รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมในรูปแบบสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และการทดสอบทางคลินิก”

โดย รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์และคณะ

กรกฎาคม 2555

สัญญาเลขที่ RDG5420010

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมในรูปแบบสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และการทดสอบทางคลินิก”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1 รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2 รศ. ดร. วัชรี คุณกิตติ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3 ผศ. ดร. ดาราพร แซ่ลี้	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

การติดเชื้อรา *Candida sp.* บริเวณเพดานปากเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค chronic atrophic candidiasis จากหลายรายงานการศึกษาพบว่า 60% ของผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ซึ่งใส่ฟันเทียมทั้งปากมีรอยโรค chronic atrophic candidiasis หรือที่เรียกว่า denture sore mouth หรือ denture stomatitis นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบยีสต์เป็นจำนวนมากที่บริเวณฐานฟันเทียมด้านที่สัมผัสกับเพดานปาก (palatal surface) ซึ่งสนับสนุนทฤษฎีที่ว่าใต้ฐานฟันเทียมเป็นแหล่งสะสม (reservoir) ของเชื้อรา ดังนั้นจึงมีการแนะนำผู้ป่วยให้ทำความสะอาดฟันเทียมโดยแช่ในน้ำยา antiseptic เพื่อกำจัดเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตเป็นยาเม็ดฟู่สำหรับทำความสะอาดฟันเทียมหลายชนิดเพื่อความสะดวกในการพกพา แต่ยาเหล่านี้ยังคงต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีรายงานว่าทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อเมือกช่องปาก นอกจากนี้ยังพบว่า มีภยันตรายจากการที่เด็กและคนชรารับประทานยาเม็ดฟู่สำหรับทำความสะอาดฟันเทียมอีกด้วย ในปัจจุบันความสนใจในการนำสมุนไพรมาใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพมีเพิ่มมากขึ้นเพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ สมุนไพรหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ทางด้านสุขภาพ เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก เครื่องสำอางและอาหารเสริมสุขภาพ แต่ยังไม่มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่สามารถรับประทานได้มาเป็นผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียม ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของฟันเทียมทางห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับ benchmarked product จากนั้นจะทำการทดสอบนำร่องทางคลินิกในอาสาสมัคร จากการศึกษาสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราที่อยู่บนพื้นผิวของฟันเทียมได้ไม่ต่างจาก benchmarked product จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นพบว่าต้นทุนการผลิตต่อ 1 หน่วยมีราคาต่ำกว่าผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่ benchmarked product ดังนั้นผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนการใช้ผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดเพื่อลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่แช่ฟันเทียมจากต่างประเทศ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของฟันเทียมทางห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับเม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® ซึ่งเป็น benchmarked product ผลการทดสอบพบว่า ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม โดยสามารถลดปริมาณเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ benchmarked product ($p > 0.05$) จากการศึกษาความคงตัวทางกายภาพและจุลชีววิทยาของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH พบว่า มีความคงตัวทางจุลชีววิทยาดี เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นานอย่างน้อย 6 เดือน และเมื่อนำตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ไปศึกษาประสิทธิผลในการต้านเชื้อทางคลินิกด้วยวิธีการจำลองฐานฟันเทียมในผู้ป่วย จำนวน 33 คน ที่ใส่ฟันเทียมอะคริลิกทั้งปากบน โดยผู้ป่วยทุกคนได้รับคำแนะนำในการทำความสะอาดฟันเทียมด้วยแปรงสีฟันกับสบู่ ผู้ป่วยในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ได้รับคำแนะนำให้แช่ฟันเทียมทั้งคืนในน้ำประปา ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และเม็ดฟู่ benchmarked product ยี่ห้อ BONYPLUS® ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดสอบในผู้ป่วยกลุ่มควบคุม พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดา ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในผู้ป่วยกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 พบว่าสามารถลดจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาบนฐานฟันเทียมผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดสอบ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ใช้ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 กับเม็ดฟู่ benchmarked product พบว่าจำนวนเชื้อราที่ลดลงภายหลังการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงว่าประสิทธิผลในการกำจัดเชื้อราบนฐานฟันเทียมของผลิตภัณฑ์ทั้งสองใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาทางคลินิกนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นมีศักยภาพในการลดจำนวนเชื้อราบนฐานฟันเทียมของผู้ป่วยและน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียมจากการติดเชื้อแคนดิดา

Abstract

The purpose of this study was to develop lemongrass oil denture cleansing concentrate solution and evaluate its efficacy against adherence of *Candida albicans* to acrylic surface compared to benchmarked product (BONYPLUS®)). The results revealed that O2NW80 new 1.1 was the most effective formula which can reduce candidal adhesion to acrylic as effective as benchmarked product. Then physical and microbiological stability of O2NW80 new 1.1 in an accelerated condition 40°C 75% RH was evaluated for 6 months. It was found that killing activity of O2NW80 new 1.1 on *C. albicans* that adhered to acrylic was not significant difference ($p > 0.05$) when compared to baseline during 6 months. The efficacy of O2NW80 new 1.1 against *Candida spp.* in 33 complete denture wearers was further determined using an in vivo replica method. Volunteers in all groups were informed to clean their dentures with toothbrush and soap. Volunteers in control group, experimental group 1 and group 2 were instructed to immerse their dentures in tap water, O2NW80 new 1.1 and benchmarked product effervescent tablets, respectively, for 4 weeks. No significant reduction in numbers of *Candida spp.* was found in control group, whereas significant reduction was observed in both experimental groups when compared to baseline. However, the reduction in numbers of *Candida spp.* was not significant difference between the experimental group 1 and group 2. These results indicate that lemongrass oil concentrated solution could reduce numbers of *Candida spp.* on acrylic denture. Therefore, it is promising of using lemongrass oil concentrated solution as a new product to prevent candida-associated denture stomatitis.

สารบัญ

หน้า

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary) i

บทคัดย่อ..... ii

Abstract..... iii

สารบัญตาราง..... v

สารบัญรูป..... vii

บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 3

ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย..... 7

อุปกรณ์การวิจัย..... 7

เคมีภัณฑ์..... 8

วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 8

ระยะที่ 1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้
ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น..... 10

ระยะที่ 2 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของ
ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น..... 22

ระยะที่ 3 การศึกษานำร่องทางคลินิก..... 22

ผลการวิจัย..... 25

บทวิจารณ์..... 72

สรุปผลการวิจัย..... 75

เอกสารอ้างอิง 76

ภาคผนวก..... 83

รายนามและสถานที่ทำงานของคณะผู้วิจัย..... 87

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 : สูตรตำรับ 5 ตำรับ……...……. 10
ตารางที่ 2 : สูตรตำรับ 17 ตำรับ……...……..…. 13
ตารางที่ 3 : สูตรตำรับ 6 ตำรับ……..……...…… 14
ตารางที่ 4 : สูตรตำรับ O2T และ O2NW (40.6%LG)……...….. 15
ตารางที่ 5 : สูตรตำรับ O2NW80……...…. 20
ตารางที่ 6 : สูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2……. 21
ตารางที่ 7 : สูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2……..……. 21
ตารางที่ 8 : ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้น
ของน้ำมันตะไคร้ Trial 3, 4, 5……..……. 25
ตารางที่ 9 : ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 17 ตำรับ…..….. 27
ตารางที่ 10 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 17 ตำรับ…..…. 29
ตารางที่ 11 : ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 6 ตำรับ……. 38
ตารางที่ 12 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 6 ตำรับ…… 39
ตารางที่ 13 : ค่า MIC และ MFC ของตำรับ O2T และ O2NW……..…… 42
ตารางที่ 14 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับ O2T และ O2NW……..… 43
ตารางที่ 15 : ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับ
ในการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ……..… 44
ตารางที่ 16 : ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับ
ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ……..……..... 44
ตารางที่ 17 : ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2T และ
O2NW ในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดย time killed method เปรียบเทียบ
กับ benchmarked product ……..... 45
ตารางที่ 18 : ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำประปา
ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% เพื่อศึกษาความคงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้……..... 50
ตารางที่ 19 : ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำประปา
ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3% เพื่อศึกษาความคงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้…..... 51

หน้า

ตารางที่ 20 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้……..... 54
ตารางที่ 21 : ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้
เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 40°C รวมทั้งลักษณะของตำรับที่ 40°C
หลังเจือจางด้วยน้ำประปา……..…….…… 55
ตารางที่ 22 : จำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาในอาสาสมัครที่นับได้จากการ
จำลองฐานฟันเทียม (replica) ก่อนการทดสอบ……..…… 63
ตารางที่ 23 : ข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา……. 64
ตารางที่ 24 : ข้อมูลเกี่ยวกับโรคทางระบบของอาสาสมัคร……. 64
ตารางที่ 25 : จำนวนโคโลนีที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียม (replica) ก่อนและ
หลังการทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียม
สารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่
benchmarked product……..……..…….. 67

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 3 ตำรับในการต้านเชื้อรา ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆ…….. 26
รูปที่ 2 Response surface plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับค่า MFC..……. 28
รูปที่ 3 Contour plot เพื่อใช้ในการหาสัดส่วนของตำรับที่ให้ค่า MFC ต่ำที่สุด..…….. 38
รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิว ของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ benchmarked product…… 46
รูปที่ 5 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW ความเข้มข้นต่างๆ ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บน พื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ benchmarked product….. 46
รูปที่ 6 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ในการต้าน เชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบ กับ benchmarked product…….……... 47
รูปที่ 7 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2 ในการต้าน เชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบ กับ O2NW80…….…..…. 48
รูปที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ เป็นสารละลายเหลืองใส ไม่แยกชั้น ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 (ซ้าย) และ O2NW80 ใหม่ 2 (ขวา)……. 49
รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80, O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2 ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ benchmarked product……. 53
รูปที่ 10 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 ความเข้มข้น 0.4% และ 0.5% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุ ที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ benchmarked product……..……. 53
รูปที่ 11 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 ณ เวลาเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำ ฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ..... 57
รูปที่ 12 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจาก เก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 1 เดือนในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิว ของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ……..... 58

หน้า

รูปที่ 13 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ……...…. 58
รูปที่ 14 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 3 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ…...……. 59
รูปที่ 15 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ……..…… 59
รูปที่ 16 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 5 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ……...… 60
รูปที่ 17 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ……...… 60
รูปที่ 18 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ…….…….. 61
รูปที่ 19 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 ในช่วง 1-6 เดือนที่เก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมหลังจากแช่วัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมในตำรับเป็นเวลา 2 ชั่วโมง……..……...……..……. 61
รูปที่ 20 แสดงลักษณะและสีของโคโลนีเชื้อราแคนดิดาสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงบน CHROMagar……..……...……. 65
รูปที่ 21 โคโลนีเชื้อแคนดิดาจากการจำลองฐานฟันเทียม…….. 66
รูปที่ 22 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนการทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product……. 68

หน้า

รูปที่ 23 จำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียมใน
อาสาสมัครหลังการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์
แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product…….. 69
รูปที่ 24 จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียมในอาสาสมัครก่อน
และหลังการทดลอง ของกลุ่มควบคุม (CT) กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียม
จากน้ำมันตะไคร้ (LG) และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product (BP) …….. 70
รูปที่ 25 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีเชื้อราที่ลดลงภายหลัง
การทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้
และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product……. 71

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การติดเชื้อรา *Candida* ในช่องปากเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค candidiasis เชื้อในกลุ่ม Candida genus ที่มักก่อโรค ได้แก่ *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* โดยในการก่อโรคนั้น เชื้อมักจะอยู่ในรูปของ biofilms ซึ่งการที่เชื้ออยู่ในรูป biofilms นี้จะทำให้มีความต้านทานต่อยาต้านเชื้อราได้มากขึ้นและยากต่อการรักษา [1] ดังนั้นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาจึงควรเป็นยาที่สามารถทำลายเชื้อในรูป biofilms ได้ ในอดีตเชื่อว่า candidiasis เป็นโรคติดเชื้อพวกฉกฉวย (opportunistic infection) ซึ่งมักพบในผู้ป่วยที่มีภาวะร่างกายอ่อนแอหรือมีโรคทางระบบอย่างอื่นอยู่ด้วย แต่ในปัจจุบันนี้พบว่าการเกิด candidiasis ในช่องปากสามารถพบได้ในกลุ่มประชากรที่ปกติ จากหลายรายงานการศึกษาพบว่า 60% ของผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ซึ่งใส่ฟันเทียมทั้งปากมีรอยโรค chronic atrophic candidiasis หรือที่เรียกว่า denture sore mouth หรือ denture stomatitis [2] รอยโรคนี้สามารถพบได้ทั้งในบริเวณใต้ฐานฟันเทียมบนและล่าง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบยีสต์เป็นจำนวนมากที่บริเวณฐานฟันเทียมด้านที่สัมผัสกับเพดานปาก (palatal surface) [3] ซึ่งสนับสนุนทฤษฎีที่ว่าใต้ฐานฟันเทียมเป็นแหล่งสะสม (reservoir) ของเชื้อรา

การใช้เม็ดฟู่ทำความสะอาดฟันเทียมเป็นวิธีที่นิยมในการใช้ขจัดและป้องกันการสะสมคราบจุลินทรีย์ คราบอาหาร หินน้ำลาย และคราบสีบนฟันเทียม เม็ดฟู่ทำความสะอาดฟันเทียมเป็นสารเคมีในกลุ่มของอัลคาไลน์เปอร์ออกไซด์ (alkaline peroxide) โดยมีองค์ประกอบหลัก 4 ชนิดคือ สารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง สารประกอบที่ให้ออกซิเจนและสารเติมใส่เพื่อปรุงแต่งกลิ่น สารเคมีเหล่านี้เมื่อนำมาละลายน้ำจะได้สารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปย่อยสลายส่วนอินทรีย์สารในแผ่นคราบจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการ 3 แบบ คือ การออกซิเดชันส่วนอินทรีย์สาร การกัดกร่อนจากสารละลายด่างและจากฟองอากาศที่เกิดขึ้น [4] ข้อดีของการใช้เม็ดฟู่ทำความสะอาดฟันเทียมคือ การใช้งานทำได้ง่าย สะดวกและทำความสะอาดฟันเทียมได้ทุกส่วน ทั้งยังช่วยลดอัตราการสึกหรอของฟันเทียมเนื่องจากการขัดถูด้วยแปรง รวมถึงลดโอกาสการแตกหักของฟันเทียมขณะทำความสะอาด ซึ่งวิธีการนี้เหมาะกับผู้ป่วยสูงอายุหรือผู้ป่วยที่มีปัญหาการเคลื่อนไหวของมือ ในปัจจุบัน แม้ว่าจะมีผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่สำหรับทำความสะอาดฟันเทียมหลายชนิดแต่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังมีราคาแพงและยังคงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีการใช้ฟันเทียมร่วมกับวัสดุฉาบฐานฟันเทียมชนิดนุ่มจำเป็นต้องระมัดระวังหากจะทำความสะอาดด้วยเม็ดฟู่ เนื่องจากอาจส่งผลต่อวัสดุฉาบฐานฟันเทียมชนิดนุ่ม เช่น ทำให้เปลี่ยนสี ผิวเกิดรูพรุน วัสดุบิดเบี้ยวหรือเปลี่ยนรูปและอาจมีผลต่อการดูดซึมน้ำของวัสดุ [4] การใช้เม็ดฟู่ทำความสะอาดฟันเทียมมีรายงานว่าทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อเมือกช่องปาก [5] นอกจากนี้ยังพบว่า มีภยันตรายจากการที่เด็กและคนชรารับประทานยาเม็ดฟู่สำหรับทำความสะอาดฟันเทียมอีกด้วย [6]

ปัจจุบันความสนใจในการนำสมุนไพรมาใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพมีเพิ่มมากขึ้นเพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่าง ประเทศ พืชสมุนไพรไทยหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ทางด้านสุขภาพ เช่น ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก เครื่องสำอางและอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากพืชสมุนไพรไทยเหล่านี้มีสรรพคุณเป็นยา อีกทั้งยังสามารถรับประทานได้และหาได้ง่าย สามารถเจริญเติบโตและทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยต่อคนและสัตว์ ราคาถูกกว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและสามารถเตรียมได้เอง โดยเฉพาะน้ำมันตะไคร้ที่เลือกใช้ในการศึกษานี้เป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารที่มีรายงานการต้านเชื้อจุลชีพหลายชนิด ได้แก่ *Propionibacterium acnes*, *Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii, Aeromonas sobria, Candida albicans, Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* [7-10] กลุ่มผู้วิจัยเองได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *C. albicans* และ *C. krusei* ของน้ำมันตะไคร้กับน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรอีก 8 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้หอม กะเพรา ไพล ขิง ขมิ้น โหระพา กระชาย และมะกรูด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีความสามารถในการต้านเชื้อราแคนดิดาทั้งในรูปแบบ biofilms และ planktonic cells ได้ดีกว่าน้ำมันสมุนไพรชนิดอื่นๆ [11,12] นอกจากนี้น้ำมันตะไคร้ยังสามารถยับยั้งการสร้าง germ tube ของเชื้อ *C. albicans* ได้เมื่อทดสอบในความเข้มข้นที่ไม่ทำลายเชื้อ และยังมี postantifungal effect ต่อเชื้อ *C. albicans* และ *C. krusei* นานกว่า nystatin ด้วย เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1.5 และ 2 เท่าของค่า MIC [13] จากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม พบว่า postantifungal effect ของน้ำมันตะไคร้สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ nystatin ตั้งแต่เวลา 10-70 นาที [13]

กลุ่มผู้วิจัยได้พัฒนาแกรนูลฟู่ที่มีส่วนผสมของน้ำมันตะไคร้ซึ่งเมื่อทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ benchmarked product [11] แต่แกรนูลฟู่ที่พัฒนาขึ้นนั้น ต้องใช้ปริมาณผงต่อ 1 ซองมาก เนื่องจาก diluents ที่นำมาดูดซับน้ำมันตะไคร้ต้องใช้ในปริมาณที่มาก ประกอบกับเมื่อนำไปทดสอบเบื้องต้นทางคลินิกพบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของฟันเทียมยังไม่น่าพอใจ ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น (concentrate solution) เพื่อลดข้อด้อยที่พบในผลิตภัณฑ์เดิม แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของฟันเทียมทางห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับ benchmarked product จากนั้นจะทำการทดสอบนำร่องทางคลินิก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น
2. ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมทางห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับ benchmarked product
3. ทำการทดสอบนำร่องทางคลินิกโดยศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* บนฐานฟันเทียมทั้งปากชนิดที่ทำด้วยเรซินอะคริลิกในผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปาก เปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ที่ใช้ในการทำความสะอาดฟันเทียมที่ใช้ทั่วไปในท้องตลาด

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Candida sp.

เชื้อนี้อยู่ใน Cryptococcaceae family สามารถพบได้ 2 รูปแบบ ซึ่งเรียกว่า dimorphism ได้แก่ รูปแบบของยีสต์ (yeast) และรูปแบบเป็นเส้น (hyphae) ซึ่งมักสัมพันธ์กับการลุกลามเข้าไปใน host สามารถพบได้ในร่างกายคนปกติเช่นในทางเดินอาหารและในช่องปากซึ่งจะไม่ก่อโรค แต่ถ้าร่างกายอ่อนแอและความสมดุลเปลี่ยนแปลงไปเช่น ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยโรคมะเร็ง จะกลายเป็นเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) สามารถก่อโรคได้ [14]

การติดเชื้อรา *Candida* ในช่องปากเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค candidiasis เชื้อในกลุ่ม Candida genus ได้แก่ *C. albicans*, *C. tropicalis, C. krusei* โดยในการก่อโรคนั้น เชื้อมักจะอยู่ในรูปของไบโอฟิล์ม ซึ่งการที่เชื้ออยู่ในรูปไบโอฟิล์มนี้จะทำให้มีความต้านทานต่อยาต้านเชื้อราได้มากขึ้นและยากต่อการรักษา [1]

ฟันเทียมฐานอคริลิกเรซิน (acrylic resin) และการอักเสบของเนื้อเยื่อ (denture stomatitis)

อคริลิกเรซิน เป็นวัสดุที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการทำฐานฟันเทียมทั้งปากในผู้ป่วยสูงอายุที่ไร้ฟันในช่องปาก (full mouth edentulous ridges) [15] เนื่องจากมีราคาถูก เมื่อตรวจดูฐานฟันเทียมที่ทำด้วยอคริลิกเรซินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (scanning electron-microscope: SEM) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่ามีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กและพื้นผิวด้านที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อมักขรุขระ [16] ซึ่งลักษณะดังกล่าวส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายและการทำความสะอาดเป็นไปได้ยาก ส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตใต้ฐานฟันเทียมได้เป็นอย่างดี [16,17] โดยพบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับการใส่ฟันเทียมในระยะเวลาเพียง 4 สัปดาห์สามารถพบเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ได้จาก

คราบจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนฐานฟันเทียม [18] จากการศึกษาของ Pesci-Bardon และคณะในปี 2006 พบว่าร้อยละ 82 ของผู้ป่วยสูงอายุไม่สามารถทำความสะอาดฟันเทียมของตนเองได้ดีพอ และพบว่าร้อยละ 30 ถึง 37 มีพฤติกรรมการใช้งานฟันเทียมที่ไม่เหมาะสม อาทิเช่น มีการใส่ฟันเทียมตลอดเวลานอน และสุขลักษณะการดูแลฟันเทียมไม่ดีเนื่องมาจากมีปัญหาในการใช้มือ [19,20] มีรายงานพบว่าผู้ป่วยถึงร้อยละ 74 ที่ใส่ฟันเทียมและไม่ถอดฟันเทียมขณะนอนหลับมีการระคายเคืองของเนื้อเยื่อจากฟันเทียม และเป็นเหตุให้เชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์มีการเจริญเติบโตได้มากขึ้น [21] เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lambson และ Anderson ในปี 1967 พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากทำความสะอาดฟันเทียมได้ไม่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมตลอดทั้งกลางวันและกลางคืนเป็นผลทำให้มีการเกาะกลุ่มกันของเชื้อราเป็นจำนวนมาก และมีการสร้างคราบจุลินทรีย์เกาะติดฐานฟันเทียมด้านเนื้อเยื่อซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของสันเหงือกที่รองรับฟันเทียม [22]

สารทำความสะอาดฟันเทียม (Denture Cleansing Agent)

ผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมจำเป็นต้องได้รับการแนะนำจากทันตแพทย์ในการดูแลสุขภาพช่องปากและฟันเทียมเพื่อให้มีสุขภาพช่องปากที่ดีและสามารถใช้งานฟันเทียมได้ยาวนานขึ้น [18,23] จากการศึกษาประเมินสภาพฟันเทียมในประเทศไทยปี 1993 พบว่ามีฟันเทียมจำนวนสูงถึงร้อยละ 64 ที่ได้รับการดูแลทำความสะอาดที่ไม่เหมาะสม [23] ซึ่งส่วนใหญ่มักพบในกลุ่มผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียมตลอดเวลาทั้งกลางวันและกลางคืน [24] การใช้สารทำความสะอาดฟันเทียมนับเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยขจัดและป้องกันการสะสมของคราบจุลินทรีย์ เศษอาหาร คราบหินน้ำลาย และคราบสีบนผิวของฟันเทียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสารทำความความสะอาดฟันเทียมแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ [25] คือ กลุ่มที่ให้ผลทางกล (Mechanical Cleansing) ซึ่งอาจเป็นครีมใช้ร่วมกับแปรงสีฟันหรืออาจเป็นน้ำยาที่ใช้ร่วมกับเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic cleanser) ซึ่งเหมาะกับผู้ป่วยพิการหรือผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้มือได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนสารทำความสะอาดอีกประเภทจะเป็นกลุ่มที่ให้ผลทางเคมี (Chemical Cleansing) ซึ่งมี 5 ชนิดด้วยกัน

1. อัลคาไลน์ เพอร์รีอกไซด์ (alkaline peroxide) หรือ เม็ดฟู่ทำความสะอาดฟันเทียมซึ่งมีองค์ประกอบหลักในผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้มีอยู่ 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ สารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เช่น โปแตสเซียมโมโนเปอร์ซัลเฟต สารที่ฤทธิ์เป็นด่าง เช่น โซเดียมคาร์บอเนต สารประกอบที่ให้ออกซิเจน เช่น โซเดียมเพอบอเรต และสารเติมใส่ ได้แก่ สารปรุงแต่งกลิ่นและสี

สารเคมีเหล่านี้เมื่อนำมาละลายน้ำจะได้สารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปย่อยสลายส่วนอินทรีย์สารในแผ่นคราบจุลินทรีย์ผ่านขบวนการ 3 แบบ คือ การออกซิเดชั่นส่วนอินทรีย์สาร การกัดกร่อนจากสารละลายด่าง และจากฟองอากาศที่เกิดขึ้น สารละลายกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพมากในการกำจัดแผ่นครบจุลินทรีย์ที่สะสมไม่นาน และการแช่ฟันเทียมในสารละลายนี้เป็น

เวลาหลายชั่วโมงหรือแช่ข้ามคืนให้ผลดีกว่าการแช่เพียง 15 ถึง 30 นาที และสามารถใช้กับฟันเทียมที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบได้

2. อัลคาไลน์ไฮโปคลอไรท์ (alkaline hypochlorite) สารอัลคาไลน์ไฮโปคลอไรท์ช่วยทำลายคราบจุลินทรีย์และมีผลฆ่าแบคทีเรียและเชื้อรา แนะนำให้แช่ฟันเทียมฐานอคริลิกในสารอัลคาไลน์ไฮโปคลอไรท์ 20 นาทีหลังทำความสะอาดด้วยแปรงสีฟันแล้ว ส่วนฟันเทียมที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบแช่ในสารอัลคาไลน์ไฮโปคลอไรท์ 10 นาที เพื่อป้องกันการเกิดการกัดกร่อนของโลหะ

3. กรดเจือจาง ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายมีส่วนประกอบของกรดเกลือ กรดฟอสฟอริก หรือกรดซัลฟุริก ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้มีความสามารถในการกำจัดคราบหินน้ำลายและคราบติดแน่นได้ดี แต่มีข้อเสียคือ ฟันเทียมที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบสามารถถูกกัดกร่อนได้ ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรงเพราะอาจระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อได้

4. สารฆ่าเชื้อ มีการแนะนำให้ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิดในการทำความสะอาดและแช่ฟันเทียม เช่น คลอเฮกซิดีน โซเดียมไฮโปคลอไรท์ สารเคมีที่เป็นด่าง คลอรีนไดออกไซด์ อัลคาไลน์-บัฟเฟอร์-กลูตาราลดีไฮด์ เป็นต้น แต่ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจมีผลข้างเคียงของสารเคมีบางตัว เช่น อาจทำปฏิกิริยากับฐานฟันเทียมบางชนิดทำให้มีการเปลี่ยนสี หรือมีการติดสีของสาร เคมี [26]

5. เอ็นไซม์ (enzyme) เป็นการแช่ฟันเทียมในสารที่มีส่วนประกอบของสารย่อยโปรตีน (alcalase protease) หากต้องการให้ได้ประสิทธิภาพการทำความสะอาดที่ดีต้องแช่หลังจากใช้แปรงทำความสะอาดแล้ว [27]

การทำความสะอาดฟันเทียมโดยการแช่ด้วยสารเคมีเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดที่ดีและการใช้งานง่าย โดยเฉพาะในผู้สูงอายุและผู้ที่มีปัญหาด้านการใช้มือ จากผลการประเมินประสิทธิภาพการต้านเชื้อราของสารทำความสะอาดฟันเทียมที่วางขายในท้องตลาด 11 ยี่ห้อในการยับยั้ง biofilm ของเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ พบว่าสารทำความสะอาดฟันเทียมทุกตัวมีประสิทธิภาพในการลดการสร้าง biofilm ของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [28] มีการแนะนำให้แช่ฟันเทียมในสารทำความสะอาดฟันเทียมมากกว่า 2 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ [29-31]

2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) reduction assay

XTT เป็น tetrazolium dye เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไมโตคอนเดรียล ดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenases) ของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต แล้วจะได้สารละลาย formazan สีเหลือง ซึ่งสีของสารละลายจะสัมพันธ์กับจำนวนหรือปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตในตัวอย่างที่ศึกษา [32,33] ดังนั้นจึงมีการใช้ XTT reduction assay ในการศึกษา metabolic activity ของเซลล์ โดยวัดสีของสารละลายที่เปลี่ยนไปด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รวมทั้งนำมาใช้ประเมินปริมาณของเชื้อราแคนดิดาในไบโอฟิล์มในหลายการศึกษาเกี่ยวกับยาที่ใช้ในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อราแคนดิดา [34-36]

ตะไคร้ *(Cymbopogon citratus*)

ตะไคร้เป็นพืชในตระกูล Graminae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cymbopogon citratus* มีชื่ออังกฤษว่า Lemon grass, Lapine ในประเทศไทยมีชื่อเรียกหลายอย่างขึ้นอยู่กับสถานที่ เช่น ตะไคร้แกง (ภาคกลาง) จะไคร (ภาคเหนือ) ไคร ไพเล็ก (ภาคใต้) คาหอม (เงี้ยว – แม่ฮ่องสอน) ห่อออตะโป (กระเหรี่ยง – แม่ฮ่องสอน) หัวสิงไค (เขมร – ปราจีนบุรี) เชิดเกรย เหลอะเกรย (เขมร – สุรินทร์) [37,38]

ตะไคร้เป็นพืชที่ปลูกง่าย พบเห็นปลูกเป็นผักสวนครัวทั่วไป ประโยชน์ของตะไคร้มีมากมาย โดยทั่วไปจะนำมารับประทานเป็นอาหาร นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการบำบัดรักษาโรคได้หลายชนิด [37,38] เช่น

ต้น ใช้ขับลม แก้ผมแตกปลาย

หัว ใช้ขับปัสสาวะ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ รักษาเกลื้อน

ใบสด ช่วยลดความดันโลหิตสูง

ราก แก้ปวดท้องและท้องเสีย

มีการศึกษาพบว่า สารสกัดจากตะไคร้มีฤทธิ์ antioxidant และสามารถกำจัด free radical [39] ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ [40] นอกจากนี้น้ำมันจากตะไคร้ยังสามารถยับยั้งการชักในหนูทดลอง [41] ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด [42] และลดระดับ cholesterol ในเลือดได้ด้วย [43]

<u>ประสิทธิภาพต่อเชื้อจุลินทรีย์</u>

สารเคมีในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด เช่น *Salmonella* spp., *Escherichai coli*, *Campylobacter jejunii*, *Clostridium perferingens*, *Acinetobacter baumanii, Aeromonas sobria, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus* [10,44-47] และ *Helicobacter pylori* [48] รวมทั้งเชื้อราพวก dermatophytes [49], *Candida albicans* [10,50], *Aspergillus flavus* [51], *Aspergillus niger* [52], *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophytes* [53] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้าน *Plasmodium berghei* [54] และลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* L. [55] ได้ด้วย

<u>สารเคมีที่สำคัญ</u>

สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยได้แก่ citral, limonene, citronellal, β-myrcene, linalool และ geraniol [42,56,57]

ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย

อุปกรณ์การวิจัย

1. หลอดทดลอง (test tube)
2. ปิเปตอัตโนมัติขนาดเล็ก (semiautomatic micropipette)
3. ตู้เพาะเชื้อ (incubator)
4. จานเพาะเชื้อ (petridishes)
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
6. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
7. Vortex mixer (vortex-genie 2™, Scientific industrial, USA)
8. เครื่องชั่งสาร
9. Microplate reader
10. Sterile loop
11. Sterile plastic tip
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (HERMLE Z200A, HERMLE LABORTECHNIK, Germany)
13. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
14. Forceps
15. Hemacytometer (Reichert-Jung, Hausser Scientific Horsham, PA, USA)
16. บีกเกอร์ (beaker)
17. ขวดรูปชั่วโมงพู่ (flask)
18. Hot plate
19. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
20. กระบอกตวง (cylinder)
21. ตู้ดูดอากาศ (hood)
22. เครื่องเสียงความถี่สูง
23. เครื่องกรองจุลินทรีย์
24. สไลด์ฝ้า
25. ชั้นวางหลอดทดลอง
26. Microtitre plate (Nunclon™, Denmark)
27. เครื่อง shaker (Shaker 25, Compact Rocker, National Labnet Company, USA)

เคมีภัณฑ์

1. Sabouraud's dextrose broth (Pronadisa, Fabricado por Hispanlab, S.A., Spain)
2. Sabouraud's dextrose agar (BBL, Becton Dickinson and Company, USA)
3. CHROMagar candida (CHROMagar®, CHRO Magar Company, Paris, France)
4. Absolute ethyl alcohol
5. Absolute methanol
6. Normal saline (NS)
7. Sodium bicarbonate
8. น้ำมันสมุนไพร (Thai China Flavours & Fragrances Industry Co., Thailand)
9. (2,3)-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2*H*-tetrazolium hydroxide (XTT) (Sigma Chemical, St Louis, Mo, USA)
10. Coenzyme Q_0 (Sigma Chemical, St Louis, Mo, USA)
11. Tween 80
12. Cetomacrogol 1000
13. Propylene glycol
14. Sodium chloride
15. Disodium hydrogen phosphate
16. Citric acid monohydrate
17. เม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein)

ระเบียบวิธีวิจัย

ระยะที่ 1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น

ตอนที่ 1 การหาส่วนประกอบในตำรับเบื้องต้น

1. ทำ preliminary study โดยนำความรู้จากโครงการ RDG5120004 [58] และ RDG4920017 [59] เตรียมตำรับทั้งหมด 5 Trials พบว่าไม่คงตัว 2 ตำรับ จึงเลือกเฉพาะ Trial 3, 4, 5 ไปตรวจสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing [60]
2. ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม
3. ผลจากตอนที่ 1 ได้ตำรับ Trial 5 ไปทำ response surface analysis

ตอนที่ 2 เตรียมตำรับผลิตภัณฑ์

1. เตรียมตำรับผลิตภัณฑ์โดยทำ formulation optimization ด้วยโปรแกรม Design expert ได้ 17 ตำรับ จากนั้นนำมาประเมินลักษณะทางกายภาพ แล้วทำ response surface analysis เพื่อหาสัดส่วนในตำรับที่ทำให้มีความคงตัวทางกายภาพที่ดี
2. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing

จากผลการศึกษาใน 17 ตำรับ เลือกตำรับมาทำ formulation optimization 6 ตำรับ

ตอนที่ 3

1. ทำ formulation optimization 6 ตำรับ
2. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing
3. จากผลในการฆ่าเชื้อพบว่า O2, O3 และ O4 มีประสิทธิภาพเท่ากันและดีที่สุด แต่เนื่องจากลักษณะทางกายภาพทั้ง 3 ตำรับไม่คงตัว โดย O2 มีลักษณะที่มีแนวโน้มว่าน่าจะคงตัวจึงปรับเป็น non-aqueous โดยศึกษาชนิดของสารก่ออิมัลชัน 2 ชนิดคือ Tween 80 และ Cetomacrogol 1000
4. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ 8 ตำรับในการป้องกันการเกิดและต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans*
5. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* เปรียบเทียบกับ benchmarked product โดย time killed assay
6. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product

จากผลการศึกษาพบว่าตำรับ O2NW สามารถต้านการเกาะของเชื้อได้ดีกว่าตำรับ O2T จึงเลือกตำรับ O2NW มาทำการศึกษาต่อไป

ตอนที่ 4

1. พัฒนาตำรับสารละลายตะไคร้เข้มข้นชนิดปราศจากน้ำ (nonaqueous concentrated preparation)
2. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product

ระยะที่ 2 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น

2.1 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH

2.2 ศึกษาความคงตัวทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH

ระยะที่ 3 การศึกษานำร่องทางคลินิก

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ระยะที่ 1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น

ตอนที่ 1

1.1 ทำ preliminary study โดยนำความรู้จากโครงการ RDG5120004 [58] และ RDG4920017 [59]

เตรียมตำรับทั้งหมด 5 Trials ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรตำรับ 5 ตำรับ

	unit	trial 1	trial 2	trial 3	trial 4	trial 5
Lemongrass oil	ml	14.6	22.2	20.0	20.0	20.0
Tween 80	g	12.2	0	0	0	0
Cetomacrogol 1000	g	0	11.1	20.0	30.0	30.0
Ethanol	ml	12.2	11.1	10.0	10.0	10.0
Propylene glycol	ml	12.2	11.1	10.0	10.0	10.0
Sodium chloride	g	12.2	11.1	10.0	10.0	0
Disodium hydrogen phosphate	g	10.9	9.9	0	0	0
Citric acid monohydrate	g	1.3	1.2	0	0	0
DI water qs to	ml	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

1.2. ประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับ ดังนี้

1) นำตำรับที่เตรียมได้ชุดที่ 1 มาทำ Heat-cool cycling 4-6 รอบ ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงของ สี pH ความหนืด และการแยกชั้นของส่วนผสม
2) นำตำรับที่เตรียมได้ชุดที่ 2 ไปเก็บที่ 45°C 75%RH นาน 30 วัน แล้วประเมินความคงตัวทางกายภาพ
3) นำตำรับที่เตรียมได้ชุดที่ 3 มาศึกษาความคงตัวเมื่อเจือจางด้วยน้ำประปา ดังนี้ นำตำรับที่เตรียมมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.6% Lemongrass oil ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของสารละลาย
4) นำข้อมูลไปหา Response surface analysis เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสม
5) เลือกตำรับที่มีความคงตัวทางกายภาพดีและตำรับที่ได้จากการทำ Response surface analysis มาศึกษาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราตลอดจนความเข้มข้นที่ต้องเจือจางในการแช่ฐานฟันเทียม

1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing [60]

ก. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแคนดิดา

เจือจางตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ด้วย Sabouraud's dextrose broth ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (two fold serial dilution) ใน micro-titre plate โดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม = 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อ *C. albicans* หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันดีแล้วเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารที่นำมาทดสอบเป็นตัวควบคุมผลบวก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ อ่านผลการเจริญของเชื้อราโดยสังเกตตะกอนขุ่นของเชื้อที่ตกอยู่ก้นหลุมซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวก เชื้อราในหลุมใดที่ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีตะกอนของเชื้อให้เห็น ความเข้มข้นของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือค่า minimum growth inhibitory concentration (MIC)

ข. การทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้อราแคนดิดา

เชื้อราที่ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้จะถูกนำมาทดสอบต่อว่าผลลบที่เห็นนั้นเนื่องจากเชื้อนั้นถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือถูกทำลาย โดยการนำส่วนผสมจากหลุมที่ให้ผลลบทุกหลุมไปเลี้ยงต่อ ทำการเขี่ยป้ายเชื้อด้วย loop บน Sabouraud's dextrose agar และเลี้ยงเชื้อต่อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อราในหลุมใดที่ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สามารถทำลายได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีโคโลนีของเชื้อให้เห็น

ความเข้มข้นของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อราได้คือค่า minimum fungicidal concentration (MFC)

1.4 ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein)

ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม (อคริลิก เรซิน) ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ โดยวิธีซึ่งรายงานโดย Taweechaisupapong และคณะ [61] ดังนี้

1.4.1 การเตรียมแผ่นอคริลิกเรซิน

นำแผ่นขี้ผึ้งสีชมพูขนาด 3x3 ตารางนิ้ว หนา 2 มิลลิเมตร ลงแบบหล่อ (flasking) เพื่อเตรียมขึ้นรูป อคริลิก เรซินชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน (heat polymerized acrylic resin) ตามกระบวนการทางห้องปฏิบัติการทันตกรรมประดิษฐ์ โดยผสมอคริลิกเรซินส่วนผงและน้ำตามอัตราส่วนที่แนะนำโดยผู้ผลิต (Takilon, Rodont, s.r.l., Milano, Italy) เมื่อส่วนผสมถึงระยะที่ปั้นเป็นก้อนได้ (dough stage) ให้ทำการอัดอคริลิกเรซินเข้าสู่แบบหล่อที่เตรียมไว้ นำไปต้มที่อุณหภูมิหม้อต้ม 165 องศาฟาเรนไฮต์ นาน 9 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นตามปกติ เมื่อได้แผ่นอคริลิกเรซินที่แข็งตัวสมบูรณ์แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยแปรงสีฟันขนนุ่มและน้ำสบู่ จากนั้นนำ แผ่นอคริลิกเรซินไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นงานความเร็วต่ำให้ได้ขนาดประมาณ 5x5 ตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในน้ำประมาณ 4 สัปดาห์เพื่อกำจัดโมโนเมอร์ส่วนเกินออกให้หมด หลังจากนั้นนำแผ่นอคริลิกเรซินไปล้างผ่านน้ำประปา (running water) อีก 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอก่อนนำมาทดสอบ

1.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวอคริลิก ณ เวลาต่างๆ ดังนี้

1.4.2.1 นำเชื้อราในปริมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองในปริมาณหลอดละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่แผ่นอคริลิกลงในหลอดทดลอง (โดยวางในแนวตั้ง) หลอดละ 1 แผ่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำแผ่นอคริลิกออกมาล้างในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อในปริมาณ 20 มิลลิลิตร/แผ่น เพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่ยึดเกาะออก

1.4.2.2 นำตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้มาเจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.6% จากนั้นนำไปใส่ในหลอดทดลองโดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลอดเท่ากับ 400 ไมโครลิตร หลอดที่เป็นตัวควบคุมผลลบใส่น้ำกลั่นในปริมาณหลอดละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่แผ่นอคริลิกที่มีเชื้อราเกาะอยู่ (จากข้อ 1.4.2.1) ลงในหลอดทดลอง (โดยวางในแนวตั้ง) หลอดละ 1 แผ่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15, 30 นาที 1, 2 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดังกล่าว นำแผ่นอคริลิกออกมาล้างในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อในปริมาณ 20 มิลลิลิตร/แผ่น จากนั้นนำแผ่นอคริลิกไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร XTT และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร coenzyme Q_0 ซึ่ง

ละลายใน PBS ในปริมาณหลอดละ 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้วนำแผ่นอคริลิกออก และนำหลอดทดลองไปเขย่า (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใส จากหลอดทดลองไปใส่ในหลุมของ 96-well microtiter plate ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร/หลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

ตอนที่ 2

2.1 เตรียมตำรับผลิตภัณฑ์

จากผลการศึกษาเบื้องต้นในตอนที่ 1 ได้ข้อสรุปว่าปริมาณ ethanol, cetomacrogaol 1000 และ propylene glycol (PG) น่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อรา จึงทำการพัฒนาตำรับน้ำมันตะไคร้เข้มข้นโดยทำ formulation optimization ด้วยโปรแกรม Design expert โดยกำหนดปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณ ethanol, cetomacrogaol 1000 และ propylene glycol (PG) นำมาประเมินลักษณะทางกายภาพ แล้วทำ response surface analysis ด้วย Box-Behnken Design เพื่อหาตำรับที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราได้ดีและมีความคงตัวทางกายภาพที่ดี จำนวน 17 ตำรับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สูตรตำรับ 17 ตำรับ

		Factor 1	Factor 2	Factor 3		
Std	**Run**	**A:ethanol**	**B:Cetomacrogol**	**C:PG**	**LG**	**water**
17	1	1	1.5	1	2	4.5
16	2	1	1.5	1	2	4.5
3	3	0	2	1	2	5
7	4	0	1.5	2	2	4.5
1	5	0	1	1	2	6
2	6	2	1	1	2	4
5	7	0	1.5	0	2	6.5
6	8	2	1.5	0	2	4.5
11	9	1	1	2	2	4
15	10	1	1.5	1	2	4.5
14	11	1	1.5	1	2	4.5
12	12	1	2	2	2	3
8	13	2	1.5	2	2	2.5
4	14	2	2	1	2	3
10	15	1	2	0	2	5
13	16	1	1.5	1	2	4.5
9	17	1	1	0	2	6

Std : Standard order, PG : propylene glycol, LG : lemongrass oil

ขั้นตอนการเตรียม

1. หลอม cetomacrogol และ PG ในน้ำ นำไปอุ่นบน water bath จน cetomacrogol หลอมหมด
2. ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม ethanol คนให้เข้ากันและเติมน้ำมันตะไคร้ลงไป คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำ จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 4 ขวดเท่าๆกัน นำตำรับที่เตรียมแบ่งออกเป็น 4 ชุด เพื่อประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับ

2.2. ประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับ

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.2

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing [60]

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.3

ตอนที่ 3

จากผลการศึกษาใน 17 ตำรับ เพื่อหาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพความคงตัวของตำรับน้ำยาแช่ฟันเทียม จึงนำมาหาสัดส่วนของตำรับที่เหมาะสม (formulation optimization) ดังนี้

3.1 จากการทำ response surface analysis เลือกสัดส่วนของส่วนประกอบในตำรับจากสมการที่ใช้ในการทำนายพื้นที่ผิวการตอบสนองซึ่งคำนวนโดยโปรแกรม Design Expert โดยเลือกสัดส่วนที่น่าจะทำให้ตำรับมีค่า MFC ต่ำที่สุด จำนวน 6 ตำรับดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สูตรตำรับ 6 ตำรับ

Optimization	Ethanol	Cetomacrogol	PG	LG	Water
O1	1.96	1.09	0.17	2	4.78
O2	0.24	1.67	0.86	2	5.23
O3	1.63	1	0.25	2	5.12
O4	1.43	1.5	1.58	2	3.49
O5	0.31	1.92	2	2	3.77
O6	0.09	1.96	2	2	3.95

PG : propylene glycol, LG : lemongrass oil

ขั้นตอนการเตรียม

1. หลอม cetomacrogol, PG และ น้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะแข็งตัวเป็นก้อนใส
2. เติม ethanol คนจนละลาย จากนั้นเติมน้ำมันตะไคร้คนให้เข้ากัน
3. ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำทั้ง 6 ตำรับ
4. แบ่งตัวอย่างเป็น 4 ขวดเท่าๆกัน นำไปทำการประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับโดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.3

3.3 จากผลในการฆ่าเชื้อพบว่า O2, O3 และ O4 มีประสิทธิภาพเท่ากันและดีที่สุด แต่เนื่องจากลักษณะทางกายภาพทั้ง 3 ตำรับไม่คงตัว โดย O2 มีลักษณะที่มีแนวโน้มว่าน่าจะคงตัวจึงปรับเป็น non-aqueous โดยศึกษาชนิดของสารก่ออิมัลชัน 2 ชนิดคือ Tween 80 และ Cetomacrogol 1000 ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สูตรตำรับ O2T และ O2NW (40.6%LG)

Optimization	Ethanol	Cetomacrogol	PG	LG	Tween 80
O2T	0.24	0	0.86	2	1.67
O2NW	0.24	1.67	0.86	2	0

PG : propylene glycol, LG : lemongrass oil

ขั้นตอนการเตรียม

1. สำหรับตำรับ O2T ให้ผสม Tween 80 และ PG เข้าด้วยกัน แล้วจึงเติม ethanol และ น้ำมันตะไคร้ลงไป ผสมให้เข้ากัน
2. ตำรับ O2NW หลอม cetomacrogol และ PG นำไปอุ่นบน water bath จน cetomacrogol หลอมหมด ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติม ethanol และ น้ำมันตะไคร้ลงไป ผสมให้เข้ากัน
3. ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำทั้ง 2 ตำรับ

4. แบ่งตัวอย่างเป็น 4 ขวดเท่าๆกัน นำไปการประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับโดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.4 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดและต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans*

3.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth dilution susceptibility testing

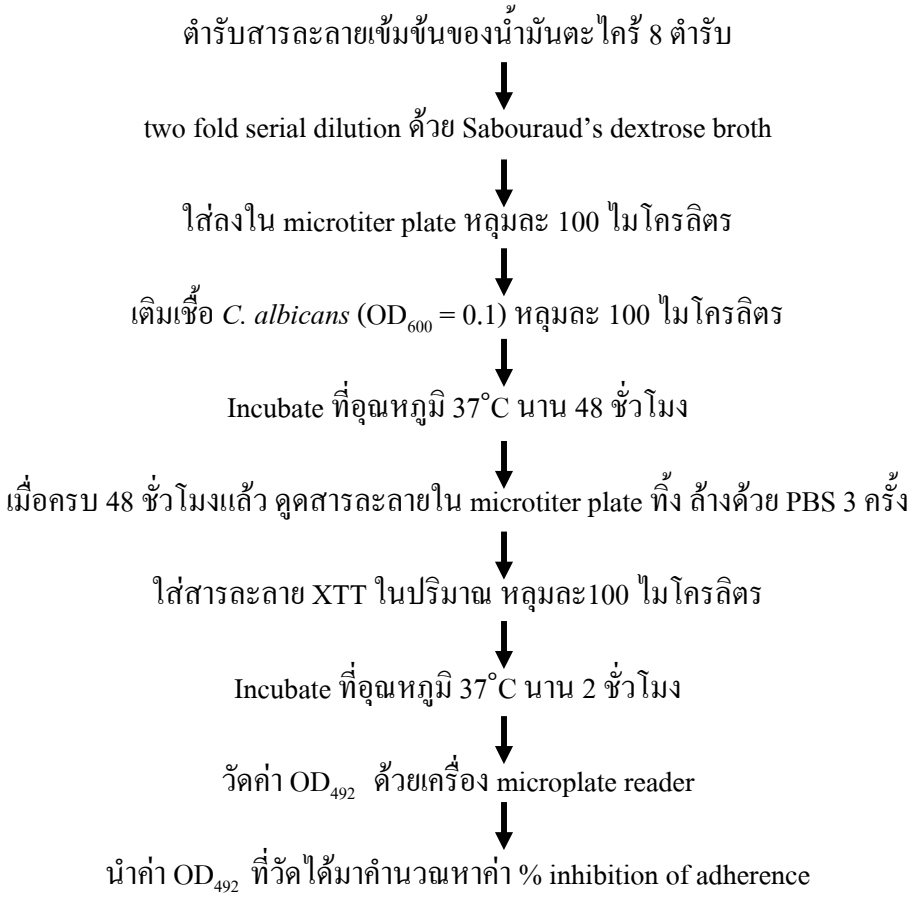
ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.3

3.4.2 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับที่สามารถป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อรา

นำตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับที่มีความเข้มข้น 2.5% มาทำการเจือจางด้วย Sabouraud's dextrose broth ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (two fold serial dilution) แล้วใส่ลงใน microtitre plate โดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันดีแล้วเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายในแต่ละหลุมออกทิ้งแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายตั้งต้น XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide] ที่เตรียมตามวิธีที่รายงานโดย Sen และคณะ [62] มาทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:6 แล้วนำไปใส่ลงใน microtiter plate ในปริมาณ หลุมละ100 ไมโครลิตร นำไปเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงวัดค่าความขุ่น (OD) ของสารละลายในแต่ละหลุมที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าความขุ่นที่วัดได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แต่ละตำรับที่สามารถป้องกันการเกิดไบโอฟิล์ม

<u>หมายเหตุ</u> : ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แต่ละตำรับจะถูกทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

Flow chart for the experiment



3.4.3 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับที่สามารถต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธีซึ่งรายงานโดย Ramage และคณะ [63]

นำเชื้อ *C. albicans* (OD_{600} = 0.1) ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดไบโอฟิล์มของเชื้อราแคนดิดา โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว นำเชื้อที่อยู่ในสารละลายออกจาก microtiter plate แล้วล้าง ไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาที่เกาะอยู่ข้างในหลุมของ microtiter plate ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นนำกระดาษกรองมาซับ PBS ที่เหลือตกค้างในหลุมออกให้แห้ง

นำตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับที่มีความเข้มข้น 2.5% มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (two fold serial dilution) ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่ลงใน microtiter plate ที่มีไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดา ในปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร หลุมที่เป็นตัวควบคุม (control) ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แล้วนำ microtiter plate ไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายใน

แต่ละหลุมออกทิ้งแล้วล้างไบโอฟิล์มในแต่ละหลุมด้วย PBS 3 ครั้งจากนั้นนำสารละลายตั้งต้น XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide] ที่เตรียมตามวิธีที่รายงานโดย Sen และคณะ [62] มาทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:6 แล้วนำไปใส่ลงใน microtiter plate ในปริมาณ หลุมละ100 ไมโครลิตร นำไปเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงวัดค่าความขุ่น (OD) ของสารละลายในแต่ละหลุมที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าความขุ่นที่วัดได้มาหาค่าร้อยละความสามารถในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อรา

หมายเหตุ : ขั้นตอนการทดสอบแสดงดัง Flow chart

: ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แต่ละตำรับจะถูกทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

Flow chart for the experiment

C. albicans (OD_{600} = 0.1) ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร

↓

Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง)

↓

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว ดูดสารละลายใน microtiter plate ทิ้ง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

↓

นำกระดาษกรองมาซับ PBS ที่เหลือตกค้างในหลุมออกให้แห้ง

↓

ใส่ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แต่ละตำรับที่ทำ two fold serial dilution ไว้แล้วในปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร หลุมที่เป็นตัวควบคุม (control) ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

↓

นำ microtiter plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง

↓

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว ดูดสารละลายใน microtiter plate ทิ้ง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

↓

ใส่สารละลาย XTT ในปริมาณ หลุมละ100 ไมโครลิตรแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

↓

วัดค่า OD_{492} ด้วยเครื่อง microplate reader

↓

นำค่า OD_{492} ที่วัดได้มาคำนวณหาค่า % inhibition of *C. albicans* biofilm

3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* เปรียบเทียบกับ benchmarked product (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein) โดย time killed assay

นำตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2T และ O2NW ไปทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดย time killed method ดังนี้

ก. ทำการเจือจางตำรับให้มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 0.6%

ข. นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมา 900 µl เติมเชื้อรา 100 µl ให้มีจำนวนเชื้อรา 10^4 CFU/ml ผสมให้เข้ากัน พร้อมจับเวลา

ค. ที่เวลา 5, 10, 15, 30, 45, 60 นาที, 2, 4, 6, 24 ชั่วโมง นำตัวอย่าง (จากข้อ ข) 100 µl เติมลงใน 2X Sabouraud's dextrose broth 100 µl ใน 96 well plate ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล จากนั้นนำส่วนผสมไปเลี้ยงต่อ บน Sabouraud's dextrose agar และเลี้ยงเชื้อต่อในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อราในหลอดทดลองใดที่ผลิตภัณฑ์สามารถทำลายได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีโคโลนีของเชื้อให้เห็น

3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4

ตอนที่ 4

พัฒนาตำรับสารละลายตะไคร้เข้มข้นชนิดปราศจากน้ำ (nonaqueous concentrated preparation)

4.1 เตรียมตำรับ O2NW80

จากผลการศึกษาในตอนที่ 3 พบว่าตำรับ O2NW สามารถต้านการเกาะของเชื้อได้ดีกว่าตำรับ O2T จึงเลือกตำรับ O2NW มาทำการศึกษาต่อ แต่เนื่องจากปริมาณน้ำมันตะไคร้ในตำรับที่ต้องนำมาเจือจางด้วยน้ำต้องใช้ในปริมาณมากจึงทำการปรับเพิ่มปริมาณน้ำมันตะไคร้ให้เข้มข้นขึ้นและมีความคงตัวทางกายภาพ ดังตำรับ O2NW80 (ตารางที่ 5) ซึ่งทำให้ได้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 59.1 %v/v

ตารางที่ 5 สูตรตำรับ O2NW80

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Ethanol	0.24 ml
Cetomacrogol 1000	1.67 g
Propylene glycol	0.86 ml
Lemongrass oil	4.0 ml

ขั้นตอนการเตรียม

หลอม Cetomacrogol 1000 และ PG เข้าด้วยกันบน water bath จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม ethanol และน้ำมันตะไคร้ลงไป (ตอนเติมน้ำมันตะไคร้ลงไป มีเม็ดเล็กๆสีขาวเกิดขึ้น คนให้ละลาย) ผสมให้เข้ากัน ได้สารละลายเหลืองใส ไม่แยกชั้น

ประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับ โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำประปา โดยปิเปตตำรับมา 60 µl เติมน้ำลงไป 5.9 ml (ตอนเติมในน้ำ เป็นก้อนขาวๆ vortex แล้วได้สารละลายขาวขุ่น)

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4

4.3 เตรียมตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2

เมื่อนำตำรับ O2NW80 ไปทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product พบว่าประสิทธิภาพลดลง จึงทำการปรับสูตรใหม่ เป็นสูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2 (ตารางที่ 6) ขั้นตอนการเตรียม ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1

ประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับหลังเตรียมเสร็จ และทำการเจือจางด้วยน้ำประปา โดยปิเปตตำรับมา 40 µl ลงในน้ำประปา 5.96 ml vortex ให้เข้ากัน ได้สารละลายขาวขุ่น ศึกษาความคงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1, 3 และ 5 วัน

ตารางที่ 6 สูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2

ส่วนประกอบ	O2NW80 ใหม่ 1 (59.3%LG)	O2NW80 ใหม่ 2 (57.9%LG)
Ethanol	0.24 ml	0.41 ml
Cetomacrogol 1000	1.5 g	1.5 g
Propylene glycol	1.0 ml	1.0 ml
Lemongrass oil	4 ml	4 ml

4.4 เตรียมตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2

เมื่อนำตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2 ไปทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ O2NW80 พบว่า O2NW80 ใหม่ 1 มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ O2NW80 แต่ดีกว่า O2NW80 ใหม่ 2 จึงทำการปรับสูตรใหม่ เป็นสูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW ใหม่ 1.2 (ตารางที่ 7) ขั้นตอนการเตรียม ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1

ประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับเมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำประปา โดยปิเปตตัวอย่างมา 30 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 6 ml ได้สารละลายขาวขุ่น ตั้งทิ้งไว้ 2, 6 และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 สูตรตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2

ส่วนประกอบ	O2NW80 ใหม่ 1.1 (59.7%LG)	O2NW80 ใหม่ 1.2 (59.2%LG)
Cetomacrogol 1000	1.7 g	1.9 g
Propylene glycol	1.0 ml	0.86 ml
Lemongrass oil	4 ml	4 ml

ระยะที่ 2 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น

2.1 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH

เตรียมตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ในรูปแบบ self-emulsified concentrated solution เพื่อลดปริมาตรให้เหลือ 1.8 มิลลิลิตรซึ่งจะสามารถบรรจุในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรได้ โดยเมื่อเจือจางด้วยน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะมีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% ซึ่งตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่เตรียมได้ประกอบด้วย น้ำมันตะไคร้ 59.7%v/v, cetomacrogol 25.4 % w/v, propylene glycol 14.9% v/v โดยการหลอม Cetomacrogol 1000 ใน propylene glycol จนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ค่อยเติมน้ำมันตะไคร้ แล้วคนให้เข้ากัน เก็บผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง ที่ 40°C 75% RH นำไปทดสอบความคงตัวทางกายภาพทุกเดือน ติดต่อกันนาน 6 เดือน

<u>การทดสอบลักษณะทางกายภาพเมื่อเจือจาง</u>

เจือจางตำรับโดยปิเปต ตัวอย่างมา 50 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 6 ml สังเกตลักษณะทางกายภาพเมื่อเจือจางใหม่ๆ และที่เวลา 2 และ 24 ชม

2.2 ศึกษาความคงตัวทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH

นำตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ซึ่งเก็บในสภาวะเร่ง ที่ 40°C 75% RH ไปทดสอบความคงตัวทางจุลชีววิทยาทุกเดือน ติดต่อกันนาน 6 เดือน โดยทดสอบประสิทธิภาพของตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม (อะคริลิก) เปรียบเทียบกับ Benchmarked product (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein)โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4.1-1.4.2

ระยะที่ 3 การศึกษานำร่องทางคลินิก

ผู้วิจัยได้นำเสนอโครงร่างวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และหลังจากโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นแล้ว (เลขที่โครงการ HE 542070) ผู้วิจัยได้ดำเนินการคัดเลือกอาสาสมัคร ดังนี้

1 กลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครในการศึกษานี้ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปาก จากภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีข้อกำหนดในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างดังต่อไปนี้

เกณฑ์ในการคัดอาสาสมัครเข้าศึกษา (Inclusion Criteria)

(1) อายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป
(2) ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปากบนฐานเรซินอะคริลิกและมีเชื้อ *C. albicans*
(3) ไม่มีประวัติการแพ้ตะไคร้หรือน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ
(4) สามารถติดต่อสื่อสารด้วยวิธีพูด อ่าน ฟัง หรือเขียนภาษา ไทยได้ หรือมีญาติที่ดูแลใกล้ชิดตลอดเวลา สามารถติดต่อสื่อสารได้ด้วยวิธีพูด อ่าน ฟัง หรือเขียนภาษาไทย
(5) เต็มใจหรือสมัครใจที่จะเข้าร่วมในการวิจัยจนถึงสิ้นสุดการวิจัยและร่วมมือปฏิบัติตามแผนที่ผู้วิจัยแนะนำ

เกณฑ์ในการคัดอาสาสมัครออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

(1) ผู้ป่วยที่มีอาการแทรกซ้อนอื่นๆ เช่น โรคทางระบบที่อาจก่อให้เกิดอันตรายได้
(2) ได้รับยาปฏิชีวนะและ/หรือยาต้านเชื้อราในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
(3) ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง
(4) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อราในช่องปากจำเป็นต้องได้รับยาต้านเชื้อราเพื่อรักษา
(5) ใช้น้ำยาบ้วนปากในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

2. การแบ่งกลุ่มการทดสอบ

เนื่องจากเป็นการศึกษานำร่องทางคลินิก จะทำการทดสอบกลุ่มละ 10 คน โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้น้ำเปล่าแช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ยาเม็ดฟู่ Bonyplus® แช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น แช่ฟันเทียมตลอดคืน

3. การทดสอบทางคลินิก

ขั้นตอนการทดสอบทางคลินิก ได้ดำเนินการ ดังนี้

1) อธิบายให้อาสาสมัครทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัยและให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ
2) ให้อาสาสมัครเซ็นชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ

3) อาสาสมัครทุกคนได้รับการซักประวัติต่างๆ และทำการบันทึกตามแบบสอบถาม

4) การตรวจภายในช่องปาก

อาสาสมัครทุกคนได้รับการตรวจช่องปากและสัมภาษณ์โดยผู้ทำการวิจัยเพียงคนเดียวตลอดการศึกษา โดยใช้ชุดตรวจภายในช่องปากซึ่งประกอบด้วยกระจกส่องปาก คีมคีบสำลี และเครื่องมือตรวจฟันและเหงือก ตรวจและบันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อภายใต้ฐานฟันเทียม โดยทำการตรวจและบันทึกก่อนเริ่มการศึกษาและการติดตามผลภายหลังจากการศึกษาครบ 4 สัปดาห์

5) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง (CHROMagar®, CHRO Magar Company, Paris, France) ในอัตราส่วน ส่วนผง 45.9 กรัม ต่อ น้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร ผสมให้ละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ต้มให้ค่อยๆ ละลายจนกระทั่งได้สารละลายเนื้อเดียว แล้วนำไปเก็บไว้ในหม้อปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50°C เพื่อเตรียมนำไปใช้ในการจำลองฐานฟันเทียมในขั้นตอนต่อไป

6) การจำลองฐานฟันเทียม

ก่อนเริ่มต้นการทดสอบจะทำการจำลองฐานฟันเทียมของอาสาสมัครด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง (first agar replica) โดยนำฟันเทียมบนของอาสาสมัครมาจุ่มล้างด้วยน้ำสะอาดปราศจากเชื้อ (sterile water) ใน beaker จากนั้นนำฐานฟันเทียมไปล้อมรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบ (boxing wax) กว้างประมาณ 1 นิ้ว โดยให้มีความสูงของแผ่นขี้ผึ้งเหนือขอบฐานฟันเทียมประมาณ 0.5 นิ้ว ใช้ขี้ผึ้งต่อขอบผนึกระหว่างขี้ผึ้งสีชมพูและขอบฟันเทียมโดยรอบให้แนบสนิทค่อย ๆ เทอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ ลงบนฐานฟันเทียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีความหนาอย่างน้อย 5 มิลลิเมตรจากฐานฟันเทียม รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเต็มที่ จากนั้นแกะแผ่นขี้ผึ้งที่ล้อมรอบขอบฟันเทียมออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่แข็งตัวแล้วออกจากฟันเทียมเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่สัมผัสกับฐานฟันเทียมอยู่ในลักษณะหงายขึ้น นำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการบันทึกลักษณะตำแหน่ง และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดา บนฐานฟันเทียม (baseline data)) ผู้ป่วยที่มีจำนวนโคโลนีเชื้อรามากกว่า 100 โคโลนี จะได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมการวิจัยโดยผู้ป่วยที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้า จะได้รับการแบ่งกลุ่มทดสอบการใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมในรูปแบบต่างๆโดยวิธีการแบ่งกลุ่มแบบสุ่มตัวอย่าง (random sampling)

7) แบ่งกลุ่มการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ให้ทันตสุขศึกษาและแนะนำการทำความสะอาดฟันเทียมด้วยวิธีต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้น้ำเปล่าแช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ยาเม็ดฟู่ Bonyplus® แช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น แช่ฟันเทียมตลอดคืน

8) นัดติดตามผลเมื่อเวลาผ่านไปครบ 4 สัปดาห์ โดยในการติดตามผลจะทำการจำลองฐานฟันเทียมของอาสาสมัครเพื่อหาปริมาณเชื้อแคนดิดาบนฐานฟันเทียม (second agar replica) แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ผลการวิจัย

การหาส่วนประกอบในตำรับเบื้องต้น

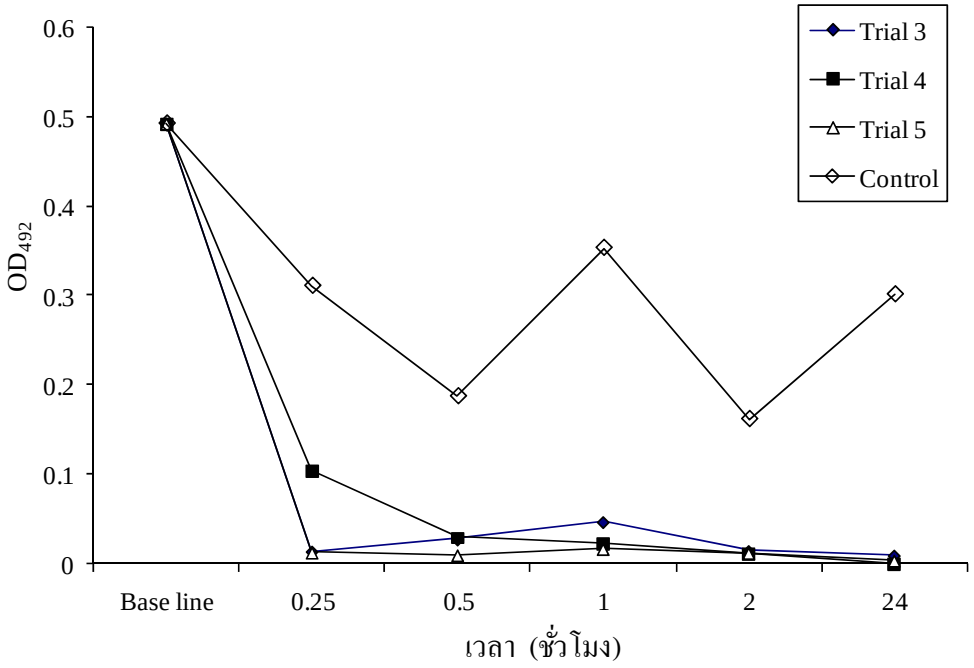
จากการศึกษาพบว่าตำรับ Trial 1 และ 2 แยกชั้นไม่คงตัว ส่วนตำรับ Trial 3 ใส แต่มีตะกอนของเกลือ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ Trial 3, 4, 5 ในการต้านเชื้อ *C. albicans* พบว่าประสิทธิภาพไม่ต่างกัน (ตารางที่ 8) แสดงว่าการเติมเกลือแกงลงในตำรับไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ และเมื่อนำตำรับ Trial 3, 4, 5 ไปทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่าง ๆ พบว่าทั้ง 3 ตำรับสามารถลดปริมาณเชื้อ *C. albicans* ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าตำรับ Trial 5 สามารถลดปริมาณเชื้อ *C. albicans* ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้ดีกว่าตำรับ Trial 3 และ 4 (รูปที่ 1) แม้ว่าจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตำรับ Trial 3 ซึ่งมีเกลือแกงเป็นองค์ประกอบสามารถลดปริมาณเชื้อในช่วง 0.25 ชั่วโมง แรกได้เท่า ๆ กับตำรับ Trial 5 แต่ประสิทธิภาพลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นก่อนที่จะสามารถลดปริมาณเชื้อได้เท่า ๆ กับ Trial 5 ที่เวลา 2 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเกิดจากการเจือจาง ซึ่งในช่วง 0.25 ชั่วโมงแรก น้ำมันตะไคร้สามารถลดปริมาณเชื้อได้อย่างรวดเร็ว เมื่อทิ้งไว้เกลือแกงในตำรับทำให้น้ำมันแยกตัวออกจากน้ำลอยขึ้นไป จึงทำให้ประสิทธิภาพลดลง ในขณะที่ตำรับ Trial 4 ซึ่งมีปริมาณ Cetomacrogol 1000 สูงกว่าตำรับ Trial 3 และอาจเป็นไปได้ว่าการเติมเกลือแกงลงในตำรับทำให้ ไมเซลล์ของ Cetomacrogol 1000 มีขนาดโตขึ้นและปลดปล่อยน้ำมันได้ช้าจึงส่งผลให้น้ำยาลดการเกาะของเชื้อได้ไม่ดีเท่า Trial 5 ซึ่งไม่มีเกลือแกงเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น จึงนำตำรับ Trial 5 ไปทำ response surface analysis ต่อไป

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ Trial 3, 4, 5

ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่ทดสอบ	MIC **(%)**	MFC **(%)**
Trial 3	0.078	0.156

Trial 4	0.078	0.156
Trial 5	0.078	0.156

MIC : minimum growth inhibitory concentration; MFC : minimum fungicidal concentration



รูปที่ 1 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 3 ตำรับในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆ

การหาองค์ประกอบในตำรับที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด (Formulation optimization)

จากผลการศึกษาเบื้องต้นได้องค์ประกอบที่น่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของน้ำยา จึงทำการศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ethanol, cetomacrogol 1000 และ propylene glycol โดยออกแบบการทดลองด้วย Box Behnken design ซึ่งจะได้ตำรับทั้งหมด 17 ตำรับ โดยมีส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ผลดังตารางที่ 9 จากการวิเคราะห์ผลด้วย ANOVA for response surface analysis พบว่า ปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ไม่สัมพันธ์กับค่า MIC จึงไม่สามารถสร้างรูปแบบจำลองในการทำนายได้ แต่พบว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย สัมพันธ์กับค่า MFC แบบ Quadratic model แสดงดังสมการ (1) และรูปที่ 2 โดยพบว่าปริมาณ ethanol ส่งผลให้ค่า MFC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.0054) และพบว่าปริมาณ ethanol และ cetomacrogol 1000 จะเกิดอันตรกริยาต่อกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P value เท่ากับ 0.0020 ส่วน propylene glycol และ cetomacrogol 1000 จะเกิดอันตรกริยาต่อกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P value เท่ากับ 0.0027 โดยพบว่าความไม่เข้ากันระหว่าง ethanol และ cetomacrogol 1000 ส่งผลให้ค่า MFC เพิ่มขึ้น ขณะที่ความไม่เข้ากันระหว่าง propylene glycol และ cetomacrogol 1000 ส่งผลให้ค่า MFC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้

ยังพบว่าหากเพิ่มปริมาณของ propylene glycol ในระดับยกกำลังสองจะส่งผลให้ค่า MFC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 17 ตำรับ

ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่ทดสอบ	MIC **(%)**	MFC **(%)**
1	0.078	0.078
2	0.078	0.078
3	-	-
4	0.078	0.078
5	0.078	0.156
6	0.078	0.078
7	0.078	0.078
8	0.078	0.156
9	0.078	0.156
10	0.078	0.078
11	0.039	0.078
12	0.039	0.078
13	0.039	0.156
14	0.078	0.156
15	0.078	0.156
16	0.039	0.078
17	0.039	0.078

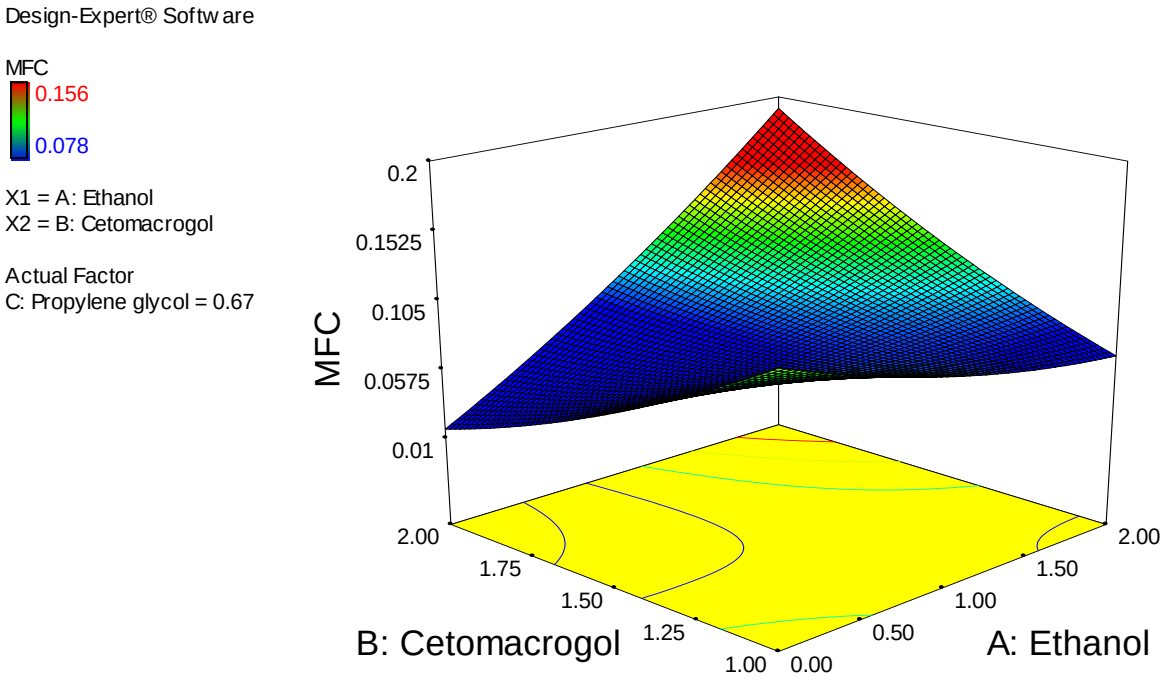
- : No inhibitory or killing effect

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยตามค่าที่ใช้จริงกับค่า MFC สามารถแสดงดังสมการ (1)

MFC = 0.263 - 0.166**Ethanol** - 0.176**Cetomacrogol** + 0.059**Propylene glycol** + 0.117**Ethanol x Cetomacrogol** - 1.128**Ethanol x Propyleneglycol** - 0.078 **Propylene glycol x Cetomacrogol** + 9.75 **Ethanol**^{2} + .039 **Cetomacrogol**^{2} + .029 **Propylene glycol** ^{2} (1)

R-squared = 0.9333

Adj R-Squared = 0.8333



รูปที่ 2 Response surface plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับค่า MFC

เมื่อนำทั้ง 17 ตำรับมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพ พบว่าเมื่อนำมาละลายน้ำให้มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้น 0.6% v/v พบว่าทุกตำรับไม่มีความคงตัวทางกายภาพ ทั้ง 3 สภาพ คือเมื่อละลายน้ำทันที หลังทำ Heat-cool cycling และ เมื่อเก็บที่ 45^{o}C นาน 30 วัน (ตารางที่ 10)

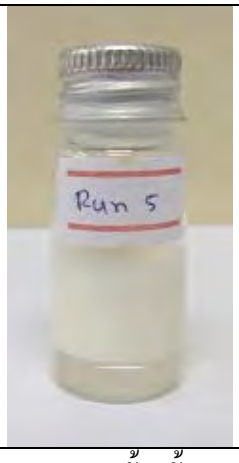
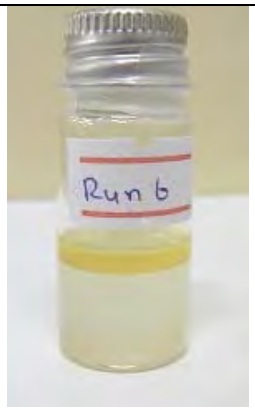
ตารางที่ 10 ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 17 ตำรับ

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
17	1			
17	1	ของผสมแยกชั้น ชั้นบนมีลักษณะเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างออกใส ขุ่นเล็กน้อย สีออกเหลืองเล็กน้อย	ของผสมแยกชั้น เป็น 3 ชั้น มีหยด lemongrass oil แยกออกมาชั้นบนเป็นหยดเล็กๆ ส่วนครีมข้นน้อยลง มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย	ตัวอย่างแยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้น มีสีเหลืองเข้มขึ้น ด้านล่างสีขุ่นขึ้น และด้านบนมีหยดน้ำมันแยกออกมา
16	2			
16	2	ของผสมแยกชั้น ชั้นบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างออกใส ขุ่นเล็กน้อย สีออกเหลืองเล็กน้อย	ของผสมแยกชั้นเป็น 3 ชั้น มีหยด lemongrass oil ชั้นบนชัดเจน ชั้นล่างเป็นของเหลวใสมีขนาดชั้นมากขึ้น ชั้นบนและล่างมีสีเข้มขึ้น	ส่วนผสมแยกชั้น ด้านบนมีชั้น lemongrass oil แยกชั้นออกมา ส่วนชั้นครีมมีสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
3	**3**			
3	**3**	ของผสมหนืดมาก (เท ไม่ได้) เป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน	ของผสมหนืด แยกชั้น (Day 0 ไม่แยก) ชั้นครีมหนืดอยู่ด้านบน ด้านหน้าครีมมีลักษณะแยกเล็กน้อย เหมือนมี oil แทรกอยู่ ส่วนล่างใสขุ่น	ส่วนผสมแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นครีมข้นสีขาว มีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย มีหยด lemongrass oil แยกออกมาเล็กน้อย ด้านบนเนื้อครีม
7	**4**			
7	**4**	ของผสมแยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน ด้านล่างเป็นสารละลายขุ่นออกเหลืองเล็กน้อย	ของผสมเหลวแยกชั้น มีหยด lemongrass oil แยกออกมาบนผิวหน้าครีมข้นด้านบน เป็นหยดเล็กๆ ของผสมมีสีเหลืองเข้มขึ้น	ส่วนผสมยังคงแยกชั้น ชั้นล่างมีสีขุ่นขึ้น ส่วนครีมด้านบนมีสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
1	**5**			
1	**5**	ของผสมแยกชั้น ชั้นบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน ด้านล่างเป็นสารละลายใส	ของผสมแยกเป็น 2 ชั้น ตรงกลางตรงรอยต่อ ขุ่นเล็กน้อย สีใกล้เคียงกัน	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น ด้านล่างที่ใส มีลักษณะขุ่นขึ้น สีครีมด้านบนมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย
2	**6**			
2	**6**	ของผสมแยกชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil ส่วนด้านล่างเป็นสารละลายใส ขุ่นเล็กน้อย	สารละลายแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างใสขึ้น สี lemongrass oil เข้มขึ้น	ส่วนผสมแยกชั้น ชั้น lemongrass oil มีชั้นหนาขึ้นกว่าเดิม สารละลายด้านล่างใสขึ้น

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
5	7			
5	7	ของผสมแยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีขาว ด้านล่างเป็นสารละลายขุ่น	ของผสมแยกชั้น ด้านบนครีมข้นมี lemongrass oil แยกออกมาเป็นหยดเล็กๆ	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น ครีมด้านบนมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย
6	8			
6	8	ของผสมแยกชั้น ชั้นบนเป็นครีมข้นสีขาว ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่น	ของผสมแยกเป็น 3 ชั้น เป็นชั้น lemongrass oil ออกมา ข้างล่างเป็นสารละลายใสขุ่น	ส่วนผสมแยกเป็น 3 ชั้น สารละลายด้านล่างขุ่นขึ้น

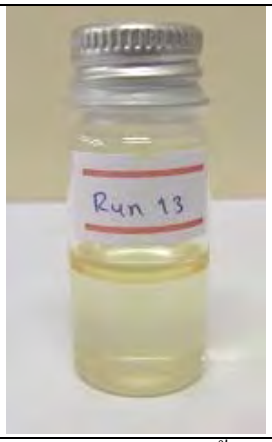
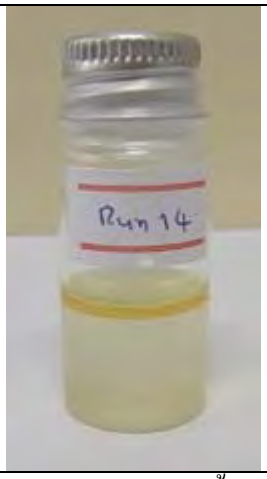
ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
11	**9**			
11	**9**	สารละลายแยกชั้นเป็นสามชั้น ด้านบนเป็น lemongrass oil ตรงกลางเป็นชั้นขาวขุ่น ด้านล่างขุ่นเล็กน้อย	สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ชั้น lemongrass oil อยู่ด้านบน สารละลายด้านล่างใส ชั้นขุ่นตรงกลางหายไป	สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ชั้น lemongrass oil กับชั้นสารละลายใสด้านล่าง
15	**10**			
15	**10**	สารละลายแยกชั้นด้านบนเป็นครีมขาวขุ่น ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่นเล็กน้อย	ของผสมมีสีเข้มขึ้นแยกเป็น 3 ชั้น แต่ชั้นครีมข้นบางลง ส่วนของสารละลายใสหนาขึ้น แต่ขุ่นขึ้นตรงรอยต่อแยกเป็นชั้นขาวขุ่นบางๆ ด้านบนผิวครีมมีหยด lemongrass oil แยกออกมาเป็นหยดเล็กๆ	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น ครีมด้านบนมีความหนาของชั้นสูงขึ้น และมีสีเข้มขึ้น ด้านล่างขุ่นขึ้น

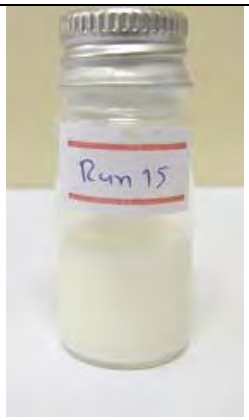
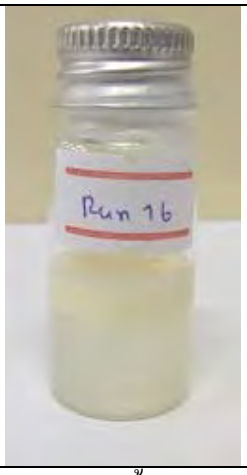
ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
14	**11**			
14	**11**	สารละลายแยกชั้น 2 ชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นขาว ด้านล่างเป็นสารละลายใสออกขุ่นเล็กน้อย	สารละลายแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ชั้นครีมข้นบางลงตรงรอยต่อมีชั้นขาวขุ่นบางๆ อยู่ ด้านล่างเป็นสารละลายขุ่นใสขึ้น หลังจาก Heat Cool Cycling มีสีเข้มขึ้น	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น ครีมด้านบนมีสีเข้มขึ้น มีหยด lemongrass oil แยกออกมาตรงผิวหน้า
12	**12**			
12	**12**	ของผสมแยกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนเป็นชั้นบางขาวขุ่น ชั้น lemongrass oil และชั้นล่างสุดเป็นชั้นสารละลายใสขุ่น	แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil และชั้นรอยต่อมีชั้นขุ่นบางๆ และชั้นสารละลายใสด้านล่าง	ส่วนผสมแยกชั้น ด้านล่างเป็นสารลายใสขึ้น และมีชั้น lemongrass oil ลอยอยู่บนผิวหน้า มีสีเข้มขึ้น

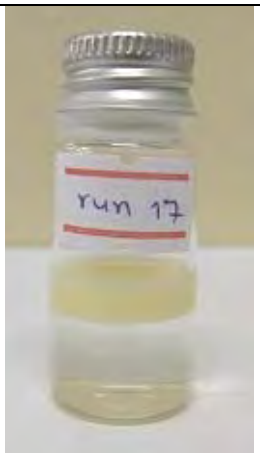
ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
8	**13**			
8	**13**	ของผสมแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil และชั้นล่างเป็นชั้นสารละลายใส ขุ่นเล็กน้อย	แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil และชั้นสารละลายใสด้านล่าง	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น และมีสีเข้มขึ้น
4	**14**			
4	**14**	ของผสมแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil และชั้นล่างเป็นชั้นสารละลายใส ขุ่นกว่า run 13 เล็กน้อย	แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil และชั้นสารละลายใสด้านล่าง	ส่วนผสมแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นส่วน lemongrass oil มีสีเข้มขึ้น สารละลายด้านล่างใสขึ้น

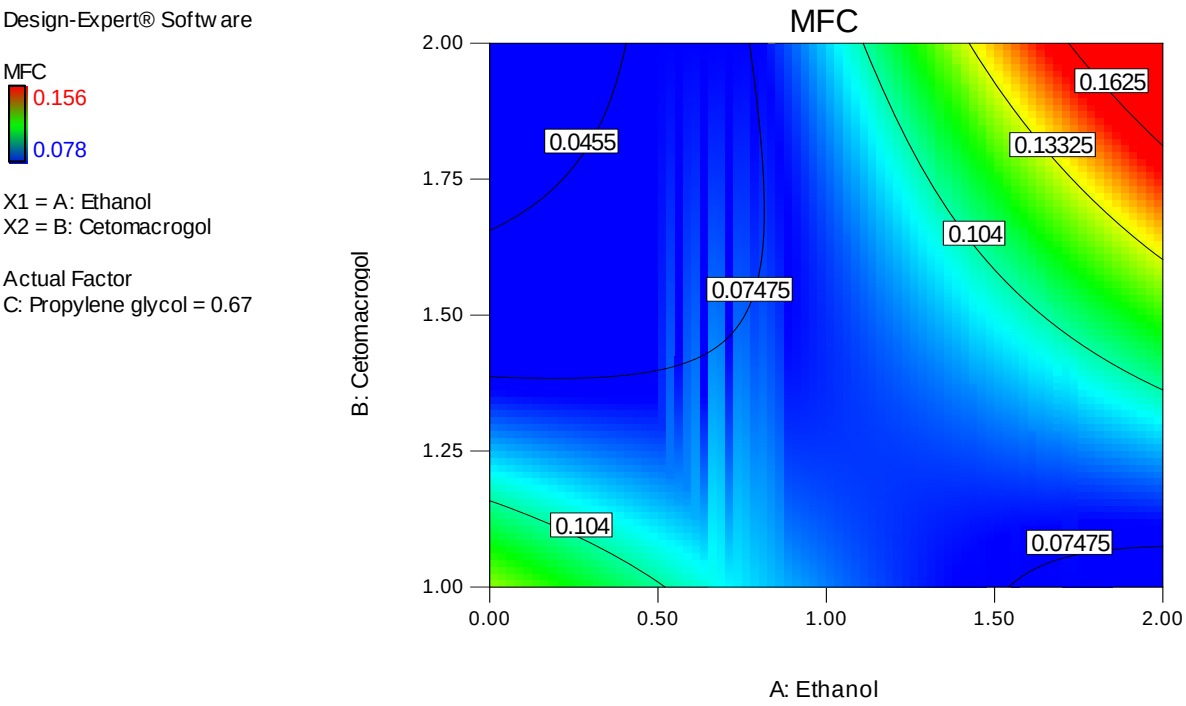
ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
10	**15**			
10	**15**	ของผสมเหลวหนืด ขาวข้น (เทได้) สีออกเหลืองเล็กน้อย ไม่แยกชั้น	ของผสมขาวข้นสีออกเหลืองนิดหน่อย ไม่แยกชั้น แต่แข็งตัว เทไม่ได้	ส่วนผสมแยกชั้น โดยมีสารละลายใสๆด้านล่าง สีใกล้เคียงเดิม มีหยดน้ำมันเล็กๆลอยหน้า
13	**16**			
13	**16**	ของผสมแยกชั้น ด้านบนเป็นครีมขาวข้น ด้านล่างเป็นสารละลายขุ่นขาว	ของผสมแยกเป็น 3 ชั้น ด้านบนมีสีเข้มขึ้น และมีหยด lemongrass oil แยกออกมาชัดเจน ตรงรอยต่อมีชั้นบางขุ่นๆ ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่น	ส่วนผสมแยกชั้น ครีมด้านบนมีสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Std	Run	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
9	**17**			
9	**17**	ของผสมแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นครีมสีเหลืองอ่อน ด้านล่างเป็นสารละลายใส	สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนมีหยด lemongrass oil แยกออกมาชัดเจน ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่น	ส่วนผสมแยกชั้นเป็น 3 ชั้น แยกเป็นชั้น lemongrass oil ชั้นครีมข้นด้านบน และสารละลายด้านล่างขุ่นขึ้นมาก

เมื่อนำค่า MFC ไปทำการหาสัดส่วนระหว่าง 3 ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด (Optimization) โดยเลือกค่า MFC ที่ต่ำที่สุดด้วยโปรแกรม Design expert จากความสัมพันธ์ที่แสดงในรูป contour plot และภาพ 3 มิติ (รูปที่ 3) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ดังสมการที่ 1 โดยกำหนดให้ค่า MFC ต่ำที่สุด โปรแกรมจะทำการคำนวนและหาสัดส่วนที่เป็นไปได้มาให้ ในที่นี้จะทำการเลือกมา 6 ตำรับ (ตารางที่ 3) เมื่อนำทั้ง 6 ตำรับไปทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ผลดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่าตำรับ O2, O3 และ O4 มีค่า MIC ต่ำกว่า O1, O5 และ O6 เมื่อนำมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพพบว่า O2 มีลักษณะทางกายภาพดีกว่า O3 และ O4 (ตารางที่ 12)



รูปที่ 3 Contour plot เพื่อใช้ในการหาสัดส่วนของตำรับที่ให้ค่า MFC ต่ำที่สุด

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MFC ของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 6 ตำรับ

ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่ทดสอบ	MIC (%)	MFC (%)
O1	0.156	0.156
O2	0.078	0.156
O3	0.078	0.156
O4	0.078	0.156
O5	0.156	0.156
O6	0.156	0.156

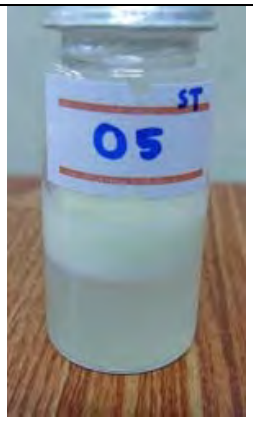
ตารางที่ 12 ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 6 ตำรับ

Optimization	**เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ**	**หลัง Heat Cool Cycling**	**เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน**
O1			
O1	แยกชั้น เป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อนอยู่ด้านบน ด้านล่างเป็นสารละลายใสสีออกเหลืองนิดๆ	ส่วนผสมแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ชั้นบนแยกเป็นชั้น lemongrass oil ชัดเจน กลางเป็นชั้นครีมข้น ส่วนสารละลายด้านล่างมีความขุ่นมากขึ้น	ของผสมแยกเป็น 2 ชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเข้มขึ้น
O2			
O2	แยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเหลืองนวล (สีไม่เข้มเท่า O1) ด้านล่างเป็นสารละลายขุ่นขาว	ส่วนผสมแยกชั้นชัดเจนกว่า day 0 สารละลายด้านล่างใสขึ้น ชั้นบนมีหยดน้ำมันแยกออกมา	ของผสมแยกชั้นชัดเจนขึ้น สารละลายด้านล่างขุ่นขาว

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Optimization	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
O3			
O3	แยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน เข้มกว่า O1 ด้านล่างเป็นสารละลายใส ใสกว่า O1	ส่วนผสมแยกเป็นสามชั้น ชั้นบนเป็นชั้น lemongrass oil ตรงกลางเป็นชั้นครีมข้น ส่วนสารละลายด้านล่างขุ่นขึ้นเล็กน้อย	ของผสมแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ด้านบนเป็นชั้น lemongrass oil สารละลายด้านล่างขุ่นขึ้น
O4			
O4	แยกชั้น ด้านบนเป็น lemongrass oil สีเหลือง ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่นเล็กน้อย	ส่วนผสมแยกชั้นเป็นสองชั้น ชั้นบนเป็น lemongrass oil สารละลายด้านล่างใสขึ้น	ของผสมแยกชั้น ด้านบนเป็นชั้น lemongrass oil ด้านล่างเป็นสารละลายใสขึ้น

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Optimization	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	หลัง Heat Cool Cycling	เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน
O5			
O5	แยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน อ่อนกว่า O1 ด้านล่างเป็นสารละลายใส	ส่วนผสมยังแยกชั้นเหมือนเดิม แต่ด้านบนมีหยดน้ำมันแยกออกมาเป็นเม็ดเล็กๆ และสารละลายด้านล่างมีความขุ่นมากขึ้น	สารละลายแยกชั้นเหมือนเดิม มีสีเข้มขึ้น มีหยดน้ำมันแยกตัวออกมาเป็นหยดเล็กๆ ส่วนสารละลายด้านล่างขุ่นมากขึ้น
O6			
O6	แยกชั้น ด้านบนเป็นครีมข้นสีเหลืองอ่อน ด้านล่างเป็นสารละลายใสขุ่น	ส่วนผสมแยกเป็นสองชั้นชัดเจนขึ้น สีเข้มขึ้น ด้านบนมีหยดน้ำมันเล็กๆ แยกออกมา	สารละลายแยกชั้นชัดเจนขึ้น มีสีเข้มขึ้น ด้านบนมีหยดน้ำมันแยกออกมา ด้านล่างเป็นสารละลายขาวขุ่นขึ้น

การพัฒนาตำรับน้ำยาแช่ฟันเทียมเพื่อแก้ปัญหาความไม่คงตัวทางกายภาพ

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าตำรับ O2 ก็ยังไม่คงตัวทางกายภาพเนื่องจากมีน้ำในตำรับ คือเกิด creaming ดังนั้นจึงปรับเปลี่ยนสูตรตำรับโดยเตรียมเป็นน้ำยาแช่ฟันเทียมชนิดปราศจากน้ำ (non aqueous) โดยทำการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด ที่สามารถละลายน้ำมันหอมระเหยได้ดี ได้แก่ cetomacrogol 1000 (O2NW) และ Tween 80 (O2T) โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการยับยั้งและทำลายเชื้อโดยวิธี broth dilution susceptibility testing พบว่า O2T มีค่า MFC ต่ำกว่า O2NW (ตารางที่ 13) และจากการศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับ O2T และ O2NW พบว่า ทั้ง 2 ตำรับมีความคงตัวทางกายภาพดี (ตารางที่ 14)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อโดยวิธี broth dilution susceptibility testing ดังกล่าวข้างต้นเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆในการยับยั้งและทำลายเชื้อที่อยู่ในสภาพเซลล์เดี่ยวซึ่งแขวนลอยอยู่ในของเหลว (planktonic cells) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่าง ๆ ในการป้องกันการเกิดและต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* เพิ่มเติมดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 ซึ่งพบว่า ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.156% ตำรับ O2T และ O2NW สามารถป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ได้ใกล้เคียงกันและดีกว่า O2 (ตารางที่ 15) แต่เมื่อเชื้อ *C. albicans* เกิดการยึดเกาะและสร้างไบโอฟิล์มแล้ว O2T จะมีประสิทธิภาพในการต้านไบโอฟิล์มได้ดีกว่า O2NW (ตารางที่ 16) และเมื่อนำตำรับ O2T และ O2NW ไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโดยการทำ challenge test ด้วยการเติมเชื้อลงในสารละลายพบว่าที่เวลา 5 นาที ตัวอย่างทั้ง 2 ตำรับสามารถฆ่าเชื้อได้หมดภายใน 5 นาที ขณะที่ benchmarked product (BONYPLUS®, Bonyf AG, Liechtenstein) ฆ่าเชื้อได้หมดที่ 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 13 ค่า MIC และ MFC ของตำรับ O2T และ O2NW

ตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ที่ทดสอบ	MIC **(%)**	MFC **(%)**
O2T	0.078	0.078
O2NW	0.078	0.156

ตารางที่ 14 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ O2T และ O2NW

Optimization	**เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ**	**หลัง Heat Cool Cycling**	**เมื่อเก็บที่ 45°C นาน 30 วัน**
O2T			
O2T	สารละลายไม่แยกชั้น เหลืองใสขุ่นมากกว่า O2NW	สารละลายไม่แยกชั้น สีเหลืองใสขึ้น	สารละลายไม่แยกชั้น สีเหลืองใสขึ้น
O2NW			
O2NW	สารละลายไม่แยกชั้น สารละลายเหลืองใส ขุ่นเล็กน้อย	สารละลายไม่แยกชั้น สารละลายเหลืองใส ขุ่นกว่าเดิมเล็กน้อย	สารละลายไม่แยกชั้น สารละลายเหลือง ใสขึ้น

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับในการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans*

Concentration	**% inhibition of adherence**						
(%)	**1.25**	**0.625**	**0.3125**	**0.156**	**0.0781**	**0.039**	**0.0195**
O1	98.43	98.36	98.70	86.65	32.34	14.16	0.30
O2	98.95	98.93	98.83	94.82	27.90	22.16	7.68
O3	96.41	98.32	98.67	89.52	11.66	13.30	2.96
O4	96.39	97.46	98.49	99.16	22.26	12.21	16.26
O5	95.71	97.32	98.54	89.30	20.30	17.67	15.85
O6	97.96	98.40	91.43	44.74	39.32	42.53	33.38
O2T	99.90	96.04	96.30	97.48	18.47	23.93	26.39
O2NW	98.40	96.68	96.30	97.60	34.68	17.28	19.93

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 8 ตำรับในการต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans*

Concentration	**% inhibition of *C. albicans* biofilm**					
(%)	**1.25**	**0.625**	**0.3125**	**0.156**	**0.0781**	**0.039**
O1	88.83	92.14	94.83	37.29	-4.05	-5.04
O2	82.04	81.43	48.70	24.84	17.06	-0.66
O3	79.70	92.66	93.31	42.10	19.30	18.75
O4	87.08	92.93	88.05	34.81	18.91	19.90
O5	85.93	91.03	44.95	24.61	18.84	14.74
O6	74.35	87.58	51.69	14.15	-3.53	3.63
O2T	99.25	94.86	90.77	49.05	41.72	36.40
O2NW	97.37	95.42	83.43	26.10	-12.19	-16.74

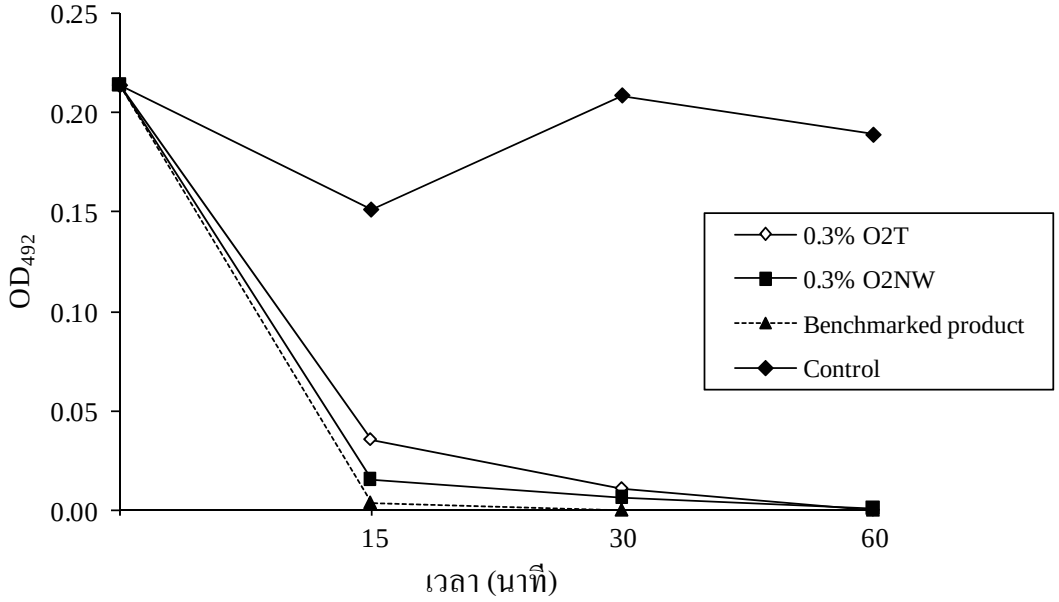
ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2T และ O2NW ในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* โดย time killed method เปรียบเทียบกับ benchmarked product

Time (min)	Control	O2T+ *C.albicans*	O2NW+ *C.albicans*	Benchmarked product
0	+	+	+	+
5	+	-	-	+
10	+	-	-	+
15	+	-	-	+
30	+	-	-	+
45	+	-	-	+
60	+	-	-	+
2 h	+	-	-	-
4 h	+	-	-	-
6 h	+	-	-	-
24 h	+	-	-	-

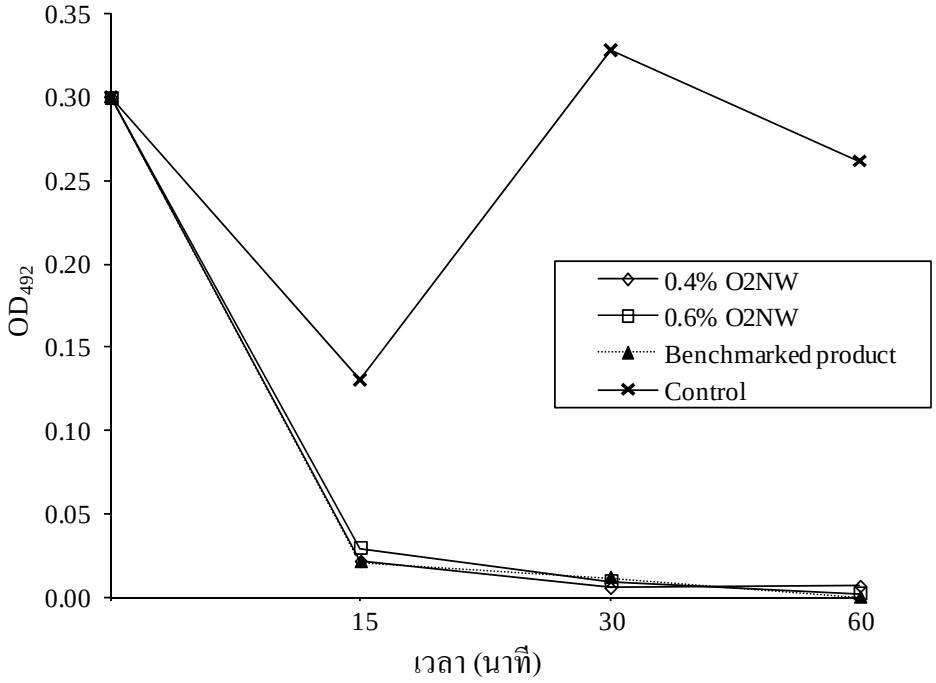
+ : มีโคโลนีของเชื้อ - : ไม่มีโคโลนีของเชื้อ

จากตารางที่ 16 พบว่าประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2T และ O2NW ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3125% สามารถต้านไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ได้มากกว่า 80% ดังนั้นจึงนำตำรับ O2T และ O2NW ไปทำการทดสอบต่อ โดยทำการเจือจางตำรับ O2T และ O2NW ให้มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3% แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product ผลการทดสอบพบว่า ตำรับ O2T, O2NW และ benchmarked product มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่าตำรับ O2NW มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้ดีกว่า O2T (รูปที่ 4) แต่ตำรับ O2NW ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3% ยังมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมน้อยกว่า benchmarked product จึงได้ลองทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2NW ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% และ 0.6% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product และพบว่า

ตำรับ O2NW ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% และ 0.6% มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเท่าๆ กับ benchmarked product (รูปที่ 5)



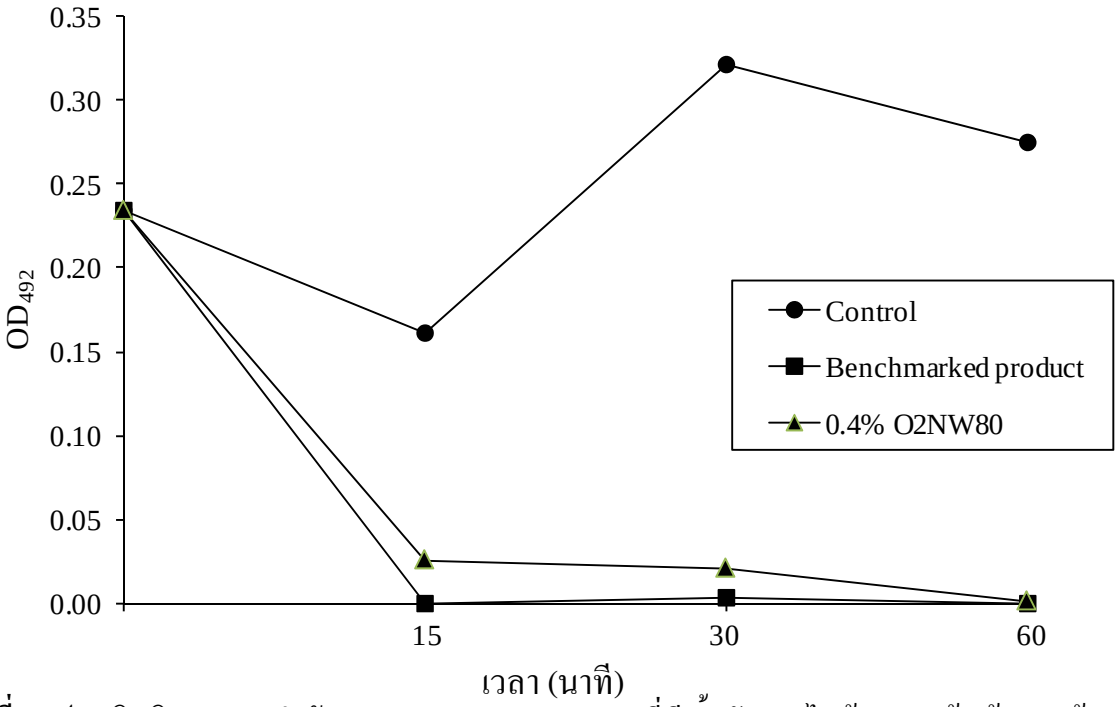
รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของตำรับ O2T และ O2NW ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ benchmarked product



รูปที่ 5 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ benchmarked product

การพัฒนาตำรับให้มีความเข้มข้นมากที่สุดก่อนนำไปทดสอบในอาสาสมัคร

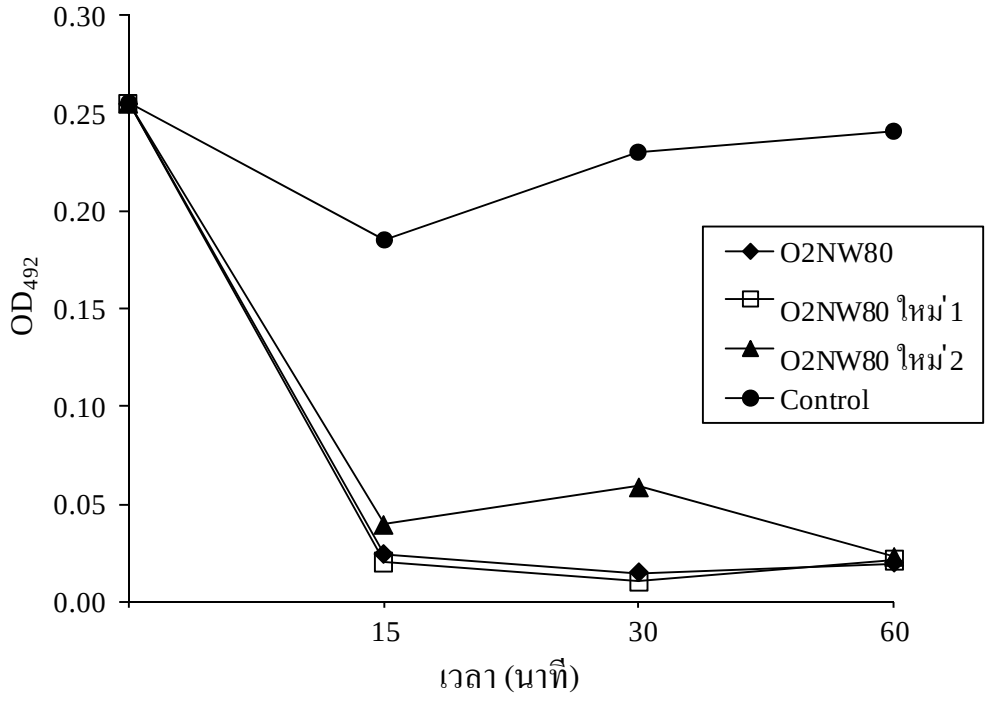
เนื่องจากผู้วิจัยต้องการลดปริมาตรของน้ำยาแช่ฟันเทียมให้เหลือน้อยที่สุดเพื่อให้ผู้ป่วยสามารถพกพาและเตรียมสะดวกขึ้น จึงปรับสูตรอีกครั้งโดยการเพิ่มน้ำมันตะไคร้ให้เข้มข้นมากขึ้น ด้วยการปรับส่วนประกอบให้เป็นดังตารางที่ 5 ได้เป็นตำรับ O2NW80 จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับ benchmarked product พบว่าตำรับ O2NW80 ประสิทธิภาพด้อยกว่า benchmarked product (รูปที่ 6) แม้ว่าจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อสังเกตลักษณะของสารละลายพบว่ามีการเกิด creaming ลอยขึ้นด้านบนทำให้น้ำมันตะไคร้ส่วนใหญ่ลอยขึ้นด้านบน ซึ่งอาจส่งผลให้ในระยะ 1 ชั่วโมงแรก ไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด



รูปที่ 6 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ benchmarked product

ผู้วิจัยจึงลองทำการพัฒนาตำรับใหม่ เป็นตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2 ดังตารางที่ 6 และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเปรียบเทียบกับตำรับ O2NW80 โดยเตรียมตำรับต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% จากผลการทดสอบพบว่าทั้ง 3 ตำรับมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 มีประสิทธิภาพ

เท่าๆ กับ O2NW80 ในขณะที่ตำรับ O2NW80 ใหม่ 2 มีประสิทธิภาพด้อยกว่า แม้ว่าจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 7) เมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ เป็นสารละลายเหลืองใส ไม่แยกชั้น (รูปที่ 8) เมื่อเจือจางด้วยน้ำประปา โดยปิเปตตัวอย่างมา 40 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 6 ml ตั้งทิ้งไว้ 1, 3 และ 5 วัน พบว่า O2NW80 ใหม่ 1 เกิด creaming น้อยกว่า และความคงตัวมากกว่า O2NW80 ใหม่ 2 (ตารางที่ 18) โดยตำรับ O2NW80 ใหม่ 2 มีการลอยของน้ำมันตะไคร้ ซึ่งสามารถยืนยันสมมติฐานที่ว่าตำรับ O2NW80 ใหม่ 2 มีประสิทธิภาพด้อยกว่า O2NW80 ใหม่ 1 อาจเกิดเนื่องจากการลอยของน้ำมันตะไคร้ ทำให้น้ำมันสัมผัสกับเชื้อได้ไม่ดีในระยะสั้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ใน O2NW80 ใหม่ 2 จะต่ำกว่า O2NW80 ใหม่ 1 และเมื่อพิจารณาส่วนประกอบในตำรับ O2NW80 ใหม่ 2 จะมีปริมาณ ethanol มากกว่าตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 อาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ ethanol ในตำรับจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการ hydrate ของส่วนที่ชอบน้ำของสารก่ออิมัลชันลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันลดลงส่งผลให้ระบบอิมัลชันไม่คงตัวเมื่อถูกเจือจาง นอกจากนี้จากการทำ Formulation optimization และ surface response analysis พบว่ามีความไม่เข้ากันของ ethanol /Cetomacrogal และในตำรับถึงแม้ว่ามี ethanol ต่างกันเพียง 0.2 ml จากสมการที่ 1 จะเห็นได้ว่าการผสม ethanol /Cetomacrogal เข้าด้วยกันจะส่งผลให้ค่า MFC เพิ่มขึ้น โดยมีสัมประสิทธิ์ของการเกิดความไม่เข้ากันเป็น 0.117 และค่า $(ethanol)^2$ เป็น 9.75 ซึ่งมากพอที่จะส่งผลให้เห็นความแตกต่างของประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะบนพื้นผิววัสดุ

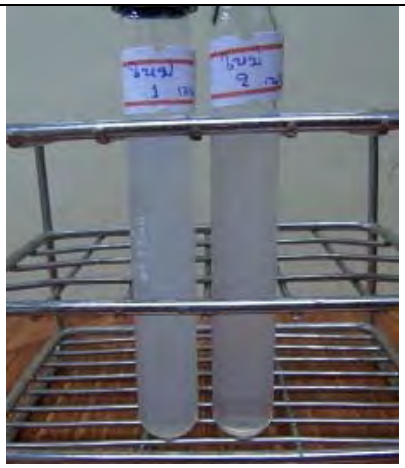
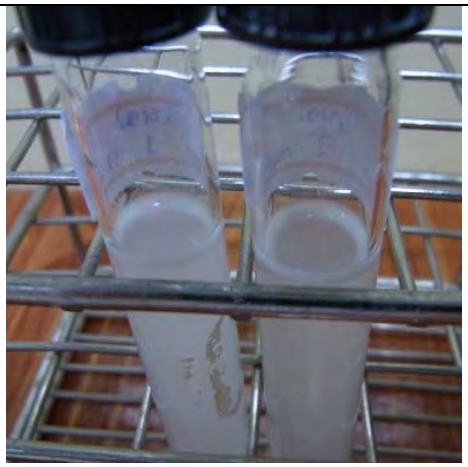
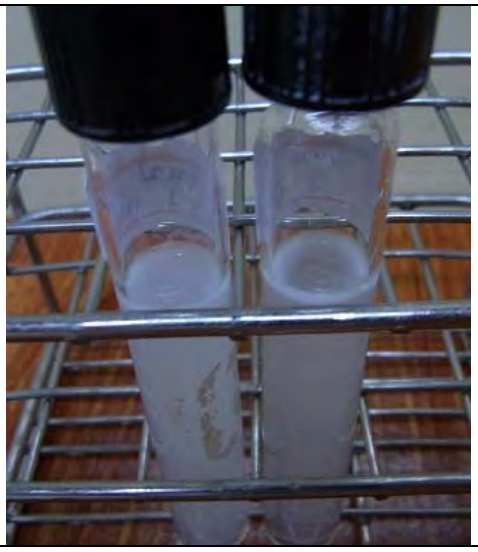


รูปที่ 7 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 และ O2NW80 ใหม่ 2 ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ O2NW80

รูปที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ เป็นสารละลายเหลืองใส ไม่แยกชั้น ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 (ซ้าย) และ O2NW80 ใหม่ 2 (ขวา)

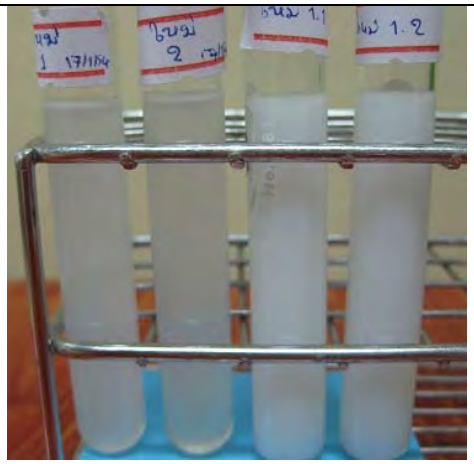
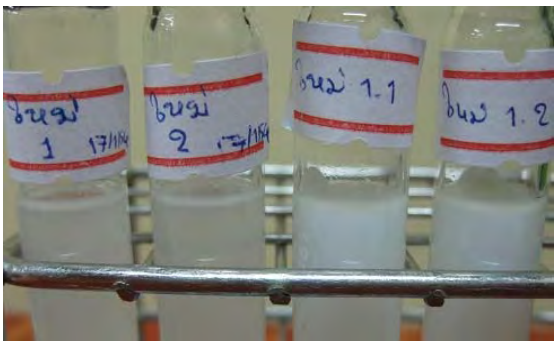
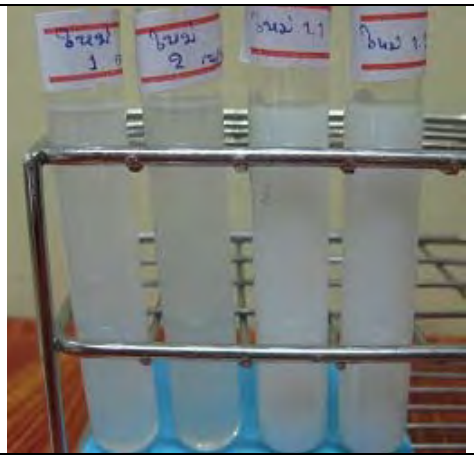
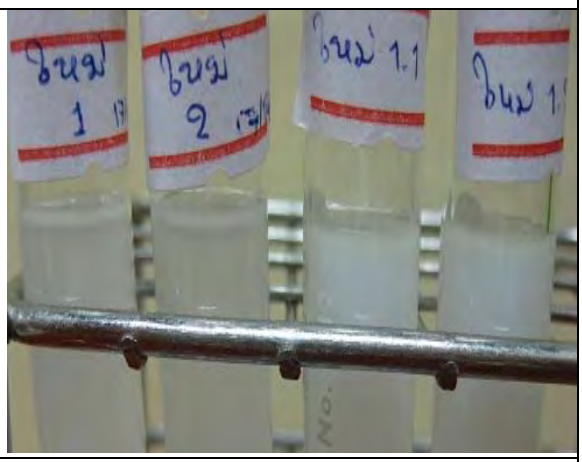
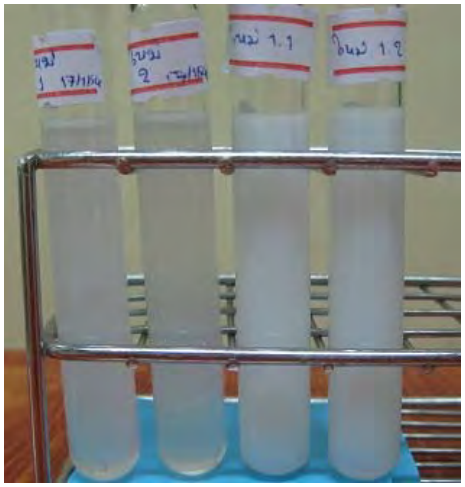
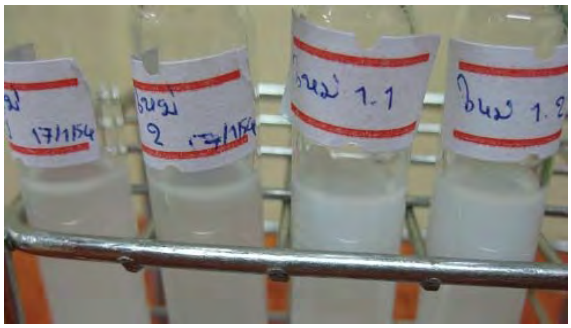
จากผลข้างต้นผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 ต่อเป็นตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2 ซึ่งมีสัดส่วนของ cetomacrogol และ propylene glycol ที่ต่างกันโดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 7 และพบว่าทั้ง 2 ตำรับมีความคงตัวทางกายภาพมากกว่า และเกิด creaming น้อยกว่า O2NW80 ใหม่ 1 (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำประปาให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4% เพื่อศึกษาความคงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้

Day 1		
Day 3		
Day 5		
	ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1 (ซ้าย) และ O2NW80 ใหม่ 2 (ขวา) รูปด้านขวา แสดงลักษณะการ	

	การแยกชั้นของตัวอย่าง

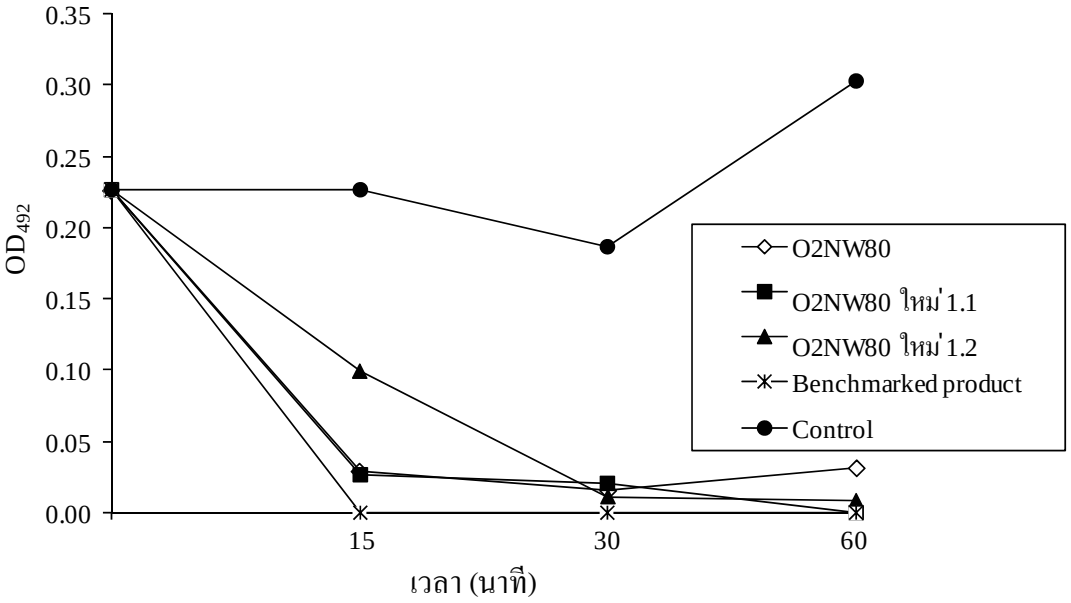
ตารางที่ 19 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำประปาให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3% เพื่อศึกษาความคงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้

ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง		
ตั้งทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง		
ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง		

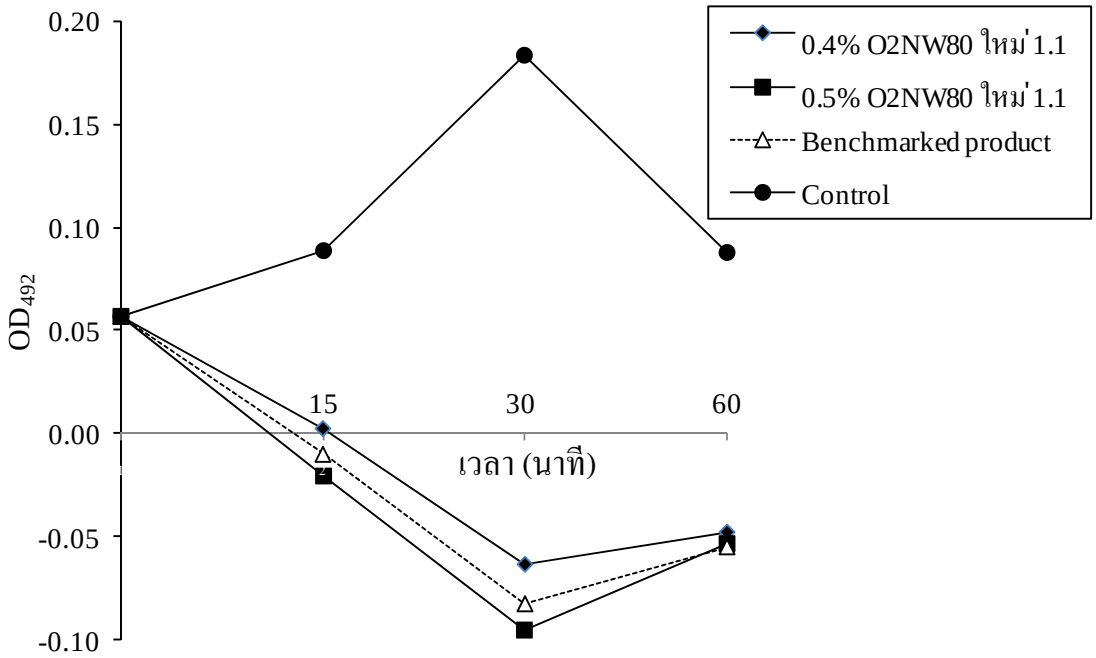
ในการพัฒนาขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเลือกตำรับที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยปรับส่วนประกอบให้มีปริมาณน้ำมันตะไคร้คงที่แต่สัดส่วนของ cetomacrogol และ propylene glycol ต่างกัน แต่ขั้นตอนในการนำมาเจือจางเพื่อทดสอบประสิทธิภาพเหมือนกัน ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายจะขึ้นกับปริมาณของน้ำมันตะไคร้ในตำรับ เมื่อนำตำรับ O2NW80 (59.1% LG), O2NW80 ใหม่ 1.1 (59.7% LG) และ O2NW80 ใหม่ 1.2 (59.2% LG) ไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ benchmarked product โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเท่ากับ 0.3% พบว่า ทั้ง 3 ตำรับและ benchmarked product มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นว่าตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีประสิทธิภาพดีกว่า ตำรับ O2NW80 และ O2NW80 ใหม่ 1.2 (รูปที่ 9) แต่ก็ยังด้อยกว่า benchmarked product เล็กน้อย การที่ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีประสิทธิภาพดีกว่า O2NW80 ใหม่ 1.2 (รูปที่ 9) อาจเกิดจากการปรับสัดส่วนระหว่าง cetomacrogol 1000 และ propylene glycol เพื่อให้ตำรับมีความคงตัวมากขึ้นส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ใน O2NW80 ใหม่ 1.1 (59.7%) มากกว่า O2NW80 ใหม่ 1.2 (59.2%) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ก็ยังด้อยกว่า benchmarked product เล็กน้อย แม้ว่าจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ผู้วิจัยจึงได้ลองทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 เพิ่มเติมโดยเตรียมให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเพิ่มขึ้นเป็น 0.4% และ 0.5% ผลการทดสอบพบว่า ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% มีประสิทธิภาพดีที่สุด (รูปที่ 10)

การคำนวณหาปริมาตรที่ต้องบรรจุในภาชนะเพื่อใช้ในการทดสอบกับอาสาสมัคร

จากผลการศึกษาข้างต้น เมื่อคำนวณกลับไปหาปริมาตรของ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่ต้องใช้ในการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเท่ากับ 0.5% พบว่า ต้องนำตัวอย่างมา 1.7 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำให้เป็น 200 มิลลิลิตร และเมื่อนำมาประมาณปริมาตรที่ติดอยู่กับหลอดหลังเทออก พบว่าต้องใส่ตัวอย่าง 1.8 มิลลิลิตรลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 จำนวน 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเจือจางด้วยน้ำให้เป็น 200 มิลลิลิตรแล้ว จะมีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% ไปทำการทดสอบทางคลินิกต่อไป



รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80, O2NW80 ใหม่ 1.1 และ O2NW80 ใหม่ 1.2 ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเท่ากับ 0.3% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ benchmarked product

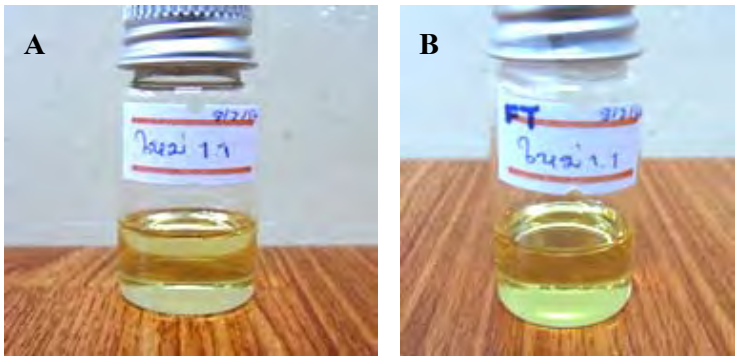
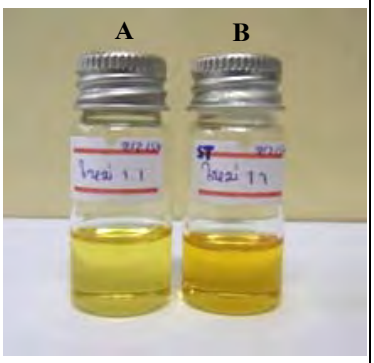


รูปที่ 10 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเท่ากับ 0.4% และ 0.5% ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับ benchmarked product

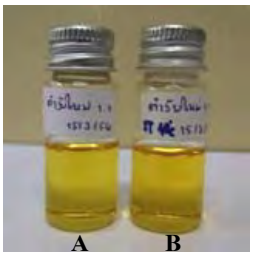
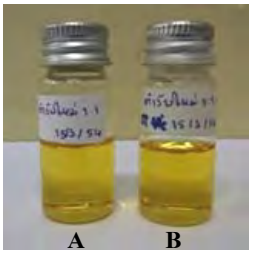
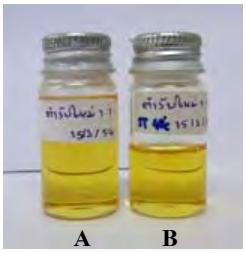
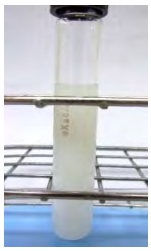
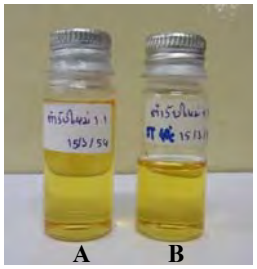
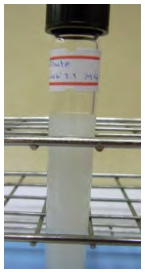
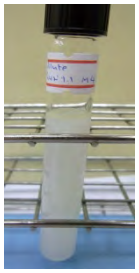
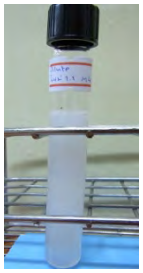
ผลการศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับ

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ พบว่าหลังผ่าน heat-cool cycling 6 รอบ สีของตำรับเข้มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกับตำรับที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง ที่ 45°C 75% RH เป็นเวลา 30 วัน สีของตำรับเข้มกว่าตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างชัดเจน (ตารางที่ 20) ส่วนลักษณะทางกายภาพของตำรับเมื่อเก็บที่ 40°C 75% RH จากเดือนที่ 1-6 แสดงดังตารางที่ 21 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างที่ 40°C 75% RH ครบ 6 เดือน พบว่าสีของตัวอย่างเข้มมากกว่าตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเล็กน้อย สอดคล้องกับการนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการ heat-cool cycling คือสีของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ขณะที่หากเก็บที่ 45°C 75% RH นาน 30 วันสีตัวอย่างจะเข้มขึ้น (ตารางที่ 20) อย่างไรก็ตามเมื่อเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำประปาพบว่าลักษณะของน้ำยาที่เจือจางด้วยน้ำประปาจะเกิด creaming บางๆ บริเวณผิวหน้าทุกเวลาที่สังเกต และปริมาณของ creaming ที่เกิดไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บนาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 21)

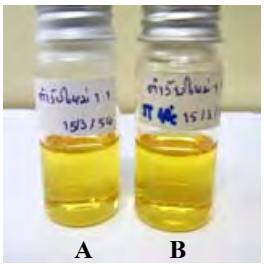
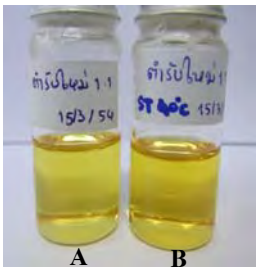
ตารางที่ 20 ลักษณะทางกายภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1

	
A : ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังผ่าน Heat-Cool Cycling 6 รอบ B : ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะเห็นได้ว่าสีของขวด A ไม่แตกต่างกันกับขวด B	หลังจากเก็บที่ 45 °C เป็นเวลา 30 วัน สีของตำรับ (ขวด B) เข้มกว่าขวด A ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างชัดเจน

ตารางที่ 21 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 40°C รวมทั้งลักษณะของตำรับที่ 40°C หลังเจือจางด้วยน้ำประปา

เดือนที่	ขวด A เป็นตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ขวด B เป็นตำรับที่เก็บที่ 40°C	ตำรับเมื่อเก็บที่ 40°C หลังเจือจางด้วยน้ำประปา		
		เวลา 0 นาที	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0				
1				
2				
3				
4				

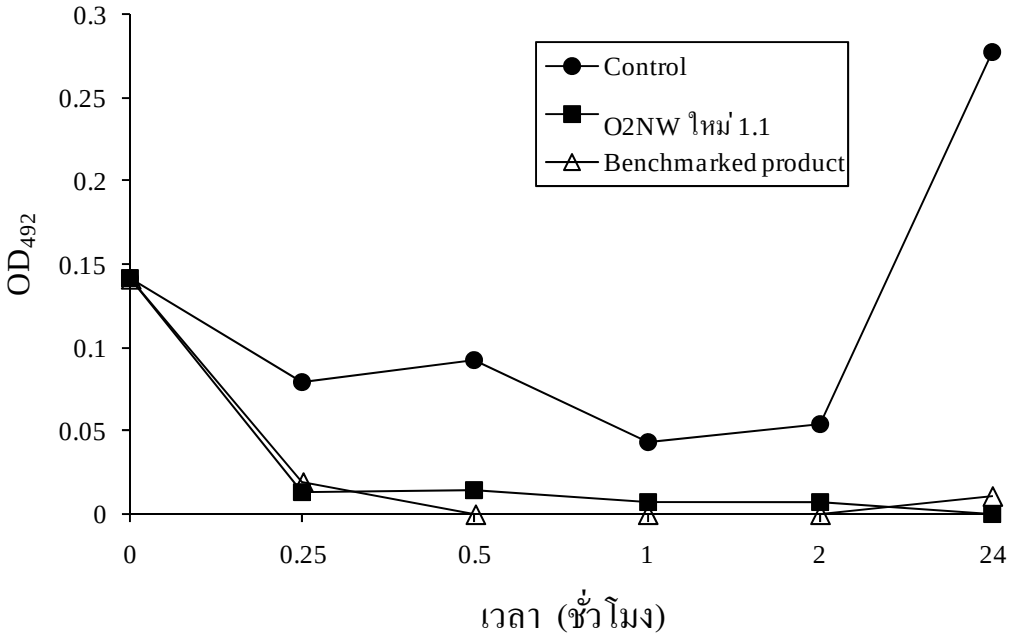
ตารางที่ 21 (ต่อ)

เดือนที่	ขวด A เป็นตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ขวด B เป็นตำรับที่เก็บที่ 40°C	ตำรับเมื่อเก็บที่ 40°C หลังเจือจางด้วยน้ำประปา		
		เวลา 0 นาที	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
5	 A B			
6	 A B			

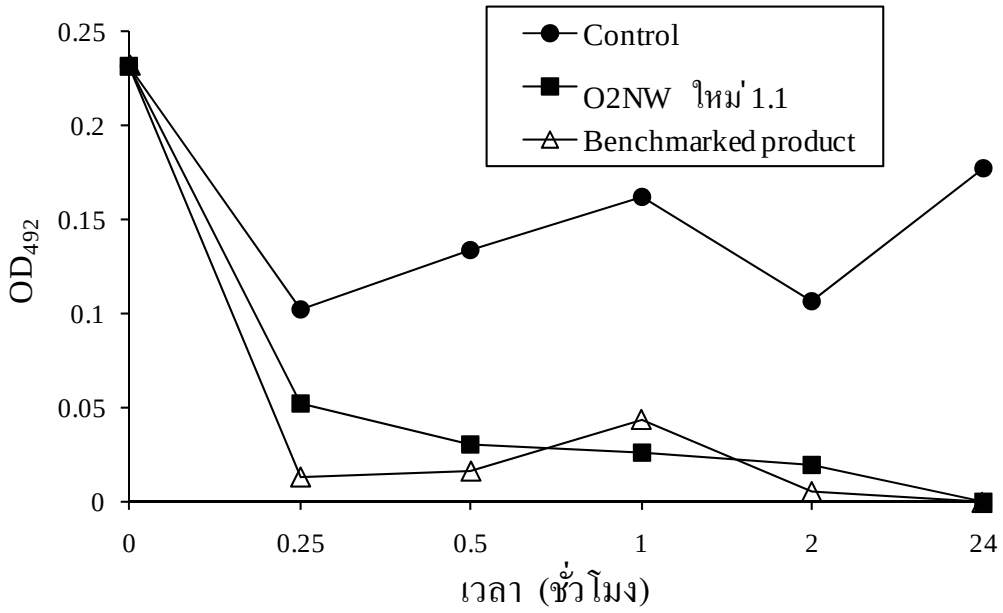
ผลการศึกษาความคงตัวทางจุลชีววิทยาของตำรับ

จากศึกษาความคงตัวทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน โดยทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมทุกๆ เดือนพบว่า ตั้งแต่เวลาเริ่มต้น (เดือนที่ 0) จนถึงเดือนที่ 6 ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ที่มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีน้ำมันตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่แตกต่างกับ benchmarked product อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 11-17) ในทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน ก็พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีน้ำมันตะไคร้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่แตกต่างกับ benchmarked product อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่นกัน (รูปที่ 18) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 11-18 ในช่วงระยะเวลา 0-2 ชั่วโมง benchmark product จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีกว่าสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ O2NW80 ใหม่ 1.1 เล็กน้อยทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากสารละลายเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้จะอยู่ในรูปของอิมัลชันซึ่งในช่วงแรกเมื่อผสมกับ

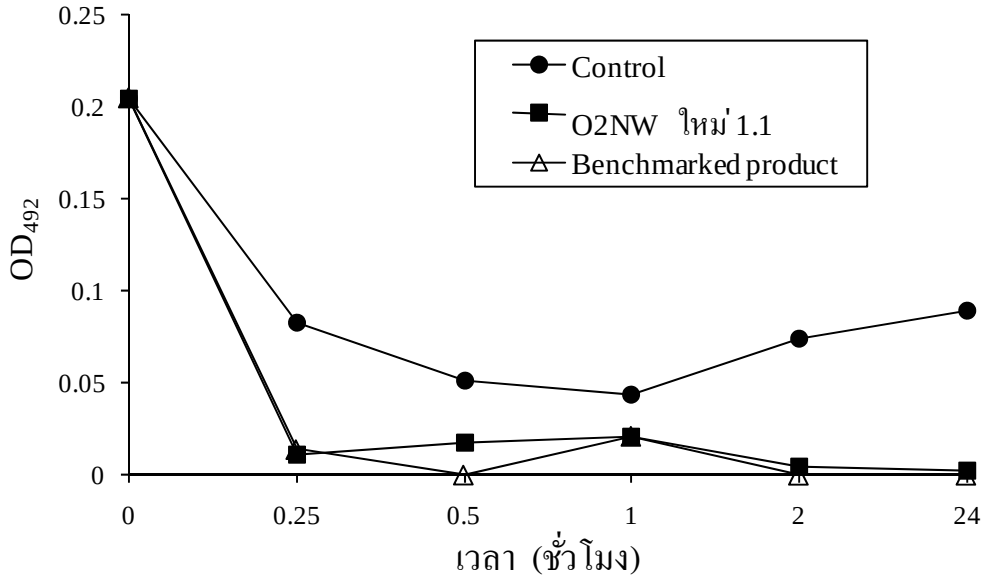
น้ำประปาใน 30 นาทีแรกระบบอาจจะกระจายตัวได้ไม่สม่ำเสมอทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อค่อนข้างแปรปรวน แต่ยังส่งผลให้เชื้อราลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง และเมื่อระบบเข้าสู่สมดุลคือมีบางส่วนที่ละลายน้ำและบางส่วนเป็นครีมลอยอยู่บนผิวหน้าทำให้ปริมาณน้ำมันตะไคร้ที่ละลายในน้ำคงที่ทำให้ ณ เวลา 2 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราจะแตกต่างกัน อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในแต่ละเดือน (รูปที่ 19) ผลการทดสอบในรูปที่ 19 แสดงว่า ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีความคงตัวทางจุลชีววิทยาดี เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้ไม่แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นนานอย่างน้อย 6 เดือน และจากข้อกำหนดระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์ พบว่าหากประสิทธิภาพของตำรับในการฆ่าเชื้อราไม่ลดลงต่ำกว่า 10 % จะสามารถเก็บได้นานอย่างน้อย 1 ปี ทั้งนี้ควรแนะนำให้ผู้ใช้แช่วัสดุฟันเทียมในน้ำยานานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาในสภาวะที่เก็บจริงในช่วง 1 ปี เพื่อยืนยันผลต่อไป



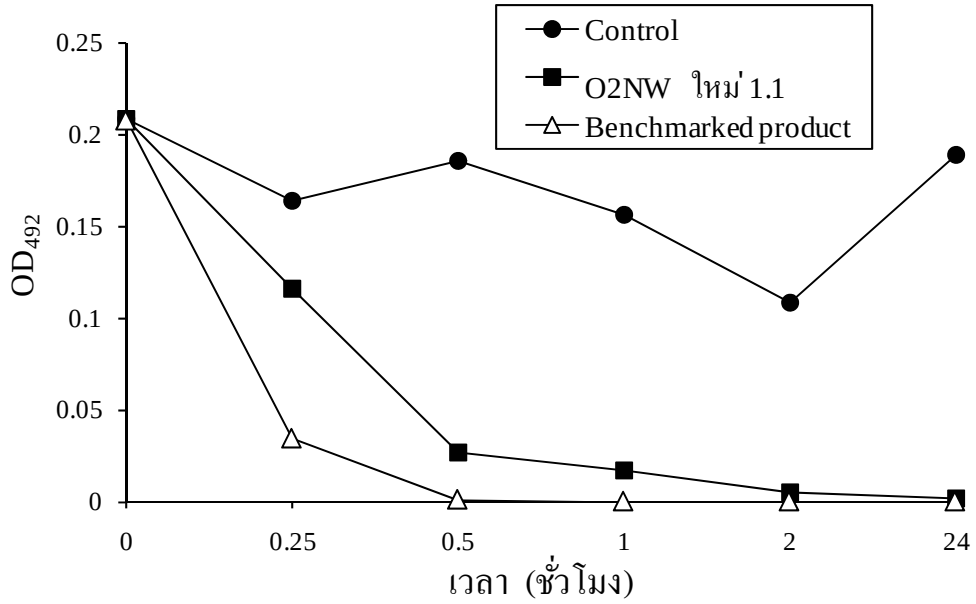
รูปที่ 11 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ณ เวลาเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



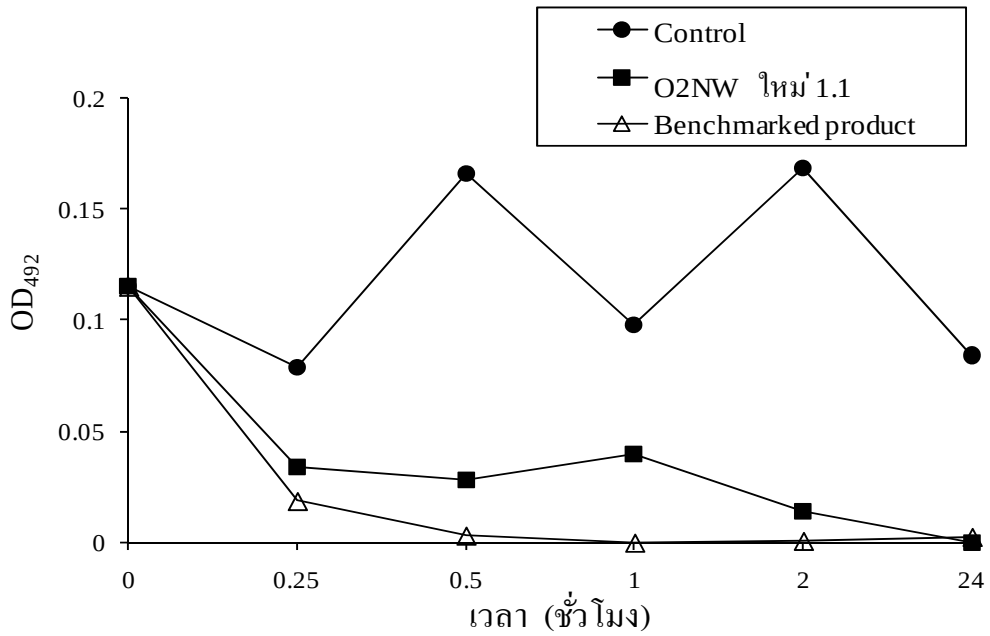
รูปที่ 12 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 1 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



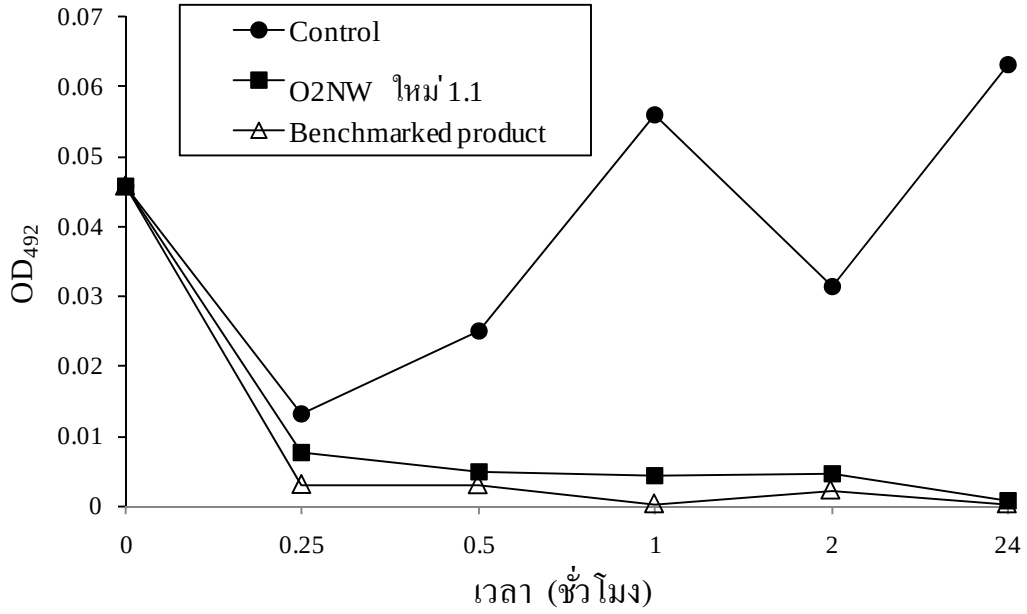
รูปที่ 13 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



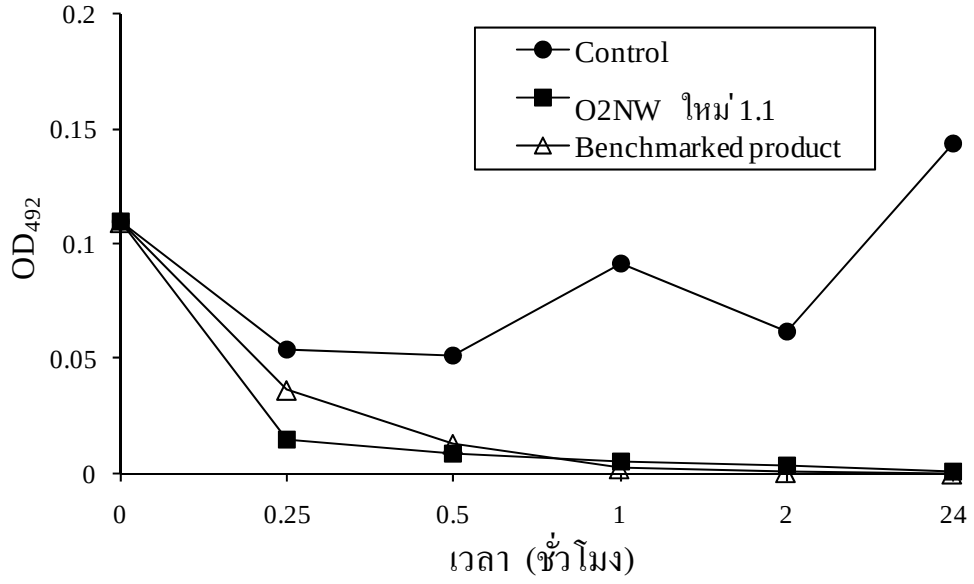
รูปที่ 14 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 3 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



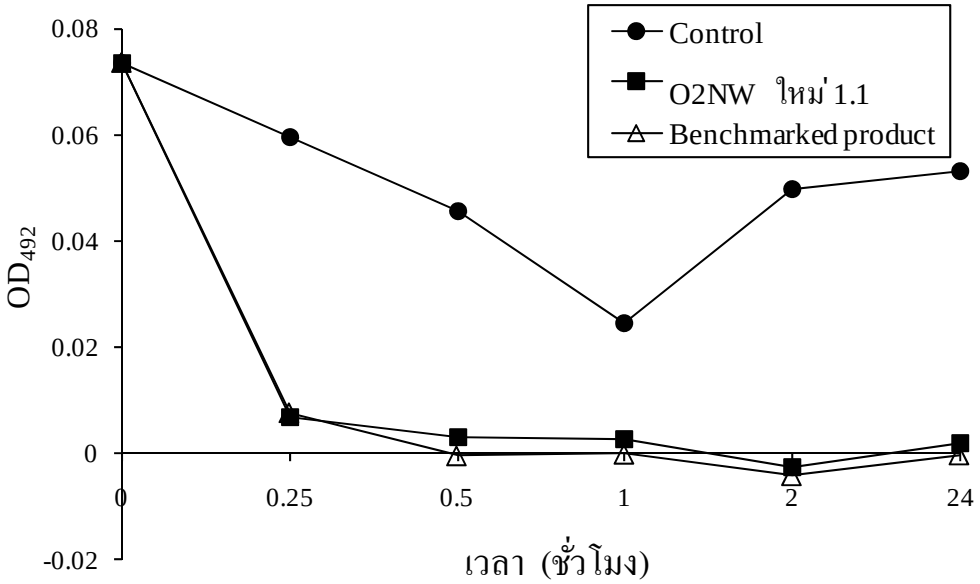
รูปที่ 15 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



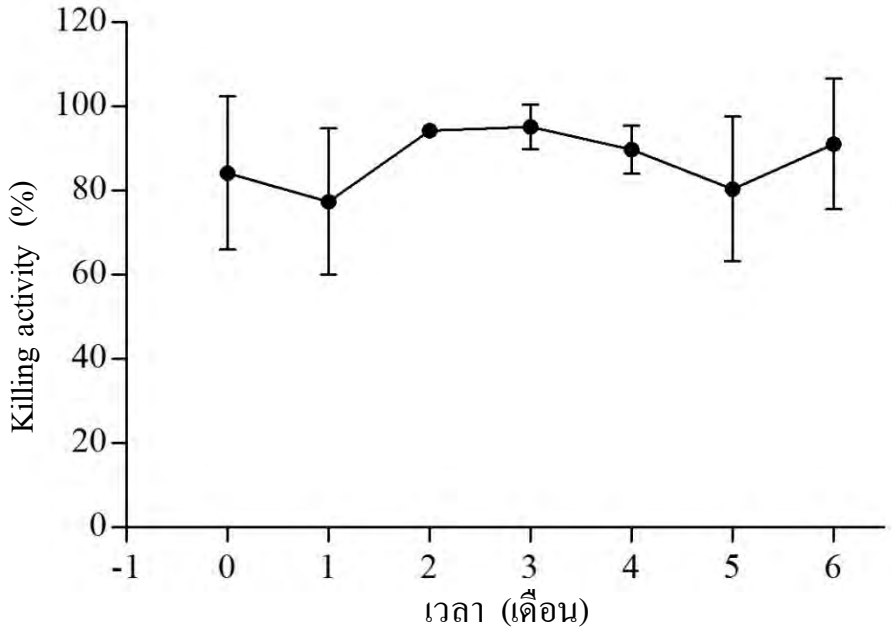
รูปที่ 16 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 5 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



รูปที่ 17 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



รูปที่ 18 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม เมื่อทดสอบโดยใช้น้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% เปรียบเทียบกับ benchmarked product ณ เวลาต่างๆ



รูปที่ 19 ประสิทธิภาพของตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ในช่วง 1-6 เดือนที่เก็บในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH ในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมหลังจากแช่วัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเจือจางตำรับให้มีน้ำมันตะไคร้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5%

ผลการคัดเลือกอาสาสมัครและการศึกษานำร่องทางคลินิก

การคัดเลือกและการแบ่งกลุ่มอาสาสมัคร

ในการศึกษาครั้งนี้มีอาสาสมัครจำนวน 56 คน ที่เข้าร่วมการวิจัยโดยอาสาสมัครได้รับการซักประวัติและตรวจภายในช่องปากรวมทั้งทำการบันทึกข้อมูลตามแบบสอบถามโดยละเอียด หลังจากนั้นอาสาสมัครได้รับการตรวจสอบปริมาณเชื้อแคนดิดา บนฐานฟันเทียมอะคริลิกทั้งปากบนด้วยวิธีการจำลองฐานฟันเทียม ซึ่งอาสาสมัครที่มีจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดามากกว่า 100 โคโลนีจะถูกคัดเข้าการศึกษา พบว่าอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์การคัดเข้าศึกษามีจำนวน 38 คน โดยอาสาสมัคร 2 รายปฏิเสธเข้าร่วมการศึกษา ส่วนอีก 3 รายอยู่ในระหว่างการใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมอื่นๆ จึงเหลือจำนวนอาสาสมัครที่ถูกคัดเข้าศึกษาในขั้นสุดท้ายจำนวนทั้งสิ้น 33 คน ทำการจัดจำแนกอาสาสมัครตามจำนวนโคโลนีเชื้อราเป็น 3 กลุ่มคือ อาสาสมัครที่มีจำนวนเชื้อมากกว่า 100 ถึง 400 โคโลนี จัดให้เป็นผู้ที่มีเชื้อระดับน้อย อาสาสมัครที่มีจำนวนเชื้อมากกว่า 400 ถึง 800 โคโลนี จัดให้เป็นผู้ที่มีเชื้อระดับปานกลาง และอาสาสมัครที่มีจำนวนเชื้อมากกว่า 800 โคโลนี จัดให้เป็นผู้ที่มีเชื้อระดับมาก จากนั้นแบ่งกลุ่มอาสาสมัครโดยวิธีการจับสลากเข้าศึกษาในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นหรือ benchmarked product โดยจัดให้ระดับของจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดากระจายใกล้เคียงกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง ซึ่งปริมาณเชื้อแคนดิดาเริ่มต้นที่ตรวจสอบด้วยวิธีการจำลองฐานฟันเทียมในอาสาสมัครทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 22

ข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา

จากแบบสอบถามและแบบตรวจบันทึกทางคลินิกเกี่ยวกับข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์การคัดเข้าร่วมการศึกษาทั้งสิ้น 33 คน แบ่งเป็นเพศชาย 16 คน และเพศหญิง 17 คน อาสาสมัครมีอายุเฉลี่ย 71 ปี อายุน้อยที่สุด 56 ปี และอายุมากที่สุด 85 ปี อาสาสมัครได้รับการใส่ฟันเทียมเป็นระยะเวลา 5-120 เดือน โดยมีอายุการใช้งานฟันเทียมเฉลี่ย 37.2 เดือน ซึ่งฟันเทียมที่ใส่เป็นฟันเทียมทั้งปากชุดแรกจำนวน 16 คน เป็นฟันเทียมชุดที่ 2 จำนวน 12 คน และมีอาสาสมัครที่ใส่ฟันเทียมมากกว่า 2 ชุด จำนวน 5 คน ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นของผู้ป่วยแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 23 จากประวัติทางการแพทย์ของอาสาสมัครที่เข้าร่วมศึกษาพบว่า อาสาสมัครที่มีประวัติของโรคทางระบบมีจำนวน 15 คน เป็นชาย 9 คน หญิง 6 คน ซึ่งโรคทางระบบที่พบได้แก่ โรคเบาหวานที่สามารถควบคุมได้ โรคหัวใจและ/หรือโรคความดันโลหิตสูง โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิแพ้ โรคไวรัสตับอักเสบชนิดซี ซึ่งสามารถควบคุมได้ และโรคอื่นๆที่ไม่รุนแรง เช่น โรคเก๊าต์ โรคต่อมลูกหมากโต ซึ่งอาสาสมัครสามารถเข้าร่วมการศึกษาได้ตามหลักกำหนดเกณฑ์การคัดเข้าศึกษา โดยอาสาสมัครบางรายมีโรคประจำตัวมากกว่า 1 โรค ข้อมูลโรคทางระบบของผู้ป่วยแสดงดังตารางที่ 24 แยกรายละเอียดตามกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 22 จำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาในอาสาสมัครที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียม (replica) ก่อนการทดสอบ

รายที่	จำนวนโคโลนี (CFU)	รายที่	จำนวนโคโลนี (CFU)	รายที่	จำนวนโคโลนี (CFU)
1	390	20	424	39	420
2	140	21	> 1000	40	24
3	77	22	496	41	10
4	>1000	23	692	42	286
5	409	24	262	43	1
6	585	25	24	44	758
7	310	26	630	45	214
8	0	27	582	46	4
9	6	28	0	47	440
10	105	29	14	48	207
11	317	30	906	49	10
12	418	31	10	50	7
13	104	32	0	51	106
14	340	33	0	52	0
15	410	34	168	53	298
16	382	35	12	54	207
17	103	36	257	55	107
18	102	37	106	56	467
19	214	38	0		

ตารางที่ 23 ข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา

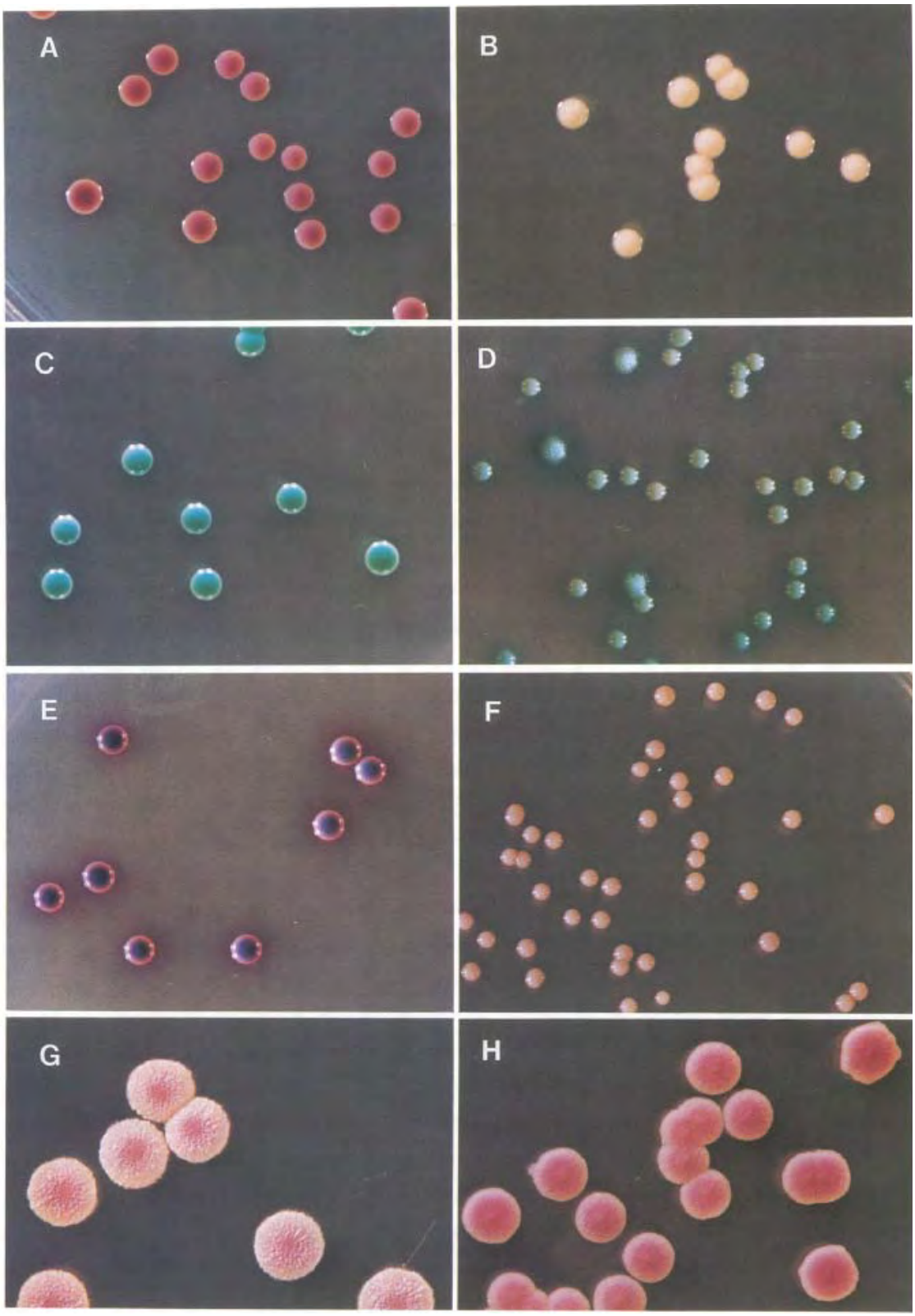
กลุ่ม	เพศ		อายุอาสาสมัคร (ปี)		อายุการใช้งานฟันเทียม (เดือน) (ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	จำนวน (คน)		
	ชาย	หญิง	อายุเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	อายุต่ำสุด –สูงสุด		ฟันเทียมชุดที่ 1	ฟันเทียมชุดที่ 2	ใส่ฟันเทียมมากกว่า 2 ชุด
อาสาสมัครทั้งหมด	16	17	71 ± 2.2	56 - 85	37.2 ± 3.3	16	12	5
กลุ่มควบคุม	5	6	74 ± 8.2	67 - 86	34.7 ± 33.9	6	4	1
กลุ่มทดลองน้ำมันตะไคร้	5	6	66 ± 4.3	57 - 69	42.2 ± 39.8	7	1	3
กลุ่มทดลอง benchmarked product	6	5	73± 7.2	57 - 83	34.8 ± 39.5	3	7	1

ตารางที่ 24 ข้อมูลเกี่ยวกับโรคทางระบบของอาสาสมัคร

กลุ่ม	เพศ		โรคทางระบบ			
	ชาย	หญิง	เบาหวาน	โรคหัวใจ/ความดันโลหิตสูง	โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน	โรคอื่นๆ
อาสาสมัครทั้งหมด (คน)	9	6	5	11	2	3
กลุ่มควบคุม (คน)	3	1	2	2	0	2
กลุ่มทดลองน้ำมันตะไคร้ (คน)	3	2	3	5	0	0
กลุ่มทดลอง benchmarked product (คน)	3	3	1	4	2	1

จำนวนและลักษณะโคโลนีของเชื้อแคนดิดาที่ได้จากการจำลองฐานฟันเทียมของอาสาสมัคร

การจำลองฐานฟันเทียมของผู้ป่วยด้วย CHROMagar นอกจากจะทำให้ทราบปริมาณของเชื้อราแล้ว ยังสามารถทราบชนิดของเชื้อราได้ด้วย เนื่องจากเชื้อราต่างชนิดกันจะให้สีของโคโลนีต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 20 [64]

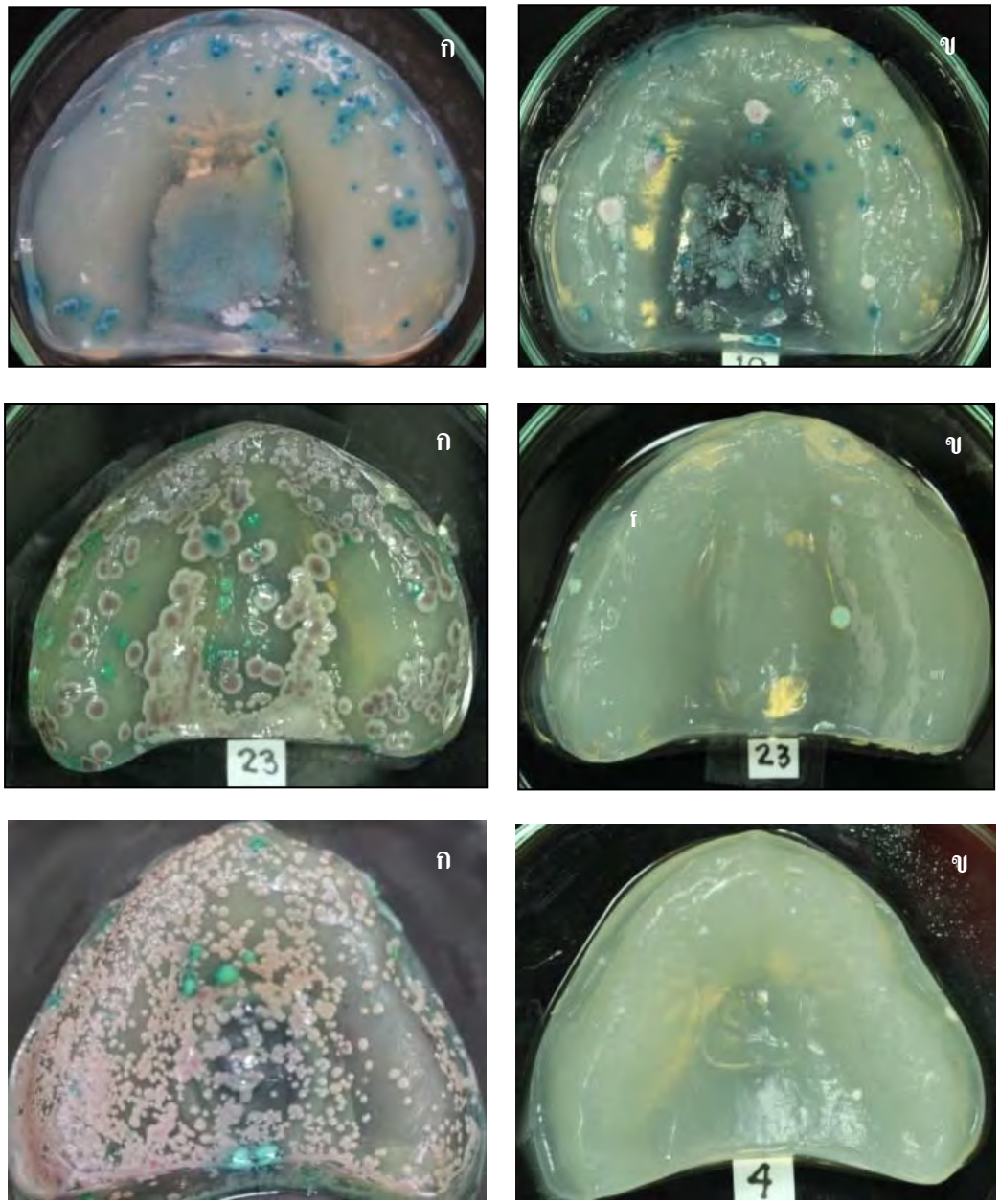


รูปที่ 20 แสดงลักษณะและสีของโคโลนีเชื้อราแคนดิดาสายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงบน CHROMagar [64]

(A) *C. glabrata* (B) *C. parapsilosis* (C) *C. albicans* (D) Geotrichumn sp.

(E) *C. tropicalis* (F) Trichosporon sp. (G) *C. krusei* (H) *C. norvegensis*

จากการจำลองฐานฟันเทียมของอาสาสมัครเพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดจำเพาะ (CHROMagar®) ก่อนและหลังการทดลองในอาสาสมัครทั้ง 33 คน พบว่าอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มการทดลองมีปริมาณและลักษณะของเชื้อแคนดิดาบนฐานฟันเทียมแตกต่างกันไป ดังแสดงในรูปที่ 21 และตารางที่ 25



รูปที่ 21 โคโลนีเชื้อแคนดิดาจากการจำลองฐานฟันเทียม (ก) ก่อนการทดลองและ (ข) หลังการทดลองในอาสาสมัครกลุ่มควบคุม (ภาพบน) กลุ่มทดลองด้วยผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น (ภาพกลาง) และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product (ภาพล่าง)

โดยในกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมอาสาสมัครทั้ง 11 ราย ได้รับคำแนะนำในการทำความสะอาดฟันเทียมด้วยเจลสบู่และแช่ฟันเทียมด้วยน้ำประปาในเวลากลางคืนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแคนดิดาก่อนและหลังการทดสอบ พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาภายหลังการทดลองลดลงในผู้ป่วย 7 ราย (ร้อยละ 64) และเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย 4 ราย (ร้อยละ 36) ในกลุ่มทดลองที่ 2 อาสาสมัคร 11 รายได้รับคำแนะนำให้ทำความสะอาดฟันเทียมร่วมกับการแช่ฟันเทียมด้วยผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น และในกลุ่มทดลองที่ 3 อาสาสมัคร 11 ราย ได้รับคำแนะนำให้ทำความสะอาดฟันเทียมร่วมกับการแช่ฟันเทียมด้วยเม็ดฟู่ benchmarked product เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแคนดิดาก่อนและหลังการทดลอง พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาลดลงในอาสาสมัครทั้งหมด (ร้อยละ 100) ของทั้งสองกลุ่มทดลอง

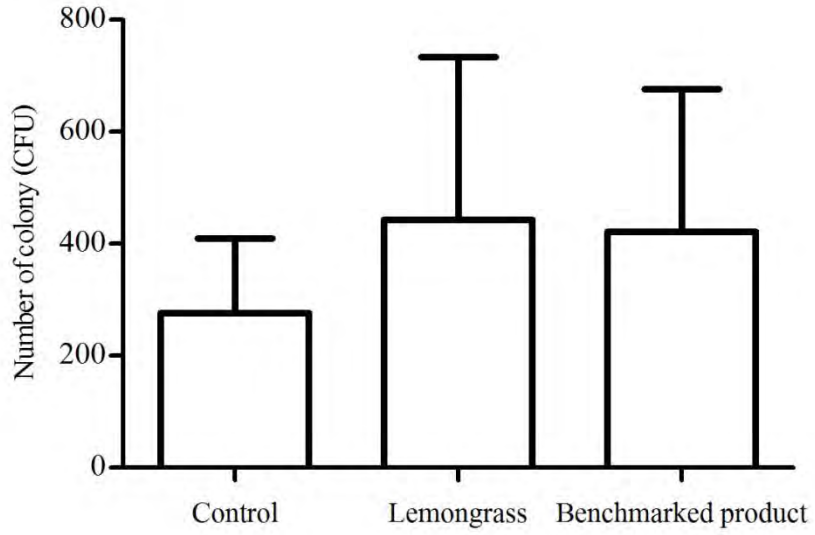
ตารางที่ 25 จำนวนโคโลนีที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียม (replica) ก่อนและหลังการทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product

รายที่	จำนวนโคโลนี (CFU)					
	กลุ่มควบคุม		กลุ่มสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้		กลุ่มเม็ดฟู่ benchmarked product	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
1	310	285	140	0	102	0
2	105	164	585	318	492	0
3	382	315	692	18	418	20
4	214	136	424	1	410	25
5	340	53	1000	235	1000	5
6	317	79	214	0	168	2
7	104	3	106	32	257	28
8	103	160	298	0	207	0
9	262	12	420	0	679	12
10	496	586	785	0	440	5

11	409	460	207	1	467	32

การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนและหลังการทดสอบ

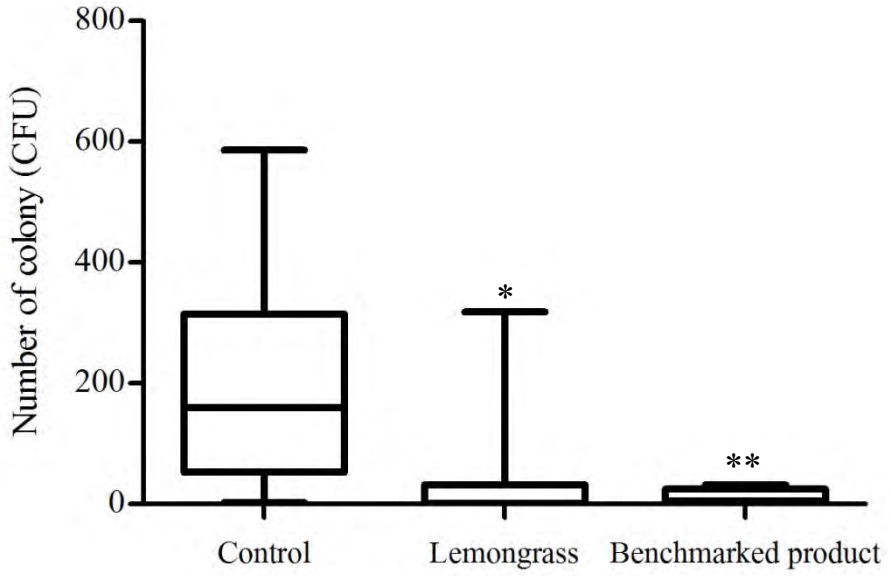
ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product แสดงดังรูปที่ 22 จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราระหว่างกลุ่มก่อนการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าจำนวนเชื้อก่อนการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม มีการแจกแจงแบบปกติจึงใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนการทดลองทั้ง 3 กลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.215$)



รูปที่ 22 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนการทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product

ในการวิเคราะห์จำนวนโคโลนีของเชื้อราหลังการทดลองของทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าในกลุ่มควบคุมมีการแจกแจงแบบปกติ แต่กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมสารละลายเข้มข้นน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product ไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ จึงใช้สถิติ Kruakal –Wallis test ร่วมกับ pairwise Mann-Whitney U test with Bonferroni adjustment ในการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งพบว่าค่ามัธยฐานจำนวนโคโลนีของเชื้อราหลังการทดลองของทั้ง 3 กลุ่ม (รูปที่ 23) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.007$) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่ม

ทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product ก็พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P = 0.001$) ส่วนกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้กับกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.614$)

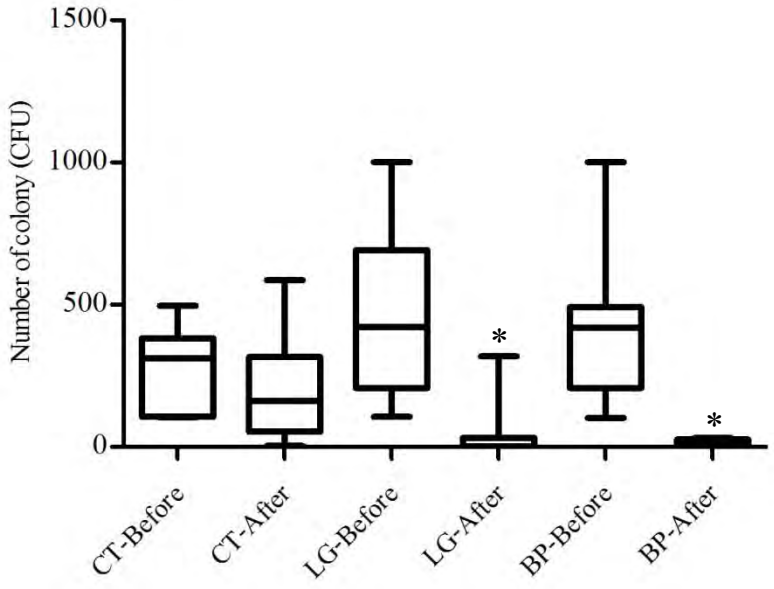


รูปที่ 23 จำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียมในอาสาสมัครหลังการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ของข้อมูลตามลำดับ

* $P = 0.007$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** $P = 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

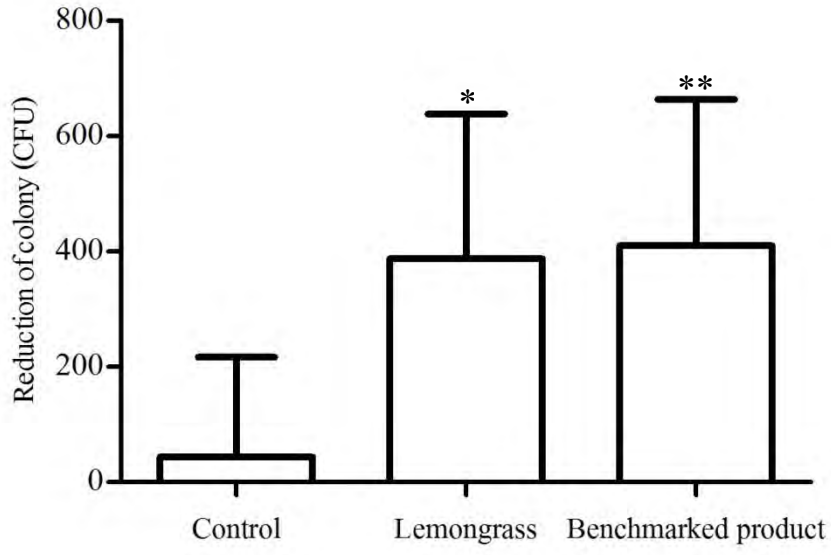
ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนและหลังการทดลองในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ Wilcoxon signed-rank test พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนและหลังการทดลองในกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.13$) ส่วนในกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อราก่อนและหลังการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$) (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่นับได้จากการจำลองฐานฟันเทียมในอาสาสมัครก่อนและหลังการทดลอง ของกลุ่มควบคุม (CT) กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ (LG) และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product (BP) เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box plot คือ เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ของข้อมูลตามลำดับ

* $P = 0.003$ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ลดลงภายหลังการทดลองระหว่างกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มพบว่ามีการแจกแจงแบบปกติ จึงทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ ANOVA ผลการวิเคราะห์พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนฐานฟันเทียมอะคริลิกที่ลดลงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.002$) (รูปที่ 25) โดยเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแต่ละคู่ทดสอบ พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ และ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.008$ และ 0.005 ตามลำดับ) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้และเม็ดฟู่ benchmarked product พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.97$)



รูปที่ 25 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีเชื้อราที่ลดลงภายหลังการทดลองในกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ และกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product

*P = 0.008 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

**P = 0.005 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ความพึงพอใจของอาสาสมัครภายหลังใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น

การประเมินความพึงพอใจของอาสาสมัครภายหลังใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นในผู้ป่วย 11 ราย ได้ทำการประเมินความพึงพอใจในด้านต่างๆ ดังนี้

- ความพึงพอใจต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์
- ความสะดวกในการใช้งาน
- บรรจุภัณฑ์มีความสะดวกต่อการพกพา
- การเปลี่ยนแปลงการรับรสของอาหาร
- อาการระคายเคืองบริเวณเนื้อเยื่อที่รองรับฟันเทียม

ผลการประเมินพบว่า ผู้ป่วยมีความพึงพอใจต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ในระดับน้อย 3 ราย (ร้อยละ 27) ระดับปานกลาง 3 ราย (ร้อยละ 27) และระดับมาก 5 ราย (ร้อยละ 46) ในด้านความสะดวกในการใช้งาน พบว่าผู้ป่วยมีความพึงพอใจทั้งหมด 11 ราย (ร้อยละ 100) และบรรจุภัณฑ์มีความสะดวกต่อการพกพา 9 ราย (ร้อยละ 82) และจากการประเมินเกี่ยวกับการรับรสอาหารภายหลังการแช่ฟันเทียมในผลิตภัณฑ์แล้ว พบว่าไม่ทำให้การรับรสของอาหารเปลี่ยนแปลง 11 ราย (ร้อยละ 100) และพบว่า

ภายหลังการแช่ผลิตภัณฑ์แล้วนำกลับไปใส่ในปาก ผู้ป่วยมีอาการระคายเคืองบริเวณเนื้อเยื่อที่รองรับฟันเทียมในระดับเล็กน้อยในผู้ป่วย 8 ราย (ร้อยละ 73) โดยเป็นเพศหญิง 3 ราย (ร้อยละ 27) เพศชาย 5 ราย (ร้อยละ 73) แต่ผู้ป่วยสามารถใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมต่อได้ ส่วนผู้ป่วย 3 ราย (ร้อยละ 27) ไม่มีอาการระคายเคืองเนื้อเยื่อที่รองรับฟันเทียมดังกล่าว

บทวิจารณ์

จากการพัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น รวมทั้งศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ พบว่าตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ 59.7%v/v, cetomacrogol 25.4% w/v และ propylene glycol 14.9% v/v มีความคงตัวทางกายภาพมากกว่าตำรับอื่นๆและมีความคงตัวทางจุลชีววิทยาดี เนื่องจากสามารถต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นานอย่างน้อย 6 เดือน จึงได้นำตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ไปทดสอบประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ทางคลินิก ในงานวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการตรวจสอบหาปริมาณเชื้อแคนดิดาบนฐานฟันเทียมอะคริลิกทั้งปากในผู้ป่วยทั้งก่อนและหลังการทดสอบโดยใช้วิธีจำลองฐานฟันเทียม (replica technique) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วและมีความไวมากกว่าวิธีอื่นในการตรวจหาเชื้อแคนดิดาบนฐานฟันเทียมด้านเนื้อเยื่อ จากการศึกษาของ Spiechowicz และคณะในปี 1991 [65] ได้ทำการศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่มีภาวะการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง พบว่าวิธีการป้าย (swab) จากเนื้อเยื่อช่องปากไม่พบเชื้อ *C. albicans* ส่วนวิธีจำลองฐานฟันเทียมสามารถพบ *C. albicans* ทุกราย และวิธีจำลองฐานฟันเทียมยังเป็นวิธีการที่สามารถตรวจนับโคโลนีของเชื้อราได้โดยตรง จึงมีหลายการศึกษาที่ใช้วิธีนี้ในการวัดปริมาณเชื้อที่ฐานฟันเทียม [66-68] นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดจำเพาะสำหรับเชื้อแคนดิดา (CHROMagar) ในการจำลองฐานฟันเทียมด้วย จึงทำให้สามารถระบุชนิดของเชื้อแคนดิดา ซึ่งจะแยกออกจากกันโดยสีของโคโลนีที่แตกต่างกันได้ด้วย [64]

ผลการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยพบว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการแนะนำในการทำความสะอาดฟันเทียมโดยการแช่ในน้ำประปาในเวลากลางคืนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีจำนวนโคโลนีของเชื้อราหลังการทดลองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อก่อนการทดลอง ซึ่งอาจเนื่องจากการให้ทันตสุขศึกษาในการทำความสะอาดฟันเทียมโดยทันตแพทย์มีส่วนช่วยส่งเสริมให้ผู้ป่วยมีพฤติกรรมในการดูแลฟันเทียมได้เหมาะสมมากขึ้น จึงสามารถควบคุมแผ่นคราบจุลินทรีย์ (plaque) และจำนวนเชื้อได้ดีขึ้น ทำให้จำนวนเชื้อราลดลงภายหลังการทดลอง [69] อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อที่ลดลงมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srinivasan ในปี 2010 พบว่าการทำความสะอาดฟันเทียมโดยแปรงด้วยมือเพียงอย่างเดียวอาจไม่

เพียงพอในการกำจัดเชื้อโรคออกจากพื้นผิวฟันเทียมได้ ดังนั้นจึงแนะนำใช้สารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมร่วมด้วย [70] นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาในผู้ป่วย 4 ราย (อายุเฉลี่ย 69 ปี) ในกลุ่มควบคุมภายหลังการให้คำแนะนำในการทำความสะอาดฟันเทียมกลับพบว่าจำนวนเชื้อราเพิ่มขึ้น การที่จำนวนโคโลนีของเชื้อรายังคงหลงเหลืออยู่บนฐานฟันเทียม เนื่องจากพื้นผิวของฐานฟันเทียมอะคริลิกมีรูพรุนเป็นผลทำให้มีการยึดเกาะของ *C. albicans* ได้มากกว่าฐานฟันเทียมที่ทำจากโลหะ (metal base) [71] โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนพื้นผิวของฟันเทียมบริเวณเพดานที่ขรุขระ จะช่วยให้มีการฝังตัวของเชื้อจุลชีพได้มากขึ้น [72,73] จากการศึกษาความขรุขระของอะคริลิกที่ใช้ทำฟันเทียมพบว่ามีค่าความขรุขระเท่ากับ 3.4 ± 0.13 ไมโครเมตร ทำให้เชื้อจุลชีพสามารถฝังตัวเข้าไปรูพรุนที่ขรุขระได้ดี และถ้าความขรุขระของพื้นผิวที่มากกว่า 0.7 ไมโครเมตรจะส่งเสริมให้เกิดการสะสมของคราบจุลินทรีย์ได้ [74] และนอกจากนี้อาจเนื่องจากบริเวณของฟันเทียมด้านติดเนื้อเยื่อบริเวณร่องรอบปากของปีกฟันเทียมด้านหน้าเป็นบริเวณที่เป็นส่วนคอดและเว้าซึ่งทำให้กำจัดเชื้อจุลชีพออกจากฐานฟันเทียมบริเวณนี้ได้ยากจึงทำให้เชื้อราลดลงในปริมาณน้อย [75]

ในกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นแช่ฟันเทียมตลอดคืน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อก่อนการทดสอบ การที่ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นสามารถลดจำนวนเชื้อราได้ดีเนื่องจากน้ำมันตะไคร้มีสาร citral ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญประมาณร้อยละ 65 ถึง 85 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาได้ดี [76] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยเองในปี พ.ศ. 2553 ก็พบว่าองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อรา คือ citral และ geraniol ซึ่งกลไกในการต้านเชื้อแคนดิดาของน้ำมันตะไคร้และสารสำคัญหลัก น่าจะเกิดจากการที่สารสำคัญหลักในน้ำมันตะไคร้ไปทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ แล้วทำให้รูปร่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ [13] รายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของ citral และ geraniol ต่อการต้านเชื้อแคนดิดาทั้งในรูปแบบไบโอฟิล์ม [77] และแพลงโทนิค [50,76,78] ที่พบว่า สารในกลุ่ม terpenes ซึ่งมักเป็นสารสำคัญหลักในน้ำมันหอมระเหยจะไปเปลี่ยนแปลง cell permeability โดยการแทรกเข้าไประหว่าง fatty acyl chains ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ membrane lipid bilayers ทำให้เกิดการทำลายของชั้นไขมันและเปลี่ยนแปลง membrane fluidity ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวและรูปร่างของเซลล์ รวมทั้งทำให้ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อลดลง [76-79] ดังนั้น การพบว่าผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้สามารถลดจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนฐานฟันเทียมได้ในการศึกษานี้ จึงน่าจะเป็นผลจากกลไกดังกล่าวข้างต้น

ในกลุ่มทดลองที่แช่ฟันเทียมด้วยเม็ดฟู่ benchmarked product ยี่ห้อ BONYPLUS® พบว่าสามารถลดจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนฐานฟันเทียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำความสะอาดฟันเทียมด้วยน้ำสบู่อย่างเดียว เนื่องจากเม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® เป็น

สารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมในกลุ่มอัลคาไลน์เปอร์ออกไซด์ (alkaline peroxide) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายซึ่งประกอบด้วยส่วนของผงหรือเม็ดเมื่อละลายในน้ำแล้วจะได้สารประกอบพวกไฮโดรเจนเจนเพอร์ออกไซด์ และผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่เหล่านี้จะมีส่วนประกอบของสารตัวอื่นๆร่วมด้วย เช่น โซเดียมเพอร์บอเรต หรือ เปอร์คาร์บอเนต เมื่อละลายในน้ำแล้วจะสามารถปล่อยออกซิเจนออกมาในรูปแบบของฟองฟู่และเป็นสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างสามารถเข้าไปย่อยสลายส่วนของอินทรีย์สารในแผ่นคราบจุลินทรีย์ ทำให้สามารถทำความสะอาดคราบจุลินทรีย์หรือคราบสีที่ติดฟันเทียมได้ [80,81] ซึ่งในกระบวนการขจัดคราบจุลินทรีย์นี้อาจส่งผลต่อความขรุขระและความแข็งแรงของฐานฟันเทียมอะคริลิกได้ โดยมีหลายการศึกษาที่พบผลสอดคล้องกันว่าการแช่ฟันเทียมในสารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมทำให้ความแข็งแรงของอะคริลิกลดลง [82,83] เช่นการศึกษาของ Peracini และคณะในปี 2010 ซึ่งพบว่าเมื่อแช่แผ่นอะคริลิกในเม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® พบว่าค่าความขรุขระของพื้นผิวอะคริลิกมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมชนิดอื่นๆและน้ำเปล่า และนอกจากนี้ค่าความแข็งแรงของวัสดุอะคริลิกมีค่าลดลงภายหลังการแช่ด้วยเม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® [84] และจากรายงานการศึกษาของ Neppelenbroek และคณะในปี 2005 รายงานว่าวัสดุอะคริลิกที่บ่มด้วยความร้อนเมื่อแช่ในสารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมพวกโซเดียมเพอร์บอเรต แล้วค่าความแข็งแรงของวัสดุ (flexural strength) มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการแช่ [85] นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Machado และคณะในปี 2009 ซึ่งพบว่าสารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมมีผลต่อความแข็งแรงและความขรุขระทั้งพื้นผิววัสดุเสริมฐานฟันเทียมและอะคริลิก ทำให้เกิดความขรุขระของพื้นผิวได้มากขึ้น [86] อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Sato และคณะในปี 2005 รายงานว่าสารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมไม่มีผลต่อความแข็งแรงและสีของอะคริลิก [87]

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นและเม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® พบว่าจำนวนเชื้อราที่ลดลงภายหลังการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.61$) ซึ่งแสดงว่าประสิทธิผลในการกำจัดเชื้อราบนฐานฟันเทียมของผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีประสิทธิผลใกล้เคียงกัน ดังนั้นผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการทำความสะอาดฟันเทียมร่วมกับวิธีการเชิงกลเพื่อลดจำนวนเชื้อราบนฐานฟันเทียม โดยมีหลายการศึกษาที่สนับสนุนการใช้สารเคมีทำความสะอาดฟันเทียม เนื่องจากพบว่าการทำความสะอาดฟันเทียมด้วยสารเคมีมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาและคราบจุลินทรีย์อื่นๆได้ดีกว่าการทำความสะอาดด้วยวิธีเชิงกล [75,88,89] ดังนั้นในผู้ป่วยที่มีข้อจำกัดเรื่องการใช้มือในการทำความสะอาดฟันเทียมควรพิจารณาใช้สารเคมีทำความสะอาดฟันเทียมร่วมด้วยเพื่อลดจำนวนเชื้อจุลชีพบนฐานฟันเทียมซึ่งจะทำให้ช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียมลงได้

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษานี้พบอาการที่ไม่พึงประสงค์ภายหลังการแช่ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ คือผู้ป่วยมีอาการระคายเคืองบริเวณเนื้อเยื่อที่รองรับฟันเทียมซึ่งเป็นอาการแสบ

เพียงเล็กน้อยและผู้ป่วยสามารถใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมต่อได้ การที่ผู้ป่วยมีอาการระคายเคืองบริเวณเนื้อเยื่อที่รองรับฟันเทียม ทั้งนี้อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อเพดานปากของผู้ป่วยสูงอายุบางลงจึงทำให้เกิดการระคายเคืองได้ง่าย จากการศึกษาลักษณะทางคลินิกของเนื้อเยื่อช่องปากและผิวหนังระหว่างเด็กและผู้สูงอายุ พบว่าผู้สูงอายุมีเนื้อเยื่อช่องปากและผิวหนังบางลง พื้นผิวเรียบและแห้ง และสูญเสียความยืดหยุ่น (elasticity) ซึ่งสภาวะดังกล่าวทำให้ง่ายต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อได้ [90] นอกจากนี้ความต้านทานของเนื้อเยื่อเพดานปากต่อรส อุณหภูมิ หรือสิ่งกระตุ้น จะมีความแตกต่างกันไปในผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งในที่นี้คือ รสชาติของสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันตะไคร้มีรสเผ็ด จึงทำให้ผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยบางรายมีอาการแสบและ/หรือ ระคายเคืองเนื้อเยื่อเพดานปาก

จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นพบว่าต้นทุนการผลิตต่อ 1 หลอดประมาณ 5 บาท ซึ่งต่ำกว่าผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่ยี่ห้อ BONYPLUS® ที่มีราคา 7 บาทต่อ 1 เม็ด ดังนั้นผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนการใช้ผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดเพื่อลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เม็ดฟู่แช่ฟันเทียมจากต่างประเทศ

สรุปผลการวิจัย

1. ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ซึ่งประกอบด้วย น้ำมันตะไคร้ 59.7%v/v, cetomacrogol 25.4% w/v และ propylene glycol 14.9% v/v เมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้เท่ากับ 0.5% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม
2. ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีความคงตัวทางกายภาพมากกว่าตำรับอื่นๆและมีความคงตัวทางจุลชีววิทยาดี เนื่องจากสามารถต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นานอย่างน้อย 6 เดือน
3. เพื่อให้ผู้ป่วยมีความสะดวกในการพกพาผลิตภัณฑ์ จึงได้พัฒนาตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ในรูปแบบ self-emulsified concentrated solution เพื่อลดปริมาตรให้เหลือ 1.8 มิลลิลิตรซึ่งจะสามารถบรรจุในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรได้ ซึ่งเมื่อผู้ป่วยจะใช้แช่ฟันเทียมก็นำสารทั้งหมดในหลอดเทลงในน้ำ 200 มิลลิลิตรก็จะได้ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้สุดท้ายเท่ากับ 0.5%
4. ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนฐานฟันเทียมอะคริลิกของอาสาสมัครภายหลังการทดสอบทางคลินิกได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่แตกต่างกับกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

[1] Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. Candida biofilm: a well-designed protected environment. Med Mycol 2005;43:191-208.

[2] Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent Oral Epidemiol 1975;3:115-9.

[3] Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis v candida agglutinins in human sera. Acta Odontol Scand 1972;30:313-25.

[4] Teptoranintra S. Denture Cleansing Methods. J Dent Assoc Thai 2001;51:56-9.

[5] Murdoch-Kinch CA, Mallatt ME, Miles DA. Oral mucosal injury caused by denture cleanser tablets: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;80:756-8.

[6] van Zoelen GA, de Vries I, Meulenbelt J. Risks of ingesting cleansing tablets for dental prostheses. Ned Tijdschr Tandheelkd 1999;106:94-6.

[7] Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. *In vitro* bioactivities of essential oils for acne control. Int J Aromather 2006;16:43-9.

[8] Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem 2005;91:621-32.

[9] Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J Antimicrob Chemother 2001;47:565-73.

[10] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999;86:985-90.

[11] สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ วัชรี คุณกิตติ ผดุงขวัญ จิตโรภาส รายงานวิจัย การพัฒนายาเม็ดฟู่สำหรับทำความสะอาดฟันปลอมที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อรา *Candida* spp. จากน้ำมันหอมระเหย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 2552

[12] สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ วัชรี คุณกิตติ สุภาภรณ์ สิงหรา ผลของน้ำมันสมุนไพรไทย 9 ชนิด ต่อการต้านเชื้อราแคนดิดา รายงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนวิจัยประจำปี พ.ศ. 2549.

[13] สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ วัชรี คุณกิตติ รายงานวิจัย ผลขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการต้านเชื้อราแคนดิดาทั้งในรูปแบบแพลงโทนิคและไบโอฟิล์ม สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 2553.

[14] Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res 1995;74:1152-61.

[15] Prachyabrued W, Silapabanleng Y, Laovanitch R. The prevalence of Candida and denture stomatitis in complete denture wearers. J Dent Assoc Thai 1988;38:101-10.

[16] Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. J Oral Rehabil 2005;32:518-25.

[17] Nevzatoglu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. Clin Oral Investig 2007;11:231-6. .

[18] Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. Int J Prosthodont 2007;20:514-20.

[19] Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. Gerodontology 2006;23:111-6.

[20] Kanli A, Demirel F, Sezgin Y. Oral candidosis, denture cleanliness and hygiene habits in an elderly population. Aging Clin Exp Res 2005;17:502-7.

[21] Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990;48:71-4.

[22] Lambson GO, Anderson RR. Palatal papillary hyperplasia. J Prosthet Dent 1967;18:528-33.

[23] Kanchanavasita W, Silapabunleng Y, Kuphasuk C. Acrylic removable partial denture failures. Mahidol Dent J 1993;13:120-6.

[24] Compagnoni MA, Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between Candida and nocturnal denture wear: quantitative study. J Oral Rehabil 2007;34:600-5.

[25] Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990;48:61-9.

[26] Shen C, Javid NS, Colaizzi FA. The effect of glutaraldehyde base disinfectants on denture base resins. J Prosthet Dent 1989;61:583-9.

[27] Odman PA. The effectiveness of an enzyme-containing denture cleanser. Quintessence Int 1992;23:187-90.

[28] Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H. Commercial denture cleansers--cleansing efficacy against *Candida albicans* biofilm and compatibility wit soft denture-lining materials. Int J Prosthodont 1995;8:434-44.

[29] Drake D, Wells J, Ettinger R. Efficacy of denture cleansing agents in an in vitro bacteria-yeast colonization model. Int J Prosthodont 1992;5:214-20.

[30] Palenik CJ, Miller CH. In vitro testing of three denture-cleaning systems. J Prosthet Dent 1984;51:751-4.

[31] Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. J Prosthet Dent 1979;42:619-23.

[32] Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism. J Clin Microbiol 2003;41:506-8.

[33] Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-t etrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. J Clin Microbiol 1998;36:1450-2.

[34] Hawser S. Adhesion of different Candida spp. to plastic: XTT formazan determinations. J Med Vet Mycol 1996;34:407-10.

[35] Hawser S. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C. albicans* cells. J Med Vet Mycol 1996;34:149-52.

[36] Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3591-6.

[37] วันดี กฤษณพันธ์ สมุนไพรน่ารู้ กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2537.

[38] นันทวัน บุณยะประภัศรและคณะ ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม1. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2536.

[39] Cheel J, Theoduloz C, Rodriguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). J Agric Food Chem 2005;53:2511-7.

[40] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000;52:673-751.

[41] Viana GS, Vale TG, Pinho RS, Matos FJ. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. J Ethnopharmacol 2000;70:323-7.

[42] Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M, et al. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. Life Sci 2006;78:1419-32.

[43] Elson CE, Underbakke GL, Hanson P, Shrago E, Wainberg RH, Qureshi AA. Impact of lemongrass oil, an essential oil, on serum cholesterol. Lipids 1989;24:677-9.

[44] Ogunlana EO, Hoglund S, Onawunmi G, Skold O. Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. Microbios 1987;50:43-59.

[45] Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett Appl Microbiol 2004;39:395-400.

[46] Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia 2005;76:233-6.

[47] Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AO, Ueno M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. Rev Saude Publica 2004;38:326-8. .

[48] Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2003;8:207-15.

[49] Wannissorn B, Jarikasem S, Soontorntanasart T. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. Phytother Res 1996;10:551-4.

[50] Abe S, Sato Y, Inoue S, Ishibashi H, Maruyama N, Takizawa T, et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2003;44:285-91.

[51] Mishra AK, Dubey NK. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Appl Environ Microbiol 1994;60:1101-5.

[52] Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. Mycoses 2006;49:316-23.

[53] Cassella S, Cassella JP. The essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) demonstrates a superior antifungal activity compared with tea tree (*Melalueca alternifolia*) or lavender (*Lavandula angustifolia*). Focus Altern Complement Ther 2002;7:88.

[54] Tchoumbougnang F, Zollo PH, Dagne E, Mekonnen Y. In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. Planta Med 2005;71:20-3.

[55] Cavalcanti ES, Morais SM, Lima MA, Santana EW. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99:541-4.

[56] Rauber Cda S, Guterres SS, Schapoval EE. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. J Pharm Biomed Anal 2005;37:597-601.

[57] Schaneberg BT, Khan IA. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. J Agric Food Chem 2002;50:1345-9.

[58] วัชรี คุณกิตติและ ฉันทนา อารมณ์ดี รายงานวิจัย การเพิ่มความคงตัวของน้ำมันตะไคร้และการพัฒนาผลิตภัณฑ์สเปรย์ฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันโรคเต้านมวัวอักเสบ (RDG 5120004) 2552.

[59] วัชรี คุณกิตติ ฉันทนา อารมณ์ดี มุกดา จิตต์เจริญธรรม รายงานวิจัย การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุ่มหัวนมแม่วัวจากน้ำมันหอมระเหยที่ฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ (RDG4920017) 2550.

[60] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 2nd ed. Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2002.

[61] Taweechaisupapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. J Ethnopharmacol 2006;106:414-7.

[62] Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;96:201-6.

[63] Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2475-9.

[64] Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol 1994;32:1923-9.

[65] Spiechowicz E, Renner RP, Pollock JJ, Santarpia RP, 3rd, Ciechowicz B, Kowalczyk W, et al. Sensitivity of the replica method in the detection of candidal infection among denture wearers with clinically healthy oral mucosa. Quintessence Int 1991;22:753-5.

[66] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999;86:985-90.

[67] Santarpia RP, 3rd, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. J Prosthet Dent 1990;63:437-43.

[68] Lal K, Santarpia RP, 3rd, Pollock JJ, Renner RP. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an in vivo replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. J Prosthet Dent 1992;67:72-7.

[69] Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. Eur J Prosthodont Restor Dent 1993;2:17-22.

[70] Srinivasan M, Gulabani M. A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. Indian J Dent Res;21:353-6.

[71] Gao N, Fan Z, Xiao X. Quantitative changes of microflora on stress-bearing areas relating to bases of removable partial dentures. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2002;20:349-52.

[72] Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. J Oral Rehabil 2005;32:518-25.

[73] Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of Candida species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent 2005;93:288-93.

[74] Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. Int J Prosthodont 2000;13:136-40.

[75] Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. J Oral Rehabil 2007;34:606-12.

[76] Silva Cde B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp. Braz J Infect Dis 2008;12:63-6.

[77] Dalleau S, Cateau E, Berges T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against Candida biofilms. Int J Antimicrob Agents 2008;31:572-6. .

[78] Bard M, Albrecht MR, Gupta N, Guynn CJ, Stillwell W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of Candida and Saccharomyces. Lipids 1988;23:534-8.

[79] Braga PC, Dal Sasso M. Morphostructural alterations of *Candida albicans* induced by thymol. A scanning electron microscopy study. J Chemother 2005;17:109.

[80] Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. Gerodontics 1985;1:202-6.

[81] Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. J Prosthet Dent 1979;42:619-23.

[82] Haywood J, Wood DJ, Gilchrist A, Basker RM, Watson CJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part II. Changes in colour and hardness following immersion in three commonly used denture cleansers. Eur J Prosthodont Restor Dent 2003;11:165-9.

[83] Mese A. Effect of denture cleansers on the hardness of heat- or auto-cured acrylic- or silicone-based soft denture liners. Am J Dent 2007;20:411-5.

[84] Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. J Prosthodont Res;54:78-83.

[85] Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. J Prosthet Dent 2005;93:171-6.

[86] Machado AL, Breeding LC, Vergani CE, da Cruz Perez LE. Hardness and surface roughness of reline and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. J Prosthet Dent 2009;102:115-22.

[87] Sato S, Cavalcante MR, Orsi IA, Paranhos Hde F, Zaniquelli O. Assessment of flexural strength and color alteration of heat-polymerized acrylic resins after simulated use of denture cleansers. Braz Dent J 2005;16:124-8.

[88] Gornitsky M, Paradis II, Landaverde G, Malo AM, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. J Can Dent Assoc 2002;68:39-45.

[89] Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. J Prosthet Dent 1988;60:467-70.

[90] Klein DR. Oral soft tissue changes in geriatric patients. Bull N Y Acad Med 1980;56:721-7.

ภาคผนวก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับ
1. พัฒนาผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น (concentrate solution)	1. พัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น	1. เตรียมตำรับผลิตภัณฑ์ 2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้	1. ได้ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันตะไคร้ 59.7%v/v, cetomacrogol 25.4% w/v และ propylene glycol 14.9% v/v 2. ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีความคงตัวทางกายภาพมากกว่าและเกิด creaming น้อยกว่าตำรับอื่นๆ
	2 ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ	1. ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่างๆ ในการฆ่าเชื้อรา *C. albicans* 2. ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมของผลิตภัณฑ์เทียบกับ benchmarked product	ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 เมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้เท่ากับ 0.5% ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียม

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับ
2. ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น	1. ทดสอบความคงตัวทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง 40°C 75% RH	1. เก็บผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพดีไว้ที่สภาวะเร่ง เพื่อทดสอบความคงตัวทางกายภาพที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน 2. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน	ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีความคงตัวทางจุลชีววิทยาดี เนื่องจากสามารถต้านเชื้อราที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำฟันเทียมได้แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นานอย่างน้อย 6 เดือน
3. การศึกษานำร่องทางคลินิก	1. คัดเลือกอาสาสมัครเพื่อศึกษาทางคลินิก	1. แบ่งกลุ่มอาสาสมัคร 2. ทำการซักประวัติต่างๆ และทำการบันทึกตามแบบสอบถาม 3. ทำการตรวจภายในช่องปากและบันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อภายใต้ฐานฟันเทียม 4. แบ่งกลุ่มการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ให้ทันตสุขศึกษาและแนะนำการทำความสะอาดฟันเทียมด้วยวิธีต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้น้ำเปล่าแช่ฟันเทียมตลอด	ตำรับ O2NW80 ใหม่ 1.1 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนฐานฟันเทียมอะคริลิกของอาสาสมัครภายหลังการทดสอบทางคลินิกได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่แตกต่างกับกลุ่มทดลองที่ใช้เม็ดฟู่ benchmarked product อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

		คืน	

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับ
3. การศึกษานำร่องทางคลินิก (ต่อ)	1. คัดเลือกอาสาสมัครเพื่อศึกษาทางคลินิก	กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ยาเม็ดฟู่ Bonyplus® แช่ฟันเทียมตลอดคืน กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ผลิตภัณฑ์แช่ฟันเทียมจากน้ำมันตะไคร้ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น แช่ฟันเทียมตลอดคืน 5. นัดติดตามผลเมื่อเวลาผ่านไปครบ 4 สัปดาห์	

รายนามและสถานที่ทำงานของคณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์
   ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002
   โทรศัพท์ 0-4320-2405
   โทรสาร 0-4320-2862
2. รศ. ดร. วัชรี คุณกิตติ
   คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
   จ. ขอนแก่น 40002
   โทรศัพท์ 0-4336-2092
   โทรสาร 0-4336-2092
3. ผศ. ดร. ทพญ. ดาราพร แซ่ลี้
   ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002
   โทรศัพท์ 0-4320-2405
   โทรสาร 0-4320-2862