บทที่ 3

การทดลอง

สารเคมี

1. benzoyl peroxide gel: Panoxyl gel® (Stiefel Laboratories(Pte)Ltd. Singapore)
2. carbopol 941 (หจก.ซี เอ็ม เคมีคอล แอนด์ แล็บ ซับพลายส์ กรุงเทพฯ)
3. cetiol HE (Cognis Thai Ltd. กรุงเทพฯ)
4. cremophor A25 (The sun chemical co.Ltd. กรุงเทพฯ)
5. cyclomethicone (บริษัทหน่ำเซียน จำกัด กรุงเทพฯ)
6. chloroform (LAB-SCAN Co.Ltd.Ireland)
7. clindamycin gel: Clindalin gel®(Union Drug Laboratories Ltd. กรุงเทพฯ)
8. ethanol 95% (องค์การสุรา)
9. eumulgin B2 (ไทยสงวนวัฒน์เคมีภัณฑ์ จำกัด กรุงเทพฯ)
10. ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA (Fluka Switzerland)
11. gallic acid (Sigma Chemical Co., USA.)
12. Folin-Denis reagent (Merck Germany)
13. hexane (LAB-SCAN Co .Ltd. Ireland)
14. hide-powder (Sigma-Aldrich Co., Germany)
15. isopropyl palmitate (Fluka Switzerland)
16. methyl paraben (Sigma Chemical Co., USA.)
17. potassium dihydrogen orthophosphate (Asia Pacific Specialty Chemical Ltd.)
18. propylene glycol (บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์ จำกัด กรุงเทพฯ)
19. propyl paraben (Sigma Chemical Co., USA.)
20. sodium metabisulfite (Sigma Chemical Co., USA.)
21. tannic acid (USP grade Riedel)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. anaerobic jar
2. autopipette
3. autoclave (Hiclave HVE-50)
4. brookfield (model DV-III programmable rheometer)
5. freeze dryer (Christ. Alpha2-4, Germany)
6. gaspak®
7. hot air oven (Thelco.Model 27)
8. incubator (National Appliance Co.USA.Model 332)
9. loop เขี่ยเชื้อ
10. ring สำรับทดสอบเชื้อ
11. rotary evaporator (Eyela N-N series)
12. soxhlet apparatus
13. spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 1001 plus)
14. spray drier (Spray drier SD-04)
15. tip ขนาด 100 μL,1000 μL
16. tube ขนาด 10 ml.
17. water bath
18. กาวเทป (transpore® บริษัท 3M จำกัด กรุงเทพฯ)
19. กระดาษกรอง
20. เครื่องชั่ง
21. เครื่องบด
22. เครื่องปั่นชนิดมีใบพัด (Heidolph)
23. เครื่องโกนขนไฟฟ้า
24. เครื่องวัดความมัน (Sebumeter)
25. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm
26. ชุดสกัดขนาด 5 L
27. ชุดล็อคกระต่าย
28. ผ้าก๊อซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
2. *Propionibacterium acnes* แยกได้จากผู้ป่วย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller Hinton Agar (Merk Ltd, Germany)
2. Mueller Hinton Broth (Merk Ltd, Germany)
3. Tryptic soy Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)
4. Tryptic soy Broth (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)

สัตว์ทดลอง

กระต่ายสีขาว พันธุ์ New Zealand white น้ำหนักระหว่าง 2.0- 2.5 กิโลกรัม เพศผู้ อายุ 8-9 เดือน จำนวน 3 ตัว จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พืชสมุนไพร

กระบือเจ็ดตัว (*Excoecaria cochinchinensis* Lour.) วงศ์ Euphorbiaceae เก็บจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เก็บสมุนไพรช่วงเวลา เดือนพฤษภาคม – ตุลาคม 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนการดำเนินงาน

ศึกษาข้อมูลกระบือเจ็ดตัวและการตั้งตำรับ

↓

ใบกระบือเจ็ดตัวอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา24 ชั่วโมง

↓

สกัดด้วยการสกัดแบบต่อเนื่องเป็น hexane, chloroform, ethanol ตามลำดับ และนำกากมา reflux ด้วยน้ำ สารสกัดน้ำมาทำให้แห้งโดยวิธี spray dry

↓

การวิเคราะห์เบื้องต้นของสารสกัดโดยวิธี thin layer chromatography และการหาปริมาณแทนนินรวมตามวิธี WHOและหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกตามวิธี AOAC

