บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance, Satorius®, Scientific promotion Co.,Ltd., Model AC2109)

2.1.2 เครื่องชั่ง (top load balance, Satorius®, Model 1402MP8)

2.1.3 เครื่องวัด pH (pH meter, Inolab®)

2.1.4 พิคโนมิเตอร์ ขนาด 5 มิลลิลิตร (pycnometer 5 ml)

2.1.5 เครื่องคนแม่เหล็กควบคุมอุณหภูมิ (temperature-controlled magnetic stirrer, Model DS-201 HS)

2.1.6 ตู้อบ (hot air oven, Memmert®, Germany)

2.1.7 เครื่องวัดความหนืด (brookfield DV3 programmable rheometer , Model RV)

2.1.8 เครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, Hewlett Packard®, series 1100)

2.1.9 คอลัมน์โครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC column , Hewlett Packard® , C18 , particle size 5 μm , diameter 4.6 mm. , length 250 mm.)

2.1.10 เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum filter apparatus)

2.1.11 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 สารเคมี

2.2.1 กรดซิตริก (citric acid, BP/USP)

2.2.2 แคลเซียม คลอไรด์ (calcium chloride, May & Baker LTD., Lot. No. 25461)

2.2.3 โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride, USP, Lot. No. 000942)

2.2.4 โซเดียม ไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate, BDH , lot 06951)

2.2.5 ดี(+) กลูโคส แอนไฮดรัส (D(+) glucose anhydrous, BP/USP)

2.2.6 ไค-โซเดียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคคาไฮเดรต (di-sodium-hydrogen phosphate dodecahydrate, Carlo Erba reagent , Lot. No. 3I 592266B)

2.2.7 ไตรเอทาโนลามีน (triethanolamine)

2.2.8 โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride, Lot. No. MU 6239)

2.2.9 โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, Merck®, Lot. No. A-262673-110)

2.2.10 โพรไพลีน กลัยคอล (propylene glycol, Lot. No. 981020 OU-2)

2.2.11 เมทานอล (methanol , AR , Lab-scan®,Ireland , batch No. 2K 05 0123)

2.2.12 เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose 4000, Lot. No. FMD)

2.2.13 แมกนีเซียม ซัลเฟต เฮปตาไฮเดรต (magnesium sulphate heptahydrate, Fluka®, Lot. No. 316166/1 – 1192)

2.2.14 อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile , AR , Lab-scan® , Lot. No. 31432)

2.2.15 เอทานอล (ethanol 99.7-100% v/v , Merck®, Lot. No. 200-578-6, Analar prod.101077y 2.5 L.)

2.2.16 ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropylmethylcellulose , BP/USP)

2.2.17 ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethylcellulose , Lot. No. 4533)

2.2.18 สีผสมอาหารสีน้ำเงิน (brilliant blue FCF 0.04%, citric acid 0.06%, water 99%, Winner®)

2.2.19 สารสกัดแอลกอฮอล์ 95% ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella* L. Murr.)

2.2.20 ลิโดเคนเจล (0.6% lidocaine gel, Sore mouth gel®)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 <u>สารสกัดจากผักคราดหัวแหวน</u>

ใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ผักคราดหัวแหวน จากส่วนของใบและดอกสดจำนวน 5.2 กิโลกรัม ซึ่งเก็บจากจังหวัดลำปาง

สารสกัดแอลกอฮอล์ 95% ผักคราดหัวแหวน ที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้วจำนวน 190.32 กรัม

↓

ละลาย ด้วย ปิโตรเลียม อีเธอร์ แช่เย็น 1 คืน

↓

ระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary evaporator

↓

ละลายด้วยอีเธอร์

↓

ล้างด้วยสารละลายด่าง

↓

ล้างด้วยสารละลายกรด

↓

เติม ผงถ่าน (activated charcoal) และ โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส

↓ กรอง

ระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary evaporator

↓

สารสกัดผักคราดหัวแหวน จำนวน 7.93 กรัม

2.3.2 <u>การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด</u>

- การหาค่าคงที่ไดอิเลคตริก (dielectric constant) : ทำโดยคัดเลือกของเหลวที่มีการศึกษาค่าคงที่ไดอิเลคตริกแล้ว จำนวน 2 ชนิด นำมาผสมในอัตราส่วนต่างๆ กัน และทดลองละลายสารสกัด จากนั้นคัดเลือกอัตราส่วนที่สารสกัดสามารถละลายได้ใส เพื่อนำมาคำนวณค่าคงที่ไดอิเลคตริก ต่อไป [60]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การหาความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) : ทำโดยใช้พิคโนมิเตอร์ ขนาด 5 มิลลิลิตร บรรจุสารสกัดจนเต็มปริมาตร และชั่งหาน้ำหนักเทียบกับน้ำ [61]

2.3.3 <u>การเตรียมบัฟเฟอร์และเนื้อเยื่อบุกระพุ้งแก้มหมู</u>

- การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ เครปส์ (krebs buffer pH 7.34) [60] : ชั่งสารเคมีตามตาราง 1 ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และนำไปวัดค่า pH

- การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ ไอโซโทนิค แมคอัลเวน (isotonic McIlvaine buffer pH 6.60) [60] : ชั่งโซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate) ปริมาณแน่นอน 52.10 กรัม และกรดซิตริก (citric acid) ปริมาณแน่นอน 5.70 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และนำไปวัด pH

- การเก็บเยื่อบุกระพุ้งแก้มหมู [62-63] : ใช้เนื้อเยื่อจากหมูโตเต็มวัย เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ทันทีที่ทำการฆ่า โดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์เครปส์ (krebs buffer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อระหว่างการเดินทาง จากนั้นนำมาเลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกโดยใช้กรรไกร และปากคีบ ให้ได้เนื้อเยื่อที่มีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร เก็บเนื้อเยื่อที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการใช้งาน และต้องใช้เนื้อเยื่อภายในสองสัปดาห์

ตาราง 1 องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ เครปส์ (krebs buffer)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)
Sodium chloride	6.90
Potassium chloride	0.35
Magnesium sulphate	0.29
Potassium phosphate	0.16
Glucose	2.00
Sodium bicarbonate	2.10
Calcium chloride	0.37

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 4 เยื่อบุกระพุ้งแก้มหมู

2.3.4 <u>การเตรียมตำรับเจลที่ใช้ในการทดสอบ</u>

ชั่งองค์ประกอบของตำรับเจลตามตาราง 2 และเตรียมตำรับโดยการโปรยสารก่อเจลลงในน้ำร้อนคนตลอดเวลาจนได้สารแขวนตะกอนที่เข้ากันดีแล้ว จึงเติมไตรเอทาโนลามีน และสารช่วยกระจายตัว (dispersing agent) ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1 คืน ก่อนที่จะนำไปทำการทดสอบ

สำหรับเจลที่ผสมสารสกัดผักคราดหัวแหวน ให้เตรียมโดยการโปรยสารก่อเจลลงในน้ำร้อนเช่นเดียวกัน แต่หลังจากเติมไตรเอทาโนลามีน แล้ว ให้เก็บเจลไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 คืน ก่อนจะนำมาบดผสมกับสารสกัดในโกร่ง โดยใช้สารช่วยกระจายตัว เตรียมตำรับให้มีความเข้มข้นของสารสกัดผักคราดหัวแหวนเท่ากับ 2% โดยน้ำหนัก

ตาราง 2 องค์ประกอบของตำรับเจล

ตำรับที่	HEC	Gelling agent A	Gelling agent B	TEA	สารช่วยกระจายตัว
1	4%	-	-	0.50%	15%
2	3%	1%	-	0.50%	15%
3	2%	2%	-	0.50%	15%
4	3%	-	1%	0.50%	15%
5	2%	-	2%	0.50%	15%
6	2%	1%	1%	0.50%	15%
7	2%	1.50%	0.50%	0.50%	15%
8	2%	0.50%	1.50%	0.50%	15%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.5 การวัดความหนืด

นำตำรับเจลที่เตรียมมาวัดความหนืดด้วยเครื่องบรุคฟิลด์วิสโคมิเตอร์ (brookfield viscometer) (ภาพ 5) โดยใช้หัววัดสำหรับความหนืดปานกลาง (model RV) และสปินเดิล (spindle) เบอร์ 14 ทำการวัดตำรับละ 3 ครั้ง ใช้ตัวอย่างครั้งละ 2 มิลลิลิตรและทำการเปลี่ยนตัวอย่างใหม่ทุกครั้งหลังจากวัดเสร็จ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37.0 องศาเซลเซียส และมีขั้นตอนการวัดโดยเริ่มจากการพักเจลเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเริ่มทำการวัดโดยให้มีอัตราเฉือน (shear rate) เริ่มต้น ที่ 5 รอบ/นาที ทำการวัดเป็นเวลา 1 นาที แล้วค่อยๆ เพิ่มอัตราเฉือน (shear rate) ขึ้นจุดละ 1 รอบ/นาที จำนวนทั้งสิ้น 6 จุด จากนั้นค่อยๆ ลดอัตราเฉือน (shear rate) ลงจุดละ 1 รอบ/นาที อีกเป็นจำนวน 5 จุด รวมวัดทั้งสิ้น 11 จุด คำนวนค่าความหนืดและค่ายีลด์สเตรส (yield stress) ของตัวอย่างด้วยโปรแกรมของเครื่องมือตามสมการบิงก์แฮม (bingham equation)

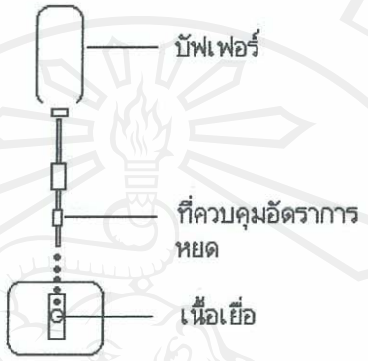
ภาพ 5 เครื่องมือวัดความหนืดบรุคฟิลด์วิสโคมิเตอร์ (brookfield viscometer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.6 การทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อของเจลโดยใช้แบบจำลองวัดเวลาการชะเจลออกจากเนื้อเยื่อ [51]

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ไอโซโทนิค แมคอัลเวน ใส่ในขวดน้ำเกลือ จากนั้นตัดเนื้อเยื่อบุกระพุ้งแก้มหมู ขนาด 1.5 x 0.5 เซนติเมตร โดยประมาณ แล้วป้ายเจลที่ทำการผสมสีผสมอาหารสีน้ำเงินในอัตราส่วน 2.5 ppm. ลงบนเนื้อเยื่อ โดยชั่งให้มีน้ำหนักเจลแน่นอน ครั้งละ

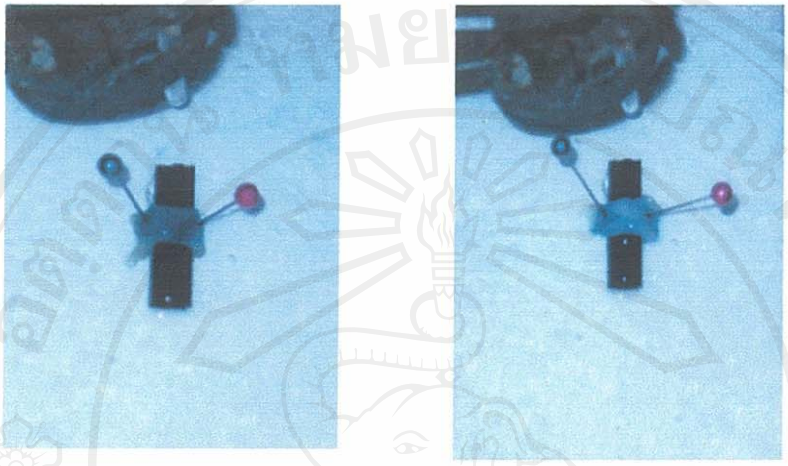
0.05 กรัม จากนั้นนำมาตรึงไว้บนแท่น และปล่อยให้สารละลายบัฟเฟอร์ไอโซโทนิค แมคอัลเวน หยดลงบนเนื้อเยื่อที่มีเจลป้ายอยู่ สูงจากเนื้อเยื่อ 5 เซ็นติเมตรด้วยอัตราเร็ว 1.39 มิลลิลิตรต่อนาทีซึ่งเป็นอัตราการชะเนื้อเยื่อในช่องปากของน้ำลาย [24] ทำการจับเวลาที่เจลถูกชะออกจากเนื้อเยื่อโดยสังเกตจากสีที่จางไปจากเนื้อเยื่อ โดยทำตำรับละ 3 ครั้ง บันทึกผล



ภาพ 6 แบบจำลองแสดงวิธีการวัดเวลาการชะเจลออกจากเนื้อเยื่อ

ภาพ 7 อุปกรณ์วัดเวลาการชะเจลออกจากเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



เริ่มต้นทดลอง หลังการทดลอง

ภาพ 8 เนื้อเยื่อก่อนและหลังการทดลองวัดเวลาการชะเจลออกจากเนื้อเยื่อ

2.3.7 <u>การทดสอบความคงสภาพของตำรับในสภาวะเร่งด้วยวิธี Heating and cooling</u>

ทำการวัด pH ความหนืด รวมทั้งคุณลักษณะทั่วไปของตำรับยาพื้นเจลก่อนทำการทดสอบความคงสภาพ จากนั้นให้แบ่งตำรับออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก เก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดช่วงการทดสอบ กลุ่มที่ 2 เก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตลอดการทดสอบ และกลุ่มสุดท้าย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อีก 48 ชั่วโมง สลับกันเป็นจำนวนทั้งสิ้น 6 รอบ หรือ 24 วัน จากนั้นให้ทำการวัด pH ความหนืด รวมทั้งคุณลักษณะทั่วไปของตำรับอีกครั้งเปรียบเทียบกับตำรับก่อนการทดสอบ ส่วนเจลที่ผสมสารสกัดผักคราดหัวแหวนจะทำการทดสอบความคงสภาพของตำรับด้วยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลับกับ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเท่านั้น [52]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.8 การหาปริมาณสารสำคัญด้วยโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography , HPLC) [11]

มีรายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการและอุปกรณ์ที่ใช้ดังนี้

เครื่องมือ	: HPLC ของบริษัท Hewlett Packard®, series 1100
คอลัมน์	: คาร์บอน18 ที่มีขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ความยาว 25 เซ็นติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ของบริษัท Hewlett Packard®
วัฏภาคเคลื่อนที่	: มีระบบที่ประกอบไปด้วย อะซิโตไนไตรล์ และ น้ำกลั่นปราศจากไอออน (de-ionized water) ในอัตราส่วน 1:1 เคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตร ต่อนาที
การตรวจวัด	: ตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร

การตรวจวัดปริมาณสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดผักคราดหัวแหวน ทำโดยการเจือจางสารสกัดด้วย เอธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol, 99%) กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ก่อนจะฉีดเข้าคอลัมน์เพื่อทำการหาโครมาโทแกรม

ส่วนการตรวจวัดปริมาณสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดผักคราดหัวแหวนในตำรับเจล ทำโดยการชั่งเจลผักคราดหัวแหวนให้มีน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.10 กรัม สกัดเจลที่ได้ด้วยเอธานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนจะฉีดเข้าคอลัมน์เพื่อทำการวัดปริมาณ

จากโครมาโทแกรมที่ได้ จะเลือกใช้พีค ณ. ช่วงเวลา 15 – 17 นาที เป็นพีคอ้างอิงในการคำนวณหาปริมาณสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดผักคราดหัวแหวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved