

บทที่ 3

การทดลอง

สารเคมี

1. 1% คลินดามัยซิน (Dalacin T[®] solution, Upjohn company, USA)
2. คาร์บอซีไวนิลโพลีเมอร์ 941 (carbopol 941[®], บริษัทหน้าเขียน จำกัด กรุงเทพฯ)
3. คาร์บอซีไวนิลโพลีเมอร์ อัลเทรซ 21 (carbopol Ultrez 21[®], บริษัทหน้าเขียน จำกัด กรุงเทพฯ)
4. โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite; Na₂S₂O₅, Sigma chemical Co., USA.)
5. ไตรเอทานอลามีน (triethanolamine, บริษัทสงหวด จำกัด กรุงเทพฯ)
6. น้ำกลั่น (distilled water, คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
7. 5% เบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ (panoxyl 5[®] acnegel, Stiefel Laboratories (Pte) Ltd., Singapore)
8. โพรพิลพาราเบน (propyl paraben, Sigma chemical Co., USA.)
9. โพรพิลีนกลัยคอล (propylene glycol, บริษัท วิทยาศาสตร์ จำกัด กรุงเทพฯ)
10. เมทานอล (methanol, HPLC grade, Merck, Germany)
11. เมทิลพาราเบน (methyl paraben, Sigma chemical Co., USA.)
12. สารมาตรฐานแมงโกสติน (Mangostin 97%, Indofine Chemical Company, Inc., NJ)
13. เอทานอล ชนิด 96% (ethanol, บริษัท สงหวด จำกัด, กรุงเทพฯ)
14. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA, Fluka, Switzerland)
15. ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropylmethylcellulose; HPMC, บริษัทราม่า โปรดักชั่น จำกัด กรุงเทพฯ)
16. Disc ขามาตรฐานแอมพิซิลลิน (Ampicillin) 10 ไมโครกรัม (Inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น 27-35 มม.)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Propionibacterium acnes* แยกได้จากอาสาสมัคร

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller Hinton Agar (MHA, Merk Ltd, Germany)
2. Mueller Hinton Broth (MHB, Merk Ltd, Germany)
3. Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid Ltd, England)
4. Tryptic Soy Broth (TSA, Oxoid Ltd, England)

สัตว์ทดลอง

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

อาสาสมัคร

ชายและหญิงช่วงอายุ 20-30 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่เป็นโรคผิวหนัง สิวบริเวณที่ทดสอบ สม่ำเสมอ

พืชสมุนไพร

1. เปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) วงศ์ Guttiferae จาก อ.เมือง จ.เชียงใหม่
2. ใบโรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis* Linn.) วงศ์ Lamiaceae จากมูลนิธิโครงการหลวง อ.เมือง จ.เชียงใหม่
3. ใบแคร์รี เสจ (*Salvia sclarea* Linn.) วงศ์ Lamiaceae จากมูลนิธิโครงการหลวง อ.เมือง จ.เชียงใหม่

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบควบคุมความร้อน (Hot air oven , THELCO[®], GCA Co. Ltd., USA.)
2. ตู้อบควบคุมความร้อนและความชื้นสัมพัทธ์
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, HICLAVE[®] HVE-50, Hirayama Manufacturing Co. Ltd., Japan)

4. ตู้เพาะเชื้อ (Incubator, Napco[®] Model 332, National Appliance Co. Ltd., USA.)
5. ตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar air flow hood, Nuaire[®], USA.)
6. ตู้เย็น (Mitsubishi[®] MR-F51E, Mitsubishi Co. Ltd., Japan)
7. กระป๋องไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar, บริษัทเอนวายเมด จำกัด กรุงเทพฯ)
8. ซองสร้างสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic generator, Gaspak[®], Mitsubishi Anaeropak[®], บริษัทเอนวายเมด จำกัด กรุงเทพฯ)
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter, Horiba[®] Model EX-20, Korea)
10. เครื่องวัดความหนืด (Viscometer, Brookfield[®] Model HA DV-III, Brookfield Co. Ltd.)
11. เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC, Water Inc., USA.)
12. C-18 column (Beckman Inc., USA.)
13. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius[®] Model BP610, AG GOTTINGEN Co. Ltd., Germany)
14. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Sartorius[®] Model BP110, AG GOTTINGEN Co. Ltd., Germany)
15. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
16. วงแหวน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มม.)
17. ไม้บรรทัด
18. ปิเปตดูดวัดถ่ายของเหลว (Autopipette, Gilson Co. Ltd., Germany)
19. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus[®], Olympus Co., Ltd., Japan)
20. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 10 และ 20 มล.
21. หลอดแก้วปริมาตรหยดละ 0.02 มล. (Calibrated pipet, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
22. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
23. เครื่องปั่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer)
24. แผ่นแปะ Hill Top[®] 25 มม. Chamber (Hill Top Companies, Cincinnati, OH, USA.)
25. กรงกระต่าย
26. ชุดลีดกระต่าย
27. เครื่องโกลนขนไฟฟ้า

แผนการดำเนินงาน



วิธีการทดลอง

1. การสกัดสารจากเปลือกผลมังคุด, ไบโอสแมรี และไบแคลรี เสง

ขั้นตอนในการสกัดสารจากเปลือกผลมังคุดมีดังนี้

ล้างเปลือกผลมังคุดให้สะอาด



หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C 24 ชั่วโมง



บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด



ชั่งผงเปลือกมังคุด ใส่ในถุงผ้าขาวบางวางในภาชนะที่มีขนาดเหมาะสม
(อัตราส่วนเปลือกผลมังคุดบดแห้ง 5 กรัม ต่อตัวทำละลายเอทานอล 30 มล.)



แบ่งเอทานอลครึ่งส่วนเดิมให้ท่วม



หมักทิ้งไว้ 2 วัน โดยคนผงมังคุดในถุงผ้าวันละ 2 ครั้ง



กรองเอาสารสกัดครั้งที่ 1 ออก



เติมเอทานอล อีกครึ่งส่วนที่เหลือ



หมักต่ออีก 5 วัน โดยคนผงมังคุดในถุงผ้าวันละ 2 ครั้ง

กรองเอาสารสกัดครั้งที่ 2 ออกรวมกับครั้งที่ 1



ระเหยตัวทำละลาย โดยใช้เครื่องระเหยแห้งโรตารีสุญญากาศ
อุณหภูมิ 50°C จนมีน้ำหนักรวบรวมประมาณ 1 ใน 5 ของน้ำหนักเริ่มต้น



เก็บสารสกัดในภาชนะกันแสงและปิดสนิท ที่อุณหภูมิ 2-8 °C

สมุนไพรโรสแมรี่ และแคร์รี เสง ได้รับจากมูลนิธิโครงการหลวง อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ซึ่งมีขั้นตอนในการสกัดสารจากใบโรสแมรี่ และใบแคร์รี เสง ด้วยวิธีการหมัก (maceration) ดังนี้

- 1) ล้างสมุนไพร นำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนแห้ง
- 2) ลดขนาดพืชด้วยเครื่องบดสมุนไพร และบดที่ก้นน้ำหนักก่อนสกัด
- 3) แช่สมุนไพรด้วย 95% Ethanol คนเป็นครั้งคราว แช่เป็นเวลา 1 วัน
- 4) ทำซ้ำ 3 ครั้ง กรองเก็บสารสกัดแต่ละครั้งรวมกัน
- 5) นำไประเหยแอลกอฮอล์ออก จนไม่มีแอลกอฮอล์ออกมาอีก
- 6) บดที่ก้นน้ำหนักของสารสกัดเข้มข้นที่ได้และเก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 2-8 °C

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเกิดสิวของสารสกัดสมุนไพร

2.1 การตรวจยืนยันเชื้อที่ใช้ทดสอบ

* เชื้อ *P. acnes* จำแนกด้วย การดูลักษณะรูปร่างของเชื้อด้วยการย้อมการติดสีแกรม, Catalase test, Indole test และ Nitrate test

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

2.2 การหา Inhibition zone โดยวิธี Well diffusion method

2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามน้ำหนักที่กำหนด (34 กรัม สำหรับ Mueller Hinton Agar (MHA) และ 40 กรัม สำหรับ Tryptic Soy Agar (TSA)) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ให้ความร้อนพร้อมกับคนไปด้วยจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด คูลแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลอง 6 มล. และ 14 มล. ปิดฝาหลวมๆ นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ 6 มล. ลงในจานเพาะเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทิ้งให้แข็ง นำมาผึ่งใน sterile hood ให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ทดสอบทันทีหรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

2.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อ *S. aureus* (ATCC 25923) เลี้ยงใน MHB และ เชื้อ *P. acnes* เลี้ยงใน TSB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C โดย *S. aureus* เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ขณะที่ *P. acnes* เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 10^8 ตัว/มล.

2.2.3 การเตรียมสารละลายพิษสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ

ซังสารสกัดมังคุด, โรสแมรี และแคลรี เสง แล้วเติมตัวทำละลาย 96% เอทานอล ปรับความเข้มข้นสุดท้ายให้เป็น 10 มก./มล.

2.2.4 ขั้นตอนการทดสอบ หา Inhibition zone

2.2.4.1 วางวงแหวน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มม.) บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2.1 ให้ห่างกันพอสมควร ตามสัญลักษณ์ที่เขียนไว้บนจานเพาะเชื้อในตำแหน่งที่ต้องการทดสอบ

2.2.4.2 นำอาหาร MHA ปริมาตร 14 มล. ที่เตรียมจากข้อ 2.2.1 มาต้มให้หลอมเหลว จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงใกล้ 60 °C จึงเก็บในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ ประมาณ 50 °C

2.2.4.3 ดูดเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2.2 จำนวน 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่หลอมไว้และมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C ผลสมให้เชื้อกระจายตัวในอาหาร เทลงในจานเพาะเชื้อที่วางวงแหวนไว้ รอให้อาหารแข็งตัว จึงนำวงแหวนออก

2.2.4.4 ดูดสารทดสอบที่เตรียมจากข้อ 2.2.3 และตัวทำละลาย ปริมาตร 0.1 มล. ลงในแต่ละหลุม

2.2.4.5 วาง disc ยาแอมพิซิลลิน (10 ไมโครกรัม) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเชื้อ *S. aureus* แล้ว เพื่อใช้เป็น positive control

2.2.4.6 นำจานอาหารที่ผสมเชื้อ *S. aureus* ไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนอาหารที่ผสมเชื้อ *P. acnes* ให้วางเรียงซ้อนกันใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak[®] ปิดฝาทันที นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.2.4.7 วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นโดยทำการวัดใน 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุมกัน 60 องศา หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผลการทดลองที่ได้

2.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดโดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method)

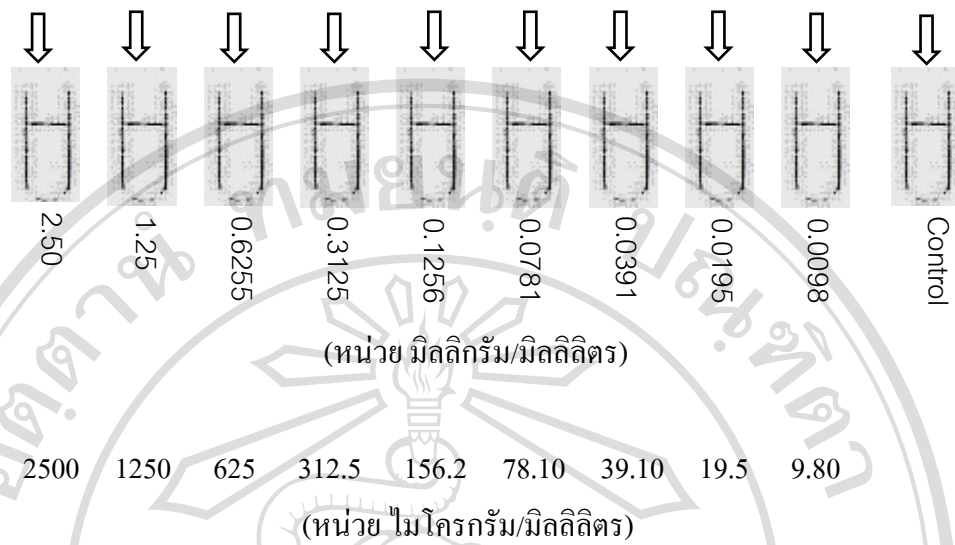
2.3.1 เตรียมเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

2.3.2 เตรียม MHB ใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 มล. ตั้งแต่หลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 10 หลอดละ 1 มล.

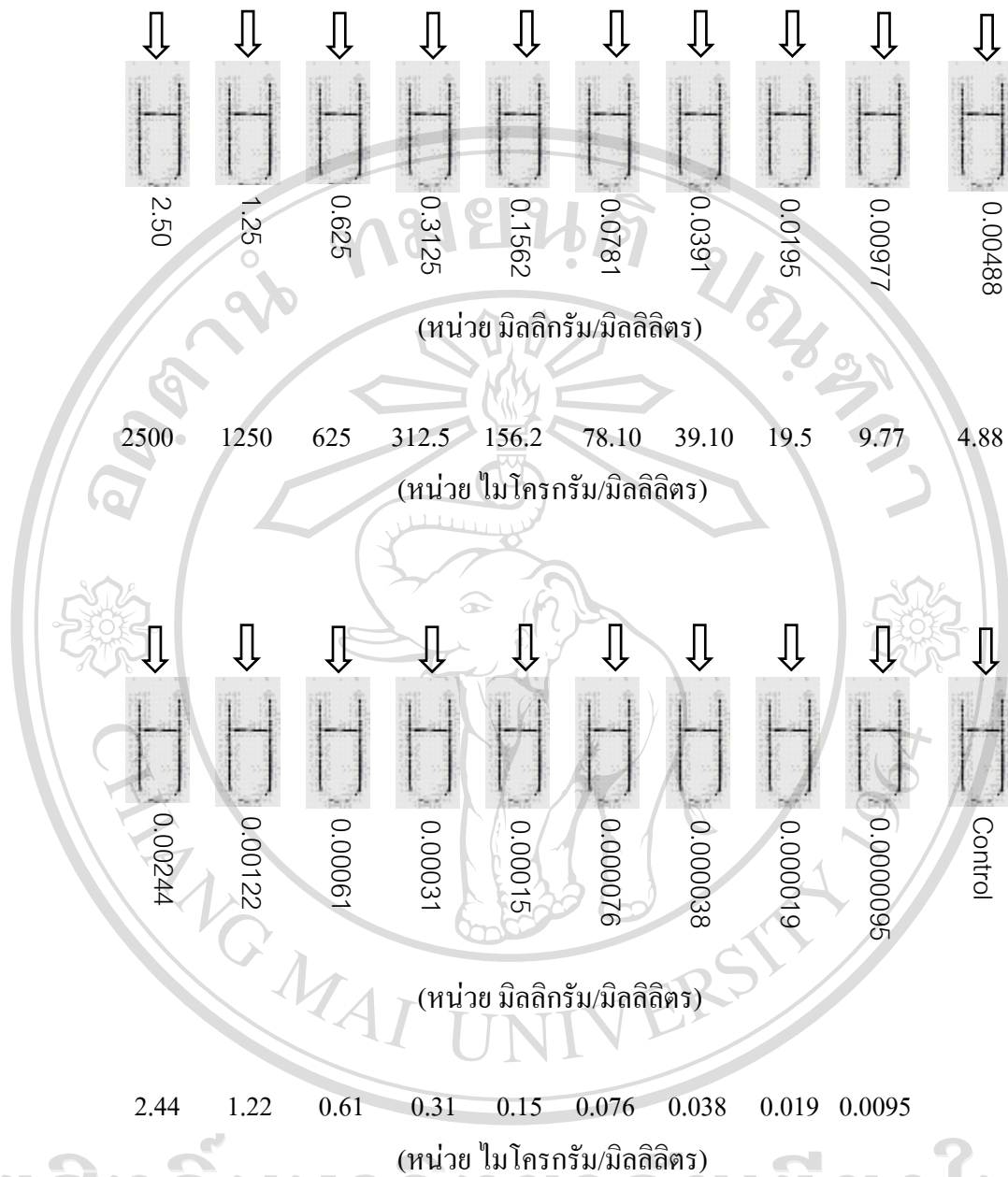
2.3.3 เติมสารสกัดที่เตรียมจากข้อ 2.2.3 ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 1 มล. และทำการเจือจางส่วนผสมในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 9 แบบ serial two-fold dilution โดยดูดสารละลายในหลอดที่ 1 จำนวน 1 มล. ใส่ในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มล. ใส่ในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากัน ทำดังนี้ไปเรื่อยๆ จนถึงหลอดที่ 9 (ยกเว้นสารสกัดมังคุดทำไปเรื่อยๆ จนถึงหลอดที่ 19)

2.3.4 เติมเชื้อ *S. aureus* ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.1 มาเจือจางด้วย MHB 100 เท่า จะได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 ตัว/มล. ลงในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 10 จำนวน หลอดละ 1 มล. ดังนั้นในปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลอดจะเป็น 2 มล. ผสมให้เข้ากัน (ความเข้มข้นของสารสกัดโรสแมรี่ และแคสรี เสด ที่มีอยู่ในหลอดทดลองที่ 1 ถึงหลอดที่ 9 จะเป็น 1:4, 1:8, 1:16...จนถึง 1:1024 ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.1 หลอดที่ 10 เป็นหลอดควบคุม คือ มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อ สำหรับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต้องเตรียมถึง 19 หลอด และหลอดที่ 20 เป็นหลอดควบคุม ดังรูปที่ 3.2) แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะเลี้ยง สำหรับเชื้อ *P. acnes* ทดสอบในทำนองเดียวกันแต่ใช้อาหารเหลวเป็น TSB และบ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3.5 อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (หลอดที่ไม่ขุ่น) ซึ่งถือเป็น MIC



รูปที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดไวรัสเมอร์และแคลรี เสง หลังเติมสารละลายเชื้อ



รูปที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด หลังเติมสารละลายเชื้อ
จากหลอดทดลองที่ 1-19 และหลอดควบคุม

2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัด

2.4.1 ใช้ inoculating loop ขนาด 10 ไมโครลิตร และสารละลายในหลอดที่ไม่ขึ้นทุกหลอดมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วนำไปบ่มเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.3.4

2.4.2 อ่านผล โดยดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเพาะเชื้อ ค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

2.5 การศึกษาเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ โดยวิธี Time killing assay [52]

2.5.1 เตรียมสารละลายเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

2.5.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

จากการหาค่า MIC ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* เท่ากัน คือ 4.88 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดแคลรี เสง มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* เท่ากัน คือ 78.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดโรสแมรีมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* เท่ากัน คือ 156.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงเตรียมสารละลายสารสกัดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นดังตารางที่ 3.1 ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดที่เตรียมเริ่มต้นเพื่อทำการศึกษาเวลาในการฆ่าเชื้อ

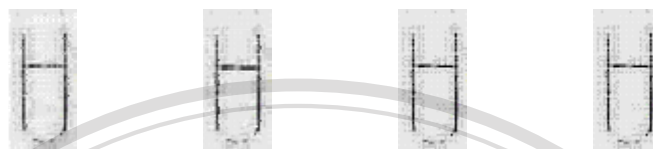
สารทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่เตรียม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	จำนวนเท่าของค่า MIC
สารสกัดมังคุด (MG)	1,953.12	400 MIC
สารสกัดแคลรี เสง (CS)	976.50	-800MIC
	1,953.12	-400MIC
	7,812.48	100MIC
	31,249.92	400MIC
	62,499.84	800MIC
สารสกัดโรสแมรี (RR)	1,953.12	-800MIC
	3,906.25	-400MIC
	15,625.00	100MIC
	62,499.84	400MIC
	124,999.68	800MIC

2.5.3. การทดสอบหาเวลาในการฆ่าเชื้อของสารสกัด

2.5.3.1 นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 2.5.2 เติมลงใน MHB (สำหรับเชื้อ *S. aureus*) และ TSB (สำหรับเชื้อ *P. acnes*) ดังตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดสุดท้ายก่อนเติมเชื้อแบคทีเรีย

หลอด ที่	สัญลักษณ์	MHB หรือ TSB (มิลลิลิตร)	สารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	-	9.9	หลอดควบคุม (control)	-
2	MG	9.8	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล	19.53
3	MC1	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดแคลรีเสจ (-800MIC) 0.1 มล	19.53 : 9.77 หรือ [4MIC : (-8)MIC]
4	MC2	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดแคลรีเสจ (-400MIC) 0.1 มล	19.53 : 19.53 หรือ [4MIC : (-4)MIC]
5	MC3	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดแคลรีเสจ (100MIC) 0.1 มล	19.53 : 78.13 หรือ [4MIC : 1MIC]
6	MC4	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดแคลรีเสจ (400MIC) 0.1 มล	19.53 : 312.50 หรือ [4MIC : 4MIC]
7	MC5	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดแคลรีเสจ (800MIC) 0.1 มล	19.53 : 625 หรือ [4MIC : 8MIC]
8	MR1	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดโรสแมรี่ (-800MIC) 0.1 มล	19.53 : 19.53 หรือ [4MIC : (-8)MIC]
9	MR2	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดโรสแมรี่ (-400MIC) 0.1 มล	19.53 : 39.06 หรือ [4MIC : (-4)MIC]
10	MR3	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดโรสแมรี่ (100MIC) 0.1 มล	19.53 : 156.25 หรือ [4MIC : 1MIC]
11	MR4	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดโรสแมรี่ (400MIC) 0.1 มล	19.53 : 625.00 หรือ [4MIC : 4MIC]
12	MR5	9.7	สารสกัดมังคุด (400 MIC) 0.1 มล + สารสกัดโรสแมรี่ (800MIC) 0.1 มล	19.53 : 1,250.00 หรือ [4MIC : 8MIC]



สารสกัด A สารสกัด B หรือ C สารสกัดผสม หลอดควบคุมเชื้อ
A+B หรือ A+C

รูปที่ 3.3 แสดงหลอดทดลองของสารทดสอบเพื่อศึกษาเวลาในการฆ่าเชื้อ

2.5.3.2 เติมเชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 0.1 มิลลิลิตร

2.5.3.3 ผสมให้เข้ากัน คูดสารละลายจำนวน 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางในน้ำเกลือ
ครั้งละ 10 เท่า จากนั้นใช้ calibrated pipette คูดสารละลายที่เจือจางแล้ว หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
จำนวน 0.02 มล. โดยเริ่มที่ความเข้มข้นต่ำสุดก่อน (ความเข้มข้นละ 3 หยด) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C (สำหรับเชื้อ *P. acnes* บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน)

2.5.3.4 นำทุกหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (สำหรับ
เชื้อ *S. aureus*) (สำหรับเชื้อ *P. acnes* บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 10 ชั่วโมง) เมื่อครบเวลา
นำหลอดทดลองออกจากตู้บ่ม (สำหรับเชื้อ *S. aureus* ออกจากตู้บ่มเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง)
(สำหรับเชื้อ *P. acnes* ออกจากตู้บ่มเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ

2.5.3.3 ทำการนับจำนวนเชื้อที่เหลืออยู่ นำไปเขียนในกราฟกระดาษ semilog โดยให้จำนวนเชื้อ
รอดชีวิต (CFU/ml) อยู่บนแกน Y และระยะเวลาที่ผ่านไปอยู่บนแกน X (ใน logarithm scale)

3. การเตรียมผลิตภัณฑ์เจล และยาน้ำใสจากสารสกัดพืชสมุนไพร

3.1 การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เจล และยาน้ำใส

3.1.1 ผลิตภัณฑ์เจล

เตรียมยาพื้นเจลและตำรับเจลสารสกัดสมุนไพร โดยปรับอัตราส่วนของ
องค์ประกอบในตำรับ นำมาศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี ค่าความเป็นกรดต่าง รวมไปถึง
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อคัดเลือกตำรับที่ดีที่สุด

องค์ประกอบในยาพื้นเจลที่นำมาพัฒนา

1. สารก่อเจล ดังนี้ Carbopol Ultrez 21, Carbopol 941, HPMC
2. EDTA
3. Sodium metabisulfite

4. Conc. Paraben
5. Triethanolamine
6. Propylene glycol
7. 96% ethanol
8. Purified water

3.1.2 ผลิตภัณฑ์ยาน้ำไอ

เตรียมตัวทำละลายยาน้ำไอและตำรับยาน้ำไอสารสกัดสมุนไพร โดยปรับอัตราส่วนขององค์ประกอบในตำรับ นำมาศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดค่าการตกตะกอน ร่วมไปกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อคัดเลือกตำรับที่ดีที่สุด

องค์ประกอบในตัวทำละลายยาน้ำไอที่นำมาพัฒนา

1. Propylene glycol
2. 96% ethanol
3. Purified water

3.2 ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแต่ละตำรับ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดค่าการตกตะกอน การแยกชั้น และทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อคัดเลือกตำรับที่ดีที่สุดมาศึกษาความคงตัวต่อไป

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์รูปแบบคล้ายกันที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ขั้นตอนการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ทำเช่นเดียวกับ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ ยกเว้นสารทดสอบจะใช้ Clindamycin solution และ Benzyl peroxide gel แทนสารสกัดสมุนไพร

5. การทดสอบความคงสภาพของสารสกัด ผลิตภัณฑ์เจล และยาน้ำไอจากสารสกัดพืชสมุนไพร

5.1 การทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่ง

5.1.1 นำสารสกัด ผลิตภัณฑ์เจลและยาน้ำไอจากสารสกัดสมุนไพรเก็บไว้ในอุณหภูมิ 45 ° ซ่ สลับกับอุณหภูมิ 4-8 ° ซ่ ทุก 2 วัน เป็นเวลา 6 รอบ

5.1.2 ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง คูณ การแยกชั้น การตกตะกอน วัดความหนืดของสารในข้อ 5.1.1 เพื่อวิเคราะห์ความคงสภาพทางกายภาพ

วัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (viscometer, Brookfield®)

Model : HA DV-III Rheometer V3.3 External Control

Spindle : SC4-28

5.1.3 ทดสอบหาค่า MIC ของสารในข้อ 5.1.1 โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) เพื่อหาความคงสภาพทางด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์

5.1.4 วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารในข้อ 5.1.1 โดยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic, HPLC) เพื่อหาปริมาณสารสำคัญแมงโกสติน (mangostin) เปรียบเทียบหลังเตรียมตัวรับเสร็จและเมื่อผ่านการทดสอบความคงสภาพเบื้องต้น

เครื่องโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงที่ใช้ในการวิเคราะห์ ใช้สภาวะดังนี้

Column : Alltech RP-C18 (5 μ m, 250x4.6 mm)

Guard column : Alltech RP-18 μ m 4x4 mm

Mobile phase : เมทานอล (methanol) : น้ำ อัตราส่วน 97.5 : 2.5

Flow rate : 1.5 มล. / นาที

Detector : UV (Ultraviolet) detector ที่ความยาวคลื่น 319 nm

เวลาที่ใช้ : 10 นาที

ปริมาณฉีด : 10 μ l

5.2 การทดสอบความคงสภาพระยะยาว

5.2.1 นำสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ผลิตภัณฑ์เจลมังคุด (บรรจุขวดแก้ว และหลอดพลาสติก) และยาน้ำสมุนไพร เก็บไว้ใน สภาวะที่แตกต่างกันดังนี้

สภาวะที่ 1 ที่อุณหภูมิ 4-8 °C

สภาวะที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 65 mmHg

สภาวะที่ 3 ที่อุณหภูมิ 40 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75 mmHg

แต่ละสภาวะจะตั้งสารทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน

5.2.2 ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง คูณ การแยกชั้น การตกตะกอน วัดความหนืดของสารในข้อ 5.2.1 ทุก 1 เดือนจนครบ 6 เดือน เพื่อวิเคราะห์ความคงสภาพทางกายภาพ

5.2.3 ทดสอบหาค่า MIC ของสารในข้อ 5.2.1 ในเดือนที่ 3 และ 6 ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) เพื่อหาความคงสภาพทางด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์

5.2.4 วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารในข้อ 5.2.1 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic, HPLC)

5.2.4.1 นำสารมาตรฐาน Mangostin มาเจือจาง ด้วยเมทานอลบริสุทธิ์ (HPLC grade) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 6 ความเข้มข้นดังนี้ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 ppm จากนั้นฉีดสารละลายเข้าสู่ระบบ HPLC ผลที่ได้จะอยู่ในรูปพื้นที่ใต้ peak (peak area) ของสารมาตรฐาน Mangostin แต่ละค่าความเข้มข้น แล้วนำ peak area ดังกล่าวไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นกับค่าความเข้มข้นในแต่ละค่า ซึ่งจะได้เป็นกราฟมาตรฐาน

5.2.4.2 นำสารในข้อ 5.2.1 มาเจือจางด้วยเมทานอลบริสุทธิ์ (HPLC grade) ตามค่าเจือจางที่เหมาะสม (อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน) แล้วนำสารละลายตัวอย่างฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ผลที่ได้จะนำ peak area ไปหาค่าความเข้มข้นของ Mangostin ด้วยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน

5.2.5 คำนวณหาอายุของผลิตภัณฑ์ โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง logarithm ของความเข้มข้น ($\log C$) กับเวลา (วัน) ตามปฏิกิริยาการสลายตัวแบบอันดับหนึ่ง หาสมการเส้นตรง นำมาคำนวณหาเวลาที่ใช้ในการสลายตัวของยา 10% (t_{90}) ดังสมการต่อไปนี้

ปฏิกิริยาการสลายตัวแบบอันดับหนึ่ง

$$\log C = \log C_0 - kt/2.303$$

$$\text{Slope} = -k/2.303$$

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

$$t_{90} = 0.104/k$$

หมายเหตุ : C คือ ความเข้มข้นของสารที่เวลา t

C_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นเมื่อผลิตยาขึ้นใหม่ ๆ ($t=0$)

k คือ ค่าคงที่ของอัตราเร็ว (rate constant หรือ velocity constant)

มีหน่วยเป็น ต่อหน่วยเวลา

$t_{1/2}$ ครึ่งอายุ (Half-life) คือ ระยะเวลาที่ยาลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง

สำหรับปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้

แต่ขึ้นกับค่าคงที่ของอัตราเร็ว

t_{90} คือ เวลาที่ใช้ในการสลายตัวของยา 10% เป็นค่าคงที่ที่เราสนใจจะทราบ

เนื่องจากตัวยาส่วนมากมีข้อกำหนดไว้ว่าจะต้องมีตัวยามากกว่า 90% ของที่บ่งไว้

6. การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นในสัตว์ทดลองและอาสาสมัคร [73-76]

6.1 การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นในกระต่าย

6.1.1 นำกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White น้ำหนักระหว่าง 2.0-2.5 กิโลกรัม เพศผู้ อายุ 7-8 เดือน จำนวน 3 ตัวมาโกนขนที่หลังกระต่ายทั้ง 2 ข้างของแนวกระดูกสันหลัง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังโกนเสร็จตรวจสอบความผิดปกติของผิวหนังกระต่าย

6.1.2 นำผลิตภัณฑ์เจล (0.2 กรัม) และยาน้ำใส (0.2 มล.) ป้ายบนแผ่นแปะ Hill Top 25 มม. Chamber แล้วติดแผ่นแปะดังกล่าวลงบนหลังกระต่ายเปรียบเทียบกับผลการระคายเคืองกับแผ่นแปะที่ป้ายด้วยยาพื้นเจล, ตัวทำละลายยาน้ำใส และแผ่นแปะที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ ติดไว้เป็นเวลา 4 ชม.

6.1.3 สังเกตอาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ของหลังกระต่ายที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากนำแผ่นแปะออก บันทึกและให้คะแนนตามหลักเกณฑ์การให้คะแนน ตามข้อ 5.1.4 นำคะแนนเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณหาดัชนีการระคายเคือง ตามข้อ 6.1.5

6.1.4 หลักเกณฑ์การให้คะแนน

6.1.4.1 ลักษณะความแดงของผิวหนัง เป็นไปตามตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 หลักเกณฑ์การให้คะแนนลักษณะความแดงของผิวหนัง

ลักษณะ	คะแนน
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่เห็น	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงจัดถึงผิวหนังตลอกสะเก็ด	4

6.1.4.2 ลักษณะความบวมของผิวหนัง เป็นไปตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 หลักเกณฑ์การให้คะแนนลักษณะความบวมของผิวหนัง

ลักษณะ	คะแนน
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่เห็น	1
บวมเล็กน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัด)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมาประมาณ 1 มม.)	3
บวมมาก (นูนขึ้นมาเกิน 1 มม. และลามออกไป)	4

6.1.5 การคำนวณหาค่าดัชนีการระคายเคืองต่อผิวหนัง

$$\text{ดัชนีการระคายเคืองต่อผิวหนัง} = \frac{\text{คะแนนรวมค่าเฉลี่ยของกระด้ายแต่ละตัว}}{\text{จำนวนกระด้ายที่ใช้ทดสอบ}}$$

หมายเหตุ ดัชนีการระคายเคืองต่อผิวหนัง ไม่เกิน 1	แสดงว่า ไม่ระคายเคือง
เกิน 1 แต่ไม่เกิน 2	แสดงว่า ระคายเคืองเล็กน้อย
เกิน 2 แต่ไม่เกิน 3	แสดงว่า ระคายเคือง
เกิน 3 แต่ไม่เกิน 4	แสดงว่า ระคายเคืองมาก

6.2 การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังเบื้องต้นในอาสาสมัคร

6.2.1 ทำความสะอาดบริเวณต้นแขนด้านนอกด้วยน้ำกลั่นก่อนทำการทดสอบครั้ง

ซ้ำในอาสาสมัครเพศชายและหญิง อายุระหว่าง 25-35 ปี จำนวน 15 คน

6.2.2 ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1.2 ถึง 6.1.5 แต่เปลี่ยนจากการติดแผ่นแปะ

ทดสอบบนหลังกระด้าย มาติดบนต้นแขนของอาสาสมัคร

7. การประเมินความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเปลือกมังคุด

ทำการสำรวจความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเปลือกมังคุดใน 2 รูปแบบ คือ เจล และยาน้ำใส โดยทำแบบสอบถามให้กับอาสาสมัครกลุ่มเดียวกับกลุ่มที่ทดสอบการระคายผิวหน้จำนวน 15 คน โดยหัวข้อที่จะประเมินผลิตภัณฑ์จะเกี่ยวข้องกับ สี กลิ่น ลักษณะ และการกระจายตัวของผลิตภัณฑ์ ดังภาคผนวก ง อาสาสมัครให้คะแนนความพึงพอใจ ดังนี้ ดีมาก = 4 คะแนน, ดี = 3 คะแนน, พอใช้ = 2 คะแนน และ ควรปรับปรุง = 1 คะแนน รวมคะแนนที่ได้ในแต่ละปัจจัย นำมาหาค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากนั้นนำมาประเมินความพึงพอใจ ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ช่วงคะแนนและระดับความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์จากสารสกัดมังคุด

คะแนน	ระดับความพึงพอใจ
1.00-1.75	ควรปรับปรุง
1.76-2.50	พอใช้
2.51-3.25	ดี
3.26-4.00	ดีมาก