↓

ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และการละลายของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

↓

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ*P. acnes* ของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

↓

เตรียมผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกรักษาสิวจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

↓

ทดสอบผลิตภัณฑ์รักษาสิวใช้ภายนอกจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัวโดยวิธีดังนี้

- ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ*P. acnes* ของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับยาแผนปัจจุบันรูปแบบคล้ายกันที่มีจำหน่ายในท้องตลาด
- ทดสอบความคงสภาพทางกายภาพ ,เคมีกายภาพ และจุลชีววิทยา
- ทดสอบความพึงพอใจและการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นในอาสาสมัคร
- ทดสอบความมันบนใบหน้าและประสิทธิภาพการรักษาในอาสาสมัคร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. การเก็บพืชสมุนไพร

ทำการเก็บใบกระบือเจ็ดตัว สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เก็บสมุนไพรช่วงเวลา เดือน พฤษภาคม – ตุลาคม 2547

2. การเตรียมใบกระบือเจ็ดตัว

นำใบกระบือเจ็ดตัวมาล้างให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การเตรียมสารสกัดและการวิเคราะห์เบื้องต้นของสารสกัด

3.1 การเตรียมสารสกัด

3.1.1 การสกัดสารมีรายละเอียดดังนี้

นำผงใบกระบือเจ็ดตัวมาสกัดด้วย Sohxlet apparatus โดยใช้ตัวทำละลายตามลำดับดังนี้ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม 95% เอทานอล และนำกากไป reflux ด้วยน้ำ

3.1.2 การทำให้สารสกัดแห้ง

(1) สารสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้แห้งโดยการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator

(2) สารสกัดน้ำ ทำให้แห้งโดยวิธี Spray dry ซึ่งเป็นส่วนที่จะนำไปเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

3.2 การทดสอบทางกายภาพ เคมีกายภาพ และการละลายของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

3.2.1 การทดสอบทางกายภาพ

ศึกษา สถานะทางกายภาพ สี กลิ่น โดยการตรวจสอบด้วยประสาทสัมผัส

3.2.2 การทดสอบทางเคมีกายภาพ

ทำการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของสารสกัด โดยใช้กระดาษวัดกรดด่างและเครื่องวัดพีเอช มิเตอร์

3.2.3 การทดสอบการละลาย

ทำการศึกษาการละลายของสารสกัดในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่น โพรพิลีนกลัยคอล 95 %เอทานอล โพลีเอธิลีนกลัยคอล 200 โดยเติมตัวทำละลายลงในสารสกัดให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1:10, 1:100 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าด้วย vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะสารละลายที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 การความคงตัวของสารสกัดที่ค่าพีเอช 4.0-6.5

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.0-6.5 แล้วเติมสารสกัดในปริมาณที่เท่ากันในแต่ละพีเอช เขย่าด้วย vortex mixer สังเกตลักษณะสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายที่ได้สัมผัสกับแสงและไม่สัมผัสกับแสง และสังเกตลักษณะสารละลายที่ได้ในที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.3 การวิเคราะห์เบื้องต้นของสารสกัด ศึกษาโดย

3.3.1 วิธี Thin layer chromatography

Technique	: one way, ascending
Absorbent	: silica gel GF_{254} มีความหนา 0.25 mm
Solvent system	: iso-butyl alcohol : glacial acid : water (3:1:1)
Distance	: 8 เซนติเมตร
Reference solution	: tannic acid in water
	gallic acid in water
Sample solution	: สารสกัดกระบือเจ็ดตัวส่วนน้ำ ความเข้มข้น 1%
Detection	: ultraviolet light ที่ความยาวคลื่น 254 nm

3.3.2 การหาปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

เนื่องจากมีรายงานด้านฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแทนนิน และการตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของวิทยานิพนธ์ธิดาสวรรค์ อิทธิวิทยาวาทย์ (2546) พบแทนนินเป็นองค์ประกอบของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว ดังนั้นการหาปริมาณแทนนินรวมในใบกระบือเจ็ดตัวจึงนำมาใช้ควบคุมคุณภาพของพืช ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

การหาปริมาณแทนนินรวมตามวิธี WHO[41] มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่ง hide powder จำนวน 6 g เขย่ากับน้ำ 80 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตะกอนทิ้ง เก็บส่วนที่กรองได้มา 50 ml ระเหยแห้ง แล้วอบที่ 105 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เรียกว่า T_0
2. ชั่งน้ำหนักผงสารสกัดกระบือเจ็ดตัวที่แน่นอน ลงในขวดรูปชมพู่
3. เติมน้ำ 150 ml ต้มบนอ่างน้ำเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 ml กรองเก็บสารสกัดโดยทิ้งส่วน 50 ml แรก
4. แบ่งส่วนที่กรองได้มา 50 ml นำมาระเหยแห้ง แล้วอบที่ 105 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง น้ำหนักสารที่ได้ เรียกว่า T_1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. แบ่งส่วนที่กรองได้อีก 80 ml นำมาผสมกับ hide powder จำนวน 6 g เขย่าด้วยเครื่องนาน 1 ชั่วโมง กรองตะกอนทิ้ง นำส่วนที่กรองได้มา 50 ml ระเหยแห้งแล้วอบที่ 105 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เรียกว่า T_2

6. คำนวณหาปริมาณแทนนินรวมจากสูตร

$$\text{ปริมาณแทนนินรวม (\%)} = \frac{[T_1-(T_2 - T_0)] \times 500}{w}$$

การหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกตามวิธี AOAC Official Method [42] มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารเคมี

1.1 Folin-denis reagent

1.2 anhydrous sodium carbonate saturated solution

ละลาย anhydrous sodium carbonate 35 g ในน้ำ 100 ml ที่อุณหภูมิ 70-80 ºC แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองผลึกออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

1.3 สารละลาย standard tannic acid ความเข้มข้น 0.1 mg/ml

ละลาย standard tannic acid จำนวน 5 mg ในน้ำ 50 ml

2. เตรียมกราฟมาตรฐานของ standard tannic acid

2.1 ดูดสารละลายกรดแทนนิกมาตรฐาน ขนาด 10,50,100,150,200 μL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ตามลำดับ

2.2 เติมน้ำกลั่น 7.5 ml ลงในข้อ 2.1 ตามลำดับ

2.3 เติม Folin-denis reagent ขนาด 0.5 ml

2.4 เติม anhydrous sodium carbonate saturated solution 1 ml

2.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

2.6 วัดค่า absorbance ที่ 760 nm แล้วพลอตกราฟระหว่างค่า absorbance กับค่าความเข้มข้นของ standard tannic acid (μg/10 ml) โดยแกน Y เป็นค่า absorbance และแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ standard tannic acid เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของ standard tannic acid ในสารละลายของสารสกัดกระบือเจ็ดตัวต่อไป

3. เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 0.1 mg/ml

3.1 ละลายผงสารสกัด 1 mg ในน้ำกลั่น 10 mlใน volumetric flask ขนาด 10 ml เตรียมทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2 วัดค่า absorbance ที่ 210 nm และ 760 nm

4. เตรียมกราฟมาตรฐานของ standard gallic acid เช่นเดียวกับข้อ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุเกิดสิวของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

4.1 การจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี [43, 44]

4.1.1. เชื้อ *S. aureus* จำแนกด้วย การดูลักษณะรูปร่างของเชื้อด้วยการย้อมการติดสีแกรม, coagulase test, glucose, PR mannitol และการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis)

4.1.2. เชื้อ *P. acnes* จำแนกด้วย การดูลักษณะรูปร่างของเชื้อด้วยการย้อมการติดสี แกรม , catalase test, indole test และ nitrate test

4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ [43, 44]

4.2.1 การเตรียม Mueller Hinton-Agar (MHA)

ชั่ง Mueller-Hinton Agar 34 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 L ให้ความร้อนพร้อมกับคนไปด้วยจนวุ้นละลายหมด ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml ปิดฝาหลวม ๆ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ºC เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทิ้งให้แข็ง นำมาผึ่งผิวหน้าให้แห้ง ใช้ทดสอบทันทีหรือเก็บไว้ใน ตู้เย็น 4 ºC

4.2.2 การเตรียม Tryptic Soy Agar (TSA)

เตรียมเช่นเดียวกันกับการเตรียม MHA แต่ใช้ Tryptic Soy Agar 40 g และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 L

4.3 การเตรียมสารละลายเชื้อ [43, 44]

4.3.1 สารละลายเชื้อ *S. aureus* (ATCC 25923)

(1) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะยอดโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกัน 4-5 โคโลนีจากวุ้นเลี้ยงเชื้อ ใส่ลงใน Mueller Hinton-Broth (MHB) 2 ml แบบ aseptic technique แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

(2) เทียบความขุ่นกับ McFarland No.0.5 ถ้าเชื้อมีความขุ่นมากให้เจือจางด้วยอาหารเหลวที่ใช้เตรียม เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml

4.3.2 สารละลายเชื้อ *P . acnes*

(1) ทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมเชื้อ *S. aureus* แต่ใช้อาหารเหลวเป็น Tryptic Soy Broth (TSB)

(2) นำไป incubate ที่สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปรับความขุ่นให้เทียบเท่า McFarland No.0.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การเตรียมสารละลายที่จะทดสอบ

เตรียมสารละลายของสารสกัดในความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 %w/v ในน้ำกลั่น

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดโดยวิธี well diffusion method [43-50]

ทำการทดสอบกับเชื้อ 2 ชนิดคือ *S .aureus* (ATCC25932) และ *P. acnes*

1. วางวงแหวนเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 mm บนเพลทที่ได้จากข้อ 4.2.1 และ4.2.2 ให้ห่างกันพอสมควร

2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากข้อ4.2.1และ4.2.2 มาหลอมที่อุณหภูมิประมาณ 50 ºC

3. ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ 0.1 ml ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมไว้ และมีอุณหภูมิไม่เกิน 45 ºC จำนวน 10 ml ผสมให้เชื้อกระจายตัวดีในอาหารแล้วเทลงในเพลทที่วางวงแหวนไว้ รอให้วุ้นแข็งตัวแล้วนำวงแหวนออก สำหรับเชื้อ *S .aureus* (ATCC25932) ใช้อาหารจากข้อ 4.2.1 ส่วนเชื้อ *P. acnes* ใช้อาหารจากข้อ 4.2.2

4. ดูดสารสกัดหรือยาที่ต้องการทดสอบจำนวน 100 μL ลงในแต่ละหลุม

5. สำหรับเชื้อ *S. aureus* นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *P. acnes* ให้เรียงเพลทลงใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak ปิดฝาทันที นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 ºC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6. วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นโดยทำการวัดใน 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุมกัน 60 ° หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผล

4.6 การหาอัตราในการฆ่าเชื้อจุลชีพของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว(time killing assay) [43-50]

เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาและการเปลี่ยนแปลงความไวของยาต่อเชื้อจุลชีพ ในระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังจากที่ได้นำยาที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาทดสอบกับเชื้อ นับโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วนำมาพล็อตกราฟระหว่างจำนวนโคโลนีกับเวลา มีขั้นตอนดังนี้

4.6.1. การเตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบ

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่จะศึกษาให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ5×10^7 CFU/ml (เทียบกับ 0.5 McFarland)

4.6.2. การเตรียมสารละลายกระบือเจ็ดตัว

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระบือเจ็ดตัวที่สามารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* (ATCC25923) และ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 1.25 mg/ml ดังนั้นต้องเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 500 mg/ml (400 เท่าของ MIC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6.3 ขั้นตอนการทดสอบหาเวลาในการฆ่าเชื้อของสารสกัด

1. ผสมสารสกัดหรือยาที่เตรียมได้ในข้อ 1 จำนวน 0.1 ml ลงใน MHB จำนวน 9.8 ml จะได้ความเข้มข้นของยาเป็น 4 เท่าของ MIC

2. เตรียม MHB จำนวน 9.9 ml เป็นหลอดควบคุม

3. เติมเชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 0.1 ml

4. ผสมให้เข้ากันโดยเร็ว แล้วดูดไป 0.1 ml ใส่ลงในน้ำเกลือเพื่อเจือจางลง ครั้งละ 10 เท่า จากนั้นหยดสารละลายเชื้อจำนวน 0.02 ml โดยเริ่มที่ความเข้มข้นต่ำสุดก่อนด้วย calibrated pipette ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 3 หยด บ่มเชื้อที่ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4 ที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมงภายหลังเติมเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 0.1 ml

6. นับจำนวนโคโลนีที่คำนวณได้แล้วนำไปเขียนกราฟในกระดาษ semilog

5. การเตรียมตำรับของสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

4.1 ตำรับไฮโดรเจล [17,51,52]

ในตำรับเจลจะมีองค์ประกอบดังนี้

-สารก่อเจล คือ คาร์โบพอล 941

-สารเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง เลือกใช้ คือ โพรไพลีน กลัยคอล

-สารกันเสีย เลือกใช้ คือ เมทิล พาราเบน โพรพิล พาราเบน

-สารต้านออกซิเดชันเลือกใช้ คือ โซเดียม เมตะไบซัลไฟท์

-สารจับโลหะ เลือกใช้ คือ EDTA

4.2 ตำรับ transparent oil in water gel [19-24,53]

ในตำรับอิมัลชันจะมีองค์ประกอบดังนี้

- สารก่อเจล เลือกสารก่อเจล คือ eumulgin B2 , cetiol HE , cremophor A25

-สารเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง เลือกใช้ คือ โพรไพลีน กลัยคอล

-สารกันเสีย เลือกใช้ คือ เมทิล พาราเบน โพรพิล พาราเบน

-สารต้านออกซิเดชันเลือกใช้ คือ โซเดียม เมตะไบซัลไฟท์

-สารจับโลหะ เลือกใช้ คือ EDTA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้น [17]

5.1 การทดสอบในสภาวะเร่ง โดย

-Freeze-Thraw cycle นำผลิตภัณฑ์ไปไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับอุณหภูมิร้อน-เย็น เป็นจำนวน 7 รอบ สังเกตผลการทดลอง

-การปั่นเหวี่ยง นำผลิตภัณฑ์ไปไว้ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการทดลอง

5.2 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นในสภาวะการทดสอบต่างๆ ดังนี้

นำผลิตภัณฑ์ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 ºC และ อุณหภูมิห้อง 32-38 ºC เป็นเวลา 2, 4 เดือน และอุณหภูมิ 45 ºC เป็นเวลา 2 และ 6 เดือน แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ดูการแยกชั้น การเปลี่ยนสี กลิ่น การตกตะกอน คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เช่น ค่าพีเอช ค่าความหนืด คุณสมบัติการไหล และการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรีย

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับยาแผนปัจจุบันรูปแบบคล้ายกันที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ใช้วิธี well diffusion method ซึ่งมีวิธีการทดลองดังที่กล่าวข้างต้น

7. การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นในกระต่ายและอาสาสมัคร ควบคู่กับการทดสอบความ
พึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นในอาสาสมัคร

7.1 การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ในกระต่าย [53]

สัตว์ทดลองที่ใช้ : กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand white น้ำหนักระหว่าง 2.0-2.5 กิโลกรัม เพศผู้อายุ 7-8 เดือน จำนวน 3 ตัว

สารที่ทดสอบ : ผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว ทั้งหมด 3 ตำรับ

7.1.1 การเตรียมและคัดเลือกสัตว์ทดลอง

คัดเลือกเฉพาะกระต่ายที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่เคยผ่านการทดสอบ ก่อนทำการทดสอบให้โกนขนที่หลังกระต่ายทั้ง 2 ข้างของแนวกระดูกสันหลัง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังโกนเสร็จตรวจสอบความผิดปกติของผิวหนังกระต่าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7.1.2 การทดสอบ

แบ่งหลังกระต่ายออกเป็น 2 ด้านตามแนวสันหลัง ปิดด้วยผ้าก๊อซ ขนาด 25 X 25 mm ซึ่งป้ายผลิตภัณฑ์ที่เตรียมไว้จำนวน 0.5 g/patch โดยเรียงจากด้านศีรษะมาสู่หางของกระต่าย หุ้มผิวหนังกระต่ายด้วยพลาสติกเพื่อกันการระเหย เมื่อครบ 4 ชั่วโมง นำผ้าก๊อซออกเช็ดด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง

7.1.3 การประเมินผล

ให้คะแนนอาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ของแต่ละตำแหน่ง ภายหลังเอาผ้าก๊อซออกที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามระบบ Draize scoring system ดังแสดงในภาคผนวกตาราง ข.1 ในการจัดประเภทของการระคายเคือง คะแนนเฉลี่ยของอาการแดงและอาการบวมในกระต่ายทั้ง 3 ตัว ณ เวลาต่าง ๆ แทนด้วย Primary Dermal Irritation (PDI) เมื่อนำผลบวกของค่า PDI ณ เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หารด้วยจำนวนช่วงเวลาที่ประเมิน ค่าที่ได้เรียกว่า Primary Dermal Irritation Index (PDII) ซึ่งค่านี้จะนำไปใช้จัดประเภทของการระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ดังแสดงในภาคผนวกตาราง ข.2

7.2 การทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์รักษาสิวจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัวของอาสาสมัคร [54]

การทดสอบอาการระคายเคืองของผิวหนังอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์จะดำเนินการตามวิธี Modified Draize Irritation Method ของ OECD ดังนี้

7.2.1 การเตรียมและคัดเลือกอาสาสมัคร

อาสาสมัคร: คัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงดีอายุตั้งแต่ 18 - 45 ปี ไม่เป็นโรคผิวหนัง สีผิวบริเวณที่จะทดสอบสม่ำเสมอ เป็นเพศชาย 15 คน และเพศหญิง 15 คน

สารที่ทดสอบ: ผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว ทั้งหมด 3 ตำรับ

7.2.2 การทดสอบ

การทดสอบจะปิดยาที่บริเวณต้นแขนด้านนอก จำนวน 6 จุดด้วยผ้าก๊อต (gauze patch) ขนาด 25X25 mm ซึ่งป้ายผลิตภัณฑ์ จำนวน 0.5 g/patch ใช้ผิวหนังเปล่าเป็นตัวควบคุม ปิดผิวหนังด้วยพลาสติกเพื่อกันการระเหย เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผ้าก๊อซออก เช็ดด้วยน้ำอุ่นทิ้งให้แห้ง สังเกตผลที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังเอาผ้าก๊อซออก ดูอาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนการทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครจะใช้อาสาสมัครกลุ่มเดียวกับการทดสอบการระคายผิวหนัง โดยหัวข้อที่จะประเมินผลิตภัณฑ์จะเกี่ยวข้องกับ สี กลิ่น ลักษณะ และการกระจายตัวของผลิตภัณฑ์

8. การทดสอบความมันของผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจล

การทดสอบความมันบนใบหน้าในอาสาสมัครของผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจล ดังนี้

8.1 การเตรียมและคัดเลือกอาสาสมัคร

อาสาสมัคร : คัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงดีอายุตั้งแต่ 18 -25 ปี ไม่เป็นโรคผิวหนัง สีผิวบริเวณที่จะทดสอบสม่ำเสมอ ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอื่นร่วมขณะที่ทำการทดสอบ เป็นเพศชาย 5 คน และเพศหญิง 5 คน เป็นคนหน้ามันง่าย

สารที่ทดสอบ : ผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบไฮโดรเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว

8.2 การทดสอบ

การทดสอบจะให้อาสาสมัครทาผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจลที่หน้าผาก หรือ จมูก หรือ คาง (ทีโซน) ทุกวัน เป็นระยะเวลา 14 วัน จะวัดความมันบนใบหน้าในวันที่ 0, 7 และวันที่ 14 โดยก่อนที่จะวัดความมัน จะเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่จะวัดด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง 10 นาที แล้วจึงวัดความมันด้วยเครื่อง sebumeter ซึ่งเครื่องจะวัดออกมาเป็นตัวเลขบอกระดับความมัน ยิ่งตัวเลขมีค่ามาก หน้ามีความมันมาก ตัวเลขมีค่าน้อย หน้ามีความมันน้อย

9. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัวในอาสาสมัคร

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัวในอาสาสมัครดังนี้

9.1 การเตรียมและคัดเลือกอาสาสมัคร

อาสาสมัคร : คัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงดีอายุตั้งแต่ 18-25 ปี เป็นสิวอักเสบ ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรักษาสิวอื่นร่วมขณะที่ทำการทดสอบเป็นเพศชาย 5 คน และเพศหญิง 5 คน

สารที่ทดสอบ : ผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว ทั้งหมด 3 ตำรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9.2 การทดสอบ

การทดสอบจะให้อาสาสมัครแต่ละคนทาผลิตภัณฑ์รักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระบือ เจ็ดตัว ทั้งหมด 3 ตำรับ บริเวณที่เป็นสิวอักเสบ เป็นระยะเวลา 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงและการลดการอักเสบของสิวอักเสบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved