

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ส่วนผสมของสารสกัดพลูและฝางแบบเสริมฤทธิ์สำหรับต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 เทคโนโลยีชีวภาพหรือเภสัชศาสตร์ ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ “ส่วนผสมของสารสกัดพลูและฝางแบบเสริมฤทธิ์สำหรับต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม”

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคทางทันตกรรมที่ทุกคนกำลังประสบอยู่และเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศในโลกปัจจุบัน คือ โรคฟันผุ (dental caries) และ โรคเหงือกอักเสบ (gingivitis)

- 10 โรคฟันผุคือโรคที่เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อแข็งของฟันซึ่งสามารถเกิดขึ้นที่บริเวณใดของฟันก็ได้และสามารถพบได้ตั้งแต่ฟันน้ำนมไปจนถึงฟันแท้ทั้งยังสามารถเกิดได้ทันทีที่ตัวฟันเริ่มโผล่ขึ้นสู่ช่องปาก โรคฟันผุในระยะแรกเริ่มผู้ป่วยจะยังไม่มีอาการใดๆ แต่เมื่อฟันผุลึกกลืนลึกลงไปถึงชั้นเนื้อฟัน (dentin) จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการเสียวฟันและปวดฟันมากขึ้นเรื่อย ๆ ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาจะทำให้รอยผุในชั้นเนื้อฟันลุกลามต่อจนทะลุเข้าโพรงฟันซึ่งเป็นที่อยู่ของเส้นเลือดและเส้นประสาทที่มาหล่อเลี้ยงฟันเกิดเป็นการอักเสบติดเชื้อทำให้เกิด
- 15 ความเจ็บปวดอย่างรุนแรงจนไม่สามารถทานอาหารได้ ทำให้สุขภาพร่างกายอ่อนแอลง เชื้อจะลุกลามต่อไปตามคลองรากฟันและเส้นเลือดทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นอันตรายถึงชีวิตได้

- ส่วนโรคเหงือกอักเสบเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากการหมักของเศษอาหาร โดยเฉพาะที่เผ็ดร้อนหรือที่สามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเหงือก รวมถึงการที่เหงือกถูกกระทบโดยวัตถุที่แหลมคมหรือแข็งจนเกิดการระคายเคืองหรือเกิดเป็นบาดแผล เป็นต้น สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งของการเกิดเหงือกอักเสบใน
- 20 ผู้ใหญ่หรือผู้สูงอายุ คือการใส่ฟันเทียม (denture stomatitis) ซึ่งโดยปกติจะเกิดการอักเสบบริเวณเนื้อเยื่อในช่องปากบริเวณที่รองรับฐานฟันเทียม ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมชนิดถอดได้ โรคเหงือกอักเสบในระยะแรกผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการเจ็บปวด แต่เมื่อการอักเสบมากขึ้นจะเห็นรอยโรคจะมีลักษณะบวมแดงกระจายตามบริเวณที่ใส่ฟันเทียม ความรุนแรงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อทำให้เกิดความเจ็บปวดอย่างรุนแรงจนไม่สามารถทานอาหารได้ ทำให้สุขภาพร่างกายอ่อนแอลง เชื้อจะลุกลามต่อไปอย่างรวดเร็วและมีโอกาสติดเชื้อใน
- 25 กระแสเลือดเป็นอันตรายถึงชีวิตได้เช่นกัน เชื้อที่ทำให้เกิดฟันผุและเหงือกอักเสบอย่างรุนแรงเป็นกลุ่มเชื้อสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) โดยเฉพาะเชื้อ *Streptococcus mutans* ร่วมกับเชื้อราในกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) โดยเฉพาะเชื้อ *Candida albicans* การรักษาในปัจจุบันทำโดยการใช้อย่างยาคีราและเชื้อราที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ทั้งสิ้น ซึ่งยาเหล่านี้มีข้อเสียคือการรักษาต้องใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้ตัวยาเกิดการสะสมในร่างกายเกิดความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงกับร่างกายได้

ในขณะเดียวกัน ผู้คนในโลกกำลังให้ความสนใจต่อระบบสีเขียว (green system) หรือการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อความปลอดภัยและยั่งยืน ผู้ประดิษฐ์ได้พิจารณาถึงพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ด้านเชื้อก่อโรคเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีเหล่านี้ ภายใต้ผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการ “การพัฒนาผลิตภัณฑ์นาโนบรรจุสารสกัดจากพลูและฝางเพื่อรักษาโรคทางทันตกรรม” เลขที่สัญญา

5 CRP6705031490 จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) เป็นการนำสารออกฤทธิ์หลายชนิดมาผสมรวมกัน ซึ่งสารผสมที่ได้ อาจเกิดการเพิ่มหรือลดฤทธิ์กันได้

การเพิ่มฤทธิ์กันมี 2 แบบ คือเพิ่มแบบธรรมดา (addition) ซึ่งเขียนเป็นสมการได้เป็น $1+1=2$ และเพิ่มแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ซึ่งเขียนเป็นสมการได้เป็น $1+1>2$ ซึ่งการใช้สารสกัดต่างชนิดกันเพื่อเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กันนี้ จะก่อเกิดประโยชน์ด้านเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้ออย่างมาก และในเวลาเดียวกัน

10 สามารถชะลอการพัฒนาการื้อยาของเชื้อก่อโรคได้ด้วย เนื่องจากสามารถลดขนาดที่ใช้ลงได้

จากการเปิดเผยข้อมูลปัจจุบันได้ปรากฏข้อมูลของ พลู ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper betle* เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) เป็นไม้เลื้อยเขียวช่อมตลอดปี เติบโตได้ดีในอากาศเขตร้อนชื้นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และใช้เป็นยาแผนโบราณกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย จีน และประเทศทางตะวันตกอีกหลายแห่ง จากภูมิปัญญาพื้นบ้าน พลูมีสรรพคุณในการบำบัด

15 โรคได้หลายอย่าง มีการใช้ใบพลูเพื่งล้างและใช้ร่วมกับพืชสมุนไพรอื่น ใบพลูมีกลิ่นหอมนิยมใช้เคี้ยวเพื่อดับกลิ่นปากและช่วยขับลม น้ำเชื้อและขับเสมหะ และช่วยในการย่อยอาหารโดยกระตุ้นการหลั่งน้ำลายและทำให้กรดส่วนเกินเป็นกลาง ตามที่กล่าวไว้ในเอกสารทางวิชาการของ Loranty, A และคณะ “Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas” ในวารสาร J

Food Compos Anal ฉบับที่ 23(5) พ.ศ. 2553 และเอกสารทางวิชาการของ Yang, J และ Chou, C “Antimicrobial

20 activity of various solvent extracts of betel quid ingredients” ในวารสาร Chemistry Abstracts ฉบับที่ 128 พ.ศ. 2540 ได้เปิดเผยถึงสารสำคัญหลายชนิดในใบพลูที่มีฤทธิ์ด้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น ยูจีนอล (eugenol) ชาวิเบโตล อะซิเตท (chavibetol acetate) ไฮดรอกซีชาวิกอล (hydroxychavicol) กรดไขมัน (fatty acids) เช่น กรดสเตียริก (stearic) และกรดปาล์มมิติ (palmitic) และ เอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl fatty acid esters) ได้แก่ สเตียริก (stearic) ปาล์มมิติค (palmitic) และไมริสติก (myristic) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถ

25 ทำลายผนังเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อได้ สอดคล้องกับเอกสารทางวิชาการของ Phumat, P และคณะ “Effects of Piper betle fractionated extracts on inhibition of Streptococcus mutans and Streptococcus intermedius” ในวารสาร Drug Discoveries & Therapeutics ฉบับที่ 12(3) พ.ศ. 2561 ได้เปิดเผยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบที่มีปริมาณมากและเป็นสารออกฤทธิ์หลักของพลู คือ 4-แอลลิลไพโรแคเทคคอล (4-allylpyrocatechol)

เชื้อแบคทีเรียที่เป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดโรคฟันผุมากที่สุดคือ *S. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถสร้างกรดในปริมาณสูง และสามารถสังเคราะห์กลูแคน (glucans) จากซูโครสที่เร่งปฏิกิริยาโดยไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase: GTFs) ซึ่ง กลูแคน (glucans) มีฤทธิ์โดยตรงในการเพิ่ม

30

ความสามารถในการเกาะติดฟันและผลิตรกรดของ *S. mutans* ให้มีปริมาณมากจนมี pH ต่ำถึง 4.0 หรือต่ำกว่า ตามที่ได้กล่าวไว้ในเอกสารทางวิชาการของ Sturr, MG และ Marquis, RE “Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria” ในวารสาร Appl. Environ. Microbiol. ฉบับที่ 58 พ.ศ. 2535

- 5 นอกจากนี้ยังได้มีการเปิดเผยแล้วว่าสารสกัดจากพลูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) ได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังที่กล่าวไว้ในวารสารทางวิชาการของ Phumat, P และคณะ เรื่อง “Effects of Piper betle fractionated extracts on inhibition of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*” ในวารสาร Drug Discoveries & Therapeutics ฉบับที่ 12(3) พ.ศ. 2561 และในเอกสารทางวิชาการของ Razak, FA และ Rahim, ZHA “The antiadherence effect of Piper betle L. and Psidium guajava extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces” ในวารสาร J. Oral Sci. ฉบับที่ 45 พ.ศ. 2546 ได้เปิดเผยถึงฤทธิ์ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกาะติดฟันของคราบ plaque ที่เพิ่งเริ่มก่อตัว ในส่วนของการยับยั้งการเกาะติดฟันของ plaque จะช่วยส่งผลให้สภาพแวดล้อมไม่เอื้อต่อการเกาะติดฟันของเชื้อ *S. mutans* จึงเป็นการลดความรุนแรงของ *S. mutans* ได้ทางหนึ่ง มีรายงานว่าสารสกัดพลูสามารถยับยั้งการทำงานของ โกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสทำให้ลดการเกิดกลูแคน (glucans) ซึ่งเป็นสารช่วยในการเกาะติดฟันของ *S. mutans* ถูกเปิดเผยไว้ในเอกสารทางวิชาการของ Nalina, T และ Rahim, Z “The Crude Aqueous Extract of Piper betle L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans*” ในวารสาร American Journal of Biochemistry and Biotechnology ฉบับที่ 3(1) พ.ศ. 2550 ส่งผลให้ *S. mutans* เกาะติดฟันได้ลดลงอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้พบรายงานว่าสารสกัดใบพลูสามารถต้านเชื้อราและต้านการอักเสบได้ และในเอกสารทางวิชาการของ Pelczar, MJ และคณะ ในหนังสือเรื่อง “Microbiology” เมื่อ พ.ศ. 2536 ได้รายงานว่าใบพลูมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ ไฮดรอกซีชาวิกอล (hydroxychavicol) ยูจีนอล (eugenol) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และ เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) ที่ป้องกันการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และ เพอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) ได้ ดังนั้นสารสกัดจากพลูจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารทางเลือกตามธรรมชาติในการป้องกันและรักษาโรคฟันผุและโรคเหงือกอักเสบได้
- 25 ฝาง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Caesalpinia sappan* เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ชัลฟินิเอซี (*Caesalpiniaecaea*) มักเรียกกันทั่วไปว่าบราซิล (Brazil) หรือ ไม้ฝาง (Sappan wood) สามารถพบในประเทศต่างๆในภูมิภาค เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปแอฟริกา ฝางเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อรา ตามการเปิดเผยไว้ในเอกสารทางวิชาการของ Nirmal, NP และ Panichayupakaranant, P “Antioxidant, antibacterial, and antiinflammatory activities of standardized brazilin-rich *Caesalpinia sappan* extract” ในวารสาร Pharm Biol ฉบับที่ 53 พ.ศ. 2558 อีกทั้งในเอกสารทางวิชาการของ Xu, P และคณะ เรื่อง “Separation of Four Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* by High-speed Countercurrent Chromatography” ในวารสาร Phytochem. Anal. ฉบับที่ 23 พ.ศ. 2555 ได้เปิดเผยองค์ประกอบ
- 30

ทางเคมีของฝางมีหลายประเภท ได้แก่ แชนโทน (Xanthone) คูมาริน (Coumarin) แชลโคน (Chalcones) ฟลา
 โวน (Flavones) โฮโมไอโซฟลาโวนอยด์ (Homoisoflavonoids) และ บราซิลลิน (brazilin) ในทางการแพทย์แผน
 จีน บราซิลลิน (brazilin) ใช้ในการรักษาเพิ่มการไหลเวียนโลหิต ส่งเสริมการมีประจำเดือน และระงับปวด
 5 มีรายงานว่า บราซิลลิน (brazilin) มีฤทธิ์หลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา ด้านการอักเสบ ลดน้ำตาล
 ในเลือด ด้านการแพ้ ด้านสิว และด้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ดังนั้น บราซิลลิน (brazilin) จึงเป็นหนึ่งใน
 สารประกอบธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สุดจากฝาง ที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายรวมทั้ง
 ทางการแพทย์และเภสัชกรรม ดังนั้นจึงมีการนำฝางมาพัฒนาเป็นสมุนไพรรักษาโรค โดยสารสกัดจากแก่นฝาง
 ให้สีชมพูอมส้มถึงแดง (sappan red) ซึ่งเป็นสีของบราซิลลิน (brazilin) นั่นเอง และเนื่องจากบราซิลลิน (brazilin)
 ให้สีแดงจึงมีการนำมาแต่งสีแดงของน้ำยาอู่ทอ และใช้เป็นสีปรุงอาหารที่ให้ความปลอดภัย นอกจากนี้ยังใช้เป็น
 10 ส่วนผสมในเครื่องสำอาง ตามที่ได้เปิดเผยไว้ในเอกสารทางวิชาการของ Wetwitayaklung, P และคณะ “The
 antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* L. heartwood in various ages” ในวารสาร Naresuan Univ J. ฉบับที่
 13 พ.ศ. 2548 นอกจากนี้ในเอกสารทางวิชาการของ Kang, SN และคณะ “Antimicrobial and antioxidant
 activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants” ในวารสาร Food Sci Biotechnol ฉบับ
 ที่ 13 พ.ศ. 2547 ได้เปิดเผยว่าสารสกัดจากฝางสามารถต้านแบคทีเรียชนิดอื่นอีกหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia*
 15 *coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*
enterica subspecies enterica serovar Typhimurium, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*,
Lactobacillus plantarum เป็นต้น

จากการสืบค้นสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับพลู พบอนุสิทธิบัตรเลขที่ 21811 ซึ่งเปิดเผยกรรมวิธีการเตรียม
 ผลิตภัณฑ์พอลิเมอร์ไมเซลล์ของสารสกัดพลูเพื่อเพิ่มการละลายในน้ำของสารสกัดจากใบพลู [21811] และ
 20 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับฝาง พบสิทธิบัตรเลขที่ 86910 ซึ่งเปิดเผยสูตรตำรับและกรรมวิธีการผลิตเจลล้างมือที่มี
 ส่วนผสมของสารสกัดฝางเพื่อยับยั้งแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ

สิทธิบัตรญี่ปุ่น เลขที่ JPH09278666A เรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้ (Antimicrobial
 agent and its production) ซึ่งกล่าวถึงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของพลู รวมทั้งวิธีเตรียมสารสกัดจากใบพลู โดยสกัด
 ด้วย เอทานอล (ethanol) หรือ เมทานอล (methanol) โดยจากเอกสารดังกล่าวสามารถยืนยันว่า สารสกัดจากใบ
 25 พลูที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลหรือเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุของโรคเหงือกและฟัน
 ผุได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากเพื่อสุขอนามัยที่ดีได้

สิทธิบัตรฟิลิปปินส์ เลขที่ PH 22010000627 U3 เรื่อง Antimicrobial cream formulation with Piper
 betle essential oil as active ingredient ซึ่งกล่าวถึง การใช้พลูในรูปแบบน้ำมันในสูตรครีม ซึ่งน้ำมันพลูมีฤทธิ์
 ด้านเชื้อราและแบคทีเรีย และสกัดออกมาโดยใช้วิธีการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (steam distillation)

30 สิทธิบัตรระหว่างประเทศ เลขที่ WO 2016/209070 A1 เรื่อง: สูตรตำรับที่มีสารสกัดจากพลูสำหรับ
 ป้องกันและรักษาโรคแบคทีเรียในสัตว์น้ำ (Compositions containing Piper betle extract for prevention and
 treatment of bacterial diseases in aquatic animals) ซึ่งกล่าวถึง การใช้สารสกัดพลูในการป้องกันการติดเชื้อ

แบคทีเรียในปลาจากสิทธิบัตรที่กล่าวมาข้างต้นนี้ จะเห็นได้ว่ามีผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ที่มีเฉพาะสารสกัดพืชเพียงชนิดเดียวเป็นสารออกฤทธิ์หลัก และถึงแม้ว่าจะมีการเปิดเผยการส่วนผสมของสารสกัดพลูร่วมกับสารอื่น ได้แก่

- สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา เลขที่ US 2009/0087501 A1 เรื่อง สูตรสำหรับช่องปากที่ประกอบด้วยสารสกัดจากพืช (Oral composition containing botanical extracts) ได้เปิดเผยถึงสูตรตำรับสำหรับดูแลช่องปาก (Oral composition) ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากพืชหลายชนิด ซึ่งรวมถึง สารสกัดจากพลู (Piper betle) อย่างใดก็ตาม มีข้อสังเกตสำคัญคือ สูตรตำรับนี้ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดจากฝาง (Caesalpinia sappan) และในเอกสารไม่ได้มีการกล่าวอ้างถึงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) ระหว่างสารสกัดต่าง ๆ ที่ใช้

- สิทธิบัตรเกาหลีเลขที่ KR 20040091236 A เรื่อง สูตรยาต้านเชื้อก่อโรคฟันผุที่มีส่วนผสมของฝาง (Drug composition against cariogenic dental pathogen containing *Caesalpinia sappan* L.) ซึ่งได้กล่าวถึงฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากของสารสกัดฝาง ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายหลายๆ ชนิด ได้แก่ น้ำ, เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) บิวทานอล (butanol) และ เมทานอล (methanol) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและการสกัดด้วยเมทานอล (methanol) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ดีที่สุด

- สิทธิบัตรเกาหลีเลขที่ KR 20220096916 A เรื่อง Antimicrobial cosmetic composition comprising *Salvia officinalis* extract *Caesalpinia sappan* bark extract *Houttuynia cordata* extract *Rosmarinus officinalis* extract *Allium scorodorus* extract and *Coptis chinensis* root extract as active ingredients ซึ่งกล่าวถึงการพัฒนาสูตรเครื่องสำอาง (cosmetic) ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้บนผิวหนัง เช่น ป้องกันสิว หรือการติดเชื้อที่ผิวหนัง ที่ประกอบด้วยสารสกัดจากพืช 6 ชนิดเป็นสารออกฤทธิ์ ได้แก่ เสดจ (*Salvia officinalis*) เปลือกฝาง (*Caesalpinia sappan* bark extract) พลู ค ว (Houttuynia cordata) โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) กระเทียมโทน (*Allium scorodorus*) รากโสมเทียม (*Coptis chinensis*) แต่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดพลู

- สิทธิบัตรระหว่างประเทศเลขที่ WO 2016/209070 A1 เรื่อง สูตรตำรับที่มีสารสกัดจากพลูสำหรับป้องกันและรักษาโรคแบคทีเรียในสัตว์น้ำ (Compositions containing Piper betle extract for prevention and treatment of bacterial diseases in aquatic animals) ได้เปิดเผยถึงการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นการนำ สารสกัดจากพลู มาใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ เช่น ปลา, กุ้ง อย่างไรก็ตามในสิทธิบัตรดังกล่าวยังคงเป็นการใช้สารสกัดพลูเพียงชนิดเดียว

- และถึงแม้จะมีการเปิดเผยการประดิษฐ์ในคำขอรับสิทธิบัตรไทย เลขที่ 2101004614 เรื่อง สูตรผสมสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อมเพื่อลดอาการอักเสบของเยื่อเมือก ซึ่งประกอบไปด้วยสารสกัดแก่นฝางและสารสกัดผลมะขามป้อม ซอร์บิแทนโมโนสเตียเรต พอลิออกซิเอทิลีน(20) ซอร์บิแทนโมโนโอเลอेट คอเลสเตอรอล พอลอกซามเมอร์ โซเดียมไคไฮโดรเจนฟอสเฟต ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมคลอไรด์ เอทานอลและน้ำ ซึ่งไม่ได้ผสมกับสารสกัดพลูแต่อย่างใด ตลอดจนไม่มุ่งเน้นถึงฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคใดๆ

สำหรับสารผสมที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบมีเพียงอนุสิทธิบัตรเลขที่ 9519 ซึ่งเปิดเผยสารผสมสำหรับการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อก่อโรคในช่องปาก ที่ประกอบด้วยสารสกัดมะหาดและคลอเฮกซิดีนซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ชนิดหนึ่ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่ายังไม่ปรากฏว่ามีการนำสารสกัดจากพืชต่างชนิดมาผสมรวมกันเพื่อให้เกิดการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม โดยเฉพาะสารผสมที่เกิดจากสารสกัดพลูและสารสกัดฝาง

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาสารผสมจากธรรมชาติเพื่อทดแทนสารเคมีในการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคฟันผุและโรคเหงือกอักเสบ โดยมุ่งเน้นการใช้สารสกัดพลูและสารสกัดฝาง ซึ่งมีองค์ประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อผสมรวมกันสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะเมื่อผสมกันในสัดส่วนที่พอเหมาะแล้ว สารผสมที่ได้จะสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคให้แก่กันและกันได้มากกว่าฤทธิ์ต้านเชื้อของพืชเดี่ยวรวมกัน ซึ่งเรียกการเพิ่มฤทธิ์เช่นนี้ว่าการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergism) ซึ่งได้รับการตรวจพิสูจน์การเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคแบบ synergism ด้วยวิธีการทดสอบต่างๆ ตามหลักการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในหลอดทดลอง (in vitro) ทั้งต่อเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุและเหงือกอักเสบ

ลักษณะของการประดิษฐ์นี้ประกอบด้วยสารสกัดพลูและสารสกัดแผ่นฝาง ในตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว ผสมรวมกันในอัตราส่วนที่สามารถออกฤทธิ์ได้แบบเสริมฤทธิ์ ซึ่งได้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางทันตกรรมได้ดีกว่าสารสกัดเดี่ยว โดยเฉพาะ เชื้อ *Streptococcus mutans* และเชื้อ *Candida albicans* ตามลำดับได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารผสมตามการประดิษฐ์นี้มีประโยชน์ในการพัฒนาต่อยอคให้เป็นผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรมในรูปแบบต่างๆ ต่อไป

รูปและคำอธิบายรูปโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบโครมาโทแกรมเอชพีแอลซี (HPLC chromatogram) ของสารสกัดแยกส่วนชั้นเอทิลอะซิเตทของใบพลู (ก) และสารมาตรฐาน โพร-แอลลีล-ไพโรแคเทคอล (4-allylpyrocatechol) (ข)

รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบโครมาโทแกรมเอชพีแอลซี (HPLC chromatogram) ของสารสกัดแยกส่วนชั้นเอทิลอะซิเตทของฝาง (ก) และของสารมาตรฐานบราซิลลิน (brazilin) (ข)

รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ หรือ เอ็มไอซี (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา หรือ เอ็มเอฟซี (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) ของสารสกัดพลูและฝางต่อเชื้อ *Candida albicans*

รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ หรือ เอ็มไอซี (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือ เอ็มบีซี (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ของสารสกัดพลูและฝางต่อเชื้อ *Streptococcus mutans*

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ส่วนผสมของสารสกัดพลูและฝางแบบเสริมฤทธิ์สำหรับด้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม ตามการประดิษฐ์นี้ มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

5 สารสกัดใบพลูในตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว อัตราส่วน 0.2 ถึง 1 ต่อ สารสกัดฝางในตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว อัตราส่วน 0.02 ถึง 8 และอัตราส่วนที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 0.25 ถึง 0.5 ต่อ 0.1 ถึง 4 ตามลำดับ

ยกตัวอย่างเช่นในสารละลายน้ำของสารผสม 1 มิลลิลิตร มีสารสกัดพลู ที่ได้จากการสกัดและควบคุมมาตรฐานในตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม และสารสกัดฝาง ที่ได้จากการสกัดและควบคุมมาตรฐานในตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว ปริมาณ 4.0 มิลลิกรัม และในสารผสมดังกล่าวอาจมีการเติมสารช่วยละลายลงไปจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้สารผสมอยู่ในรูปสารละลาย

ตัวทำละลายประเภทไม่มีขั้ว ตามการประดิษฐ์นี้ สามารถเลือกใช้ เฮกเซน แอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล คีโตน เอสเทอร์ เช่น เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) บิวทิลอะซิเตท (butyl acetate) และไดคลอโรมีเทน ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือส่วนผสมของสารเหล่านี้

15 สารสกัดสารสกัดใบพลูในชั้นเอทิลอะซิเตท ตามการประดิษฐ์นี้ที่เหมาะสมสามารถเตรียมได้จาก กระบวนการดังนี้

- ก. นำใบพลูสะอาด ทำให้แห้งแล้วป่นเป็นผงละเอียด
- ข. นำผงที่ได้ จากขั้นตอน ก. ปริมาณหนึ่งส่วน หมักกับเฮกเซน (hexane) สามส่วน โดยปริมาตร คนผสมเป็นระยะ จนกระทั่งส่วนผสมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี
- ค. กรองแยกตะกอนจากน้ำหมักในขั้นตอน ข. โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนบนมาหมักซ้ำด้วยเฮกเซน ทำซ้ำตามขั้นตอนนี้ จนกระทั่งได้น้ำหมักครั้งสุดท้ายไม่มีสี จากนั้นจึงนำกากที่ได้ครั้งสุดท้ายไประเหยเพื่อกำจัดเฮกเซน
- ง. นำกากที่ผ่านการระเหยเฮกเซนออกจากขั้นตอน ค. ปริมาณหนึ่งส่วน หมักกับเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาณสามส่วน โดยปริมาตร คนผสมเป็นระยะ จนกระทั่งส่วนผสมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี
- จ. กรองแยกตะกอนจากน้ำหมักในขั้นตอน ง. จากนั้นนำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท และกรองแยกเก็บเฉพาะส่วนน้ำหมัก และนำตะกอนที่ได้หมักซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท ทำซ้ำขั้นตอนนี้ จนกระทั่งได้น้ำหมักครั้งสุดท้ายไม่มีสี
- ช. กำจัดเอทิลอะซิเตท ออกจากน้ำหมักที่ได้จากขั้นตอน จ. ด้วยวิธีการระเหยแห้ง จะได้สารสกัดพลูในชั้นเอทิลอะซิเตท

เพื่อให้เข้าใจการประดิษฐ์ยิ่งขึ้นสามารถอธิบายกระบวนการเตรียมได้ตามตัวอย่างการเตรียมสารสกัดดังต่อไปนี้ นำใบพลูสดมาล้างน้ำให้สะอาด ทำให้แห้งแล้วปั่นเป็นผงละเอียด นำผงที่ได้ 1 ส่วนมาหมักกับเฮกเซน (hexane) 3 ส่วน โดยปริมาตร ทิ้งไว้ 1 คืนพร้อมคนผสมเป็นครั้งคราว สีของส่วนผสมจะเกิดการเปลี่ยนจากสีเป็นสีเข้มขึ้นจนกระทั่งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอีกต่อไป จากนั้นกรองน้ำหมักทิ้งและนำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเฮกเซน ทำเช่นเดิมอีก 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งน้ำหมักไม่มีสี นำกากที่ได้ครั้งสุดท้ายไปประเหยเพื่อกำจัดเฮกเซน นำกากที่ระเหยเฮกเซนออกหมดแล้ว 1 ส่วนมาหมักกับเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) 3 ส่วน ทิ้งไว้ 1 คืนพร้อมคนผสมเป็นครั้งคราว กรองเอาน้ำหมักเก็บไว้ นำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตทเช่นเดิมอีก 4 ครั้ง หรือจนน้ำหมักที่ได้ไม่มีสี นำน้ำหมักของเอทิลอะซิเตทมารวมกัน แล้วนำไปประเหยเพื่อกำจัดเอทิลอะซิเตทออกจนหมด จะได้สารสกัดพลูตามที่ต้องการ

- 10 สารสกัดผงในชั้นเอทานอล ที่เหมาะสมตามการประดิษฐ์นี้สามารถเตรียมได้จากกระบวนการดังนี้
 - ก. นำผง โดยเฉพาะในส่วนแก่นผงสะอาด ทำให้แห้งแล้วปั่นเป็นผงละเอียด
 - ข. นำผงที่ได้ จากขั้นตอน ก. ปริมาณหนึ่งส่วน หมักกับเฮกเซน (hexane) สามส่วน โดยปริมาตร คนผสมเป็นระยะ จนกระทั่งส่วนผสมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี จากนั้นกรองแยกน้ำหมักทิ้ง และนำตะกอนหมักซ้ำด้วยเฮกเซน ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหมักครั้งสุดท้ายไม่มีสี จากนั้นจึงนำกากที่ได้ครั้งสุดท้ายไปประเหยเพื่อกำจัดเฮกเซน
 - ค. นำกากที่ผ่านการระเหยเฮกเซนออกจากขั้นตอน ข. ปริมาณหนึ่งส่วน หมักกับเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาณสามส่วน โดยปริมาตร คนผสมเป็นระยะ ทิ้งไว้จนกระทั่งส่วนผสมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี จากนั้นกรองแยกน้ำหมักทิ้ง และนำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท ทำซ้ำขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้น้ำหมักครั้งสุดท้ายไม่มีสี แล้วจึงนำกากที่ได้ครั้งสุดท้ายไปประเหยเพื่อกำจัดเอทิลอะซิเตท
 - ง. นำกากที่ผ่านการระเหยเอทิลอะซิเตทออกจากขั้นตอน ค. ปริมาณหนึ่งส่วน หมักกับเอทานอล (ethanol) ปริมาณสามส่วน โดยปริมาตร คนผสมเป็นระยะ ทิ้งไว้ จนกระทั่งส่วนผสมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี จากนั้นกรองแยกเก็บน้ำหมักไว้ และนำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทานอลทำซ้ำขั้นตอนนี้ จนกระทั่งได้น้ำหมักครั้งสุดท้ายไม่มีสี จะได้น้ำหมักเอทานอล
 - จ. กำจัดเอทานอลออกจากหมักเอทานอลที่ได้จากขั้นตอน ง. ทั้งหมด ด้วยวิธีการระเหย จะได้สารสกัดผงในชั้นเอทานอล

สารสกัดผง เตรียมจากการนำผง โดยเฉพาะส่วนของแก่นผงมาล้างน้ำให้สะอาด สับเป็นชิ้นเล็กๆ ทำให้แห้งแล้วปั่นเป็นผงละเอียด นำผงที่ได้ 1 ส่วนมาหมักกับเฮกเซน 3 ส่วน โดยปริมาตร ทิ้งไว้ 1 คืนพร้อมคนผสมเป็นครั้งคราว กรองเอาน้ำหมักทิ้งไป นำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเฮกเซน ทำเช่นเดิมอีก 4 ครั้งหรือจนกระทั่งน้ำหมักไม่มีสี นำกากที่ได้ครั้งสุดท้ายไปประเหยเพื่อกำจัดเฮกเซน นำกากที่ระเหยเฮกเซนออกหมดแล้ว 1 ส่วนมาหมักกับเอทิลอะซิเตท 3 ส่วน โดยปริมาตร ทิ้งไว้ 1 คืนพร้อมคนผสมเป็นครั้งคราว กรองเอาน้ำหมักทิ้งไป นำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท ทำเช่นเดิมอีก 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งน้ำหมักไม่มีสี นำกากที่ได้ครั้ง

สุดท้ายไปประเหยเพื่อกำจัดเอทิลอะซิเตท นำกากที่ระเหยเอทิลอะซิเตทออกหมด แล้ว 1 ส่วนมาหมักกับเอทานอล (ethanol) 3 ส่วน ทั้งไว้ 1 คืนพร้อมคนผสมเป็นครั้งคราว กรองเอาน้ำหมักเก็บไว้ นำตะกอนมาหมักซ้ำด้วยเอทานอลเช่นเดิมอีก 4 ครั้ง หรือจนน้ำหมักที่ได้ไม่มีสี น้ำนำหมักของเอทานอลมารวมกัน แล้วนำไปประเหยเพื่อกำจัดเอทานอลออกจนหมด จะได้สารสกัดฝางตามที่ต้องการ

- 5 นำสารสกัดพลูและสารสกัดฝางไปควบคุมมาตรฐานโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) และใช้สารมาตรฐาน 4-แอลลิลไพโรแคเทคอล (4-allylpyrocatechol) สำหรับควบคุมมาตรฐานสารสกัดพลู และใช้สารมาตรฐานบราซิลิน (brazilin) สำหรับควบคุมมาตรฐานสารสกัดฝาง

- 10 สารสกัดพลูที่ได้มาตรฐานตามการประคิษฐ์นี้ต้องมีปริมาณ APC ไม่ต่ำกว่า 250 มิลลิกรัม ใน 1 กรัมของสารสกัด และสารสกัดฝางที่ได้มาตรฐานตามการประคิษฐ์นี้ต้องมีปริมาณบราซิลิน (brazilin) ไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัม ใน 1 กรัมของสารสกัด

ในส่วนของการทดลองเพื่อยืนยันว่าสารผสมของสารสกัดพลูและฝางสามารถเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม ตามการประคิษฐ์นี้ ทำดังนี้

- 15 ก. เตรียมสารละลายของสารสกัดพลูและสารละลายของสารสกัดฝางที่ในน้ำแยกกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดในแต่ละสารละลายอยู่ในช่วง 0.1 – 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเจือจางสองเท่า (two-fold dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 16, 8, 4, 2, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงอาจต้องใช้สารช่วยละลายเดิมลงไปเล็กน้อยเพื่อให้สารสกัดเข้ากับน้ำได้

- 20 ข. ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) โดยนำสารละลายจากข้อ ก. 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วยอาหารเหลวซาบอราวด์ (Sabouraud broth) สำหรับเชื้อรา และเบร็นฮาร์ดอินฟิวชันมีเดีย (brain heart infusion medium) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ลงในจานหลุมที่มี 96 หลุม และนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาปรับความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 0.5 แมคฟาแลนด์มาตรฐาน (McFarland Standard) ซึ่งมีปริมาณเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *S. mutans* 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง
- 25 ความเข้มข้น 1,000 เท่า สำหรับ เชื้อ *C. albicans* และเจือจางความเข้มข้น 100 เท่า สำหรับ เชื้อ *S. mutans* จากนั้นแบ่งมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ในจานหลุมที่มี 96 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16–24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการสังเกตความขุ่นและหาค่า MIC โดยนับหลุมในจานหลุมที่มี 96 หลุมสุดท้ายที่ไม่ขุ่นแสดงถึงไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (นับจากหลุมที่มีความเข้มข้นของสารสกัดมากที่สุด)

- 30 ค. ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimum fungicidal concentration หรือ MFC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration หรือ MBC)

- ง. จากค่า MIC, MBC, และ MFC จะเห็นว่าสารสกัดพลูและสารสกัดฝางมีฤทธิ์ต้านทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย แต่สารสกัดพลูมีฤทธิ์เด่นในด้านต้านเชื้อรา ส่วนสารสกัดฝางมีฤทธิ์เด่นด้านต้านเชื้อแบคทีเรีย
- จ. การทดลองเพื่อยืนยันการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ ใช้วิธีเช็กระบบ (checkerboard assay) โดยการเตรียมสารผสมที่มีสารสกัดพลูและสารสกัดฝางในปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วคำนวณหาค่าดัชนีความเข้มข้นแฟรกชันนอลอินฮิบิชัน (fractional inhibition concentration index หรือ FIC ind) ของสารผสม ซึ่งมีสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{FIC ind} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารสกัดพลูในสารผสม}}{\text{MICของสารสกัดพลูเดี่ยว ๆ}} + \frac{\text{ความเข้มข้นของสารสกัดฝางในสารผสม}}{\text{MICของสารสกัดฝางเดี่ยว ๆ}}$$

การแปลผล จากค่าดัชนีความเข้มข้นแฟรกชันนอลอินฮิบิชัน (fractional inhibition concentration index หรือ FIC index) ดังต่อไปนี้

- FIC index ≤ 0.5 = เกิดการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergism)
- FIC index = 0.51-0.99 = เกิดการเพิ่มฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์บางส่วน (partial synergism)
- FIC index = 1 = เกิดการเพิ่มฤทธิ์แบบธรรมดา (addition)
- FIC index = 1 - 4 = เกิดการเพิ่มฤทธิ์แบบธรรมดาบางส่วน (partial addition)
- FIC index > 4 = เกิดการลดฤทธิ์ (antagonism)

ซึ่งผลการทดสอบที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 โดยจะเห็นได้ว่าสัดส่วนของสารสกัดแต่ละตัวจะมีช่วงของการให้ฤทธิ์แบบเสริมกัน

ตารางที่ 1 ผลการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ของสารสกัดผสม

FIC index ของสารสกัดผสม (mg/mL)		FIC index	แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม
สารสกัดพลู	สารสกัดฝาง		
1.00	4.00	1.00	ธรรมดา
1.00	8.00	1.50	ธรรมดาบางส่วน
0.50	4.00	0.75	เสริมฤทธิ์บางส่วน
0.50	8.00	1.25	ธรรมดาบางส่วน
0.25	4.00	0.50	เสริมฤทธิ์
0.25	8.00	1.12	ธรรมดาบางส่วน

ตารางที่ 2 ผลการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดผสม

	FIC ของสารสกัดผสม (mg/mL)		FIC index	แปลผลดัชนีชี้วัด ประสิทธิภาพร่วม
	สารสกัดพลู	สารสกัดฝาง		
5	1.00	0.02	1.06	ธรรมดา
	1.00	0.03	1.12	ธรรมดาบางส่วน
	1.00	0.06	1.24	ธรรมดาบางส่วน
	1.00	0.12	1.48	ธรรมดาบางส่วน
	0.50	0.12	0.78	เสริมฤทธิ์บางส่วน
10	0.50	0.25	1.50	ธรรมดาบางส่วน
	0.25	0.25	1.25	ธรรมดาบางส่วน

นอกจากนี้เพื่อพิสูจน์ว่าสารสกัดพลูและฝาง มีการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) กัน ได้มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ดังต่อไปนี้

เชื้อที่ใช้ทดสอบคือเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเหงือกอักเสบ และเชื้อ *Streptococcus mutans* DMST 18777 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ โดยศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อโดยวิธีการนับโคโลนีของเชื้อภายหลังสัมผัสด้วยสารทดสอบ ด้วยเทคนิคการนับเซลล์แบบครอปหรือสเปรด เพลต (drop/spread plate)

ผลต่อเชื้อ *Candida albicans*

วิธีทดลองเริ่มจากการเตรียมสารสกัด เพื่อให้มีความเข้มข้นที่ทดสอบแล้วว่าเกิดฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergism) ในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้แก่ความเข้มข้นของสารสกัดพลูเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดฝางเท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดผสมระหว่างพลูและฝาง ที่มีสารสกัดพลู 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อยู่ร่วมกับสารสกัดฝาง 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซาบูโรด์ บรอก (Sabouraud broth) สำหรับเชื้อ *Candida albicans* และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฮาร์ทเบรน บรอก (Heart brain broth) สำหรับเชื้อ *Streptococcus mutans*

นำเชื้อ *C. albicans* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซาบูโรด์ บรอก (Sabouraud broth) ซึ่งมีปริมาณของเชื้อเท่ากับ 1×10^6 ตัว/มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้น 1000 เท่า หลังจากนั้นเติมลงใน 96 แผ่นเพลทหลุม (well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดที่เตรียมไว้ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในขณะเดียวกันทำกลุ่มควบคุมแบบลบ (negative control) ซึ่งเตรียมในปริมาณเท่ากันแต่ไม่ใส่สารสกัด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16–24 ชั่วโมง แล้วมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 10^2 เท่า แล้วนำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่เจือจางหยดลงบนอาหารแข็งซาบูโรด์ อะการ์ (Sabouraud agar) ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ของสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดผสม

5

สารสกัดที่ใช้ทดสอบ และ	ปริมาณ (μL)		CFU (n=3)
	สารทดสอบ	อาหาร	
negative control			
ฟลู 0.5 (mg/mL)	100	100	13.3 ± 3.0
ฟาง 4 (mg/mL)	100	100	25.7 ± 0.6
ฟลู 0.5 (mg/mL) + ฟาง 4 (mg/mL)	100	100	2.3 ± 0.6
กลุ่มควบคุมแบบลบ (Negative control)	100	100	49.7 ± 6.5

1. ผลต่อเชื้อ *Streptococcus mutans*

10

วิธีทดลองเริ่มจากการเตรียมสารสกัด เพื่อให้มีความเข้มข้นที่ทดสอบแล้วเกิดแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้แก่ความเข้มข้นของสารสกัดฟลูเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดฟางเท่ากับ 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบร็นฮาร์ทอนฟิวชั่น บร็อธ (brain heart infusion broth)

15

นำเชื้อ *S. mutans* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเบร็นฮาร์ทอนฟิวชั่น บร็อธ (brain heart infusion broth) ซึ่งมีปริมาณของเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 ตัวต่อมิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้น 100 เท่า หลังจากนั้นเติมลงใน 96 แผ่นเพลทหลุม (well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดที่เตรียมไว้ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในขณะเดียวกันทำ negative control ซึ่งเตรียมในปริมาณเท่ากันแต่ไม่ใส่สารสกัด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16–24 ชั่วโมง แล้วมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 10^5 เท่า แล้วนำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่เจือจางหยดลงบนอาหารแข็งเบร็นฮาร์ทอนฟิวชั่น อะการ์ (brain heart infusion agar) ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4

20

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* ของสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดผสม

25

สารสกัดที่ใช้ทดสอบ และ	ปริมาณ (μL)		CFU (n=3)
	สารทดสอบ	อาหาร	
negative control			
ฟลู 0.5 (mg/mL)	100	100	154.0 ± 33.8
ฟาง 0.12 (mg/mL)	100	100	83.7 ± 11.9
ฟลู 0.5 (mg/mL) + ฟาง 0.12 (mg/mL)	100	100	16.3 ± 5.9
Negative control	100	100	242.7 ± 39.7

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์