. ผลทางออสโมติก ในน้ำผึ้งนั้นจะมีน้ำตาลglucose และน้ำตาลfructoseเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งจะมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลของน้ำที่แข็งแรง ทำให้ปริมาณโมเลกุลน้ำที่เหลืออยู่ในน้ำผึ้งนั้นมีปริมาณน้อยมากที่จะให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ ปริมาณน้ำอิสระจะถูกวัดและรายงานเป็นค่า water activity (aw) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าค่า aw ของน้ำผึ้งนั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.479-0.557 (Cavia, 2004: 268-70) โดยมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ถ้าหากค่า aw มีค่าอยู่ระหว่าง 0.94-0.99 (Blickstad, 1984: 13-7) ดังนั้นน้ำผึ้งจึงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดโดยใช้ความดันออสโมติกได้ แต่ถ้าหากทำการเจือจางน้ำผึ้งด้วยน้ำแล้วนั้น ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยใช้ผลทางออสโมติกของน้ำผึ้งจะเสียไป

ปัจจัยที่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

มีการศึกษาพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของน้ำผึ้งได้ถึง 100 เท่าด้วยกัน ซึ่งขึ้นกับลักษณะภูมิประเทศที่ทำการเพาะเลี้ยงผึ้ง ฤดูกาลที่ทำการเก็บน้ำผึ้ง ชนิดของพืชที่ผึ้งทำการเก็บน้ำหวาน รวมถึงวิธีและกระบวนการในการเก็บน้ำผึ้ง และสภาวะในการเก็บน้ำผึ้งด้วย (Molan, 2000; 249-50) และ Basualdo (2007) ได้ทำการศึกษาพบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งนั้นจะขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้รวมถึงชนิดของแบคทีเรียด้วย ซึ่งถ้าหากใช้น้ำผึ้งในความเข้มข้นสูง จะทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้มากตามไปด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยในเรื่องของปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เช่นน้ำผึ้ง manuka จะมีปริมาณสาร MGO ที่สูงมาก แต่มีปริมาณของ hydrogen peroxide ที่ต่ำมาก ดังนั้นสาร MGO จึงเป็นสารหลักที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในน้ำผึ้ง manuka ส่วนปริมาณของ hydrogen peroxide จะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืชด้วย โดยเอนไซม์ catalase จะเป็นเอนไซม์ที่สลาย hydrogen peroxideทำให้น้ำผึ้งบางชนิดหมดฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียไป ซึ่งเอนไซม์ catalase จะมาจากละอองเรณูและน้ำหวานของดอกไม้บางชนิด (ส่วนใหญ่มาจากน้ำหวาน) โดยมีการศึกษาพบว่าน้ำผึ้งจากดอกไม้บางชนิดจะมีปริมาณเอนไซม์ catalase ที่สูง ทำให้ปริมาณ hydrogen peroxide ต่ำ ส่วนน้ำผึ้งจากดอกไม้ที่มีปริมาณเอนไซม์ catalase ต่ำ จะมีปริมาณ hydrogen peroxide ที่สูง นอกจากนี้การสัมผัสกับแสงและความร้อนของน้ำผึ้งนั้นสามารถส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน เนื่องจากเอนไซม์ glucose oxidase เป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อความร้อนและแสงสว่าง ดังนั้นถ้าหากน้ำผึ้งถูกสัมผัสกับความร้อนและแสงสว่างเป็นเวลานานๆ จะทำให้เอนไซม์ glucose oxidase สามารถเสื่อมสลายได้ ซึ่งจะส่งผลทำให้ปริมาณของ hydrogen peroxide ลดลงตามไปด้วย

การนำน้ำผึ้งมาใช้ทางยา

จากฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้มีการนำเอาน้ำผึ้งนั้นมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยข้อดีของน้ำผึ้งในการนำมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียนั้นคือ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่บริเวณผิวหนังชั้นตื้นได้ดี รวมถึงน้ำผึ้งบางส่วนสามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังและไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังชั้นลึกได้ด้วย (Cutting, 2007: 49-54) และยังช่วยในการสมานแผลที่เกิดจาก

แผลไฟไหม้และลดการเกิดแผลเป็นได้อีกด้วย (Subrahmanyam, 1991: 497-8) รวมถึงยังไม่พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียชนิดใดดื้อต่อน้ำผึ้ง (Kwakman, 2008:1677-82) แต่การใช้น้ำผึ้งนั้นมีข้อเสียอยู่บางประการเช่นกัน เช่น น้ำผึ้งมีความหนืดสูง ทำให้เมื่อใช้ทาบริเวณผิวหนังแล้วจะก่อให้เกิดความรู้สึกเหนอะหนะมาก จึงทำให้ความร่วมมือในการใช้ของผู้ป่วยค่อนข้างต่ำ และน้ำผึ้งอยู่ในลักษณะของเหลวที่สามารถไหลได้ ดังนั้นจึงทำให้การทาบริเวณแผลทำได้ลำบาก นอกจากนี้ยังต้องมีความระมัดระวังในการใช้ด้วยเนื่องจากผู้ป่วยบางคนอาจแพ้ส่วนประกอบของน้ำผึ้ง ผลิตภัณฑ์จากผึ้ง หรือเหล็กในของผึ้ง เป็นต้น

ในประเทศไทยนั้นได้มีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาแผลผ่าตัดหน้าท้องที่มีภาวะแทรกซ้อนซึ่งแยกออกจากกัน มาเป็นระยะเวลานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยอาศัยความร่วมมือกันทั้งจาก สูติแพทย์ พยาบาล เภสัชกร คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งน้ำผึ้งที่ใช้นั้นจะใช้ในรูปแบบน้ำผึ้งแท้ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว โดยพบว่าได้ผลในการรักษาดีมาก เนื้อเยื่อบริเวณแผลมีการอักเสบลดลง การบวมของแผลลดลง กลิ่นที่เกิดจากการติดเชื้อหายไป เนื้อเยื่อบริเวณแผลสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดระหว่างการทำความสะอาดแผล ไม่จำเป็นต้องเลาะ หรือตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลผ่าตัดออก ทำให้ผู้ป่วยเกิดความพึงพอใจในการรักษา รวมถึงสามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลได้อีกด้วย (Phuapradit, 2012)

นอกจากนี้ในต่างประเทศได้มีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อจากแบคทีเรียบริเวณผิวหนังเช่นกัน เช่น ประเทศอังกฤษ หน่วยงานระบบบริการสุขรูปแห่งชาติ (NHS) ได้มีการพัฒนาแนวทางเวชปฏิบัติในการใช้น้ำผึ้งรักษาแผลติดเชื้อเพื่อเป็นแนวทางให้บุคลากรทางการแพทย์ โดยระบุรายละเอียดไว้ดังนี้ (Derby City PCT, 2012)

1. การใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อควรทำโดยบุคลากรที่ผ่านการฝึกฝนการใช้น้ำผึ้งมาแล้ว

2. การใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อ สามารถใช้ได้กับแผล 4 กรณี ดังนี้

    2.1 ผู้ป่วยที่มีแผลติดเชื้อที่รุนแรง

    2.2 ผู้ป่วยที่มีแผลติดเชื้อที่รุนแรงที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในรูปแบบยารับประทานหรือในรูปแบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำ

    2.3 ผู้ป่วยที่แผลมีการตายของเนื้อเยื่อ

2.4 ผู้ป่วยที่แผลมีกลิ่นเหม็น

3. ข้อห้ามใช้ ห้ามใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อในผู้ป่วย 3 ประเภท ดังนี้

3.1 ผู้ป่วยที่มีประวัติการแพ้น้ำผึ้ง

3.2 ผู้ป่วยที่มีประวัติการแพ้เข็มพิษของผึ้ง

3.3 ผู้ป่วยที่มีสารคัดหลั่งจากแผลเป็นปริมาณมาก ซึ่งสามารถจะไปเจือจางน้ำผึ้งทำให้น้ำผึ้งอาจไม่มีประสิทธิภาพในการรักษา รวมถึงสามารถส่งผลทำให้น้ำผึ้งยึดติดกับแผลได้ไม่ดีด้วย

4. ข้อควรระวังในการใช้ ควรระมัดระวังการใช้ในผู้ป่วย 2 ประเภท ดังนี้

4.1 ผู้ป่วยโรคเบาหวาน เนื่องจากน้ำผึ้งมีส่วนประกอบหลักคือ น้ำตาลglucose และน้ำตาล fructose ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีการศึกษาใดออกมารองรับว่าการใช้น้ำผึ้งในรูปแบบยาทาภายนอกกับแผลลักษณะเปิด จะสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยได้ก็ตาม แต่ควรจะมีการติดตามระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานที่ใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อด้วย

4.2 ผู้ป่วยที่ปวดบริเวณแผลติดเชื้อ เนื่องมาจากผู้ป่วยบางคนอาจเกิดความรู้สึกเจ็บแผลที่เป็นมากขึ้นหลังจากการใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อ เนื่องจากน้ำผึ้งมีผลทางออสโมติกมาเกี่ยวข้องด้วย ดังนั้นถ้าหากผู้ป่วยมีอาการปวดมากขึ้น ควรที่จะมีการให้ยาแก้ปวดอย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถแก้ได้ด้วยการคลี่ผ้าพันแผลออกให้เหลือความหนาที่พันแผลเพียงเล็กน้อย ซึ่งถ้าหากอาการปวดของแผลยังไม่ลดลง ให้นำผ้าพันแผลออก และทำการล้างแผลด้วยน้ำเกลือ และไม่ควรที่จะใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีอาการปวดมากที่บริเวณแผล

5. การทาน้ำผึ้ง จะทำโดยการเทน้ำผึ้งลงไปยังผ้าพันแผลก่อน เนื่องจากถ้าเทน้ำผึ้งลงที่แผลโดยตรง จะทำให้น้ำผึ้งไหลไปยังบริเวณนอกขอบเขตของแผล ทำให้การพันแผลทำได้ลำบากขึ้น

6. แผลที่มีลักษณะเป็นช่องว่าง การทาน้ำผึ้ง จะต้องทาน้ำผึ้งให้เต็มบริเวณช่องว่างของแผลก่อนที่จะทำการพันแผล เพื่อให้แน่ใจว่าน้ำผึ้งจะสามารถซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของแผลได้

7. เพื่อให้น้ำผึ้งยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การทาน้ำผึ้งอย่างสม่ำเสมอถือเป็นอีกส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญในการรักษา โดยจะทำการทาน้ำผึ้งเพิ่มเติม เมื่อสีของน้ำผึ้งที่แผลนั้นเปลี่ยนไปจากเลือดและสารคัดหลั่งจากแผล เนื่องจากเลือดและสารคัดหลั่งจากแผลจะสามารถลดผลทางออสโมติกของน้ำผึ้ง ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลง ในกรณีที่แผลนั้นไม่มีสารคัดหลั่งออกมา ควรจะมีการเปลี่ยนบริเวณผ้าพันแผลสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่ายังมีน้ำผึ้งเพียงพอในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

8. ควรมีการประเมินการรักษาแผลติดเชื้อจากการใช้น้ำผึ้ง เมื่อผ่านไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อประเมินว่าควรที่จะใช้น้ำผึ้งในการรักษาต่อไป หรือควรที่จะใช้ทางเลือกอื่นแทนในการรักษา

เทคนิคทางจุลชีววิทยาที่ใช้ในงานวิจัย

การย้อมแกรม

ในปี ค.ศ. 1884 Christian Gram นักวิทยาแบคทีเรียชาวเดนมาร์กได้พัฒนาเทคนิคการย้อมสีซึ่งใช้แยกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ กระบวนการดังกล่าวมีพื้นฐานมาจากความสามารถของจุลชีพในการรักษาไว้ซึ่งสีม่วงของ crystal violet ขณะที่ถูกขจัดสีออกไป (decolorization) ด้วยแอลกอฮอล์ แบคทีเรียแกรมลบถูกขจัดสีออกไปโดยแอลกอฮอล์ ทำให้สูญเสียสีม่วงของ crystal violet ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่ถูกขจัดสีออกไปโดยแอลกอฮอล์และยังคงติดสีม่วง หลังจากการขจัดสีจะใช้ safranin ซึ่งเป็นสีย้อมสีแดงที่จะให้สีชมพูแก่แบคทีเรียแกรมลบที่ถูกขจัดสี

Crystal violet เป็นสีย้อมตัวหลักๆที่ทำให้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบติดสีม่วงหลังจากการย้อมสี 20 วินาที เมื่อใช้ gram's iodine ซึ่งเป็นสารที่ใช้ติดสีย้อมเป็นเวลา 1 นาที สีของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบยังคงติดสีม่วง หน้าที่ของสารที่ใช้ติดสีย้อมคือไปรวมกับ crystal violet ได้เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายในแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อใช้ 95% ethanol ซึ่งเป็นสารขจัดสีเป็นเวลา 10-20 วินาที จะทำให้แบคทีเรียแกรมลบถูกชะล้างสีออกไป แต่แบคทีเรียแกรมบวกยังคงติดสีม่วงอยู่ ใน

ขั้นตอนสุดท้ายใช้ safranin ซึ่งเป็นสีย้อมที่ให้สีชมพูแก่แบคทีเรียแกรมลบที่ถูกขจัดสีแต่ไม่มีผลต่อสีม่วงของแบคทีเรียแกรมบวก

Disk diffusion susceptibility testing

Disk diffusion method มีพื้นฐานมาจากการแพร่ของยาที่ถูกปลดปล่อยมาจาก disk ผ่านไปตาม agar มีตัวแปรหลายอย่างที่มีผลต่อการแพร่ เมื่อเติมยาปฏิชีวนะลงไปใน well ที่ตัดลงไปใน agar หรือนำ disk ที่มียาปฏิชีวนะวางลงบนผิวหน้าของ agar ยาจะเริ่มแพร่ทันทีและแพร่ไปเพื่อลด concentration gradient จากขอบของ well หรือ disk เมื่อผ่านไปหลายชั่วโมง concentration gradient จะลดลงเพราะยามีการแพร่ไปเรื่อยๆ ใน disk susceptibility testing จะวาง disk ลงบนผิวหน้าภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียลงไป การเกิดขึ้นของโซนเป็นผลจากการแข่งขันกันระหว่างการแพร่ของยา และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใส่ลงไป โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดของโซน มีดังนี้

1. ปริมาณยาที่อยู่ใน disk (disk content) ควรจะทำให้เกิดโซนในขนาดกลาง (15-35 มิลลิเมตร) ภายใต้สภาวะปกติ FDA กำหนดให้ปริมาณที่แท้จริงของยาใน disk ต้องมีค่าระหว่าง 90-125% จากที่ได้อ้างไว้ ขนาดโซนที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณยาใน disk

2. ความกว้างของ disk (disk size) มีผลต่อปริมาณการแพร่ของยา disk ขนาดใหญ่ให้โซนขนาดใหญ่เมื่อกำหนดให้ปริมาณยาเท่ากัน โดยทั่วไปจะผลิตในขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร คุณสมบัติของกระดาษก็มีผลต่อการปลดปล่อยตัวยาเช่นกัน

3. คุณสมบัติการแพร่ของตัวยา (diffusion characteristics of the drug) คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลยาคือขนาดและประจุ โดยทั่วไปโมเลกุลใหญ่จะแพร่ช้ากว่าและให้โซนขนาดเล็กกว่า โมเลกุลที่เป็น cationic จะยับยั้งการแพร่ของตัวมันเองจากการเกิดอันตรกิริยากับกรดและหมู่ sulphate ของ agar

4. ความลึกของ agar (agar depth) มีผลต่อขนาดโซนใส ส่วนใหญ่แล้วจะใช้ความลึกที่ 4 มิลลิเมตร ความลึกน้อยๆจะให้ขนาดโซนใสที่ดี ความลึกที่มากจะมีความแปรปรวนของขนาดโซนใสน้อยกว่า และความลึกที่น้อยกว่า 3 มิลลิเมตรจะมีความแปรปรวนของขนาดโซนมาก

5. ระยะเวลาระหว่างการใส่เชื้อลงบนผิวหน้า agar และการวาง disk (time between inoculation and disk placement) มีผลต่อขนาดโซน เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง

ซึ่งก็คืออุณหภูมิเดียวกับขั้นตอนการใส่เชื้อ โดย disk diffusion method แนะนำให้วาง disk ภายใน 15 นาทีหลังการใส่เชื้อ

6. ระยะเวลาในการบ่ม (incubation time) เชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้เร็วจะให้โซนเกิดขึ้นภายในไม่กี่ชั่วโมงหลังจากบ่ม ในทางทฤษฎีสามารถอ่านขนาดโซนได้เมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อสามารถมองเห็นได้ แต่แนะนำให้บ่มต่อไปสำหรับทุกเชื้อและทุกวิธีการทดลอง เพราะขนาดโซนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ภายหลังจากเชื้อเจริญเติบโตจนมองเห็นได้ ผลการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการ 1. เจริญเติบโตล่าช้า 2. ส่วนที่ยับยั้งได้บางส่วน (partial inhibition) มองเห็นชัดเจนขึ้น และหรือ 3. การปรากฏอย่างล่าช้าของเชื้อดื้อยา ปกติแนะนำให้บ่มนาน 18 ชั่วโมง ถ้าขนาดโซนใสถึงจุดที่เป็นช่วงของการดื้อยาแล้ว การบ่มต่อไปอาจทำให้ขนาดโซนเล็กลง

7. อุณหภูมิในการบ่ม (incubation temperature) ต้องเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดลอง แบคทีเรียที่ก่อโรคในคนส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงแนะนำให้บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

8. ความหนาแน่นของเชื้อที่ใส่ลงไป (inoculum density) ปริมาณเชื้อที่ใส่ลงไปมีผลต่อขนาดโซนใสมากกว่าปัจจัยอื่นๆ ในกรณีที่ใส่เชื้อมากเกินไป อาจจะทำให้ไม่เกิดโซนทั้งที่จุลชีพไวรับต่อยา บางวิธีจึงเลือกที่จะใช้การเทียบมาตรฐานความขุ่นของเชื้อเทียบกับ McFarland 0.5 barium sulfate standard ทำให้ปริมาณเชื้อในแต่ละชนิดที่ใส่ลงไปแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

9. ขอบของโซนใส (zone edge) ยาบางกลุ่มให้ขอบโซนคลุมเครือ ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งที่ค่อยๆ ลดลงตลอดระยะทาง 1-5 มิลลิเมตร เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ขึ้น แนะนำให้ผู้อ่านประมาณจุดที่ยับยั้งได้ 80% และกำหนดให้จุดนั้นเป็นขอบโซน

10. ระยะห่างระหว่าง disk (disk spacing) การกำหนดระยะห่างระหว่าง disk ควรคำนึงถึงปริมาณยาใน disk และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ปริมาณยาที่มากและอัตราการเจริญที่ต่ำจะทำให้ได้โซนขนาดใหญ่ ถ้าโซนขนาดใหญ่เกินไปอาจจะไปทับกับโซนข้างเคียงทำให้การอ่านค่าขนาดโซนอาจไม่ถูกต้อง NCCLS จึงกำหนดให้ระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางของแต่ละ disk อยู่ห่างกัน 24 มิลลิเมตร เพื่อลดโอกาสการเกิดส่วนที่ทับกัน ถ้าใช้ plate ขนาด 90 มิลลิเมตร จะวาง disk ได้เพียง 5 อัน และถ้าใช้

6-8 อัน อาจจะไม่ค่อยสะดวก แต่บางแห่งกำหนดให้วางได้ถึง 6 อัน ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณยาที่น้อยซึ่งจะช่วยป้องกันการซ้อนทับกัน

ปัจจุบันมี Disk susceptibility testing method หลายวิธี โดยวิธีของ NCCLS ถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดวิธี Disk susceptibility testing method ของ NCCLS

คุณสมบัติ	**ข้อกำหนดที่ระบุไว้**
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Mueller-Hinton
pH	7.2-7.4 ที่อุณหภูมิห้อง
ความเข้มข้นของ divalent cation	ไม่พบ
เส้นผ่านศูนย์กลาง plate	90 มิลลิเมตร, 100 มิลลิเมตร, 150 มิลลิเมตร
ความลึกของ agar	ประมาณ 4 มิลลิเมตร (25-30 มิลลิลิตร/plate 100 มิลลิลิตร, 60-70 มิลลิลิตร/plate 150 มิลลิลิตร)
การเก็บ plate	เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส มากกว่า 7 วัน
การเก็บ disk	แช่ตู้เย็นที่ -8 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า หรือแช่แข็งในห้องแช่แข็งที่ไม่มีระบบ frost-free ที่ -14 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า
การใช้ disk	นำออกจากตู้เย็นหรือห้องแช่แข็ง 1-2 ชั่วโมงก่อนใช้
ของเหลวที่ใช้เตรียมเชื้อ	0.9% saline
จำนวนโคโลนีที่ใช้เตรียม	3-5 โคโลนี เขี่ยด้วย loop
การเตรียมเชื้อ	เตรียมใน saline
การ calibrate เชื้อ	0.5 $BaSO_4$ McFarland
การใส่เชื้อ	ใช้ไม้พันสำลีจุ่มและกดข้างหลอดก่อนนำมาถูให้ทั่วผิวหน้า plateใน 2 ทิศทางหรือมากกว่าที่ 60^{o}

คุณสมบัติ	ข้อกำหนดที่ระบุไว้
จำนวนและระยะห่างระหว่าง disk	ระยะห่างอย่างน้อย 24 มิลลิเมตรจากจุดศูนย์กลางถึงจุดศูนย์กลางเช่น 12 disks/plate ขนาด 150 มิลลิเมตร 5-6 disks/plate ขนาด 100 มิลลิเมตร disk ที่ให้โซนขนาดใหญ่ควรวางถัดจาก disk ที่ให้โซนขนาดเล็ก
เวลาระหว่างการใส่เชื้อและวาง disk	ไม่เกิน 15 นาที
อุณหภูมิและเวลาในการบ่ม	35 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง
บรรยากาศ	อากาศ
การวาง plate ซ้อนกัน	ไม่ได้ระบุ
การแปลผล	อ้างอิงตาม NCCLS
การแบ่งประเภทของผลลัพธ์	Sensitive, Intermediate, Resistance
QC strains	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923
คุณสมบัติ	ข้อกำหนดที่ระบุไว้
การอ่านขนาดโซน	ใช้ไม้บรรทัดหรือ sliding caliper วัดโซนที่สมบูรณ์ที่สุด โดยให้ petri dish ห่างจากฉากหลังสีดำที่ไม่สะท้อนแสงประมาณ 2-3 นิ้ว สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น วัดโซนจากผิวหน้า สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อใส วัดโซนจากฐาน

Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพมีหลักการพัฒนามาจากการศึกษาของ Fleming โดยใช้เทคนิคการเจือจาง 2 เท่า (serial twofold dilutions) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเรียกว่า Broth dilution method เริ่มแรกเทคนิคนี้ทำในหลอดทดลองโดยมีปริมาตรสุดท้าย 1-2 มิลลิลิตร (macrobroth หรือ macrodilution technique) ห้องทดลองส่วนใหญ่ยึดตามวิธีการของ International Collaborative Study (ICS)

ปัจจัยที่มีผลต่อ broth dilution test ประกอบด้วย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (media) ในอุดมคตินั้นอาหารเลี้ยงเชื้อควรจะมีคุณสมบัติจำลองแบบมาจากเลือดที่ซึ่งเชื้อจุลชีพและยาต้านเชื้อจะมีอันตรกิริยากัน เป็นที่ชัดเจนว่าไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อใดที่เหมาะสมกับการทดสอบยาต้านเชื้อและเชื้อจุลชีพได้ทุกชนิด คุณสมบัติสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อในอุดมคติ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อควรสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้หลากหลาย แสดงส่วนประกอบของสูตรตำรับที่ใช้ในการผลิต แม้ว่าต่างรุ่นการผลิตหรือต่างโรงงานแต่ก็ควรให้ผลการทดลองไม่ต่างกัน ไม่พบสารที่อาจเกิดปฏิกิริยากับยาต้านเชื้อที่ใช้ทดสอบ สามารถควบคุม pH ได้ตลอดการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแบบ broth และ agar ควรมีสูตรตำรับเหมือนกันยกเว้นสารทำให้แข็ง และอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีความเป็น isotonic MHB (Mueller-Hinton broth) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แนะนำให้ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำ broth dilution test

2. pH, buffer, and incubation pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ดังนั้น buffer capacity ที่มีในสูตรตำรับอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับความคงที่ของ pH ตลอดการบ่ม บรรยากาศก็มีส่วนสำคัญเช่นกัน ก๊าซ CO_2 ในบรรยากาศขณะบ่มอาจทำให้เปลี่ยนแปลง pH ไปเป็นกรดมากขึ้น อุณหภูมิในการบ่มควรอยู่ระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส สำหรับระบบ broth dilution การอ่านค่า MIC จากการบ่มข้ามคืนจะให้ผลการทดลองที่มี reproducibility ดีที่สุด

3. Cation concentration and osmolarity divalent cation อย่าง calcium และ magnesium ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพบางชนิด มีคำแนะนำว่าควรเพิ่มเติมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ magnesium เท่ากับ 20-35 มิลลิกรัมต่อลิตร และ calcium เท่ากับ 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับช่วงความเข้มข้นที่พบในซีรั่ม สำหรับความเข้มข้นของ sodium chloride มีผลเปลี่ยน osmolarity ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลต่อฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพบางตัว

4. Supplements and other additives ปัจจุบัน MHB เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายให้ใช้ในงาน antimicrobial susceptibility test และเหมาะกับเชื้อก่อโรคมาตรฐานที่เจริญเติบโตเร็ว เช่น staphylococci แต่สำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญเติบโตอย่างช้าๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจจะต้องการอาหารเสริมหรือการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ การใส่อาหารเสริมที่ไม่รู้ส่วนประกอบทางเคมีที่แน่ชัดในบางครั้งอาจไป

ปรับเปลี่ยนฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามถ้ามีการควบคุมดีๆ การใส่อาหารเสริมก็จะให้ผลดีในการทดลอง

5. Inoculum size, effects, and standardization การปรับปริมาณเชื้อที่ใส่ลงไปสำคัญสำหรับ broth dilution test มากกว่า disk diffusion method เนื่องจากสามารถประเมินเชื้อที่เจริญเติบโตบน agar ได้ด้วยสายตา แต่ยากที่จะประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อในหลอดทดลอง โดยปริมาณเชื้อมีผลต่อ MIC เมื่อปริมาณเชื้อยิ่งมากก็มีความเป็นไปได้ที่จะมีเชื้อดื้อยาอยู่มากที่จะอยู่รอดและเจริญเติบโตต่อไป และทำให้ MIC สูงขึ้น งานวิจัยส่วนใหญ่สนับสนุนงานของ ICS ที่แนะนำว่าปริมาณเชื้อ 10^5-10^6 CFU/ml จะให้ผลการทดลอง macrobroth dilution test ที่เป็นที่ยอมรับ

6. Methodology for standardizing inocula การปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland 0.5 turbidity standard เป็นวิธีการที่ใช้กันบ่อยใน macrodilution systems โดยมักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบ เช่น MHB โดยกระจายโคโลนีของเชื้อให้สัมพันธ์กับ McFarland turbidity standard จากนั้น เจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอย่างเหมาะสม (เช่น 1:2000)

Standard macrodilution broth procedure

วิธีการพื้นฐานที่ถูกใช้กันมากในห้องทดลอง คือ วิธีของ ICS (International Collaborative Study) สารละลายของยาต้านจุลชีพเตรียมโดยเจือจางยากับ Mueller-Hinton broth (MHB) ให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการ การทดลองนี้ทำในหลอดทดลองขนาด 100 มิลลิเมตรที่มีฝาเกลียวปิด (หรืออุดด้วยฝ้าย) จำนวน 13 หลอด การเจือจาง 2 เท่าทำได้โดยการนำสารละลายของยาต้านจุลชีพ 2 มิลลิลิตร เติมลงไปในหลอดทดลองที่ 1 หลอดทดลองที่เหลือเติม MHB 1 มิลลิลิตร ใช้ pipette ปราศจากเชื้อดูดสารละลายในหลอดที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตรไปใส่หลอดที่ 2 หลังจากผสมกันดีแล้ว ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตรจากหลอดที่ 2 ลงในหลอดที่ 3 (ในแต่ละครั้งที่ย้ายสารให้ใช้ pipette แยกกัน) ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนถึงหลอดรองสุดท้ายที่ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตรทิ้งไป หลอดสุดท้ายไม่มียาต้านจุลชีพจึงใช้เป็นตัวควบคุม ความเข้มข้นสุดท้ายของยาต้านจุลชีพในแต่ละหลอดจะเป็นครึ่งหนึ่งจากตอนแรกเนื่องจากการใส่ broth ที่มีเชื้อลงไปในปริมาณเท่ากัน สำหรับการเตรียมเชื้อนั้นจะปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 standard และเจือจางต่อใน broth ในอัตราส่วน 1:200 จะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^5-10^6 CFU/ml และนำ 1 มิลลิลิตรของเชื้อที่เตรียมได้เติมลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน

16-20 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาต้านจุลชีพที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่สังเกตด้วยตาได้อย่างสมบูรณ์เป็นตัวแทนของ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอิมัลชัน

อิมัลชัน (emulsion) หมายถึง ระบบกระจายตัวระดับคอลลอยด์ที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน โดยใช้ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เป็นตัวผสานเข้าด้วยกัน โดยของเหลวชนิดหนึ่งเป็นวัฏภาคภายใน (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เป็นวัฏภาคภายนอก (external or continuous phase) โดยทั่วไปหยดของวัฏภาคภายในมีขนาดต่างๆกัน ตั้งแต่ขนาดที่เล็กกว่า 0.05 ไมครอน จนถึง 25 ไมครอน ซึ่งขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในมีผลต่อการกระจายแสงได้ต่างกัน จึงทำให้อิมัลชันมีลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้แตกต่างกัน

ขนาดหยดอนุภาควัฏภาคภายในและลักษณะอิมัลชันที่มองเห็น

ตารางที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดหยดอนุภาควัฏภาคภายใน และลักษณะอิมัลชันที่มองเห็น

ขนาดหยดอนุภาควัฏภาคภายใน	ลักษณะอิมัลชันที่มองเห็น
เล็กกว่า 0.05 ไมครอน	โปร่งใส (transparent)
0.05 - 0.10 ไมครอน	ขุ่นหรือโปร่งใส (translucent)
0.10 - 1.00 ไมครอน	สีขาวอมฟ้า
ใหญ่กว่า 1.00 ไมครอน	ขุ่นขาวทึบ

ชนิดของอิมัลชัน

แบ่งตามลักษณะภายนอกที่มองเห็น ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. แมคโครอิมัลชัน (macroemulsion) เป็นอิมัลชันที่มีอนุภาคของวัฏภาคภายในขนาดตั้งแต่ 0.25 – 10 ไมครอน ทำให้เกิดความแตกต่างในค่าดัชนีการหักเหของแสงของวัฏภาคทั้งสอง และเกิดการกระจายแสงทำให้ดูมองขุ่นขาว แมคโครอิมัลชันพบมากในอุตสาหกรรม อาหาร ยา และเครื่องสำอาง

2. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นอิมัลชันที่มีอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กประมาณ 10-75 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible light) จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง แสงทะลุผ่านได้ ทำให้ดูโปร่งใส

แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก ได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำ วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน ค่อนข้างเหนอะหนะและล้างน้ำออกยาก

2. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ มีความเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายตัวดี ล้างน้ำออกง่าย

3. อิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น w/o/w หรือ o/w/o

แบ่งตามความหนืดของอิมัลชัน ได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. โลชัน (lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ ไหลได้ มีวัฏภาคภายในปริมาณสูง (ไม่เกิน 35%) โลชันอาจเป็นทั้งชนิด o/w และ w/o

ชนิด w/o จะให้ความรู้สึกเหนอะหนะผิว ใช้ในโลชันป้องกันแดดชนิดที่มีคุณสมบัติกันน้ำ ที่ใช้ทาก่อนลงเล่นน้ำเป็นต้น

ชนิด o/w เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทาผิว โดยเฉพาะผิวหนังที่มีบริเวณกว้าง เพราะทาแล้วชุ่มชื้น ไม่เหนอะหนะ ดูดซึมดี ให้ความรู้สึกสบาย และล้างออกได้ง่าย เช่นโลชันทาผิว โลชันป้องกันแสงแดด เป็นต้น

2. ครีม (cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง (ลักษณะกึ่งแข็ง) ประกอบด้วยสารพวกไขมันแข็ง (waxes) และไขมัน (fatty acid or fatty alcohol) ผสมอยู่กับน้ำมัน (oil) ในวัฏภาคน้ำมัน ครีมมีทั้งชนิด o/w และ w/o ครีมจะมีความหนืดมากกว่าโลชัน เพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในสูงกว่า คือประมาณ 35-75 % นอกจากนี้กรณีของครีมชนิด o/w อาจมีการใส่สารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ร่วมด้วยในตำรับเช่น acacia, veegum และ methylcellulose เป็นต้น

ส่วนประกอบของอิมัลชัน

1. วัฏภาคน้ำ (water phase) ได้แก่ น้ำและสารต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ สารอื่นๆที่อยู่ในวัฏภาคน้ำ ได้แก่

- สารเพิ่มความหนืด เช่น acacia, veegum, methylcellulose และ carbopol เป็นต้น

- สาร humectant เช่น glycerin และ propylene glycol เป็นต้น

- สารกันเสีย เช่น metthylparaben และ sodium benzoate เป็นต้น

- สารลดแรงตึงผิว เช่น Tween® และ sodium lauryl sulfate เป็นต้น

- สีที่ละลายน้ำ สารต้านออกซิเดชัน เช่น sodium metabisulfite เป็นต้น

- สารออกฤทธิ์ที่ละลายน้ำได้ เช่น cetylpyridinium chloride และ benzalkonium chloride เป็นต้น

2. วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ได้แก่น้ำมันต่างๆเช่น olive oil, mineral oil และ castor oil นอกจากน้ำมันแล้วยังมีสารอื่นๆที่อยู่ในวัฏภาคน้ำมัน ได้แก่

- ไขมัน เช่น stearyl alcohol, stearic acid, cetyl alcohol และ lanolin เป็นต้น

- ไขมันแข็ง เช่น beeswax, paraffin wax และ canauba wax เป็นต้น

- สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารกันหืน เช่น BHT และ BHA เป็นต้น

- สารลดแรงตึงผิว เช่น Span® และ Eumulgin®C 1000 เป็นต้น

- สารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น ฮอร์โมนและวิตามิน เป็นต้น

3. ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) มีหน้าที่ผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ สารที่สามารถเป็นตัวทำอิมัลชัน ได้แก่

- สารลดแรงตึงผิวเช่น Tween®, Span® และ sodium lauryl fulfate เป็นต้น

- คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น acacia และ gelatin เป็นต้น

- ของแข็งอนุภาคละเอียด เช่น bentonite และ colloidal magnesium aluminium silicate เป็นต้น

การทำให้เกิดอิมัลชัน

การเกิดอิมัลชันได้ต้องอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็กๆ โดยอาศัยการให้พลังงาน ซึ่งอาจใช้ในรูปของความร้อน (heat) การคนหรือเขย่า (mechanical agitation) การสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (untrasonic vibration) หรือไฟฟ้า (electricity) เป็นต้น

2. การทำให้หยดเล็กๆ ที่กระจายตัวอยู่นั้นคงสภาพอยู่ได้ซึ่งอาศัยตัวทำอิมัลชันดังกล่าว

กลไกการทำงานของตัวทำอิมัลชัน

1. ลดแรงตึงระหว่างผิวของของเหลวทั้งสอง เป็นการลดพลังงานอิสระที่พื้นผิวด้วย ทำให้โอกาสที่หยดวัฏภาคซึ่งกระจายตัวอยู่นั้นรวมตัวกันได้น้อยลง เป็นการเพิ่มความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์

2. เกิดฟิล์มที่แข็งแรงและยืดหยุ่นโดยรอบหยดวัฏภาคภายใน ความแข็งแรงและลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลของฟิล์มนี้แตกต่างกันออกไป แล้วแต่ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันที่ใช้ ฟิล์มอาจเรียงตัวเป็นโมเลกุลเดี่ยว (monomolecular film) โดยหันด้านมีประจุเข้าหาวัฏภาคน้ำ ด้านไม่มีประจุจะหันเข้าหาวัฏภาคน้ำมัน ฟิล์มชนิดนี้มักเกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำอิมัลชันหรือมีการเรียงตัวซ้อนกันเป็นโมเลกุล (multimolecular film) ซึ่งเกิดจากการใช้คอลลอยด์ที่ชอบน้ำเป็นตัวทำอิมัลชัน หรือมีการเรียงตัวของอนุภาคเล็กละเอียดของของแข็ง (solid particle film) ซึ่งเกิดจากการใช้ของแข็งเล็กละเอียดบางชนิดซึ่งดูดซับหน้าประจันของวัฏภาคทั้งสองได้

ชนิดของสารก่ออิมัลชัน

1. สารก่ออิมัลชันจากธรรมชาติ ส่วนมากใช้ในการเตรียมยาสำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย มีข้อเสียคือมีความผันแปรในส่วนประกอบในแต่ละครั้งที่ผลิต และเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี

1.1 สารก่ออิมัลชันจากพืช

1.1.1คาร์โบไฮเดรตหรือ polysaccharides เช่น acacia, tragacanth, agar, pectin, และ sodium alginate เป็นต้น

1.1.2 กลุ่มอนุพันธ์ cellulose เช่น methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose และ ethylcellulose เป็นต้น

1.2.สารก่ออิมัลชันจากสัตว์ เช่น gelatin, egg yolk, wool fat, wool alcohol และ bile salts เป็นต้น

2. Finely divided solid เป็นของแข็งที่เป็นผงละเอียดขนาดเล็กมาก ซึ่งสามารถเรียงตัวเป็นฟิล์มที่แข็งแรงรอบหยดวัฏภาคภายในช่วยป้องกันการรวมตัวของหยด ได้แก่ bentonite, veegum และ colloidal silicon dioxide

3. สารก่ออิมัลชันสังเคราะห์ เป็นสารก่ออิมัลชันที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ ข้อดีคือ มีคุณสมบัติแน่นอนสม่ำเสมอ ไม่เป็นแหล่งเกิดของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดอิมัลชันคงตัวโดยเกิดฟิล์มหุ้มรอบหยด วัฏภาคภายใน และช่วยลดแรงตึงผิว สำหรับสารก่ออิมัลชันที่มีประจุจะเกิด electrical double layer ช่วยเพิ่มความคงตัวได้มากขึ้นอีก

3.1 สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ ในสารละลายที่เป็นน้ำสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้สามารถแตกตัวให้ประจุลบซึ่งทำให้เกิดอิมัลชันได้ ราคาถูก แต่ข้อเสียคือ ไวต่อ pH และอิเล็กโทรไลต์ ความไม่สามารถเข้ากันได้กับสารประจุบวกและกรด ระคายเคือง เช่น soaps, sulfated compound และ sulfonated compound ให้ผลดีที่ pH มากกว่า 7

3.2 สารลดแรงตึงผิวประจุบวก สารกลุ่มนี้สามารถแตกตัวให้ประจุบวกในสาระละลายที่เป็นน้ำ ได้แก่ cetrimide และ quaternary ammonium salt ไม่สามารถเข้ากันได้กับสารประจุลบ ให้ผลดีที่pHต่ำกว่า 7 อาจจะระคายเคืองและเป็นพิษต่อตาและผิวหนัง

3.3 สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุมีทั้งชนิดละลายในน้ำมันซึ่งทำให้เกิด w/o และชนิดที่ละลายน้ำซึ่งทำให้เกิด o/w ข้อดีคือ สามารถเข้ากับยาได้หลายชนิด ทนต่อ pH กว้าง ได้ผลดีที่ pH 4-8 ทนต่อแคลเซียม กรด และอิเล็กโทรไลต์มากกว่าชนิดอื่น ระคายเคืองน้อย ใช้

กับแผลเปิดได้ มีความเป็นพิษต่ำ ใช้ได้ทั้งยารับประทาน ยาฉีด และยาทาภายนอก ประกอบด้วยส่วนหัวที่ละลายน้ำ และส่วนหางที่ละลายน้ำมันซึ่งเป็นสายไฮโดรคาร์บอนความยาว 12-18 สามารถปรับสัดส่วนของกลุ่มที่ชอบน้ำ และกลุ่มชอบน้ำมันเพื่อให้ได้สารก่ออิมัลชันที่มีคุณสมบัติต่างๆปรับความข้นเหลวของอิมัลชันได้

3.3.1. Sorbitan fatty acid esters (Span®, Montane®, Arlacel®) ได้จากการทำระหว่างกรดไขมันและ sorbitol เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำมัน ทำให้เกิดอิมัลชันชนิด w/o ใช้ร่วมกับสารก่ออิมัลชันที่ละลายในน้ำ เช่น polysorbate เพื่อให้เกิดฟิล์มเชิงซ้อนที่แข็งแรงรอบหยดวัฏภาคภายใน

ตารางที่ 10 แสดงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม sorbitan fatty acid ester

ชื่อทางเคมี	ชื่อทางการค้า	HLB	สถานะ
Sorbitan monolaurate	Span®20	8.6	ของเหลว
Sorbitan monopalmitate	Span®40	6.7	ของแข็ง
Sorbitan monostearate	Span®60	4.7	ของแข็ง
Sorbitan monooleate	Span®80	4.3	ของเหลว

3.3.2. Polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Polysorbate, Tween®, Montanox®) โครงสร้างประกอบด้วย sorbitan fatty acid ester และกลุ่ม oxyethylene ซึ่งเป็นกลุ่มที่ชอบน้ำ เป็นสารก่ออิมัลชันที่ละลายในน้ำได้ ทำให้เกิดอิมัลชันชนิด o/w และช่วยเพิ่มการดูดซึมของตัวยาที่ละลายในน้ำมัน นิยมใช้ร่วมกับ Span® เพื่อให้เกิดฟิล์มที่แข็งแรง อาจใช้ Tween® ร่วมกับสารที่ละลายน้ำมันที่ไม่มีประจุ เช่น glyceryl monostearate (GMS), cetyl และ stearyl alcohol เพื่อเพิ่มความข้นหนืดของตำรับที่ทำให้อิมัลชันคงตัวมากขึ้น

ตารางที่ 11 แสดงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters

ชื่อทางเคมี	ชื่อทางการค้า	HLB	สถานะ
Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Tween®20	16.7	ของเหลว
Polyoxyethylenesorbitan monopalmitate	Tween®40	15.6	ของหลว
Polyoxyethylenesorbitan monostearate	Tween®60	14.9	ของเหลว
Polyoxyethylenesorbitan monooleate	Tween®80	15.0	ของเหลว

3.3.3 Fatty acid polyoxyethylene esters (polyoxyl esters, macrogol esters) ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและ ethylene oxide ได้แก่ polyoxyethylene 40 stearate (Myrj®52, PEG-40 stearate) เป็นสารก่ออิมัลชันชนิด o/w ใช้ร่วมกับ stearyl alcohol ได้อิมัลชันสวยงาม แต่ระคายเคืองง่าย ส่วนมากนำไปใช้เป็นยาพื้นของยาเหน็บ สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารกันเสีย ทำให้ฤทธิ์ของสารกันเสียลดลงได้

ตารางที่ 12 แสดงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม fatty acid polyoxyethylene esters

ชื่อทางเคมี	ชื่อทางการค้า	HLB	สถานะ
Polyoxyethylene (8) stearate	Myrj®45	11.1	ของแข็ง
Polyoxyethylene (20) stearate	Myrj®49	15	ของแข็ง
Polyoxyethylene (40) stearate	Myrj®52	16.9	ของแข็ง
Polyoxyethylene (50) stearate	Myrj®53	17.9	ของแข็ง
Polyoxyethylene (100) stearate	Myrj®59	18.8	ของแข็ง

3.3.4 Fatty alcohol polyoxyethylene ethers ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง fatty alcoholและethylene oxide สารกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ ได้แก่ cetomacrogol 1000 (macrogol cetotearyl ether 22, polyethylene glycol monocetyl ether) ทำให้เกิดอิมัลชันชนิด o/w ควรใช้ร่วมกับสารก่ออิมัลชันที่ชอบน้ำมัน ทนต่อ pH ช่วงกว้าง ไม่ทนต่ออิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้นสูง ควรใช้สารที่มี HLB ต่ำ ผสมกับสารที่มี HLB สูงในกลุ่มเดียวกัน โดยไม่ต้องคิดค่า HLB ของตำรับ

นิยมใช้ Brij®72 (steareth-2) 3-9% ซึ่งทำให้เกิดอิมัลชัน o/w ที่ pH 3 ร่วมกับ Brij®721 (steareth-21) 2-6% เพื่อเพิ่มเนื้อและเพิ่มความข้นของตำรับ ไม่ระคายเคือง ทำให้ผิวหนังอ่อนนุ่ม

ตารางที่ 13 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม polyoxyethylene ethers

ชื่อทางเคมี	ชื่อทางการค้า	HLB	สถานะ
Polyoxyethylene (4) lauryl ether	Brij®30	9.7	ของเหลว
Polyoxyethylene (2) stearyl ether	Brij®72	4.9	ของแข็ง
Polyoxyethylene (2) oleyl ether	Brij®93	4.9	ของเหลว
Polyoxyethylene (20) oleyl ether	Brij®98	15.3	ของแข็ง
Polyoxyethylene (21) stearyl ether	Brij® 721	15.5	ของแข็ง

3.3.5. Glycol และ glycerol ether

3.3.5.1 Glycol monostearate (GMS) GMS NF เป็นสารที่ชอบน้ำมัน กระจายตัวได้ในน้ำร้อนที่มีสบู่ หรือสารลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดอิมัลชัน w/o ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน โดยเพิ่มความข้นของตำรับ นิยมใช้กับ monovalent soap หรือ amine soap ได้แก่

- GMS SE (Glycol monostearate self-emulsifying) ได้จาก GMS ผสม sodium lauryl sulfate หรือ sodium/ potassium stearate จำนวนเล็กน้อย ทำให้เกิด อิมัลชัน o/w เข้ากันไม่ได้กับกรดด่างและอิเล็กโทรไลต์

- GMS acid-emulsifying ได้จากการทำเอสเตอร์กับสารก่ออิมัลชันเสริมไม่ถูกทำลายโดยกรดหรืออิเล็กโทรไลต์

3.3.5.2 Glycol stearate ได้จากการทำปฏิกริยาระหว่าง ethylene glycol และ stearic acid ได้สารที่ชอบน้ำมัน

3.3.5.3 Glycol stearate SE ได้จาก glycol stearate ผสมกับ sodium/potassium stearate

3.3.6 Poloxamer เป็น block copolymers ประกอบด้วย polyoxyethylene ซึ่งละลายน้ำ และpolyoxypropylene ซึ่งละลายในอีกวัฏภาคหนึ่ง ทำให้เกิดอิมัลชันชนิด o/w ได้แก่ Pluronic®F-68 (Poloxamer-188) ใช้ใน intravenous fat emulsion

3.3.7. Arlatone® (ICI) เป็นสารก่ออิมัลชันกึ่งสังเคราะห์ ได้จาก sorbitan stearate ผสมกับ sucrose cocoate ข้อดีคือไม่มี ethylene oxide สามารถสลายตัวได้ในร่างกาย ทำให้เกิดอิมัลชันชนิด o/w มีค่า HLB 6

3.4 สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ จะแสดงประจุใดขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย ไม่ระคายเคือง ได้แก่ lecithin ซึ่งใช้ในอิมัลชันสำหรับให้ทางหลอดเลือดดำ

ระบบ HLB

มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดกลุ่มสาร โดยค่า HLB ของสารแต่ละชนิดแสดงถึงความมีขั้วของสารและสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบน้ำมัน มีค่าระหว่าง 1-40 โดยสารที่มีค่า HLB มากกว่า 10 จะมีคุณสมบัติชอบน้ำ แต่หากค่า HLB ต่ำกว่า 10 จะชอบน้ำมัน นอกจากนี้ยังมีการกำหนดค่า required HLB ให้กับน้ำมันหรือสารที่คล้ายน้ำมันด้วย

ประโยชน์ของระบบ HLB มีดังนี้

1. เพื่อคำนวณหาค่า required HLB ทั้งหมดของตำรับ โดยคำนวณเฉพาะสารที่ชอบน้ำมันทั้งหมดในตำรับ

2. ใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของสารก่ออิมัลชัน หรือสารก่ออิมัลชันผสม โดยเลือกให้มีค่า HLB ใกล้เคียงกับ required HLB ในตำรับ เพื่อให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดของอนุภาคเล็กที่สุดและคงตัวที่สุด

3. ใช้คำนวณหาปริมาณสารก่ออิมัลชัน 2 ชนิดที่ใช้ร่วมกันในสัดส่วนที่ทำให้ได้ค่า HLB ที่ต้องการ โดยใช้ร้อยละ 2 - 10 ของตำรับ

4. ใช้ได้ดีกับสารก่ออิมัลชันชนิดไม่มีประจุ

ตัวอย่างการคำนวณค่า required HLB ทั้งหมดของระบบ

Rx	Mineral oil	35%
	Lanolin	1%
	Cetyl alcohol	1%
	Emulsifier	7%
	Purified water	56%
	M.ft. o/w emulsion 100 ml	

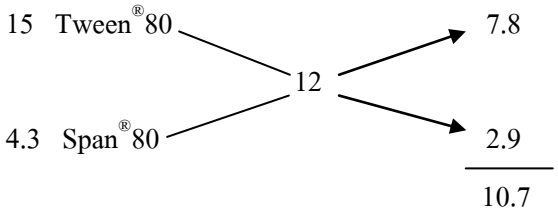
ส่วนประกอบน้ำมันในตำรับ 35%+1%+1% = 37%

Mineral oil	35/37	= 94.6%	= 0.946 ส่วน
Lanolin	1/37	= 2.7%	= 0.027 ส่วน
Cetyl alcohol	1/37	= 2.7%	= 0.027 ส่วน

Required HLB = 0.946x12 + 0.027x10 + 0.027x15 =12.1

ดังนั้นการเตรียมอิมัลชันชนิด o/w ให้มีความคงตัว ควรเลือกสารก่ออิมัลชันที่มีค่า HLB = 12.1

จากค่า HLB = 12.1 เลือกคู่สารก่ออิมัลชัน Tween®80 (HLB=15) และ Span®80 (HLB=4.3) สามารถคำนวณหาปริมาณสารก่ออิมัลชันโดยวิธี Alligation



อัตราส่วน Tween®80:Span®80 = 7.8:2.9

ต้องใช้ Tween®80 = 7.8/10.7*7 = 5.1 g

ต้องใช้ Span®80 = 2.9/10.7*7 = 1.9 g

ต้องใช้ Tween®80 จำนวน 5.1 g ผสมกับ Span®80 จำนวน 1.9 g เพื่อให้ได้ HLB ของระบบ = 12.1

วิธีการเตรียมอิมัลชัน

มีจุดประสงค์เพื่อให้ของเหลวที่ไม่เข้ากันสามารถผสมเป็นเนื้อเดียวได้อย่างสม่ำเสมอ โดยการใช้พลังงานจากภายนอกทำให้วัฏภาคภายในแตกออกเป็นหยดเล็กๆ โดยอาจให้พลังงานความร้อน การเขย่า การคน การใช้คลื่นเหนือเสียง หรือพลังงานไฟฟ้าเป็นต้น ทั้งนี้ระยะเวลาในการให้พลังงานยังมีผลต่อความคงตัวของอิมัลชันด้วย อิมัลชันที่คงตัวดีควรมีขนาดหยดวัฏภาคภายในระหว่าง 0.5 - 2.5 ไมครอน

วิธีการเตรียมอิมัลชันในห้องปฏิบัติการ

วิธีการเตรียมอิมัลชันในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี การเลือกใช้ขึ้นกับชนิดและคุณสมบัติของส่วนประกอบในตำรับ และเครื่องมือที่ใช้ มีดังนี้

1. Dry gum method (Continental method, 4:2:1 method)

2. Wet gum method (English method)

3. Bottle method (Forbes bottle method)

4. Beaker method

5. Auxiliary method

วิธีการเตรียมอิมัลชันโดย Beaker method

1. แยกส่วนประกอบในตำรับเป็นวัฏภาคน้ำ และวัฏภาคน้ำมัน

2. กรณีวัฏภาคน้ำมันมีสารที่เป็นของแข็งหรือกึ่งแข็ง ให้หลอมวัฏภาคน้ำมันโดยใช้หม้อไอน้ำจนอุณหภูมิมากกว่าจุดหลอมเหลวที่มีค่ามากที่สุด 5-10 องศาเซลเซียส

3. อุ่นวัฏภาคน้ำให้มีอุณหภูมิมากกว่าวัฏภาคน้ำมัน 3-5 องศาเซลเซียส

4. ค่อยๆเติมวัฏภาคภายในลงวัฏภาคภายนอกเป็นสายคนตลอดเวลา จนเกิดอิมัลชัน และอุณหภูมิลดลง ลักษณะขุ่นขาวทึบและข้นหนืดมากขึ้น (congeal)

ความคงตัวของอิมัลชัน

1. ความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ ขนาดและการกระจายขนาดของหยดวัฏภาคภายใน สี กลิ่น ความข้นหนืด การเกิด creaming, flocculation, coalescence และ cracking

2. ความคงตัวทางเคมี

3. ความคงตัวต่อเชื้อจุลินทรีย์

4. ความไม่คงตัวที่เกี่ยวข้องกับภาชนะบรรจุหรือฝาปิด

วิธีการประเมินความคงตัวของอิมัลชัน

วิธีการประเมินความคงตัวของอิมัลชันทำโดยใช้ภาชนะบรรจุหลายๆชนิดที่มีขนาดต่างๆ และทดสอบโดยใช้สภาวะใดสภาวะหนึ่ง จากนั้นประเมินความคงตัวโดยสังเกตลักษณะทางกายภาพ และการวิเคราะห์ตัวยาทางเคมี

1. ตั้งอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12-24 เดือน

2. ตั้งอิมัลชันไว้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ และสภาวะที่มีแสงในภาชนะบรรจุปิดสนิทรวมทั้งในภาชนะบรรจุ ที่เปิดฝาไว้ด้วยเป็นเวลา 12-24 เดือน

3. ตั้งอิมัลชันไว้ที่สภาวะเร่ง

การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อความคงตัวทางกายภาพ

- 45 องศาเซลเซียส 1 เดือน หรือ 4 องศาเซลเซียส 1 เดือน หรือ 37 องศาเซลเซียส 6 เดือน

- Freeze thaw cycle (Heat cool cycle) ตู้เย็น (5 องศาเซลเซียส) และ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 48 ชั่วโมง 6-8 รอบ หรือ -20 องศาเซลเซียสและ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 24 ชั่วโมง 2-3 รอบ

Agitation เขย่าในขวด 60 รอบ/นาที 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 45 องศาเซลเซียส สำหรับประเมินสภาวะการขนส่ง

Centrifugation เครื่องปั่นด้วยแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง 2000-3000 จี (g) ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที สำหรับประเมินการเกิดการแยกชั้น เป็นครีมที่เวลา 1 ปี

บทที่ 3

วัสดุสารเคมีและวิธีการทดลอง

วัตถุดิบ

น้ำผึ้งดอกลำไย (วันหมดอายุ 17/04/15) น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ (วันหมดอายุ 17/03/15) และน้ำผึ้งดอกงา (วันหมดอายุ 09/01/15) น้ำผึ้งแท้ไม่ใส่สารกันเสีย จากฟาร์มผึ้งเทพภักดี จังหวัดลพบุรี และน้ำผึ้งสวนจิตรลดา (วันหมดอายุ 25/05/13) จากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. Mueller-Hinton agar , Lot No. 8043169 Becton Dickinson, USA
2. Mueller-Hinton broth, Lot No. 4322433 Becton Dickinson, USA
3. Sodium chloride, Lot No. K32104204 324 Merck, Germany
4. Stearic acid
5. Mineral oil
6. Spermaceti
7. Cyclomethicone (CM)
8. Propylene glycol (PG)
9. Distilled water
10. Paraben concentrate
11. Sorbitan monostearate (Span®60)
12. Polyoxyethylenesorbitan monostearate (Tween®60)
13. Sorbitan monooleate (Span®80)
14. Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween®80)
15. Polyoxyethylene (2) stearyl ether (Brij®72)

16. Polyoxyethylene (21) stearyl ether (Brij® 721)
17. Glyceryl monostearate_self-emulsifying (GMS SE)

อุปกรณ์

1.	Autoclave, Model HA-3D	Hirayama Mfg. Corp., Japan
2.	Hot air oven (Drying cabinet), Type T 5090 E	Heraeus
3.	Incubator	Memmert, Germany
4.	Microscope	Olympus, Japan
5.	Spectrophotometer, Spectro 22RS	LaboMed, Inc., USA
6.	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., USA
7.	Water bath, Model 1092	GFL, Germany
8.	Homogenizer U, 14-06-94/35-1	Ystral
9.	HAAKE RotoVisco® 1	LMS Instruments Co. Ltd.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิดโดยใช้วิธี Agar diffusion method และเลือกน้ำผึ้งจากดอกไม้ชนิดที่ให้โซนใส (inhibition zone) สูงที่สุดทำการทดสอบหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยใช้วิธี Broth dilution method

1.1 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิดโดยใช้วิธี Agar diffusion method (Lorian, 2005)

1.1.1 การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีในการดำเนินการวิจัย

เตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Mueller-Hinton agar) แบบเอียง (slant) แล้วนำเข้า incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยละลาย Mueller-Hinton agar ชนิดผงสำเร็จรูปในน้ำกรอง เตรียมน้ำเกลือ 0.9% (Normal Saline Solution, NSS) โดยละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกรอง แล้วนำทั้งหมดไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 lb/inch^{2} เวลา 15 นาที สำหรับเครื่องแก้วอื่นๆ เช่น petri dish, pipette และ cylinder cup นำไปอบฆ่าเชื้อใน hot air oven อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลา 120 นาที

1.1.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิด

เตรียม suspension ของเชื้อในข้อ 1.1.1 ในน้ำเกลือ นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm วัดค่า Optical Density (OD) ให้ได้ 0.132 ซึ่งจะมีความขุ่นเทียบได้กับ McFarland turbidity standard No. 0.5 ที่จะมีเชื้ออยู่ประมาณ 1.0-2.0 x 10^{8} CFU/ml (NCCLS, 2003)

เท plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar 20 ml ทิ้งไว้ให้เย็นลง ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงใน suspension เชื้อข้างต้นทาถูลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวแล้วให้ทั่ว วาง cylinder cup ลงไป นำน้ำผึ้งชนิดต่างๆมาหยอดแต่ละ cylinder cup จนเต็ม ดังนี้ 1. น้ำผึ้งดอกลำไย 2. น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ 3. น้ำผึ้งดอกงา 4. น้ำผึ้งสวนจิตรลดา และมีน้ำกลั่นเป็น negative control และ disc ยา Penicillin G 10 units เป็น positive control ทำทั้งหมด 5 ซ้ำ ตั้งที่อุณหภูมิ ห้อง 30 นาที ก่อนนำไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.1.3 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิด

ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยใช้มาตรวัด vernier caliper นำข้อมูลทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA และเลือกน้ำผึ้งชนิดที่มีขนาดโซนใสสูงซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบที่ดีมาทำการทดสอบหา MIC ต่อไป

1.2 การหาค่า MIC ของน้ำผึ้งต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้วิธี Broth dilution method (Lorian, 2005)

1.2.1 การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีในการดำเนินการวิจัย

เตรียมเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth, น้ำเกลือ 0.9% และเครื่องแก้วโดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1.1

1.2.2 การหา MIC ของน้ำผึ้งต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เตรียม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^8 CFU/ml และนำไปเจือจางต่อในน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:10 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^7 CFU/ml

เจือจางน้ำผึ้งชนิดที่เลือกมาจากข้อ 1.1.3 ใน Mueller-Hinton broth ให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 g/ml ตามลำดับ โดยเตรียมความเข้มข้นละ 20 ml ปั่นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เติม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เตรียมไว้ข้างต้น 100 µl โดยใช้ micropipette ปั่นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และมีหลอดทดลองอีกชุดหนึ่งที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อเพื่อใช้เป็น positive control และหลอดทดลองที่มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียวใช้เป็น negative control จากนั้นนำทั้งหมดไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2.3 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละความเข้มข้น

ประเมินค่าความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ (MIC) จากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น เมื่อทราบ MIC เบื้องต้นแล้วจะมีการทำการทดลองซ้ำโดยทดลองในช่วงความเข้มข้นที่แคบลงเพื่อให้ได้ค่า MIC ที่ใกล้เคียงค่าจริงมากที่สุด และเลือกน้ำผึ้งที่มีค่า MIC น้อยที่สุดมาใช้ในการเตรียมครีมน้ำผึ้ง

2. การศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง

ศึกษาผลกระทบของความร้อนที่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้ง โดยการนำน้ำผึ้งที่มีค่า MIC น้อยที่สุดมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิที่นิยมใช้ในการเตรียมครีมแบบ Beaker method และนำมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโดยใช้วิธี Agar diffusion method และวิธี Broth dilution method เช่นเดียวกับข้อ 1

2.1 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน โดยใช้วิธี Agar diffusion method

2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีในการดำเนินการวิจัย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1 และเตรียมน้ำผึ้งโดยนำน้ำผึ้งมาผ่านความร้อนโดยใช้ water bath ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.1.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน

เตรียม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^8 CFU/ml

เท plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ทิ้งไว้ให้เย็นลง ใช้ไม้พันสำลีจุ่ม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่เตรียมไว้ทาถูลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวแล้วให้ทั่ว วาง cylinder cup ลงไป นำน้ำผึ้งที่มีค่า MIC น้อยที่สุดที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และไม่ผ่านความร้อนมาหยอดใน cylinder cup จนเต็ม ดังนี้ 1. น้ำผึ้งที่ผ่านความร้อน 2. น้ำผึ้งที่ไม่ผ่านความร้อน และ 3. น้ำเป็น negative control ทำซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง และทำเช่นเดียวกันนี้แต่เปลี่ยนไปใช้น้ำผึ้งที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.1.3 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง

ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส โดยใช้มาตรวัด vernier caliper นำข้อมูลทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Pair samples t-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโซนใสระหว่างน้ำผึ้งก่อนและหลังการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาค่า MIC ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนโดยใช้วิธี Broth dilution method

2.2.1 การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีในการดำเนินการวิจัย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.2.2 การศึกษา MIC ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน

เตรียม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^8 CFU/ml และนำไปเจือจางต่อในน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:10 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^7 CFU/ml

เจือจางน้ำผึ้งที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส ใน Mueller-Hinton broth ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ MIC เติม suspension ของเชื้อลงไป 100 µl โดยใช้ micropipette ปั่นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แต่ละอุณหภูมิทำซ้ำ 5 ครั้ง และมีหลอดทดลองแยกที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อซึ่งใช้เป็น positive control และหลอดทดลองที่มีน้ำผึ้งความเข้มข้นเท่ากับ MIC แต่ไม่ได้เติมเชื้อใช้เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

2.2.3 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน

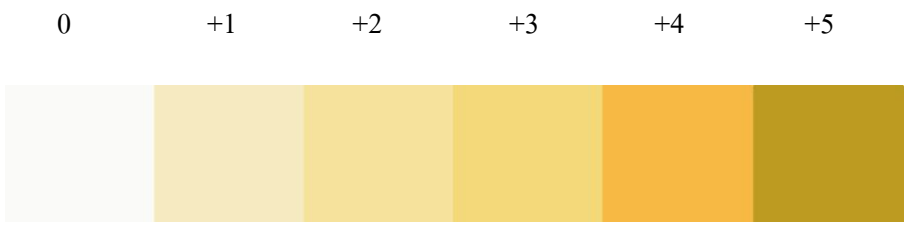
ดูผลความขุ่นของหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC ของน้ำผึ้งที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส

3. การตั้งสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

3.1 การพัฒนาสูตรตำรับยาพื้นครีม

3.1.1 เลือกสูตรตำรับยาพื้นครีมที่จะนำมาพัฒนา

ทำการพัฒนาสูตรตำรับครีมชนิด o/w ที่มีน้ำในสูตรตำรับปริมาณมาก เพื่อให้สามารถใส่น้ำผึ้งแทนที่น้ำได้และประเมินลักษณะทางกายภาพจากสี (ดังรูปที่ 13), กลิ่น, การแยกชั้น, เนื้อครีม และลักษณะสัมผัสจากความเหนอะหนะ, การกระจายตัว, การซึมผ่านผิว, การเกิดปื้นขาว แล้วนำมาหาชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสม



รูปที่ 13 แสดงแถบสีอ้างอิงที่ใช้ประเมินสีของครีมน้ำผึ้ง

3.1.2 การหาชนิดและปริมาณสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสม

นำยาพื้นครีมที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดีจากข้อ 3.1.1 มาเปลี่ยนชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชัน โดยใช้สารก่ออิมัลชันชนิดไม่มีประจุ 4 ระบบ คือ

Span®60 และ Tween®60 คำนวณสัดส่วนที่เหมาะสมจากค่า HLB

Span®80 และ Tween®80 คำนวณสัดส่วนที่เหมาะสมจากค่า HLB

Brij®72 และ Brij®721 ใช้สัดส่วน 1 ต่อ 1

Glyceryl monostearate self-emulsifying (GMS SE) ใช้ ปริมาณสารก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ ร้อยละ 3, 4 และ 5 ของสูตรตำรับ เตรียมครีมโดยวิธี beaker method ประเมินลักษณะทางกายภาพ และความคงตัวของยาพื้นครีมที่เตรียมได้

จากข้อ 3.1.1 สูตรตำรับที่เหมาะสมจะนำมาใช้พัฒนา มีส่วนประกอบ ได้แก่

วัฏภาคน้ำมันคือ stearic acid, mineral oil, spermaceti, cyclomethicone

วัฏภาคน้ำคือ propylene glycol, distilled water, paraben concentrate

3.1.3 การเตรียมครีม

1. แยกชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 14, 15 และ 16

2. หลอมวัฏภาคน้ำมันบนหม้ออังไอน้ำ โดยเรียงจากสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงไปต่ำ จนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ยกลงจากหม้ออังไอน้ำ คนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม cyclomethicone

3. อุ่นวัฏภาคน้ำทั้งหมดบนหม้ออังไอน้ำ จนมีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

4. เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำเป็นสายช้าๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาจนเย็น

5. บรรจุลงในขวดแก้วที่ปิดสนิท

6. ประเมินครีมก่อนทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

7. นำไปเก็บในสภาวะเร่ง

8. ประเมินครีมหลังทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

3.1.4 การประเมินยาพื้นครีม

3.1.4.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

นำยาพื้นครีมที่เตรียมได้มาพิจารณาสี กลิ่น การแยกชั้น ลักษณะเนื้อครีม ลักษณะสัมผัส โดยใช้ประสาทสัมผัสของผู้ประเมิน และความหนืดของครีม โดยใช้เครื่องวัดความหนืด

3.1.4.2 การประเมินความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

นำมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยวิธี heating cooling cycle โดยนำยาพื้นครีมที่เตรียมได้ใส่ขวดแก้วที่ปิดสนิท นำไปใส่ในตู้อบ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้อบ ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยกชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง จากนั้นนำไปใส่ตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้เย็น ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยกชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง นับเป็นหนึ่งรอบของการทดสอบ ทำการทดสอบซ้ำจนครบ 6 รอบ ตั้งครีมทิ้งไว้จนอุณหภูมิกลับสู่อุณหภูมิห้อง พิจารณาลักษณะทางกายภาพประกอบด้วย สี ,กลิ่น ,การแยกชั้น ,ลักษณะเนื้อครีม ,ลักษณะสัมผัส โดยใช้ประสาทสัมผัสของผู้ประเมิน และความหนืดที่วัดด้วยเครื่องวัดความหนืด

ตารางที่ 14 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันร้อยละ 3 ของตำรับ

สูตรตำรับที่	วัฏภาคน้ำมัน (g)					วัฏภาคน้ำ (g)			
	Stearic acid	**Mineral oil**	**Spermaceti**	**CM**	**สารก่ออิมัลชัน**	**สารก่ออิมัลชัน**	**PG**	**Paraben concentrate**	**Distilled water**
1 (ST60)	10	7	5	5	Span®60 1.01	Tween®60 1.99	5	1	64
2 (ST80)	10	7	5	5	Span®80 1.01	Tween®80 1.99	5	1	64
3 (GMSSE)	10	7	5	5	GMSSE 3	-	5	1	64
4 (BB)	10	7	5	5	Brij®72 1.5	Brij®721 1.5	5	1	64

ตารางที่ 15 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันร้อยละ 4 ของตำรับ

สูตรตำรับที่	วัฏภาคน้ำมัน (g)					วัฏภาคน้ำ (g)			
	Stearic acid	**Mineral oil**	**Spermaceti**	**CM**	**สารก่ออิมัลชัน**	**สารก่ออิมัลชัน**	**PG**	**Paraben concentrate**	**Distilled water**
5 (ST60)	10	7	5	5	Span®60 1.33	Tween®60 2.66	5	1	63
6 (ST80)	10	7	5	5	Span®80 1.33	Tween®80 2.66	5	1	63
7 (GMSSE)	10	7	5	5	GMSSE 4	-	5	1	63
8 (BB)	10	7	5	5	Brij®72 2	Brij®721 2	5	1	63

ตารางที่ 16 แสดงสูตรตำรับของยาพื้นครีมที่มีปริมาณสารก่ออิมัลชันร้อยละ 5 ของตำรับ

สูตรตำรับที่	วัฏภาคน้ำมัน (g)					วัฏภาคน้ำ (g)			
	Stearic acid	**Mineral oil**	**Spermaceti**	**CM**	**สารก่ออิมัลชัน**	**สารก่ออิมัลชัน**	**PG**	**Paraben concentrate**	**Distilled water**
9 (ST60)	10	7	5	5	Span® 60 1.68	Tween® 60 3.32	5	1	62
10 (ST80)	10	7	5	5	Span® 80 1.63	Tween® 80 3.37	5	1	62
11 (GMS)	10	7	5	5	GMS SE 5	-	5	1	62
12 (BB)	10	7	5	5	Brij® 72 2.5	Brij® 721 2.5	5	1	62

หมายเหตุ ST60 หมายถึง ใช้ Span®60 และ Tween®60 , ST80 หมายถึง ใช้ Span®80 และ Tween®80, GMSSE หมายถึง ใช้ Glyceryl monostearate self emulsifying, BB หมายถึง ใช้ Brij®72 และ Brij®721

3.2 การพัฒนาสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

3.2.1 การเตรียมครีมน้ำผึ้ง

เลือกสูตรตำรับยาพื้นครีมที่มีลักษณะทางกายภาพ, ความคงตัวทางกายภาพ และลักษณะสัมผัสที่เหมาะสม นำมาพัฒนาโดยใส่น้ำผึ้งจากดอกงา ซึ่งเป็นสารสำคัญปริมาณ 2 เท่าของค่า MIC ลงไปในสูตรตำรับ และเตรียมโดยวิธี beaker method โดยแบ่งการผสมน้ำผึ้งเข้ากับยาพื้นครีมออกเป็น 3 วิธี คือ

3.2.1.1 การเตรียมครีมโดยวิธีไม่ใช้ความร้อน

1. แยกชั่งสารเป็นวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำ (ยกเว้นน้ำผึ้ง) ดังตารางที่ 17

2. หลอมวัฏภาคน้ำมันบนหม้ออังไอน้ำ โดยเรียงจากสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงไปต่ำ จนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ยกลงจากหม้ออังไอน้ำ คนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม cyclomethicone

3. อุ่นวัฏภาคน้ำทั้งหมดบนหม้ออังไอน้ำ จนมีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

4. เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำเป็นสายช้าๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาจนเป็นอิมัลชัน เติมน้ำผึ้งที่ชั่งไว้ แล้วนำไปปั่นด้วย homogenizer ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. บรรจุลงในขวดแก้วที่ปิดสนิท

6. ประเมินครีมก่อนและหลังทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

3.2.1.2 การเตรียมครีมโดยวิธีใช้ความร้อนบางส่วน

1. แยกชั่งสารเป็นวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำดังตารางที่ 17 โดยชั่งน้ำผึ้งเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ใช้ในสูตรตำรับรวมกับวัฏภาคน้ำ และส่วนที่เหลือชั่งแยกไว้

2. หลอมวัฏภาคน้ำมันบนหม้ออังไอน้ำ โดยเรียงจากสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงไปต่ำ จนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ยกลงจากหม้ออังไอน้ำ คนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม cyclomethicone

3. อุ่นวัฏภาคน้ำทั้งหมดบนหม้ออังไอน้ำ จนมีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

4. เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำเป็นสายช้าๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาจนเป็นอิมัลชัน เติมน้ำผึ้งที่เหลือ แล้วนำไปปั่นด้วย homogenizer ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. บรรจุลงในขวดแก้วที่ปิดสนิท

6. ประเมินครีมก่อนและหลังทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

3.2.1.3 การเตรียมครีมโดยวิธีใช้ความร้อน

1. แยกชั่งสารเป็นวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำดังตารางที่ 17 รวมทั้งน้ำผึ้งทั้งหมดในวัฏภาคน้ำ

2. หลอมวัฏภาคน้ำมันบนหม้ออังไอน้ำ โดยเรียงจากสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงไปต่ำ จนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ยกลงจากหม้ออังไอน้ำ คนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม cyclomethicone

3. อุ่นวัฏภาคน้ำทั้งหมดบนหม้ออังไอน้ำ จนมีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

4. เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำเป็นสายช้าๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาจนเป็นอิมัลชัน แล้วนำไปปั่นด้วย homogenizer ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. บรรจุลงในขวดแก้วที่ปิดสนิท

6. ประเมินครีมก่อนและหลังทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้สภาวะเร่ง

3.2.2 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของครีมน้ำผึ้ง

3.2.1.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

นำครีมน้ำผึ้งที่เตรียมได้มาพิจารณาสี กลิ่น การแยกชั้น ลักษณะเนื้อครีม ลักษณะสัมผัส และความหนืดของครีม โดยใช้เครื่องวัดความหนืด

3.2.1.2 การประเมินลักษณะทางกายภาพ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)

<u>การประเมินความคงตัวทางกายภาพโดยใช้ heating cooling cycle สภาวะที่ 1</u>

นำมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยวิธี heating cooling cycle โดยนำครีมน้ำผึ้งที่เตรียมได้ใส่ขวดแก้วที่ปิดสนิท นำไปใส่ในตู้อบ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้อบ จดบันทึกลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำไปใส่ตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้อบ ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยกชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง จากนั้นนำไปใส่ตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้เย็น ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยก

ชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง นับเป็นหนึ่งรอบของการทดสอบ ทำการทดสอบซ้ำจนครบ 6 รอบ ตั้งครีมทิ้งไว้จนอุณหภูมิกลับสู่อุณหภูมิห้อง พิจารณาลักษณะทางกายภาพประกอบด้วย สี ,กลิ่น ,การแยกชั้น ,ลักษณะเนื้อครีม ,ลักษณะสัมผัส โดยใช้ประสาทสัมผัสของผู้ประเมิน และความหนืดที่วัดด้วยเครื่องวัดความหนืด

<u>การประเมินความคงตัวทางกายภาพโดยใช้ heating cooling cycle สภาวะที่ 2</u>

นำมาทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยวิธี heating cooling cycle โดยนำครีมน้ำผึ้งที่เตรียมได้ใส่ขวดแก้วที่ปิดสนิท นำไปใส่ในตู้อบ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้อบ ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยกชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง จากนั้นนำไปใส่ตู้เย็นช่องธรรมดาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกจากตู้เย็น ประเมินการแยกชั้น ลักษณะของเนื้อครีม หากเกิดการแยกชั้นหรือเหลวไหลได้ ทำการคัดออกจากการทดลอง นับเป็นหนึ่งรอบของการทดสอบ ทำการทดสอบซ้ำจนครบ 6 รอบ ตั้งครีมทิ้งไว้จนอุณหภูมิกลับสู่อุณหภูมิห้อง พิจารณาลักษณะทางกายภาพประกอบด้วย สี ,กลิ่น ,การแยกชั้น ,ลักษณะเนื้อครีม ,ลักษณะสัมผัส โดยใช้ประสาทสัมผัสของผู้ประเมิน และความหนืดที่วัดด้วยเครื่องวัดความหนืด

ตารางที่ 17 แสดงสูตรตำรับของครีมน้ำผึ้งที่มีปริมาณน้ำผึ้งจากดอกงา 2 เท่าของค่า MIC

สูตรตำรับที่	วัฏภาคน้ำมัน (g)					วัฏภาคน้ำ (g)				
	Stearic acid	**Mineral oil**	**Spermaceti**	**CM**	**สารก่ออิมัลชัน**	**สารก่ออิมัลชัน**	**PG**	**Paraben concentrate**	**Distilled water**	**น้ำผึ้งดอกงา**
13 (ST80 4%)	10	7	5	5	Span®80 1.33	Tween®80 2.66	5	1	33	30
14 (GMSSE 3%)	10	7	5	5	GMS SE 3	-	5	1	34	30
15 (GMSSE 4%)	10	7	5	5	GMS SE 4	-	5	1	33	30
16 (GMSSE5%)	10	7	5	5	GMS SE 5	-	5	1	32	30
17 (ST80 4%)	10	7	5	5	Span®80 1.33	Tween®80 2.66	5	1	33	30
18 (GMSSE 3 %)	10	7	5	5	GMS SE 3	-	5	1	34	30
19 (GMSSE 4%)	10	7	5	5	GMS SE 4	-	5	1	33	30
20 (GMSSE 5%)	10	7	5	5	GMS SE 5	-	5	1	32	30
21 (ST80 4%)	10	7	5	5	Span®80 1.33	Tween®80 2.66	5	1	33	30
22 (GMSSE 3%)	10	7	5	5	GMS SE 3	-	5	1	34	30
23 (GMSSE 4%)	10	7	5	5	GMS SE 4	-	5	1	33	30
24 (GMSSE 5%)	10	7	5	5	GMS SE 5	-	5	1	32	30

หมายเหตุ ST80 หมายถึง ใช้ Span®80 และ Tween®80,

GMS SE หมายถึง ใช้ Glyceryl monostearate self emulsifying

4. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.3 กับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar diffusion method เช่นเดียวกับข้อ 1.1

4.1 การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีในการดำเนินการวิจัย

ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1

4.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิด

เตรียม suspension ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2 ได้เชื้อประมาณ 1.0-2.0 x 10^8 CFU/ml

เท plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ทิ้งไว้ให้เย็นลง ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงใน suspension ของเชื้อทาถูบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวแล้วให้ทั่ว วาง cylinder cup ลงไปบน plate และหยอด cylinder cup ดังนี้ 1. ครีมน้ำผึ้ง 2. ยาพื้นครีมเป็น negative control 3. น้ำผึ้งชนิดและความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมครีมน้ำผึ้ง 4. น้ำเป็น negative control 5. Gentamicin cream เป็น positive control โดยเจือจางน้ำผึ้งในน้ำ ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีก่อนนำไปบ่มใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.3 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของครีมน้ำผึ้ง

ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส โดยใช้มาตรวัด vernier caliper นำข้อมูลทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งแต่ละชนิด โดยใช้วิธี Agar diffusion method ขนาดโซนใสของน้ำผึ้งชนิดต่างๆแสดงในตารางที่ 18 พบว่าขนาดโซนใสเฉลี่ยของน้ำผึ้งสวนจิตรลดาเท่ากับ 13.94±2.88 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกลำไยเท่ากับ 13.70±1.54 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่เท่ากับ 10.17±0.74 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกงาเท่ากับ 12.81±1.87 มิลลิเมตร และน้ำกลั่นเท่ากับ 8.57±0.73 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 14 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA พบว่าค่า p-value น้อยกว่า 0.01 แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงนำไปเปรียบเทียบแบบรายคู่โดยใช้วิธี LSD พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสของน้ำผึ้งสวนจิตรลดา น้ำผึ้งดอกลำไย และน้ำผึ้งดอกงามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ negative control (น้ำกลั่น) ($p < 0.05$) แต่น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่มีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสไม่แตกต่างจากน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.162$) แสดงให้เห็นว่าน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ไม่แตกต่างจากน้ำกลั่น จึงตัดน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ออกไปจากการทดลองในขั้นต่อไป ส่วนน้ำผึ้งสวนจิตรลดาแม้ว่าจะมีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสแตกต่างจากน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงา สำหรับน้ำผึ้งสวนจิตรลดาจากฉลากไม่ได้ระบุถึงที่มาแต่ที่เลือกมาทำการทดลองเปรียบเทียบเนื่องจากเป็นน้ำผึ้งธรรมชาติในโครงการหลวงที่หาซื้อได้ตามท้องตลาดจึงอาจมีที่มาจากดอกไม้หลายชนิด ดังนั้นในการศึกษาทดลองนี้น้ำผึ้งที่ถูกเลือกใช้สำหรับการทดลองหาค่า MIC ในขั้นต่อไปคือ น้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาซึ่งได้ขนาดของโซนใสเฉลี่ยสูง สำหรับค่าเฉลี่ยขนาดโซนใสของ Penicillin G 10 units เท่ากับ 33.83±5.23 มิลลิเมตร เทียบกับมาตรฐาน (CLSI, 2007) แล้วจะอยู่ในเกณฑ์ที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีความไวต่อยา penicillin G ที่ใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้

ตารางที่ 18 แสดงขนาดโซนใสของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ

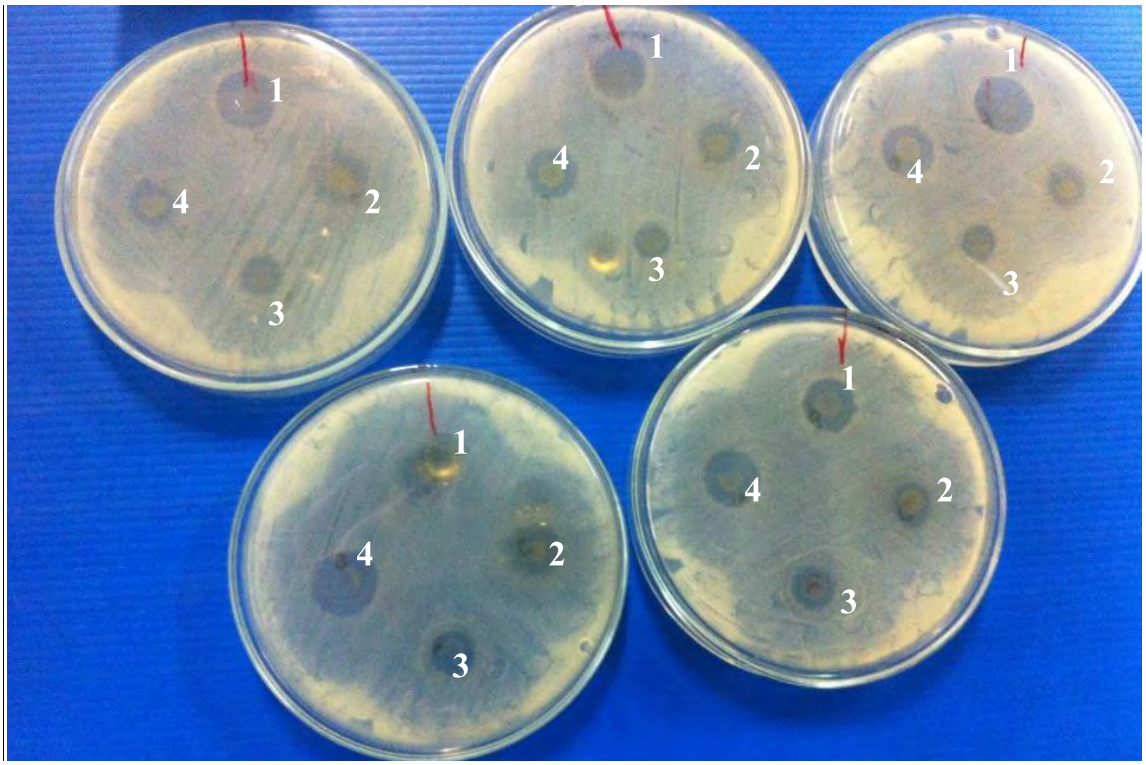
ชนิดน้ำผึ้ง	**ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)**					
	Plate ที่ 1	**Plate ที่ 2**	**Plate ที่ 3**	**Plate ที่ 4**	**Plate ที่ 5**	**ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**
น้ำผึ้งสวนจิตรลดา	15.30	17.80	13.30	13.30	10.00	13.94±2.88
น้ำผึ้งดอกลำไย	11.60	14.10	12.70	14.70	15.40	13.70±1.54
น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่	10.20	10.55	9.00	11.00	10.10	10.17±0.74
น้ำผึ้งดอกงา	14.40	13.90	11.80	10.00	13.95	12.81±1.87

หมายเหตุ: ขนาดโซนใสของน้ำกลั่นคือ 8.10, 8.50, 9.85, 8.30 และ 8.10 มิลลิเมตร

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 8.57±0.73 มิลลิเมตร

ขนาดโซนใสของ penicillin G 10 units คือ 29.20, 39.50 และ 32.80 มิลลิเมตร

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 33.83±5.23 มิลลิเมตร



รูปที่ 14 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ
(1 = น้ำผึ้งสวนจิตรลดา, 2 = น้ำผึ้งดอกงา, 3 = น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่, 4 = น้ำผึ้งดอกลำไย)

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ (MIC) โดยใช้น้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาที่คัดเลือกมาจากขั้นตอนแรกเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 g/ml ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ผลการประเมินความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังตารางที่ 19 พบว่า MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงามีค่าเท่ากันคือเท่ากับ 0.25 g/ml ซึ่งจากความเข้มข้นนี้ถ้านำไปพัฒนาต่อจะใช้น้ำผึ้งปริมาณมากในการตั้งสูตรตำรับครีมน้ำผึ้ง และค่า MIC ที่ได้มาจากการทดลองในช่วงความเข้มข้นค่อนข้างกว้าง จึงทำการทดลองซ้ำโดยกำหนดช่วงความเข้มข้นที่แคบลงเพื่อให้ได้ MIC ที่มีค่าใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.2, 0.15 และ 0.125 g/ml ตามลำดับ โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ผลการประเมินความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังตารางที่ 20 พบว่า MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไยเท่ากับ 0.2 g/ml และน้ำผึ้งดอกงาเท่ากับ 0.15 g/ml ดังรูปที่ 15 และ 16 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าน้ำผึ้งดอกงามี MIC ต่ำกว่าน้ำผึ้งดอกลำไย เมื่อนำไปใช้ในสูตรตำรับจะสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าเพื่อให้ได้

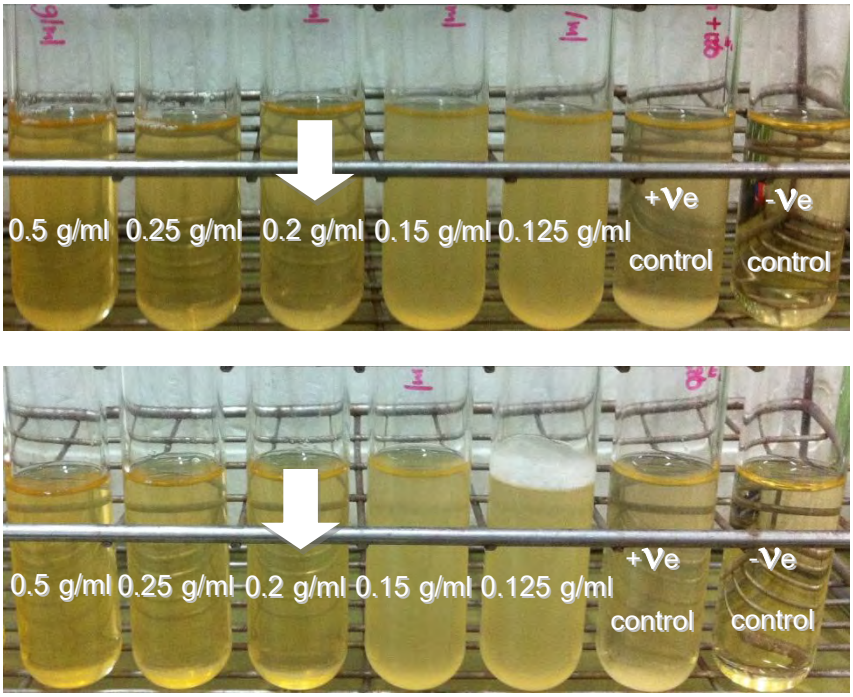
ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทัดเทียมกัน จึงเลือกน้ำผึ้งดอกงาเป็นสารสำคัญในตำรับครีมครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนัง

ตารางที่ 19 แสดงผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งชนิดและความเข้มข้น 0.03125-1 g/ml

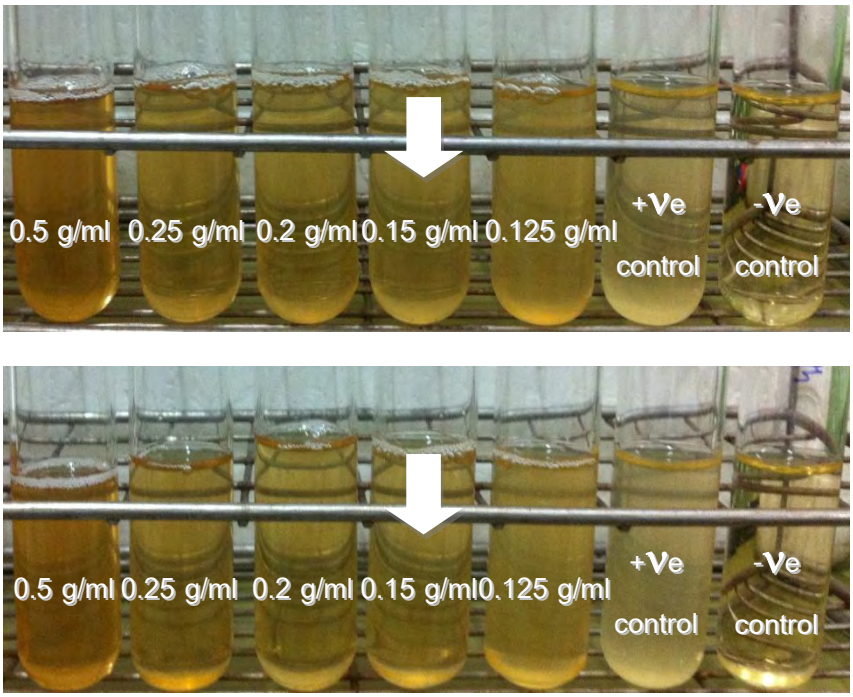
ครั้งที่	ชนิดน้ำผึ้ง	ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง (g/ml)					
		1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
1	น้ำผึ้งดอกลำไย	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
2	น้ำผึ้งดอกลำไย	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น

ตารางที่ 20 แสดงผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งชนิดและความเข้มข้นต่างๆ 0.125-0.5 g/ml

ครั้งที่	ชนิดน้ำผึ้ง	ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง (g/ml)				
		0.5	0.25	0.2	0.15	0.125
1	น้ำผึ้งดอกลำไย	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น
2	น้ำผึ้งดอกลำไย	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ขุ่น



รูปที่ 15 แสดงค่า MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไย (ครั้งที่ 1 MIC 0.2 g/ml, ครั้งที่ 2 MIC 0.2 g/ml)



รูปที่ 16 แสดงค่า MIC ของน้ำผึ้งดอกงา (ครั้งที่ 1 MIC 0.15 g/ml, ครั้งที่ 2 MIC 0.15 g/ml)

2. การศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง

จากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยอ่านผลจากโซนใสเป็นหน่วยมิลลิเมตร ให้ผลดังตารางที่ 21 พบว่าขนาดโซนใสเฉลี่ยของน้ำผึ้งดอกลำไยก่อนผ่านความร้อนเท่ากับ 13.92±1.50 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกงาก่อนผ่านความร้อนเท่ากับ 13.29±1.09 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกลำไยหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 12.90±1.93 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 13.78±1.55 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 17 สำหรับขนาดโซนใสของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้ผลดังตารางที่ 22 พบว่าขนาดโซนใสเฉลี่ยของน้ำผึ้งดอกลำไยก่อนผ่านความร้อนเท่ากับ 14.59±2.39 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกงาก่อนผ่านความร้อนเท่ากับ 13.04±4.31 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกลำไยหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 13.47±1.88 มิลลิเมตร น้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 12.79±0.70 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 18 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโซนใสของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังผ่านความร้อนโดยใช้ independent samples T test พบว่า ที่ระดับความมั่นใจ 95% น้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีขนาดโซนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.433$ และ $p = 0.626$ ตามลำดับ) ส่วนน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีขนาดโซนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p = 0.435$ และ $p = 0.931$ ตามลำดับ) จะเห็นได้ว่าน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส มีขนาดโซนใสไม่แตกต่างจากน้ำผึ้งก่อนผ่านความร้อน แสดงว่าความร้อนไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

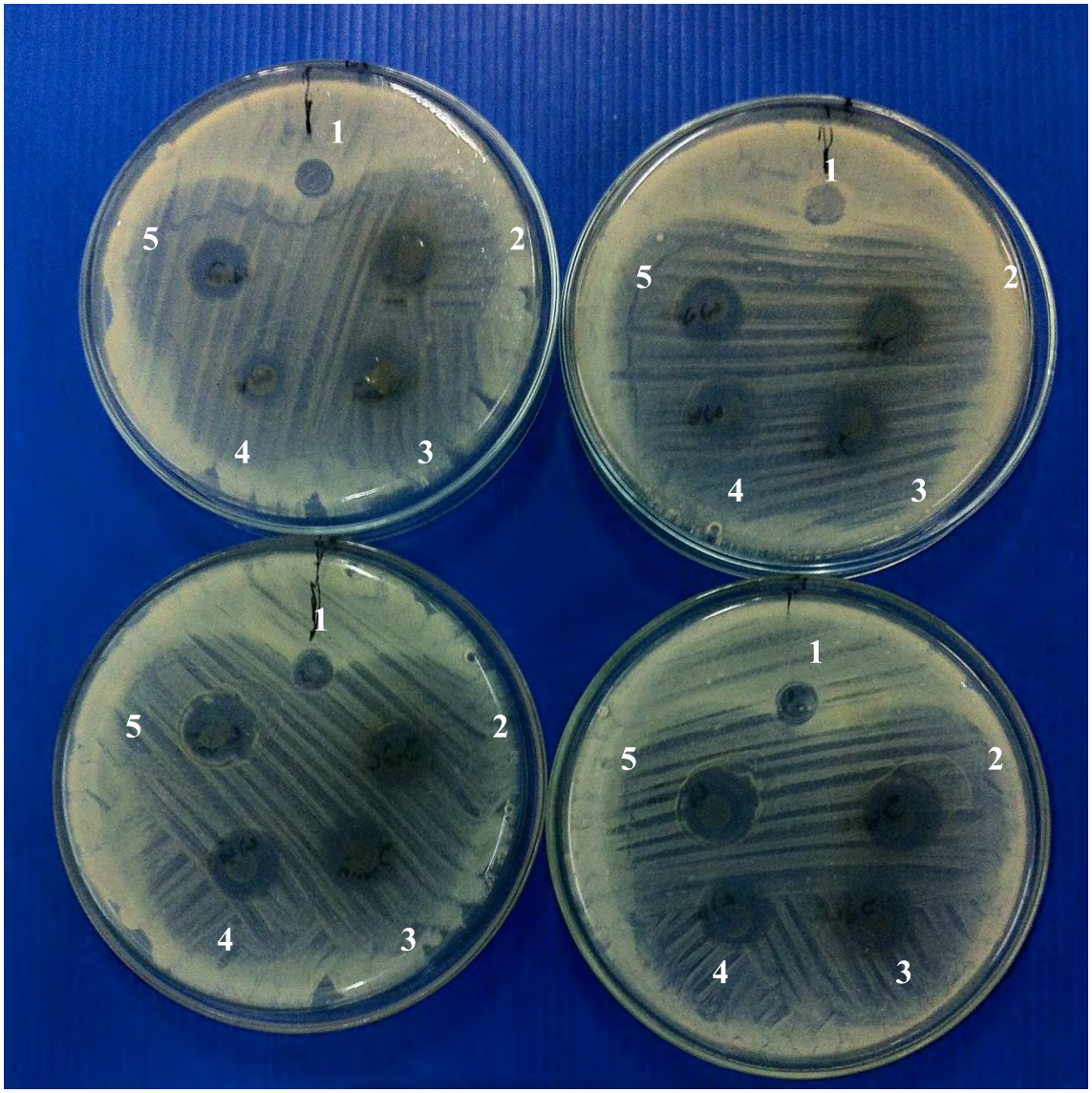
ตารางที่ 21 แสดงขนาดโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ชนิดน้ำผึ้ง	**ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)**					
	Plate ที่ 1	**Plate ที่ 2**	**Plate ที่ 3**	**Plate ที่ 4**	**Plate ที่ 5***	**ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**
น้ำผึ้งดอกลำไย (ก่อน)	12.30	13.00	15.20	15.20	-	13.92±1.50
น้ำผึ้งดอกงา (ก่อน)	11.75	14.20	13.30	13.90	-	13.29±1.09
น้ำผึ้งดอกลำไย (หลัง)	10.50	14.90	12.30	13.90	-	12.90±1.93
น้ำผึ้งดอกงา (หลัง)	12.00	13.00	15.40	14.70	-	13.78±1.55
น้ำกลั่น	7.55	7.00	8.50	8.50	-	7.89±0.74

หมายเหตุ: *Plate ที่ 5 เกิดการปนเปื้อนจึงไม่มีค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส

ตารางที่ 22 แสดงขนาดโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

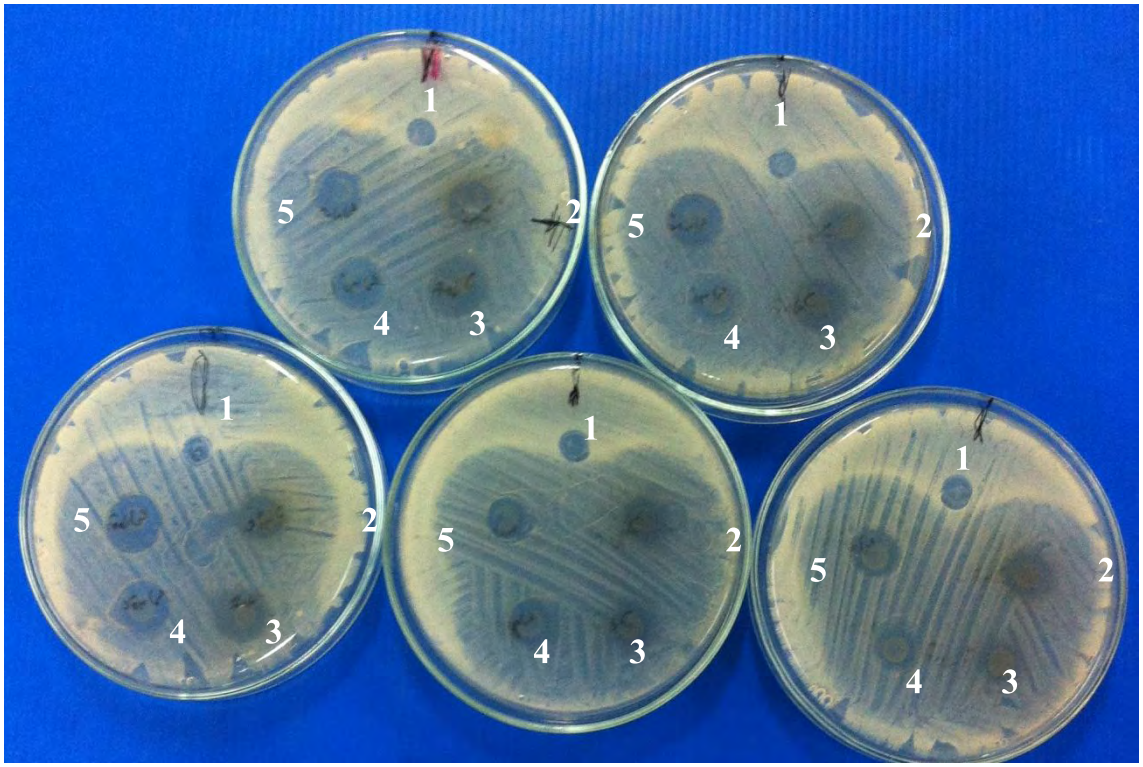
ชนิดน้ำผึ้ง	**ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)**					
	Plate ที่ 1	**Plate ที่ 2**	**Plate ที่ 3**	**Plate ที่ 4**	**Plate ที่ 5**	**ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**
น้ำผึ้งดอกลำไย (ก่อน)	15.75	16.70	16.10	10.90	13.50	14.59±2.39
น้ำผึ้งดอกงา (ก่อน)	19.00	14.00	14.50	8.30	9.40	13.04±4.31
น้ำผึ้งดอกลำไย (หลัง)	14.40	15.45	14.55	11.10	11.85	13.47±1.88
น้ำผึ้งดอกงา (หลัง)	11.65	12.70	13.30	12.90	13.40	12.79±0.70
น้ำกลั่น	9.05	8.50	8.30	9.25	8.10	8.64±0.49



รูปที่ 17 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

(1 = น้ำกลั่น, 2 = น้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อน, 3 = น้ำผึ้งดอกงา,

4 = น้ำผึ้งดอกลำไยหลังผ่านความร้อน, 5 = น้ำผึ้งดอกลำไย)

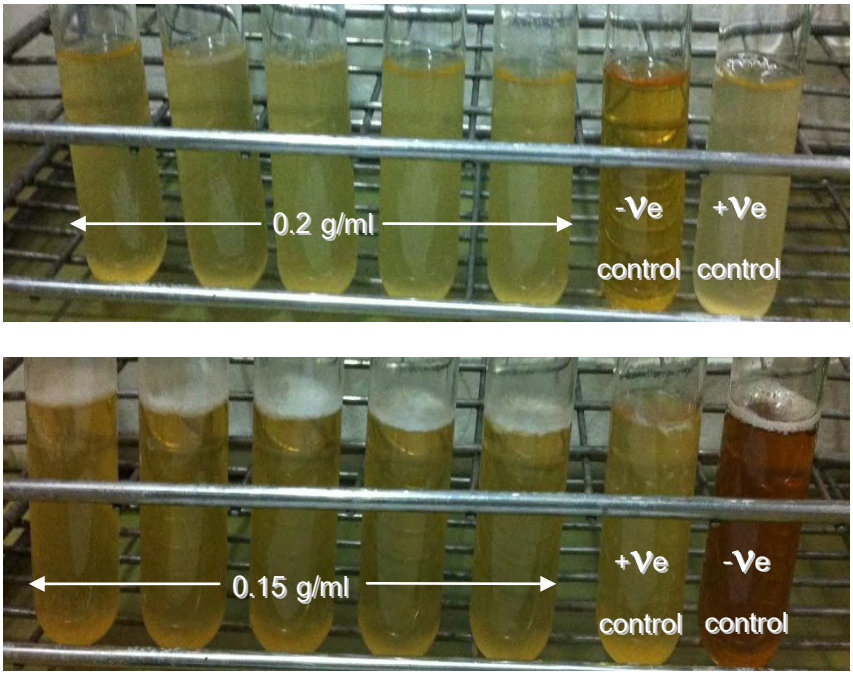


รูปที่ 18 แสดงโซนใสของน้ำผึ้งก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
(1 = น้ำกลั่น, 2 = น้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อน, 3 = น้ำผึ้งดอกงา,
4 = น้ำผึ้งดอกลำไยหลังผ่านความร้อน, 5 = น้ำผึ้งดอกลำไย)

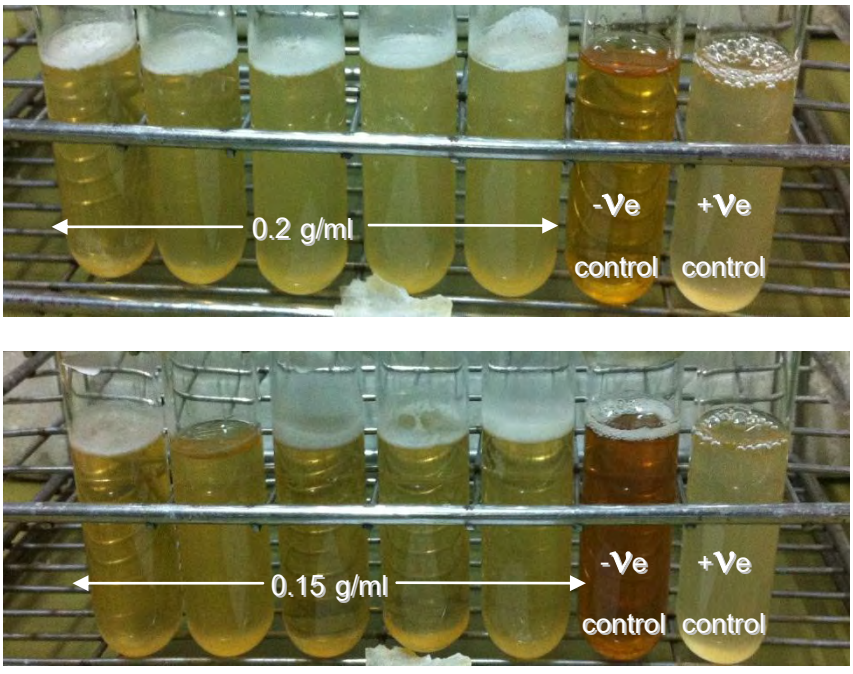
ณ ความเข้มข้นที่ MIC ของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังตารางที่ 23 พบว่าทุกหลอดมีลักษณะขุ่น ดังรูปที่ 19 และ 20 จึงทำการทดลองซ้ำแต่ใช้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MIC (0.4 g/ml สำหรับน้ำผึ้งดอกลำไยและ 0.3 g/ml สำหรับน้ำผึ้งดอกงา) พบว่าหลอดทดลองที่มีน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MIC ผลการสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังตารางที่ 24 ไม่พบความขุ่นเกิดขึ้น ดังรูปที่ 21 และ 22 จึงสามารถสรุปได้ว่าค่า MIC ต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาหลังผ่านความร้อนทั้งที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส มีค่าเป็น 2 เท่าของค่า MIC (0.4 g/ml สำหรับน้ำผึ้งดอกลำไยและ 0.3 g/ml สำหรับน้ำผึ้งดอกงา)

ตารางที่ 23 แสดงผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC

อุณหภูมิ	**น้ำผึ้ง**	**หลอดที่ 1**	**หลอดที่ 2**	**หลอดที่ 3**	**หลอดที่ 4**	**หลอดที่ 5**
60 องศาเซลเซียส	น้ำผึ้งดอกลำไย 0.2 g/ml	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา 0.15 g/ml	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
70 องศาเซลเซียส	น้ำผึ้งดอกลำไย 0.2 g/ml	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา 0.15 g/ml	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น	ขุ่น



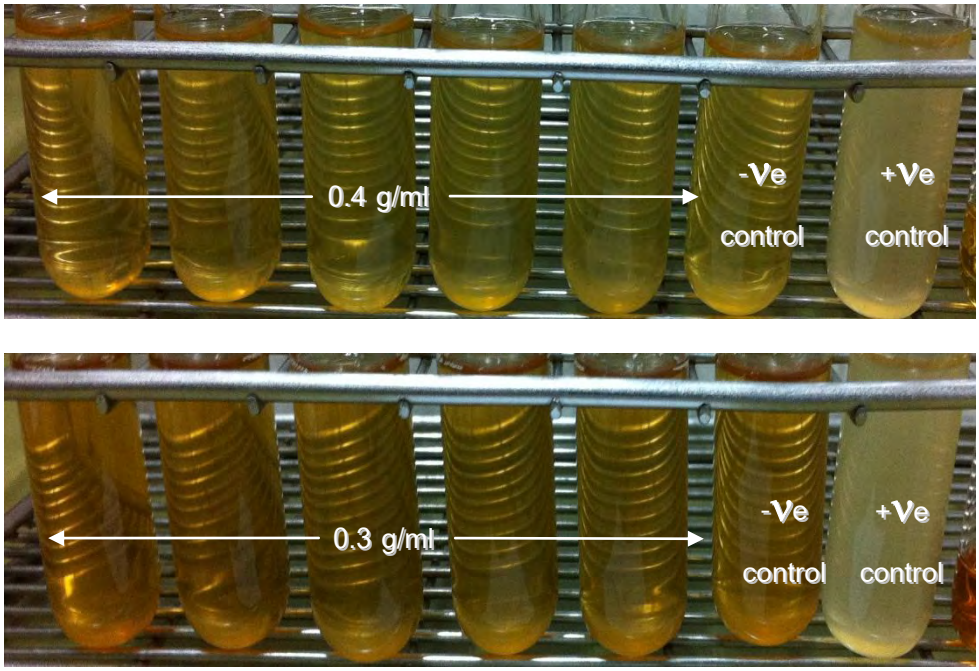
รูปที่ 19 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (ครั้งที่ 1 ขุ่นทุกหลอด, ครั้งที่ 2 ขุ่นทุกหลอด)



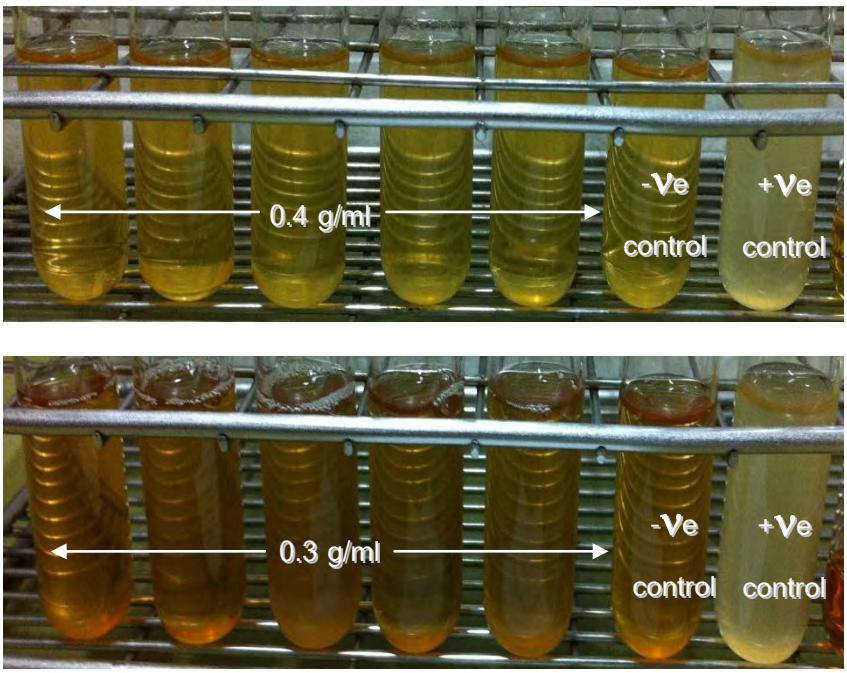
รูปที่ 20 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (ครั้งที่ 1 ขุ่นทุกหลอด, ครั้งที่ 2 ขุ่นทุกหลอด)

ตารางที่ 24 แสดงผลความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC

อุณหภูมิ	น้ำผึ้ง	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5
60 องศาเซลเซียส	น้ำผึ้งดอกลำไย 0.4 g/ml	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา 0.3 g/ml	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น
70 องศาเซลเซียส	น้ำผึ้งดอกลำไย 0.4 g/ml	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น
	น้ำผึ้งดอกงา 0.3 g/ml	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น	ไม่ขุ่น



รูปที่ 21 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC (ครั้งที่ 1 ไม่ขุ่นทุกหลอด, ครั้งที่ 2 ไม่ขุ่นทุกหลอด)



รูปที่ 22 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC (ครั้งที่ 1 ไม่ขุ่นทุกหลอด, ครั้งที่ 2 ไม่ขุ่นทุกหลอด)

จากการศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งทั้ง 2 วิธี โดย Agar diffusion method นั้น พบว่าความร้อนไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จากค่าเฉลี่ยขนาดโซนใสซึ่งไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ แต่เมื่อใช้วิธี Broth dilution method พบว่าความร้อนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยพบว่าค่า MIC สูงขึ้นเป็น 2 เท่าจากของเดิม ดังนั้นการเตรียมครีมน้ำผึ้งถ้าใช้กระบวนการให้ความร้อน (Beaker method) ควรใช้น้ำผึ้งที่ความเข้มข้นอย่างน้อยเท่ากับ 2 เท่าของ MIC ขึ้นไป

3 การตั้งสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

3.1 การพัฒนาสูตรตำรับยาพื้นครีม

3.1.1 เลือกสูตรตำรับยาพื้นครีมที่จะนำมาพัฒนา

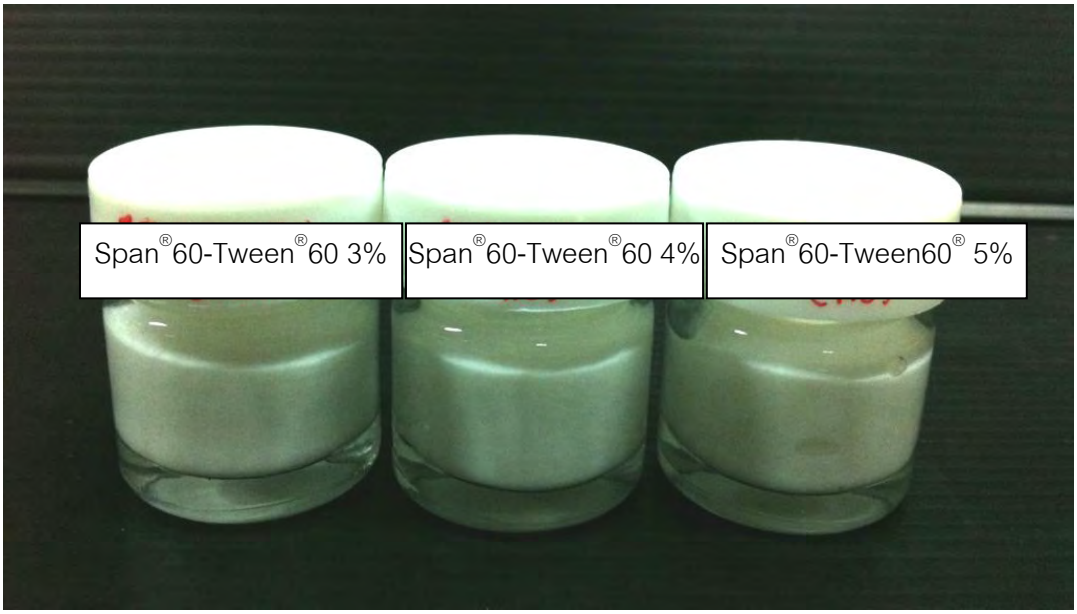
จากการพัฒนาสูตรเพื่อหาสูตรตำรับยาพื้นครีม โดยใช้ Span®60 และ Tween®60 ร้อยละ 3 ของสูตรตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชัน ได้สูตรตำรับครีมชนิด o/w โดยมีน้ำในสูตรตำรับปริมาณมาก ทำให้สามารถใส่น้ำผึ้งซึ่งเป็นสารสำคัญที่ละลายน้ำได้ในปริมาณสูง และมีลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัมผัสที่ดี ดังตารางที่ 35 (ภาคผนวก) จึงเลือกสูตรตำรับนี้ในการนำไปหาชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสม ดังนี้

สูตรตำรับยาพื้นครีม สำหรับปริมาณสารก่ออิมัลชันร้อยละ 3 - 5 ของตำรับ

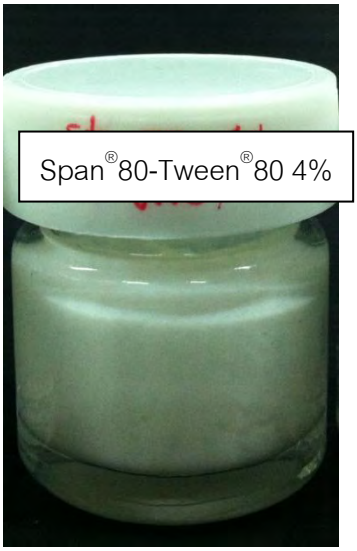
	ปริมาณในครีม 100 g
Stearic acid	10
Spermaceti	5
Mineral oil	7
Cyclomethicone	5
Emulsifier	3 – 5
Propylene glycol	5
Paraben concentrate	1
Distilled water	62 - 64

3.1.2 การหาชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสม

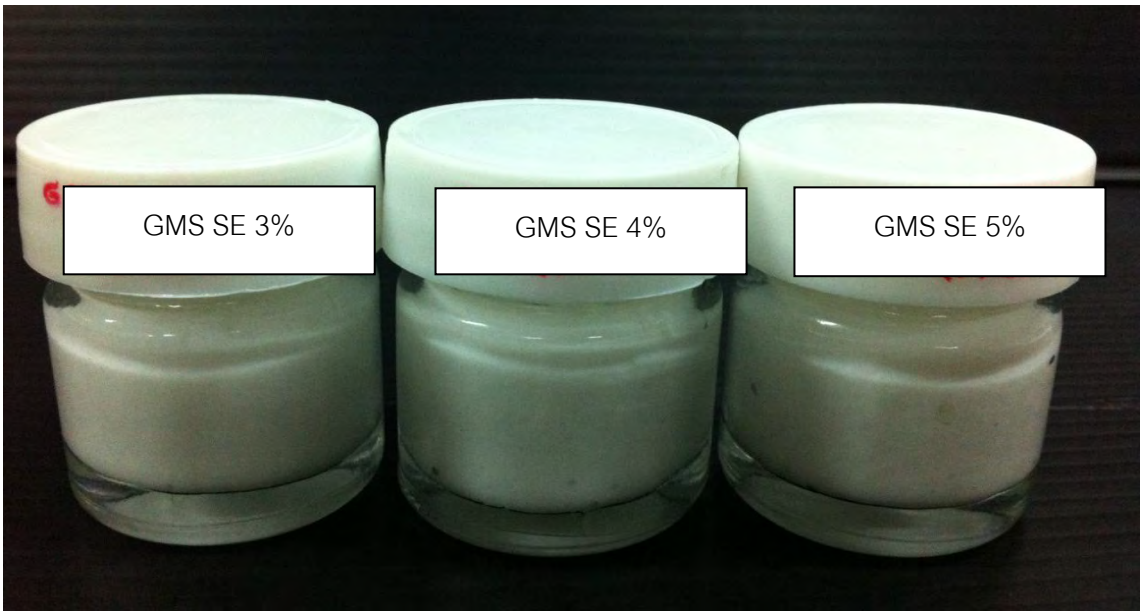
จากการศึกษาพบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 3 และ5 ของตำรับ เมื่อเตรียมเสร็จเกิดการแยกชั้น เนื้อครีมหยาบเป็นเม็ด ไม่มีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นครีมน้ำผึ้งต่อไป จึงไม่ทำการศึกษาต่อ ในขณะที่ครีมสูตรตำรับอื่นๆไม่มีการแยกชั้น ดังรูปที่ 23, 24, 25 และ 26 มีลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัมผัส ดังตารางที่ 36 (ภาคผนวก) จึงทำการทดสอบโดยใช้สภาวะเร่งต่อไป



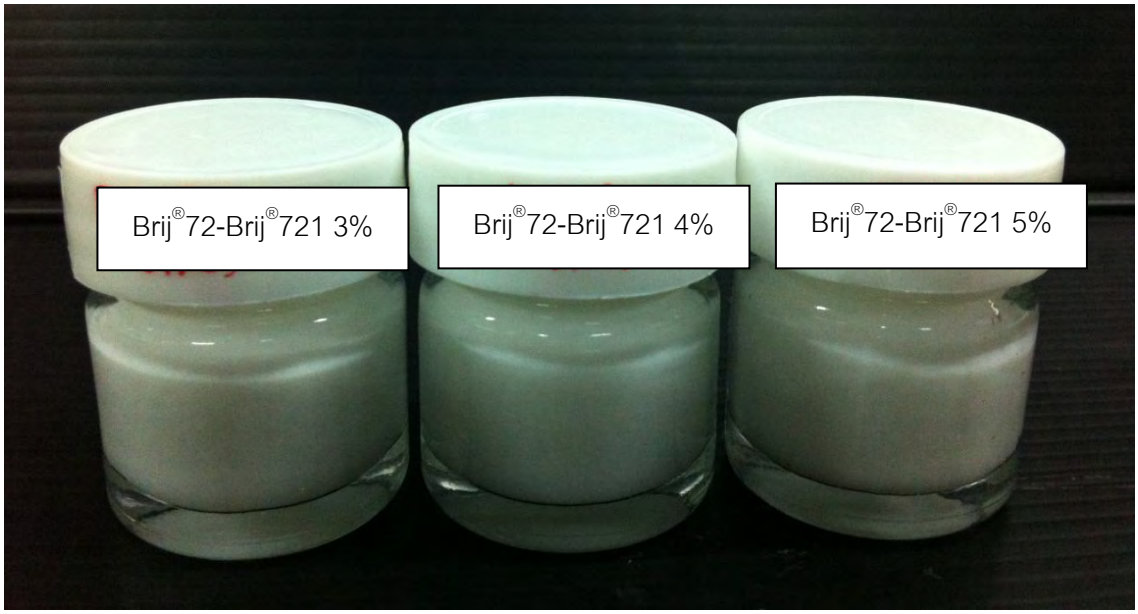
รูปที่ 23 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®60 และ Tween®60 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)



รูปที่ 24 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)



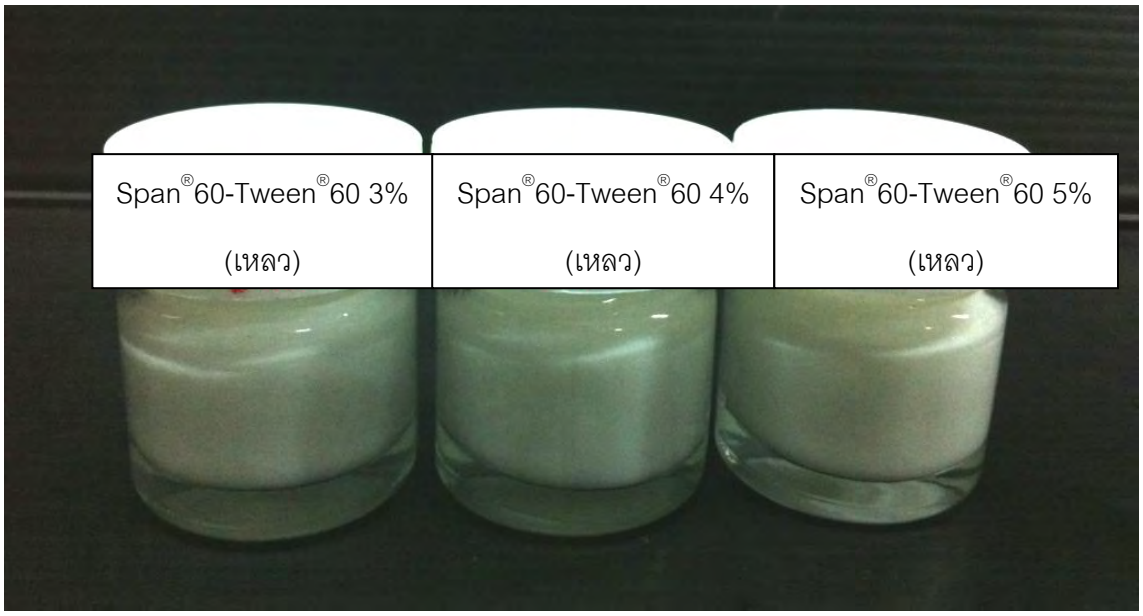
รูปที่ 25 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)



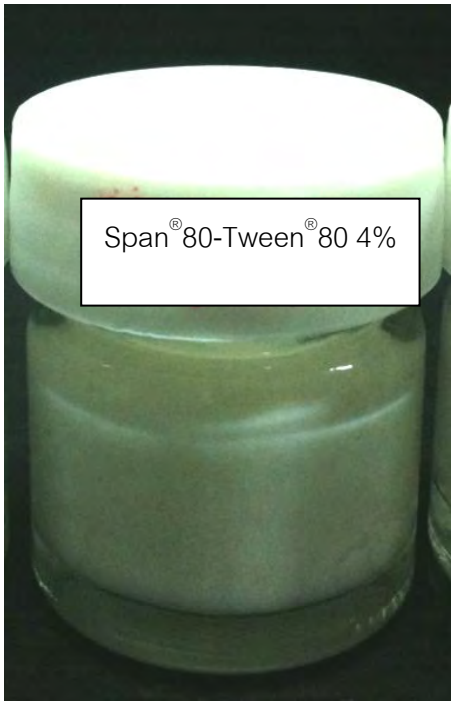
รูปที่ 26 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

หลังจากสภาวะเร่งพบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ มีลักษณะเหลวไหลได้หลังผ่านสภาวะเร่งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 3 และสูตรตำรับที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 3 และ 5 ของตำรับ รวมถึงสูตรตำรับที่ใช้ Span®60 และ Tween®60 ปริมาณร้อยละ 3,4และ5 ของตำรับ มีลักษณะเหลวไหลได้หลังผ่านสภาวะเร่งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 6 ซึ่งแสดงถึงความไม่คงตัวของครีม ไม่เหมาะกับการพัฒนาเป็นครีมน้ำผึ้งต่อไป จึงคัดออกจากการศึกษา ในขณะที่ครีมสูตรตำรับอื่นๆซึ่งได้แก่ สูตรตำรับที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของสูตรตำรับ, GMS SE ปริมาณร้อยละ 3,4 และ 5 ของสูตรตำรับ ไม่มีการแยกชั้นดังรูปที่ 27, 28, 29 และ 30 มีลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัมผัส ดังตารางที่ 37 (ภาคผนวก) จึงนำไปวัดความหนืด เพื่อเปรียบเทียบกับความหนืดก่อนการทดสอบด้วยสภาวะเร่ง พบว่า ยาพื้นครีมทุกสูตรตำรับที่นำมาวัดความหนืด มีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Span®80 และ Tween®80 ร้อยละ 4 ($p<0.01$), GMS SE ร้อยละ 3 ($p<0.05$), GMS SE ร้อยละ 4 ($p<0.01$), GMS SE ร้อยละ 5 ($p<0.05$)) ซึ่งอาจเนื่องมาจากภาชนะบรรจุที่ใช้บรรจุครีมนั้นไม่สามารถป้องกันการระเหยเข้า-ออกของน้ำได้ น้ำในครีมจึงระเหย

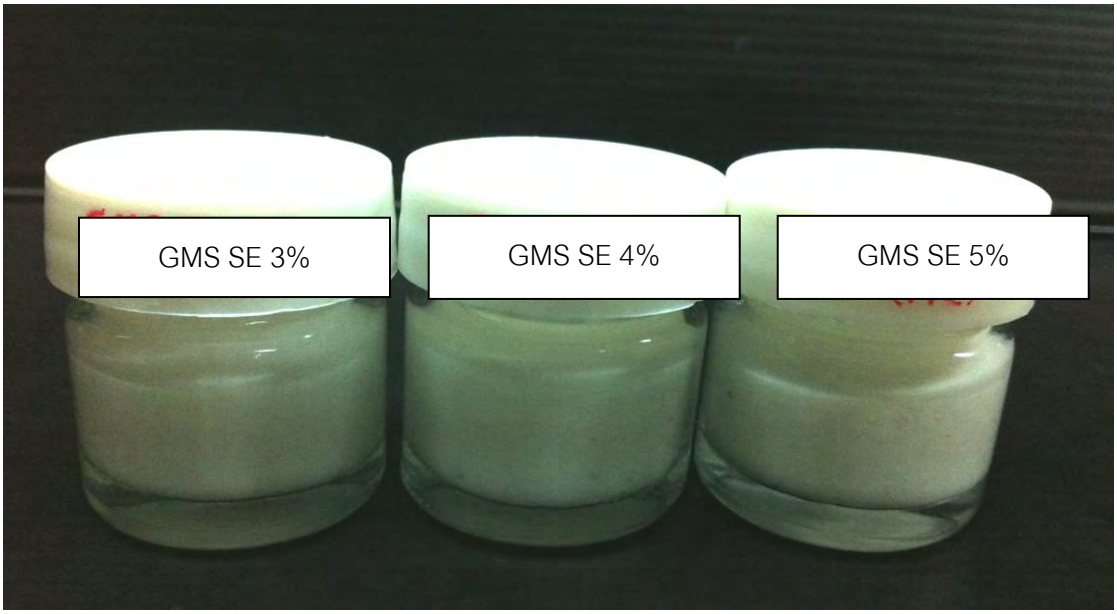
ออกไประหว่างการเก็บด้วยสภาวะเร่ง ทำให้ครีมมีลักษณะแข็งมากขึ้น ความหนืดจึงเปลี่ยนแปลงไปมาก ประกอบกับความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไม่ส่งผลต่อลักษณะสัมผัสของครีม จึงไม่คัดยาพื้นครีมที่มีการเปลี่ยนแปลงของความหนืดออกจากการศึกษา นอกจากนี้จากการทดลองพบว่ายาพื้นครีมที่คัดออกจากการศึกษา เกิดความไม่คงตัวหลังจากผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีผลต่อความคงตัวของตำรับครีม โดยทำให้ครีมเหลวและไหลได้ คณะผู้วิจัยจึงได้เพิ่มการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสลับกับ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 รอบ ในการทดสอบครีมน้ำผึ้งที่สภาวะเร่งเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเก็บครีมน้ำผึ้งต่อไป



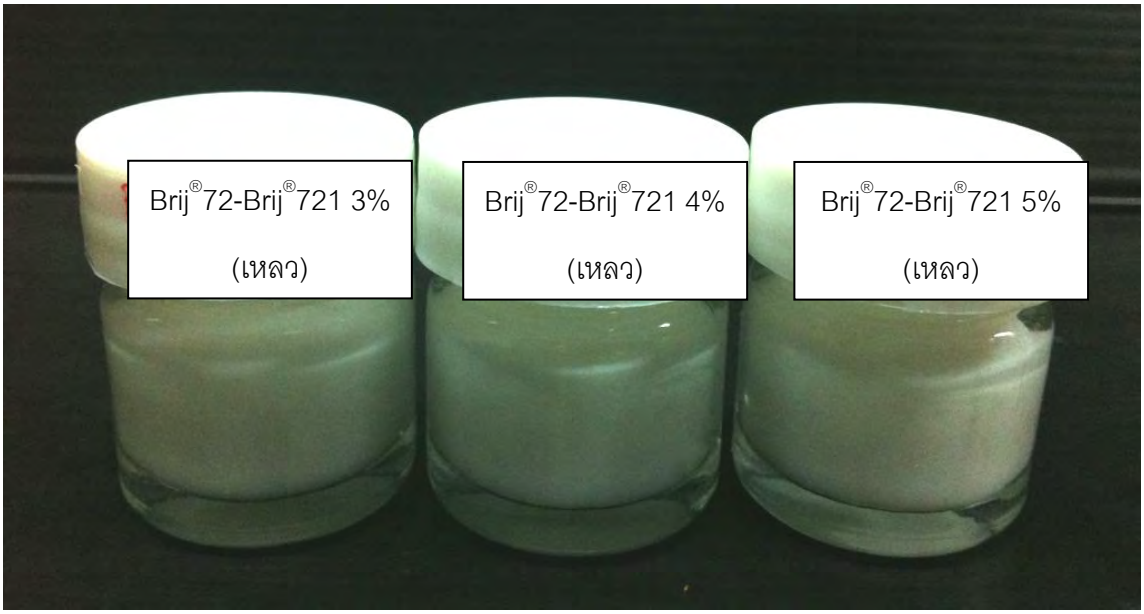
รูปที่ 27 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®60 และ Tween®60 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)



รูปที่ 28 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)



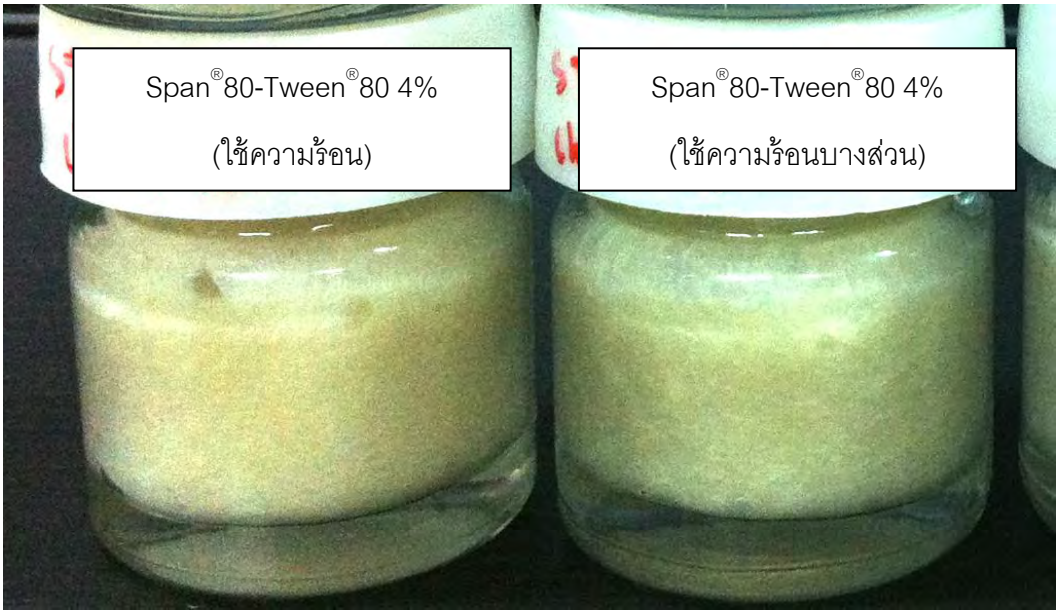
รูปที่ 29 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)



รูปที่ 30 แสดงยาพื้นครีมที่ใช้ Brij®72 และ Brij®721 ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ5 ของตำรับ (หลังทดสอบสภาวะเร่ง)

3.2 การพัฒนาสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

จากการเตรียมครีมน้ำผึ้งโดยวิธีใช้ความร้อน,ใช้ความร้อนบางส่วน และไม่ใช้ความร้อน พบว่า ครีมน้ำผึ้งสูตรตำรับที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของสูตรตำรับ เมื่อเตรียมโดยวิธีไม่ใช้ความร้อนเกิดการแยกชั้นหลังเตรียมเสร็จ จึงคัดออกจากการศึกษา สำหรับครีมน้ำผึ้งสูตรตำรับอื่นๆมีความคงตัวหลังเตรียมเสร็จ ดังรูปที่ 31-38 จึงนำไปทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งต่อไป

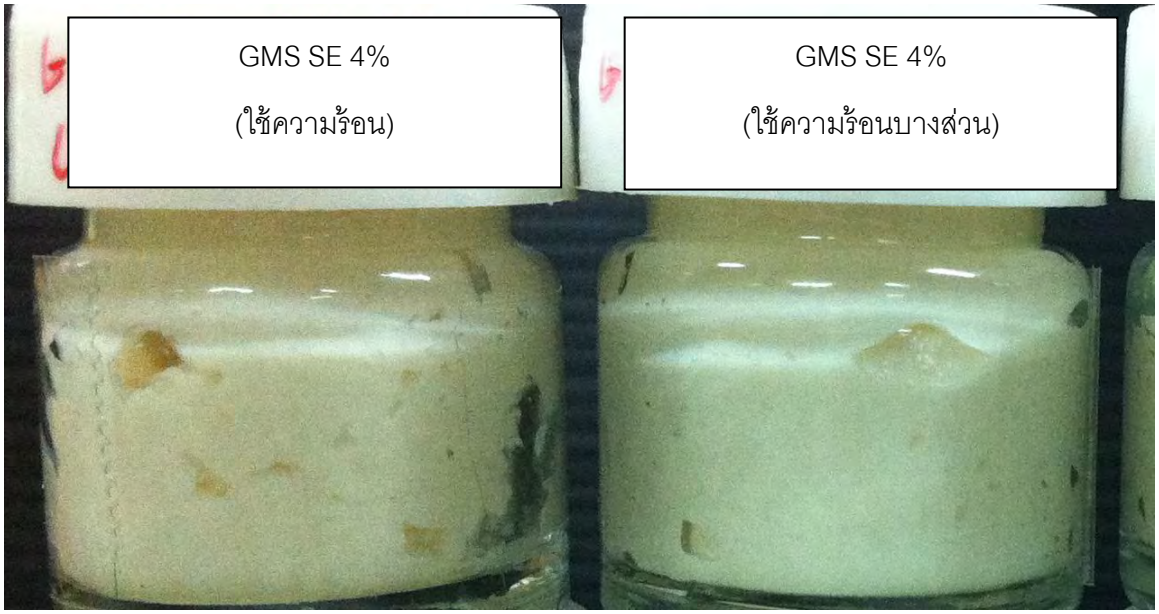


รูปที่ 31 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

รูปที่ 32 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

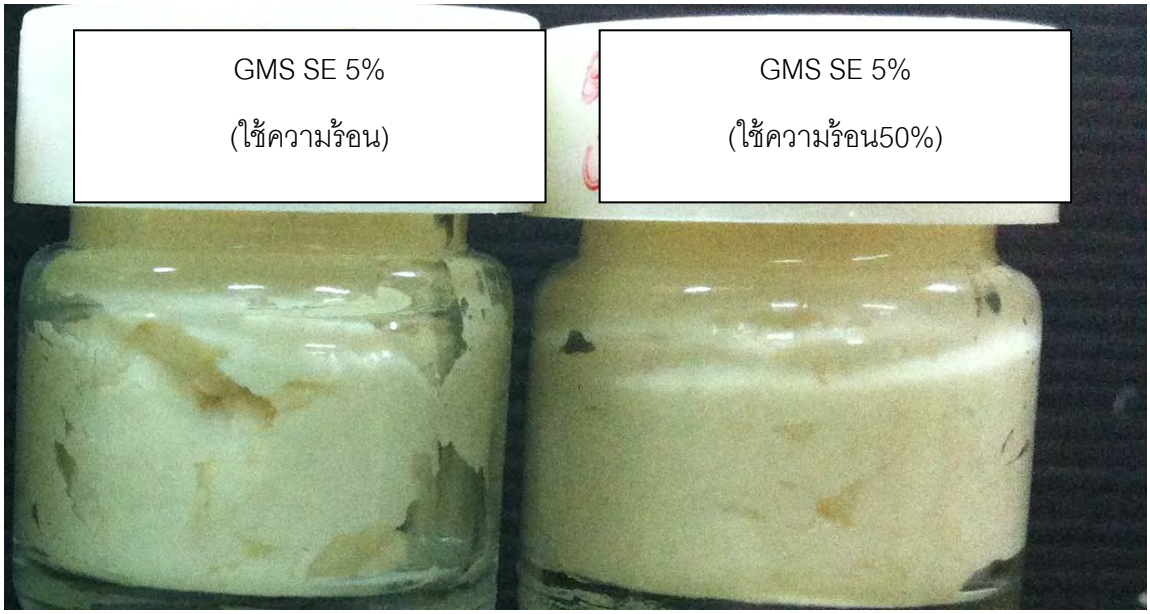
รูปที่ 33 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

รูปที่ 34 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)



รูปที่ 35 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

รูปที่ 36 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)



รูปที่ 37 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ โดยวิธีใช้ความร้อน (ซ้าย) และวิธีใช้ความร้อนบางส่วน (ขวา) ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

รูปที่ 38 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

ลักษณะของครีมน้ำผึ้งหลังผ่านการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งดังรูปที่ 39-42 จากการศึกษาความคงตัวพบว่าครีมน้ำผึ้งเมื่อผ่านการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และประเมินลักษณะทางกายภาพดังตารางที่ 44 (ภาคผนวก) ครีมน้ำผึ้งทุกสูตรตำรับไม่คงตัวทางกายภาพ โดยสูตรตำรับที่ใช้วิธีไม่ใช้ความร้อนครีมน้ำผึ้งเกิดการแยกชั้นในช่วงแรกของการทดสอบ ในขณะที่สูตรตำรับที่ใช้ความร้อนบางส่วนและใช้ความร้อนทั้งหมดเหลวและไหลได้หลังผ่านการให้ความร้อนในรอบแรกของการศึกษา ดังนั้นครีมน้ำผึ้งทุกสูตรตำรับไม่คงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยวิธีการเตรียมครีมที่ไม่ใช้ความร้อน ทำให้เกิดความไม่คงตัวของครีมมากที่สุด (แยกชั้นในรอบแรก) อาจเนื่องจากน้ำผึ้งมีความหนักทำให้เข้าผสมกับวัฏภาคน้ำและเกิดเป็นอิมัลชันได้ไม่ดีนัก เมื่อทำการผสมโดยไม่ใช้ความร้อน

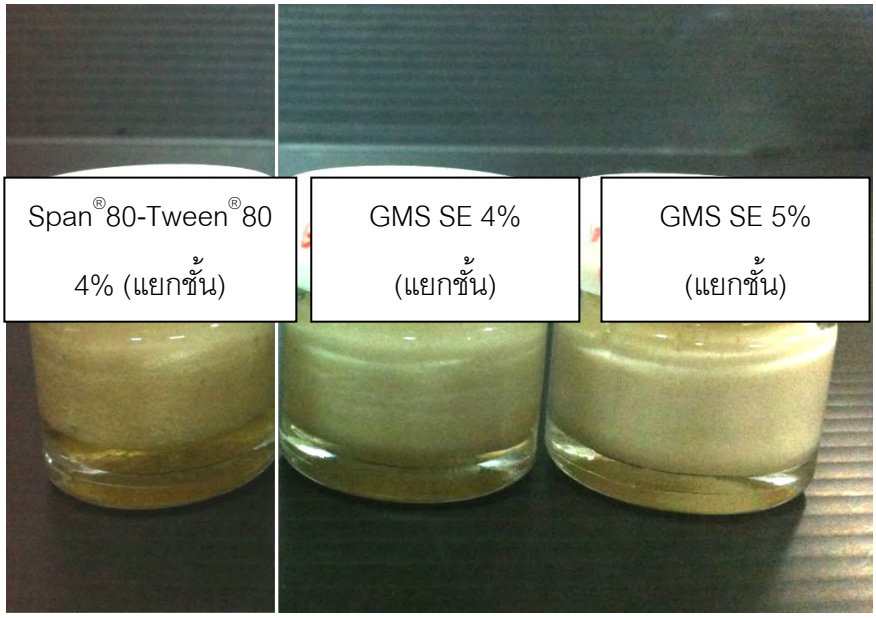
จากการศึกษาความคงตัวทางกายภาพด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และประเมินลักษณะทางกายภาพดังตารางที่ 45 (ภาคผนวก) ครีมน้ำผึ้งสูตรตำรับที่ใช้วิธีไม่ใช้ความร้อนเกิดการแยกชั้นในช่วงแรกของการศึกษา ในขณะที่สูตรตำรับที่ใช้ความร้อนบางส่วนเกิดการแยกชั้นทุกสูตรตำรับเช่นกัน ดังนั้นการเตรียมครีมน้ำผึ้งด้วยวิธีไม่ใช้ความร้อนและใช้ความร้อนบางส่วนจึงไม่เหมาะสมในการใช้เตรียมครีมน้ำผึ้ง โดยอาจเนื่องมาจากน้ำผึ้งมีความหนักทำให้เข้าผสมกับวัฏภาคน้ำและเกิดเป็นอิมัลชันได้ไม่ดีนัก เมื่อทำการผสมโดยไม่ใช้ความร้อนหรือใช้ความร้อนบางส่วน

ครีมน้ำผึ้งที่เตรียมด้วยวิธีใช้ความร้อนโดยใช้ Span®80 และ Tween®80 ร้อยละ 4 ของสูตรตำรับนั้น เหลวและไหลได้ เมื่อผ่านความร้อนในการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่งโดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในรอบแรก ในขณะที่ครีมน้ำผึ้งที่เตรียมด้วยวิธีใช้ความร้อนโดยใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ 5 ของสูตรตำรับ มีลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัมผัสที่ไม่เปลี่ยนแปลงจากก่อนการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง จึงนำไปวัดความหนืดซึ่งพบว่าครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3,4 และ 5 ของตำรับมีความหนืดลดลงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ(GMS SE ร้อยละ 3 ($p<0.01$), GMS SE ร้อยละ 4 ($p<0.01$), GMS SE ร้อยละ 5 ($p<0.01$)) ดังตารางที่ 47, 48 และ 49 (ภาคผนวก) อาจเนื่องมาจากน้ำผึ้งเมื่อให้ความร้อน

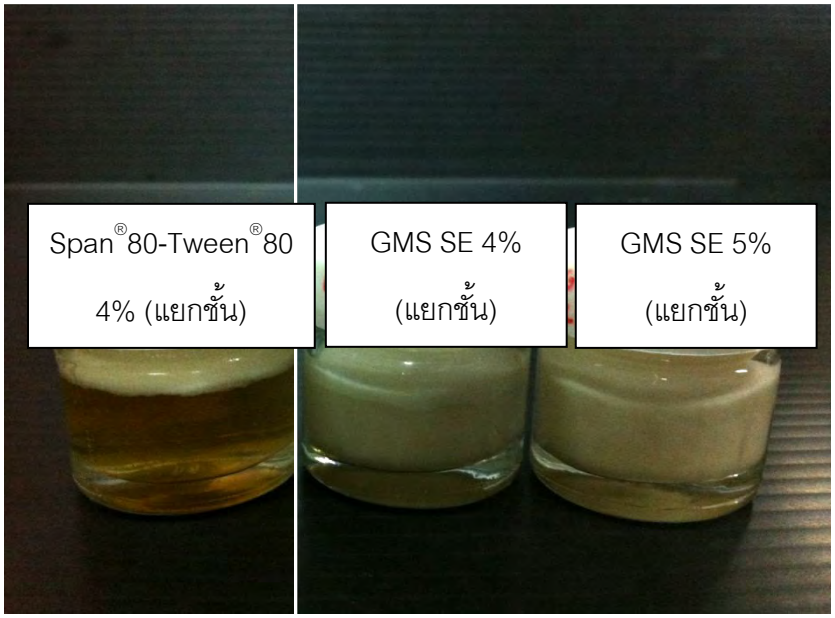
สม่ำเสมอเป็นระยะเวลาหนึ่ง ทำให้น้ำผึ้งแปรสภาพไปมีความหนืดลดลง ดังการทดลองเพิ่มเติมดังนี้

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความหนืดของน้ำผึ้ง

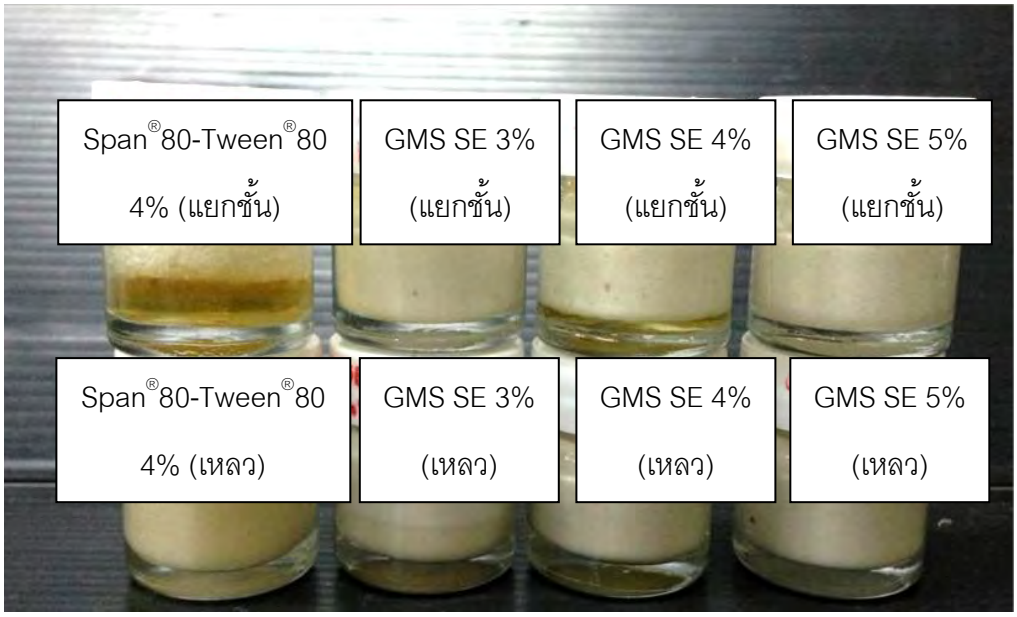
ให้ความร้อนน้ำผึ้งดอกงาด้วยหม้ออังไอน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความหนืดของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อน พบว่าน้ำผึ้งเมื่อได้รับความร้อนจะมีความหนืดลดลงอย่างมีนัยสำคัญดังตารางที่ 51 (ภาคผนวก) ดังนั้นน้ำผึ้งที่ได้รับความร้อนจะสูญเสียความหนืดอย่างถาวร เมื่อนำมาใส่ในครีมและนำไปศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงทำให้ครีมน้ำผึ้งมีความหนืดลดลงอย่างถาวรด้วยเช่นกัน ความหนืดที่ลดลงนี้ไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพและลักษณะสัมผัสอื่นๆของครีมน้ำผึ้ง ทั้งยังไม่ส่งผลต่อความร่วมมือในการใช้ของผู้ป่วย จึงนำสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งที่เตรียมด้วยวิธีใช้ความร้อนโดยใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, 4 และ 5 ของสูตรตำรับไปศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ต่อไป



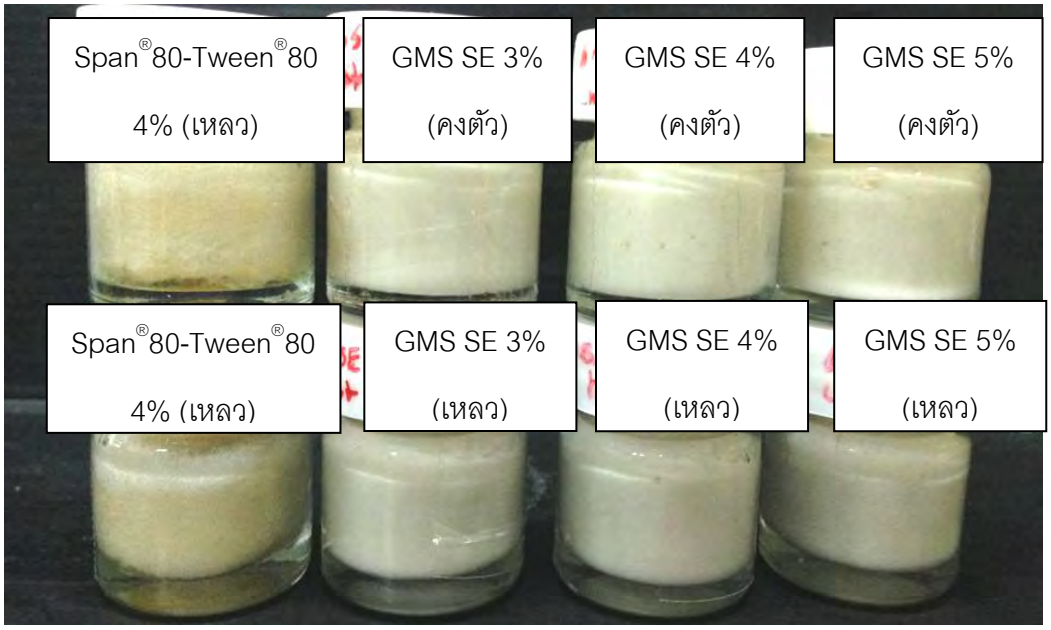
รูปที่ 39 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน หลังทดสอบสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 40 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีไม่ใช้ความร้อน หลังทดสอบสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 41 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีใช้ความร้อนบางส่วน หลังทดสอบสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 40 (บน) และ 45 (ล่าง) องศาเซลเซียส



รูปที่ 42 แสดงครีมน้ำผึ้งที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดและปริมาณต่างๆ โดยวิธีใช้ความร้อนหลังทดสอบสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 40 (บน) และ 45 (ล่าง) องศาเซลเซียส

4. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งกับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar diffusion method

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของครีมน้ำผึ้งดอกงา โดยใช้วิธี Agar diffusion method พบว่าขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของสูตรตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันเป็นดังตารางที่ 25, 26 และ 27 ตามลำดับ ขนาดโซนใสเฉลี่ยของครีมน้ำผึ้งที่ดอกงาใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของสูตรตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันเท่ากับ 9.37±0.46, 8.57±0.38 และ 9.02±0.51 ตามลำดับ ดังรูปที่ 43, 44 และ 45 ตามลำดับ เมื่อนำแต่ละข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA พบว่าค่า p-value น้อยกว่า 0.01 ทั้งหมด แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงนำไปเปรียบเทียบแบบรายคู่โดยใช้วิธี LSD พบว่าครีมน้ำผึ้งดอกงาที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ และ ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันมีค่าเฉลี่ยของโซนใสแตกต่างจากยาพื้นครีมที่เป็น negative control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันมีค่าเฉลี่ยของโซนใสไม่แตกต่างจากยาพื้นครีมอย่างมีนัยสำคัญ

($p = 0.309$) ดังนั้นครีมน้ำผึ้งดอกงาที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันมีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสสูงที่สุด จึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อ

ตารางที่ 25 แสดงขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน

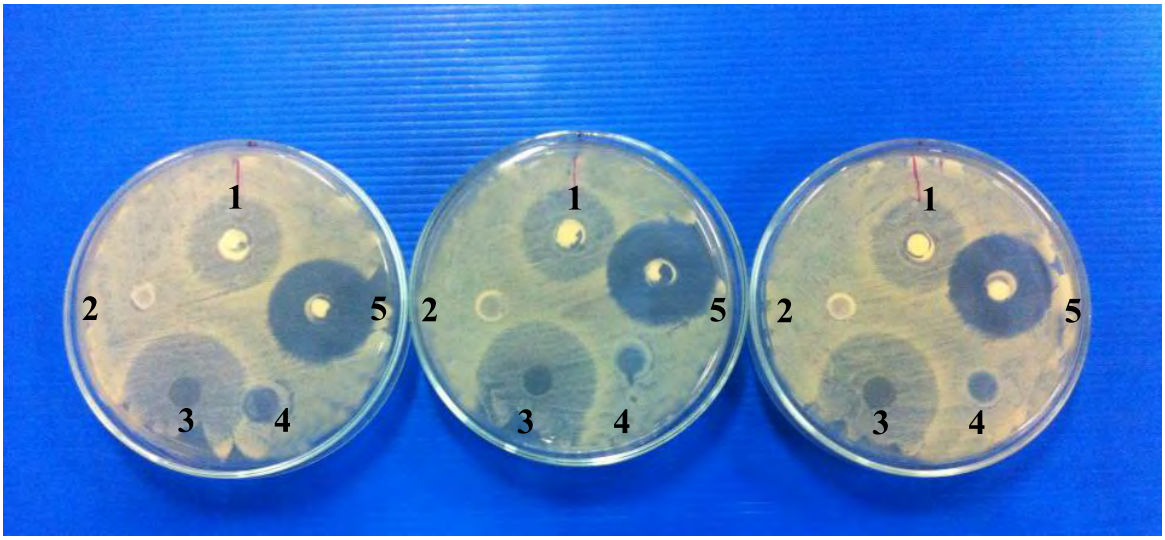
ตัวอย่าง	**ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)**			
	Plate ที่ 1	**Plate ที่ 2**	**Plate ที่ 3**	**ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**
ครีมน้ำผึ้ง	9.90	9.15	9.05	9.37±0.46
ยาพื้นครีม	7.80	7.45	8.00	7.75±0.28
น้ำผึ้ง 0.3 g/ml	9.05	9.00	9.00	9.00±0.57
น้ำกลั่น	9.00	8.00	8.10	8.37±0.55
Gentamicin cream	29.65	30.30	29.25	29.73±0.53

ตารางที่ 26 แสดงขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน

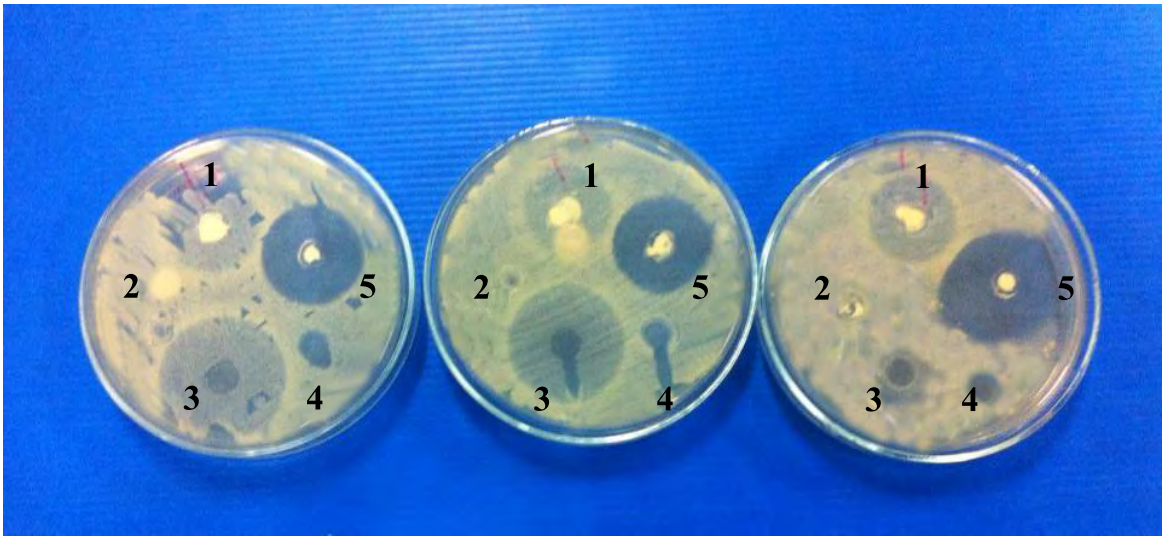
ตัวอย่าง	**ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)**			
	Plate ที่ 1	**Plate ที่ 2**	**Plate ที่ 3**	**ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน**
ครีมน้ำผึ้ง	8.40	9.00	8.30	8.57±0.38
ยาพื้นครีม	7.45	8.00	7.00	7.48±0.50
น้ำผึ้ง 0.3 g/ml	9.65	8.75	8.60	9.00±0.57
น้ำกลั่น	7.90	8.25	7.95	8.03±0.19
Gentamicin cream	29.65	33.90	29.10	30.88±2.63

ตารางที่ 27 แสดงขนาดโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน

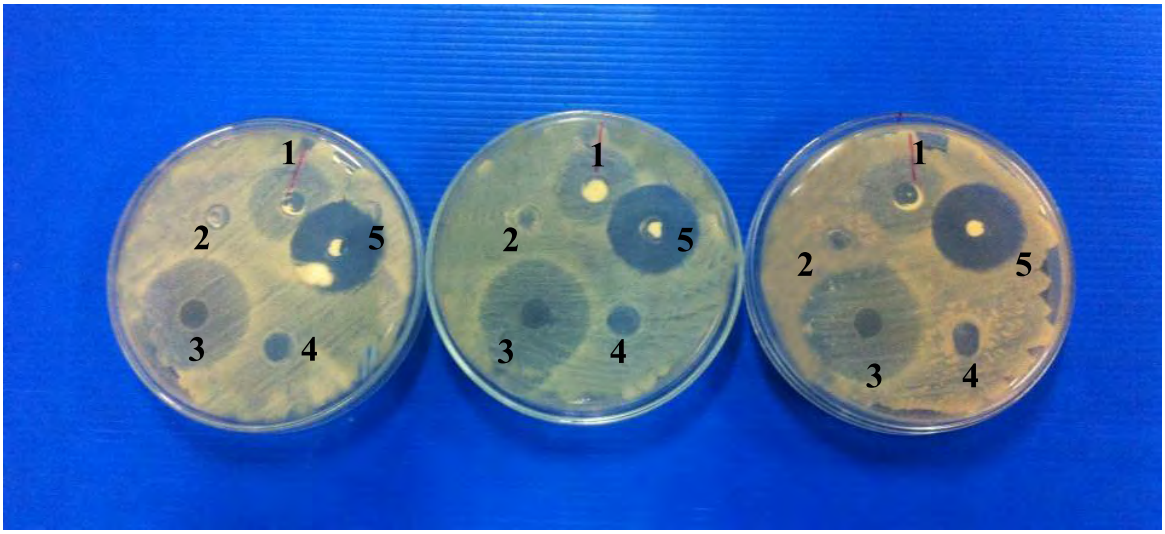
ตัวอย่าง	ขนาดโซนใส(มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	Plate ที่ 1	Plate ที่ 2	Plate ที่ 3	
ครีมน้ำผึ้ง	8.80	9.60	8.65	9.02±0.51
ยาพื้นครีม	7.85	7.90	7.40	7.72±0.28
น้ำผึ้ง 0.3 g/ml	8.85	9.00	9.65	9.17±0.43
น้ำกลั่น	8.55	9.15	7.80	8.50±0.68
Gentamicin cream	27.75	29.75	27.90	28.47±1.11



รูปที่ 43 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชัน (1 = ครีมน้ำผึ้ง, 2 = ยาพื้นครีม, 3 = น้ำผึ้งดอกงา 0.3 g/ml, 4 = น้ำกลั่น, 5 = Gentamicin cream)



รูปที่ 44 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชัน (1 = ครีมน้ำผึ้ง, 2 = ยาพื้นครีม, 3 = น้ำผึ้งดอกงา 0.3 g/ml, 4 = น้ำกลั่น, 5 = Gentamicin cream)



รูปที่ 45 แสดงโซนใสของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชัน (1 = ครีมน้ำผึ้ง, 2 = ยาพื้นครีม, 3 = น้ำผึ้งดอกงา 0.3 g/ml, 4 = น้ำกลั่น, 5 = Gentamicin cream)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953

น้ำผึ้งดอกลำไย และน้ำผึ้งดอกงามีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำกลั่น ($p\text{-value} < 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 13.70±1.54 มิลลิเมตร และ 12.81±1.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมี positive control คือ penicillin G 10 units ซึ่งมีโซนใสเท่ากับ 33.83±5.23 มิลลิเมตร และพบว่าน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงา มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 (MIC) เท่ากับ 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.15 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ น้ำผึ้งที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นครีมน้ำผึ้งต่อไป คือ น้ำผึ้งดอกงา

2. ผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953

พบว่าน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีขนาดโซนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.433$ และ $p\text{-value} = 0.626$ ตามลำดับ) รวมถึงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าน้ำผึ้งดอกลำไยและน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังให้ความร้อน มีขนาดโซนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p\text{-value} = 0.435$ และ $p\text{-value} = 0.931$ ตามลำดับ) แต่เมื่อมาทำการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 (MIC) พบว่าความร้อนมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ โดยทำให้ค่า MIC มีค่าสูงขึ้นเป็น 2 เท่าของ MIC เดิม

3. ผลการเตรียมสูตรตำรับยาพื้นครีมที่เหมาะสม

สูตรตำรับยาพื้นครีมที่มีความเหมาะสมและคุณสมบัติตามที่ต้องการคือ สูตรตำรับที่ใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ, Glyceryl monosterate self-emulsifying (GMS SE) ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของตำรับ ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 แสดงสูตรตำรับยาพื้นครีมใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับ, GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของตำรับ

สาร	ร้อยละของปริมาณสารในสูตรตำรับที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ			
	Span®60 และ Tween®60 4%	**GMS SE 3%**	**GMS SE 4%**	**GMS SE 5%**
Stearic acid	10	10	10	10
Spermaceti	5	5	5	5
Mineral oil	7	7	7	7
Cyclomethicone	5	5	5	5
Span®80	1.33	-	-	-
Tween®80	2.66	-	-	-
GMS SE	-	3	4	5
Propylene glycol	5	5	5	5
Paraben concentrate	1	1	1	1
Distilled water	63	64	63	62

3. ผลการพัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งดอกงา

ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสมต่อการใช้ในสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งดอกงา คัดเลือกโดยอาศัยผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ คือมีตำรับที่ใช้สารก่ออิมัลชัน GMS SE ปริมาณร้อยละ 3, ร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของตำรับ (ดังตารางที่ 29) ผ่านการทดสอบความคงตัวเบื้องต้นและทำการผสมน้ำผึ้งขณะที่ร้อนโดยใช้ปริมาณของน้ำผึ้งดอกงาเป็น 2 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 (MIC) คือ 30 กรัม/ยาพื้นครีม 100 กรัม

ตารางที่ 29 แสดงสูตรตำรับยาครีมที่ผสมน้ำผึ้งที่ผ่านในการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953

สาร (%)	ร้อยละของปริมาณสารในสูตรตำรับที่ใช้สารก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ		
	GMS SE 3%	**GMS SE 4%**	**GMS SE 5%**
Stearic acid	10	10	10
Spermaceti	5	5	5
Mineral oil	7	7	7
Cyclomethicone	5	5	5
GMS SE	3	4	5
Propylene glycol	5	5	5
น้ำผึ้งดอกงา	30	30	30
Paraben concentrate	1	1	1
Distilled water	34	33	32

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 ของสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้งกับตัวอย่างครีมที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ

พบว่าครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับ เป็นสารก่ออิมัลชันมีขนาดโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 9.37±0.46 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจากยาพื้นครีมอย่างมีนัยสำคัญ (p-value<0.05) มีค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสกว้างที่สุดเมื่อเทียบกับครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 และร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน จึงเป็นสูตรตำรับที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ต่อไป ส่วนครีมที่มีส่วนผสมของยา gentamicin มีขนาดโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 29.73±0.53 มิลลิเมตร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการหาปริมาณของสารสำคัญที่อยู่ในน้ำผึ้ง โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อจะได้ทราบปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในน้ำผึ้งให้แน่นอนมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสูตรตำรับ และต่อการทดสอบความคงตัวทางเคมีด้วย

2. ควรมีการสกัดเอาเฉพาะสารสำคัญของน้ำผึ้งมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 และนำมาเตรียมครีม เนื่องจากการนำเอาน้ำผึ้งมาใช้โดยตรงจะควบคุมตัวแปรต่างๆได้ยากขึ้น เนื่องจากน้ำผึ้งประกอบด้วยสารหลายชนิด

3. ควรมีการพัฒนาด้านความรู้สึกสัมผัสของผลิตภัณฑ์ให้มีความน่าใช้เพิ่มขึ้น เนื่องจากครีมน้ำผึ้งที่พัฒนานั้นยังคงมีความรู้สึกสัมผัสที่มันและเหนอะหนะพอสมควร ซึ่งจะทำให้เกิดความยอมรับในการใช้งานของคนทั่วไปมากยิ่งขึ้น

4. ควรมีการทดสอบความคงตัวทางกายภาพรัดกุมให้มากขึ้น เนื่องจากการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี heating-cooling cycle นั้นมีข้อจำกัดทางด้านระบบการรักษาความปลอดภัยในการใช้งานห้องปฏิบัติการ ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อเนื่องตามที่ควรจะเป็นได้ ซึ่งอาจส่งผลต่อข้อมูลที่ได้จากผลการทดสอบ

5. ควรมีการทดสอบการระคายเคือง เช่น 24 hour patch test และความพึงพอใจของอาสาสมัครสุขรูปดี เพื่อให้ได้ข้อมูลการใช้งานจริงจากผู้ใช้ว่าเกิดการระคายเคืองจากการใช้ผลิตภัณฑ์หรือไม่ และผู้ใช้มีความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์มากน้อยแค่ไหน ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ.เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง.โอเดียนสโตร์; 2532

2. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. SOP DMSc การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์ยา. [Online]. 2012 [cited 2012 Oct 21]; [5 screens]. Available from: http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/drug/km/

3. Adams CJ, Boult CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, et al. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res*. 2008; 343: 651–9.

4. Adams CJ, Manley HM, Molan PC. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. *Carbohydr Res*. 2009; 344 : 1050–3.

5. Adcock D. The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *J Apicult Res*. 1962; 1: 38–40.

6. Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*. 1991; 43: 817–22.

7. Allen KL, Hutchinson G, Molan PC. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World Healing Congress, Melbourne, Australia. 2000; 10-13.

8. Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48(2):244-52.

9. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 61-143.

10. Anzai H, Stanley JR, Amagai M. Production of low titers of anti-desmoglein 1 IgG autoantibodies in some patients with staphylococcal scalded skin syndrome. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(9): 2139-41.

11. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society Microbiology; 2003. p. 384-404.

12. Bass JW, Chan DS, Creamer KM, et al. Comparison of oral cephalexin, topical mupirocin and topical bacitracin for treatment of impetigo. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; 16(7): 708-10.

13. Basualdo C, Sgroy V, Finola MS, Juam M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Vet Microbiol*. 2007; 124: 375-81.

14. Benson HJ. Microbiological applications. 6th ed. Dubuque (IA): Wm. C. Brown Publishers; 1994.

15. Berger TG: Treatment of bacterial, fungal, and parasitic infections in the HIV infected host. *Sem Dermatol.* 1993; 12: 296-300.

16. Bishara J, Golan-Cohen A, Robenshtok E, Leibovici L, Pitlik S. Antibiotic use in patients with erysipelas: a retrospective study. *Isr Med Assoc J*. 2001; 3(10): 722-4.

17. Blickstad E. The effect of water activity on growth and end-product formation of two Lactobacillus spp. and Brochothrix thermosphacta ATCC 11509T *Appl Microbiol Biotechnol.* 1984; 19: 13-7.

18. Bogdanov S, Martin, P, Lüllmann C. Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie*. 1997: 1-59.

19. Bogdanov, S., Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg*. 1999; 90: 108.

20. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr*. 2008; 27: 677–89.

21. Bosi G, Battaglini M. Gas-chromatographic analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. *J Apic Res*. 1978; 17: 152.

22. Botach GA, Foster TJ. Staphylococcus aureus exotoxins. In Fischetti VA, Novick RP, Feretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. Gram positive pathogen. Washington: ASM press. pp. 367-91.

23. Boyd B, Castañar J. Retapamulin. *Drugs Future*. 2006; 31: 107.

24. Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, Tempst P. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J Biol Chem*. 1994; 269: 28569–75.

25. Cavia MM, Fernandez-Muin MA, Huidobro JF, Sancho MT. Correlation between moisture and water activity of honeys harvested in different years. *J Food Sci*. 2004; 69: 368–70.

26. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10: 781-91.

27. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *J invest dermatol.* 2001; 6(3): 170-4.

28. Clark DC. Common acute hand infections. *Am Fam Physician*. 2003; 68(11): 2167-76.

29. Cole C, Gazewood J. Diagnosis and treatment of impetigo. *Am Fam Physician*. 2007; 75(6): 859-64.

30. Cutting KF. Honey and contemporary wound care: an overview. *Ostomy Wound Manage*. 2007; 53: 49–54.

31. Denton M, O'Connell B, Bernard P, Jarlier V, Williams Z, Henriksen AS. The EPISA study: antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus causing primary or secondary skin and soft

tissue infections in the community in France, the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(3): 586-8.

32. Derby City PCT. Guidelines for the use of Honey in wound management. [online]. 2012 [cited 2012 Nov 4]; [8 screens]. Available form: http://www.derbycitypct.nhs.uk/UserFiles/DocumentsSecure/policies/20100629-G045%20-%20Honey%20Guidelines.pdf

33. Drug and Therapeutics Bulletin. Retapamulin for impetigo and other infections. *Drug Ther Bull.* 2008; 46(10): 76-9.

34. Dyce EJ. Producing finely granulated or creamed honey. In: Crane E, eds. Honey. Crane, Russak and Company, Inc.; 1975.

35. Ellis Simonsen SM, van Orman ER, Hatch BE, et al. Cellulitis incidence in a defined population. *Epidemiol Infect*. 2006; 134(2): 293-9.

36. Foster TJ. The Staphylococcus aureus "superbug". *J Clin Invest*. 2004; 114(12): 1693–6.

37. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J Biol Chem*. 1990; 265: 11333–7.

38. Gelmetti C. Local antibiotics in dermatology. *Dermatol Ther.* 2008; 21(3): 187-95.

39. Geria AN, Schuartz RA. Impetigo Update: New Challenges in the Era of Methicillin Resistance. *Cutis*. 2010; 85(2): 65-70.

40. Global Village Institute for Appropriate Technology. Honey Bees and Beekeeping. [online]. 2012 [cited 2012 Oct 29]; [5 screens]. Available form: http://www.i4at.org/lib2/bees.htm

41. Hanakawa Y, Stanley JR. Mechanisms of blister formation by staphylococcal toxins. *J Biochem*. 2004;136(6):747-50.

42. Hepburn MJ, Dooley DP, Skidmore PJ, Ellis MW, Starnes WF, Hasewinkle WC. Comparison of short-course (5 days) and standard (10 days) treatment for uncomplicated cellulitis. *Arch Intern Med*. 2004; 164(15): 1669-74.

43. Huidobro JF, Sanchez MP, Muniategui S, Sancho MT. Precise method for the measurement of catalase activity in honey. *J AOAC Int*. 2005; 88: 800–4.

44. Humpreys H. Staphylococus. In. Greenwoods D, Slack RCB, Peutherer JF, eds. Medical Microbiology. China; 2002. pp. 168-173.

45. Jacobs MR. Retapamulin: a semisynthetic pleuromutilin compound for topical treatment of skin infections in adults and children. *Future Microbiol*. 2007; 2(6): 591-600.

46. Jones RS. Expert advice on erasing the MRSA threat. *Pract Dermatol*. 2005;34-7.

47. Jones R. Honey and healing through the ages. In Munn P, Jones R, eds. Honey and Healing. Cardiff: International Bee Research Association IBRA; 2001. pp 1–4.

48. Jorup-Ronstrom C. Epidemiological, bacteriological and complicating features of erysipelas. *Scand J Infect Dis*. 1986; 18(6): 519-24.

49. Kingsley A. The use of honey in the treatment of infected wound. *British J Nursing*. 2001; 10: S13-S16.

50. Koning S, van der Wouden JC, Chosidow O, et al. Efficacy and safety of retapamulin ointment as treatment of impetigo: randomized double-blind multicentre placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*. 2008; 158(5): 1077-82.

51. Kuniyuki S, Nakano K, Maekawa N, Suzuki S. Topical antibiotic treatment of impetigo with tetracycline. *J Dermatol*. 2005; 32(10): 788-92.

52. Kwakman PHS, Van den Akker JP, Guclu A, Aslami H, Binnekade JM, de Boer L, et al. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 1677–82.

53. Kwakman PHS, Velde, AAT, Boer LD, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. How honey kills bacteria. *FASEB J*. 2010; 24: 2576–82.

54. Kwakman PHS, Velde AAT, Boer LD, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS One*. 2011; 6(3): e17709.

55. Ladhani S, Robbie S, Garratt RC, Chapple DS, Joannou CL, Evans RW. Development and evaluation of detection systems for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(6): 2050-4.

56. Laurent F, Tristan A, Croze M, et al. Presence of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone (EEFIC) of Staphylococcus aureus in France. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2): 420-1.

57. Lazzarini L, Conti E, Tositti G, de Lalla F. Erysipelas and cellulitis: clinical and microbiological spectrum in an Italian tertiary care hospital. *J Infect*. 2005; 51(5): 383-9.

58. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res*. 2005; 36: 464-7.

59. Marx J. Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice. Vol 1. 5th ed. St. Louis, Mo: Mosby; 2002. p. 529-30.

60. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: 483–9.

61. McLellan AR. Calcium, magnesium, potasium and sodium in honey and in nectar secretion. *J Apic Res*. 1975; 73: 57.

62. Molan PC. The antibacterial nature of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. 1992; 73: 5-28.

63. Molan PC, Cooper RA. Honey and sugar as a dressing for wounds and ulcers. *Trop Doct*. 2000; 30: 249-50.

64. Moulin F, Quinet B, Raymond J, Gillet Y, Cohen R. Managing children skin and soft tissue infections. *Arch Pediatr*. 2008; 15: S62-7.

65. Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol*. 2004; 97: 1–8.

66. Murray PR, Rosenthal KS, Pfalter MA. Staphylococcus and related organisms. In Mandell GI, Bennett JE, Polin R, eds. Medical Microbiology. 5th ed. Edinburgh: Elsevier Mosby; 2005. p.221-236.

67. O'Neill AJ, Larsen AR, Skov R, Henriksen AS, Chopra I. Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(5): 1505-10.

68. Opal S, Petropoulos P, Mikolich D, Ferri F. Ferri's Clinical Advisor: Instant Diagnosis and Treatment. Philadelphia, Pa: Mosby; 2008. p. 667.

69. Pereira de Godoy JM, Azoubel LM, Guerreiro Godoy Mde F. Erysipelas and lymphangitis in patients undergoing lymphedema treatment after breast-cancer therapy. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2009; 18(2): 63-5.

70. Phuapradit W, Saropala N. Sweet salvation. [online]. 2012 [cited 2012 Nov 4]; [3 screens]. Available form: http://ramaclinic.ra.mahidol.ac.th/sweet-salvation/welcome.htm

71. Rajan F. Skin and soft-tissue infections:Classifying and treating a spectrum. *Clev Clin J Med*. 2012; 79(1): 57-66.

72. Rockwell PG. Acute and chronic paronychia. *Am Fam Physician*. 2001; 63(6): 1113-6.

73. Scheinfeld N. A Primer In Topical Antibiotics For The Skin And Eyes. *J Drugs Dermatol*. 2008; 7(4): 409-415.

74. Schepartz AI. Honey catalase: occurance and some kinetic properties. *J Apic Res*. 1966; 5: 167–76.

75. Silverberg N, Block S. Uncomplicated skin and skin structure infections in children: diagnosis and current treatment options in the United States. *Clin Pediatr*. 2008; 47(3): 211-9.

76. Simpson JE, Greenwood SP. Can honey from sugar-fed bees be distinguished from natural honey by its flavour?. *Bee World*. 1975; 55:10.

77. Stephens JM, Schlothauer RC, Morris BD, Yang D, Fearnley L, et al. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chem*. 2010; 120: 78–86.

78. Stulberg DL, Penrod MA, Blatny RA. Common Bacterial Skin Infections. *Am Fam Physician*. 2002; 66(1): 119-23.

79. Subrahmanyam M. Topical application of honey in treatment of burns. *Br J Surg*. 1991; 78: 497–8.

80. Sykes G. Disinfection and sterilization. 2nd ed. London : Soon; 1965.

81. Takenaka T. An α-glucosidase from honey. *Honeybee Sci*. 1980; 1:13.

82. Turnidge JD, Bell JM. Antimicrobial susceptibility on solid media. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 8-60.

83. Van den Berg AJ, Van den Worm E, Van Ufford HC, Halkes SB, Hoekstra MJ, Beukelman CJ. An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *J Wound Care*. 2008; 17: 172-8.

84. Visavadia BG, Honeysett J, Danford MH. Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *Br J Maxillofac Surg*. 2006; 44: 38-41.

85. Weigel KU, Opitz T, Henle T. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Eur Food Res Technol.* 2004; 218: 147–51.

86. White JW, Subers MH, Schepartz, AJ. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochem Biophys Acta*. 1963; 73: 57-70.

87. White, JW. Composition of honey. In Crane E (ed.) Honey. A Comprehensive survey, London: Heinemann Edition; 1975. pp 157-206.

88. White JW. Hydroxymethylfurfural content of honey as an indicator of its adulteration with invert sugars. Bee World. 1980; 61: 29.

89. Wilkinson RD, Carey WD. Topical mupirocin versus topical neosporin in the treatment of cutaneous infections. *Int J Dermatol*. 1988; 27(7): 514-5.

90. Woodford N, Afzal-Shah M, Warner M, Livermore DM. In vitro activity of retapamulin against Staphylococcus aureus isolates resistant to fusidic acid and mupirocin. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(4): 766-8.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.1 การประเมินผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งชนิดต่างๆ โดยการวัดขนาดโซนใส

ตารางที่ 30 แสดงการวิเคราะห์ผลของน้ำผึ้งชนิดต่างๆต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA

➔ **Oneway**

Descriptives

Zone

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Suanjit	5	13.9400	2.87628	1.28631	10.3686	17.5114	10.00	17.80
Longan	5	13.7000	1.53786	.68775	11.7905	15.6095	11.60	15.40
Lychee	5	10.1700	.74297	.33226	9.2475	11.0925	9.00	11.00
Sesame	5	12.8100	1.86628	.83463	10.4927	15.1273	10.00	14.40
Water	5	8.5700	.73451	.32848	7.6580	9.4820	8.10	9.85
Total	25	11.8380	2.67949	.53590	10.7320	12.9440	8.10	17.80

ANOVA

Zone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	111.461	4	27.865	9.159	.000
Within Groups	60.850	20	3.043		
Total	172.311	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Zone

LSD

(I) Honey	(J) Honey	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Suanjit	Longan	.24000	1.10318	.830	-2.0612	2.5412
	Lychee	3.77000*	1.10318	.003	1.4688	6.0712
	Sesame	1.13000	1.10318	.318	-1.1712	3.4312
	Water	5.37000*	1.10318	.000	3.0688	7.6712
Longan	Suanjit	-.24000	1.10318	.830	-2.5412	2.0612
	Lychee	3.53000*	1.10318	.004	1.2288	5.8312
	Sesame	.89000	1.10318	.429	-1.4112	3.1912
	Water	5.13000*	1.10318	.000	2.8288	7.4312
Lychee	Suanjit	-3.77000*	1.10318	.003	-6.0712	-1.4688
	Longan	-3.53000*	1.10318	.004	-5.8312	-1.2288
	Sesame	-2.64000*	1.10318	.027	-4.9412	-.3388
	Water	1.60000	1.10318	.162	-.7012	3.9012
Sesame	Suanjit	-1.13000	1.10318	.318	-3.4312	1.1712
	Longan	-.89000	1.10318	.429	-3.1912	1.4112
	Lychee	2.64000*	1.10318	.027	.3388	4.9412
	Water	4.24000*	1.10318	.001	1.9388	6.5412
Water	Suanjit	-5.37000*	1.10318	.000	-7.6712	-3.0688
	Longan	-5.13000*	1.10318	.000	-7.4312	-2.8288
	Lychee	-1.60000	1.10318	.162	-3.9012	.7012
	Sesame	-4.24000*	1.10318	.001	-6.5412	-1.9388

*. The mean difference is significant at the .05 level.

2. การศึกษาผลของความร้อนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้ง

2.1 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งหลังผ่านความร้อน โดยใช้วิธี Agar diffusion method

ตารางที่ 31 แสดงการวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำผึ้งดอกลำไยโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test

T-Test

Group Statistics

	Longan_60	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Zone	Before	4	13.9250	1.49972	.74986
	After	4	12.9000	1.92527	.96264

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Zone	Equal variances assumed	.257	.630	.840	6	.433	1.02500	1.22023	-1.96079	4.01079
	Equal variances not assumed			.840	5.661	.435	1.02500	1.22023	-2.00468	4.05468

ตารางที่ 32 แสดงการวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกงาโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test

T-Test

Group Statistics

	Sesame_60	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Zone	Before	4	13.2875	1.09116	.54558
	After	4	13.7750	1.55430	.77715

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Zone	Equal variances assumed	1.575	.256	-.513	6	.626	-.48750	.94953	-2.81093	1.83593
	Equal variances not assumed			-.513	5.379	.628	-.48750	.94953	-2.87750	1.90250

ตารางที่ 33 แสดงการวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกลำไยโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test

T-Test

Group Statistics

	Longan_70	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Zone	Before	5	14.5900	2.39176	1.06963
	After	5	13.4700	1.88368	.84241

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Zone	Equal variances assumed	.330	.582	.823	8	.435	1.12000	1.36152	-2.01968	4.25968
	Equal variances not assumed			.823	7.583	.436	1.12000	1.36152	-2.04995	4.28995

ตารางที่ 34 แสดงการวิเคราะห์ผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ของน้ำผึ้งดอกงาโดยใช้สถิติ Independent-Samples T Test

T-Test

Group Statistics

	Sesame_70	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Zone	Before	5	13.0400	4.30964	1.92733
	After	5	12.7900	.69857	.31241

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Zone	Equal variances assumed	8.677	.019	.128	8	.901	.25000	1.95249	-4.25244	4.75244
	Equal variances not assumed			.128	4.210	.904	.25000	1.95249	-5.06595	5.56595

3. การตั้งสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus ATCC 25923* บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

3.1 การพัฒนาสูตรตำรับยาพื้นครีม

ตารางที่ 35 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่พัฒนาได้โดยใช้ Span®60 และ Tween®60 เป็นสารก่ออิมัลชัน

สูตรตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ				ลักษณะสัมผัส			
	สี	กลิ่น	การแยกชั้น	เนื้อครีม	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การซึมผ่านผิว	การเกิดปื้นขาว
1	0	Wax	0	เนียนนุ่ม มันวาว เล็กน้อย	+3	+4	+1	+4

หมายเหตุ 0 = น้อยที่สุด, +1 = น้อยมาก, +2 =น้อย, +3 = ปานกลาง, +4 มาก, +5 = มากที่สุด

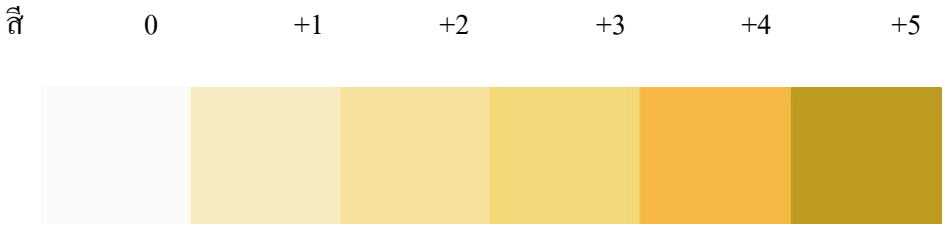
สี 0 +1 +2 +3 +4 +5

ตารางที่ 36 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่ใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะปกติ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

สูตรตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ				ลักษณะสัมผัส			
	สี	กลิ่น	การแยกชั้น	เนื้อครีม	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การซึมผ่านผิว	การเกิดปื้นขาว
1 (ST60 3%)	0	Wax	0	หยาบมีเม็ดมาก	+3	+4	+1	+4
2 (ST60 4%)	0	Wax	0	หยาบมีเม็ดปานกลาง	+3	+4	+1	+4
3 (ST60 5%)	0	Wax	0	หยาบมีเม็ดปานกลาง	+3	+4	+1	+4
4 (ST80 3%)	0	Wax	+4	หยาบมีเม็ดมาก	-	-	-	-
5 (ST80 4%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+4	+3	+3
6 (ST80 5%)	0	Wax	+4	หยาบมีเม็ดมาก	-	-	-	-
7 (GMSSE 3 %)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+4	+3	+3
8 (GMSSE 4%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+3	+3	+3
9 (GMSSE5%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+3	-+3	+3
10 (BB 3%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+4	+2	+3
11 (BB 4%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+4	+2	+4
12 (BB 5%)	0	Wax	0	เนียนนุ่ม	+2	+4	+2	+4

หมายเหตุ 0 = น้อยที่สุด, +1 = น้อยมาก, +2 =น้อย, +3 = ปานกลาง, +4 มาก, +5 = มากที่สุด,

- = ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากครีมไม่คงตัวหลังเตรียมเสร็จ



ตารางที่ 37 แสดงผลการประเมินยาพื้นครีมที่ใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ หลังทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง

สูตรตำรับที่	รอบที่						หมายเหตุ
	1	2	3	4	5	6	
1 (ST60 3%)	✓	✓	✓	✓	✓	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 6
2 (ST60 4%)	✓	✓	✓	✓	✓	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 6
3 (ST60 5%)	✓	✓	✓	✓	✓	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 6
5 (ST80 4%)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
7 (GMSSE 3 %)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
8 (GMSSE 4%)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
9 (GMSSE5%)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
10 (BB 3%)	✓	✓	✓	✓	✓	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 6
11 (BB 4%)	✓	✓	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 3
12 (BB 5%)	✓	✓	✓	✓	✓	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 6

หมายเหตุ NC (No change) = ไม่เปลี่ยนแปลงจากการประเมินก่อนหน้า

ตารางที่ 38 แสดงค่าความหนืดของยาพื้นครีมก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง

สูตรตำรับที่	ความหนืดก่อนการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)			ความหนืดหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1 (ST60 3%)	800	881.5	751.8	-	-	-
2 (ST60 4%)	851.1	816.0	874.2	-	-	-
3 (ST60 5%)	951.7	1010.0	1006.0	-	-	-
4 (ST80 3%)	-	-	-	-	-	-
5 (ST80 4%)	1503.0	1509.0	1507.0	2180.0	2070.0	2110.0
6 (ST80 5%)	-	-	-	-	-	-
7 (GMSSE 3 %)	745.4	742.9	766.4	652.3	716.0	662.2
8 (GMSSE 4%)	1690.0	1602.0	1556.	2003.0	2020.0	2041.0
9 (GMSSE5%)	1792.0	1906.0	1816.0	2145.0	2091.0	1951.0
10 (BB 3%)	1484.0	1400.0	1413.0	-	-	-
11 (BB 4%)	1609.0	1710.0	1731.0	-	-	-
12 (BB 5%)	2454.0	2543.0	2269	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากครีมไม่ผ่านการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง

ตารางที่ 39 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	ST80_4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	1506.333	3.0551	1.7638
	After	3	2120.000	55.6776	32.1455

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	6.100	.069	-19.062	4	.000	-613.6667	32.1939	-703.0511	-524.2822
	Equal variances not assumed			-19.062	2.012	.003	-613.6667	32.1939	-751.3942	-475.9392

ตารางที่ 40 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_3	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	751.567	12.9067	7.4517
	After	3	676.833	34.2786	19.7908

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	4.584	.099	3.534	4	.024	74.7333	21.1472	16.0194	133.4473
	Equal variances not assumed			3.534	2.556	.050	74.7333	21.1472	.3096	149.1571

ตารางที่ 41 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	1616.000	68.0882	39.3107
	After	3	2021.333	19.0351	10.9899

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	3.612	.130	-9.930	4	.001	-405.3333	40.8180	-518.6623	-292.0043
	Equal variances not assumed			-9.930	2.311	.006	-405.3333	40.8180	-560.1602	-250.5064

ตารางที่ 42 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของยาพื้นครีมที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_5	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	1838.000	60.0999	34.6987
	After	3	2062.333	100.1266	57.8081

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	1.093	.355	-3.327	4	.029	-224.3333	67.4224	-411.5279	-37.1388
	Equal variances not assumed			-3.327	3.276	.039	-224.3333	67.4224	-429.0422	-19.6245

3.2 การพัฒนาสูตรตำรับครีมรักษาแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus ATCC 25923* บริเวณผิวหนังจากน้ำผึ้ง

ตารางที่ 43 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้ง ที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ (ก่อนทดสอบสภาวะเร่ง)

สูตรตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ				ลักษณะสัมผัส			
	สี	กลิ่น	การแยกชั้น	เนื้อครีม	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การซึมผ่านผิว	การเกิดปื้นขาว
13 (NST80 4%)	+3	น้ำผึ้ง	0	เนื้อหยาบ	+4	+3	+4	0
14 (NGMSSE 3 %)	-	-	+5	-	-	-	-	-
15 (NGMSSE 4%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนื้อหยาบ	+3	+4	+4	0
16 (NGMSSE5%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
17 (50%ST80 4%)	+3	น้ำผึ้ง	0	เนื้อหยาบ	+4	+3	+4	0
18 (50%GMSSE 3 %)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
19 (50%GMSSE 4%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
20 (50%GMSSE5%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
21 (HST80 4%)	+3	น้ำผึ้ง	0	เนื้อหยาบ	+4	+4	+4	0
22 (HGMSSE 3 %)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
23 (HGMSSE 4%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0
24 (HGMSSE5%)	+1	น้ำผึ้ง	0	เนียนนุ่ม	+3	+4	+4	0

หมายเหตุ 0 = น้อยที่สุด, +1 = น้อยมาก, +2 =น้อย, +3 = ปานกลาง, +4 มาก, +5 = มากที่สุด,
- = ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากครีมไม่คงตัวหลังเตรียมเสร็จ

ตารางที่ 44 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้งที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะเร่ง (45 องศาเซลเซียส)

สูตรตำรับที่	รอบที่						หมายเหตุ
	1	2	3	4	5	6	
13 (NST80 4%)	×	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความเย็น Cycle 1
15 (NGMSSE 4%)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle 2
16 (NGMSSE5%)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความเย็น Cycle 2
17 (50%ST80 4%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
18 (50%GMSSE 3 %)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
19 (50%GMSSE 4%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
20 (50%GMSSE5%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
21 (HST80 4%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
22 (HGMSSE 3 %)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
23 (HGMSSE 4%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1
24 (HGMSSE5%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle1

ตารางที่ 45 แสดงผลการประเมินครีมน้ำผึ้งที่ใช้ปริมาณน้ำผึ้ง 2 เท่าของค่า MIC โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารก่ออิมัลชันต่างๆ ที่สภาวะเร่ง (40 องศาเซลเซียส)

สูตรตำรับที่	รอบที่						หมายเหตุ
	1	2	3	4	5	6	
13 (NST80 4%)	×	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความเย็น Cycle 1
15 (NGMSSE 4%)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความเย็น Cycle 2
16 (NGMSSE5%)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle 2
17 (50%ST80 4%)	×	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle1
18 (50%GMSSE 3 %)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle 2
19 (50%GMSSE 4%)	✓	×	×	×	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle 2
20 (50%GMSSE5%)	✓	✓	✓	✓	×	×	แยกชั้นหลังผ่านความร้อน Cycle 5
21 (HST80 4%)	×	×	×	×	×	×	เหลวหลังผ่านความร้อน Cycle 1
22 (HGMSSE 3 %)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
23 (HGMSSE 4%)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC
24 (HGMSSE5%)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	NC

หมายเหตุ NC (No change) = ไม่เปลี่ยนแปลงจากการประเมินก่อนหน้า

ตารางที่ 46 แสดงค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง

สูตรตำรับที่	ความหนืดก่อนการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)			ความหนืดหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
13 (NST80 4%)	1401.0	1220.0	1318.0	-	-	-
14 (NGMSSE 3 %)	1713.0	1851.0	1623.0	-	-	-
15 (NGMSSE 4%)	-	-	-	-	-	-
16 (NGMSSE5%)	3190.0	3237.0	3396.0	-	-	-
17 (50%ST80 4%)	715.9	728.9	710.1	-	-	-
18 (50%GMSSE 3 %)	3370.0	3367.0	3727.0	-	-	-
19 (50%GMSSE 4%)	2920.0	3232.0	2848.0	-	-	-
20 (50%GMSSE5%)	3414.0	3103.0	2859.0	-	-	-
21 (HST80 4%)	899.6	835.8	949.5	-	-	-
22 (HGMSSE 3 %)	2457.0	2462.0	2452.0	1231.0	1248.0	1170.0
23 (HGMSSE 4%)	3449.0	3193.0	3538.0	1327.0	1377.0	1397.0
24 (HGMSSE5%)	2756.0	2939.0	2557.0	1869.0	1954.0	2092.0

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากครีมไม่ผ่านการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง

ตารางที่ 47 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_3	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	2457.000	5.0000	2.8868
	After	3	1216.333	41.0163	23.6807

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	8.779	.041	52.006	4	.000	1240.6667	23.8560	1174.4317	1306.9017
	Equal variances not assumed			52.006	2.059	.000	1240.6667	23.8560	1140.8092	1340.5241

ตารางที่ 48 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	3393.333	179.1098	103.4091
	After	3	1367.000	36.0555	20.8167

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	6.167	.068	19.210	4	.000	2026.3333	105.4835	1733.4641	2319.2026
	Equal variances not assumed			19.210	2.162	.002	2026.3333	105.4835	1603.5263	2449.1403

ตารางที่ 49 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของตำรับเป็นสารก่ออิมัลชัน ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	GMSSE_5	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	2750.667	191.0558	110.3061
	After	3	1971.667	112.5448	64.9778

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	.494	.521	6.085	4	.004	779.0000	128.0217	423.5548	1134.4452
	Equal variances not assumed			6.085	3.239	.007	779.0000	128.0217	388.0579	1169.9421

ตารางที่ 50 แสดงค่าความหนืดของน้ำผึ้งก่อนและหลังการให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

น้ำผึ้ง	**ความหนืดก่อนการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)**			**ความหนืดหลังการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะเร่ง (centipoise)**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
น้ำผึ้งจากดอกงา	5857.0	5710.0	5812.0	3367.0	3523.0	3547.0

ตารางที่ 51 แสดงการวิเคราะห์ค่าความหนืดของน้ำผึ้งดอกงาก่อนและหลังผ่านความร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยใช้สถิติ independent samples T-test

T-Test

Group Statistics

	Honey	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Before	3	5793.000	75.3193	43.4856
	After	3	3479.000	97.7343	56.4269

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viscosity	Equal variances assumed	.494	.521	32.482	4	.000	2314.0000	71.2390	2116.2087	2511.7913
	Equal variances not assumed			32.482	3.756	.000	2314.0000	71.2390	2111.0409	2516.9591

4. การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสูตรตำรับครีมน้ำผึ้งกับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar diffusion method

ตารางที่ 52 แสดงการวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 3 ของสูตรตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA

➔ **Oneway**

Descriptives

Zone

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Honey cream GMS SE 3%	3	9.3667	.46458	.26822	8.2126	10.5207	9.05	9.90
Cream base GMS SE 3%	3	7.7500	.27839	.16073	7.0584	8.4416	7.45	8.00
Honey 30%	3	9.0167	.02887	.01667	8.9450	9.0884	9.00	9.05
Water	3	8.3667	.55076	.31798	6.9985	9.7348	8.00	9.00
Gentamicin	3	29.7333	.52994	.30596	28.4169	31.0498	29.25	30.30
Total	15	12.8467	8.76565	2.26328	7.9924	17.7009	7.45	30.30

ANOVA

Zone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1073.956	4	268.489	1528.400	.000
Within Groups	1.757	10	.176		
Total	1075.712	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Zone

LSD

(I) Cream	(J) Cream	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Honey cream GMS SE 3%	Cream base GMS SE 3%	1.61667*	.34222	.001	.8542	2.3792
	Honey 30%	.35000	.34222	.331	-.4125	1.1125
	Water	1.00000*	.34222	.015	.2375	1.7625
	Gentamicin	-20.36667*	.34222	.000	-21.1292	-19.6042
Cream base GMS SE 3%	Honey cream GMS SE 3%	-1.61667*	.34222	.001	-2.3792	-.8542
	Honey 30%	-1.26667*	.34222	.004	-2.0292	-.5042
	Water	-.61667	.34222	.102	-1.3792	.1458
	Gentamicin	-21.98333*	.34222	.000	-22.7458	-21.2208
Honey 30%	Honey cream GMS SE 3%	-.35000	.34222	.331	-1.1125	.4125
	Cream base GMS SE 3%	1.26667*	.34222	.004	.5042	2.0292
	Water	.65000	.34222	.087	-.1125	1.4125
	Gentamicin	-20.71667*	.34222	.000	-21.4792	-19.9542
Water	Honey cream GMS SE 3%	-1.00000*	.34222	.015	-1.7625	-.2375
	Cream base GMS SE 3%	.61667	.34222	.102	-.1458	1.3792
	Honey 30%	-.65000	.34222	.087	-1.4125	.1125
	Gentamicin	-21.36667*	.34222	.000	-22.1292	-20.6042
Gentamicin	Honey cream GMS SE 3%	20.36667*	.34222	.000	19.6042	21.1292
	Cream base GMS SE 3%	21.98333*	.34222	.000	21.2208	22.7458
	Honey 30%	20.71667*	.34222	.000	19.9542	21.4792
	Water	21.36667*	.34222	.000	20.6042	22.1292

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 53 แสดงการวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 4 ของสูตรตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA

Oneway

Descriptives

Zone

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Honey cream GMS SE 4%	3	8.5667	.37859	.21858	7.6262	9.5071	8.30	9.00
Cream base GMS SE 4%	3	7.4833	.50083	.28916	6.2392	8.7275	7.00	8.00
Honey 30%	3	9.0000	.56789	.32787	7.5893	10.4107	8.60	9.65
Water	3	8.0333	.18930	.10929	7.5631	8.5036	7.90	8.25
Gentamicin	3	30.8833	2.62694	1.51667	24.3576	37.4090	29.10	33.90
Total	15	12.7933	9.43540	2.43621	7.5682	18.0185	7.00	33.90

ANOVA

Zone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1231.068	4	307.767	201.067	.000
Within Groups	15.307	10	1.531		
Total	1246.374	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Zone

LSD

(I) Cream	(J) Cream	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Honey cream GMS SE 4%	Cream base GMS SE 4%	1.08333	1.01017	.309	-1.1675	3.3341
	Honey 30%	-.43333	1.01017	.677	-2.6841	1.8175
	Water	.53333	1.01017	.609	-1.7175	2.7841
	Gentamicin	-22.31667*	1.01017	.000	-24.5675	-20.0659
Cream base GMS SE 4%	Honey cream GMS SE 4%	-1.08333	1.01017	.309	-3.3341	1.1675
	Honey 30%	-1.51667	1.01017	.164	-3.7675	.7341
	Water	-.55000	1.01017	.598	-2.8008	1.7008
	Gentamicin	-23.40000*	1.01017	.000	-25.6508	-21.1492
Honey 30%	Honey cream GMS SE 4%	.43333	1.01017	.677	-1.8175	2.6841
	Cream base GMS SE 4%	1.51667	1.01017	.164	-.7341	3.7675
	Water	.96667	1.01017	.361	-1.2841	3.2175
	Gentamicin	-21.88333*	1.01017	.000	-24.1341	-19.6325
Water	Honey cream GMS SE 4%	-.53333	1.01017	.609	-2.7841	1.7175
	Cream base GMS SE 4%	.55000	1.01017	.598	-1.7008	2.8008
	Honey 30%	-.96667	1.01017	.361	-3.2175	1.2841
	Gentamicin	-22.85000*	1.01017	.000	-25.1008	-20.5992
Gentamicin	Honey cream GMS SE 4%	22.31667*	1.01017	.000	20.0659	24.5675
	Cream base GMS SE 4%	23.40000*	1.01017	.000	21.1492	25.6508
	Honey 30%	21.88333*	1.01017	.000	19.6325	24.1341
	Water	22.85000*	1.01017	.000	20.5992	25.1008

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 54 แสดงการวิเคราะห์ผลของครีมน้ำผึ้งที่ใช้ GMS SE ปริมาณร้อยละ 5 ของสูตรตำรับเป็นสารก่ออิมัลชันต่อโซนใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้สถิติ One way ANOVA

Oneway

Descriptives

Zone

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Honey cream GMS SE 5%	3	9.0167	.51072	.29486	7.7480	10.2854	8.65	9.60
Cream base GMS SE 5%	3	7.7167	.27538	.15899	7.0326	8.4007	7.40	7.90
Honey 30%	3	9.1667	.42525	.24552	8.1103	10.2230	8.85	9.65
Water	3	8.5000	.67639	.39051	6.8198	10.1802	7.80	9.15
Gentamicin	3	28.4667	1.11393	.64313	25.6995	31.2338	27.75	29.75
Total	15	12.5733	8.26148	2.13311	7.9983	17.1484	7.40	29.75

ANOVA

Zone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	951.098	4	237.774	536.535	.000
Within Groups	4.432	10	.443		
Total	955.529	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Zone

LSD

(I) Cream	(J) Cream	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Honey cream GMS SE 5%	Cream base GMS SE 5%	1.30000*	.54355	.038	.0889	2.5111
	Honey 30%	-.15000	.54355	.788	-1.3611	1.0611
	Water	.51667	.54355	.364	-.6944	1.7278
	Gentamicin	-19.45000*	.54355	.000	-20.6611	-18.2389
Cream base GMS SE 5%	Honey cream GMS SE 5%	-1.30000*	.54355	.038	-2.5111	-.0889
	Honey 30%	-1.45000*	.54355	.024	-2.6611	-.2389
	Water	-.78333	.54355	.180	-1.9944	.4278
	Gentamicin	-20.75000*	.54355	.000	-21.9611	-19.5389
Honey 30%	Honey cream GMS SE 5%	.15000	.54355	.788	-1.0611	1.3611
	Cream base GMS SE 5%	1.45000*	.54355	.024	.2389	2.6611
	Water	.66667	.54355	.248	-.5444	1.8778
	Gentamicin	-19.30000*	.54355	.000	-20.5111	-18.0889
Water	Honey cream GMS SE 5%	-.51667	.54355	.364	-1.7278	.6944
	Cream base GMS SE 5%	.78333	.54355	.180	-.4278	1.9944
	Honey 30%	-.66667	.54355	.248	-1.8778	.5444
	Gentamicin	-19.96667*	.54355	.000	-21.1778	-18.7556
Gentamicin	Honey cream GMS SE 5%	19.45000*	.54355	.000	18.2389	20.6611
	Cream base GMS SE 5%	20.75000*	.54355	.000	19.5389	21.9611
	Honey 30%	19.30000*	.54355	.000	18.0889	20.5111
	Water	19.96667*	.54355	.000	18.7556	21.1778

*. The mean difference is significant at the .05 level.