บทที่ 3
วัสดุ และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

<u>เครื่องมือ</u>

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ 4 ตำแหน่ง (Sartorius AC210 S, บริษัท Scientific Promotion Co., LTD, ประเทศเยอรมัน)
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius BP610, บริษัท Scientific Promotion Co., LTD, ประเทศเยอรมัน)
3. เครื่องคนด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Variomag telesystem, บริษัท Scientific Promotion Co., LTD, ประเทศเยอรมัน)
4. เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Pressure Liquid Chromatography) (Hewlett Packard series 1100, บริษัท Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5. เครื่องวัด pH (PH 211, บริษัท HANNA instruments, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum) (Rocker 300, บริษัท Gibthai Co., Ltd, ประเทศไทย)
7. เครื่อง rotary evaporator (EYELA SB-1000, บริษัท Tokyo rikakikai Co., Ltd, ประเทศญี่ปุ่น)
8. เครื่องวัดความหนืดชนิดอาศัยการหมุนของแกน (Brookfield Model Visco-meter) (TC-500, Brookfield engineering Lab, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลต (Microtiter plate reader) (Biorad 680, บริษัท Bio-rad Laboratories Ltd, ประเทศไทย)
10. ตู้อบ (Memmert, บริษัท BEC, ประเทศเยอรมัน)
11. กล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น Alphaphot-2 YS2 ที่ต่อกับกล้อง digital Nikon รุ่น coolpix4500 (บริษัท Nikon, ประเทศญี่ปุ่น)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. เครื่อง skin-visiometer® SV600 (skin-visiometer® SV600, บริษัท CK electronic, ประเทศเยอรมัน)
13. เครื่อง Corneometer (บริษัท CK electronic, ประเทศเยอรมัน)
14. เครื่อง Mexameter (บริษัท CK electronic, ประเทศเยอรมัน)

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร
2. ไมโครเพลต (microplate)
3. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
4. เครื่องคน (stirrer)
5. กระดาษกรอง
6. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 10, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
7. ผ้าก๊อซ
8. ขวดพลาสติกปากกว้างขนาดบรรจุ 5 และ 10 กรัม
9. เตาไฟฟ้า
10. เทอร์โมมิเตอร์
11. กระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน

<u>พืชสมุนไพร และสารเคมี</u>

1. ผงสมุนไพรเอ็คไคนาเซีย เพอร์พูเรีย (*E. purpurea*) (Lot No. 48/0000009, บริษัท ภัทรอุดมภัณฑ์จำกัด, ประเทศไทย)
2. สารมาตรฐาน cichoric acid (Batch no.948, บริษัท Phyto Lab ประเทศเยอรมัน)
3. สารมาตรฐาน caftaric acid (Batch no.852, บริษัท Phyto Lab ประเทศเยอรมัน)
4. เอทานอล (analytical Grade, บริษัท Labscan asia จำกัด, ประเทศไทย)
5. เมทานอล (analytical Grade, บริษัท Labscan asia จำกัด, ประเทศไทย)
6. เมทานอล (HPLC Grade, บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน)
7. อะซีโตรไนไตร์ล (acetonitrile, HPLC Grade, บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน)
8. กรดฟอสฟอริก (orthophosphoric acid, analytical Grade, บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. สาร ABTS (2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) (Lot 104K1320, บริษัท SIGMA-ALDRICH, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
10. สารมาตรฐาน trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Lot 01401HU, บริษัท SIGMA-ALDRICH, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate, Analytical grade, บริษัท BDH Chemicals, ประเทศอังกฤษ)
12. ไอโสโพรพิวมายริสเตต (Isopropyl myristate, บริษัทฮงฮวดจำกัด, ประเทศไทย)
13. พาราฟินเหลว (liquid paraffin, บริษัทวิทยาศรมจำกัด, ประเทศไทย)
14. สเตียริลแอลกอฮอล์ (stearyl alcohol, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
15. เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose 4000, บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)
16. ไฮดรอกซีโพรพิวเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropylmethylcellulose, Lot. 007500, บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)
17. คาร์โบพอล (Carbopol 941, หจก. ซี.เอ็ม.เคมีคอล แอนด์ แล็บ ซัพพลายส์, ประเทศไทย)
18. วาสลีน (white soft paraffin, Lot. 001546, บริษัทวิทยาศรมจำกัด, ประเทศไทย)
19. กลีเซอริน (glycerine, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
20. กรดสเตียริก (stearic acid, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
21. โพรไพลีนกลัยคอล (propylene glycol, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
22. ลาโนลิน (lanolin anhydrous, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
23. สารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteus, บริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน)
24. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
25. ซีติลแอลกอฮอล์ (cetyl alcohol, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
26. โซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate, Pharmaceutical grade, หจก. โอ.วี.เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย, ประเทศไทย)
27. ทวีน 80 (tween 80, บริษัท Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

28. สแปน 80 (span 80, บริษัท Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
29. ขี้ผึ้งขาว (white bees wax, บริษัทวิทยาศรมจำกัด, ประเทศไทย)
30. ไตรเอทานอลามีน (triethanolamine, Carlo Erba reagent s.r.1. monteoison group, ประเทศอิตาลี)

3.2 วิธีการดำเนินการศึกษา

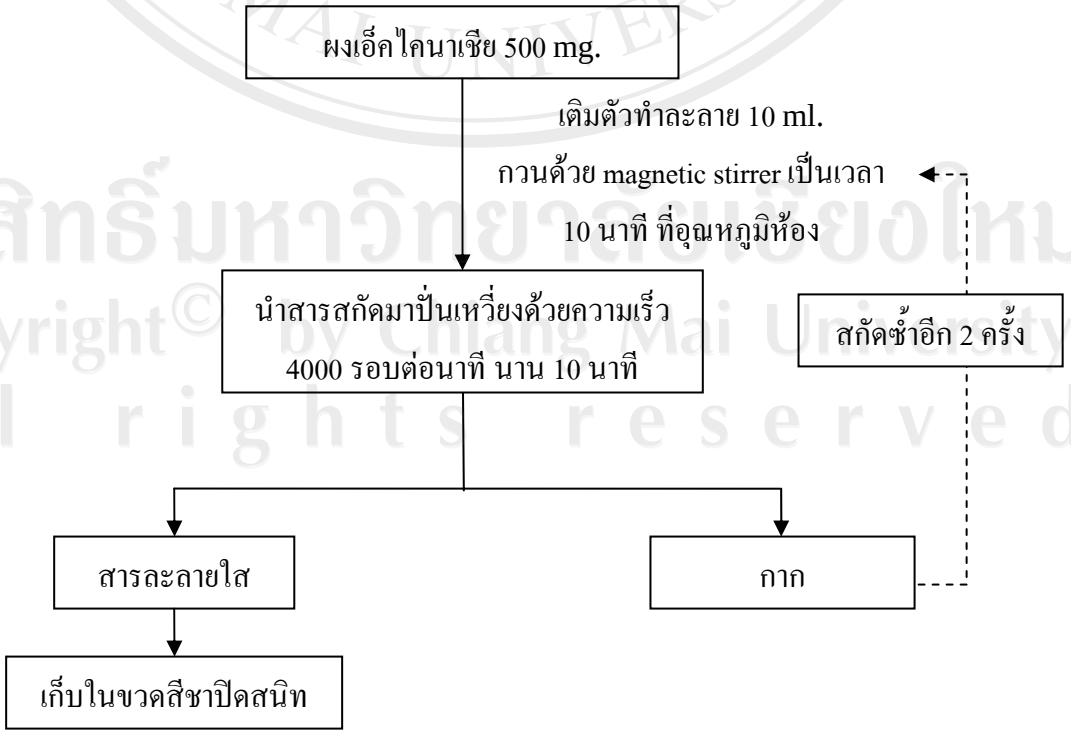
3.2.1 การสกัดสารจากผงแห้งสมุนไพร *E. purpurea* ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างกัน

ศึกษาลักษณะผงสมุนไพรภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เก็บสมุนไพรเอ็คไคนาเซีย เพอร์พูเรีย ที่ได้ผ่านการตรวจเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์แล้วจากไร่ทานตะวันแดง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ มาบดเป็นผงเพื่อใช้เปรียบเทียบกับลักษณะผงสมุนไพรที่ได้รับจากบริษัทภัทรอุดมภัณฑ์จำกัดว่าเป็นสมุนไพรดังกล่าวจริง โดยนำเฉพาะส่วนเหนือดิน มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ คัดแยกออกเป็นส่วนใบ ลำต้น และดอก นำไปอบที่อุณหภูมิ 45°C จนแห้ง แล้วจึงบดในแต่ละส่วนให้เป็นผงละเอียด ตรวจดูลักษณะผงสมุนไพรหลังบดด้วยกล้องจุลทรรศน์

สกัดผงสมุนไพรเอ็คไคนาเซีย

สกัดสารจากผงสมุนไพรด้วยสารละลายเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% และ 95% v/v ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ และสังเกตลักษณะภายนอกของสารสกัดที่เตรียมได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชัน และการหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีโนลิกของสารสกัด

<u>การทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชัน</u>

การทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชันในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธี TEAC เริ่มจากการนำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2.1 จำนวน 1 mg. ผสมกับเอทานอลในปริมาตร 1 ml. จากนั้นนำสารละลายของสารสกัดที่เตรียมได้จำนวน 20 µl ไปผสมกับสารละลาย ABTS working solution 180 µl ใน microtiter plate วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทุก 5 นาทีเป็นเวลา 30 นาที และวัดต่อทุก 10 นาที จนครบ 90 นาที นำค่าการดูดกลืนแสง มาคำนวณหาค่า % inhibition จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{Abs.control - Abs.sample}{Abs.control} \right) \times 100$$

โดย

Abs.control = ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล 20 µl + สารละลาย ABTS working solution ปริมาตร180 µl

Abs.sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง + สารละลายABTS working solution ปริมาตร180 µl

หาค่า TEAC จากการคำนวณความเข้มข้นของ trolox ในหน่วย mM ที่ให้ค่า % inhibition เทียบเท่ากับสารตัวอย่างหนัก 1 mg. โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลาย trolox

<u>การหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีโนลิก</u>

เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชัน จากนั้นนำไปผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu working solution ปริมาตร 180 µl ใน microplate เขย่าให้เข้ากัน และนำไปเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แปลผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

<u>การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม</u>

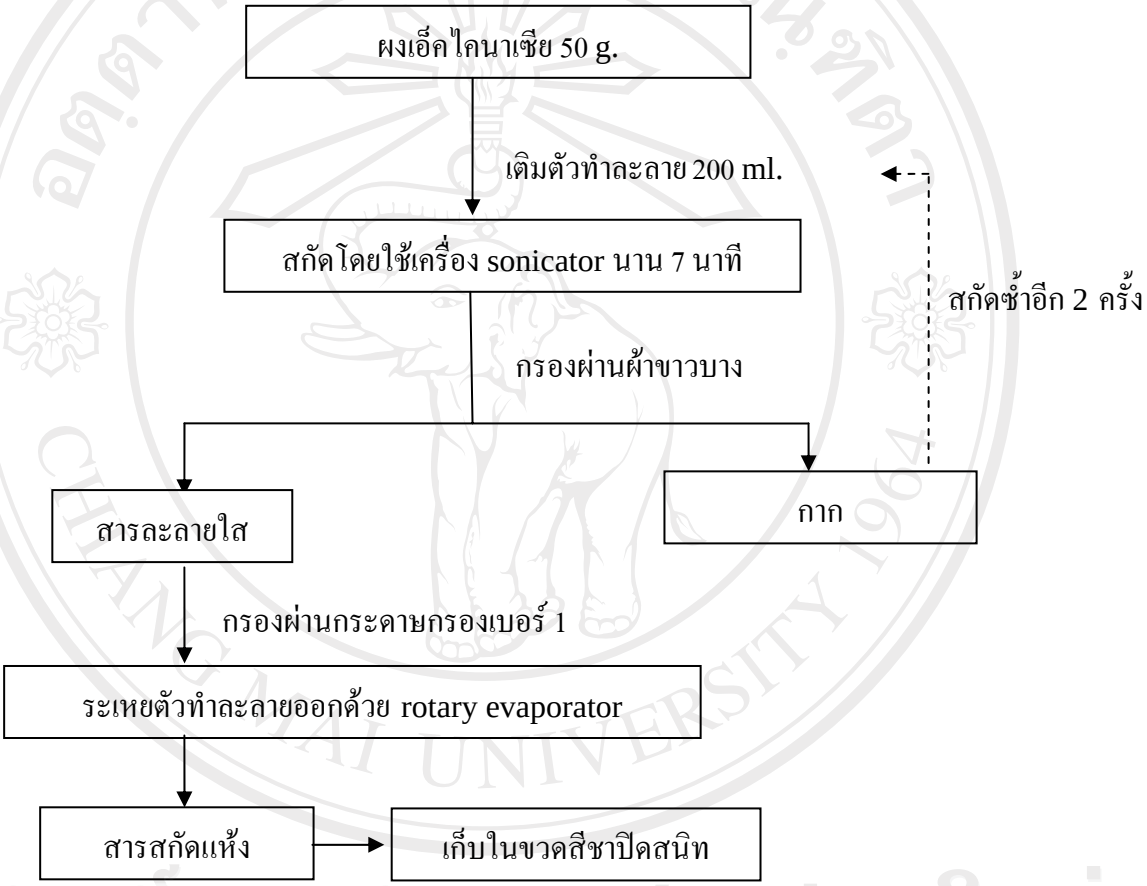
นำข้อมูลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมของสารสกัดในตัวทำละลายแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกัน คัดเลือกตัวทำละลายที่ให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร้อยละของผลได้สูง มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันและมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการสกัดผงแห้งสมุนไพรเอ็คไคนาเซีย เพอร์พูเรียในปริมาณมากต่อไป

<u>การขยายกำลังการผลิต (Scale up) สำหรับการสกัดสารจากผงสมุนไพร</u>

ในการผลิตสารสกัดปริมาณมาก ได้มีการปรับปรุงกระบวนการสกัดสารจากผงสมุนไพร ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยมีการใช้วิธี sonication ร่วมด้วยตามขั้นตอนต่อไปนี้



สังเกตลักษณะภายนอกของสารสกัดที่เตรียมได้ วัดค่าความเป็นกรดด่างและคำนวณหาค่าร้อยละของผลได้ (% yield) ของสารสกัดที่ได้ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละของผลได้} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้หลังการทำให้แห้ง}}{\text{น้ำหนักของผงสมุนไพรเอ็คไคนาเซียที่ใช้}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยวิธี HPLC

การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากผงแห้งสมุนไพร *E. purpurea* มีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดในการสกัดแต่ละครั้ง เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีคุณภาพสม่ำเสมอกันในทุกรุ่นของการสกัด สารสำคัญในสารสกัดที่จะวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ได้แก่ caftaric acid และ cichoric acid ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

<u>สภาวะในการวิเคราะห์</u>

วัฏภาคคงที่ (stationary phase) : คอลัมน์ชนิด reversed phase C-18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร และมีขนาดอนุภาคที่บรรจุภายในคอลัมน์ 5 ไมครอน

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase): สารละลายผสมระหว่าง Acetonitrile และ 0.1% v/v orthophosphoric acid ในน้ำ โดยกำหนดให้มีการผสมกันแบบเกรเดียน ดังอัตราส่วนที่แสดงในตารางที่ 3-1 ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด (detector) : UV detector โดยกำหนดค่าความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่ 330 นาโนเมตร

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารสกัด *E. purpurea*

เวลา (นาที)	***Acetonitrile* (%)**	**0.1% *v/v orthophosphoric acid* ในน้ำ (%)**
0	10	90
8	60	40
11	10	90

<u>การสร้างกราฟมาตรฐาน caftaric acid และ cichoric acid</u>

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน caftaric acid ให้มีความเข้มข้น 9.66, 19.32, 48.30, 96.60, 193.20, 289.80 และ 386.40 µg/ml. และสารละลายของสารมาตรฐาน cichoric acid ให้มีความเข้มข้น 9.42, 18.84, 47.10, 94.20, 188.40, 282.60, 376.80, 471.00 และ 659.40 µg/ml.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ตามสภาวะในข้อ 3.1 นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของ caftaric acid และ cichoric acid

<u>การวิเคราะห์หาสารประกอบสำคัญ และการหาปริมาณ caftaric acid และ cichoric acid ในสารสกัด</u>

ละลายสารสกัดจำนวน 10 mg. ด้วยเมทานอล 1 ml. แล้วนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ caftaric acid และ cichoric acid โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ caftaric acid และ cichoric acid.

3.2.4 การศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ

นำสารสกัดที่เตรียมได้เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่าง ๆ คือตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C, อุณหภูมิห้องและ ตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 เดือน โดยจะเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 และ 28 เพื่อนำไปศึกษา

ลักษณะภายนอก โดยการสังเกตจากสีของสารสกัด

ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน ทดสอบโดยวิธี ABTS

ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวม ทดสอบโดยวิธี Folin-Ciocalteu

3.2.5 การพัฒนาตำรับครีม และเจลจากสารสกัดสมุนไพร

<u>ก) การเตรียมยาพื้น</u>

เตรียมยาพื้นทั้งสิ้น 30 ตำรับแบ่งเป็นยาพื้นครีม 15 ตำรับ และยาพื้นเจล 15 ตำรับ ดังแสดงในตารางที่ 3-2 และ 3-3 แล้วนำยาพื้นที่เตรียมได้ทั้งหมดมาศึกษาสมบัติ ดังต่อไปนี้

ลักษณะทางกายภาพ โดยยาพื้นที่เป็นครีมสังเกตลักษณะ สี กลิ่น ความเนียน ความหนืด ความมัน การแยกชั้น ส่วนยาพื้นเจลจะสังเกต สี ความขุ่น ฟองอากาศ ความหนืด เนื้อเจล ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยวัดจากเครื่อง pH meter

พฤติกรรมการไหล และความหนืด ของแต่ละตำรับด้วยเครื่องBrookfield viscometer ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยเลือกใช้หัวปั่น และความเร็วในการคนให้เหมาะสมกับความหนืดของยาพื้นแต่ละตำรับ

<u>ข) การทดสอบความคงสภาพของยาพื้น</u>

นำยาพื้นทุกตำรับไปทดสอบความคงสภาพในสภาวะแตกต่างกัน คือ ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C, อุณหภูมิห้องและ ตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 เดือน รวมถึงทดสอบในสภาวะร้อน-เย็นสลับกัน (Heating & Cooling) จำนวน 6 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำยาพื้นทั้งหมดมาศึกษาสมบัติดังข้อ 3.2.5(ก) เปรียบเทียบกับลักษณะของยาพื้นก่อนการศึกษาความคงสภาพ

ค) การเตรียมตำรับยาครีม และเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซีย

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดในตำรับยาครีม และเจล

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ควรมีในตำรับ เพื่อให้ตำรับที่เตรียมได้มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันเทียบเท่ากับตำรับที่ประกอบด้วย alpha tocopherol ในความเข้มข้น 5%

การเตรียมตำรับยาครีมและเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซีย

นำตำรับยาพื้นครีม และเจลที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี น่าใช้ มีความคงสภาพดีมาผสมกับเข้ากับสารสกัดเอ็คไคนาเซียในความเข้มข้นที่คำนวณได้จากนั้นศึกษาสมบัติของตำรับที่เตรียมได้ในด้านลักษณะภายนอก pH และ พฤติกรรมการไหล

ง) การศึกษาความคงสภาพทางกายภาพของตำรับยาครีม และเจลจากสารสกัดเอ็คไคนาเซีย

เพื่อศึกษาความคงสภาพทางกายภาพของตำรับหลังจากผสมสารสกัดเอ็คไคนาเซียได้มีการนำตำรับยาครีมและเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซียที่เตรียมได้ทั้งหมดไปทดสอบความคงสภาพในอุณหภูมิที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับการทดสอบความคงสภาพของยาพื้น แล้วประเมินความคงสภาพทางกายภาพของตำรับยาครีมและเจลเมื่อครบกำหนดเวลา 1 เดือน

จ) การศึกษาความคงสภาพทางเคมี และความคงสภาพของฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของตำรับยาครีม และเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซีย

เพื่อศึกษาความคงสภาพทางเคมี และฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดหลังจากผสมเข้าไปในตำรับ จึงได้คัดเลือกตำรับยาครีม และเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซียที่มีความคงสภาพทางกายภาพมาอย่างละ 1 ตำรับ ไปเก็บที่อุณหภูมิแตกต่างกันเช่นเดียวกับการศึกษาการคงสภาพของยาพื้น ประเมินฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมของแต่ละตำรับ เป็นระยะเวลา 4 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3-2 สูตรตำรับ และปริมาณที่ใช้ในการเตรียมยาพื้นครีมจำนวน 100 กรัม

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในสูตรตำรับ (ในหน่วยกรัม)														
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5A	5B	5C
White bees wax	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mineral oil	35	35	35	19	10	12	14	15	15	32	30	35	-	-	-
Cetyl alcohol	5	5	5	4	5	6	-	-	-	6	6	5.5	4	4	5
Stearyl alcohol	9	9	9	-	-	-	5	8	6	6.5	6	6	4.5	5	5
Span 80	1.5	2.11	3.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	3.5	4.89	6.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conc. paraben	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Stearic acid	-	-	-	3	3	2	6	7	7	-	-	-	6.7	6.5	6.5
Lanolin	-	-	-	1.5	2	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerine	-	-	-	11	11	10	-	-	-	-	-	-	20	20	20
Triethanolamine	-	-	-	2	2	2	4	5	5.5	-	-	-	-	-	-
Isopropyl myristate	-	-	-	-	-	-	10	12	12	-	-	-	-	-	-
SLS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Water	44.5	42.5	39.5	59	66.5	66	60.5	53.5	55.5	54	56.5	52	63.3	63	62

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3-3 สูตรตำรับ และปริมาณที่ใช้ในการเตรียมยาพื้นเจลจำนวน 100 กรัม

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในสูตรตำรับ (ในหน่วยกรัม)														
	6A	6B	6C	7A	7B	7C	8A	8B	8C	9A	9B	9C	10A	10B	10C
MC เข้มข้น 3%	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-
MC เข้มข้น 3.5%	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-
MC เข้มข้น 4%	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-
HPMC เข้มข้น 3%	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-
HPMC เข้มข้น 3.5%	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-
HPMC เข้มข้น 4%	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	65
Carbopol 940 เข้มข้น 1.5%	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbopol 940 เข้มข้น 2%	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-	-
Carbopol 940 เข้มข้น 2.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	-	-	-
Propylene glycol	65	65	65	65	65	65	65	65	65	-	-	-	-	-	-
Glycerine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	65	65	65	65	65
Conc.paraben	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Water	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27

โดย MC = methylcellulose และ HPMC = Hydroxypropylmethylcellulose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.6 การประเมินการระคายเคือง ประสิทธิภาพ และความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์

ก) ยื่นเสนอโครงการต่อคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพ และป้องกันภยันตรายในการวิจัยกับมนุษย์ เพื่อขอรับการพิจารณาทดสอบในอาสาสมัคร

จัดเตรียมเอกสาร แบบฟอร์มที่ใช้ในการวิจัย และใบยินยอมของอาสาสมัครเพื่อยื่นเสนอโครงการต่อคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพ และป้องกันภยันตรายในการวิจัยกับมนุษย์ในการขอรับการพิจารณาอนุมัติให้มีการดำเนินการวิจัยในคนซึ่งจะนำมาเป็นส่วนหนึ่งในการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ (ดังรายละเอียดที่แสดงในภาคผนวก)

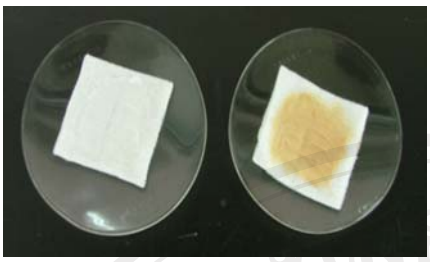
ข) การศึกษาการระคายเคืองต่อผิวหนังและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

นำตำรับยาที่ผ่านการคัดเลือก 2 ตำรับมาทดสอบในคนโดยการคัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพแข็งแรงดี อายุตั้งแต่ 25 – 40 ปี ไม่เป็นโรคผิวหนัง และไม่มีประวัติการเกิดการแพ้ใด ๆ มาก่อน มีสีผิวบริเวณที่จะทดสอบสม่ำเสมอ มาทดสอบดังต่อไปนี้

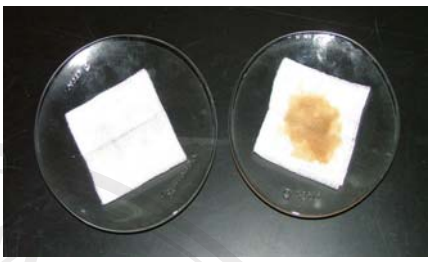
การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนัง

ทดสอบโดยใช้วิธี patch test (16, 24, 44, 53) ดังแสดงในรูปที่ 3-1 โดยใช้แผ่นผ้าก๊อซที่มีขนาดกว้าง และยาวขนาด 2.5 เซนติเมตร ชุบตำรับยาที่จะทดสอบ แล้วปิดลงบนบริเวณเล็ก ๆ ใต้ท้องแขนด้านบนของอาสาสมัครห่างจากข้อพับ 1 นิ้ว หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพลาสติกบาง ๆ ปิดทับ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผ้าก๊อซออก เช็ดด้วยน้ำอุ่นทิ้งให้แห้ง สังเกตผลที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วประเมินผลการระคายเคืองจากการอ่านผลการเกิดอาการบวม หรือแดงตามค่าระดับคะแนนดังแสดงในตารางที่ 3-4

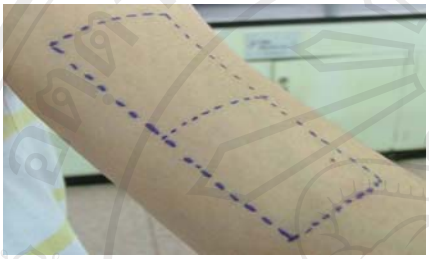
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



A



B



C

D

รูปที่ 3-1 การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของตำรับครีม และเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซีย

A = ลักษณะแผ่นทดสอบตำรับยาพื้นครีม และตำรับครีมสารสกัด

B = ลักษณะแผ่นทดสอบตำรับยาพื้นเจล และตำรับเจลสารสกัด

C = ตำแหน่งบริเวณใต้ท้องแขนก่อนการทดสอบ

D = ขณะทำการทดสอบการระคายเคือง

ตารางที่ 3-4 การให้คะแนนการสังเกตอาการระคายเคือง

คะแนน	อาการ
0	ไม่เกิดอาการบวมแดง
1	เกิดอาการบวมแดงน้อยมาก
2	เกิดอาการบวมแดงชัดเจน
3	เกิดอาการบวมแดงปานกลางถึงมาก
4	เกิดอาการบวมแดงรุนแรง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนัง

ใช้เครื่อง corneometer ประเมินความชุ่มชื้นของผิวหนัง และเครื่อง skin visiometer เพื่อประเมินริ้วรอย และความหยาบละเอียดของผิวหนังอาสาสมัครก่อนการใช้ผลิตภัณฑ์ จากนั้นให้อาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมงานวิจัยใช้ผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบ ประกอบด้วย ตำรับยาพื้นครีมและเจลอย่างละ 1 ตำรับ เพื่อเป็นตัวควบคุม และตำรับยาพื้นครีมและเจลที่มีสารสกัดสมุนไพรอย่างละ 1 ตำรับ โดยให้อาสาสมัครทาผลิตภัณฑ์ในบริเวณเหนือและใต้ข้อพับแขน วันละ 1 ครั้งก่อนนอน และอาสาสมัครแต่ละคนจะถูกกำหนดให้ทาผลิตภัณฑ์แต่ละตำแหน่งที่แตกต่างกันไป ซึ่งจะกำหนดให้โดยการสุ่ม หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 1 เดือน จะ ประเมินผลสภาพผิวหนังของอาสมัครอีกครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบผลระหว่างสภาพผิวหนังบริเวณที่ทายาพื้นที่มี และไม่มีตัวยา ประเมินความแตกต่างโดยใช้สถิติ t-test และ one-way ANOVA

การประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์

ให้อาสาสมัครกรอกแบบสอบถามความพึงพอใจ (ดังที่แสดงในภาคผนวก) หลังการใช้ผลิตภัณฑ์ครั้งแรก และเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ครบเป็นเวลา 1 เดือน ประเมินผลข้อมูลโดยใช้สถิติ Wilcoxon Signed Ranks Test

3.2.7 รวบรวมข้อมูล/วิเคราะห์/เขียนรายงาน

รวมรวมข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการวิจัย วิเคราะห์ และสรุปผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved