

บทนำ

ผิวหนังเป็นบริเวณภายนอกที่สัมผัสกับสิ่งต่าง ๆ มากมาย เซรั่มและครีมและสเปรย์ใหม่ทดแทนเซลล์เก่าได้ตลอดชีวิต โดยประกอบด้วย 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า และชั้นหนังแท้ (Riviere, 2006) ชั้นหนังกำพร้าอยู่ชั้นบนของชั้นหนังแท้ ไม่มีหลอดเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยง ประกอบด้วยเยื่อผิวหนังชนิด stratified squamous keratinized epithelium ซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์ 4 ชนิด คือ keratinocytes, melanocytes, langerhans และ merkel cells ชั้นหนังแท้อยู่ใต้หนังกำพร้า มีหลอดเลือด ท่อน้ำเหลืองและเส้นประสาทมาเลี้ยง แบ่งออกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเรียกว่า papillary layer และชั้นล่างเรียกว่า reticular layer ซึ่งจะประกอบไปด้วยประกอบไปด้วยคอลลาเจน (Collagen) ชนิดที่ 1 และ 3 , อีลาสติน (elastin), fibroblasts , macrophages และ mast cells มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ระบุว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นสาเหตุหลักของริ้วรอยก่อนวัยและปัญหาสุขภาพผิวต่างๆ ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะทำลายผิวโดยการสร้าง reactive oxygen species ซึ่งจะไปทำลาย membrane lipids, cellular protein และ DNA โดยเวลาที่รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิด B (UV-B) สัมผัสผิวหนัง มันจะทำลาย metalloproteinase ต่างๆ โดยที่เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มใหญ่ ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ collagenases elastase และ proteinase อื่นๆ อีกมาก ที่มีความสำคัญต่อการเกิดริ้วรอยตามธรรมชาติ การได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตแบบต่อเนื่องจะทำให้เกิดกลไกการทำลายผิวมากกว่าการซ่อมแซมทำให้ผิวเกิดริ้วรอยก่อนวัย (Barel และคณะ, 2001)

ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหลายชนิดที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อประโยชน์ในแง่ของการต้านการเกิดริ้วรอยก่อนวัย สารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ทั่วไปเช่น beta-carotene, lutein, lycopene, Selenium, Vitamin A, Vitamin C และ Vitamin E (Burton และคณะ, 1980; Sadaba และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีสารอีกหลายชนิดที่มีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งโดยมากจะเป็นสารพวก phenolic compound ที่พบเป็นสารประกอบตามธรรมชาติในพืช ตัวอย่างเช่น catechin, rutin, quercetin และ gallic acid เป็นต้น

กรดแกลลิก (Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)) เป็นสาร กลุ่ม polyphenyl ซึ่งในธรรมชาติ ได้จาก gallnut และชาเขียว (green tea) ซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่ามีฤทธิ์ที่หลากหลายทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial) ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activities) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) และมักใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารอื่นๆ ด้วย (Sang-Hyun และคณะ, 2006) ฤทธิ์ต้านการอักเสบของกรดแกลลิกเป็นแบบขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับ (dose-dependent) ในการยับยั้งสารเหนี่ยวนำการปลดปล่อยฮิสตามีนและ IgE-mediated histamine release ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับกรดแกลลิกให้ผลที่ไม่ต่างกัน นอกจากนี้มีผลการศึกษาลำดับความสามารถของฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activities) ตามลำดับดังนี้ mallotusinic acid > mallotinic acid = geraniin > epigallocatechin gallate (EGCG) > corilagin > ellagic acid > gallic acid > quercetin > rutin > chlorogenic acid และลำดับความสามารถของฤทธิ์ superoxide radical-scavenging activity ตามลำดับดังนี้ epigallocatechin gallate (EGCG) > corilagin > mallotusinic acid > geraniin > mallotinic acid > gallic acid > ellagic acid > chlorogenic acid > quercetin > rutin (Hiromasa และคณะ, 2008) นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยังมีการศึกษาพบว่ากรดแกลลิกอาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพวก *E. coli* , *S. aureus* , *P. aeruginosa* ได้แบบอ่อนๆ และ ค่อนข้างมีฤทธิ์ในการต้าน *K. pneumoniae* อีกด้วย (Rodrguez และคณะ, 2007)

เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermosensitive gel) คือระบบของสารละลายที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นเจล (sol-gel transition) ได้เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง กล่าวอีกนัยหนึ่งคือสารละลายของพอลิเมอร์จะเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นเจลได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้ อุณหภูมิที่สารเปลี่ยนสถานะ (gelation temperature) จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ คือเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์สูงขึ้น อุณหภูมิที่เปลี่ยนจากสารละลายไปเป็นเจลจะต่ำลง มีพอลิเมอร์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติดังที่กล่าวมาข้างต้น ตัวอย่างเช่น กลุ่มอนุพันธ์เซลลูโลส (cellulose derivatives), Xyloglucan, N-isopropylacrylamide copolymer และ Poloxamer (Eve และ Leroux, 2004)

Poloxamer เป็น non-ionic surface active agents โครงสร้างเป็น triblock co-polymer (ABA-type) ประกอบด้วย polyethylene oxide (PEO)(A) ซึ่งเป็น Hydrophilic part และ polypropylene oxide (PPO)(B) ซึ่งเป็น Hydrophobic part ลักษณะทางกายภาพเป็นผงหยาบ ของแข็งสีขาว มีความมันวาว เมื่อละลายเป็น solution จะไม่มีสี ทำให้นิยมนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม กลไกการเปลี่ยนจาก Sol เป็น Gel ที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการศึกษาพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิด Micelle คือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง critical micellization temperature จะเป็นผลให้ PPO block เกิด dehydration เกิดเป็น Micelle แล้วจับกันแน่นก่อตัวเป็นเจลขึ้น Poloxamer ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน อุณหภูมิที่เปลี่ยนเป็นเจลจะต่างกันไป (Eve และ Leroux, 2004; Scherlund, 2000)

ในการศึกษารั้วนี้ เป็นการศึกษาการเตรียมเจล Poloxamer เพื่อบรรจุกรดแกลลิก ในรูปแบบที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermosensitive gel) โดยศึกษาถึงวิธีการเตรียมเจล Poloxamer เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เจลในรูปแบบที่เหมาะสมที่สุด โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงจาก sol เป็น gel เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิด้วยการวัดความหนืดและสังเกตลักษณะภายนอก จากนั้นบรรจุกรดแกลลิกเข้าในสารละลาย Poloxamer (ชนิด Lutrol® F127 ซึ่งคาดว่าจะช่วยเพิ่มการละลายของกรดแกลลิกได้) ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของกรดแกลลิกที่สามารถบรรจุได้ จากนั้นทดสอบการปลดปล่อยยาจากตำรับเจล แล้ววัดด้วย UV-visible spectrophotometer และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS method และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย กับเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albican* โดยวิธี Cup method ทั้งนี้คาดว่าเจลแกลลิกในรูปแบบที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพอีกรูปแบบหนึ่ง อีกทั้งมีความสะดวกในด้านผลคือการบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ ซึ่งน่าจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต่อไปได้

บททบทวนวรรณกรรม

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย มีเนื้อที่ทั้งหมดเกือบ 2 ตารางเมตร มีความหนาต่างกันตามที่ต่างๆกันของร่างกาย ประกอบด้วย ส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ผิวหนังชั้นนอก (Epidermis) ผิวหนังชั้นกลาง (Dermis) ผิวหนังชั้นล่าง (Hypodermis)

ผิวหนังชั้นนอก (Epidermis) เป็นชั้นของ stratified squamous epithelium ผิวหนังชั้นนี้ไม่มีเส้นเลือด ประกอบด้วยชั้นต่างๆ 5 ชั้น ดังนี้

- 1) Stratum corneum เป็นเซลล์ชั้นนอกสุดของผิวหนัง ประกอบด้วย keratin ซึ่งช่วยให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ช่วยป้องกันเซลล์ที่ยังมีชีวิตที่อยู่ข้างใต้ไม่ให้แห้งจากการสัมผัสกับอากาศ เซลล์ชั้นนี้สามารถหลุดลอกออกไปและมีเซลล์ใหม่มาทดแทน
- 2) Stratum lucidum เป็นชั้นที่โปร่งแสงของเซลล์ที่ตาย

- 3) Stratum granulosum มีความหนาประมาณ 2-4 ชั้น ของเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย แกรนูล และ keratohyaline ซึ่งกระบวนการตายของเซลล์ keratinization เกิดที่ชั้นนี้
- 4) Stratum spinosum เป็นชั้นของเซลล์รูปหนาม ช่วยพยุงยึดชั้นนี้ให้มีความแข็งแรง มีการแบ่งตัวของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์มาก เซลล์ใหม่ๆเกิดขึ้นที่ชั้นนี้ และถูกผลักขึ้นไปอยู่ที่ผิว เพื่อไปแทนเซลล์ชั้นบนที่หลุดออกไป
- 5) Stratum basal ชั้นล่างสุดอยู่ติดกับ ชั้น dermis ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวของ columnar หรือ cuboidal cell มีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นเซลล์ใหม่เพื่อแทนที่เซลล์ชั้นบนที่หลุดออกไป

ผิวหนังชั้นกลาง (dermis) เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของผิวหนัง เป็นชั้นที่มีความแข็งแรง ประกอบด้วยโครงสร้างของ connective tissue ของ collagenous, reticular และ elastic fiber โดย Collagenous fiber เกิดจากโปรตีน คอลลาเจนที่ค่อนข้างหนา ช่วยให้เกิดความแน่นของ ผิวหนัง ส่วน Reticular fiber เป็นส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรง ของผิวหนัง และ Elastic fiber ให้ความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง

เซลล์ของ dermis ส่วนใหญ่เป็น fibroblast, fat cell และ macrophage ซึ่ง macrophage เป็นตัวทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ผิวหนัง เส้นเลือด ท่อน้ำเหลือง ปลายประสาท ขุมขน และ ต่อมต่างๆ ชั้น dermis ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น ซึ่งไม่สามารถแยกกันได้ดีขาด คือ papillary layer ถัดลงมาเป็น reticular layer

Papillary layer ประกอบด้วย connective tissue หลวมๆ ของมัด collagen fiber ชั้นนี้มีลักษณะเป็นปุ่มๆ ที่ผิว ซึ่งจะสวมต่อกับชั้นของ epidermis ได้แนบสนิท ในชั้น papillae ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นเลือดฝอย และเส้นประสาท

Reticular layer ประกอบด้วย ที่แน่น และ coarse collagen fiber และ fiber bundle ไขว้กันไปมาเกิดโครงสร้าง elastic ที่แข็งแรง และลึกลงไป พบหลอดเลือดและท่อน้ำเหลือง เส้นประสาท ปลายประสาทที่เป็นอิสระ fat cell sebaceous gland รากของผมและขน ในชั้นที่ลึกที่สุดของ reticular layer ประกอบด้วยไฟเบอร์ของกล้ามเนื้อเรียบ

ผิวหนังชั้นล่าง (Hypodermis) อยู่ใต้ชั้น dermis อาจเรียก subcutaneous layer ประกอบด้วย fiber tissue หลวมๆ โดยทั่วไป Hypodermis จะหนากว่า dermis และอุดมไปด้วยเส้นเลือด ท่อน้ำเหลือง เส้นประสาท ต่อมเหงื่อ และ hair follicle ขอบเขตของ dermis และ Hypodermis เห็นไม่ชัดเจน

ความแก่ (Aging)

ความแก่ เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เมื่ออายุมากขึ้น ผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีสาเหตุจากแรงโน้มถ่วงของโลก แสงแดด การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ และใบหน้า เช่น การเคี้ยว และการยิ้ม นอกจากนี้ คอลลาเจน และ Elastic fiber ซึ่งอยู่ในชั้น dermis ของผิวหนังยังมีปริมาณลดลงและเสื่อมสภาพ ให้ความยืดหยุ่นและความเต่งตึงของผิวหนังลดลง รวมทั้งความชุ่มชื้นของผิวหนังลดลงและเนื่องจากต่อมต่างๆ ที่อยู่ใต้ผิวหนังทำงานลดลง ความแก่จึงไม่สามารถหลีกเลี่ยง แต่ชะลอทำให้ช้าลงหรือหรือฟื้นฟูสภาพผิวให้ดูดีขึ้นได้ โดยการให้สารอาหารและวิตามินเพื่อเสริมสร้างเซลล์ผิว ตลอดจนการให้สารช่วยการคลายตัวของกล้ามเนื้อเพื่อลดรอยเหี่ยวย่นและให้สารที่ร่างกายสร้างได้ในปริมาณลดลงเข้าไปทดแทน (ปลื้มจิตต์, 2540)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เป็นตัวเสริมให้แก่เร็วขึ้น ได้แก่ มลภาวะ ความเครียด แสงแดด (โดยเฉพาะรังสี UVA และ UVB) และอาหาร ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายเซลล์ของร่างกายรวมถึงเซลล์ผิวหนัง ให้ความแข็งแรงของผนังเซลล์ลดลง เกิดการเสื่อมสลายของคอลลาเจนและกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้ความสามารถในการรักษาความชุ่มชื้น ความยืดหยุ่นลดลง และเกิดการเหี่ยวย่นของผิวตามมา ซึ่งเรียกว่า แก่ก่อนวัย

โครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปในผิวหนังที่แก่ (Structural skin changes in aging) มีหลายรูปแบบ ซึ่งโดยปกติผิวหนังของคนจะไม่เรียบ แต่จะมีริ้วรอยให้เห็น ริ้วรอยเหล่านี้เกิดจากการที่ผิวมีเส้นแนวตั้งและแนวนอนที่ขนาบและตัดกัน เป็นรูป 3 เหลี่ยมหรือสี่เหลี่ยม ริ้วรอยเหล่านี้เรียกว่า Microrelief ในเด็กวัยรุ่นและคนชราที่มีการตัดกันที่มีการเอียงมุมที่แตกต่างกัน ริ้วรอยเหล่านี้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างความยืดหยุ่นของ dermis ส่วนบนริ้วรอยเหล่านี้ที่เกิดเป็นตีนกาเมื่ออายุ 30-35 ปี พบว่าจำนวนริ้วรอยเพิ่มขึ้น เมื่ออายุเพิ่มขึ้น ส่วนความลึกของรอย (ทำให้เกิดตีนกา) จะเริ่มมีความลึกตั้งแต่ 25 micron และเพิ่มขึ้นเป็น 8 เท่า เมื่ออายุ 65 ปี เชื่อกันว่าความลึกของริ้วรอยเหล่านี้เกิดจากการที่โครงสร้างของความยืดหยุ่นของ fiber ในผิวหนังถูกทำลายซึ่งจะเริ่มเกิดเมื่ออายุ 30 ปี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังชั้นต่างๆ เป็นดังนี้

1. ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)

สิ่งที่เกิดขึ้นที่ชัดเจนที่สุด คือ รอยเชื่อมต่อระหว่าง epidermis กับ dermis (epidermal junction) ที่มีลักษณะเป็นคลื่นจะหายไป ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่าง 2 ชั้น ลดน้อยลงทำให้ถลอกหรือเกิดแผลได้ง่าย (blister) และแผลหายช้า keratocytes มีขนาดและรูปร่างต่างไปจากเดิมทำให้ผิวหนังชั้นนี้บางลง เซลล์ไม่เกาะติดกันแน่นเหมือนเดิม จึงหลุดร่อนได้ง่ายคล้ายแผ่นไม้เก่าๆ ที่มุงหลังคา นอกจากนี้เซลล์ยังติดสี (straining qualities) เปลี่ยนไปและการแบ่งตัวผิดปกติเกิดได้ง่าย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของเนื้องอกหรือมะเร็งผิวหนังและพบอีกว่า Melanocytes จำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัด (เซลล์สร้างสีน้อยลง 8-20% ในทุก 10 ปีหลังอายุ 30 ปี) ทำให้ผิวของผู้สูงอายุมีสีไม่สม่ำเสมอ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงแดด เซลล์สร้างสีจะรวมกลุ่มกันเฉพาะที่เกิดเป็นกระแดด (lentigo senilis) นอกจากนี้ langerhan cell ลดจำนวนลง 50% ทำให้มีโอกาสติดเชื้อและเป็นมะเร็งที่ผิวหนังได้ง่าย แต่มีอาการแพ้ (contact dermatitis) ลดลง

2. ชั้นหนังแท้ (Dermis)

ความหนาแน่นของส่วนประกอบของชั้นนี้ลดลง จำนวนของหลอดเลือดและเซลล์ในชั้นนี้ก็ลดลงทำให้ผิวหยาบลงอย่างเห็นได้ชัด โดยปกติผู้หญิงจะมี dermis บางกว่าผู้ชาย ทำให้ได้ข้ออธิบายได้ว่าทำไมผิวผู้หญิงจึงถูกทำลายได้เร็วกว่า นอกจากนี้ปริมาณ collagen ใน dermis จะลดลง จำนวนปีละ 1% collagen fiber มีขนาดและจำนวน cross linkage เพิ่มขึ้นตามอายุทำให้ collagen fiber แข็งขึ้น มี tensile strength เพิ่มขึ้น ทำให้ผิวมีความเปราะบางและฉีกขาดง่ายขึ้น elastic fiber มีการเรียงตัวและส่วนประกอบโครงสร้างและคุณสมบัติไม่เหมือนเดิม ทำให้ไม่สามารถรักษาความยืดหยุ่นไว้ได้ ทำให้เกิดรอยเหี่ยวย่นและหย่อนยาน นอกจากนี้จำนวนหลอดเลือดลดลงทำให้ผิวหนังมีลักษณะเย็นชืดและชืดและมีจำนวนไขมันใต้ชั้นผิวหนังและต่อมเหงื่อลดลงทำให้มีโอกาสเกิด hypothermia หรือ hyperthermia ง่ายขึ้น ground substance ที่สำคัญ คือ กรด hyaluronic และ dermatan sulfate ในชั้นนี้มีปริมาณลดลงร่วมกับการที่มีเลือดมาเลี้ยงน้อยลง ทำให้ dermal clearance ของสารแปลกปลอมลดลง ทำให้ระยะเวลาการแพ้สารจากสัมผัส (contact dermatitis) นานขึ้น มีโอกาสเกิดแผลง่าย การที่ผนังหลอดเลือดบางลงและความสามารถในการพุงหลอดเลือดลดลง รวมทั้งปริมาณ ground substance ลดลงทำให้ระยะทางระหว่างมัดของ collagen ลดลงมีการอัดของมัด collagen มากขึ้น จึงทำให้ผิวมีความยืดหยุ่นลดลง

สมมติฐานของความแก่ (Hypothesis of Aging)

มีสมมติฐานหลายแบบที่พยายามอธิบายกระบวนการพื้นฐานของความแก่ กลไกต่างๆเหล่านี้สามารถนำมารวมกันเพื่ออธิบายกระบวนการแก่ได้

1. สมมติฐานอนุมูลอิสระ (Free radical hypothesis)

เมื่อเซลล์ใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญเชื้อเพลิงในเซลล์ สิ่งที่ได้ออกมาคือ free radical (oxidant) ซึ่ง free radical นี้ จะนำ unpaired electron และเกิดการ oxidize โมเลกุลตลอดทั่วร่างกาย เกิด superoxide radicals ซึ่งเป็นออกซิเจนโมเลกุลที่มีประจุและจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide โดยเอนไซม์ superoxide dismutase โดย

ปกติ hydrogen peroxide ที่มีอันตรายสูง จะถูก deactivate ไปเป็นออกซิเจน และ น้ำ ที่ไม่มีอันตราย โดยเอนไซม์อีกชนิด เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น การผลิตเอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยน free radical oxygen และ superoxide ให้เป็นออกซิเจน และน้ำน้อยลง ทำให้มีการสะสมของ superoxide และ hydrogen peroxide มากขึ้น ที่ทำให้เกิดอันตรายในเซลล์ ทำให้เกิด cross linking ของโมเลกุล ซึ่งทำลายหน้าที่ของ phospholipids protein nucleic acid และเอนไซม์ของเซลล์ เป็นผลทำให้ เอนไซม์ที่ผนังเซลล์ gene expression หรือกลไกอื่นๆ ทำงานผิดปกติได้ ก่อให้เกิดความแก่ และ พยาธิสภาพต่างๆ มากมาย

2. สมมติฐานข้อจำกัดการแบ่งตัว (Limit on cell division hypothesis)

เนื่องจากเซลล์ตามปกติของร่างกายไม่ได้ถูกโปรแกรมให้เจริญ และเกิดใหม่ตลอดเวลา และเซลล์บางชนิดมีข้อจำกัดในการแบ่งเซลล์ การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ ถูกกระตุ้นโดยการร่วมกันของโปรตีนชนิดพิเศษ คือ growth factor ดังนั้นเซลล์ที่ไม่ได้รับ growth factor อย่างเพียงพอ จะทำให้เฉื่อยหลังการแบ่งตัวทำให้เกิดการแก่ก่อนวัย

กรดแกลลิก (Gallic acid)

กรดแกลลิก (Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)) เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งพบได้ในธรรมชาติ ได้จาก gallnut, green tea (ชาเขียว), sumac, witch hazel และ Oak bark (เปลือกต้นโอ๊ค) พบได้ทั้งในรูปอิสระและเป็นส่วนหนึ่งของสารแทนนิน (tannins) ซึ่งในโครงสร้างของกรดแกลลิกมีสองหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ hydroxyl groups และ carboxylic acid group เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่ามีฤทธิ์ที่หลากหลายทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial) ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activities) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) และฤทธิ์ต้านเม็ดสี (Antimelanogenic) (Krogh และคณะ, 2000; Zhongbing และคณะ, 2006; Shahrzad และคณะ, 2001; Rodriguez และคณะ, 2007) และมักใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารอื่นๆ ด้วย ฤทธิ์ต้านการอักเสบของกรดแกลลิกเป็นแบบขึ้นอยู่กับการได้รับ (dose-dependent) ในการยับยั้งสารเหนี่ยวนำการปลดปล่อยฮิสตามีนและ IgE-mediated histamine release ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการอักเสบ ซึ่งความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับกรดแกลลิกให้ผลที่ไม่ต่างกัน และลดการกระตุ้น pro-inflammatory cytokine gene expression และสารอื่นๆ เช่น TNF- α และ IL-6 ใน human mast cells ซึ่งฤทธิ์เหล่านี้ทำให้กรดแกลลิกมีฤทธิ์ลดอาการแพ้ได้เช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับยา disodium cromoglycate และมีรายงานว่ากรดแกลลิกเป็นหนึ่งในสารกลุ่ม polyphenolic ที่มีความสามารถลดการปลดปล่อยสาร histamine จาก rat basophilic leukemia cells และ กดการสร้าง pro-inflammatory cytokine ใน murine peritoneal macrophages (Sang-Hyun และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามกรดแกลลิกมีการละลายน้ำไม่ดี (11.5 มก/มล) (Hansen และ Lust, 2001; O'Neil และคณะ, 2001) ซึ่งอาจจำเป็นต้องมีการเพิ่มการละลายของสารนี้ในระบบที่เป็นน้ำ

นอกจากนี้ยังผลการศึกษาได้เสนอลำดับความสามารถของฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activities) ตามลำดับดังนี้ mallotusinic acid > mallotinic acid = geraniin > epigallocatechin gallate (EGCG) > corilagin > ellagic acid > gallic acid > quercetin > rutin > chlorogenic acid และลำดับความสามารถของฤทธิ์ superoxide radical-scavenging activity ตามลำดับดังนี้ EGCG > corilagin > mallotusinic acid > geraniin > mallotinic acid > gallic acid > ellagic acid > chlorogenic acid > quercetin > rutin (Hiromasa และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่ากรดแกลลิกอาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพวก *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ได้แบบอ่อนๆ และ ค่อนข้างมีฤทธิ์ในการต้าน *K. pneumoniae* อีกด้วย (Rodriguez และคณะ, 2007) และมีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อยสารกลูตาเมต (glutamate) และ generation of

reactive oxygen species (ROS) จึงทำให้มีฤทธิ์ neuroprotective (Ban และคณะ, 2008) ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็งมีการศึกษาหนึ่งพบว่ากรดแกลลิกเป็นสารกลุ่ม phenolic acid ตัวเดียวที่มีความสามารถในการยับยั้ง mutagenicity ของ 5NFAA ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งรายงานฤทธิ์ antimutagenic เรียงตามลำดับความแรงจากมากไปน้อยดังนี้ gallic acid > ferulic acid > caffeic acid > syringic acid > vanillic acid (Birosova, 2005) และฤทธิ์ต้านเม็ดสี (Antimelanogenic) จากการศึกษาหนึ่งรายงานว่าการแกลลิกมีความสามารถมากในการลดการทำงานของ mushroom tyrosinase ลดปริมาณเมลานินใน B16 melanoma cells และลดอัตราส่วนของ glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio) โดยเทียบกับสารมาตรฐานคือ kojic acid อย่างมีนัยสำคัญซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็น whitening agent ได้ และหมู่ tri-hydroxyl เป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์เป็น potent radical scavenging และหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง *para* กับ หมู่ carboxylic มีส่วนสำคัญอย่างมากต่อความสามารถการเป็นสาร antioxidant (You, 2007)

เจล (Gel)

Sol phase หมายถึง สภาพของเหลวที่ไหลได้ ในขณะที่ gel phase หมายถึงสภาพที่ไม่ไหลภายในระยะเวลาที่กำหนด ระบบพอลิเมอร์ที่มีระดับความเข้มข้นสูงกว่า critical gel concentration (CGC) จะมีแสดงสภาพเป็น gel phase โดยส่วนใหญ่ค่า CGC จะแปรผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยมีวิธีการตรวจอย่างง่าย คือ test-tube inverting method โดยสังเกตการไหลของสารละลายโดยการเอียงหลอดทดลอง ถ้าสารละลายไหลได้ถือว่าสารอยู่ใน sol phase แต่หากไม่ไหลถือว่าเป็น gel phase การไหลดังกล่าวขึ้นกับเวลา อัตราการเอียงหลอดทดลอง ปริมาณสาร และเส้นผ่าศูนย์กลางหลอดทดลอง เวลาและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของพอลิเมอร์ดังนั้นจึงควรควบคุมปัจจัยเหล่านี้ก่อนทำการทดลอง อีกวิธีในการทดสอบคือวิธี falling ball method โดยใช้ลูกบอลขนาดเล็กหนักๆ วางบนผิวหน้าของสารที่จะทดสอบ และวัดการแทรกผ่านของลูกบอลในชั้นเจลภายใต้สภาวะที่กำหนด ในกรณีที่สารเปลี่ยนสภาพด้วยการเหนี่ยวนำจากอุณหภูมิจะสามารถตรวจวัด endothermic peak จาก differential scanning calorimetry (DSC) ได้ โดยยังสามารถวัดค่า enthalpy ของการเกิด gelation ได้ด้วย นอกจากนี้มีการนำ dynamic mechanical analysis มาใช้ทดสอบได้ด้วย โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ storage modulus ของระบบ (Jeog และคณะ, 2002)

เจลไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermosensitive gel)

เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ มีคุณสมบัติการเปลี่ยนรูปจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสารที่มีความแข็งมากขึ้นที่อุณหภูมิหนึ่งๆ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ positive temperature และ negative temperature ระบบ positive temperature จะมีค่า upper critical solution temperature (UCST) ที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า upper critical solution temperature (UCST) พอลิเมอร์จะสามารถเปลี่ยนเป็นเจลได้ ในทางตรงกันข้ามระบบ negative temperature จะมีค่า lower critical solution temperature (LCST) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า lower critical solution temperature (LCST) พอลิเมอร์จะละลาย ที่อุณหภูมิสูงกว่า lower critical solution temperature (LCST) พอลิเมอร์จะมีความสามารถในการเข้ากับน้ำลดลงจนไม่ละลายน้ำ และเกิดเป็นเจล (Dumortier และคณะ, 2006; Peppas และคณะ, 2000)

กลไกในการก่อเจลของเจลไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในน้ำมีด้วยกันหลายกลไก พอลิเมอร์ส่วนมากการละลายน้ำจะลดลง เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน ส่งผลให้ความเป็น hydrophilicity ของสายพอลิเมอร์เปลี่ยนไป ปกติแล้วเมื่อพอลิเมอร์ละลายในน้ำ จะมีแรงระหว่างโมเลกุลที่เกี่ยวข้องทั้งสิ้น 3 แรง คือ แรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ แรงระหว่างพอลิเมอร์กับน้ำ และ แรงระหว่างโมเลกุลของน้ำ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกี่ยวข้องกับความ

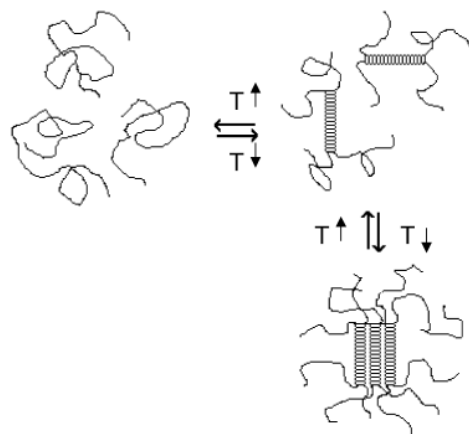
สมดุลของหมู่ที่ชอบน้ำและหมู่ไม่ชอบน้ำของสายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์และพลังงานอิสระ (free energy; ΔG) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) และอุณหภูมิ ดังสมการที่เกี่ยวข้องคือ

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

ทั้งนี้เมื่อ ΔH น้อยกว่า ΔS การเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้ $T\Delta S$ เพิ่มขึ้น ทำให้ ΔG มีค่าติดลบ ส่งเสริมให้สายโซ่พอลิเมอร์มีปฏิสัมพันธ์กันที่ lower critical solution temperature (LCST) ส่งผลทำให้แรงระหว่างพอลิเมอร์กับน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแรงระหว่างพอลิเมอร์ด้วยกันเอง หรือระหว่างโมเลกุลน้ำด้วยกันเอง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคือพอลิเมอร์เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) และมีโครงสร้างในรูปที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากสำหรับการนำมาใช้ทางการแพทย์และในทางเภสัชกรรม เนื่องจากมีข้อดีมากมาย เช่น ง่ายต่อการผสมในสูตรตำรับ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และมีวิธีการบริหารยาที่สะดวก ในทางเภสัชศาสตร์และทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการนำมาใช้เป็นยาพื้นในการช่วยละลายยาที่ไม่เข้ากับน้ำและมวลโมเลกุลต่ำ controlled release ใช้ติดฉลากระบบนำส่งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ตัวอย่างเช่น โปรตีน ยีน หยุดการเคลื่อนไหวของเซลล์ และการตัดต่อเนื้อเยื่อ เมื่อเกิดเป็นเจลแล้วจะแสดงคุณสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) สลายตัวโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) ผลิตภัณฑ์ซึ่งเมื่อสลายตัวแล้วไม่เกิดพิษ เป็นข้อดีซึ่งสามารถนำทดลองในสัตว์ทดลองได้ นอกจากนี้ระบบพอลิเมอร์จากธรรมชาติและดัดแปลงจากธรรมชาติแล้วยังมีระบบพอลิเมอร์อื่นๆ ได้แก่ N-isopropylacrylamide copolymers, poly(ethylene oxide)/ poly(propylene oxide) block copolymers และ poly(ethylene glycol) / poly(D,L-lactide-co-glycolide) block copolymers (Eve และ Leroux, 2004)

สำหรับพอลิเมอร์จากธรรมชาติและอนุพันธ์ชอบเกิดเจลในตัวกลางที่เป็นน้ำมากกว่าสารทำละลายอินทรีย์ การเกิด triple helical conformation ของเจลาติน และ double helical conformation ของโพลีแซคคาไรด์ เหนี่ยวนำการเติบโตของผลึกระหว่างการเกิดเจล การเกิด helix และติดตามด้วยการรวมกลุ่มของ helix ส่งผลให้เกิดจุดเชื่อมในโครงสร้าง (junction point) ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยที่อุณหภูมิสูงสารจะมีสภาพของ random coil conformation และเกิด double helix และการรวมกลุ่มก่อตัวเหนี่ยวนำการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำ



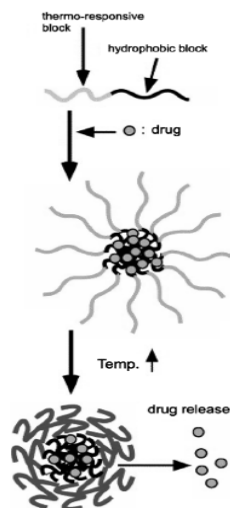
รูปที่ 1 กลไกการเกิดเจลของโพลีแซคคาไรด์ในตัวกลางที่เป็นน้ำ จาก random coil เปลี่ยนเป็น helix

หลายอัน ก่อนการรวมตัวเพื่อก่อตัวเป็นส่วนรอยต่อ (junction zone) ของเจล (Jeog และคณะ, 2002)

พอลิเมอร์จากธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดเจลเมื่ออุณหภูมิต่ำลง อย่างไรก็ตามมีอนุพันธ์เซลลูโลสบางชนิดที่ละลายน้ำได้และเกิดเจลที่อุณหภูมิสูง ปกติแล้วเซลลูโลสไม่ละลายในน้ำแต่เมื่อมี hydrophilic moieties ในโครงสร้างที่เหมาะสมเพื่อละลายน้ำได้ ดังนั้นเมื่อเกิดสมดุลระหว่าง hydrophilic moieties และ hydrophobic

moieties อนุพันธ์เซลลูโลสจึงละลายน้ำได้และแสดงคุณสมบัติการเปลี่ยนจากสารละลายในน้ำเป็นละลายได้น้อยลง ดังนั้นการเปลี่ยนจากสารละลายเป็นเจลขึ้นกับการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีของเซลลูโลส ทำให้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการละลายน้ำจะลดลง ขณะที่แรงปฏิกริยาระหว่างพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น methyl cellulose และ hydroxypropyl cellulose (Jeog และคณะ, 2002)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ระบบนำส่งยาหลายรูปแบบมีการนำเจลไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาใช้เพิ่มมากขึ้น โดยแต่ละระบบมีทั้งข้อดีและข้อเสีย การเลือกใช้ขึ้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารที่ใช้และการนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรค ตัวอย่างเช่น ระบบนำส่งยาตาจะต้องพิจารณาเลือกเจลที่มีลักษณะใสเป็นสำคัญ โดยเจลที่ไม่มีคุณสมบัติสลายตัวโดยกระบวนการทางชีวภาพ (non-biodegradable) จะไม่นิยมนำมาใช้ในยาฉีด สำหรับ Poloxamer hydrogel ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับทางคลินิก มีกลไกการควบคุมการปลดปล่อยยาดังแสดงในรูปที่ 2 ในการใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลาย และสารเพิ่มความหนืด เจลนี้ไม่มีคุณสมบัติสลายตัวโดยกระบวนการทางชีวภาพ (non-biodegradable) และควบคุมการปลดปล่อยและออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ได้เพียงไม่กี่วันเท่านั้น จึงไม่ถูกคาดหวังที่จะนำมาประยุกต์ใช้ฝังเข้าไปในร่างกาย ปัจจุบันมีการพัฒนาออกแบบอนุพันธ์ของ poloxamer จึงทำให้สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โพลิแซคาไรด์จะมีคุณสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) สลายตัวโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเป็นเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ แต่อย่างไรก็ตามระบบนี้ไม่สามารถพัฒนาเป็น ยามวลโมเลกุลสูงและ hydrophilic ที่ออกฤทธิ์เนิ่น เนื่องจากมีขนาดใหญ โครงสร้างมีความพรุนทำให้น้ำสามารถแพร่ผ่านเข้าได้อย่างรวดเร็ว แต่เหมาะสมที่จะเป็นแบบโครงสำหรับการเจริญของเซลล์ และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ สำหรับ PEO/PLGA hydrogels เป็นระบบอีกระบบหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรม เนื่องจากมีคุณสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และมีข้อมูลความปลอดภัยสูง นิยมนำมาใช้ในระบบนำส่งยาที่ทำให้สารออกฤทธิ์ได้มากกว่าสัปดาห์หรือมากกว่า 1 เดือน (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

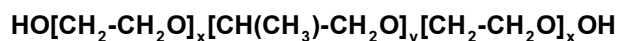


รูปที่ 2 แสดงการปลดปล่อยยาจากไมเซลล์ของโพลิเมอร์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

Poloxamer 407 (Pluronic F 127[®], Lutrol F 127[®])

Poloxamer เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ถูกสังเคราะห์ขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1950 และได้ถูกนำมาใช้ในงานเภสัชกรรมในหลาย ๆ วัตถุประสงค์ ซึ่งข้อมูลของ Poloxamer มีบรรจุอยู่ใน monograph ของเภสัชตำรับของสหรัฐอเมริกา (USP) และเภสัชตำรับของยุโรป (EP) (Dumortier และคณะ, 2006)

โครงสร้างของ Poloxamer ประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำคือ Poly-Propylene oxide (PPO) และส่วนที่ชอบน้ำคือ Poly-Ethylene oxide (PEO) มาต่อกันในลักษณะเป็น Triblock co-polymer คือ $\text{PEO}_x\text{-PPO}_y\text{-PEO}_x$ หรือแสดงในรูปสูตรโครงสร้างทางเคมีได้ดังนี้



มีชื่อทางการค้าเช่น Pluronic[®], Lutrol[®], Sypperonic[®], หรือ Tetronic[®] เป็นต้น

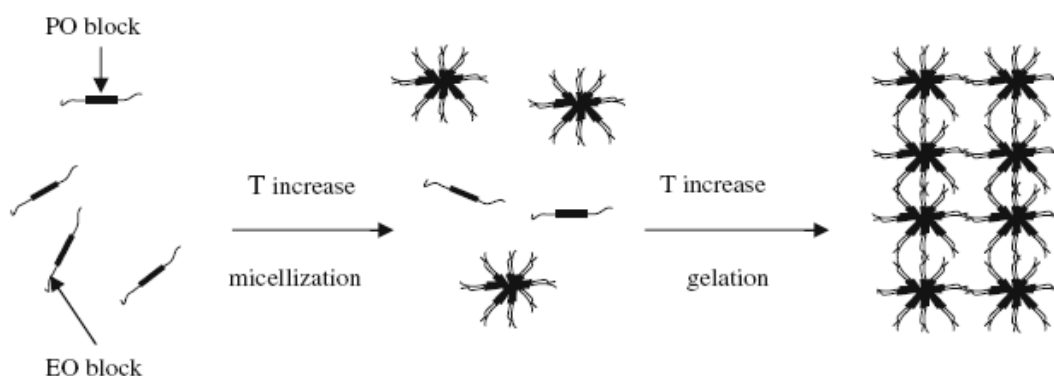
Poloxamer 407 หรือ Pluronic F 127[®] มีคุณสมบัติเป็น non-ionic surfactant ซึ่งมีมากกว่า 30 ชนิด แตกต่างกันไปตามสัดส่วนของหมู่ PEO และ PPO มีการนำ Poloxamer 407 มาใช้มากในการตั้งตำรับเภสัชภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ยาฉีด ยาากิน ยาพ่นจมูก ยาน้ำใส ยาน้ำแขวนตะกอน ยาตา และยาใช้ภายนอกอื่นๆ (Dumortier และคณะ, 2006)

ตารางที่ 1 สัดส่วนของ PEO(x) และ PPO (y) ตามสูตรโครงสร้าง $\text{PEO}_x\text{-PPO}_y\text{-PEO}_x$

Pluronic [®]	Poloxamer	x	Y
L44NF	124	12	20
F68NF	188	80	27
F87NF	237	64	37
F108NF	338	141	44
F127NF	407	101	56

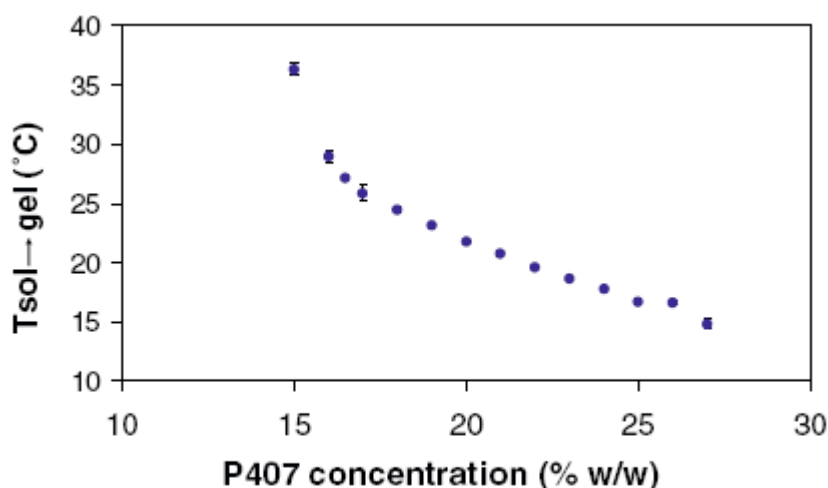
ที่มา : BASF Corporation , Technical Bulletin, Pluronic[®] Block Copolymer NF Grades

สารละลายของ Poloxamer 407 จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermo-sensitive) คือ สารละลาย Poloxamer สามารถเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่อุณหภูมิต่ำไปเป็นเจลได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะที่เรียกว่า sol-gel transition temperature ($T_{\text{sol-gel}}$) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสถานะจะค่อยๆเกิดขึ้นแบบช้าๆ และสามารถผันกลับเป็นของเหลวได้เมื่ออุณหภูมิต่ำลงกว่า $T_{\text{sol-gel}}$ จึงเรียกเจลของ Poloxamer ว่า Thermo-reversible gel การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลนั้นอธิบายได้โดยทฤษฎีของการก่อตัวเป็นไมเซลล์ (Micelle) จะเกี่ยวข้องกับค่าความเข้มข้นวิกฤตของการก่อตัวเป็นไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration-CMC) ซึ่งจะมีค่าเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิต่ำ ค่า CMC จะสูง นั่นคือสารละลาย Poloxamer ต้องมีความเข้มข้นมากจึงจะกลายเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำๆ กลไกในการก่อตัวเป็นไมเซลล์อธิบายได้ว่า เนื่องจากสาย Poloxamer ประกอบด้วยทั้งส่วนที่ชอบน้ำคือ PEO และส่วนที่ไม่ชอบน้ำคือ PPO เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่วน PPO จะมีค่าการละลายที่ต่ำลงเรื่อยๆจนถึง $T_{\text{sol-gel}}$ จะเกิดการก่อตัวเป็นไมเซลล์ขึ้นโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำคือ PPO เข้าด้านใน และส่วนที่ชอบน้ำคือ PEO ออกด้านนอก สารละลายจึงมีความหนืดสูงขึ้นจนกลายเป็นเจลในที่สุด ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กลไกการเกิดเป็นไมเซลล์ของ Poloxamer (Dumortier และคณะ, 2006)

ค่า Tsol-gel ของสารละลาย Poloxamer จะมีค่าแปรผกผันกับความเข้มข้นของ Poloxamer คือหากมีความเข้มข้นของ Poloxamer ต่ำๆ ค่า Tsol-gel จะสูง และหากความเข้มข้นของ Poloxamer เพิ่มขึ้นค่า Tsol-gel จะต่ำลงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะ (Tsol-gel) และความเข้มข้นของ Poloxamer 407 (Dumortier และคณะ, 2006)

ทั้งนี้ตัวยาหรือสารอื่นๆที่ใช้ในตำรับเช่นเกลือ สารลดแรงตึงผิว สารช่วยเพิ่มการละลายและตัวยาสามารถมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Tsol-gel ของสารละลาย Poloxamer ได้ (Karmarkar และคณะ, 2005) ทั้งในแง่ที่ทำให้มีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงมากกว่าในสารละลายที่เป็น Poloxamer เดียวๆในความเข้มข้นที่เท่ากันของ Poloxamer เนื่องจากสารเหล่านั้นรบกวนการก่อตัวเป็นไมเซลล์ของ Poloxamer โดยไปมีผลรบกวนการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลส่วน PPO และ PEO ตัวอย่างสารจำพวกเกลือเช่น Sodium chloride, Sodium dihydrogen phosphate จะมีผลทำให้ Tsol-gel ลดลง สารหรือตัวยาที่มีความเป็นกรดเช่น Hydrochloric acid, Diclofenac จะมีผลทำให้ Tsol-gel เพิ่มขึ้น (Dumortier และคณะ, 2006; Desai และคณะ, 2001)

การเตรียมตำรับเจลไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermo-reversible gel)

ใช้วิธีการเตรียมแบบเย็น (Cold method) โดยละลาย Poloxamer และสารประกอบอื่นๆในตำรับในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 4-5°C ผสมจนได้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ Poloxamer ในช่วง 20-30% ของตำรับจะสามารถเตรียมที่ 4-5°C ได้ง่าย หากใช้ปริมาณ Poloxamer ที่มากขึ้นจะต้องใช้อุณหภูมิในการเตรียมต่ำลงอีกและต้องใช้เวลาในการเตรียมตำรับมากขึ้น สารละลายของ Poloxamer จะมีความคงตัวมากทั้งในสภาวะที่มีกรด ด่าง หรือ ไอออนของโลหะหนัก (Karmarkar, 2005) สามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ด้วยวิธี Autoclave (120°C, 15 min, 1 bar) โดยไม่มีผลทำให้ความหนืดเปลี่ยนแปลง แต่ยังไม่มีการศึกษายืนยันว่าความร้อนทำให้ Poloxamer เกิดการสลายตัวหรือไม่ (Dumortier และคณะ, 2006)

คุณสมบัติของ Poloxamer 407 (Dumortier และคณะ, 2006)

Poloxamer 407 มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หลายประการที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมได้หลากหลาย ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของ Poloxamer มีดังนี้

1. การช่วยเพิ่มค่าการละลาย (Solubilization Promotin)

Poloxamer ช่วยเพิ่มค่าการละลายของตัวยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำมากๆ เช่น Indomethacin, Insulin, Piroxicam, nifedipine เป็นต้น โดยการก่อตัวเป็นไมเซลล์แล้วหุ้มตัวยาเอาไว้ภายในโครงสร้าง ตัวอย่างเช่น Piroxicam มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถึง 11 เท่าเมื่อผสมอยู่ในสารละลาย Poloxamer เข้มข้น 22.5 % w/w, Nifedipine มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถึง 27 เท่าเมื่อผสมอยู่ในสารละลาย Poloxamer 4 % w/w เป็นต้น

2. การช่วยเพิ่มความคงตัว (Stabilisation Properties)

มักมีการใช้ Poloxamer เป็นสารช่วยเพิ่มความคงตัวของตำรับยาโปรตีน โดยมีผลให้โปรตีนคงรูปร่าง 3 มิติได้ดี เกิดการแตกออกของสายโปรตีนได้น้อย และลดการเกิดการจับกันทางไฟฟ้า (electrical binding) ของโปรตีน นอกจากนี้มีการนำ Poloxamer มาเพิ่มความคงตัวของ micro- หรือ nano-particles ให้มีการแตกตัว (aggregation) ได้ยากขึ้น รวมถึงตำรับไลโปโซม (Liposome) ซึ่ง Poloxamer จะทำให้ไลโปโซมคงตัวและมีค่าครึ่งชีวิตยาวนานขึ้น

3. คุณสมบัติการยึดติด (Adhesive Properties)

การยึดติดเนื้อเยื่อร่างกายเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ Poloxamer ที่นำมาใช้ในตำรับยาใช้ภายนอกเช่น ยาหยอดตา, ยาเหน็บทวาร, และยาทาภายนอก เป็นต้น ซึ่งพบว่าทำให้ตำรับเกาะติดกับบริเวณที่ใช้ได้นานขึ้นทำให้ตัวยาถูกดูดซึมได้ดีขึ้น โดยการยึดติดเนื้อเยื่อร่างกายของ Poloxamer จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและอุณหภูมิ

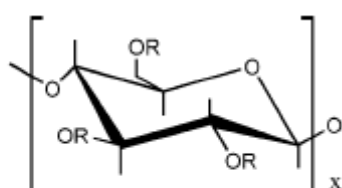
4. คุณสมบัติการไหล (Rheological Properties)

ลักษณะการไหลของ Poloxamer จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ คือหากอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า Tsol-gel สารละลายจะมีพฤติกรรมการไหลแบบนิวโตเนียน (Newtonian) และเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิสูงกว่า Tsol-gel จะมีพฤติกรรมการไหลแบบไม่เป็นนิวโตเนียน (Non-newtonian) โดยจะปรากฏค่า yield value และลักษณะของการไหลเป็นแบบพลาสติก (Plastic flow)

Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)

HPMC เป็นพอลิเมอร์จำพวกโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) อยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของเซลลูโลส (Cellulose Derivatives) นิยมนำมาใช้ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางและยา โดยในทางยานำมาใช้ประโยชน์เป็นสารก่อเจล สารช่วยกระจายตัว สารช่วยแขวนตะกอน หรือเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบเม็ดยา และใช้ในระบบนำส่งยาแบบออกฤทธิ์เนิ่นเพื่อช่วยในการควบคุมการอัตราการปลดปล่อยยา มีความสามารถในการกักเก็บน้ำ ไวโนโมเลกุลได้ดีจึงมักถูกนำมาใช้ผสมร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในตำรับยาที่เป็นเจลเพื่อช่วยป้องกันการระเหยของน้ำและแอลกอฮอล์ออกจากตำรับ (<http://www.ronasgroup.com-hydroxypropyl-methyl-cellulose>, 2008)

ลักษณะทางกายภาพเป็นผงละเอียดสีขาวคล้ายแป้ง ละลายในน้ำได้น้อยมาก แต่สามารถเปียกน้ำได้ เมื่อถูกโปรยลงในน้ำจะเกิดการเกาะกลุ่มกัน แล้วค่อยๆ เปียกน้ำเกิดการพองตัวขึ้นจนได้สารละลายที่ใสหรืออาจมีสีขุ่นเล็กน้อยเหมือนคอลลอยด์ (colloid) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของ HPMC

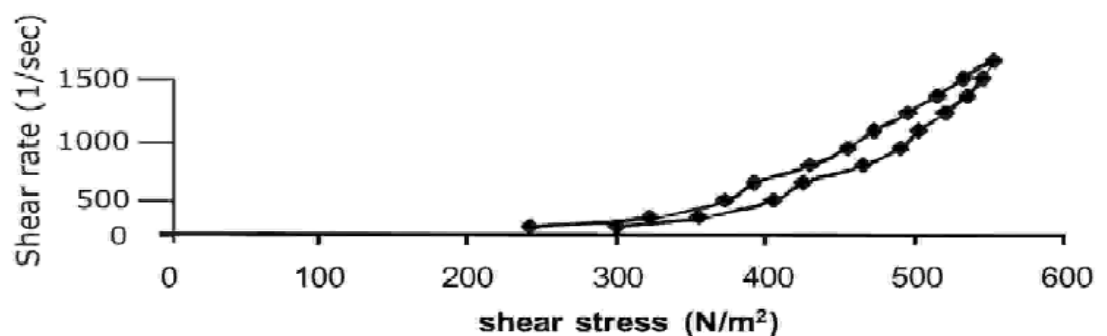
R = CH₃ or CH₂CH(CH₃)OH or H

สารละลายของพอลิเมอร์ที่มีต้นกำเนิดจากธรรมชาติส่วนใหญ่จะเตรียมเป็นเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ โดยที่อุณหภูมิต่ำๆ จะมีสถานะเป็นเจล ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเป็นสารละลาย ตัวอย่างเช่น carrageenan แต่มีข้อบกพร่องสำหรับสารในกลุ่มอนุพันธ์ของเซลลูโลสบางชนิดที่มีการก่อเจลไม่เป็นไปตามกลไกนี้ คือ Methylcellulose (MC) และ Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) โดยสารละลายของทั้ง MC และ HPMC ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ในช่วง 1-10% จะมีคุณสมบัติไวต่ออุณหภูมิในลักษณะที่เมื่ออุณหภูมิต่ำๆ จะมีสถานะเป็นสารละลาย เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจุดเปลี่ยนจากสารละลายไปเป็นเจล (Tsol-gel) ก็จะกลายสภาพเป็นเจลได้ และค่า Tsol-gel ของ MC และ HPMC คือ 40-50°C และ 75-90°C ตามลำดับ (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

กลไกการเปลี่ยนจากสารละลายไปเป็นเจลเกิดจากการทำปฏิกิริยากันของส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุล คือ บริเวณหมู่แทนที่ที่เป็น Methoxy โดยที่อุณหภูมิต่ำๆ โมเลกุลของพอลิเมอร์จะมีการละลายที่ดีจึงไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสายพอลิเมอร์ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โมเลกุลของพอลิเมอร์จะเริ่มสูญเสียโมเลกุลน้ำออกไป ทำให้เกิดปฏิกิริยากันระหว่างบริเวณที่ไม่ชอบน้ำเข้ามาเกาะรวมตัวกันเป็นโครงร่างตาข่าย ทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

ถึงแม้ว่าสารละลายของอนุพันธ์ของเซลลูโลสเหล่านี้ (MC และ HPMC) จะสามารถเตรียมเป็นเจลที่ไวต่ออุณหภูมิได้ แต่ก็ไม่นิยมนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาที่เป็นเจลที่ไวต่ออุณหภูมิเนื่องจากมีอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะ (Tsol-gel) ที่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายค่อนข้างมาก ในระยะหลังๆ จึงมีการปรับปรุงระบบโดยการเติมสารบางชนิดเช่น Sodium chloride ลงไปพบว่าช่วยลด Tsol-gel ลงได้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิของร่างกายคือ ระบบของ MC ลดลงเหลือประมาณ 34°C และระบบ HPMC ลดลงเหลือประมาณ 40°C (Ruel-Gariepy และ Leroux, 2004)

สารละลายของพอลิเมอร์จากธรรมชาติโดยทั่วไปรวมทั้ง HPMC มักมีพฤติกรรมการไหลแบบพลาสติก ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ลักษณะการไหลของสารละลาย HPMC (Sanja และคณะ, 2007)

วิธี Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยการทำแผ่นยาปฏิชีวนะ (antimicrobial disc) แพร่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อกระจายอยู่ในจำนวนที่เหมาะสมหรือมีความขุ่นประมาณ McFarland standard 0.5 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone of inhibition ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นของยาสูง ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยจะเห็นเป็นวงใสๆ และ

ขนาดของ zone of inhibition นอกจากจะขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อสารแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ หลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของยาปฏิชีวนะ ปริมาณอัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความสะดวก ความประหยัด และ มีการใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการทดสอบแบบอื่นๆ (<http://itech.pjc.edu/fduncan/mcb1000/discdiff.pdf>, 2005)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี **Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity assay (VCEAC)** (Kim และ Lee, 2004)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยประยุกต์จากวิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay (TEAC) (Duros และคณะ, 2004) เป็นการวิเคราะห์ที่ใช้หลักการของ Radical Scavenger เพื่อประเมิน Total radical scavenging capacity บนพื้นฐานของความสามารถที่จะจับ ABTS ซึ่งจะตรววัดในนาที่ที่ 6 หลังจากเติมสารที่ต้องการทดสอบ และนำผลที่ได้จากการต้านอนุมูลอิสระของสารมาเปรียบเทียบกับ การต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid (vitamin C)

ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ABTS มีสีน้ำเงินเข้ม สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จำนวน ABTS ลดลง ทำให้สีของสารละลายจางลง สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ ABTS

วัสดุชีวภาพ ที่ใช้สำหรับรักษาแผล (wound dressing) และเตรียมเป็นโครงสร้างความพรุนสูง เช่น scaffold หรือ sponge ควรมีคุณสมบัติสลายตัวได้ทางชีวภาพ พอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ทางชีวภาพที่ใช้ในการขึ้นรูปวัสดุชีวภาพ ได้แก่ polyglycolide, polylactide, collagen, chitin, gelatin, hyaluronate เป็นต้น (Choi และคณะ, 1999) การเพิ่มคุณสมบัติความคงทนให้กับวัสดุชีวภาพนิยมใช้การ crosslink สายโซ่โมเลกุลพอลิเมอร์ที่ใช้เตรียมวัสดุชีวภาพ การ crosslink พอลิเมอร์ เช่น gelatin สามารถใช้การให้ความร้อน การใช้สารเคมี และการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต สำหรับสารเคมีที่นำมาใช้สำหรับการ crosslink เช่น formaldehyde, glutaraldehyde, carbodiimide, diepoxy compound, diisocyanate ซึ่งโดยมากสารกลุ่มนี้มีความเป็นพิษทำให้ต้องระมัดระวังในการใช้ สาร 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ไม่เป็นพิษ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยสารมีการเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์ยูเรียที่ละลายน้ำได้และมีพิษต่ำต่อเซลล์ (Choi และคณะ, 1999)

การใช้พอลิเมอร์ผสมในการขึ้นรูปวัสดุโครงสร้างความพรุนสูงเป็นอีกวิธีที่นิยมในการปรับคุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุชีวภาพ รวมทั้งการบรรจุสารออกฤทธิ์ชีวภาพในโครงสร้างดังกล่าวสามารถทำให้การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของวัสดุชีวภาพมีได้หลากหลายขึ้น การเพิ่มปริมาณ alginate ใน gelatin-alginate sponge ซึ่งเตรียมโดยการ crosslink ด้วย EDC จะส่งผลให้ความพรุนสูงขึ้นและเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำ และ เมื่อนำมาบรรจุยา silver sulfadiazine หรือ gentamicin sulfate จะค่อยๆปลดปล่อยยาได้นานถึง 4 วัน และทนต่อการย่อยด้วย collagenase ได้ถึง 3 วันและช่วยในการสมานแผลในหนูทดลองได้ (Choi และคณะ, 1999) การปลดปล่อย platelet-derived growth factor เพื่อใช้เพิ่มการสร้างเซลล์กระดูก จาก sponge ที่เตรียมจาก chondroitin-4-sulfate ร่วมกับ chitosan โดยการ freeze dry และ crosslink แล้วนำมาแช่ในสารออกฤทธิ์ สามารถควบคุมได้จากการปรับเปลี่ยนปริมาณโคโตแซนและปริมาณสารออกฤทธิ์ที่นำมาบรรจุ ซึ่งการใช้พอลิเมอร์สองชนิดร่วมกันในการนำส่งสารออกฤทธิ์สามารถทำให้ osteoblast เติบโตได้ดีกว่าการใช้ sponge ที่เตรียมจากโคโตแซนอย่างเดียวในการบรรจุสารออกฤทธิ์ (Park และคณะ, 2000) จากการเตรียม sponge ที่ประกอบด้วย sodium alginate และ chitosan ที่บรรจุยา paracetamol พบว่าการใช้พอลิเมอร์เป็นโคโตแซนจำทำให้ได้ sponge ที่แข็งแรง ขณะที่การใช้

sodium alginate จะได้โครงสร้างที่ไม่แข็งแรง และการใช้พอลิเมอร์ร่วมสามารถปรับคุณสมบัติเชิงกลและการควบคุมการปลดปล่อยยาได้ โครงสร้างไคโตแซนความพรุนสูงรูปแบบ scaffold ซึ่งมีการเชื่อมด้วย fructose มีประสิทธิภาพในการใช้เลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้ fructose (Lai และคณะ, 2003)

ในการใช้ประโยชน์จากวัสดุชีวภาพความพรุนสูงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่นสารทำละลายในการขึ้นรูป เทคนิคการขึ้นรูป สภาวะการต่างในการนำไปใช้งาน ผลของการ crosslink คุณสมบัติการดูดซับตัวกลาง และอัตราการสลายตัวทางชีวภาพ เป็นต้น sponge ที่เตรียมจากไคโตแซนโดยวิธี freeze drying บรรจุ triamcinolone acetonide และผ่านการ crosslink ด้วย glutaraldehyde มียาอยู่ในรูปผลึกในโครงสร้าง sponge ยา มีการปลดปล่อยขึ้นกับความเข้มข้นการต่างของตัวกลาง โดยการปลดปล่อยยาในสภาวะที่เป็นกรดสูงกว่าที่ pH 7.4 ยา มีการปลดปล่อยสอดคล้องกับโมเดลการปลดปล่อยยาของ higuchi's โดยปลดปล่อยได้นาน > 52 ชั่วโมง การเพิ่มขนาดบรรจุจะทำให้การปลดปล่อยยาช้าลง ปฏิกริยา N-acetylation หรือ การ crosslink โครงสร้างจะทำให้ยาปลดปล่อยช้าลง (Oungbho และคณะ, 1997.) ชนิดของกรดที่ใช้ในการละลายไคโตแซนในการขึ้นรูป sponge มีผลต่อคุณสมบัติและการปลดปล่อยยา prednisolone จาก sponge ที่เตรียมด้วยการ freeze dry โดยยาจะปลดปล่อยได้ช้าลงเมื่อ sponge ผ่านการ crosslink ด้วย glutaraldehyde (Leffler และ Muller, 2000) นอกจากนี้ยังมีการเตรียมวัสดุสอดช่องคลอดซึ่งเป็น sponge ที่เตรียมจาก collagen และบรรจุ retinoid (Dorr และคณะ, 1982) พอลิเมอร์อื่นที่มีรายงานการนำมาใช้เตรียมโครงสร้างความพรุนสูง เช่น hydroxypropyl cellulose (Kato and Gehrke, 2004) จากการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่า sponge ที่เตรียมจาก poly(d,l)-lactide ซึ่งบรรจุ chloramphenicol เตรียมด้วยวิธี solvent evaporation มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษาแผล (Tas และคณะ, 1998)

ช่วงเวลาประมาณสิบห้าปีที่ผ่านมา สารกลุ่มไคตินและไคโตแซนซึ่งมีจุดกำเนิดจากธรรมชาติได้รับความสนใจอย่างมากจากวงการต่างๆ อาทิเช่น เกษตรกรรม สิ่งทอและบรรจุภัณฑ์ เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ และการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เป็นต้น ไคตินเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่มีมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส และเป็นพอลิเมอร์ที่มี amino sugar เป็นองค์ประกอบที่พบในธรรมชาติมากที่สุด (Knapczk, 1988) วัตถุประสงค์ที่นิยมนำมาใช้เตรียมไคตินไคโตแซนคือเปลือกกุ้งและปู ทำให้พอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถผลิตได้จากของเสียของอุตสาหกรรมสัตว์น้ำไทยที่มีจำนวนมากมาย และปัจจุบันมีอุตสาหกรรมภายในประเทศหลายแห่งรองรับเพื่อนำมาแปรรูปเป็นไคตินและไคโตแซน การนำไคตินมาใช้ประโยชน์มีข้อจำกัดคือมีสารทำละลายที่สามารถละลายได้น้อยชนิด (Isurata และคณะ, 1993) ในขณะที่ไคโตแซนมีลักษณะเด่นคือสามารถไอออนไนซ์ให้ประจุบวกได้จากหมู่เอมีโนมากมายบนสายโซ่โมเลกุล ในช่วงที่มีความเป็นกรดสารไคโตแซนจะละลายและมีประจุเป็นบวกบนโครงสร้าง โดยหากสายโซ่โมเลกุลมี %deacetylation สูง จะทำให้มีหมู่เอมีโนอิสระเพิ่มขึ้นส่งผลให้พอลิเมอร์มีประจุบวกมากขึ้นด้วย เนื่องจากคุณสมบัติที่ต่างกันของสารไคโตแซน เช่น ความเข้ากันได้กับร่างกาย และการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำให้มีผู้พยายามนำมาใช้ประโยชน์ ส่วนมากนำมาใช้เป็นสารช่วยในตำรับต่าง ๆ เช่น ช่วยให้ออกฤทธิ์เร็วขึ้น และช่วยเพิ่มการละลายหรือแตกตัวของตัวยาได้ดีขึ้น (Duggin, 1989) การศึกษาของ Nigalaye และคณะ (Nigalaye และคณะ, 1990) พบว่าการผสมสารไคโตแซนกับยา theophylline ในปริมาณมากกว่า 50% ของน้ำหนักยาเม็ดทำให้ได้ยาเม็ดรูปมาทริกซ์ที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาให้ออกฤทธิ์นาน ถ้าปริมาณของสารไคโตแซนลดลงต่ำกว่า 33% มีผลให้ตัวยาถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว และปริมาณสารไคโตแซนต่ำกว่า 10% มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยแตกตัว อย่างไรก็ตามการทดลองดังกล่าวพบว่าหากใช้คาร์โบเมอร์ 934 เติมน้ำใน 10% สารไคโตแซนที่ผสมกับกรดซิตริก เมื่อนำส่วนผสมไปตอกเม็ดทำให้ได้ยาเม็ดรูปเมทริกซ์ที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและเกิดการกร่อนของมาทริกซ์ซึ่งทำให้เกิดเจลและสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาให้ออกฤทธิ์นานได้เช่นกัน นอกจากนี้การผสมสารไคโตแซนกับยา diclofenac sodium และ propanolol hydrochloride แล้วนำมาตอกเป็นเม็ดสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาให้ออกฤทธิ์นานได้เช่นกันโดยกลไกการทำให้เกิดเจลที่ค่า pH ต่ำ ๆ ของสารไคโตแซน

และยังพบว่าการใช้อนุพันธ์ของสารไคโตแซน เช่น chitosan malate สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาให้ออกฤทธิ์นานได้เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกักเก็บได้เช่นกัน รายงานการนำไคโตแซนมาใช้ร่วมกับพอลิเมอร์ประจุลบได้แก่ การนำสารไคโตแซนมาเตรียมในรูป polyion complex กับ sodium hyaluronate เพื่อใช้ในรูปแบบยาฝังใต้ผิวหนัง (Lee และคณะ, 2003) และรูปแบบ sponge (Isurata และคณะ, 1993) การนำมาเตรียมไฮโดรเจลกับ poly(acrylic) acid ซึ่งพบว่าการปลดปล่อยยา amoxycillin ถูกควบคุมจากอัตราการพองตัวและการกร่อนตัวของพอลิเมอร์เชิงซ้อน (Torrado และคณะ, 2003; Torre และคณะ 2003) นอกจากนี้ยังมีการเตรียมไคโตแซน ในรูป polyion complex กับ โมโนเมอร์ acrylic acid ด้วยวิธี photoinitiated free-radical polymerization ซึ่งทำให้การพองตัวลดลง (Nge, 2002) อีกทั้งมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับทำ wound dressing ที่เตรียมจากไคโตแซนและ sodium alginate ด้วย (Kim และคณะ, 1999)

มีการศึกษาจำนวนมากที่กล่าวถึงคุณสมบัติของไคโตแซนในการยับยั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์ และไวรัสบางชนิด สมมติฐานเกี่ยวกับการทำงานของไคโตแซนคือประจุบวกจะเข้าจับกับผนังเซลล์จุลชีพและทำให้เกิดช่องหรือโพรงทำให้ผนังเซลล์รั่ว ไคโตแซนสามารถจับไอออนโลหะที่สำคัญต่อการเจริญของจุลชีพ หรือไคโตแซนอาจแทรกตัวผ่านเข้าไปในเซลล์จุลชีพแล้วยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA (Tsai และ Su 1999; Cuero, 1999; Helander และคณะ, 2001) ไคโตแซนในรูปแบบแลคเตทสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบได้ โดยแบคทีเรียจะเจริญช้าลง 10-10,000 เท่า พบว่ารายงานฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพด้วยไคโตแซนยังมีมาอย่างต่อเนื่อง (Tsai และคณะ, 2000; Ouattar และคณะ, 2000; Hi และคณะ, 2001) การเตรียมไคโตแซนในรูป oligosaccharide สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คือ 2-29 ppm ซึ่งน้อยกว่าของไคโตแซนปกติที่ต้องใช้ถึง 50-1000 ppm ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวเพื่อการใช้สารถนอมนมให้เก็บได้นานขึ้น (Tsai และคณะ, 2000) ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ของไคโตแซนสูงขึ้นในภาวะที่เป็นกรดและเชื้อในช่วง exponential phase ทั้งนี้ไอออนประจุบวกลดฤทธิ์ไคโตแซนเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไคโตแซน ไคโตแซนมีผลทำให้ glucose และ lactate dehydrogenase รั่วออกจากเซลล์ของเชื้อนี้ ผลจากการทดลองสนับสนุนสมมติฐานกลไกการยับยั้งแบคทีเรียจากการเกิดการจับระหว่างไคโตแซนและประจุลบบนพื้นผิวแบคทีเรียและมีผลเปลี่ยนแปลงค่าการซึมผ่านของเมมเบรน (Tsai และ Su, 1999) फिल्मและเจลไคโตแซนที่มีส่วนผสม chlorhexidine gluconate ในการฆ่าเชื้อในโรค periodontal คือ *P. gingivalis* มีฤทธิ์มากขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลไคโตแซนสูงขึ้น โดยการผสมกับ chlorhexidine gluconate มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียดีกว่าการใช้ไคโตแซนอย่างเดียว (Ikinci และคณะ, 2002) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาการใช้ฟิล์มไคโตแซนในการถนอมอาหารประเภทเนื้อ (Ouattar และคณะ, 2000)

การยับยั้งการเจริญของเชื้อราในหลอดทดลองของไคโตแซนคาดว่าเกิดจากในรามิโงด์ประกอบของสารกลุ่มไคตินในผนังเซลล์ การให้สารนี้เข้าไปอีกอาจมีผลรบกวนการเติบโตของเชื้อราและกระตุ้นกลไกการป้องกันตัว (defense mechanism) เช่น ทำให้เพิ่มและสะสม chitinase การสังเคราะห์ด้วยยับยั้ง proteinase การเกิด lignification และเหนียวหนา callous synthesis ผลการยับยั้งเชื้อราได้นำมาใช้ในการถนอมผักผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวซึ่งมีรายงานไว้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศจำนวนมาก มีรายงานว่าสาร N-carboxymethyl chitosan สามารถลดการผลิต aflatoxin ใน *A. flavus* และ *A. parasiticus* ประมาณมากกว่า 90% และการเติบโตของเชื้อราลดลง (Tharanathan and Kittur, 2003) จากการทดสอบการยึดติดเซลล์ของเชื้อรา (fungal cell adherence test) พบว่าไคโตแซนไม่เพียงมีผลยับยั้งการยึดติดเซลล์ *Candida albicans* บนเซลล์เยื่อบุช่องคลอดมนุษย์ หรือเซลล์ HeLa แต่ยังมีผลอย่างไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อราและเซลล์เยื่อบุด้วย (Knapczk และคณะ, 1992)

ผลของไคโตแซนในการเร่งการหายของแผลในสัตว์เกิดจากสารนี้เร่งการทำงานของ polymorphonuclear leukocytes (ทำให้เกิด phagocytosis, การผลิต osteopontin และ leukotriene B4), macrophage (ทำให้เกิด

phagocytosis, การผลิต interleukin (IL)-1, transforming growth factor B1 และ platelet derived growth factor) และ fibroblasts (การผลิต IL-8) ทำให้โคโตแซนสังเสริม granulation และ organization ทำให้แผลสมานตัวเร็วขึ้น (Ueno และคณะ, 2001)

โคโตแซนถูกนำมาใช้รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก เพราะสามารถเกิดเป็นฟิล์มที่แข็งและเหนียว ดูดน้ำได้ และเข้าได้กับร่างกาย และยังก่อตัวเป็นฟิล์มได้โดยตรงบนแผลไฟไหม้ สารละลาย โคโตแซนอะซิเตตยังให้ความเย็นและความรู้สึกสบายแก่ผู้ป่วย โดยกรดไม่ก่อให้เกิด customary astringent ข้อดีอื่นๆ คือ ออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ ($7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}(\text{mlO}_2/\text{mlx mHg})$) ซึ่งสามารถป้องกันภาวะการขาดออกซิเจนของเนื้อเยื่อที่ตาซึ่งเกิดได้เมื่อการซึมผ่านของออกซิเจนต่ำกว่า $3 \times 10^{-11} (\text{cm}^2/\text{s})$ และฟิล์มสามารถดูดซับน้ำได้ประมาณ 50% โดยน้ำหนัก และยังสลายได้ด้วย lysozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะเคลื่อนย้ายมายังบริเวณบาดแผล ดังนั้นไม่จำเป็นต้องเอาฟิล์มโคโตแซนออกจากแผลภายหลังการใช้ จากการทดลองหา suspension ของ pseudomonas aeruginosa บนแผลที่ตัวหนู แล้วทดลองรักษาด้วย (a) โคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (M.W.86000) (b) โคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (MW.2200) (c) โคโตแซนชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูง + 1% silver sulfadiazine (SSD) (d) โคโตแซนชนิดชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ + 1% SSD (e) 1%-SSD-cream (silvadene®) โดยทาหลังจากการ burn 4-5 ชม. วันละ 2 ครั้ง พบว่าทุกตำรับที่มีโคโตแซนจะเกิดฟิล์มบางๆ คลุมแผลอยู่ พบว่าโคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำให้ผลต่างกัน โดยโคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้ผลดีกว่า การใช้ silvadene® cream ให้หนูมีชีวิต 82% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแบบผสมที่มีโคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ส่วนแบบที่ผสมกับโคโตแซนชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพิ่มการมีชีวิตอยู่จาก 82% เป็น 95% พบว่าการผสมโคโตแซนไม่ได้ช่วยเพิ่มการรักษาของ silver sulfadiazine เมื่อเทียบกับ silvadene® cream อย่างไรก็ตามโคโตแซนช่วยป้องกัน adverse effect ของ trauma และ infection เมื่อปราศจากตัวยา (Mima และคณะ, 1993)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าโคโตแซนมีคุณสมบัติกายภาพเคมีที่เหมาะสมหลายประการในการนำมาใช้เป็นโครงสร้างพูน อย่างไรก็ตามต้องศึกษาวิธีการขึ้นรูปที่เหมาะสมเพื่อให้ได้โครงสร้างโคโตแซนพูนที่แข็งแรงและบรรจุสารออกฤทธิ์ได้ในปริมาณสูง รวมทั้งยังสามารถแสดงฤทธิ์ต่อต้านเชื้อโรคได้ดีด้วย โดยเลือกใช้โคโตแซนที่มี %deacetylation สูงที่มีหมู่อะมิโนซึ่งเป็น reactive group ในโครงสร้างมาก และศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลโคโตแซนต่อคุณสมบัติโครงสร้างด้วยเพราะคาดว่าจะมีผลต่อความแข็งแรงและคุณสมบัติการกายภาพอื่นๆ โครงสร้างที่พัฒนาขึ้นมีโอกาสได้รับการยอมรับและมีการใช้อย่างกว้างขวางได้ในอนาคต อีกทั้งยังจะเป็นระบบที่สามารถประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์อื่นๆได้ด้วย ซึ่งการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการเตรียมระบบนี้ได้แก่เทคนิคการขึ้นรูป และความเข้มข้นสาร crosslinking รวมทั้งการบรรจุสารออกฤทธิ์ในโครงสร้างโคโตแซนความพูนสูง

ปัจจุบันเริ่มมีความสนใจในการบรรจุสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติในโครงสร้างความพูนสูง ซึ่งขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่ต้องการจากระบบนำส่งนี้ เช่นการใช้สมานแผลให้หายเร็วขึ้น เป็นต้น กระบวนการสมานแผลของร่างกายทำให้เกิดขบวนการออกซิเดชันซึ่งมีผลยับยั้งการเกิดเนื้อเยื่อใหม่ ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการค่อยๆนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น curcumin จากวัสดุชีวภาพที่บริเวณแผล ซึ่งพบว่ามีผลให้แผลหายเร็วขึ้นได้ (Gopinath และคณะ, 2004) สารจากธรรมชาติที่ใช้สมานแผลสกัดจากพืชชื่อ danshen (*Radix miltiorrhizae*) ซึ่งมี tanshinone IIa เป็นสารกลุ่ม diterpene เป็นสาร marker นำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในฟิล์มโคโตแซนที่ผสมกับเจลาติน พบว่าเมื่อวิเคราะห์สารที่ปลดปล่อยด้วยวิธี HPLC สารค่อยๆ มีการปลดปล่อยที่สอดคล้องกับโมเดลการปลดปล่อยแบบ higuchi (Zhao และคณะ, 2002)

อาคาเซีย (acacia หรือ gum acacia หรือ gum Arabic) เป็นยางที่ได้จากต้น *Acacia Senegal* และ *Acacia seyal* ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์เชิงซ้อนและมีไนโตรเจนจำนวนเล็กน้อย องค์ประกอบทางเคมีจะแตกต่างกันเล็กน้อยตามแหล่งที่มา ภูมิอากาศ ฤดูกาลและอายุของต้น ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานที่อยู่ในโมเลกุล

ประกอบด้วยน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล คือ galactose (44%), arabinose (24%), glucuronic acid (14.5%), rhamnose (13 %) และ 4-O-methylglucuronic acid (1.5%) acacia ถูกนำมาใช้มากที่สุดในกลุ่มของไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากพืชเพราะละลายได้ดีในน้ำและทนต่อ pH ส่วนใหญ่ acacia จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภท confectionery เช่น marshmallows และ toffees เพราะทำหน้าที่ยับยั้งการตกผลึกของน้ำตาลและช่วยให้เกิดอิมัลชันได้ดี ในอุตสาหกรรมการผลิตสารที่ให้กลิ่นจะใช้ acacia เป็น fixative ทำให้สารที่ให้กลิ่นติดอยู่บนผิวของอาหาร ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันและการระเหยของสารที่ให้กลิ่นออกไปจากอาหารอีกด้วย (Carbohydrate technology, 2011) อะลูมิเนียมโมโนสเตียเรต (aluminium monostearate; AMS) มีส่วนของ fatty acid ซึ่งมีสมบัติ hydrophobic อาจทำให้โครงสร้างความพรุนสูงของ chitosan และ acacia ละลายน้ำได้ลดลงจึงคงรูปและค่อยๆ ปลดปล่อยสารได้ดี (Yahya และ Arof, 2003)

ลำพูมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. อยู่ในวงศ์ Sonneratiaceae เป็นพืชยืนต้นขนาดใหญ่ชอบขึ้นตามชายเลน ริมคลอง ริมแม่น้ำ ตรงระดับน้ำขึ้นน้ำลง พบทั่วไปในน้ำกร่อยและน้ำจืด ประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ในจังหวัดที่มีป่าชายเลน (วารินทร์, 2541) การใช้ลำพูในวิถีชีวิตคนไทยมีไม่มากนัก แต่พบว่าชาวพม่าใช้ผลลำพูเป็นยาพอก และชาวอินโดนีเซียพอกใบที่บิดและผสมกับเกลือแล้วในบริเวณบาดแผลหรือแผลฟกช้ำ (Perry, 1980) สารสกัดจาก *Sonneratia caseolaris* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อทดสอบด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging effect บนแผ่นแรงกลชนิดบาง (thin-layer chromatography) และจากการแยกสารควบคู่ไปกับการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า flavonoids ชนิด คือ luteolin และ luteolin 7-O- β -glucoside มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Sadhu และคณะ, 2006) สารสกัดจากต้นลำพูมีการนำมาใช้เพื่อผดสุมาน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ และยังสามารถใช้เพื่อหยุดเลือดจากบาดแผลได้ (Ghani, 2003) จากการศึกษาฤทธิ์สารสกัดจากพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆ ได้รายงานการพบว่าที่หุ้มดอก เกสร และผลลำพู มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชป่าชายเลนอื่นเมื่อทดสอบด้วย โดยการที่สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีจึงเป็นไปได้ว่าจะมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์อื่นๆ โดยเฉพาะส่วนเมล็ดก็มีฤทธิ์ดังกล่าวเช่นกัน (ธวัชชัย และคณะ, 2549)

ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาการเตรียมโครงสร้างความพรุนสูง chitosan ผสมกับอคาเซียเพื่อบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่สกัดจากเมธานอล ซึ่งในผงแห้งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยศึกษาถึงวิธีการเตรียม chitosan และ acacia ให้อยู่ในรูปโครงสร้างที่มีความพรุนสูงผ่านการ freeze drying จากนั้นจึงบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ใช้ตัวทำละลายต่างกัน และความเข้มข้นต่างกัน เข้าไปในโครงสร้างความพรุนสูง คุณลักษณะพื้นผิวและภาพตัดขวางด้วย Scanning Electron Microscope แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar-diffusion method เพื่อหาตัวทำละลาย และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู โครงสร้างความพรุนสูงที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูนี้ น่าจะสามารถพัฒนาเป็นแผ่นแปะแผลให้หายเร็วขึ้น และป้องกันการติดเชื้อจากฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารสกัดดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

A. การเตรียมและทดสอบสมบัติเจลไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

สารเคมี

1. Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemic GmbH เมือง Buchs ประเทศ Spain)
2. Lutrol[®] F127 (Lot. WPTX607B, VITA CO., LTD กรุงเทพมหานคร)
3. HPMC K 15 M (Lot No. PH26012N31, Dow Chemical, USA)
4. N-methyl pyrrolidone (NMP) (Solubilizer N) (Sigma-Aldrich Chemic GmbH ประเทศ Switzerland)
5. Citrate-Phosphate Buffer pH 5.5
6. สาร 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich เมือง Steinheim ประเทศ Germany)
7. สาร (±)- α -Tocopherol, approx. 95% HPLC (Sigma-Aldrich เมือง Steinheim ประเทศ Germany)
8. สาร L-Ascorbic acid (Fisher Scientific UK Limited เมือง Leics ประเทศ United Kingdom)
9. สาร Potassium persulphate (Unilab เมือง Seven Hills ประเทศ Australia)
10. สารละลาย Ethanol (Merck KGa A เมือง Darmstadt ประเทศ Germany)
11. SDA (Difco[™] Sabouraud Dextrose Agar: Becton, Dickinson and Company Sparks)
12. SDB (Difco[™] Sabouraud Dextrose Broth: Becton, Dickinson and Company Sparks)
13. TSA (Difco[™] Tryptic Soy Agar (Soybean-casein Digest Agar): Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
14. TSB (Difco[™] Tryptic Soy Broth (Soybean-casein Digest Agar): Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
15. ยา ampicillin disc 10 μ g (OXOID – Antimicrobial Susceptibility test discs, Oxoid Limited เมือง Hampshire ประเทศ England)

เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องวัดความหนืด Brookfield DV-III ULTRA programmable rheometer ของบริษัท BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, INC. เมือง Middleboro สหรัฐอเมริกา
2. pH meter รุ่น Professional Meter Sartorius
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB shaking incubator ของบริษัท Sheldon Mfg. Inc. เมือง Cornelius รัฐ Oregon ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. UV-Visible spectrophotometer รุ่น 8453 E ของบริษัท Agilent technology ประเทศจีน

5. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ยี่ห้อ Sanden intercool
6. ตู้อบ Climatic chamber รุ่น KBF 240 บริษัท Binder GmbH Bergsh
7. เครื่อง Vortex-2 ของบริษัท Scientific industries, inc เมือง New York ประเทศ USA
8. Autoclave (REXALL-LS-ZD: Rexall industries co; Ltd, Kaohsiung ประเทศไต้หวัน)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การพัฒนาสูตรตำรับเจลกรดแกลลิกโดยใช้สารก่อเจล 2 ชนิดคือ Poloxamer และ HPMC

1.1. การศึกษาความเข้มข้นของ Poloxamer (Lutrol® F127) ที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เตรียมระบบเจลจาก poloxamer ชนิด lutrol F127 ด้วยวิธี cold method (Schmolka, 1972) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารละลาย Poloxamer ที่มีอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นเจล (Tsol-gel) ในช่วงอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิ 35°C จะมีความเข้มข้นประมาณ 15-20% w/w แต่ทั้งนี้สารสำคัญที่ใช้ในตำรับคือกรดแกลลิก (Gallic acid) อาจมีผลเปลี่ยนแปลง Tsol-gel ของสารละลาย Poloxamer ให้เพิ่มขึ้นได้และเนื่องจากต้องการบรรจุกรดแกลลิกในปริมาณมากจึงอาจมีผลให้ Tsol-gel สูงขึ้นมาก จึงเลือกความเข้มข้นของ Poloxamer ที่ 20 % w/w ในการตั้งตำรับเพื่อให้มี Tsol-gel อยู่ในช่วงอุณหภูมิห้องได้หลังจากใส่กรดแกลลิกในตำรับแล้ว

ค่าการละลายของกรดแกลลิกในน้ำคือ 1 g ในน้ำ 87 mL หรือ 11.5 mg ในน้ำ 1 mL (Hensen และ Just, 2001; O'Neil, 2001) ซึ่งค่อนข้างต่ำ และเนื่องจากต้องการบรรจุกรดแกลลิกให้ได้ปริมาณมากขึ้นจึงใช้สารช่วยเพิ่มการละลาย (Solubilizer) ซึ่งในที่นี้ใช้สารช่วยเพิ่มการละลาย N (Solubilizer N)

1.1.1. หาปริมาณของ solubilizer N ที่เหมาะสมในการเตรียมเจลพื้น

วิธีการทดลอง

- 1) เตรียมสารละลาย Poloxamer 20% w/w ของตำรับเจลพื้น โดยละลาย Lutrol® F127 ในน้ำเย็นอุณหภูมิประมาณ 4-5°C คนจนละลายหมด บรรจุในขวดยาหม่องจำนวน 6 ตำรับ
- 2) ใส่ Solubilizer N ในแต่ละตำรับโดยเติมปริมาณ 5%, 10%, 15%, 20%, 25% และ 30% w/w ตามลำดับ คนผสมให้เข้ากัน
- 3) นำสารละลายที่เตรียมได้ไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4°C เป็นเวลา 1 คืนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีขึ้น
- 4) นำตำรับเจลพื้น que เตรียมได้ออกจากตู้เย็น สังเกตลักษณะภายนอกคือสี ความใส และความเป็นเนื้อเดียวกันของเจล บันทึกผล
- 5) สังเกตการเปลี่ยนสถานะจากสารละลาย (sol) ไปเป็นเจล (gel) โดยจับเวลาที่ 5 นาที, 20 นาที และ 40 นาที ดูการไหล ความหนืดของสารละลาย โดยสังเกตด้วยตาเปล่า บันทึกผล ตามวิธีของ Yang และคณะ (2009)
- 6) วัด pH ของตำรับเจลพื้นโดยเตรียมสารละลายเจลพื้นเข้มข้น 1% w/v ในน้ำกลั่น แล้ววัด pH ด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล

1.1.2. การศึกษาคุณสมบัติเชิงความร้อน ด้วยเครื่องมือ Differential scanning calorimeter (DSC) (เครื่องวิเคราะห์ห่อหุ้มโดยใช้รังสีความร้อน)

1)เตรียม pan ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างสูตรตำรับต่าง ๆ ใส่ลงใน Sealed sample pan สำหรับของเหลว ให้ได้ปริมาณสาร 5.800 มิลลิกรัม แล้วปิดด้วย Sealed sample pan cover

2)นำ pan ตัวอย่าง เข้าสู่ส่วนวิเคราะห์ของเครื่อง Differential scanning calorimeter โดยควบคุมการวิเคราะห์ดังนี้

2.1) ช่วงอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ถึง 70 องศาเซลเซียส ใน อัตราการให้ความร้อน (heating rate) 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (ทดสอบตำรับที่ประกอบด้วย Solubilizer N ในความเข้มข้น 0% 10% 20% 30% 50% 60% 80% ของสูตรตำรับที่มี Lutrol® F127 เป็นพอลิเมอร์ 20% (L20, L20N10, L20N20, L20N30, L20N50, L20N60, L20N80))

2.2) ช่วงอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ถึง 70 องศาเซลเซียส ใน อัตราการให้ความร้อน(heating rate) 5 10 และ 20 องศาเซลเซียสต่อนาที (ทดสอบตำรับที่ประกอบด้วย Solubilizer N ในความเข้มข้น 80% ของสูตรตำรับที่มี Lutrol F127 เป็นพอลิเมอร์ 20%(L20N80))

1.1.3. การหาปริมาณกรดแกลลิกที่เหมาะสมในการบรรจุในตำรับเจลพื้น L20N25 (Lutrol F127® 20 %w/w + Solubilizer N 25% w/w)

วิธีการทดลอง

- 1) เตรียมเจลพื้น L20N25 จำนวน 10 ขวด (แต่ละขวดห้กลับปริมาณกรดแกลลิกที่ต้องเติมแล้ว) แช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ไว้ 1 คืนให้ได้ตำรับที่ใสและเป็นเนื้อเดียวกัน
- 2) นำเจลพื้นที่ได้มาบรรจุกรดแกลลิก ผสมในถึงน้ำแข็งโดยเติมปริมาณ 1 % w/w ในขวดที่ 1 เพิ่มปริมาณครั้งละ 1% w/w จนถึง 10 % w/w ในขวดที่ 10 ตามลำดับ คนจนกรดแกลลิก ละลายหมด รอจนสารละลายที่ได้ใส ไม่มีฟอง
- 3) สังเกตลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลกรดแกลลิกที่เตรียมได้ สังเกตความหนืด การเปลี่ยนแปลงสถานะจากสารละลายไปเป็นเจลเมื่อนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล

1.1.4. การหาปริมาณกรดแกลลิกที่เหมาะสมในการบรรจุในตำรับเจลพื้น L25N25 (Lutrol F127® 25 %w/w + Solubilizer 25% w/w)

วิธีการทดลอง

- 1) เตรียมเจลพื้น L25N25 จำนวน 8 ขวด (แต่ละขวดห้กลับปริมาณกรดแกลลิกที่ต้องเติมแล้ว) แช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ไว้ 1 คืนให้ได้ตำรับที่ใสและเป็นเนื้อเดียวกัน
- 2) นำเจลพื้นที่ได้มาบรรจุกรดแกลลิก ผสมในถึงน้ำแข็งโดยเติมปริมาณ 1 % w/w ในขวดที่ 1 เพิ่มปริมาณครั้งละ 1% w/w จนถึง 8 % w/w ในขวดที่ 8 ตามลำดับ คนจนกรดแกลลิก ละลายหมด รอจนสารละลายที่ได้ใส ไม่มีฟอง
- 3) สังเกตลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลกรดแกลลิกที่เตรียมได้ สังเกตความหนืด การเปลี่ยนแปลงสถานะจากสารละลายไปเป็นเจลเมื่อนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล
- 4) วัดความหนืดของตำรับที่อุณหภูมิ 4°C, 28°C และ 35°C โดยใช้เครื่องวัดความหนืด
- 5) วัด pH ของตำรับ โดยนำเจลไปละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1% w/v บันทึกผล

1.2. ศึกษาการเตรียมตำรับเจลกรดแกลลิกโดยใช้ HPMC เป็นสารก่อเจล

การทดลองนี้จะเตรียมสูตรตำรับเจลกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นของกรดแกลลิก 5% w/w โดยใช้ HPMC เป็นสารก่อเจลในปริมาณ 3% w/w และใช้ solubilizer N 25% w/w ได้เป็นตำรับเจล กรดแกลลิก H3N25G5 เพื่อใช้เป็นตำรับเจลเปรียบเทียบกับตำรับเจลกรดแกลลิกที่ใช้ Lutrol® F127 เป็นสารก่อเจล

วิธีการเตรียมตำรับ

- 1) เตรียมเจลพื้น HPMC โดยใช้ความเข้มข้น HPMC 3% w/w โดยค่อยๆ โปริย HPMC ลงในน้ำ คนผสมจน HPMC พองตัวได้สารละลายที่มีความหนืด
- 2) ใส่ solubilizer N ปริมาณ 25% w/w ลงในเจลที่เตรียมได้ คนผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 3) ใส่กรดแกลลิกปริมาณ 5% w/w ของตำรับ คนจนกรดแกลลิกละลายหมด
- 4) สังเกตลักษณะทางกายภาพของเจลที่เตรียมได้ รวมทั้งวัดความหนืดและ pH ของตำรับ บันทึกผล

2. การศึกษาค่าการละลายของกรดแกลลิก (Gallic acid)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมระบบสารละลาย A, B, C และ D ในหลอดทดลองแบบฝาเกลียวโดยเติม Gallic acid จนกว่าจะอิ่มตัว โดยแต่ละระบบสารละลายประกอบด้วยสารต่างๆดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่างๆในระบบที่ใช้ทดสอบค่าการละลายของ gallic acid

Component	Solubilizer N	Lutrol® F127	H ₂ O (qs to)	Gallic acid
A	5 g	-	-	Excess
B	1.25 g (25%w/w)	1.25 g (25%w/w)	5 g	Excess
C	1.25 g (25%w/w)	-	5 g	Excess
D	-	-	5 g	Excess

2. นำสารที่ได้ในแต่ละตำรับไปตั้งทิ้งไว้ที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ° ซ ที่มีรอบการหมุนเท่ากับ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดส่วน supernatant มาเจือจางและวิเคราะห์หาปริมาณ Gallic acid ที่ละลายได้ดังต่อไปนี้

- A. pipette ตำรับ Solubilizer N 25%w/w + Gallic acid จำนวน 10 µL ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1000 µL แล้ว pipette สารละลายในหลอดทดลอง จำนวน 10 µL เติมน้ำกลั่น 7900 µL จะได้สารละลายเจือจาง 1:8000
- B. pipette ตำรับ H₂O+ Solubilizer N 25%w/w + Lutrol F127 25%w/w + Gallic acid จำนวน 10 µL ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1000 µL แล้ว pipette สารละลายในหลอดทดลอง จำนวน 10 µL เติมน้ำกลั่น 4900 µL จะได้สารละลายเจือจาง 1:5000
- C. pipette ตำรับ H₂O+ Solubilizer N 25%w/w + Gallic acid จำนวน 10 µL ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1000 µL แล้ว pipette สารละลายในหลอดทดลอง จำนวน 10 µL เติมน้ำกลั่น 3900 µL จะได้สารละลายเจือจาง 1:4000

- D. pipette ต่ำรับ H_2O +Gallic acid จำนวน 10 μL ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 1000 μL แล้ว pipette สารละลายในหลอดทดลอง จำนวน 10 μL เติมน้ำกลั่น 1900 μL จะได้สารละลายเจือจาง 1:2000
3. นำสารละลายที่เจือจางแล้วในข้อ 2.1-2.4 มาวิเคราะห์ปริมาณ Gallic acid ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 307 nm และคำนวณหาปริมาณ Gallic acid ที่ละลายได้ในแต่ละระบบ

วิธีการคำนวณ

- 1) คำนวณปริมาณกรดแกลลิกจากสมการที่ได้จาก standard curve คือ $y = 1.4911x - 0.0128$ (y คือ ค่าการดูดกลืนแสง, x คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิก หน่วยเป็น mg/mL)
- 2) หาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นในแต่ละตำรับ
- 3) นำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นคูณกับค่า dilution factor จะได้ค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของกรดแกลลิก

3. การทดสอบคุณสมบัติของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

3.1. การศึกษาพฤติกรรมการไหล (Rheology) ของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

วิธีการทดลอง

- 1) เตรียมเจลแกลลิกความเข้มข้นที่เลือกไว้
- 2) ปรับอุณหภูมิให้ได้ที่ต้องการ คือ 4°C อุณหภูมิห้อง (~28°C) และ 35°C ตามลำดับ
- 3) วัดความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield ซึ่งมี cone ขนาดเบอร์ 52
- 4) ค่อยๆ เพิ่มอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ไปเรื่อยๆ จากต่ำสุด วัดความหนืดของเจล หลังเปลี่ยนอัตราเร็วแต่ละครั้งประมาณ 10-20 วินาที จนเครื่องไม่สามารถอ่านค่าความหนืดของเจลได้จึงค่อยๆ ลด Shear rate ลง
- 5) นำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟระหว่าง shear rate กับ shear stress
- 6) จากสมการ $\log G = N \log F - \log \eta'$ พล็อตกราฟระหว่าง $\log G$ กับ $\log F$ (Martin, 1993)
ความชันของกราฟคือค่า N โดยแปลผลการไหลของตำรับจากเกณฑ์ดังนี้
ถ้าใกล้เคียง 1 คือ newtonian
ถ้าน้อยกว่า 1 คือ Dilatant
ถ้ามากกว่า 1 คือ Pseudoplastic หรือ Plastic กรณีที่มีค่า yield point

3.2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity assay (AEAC) ทั้งนี้ดัดแปลงการทดสอบตามวิธีการทดสอบของ Re และคณะ (1999)

3.2.1. การเตรียมสารที่ใช้ใน AEAC assay

3.2.1.1. การเตรียม ABTS radical cation ($ABTS^{2\cdot-}$) ตามขั้นตอนดังนี้

- a) เตรียม 7 mM $ABTS^{2\cdot-}$ โดยชั่ง $ABTS$ 0.096 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น DI
- b) เตรียม 2.45 mM Potassium persulfate โดยชั่ง Potassium persulfate 0.0165 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น DI
- c) 3.2.1.1.3 เตรียมสารละลาย $ABTS$ โดยเทสาร 7 mM $ABTS^{2\cdot-}$ ที่เตรียมในข้อ 1.1 จำนวน 25 mL ลงใน flask ขนาด 100 mL จากนั้นเท 2.45 mM Potassium persulfate จำนวน 25 mL

ผสมลงไปโดยไม่ต้องปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

3.2.1.2. การเตรียมสารละลาย ascorbic acid (stock solution) โดยชั่ง ascorbic acid 0.005 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วย Ethanol

3.2.1.3. การเตรียมสารละลาย vitamin E (stock solution) โดยชั่ง vitamin E 0.025 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วย Ethanol

3.2.1.4. การเตรียมสารละลาย gallic acid (stock solution) โดยชั่ง gallic acid 0.025 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วย Ethanol

3.2.1.5. การเตรียมสารละลายเจล L25N25G5 โดยชั่ง เจล L25N25G5 0.020 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 99.9 % Ethanol

3.2.1.6. การเตรียมสารละลาย เจล L25N25G5 ภายหลัง stability test โดยชั่งเจล L25N25G5 ภายหลัง stability test 0.020 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 99.9 % Ethanol

3.2.1.7. การเตรียมสารละลายเจล H3N25G5 โดยชั่ง เจล H3N25G5 0.050 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 99.9 % Ethanol

3.2.1.8. การเตรียมสารละลาย เจล H3N25G5 ภายหลัง stability test โดยชั่ง เจล H3N25G5 ภายหลัง stability test 0.050 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 99.9 % Ethanol

3.2.1.9. การเตรียมสารละลายเจล L25N25 โดยชั่ง เจล L25N25 0.2 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วย 99.9 % Ethanol

3.2.2. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid

3.2.2.1. เตรียมสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 50, 90, 130, 170 และ 210 µg/mL จาก stock solution

3.2.2.2. แบ่งสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วยความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น จนได้ Absorbance ที่ ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.70 ± 0.02 โดยสภาวะที่การทดลองคือ อุณหภูมิห้อง และ ไม่มีแสง

3.2.2.3. ปิเปตสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้วปริมาณ 3mL ใส่ในหลอดทดลอง ที่ห่อด้วย aluminium foil

3.2.2.4. ปิเปตสารละลายเจือจางของ ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 50 µL ใส่ในหลอดทดลอง ในข้อที่ 2.3 ปั่นผสมให้เข้ากันบน Voltex mixture ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm ครั้งแรกเป็นนาทีที่ 1 และตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที วัด Absorbance ครั้งที่สองเป็นนาทีที่ 6

3.2.2.5. คำนวณค่าต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (%inhibition) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ ascorbic acid โดยสามารถคำนวณได้ดังสูตร

$$\%inhibition = [(A \text{ ABTS เริ่มต้น} - A \text{ ABTS นาทีที่6}) / A \text{ ABTS เริ่มต้น}] \times 100$$

3.2.2.6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ascorbic acid กับค่าต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (%inhibition) เพื่อหาค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50})

3.2.3. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลาย vitamin E

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลาย vitamin E ให้มีความเข้มข้น 150, 250, 350, 450 และ 550 µg/mL

3.2.4. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลาย gallic acid

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลาย gallic acid ให้มีความเข้มข้น 10, 30, 50, 70 และ 90 µg/mL

3.2.5. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล L25N25G5

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลายเจล L25N25G5 ให้มีความเข้มข้น 300, 600, 900, 1300 และ 1700 µg/mL โดยคิดเป็นความเข้มข้นของสาร gallic acid เท่ากับ 15, 30, 45, 65 และ 85 µg/mL ตามลำดับ

3.2.6. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล L25N25G5 ภายหลัง stability test

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลายเจล L25N25G5 ภายหลัง stability test ให้มีความเข้มข้น 400, 800, 1200, 1600 และ 2000 µg/mL โดยคิดเป็นความเข้มข้นของสาร gallic acid เท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/mL ตามลำดับ

3.2.7. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล H3N25G5

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลายเจล H3N25G5 ให้มีความเข้มข้น 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 µg/mL โดยคิดเป็นความเข้มข้นของสาร gallic acid เท่ากับ 25, 50, 75, 100 และ 125 µg/mL ตามลำดับ

3.2.8. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล H3N25G5 ภายหลัง stability test

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย ascorbic acid โดยเจือจางสารละลายเจล H3N25G5 ภายหลัง stability test ให้มีความเข้มข้น 250, 650, 1000, 1250 และ 1750 µg/mL โดยคิดเป็นความเข้มข้นของสาร gallic acid เท่ากับ 12.5, 32.5, 50.0, 62.5 และ 87.5 µg/mL ตามลำดับ

3.3. การศึกษาการปลดปล่อยกรดแกลลิกออกจากตำรับเจล

วิธีการทดลอง

- 1) บรรจุเจลกรดแกลลิกลงในถ้วยตะไล (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 cm ความสูงประมาณ 1 cm) ที่ทราบน้ำหนักจนเต็มพอดีขอบถ้วยจำนวน 6 ถ้วย โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศแทรกอยู่ในเนื้อเจล แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยหลังบรรจุเจล คำนวณปริมาณเจลที่บรรจุในแต่ละถ้วย
- 2) อุ่น Citrate-Phosphate Buffer pH 5.5 จนได้อุณหภูมิประมาณ 35°C ตวง buffer ปริมาตร 40 mL ใส่ขวดแก้วมีฝาปิดขนาด 50 mL จำนวน 6 ขวด
- 3) นำขวดแก้วไปใส่ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ แล้วใช้ forcep คีบถ้วยกระเบื้องใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุ buffer แล้วปิดฝาขวดให้เรียบร้อย

- 4) กำหนดสภาวะในการทำ dissolution test คือ รอบเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 35°C สุ่มตัวอย่างครั้งละ 5 mL โดยใช้ micropipette แล้วเติม buffer กลับลงไปครั้งละ 5 mL ทำการสุ่มที่เวลา 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 และ 480 นาที
- 5) นำตัวอย่างที่สุ่มได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrometer ที่ 307 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดแกลลิกที่ปลดปล่อยออกมาจากเจลที่เวลาต่างๆ ทั้งนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 5 % w/w ที่ละลายในสารละลาย Solubilizer N 25% w/w ในน้ำ

วิธีการคำนวณ

- 1) คำนวณปริมาณกรดแกลลิกในสารละลาย 5 mL ที่สุ่มมาที่เวลาต่างๆจากสมการที่ได้จาก standard curve คือ $y = 1.4911x - 0.0128$ (y คือ ค่าการดูดกลืนแสง, x คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิก หน่วยเป็น mg/mL)
- 2) คำนวณปริมาณกรดแกลลิกใน 40 mL ที่เวลาต่างๆ
- 3) หาปริมาณกรดแกลลิกสะสมที่เวลาต่างๆโดยนำค่าที่คำนวณได้ใน 40 mL บวกกับค่าใน 5 mL ของเวลาที่สุ่มก่อนหน้านี้ แล้วคำนวณปริมาณสะสมที่เวลาต่างๆเป็น % Release โดยเทียบกับน้ำหนักเจลที่ชั่งได้ในแต่ละถ้วย
- 4) นำค่า % Release ที่เวลาต่างๆของแต่ละถ้วยมาหาค่าเฉลี่ยแล้วสร้างกราฟระหว่าง % Release และ Time (min)

ข้อมูลการปลดปล่อยยาที่ได้นำมาพิตกับสมการการปลดปล่อยยาต่างๆ คือ power law expression, Higuchi's equation, first order และ zero order equation ด้วยเทคนิค nonlinear regression โดยใช้โปรแกรม Scientist for Windows, version 2.1 (MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT, USA) (MicroMath, 1995) เพื่อหาหลักในการปลดปล่อยยานี้โดยพิจารณาจากค่า coefficient of determination (r^2) และ model selection criteria (msc) ซึ่งหากมีค่าที่สูงแสดงถึงข้อมูลการปลดปล่อยยาดังกล่าวพิตได้ดีกับสมการนั้นๆ

3.4. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

วิธีทำการทดลอง

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดย ชั่ง TSA 20 g ละลายในน้ำกลั่น 500 mL ตั้งบน hot plate คนสม่ำเสมอจนได้สารละลายสีเหลืองใส นำไปต้ม 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121°C (1.2 kg/cm²)
2. นำเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* จาก slant มาเลี้ยงต่อใน TSB และ *C. albican* จาก slant มาเลี้ยงต่อใน SDB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่มแล้วมา 100 μ L ลงใน TSB หลอดใหม่ แล้วนำไปบ่มต่อ 4 ชั่วโมงภายในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที
3. นำเชื้อที่บ่มแล้วมา เจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 โดยวัด absorbance ที่ ความยาวคลื่น 530 nm ให้อยู่ประมาณ 0.5
4. นำเชื้อที่เจือจางแล้วมา spread บน plate ด้วยไม้พันสำลี ให้กระจายทั่วทั้ง plate
5. วาง cup stainless ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร และ disc ยา ampicillin ตามจุดที่กำหนด โดยวางให้ห่างเท่าๆ กัน โดย จะหยอดสารสูตรตำรับที่เตรียมขึ้นใน cup จนเต็ม cup เพื่อทดสอบดังรูปที่ 7

6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (ในกรณี *C. albican* บ่มนาน 72 ชั่วโมง)
7. วัด clear zone หรือ inhibition area โดยแสดงในรูปเส้นผ่านศูนย์กลางโดยวัดด้วยไม้บรรทัดแล้วนำมาเฉลี่ย (n=3)



รูปที่ 7 วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อโรคด้วย cup method

3.5. การทดสอบความคงตัวของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ (Stability test - Temperature Cycling)

วิธีการทดสอบ

- 1) เตรียมเจลกรดแกลลิก 20 กรัมบรรจุในขวดยาหม้อมีฝาปิดจำนวน 3 ชุดดังนี้
 - ชุดที่ 1 สูตรตำรับ L25N25G5 และสูตรตำรับ H3N25G5 สูตรตำรับละ 3 ขวด สำหรับการทำ Temperature cycling (เก็บที่ 4°C ในตู้เย็น ยี่ห้อ Sanden intercool สลับกับเก็บที่ 45°C ในตู้อบ Climatic chamber รุ่น KBF 240 บริษัท Binder GmbH Bergsh)
 - ชุดที่ 2 สูตรตำรับ L25N25G5 และสูตรตำรับ H3N25G5 สูตรตำรับละ 3 ขวด สำหรับเก็บไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้องเป็นตำรับควบคุมสำหรับเปรียบเทียบ
 - ชุดที่ 3 สูตรตำรับ L25N25G5 จำนวน 3 ขวด สำหรับเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°C เป็น control
- 2) นำเจลชุดที่ 1 เป็นชุดทดสอบ stability โดยทำ Temperature cycling (4°C สลับกับ
- 3) 45°C) โดยเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน นับเป็น 1 รอบ แล้วเก็บสลับต่อไปจนครบ 5 รอบ
- 4) นำเจลกรดแกลลิกในชุดที่ 2 ไปเก็บไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้องและชุดที่ 3 เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาเท่ากับชุดที่ทำ temperature cycling
- 5) เมื่อทำ temperature cycling ครบ 5 รอบ นำตำรับเจลจากทั้ง 3 ชุดมาสังเกตลักษณะทางกายภาพ เช่น สี ความหนืด วัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดและวัดค่า pH ด้วย pH meter

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาปริมาณของ solubilizer N ที่เหมาะสมในการเตรียมเจลพื้น

ในการเตรียมเจลพื้น Lutrol® F127 โดยใช้สาร Solubilizer N ในความเข้มข้นที่ต่างกันพบว่าได้เจลพื้นที่มีความใสทุกตำรับ และตำรับ L20N30 จะมีเนื้อเจลมีลักษณะเป็นมันมาก และจากการสังเกตความหนืดของตำรับยา พบว่ามีความหนืดเพิ่มขึ้นตามปริมาณ solubilizer ที่เพิ่มขึ้น และการสังเกตการณ์เปลี่ยนสถานะจากสารละลายไปเป็นเจลพบว่าตำรับที่มีปริมาณ Solubilizer มากกว่าจะมีการเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลได้เร็วกว่า (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า Solubilizer ซึ่งเข้ากันกับน้ำได้ดีจะไปแย่งน้ำออกจากโมเลกุล Poloxamer ส่วน PPO ทำให้เกิดการก่อตัวเป็นไมเซลล์ (micelle) ได้เร็วขึ้น หรือคือมี Tsol-gel ที่ต่ำลง (Ivanova และคณะ, 2001) ดังนั้นจึงมีปริมาณ Solubilizer N นี้มากจะยิ่งทำให้ Tsol-gel ต่ำลงมาก ส่วน pH ของตำรับเจลพื้นที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง pH 5 ดังนั้นอาจถือได้ว่าปริมาณ solubilizer N ที่แตกต่างกันไม่มีผลทำให้ pH เปลี่ยนแปลง จากผลการสังเกตลักษณะทางกายภาพ การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจล และค่า pH ของตำรับ พบว่าตำรับเจลพื้น L20N25 มีความเหมาะสมในการนำไปใช้บรรจุกรดแกลลิกต่อไปเนื่องจากได้ตำรับที่มีความใส เนื้อเจลเข้ากันเป็นเนื้อเดียว มีความหนืดและระยะเวลาในการเปลี่ยนสถานะเหมาะสม และปริมาณ solubilizer มากเพียงพอในการช่วยเพิ่มการละลายของกรดแกลลิกได้ดี ซึ่งคาดว่าจะช่วยทำให้บรรจุกรดแกลลิกในตำรับได้มากขึ้น มีรายงานว่าสารทำละลาย เช่น glycerol และ ethanol ที่มีผลต่อการเปลี่ยนวัตถุภาคของระบบที่มีพอลิเมอร์นี้เป็นองค์ประกอบและมีผลต่อโครงสร้างของพอลิเมอร์ (Ivanova และคณะ, 2001) ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ที่ไม่ละลายในน้ำ เช่น indomethacin และ naproxen สามารถลดขนาดไมเซลล์ของพอลิเมอร์นี้ และยายังลดการจับตัวจึงลดจำนวนของไมเซลล์ได้ (Sharma และ Bhatia, 2004)

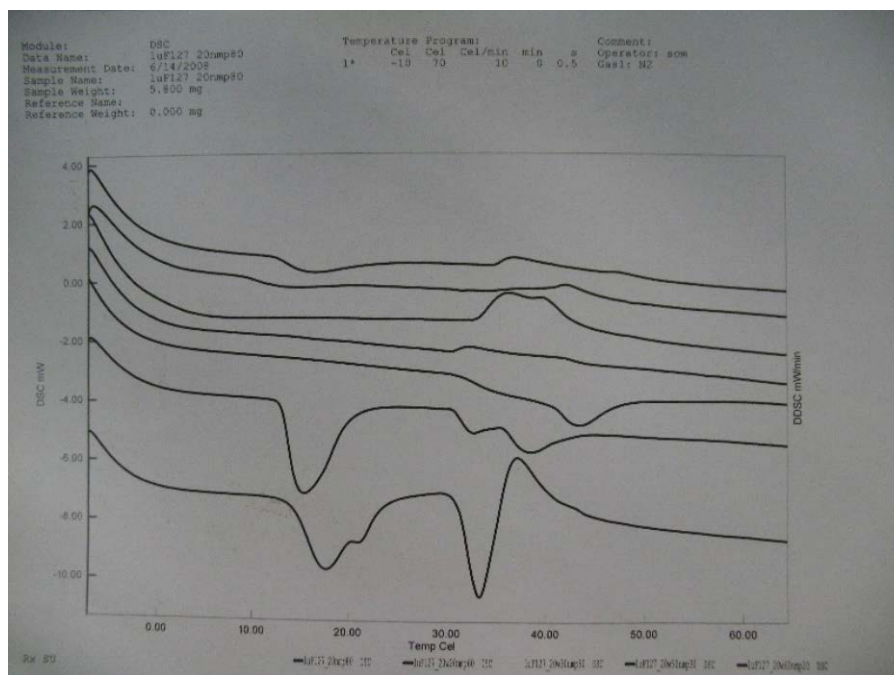
ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ การเปลี่ยนสถานะ และ pH ของเจลพื้น

ลำดับที่	สูตรตำรับ	ลักษณะทางกายภาพที่อุณหภูมิห้อง	ลักษณะการเปลี่ยนสถานะหลังนำออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	pH $\pm$ S.D.
1	L20N5	สารละลายใส ไม่มีสี มีความหนืดน้อย (+)	ที่ 5 นาที เหลวไหลดี ที่ 40 นาที หนืดขึ้น	5.103 $\pm$ 0.114
2	L20N10	สารละลายใส หนืดเล็กน้อย(++)แต่ยังไหลได้	ที่ 5 นาที เหลวไหลดี ที่ 20 นาที หนืดกว่าสูตร L20N5 ที่ 40 นาที หนืดขึ้น	5.113 $\pm$ 0.124
3	L20N15	สารละลายใส หนืดเล็กน้อย(++)แต่ยังไหลได้	ที่ 5 นาที เหลวไหลดี ที่ 20 นาที หนืดกว่าสูตร L20N5 ที่ 40 นาที หนืดขึ้น	5.002 $\pm$ 0.144
4	L20N20	สารละลายใส หนืดมากขึ้น(+++)	ที่ 5 นาที เหลวไหลดี ที่ 20 นาที หนืดขึ้นกว่าสูตรที่ 1-3 ที่ 40 นาที เป็นเจลไม่ไหล	5.214 $\pm$ 0.167
5	L25N25	สารละลายใส หนืดมากขึ้น(+++)	ที่ 5 นาที เหลวไหลดี ที่ 20 นาที เป็นเจลไม่ไหล	5.022 $\pm$ 0.179
6	L25N30	สารละลายค่อนข้างใส มีความหนืดมาก (+++++) เนื้อเจลเป็นมัน แยกชั้น	ที่ 5 นาที หนืดเร็วมากทันที ที่ 20 นาที เป็นเจลไม่ไหล	5.295 $\pm$ 0.111

หมายเหตุ L คือ Lutrol® F127; N คือ Solubilizer N ซึ่งหมายถึง NMP; ตัวเลขด้านหลังตัวอักษร L และ N แสดงปริมาณในตำรับ (% w/w)

การศึกษาคุณสมบัติเชิงความร้อน ด้วยเครื่องมือ Differential scanning calorimeter (DSC)
(เครื่องวิเคราะห์ห่อหุ้มโดยใช้รังสีความร้อน)

โดยทั่วไปในการเปลี่ยนแปลงพลังงานในการเกิดเจลที่ถูกเหนี่ยวนำจากอุณหภูมิสามารถตรวจวัดได้ด้วย DSC (Wanka และคณะ, 1994; Scherlund และคณะ, 2000) จากการศึกษาตำรับที่ประกอบด้วย Solubilizer N ในความเข้มข้น 0% 10% 20% 30% 50% 60% 80% ของสูตรตำรับที่มี Lutrol F127 เป็นพอลิเมอร์ 20% (L20, L20N10, L20N20, L20N30, L20N50, L20N60, L20N80) (ตัวเลขหลัง L คือความเข้มข้นของ Lutrol F127 และตัวเลขหลัง N เป็นความเข้มข้นของ solubilizing agent N โดยน้ำหนัก) แสดงในรูปที่ 8 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบ Exothermic โดยพบว่าความเข้มข้นของ Solubilizer N ในตำรับยิ่งเข้มข้นมากขึ้นการเกิดเจลก็จะใช้อุณหภูมิต่ำมากขึ้น (อาจเกิดจากการ crosslink ของโมเลกุลพอลิเมอร์) แสดงได้จากสารละลายเป็นเจลในช่วงอุณหภูมิ 15.46 องศาเซลเซียส ถึง 17.69 องศาเซลเซียส ในตำรับที่ประกอบด้วย Solubilizer N ในความเข้มข้น 60% (L20N60) และ 80% (L20N80) ส่วนในตำรับอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับการสังเกตลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงสถานะด้วยสายตา สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ Solubilizer N ที่มากขึ้นมีผลต่อความหนืดหรือการเปลี่ยนแปลงสถานะของตำรับจากของเหลวเป็นเจลได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาตำรับที่ประกอบด้วย Solubilizer N ในความเข้มข้น 80% (L20N80) ของสูตรตำรับที่มี Lutrol F127 เป็นพอลิเมอร์ 20% ที่อัตราการให้ความร้อนต่างๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบ Exothermic ในช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกันคือ 17.04 องศาเซลเซียส ถึง 22.23 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาข้างต้นก่อนหน้านี้ จากการศึกษาพบว่าการให้ความร้อนยิ่งต่ำจะทำให้ได้ DSC Thermograms ที่ยิ่งละเอียด แต่อย่างไรก็ตามการให้อัตราการให้ความร้อนที่ต่ำจะต้องให้เวลาในการวิเคราะห์ที่นานเกินไป ดังนั้นอัตราการให้ความร้อนที่เหมาะสมคือ 10 องศาเซลเซียสต่อ นาที จึงสรุปได้ว่าการใช้ Solubilizer N ไม่ควรใช้ในความเข้มข้นที่สูง เนื่องจากจะมีผลทำให้ตำรับมีการเปลี่ยนแปลงจากของเหลวเป็นเจลเร็วเกินไป



รูปที่ 8 DSC Thermograms ของเจล Lutrol® F127 ที่มีปริมาณ Solubilizer N

ผลการหาปริมาณกรดแกลลิกที่เหมาะสมในการบรรจุในตำรับเจลพื้น L20N25 (Lutrol F127® 20 %w/w + Solubilizer N 25% w/w)

ในการทดลองบรรจุกรดแกลลิกในปริมาณที่ต่างกันลงในเจลพื้นสูตร L20N25 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่าได้สูตรตำรับเจลที่ใส และมีสีเหลืองอ่อนๆ โดยสีเหลืองมีความเข้มข้นตามปริมาณของกรดแกลลิกที่เพิ่มขึ้น ผลการสังเกตความหนืดด้วยตาเปล่าและจากการวัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดพบว่า ความหนืดของตำรับเจลลดลงเมื่อปริมาณกรดแกลลิกในตำรับเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณกรดแกลลิกสูงสุดที่ยังสามารถวัดความหนืดได้ที่ 0.1 rpm คือ 3% w/w ซึ่งจากการสังเกตยังสามารถเปลี่ยนสถานะเป็นเจลไม่ไหลได้เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 40 นาที ทั้งนี้ผลของการทำให้ความหนืดของเจลลดลงของกรดแกลลิกอาจเนื่องมาจากกรดแกลลิกสามารถละลายใน Solubilizer ได้ดีกว่าน้ำจึงดึง solubilizer ออกจากโมเลกุลของน้ำทำให้มีโมเลกุลของน้ำไปละลายสาย Poloxamer ส่วน PPO ได้มากขึ้น จึงมีการก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ช้าลง หรือคือมี Tsol-gel สูงขึ้นมากกว่า 35°C ทำให้ยังคงเป็นสารละลายไม่เปลี่ยนไปเป็นเจลที่ 35°C ดังนั้นปริมาณกรดแกลลิกยิ่งสูง การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลยิ่งช้าลง จากผลการเตรียมตำรับที่ได้จึงอาจปรับปรุงให้เจลมีความแข็งแรงมากขึ้น (มี Tsol-gel ต่ำลง) เพื่อให้สามารถบรรจุกรดแกลลิกได้ในปริมาณที่มากขึ้นในขณะที่ยังสามารถเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาไม่นานเกินไป ซึ่งในการปรับปรุงได้เพิ่มปริมาณ Lutrol® F127 ในตำรับจาก 20% w/w ไปเป็น 25% w/w

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพจากการสังเกตและการเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลของตำรับเจลกรดแกลลิก L20N25 ที่มีความเข้มข้นของกรดแกลลิกต่างกัน

ลำดับที่	สูตรตำรับ	ลักษณะทางกายภาพเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	ลักษณะการเปลี่ยนสถานะหลังนำออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	ความหนืดที่วัดได้จากเครื่องวัดความหนืด (cPs)
1	L20N25G1	เป็นเจลใส มีความหนืด (++++) ใกล้เคียงกับเจลพื้น	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เป็นเจลไม่ไหล	897x10 ³
2	L20N25G2	เป็นเจลใส มีความหนืด (++++)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เป็นเจลไม่ไหล	847x10 ³
3	L20N25G3	เป็นเจลใส มีความหนืด (+++)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที หนืดมากขึ้น ที่ 40 นาที หนืดขึ้นเป็นเจลไม่ไหล	758x10 ³
4	L20N25G4	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+) มีความหนืด (+)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที หนืดมากขึ้น ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นเป็นเจลแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นเป็นเจลแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้
5	L20N25G5	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+) มีความหนืด (+)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที หนืดมากขึ้น ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นเป็นเจลแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นเป็นเจลแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้

ลำดับที่	สูตรตำรับ	ลักษณะทางกายภาพเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	ลักษณะการเปลี่ยนสถานะหลังนำออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	ความหนืดที่วัดได้จากเครื่องวัดความหนืด (cPs)
6	L20N25G6	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (++) หนืดเล็กน้อย (+) ไหลได้	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้
7	L20N25G7	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (++) หนืดเล็กน้อย (+) ไหลได้	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้
8	L20N25G8	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+++) ไม่หนืด (+) ไหลได้ดี	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้
9	L20N25G9	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+++++) ไม่หนืด ไหลได้ดี	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที เหลวไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้
10	L20N25G10	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+++++) ไม่หนืด ไหลได้ดี	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที เหลวไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมง หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้	เหลวเกินไปวัดไม่ได้

หมายเหตุ - L คือ Lutrol® F127
 - N คือ Solubilizer N
 - G คือ Gallic acid
 - ตัวเลขด้านหลังตัวอักษร L, N และ G แสดงปริมาณในตำรับ (% w/w)
 - วัดความหนืดด้วยหัว CPE 52 ที่ 0.1 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (28°C)

ผลการหาปริมาณกรดแกลลิกที่เหมาะสมในการบรรจุในตำรับเจลพื้น L25N25 (Lutrol F127® 25 %w/w + Solubilizer 25% w/w)

โดยทั่วไป Tsol-gel ของระบบ Lutrol® F127 25% w/w อยู่ที่ประมาณ 17°C (Scherlund และคณะ, 2000) ทั้งนี้จากการปรับปรุงสูตรตำรับเจลกรดแกลลิกให้มีความแข็งแรงมากขึ้นโดยเพิ่มปริมาณ Lutrol® F127 เป็น 25% w/w แล้วบรรจุกรดแกลลิกในปริมาณที่ต่างกันลงในเจลพื้นสูตร L25N25 เพื่อหาปริมาณกรดแกลลิกที่เหมาะสมในการทำให้เจลยังสามารถเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาไม่นานเกินไป ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 และ 6 และรูปที่ 9 พบว่าได้สูตรตำรับเจลที่ใส และมีสีเหลืองอ่อนๆ โดยสีเหลืองมีความเข้มมากขึ้นตามปริมาณของกรดแกลลิกที่เพิ่มขึ้น ผลการสังเกตความหนืดพบว่าเจลพื้น (L25N25) ที่ได้มีความหนืดสูงขึ้นกว่าเจลพื้นเดิม (L20N25) และพบว่าในช่วงความเข้มข้นของกรดแกลลิก 1% – 6% w/w ความหนืดของตำรับมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อปริมาณกรดแกลลิกเพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้มีความตรงกันข้ามกับสูตรเจลพื้นที่มีปริมาณ Lutrol® F127 20%

w/w ที่ความหนืดจะลดลงเมื่อกรดแกลลิกเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณ Lutrol® F127 มีผลให้เจลมีความแข็งแรงขึ้นอย่างมากและมี Tsol-gel ต่ำลงกว่าเจลพื้น L20N25 ซึ่งผลจากการที่กรดแกลลิกไปถึง solubilizer ออกมาแล้วทำให้น้ำไปละลายส่วน PPO มากขึ้นแล้วมีผลให้ Tsol-gel สูงขึ้นได้ แต่อาจไม่ทำให้ Tsol-gel ของตำรับเจลพื้น L25N25 สูงขึ้นจนเกินอุณหภูมิห้องทำให้ยังคงก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ แล้วมีความหนืดสูงขึ้นจนกลายเป็นเจลได้ในขณะที่อุณหภูมิค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้อง และจากการที่ Tsol-gel ของตำรับเพิ่มขึ้นตามปริมาณกรดแกลลิกที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้อย่างช้าๆ จึงมีผลให้การจัดเรียงโครงร่างของเจลมีความเป็นระเบียบมากขึ้นจึงอาจทำให้ตำรับที่มีกรดแกลลิกมากกว่ามีความหนืดมากกว่าดังแสดงจากรูปที่ 9 ส่วนตำรับเจลกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นของกรดแกลลิก 7% และ 8% w/w พบว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องยังคงมีลักษณะสารละลายเหลวไม่หนืดเป็นเจล อาจเนื่องมาจาก Tsol-gel เพิ่มสูงขึ้นจนเกินช่วงอุณหภูมิห้อง ผลการวัด pH พบว่าตำรับเจลพื้นที่ไม่ได้บรรจุกรดแกลลิกมี pH ประมาณ 6.26 และเมื่อบรรจุกรดแกลลิกลงไปพบว่าผลให้ pH ของตำรับต่ำลง โดยที่กรดแกลลิก 1% w/w มี pH ต่ำลงเป็น 4 และเมื่อปริมาณกรดแกลลิกเพิ่มขึ้นทำให้ pH ต่ำลงเรื่อยๆ แต่ไม่มาก มีช่วงห่าง pH ของตำรับที่มีกรดแกลลิกประมาณ 0.1 ซึ่ง pH ของตำรับ L25N25G5 มีค่าต่ำที่สุดคือประมาณ 3.75 จากผลการสังเกตลักษณะทางกายภาพ การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง ผลการวัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด และค่า pH ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นทำให้สามารถเลือกสูตรตำรับเจลกรดแกลลิกที่เหมาะสมได้คือสูตร L25N25G5 (Lutrol F127 25% w/w + Solubilizer N 25% w/w + Gallic acid 5% w/w) (ตัวเลขหลัง G คือความเข้มข้นของ gallic acid โดยน้ำหนัก) เนื่องจากเป็นสูตรตำรับที่มีปริมาณกรดแกลลิกสูงสุดที่ยังคงเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลาไม่นานเกินไปคือประมาณ 20-30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิว่าเพิ่มขึ้นเร็วหรือไม่ และเจลมีลักษณะใสเป็นเนื้อเดียวกัน มีค่า pH ไม่ต่างจากตำรับที่มีกรดแกลลิกต่ำที่สุดนัก แต่ความหนืดที่ได้มีค่าค่อนข้างสูง

ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพจากการสังเกตและการเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลของตำรับเจลกรดแกลลิก L25N25 ที่มี
ความเข้มข้นของกรดแกลลิกต่างกัน

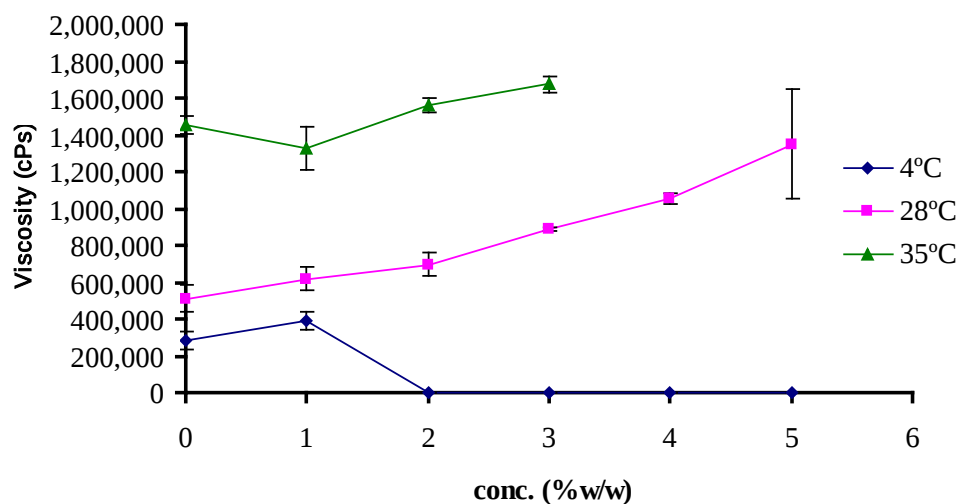
ลำดับที่	สูตรตำรับ	ลักษณะทางกายภาพ จากการสังเกต	ลักษณะการเปลี่ยนสถานะหลัง นำออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
1	Control (L25N25)	เป็นเจลใสมีความหนืดมาก(+5)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 10 นาที เป็นเจลไม่ไหล
2	L25N25G1	เป็นเจลใส มีความหนืด (+5)ใกล้เคียงกับเจลพื้น L25N25	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 10 นาที เป็นเจลไม่ไหล
3	L25N25G2	เป็นเจลใส มีความหนืด (+6)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 15 นาที เป็นเจลไม่ไหล
4	L25N25G3	เป็นเจลใส มีความหนืด (+6)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 15 นาที เป็นเจลไม่ไหล
5	L25N25G4	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+) มีความหนืด (+7)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เป็นเจลไม่ไหล
6	L25N25G5	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (+) มีความหนืด (+7)	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที หนืดมากขึ้น ที่ 30 นาที เป็นเจลไม่ไหล
7	L25N25G6	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (++) ความหนืดน้อยกว่าตำรับ L25N25G5 (+3) ไหลได้ที่อุณหภูมิห้อง	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 60 นาที เป็นเจลไม่ไหล
8	L25N25G7	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (++) ความหนืดน้อยกว่าตำรับ L25N25G5 (+3) ไหลได้ที่อุณหภูมิห้อง	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 40 นาที เหลวไหลได้ ที่ 60 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมงหนืดมากขึ้นไหลได้
9	L25N25G8	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อนๆ (++) ความหนืดน้อยกว่าตำรับ L25N25G5 (+3) ไหลได้ที่อุณหภูมิห้อง	ที่ 5 นาที เหลวไหลได้ ที่ 20 นาที เหลวไหลได้ ที่ 60 นาที หนืดมากขึ้นแต่ไหลได้ ที่ 24 ชั่วโมงหนืดมากขึ้นไหลได้

หมายเหตุ - L คือ Lutrol® F127; N คือ Solubilizer N; G คือ Gallic acid; ตัวเลขด้านหลังตัวอักษร L, N และ G แสดง
ปริมาณในตำรับ (% w/w)

ตารางที่ 6 ค่าความหนืดของเจลที่อุณหภูมิต่างๆ และค่า pH ที่อุณหภูมิห้อง

ลำดับที่	Formula	mean			
		Viscosity (cPs) $\pm$ SD			pH $\pm$ SD
		4°C	28°C	35°C	
1	Control (L25N25)	283333 $\pm$ 50836	507666 $\pm$ 72858	1456666 $\pm$ 50332	6.263 $\pm$ 0.069
2	L25N25G1	391333 $\pm$ 45742	617333 $\pm$ 63010	1326666 $\pm$ 115470	4.068 $\pm$ 0.032
3	L25N25G2	3073 $\pm$ 192	696333 $\pm$ 60467	1563333 $\pm$ 37859	3.925 $\pm$ 0.048
4	L25N25G3	1665 $\pm$ 429	887666 $\pm$ 14047	1673333 $\pm$ 47258	3.875 $\pm$ 0.030
5	L25N25G4	1240 $\pm$ 234	1056666 $\pm$ 30550	NP	3.822 $\pm$ 0.004
6	L25N25G5	874 $\pm$ 69	1350000 $\pm$ 295465	NP	3.752 $\pm$ 0.012

- หมายเหตุ - L คือ Lutrol® F127
 - N คือ Solubilizer N
 - G คือ Gallic acid
 - ตัวเลขด้านหลังตัวอักษร L, N และ G แสดงปริมาณในตำรับ (% w/w)
 - NP คือ วัดค่าไม่ได้ (not determined)



รูปที่ 9 ความหนืดที่อุณหภูมิต่างๆของตำรับเจลกรดแกลลิกที่มีปริมาณกรดแกลลิกต่างกัน (0% - 5% w/w)

ผลศึกษาการเตรียมตำรับเจลกรดแกลลิกโดยใช้ HPMC เป็นสารก่อเจล

การเตรียมตำรับเจลโดยใช้ HPMC (H) (ตัวเลขหลัง H คือความเข้มข้นของ H และตัวเลขหลัง N เป็นความเข้มข้นของ solubilizing agent N โดยน้ำหนัก) เป็นสารก่อเจล พบว่าได้เจลใสที่มีลักษณะหนืดคล้ายแป้งเปียก ใสได้เล็กน้อย มีสีเหลืองอ่อนๆ จากการวัดความหนืดที่อุณหภูมิต่างๆ (ตารางที่ 7) ด้วยเครื่องวัดความหนืดพบว่า ทั้งเจลที่เป็นตำรับเจลพื้นคือ H3N25 และตำรับที่บรรจุกรดแกลลิกคือ H3N25G5 มีแนวโน้มที่จะมีความหนืดสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจาก HPMC เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ในกลุ่มอนุพันธ์ของเซลลูโลส (Cellulose derivatives) ซึ่งมีคุณสมบัติไวต่ออุณหภูมิเช่นกัน ซึ่งการเปลี่ยนความหนืดเกิดเนื่องมาจากการลดลงของการละลายของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำของ HPMC คือบริเวณที่มีหมู่แทนที่เป็น Methoxy นั่นคือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอาจมีผลช่วยเพิ่มค่าการละลายของหมู่ Methoxy ของสาย HPMC ทำให้มีความหนืดต่ำลง ส่วนความหนืดของ เจลพื้น H3N25 และ เจลกรดแกลลิก H3N25G5 ที่แต่ละอุณหภูมิพบว่าไม่ค่อยแตกต่างกัน แสดงว่ากรดแกลลิกอาจไม่มีหรือมีผลน้อยมากต่อการละลายของหมู่ Methoxy ของสาย HPMC ความหนืดจึงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อเทียบกับเจลพื้น ผลการวัด pH ของตำรับเจลพื้นมีค่าประมาณ 5.5 – 5.6 และเมื่อบรรจุกรดแกลลิก 5% w/w พบว่ามี pH ต่ำลงเหลือประมาณ 3.5 เมื่อเปรียบเทียบสูตรตำรับเจลที่ใช้ Lutrol® F127 (L25N25G5) กับสูตรตำรับที่ใช้ HPMC (H3N25G5) รวมถึงเจลพื้นคือ L25N25 และ H3N25 พบว่าตำรับที่ใช้ Lutrol F127 จะมีความหนืดสูงกว่มาก เป็นเจลที่ไม่ไหล แต่ตำรับที่ใช้ HPMC จะเป็นเจลเหนียวที่ไหลได้ และตำรับที่ได้มีความใสใกล้เคียงกันแต่ตำรับที่ใช้ HPMC จะมีสีเหลืองที่เข้มกว่าอย่างชัดเจน ส่วน pH ของตำรับเจลพื้น และเจลที่บรรจุกรดแกลลิกแล้วของทั้ง 2 ตำรับ พบว่าตำรับที่ใช้ Lutrol F127 มีค่า pH สูงกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 7 ลักษณะทางกายภาพ ค่าความหนืดและ pH ที่วัดได้จากตำรับ H3N25G5

สูตรตำรับ	ขวดที่	pH	Viscosity (cPs)			ลักษณะทางกายภาพ
			4°C	28°C	35°C	
H3N25 (Control)	A	5.556	118,270	42,863	46,435	ลักษณะเป็นเจลหนืดคล้ายแป้งเปียก ใสไม่มีสี ไหลได้เล็กน้อย
	B	5.63	110,730	36,910	40,680	
	C	5.625	112,912	41,871	40,283	
	เฉลี่ย	5.603	113970	40548	42466	
	± SD	± 0.041	± 3879	± 3189	± 3442	
H3N25G5	A	3.562	152,600	63,699	37,704	ลักษณะเป็นเจลสีเหลืองใสหนืดคล้ายแป้งเปียก ไหลได้ดีกว่า control เล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้จะมีสีเหลืองเข้มขึ้น
	B	3.516	149,822	45,840	30,957	
	C	3.504	157,760	58,341	28,377	
	เฉลี่ย	3.527	153394	55960	32346	
	± SD	± 0.030	± 4028	± 9164	± 4816	

- หมายเหตุ
- H คือ HPMC
 - N คือ Solubilizer N
 - G คือ กรดแกลลิก (Gallic acid)
 - ตัวเลขด้านหลังตัวอักษร L, N และ G แสดงปริมาณในตำรับ (% w/w)
 - วัดความหนืดโดยใช้หัว CPE 52 ที่ 1rpm

การศึกษาค่าการละลายของกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากผลการทดลองพบว่าลำดับความสามารถในการละลายกรดแกลลิกใน ระบบ A > ระบบ B > ระบบ C > ระบบ D (ตารางที่ 8) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ตำรับ Solubilizer N 25%w/w + Gallic acid มีความสามารถในการละลายได้สูงที่สุดเนื่องจากมีสาร Solubilizer N สามารถช่วยในการละลายกรดแกลลิกได้ดี ส่วนตำรับ H₂O + Solubilizer N 25%w/w + Lutrol F127 25%w/w + Gallic acid ซึ่งเป็นตำรับที่การศึกษานี้เลือกมาใช้ต่อไปนั้น มีความสามารถในการละลายได้ดี เนื่องจากมีสาร Solubilizer N และมีเจล Lutrol F127 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น non-ionic surfactant ช่วยลดแรงตึงผิวของตำรับและช่วยในการละลายกรดแกลลิก สำหรับตำรับ H₂O + Solubilizer N 25%w/w + Gallic acid ซึ่งไม่มีส่วนผสมของ Lutrol F127 พบว่าความสามารถในการละลายกรดแกลลิกลดลงเมื่อเทียบกับตำรับที่มีส่วนผสมของ Lutrol F127 และตำรับ H₂O+Gallic acid มีความสามารถในการละลายกรดแกลลิกได้น้อยที่สุด เนื่องจากไม่มีสารช่วยละลายผสมอยู่ และการละลายของ Gallic acid ในน้ำไม่ดี ซึ่งจากการค้นคว้าพบว่า Gallic acid มีค่าการละลาย 1 กรัมในน้ำ 87 mL และพบว่ามี การนำ Lutrol F127 (Poloxamer) มาช่วยเพิ่มค่าการละลายของตัวยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ มากๆ เช่น Indomethacin, Insulin, Piroxicam, nifedipine เป็นต้น (Hansen และ Just, 2004) จึงสรุปได้ว่า Lutrol F127 สามารถช่วยเพิ่มการละลายของ Gallic acid ในตำรับได้

ตารางที่ 8 ค่าการละลายของกรดแกลลิกในระบบสารละลายต่างๆ

Component	Absorbance	Conc. (mg./mL)	Dilution factor	Conc. (mg/mL)	Mean $\pm$ S.D. (mg/mL)
Solubilizer N + Gallic acid (A)	0.5189	0.3394		2715.2	
	0.5927	0.3889	X 8000	3111.2	2977.0 $\pm$ 226.8
	0.5915	0.3881		3104.8	
H ₂ O + Solubilizer N 25% w/w + Lutrol F127 25% w/w + Gallic acid (B)	0.7301	0.4811		2405.5	
	0.7626	0.5029	X 5000	2514.5	2487.0 $\pm$ 71.8
	0.7706	0.5082		2541	
H ₂ O + Solubilizer N 25%w/w + Gallic acid (C)	0.3087	0.1984		793.6	
	0.3794	0.2459	X 4000	983.6	975.6 $\pm$ 178.1
	0.4414	0.2874		1149.6	
H ₂ O+Gallic acid (D)	0.5111	0.3342		668.4	
	0.5813	0.3813	X 2000	762.6	691.6 $\pm$ 62.7
	0.4928	0.3219		643.8	

การทดสอบคุณสมบัติของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

การศึกษาพฤติกรรมการไหลของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

สำหรับสูตรที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สูตรตำรับ control L25N25 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/wในน้ำ) พบว่า มีลักษณะการไหลเป็นแบบ Plastic (รูปที่ 10) คือ เมื่อให้แรงถึงจุดๆหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า yield value ของเหลวจะเริ่มเคลื่อนที่และถ้ายังคงให้แรงต่อ ของเหลวก็จะมีการไหลเป็นแบบ Newtonian เมื่อ extrapolate ค่า yield value จะมีค่าเท่ากับ 1250 โดยอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ที่สามารถให้ได้สูงสุดมีค่าประมาณ 4 sec⁻¹ เมื่อค่อยๆ ลดแรงลงพบว่ากราฟมีลักษณะเป็น

Rheopeccic คือ มีความหนืดมากขึ้น จากสมการ $\log G = N \log F - \log \eta'$ เมื่อนำค่าได้ไปพล็อตกราฟสมการเส้นตรงระหว่าง $\log G$ กับ $\log F$ (รูปที่ 11) ความชันของกราฟคือค่า N พบว่ามีค่า $N = 4.2931$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 และมีค่า yield value เจลมีการไหลเป็นแบบ Plastic เมื่อใส่ gallic acid เป็นส่วนประกอบในตำรับ คือ สูตรตำรับ L25N25G5 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/w+Gallic acid 5% w/wในน้ำ) พบว่า มีลักษณะการไหลเป็นแบบ Newtonian คือ เมื่อให้แรงที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ของเหลวจะเกิดการไหล โดยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงที่ใช้ (รูปที่ 12 และ 13)

อุณหภูมิห้อง

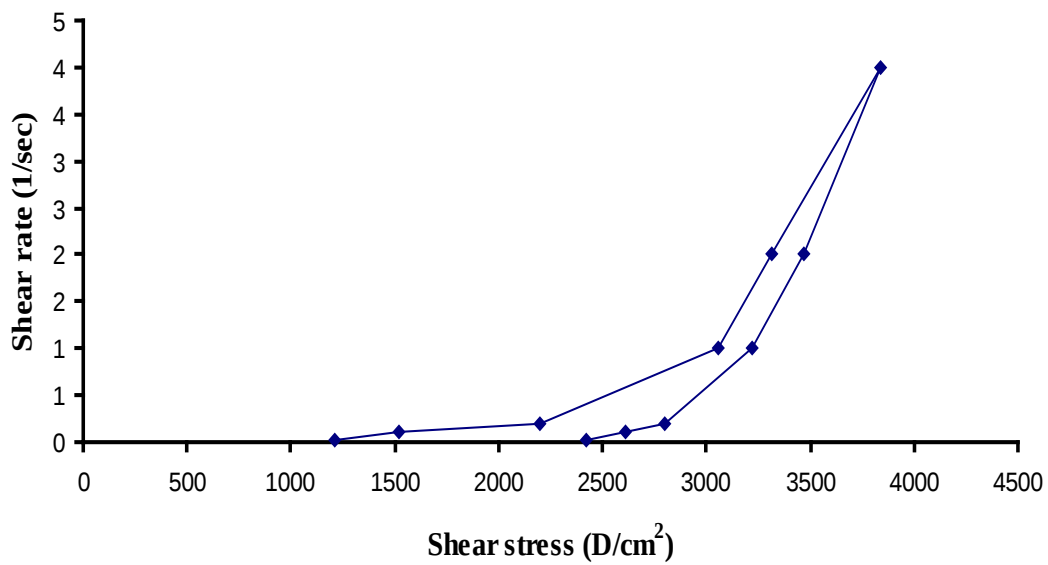
สูตรตำรับ control L25N25 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/wในน้ำ) พบว่า มีลักษณะการไหลเป็นแบบ Plastic คือ เมื่อให้แรงถึงจุดๆหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า yield value ของเหลวจะเริ่มเคลื่อนที่ และถ้ายังคงให้แรงต่อของเหลวก็จะมีการไหลเป็นแบบ Newtonian เมื่อ extrapolate ค่า yield value จะมีค่าเท่ากับ 500 โดยอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ที่สามารถให้ได้สูงสุดมีค่าประมาณ 0.6 sec^{-1} เมื่อค่อยๆ ลดแรงลงพบว่ากราฟมีลักษณะเป็น Rheopeccic คือ มีความหนืดมากขึ้น (รูปที่ 14) จากสมการ $\log G = N \log F - \log \eta'$ เมื่อนำค่าได้ไปพล็อตกราฟสมการเส้นตรงระหว่าง $\log G$ กับ $\log F$ (รูปที่ 15) ความชันของกราฟคือค่า N พบว่ามีค่า $N = 1.6574$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 และมีค่า yield value เจลมีการไหลเป็นแบบ Plastic เมื่อใส่ gallic acid เป็นส่วนประกอบในตำรับ คือ สูตรตำรับ L25N25G5 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/w+Gallic acid 5% w/wในน้ำ) พบว่าเจลมีลักษณะหนืดมากขึ้น โดยมีค่า yield value เพิ่มขึ้นเป็น 1750 และอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ที่สามารถให้ได้สูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 1 sec^{-1} และยังมีลักษณะการไหลเป็นแบบ Plastic อยู่โดยมีค่า $N = 4.6424$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 และมีค่า yield value (รูปที่ 16 และ 17)

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

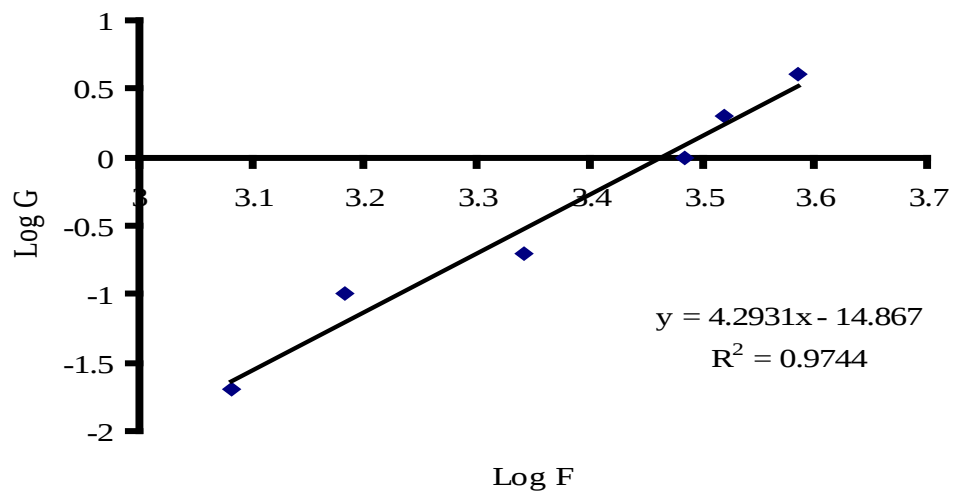
สูตรตำรับ control L25N25 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/wในน้ำ)พบว่า มีลักษณะการไหลเป็นแบบ Plastic เมื่อ extrapolate ค่า yield value จะมีค่าเท่ากับ 500 โดยอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ที่สามารถให้ได้สูงสุดมีค่าประมาณ 0.4 sec^{-1} เมื่อค่อยๆ ลดแรงลงพบว่ากราฟมีลักษณะเป็น Rheopeccic คือ มีความหนืดมากขึ้น (รูปที่ 18) จากสมการ $\log G = N \log F - \log \eta'$ เมื่อนำค่าได้ไปพล็อตกราฟสมการเส้นตรงระหว่าง $\log G$ กับ $\log F$ (รูปที่ 19) ความชันของกราฟคือค่า N พบว่ามีค่า $N = 2.4635$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 และมีค่า yield value จึงสนับสนุนว่า เจลมีการไหลเป็นแบบ Plastic เมื่อใส่ gallic acid เป็นส่วนประกอบในตำรับ คือ สูตรตำรับ L25N25G5 (Lutrol 25% w/w+ solubilizer N 25% w/w+Gallic acid 5% w/wในน้ำ) พบว่าเจลมีลักษณะหนืดมากขึ้น โดยมีค่า yield value เพิ่มขึ้นเป็น 1000 และอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ที่สามารถให้ได้สูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 1 sec^{-1} และยังมีลักษณะการไหลเป็นแบบ Plastic อยู่โดยมีค่า $N = 2.4637$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 และมีค่า yield value (รูปที่ 20 และ 21) จากการสรุปดังแสดงในตารางที่ 9 สรุปว่าเมื่อเปรียบเทียบความหนืดที่อุณหภูมิห้อง และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิสูงขึ้น เจลจะมีลักษณะหนืดขึ้นด้วย เนื่องจากคุณสมบัติของพอลิเมอร์เอง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลเปล่ากับเจลที่มี gallic acid เป็นส่วนประกอบ พบว่าเจลที่มี gallic acid เป็นส่วนประกอบ จะมีความหนืดเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการละลายของตัว gallic acid ซึ่งจะละลายในน้ำได้ดีกว่าใน Lutrol จึงดึงน้ำมาใช้ในการละลายตัวเองมาก ปริมาณน้ำที่ใช้ละลาย Lutrol น้อยลง ส่งผลทำให้โครงสร้างการจัดเรียงตัวของ Lutrol มีลักษณะแข็งแรงมากขึ้น ทำให้หนืดมากขึ้น

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A. สูตรตำรับ L25N25 (control)

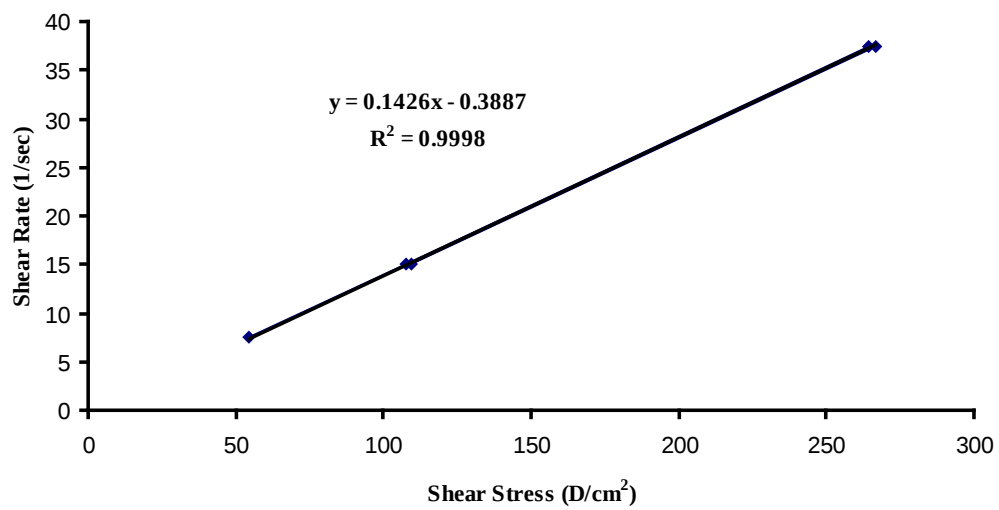


รูปที่ 10 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ L25N25 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

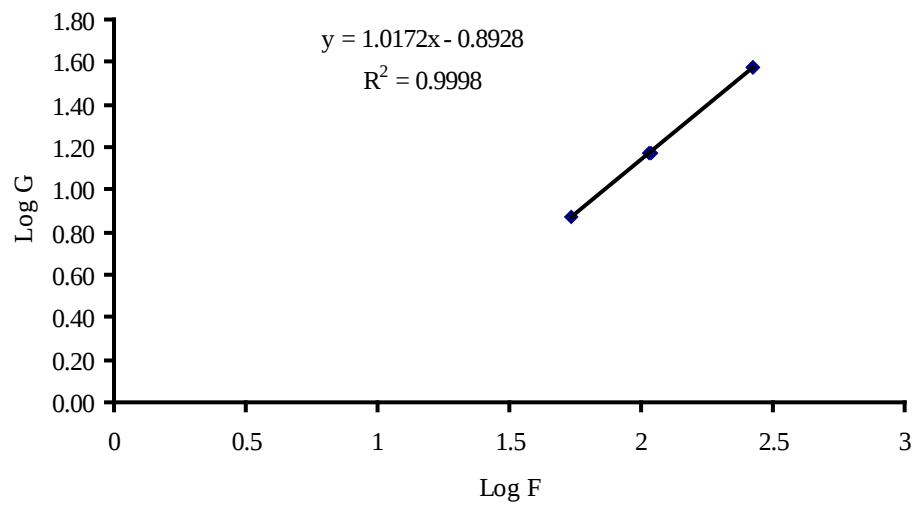


รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

B. สูตรตำรับ L25N25G5



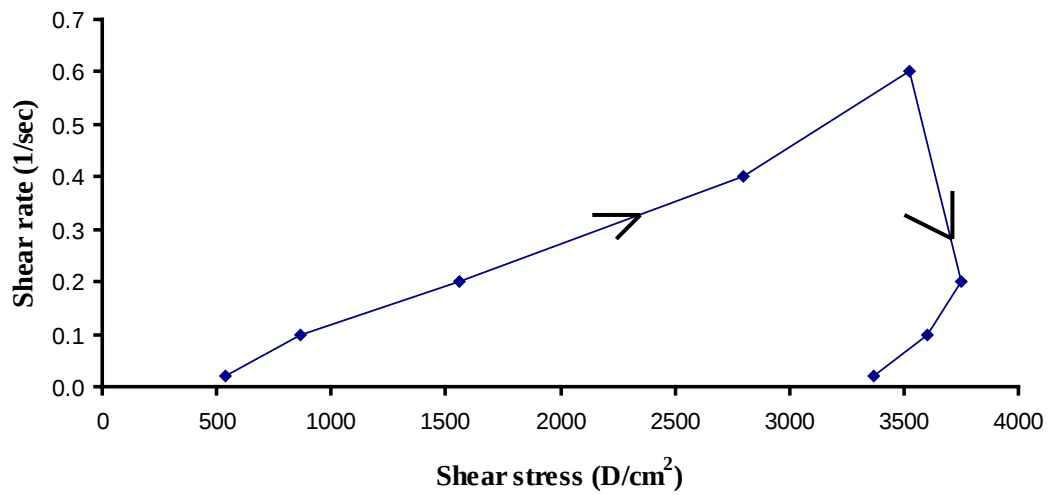
รูปที่ 12 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



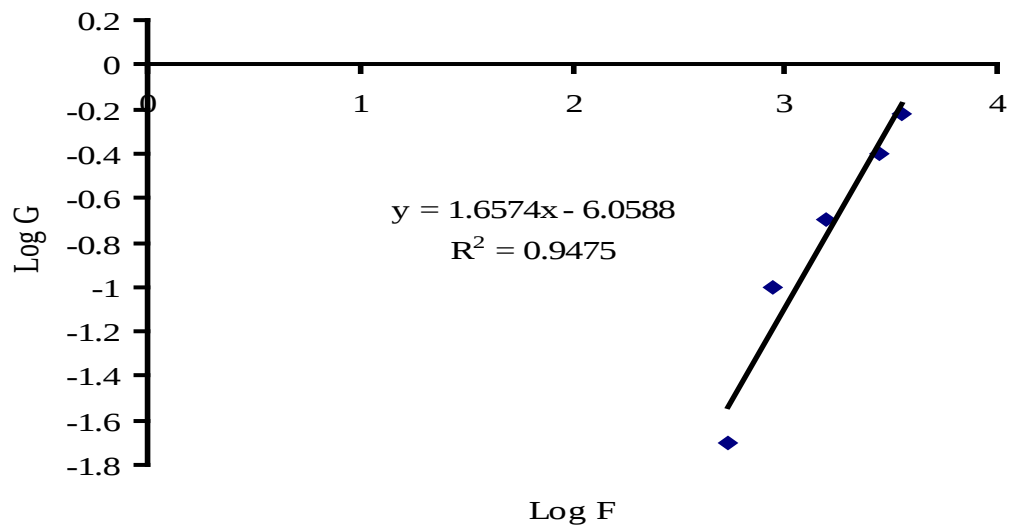
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิห้อง

A. สูตรตำรับ L25N25 (control)

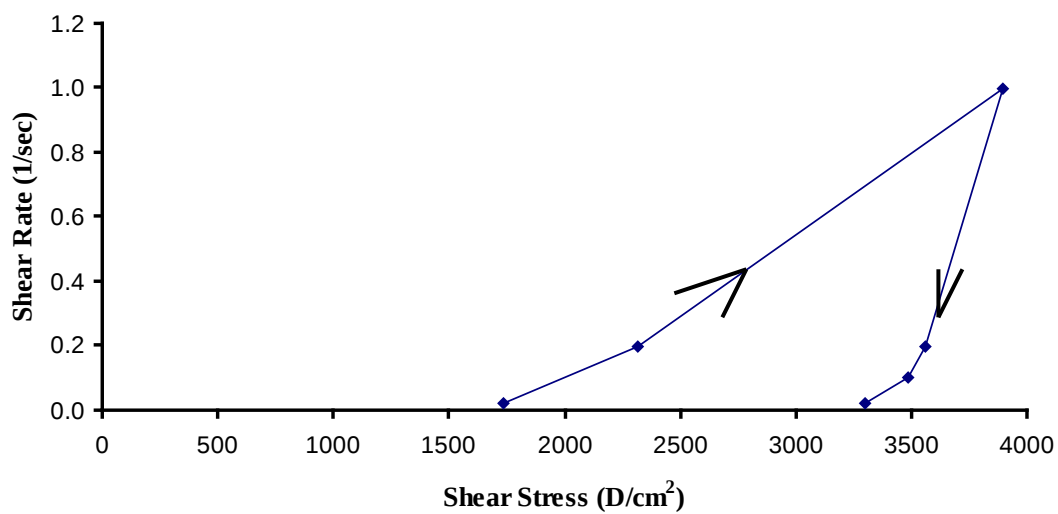


รูปที่ 14 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ control L25N25 ที่อุณหภูมิห้อง

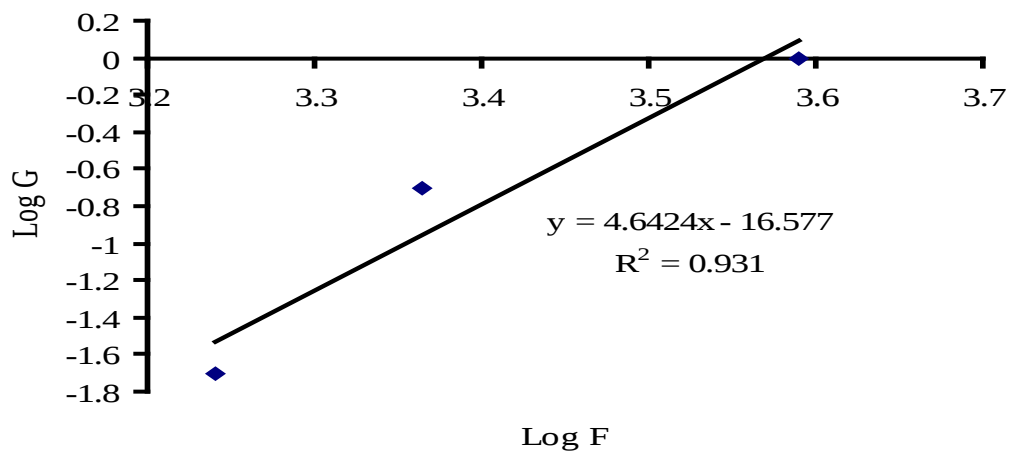


รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25 ที่อุณหภูมิห้อง

B. สูตรตำรับ L25N25G5



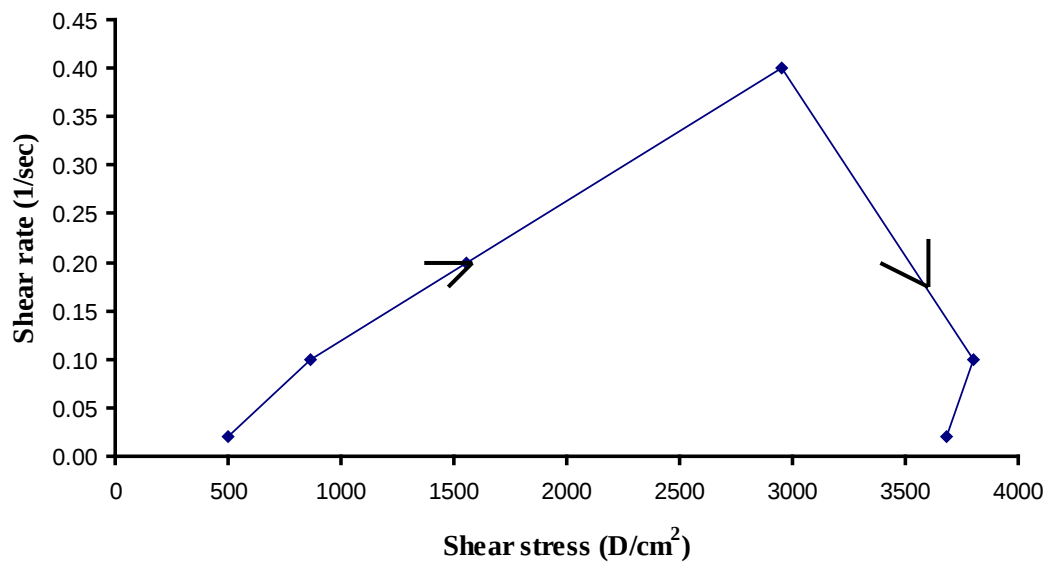
รูปที่ 16 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิห้อง



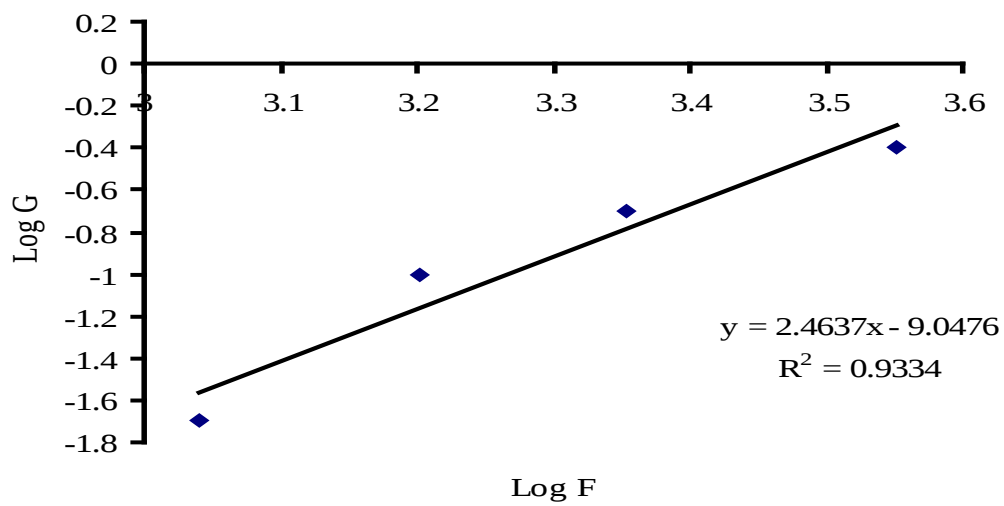
รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิห้อง

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

A. สูตรตำรับ L25N25 (control)

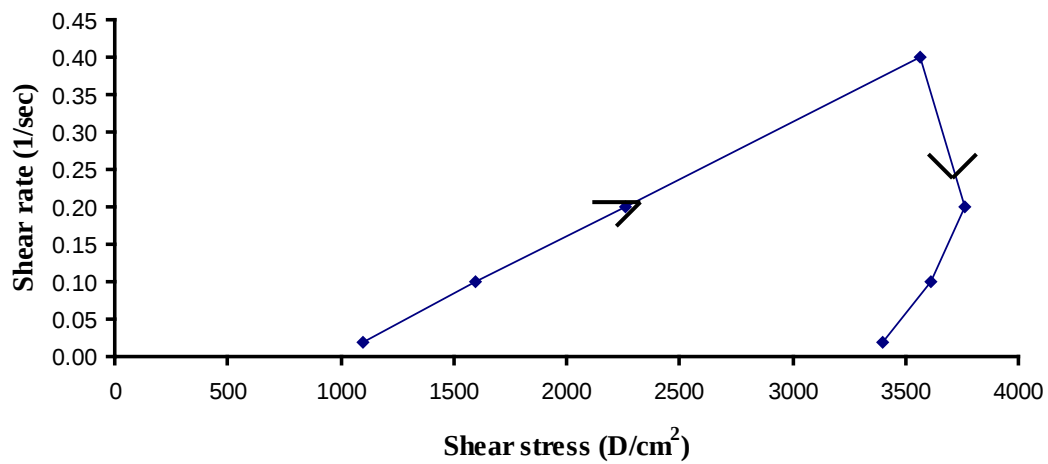


รูปที่ 18 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ control L25N25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

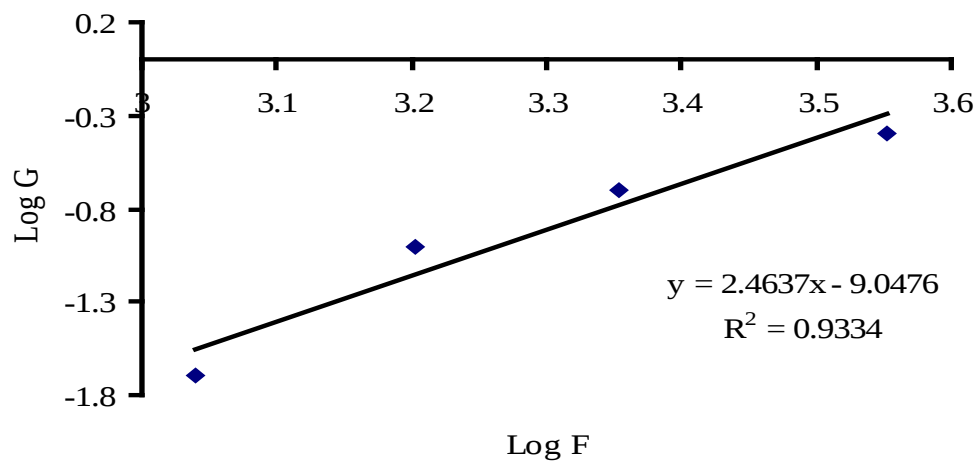


รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

B. สูตรตำรับ L25N25G5



รูปที่ 20 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับ L25N25G5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

พฤติกรรมกรไหลของเจลตำรับต่างๆที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการพลอตกราฟระหว่าง Log G และ Log F จากสมการของ Martin's คือ

$$\text{Log } G = N \text{Log } F - \text{Log } \eta'$$

ค่า N (slope) ที่ได้ นำมาทำนายพฤติกรรมกรไหลของสารได้ตามเกณฑ์ที่ระบุคือ

ถ้า $N = 1$ สารจะมีพฤติกรรมกรไหลแบบ Newtonian

ถ้า $N > 1$ สารจะมีพฤติกรรมกรไหลแบบ Pseudoplastic

ถ้า $N < 1$ สารจะมีพฤติกรรมกรไหลแบบ Dilatant

ตารางที่ 9 ค่า N และพฤติกรรมการไหลของเจลกรดแกลลิกที่อุณหภูมิต่างๆ

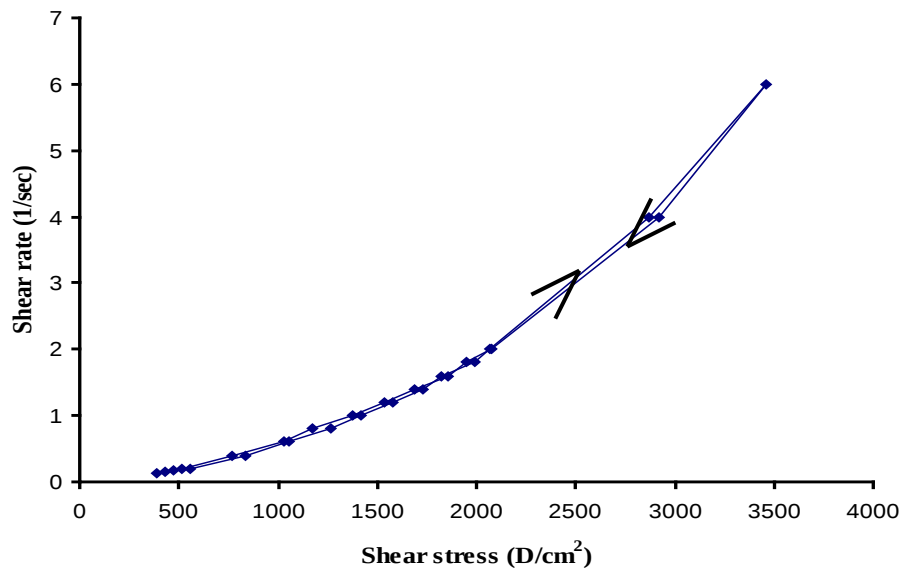
ตำรับเจล	อุณหภูมิที่ศึกษา	ค่า N	พฤติกรรมการไหล
L25N25	4°C	4.2931	Plastic (พยู yield point)
	28°C	1.6574	Plastic (พยู yield point)
	35°C	2.4637	Plastic (พยู yield point)
L25N25G5	4°C	1.0172	Newtonian
	28°C	4.6424	Plastic (พยู yield point)
	35°C	2.4637	Plastic (พยู yield point)
H3N25	4°C	1.6906	Pseudo plastic
	28°C	1.7192	Pseudo plastic
	35°C	1.6607	Pseudo plastic
H3N25G5	4°C	1.6508	Pseudo plastic
	28°C	1.7427	Pseudo plastic
	35°C	1.6513	Pseudo plastic

สำหรับสูตรที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์

สำหรับสูตรที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ รูปแบบการไหลที่ได้ของทุกสูตรตำรับเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ มีการไหลเป็นแบบ Pseudoplastic คือเมื่อให้แรงที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ของเหลวจะเกิดการไหลแต่อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงที่ใช้ ถ้าให้แรงมากๆ การไหลจะมากขึ้น ความหนืดจะลดลง ซึ่งมีสอดคล้องกับรายงานก่อนๆ (Chen, 2007) เมื่อเปรียบเทียบความหนืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 22 และ 23) อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 24 และ 25) และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 26 และ 27) พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เจลจะมีลักษณะหนืดลดลง เนื่องจากคุณสมบัติของพอลิเมอร์เอง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเจลเปล่ากับเจลที่มี gallic acid เป็นส่วนประกอบ พบว่าเจลที่มี gallic acid เป็นส่วนประกอบ จะมีความหนืดเพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษาผลของ nicotinamide ต่อคุณสมบัติของสารละลาย HPMC ในน้ำ พบว่า nicotinamide จะส่งผลทำให้สารละลาย HPMC มีความหนืดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก nicotinamide จะมีความชอบต่อหมู่ hydrophilic ของ HPMC เกิดพันธะ H-bonding ทำให้การจัดเรียงตัวของ HPMC เปลี่ยนไป โดยจะขยาย coils ของ HPMC (Hino และ Ford, 2001) ซึ่งคาดว่ากลไกที่ทำให้เจลที่มี gallic acid มีความหนืดเพิ่มขึ้นน่าจะเป็นกลไกเดียวกัน เพราะ gallic acid มีหมู่ซึ่งสามารถเกิดพันธะ H-bonding กับ HPMC ได้

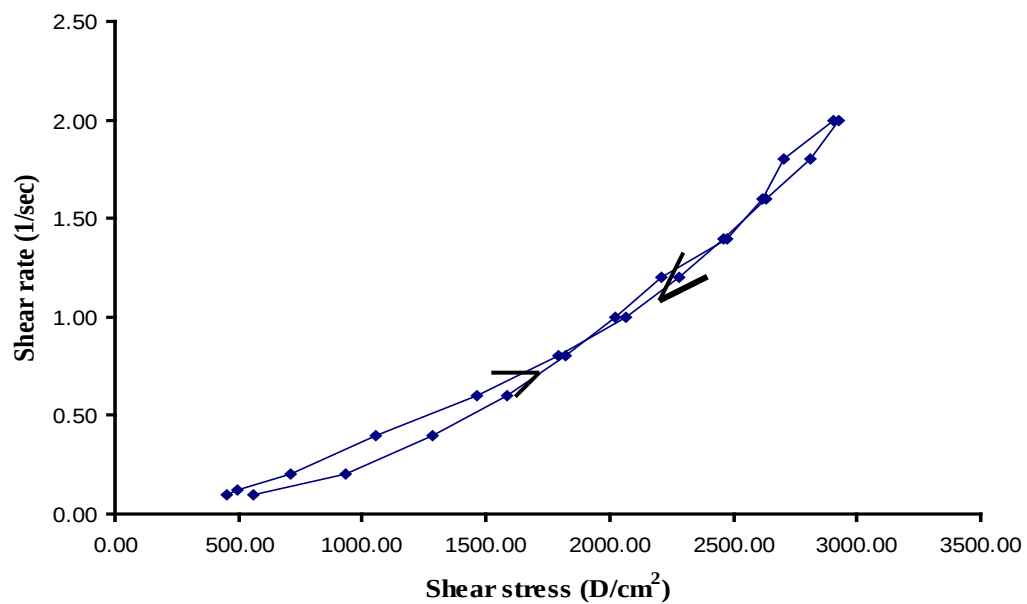
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A. สูตรตำรับ H3N25 (Control)



รูปที่ 22 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

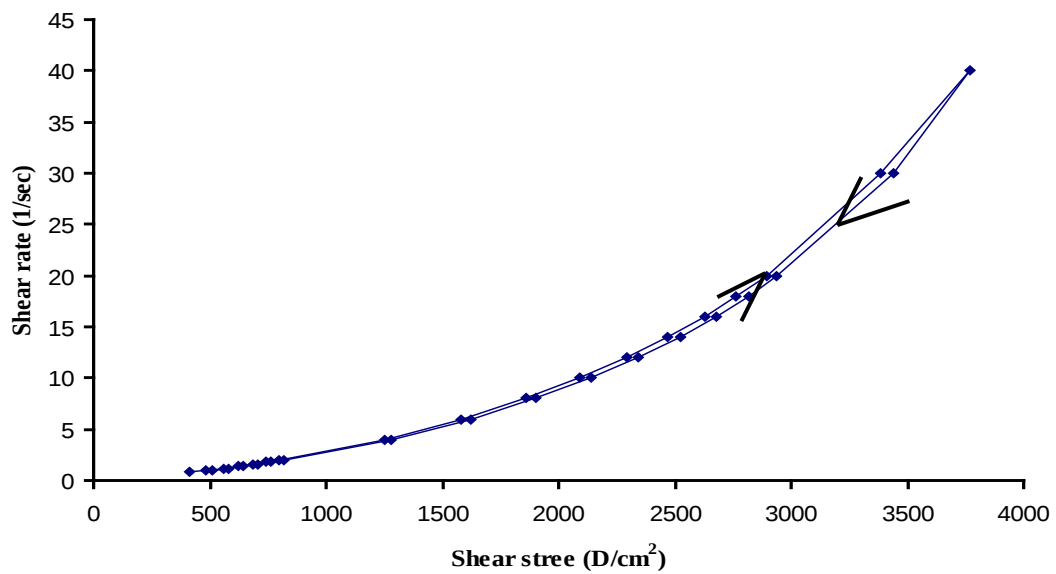
B. สูตรตำรับ H3N25G5



รูปที่ 23 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25G5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

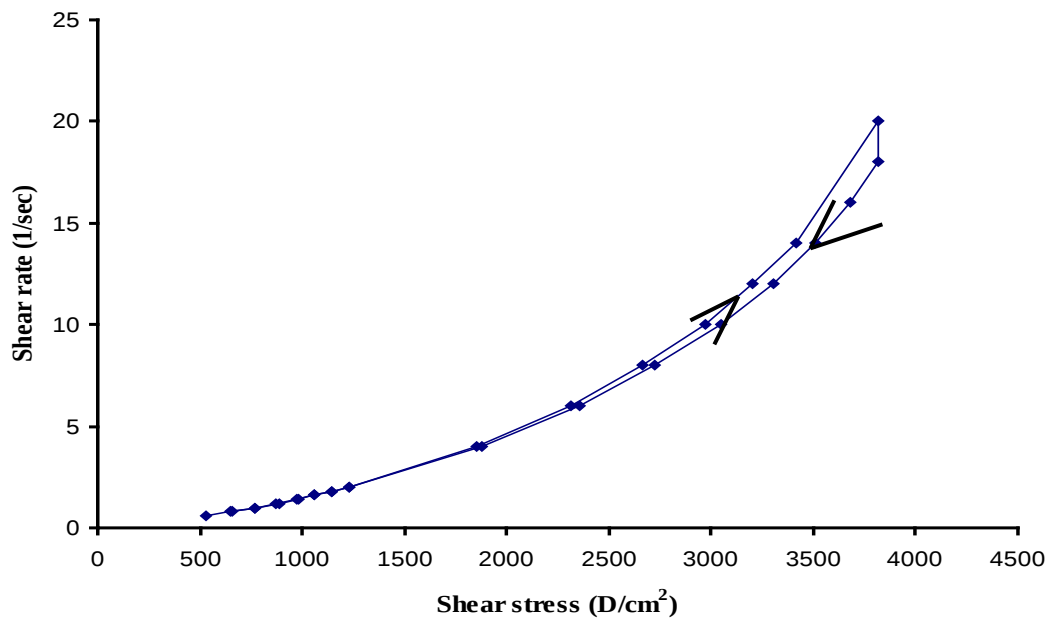
อุณหภูมิห้อง

A. สูตรตำรับ H3N25 (Control)



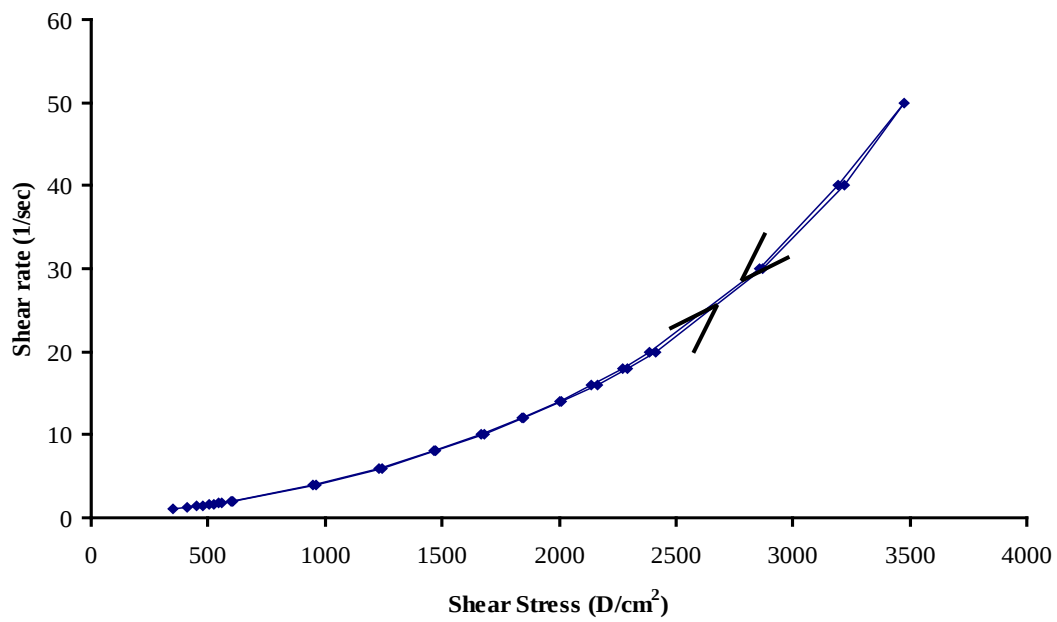
รูปที่ 24 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25 ที่อุณหภูมิห้อง

B. สูตรตำรับ H3N25G5



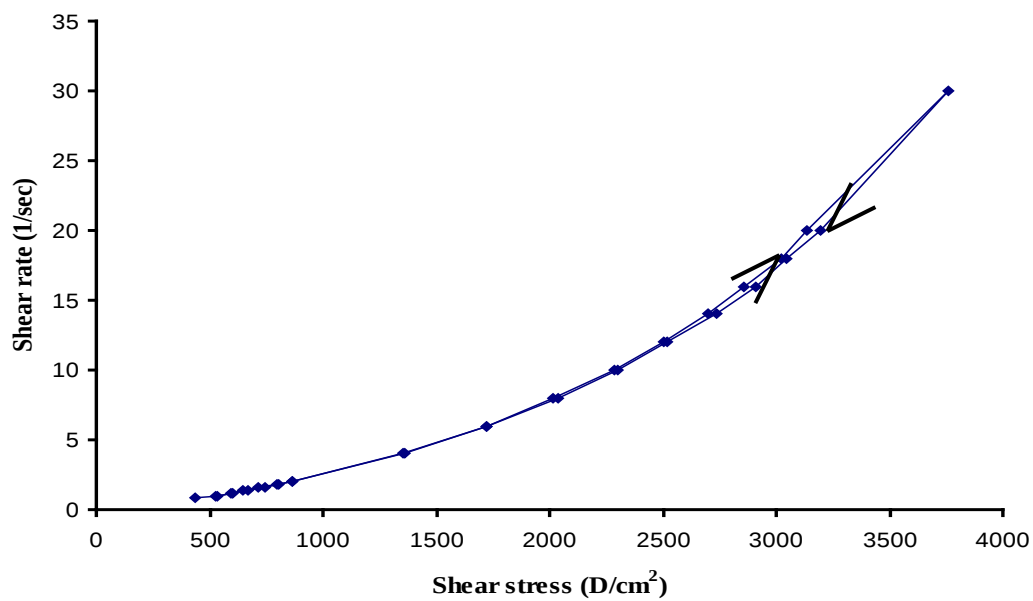
รูปที่ 25 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25G5 ที่อุณหภูมิห้อง

A. สูตรตำรับ H3N25 (Control)



รูปที่ 26 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

B. สูตรตำรับ H3N25G5



รูปที่ 27 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับ H3N25G5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

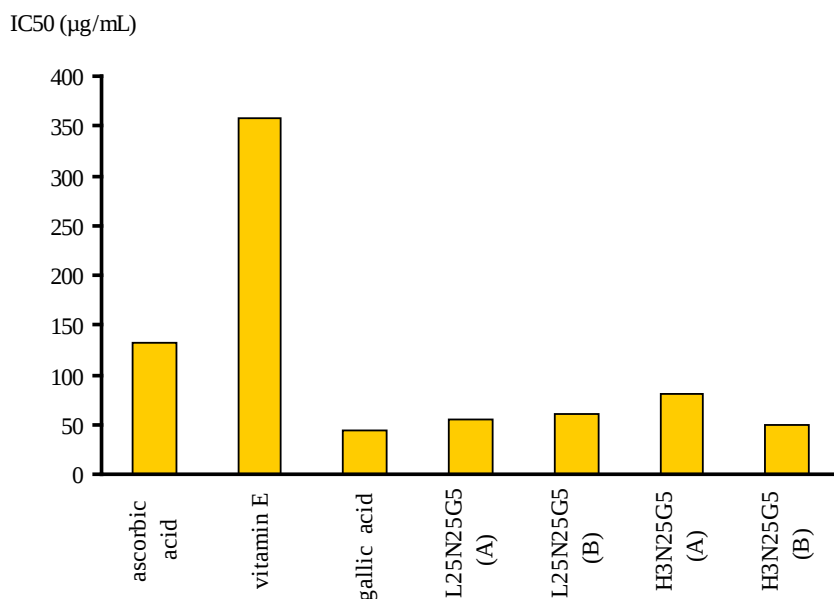
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี **Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity assay (AEAC)**

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายเจล L25N25 และ H3N25 ซึ่งไม่มีสาร gallic acid ในตำรับ พบว่าสารละลายเจลพื้นทั้งสองไม่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ จึงสรุปได้ว่าการยับยั้งอนุมูลอิสระของตำรับเจล เกิดจากสาร gallic acid จากการคำนวณหาค่า IC_{50} (ตารางที่ 10 และรูปที่ 28) พบว่าใช้สาร ascorbic acid 132.62 μg มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ในขณะที่ vitamin E ต้องใช้ 358.38 μg จึงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% นอกจากนี้พบว่าสาร gallic acid ใช้ปริมาณเพียง 43.54 μg สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ดังนั้นจึงเลือกสาร ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เนื่องจากให้ฤทธิ์ที่ดี แต่น้อยกว่า gallic acid ซึ่งใช้เป็นสารสำคัญในตำรับเมื่อนำตำรับเจลที่เตรียมมาหาค่า IC_{50} ของสาร gallic acid ในเจล lutrol (L25N25G5) พบว่าใช้ปริมาณ gallic acid ในเจล lutrol เพียง 55.27 μg สามารถสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ซึ่งต่างจากเจล lutrol หลังจากทำ stability test เพียงเล็กน้อยคือ ใช้ปริมาณ gallic acid ในเจล lutrol หลังจากทำ stability test 59.96 μg จึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ของ gallic acid ในเจล lutrol เล็กน้อย ส่วนการใช้เจล HPMC มาหาค่า IC_{50} ของ gallic acid ในเจล พบว่าต้องใช้ gallic acid 80.22 μg จึงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% และเมื่อนำเจล HPMC (H3N25G5) หลังผ่าน stability test พบว่า ใช้เพียง gallic acid 49.90 μg สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่า เจล HPMC ก่อนทำ stability test ทั้งนี้เนื่องจากเจล HPMC เมื่อผ่านการทดสอบ stability test สีของเจลเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสี เป็นสีเหลือง จึงรบกวนช่วงการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง visible (734 nm) ทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อน จากการที่เจล lutrol สามารถละลายใน Ethanol ได้ทันที แต่เจล HPMC ต้องละลายในน้ำกลั่นก่อน จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย Ethanol ทำให้การละลายของสาร gallic acid ในตำรับเจล lutrol ดีกว่า ส่งผลให้เจล lutrol ก่อนทำ stability test มีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่า เจล HPMC ก่อนทำ stability test จากผลการคำนวณค่า AEAC พบว่า gallic acid ในตำรับเจล มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงกว่า ascorbic acid แต่น้อยกว่าสาร gallic acid อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เนื่องจากในตำรับเจลมี ฟองอากาศ มี oxygen อาจเกิดปฏิกิริยากับ สาร gallic acid ทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร gallic acid ในตำรับเจลลดลง

ตารางที่ 10 IC_{50} และ AEAC ของ ascorbic acid, vitamin E, gallic acid และเจล gallic acid

Substances	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	AEAC	Equation**	r^2
ascorbic acid	132.62	1.0000	$y = 0.3695x + 0.9981$	0.9970
vitamin E	358.38	2.7023	$y = 0.1295x + 3.5899$	0.9977
gallic acid	43.54	0.3283	$y = 0.8585x + 12.6200$	0.9950
L25N25G5*	55.27	0.4167	$y = 0.7851x + 6.6074$	0.9939
H3N25G5*	80.22	0.6049	$y = 0.5548x + 5.4914$	0.9971

* calculated as a concentration of loaded gallic acid; ** obtained from the plot between % inhibition and sample concentrations

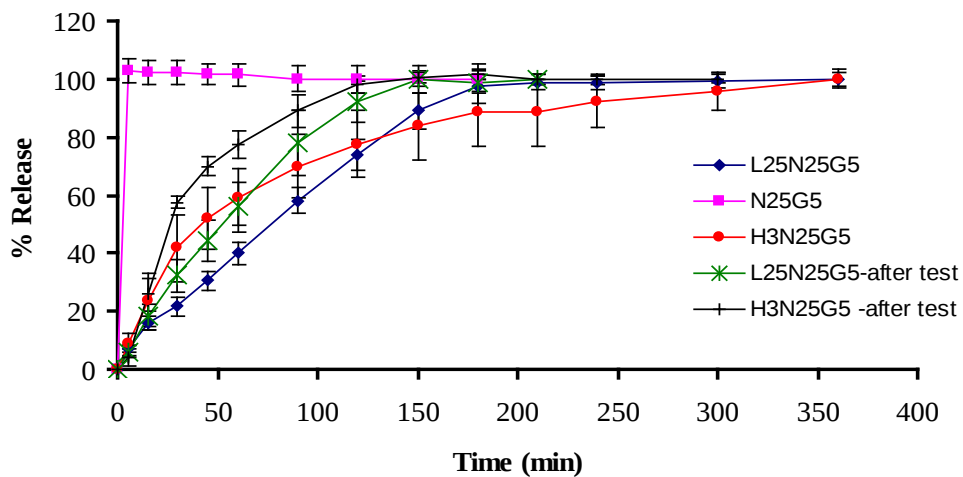


รูปที่ 28 ค่า IC₅₀ ของสารและตำรับเจลที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) (A: freshly prepared ; B: after stability test)

การปลดปล่อยสาร

การทดสอบการปลดปล่อยกรดแกลลิกนี้ทำการทดสอบด้วยวิธี membrane-less method (Liu และคณะ, 2009) การปลดปล่อยกรดแกลลิกจากตำรับเจลต่างๆคือ ตำรับ Lutrol F127 (L25N25G5) และตำรับ HPMC (H3N25G5) ทั้งก่อนและหลังทดสอบ stability และตำรับเปรียบเทียบคือ N25G5 (รูปที่ 29) พบว่าตำรับเปรียบเทียบซึ่งไม่มีสารก่อเจลมีการปลดปล่อยกรดแกลลิกออกมาหมดตั้งแต่แรก ส่วนตำรับเจล L25N25G5 ก่อนทดสอบ stability มีการปลดปล่อยกรดแกลลิกออกจากตำรับอย่างช้าๆ และคงที่โดยปลดปล่อยหมดภายในเวลาประมาณ 180 นาที และตำรับเจล H3N25G5 ก่อนทดสอบ stability มีการปลดปล่อยกรดแกลลิกออกจากตำรับเร็วกว่าตำรับ L25N25G5 ในช่วง 60 นาทีแรกแล้วค่อยๆปลดปล่อยช้าลงจนหมดภายในเวลา 380 นาที สาเหตุที่ตำรับ L25N25G5 ปลดปล่อยกรดแกลลิกหมดได้เร็วกว่าตำรับ H3N25G5 เนื่องจาก Lutrol F 127 มีคุณสมบัติเป็น non-ionic surfactant จึงสามารถก่อตัวเป็นไมเซลล์ (micelle) กักเก็บกรดแกลลิกไว้ภายในช่วยให้ละลายน้ำได้ดีและมีการปลดปล่อยที่คงที่กว่า HPMC ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์จำพวก Polysaccharide ซึ่งไม่ละลายน้ำแต่มีการพองตัวในน้ำ

การปลดปล่อยกรดแกลลิกออกจากตำรับ HPMC ที่เร็วในช่วงแรกแล้วช้าลงในช่วงหลังอาจเนื่องมาจากในช่วงแรกกรดแกลลิกที่อยู่ระหว่างสายพอลิเมอร์ยังมีความเข้มข้นสูงสามารถถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายจากด้านบนของถ้วย โดยสายพอลิเมอร์ที่เกาะกันค่อยๆ ถูกชะล้างแล้วหลุดออกไปในบัฟเฟอร์ ในอัตราที่ช้ากว่าการละลายของกรดแกลลิก และเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของกรดแกลลิกด้านบนของถ้วยลดลงสายพอลิเมอร์ที่ออกไปจากถ้วยได้ช้าก็จะขัดขวางการสัมผัสของ buffer กับกรดแกลลิกที่อยู่ภายในทำให้กรดแกลลิกถูกปลดปล่อยออกมาได้ช้าลง สูตรตำรับ L25N25G5 หลังทดสอบ stability มีลักษณะการปลดปล่อยกรดแกลลิกใกล้เคียงกับก่อนทดสอบ stability แต่มีการปลดปล่อยที่เร็วกว่าเล็กน้อยคือปลดปล่อยหมดภายในเวลาประมาณ 150 นาที และสูตรตำรับ H3N25G5 หลังทดสอบ stability มีการปลดปล่อยที่เร็วกว่าก่อนทดสอบ stability คือปลดปล่อยหมดตั้งแต่ช่วง 150 นาทีแรกเช่นกัน ทั้งนี้การปลดปล่อยกรดแกลลิกออกจากตำรับที่เร็วขึ้นของทั้งสองตำรับอาจเนื่องมาจากเมื่อทดสอบ stability มีผลให้ความหนืดของเจลทั้ง 2 ตำรับลดลงโดยเฉพาะตำรับเจล HPMC ทำให้ปลดปล่อยได้เร็วขึ้นมาก



รูปที่ 29 การปลดปล่อยกรดแกลลิกจากเจลกรดแกลลิกตำรับต่างๆ ใน Citrate-Phosphate Buffer pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 35°C หลังการเตรียมเจลเสร็จและหลังการทดสอบ stability

จากการวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยยาด้วยการฟิตข้อมูลการปลดปล่อยยากับสมการการปลดปล่อยยาต่างๆ พบว่า ข้อมูลการปลดปล่อยยาของเจลทั้งสองระบบสามารถฟิตได้ดีกับสมการ power law (ตารางที่ 11) ข้อมูลการปลดปล่อยยาของ L25N25G5 มีลักษณะเข้าใกล้การปลดปล่อยแบบอันดับศูนย์ (zero order release kinetic) โดยมี r^2 ที่ 0.9975 ขณะที่การปลดปล่อยของ H3N25G5 เป็นการปลดปล่อยแบบ first order (ตารางที่ 11) จากค่า n (ตารางที่ 12) สามารถระบุถึงกลไกการปลดปล่อยยา ทั้งนี้ค่าดังกล่าวของ L25N25G5 มีค่าเข้าใกล้ 0.89 บ่งชี้ว่า ยามีการปลดปล่อยด้วยอัตราเร็วที่คงที่จากเจลในระบบ L25N25G5 สำหรับค่า n ของ H3N25G5 มีค่า 0.55 แสดงว่าระบบมีการปลดปล่อยยาแบบ anomalous (non-Fickian) ซึ่งมีรูปแบบการปลดปล่อยด้วยอัตราเร็วสูงในช่วงแรกและอัตราการปลดปล่อยจะช้าลง ค่า k เป็นค่าคงที่ของการปลดปล่อยยาซึ่งค่าที่สูงแสดงว่ายาลดปล่อยได้เร็วกว่าระบบที่มีค่า n ที่ต่ำกว่า (Peppas, 1985; Ritger และ Peppas, 1987; Sanja และคณะ, 2007)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการฟิตข้อมูลการปลดปล่อยยากับสมการการปลดปล่อยยาต่างๆ

Formula	Power law		First order		Higuchi's		Zero order	
	r^2	MSC	r^2	MSC	r^2	MSC	r^2	MSC
L25N25G5	0.9980	5.31	0.9559	2.45	0.9113	1.76	0.9975	5.34
H3N25G5	0.9997	7.04	0.9888	3.83	0.9778	3.14	0.9146	1.79

ตารางที่ 12 Estimate parameter จากการฟิตข้อมูลการปลดปล่อยยากับสมการ power law

Formula	$k \pm SD (x 10^{-1})$	$n \pm SD$	TI (min)
L25N25G5	0.0362 ± 0.0291	1.10 ± 0.15	-17.49 ± 10.20
H3N25G5	1.6153 ± 0.0568	0.55 ± 0.08	11.46 ± 0.37

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของตำรับเจลต่าง ๆ ก่อน และหลัง temperature cycling ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ พบว่า สูตรตำรับที่ใช้ Lutrol® F 127 เป็นพอลิเมอร์ (L25N25) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (L25N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้น้อยมากหรือเกือบไม่ได้เลย สูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (H3N25) สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (H3N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้มากขึ้นเล็กน้อย จากพอลิเมอร์ทั้งสอง จึงสรุปได้ว่า gallic 5% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีฤทธิ์เลย แต่เมื่อเปรียบเทียบตำรับทั้ง 4 สูตร กับ ยา Ampicillin (10 µg) พบว่า Ampicillin (10 µg) มีฤทธิ์ดีมาก ในขณะที่ สูตรตำรับทั้ง 4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้น้อยกว่ามาก (รูปที่ 30) ส่วน solubilizer N (100%) มีฤทธิ์ได้มากใกล้เคียงกับ ยา Ampicillin (10 µg) (รูปที่ 31) สูตรตำรับที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์ (L25N25) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (L25N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ สูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (control HPMC (H3N25) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (gel สูตร H3N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ (รูปที่ 32) จึงสรุปได้ว่า gallic 5% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยในสูตรที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์ (L25N25G5) มีฤทธิ์ดีกว่าสูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (H3N25G5) ในขณะที่ Ampicillin (10 µg) มีฤทธิ์ดีมาก ส่วน solubilizer N (100%) มีฤทธิ์ดีรองจาก Ampicillin (10 µg) แต่เมื่อเปรียบเทียบตำรับทั้ง 4 สูตร กับ ยา Ampicillin (10 µg) และ solubilizer N (100%) พบว่ามีฤทธิ์ดังนี้ $L25N25 = H3N25 < H3N25G5 < L25N25G5 \ll \text{solubilizer N} < \text{Ampicillin (10 µg)}$ สูตรตำรับที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์ (L25N25) สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (L25N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ดีขึ้น สูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (H3N25) สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับที่มี gallic 5% (H3N25G5) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ดีขึ้น (รูปที่ 33) จึงสรุปได้ว่า สูตรตำรับที่ไม่มี gallic 5% (L25N25) และ (H3N25) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของ solubilizer N ที่มีอยู่ในตำรับ ส่วน gallic 5% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ โดยในสูตรที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์ (L25N25G5) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (H3N25G5) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจาก inhibition zone แล้ว จะพบว่าสูตรตำรับที่มี gallic 5% น่าจะ มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ เชื้อ *C. albican* > *S. aureus* >> *E. coli* ตามลำดับ การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสูตรตำรับหลังจากทำการทดสอบ Stability test ด้วย Temperature cycling 5 รอบ เปรียบเทียบกับตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สูตรตำรับทั้ง 4 สูตร คือ L25N25G5 และ H3N25G5 ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทดสอบ Stability test พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เลย (รูปที่ 34) สูตรตำรับ L25N25G5 ที่ไม่ได้ผ่าน Temperature cycling ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ในขณะที่ สูตรตำรับ L25N25G5 ที่ได้ผ่าน Temperature cycling ไม่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นเดียวกัน (รูปที่ 35) อาจสรุปได้ว่าหลังจากทำ Temperature cycling อาจมีผลต่อความคงตัวของ Gallic acid ในตำรับ ซึ่งพบว่า สูตรตำรับมีสีที่เข้มขึ้น และมีพีเอชที่สูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลพื้นฐานที่ Gallic acid มีความไม่คงตัวต่อภาวะต่าง สูตรตำรับทั้ง H3N25G5 ที่ผ่านและไม่ได้ผ่าน Temperature cycling สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ ยา Ampicillin (10 µg) พบว่า Ampicillin (10 µg) มีฤทธิ์ดีกว่าประมาณ 2.5 เท่า อาจเป็นไปได้ว่า หลังจากทำ Temperature cycling สูตรตำรับมีสีที่เข้มขึ้นมากซึ่งอาจมีผลต่อความคงตัวของตำรับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่มากนี้เองอาจเป็นปัจจัยภายในหนึ่งที่ทำให้ตำรับยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้เช่นเดียวกัน สูตรตำรับ L25N25G5 ที่ไม่ได้ผ่าน Temperature cycling สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ ในขณะที่สูตรตำรับ L25N25G5 ที่ได้ผ่าน Temperature cycling มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ลดลงเล็กน้อย ซึ่งสูตรตำรับ H3N25G5 ให้ผลเช่นเดียวกับสูตรตำรับ L25N25G5 คือ

H3N25G5 ที่ผ่าน Temperature cycling มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albican* ได้ลดลงเล็กน้อย แต่โดยในสูตรที่ใช้ Lutrol เป็นพอลิเมอร์ (L25N25G5) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสูตรตำรับที่ใช้ HPMC เป็นพอลิเมอร์ (H3N25G5) ทั้งที่ผ่านและไม่ได้ผ่าน Temperature cycling (รูปที่ 36) สรุปได้ว่าการทำการทดสอบ Stability test มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albican* เล็กน้อย แต่มีข้อสังเกตที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ ใน plate ทดสอบเชื้อ *C. albican* agar กลับไม่มีสี ทำให้เป็นที่สงสัยว่า ฤทธิ์ที่มีอยู่นี้เป็นฤทธิ์จาก gallic acid หรือไม่ ซึ่งกำลังตรวจสอบซ้ำ อย่างไรก็ตามคาดว่า อาจเนื่องมาจาก gallic acid ไม่ทำปฏิกิริยากับ SDA เหมือนที่ทำปฏิกิริยากับ TSA จาก NMP ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มการละลายในการศึกษานี้มีการใช้เป็นสารทำละลายพอลิเมอร์เช่น poly (DL-lactide) และ sucrose acetate isobutyrate (Koizumi และคณะ, 2004) สำหรับเตรียมระบบเจลชนิดกึ่งตัวเองได้สำหรับฉีดเนื่องจากเป็นสารทำละลายชนิดที่มีความเข้ากันได้กับร่างกายและสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Sanghvi และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบระบบเจลที่พัฒนาขึ้นซึ่งนอกจากช่วยเพิ่มการละลายของสารได้แล้วยังมีคุณสมบัติอื่นที่น่าสนใจด้วยซึ่งรวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรค

ตารางที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อของตำรับต่างๆ หลังเตรียมเสร็จ

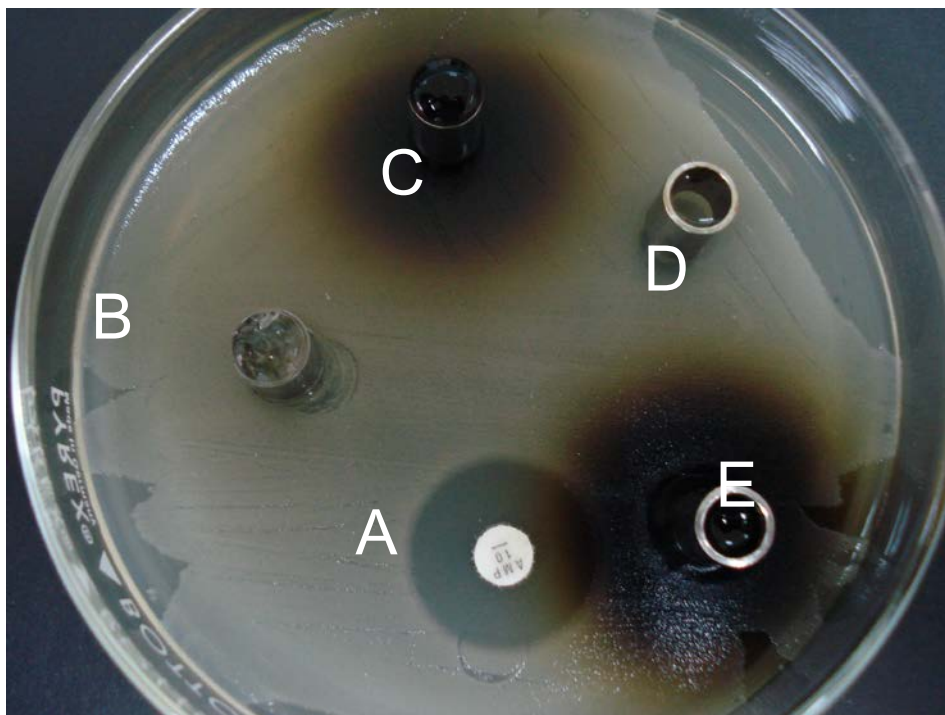
organism	Formula	Clear zone (cm)				
		A	B	C	mean	S.D.
<i>E. coli</i>	L25N25	0	0	0	0	0
	L25N25G5	0	0	1.3	0.43	0.61
	H3N25	1	0	1.1	0.7	0.5
	H3N25G5	1.2	0	1	0.73	0.52
	Solubilizer N	2.5	1.8	2	2.1	0.29
	Ampicillin (10 µg)	2	2	1.9	1.97	0.05
<i>S. aureus</i>	L25N25	0	0	0	0	0
	L25N25G5	1.25	1.25	1.7	1.4	0.21
	H3N25	0	0	0	0	0
	H3N25G5	1.15	1.25	1.1	1.17	0.06
	Solubilizer N	2	3.5	1.6	2.37	0.82
	Ampicillin (10 µg)	3.8	4	3.45	3.75	0.23
<i>C. albican</i>	L25N25	1.85	1.8	1.6	1.75	0.11
	L25N25G5	2.3	2	2	2.1	0.14
	H3N25	1.8	1.8	1.8	1.8	0
	H3N25G5	2	2	2	2	0

หมายเหตุ A:เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน, B:หลังทำ Temperature cycling จำนวน 5 รอบ

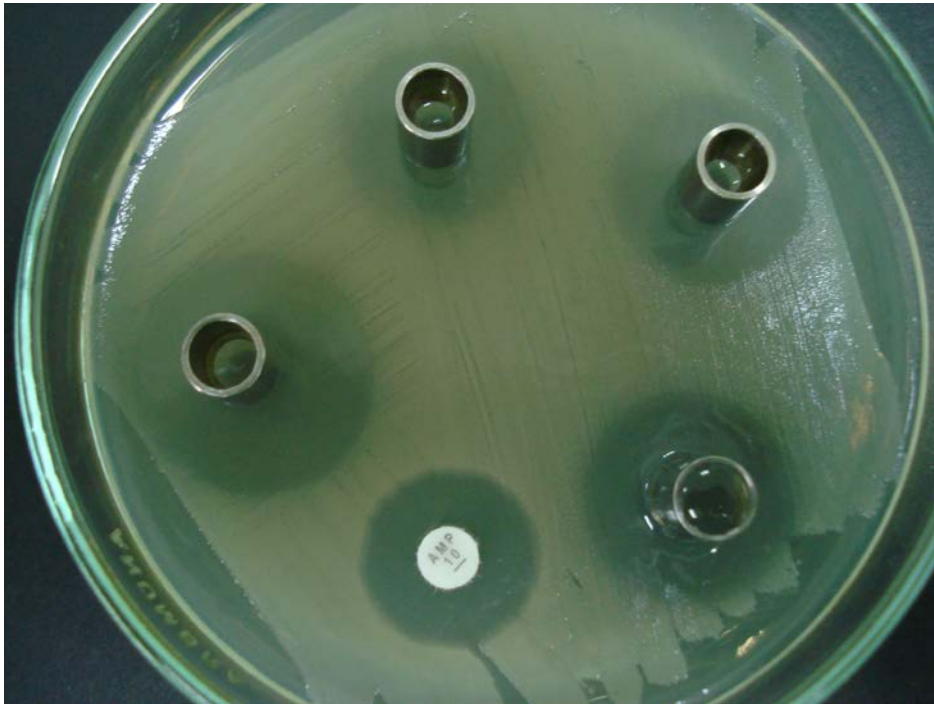
ตารางที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อของตำรับต่างๆ เมื่อผ่าน temperature cycling

Organism	Formula	Clear zone (cm)				
		A	B	C	mean	S.D.
<i>E. coli</i>	L25N25G5 (A)	0	0	0	0	0
	L25N25G5(B)	0	0	0	0	0
	H3N25G5 (A)	0	0	0	0	0
	H3N25G5(B)	0	0	0	0	0
	Ampicillin (10 µg)	1.55	1.6	1.75	1.63	0.08
<i>S. aureus</i>	L25N25G5 (A)	0	0	0	0	0
	L25N25G5 (B)	0	1.5	0	0.5	0.71
	H3N25G5 (A)	1.9	1.1	1.25	1.42	0.35
	H3N25G5(B)	1.85	1.3	1.15	1.43	0.3
	Ampicillin (10 µg)	3.8	4	3.8	3.87	0.09
<i>C. albican</i>	L25N25G5 (A)	2	2.2	2.2	2.13	0.09
	L25N25G5 (B)	1.65	1.8	1.85	1.77	0.08
	H3N25G5 (A)	2	2	2	2	0
	H3N25G5(B)	2	1.85	2	1.95	0.07

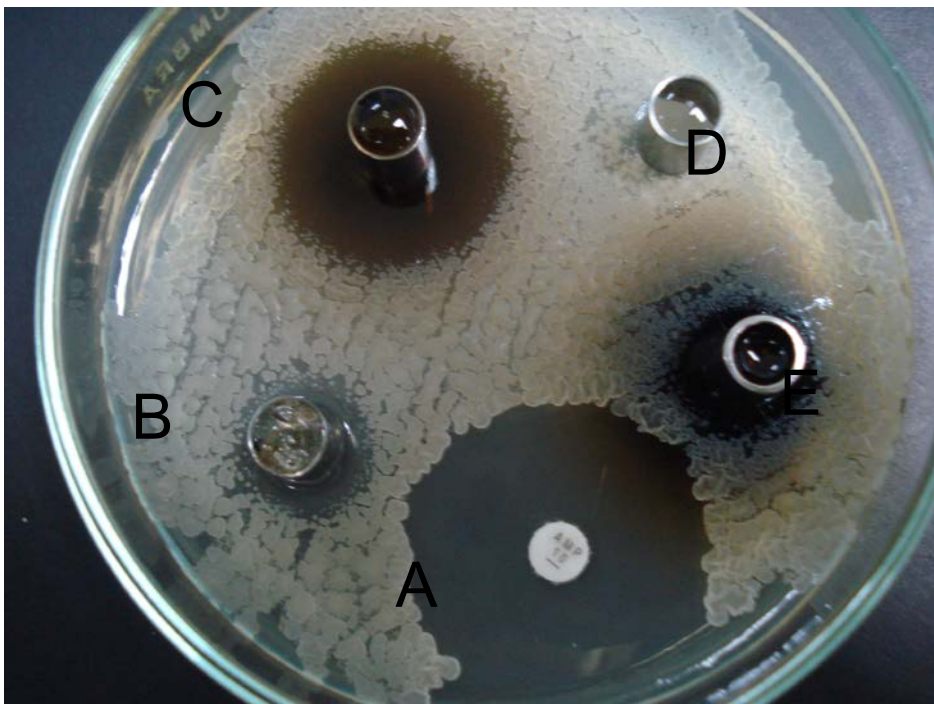
หมายเหตุ A:เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน, B:หลังทำ Temperature cycling จำนวน 5 รอบ



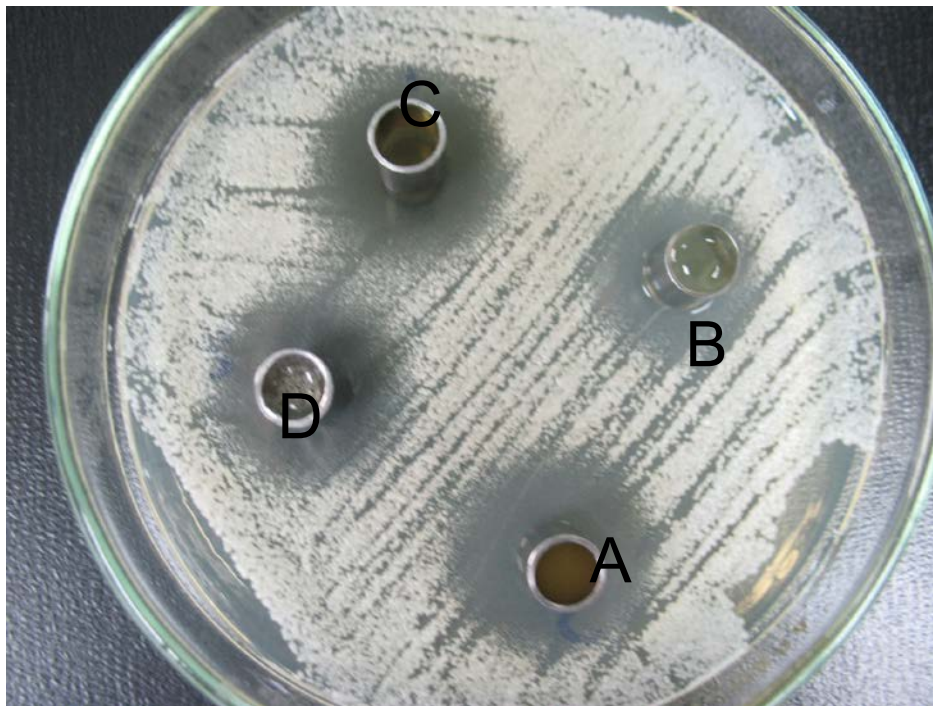
รูปที่ 30 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของ A : ampicillin 10 µL; B : L25N25; C : L25N25G5; D : H3N25; E : H3N25G5



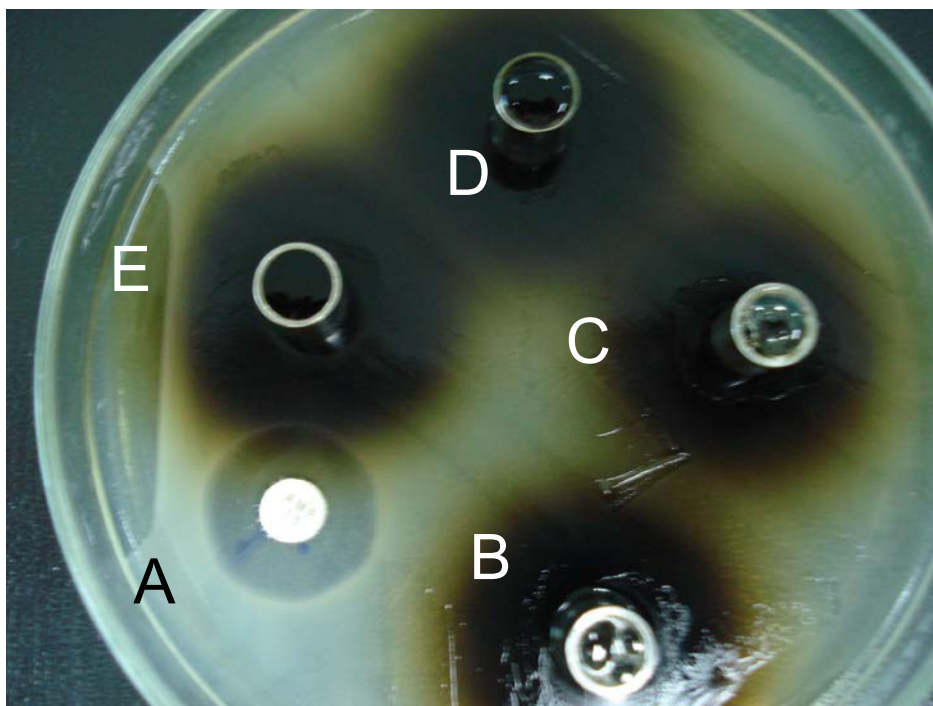
รูปที่ 31 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของ Solubilizer N



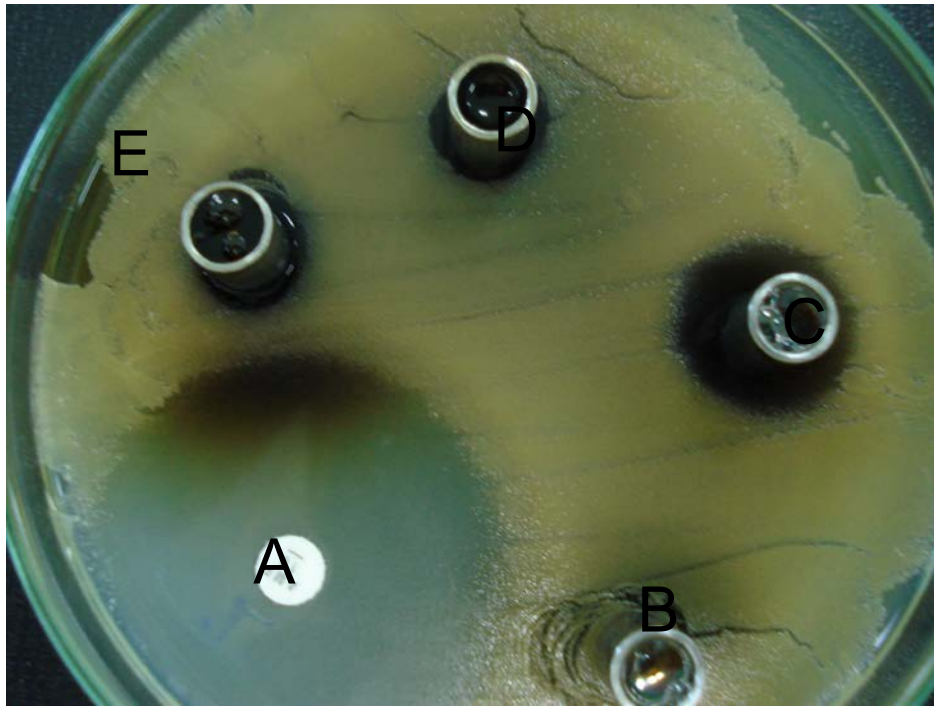
รูปที่ 32 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของ A : ampicillin 10 μ L; B : L25N25; C : L25N25G5; D : H3N25; E : H3N25G5



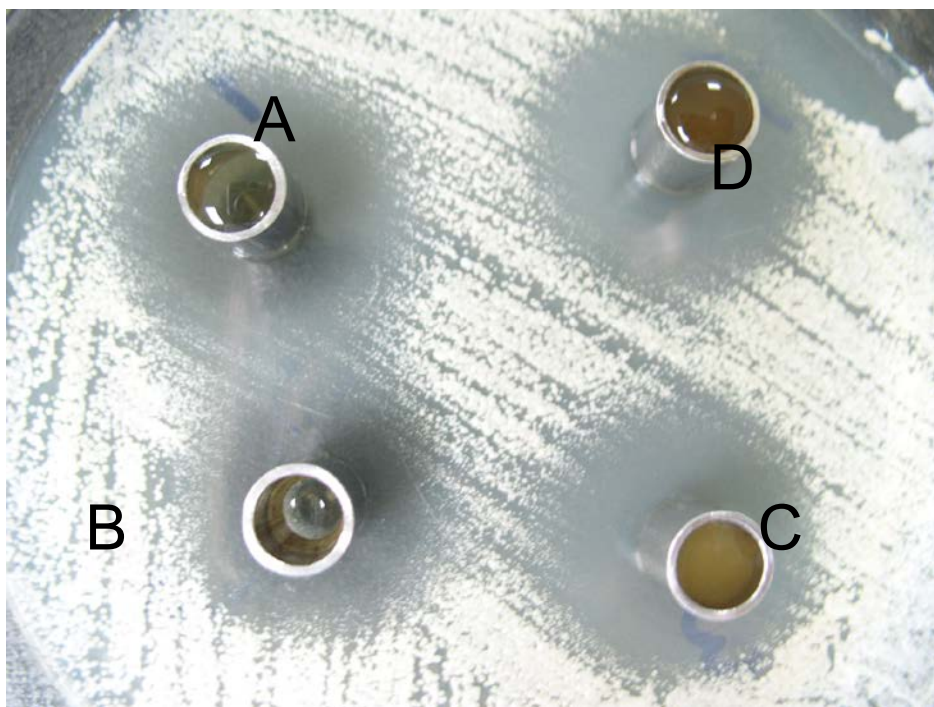
รูปที่ 33 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. albican* ของ A : H3N25G5; B : H3N25; C : L25N25G5; D : L25N25



รูปที่ 34 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของ A : ampicillin 10 μ L; B : L25N25G5 (A); C : L25N25G5 (B); D : H3N25G5 (A); E : H3N25G5 (B)



รูปที่ 35 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของ A : ampicillin 10 μ L; B : L25N25G5 (A);
C : L25N25G5 (B); D : H3N25G5 (A); E : H3N25G5 (B)



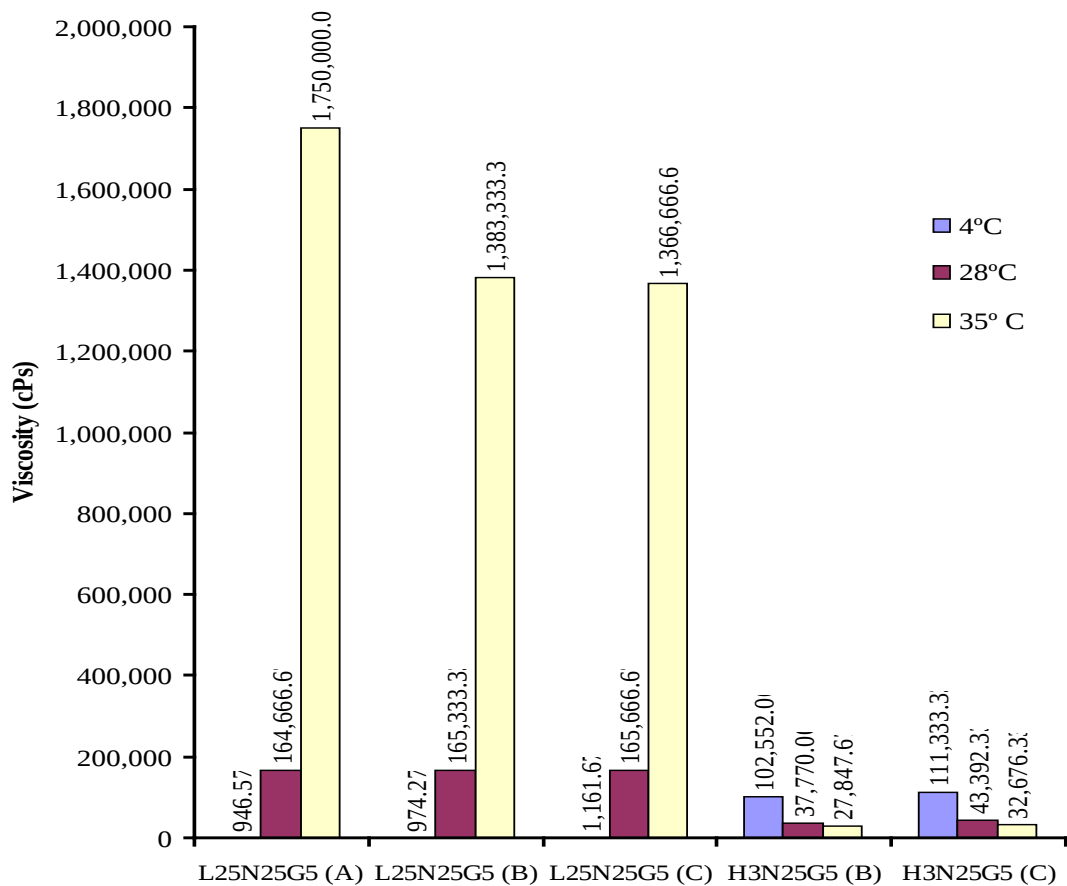
รูปที่ 36 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของ A : L25N25G5 (A); B : L25N25G5 (B);
C : H3N25G5 (A); D : H3N25G5 (B)

การทดสอบความคงตัวของเจลกรดแกลลิกตำรับต่าง ๆ (Stability test - Temperature Cycling)

จากการนำเจลกรดแกลลิกสูตรตำรับ L25N25G5 และสูตรตำรับ H3N25G5 มาทดสอบ stability พบว่าเจลสูตรตำรับที่ผ่าน Temperature cycling จำนวน 5 รอบ ของทั้ง 2 สูตรจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นกว่าตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและตำรับที่เก็บในตู้เย็นของตำรับ L25N25G5 (ตารางที่ 15) โดยเฉพาะตำรับ H3N25G5 ที่ผ่าน Temperature cycling จะมีสีเหลืองเข้มจนออกสีน้ำตาล สามารถเรียงลำดับความเข้มของสีจากน้อยไปมากได้ดังนี้ L25N25G5 (A) < L25N25G5 (B) < L25N25G5 (C) < H3N25G5 (B) < H3N25G5 (C) ผลการวัดความหนืดพบว่าตำรับ L25N25G5 ที่เก็บในทุกสภาวะจะมีความหนืดลดลงกว่าตำรับภายหลังการเตรียม (รูปที่ 37) และเมื่อเทียบกับที่ทำ stability ด้วยกันพบว่าที่อุณหภูมิต่างๆ ความหนืดที่วัดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และความหนืดจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ยังคงเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนตำรับ H3N25G5 ที่เก็บในทุกอุณหภูมิพบว่าความหนืดที่วัดได้จะใกล้เคียงกับตำรับที่เตรียมใหม่ๆ ผลการวัด pH ของทุกสูตรตำรับพบว่าค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ pH ที่วัดได้จากตำรับที่เตรียมเสร็จใหม่ๆคือเพิ่มจาก pH ประมาณ 3.5 -3.8 ไปเป็น 5.7-5.9 ซึ่งผลของความหนืดและ pH ที่เปลี่ยนแปลงหลังผ่านการทดสอบ stability อาจเกิดเนื่องมาจากการเปลี่ยนสภาพการก่อเจลของพอลิเมอร์ และอาจมีผลให้ความหนืดของเจลกรดแกลลิกสูตรที่ใช้ Lutrol® F127 ลดลง หรือมีผลทำให้ Tsol-gel สูงขึ้น

ตารางที่ 15 ลักษณะทางกายภาพ ผลการวัด pH และความหนืดของเจลกรดแกลลิกหลังการทดสอบ stability

สูตรตำรับ	เก็บที่	ค่าเฉลี่ย				ลักษณะทางกายภาพ
		ความหนืด(cPs) ± SD			pH	
		4°C	28°C	35°C		
L25N25G5	4°C (A)	946±36	164,666±2,309	1,750,000±156,205	5.766±0.093	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อน (+)เปลี่ยน เป็นเจลได้เมื่อตั้งทิ้งไว้
	อุณหภูมิห้อง (B)	974±53	165,333±2,517	1,383,333±41,633	5.807±0.025	สารละลายใส มีสีเหลืองอ่อน (++) เปลี่ยนเป็นเจลได้เมื่อตั้งทิ้งไว้
	4°C สลับ 45°C (C)	1,161± 588	165,666±5,859	1,366,666±37,859	5.736±0.019	สารละลายใส มีสีเหลืองเข้มขึ้น (+++)เปลี่ยนเป็นเจลได้เมื่อตั้งทิ้งไว้
H3N25G5	อุณหภูมิห้อง (B)	102,552±7,281	37,770±895	27,847±1,213	5.867±0.079	เจลใส มีสีเหลืองเข้ม(++++) มีความหนืดปานกลาง ไหลได้
	4°C สลับ 45°C (C)	111,333±8,622	43,392±826	32,676±499	5.836±0.034	เจลใส มีสีเหลืองเข้มออกน้ำตาล(++++++) มีความหนืดปานกลาง ไหลได้



รูปที่ 37 ความหนืดของตำรับเจลหลังการเก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ

สรุป

จากการพัฒนาสูตรตำรับเจลกรดแกลลิกในลักษณะของเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิพบว่า ได้สูตรตำรับเจลที่เหมาะสมคือ Lutrol® F127 25 % w/w + Solubilizer N 25 % w/w + Gallic acid 5 % w/w (L25N25G5) ซึ่งมีลักษณะใส เนื้อเรียบเนียน โดยมีสูตรตำรับที่ใช้ HPMC (H3N25G5) เป็นตำรับเปรียบเทียบ เมื่อนำมาศึกษาการปลดปล่อยสาร G ออกจากตำรับแบบภาวนอกร่างกายใน Citrate-phosphate buffer pH 5.5 พบว่าตำรับ L25N25G5 ปลดปล่อย G ออกจากตำรับได้ในอัตราที่เร็วและคงที่กว่าเมื่อเทียบกับตำรับ H3N25G5 และเมื่อทดสอบพฤติกรรมการไหล (Rheology) พบว่า L25N25G5 มีพฤติกรรมการไหลแบบนิวโตเนียน (newtonian flow) ที่อุณหภูมิ 4°C และแบบพลาสติก (plastic flow) ที่ 28°C และ 35°C เมื่อเทียบกับสูตร H3N25G5 ซึ่งพบว่ามีพฤติกรรมการไหลแบบซูโดพลาสติก (Pseudoplastic flow) ที่ทั้ง 3 อุณหภูมิ นอกจากนี้ L25N25G5 ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นเจลลดเลือนริ้วรอยที่สามารถทำได้ง่ายในขณะที่เป็นของเหลว แล้วเปลี่ยนเป็นเจลที่ติดผิวได้

B. การเตรียมเจลจากสารสกัดเมล็ดลำพู ในรูปยาฉีดเข้าสู่ปริทันต์

1. การเตรียมเจลจากสารสกัดเมล็ดลำพู ในรูปยาฉีดเข้าสู่ปริทันต์

1.1. สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมี

- N-Methyl-2-Pyrrolidinone (NMP), 99% extra pure (Lot. A0277037, ACROS, USA)
- Eudragit® RS PO (Lot. G080938195, EVONIK industries, Germany)
- สารสกัดจากเมล็ดลำพู ที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล (SO) 1%, 5% และ 15%
- 2,2' – Azino–bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ~98% (Lot. 015K0795, Sigma®, USA)
- Potassium persulfate (Lot. F2E077, Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia)
- 0.01%(v/v) H₃PO₄
- Acetonitrile HPLC grade
- Methanol (CH₃OH) HPLC grade
- Gallic acid (Fluka 48630)
- Luteolin -7-O-glucoside (Extrasynthese 0053)
- Luteolin (Extrasynthese 0053)

สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ

- Tryptic Soy Broth (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Tryptic Soy Agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Difco™ Sabouraud Dextrose Agar (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Difco™ Sabouraud Dextrose Broth (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company, USA)

เชื้อจุลินทรีย์

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*
- *Streptococcus mutans* ATCC 27175
- *Propionibacterium acnes* ATCC 11827
- Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก

เครื่องมือและอุปกรณ์

- Ultrasonic bath (Transonic รุ่น Elma transonic ของบริษัท ELMA-HANS SCHMIDBAUER GMBH & CO KG, Singen, Germany)

- pH meter รุ่น Professional Meter Sartorius
- pH meter (Denver Ultrabasic Benchtop meter, New York, USA)
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield DV-III ULTRA programmable rheometer ของบริษัท
BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, INC. เมือง Middleboro สหรัฐอเมริกา)
- Syringe (NIPRO (Thailand) CORP., LTD. Pra Nakhon Si Ayutthaya, Thailand)
- Dispensing Needles 20 Gauge 1.0" , ID= 0.025", OD = 0.036"
(Lot. JG20-1.0P, Howard Electronic Instrument Inc.)
- เครื่อง Vortex-2 (บริษัท Scientific industries inc., New York, USA)
- UV-Visible spectrophotometer (รุ่น 8453 E ของบริษัท Agilent technology, China)
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (SHEL LAB shaking incubator ของบริษัท Sheldon Mfg. Inc.
Cornelius, USA)
- Molecularporous membrane tubing Flat Width= 23±2mm, Diameter= 14.6mm,
Vol/Length=1.7ml/cm (Spectrum Laboratories, Inc., USA)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Agilent 1100 series
VWD detector
- Column RP-18 (10 µm) Semi-preparative Merck, LiChroCART 250-10 HPLC-
Cartridge, LiChrospher 100 RP-10 (10µm), Lot No. 94035341
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Sartorius รุ่น CP224S)
- syringe filter 0.45 µm
- syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร
- UV-Visible spectrophotometer (รุ่น 8453 E ของบริษัท Agilent technology, China)
- Laminar Air Flow (รุ่น Bio Safe 2010 ของบริษัท Holten LaminAir, Denmark)
- Anaerobic incubator (รุ่น Forma Anaerobic system ของบริษัท ThermoForma, USA)

1.2. วิธีการทดลอง

1.2.1. การเตรียมเจลจากสารสกัดเมล็ดลำพู (SO) ในรูป Injection

- 1.2.1.1. ละลายสารสกัดจากเมล็ดลำพู (SO) ใน NMP โดยเติม SO 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% 25%, 30%, 35% w/w ตามลำดับ คนให้เข้ากัน ถ้ายังไม่ละลายให้ใช้เครื่อง sonicator ช่วยในการละลาย
- 1.2.1.2. ละลาย Eudragit® RS PO ในสารละลายข้างต้นจนได้ ความเข้มข้น 30% w/w
- 1.2.1.3. สังเกตลักษณะภายนอกของเจล คือ สี และความหนืดของเจล บันทึกผล
- 1.2.1.4. วัด pH ของตำรับเจลด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล (n=3)
- 1.2.1.5. วัดความหนืดของตำรับที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง Brookfield บันทึกผล (n=3)
- 1.2.1.6. การศึกษาพฤติกรรมการไหล (Rheology) ของเจลตำรับต่าง
 - a) ค่อยๆ เพิ่มอัตราเร็วในการหมุน (Shear rate) ไปเรื่อยๆ จากต่ำสุด วัดค่า Shear stress หลังเปลี่ยนอัตราเร็วแต่ละครั้งประมาณ 10-20 วินาที จนเครื่องไม่สามารถอ่านค่าความหนืดของเจลได้จึงค่อยๆ ลด Shear rate ลง
 - b) นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟระหว่าง shear rate กับ shear stress
 - c) จากสมการ $\log G = N \log F - \log \eta'$ พล็อตกราฟระหว่าง $\log G$ กับ $\log F$

ความชันของกราฟคือค่า N โดยแปลผลการไหลของตำรับจากเกณฑ์ดังนี้

ถ้า N ใกล้เคียง 1 คือ newtonian

ถ้า N น้อยกว่า 1 คือ Dilatant

ถ้า N มากกว่า 1 คือ Pseudoplastic หรือ Plastic กรณีที่มีค่า yield point

1.2.2. การทดสอบคุณสมบัติในการก่อตัวเป็นเจลของตำรับยาเมื่อนีตลงในสารละลายต่างๆ

1.2.2.1. เติมสารละลาย buffer pH 1.2, 6.8, และ น้ำ ปริมาณ 5mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL

1.2.2.2. นีตเจลปริมาณ 1 mL ลงในสารละลายโดยใช้หัวเข็ม

1.2.2.3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเจลที่ 0 นาที, 1 นาที และ 30 นาที และทำการบันทึกผล

1.2.3. การทดสอบการแพร่ของเจล

1.2.3.1. เติมสารละลาย buffer pH 6.8 ปริมาณ 5mL ลงในหลอดทดลองที่มีเจล ที่เตรียมจากสาร สกัดเมล็ดลำพู 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% ปริมาณ 1mL

1.2.3.2. บันทึกระยะเวลาในการแพร่ของเจล

1.2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Gallic acid Equivalent Antioxidant Capacity assay (GEAC)

1.2.4.1. การเตรียมสารที่ใช้ใน GEAC assay

1.2.4.1.1. การเตรียม ABTS radical cation ($ABTS^{2+}$) ตามขั้นตอนดังนี้

1.2.4.1.1.1. เตรียมสารละลาย $ABTS^{2+}$ ความเข้มข้น 7 mM โดยชั่ง $ABTS$ 0.0960 g ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น DI

1.2.4.1.1.2. เตรียมสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM โดยชั่ง Potassium persulfate 0.0165 g ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับ ปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น DI

1.2.4.1.1.3. เตรียมสารละลาย $ABTS$ โดยเทสารละลาย $ABTS^{2+}$ ความเข้มข้น 7 mM ที่เตรียม ในข้อ a) จำนวน 25 mL ลงใน flask ขนาด 100 mL จากนั้นเทสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ที่เตรียมในข้อ b) จำนวน 25 mL ผสมลงไปโดยไม่ต้องปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

1.2.4.1.2. การเตรียมสารละลาย gallic acid (stock solution) โดยชั่ง gallic acid 0.0250 g ใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น

1.2.4.1.3. การเตรียมสารละลายเจลโดย

1.2.4.1.3.1. ชั่ง เจล 0.050 g ใน beaker ขนาด 50 mL

1.2.4.1.3.2. เติม Ethanol 5 mL และคนให้เข้ากัน

1.2.4.1.3.3. เติม น้ำ 1 mL เพื่อช่วยให้สารละลายมีความใส

1.2.4.1.3.4. เทสารละลายที่ได้ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL และปรับปริมาตรด้วย Ethanol

1.2.4.2. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลาย Gallic acid

1.2.4.2.1. เตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 160, 240, 320, 400 และ 480 $\mu\text{g/mL}$ จาก stock solution

1.2.4.2.2. แบ่งสารละลาย ABTS มาเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น จนได้ Absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.70 ± 0.02 โดยสภาวะที่ทดลองคือ อุณหภูมิห้อง และไม่มีแสง

1.2.4.2.3. ปิเปตสารละลาย ABTS ที่เจือจางปริมาณ 3 mL ใส่ในหลอดทดลองที่ห่อด้วย aluminium foil

1.2.4.2.4. ปิเปตสารละลายเจือจางของ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆปริมาณ 50 μ L ใส่ลงในหลอดทดลอง ในข้อที่ 1.2.4.2.3 ปั่นผสมให้เข้ากันบน Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที วัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm ครั้งแรกเป็นนาทีที่ 1 และตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที วัด Absorbance ครั้งที่สองเป็นนาทีที่ 6

1.2.4.2.5. คำนวณค่าต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (%inhibition) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ gallic acid โดยสามารถคำนวณได้ดังสูตร

$$\%inhibition = [(A \text{ ABTS เริ่มต้น} - A \text{ ABTS นาทีที่ 6}) / A \text{ ABTS เริ่มต้น}] \times 100$$

1.2.4.3. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายลำพู

ทำการทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย gallic acid โดยเจือจางสารละลายเจล ให้มีความเข้มข้น 200, 500, 600, 700 และ 800 μ g/mL

1.2.4.4. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล ที่มี SO 7.5% ของตำหรับที่เตรียม

ทำการทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย gallic acid โดยเจือจางสารละลายเจล ให้มีความเข้มข้น 600, 750, 1050, 1350 และ 1500 μ g/mL

1.2.4.5. วิธีการทำ Calibration curve ของสารละลายเจล ที่มี SO 10% ของตำหรับที่เตรียม

การทดลองเหมือนการทำ Calibration curve ของสารละลาย gallic acid โดยเจือจางสารละลายเจล ให้มีความเข้มข้น 600, 800, 1200, 1600 และ 1800 μ g/mL

1.2.5 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคด้วยวิธี Cup method

1.2.5.1 ทำการเพาะเชื้อ

Staphylococcus aureus ด้วยอาหาร Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

Escherichia coli ด้วยอาหาร Tryptic Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

Candida albicans ด้วยอาหาร Difco™ Sabouraud Dextrose Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

Streptococcus mutans ATCC 27175 ด้วยอาหาร Brain Heart Infusion บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

Propionibacterium acnes ATCC 11827 ด้วยอาหาร Brain Heart Infusion บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

Anaerobic bacteria จากร่องเหวี่ยง ด้วยอาหาร Brain Heart Infusion บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

1.2.5.2 วิธีการเตรียมความขุ่นมาตรฐาน

- นำเชื้อที่บ่มแล้ว มาวัดความขุ่นมาตรฐานด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer โดยใช้อาหาร TSB (สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*) หรือ SDB (สำหรับ

เชื้อ *Candida albicans*) เป็น Blank วัดค่า Absorbance ที่ 530 nm ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.5 หรือ BHI (สำหรับเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 และ Anaerobic bacteria จากร่องเหลือง) เป็น Blank วัดค่า Absorbance ที่ 540 nm ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.5

- b. ทำการปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐานด้วยการทำ dilution
- c. ทำการคำนวณหาปริมาตรของเชื้อเพื่อ dilute ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml ด้วยสมการดังนี้

<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = 2 \times 10^{-5}x + 0.0282$	(y $\times 10^4$ cfu/ml)
<i>Escherichia coli</i>	$y = 8 \times 10^{-5}x + 0.029$	(y $\times 10^4$ cfu/ml)
<i>Candida albicans</i>	$y = 0.003x - 0.032$	(y $\times 10^4$ cfu/ml)
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175	$y = 0.024x - 0.1024$	(y $\times 10^6$ cfu/ml)
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	$y = 0.003x - 0.061$	(y $\times 10^6$ cfu/ml)
Anaerobic bacteria	$y = 0.004x - 0.022$	(y $\times 10^6$ cfu/ml)

หมายเหตุ y คือ ค่า OD และ x คือ ปริมาตรของเชื้อที่ต้องการรู้

1.2.5.3 ทำการทดสอบด้วยวิธี cup method ตามขั้นตอนดังนี้

- เพาะเชื้อลงในอาหาร TSA (สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*) หรือ SDA (สำหรับเชื้อ *Candida albicans*) หรือ BHI agar (สำหรับเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 และ Anaerobic bacteria จากร่องเหลือง) โดยใช้ sterile swab จุ่มลงในเชื้อที่ทำการ dilute แล้วหมุน swab กับผิวด้านในหลอดให้ swab พอหมาดๆ
- แล้วจึงใช้ swab มาป้ายให้เป็น 3 ระบาย ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ปลอ่ยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ประมาณ 3-5 นาที
- ใช้ sterile forceps ลนเปลวไฟ แล้วปลอ่ยให้เย็นจึงคีบ cup มาวางบนผิวของอาหาร เป็นจำนวน 4 cups โดยที่จะวางในลักษณะที่ตรงข้ามกัน
- ใช้ sterile pipette ตูดตัวอย่างเจลทั้ง 4 ตัวอย่าง หยดลงใน cups แต่ละอันให้เต็มจนครบทั้ง 4 cups
- ทำซ้ำเช่นเดียวกันอีก 2 plates
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
- การแปลผลการทดสอบ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร (n=3) (โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของ cup เท่ากับ 8 มม.)

1.2.5.4 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคเพิ่มเติมของสารสกัดลำพูส่วนต่าง ๆ

ทำการเพาะเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 และ Anaerobic bacteria จากร่องเหลืองเช่นเดียวกับวิธีด้านบน และเตรียมสารสกัดลำพูส่วนต่าง ๆ (ที่หุ้มดอกลำพู, เกสรลำพู, เมล็ดลำพู, ผลลำพู, ใบลำพู และ รากอากาศที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอล) และสาร leteolin, leteolin glycoside และ gallic acid ในความเข้มข้น 2.5% w/w ในน้ำ และนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วย

วิธี cup method เช่นเดียวกับวิธีด้านบน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง และทำการแปลผลการทดสอบ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ใช้หน่วยเป็นมิลลิเมตร (n=3)

1.2.6 การศึกษาการปลดปล่อยสารจากเจลสารสกัดลำพูด้วยวิธี dialysis tube

1.2.6.1 ชั่งเจลตำรับซึ่งมีสารสกัดลำพูที่สกัดเมล็ดลำพูด้วยการหมักด้วยเมธานอล (ความเข้มข้นสารสกัด 10%) ปริมาณ 1g ใส่ dialysis tube และปิดปลายทั้งสองด้านด้วย clip

1.2.6.2 นำ dialysis tube ไปใส่ใน buffer pH 6.2 ปริมาณ 100 mL

1.2.6.3 นำไปใส่ใน shaking incubator ที่ความเร็ว 200 rpm

1.2.6.4 สุ่มตัวอย่างมา 10 mL ที่เวลาต่างๆ

1.2.6.5 เติม buffer ที่มีปริมาณเท่าเดิมทดแทน

1.2.6.6 ทำการวิเคราะห์สารสำคัญที่แพร่สู่บัฟเฟอร์ด้วยวิธี HPLC

1.2.6.6.1 ระบบที่ใช้กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

Mobile phase = 0.01%(v/v) H_3PO_4 : CH_3CN

Flow rate = 5 ml/minute

Column = RP-18 (10 μ m) Semi-Preparative

Wavelength = 280 nm

Method = Gradient elution

0-20 % CH_3CN เวลา 10 นาที

20 % CH_3CN เวลา 10-20 นาที

20-60 % CH_3CN เวลา 20-30 นาที

60 % CH_3CN เวลา 30-40 นาที

1.2.6.6.2 วิเคราะห์สารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดเมล็ดลำพู

1.2.6.6.2.1 นำสารสกัดจากเมล็ดลำพู น้ำหนัก 0.0500 g ปรับปริมาตรด้วย 100% NMP 10 ml (5mg/ml) ใช้เครื่อง Ultrasonicator เพื่อช่วยในการละลายของสารสกัด แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5mg/ml ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μ m และฉีดเข้า HPLC สังเกต peak ที่ตรงกับสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า SD

1.2.6.6.3 วิเคราะห์สารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดเมล็ดลำพูเมื่ออยู่ในรูปเจลที่ปลดปล่อยในตัวกลางที่เป็น phosphate buffer pH 6.8

1.2.6.6.3.1 ทำการศึกษาการปลดปล่อยสารด้วยวิธี dialysis tube โดยบรรจุระบบที่เตรียมขึ้นที่มี SO 5% มาบรรจุใน dialysis tube ประมาณ 1 กรัม โดยชั่งน้ำหนักที่บรรจุแล้วนำมาปิดส่วนปลายทั้งสองด้านให้สนิทด้วยการผูกด้วยด้าย ก่อนนำแช่ในตัวกลางที่เป็น phosphate buffer pH 6.8 ปริมาณ 40 มล ที่เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่ 37 °C นำตัวอย่างที่สุ่มมา ณ เวลาต่างๆ มากรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μ m และฉีดเข้า HPLC สังเกต peak ที่ตรงกับสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า SD

1.3 ผลการทดลอง

- 1.3.1 การสังเกตลักษณะภายนอกของเจลพื้น (30% w/w Eudragit® RS PO + NMP) เมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากเมล็ดลำพู
- จากผลการทดลองพบว่า เมื่อปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูเพิ่มขึ้น สี และความหนืดที่สังเกตด้วยตาเปล่าจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15

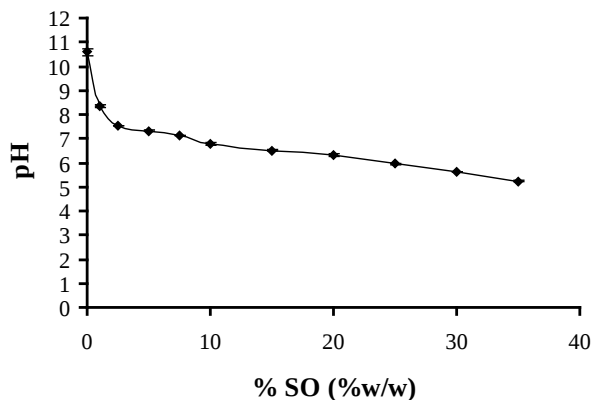
ตารางที่ 15 ลักษณะภายนอกของเจล คือ สี และความหนืดของเจล ที่อุณหภูมิห้อง โดยสังเกตด้วยตาเปล่า

% SO	สี	ความหนืดที่สังเกตด้วยตาเปล่า
0.0	ใส	(+1)
1.0	น้ำตาล (+)	(+1)
2.5	น้ำตาล (++)	(+2)
5.0	น้ำตาล (+++)	(+3)
7.5	น้ำตาล (+++)	(+4)
10.0	น้ำตาล (+++)	(+5)
15.0	น้ำตาล (++++)	(+6)
20.0	น้ำตาล (+++++)	(+7)
25.0	น้ำตาล (+++++)	(+8)
30.0	น้ำตาล (+++++)	(+9)
35.0	น้ำตาล (+++++)	(+10)

- 1.3.2 การวัด pH ของตำรับเจลด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล (n=3)
- จากผลการทดลองพบว่า pH ของเจลพื้นมีความเป็นเบส แต่เมื่อปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH มีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1

ตารางที่ 2 ค่า pH ของเจลในตำรับต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง

% SO	pH	
	Mean	SD
0.0	10.59	0.14
1.0	8.35	0.06
2.5	7.54	0.03
5.0	7.32	0.02
7.5	7.14	0.02
10.0	6.76	0.06
15.0	6.52	0.02
20.0	6.32	0.06
25.0	5.94	0.03
30.0	5.61	0.01
35.0	5.24	0.01



รูปที่ 1 ค่า pH ของตำรับเจลที่มีปริมาณ สารสกัดลำพู ต่างกัน (0% - 35% w/w)

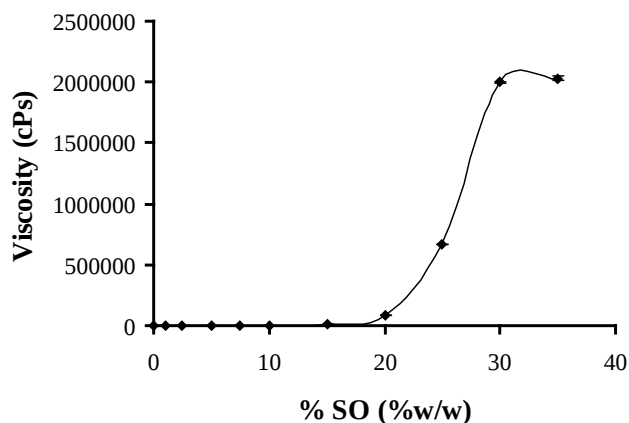
1.3.3 การวัดค่าความหนืดของเจลที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องวัดความหนืด บันทึกผล (n=3)
 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูเพิ่มขึ้น ค่าความหนืดที่วัดโดยเครื่องวัด
 ความหนืด จะมีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2)

ตารางที่ 3 ค่าความหนืดของเจลในตำรับต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง

%SO	Viscosity (cp)	
	mean	SD
0.0*	302.42	0.91
1.0*	354.77	0.40
2.5*	770.60	0.88
5.0*	940.51	2.16
7.5*	1432.10	4.45
10.0*	2557.31	16.17
15.0*	8207.70	28.32
20.0**	86393.30	99.63
25.0**	663671.55	763.79
30.0**	1997629.33	9165.55
35.0**	2030702.67	19577.63

หมายเหตุ

- * วัดความหนืดด้วยหัว CPE 40 โดยวันที่ค่า Torque = 50%
- ** วัดความหนืดด้วยหัว CPE 52 โดยวันที่ค่า Torque = 50%

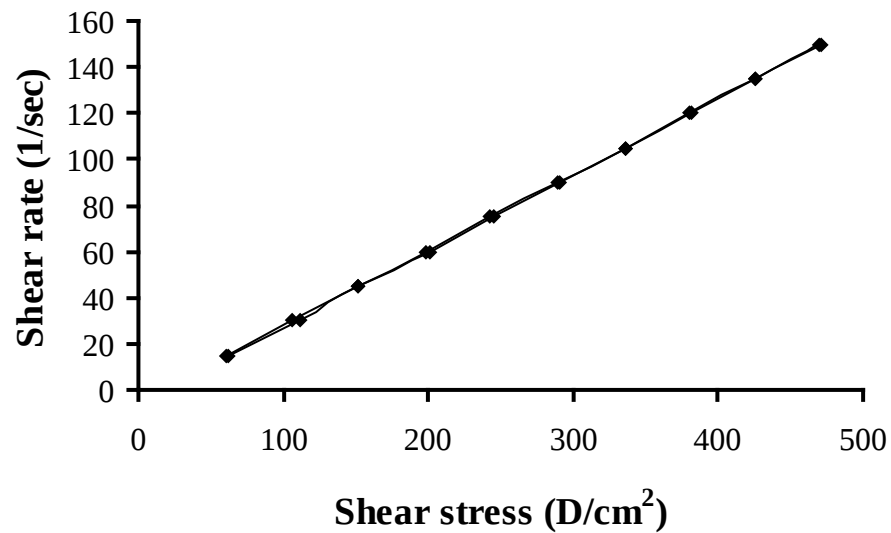


รูปที่ 2 ความหนืดของตำรับเจลที่มีปริมาณ สารสกัดลำพู ต่างกัน (0% - 35% w/w)

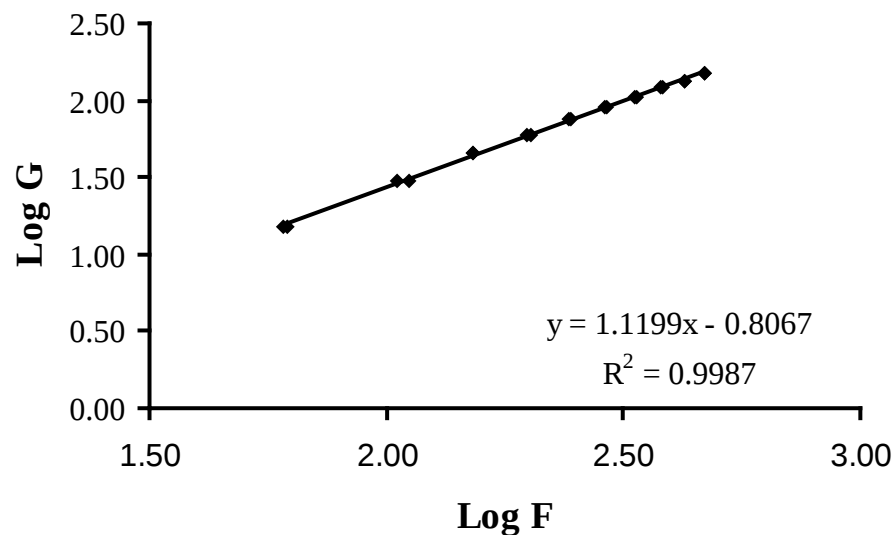
1.3.4 การศึกษาพฤติกรรมการไหลของเจลในตำรับต่างๆ

จากการศึกษารูปแบบการไหลพบว่าตำรับมีการไหลแบบ Newtonian ยกเว้นตำรับสุดท้ายที่มีสารสกัด 15% มีการไหลแบบ thixotropic ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4 และรูปที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบการไหลของตำรับต่างๆ

1.3.4.1 SO 0.0%

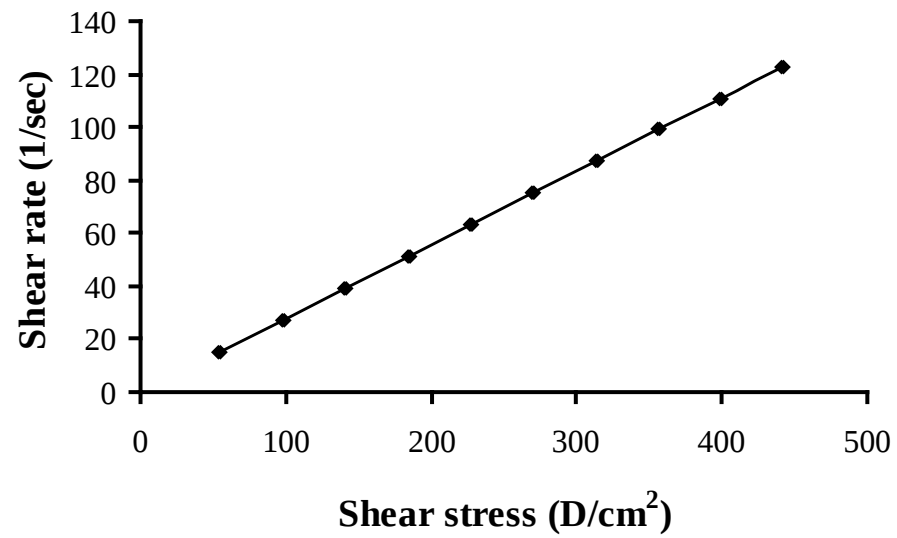


รูปที่ 3 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับเจลที่ไม่มีสารสกัด SO

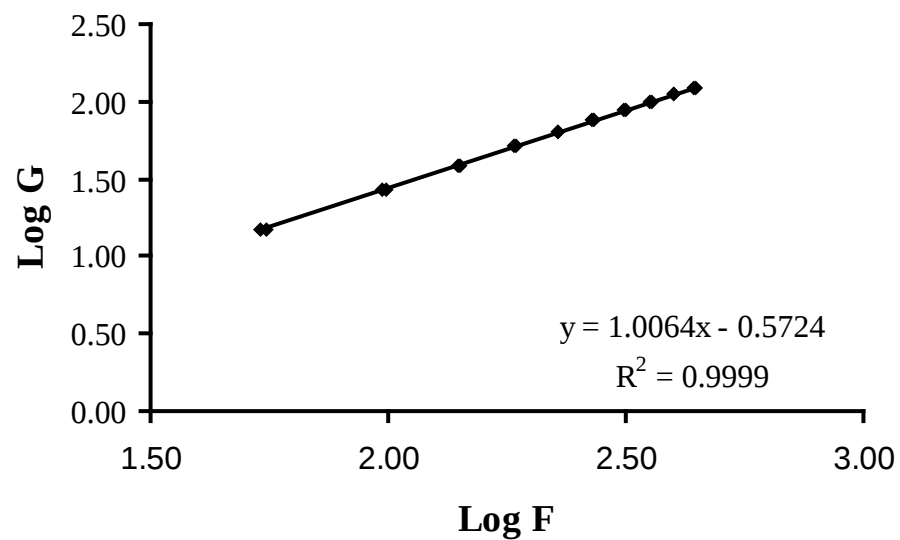


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับเจลที่ไม่มีสารสกัด SO

1.3.4.2 SO 1.0%

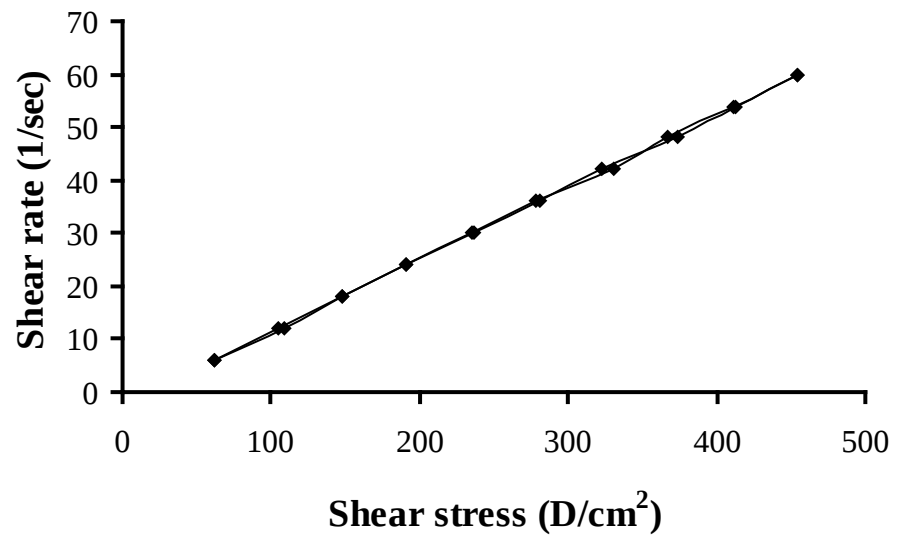


รูปที่ 5 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 1.0%

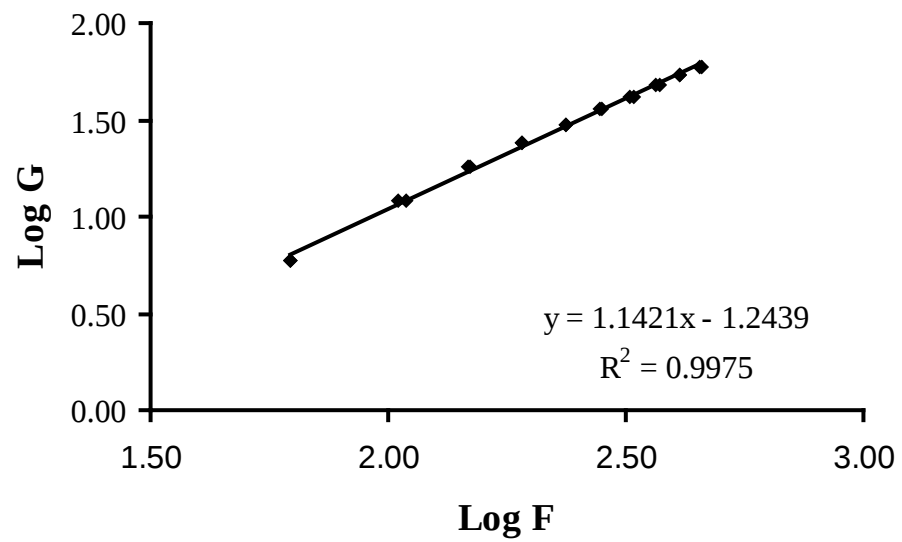


รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 1.0%

1.3.4.3 SO 2.5%

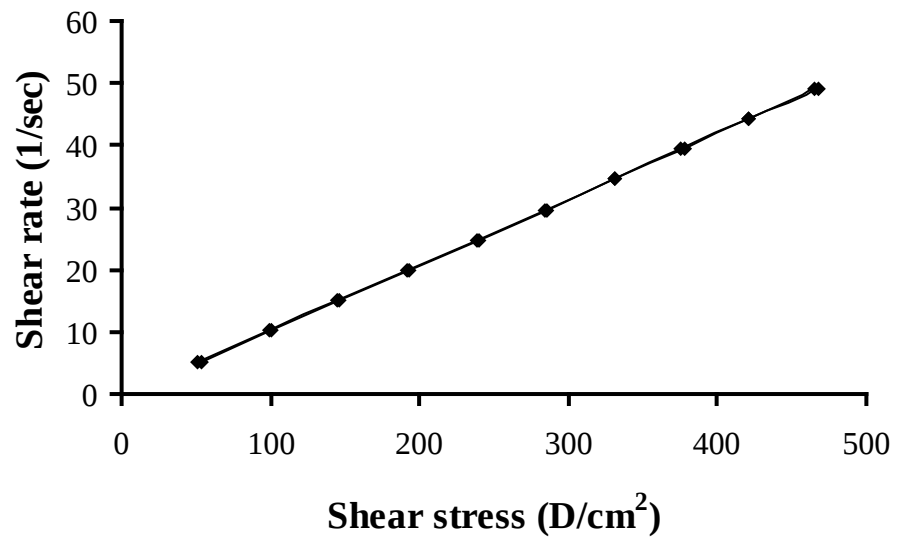


รูปที่ 7 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 2.5%

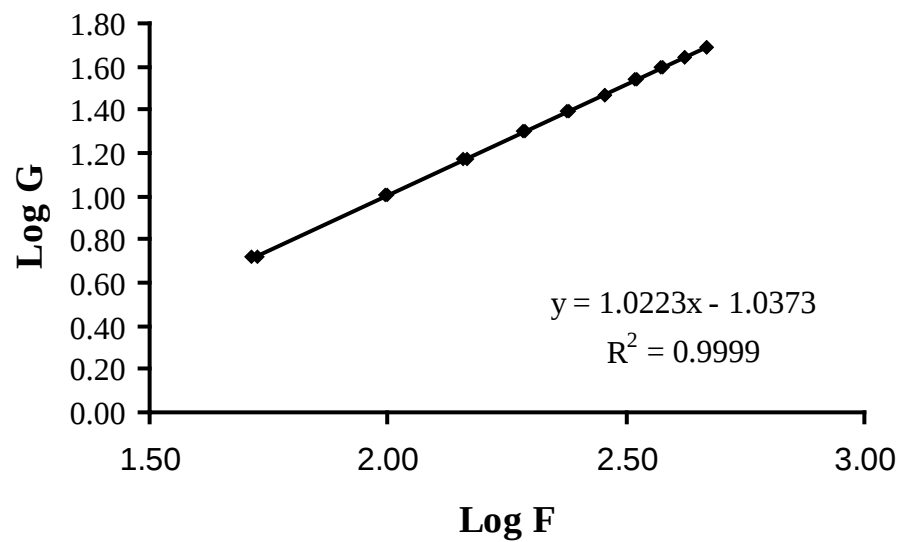


รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 2.5%

1.3.4.4 SO 5.0%

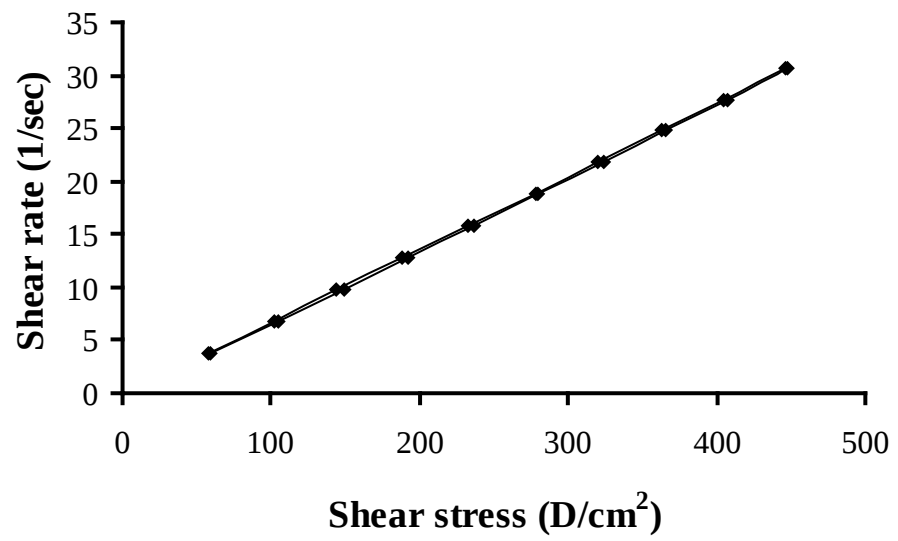


รูปที่ 9 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 5.0%

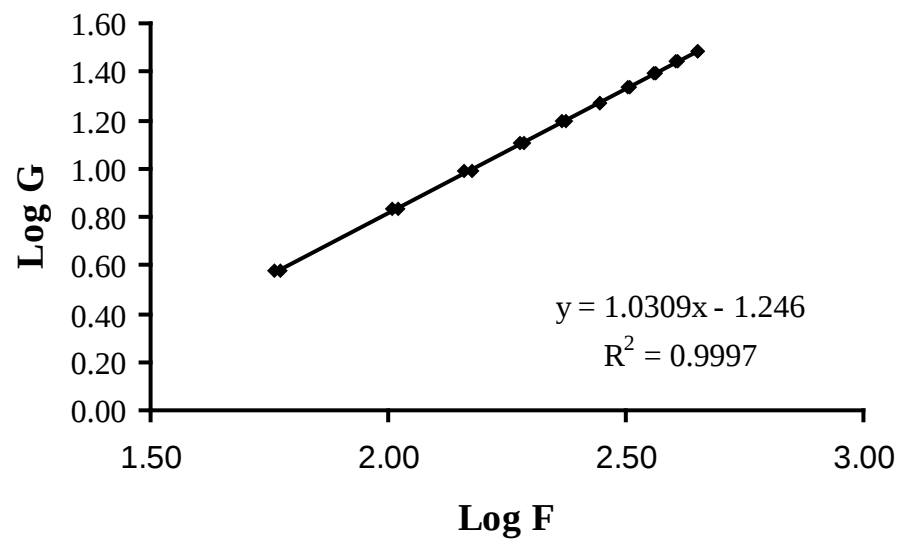


รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 5.0%

1.3.4.5 SO 7.5%

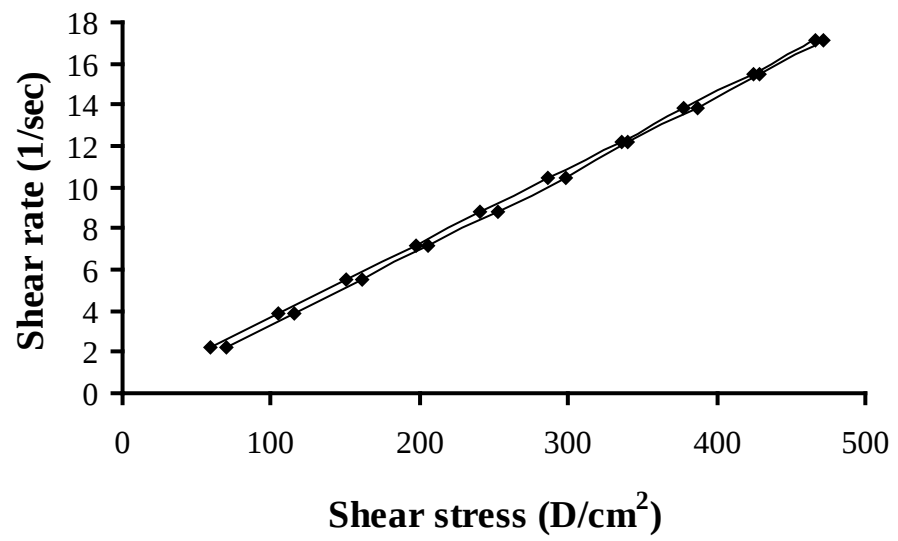


รูปที่ 11 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 7.5%

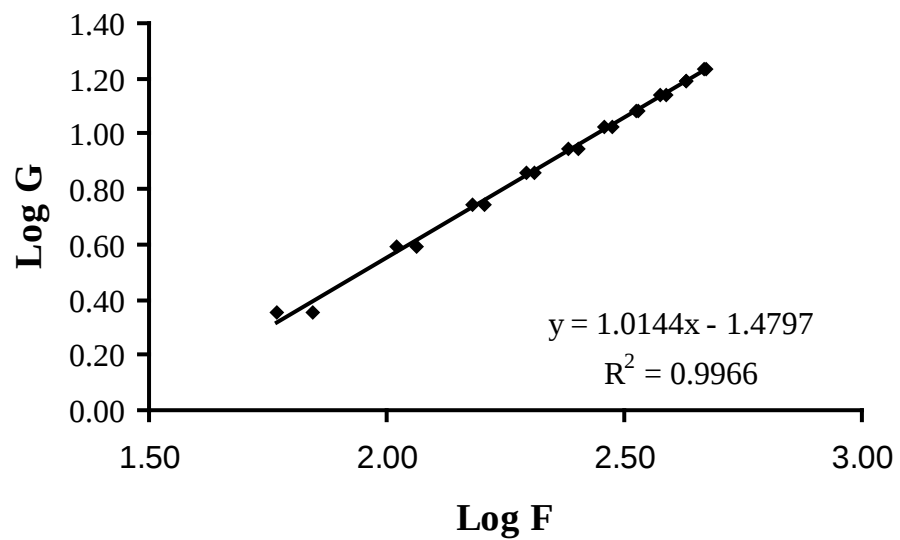


รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 7.5%

1.3.4.6 SO 10.0%

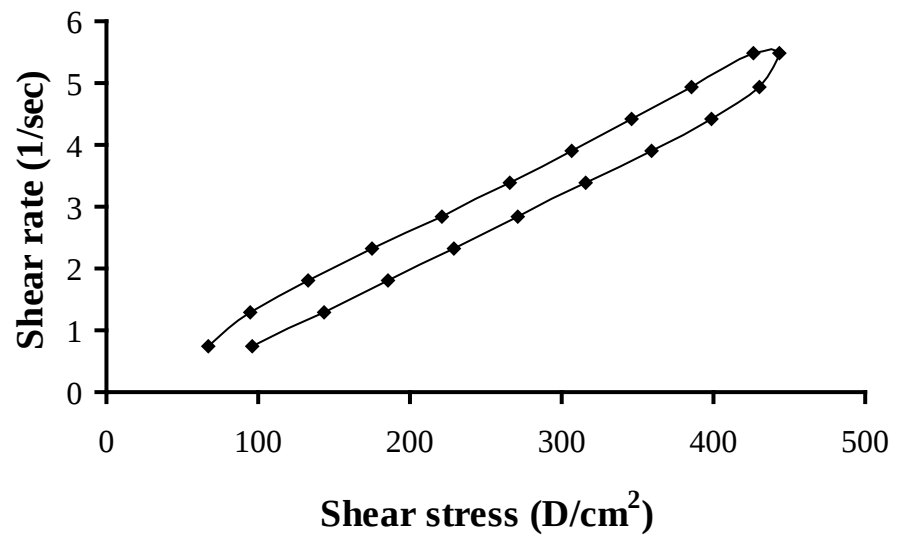


รูปที่ 13 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 10.0%

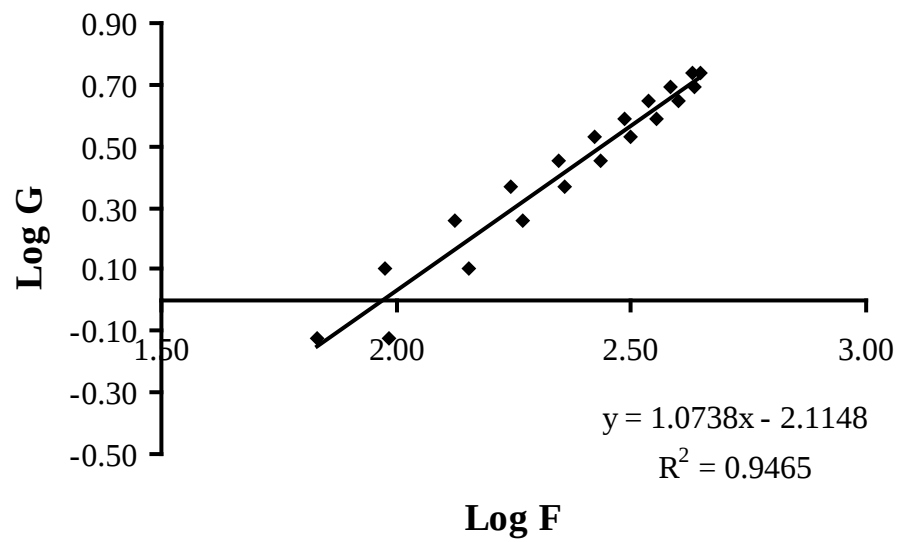


รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 10.0%

1.3.4.7 SO 15.0%



รูปที่ 15 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับที่มีเจล SO 15.0%



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่าง Log G และ Log F ของสูตรตำรับที่มีเจล SO 15.0%

การพลอตกราฟระหว่าง Log G กับ Log F จากสมการของ Martin's คือ

$$\text{Log } G = N \text{Log } F - \text{Log } \eta'$$

ค่า N (slope) ที่ได้ นำมาทำนายพฤติกรรมการไหลของสารจากเกณฑ์ที่ระบุคือ

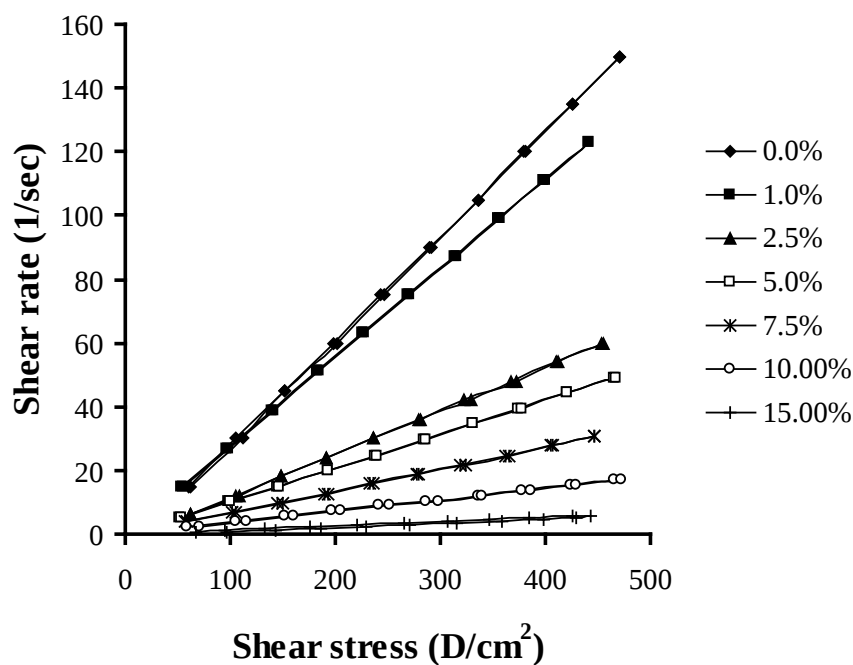
ถ้าใกล้เคียง 1 คือ Newtonian

ถ้าน้อยกว่า 1 คือ Dilatant

ถ้ามากกว่า 1 คือ Pseudoplastic หรือ Plastic กรณีที่มีค่า yield point

ตารางที่ 4 ค่า N และพฤติกรรมการไหลของเจลในตำรับต่างๆ

% SO	ค่า N	Rheology
0.0	0.9987	Newtonian
1.0	0.9999	Newtonian
2.5	0.9975	Newtonian
5.0	0.9999	Newtonian
7.5	0.9997	Newtonian
10.0	0.9966	Newtonian
15.0	0.9465	Thixotropic flow



รูปที่ 17 รูปแบบการไหลของสูตรตำรับต่างๆ

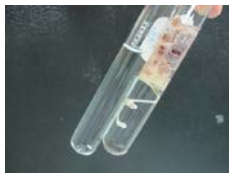
1.3.5 การทดสอบคุณสมบัติในการก่อตัวเป็นเจลของตำรับยาเมื่อนี้ดลงในสารละลายต่างๆ

เมื่อนี้ดเจลตำรับต่างๆลงใน Phosphate buffer pH 1.2 พบว่าลักษณะทางกายภาพของเจลมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม สิ่งที่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนคือ สี ซึ่งในตอนแรกเจลจะมีสีน้ำตาล (ในตำรับที่มีลำพู) แต่เมื่อสัมผัสกับ Phosphate buffer pH 1.2 เจลจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีขาว โดยเจลที่สัมผัสกับ Phosphate buffer โดยตรงจะเปลี่ยนในทันที และเจลด้านใน (ที่ไม่ได้สัมผัสกับ Phosphate buffer โดยตรง) จะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีขาว เมื่อทิ้งไว้ระยะหนึ่ง นอกจากนี้เจลยังมีลักษณะ แข็งขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก Phosphate buffer ได้ซึมเข้าสู่เนื้อเจล ทำให้เจลพองตัวออก (ตารางที่ 5)

เมื่อนี้ดเจลตำรับต่างๆลงใน Phosphate buffer pH 6.8 พบว่าลักษณะทางกายภาพของเจลมีการเปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกันกับเมื่อนี้ดเจลลงใน Phosphate buffer pH 1.2 คือ เจลจะเปลี่ยนเป็นสีขาว และ พองตัวออก แต่จะแตกต่างกันที่ระยะเวลา เนื่องจากการพองตัวของเจลใน Phosphate buffer pH 6.8 จะใช้เวลานานกว่าเจลที่นี้ดลงใน Phosphate buffer pH 1.2 (ตารางที่ 6)

เมื่อนี้ดเจลตำรับต่างๆลงในน้ำ พบว่าลักษณะทางกายภาพของเจลมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงครั้งนี้ต่างไปจากเจลที่นี้ดลงใน Phosphate buffer pH 1.2 และ 6.8 เพราะเมื่อนี้ดเจลลงในน้ำ เจลจะเปลี่ยนเป็นสีขาวเฉพาะส่วนที่สัมผัสกับน้ำโดยตรงก่อนที่จะแตกตัว และตกตะกอน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของเจล เมื่อ นี้ดลงไป ใน Phosphate buffer pH 1.2 โดยสังเกตด้วยตาเปล่า จับเวลาที่ 0 นาที, 1 นาที และ 30 นาที

ระบบที่มี SO ปริมาณต่างๆ	0 Minute	1 Minute	30 Minutes
Control (0% SO)			
1% SO			
2.5% SO			

			
5% SO			
7.5% SO			

ตารางที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของเจล เมื่อ ฉีดลงไป ใน Phosphate buffer pH 6.8 โดยสังเกตด้วยตาเปล่า
จับเวลาที่ 0 นาที, 1 นาที และ 30 นาที

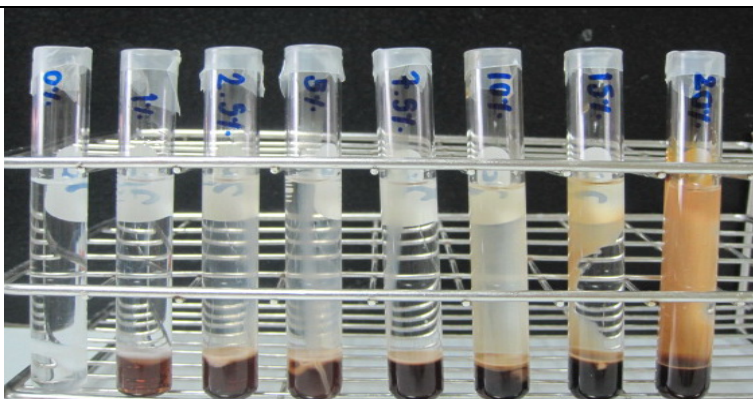
ระบบที่มี SO ปริมาณต่างๆ	0 Minute	1 Minute	30 Minutes
Control (0% SO)			
1% SO			
2.5% SO			
5% SO			

			
7.5% SO			

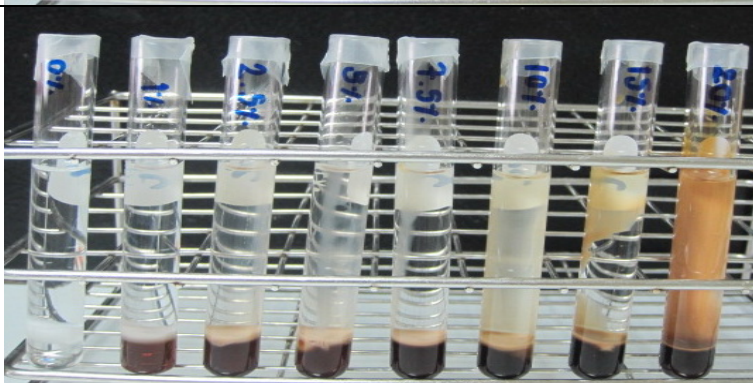
ตารางที่ 7 ลักษณะทางกายภาพของเจล เมื่อ ฉีดลงไปใ้ในน้ำ โดยสังเกตด้วยตาเปล่า
 จับเวลาที่ 0 นาที, 1 นาที และ 30 นาที

ระบบที่มี SO ปริมาณต่างๆ	0 Minute	1 Minute	30 Minutes
Control (0% SO)			
1% SO			
2.5% SO			

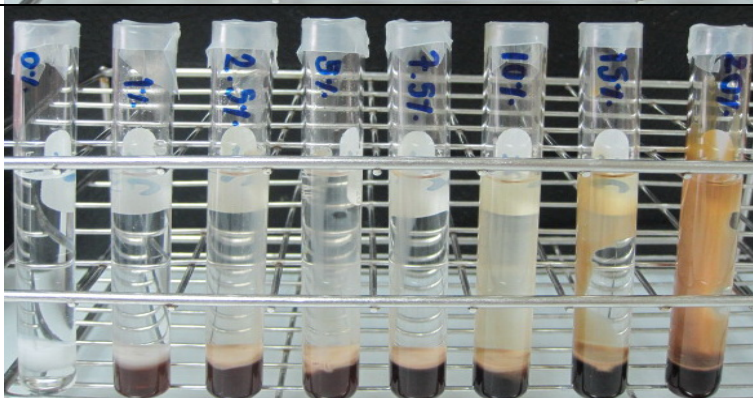
5 Minutes



30 Minutes

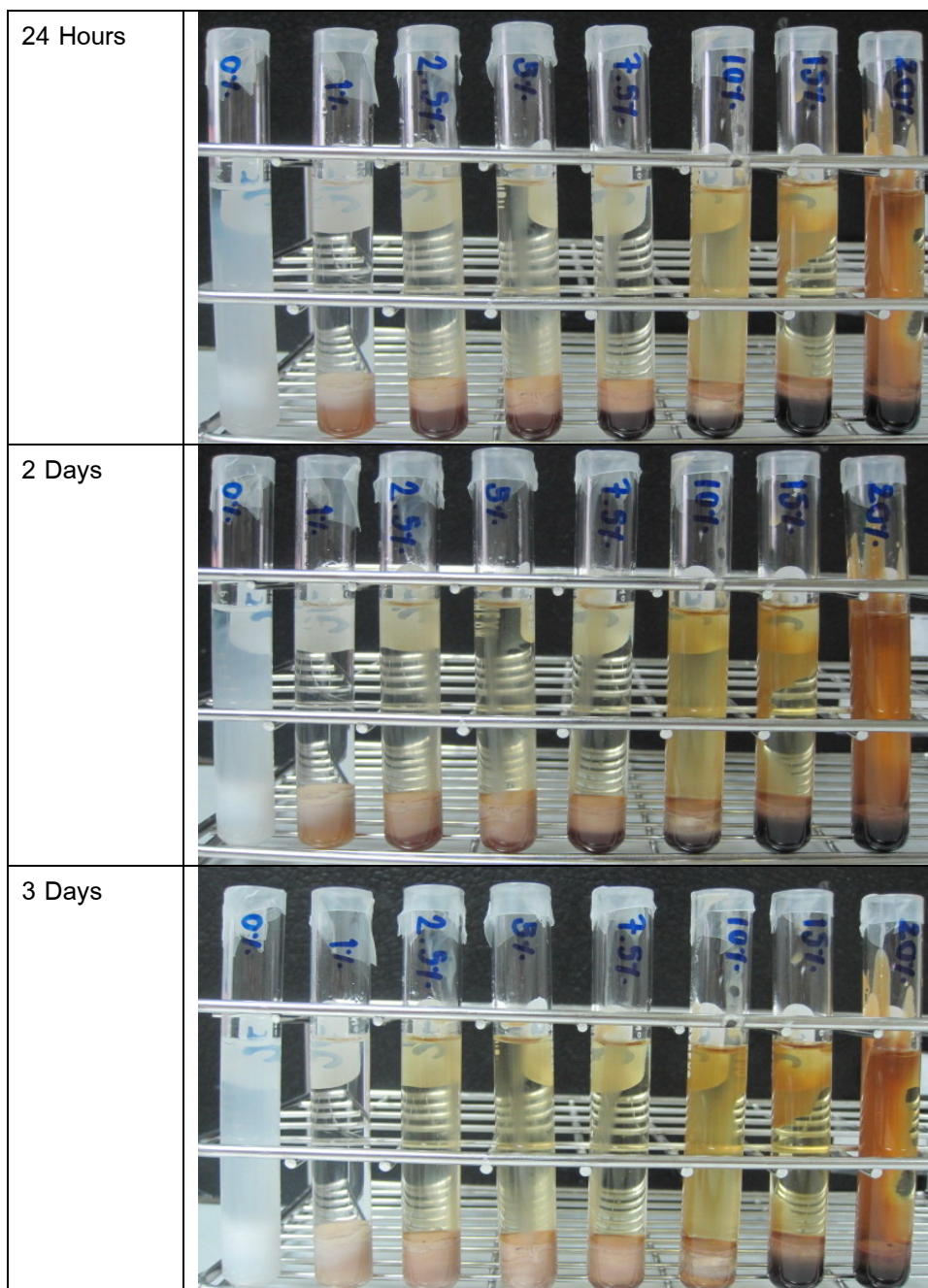


1 Hour



16 Hours





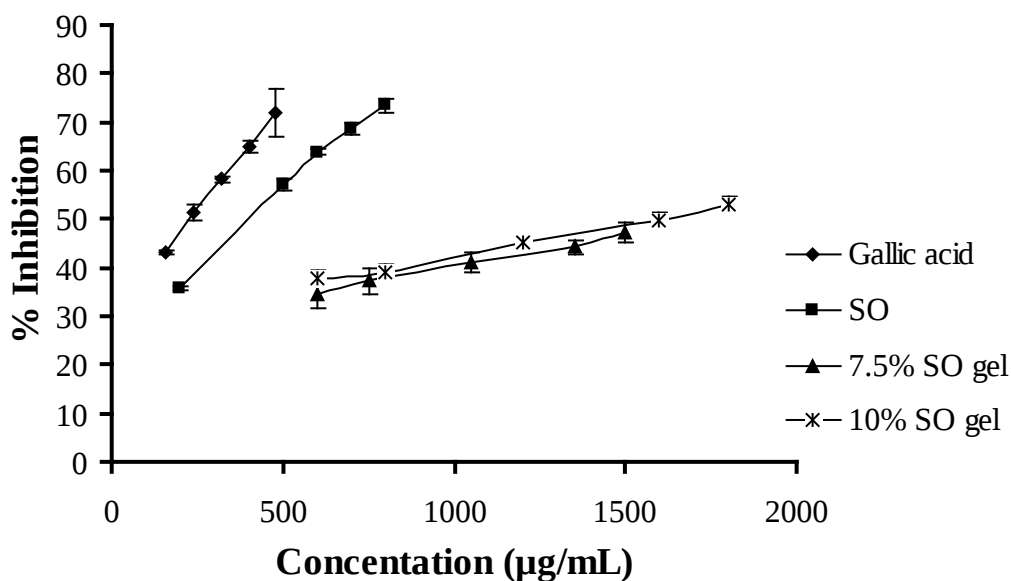
1.3.7 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Gallic acid Equivalent Antioxidant Capacity assay (GEAC)

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อสารสกัดเมล็ดลำพูอยู่ในรูปของเจลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่าเมื่ออยู่ในรูปของสารสกัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสูญเสียฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างการเตรียมตำรับ (ตารางที่ 9 และ รูปที่ 18)

ตารางที่ 9 ค่า IC_{50} และ R^2 ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

ที่	สารละลาย	IC_{50}	R^2
1	Gallic acid	231 $\mu\text{g/mL}$	0.9989
2	สารสกัดเมล็ดลำพู	405 $\mu\text{g/mL}$	0.9914

3	7.5% SO gel	1727 µg/mL	0.9922
4	10% SO gel	1591 µg/mL	0.9946



รูปที่ 18 ค่า IC_{50} และ R^2 ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

1.3.8 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคของเจลจากสารสกัดเมล็ดลำพู

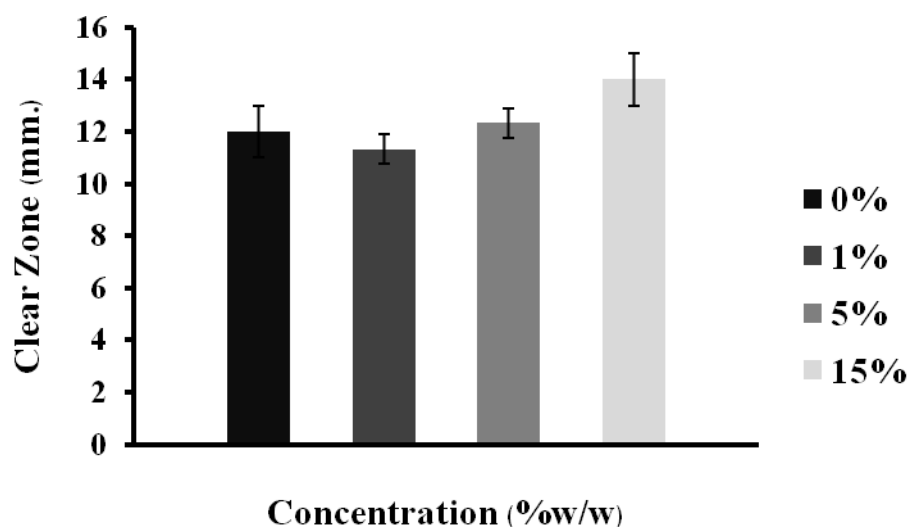
ตำรับเจลที่มีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูความเข้มข้น 1% และ 5% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (รูปที่ 19) และ *Escherichia coli* (รูปที่ 20) ไม่แตกต่างกันกับตำรับที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดลำพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเจลมีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพู (SO) เพิ่มขึ้นเป็น 15% มีผลทำให้สารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *Candida albicans* พบว่า ตำรับเจลที่มีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูความเข้มข้น 1% และ 5% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* (รูปที่ 21) ไม่แตกต่างกันกับตำรับที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดลำพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเจลมีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพู (SO) เพิ่มขึ้นเป็น 15% มีผลทำให้สารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากเมล็ดลำพูไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* แต่ที่เกิด Clear Zone ขึ้นเป็นผลมาจาก NMP เมื่อมีปริมาณของสารสกัดมากขึ้น ทำให้ปริมาณสาร NMP ลดลง สารตัวอย่างจึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ลดลง

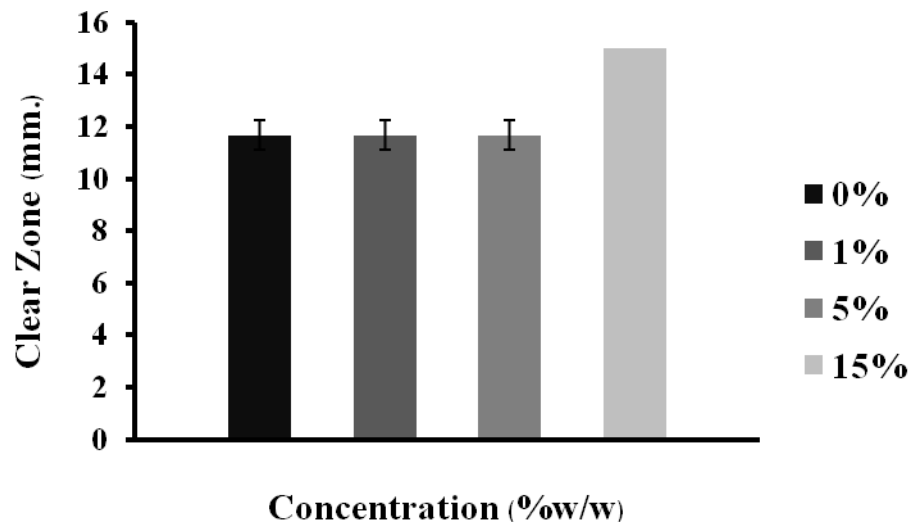
เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 (รูปที่ 22) และ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก (รูปที่ 23) ตำรับเจลที่มีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูความเข้มข้น 1% และ 5% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือกไม่แตกต่างกันกับตำรับที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดลำพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเจลมีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพู (SO) เพิ่มขึ้นเป็น 15% ทำให้สารตัวอย่างไม่มีฤทธิ์ใน

การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก อาจเนื่องมาจาก สารสกัดจากเมล็ดลำพูไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* และ Anaerobic bacteria จากร่องเหงือก แต่ที่เกิด Clear Zone ขึ้นเป็นผลมาจาก NMP และเจลที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพูมากที่สุด ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* อาจเพราะเมื่อมีปริมาณของสารสกัดมากขึ้น ทำให้ปริมาณสาร NMP ลดลง

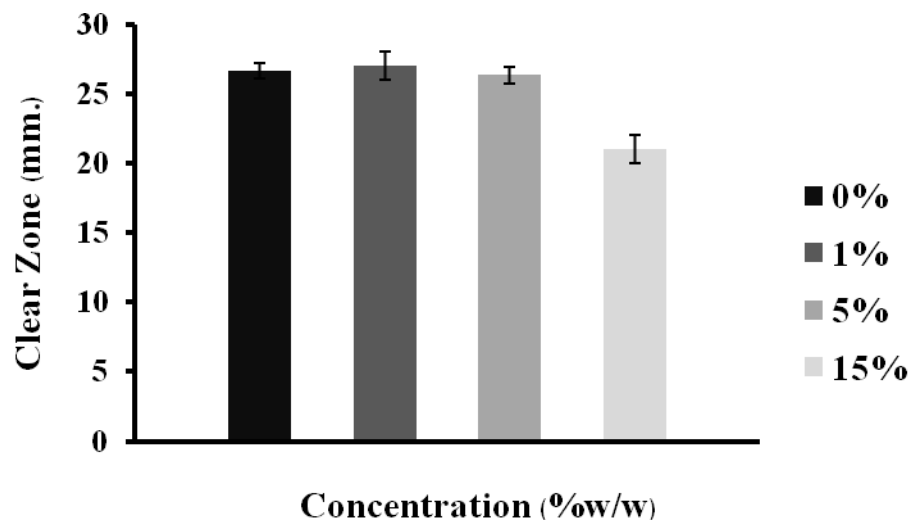
ส่วนผลต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 (รูปที่ 24) พบว่าตำรับเจลที่มีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูความเข้มข้น 1% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ไม่แตกต่างกันกับตำรับที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดลำพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเจลมีปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพู (SO) เพิ่มขึ้นเป็น 5% และ 15% มีผลทำให้สารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



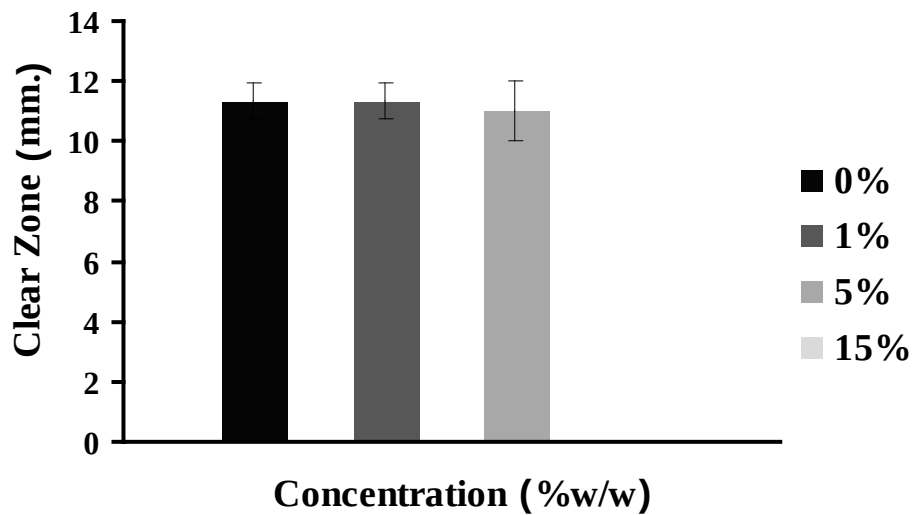
รูป 19 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมทานอล) ความเข้มข้นต่างๆ



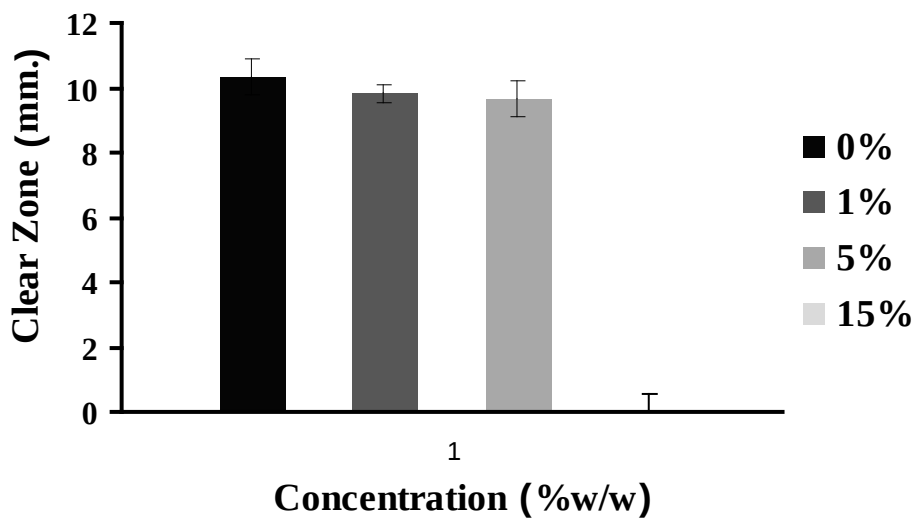
รูป 20 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมทานอล) ความเข้มข้นต่างๆ



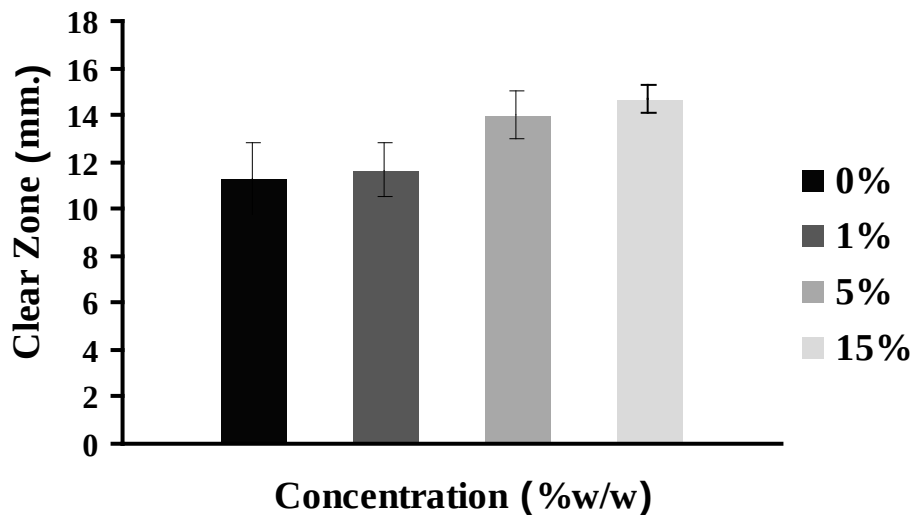
รูป 21 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมทานอล) ความเข้มข้นต่างๆ



รูป 22 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมธานอล) ความเข้มข้นต่างๆ



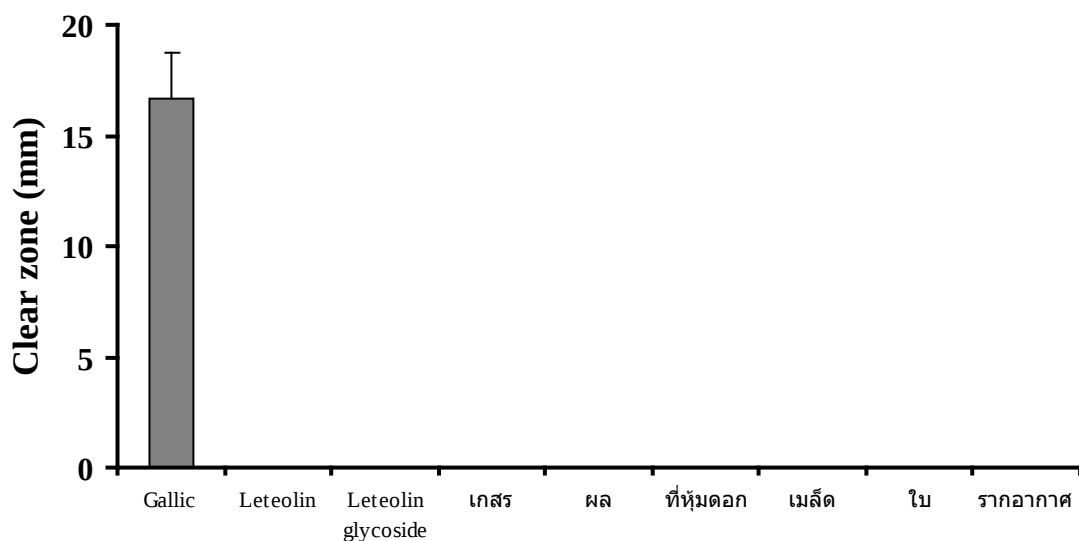
รูป 23 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือกของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมธานอล) ความเข้มข้นต่างๆ



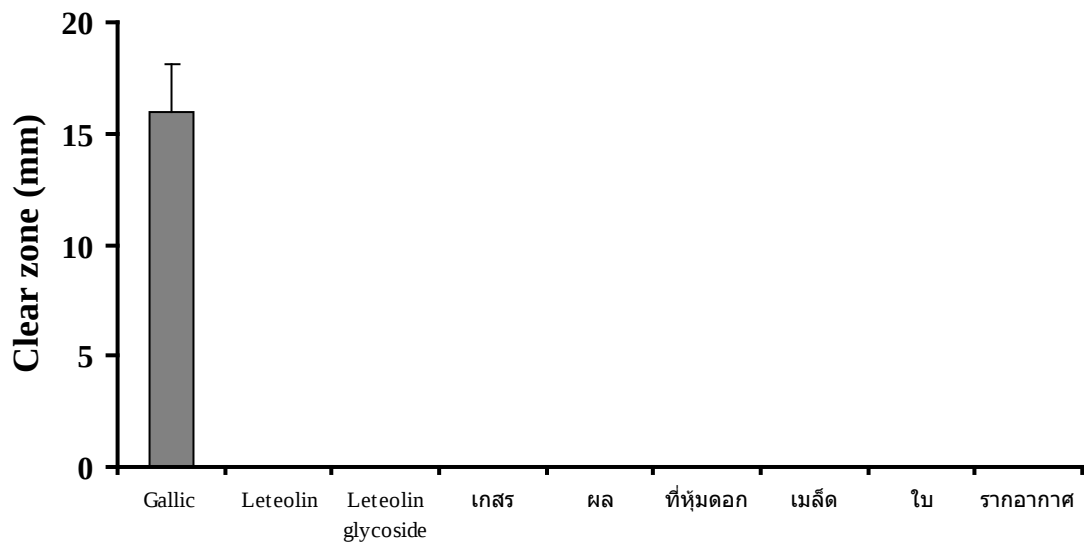
รูป 24 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ของเจล Eudragit RS ใน NMP ที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู (ที่เตรียมจากการหมักด้วยเมธานอล) ความเข้มข้นต่างๆ

1.3.9ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคเพิ่มเติมของสารสกัดลำพูส่วนต่าง ๆ

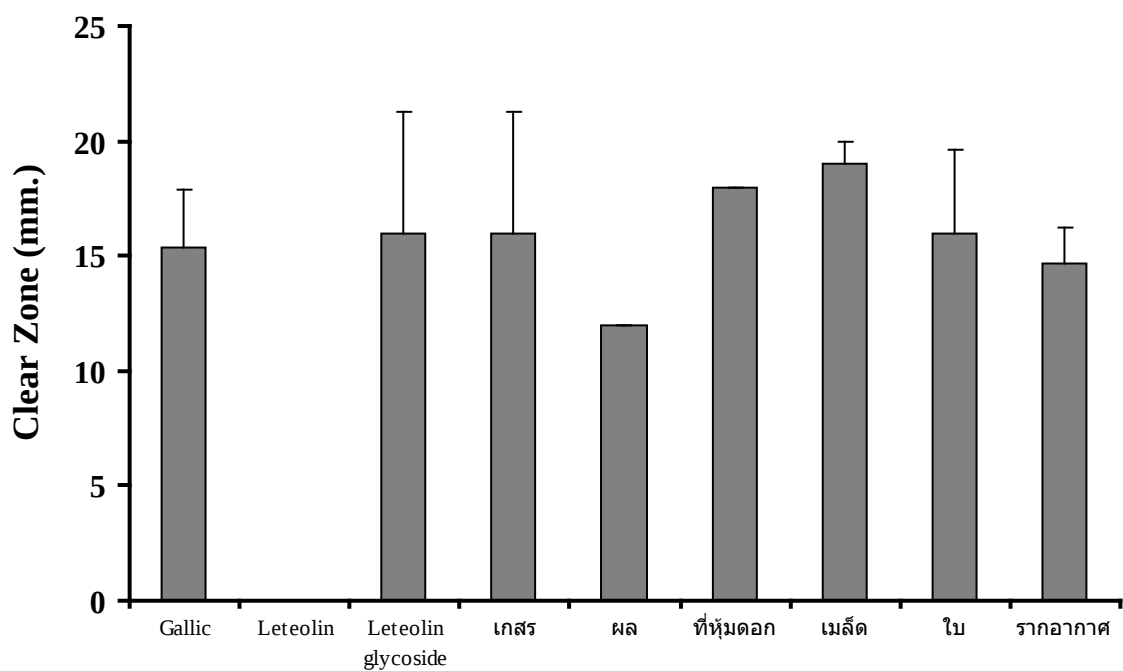
เมื่อทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดลำพูจากส่วนต่าง ๆ กับเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 และ Anaerobic bacteria (black colony) (ตารางที่ 34-36 ในภาคผนวก) พบว่าสารสกัดจากลำพูทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 (รูปที่ 25) และ Anaerobic bacteria (black colony) (รูปที่ 26) ขณะที่พบว่าทุกส่วนของสารสกัดลำพู (ที่หุ้มดอกลำพู, เกสรลำพู, เมล็ดลำพู, ผลลำพู, ใบลำพู และรากอากาศ) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 (รูปที่ 27) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดนี้สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในตำรับเจลของสารสกัดจากเมล็ดลำพู



รูป 25 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ของสารสกัดจากลำพูส่วนต่าง ๆ ในเมธานอล



รูป 26 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก ของสารสกัดจากลำพู ส่วนต่าง ๆ ในเมธานอล

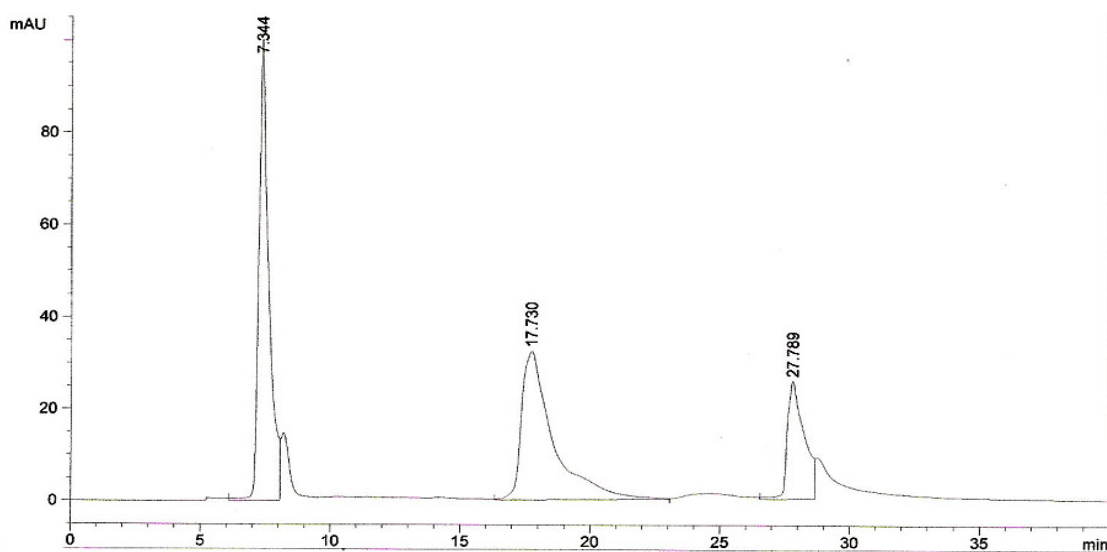


รูป 27 Clear Zone จากการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ของสารสกัดจากลำพูส่วนต่าง ๆ ในเมธานอล

1.3.9 การปลดปล่อยสารจากตำรับเจลสารสกัดจากเมล็ดลำพู

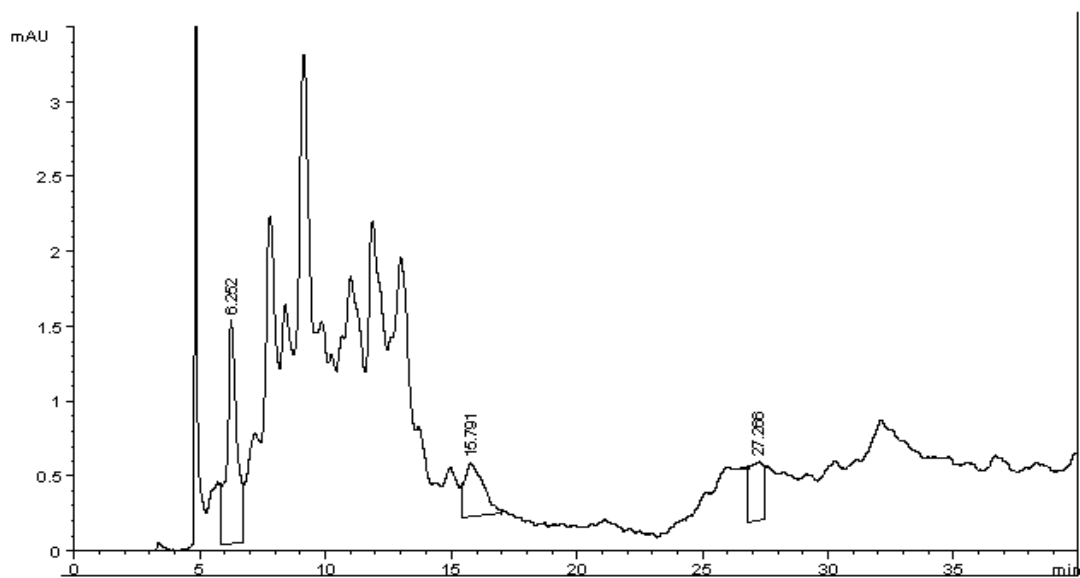
ในการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากเจลได้เริ่มจากการวัดปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิด คือ Gallic acid, Luteolin glycoside และ Luteolin ในสารสกัดเมล็ดลำพูที่สกัดด้วยการหมักด้วยเมธานอลโดยเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งมีโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 28 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ด

ลำพูความเข้มข้น 0.50 mg/ml แสดงในรูปที่ 29 โดยตาราง 10 แสดงเวลาสัญญาณโครมาโตแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดเมล็ดลำพูที่ตรงกับสารมาตรฐาน ลักษณะโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์พีเพอร์ที่ผ่านการทดสอบการปลดปล่อยที่เวลาต่างๆ ด้วย HPLC แสดงในรูปที่ 30-34 การปลดปล่อยสาระสำคัญ 3 ชนิดจากตำรับเจลที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู 10% แสดงในรูปที่ 35 พบว่า gallic acid จะปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรก 30 นาทีแรก แล้วค่อยๆปลดปล่อยจนถึง 720 นาที ส่วน luteolin จะปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรก 120 นาทีแรก แล้วค่อยๆปลดปล่อยจนถึง 720 นาที สำหรับ luteolin glycoside เริ่มปลดปล่อยที่เวลา 480 นาที และปลดปล่อยได้ค่อนข้างน้อย



รูปที่ 28 โครมาโตแกรมแสดงสัญญาณของ Gallic acid, Luteolin glycoside และ Luteolin ตามลำดับ

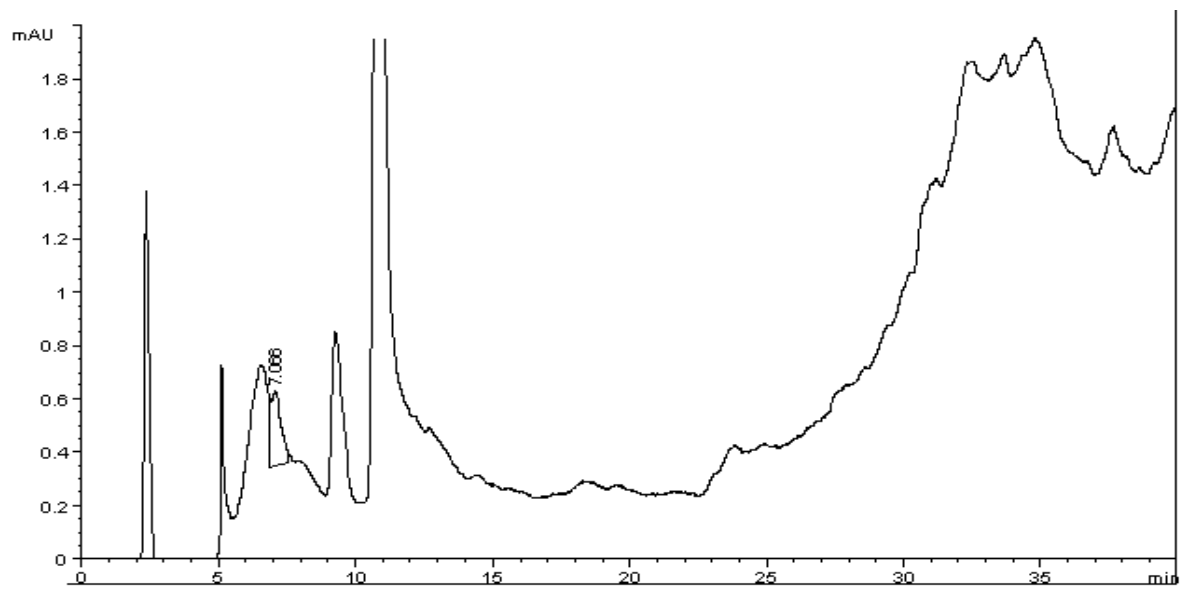
โดยสามารถแยก Gallic acid	ที่ T_R ประมาณ 7.344 นาที
Luteolin glycoside	ที่ T_R ประมาณ 17.730 นาที
Luteolin	ที่ T_R ประมาณ 27.789 นาที



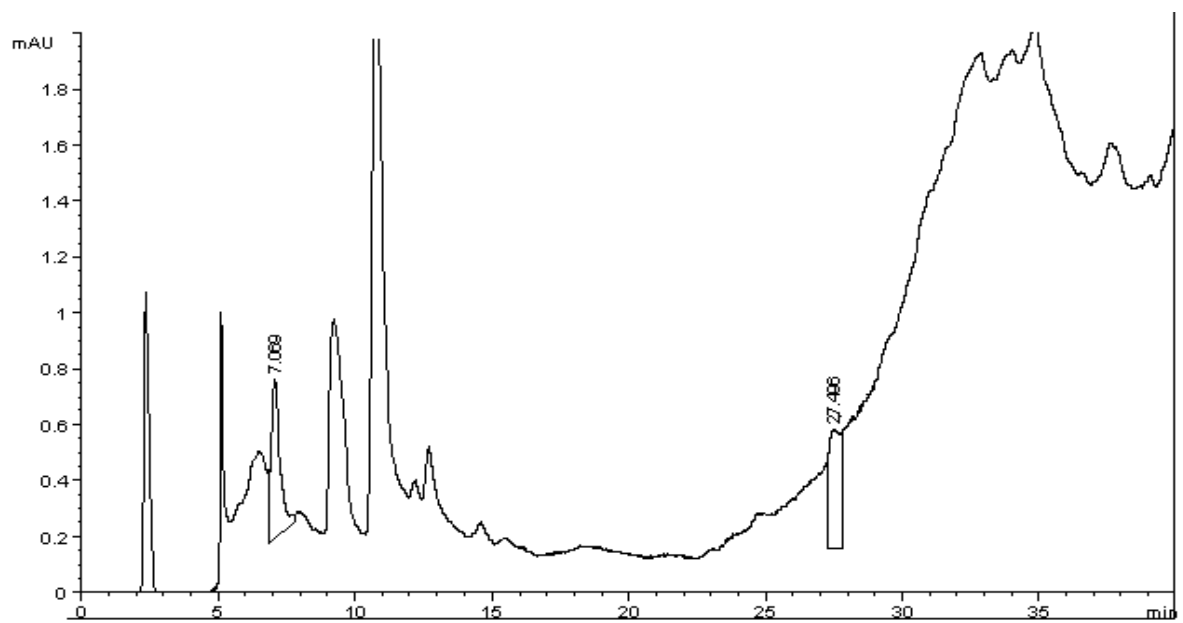
รูปที่ 29 แสดงสัญญาณโครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดลำพู ความเข้มข้น 0.50 mg/ml

ตารางที่ 10 เวลาสัญญาณโครมาโตแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของพีคจากสารสกัดเมล็ดลำพูที่ตรงกับสารมาตรฐาน

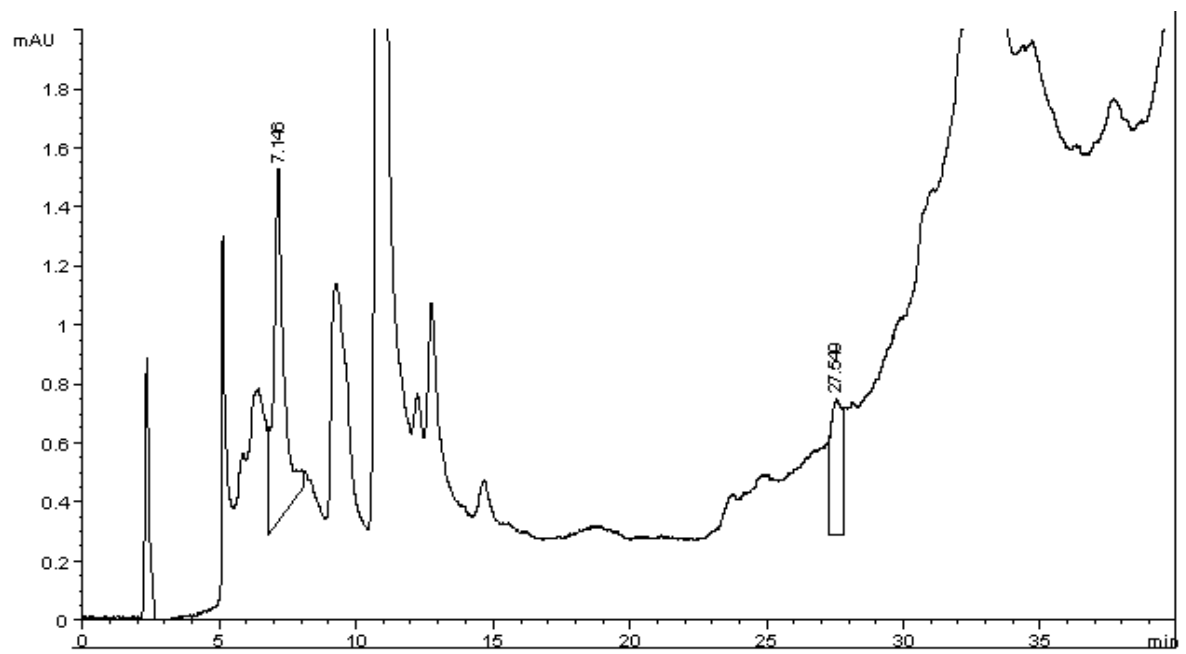
สารสกัดเมล็ดลำพู	เวลาสัญญาณโครมาโตแกรม T_R (min) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน			พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ตรงกับสารมาตรฐาน (mAU*s)		
	Gallic acid	Luteolin glycoside	Luteolin	Gallic acid	Luteolin glycoside	Luteolin
ตัวอย่าง ที่ 1	6.289	38.923	15.756	38.923	15.756	22.848
ตัวอย่าง ที่ 2	6.252	39.777	15.791	39.777	15.791	18.482
ตัวอย่าง ที่ 3	6.137	41.666	15.895	41.666	15.895	24.231
AVG	6.226	40.122	15.814	40.122	15.814	21.854
SD	0.079	1.404	0.072	1.404	0.072	3.001



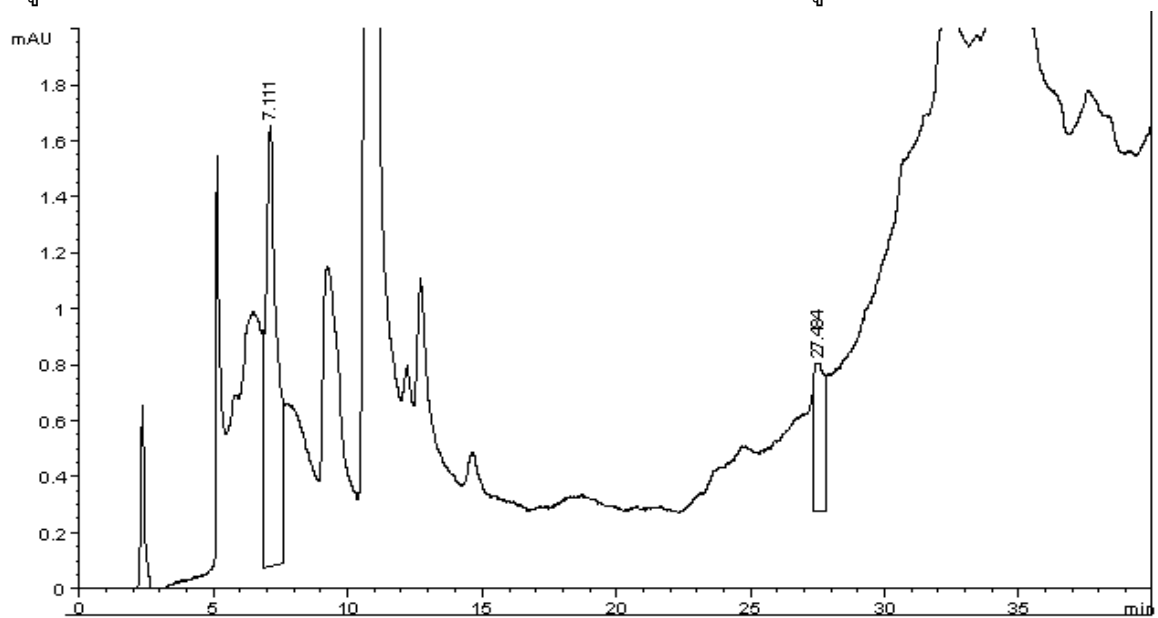
รูปที่ 30 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการปลดปล่อยสารสกัดเมล็ดลำพูจากเจลที่เวลา 30 นาที



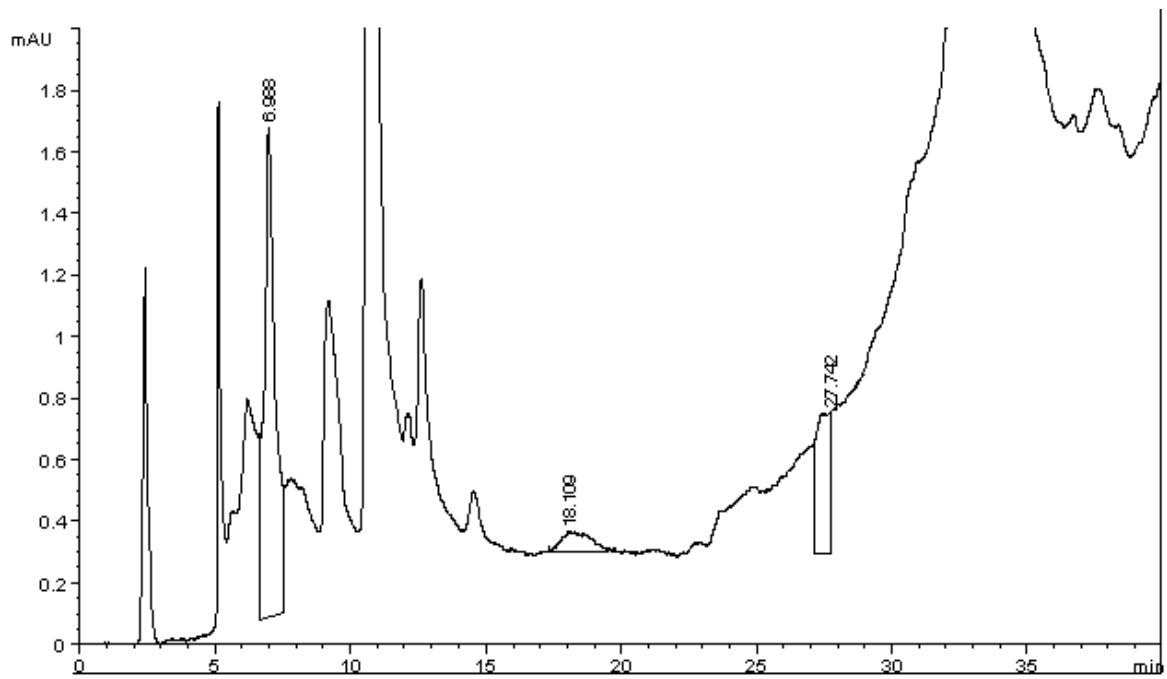
รูปที่ 31 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการปลดปล่อยสารสกัดเมล็ดลำพูจากเจลที่เวลา 120 นาที



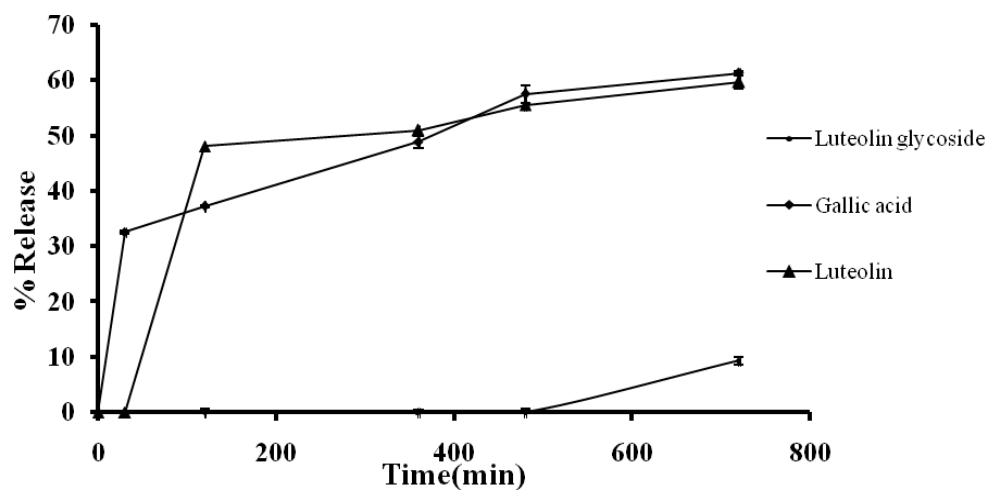
รูปที่ 32 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการปลดปล่อยสารสกัดเมล็ดลำพูจากเจลที่เวลา 360 นาที



รูปที่ 33 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการปลดปล่อยสารสกัดเมล็ดลำพูจากเจลที่เวลา 480 นาที



รูปที่ 34 โครมาโตแกรมของตัวอย่างจากการปลดปล่อยสารสกัดเมล็ดลำพูจากเจลที่เวลา 720 นาที



รูปที่ 35 เปอร์เซนต์การปลดปล่อยสะสมของ Gallic acid, Luteolin glycoside และ Luteolin จากเจลที่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพูความเข้มข้น 10%

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารและ DMSO ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ทดสอบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสจากเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์เป็นวิธี standard method (Tipton *et al.*, 2003) เตรียมเซลล์โดยการขูดเนื้อเยื่อเหงือกที่ติดมากับฟันที่ถูกถอนแล้ว มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้ววางลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร นำ cover slip ปลอดเชื้อวางทับ เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อเหงือกเคลื่อนย้าย จนกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจะคลานออกจากชิ้นเนื้อ เซลล์ไฟโบรบลาสที่ใช้ในการทดลองมาจากเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในรอบที่ 3-10 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นชนิด DMEM ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum ร้อยละ 10 และเพนนิซิลินและสเตอริโตมัยซินซัลเฟตอย่างละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะถูกเลี้ยงภายในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นประจำทุกสัปดาห์จนกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจะเพิ่มจำนวนให้เห็น หลังจากนั้นใส่ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ร้อยละ 0.05 เพื่อแยกเซลล์ให้หลุดจากกันและหลุดจากจานเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวนหรือขยายปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงแบบนั้นจนกระทั่งถึงขั้นตอนนำเซลล์มาทดสอบ การทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือกนี้ ทำตามวิธีของ Denizot และ Lang ในปี ค.ศ. 1986 (Denizot and Lang, 1986)

ตารางที่ 3 ค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสจากเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์หลังการทดสอบด้วยสารสกัดจากลำพู

Compound no.	ED ₅₀ (μg/ml)	% Viability of HGF*	% Viability of macrophge cell line U937*
Media Control	-	100.02 ± 0.01	100.01 ± 0.01
L0	> 10	87.13 ± 0.01	100.54 ± 0.11
L4	> 10	83.91 ± 0.05	104.39 ± 0.04
P0	> 10	93.56 ± 0.05	98.14 ± 0.21
P4	> 10	85.98 ± 0.02	101.20 ± 0.18
S0	> 10	98.16 ± 0.13	102.10 ± 0.04
S4	> 10	108.97 ± 0.12	101.90 ± 0.08

Note: % viability of human gingival fibroblasts after exposed to samples at concentration of 10 mg/ml for 3 days.

ผลการทดสอบและอภิปรายผล

จากการทดสอบพบว่า สารทดสอบทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสเหงือกและเซลล์ไลน์มาโคฟาจเลย เมื่อทดสอบสารที่ระดับความเข้มข้น 10 μg/ml อย่างไรก็ตาม สาร L0 และ L4 และ P4 ก็มีผลต่อการเจริญของเซลล์บ้างเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ

C. การพัฒนาโครงสร้างความพรุนสูงบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู

(Development of High Porosity Scaffold Containing Extract of *Sonneratia caseolaris* Seed)

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- Magnetic Stirrer (Rexim RS-6D, Scientific Promotion CO.,LTD,Thailand)
- Homogenizer (IKA[®], Werke GMBGH & CO. KG, Staufen, Germany)
- Analytical balance (Sartorius, AG Gottingen, Germany)
- Inverted microscope (Nikon, Hollywood international LTD, Japan)
- Shaking incubator (Handy LAB[®], N-BIOTEX, Korea)
- Autoclave (Heraeus UT 6760, Kendro Laboratory Products, Germany)
- Texture analyzer (TA.XTplus, Stable Micro System, Surrey, England)
- Scanning Electron Microscope (Cam Scan MX-2000, UK)
- UV Spectrophotometer (G1103A, Agilent Technologies, China)
- Freeze Dryer (Labconco triad 7400030, Labconco, Missouri, USA)
- Incubator (BPH 9042, Shanghai Lorderan Scientific Instrument Co.,Ltd, China)
- Laminar Air Flow (Biosafe 2010)
- X-Ray Powder Diffraction (Miniflex II, Rigaku Corp. Tokyo, Japan)
- Thermogravimetric analyzer (Pyris/TGA, PerkinElmer, USA)
- Differential Scanning Calorimetry (Pyris Sapphire DSC, Standard 115V, Perkin Elmer instruments, Japan)
- FT-IR spectroscopy (Nicolet 4700, Becthai, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Chitosan , Low M.W. W chitosan, ผ่านแรง 80# (Crab shell), %DD >99.3%, M.W. 70 kDa (Aqua pnemier,Chonburi, Thailand)
- Lactic acid (Batch No. 0905046, Ajax Finechem, Seven Hills, Australia)
- Aluminium monostearate (Lot No. 0001447128, Sigma-aldrich, MO, USA)
- Acacia (Batch No. 000349, วิทยาธรรม จำกัด, Bangkok, Thailand)
- Sodium Hydroxide (Lot No. 03/07/157A , P.C. DRUG CENTER , Bangkok ,Thailand)
- Methanol (Lot No. K33730209 404, Merck KGaA, Germany)
- Ethanol (Lot No. 617W62, J.T. Baker, Malaysia)
- สารสกัดจากเมล็ดลำพู ซึ่งสกัดเมล็ดลำพูด้วยเมทานอลในอัตราส่วนเมล็ดลำพู : เมทานอล 1:4 และนำแห้งด้วย Rotary evaporator ที่ 50 °ซ จนได้สารสกัดแห้ง
- Sabouraud Dextrose Agar (Batch No.9113804, Becton, Dickinson and company, USA)

- Tryptic Soy Broth (Batch No.0202138, Becton, Dickinson and company, USA)
- Brain heart infusion (Becton, Dickinson and company, USA)
- Phosphate buffer pH = 7.4

NaCl	8	g (Lot No. C27348, J.T. Baker, Malaysia)
KCl	0.2	g (Batch No.AF501338, Ajax Finechem, Seven Hills, Australia)
Na ₂ HPO ₄	1.44	g (Batch No. AF405300, Ajax Finechem, Seven Hills, Australia)
KH ₂ PO ₄	0.24	g (Batch No. AF501339, Ajax Finechem, Seven Hills, Australia)
H ₂ O	q.s	1000 ml

วิธีทดลอง

1. การเตรียม sponge จากพอลิเมอร์ chitosan และ sponge จากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง chitosan กับ acacia หรือ tragacanth ในหลายรูปแบบดังนี้

- 4% chitosan sponge ที่ไว้ที่ 15 นาที หลัง จากผสมกับ AMS
- 2% chitosan acacia sponge
- 2% chitosan acacia+AMS sponge
- 2% chitosan tragacanth
- 2% chitosan tragacanth+AMS

ทำการเตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

- 4% w/w Chitosan solution
- 4% w/w Chitosan AMS solution
- 2% w/v Chitosan acacia solution
- 2% w/v Chitosan-acacia –AMS solution
- 2% w/v Chitosan-tragacanth solution
- 2% w/v Chitosan-tragacanth-AMS solution

หมายเหตุ : **Chitosan** → Chitosan M.W. 70 kDa

โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเตรียม 4% w/w Chitosan solution

1. ชั่ง chitosan และนำไปละลายใน 2 % w/v Lactic acid solution ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางจนได้ 4% w/w chitosan solution

1.2 การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ที่ต้องการโดย

1. ผสม 4%w/w chitosan solution และ สารละลาย 4%w/v acacia หรือ %w/v tragacanth ให้เข้าด้วยกันโดยใช้สัดส่วนเป็น 50:50 โดยน้ำหนัก
2. เติม aluminium monostearate 2.5% ของสารละลายที่ต้องการเตรียม sponge

3. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Homogenizer
4. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที หรือ 24 ชั่วโมงสำหรับ 4% chitosan A sponge

1.3 การเตรียม sponge

1. ใช้ไมโครปิเปตดูด สารละลายที่เตรียมได้ ที่ผสมได้ใส่ใน plastic blister ชนิด 50 หลุม จนเต็ม
2. นำ plate ไปแช่ในตู้แช่เย็นที่ -20°C เป็นเวลา 1-2 วัน
3. นำไป lyophilize ที่ -40°C 3-4 วัน จน sponge แห้ง ด้วยเครื่อง Freeze Dryer

2. การล้าง residue acid จาก sponge

1. เตรียมสารละลาย 1 N NaOH ปริมาตร 2.5 L
2. นำ sponge ที่เตรียมไว้ใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH : Ethanol = 20 : 80 150 ml
3. นำ sponge ที่แช่ในสารละลายไปคนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
4. หลังจากที่ถูกคนโดยใช้ magnetic stirrer ครบ 20 นาทีแล้วนำ sponge ขึ้นและนำไปใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH : Ethanol = 40 : 60 150 ml
5. นำ sponge ที่แช่ในสารละลายไปคนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
6. หลังจากที่ถูกคนโดยใช้ magnetic stirrer ครบ 20 นาทีแล้วนำ sponge ขึ้นและนำไปใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH : Ethanol = 60 : 40 150 ml
7. นำไปคนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
8. นำ sponge ขึ้นและนำไปใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH : Ethanol = 80 : 20 150 ml
9. นำไปคนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
10. นำ sponge ขึ้นและนำไปใส่ลงในสารละลาย 1N NaOH : Ethanol = 100 : 0 150 ml
11. นำไปคนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
12. ล้าง sponge โดยนำไปใส่ลงในน้ำกลั่น 150 ml คนโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที 3 ครั้ง

3. การเตรียม sponge

วิธีการเตรียม sponge บรรจุสารสกัดเมล็ดลำพู

1. ชั่งสารสกัดจากเมล็ดลำพู 0.625 g ละลายใน methanol 20 ml จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25 mg/ml
2. ทำการบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ละลายไว้ ลงใน sponge โดยเตรียมในความเข้มข้น 25 mg/sponge ทั้งให้ methanol ระเหยจนหมด จึงนำ sponge ไปใช้ทดสอบต่อไป โดยมี negative control คือ sponge ที่บรรจุ methanol ปริมาณ 800 μl โดยทิ้งไว้ให้สารระเหยจนหมด และมี Positive control คือ Ampicilin 10 ug/disk

วิธีการเตรียม disk บรรจุสารสกัดเมล็ดลำพู

1. ชั่งสารสกัดจากเมล็ดลำพู 0.625 g ละลายใน methanol 20 ml จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 31.25 mg/ml
2. ทำการบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่ละลายไว้ ลงใน disk โดยเตรียม 2 ความเข้มข้น คือ 6.25 mg/disk และ 12.5 mg/disk โดยมี negative control คือ disk ที่บรรจุ methanol ปริมาณ 200 μl และ 400 μl และมี Positive control คือ Ampicilin 10 ug/disk
3. ทิ้งให้ methanol ระเหยจนหมด จึงนำ disk เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้ตู้ดูดอากาศไปใช้ทดสอบต่อไป

นิยามศัพท์

Clear Zone หมายถึง บริเวณใสซึ่งแสดงถึงบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ การวัดขนาดของ clear zone (mm) จะวัดเส้นรัศมีของวงใสที่เกิดขึ้นโดยวัดจากตั้งแต่ขอบของตัวอย่าง

คำย่อ	องค์ประกอบ
CM	Chitosan + AMS sponge
CCA	chitosan + acacia sponge ชนิดที่ไม่ล้าง
CAM	Chitosan + Acacia + Aluminium monostearate sponge
CAM W	Chitosan + Acacia + Aluminium monostearate sponge ที่ผ่านการล้าง
CAML W	Chitosan + Acacia + Aluminium monostearate sponge ที่ผ่านการล้าง + สารสกัดเมล็ดลำพู
CAML WR	Chitosan + Acacia + Aluminium monostearate sponge ที่ผ่านการล้าง + สารสกัดเมล็ดลำพู หลังทดสอบการปลดปล่อย

4. การประเมินผล

4.1 ประเมินลักษณะสารละลาย chitosan และลักษณะ sponge ที่ได้ด้วยตาเปล่า

4.2 ประเมินลักษณะ sponge หลังจากทำการล้าง sponge ด้วยตาเปล่า

4.3 Scanning Electron Microscope

1. ตัดตัวอย่างแบบ cross section และ longitudinal section ด้วยใบมีดโกน
2. เคลือบตัวอย่างด้วยทอง
3. นำมาวัด SEM ที่ความต่างศักย์ 15 kV วิธี back scattered electron image

4.4 การทดสอบ texture analysis

ทำการวัด Force (N) ที่ทำให้เกิด strain 6% คือมีทำให้เกิดระยะที่เปลี่ยนแปลง 6% จากความยาวเดิม ด้วยเครื่อง texture analyzer โดยมีสภาวะการทดสอบดังนี้

- Software : Texture exponent 32
- Probe ที่ใช้ part code p/2
2 mm cyl. Stainless batch No. 10982
- Pretest speed 1 mm/sec
- Test 2 mm/sec
- Post test 10 mm/sec
- Contact force 5 g
- Target mode : strain 6%

4.5 Water sorption และ Weight loss

1. นำ sponge ที่ผ่านการล้างแล้วมาทำการทดสอบ Water sorption โดยทำชั่งน้ำหนัก sponge แต่ละชิ้นแล้วใส่ sponge ลงใน phosphate buffer pH 7.4 100 ml ทำทั้งหมด 6 ชุด
2. ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทำการชั่งน้ำหนัก sponge โดยมีการชั่งน้ำด้วยกระดาศกรงเล็กน้อยก่อนชั่ง
4. นำ sponge ที่ชั่งแล้วไปอบที่ 65 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. จัดบันทึกน้ำหนักที่คงที่หลังอบเพื่อนำไปใช้คำนวณเพื่อหาค่า Water sorption และ Weight loss

$$\text{Water sorption} = \frac{\text{น้ำหนัก sponge หลังแช่ใน phosphate buffer} - \text{น้ำหนัก sponge ก่อนแช่}}{\text{น้ำหนัก sponge ก่อนแช่}} \times 100$$

$$\text{Weight loss} = \frac{\text{น้ำหนัก sponge ก่อนแช่} - \text{น้ำหนัก sponge คงที่หลังอบ}}{\text{น้ำหนัก sponge ก่อนแช่}} \times 100$$

4.6 วิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

4.6.1 วิธี Agar diffusion

2. ทำการเพาะเชื้อ

- เพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยอาหาร Tryptic Soy Broth ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
- เพาะเชื้อ *P. acnes* ในอาหาร Brain heart infusion

3. วิธีการเตรียมความเข้มข้นมาตรฐาน

- a. นำเชื้อที่ปั่นแล้ว มาวัดความเข้มข้นมาตรฐานด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้อาหาร TSB (สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus*) เป็น Blank วัดค่า Absorbance ที่ 530 nm
- b. ทำการปรับความเข้มข้นให้เท่ากับความเข้มข้นมาตรฐานด้วยการทำ dilution
- c. ทำการคำนวณหาปริมาตรของเชื้อเพื่อ dilute ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml ด้วยสมการดังนี้

$$\text{Staphylococcus aureus } Y = 2 \times 10^{-5} X + 0.0282$$

$$(\text{ค่า } X \text{ ที่ได้ } \times 10^4)$$

หมายเหตุ Y คือ ค่า Absorbance และ X คือ ปริมาตรของเชื้อที่ต้องการรู้

4. เพาะเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* ลงในอาหาร TSA และ BHI ตามลำดับ โดยใช้ sterile swab จุ่มลงในเชื้อที่ทำการ dilute แล้ว หมุน swab กับผิวด้านในหลอดให้ swab พอหมดๆ
5. แล้วจึงใช้ swab มาป้ายให้เป็น 3 ระบาย ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที

6. ใช้ sterile forceps ลนเปลวไฟ แล้วปล่อยให้เย็นจึงคืบ disk ที่โหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพู 6.25 mg, 12.5 mg, methanol 200 μ l, methanol 400 μ l และ ampicillin 10 μ g มาวางบนผิวของอาหารในลักษณะที่ตรงข้ามกัน (ทำซ้ำเช่นเดียวกันอีก 2 plate)
7. ใช้ sterile forceps ลนเปลวไฟ แล้วปล่อยให้เย็นจึงคืบ sponge ที่โหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพู 25 mg, methanol 800 μ l และ ampicillin 10 μ g มาวางบนผิวของอาหารในลักษณะที่ตรงข้ามกัน (ทำซ้ำเช่นเดียวกันอีก 2 plate)
8. สำหรับ *S. aureus* บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง และ *P. acnes* บ่มใน anaerobic incubator
9. การแปลผลการทดสอบ วัดรัศมีและเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ใช้หน่วยเป็น cm (n=3)

4.6.2 วิธี broth dilution

1. ทำการเพาะเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* ใน TSB และ BHI ตามลำดับ ให้มีความเข้มข้น 10^5 cfu/ml จำนวน 4 หลอดทดลองในแต่ละเชื้อ
2. นำ sponge เป่า , sponge บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู , disk ampicillin 10 μ g ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 1,2,3 ที่ได้ทำการเพาะเชื้อไว้แล้วดังกล่าว ส่วนหลอดที่ 4 ไม่ใส่อะไรเป็น control
3. นำไปเขย่าเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. หลังจากเขย่า หลอดที่ใส่ sponge บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู และหลอด control ทำการ dilute เป็น 100 x, 1000 x และ 10^4 x ส่วนหลอดที่ใส่ sponge เป่าและหลอดที่ใส่ disk ampicillin 10 μ g ทำการ dilute เป็น 100 x และ 1000 x
5. หลังจาก dilute ในแต่ละหลอดทดลอง นำมา 0.1 ml spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (n=3) สำหรับ *S. aureus* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
6. ทำการแปลผลโดยนับจำนวน colony/plate แล้วคำนวณเป็น cfu/ml

4.7 ศึกษาปริมาณการปลดปล่อยสารฟีนอลิกจากโครงสร้างความพรุนสูง

1. ทำ calibration curve โดยใช้ gallic acid ละลายใน methanol : water (50 : 50) ใน 0, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิกรัม/ลิตร เทียบหา total phenolic compounds ในความหมายของ Gallic acid equivalents (mg/g dry mass) เพื่อหาความเข้มข้น และหาลักษณะของการปลดปล่อยสารสกัดจากโครงสร้าง
2. ศึกษาปริมาณการปลดปล่อยสารฟีนอลิกจากโครงสร้างความพรุนสูงโดยใช้ shaker incubator ปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้ phosphate buffer pH 7.4 และใช้ 1:1 phosphate buffer pH 7.4:methanol ปริมาตร 60 ml เป็นตัวกลาง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
3. สุ่มตัวอย่างที่เวลา 5, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 และ 720 นาที ปริมาตร 5 ml และเติม phosphate buffer pH 7.4 หรือ 1:1 phosphate buffer pH 7.4:methanol ลงไปทดแทน

4. ทำการวัดสารประกอบ Phenolic compound โดยเจือจางสารละลายที่สุ่มมาในอัตราส่วนต่างๆ ใช้สารตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 7 มล. จากนั้นเติม Folin –Ciocalteu's reagent ปริมาตร 1 มล. เติมหาสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 1 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm (32) ทำ blank โดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 หรือ 1:1 phosphate buffer pH 7.4:methanol แทนสารตัวอย่าง
5. คำนวณกลับเพื่อหาปริมาณ phenolic compound ที่ปลดปล่อยออกจากโครงสร้างความพรุนสูง
6. หาปริมาณ phenolic compound ทั้งหมดที่บรรจุในโครงสร้างความพรุนสูงโดย ซึ่งสารสกัดจากเมล็ดลำพูปริมาณเท่ากับที่บรรจุในโครงสร้างความพรุนสูงละลายด้วย methanol แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent
7. เขียนกราฟการปลดปล่อย และหารูปแบบการปลดปล่อยสารของโครงสร้างความพรุนสูง

4.8 การประเมินคุณสมบัติของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย FT-IR spectroscopy

1. นำโครงสร้างความพรุนสูงที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ รวมทั้งสารเดี่ยวแต่ละชนิดคือ chitosan oligomer, AMS และ Acacia มาแยกบดผสมกับ KBr ในอัตราส่วนประมาณ 2:100 แล้วนำไปใส่ลงในเครื่องอัดแผ่นตัวอย่าง
2. นำแผ่นตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR spectroscopy โดยเก็บข้อมูลในช่วง 400 - 4000 cm^{-1} ตั้งค่าการสแกน 32 ครั้ง

4.9 การประเมินคุณสมบัติเชิงความร้อนของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย Differential Scanning Calorimetry (DSC)

นำโครงสร้างความพรุนสูงที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ รวมทั้งสารเดี่ยวแต่ละชนิดคือ chitosan oligomer, AMS และ Acacia มาชั่งน้ำหนักปริมาณ 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาตใส่ตัวอย่างอะลูมิเนียม ปิดภาตตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry ในช่วงอุณหภูมิ 30–350 องศาเซลเซียส ให้อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 10 องศาเซลเซียส/นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

4.10 การประเมินคุณสมบัติเชิงความร้อนของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย Thermogravimetry (TG)

1. นำตัวอย่างโครงสร้างความพรุนสูงที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ รวมทั้งสารเดี่ยวแต่ละชนิดคือ chitosan oligomer, AMS และ Acacia มาชั่งน้ำหนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียมสำหรับใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดเปิด
2. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric analyzer (TGA) ในโหมด dynamic thermal analysis เพื่อดูการลดลงของน้ำหนักของตัวอย่างในขณะที่เพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปเรื่อยๆ ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิ 30 – 500 องศาเซลเซียส โดยกำหนดอัตราการเพิ่มขึ้น

ของอุณหภูมิเท่ากับ 5, 10, 15 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ภายใต้บรรยากาศของอากาศปกติ

3. คำนวณค่าพลังงานในการสลายตัวจากวิธีของ Kissinger (de Britto and Campana-Filho. 2007) โดยพลอตกราฟระหว่าง $\ln \beta / T_m^2$ และ $1/T_m$ จากสมการ

$$\ln \frac{\beta}{T_m^2} = \left\{ \ln \frac{AR}{E_a} + \ln[n(1 - \alpha_p)^{n-1}] \right\} - \frac{E_a}{RT_m}$$

ซึ่งจะได้เส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ E_a/R โดย E_a คือ ค่าพลังงานที่ใช้ในการสลายตัว (activation energy) และ T_m คือค่าอุณหภูมิที่มีอัตราการสลายตัวสูงสุด (temperature of the maximum reaction rate)

4.11 การประเมินคุณสมบัติเชิงผลึกของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย X-Ray Powder Diffraction (XRPD)

1. นำสารเดี่ยวแต่ละชนิดคือ chitosan oligomer, AMS และ Acacia มาอัดลงแผ่นแก้วบรรจุตัวอย่าง ส่วนโครงสร้างความพรุนสูงเตรียมตัวอย่างให้เป็นแผ่นขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปติดบนแผ่นแก้วสำหรับยึดตัวอย่าง
2. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โครงสร้างเชิงผลึกด้วยเครื่อง X-Ray Powder Diffraction โดยมีแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์เป็นชนิด Cu-K α ซึ่งให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นเท่ากับ 1.541841 อังสตรอม ทำการวิเคราะห์ในช่วง 4 – 60 องศา 2 θ กำหนดความต่างศักย์ที่ 30 กิโลโวลต์ และกระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์

4.12 การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ HepG2บนโครงสร้างไคโตซานความพรุนสูง

1. นำสารสกัดจากเมล็ดลำพูส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (CSSO) มาละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL
2. นำ chitosan sponges ดำรับ CSLA (4% w/w chitosan ใน 2% lactic acid) และ CSAMSLA (2.5% aluminum monostearate ในสารละลาย 4% w/w chitosan ใน 2% lactic acid) ซึ่งผ่านการ autoclave เป็นเวลา 5 นาทีและฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เป็นเวลา 15 นาที มาบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู โดยค่อยๆ หยดสารละลายในข้อ 1 ลงไปจนมีปริมาณสารสกัด 10 mg, 20 mg และ 30 mg/sponge แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมทานอลระเหยออกไปจนหมด
3. นำ chitosan sponge ที่ไม่มีสารสกัด (กลุ่มควบคุม) และมีสารสกัดในปริมาณ 10 mg, 20 mg และ 30 mg ตามลำดับ ดำรับละ 3 อัน ใส่ลงใน 6-well plates
4. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ชนิดไม่มี serum ลงไป well ละ 7 mL ให้ท่วมผิวหน้าของ sponge
5. นำ cell suspension ของ HepG2 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^6 cell/mL ลงไป well ละ 1 mL จากนั้นเลื่อนเขย่า well plate ไป-มาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้งเพื่อให้เซลล์กระจายตัวจนทั่วผิวหน้าของ sponge แล้วนำเข้าไปบ่มในตู้บ่ม (ในสภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C และมีความชื้น) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะ sponge
6. นำ sponge ออกมาแล้วนับจำนวนเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะ sponge แต่ละอัน โดยใช้ micropipette ค่อยๆ ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละ well plate ออกมาใส่ในหลอดทดลอง ใช้ forceps คีบ sponge ออกจาก well plate และดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจาก well plate จนหมด

7. ใส่สารละลาย trypsin ลงใน well plate ปริมาตร 1 mL แล้วนำเข้าไบบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 9 นาที เพื่อให้เซลล์ที่ยึดเกาะใน well plate หลุดออกมา (trypsinization)
8. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ชนิดมี serum ลงไป 1mL/well เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่รวมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในข้อ 6
9. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ที่รอบหมุน 1500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนลงมา
10. เทสารละลายส่วน supernatantทิ้งไป แล้วเติม phosphate buffer pH 7.4 ในปริมาณที่แน่นอน ทำการ resuspend เซลล์ โดยใช้ micropipette ดูดแล้วปล่อยซ้ำๆ ประมาณ 17 รอบ แล้วนำสารละลายใส่ใน heamocytometer เพื่อนับจำนวนเซลล์
11. นำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคูณกับปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติมลงไปในช่วง 10 และคูณด้วย 10^4 ได้เป็นจำนวนเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะ sponge (No. of unattached cell)
12. นำจำนวนเซลล์ที่คำนวณได้ในข้อ 11 มาลบออกจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใส่ลงไปในแต่ละ well plate ได้เป็นจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะ sponge (No. of attached cell)
13. คำนวณ % attachment ตามสูตร

$$\% \text{ attachment} = \frac{\text{No. of attached cell}}{\text{No. of seeded cell}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลประเมินลักษณะสารละลาย chitosan และลักษณะ sponge ที่ได้ด้วยตาเปล่า

จากการเตรียม sponge จากพอลิเมอร์ chitosan และ sponge จากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง chitosan กับ acacia และ tragacanth ในหลายรูปแบบเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมในการทำมาใช้พัฒนาต่อโดยเลือกระบบที่เป็น polyelectrolyte complex ระหว่าง chitosan กับ acacia ซึ่งมีประจุตรงข้ามกันเนื่องจากการเกิดเป็น polyelectrolyte complex นี้มีข้อดีเหนือกว่าระบบที่มี chitosan เพียงอย่างเดียวคือ โครงสร้างจะมีความแข็งแรงมากขึ้น และสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 ลักษณะสารละลาย chitosan และลักษณะ sponge ที่ผสมกับสารอื่น

System	Physical appearance of aqueous system	Physical appearance of sponge
4% Chitosan	yellowish low viscosity solution	-
4% Chitosan + AMS	Phase separation Yellowish dispersion Upper: AMS Lower: turbidity	2 layers of yellowish structure with easily collapsible
4% Chitosan + acacia	yellowish moderate viscosity solution yellowish dispersion	Porous structure with easily collapsible
4% Chitosan + 4% acacia + AMS	Homogeneous yellowish moderate viscosity dispersion	Small porous and not easily to collapse
4% Chitosan + 4% tragacanth	Rather yellowish moderate viscosity dispersion	Yellowish fibrous structure with easily collapsible
4% Chitosan + 4% tragacanth + AMS	Phase separation Yellowish dispersion Upper: AMS ,Lower: turbidity	-

ผลประเมินลักษณะ sponge หลังจากทำการล้าง sponge ด้วยตาเปล่า

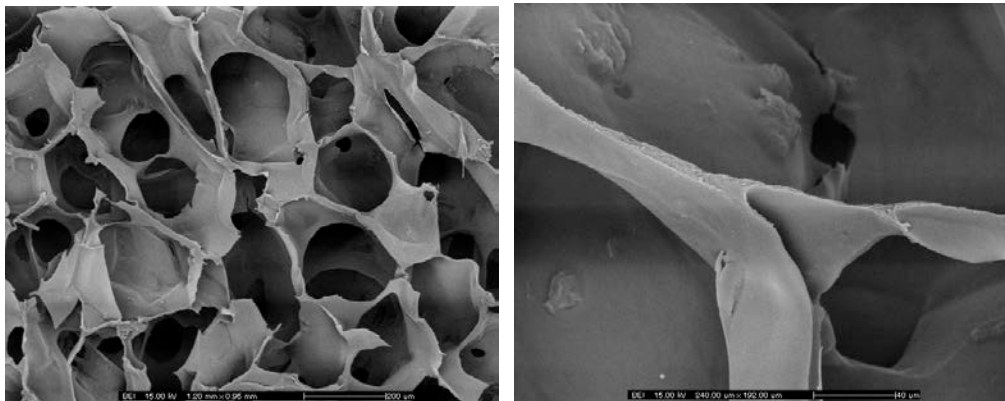
ตารางที่ 2 บันทึกลักษณะ sponge หลังจากทำการล้าง sponge

สารที่ใช้	hardness	ลักษณะภายนอก
Chitosan	++++	บีบแล้วยุบบ้างแต่ไม่นิ่มมาก ผิวไม่เรียบสีเข้มกว่า 24 hr มีส่วนที่กร่อนเล็กน้อย (ด้าน AMS)
Chitosan ที่ผสมกับ acacia	++	ไม่มีเม็ดที่กร่อนหรือเสียรูป บีบแล้วยุบลงค่อนข้างมาก ผิวหน้าไม่เรียบ
Chitosan ที่ผสมกับ acacia และ AMS	++	นิ่ม บีบแล้วยุบ สีขาว ผิวไม่เรียบ ด้าน AMS ขาวกว่า
Chitosan ที่ผสมกับ tragacanth	++	นิ่ม บีบแล้วยุบ สีเหลืองนวล ผิวไม่เรียบ แยกชั้น เม็ดบีบทย่อยข้างสมบูรณ์

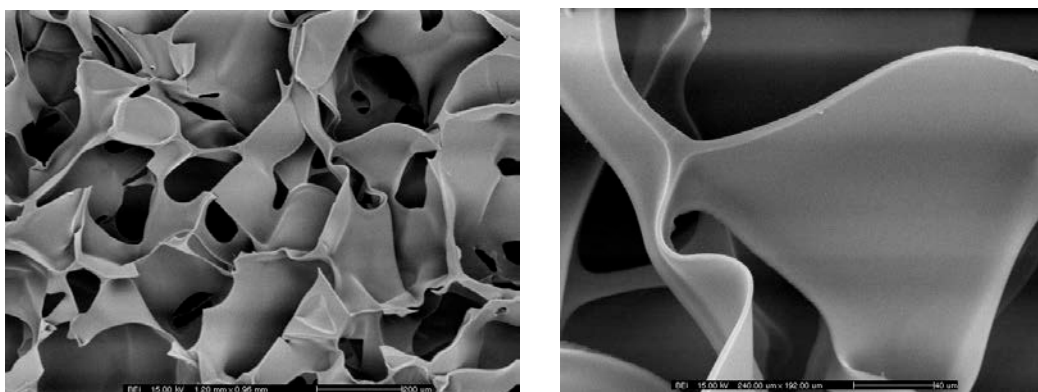
ผลการประเมิน Scanning Electron Microscope

Sponge ที่นำไปศึกษาด้วย scanning electron microscope (SEM) พบว่า sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan และ AMS (CM) ที่ผิวของ sponge มีผลึกของ aluminium monostearate เกาะอยู่ และ มีความพรุนสูงดังแสดงในรูปที่ 7 sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan และ acacia (CA) ชนิดที่ไม่ล้างจะพบว่า sponge มีผิวเรียบไม่มีผลึกใดๆ เกาะอยู่ดังแสดงในรูปที่ 8 สำหรับ sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan และ acacia และผ่านการล้าง (CAW) จะพบว่าผิวของ sponge มีเส้นใยที่เกิดจากการห่อตัวของ gel คือ acacia ที่ผ่านการ freeze dry ดังแสดงในรูปที่ 9 ขณะที่ sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan, acacia และ AMS ไม่ผ่านการล้าง (CAM) มีความพรุนสูง ผังเซลล์มีลักษณะบาง แยกได้เซลล์ชัดเจน และมีลักษณะเซลล์มีความสมบูรณ์ และที่ความละเอียดขนาด 500 เท่าพบผลึกของ Aluminium monostearate เกาะอยู่บริเวณผนังเซลล์ และเมื่อดูจากภาพ cross-section และ longitudinal-section พบว่าใน sponge ขนาดเซลล์ไม่สม่ำเสมอในทั้งเม็ดโดยด้านบนของเม็ดจะมีส่วนของ Aluminium monostearate เกาะอยู่เป็นจำนวนมาก และในส่วนด้านล่างเซลล์จะใหญ่ไม่ต่อเนื่องดังแสดงในรูปที่ 10,11 ส่วน sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan, acacia, AMS sponge ผ่านการล้าง (CAM W) จะพบว่าผิวของ sponge มีผลึกของ aluminium monostearate เกาะอยู่จำนวนมาก และมีการห่อตัวของ gel คือ acacia เนื่องจาก acacia ผ่านการ freeze dry ดังแสดงในรูปที่ 12 ส่วน sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan, acacia, AMS ซึ่งผ่านการล้าง และเมื่อดูจากภาพ longitudinal-section พบว่าใน sponge ขนาดเซลล์ไม่สม่ำเสมอ โดยในส่วนกึ่งกลางของเม็ดพบว่ามีรูพรุนมาก คือเซลล์ใหญ่และไม่สม่ำเสมอ ดังแสดงในรูปที่ 13 และ sponge ที่มีส่วนประกอบของ chitosan, acacia, AMS sponge ผ่านการล้างและทำการโหลดสารสกัดเมลิตล้าพบภาพที่ได้เมื่อเทียบกับภาพก่อนโหลดสารสกัดเมลิตล้าพบผลึกเล็กๆอยู่ตามเซลล์มากขึ้นซึ่งคาดว่าเป็นสารสกัดเมลิตล้าที่ไล่ลงไป ตามรูปที่ 14,15 และเมื่อนำ sponge ไปทดสอบการ

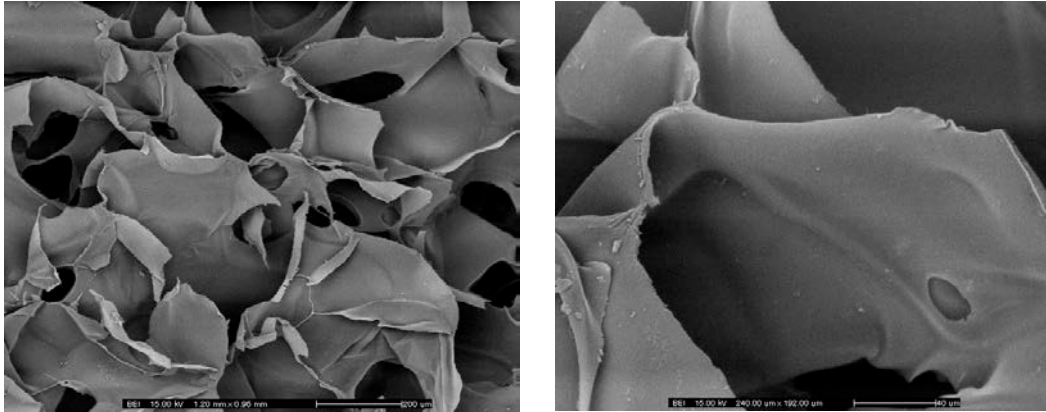
ปลดปล่อยสารสกัดจากเมล็ดลำพูโดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลางพบว่าผนังเซลล์มีเจลเป็นแผ่นและยังคงพบผลึกก้อนเล็กๆอยู่ตามเซลล์ซึ่งคิดว่าอาจจะเป็นสารสกัดเมล็ดลำพูที่ยังหลงเหลืออยู่จากการทดสอบปลดปล่อย ตามรูปที่ 16,17 เมื่อนำ sponge ไปทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดจากเมล็ดลำพูโดยใช้ 1:1 phosphate buffer pH 7.4 : methanol เป็นตัวกลาง พบว่า cell ที่ได้มีช่องว่างจำนวนมาก ผนังบาง ขนาดเซลล์ไม่สม่ำเสมอ และยังพบผลึกของ aluminium monostearate เกาะอยู่รวมถึงผลึกก้อนเล็กๆซึ่งคิดว่าอาจจะเป็นสารสกัดเมล็ดลำพูที่ยังหลงเหลืออยู่จากการทดสอบปลดปล่อยตามรูปที่ 18,19



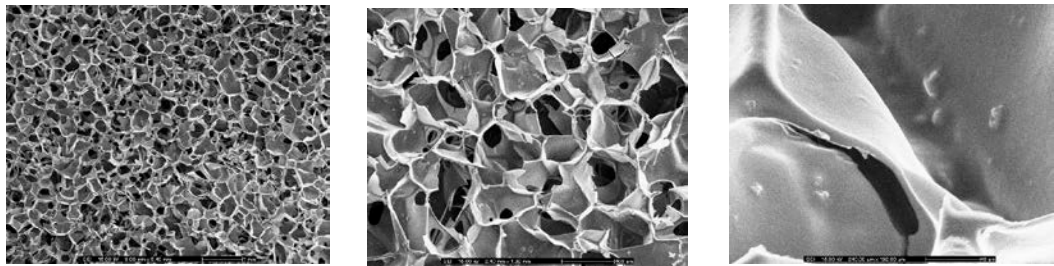
รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + AMS sponge (CM) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 50 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



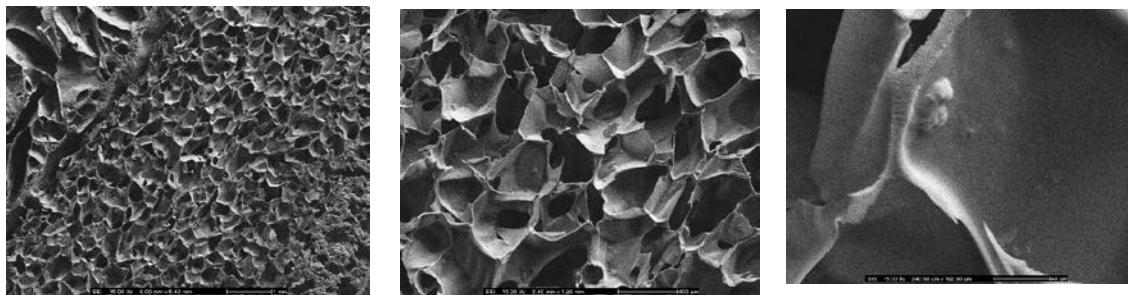
รูปที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia sponge ไม่ล้าง (CA) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 50 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



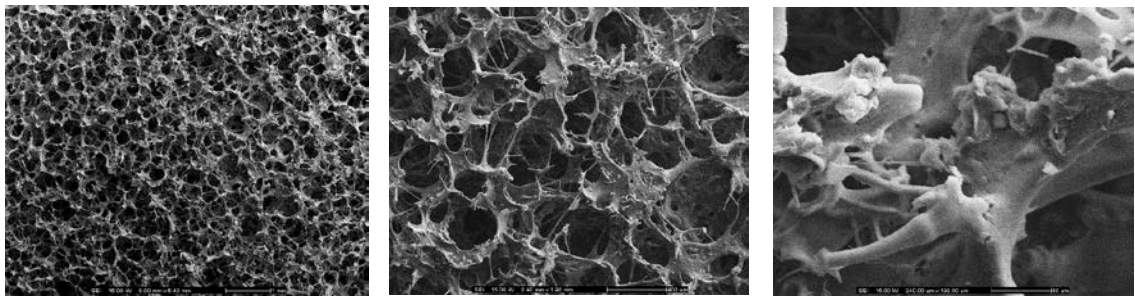
รูปที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia sponge ล้าง (CA W) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 50 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



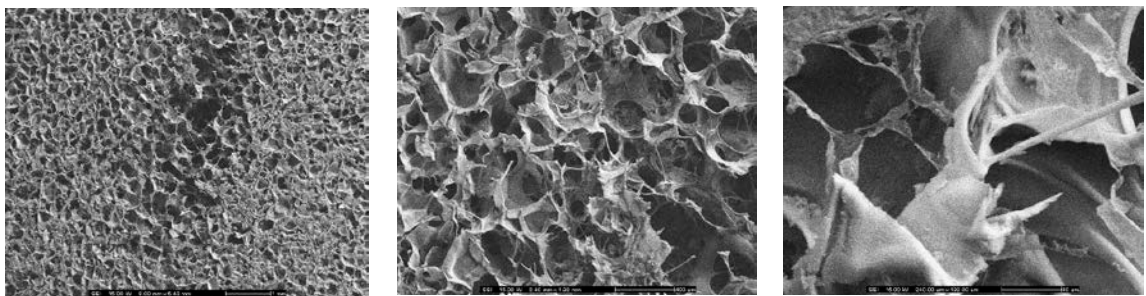
รูปที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge (CAM) ตัด cross-section ไม่ล้างที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



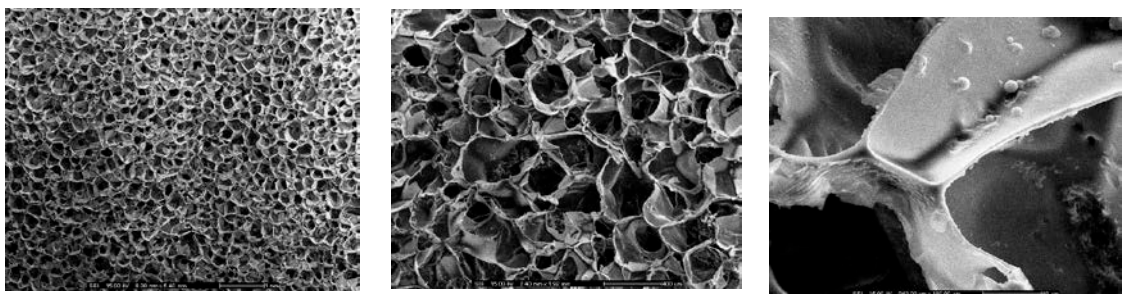
รูปที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge (CAM) ตัด longitudinal-section ไม่ล้างที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



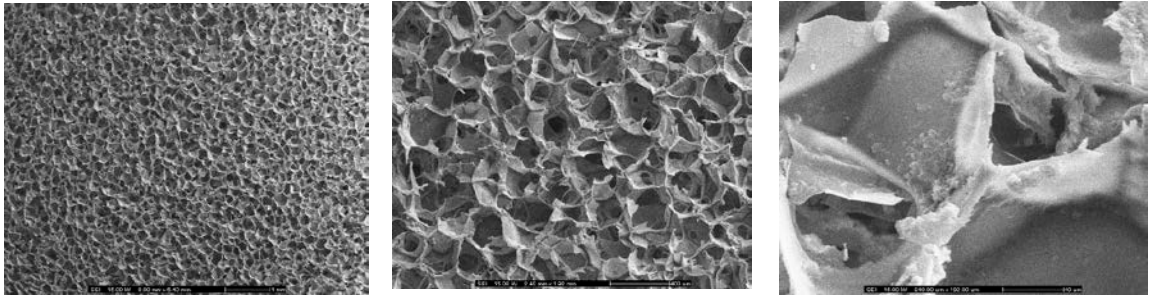
รูปที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid (CAM W) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



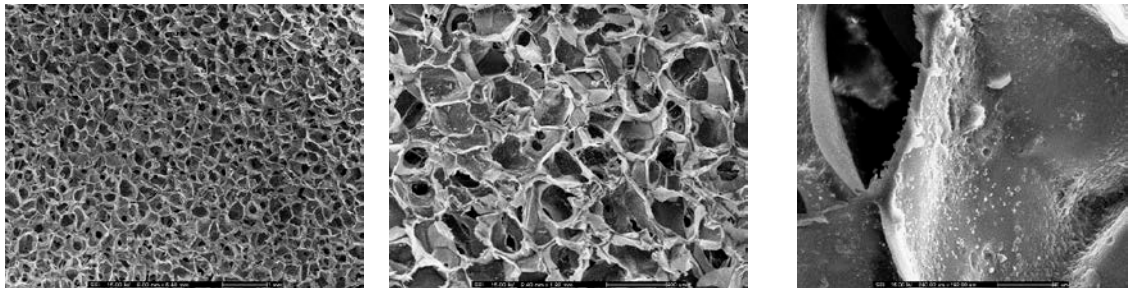
รูปที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid (CAM W) ตัด longitudinal-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



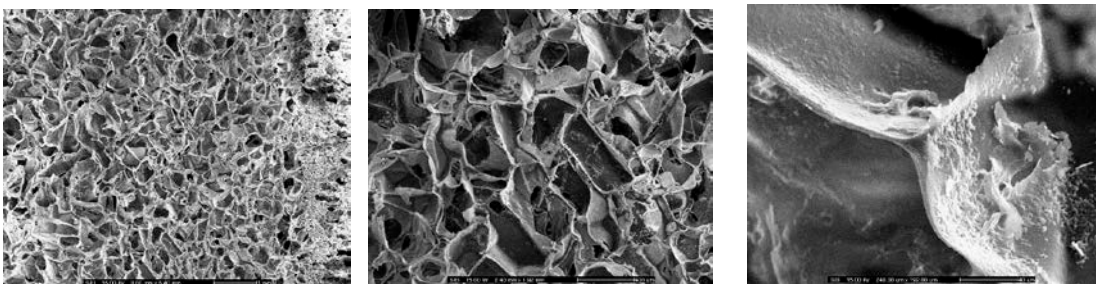
รูปที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพู (CAML W) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



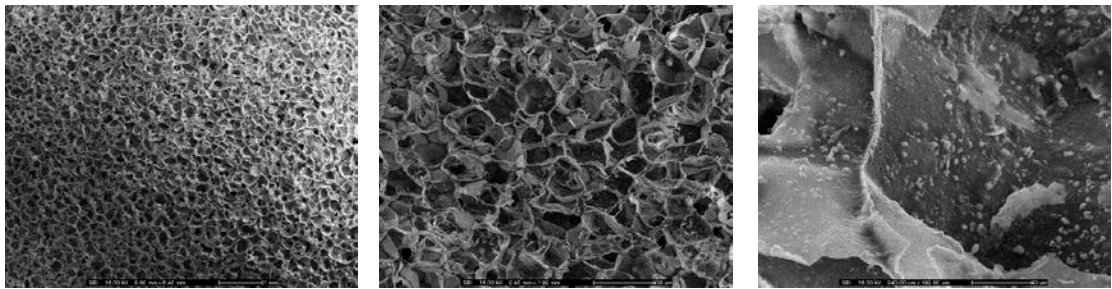
รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพู (CAML W) ตัด longitudinal-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



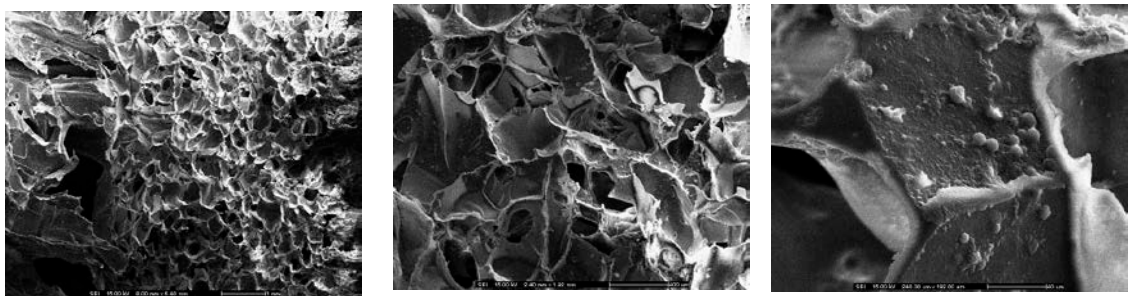
รูปที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพูหลังทดสอบการปลดปล่อยใน PBS (CAML WR) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



รูปที่ 17 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพูหลังทดสอบการปลดปล่อยใน PBS (CAML WR) ตัด longitudinal-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



รูปที่ 18 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพูหลังทดสอบการปลดปล่อยในระบบ methanol และ PBS (CAML WR) ตัด cross-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)



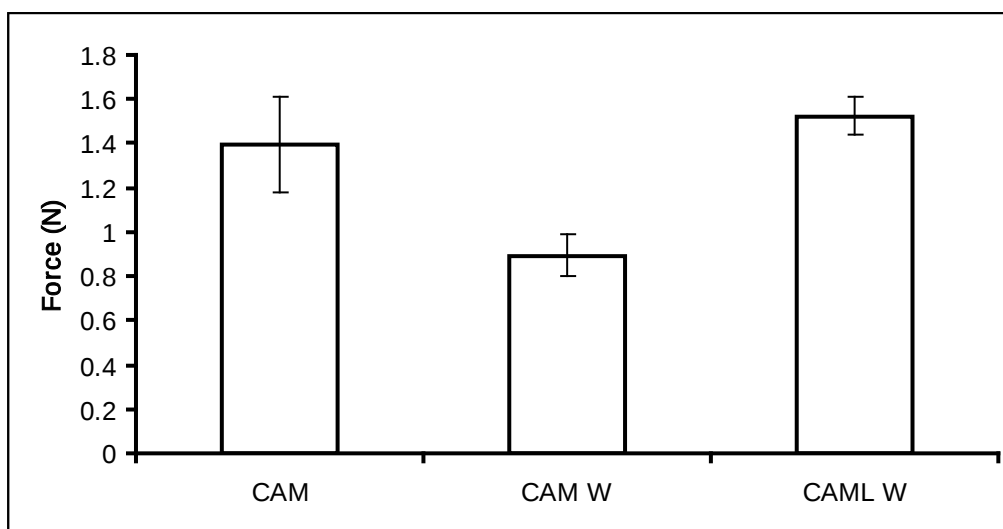
รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากกล้อง scanning electron microscope ของ chitosan + acacia + AMS sponge ที่ผ่านการล้าง residue acid และทำการโหลดสารสกัดจากเมล็ดลำพูหลังทดสอบการปลดปล่อยในระบบ methanol และ PBS (CAML WR) ตัด longitudinal-section ที่กำลังขยาย 15 เท่า (ซ้าย) 50 เท่า (กลาง) และกำลังขยาย 500 เท่า (ขวา)

ผลการทดสอบด้วย texture analysis

CAM และ CAML W มีความแข็งมากกว่า CAM W อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ CAML W มีความแข็งมากกว่า CAM อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปคือ เมื่อทำการล้าง sponge จะทำให้ความแข็งของ sponge ลดลงอาจเกิดจากในขณะทำการล้าง residual acid ด้วย ethanol และ NaOH เกิดการละลายน้ำของ acacia ที่อยู่ในโครงสร้าง sponge และเมื่อบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูทำให้ sponge ที่ได้มีความแข็งมากขึ้นก็อาจเกิดจากอนุภาคของสารสกัดจากเมล็ดลำพูเข้าไปเกาะอยู่ตามผนังโครงสร้าง

ตารางที่ 3 Force (N) จากการทดสอบ sponge ด้วยเครื่อง texture analyzer

ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่			เฉลี่ย	SD
	1	2	3		
CAM	1.148	1.503	1.543	1.398	0.217
CAM W	0.973	0.791	0.917	0.894	0.094
CAML W	1.626	1.474	1.475	1.525	0.088



รูปที่ 20 กราฟแสดงแรงต้านการกดของ sponge 3 ชนิดจากการทดสอบด้วยเครื่อง texture analyzer

ผลการทดสอบ Water sorption และ Weight loss

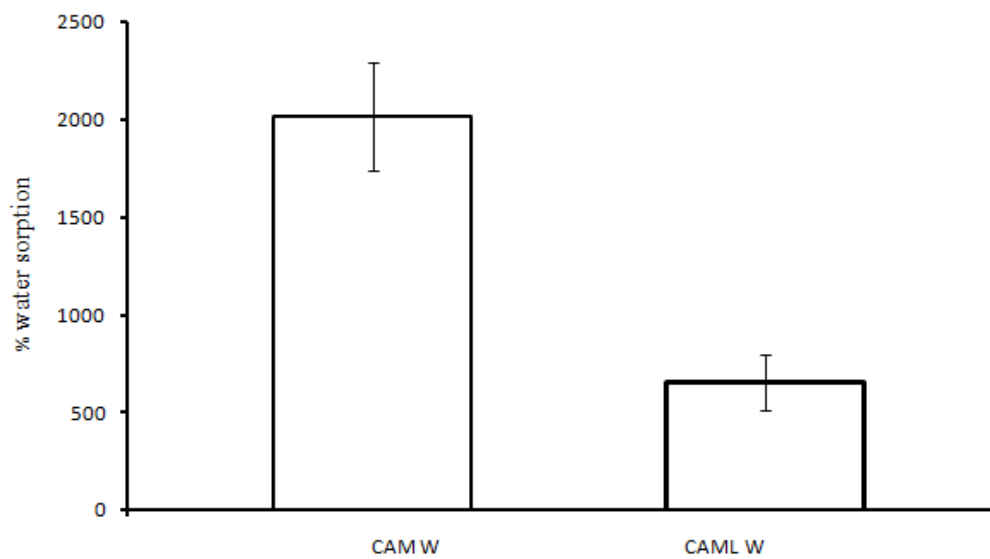
Sponge ที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู และ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู มีน้ำหนักหลังแช่เพิ่มขึ้นจากก่อนแช่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า sponge ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ เนื่องจาก Sponge เป็นโครงสร้างที่มีความพรุนสูงจึงสามารถดูดซับน้ำได้ดีถึง 2014.96% และ 652.98% Sponge ที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู และ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู มีน้ำหนักหลังอบเปลี่ยนแปลงจากก่อนแช่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า sponge มีความกรอบน้อย โดยที่ผล water sorption และ weight loss ของ sponge ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูมีผลต่อการดูดซับน้ำและความกรอบของ sponge เนื่องจากสารสกัดจากเมล็ดลำพูเป็นสาร hydrophobic ทำให้น้ำไม่ถูกดูดซับเข้ามาในโครงสร้างได้เท่าที่ควร และมีผลต่อความกรอบเนื่องจากสารสกัดที่เกาะอยู่ในโครงสร้างทำให้โครงสร้างแข็งแรงขึ้น

ตารางที่ 4 %water sorption and weight loss ของ sponge ที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู

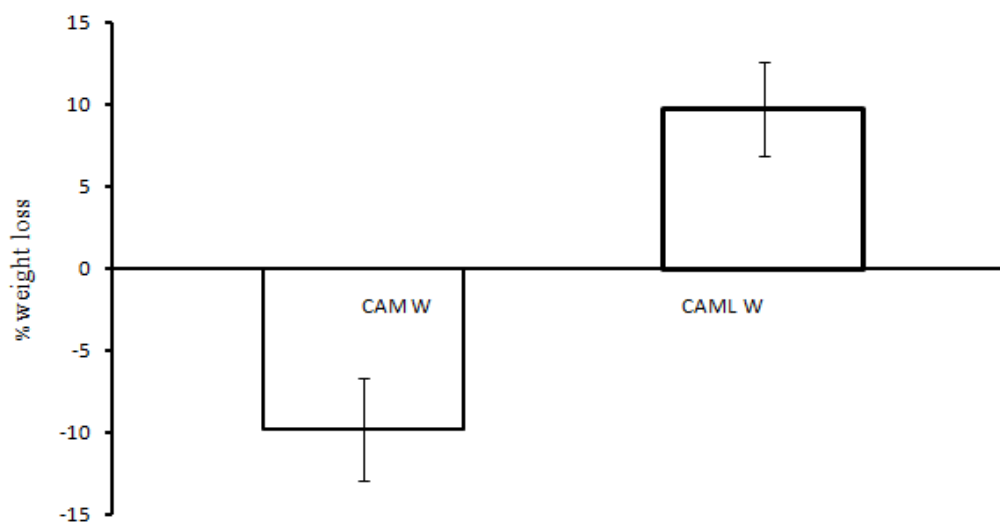
เมล็ดที่	น้ำหนัก (g)			%water sorption	น้ำหนัก (g)	ความ กร่อน	% Weight loss
	ก่อนแช่	หลังแช่	ผลต่าง		หลังอบ		
1	0.0145	0.3328	0.3183	2195.17	0.0161	-0.0016	-11.03
2	0.0136	0.2541	0.2405	1768.38	0.0142	-0.0006	-4.41
3	0.0136	0.3319	0.3183	2340.44	0.0148	-0.0012	-8.82
4	0.0153	0.3525	0.3372	2203.92	0.0167	-0.0014	-9.15
5	0.0144	0.2955	0.2811	1952.08	0.0163	-0.0019	-13.19
6	0.0158	0.2733	0.2575	1629.75	0.0177	-0.0019	-12.03
เฉลี่ย				2014.96			-9.77
SD				278.30			3.11

ตารางที่ 5 %water sorption and weight loss ของ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู

เมล็ดที่	น้ำหนัก (g)			% water sorption	น้ำหนัก (g)	ความ กร่อน	% Weight loss
	ก่อนแช่	หลังแช่	ผลต่าง		หลังอบ		
1	0.036	0.3329	0.2969	824.72	0.0330	0.003	8.33
2	0.034	0.3196	0.2856	840	0.0323	0.0323	5
3	0.0312	0.2	0.1688	541.03	0.0280	0.028	10.26
4	0.0355	0.2341	0.1986	559.44	0.0320	0.032	9.86
5	0.0367	0.2373	0.2006	546.59	0.0318	0.0318	13.35
6	0.0312	0.2203	0.1891	606.09	0.0276	0.0276	11.54
เฉลี่ย				652.98			9.72
SD				140.91			2.86



รูปที่ 21 % water sorption ของ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูและไม่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู



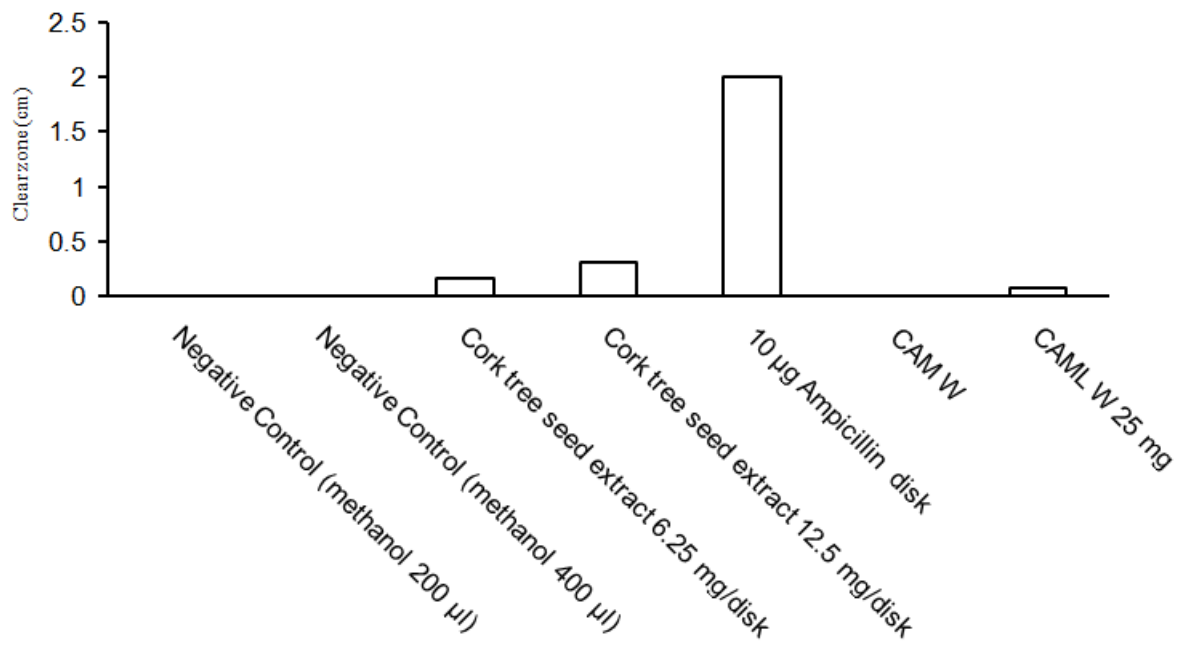
รูปที่ 22 % weight loss ของ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูและไม่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar diffusion

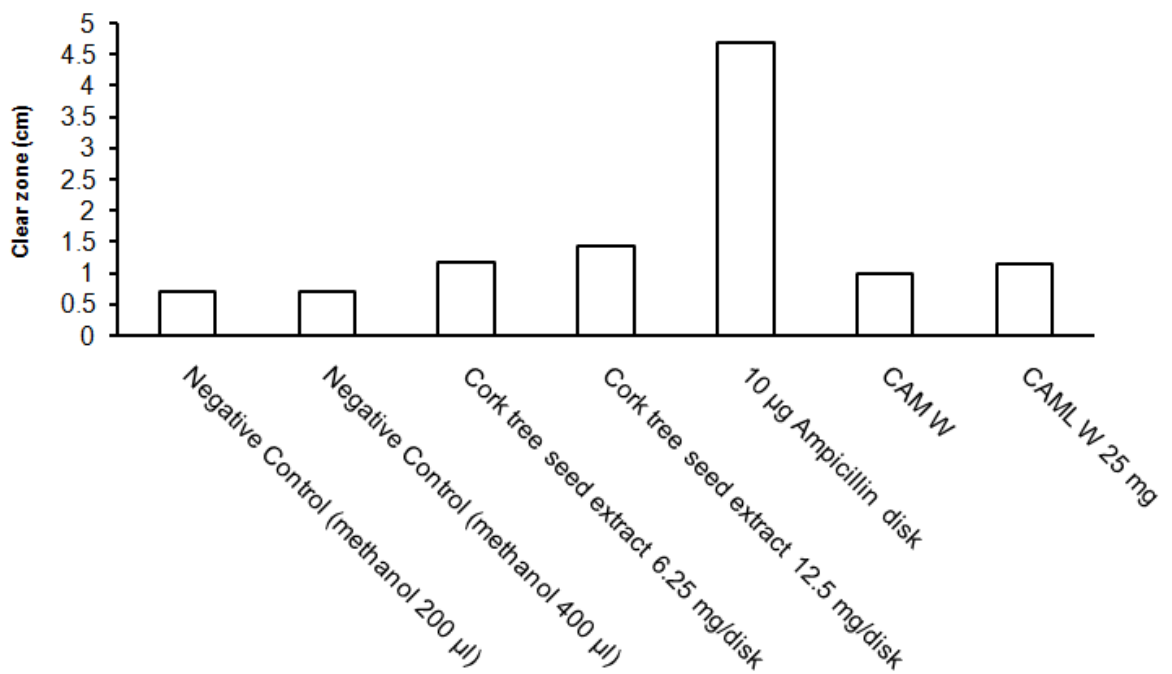
จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่า disk ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 6.25 mg/disk มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* มากกว่า disk ที่บรรจุ methanol 200 μ l ซึ่งระเหยแห้งและใช้เป็น negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางฎ.และฐ.ในภาคผนวก สำหรับ disk ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 12.5 mg/disk มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* มากกว่า disk ที่เป็น negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางฎ.และฐ.ในภาคผนวก ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่มากขึ้นมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตาราง ฎ แต่สำหรับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่มากขึ้นไม่ได้มีความสามารถยับยั้งเชื้อมากขึ้น ($p < 0.05$) sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 25 mg มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* มากกว่า sponge ที่บรรจุ methanol 800 μ l ที่ระเหยแห้งและใช้เป็น negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังที่แสดงในตารางฎ.และฐ. และพบว่า 10 μ g ampicillin disk มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อมากกว่า disk และ sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในตารางฎ.และฐ. แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้

ตารางที่ 6 Clear zone จากการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี Agar diffusion method (n=3)

ตัวอย่างทดสอบ	Clear zone <i>S. aureus</i> (mm) วัด รัศมีจากขอบตัวอย่าง			mean	SD	Clear zone <i>S. aureus</i> (cm) วัดเส้น ผ่านศูนย์กลางของ clear zone			mean	SD
	1	2	3			1	2	3		
Negative Control (methanol 200 µl)	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0.7	0.7	1.36E-16
Negative Control (methanol 400 µl)	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0.7	0.7	1.36E-16
สารสกัดจากเมล็ดลำพู 6.25 mg/disk	0.1	0.2	0.2	0.166667	0.057735	1.1	1.2	1.2	1.166667	0.057735
สารสกัดจากเมล็ดลำพู 12.5 mg/disk	0.3	0.3	0.3	0.3	0	1.3	1.5	1.5	1.433333	0.11547
Ampicillin 10 µg	2	2	2	2	0	4.7	4.7	4.7	4.7	0
CAM W	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
CAML W 25 mg	0.1	0	0.1	0.066667	0.057735	1.2	1	1.2	1.133333	0.11547



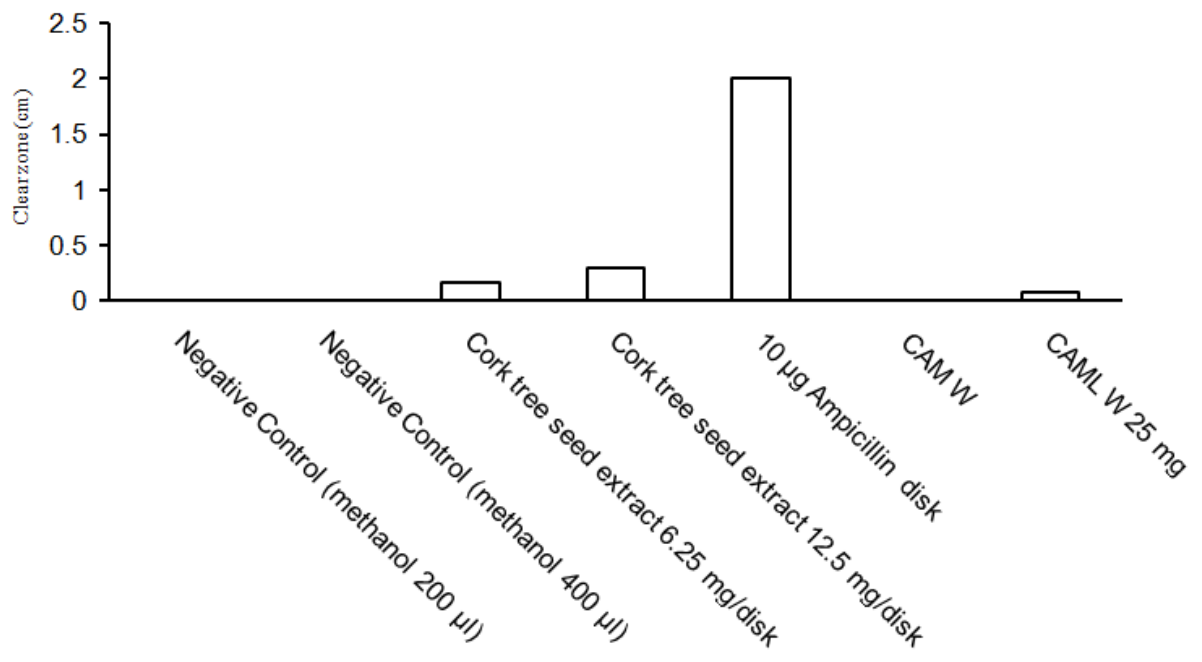
รูปที่ 23 clear zone วัดรัศมีจากขอบของตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S.aureus* (n=3)



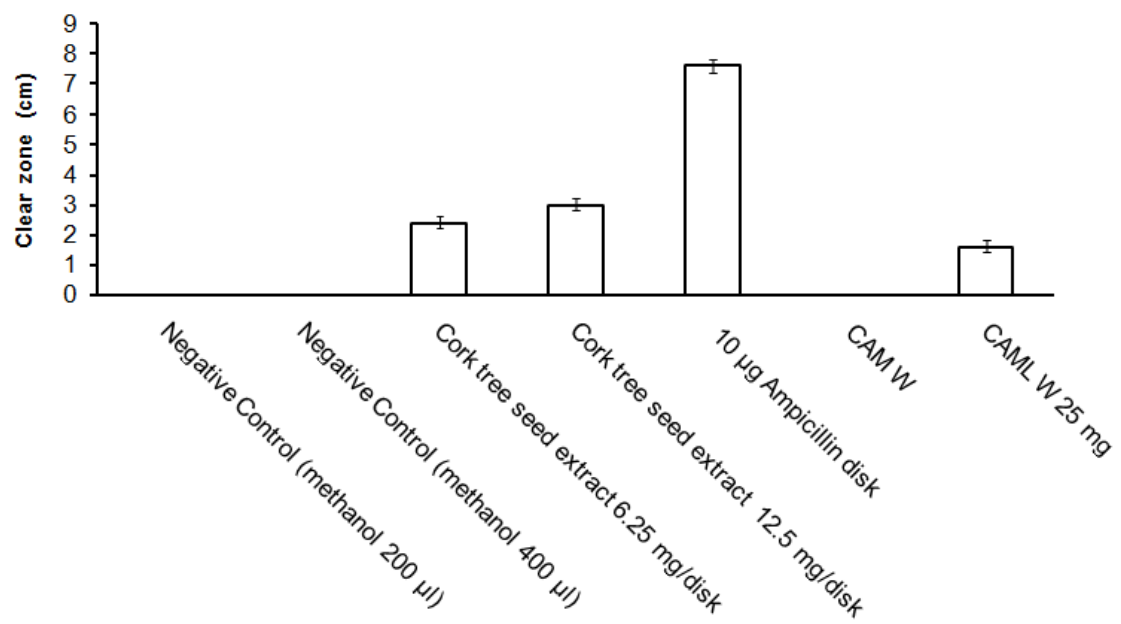
รูปที่ 24 clear zone วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S.aureus* (n=3)

ตารางที่ 7 Clear zone จากการทดสอบกับเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี Agar diffusion method (n=3)

ตัวอย่างทดสอบ	Clear zone <i>P. acnes</i> (cm) วัดรัศมี จากขอบตัวอย่าง			mean	SD	Clear zone <i>P. acnes</i> (cm) วัดเส้น ผ่านศูนย์กลางของ clear zone			mean	SD
	1	2	3			1	2	3		
Negative Control (methanol 200 μ l)	0	0	0			0	0	0		
Negative Control (methanol 400 μ l)	0	0	0			0	0	0		
สารสกัดจากเมล็ดลำพู 6.25 mg/disk	1	0.8	0.9	0.9	0.1	2.6	2.2	2.4	2.4	0.2
สารสกัดจากเมล็ดลำพู 12.5 mg/disk	1.3	1.2	1.1	1.2	0.1	3.2	3	2.8	3	0.2
10 μ g Ampicillin disk	3.4	3.5	3.6	3.5	0.1	7.4	7.6	7.8	7.6	0.2
CAM W	0	0	0			0	0	0		
CAML W 25 mg	0.3	0.4	0.2	0.3	0.1	1.6	1.8	1.4	1.6	0.2



รูปที่ 25 clear zone วัดรัศมีจากขอบของตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P.acnes* (n=3)



รูปที่ 26 clear zone วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P.acne* (n=3)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี broth dilution พบว่า Sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 25 mg สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า sponge เปล่า และ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตาราง ผ. และมีความสามารถยับยั้งเชื้อไม่ต่างจาก 10 μ g ampicillin

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี broth dilution พบว่า Sponge ที่บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 25 mg สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า sponge เปล่า และ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตาราง ด. และมีความสามารถยับยั้งเชื้อไม่ต่างจาก 10 μ g ampicillin

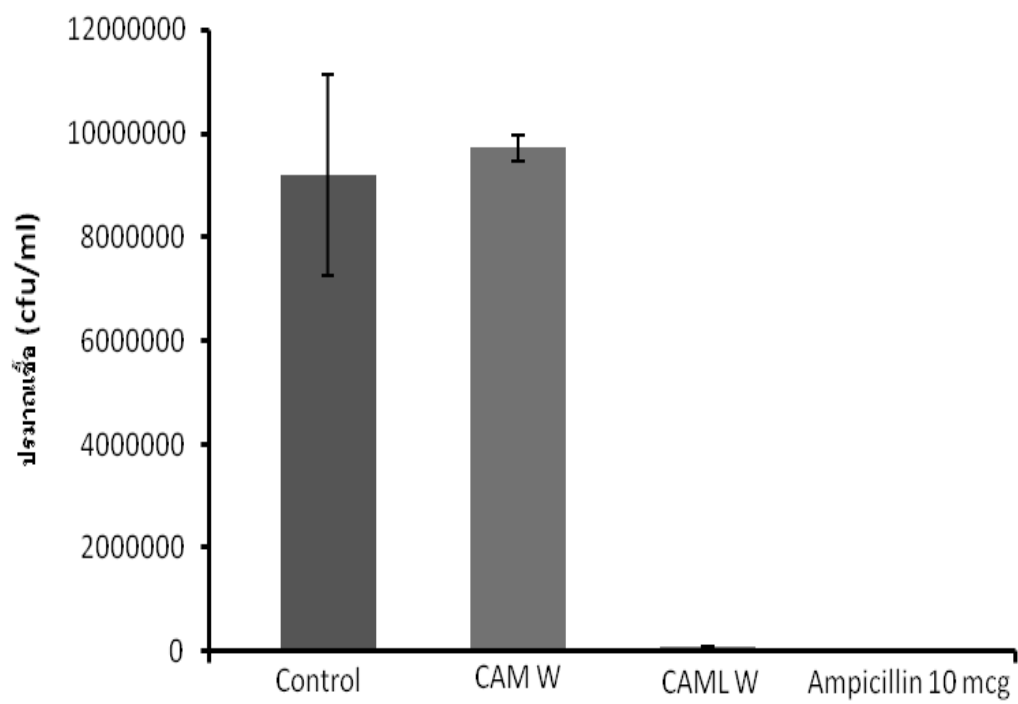
	Control									
	Colony/plate					Cfu/ml				
	1	2	3	average	SD	1	2	3	average	SD
100x	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1000x	1138	767	854	920	194	1.138x10 ⁷	7.67x10 ⁶	8.54x10 ⁶	9.19x0 ⁶	1.94x10 ⁶
10 ⁴ x	172	177	132	160	25	1.71x10 ⁷	1.77x10 ⁷	1.32x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	2.47 x10 ⁷

	CAM W									
	Colony/plate					Cfu/ml				
	1	2	3	average	SD	1	2	3	average	SD
100x	*	*	*	*		*	*	*	*	*
1000x	990	787	950	909	108	9.9x10 ⁶	7.87x10 ⁶	9.55x10 ⁶	9.09x10 ⁶	1.08 x10 ⁶
10 ⁴ x	-	-	-	-	-.	-	-	-	-	-

	Sponge บรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู 25 mg									
	Colony/plate					Cfu/ml				
	1	2	3	average	SD	1	2	3	average	SD
100x	102	74	43	73	30	1.02×10^5	7.4×10^4	4.3×10^4	7.3×10^4	2.95×10^4
1000x	31	84	21	45	34	3.1×10^5	8.4×10^4	2.1×10^4	4.5×10^4	3.39×10^4
$10^4 \times$	5	0	0	2	3	5×10^5	0	0	1.67×10^5	2.89×10^5

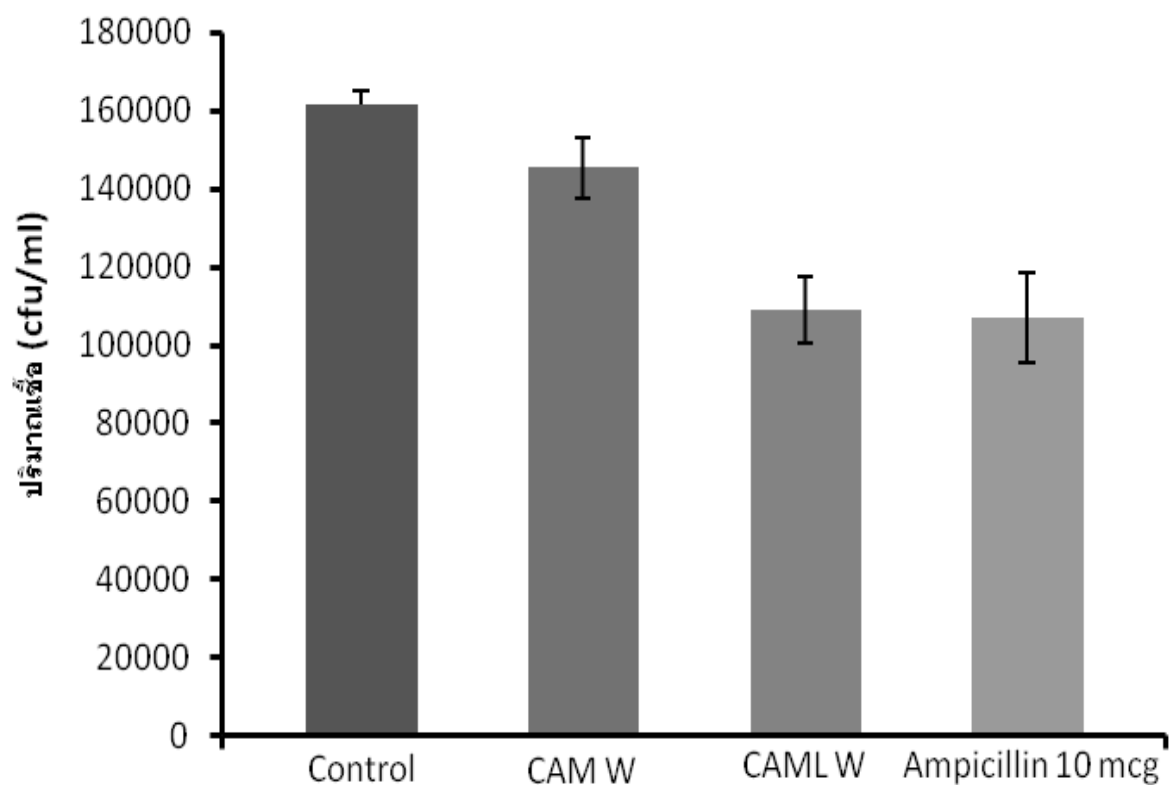
	10 µg ampicillin disk									
	Colony/plate					Cfu/ml				
	1	2	3	average	SD	1	2	3	average	SD
100x	10	14	10	11	2	1×10^4	1.4×10^4	1×10^4	1.13×10^4	2.31×10^3
1000x	47	18	9	25	20	4.7×10^5	1.8×10^5	9×10^4	2.47×10^5	1.96×10^5
$10^4 \times$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ * ไม่สามารถนับได้
 - ไม่ได้ทำการทดลอง



รูปที่ 27 ปริมาณเชื้อ *S.aureus* ที่เหลือจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบโดยวิธี broth dilution (n=3)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี broth dilution (n=3)



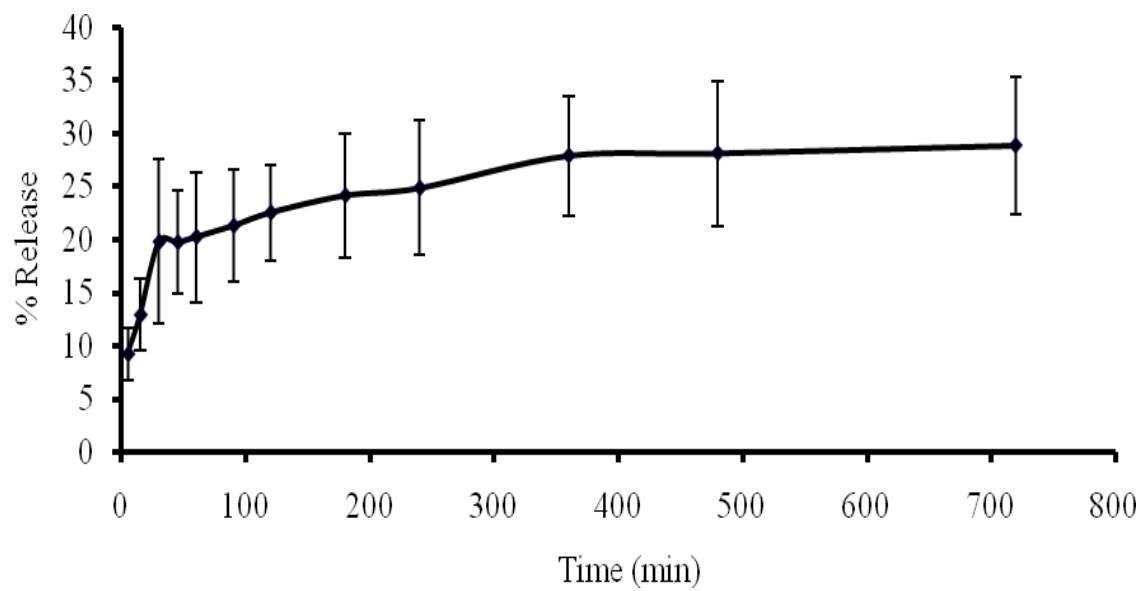
รูปที่ 28 ปริมาณเชื้อ *P.acne* ที่เหลือจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบโดยวิธี broth dilution (n=3)

ผลการศึกษาปริมาณการปลดปล่อยสารฟีนอลิกจากโครงสร้างความพรุนสูง

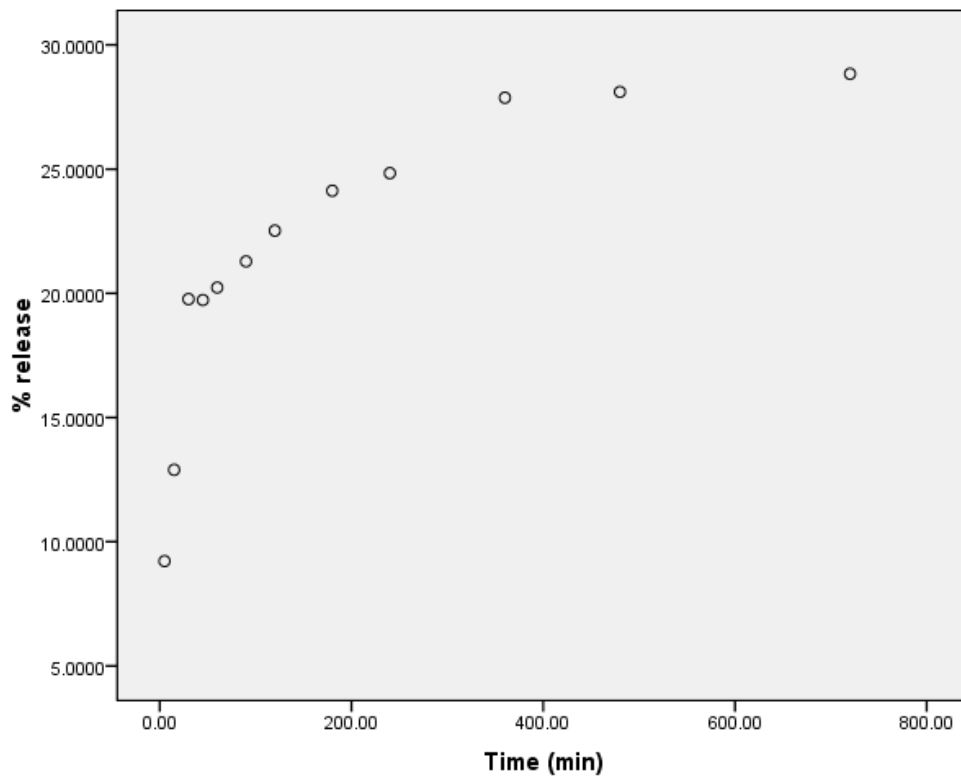
ตารางที่ 10 ปริมาณการปลดปล่อยสารฟีนอลิกสะสมจากโครงสร้างความพรุนสูงโดยใช้ตัวกลางคือ 1:1 methanol : phosphate buffer pH 7.4

Time (min)	ปริมาณสารที่ปลดปล่อย (mg)						mean	SD
	1	2	3	4	5	6		
5	8.48	9.05	9.15	5.27	12.62	10.72	9.22	2.45
15	9.41	12.61	14.23	8.43	15.89	16.78	12.89	3.41
30	12.46	19.44	32.03	10.59	22.01	22.07	19.77	7.73
45	13.12	21.82	20.67	14.47	23.55	24.75	19.73	4.83
60	10.47	23.00	20.41	16.48	22.87	28.17	20.23	6.12
90	13.97	21.71	20.63	17.55	24.79	29.07	21.29	5.31

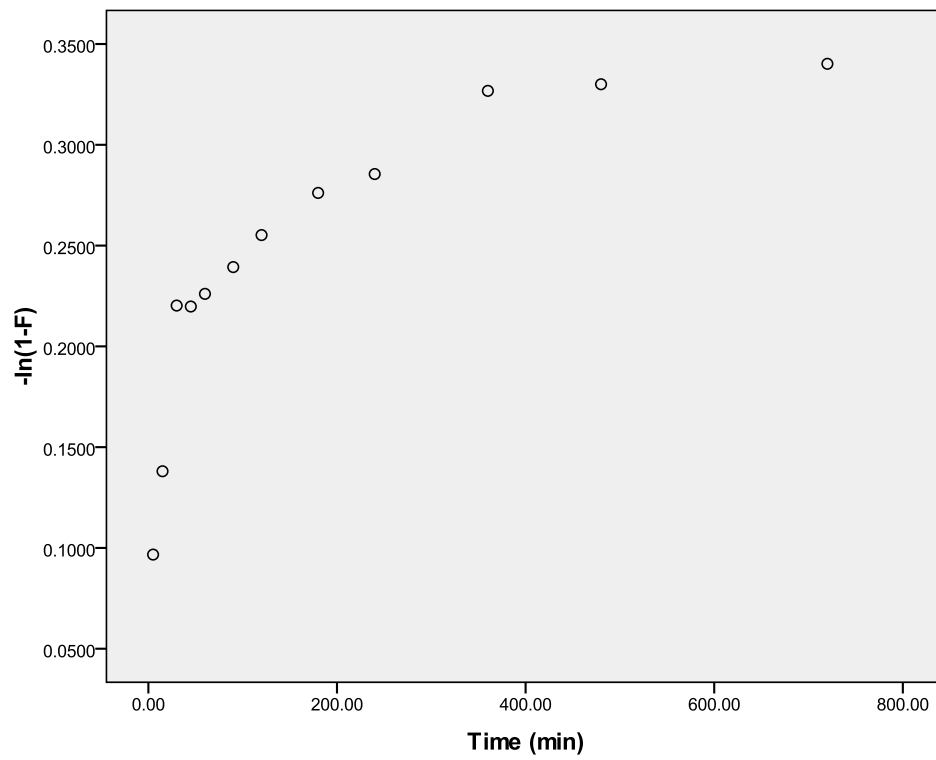
120	17.67	23.22	22.00	18.13	24.14	29.99	22.53	4.52
180	15.68	24.34	23.11	21.47	26.90	33.27	24.13	5.84
240	16.45	24.47	22.89	22.78	26.69	35.73	24.84	6.33
360	19.16	31.18	24.87	28.55	27.68	35.81	27.87	5.65
480	17.70	28.32	26.49	26.96	30.37	38.82	28.11	6.81
720	18.57	29.36	27.06	27.84	31.59	38.60	28.84	6.52



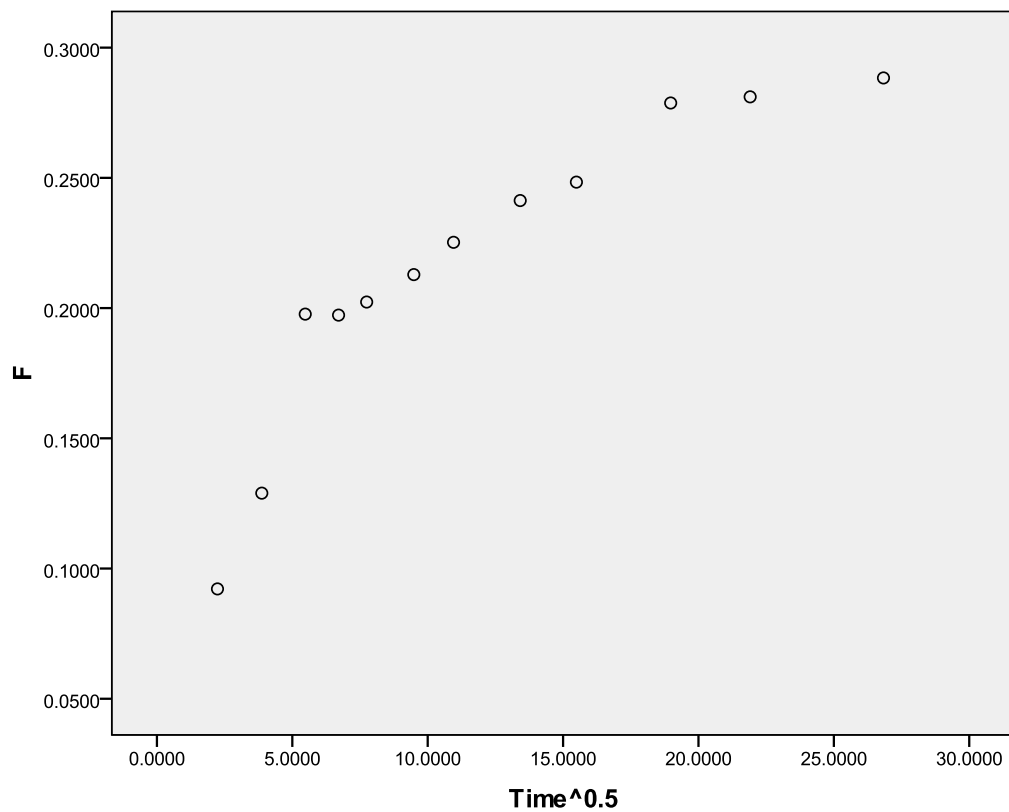
รูปที่ 29 ปริมาณสารฟีนอลิกที่ปลดปล่อยสะสมจากโครงสร้างความพรุนสูง เมื่อใช้ 1:1 methanol : phosphate buffer pH 7.4 (n=6)



รูปที่ 30 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ zero order



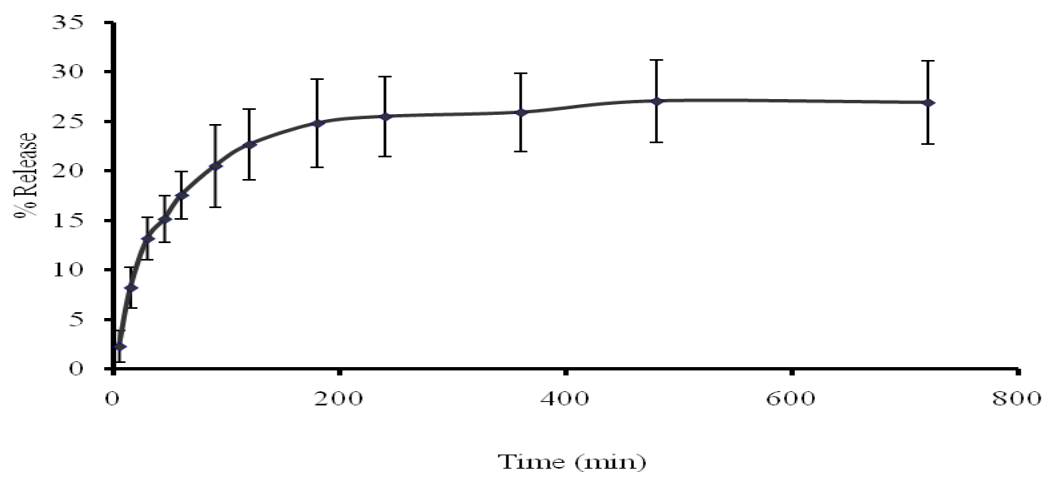
รูปที่ 31 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ first order



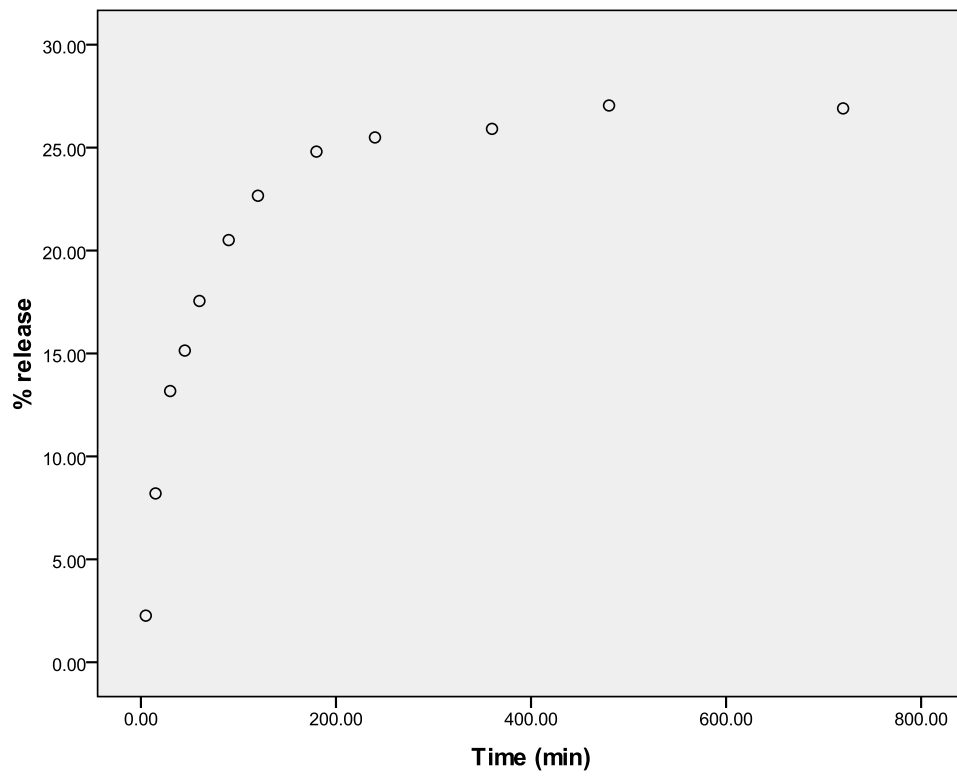
รูปที่ 32 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ Higuchi's model

ตารางที่ 11 ค่าสัมประสิทธิ์ของการกำหนด (r^2) ของสารฟิโนลิกที่ปลดปล่อยจากโครงสร้างความพรุนสูง เมื่อใช้ methanol : phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 50:50 เป็นตัวกลาง

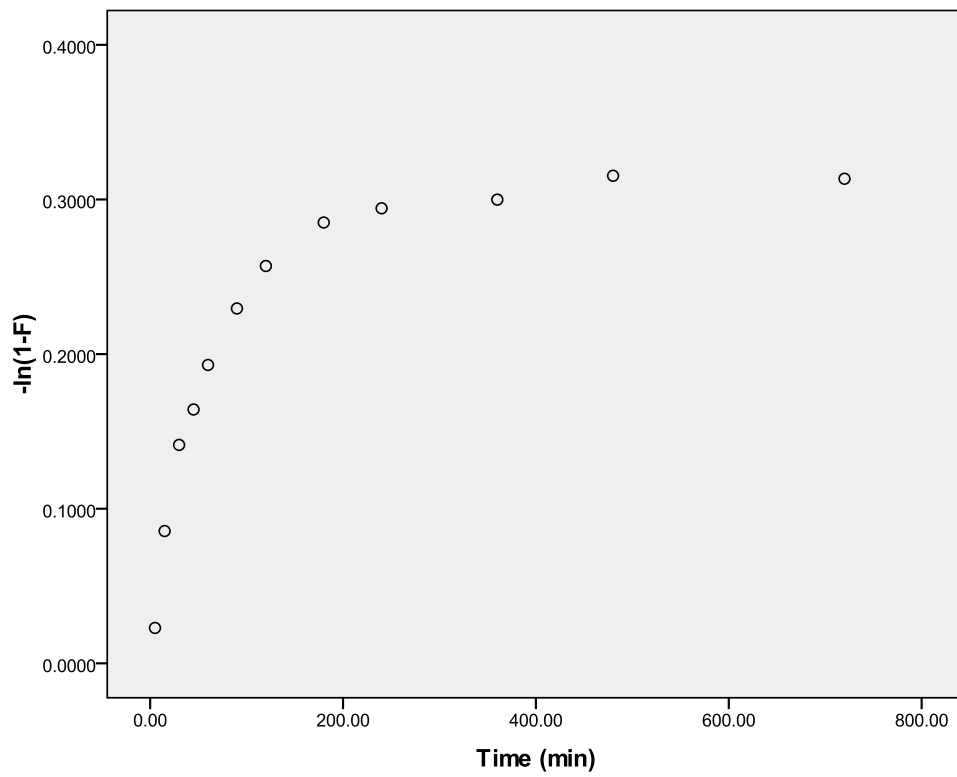
ลักษณะ sponge	r^2		
	Zero order	First order	Higuchi's model
CAML W	0.6726	0.6051	0.8243



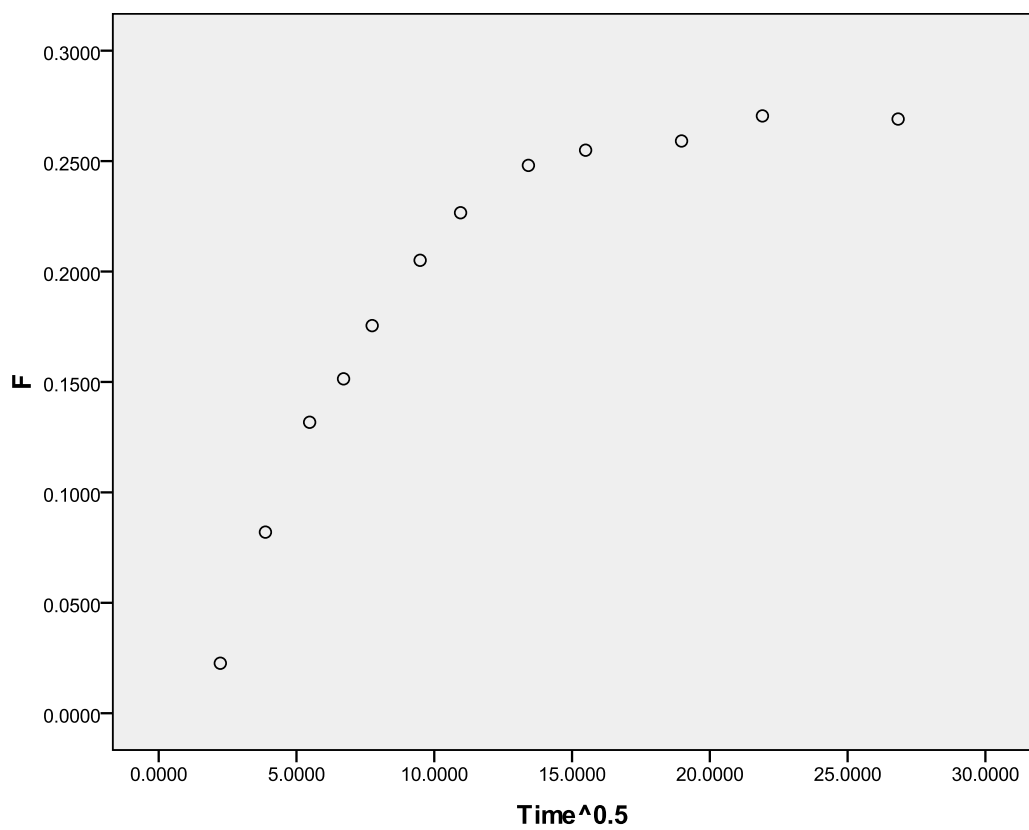
รูปที่ 33 ปริมาณสารฟีนอลิกที่ปลดปล่อยสะสมจากโครงสร้างความพรุนสูง เมื่อใช้ phosphate buffer pH7.4 เป็นตัวกลาง (n=6)



รูปที่ 34 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ zero order



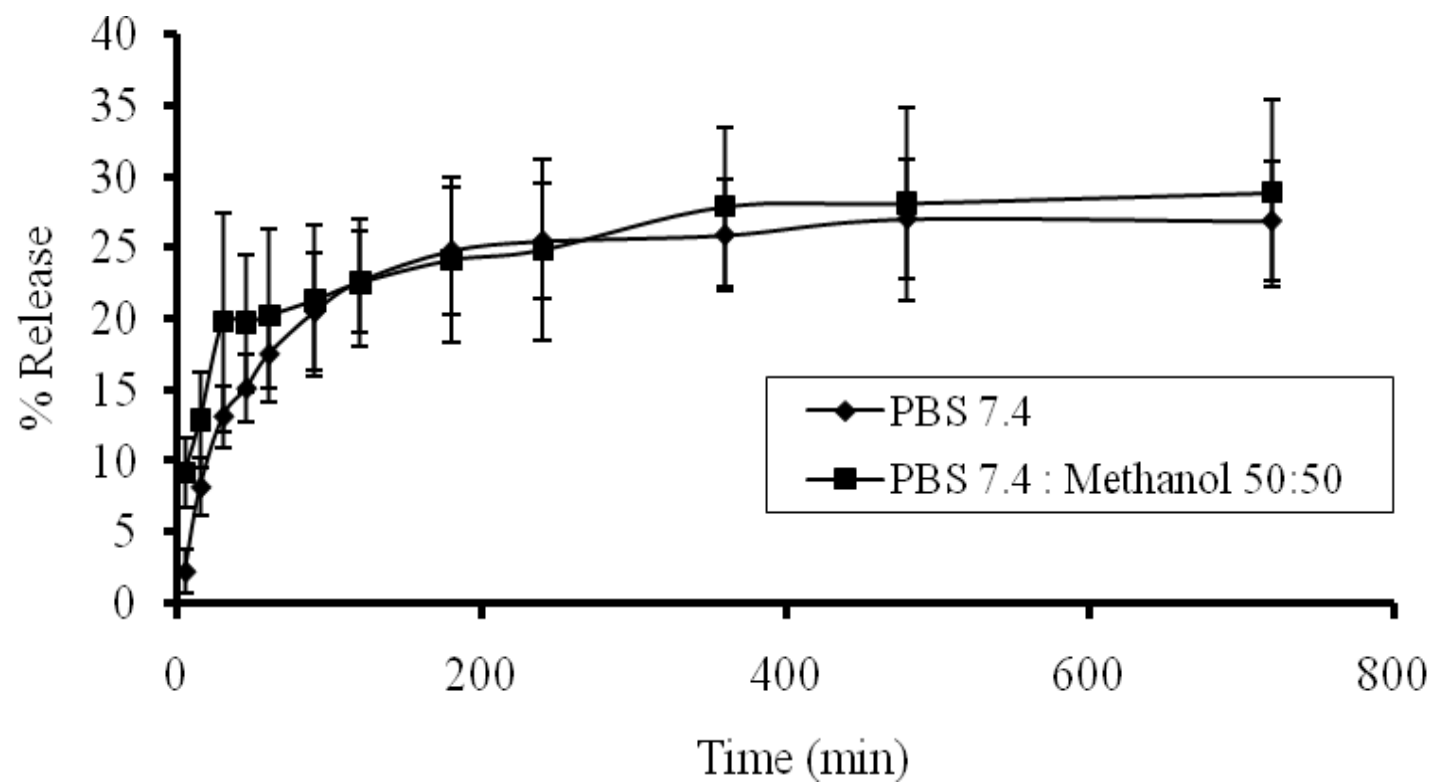
รูปที่ 35 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ first order



รูปที่ 36 การปลดปล่อยสารเมื่อพลอตความสัมพันธ์ในรูปแบบ Higuchi's model

ตารางที่ 13 ค่าสัมประสิทธิ์ของการกำหนด (r^2) ของสารฟิโนลิกที่ปลดปล่อยจากโครงสร้างความพรุนสูง เมื่อใช้ phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลาง

ลักษณะ sponge	r^2		
	Zero order	First order	Higuchi's model
CAML W	0.8647	0.5306	0.9685



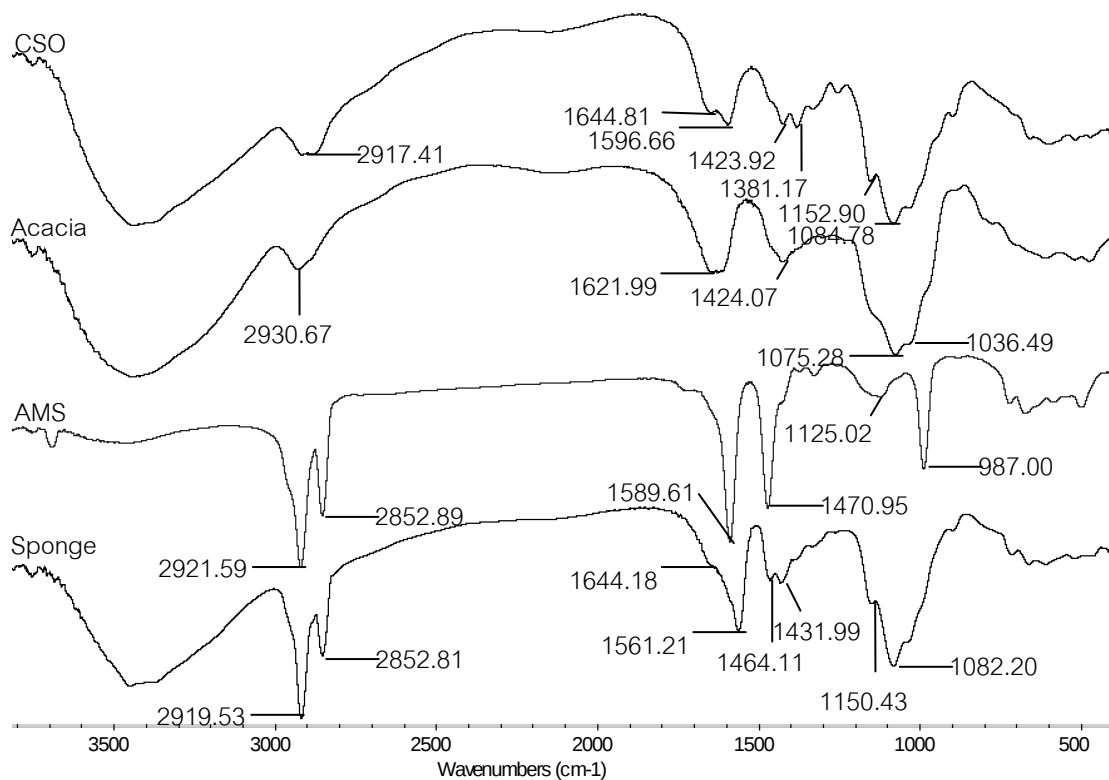
รูปที่ 37 เปรียบเทียบการปลดปล่อยสารสกัดจากเมล็ดลำพูใน phosphate buffer pH 7.4 และ phosphate buffer pH 7.4 : methanol 50 :50

จากการทดสอบการปลดปล่อยพบว่า เมื่อใช้ 1:1 methanol : phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลางนั้น sponge สามารถปลดปล่อยสารสกัดจากเมล็ดลำพูได้ ร้อยละ 28.83 โดยใช้เวลาในการปลดปล่อยสาร 400 นาที และเมื่อใช้ phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลาง sponge สามารถปลดปล่อยสารสกัดจากเมล็ดลำพูได้ ร้อยละ 26.9 ใช้เวลาในการปลดปล่อยสาร 200 นาที และพบว่าจากรูปแบบการปลดปล่อยสารที่ได้ สารมีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และช้าลงในช่วงหลัง อันเนื่องมาจากโครงสร้าง sponge ที่มีความพรุนสูงมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้สารสัมผัสกับตัวทำละลายได้มากจึงทำให้สารละลายและถูกปลดปล่อยได้อย่างรวดเร็ว โดยมีรูปแบบการปลดปล่อยสารแบบ Higuchi model มีค่า r^2 คือ 0.8125 เมื่อใช้ 1:1 methanol : phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลางและ r^2 คือ 0.7490 เมื่อใช้ phosphate buffer pH 7.4 เป็นตัวกลาง โดยเป็นการแพร่ผ่านของสารสกัดจากโครงสร้างออกมา

ผลการประเมินคุณสมบัติของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย FT-IR spectroscopy

FT-IR spectra (รูปที่ 38) ของ chitosan oligomer ปรากฏ peak ของ amide I ($\text{C}=\text{O}$ stretching) และ amide II (N-H angular deformation) ที่ตำแหน่ง 1644 cm^{-1} และ 1596 cm^{-1} ตามลำดับ ปรากฏ peak ของ C-N axial deformation ของหมู่ amino ที่ตำแหน่ง 1424 cm^{-1} และ 1381 cm^{-1} และพบ peak ที่เป็นเอกลักษณ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ C-O-C symmetric stretching และ C-O stretching vibration ที่ตำแหน่ง 1152 cm^{-1} และ 1084 cm^{-1} ตามลำดับ FT-IR spectra ของ acacia ปรากฏ peak ของ asymmetric และ symmetric stretching vibration ของ carboxylic acid salt ($-\text{COO}^-$) ที่ตำแหน่ง 1621 cm^{-1} และ 1424 cm^{-1} ตามลำดับ และ peak ของ C-O stretching ที่ 1075 cm^{-1} และ 1036 cm^{-1} (Espinosa-Andrews, *et.al.*, 2010) FT-IR spectra ของ aluminum monostearate (AMS) ปรากฏ peak ของ $-\text{CH}_2$ vibration ที่ตำแหน่ง 2921 cm^{-1} และ 2852 cm^{-1} และ peak ของ metal carboxylate stretching vibration ที่ตำแหน่ง 1589 cm^{-1} และ 1470 cm^{-1} (Phaechemud, *et.al.*, 2009)

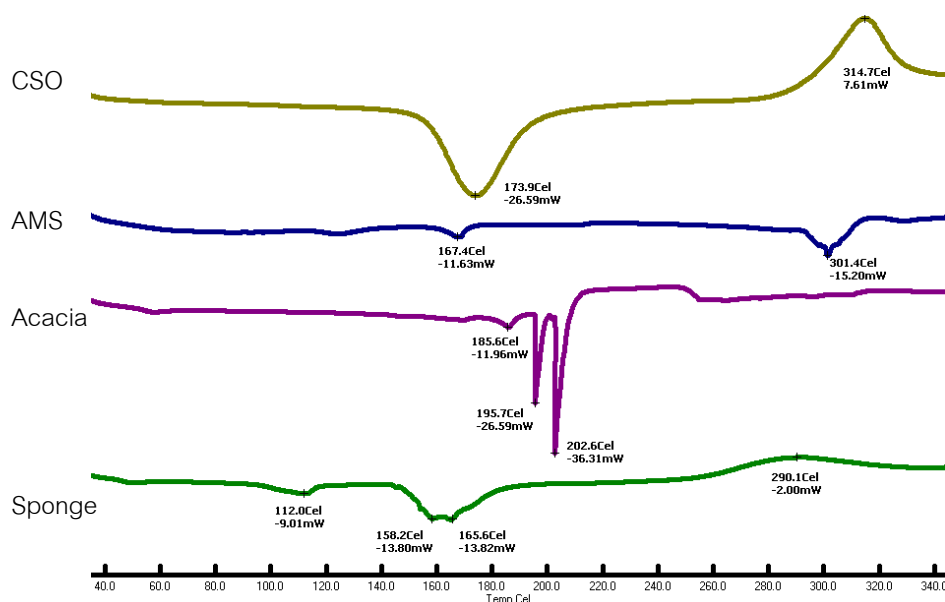
FT-IR spectra ของโครงสร้างความพรุนสูงซึ่งประกอบด้วย chitosan, acacia และ AMS ยังคงปรากฏ peak ที่ชัดเจนของ AMS คือ $-\text{CH}_2$ vibration ที่ตำแหน่ง 2919 cm^{-1} และ 2852 cm^{-1} แต่พบการเปลี่ยนแปลงไปของ peak บริเวณ $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ โดยพบ peak ที่เด่นชัดที่ตำแหน่ง 1561 cm^{-1} ซึ่งคาดว่าเป็น peak ที่แสดงถึงการเลื่อนตำแหน่งไปของ $\text{C}=\text{O}$ stretching ของหมู่ carboxylate salt ของ acacia และ N-H bending ของ chitosan เนื่องจากการจับกันด้วยพันธะ ionic นอกจากนี้เนื่องจาก peak ที่เด่นชัดของ metal carboxylate ของ AMS ซึ่งปกติพบที่ตำแหน่ง 1589 cm^{-1} และ 1470 cm^{-1} ไม่ปรากฏใน spectra ของโครงสร้างความพรุนสูง จึงคาดการณ์ว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ AMS บางส่วนไปเป็น stearic acid ในระหว่างขั้นตอนการเตรียม เนื่องจากเกิดการแตกตัวออกมาของ aluminum ion และ stearate molecule เมื่อสัมผัสกับสารละลายตัวกลางที่เป็นกรดและมีความเป็นไปได้ที่ stearate ที่แตกตัวออกมานั้นไปสร้างพันธะ ionic กับหมู่ amino ของ chitosan ซึ่งทำให้ peak ที่ตำแหน่ง 1561 cm^{-1} ปรากฏอย่างเด่นชัด



รูปที่ 38 FT-IR spectra ของ chitosan oligomer (CSO), acacia, aluminum monostearate (AMS) และโครงสร้าง ความพรุนสูง (sponge)

ผลการประเมินคุณสมบัติเชิงความร้อนของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย DSC

DSC thermogram ของ chitosan ปรากฏ endothermic peak ที่อุณหภูมิประมาณ 174°C คาดว่าน่าจะเป็นจุดหลอมเหลวของสารนี้ และมีพีคการสลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 315°C สำหรับ AMS มีจุดหลอมเหลวที่ 167.4°C และสลายตัวที่ 301.4°C ส่วน acacia มีพีคการเปลี่ยนแปลงปรากฏที่ประมาณ 185-202°C ขณะที่โครงสร้างความพรุนสูงนั้นมีพีคที่น่าจะแสดงการสูญเสียความชื้นที่ประมาณ 112°C และพีคการหลอมเหลวที่กว้างในช่วง 158-165°C และสลายตัวที่ประมาณ 290°C แสดงว่าการเตรียมเป็นโครงสร้างความพรุนสูงนี้ทำให้การสลายตัวด้วยความร้อนเกิดได้ง่ายขึ้นเพราะอุณหภูมิการสลายตัวต่ำลงบ้าง



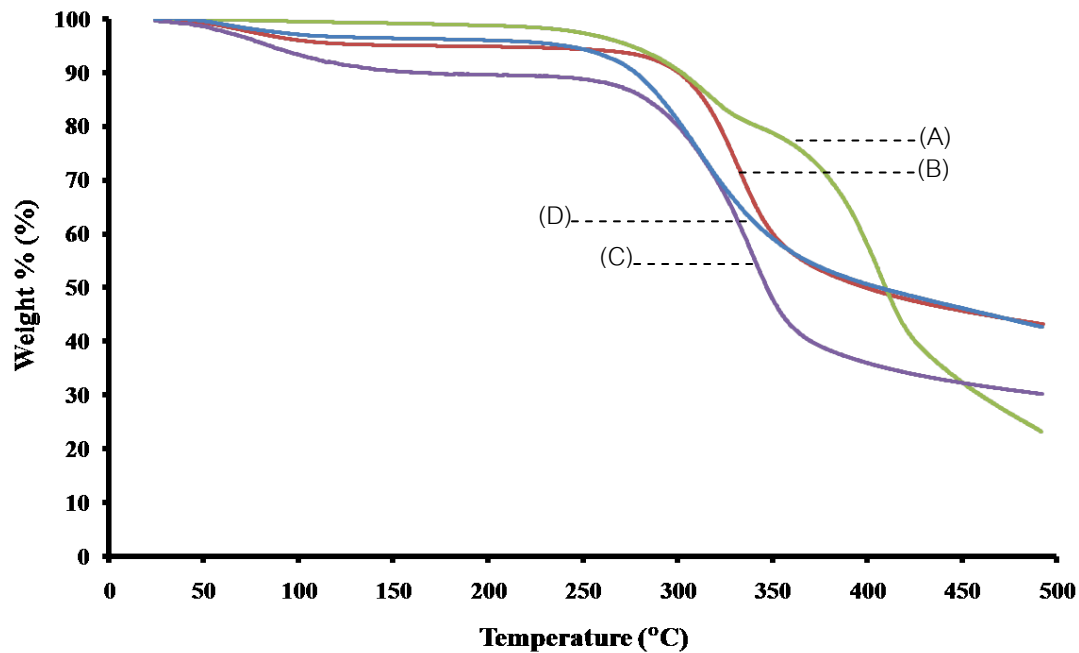
รูปที่ 39 DSC thermogram ของ chitosan oligomer (CSO), acacia, aluminum monostearate (AMS) และ โครงสร้างพรุนสูง (sponge)

ผลการประเมินคุณสมบัติเชิงความร้อนของโครงสร้างพรุนสูงด้วย Thermogravimetry (TG)

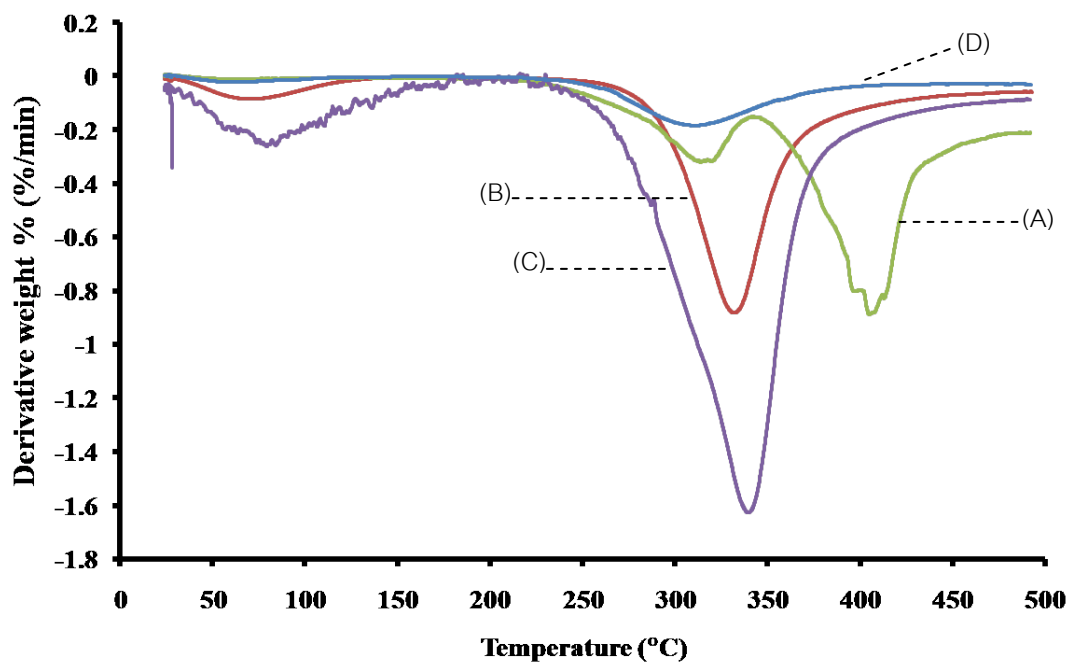
การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเชิงความร้อนโดยวิธี Thermogravimetry ของสารเดี่ยวคือ chitosan oligomer, acacia และ aluminum monostearate และของระบบโครงสร้างพรุนสูงได้ผลดังแสดงในรูปที่ 40 และ 41 และค่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการสลายตัว (Initial temperature (T_{int})), ค่าอุณหภูมิที่มีอัตราการสลายตัวสูงสุด (Temperature of maximum degradation rate (T_m)) และ พลังงานที่ใช้ในการสลายตัว (Activation energy (E_a)) ดังตารางที่ 14

จากผลการทดลองพบการเปลี่ยนแปลง 2 ช่วงของทั้งสารเดี่ยวและระบบโครงสร้างพรุนสูง ยกเว้น Alst พบการเปลี่ยนแปลง 3 ช่วง โดยการเปลี่ยนแปลงช่วงแรกของสารเดี่ยวและ โครงสร้างพรุนสูงเกิดใน อุณหภูมิช่วง 25-120 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นช่วงที่มีการระเหยไของ ความชื้นที่มีอยู่ในระบบ การเปลี่ยนแปลง ในช่วงที่สองของ chitosan เกิดที่ T_m เท่ากับ 331.25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการแตกออกของหมู่ acetyl ที่เหลืออยู่ (deacetylation) และการแตกออกของพันธะ β -1,4-linkage ของสาย chitosan (depolymerization) โดยมีน้ำหนัก เหลืออยู่ประมาณ 43% โดยน้ำหนัก และใช้พลังงานในการเปลี่ยนแปลง (activation energy: E_a) เท่ากับ 104.78 kJ/mol.K การเปลี่ยนแปลงช่วงที่สองของ acacia เกิดที่ T_m เท่ากับ 340.9 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการเผา ไหม้ มีน้ำหนักเหลืออยู่ประมาณ 30% โดยน้ำหนัก ใช้พลังงานเท่ากับ 214.43 kJ/mol.K ส่วนการเปลี่ยนแปลงช่วง ที่สองของ aluminum monostearate พบที่อุณหภูมิ T_m เท่ากับ 314 องศาเซลเซียส ซึ่งเกิดจากการแตกออกของ พันธะระหว่าง aluminum และ stearate molecule มีน้ำหนักเหลือประมาณ 81 % โดยน้ำหนัก ใช้พลังงาน 96.79 kJ/mol.K และในช่วงที่สามเกิดที่ T_m เท่ากับ 407.143 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เกิดการแตกออกของสายโซ่ของ stearate มีน้ำหนักเหลือประมาณ 23% โดยน้ำหนัก ใช้พลังงานเท่ากับ 122.17 kJ/mol.K การเปลี่ยนแปลงในช่วงที่ สองของโครงสร้างพรุนสูงเกิดที่ T_m เท่ากับ 310.937 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักเหลืออยู่ประมาณ 42% โดย น้ำหนัก ใช้พลังงาน 100.28 kJ/mol.K ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการสลายตัวช่วงที่สองของสารเดี่ยว และใช้ พลังงานในการสลายตัวต่ำกว่า หมายความว่าหลังจากขึ้นรูปเป็นโครงสร้างพรุนสูงแล้วมีความทนต่ออุณหภูมิ

ต่ำกว่าสารเดี่ยว อาจเนื่องมาจากหลังจากการขึ้นรูปเป็นโครงสร้างความพรุนสูงทำให้โครงสร้างผลึกของสารเสียไปจึงมีความทนต่อความร้อนน้อยกว่าสารเดี่ยวที่ยังคงมีความเป็นผลึกอยู่



รูปที่ 40 TG curves ของ aluminum monostearate (A), chitosan oligomer (B), acacia (C) และ โครงสร้าง ความพรุนสูง (D)



รูปที่ 41 DTG curves ของ aluminum monostearate (A), chitosan oligomer (B), acacia (C) และ โครงสร้าง ความพรุนสูง (D)

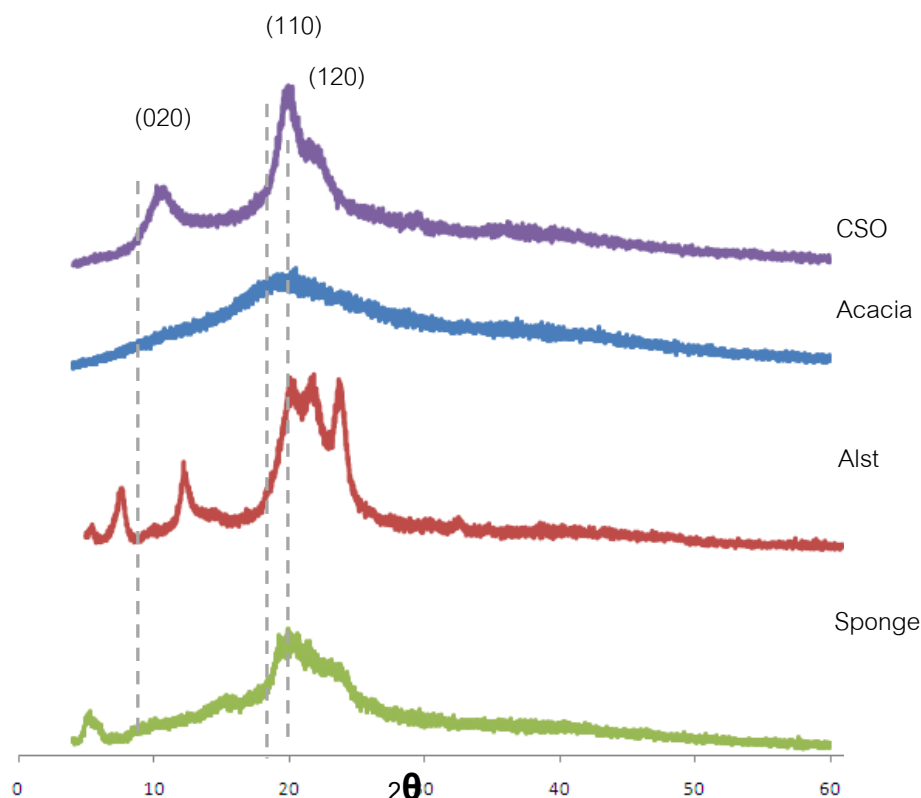
ตารางที่ 14 ค่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการสลายตัว (Initial temperature (T_{int})), ค่าอุณหภูมิที่มีอัตราการสลายตัวสูงสุด (Temperature of maximum degradation rate (T_m)) และ พลังงานที่ใช้ในการสลายตัว (Activation energy (E_a)) ของสารเดี่ยวและโครงสร้างความพรุนสูง

Sample	Stage of event	T_{int}	T_m	Weight (%)	E_a (kJ/mol K)
chitosan	1	25	71.875	95.255	-
	2	250	331.250	43.112	104.78
acacia	1	25	78.125	89.851	-
	2	242.187	340.900	30.120	214.43
aluminum monostearate	1	27.87	58.37	99.122	-
	2	240	314.286	81.37	96.79
	3	346.667	407.143	23.135	122.17
sponge	1	40	62.500	96.559	-
	2	209.375	310.937	42.565	100.28

หมายเหตุ- ข้อมูลได้จากอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 10°C/min และ E_a ของการสลายตัวของสารคำนวณจาก Kissinger method โดยใช้อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่ 5, 10, 15 และ 20 °C/min

ผลการประเมินคุณสมบัติเชิงผลึกของโครงสร้างความพรุนสูงด้วย X-Ray Powder Diffraction (XRPD)

Diffractogram ของสารเดี่ยวและโครงสร้างความพรุนสูงแสดงดังรูปที่ 42 โดยปกติรูปแบบ diffractogram ของ chitosan จะพบ 5 peak ที่เด่นชัดในช่วง 5-40 องศา 2θ โดยแสดงชนิดของผลึกได้เป็นระนาบ 020, 110, 120, 101 และ 130 ตามลำดับ ซึ่งระนาบที่มีความเข้มสูงที่สุดคือระนาบ 020 และ 110 โดยพบว่าหาก degree of deacetylation สูงขึ้น ความเข้มของระนาบ 020 และ 110 จะลดต่ำลงและเลื่อนตำแหน่งไปทางค่ามุมที่สูงขึ้น (Zhang, *et.al.*, 2005) ในการทดลองนี้พบว่ารูปแบบ Diffractogram ของ chitosan ปรากฏ peak ที่เด่นคือระนาบ 020 ($2\theta=10.53$), 110 ($2\theta=19$) และ 120 ($2\theta=22.205$) ดังแสดงในรูป ส่วน Diffractogram ของ acacia พบว่าเป็นรูปแบบอสัณฐาน (amorphous) ปรากฏเป็น peak ฐานกว้างซึ่งมีจุดสูงสุดอยู่ที่ตำแหน่ง $2\theta=18.93$ สำหรับ Diffractogram ของ aluminum monostearate พบ peak ปรากฏในช่วง 5-40 องศา 2θ พบจำนวน 4 peak คือที่ 2θ เท่ากับ 6.677, 11.28, 19.453 และ 22.809 หลังจากขึ้นรูปเป็นโครงสร้างความพรุนสูง พบว่า Diffractogram ของระบบมีลักษณะแสดงถึงความเป็นผลึกน้อยกว่า chitosan และ aluminum monostearate เดี่ยวๆ แต่มีลักษณะเป็นผลึกมากกว่า acacia เดี่ยวๆ โดยพบ peak ต่างๆ บริเวณ 5-30 องศา 2θ โดยตำแหน่งสูงสุดพบใกล้เคียงกับ peak ของ chitosan คือบริเวณ $2\theta=19.47$ และ 21.4 ซึ่งแสดงว่าหลังผสมกันแล้วสารค่อนข้างเป็นเนื้อเดียวกันดี ทำให้รูปแบบผลึกลดน้อยลง จากการวิเคราะห์รูปแบบ diffractogram แสดงให้เห็นว่า การขึ้นรูปเป็นโครงสร้างความพรุนสูงทำให้ความเป็นผลึกของสารเสียไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดย TGA ที่พบว่าระบบโครงสร้างความพรุนสูงมีความทนต่อการสลายตัวด้วยความร้อนได้ต่ำกว่าสารเดี่ยว

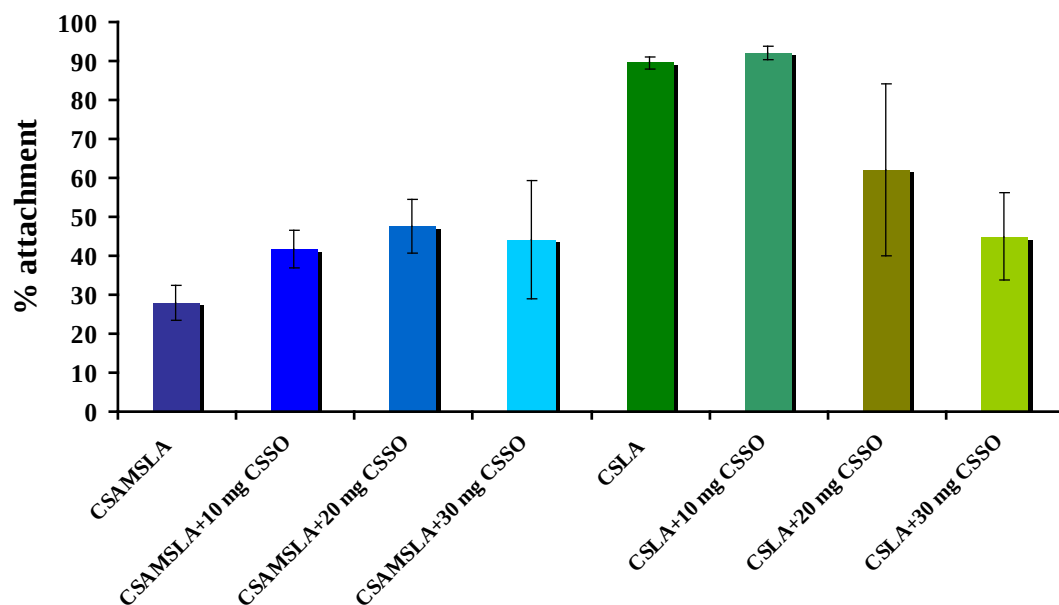


รูปที่ 42 Diffractogram ของ chitosan oligomer (CSO), acacia, aluminum monostearate (AMS) และโครงสร้าง ความพรุนสูง (sponge)

ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ HepG2บนโครงสร้างไคโตซานความพรุนสูง

สำหรับตำรับที่ไม่มีสารสกัดจากเมล็ดลำพู เซลล์ HepG2 สามารถยึดเกาะบน chitosan sponge ตำรับ CSLA ได้ดีมากประมาณ 90% ดังแสดงในรูปที่ 43 เนื่องจากโมเลกุลของ chitosan มีหมู่ $-NH_2$ ซึ่งให้ประจุบวก ทำให้มีความชอบต่อผิวเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็น polysaccharides ซึ่งมีประจุเป็นลบ ในทางกลับกัน ปริมาณเซลล์ HepG2 ที่ยึดเกาะบน chitosan sponge ตำรับ CSAMSLA มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนที่ยึดเกาะบนสูตรตำรับ CSLA โดยมีการยึดเกาะได้น้อยกว่า 30% อาจเป็นเพราะ stearic acid (จาก aluminum monostearate) ซึ่งมีประจุลบที่แทรกตัวและเกิดพันธะอยู่กับหมู่ $-NH_2$ ของโครงสร้าง chitosan ทำให้บดบังหมู่ $-NH_2$ ที่มีประจุบวกที่สามารถเกาะกับผิวเซลล์ที่มีประจุลบได้

ผลของปริมาณสารสกัดจากเมล็ดลำพูที่มีต่อการยึดเกาะของเซลล์ HepG2 พบว่า ในตำรับ CSAMSLA การยึดเกาะของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น แต่สำหรับตำรับ CSLA พบว่าปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะมีแนวโน้มลดลงค่อนข้างมากเมื่อปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ลดลง อาจเกิดจากปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้น หรือสาเหตุอื่นอาจเกิดจากการที่โครงสร้างของ sponge เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากเมทานอลที่ใช้ในขั้นตอนการใส่สารสกัดลงใน sponge เป็นสาเหตุที่ทำให้ chitosan sponge เกิดการหดตัว โดยพบว่าตำรับ CSLA เกิดการหดตัวลงอย่างมาก ในขณะที่การหดตัวของตำรับ CSAMSLA เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากไขมันที่มีอยู่ในโครงสร้างช่วยให้ sponge มีโครงสร้างที่แน่นและแข็งแรงมากขึ้น จึงมีการหดตัวลงน้อยกว่า การที่ sponge หดตัวลงอาจทำให้ปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะได้มีปริมาณลดลงได้ ทั้งนี้ตำรับที่มีสารสกัดปริมาณสูงจะมีการเติมเมทานอลในปริมาณที่มากกว่าด้วยเช่นกัน (สารละลายสารสกัดเข้มข้น 5 mg/mL)



รูปที่ 43 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของเซลล์ HepG2 บน chitosan sponge ดำรับต่างๆ

ตารางที่ 15 จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน chitosan sponge ดำรับต่างๆ

Formula	No. of attached cells ($\times 10^4$)/well					% attachment
	1	2	3	Avg	SD	
CSAMSLA	23.50	28.00	32.50	28.00	4.50	28.00
CSAMSLA+10 mg CSSO	36.25	45.25	43.75	41.75	4.82	41.75
CSAMSLA+20 mg CSSO	55.00	46.75	41.00	47.58	7.04	47.58
CSAMSLA+30 mg CSSO	61.75	34.00	37.00	44.25	15.23	44.25
CSLA	70.03	71.98	73.10	71.70	1.56	89.63
CSLA+10 mg CSSO	71.68	75.15	74.25	73.69	1.80	92.11
CSLA+20 mg CSSO	45.35	73.63	29.90	49.63	22.17	62.03
CSLA+30 mg CSSO	46.85	36.65	24.50	36.00	11.19	45.00

ตารางที่ 16 จำนวนเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะบน chitosan sponge ดำรับต่างๆ

Formula	No. of unattached cells ($\times 10^4$)/well				
	1	2	3	Avg	SD
CSAMSLA	76.50	72.00	67.50	72.00	4.50
CSAMSLA+10 mg CSSO	63.75	54.75	56.25	58.25	4.82
CSAMSLA+20 mg CSSO	45.00	53.25	59.00	52.42	7.04
CSAMSLA+30 mg CSSO	38.25	66.00	63.00	55.75	15.23
CSLA	9.98	8.03	6.90	8.30	1.56
CSLA+10 mg CSSO	8.33	4.85	5.75	6.31	1.80
CSLA+20 mg CSSO	34.65	6.38	50.10	30.38	22.17
CSLA+30 mg CSSO	33.15	43.35	55.50	44.00	11.19

หมายเหตุ: ชุด CSAMSLA: No. of seeded cell = 1×10^6 cells/well

ชุด CSLA: No. of seeded cell = 0.8×10^6 cells/well

บรรณานุกรม

- Ban JY, Nguyen HT, Lee HJ. Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae radix* on amyloid beta protein (25--35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(1):149-53.
- Barel AO, Marc P, Maibach HI. *Handbook of cosmetic science and technology*. NY: Marcel Dekker; 2001.
- Birošova L, Mikulšova M, Vavrkovb S. Antimutagenic effect of phenolic acid. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(2):489–91.
- Burton GW, Page YL, Gabe EJ, Ingold KU. Antioxidant activity of vitamin E and related phenols. Importance of stereoelectronic factors. *J Am Chem Soc.* 1980;102:7791-2
- Chen HH. Rheological properties of HPMC enhanced Surimi analyzed by small- and large-strain tests: I. The effect of concentration and temperature on HPMC flow properties. *Food Hydrocolloid.* 2007;21:1201–8.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89:271-7.
- Desai PR, Jain NJ, Sharma RK, Bahadur P: Effects of additives on micellization of PEO/PPO/PEO block copolymer F127 in aqueous solution. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2001;178:57-69.
- Disc Diffusion Susceptibility Methods [online]. 2005 [cited 2008 Sep 1]; Available from: URL:<http://itech.pjc.edu/fduncan/mcb1000/discdiff.pdf>
- Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A Review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709-28
- Duros LM, Floch GL, Magne C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:45–9.
- Eve RG, Leroux JC. *In situ* forming hydrogels review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:409-26.
- Hansen CM, Just L. Prediction of environmental stress cracking in plastics with Hansen solubility parameters. *Ind Eng Chem Res.* 2001;40:21–5.
- Hino T, Ford JL. Effect of nicotinamide on the properties of aqueous HPMC solutions. *Int J Pharm.* 2001;226:53–60.
- Hiromasa T, Takuya K, Terumi T, Yukari O, Naoto I, Toshihiko U, Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food Chem.* 2008;109(1):64-71.
- Ivanova R, Alexandridis P, Lindman B. Interaction of poloxamers block copolymers with cosolvents and surfactants. *Colloid Surface. A.* 2001;183-185:41-53.
- Jeog B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:37-51.
- Karmarkar AB. Poloxamers and their applications [online]. 2005 [cited 2008 Aug 4]. Available from: URL:<http://www.pharmainfo.net/pharma-student> magazine/poloxamers-and-their-applications
- Kim DO, Lee CY. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Food Science Nutrition;* 2004(44):253-73 .
- Koizumi A, Fujii M, Kondoh M, Watanabe Y. Effect of *N*-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of estradiol. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;57:473-8.

- Krogh R, Yunes RA, Andricopulo AD. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. *Il Farmaco*. 2000;55:730-5.
- Liu Y, Zhu YY, Wei G, Lu WY. Effect of carrageenan on poloxamer-based *in situ* gel for vaginal use: Improved *in vitro* and *in vivo* sustained-release properties. *Eur J Pharm Sci*. 2009;37:306-12.
- Martin A. Rheology. In: *Physical pharmacy* 4th edn, Philadelphia: LEA & FEBIGER. 1993. pp. 453-73.
- MicroMath. *Scientist Handbook Rev. 7EEF*. Salt Lake City. MicroMath, 1995. p. 467.
- O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Obenchain JR, Gallipeau JAR, D'Arecca MA, eds. Gallic acid. In: *The Merck index* 13th edn. New Jersey: Merck research laboratories; 2001. p. 261.
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W. and Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27-46.
- Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv*. 1985;60:110-1.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*. 1999;26:1231-7.
- Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Rel*. 1987;5:37-42.
- Riviere JE. *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*. NY: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006.
- Rodriguez VMJ, Alberto MR, de Nadra MMC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 2007;18:93-101.
- Ruel-Gariepy E, Leroux J-C. *In situ*-forming hydrogels- review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:409-26.
- Sadaba LM, Fernandez-Robredo P, Rodriguez JA, Layana AG. Antioxidant effects of vitamins C and E, multivitamin-mineral complex and flavonoids in a model of retinal oxidative stress: The Apoe-deficient mouse. *Exp Eye Res*. 2008;86(3):470-9.
- Sanghvi R, Narazaki R, Machatha SG, Yalkowsky SH. 2008. Solubility improvement of drugs using *N*-methyl pyrrolidone. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(2):366-76.
- Sang-Hyun K, Chang-Duk J, Kyongho S, Byung-Ju C, Hyunjeung L. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*. 2006;91(1):123-31.
- Sanja, Jain BD, Padsalg A, Patel K, Mokale V. Formulation development and evaluation of Fluconazole gel in various polymer bases. *Asian J Pharm*. 2007;1(1):63-8
- Scherlund M, Malmsten M, Holmqvist P. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. *Int J Pharm*. 2000;194:103-6.
- Schmolka IR. Artificial skin I. preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res*. 1972;6(6):571 - 582.
- Shahzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nu Tr*. 2001;131:1207-10.
- Sharma PK, Bhatia SR. Effect of anti-inflammatories on pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *Int J Pharm*. 2004;278:361-77.
- Tipton DA, Flynn JC, Stein SH, Dabbous M. Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1 β -stimulated prostaglandin E₂ and IL-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2003;74:1754-1763
- Wanka G, Hoffmann H, Ulbricht W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromol*. 1994;27:4115-59.

Yang Y, Wang JC, Zhang X, Lu WL, Zhang Q. A novel mixed micelle gel with thermo-sensitive property for the local delivery of docetaxel. *J Control Rel.* 2009;135:175–82.

You JK. Antimelanogenic and Antioxidant properties of gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(6):1052-5.

Zhongbing L, Guangjun N, Belton PS, Tang H, Zhao B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem Inter.* 2006;48:263-74.

ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์. ความแก่ กลไกและปัจจัยที่มีอิทธิพล. ใน: พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์, เอื้อมพร ศรีกฤษณพล, ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์, ดวงดาว จันทศาสตร์, บรรณาธิการ. เทคโนโลยีการพัฒนารับเครื่องสำอางและการผลิตขั้นอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2540. หน้า 10-42.

sponge

Choi YS, Hong SR, Lee YM, et al. Study on gelatin containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 1999;20:409-17.

Park YJ, Lee YM, Lee JY, et al. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Rel.* 2000;67: 385-94.

Lai HL, Abu'Khalil A, Craig DQM. The preparation and characterization of drug-loaded alfinite and chitosan sponges. *Int J Pharm.* 2003;251:175-81.

Oungbho K, Muller BW. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. *Int J Pharm.* 1997;156: 229-37.

Leffler CC, Muller BW. Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges. *Int J Pharm.* 2000;194: 229-37.

Dorr RT, Surwit EA, Droegemueller W. et al. In vitro retinoid binding and release from a collagen sponge material in a simulated intravaginal environment. *J. Biomed. Mater. Res.* 1982 ;16(6): 839-50.

Kato N, Gehrke SH. Microporous, fast response cellulose ether hydrogel prepared by freeze-drying. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004;38:191-6.

Tas C, Kozluca A, Omer MA. et al. In vivo degradation and release kinetics of chloramphenicol-loaded poly (D,L)-lactide sponges. *Tissue Eng.* 1998;4(4):353-63.

Knapczk J. et al. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical application. In G. Skjak-brack, T. Anthonsen and P. Sandford (eds). *Chitin and chitosan. Proceedings from the 4th international conference on chitin and chitosan.* New York: Elsevier Applied Science, 1988, pp. 658-662

Isurata T, Hayash T, Tshihara K. *Biomedical application of polymeric materials.* BocaRaton-London, CRC Press, 1993.

Duggin, G., Chitosan make the grade. *Manu Chem.* 1989;60 (10), 31, 33, 35.

Nigalaye AG, Adusumilli P, Bolton S. Investigation of prolonged drug release from matrix formulations of chitosan. *Drug Dev Ind Pharm.* 1990;16(3), 449-67.

Lee SB. et al. Preparation and properties of polyelectrolyte complex sponges composed of hyaluronic acid and chitosan and their biological behaviors. *J Appl Polym Sci.* 2003;90:925-32.

Torrado S, Prada R, Paloma M., Torrado S. Chitosan-poly(acrylic) acid polyion complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *Biomaterials* 2003;25:917-23.

- Torre P, et al. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid). Study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure. *Biomaterials* 2003;24:1499-1506.
- Nge TT, et al. Synthesis and characterization of chitosan/poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex. *J. Appl Polym Sci* 2002;83:1025-35.
- Kim HJ, et al. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999;10(5):543-556.
- Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 1999;62(3):239-43.
- Cuero RG. Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS.* 1999;87:315-33.
- Helander IM, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2001;71(2-3):235-44.
- Tsai GJ, Wu ZY, Su WH. Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J Food Prot.* 2000;63(6):747-52.
- Ouattar B, et al. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int J Food Microbiol.* 2000;62(1-2):139-48.
- Hi O, Kim YJ, Chang EJ, Kim JY. Antimicrobial characteristics of chitosan against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(11):2378-83.
- Ikinci G et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm.* 2002;235:121-7.
- Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin- the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 2003;43(1):61-87.
- Knapczk J, Macura AB, Pawlik B. Simple tests demonstrating the antimycotic effect of chitosan. *Int J Pharm.* 1992;80:33-8.
- Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and healing applications of chitosan. *Adv Drug Del Rev.* 2001; 52:105-15.
- Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J Appl Polym Sci.* 1993;28:1909-17
- Gopinath D, Ahmed MR, Gomathi K, et al. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials* 2004;25:1911-17.
- Zhao H-R, Wang K, Zhao Y, Pan L-Q. Novel sustained-release implant of herb extract using chitosan. *Biomaterials* 2002;23: 4459-62.

Acacia

- Carbohydrate technology [Online]. n.d. [cited 2011 Apr 25]; Available from: URL: http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap4/chapter4_5.html
- Yahya MZA, Arof AK. Effect of oleic acid plasticizer on chitosan–lithium acetate solid polymer electrolytes. *Eur Polym J* 2003;39:897–902.

วารินทร์ พิศโหมก.โครงการการจัดการทรัพยากรชายฝั่งและพื้นที่ลุ่มภาคใต้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เฟื่องฟ้าพรินต์; 2541.

Perry LM. Medicinal plants of east and southeast asia. MA (USA):The MIT Press;1980.

Sadhu SK, Ahmed F, Ohtsuki T, Ishibashi M. Flavonoids from *Sonneratia caseolaris*. J Nat Med 2006;60:264–5.

Ghani A. Medicinal plants of Bangladesh with chemical constituents and uses. 2nd ed. Dhaka (Bangladesh): Asiatic Society of Bangladesh 2003

รัชชัย แพชมัด และคณะ. รายงานการวิจัยเรื่องพิษของเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยบางชนิดและการเตรียมในรูปแบบเจลและครีม. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2549.

Espinosa-Andrews H, Sandoval-Castilla O, Vázquez-Torres H, Vernon-Carter EJ, Lobato-Calleros C. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. Carbohydr Polym 2010;79:541–546

Phaechamud T, Charoenteeraboon J, Mahadlek J. Characterization and in-vitro drug release of a chitosan-magnesium stearate monolithic matrix system. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 2009;4(5):265-76.

Zhang Y, Xue C, Xue Y, Gao R, Zhang X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. Carbohydr Res. 2005;340:1914–1917

ภาคผนวก

ตารางที่ 28 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	11.00	13.00	12.00	12.00	1.00
Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	11.00	11.00	12.00	11.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	12.00	13.00	12.00	12.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	14.00	15.00	13.00	14.00	1.00

ตารางที่ 29 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	11.00	12.00	12.00	11.67	0.58

Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	11.00	12.00	12.00	11.67	0.58
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	11.00	12.00	12.00	11.67	0.58
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	15.00	15.00	15.00	15.00	0.00

ตารางที่ 30 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	26.00	27.00	27.00	26.67	0.58
Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	26.00	27.00	28.00	27.00	1.00
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	26.00	26.00	27.00	26.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	21.00	20.00	22.00	21.00	1.00

ตารางที่ 31 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	11.00	11.00	12.00	11.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	11.00	11.00	12.00	11.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	10.00	12.00	11.00	11.00	1.00
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 32 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	10.00	11.00	10.00	10.33	0.58
Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	9.50	10.00	10.00	9.83	0.29
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	9.00	10.00	10.00	9.67	0.58
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 33 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

สูตรตำรับ	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Eudragit 30% w/w + NMP	10.00	11.00	13.00	11.33	1.53
Eudragit 30% w/w + 1% SO + NMP	11.00	11.00	13.00	11.67	1.15
Eudragit 30% w/w + 5% SO + NMP	13.00	14.00	15.00	14.00	1.00
Eudragit 30% w/w + 15% SO + NMP	14.00	15.00	15.00	14.67	0.58

ตารางที่ 34 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ของสารสกัดจากลำพูส่วนต่าง ๆ

สาร (ในน้ำ)	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Gallic	19	15	16	16.67	2.08
Leteolin	-	-	-	-	-
Leteolin glycoside	-	-	-	-	-
เกสร	-	-	-	-	-
ผล	-	-	-	-	-
ที่หุ้มดอก	-	-	-	-	-
เมล็ด	-	-	-	-	-
ใบ	-	-	-	-	-
รากอากาศ	-	-	-	-	-

ตารางที่ 35 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ Anaerobic bacteria (black colony) จากร่องเหงือก ของสารสกัดจากลำพูส่วนต่าง ๆ

สาร (ในน้ำ)	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Gallic	17	15	16	16.00	1.00
Leteolin	-	-	-	-	-
Leteolin glycoside	-	-	-	-	-
เกสร	-	-	-	-	-
ผล	-	-	-	-	-
ที่หุ้มดอก	-	-	-	-	-
เมล็ด	-	-	-	-	-
ใบ	-	-	-	-	-
รากอากาศ	-	-	-	-	-

ตารางที่ 36 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ของสารสกัดจากลำพูส่วนต่าง ๆ

สาร (ในน้ำ)	Clear Zone (mm.)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	S.D.
Gallic	18	15	13	15.33	2.52
Leteolin	-	-	-	-	-
Leteolin glycoside	-	18	-	18.00	0.00
เกสร	10	20	18	16.00	5.29
ผล	-	-	12	12.00	0.00
ที่หุ้มดอก	10	18	20	16.00	5.29
เมล็ด	20	19	18	19.00	1.00
ใบ	12	17	19	16.00	3.61
รากอากาศ	13	15	16	14.67	1.53

ตารางที่ 12 ปริมาณการปลดปล่อยสารฟีนอลิกสะสมจากโครงสร้างความพรุนสูงโดยใช้ตัวกลางคือ phosphate buffer pH 7.4

Time (min)	ปริมาณสารที่ปลดปล่อย (mg)						mean	SD
	1	2	3	4	5	6		
5	4.56	1.54	4.04	1.13	1.25	1.06	2.26	1.60
15	9.34	7.35	11.64	5.75	7.92	7.22	8.20	2.04
30	14.98	14.24	15.73	11.40	12.51	10.19	13.17	2.17
45	17.62	13.57	17.80	14.87	15.33	11.65	15.14	2.37
60	19.67	15.34	20.86	16.23	18.22	14.98	17.55	2.41
90	26.57	16.86	23.13	18.32	22.35	15.82	20.51	4.17
120	25.47	21.48	26.68	20.26	24.70	17.39	22.66	3.55
180	27.69	22.65	31.11	23.38	25.76	18.24	24.81	4.44
240	27.44	24.11	31.39	23.08	27.05	19.89	25.49	4.00
360	29.17	23.74	31.13	23.07	27.44	20.91	25.91	3.95
480	29.33	26.25	33.39	24.00	27.85	21.45	27.05	4.18
720	28.89	27.41	33.42	23.94	26.58	21.18	26.90	4.20

ประวัติและผลงานของผู้วิจัย

นายรัชชัย แพชมัด

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นายรัชชัย แพชมัด
(ภาษาอังกฤษ) Thawatchai Phaechamud

2. วัน เดือน ปีเกิด 27 เมษายน พ. ศ. 2511

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000
โทรศัพท์: 01 9414205, 034 255800 โทรสาร: 034 255801
Email: thawatchai@su.ac.th; thawatchaienator@gmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 42 หมู่ 1 ต. หอมเกร็ด อ. สามพราน จ. นครปฐม 73100

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก สาขาเภสัชกรรม Ph.D. (Pharmaceutics) 2542 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาโท สาขา เภสัชอุตสาหกรรม M.Sc. (Manufacturing Pharmacy) 2538 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาตรี 2533 เภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท Effect of variables in chitosan film on propranolol hydrochloride coated tablets
- ระดับปริญญาเอก Film-coating of chitosan onto propranolol hydrochloride tablet: Approach to fast and extended drug release

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ด้านเภสัชกรรม เภสัชอุตสาหกรรม ในด้าน

- Kinetics of drug release
- Controlled drug delivery system
- Herbal preparation and development
- Polymeric film characterization
- Compatibility between dye and polymer

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Variables affecting the release of propranolol hydrochloride from layered hydrophilic matrix tablets. 2003. Silpakorn University Research & Development Institute (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Enhancement of the aqueous solubility of curcuminoid with solid dispersion techniques. Preliminary study. Faculty of Pharmacy, Silpakorn University. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

The control of drug release from capsule using polyelectrolyte complex system of chitosan and anionic polymers. 2005. Silpakorn University Research & Development Institute (หัวหน้าโครงการวิจัย)

IPUS 2005. Preparation of Risperidone Orodispersible Tablet. The Thai Research Fund, Thailand (หัวหน้าโครงการวิจัย)

New Researchers Grant 2004, The Thai Research Fund, Thailand (หัวหน้าโครงการวิจัย)

8.2 Publications

Thawatchai Phaechamud and Kotchamon Yodkhum. 2012. Characteristic of hydroxypropyl methyl cellulose gel comprising gallic acid dispersed in N-methyl pyrrolidone. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 3(1): 347-351.

Thawatchai Phaechamud, Kotchamon Yodkhum, Chutima Limmatvapirat and Penpan Wetwitayaklung. 2012. Morphology, thermal and antioxidative properties of water extracts from *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. prepared with freeze drying and spray drying. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 3(1): 725-739.

Thawatchai Phaechamud and Manisara Phiriyawirut. 2011. *In vitro* cytotoxicity and degradability tests of gallic acid-loaded cellulose acetate electrospun fiber. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2(3): 85-98.

Manisara Phiriyawirut and Thawatchai Phaechamud. 2011. Suitable Electrospinning Condition for Gallic Acid-loaded Cellulose Acetate Fiber. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2(3): 210-220.

Chutima Limmatvampirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklug, Chanokporn Sukonpan and Thawatchai Phaechemud. 2011. Stability and antioxidant activity of polyphenols in methanolic extracts of *Sonneratia caseolaris* seeds. **Advanced Material Research** 146-147: 1062-5.

T. Phaechemud, W. Mueannoom, S. Tuntarawongsa and S. Chitrattha. 2010. Preparation technique for coated valproic acid and sodium valproate sustained-release matrix tablet. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences** 72(2): 30-40 (impact factor 0.455).

A. Mesnukul, K. Yodkhum, J. Mahadlek and **T. Phaechemud**. 2010. Characterization of Indomethacin Release from Polyethylene Glycol Tablet Fabricated With Mold Technique. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences** 72(1): 92-100 (impact factor 0.455).

Kotchamon Yodkhum, Sumalee Wannachaiyasit and Thawatchai Phaechemud. 2010. Gallic thermosensitive gel. **Advanced Material Research** 93-94:433-438.

Anongnart Mesnukul, Kotchamon Yodkhum and **Thawatchai Phaechemud**. 2009. Solid dispersion matrix tablet comprising indomethacin-PEG-HPMC fabricated with fusion and mold technique. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences** 71(4): 413-420.

Thawatchai Phaechemud, Juree Charoenteeraboon, Jongjan Mahadlek. 2009. Characterization and *in-vitro* drug release of a chitosan-magnesium stearate monolithic matrix system. **Asian J Pharmaceutical Science** 4(5): 265-276.

N. Hongsith, T. Chairuangsi, T. Phaechemud and **S. Choopun**. 2009. Growth kinetic and characterization of tetrapod ZnO nanostructures. **Solid State Communications** 149: 1184-1187. (impact factor: 1.557)

Thawatchai Phaechemud, Photchanart Toprasri, and Chatchai Chinpaisal. 2009. Antioxidant activity of *Areca catechu* L. extracts in human hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Pharmaceutical Biology*. 47(3) March: 242-247. (Impact factor: 0.397).

Thawatchai Phaechemud and Garnpimol C. Ritthidej. 2008. Formulation variables influencing drug release from layered matrix system comprising chitosan and xanthan gum. **AAPS PharmSciTech** 9(3): 870-877. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud and Juree Charoenteeraboon. 2008. Antibacterial activity and drug release of chitosan sponge containing doxycycline hyclate. **AAPS PharmSciTech** 9(3): 829-835. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud, 2008. Variables Influencing Drug Release from Layered Matrix System Comprising Hydroxypropyl Methylcellulose. **AAPS PharmSciTech**. 9(2): 668-674. (impact factor 1.445)

Thawatchai Phaechemud and Garnpimol C. Ritthidej. 2007. Sustained-release from Layered Matrix System Comprising Chitosan and Xanthan Gum. *Drug Development Industrial Pharmacy* 33(6): 395-405. (Impact factor: 0.821)

Ritthidej, G. C., and Phaechemud, T. (2003) "Effect of anionic water-soluble dyes on film coating properties of chitosan acetate" *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29(5): 585-594.

Ritthidej, G. C., Phaechemud, T. and Koizumi, T. (2002) "Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films" *Int. J. Pharm.* 232,11-22.

Koizumi, T. , Ritthidej, G. C. and Phaechemud, T. (2001) "Mechanistic modeling of drug release from chitosan coated tablets" *J. Controlled Release* 70: 277-284.

Phaechemud, T., Koizumi, T. and Ritthidej, G. C. (2000) "Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet" *Int.J.Pharm.*198, 97-111.

Ritthidej, G. C., **Phaechemud, T.** and Koizumi, T. (2000) "Additives in moist-heat-treated chitosan acetate films: a method to extend the release of propranolol hydrochloride-coated tablets" *STP. Pharma. Sci* 10(1), 112-119.

8.3 Presentations

ธวัชชัย แพชมัด และ จงจันทร์ มหาดเล็ก การประเมินลักษณะกายภาพเจลลุ่มสำหรับใช้รักษาโรคปริทันต์อักเสบ *The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 82-87

ธวัชชัย แพชมัด และ ศติประภา ชิตรัตตา โครงสร้างความปลอดภัยโคโคแซนที่ขึ้นรูปด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง *The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 117-122.

ธวัชชัย แพชมัด อรุณี เชื้อแก้ว และ กษมน ยอดขำ ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในชาชงจากส่วนต่างๆ ของลำพู (*Sonneratia caseolaris* (Linn.) Engl.) และผลของการทำแห้งด้วยเทคนิคต่างๆ ที่มีต่อปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก *The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 133-139.

ธวัชชัย แพชมัด และ ชุตินา ลัมมัทวาทิธิ์ ปริมาณและการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากลำพูที่สกัดด้วยน้ำร้อน *The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี, วันที่12-13 กุมภาพันธ์ 2554, หน้า 42-45.

ปรัชญา เกตุวงศา และ ธวัชชัย แพชมัด การพัฒนาเจลกรตเกลลิก บทความวิจัย *การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และสร้างสรรค์ ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4* ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-331-P-334.

ชนกพรหม สุกนธ์พันธุ์, ชุตินา ลิ้มมัทวาภิรัตน์, จุรีย์ เจริญธีรบูรณ์, ภัทราวดี เหลืองรูปราณี และ ธวัชชัย แพชมัด
การศึกษาเครื่องหมายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบในเมธานอลของลำพู (*S. caseolaris*) โดย
ใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตรเมทรี บทความวิจัย **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และ
สร้างสรรค์ ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4** ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-362-P-366.

ใจเอก ชลชีวะ และ ธวัชชัย แพชมัด การเปรียบเทียบการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตต้นกล้าผักกาดหอมของสาร
สกัดจากเปลือก รากอากาศ และเมล็ดลำพู บทความวิจัย **การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย/และสร้างสรรค์
ศิลปการวิจัยครั้งที่ 4** ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบ พระชนพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขต
พระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม วันที่ 19-21 มกราคม 2554 หน้า P-318-P-321.

Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklung and Thawatchai Phaechemud.
Comparison of *Sonneratia caseolaris* extracts using different solvents. **3st Silpakorn University Research Fair.**
28-29th January, 2010, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand. p.42-43. (poster)

Phaechemud T., Mahadlek J. and Charoenteeraboon J. Antimicrobial of in situ forming gel comprising cork tree
seed extract. **The International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants.** The Empress Hotel, Chiang
Mai, Thailand, December 15-18, 2011, p. 111.

Thawatchai Phaechemud and Manisara Phiriyawirut. Release behavior and toxicity of gallic acid-loaded
cellulose acetate electrospun on fibroblast cell. **International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants.**
The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand 15th -16th Nov. 2011. Thailand, p. 104.

Thawatchai Phaechemud and Manisara Phiriyawirut. Biodegradability of gallic acid-loaded cellulose acetate
fiber. **International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants.** *The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand*
15th -16th Nov. 2011. Thailand, p. 103.

Thawatchai Phaechemud and Chutima Limmatvapirat. Process parameter affecting production of *Sonneratia*
caseolaris (L.) Engl. herbal tea. **The Third International Conference on Natural Products for Health and**
Beauty. 16-18 March 2011. Bangkok, Thailand, p.159

Manisara Phiriyawirut and **Thawatchai Phaechemud**. Suitable electrospinning condition for gallic acid-loaded
cellulose acetate fiber. **The Third International Conference on Natural Products for Health and Beauty.** 16-
18 March 2011. Bangkok, Thailand, p. 161.

Thawatchai Phaechemud and Manisara Phiriyawirut. Release mechanism of gallic acid-loaded cellulose acetate
electrospun mat. **The Third International Conference on Natural Products for Health and Beauty.** 16-18
March 2011. Bangkok, Thailand, p. 160.

Phaechamud T. and Katewongsa P. Condition affecting the germination of cork tree seedlings (*Sonneratia caseolaris* (Linn.) Engl.). **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand, February 21-26, 2011. p. 188.

8.4 Invited Speaker

Updating the use of global nanomaterials in cosmetics: sunscreens, anti-aging treatments and hair cosmetics. In Cosmetics, skincare and fragrance 2010. The Asia Business Forum, 9-10 September 2010, Grand Millenium Sukhumvit, Bangkok, Thailand.

เทคโนโลยีการผลิตตำรับเครื่องสำอางจากสารธรรมชาติ การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง สมุนไพรเพื่อความงามและสุขภาพ (Herbals for Aesthetic and Health) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10 ต.ค. 2552

8.5 หนังสือ

รัชชัย แพชมัด การพัฒนายาเม็ดเมทริกซ์ชนิดรับประทาน หนังสือประชุมวิชาการ Technology diversity for pharmaceutical products development โดย ปราณีต โอปะณะโสภิต และคณะ, 2554

รัชชัย แพชมัด เทคโนโลยีการผลิตตำรับเครื่องสำอางจากธรรมชาติ 2552 มณฑนา ภาณุมากรณ์ เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร หน้า 185-198.

8.6 บทความทางวิชาการ

Sarun Tantarawongsa and Thawatchai Phaechamud. 2011. "Eutectic system in pharmaceutical applications" Thai Pharm. Health Sci. J. 6(1): 66-72. (*Thai version*)

8.7 รางวัลที่เคยได้รับ (เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **First prize award (together with Manisara Phiriyawirut).** (Release mechanism of gallic acid-loaded cellulose acetate electrospun mat). **The Third International Conference on Natural Products for Health and Beauty.** Rungsit University 16-18 March 2011. The Emerale hotel, Bangkok, Thailand.
- **Third oral presentation award (together with Nin Prapongsena, and Juree Charoenteeraboon).** (Hepatoprotective effect of *Sonneratia caseolaris* methanolic seed extract, luteolin and luteolin-7-O- β -glycoside against ethanol in HepG2 cell). **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand, February 21-26, 2011.
- **Best oral presentation award (together with Waraporn Kaewprayoon, Panee Srisa-ard and Suporn Charumanee).** (Development of colon-targeted drug delivery system using polysaccharaides from konjac). **The 3rd Annual Northeast Pharmacy Research Conference.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand, February 21-26, 2011.
- **Poster Award, (together with Kotchamon Yodkhum and Sumalee Wannachaiyasit)(Gallic thermosensitive gel).****International Conference on Functionalized and sensing materials (FuSeM 2009),** 7-9 December 2009, Chulabhorn Convention Center, Bangkok, Thailand.

- Senior Popular Vote Award, (together with Panida Sotanasomboon and Wattanaporn srirach) (Dog Mouth and Breath Smell Eradication Product). **IPUS: Industrial Projects for Undergraduate Students**. 25-29th March, 2009, Siam Paragon, Bangkok Thailand.
- Senior Poster Award, (together with Jongjan Mahadlek, Supab Choopun and Juree Charoenteeraboon) (Characterization of Typical and Nano Zinc Oxide). **2st Silpakorn University Research Fair**. (18-19th December, 2008, Silpakorn University, Thapha, Bangkok Thailand. pp. 578-584)
- Alumni Award 2008, Silpakorn University Alumni, Silpakorn University, Thapra, Bangkok, Thailand, October 12, 2008.
- Senior Poster Award, (together with Taksin Srichan and Juree Charoenteeraboon) (Cytotoxic Activity of Edible Flower Extracts in Huh 7. **Current in Therapy and New Drug III: Natural sources & active compound discovery**, Asia hotel, Bangkok, Thailand, April 24-25, 2008. P-28)
- Good Poster Award, (together with Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpun Wetwitayaklung) (The Total Polyphenol Contents of Exuding Latex and Juice from Banana Flowers. **1st Silpakorn University Research Fair**. 22th November, 2007, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand. pp. 586-592)
- Good Poster Award, (together with **Juree Charoenteeraboon**) (Fabrication of chitosan sponge containing doxycycline hyclate. **The 5th National Conference on Biomedical Engineering (NCBME 2007)**. Twin Tower Hotel, Bangkok, Thailand, 8th July, 2007. pp. 193-196.)
- Second Poster Award, (together with Photchanart Toprasri) (Hydrophobic Colloidal Silicon Dioxide As Gel Base for Controlled Drug Release. **Innovation: Applications of Nanotechnology in Pharmaceuticals, Cosmetics and Natural Products**. Lotus Hotel, Pang Suan Kaew, Chiangmai, Thailand. 9-11 August, 2006. pp: 281-282.)
- Best Poster Award in Session: Polymers, (together with Garmpimol C. Ritthidej) (Controlled Release of Propranolol HCl from Chitosan-Lactose-Xanthan Gum Matrix Tablets. **The Fourth Thailand Materials Science and Technology Conference**. Thailand Science Park, Patumthani, Thailand March 31- April 1, 2006. PP04, pp. 411-413.)
- Outstanding Poster Award, (together with Penpun Wetwitayaklung, Chutima Limmatvapirat, Thawatchai Phaechamud, Sindchai Keokitichai.) (The Study of Antioxidant Activities of *Musa sapientum* L. Flowers by Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay. **The 2nd AASP Symposium and 2nd APEM Conference 2005: Regional Cooperation In Pharmacy Education, Research And Services**. Montein Riverside Bangkok, Thailand 14th -17th November 2005. PP N6, p. 149-152.)
- Outstanding Poster Award, (together with Garmpimol C. Ritthidej.) (Modification of Drug Release from Chitosan Matrix Tablets. **The 2nd AASP Symposium and 2nd APEM Conference 2005: Regional Cooperation In Pharmacy Education, Research And Services**. Montein Riverside Bangkok, Thailand 14th -17th November 2005. PP T8, p. 195-197.)
- Outstanding Poster Award, (together with Juree Charoenteeraboon and Sindchai Keokitichai.) (Effect of Age and Type of Sappan Wood on Color Extraction. **The 2nd AASP Symposium and 2nd APEM Conference 2005: Regional Cooperation In Pharmacy Education, Research And Services**. Montein Riverside Bangkok, Thailand 14th -17th November 2005. PP N8, p. 155-157.)

8.8 งานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

- ไม่มี

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ไม่มี

- **Phuagphong P**, Fukushima T, Hatanaka R, Tanaka K, Baba A, Matsuda T. T-588, a cognitive enhancer, protects against sodium nitroprusside-induced toxicity in cultured astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **95**:135-138 (2004)
- Takuma K, **Phuagphong P**, Lee E, Enomoto R, Mori K, Baba A, Matsuda T. The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**:64-71 (2002)
- Takuma K, **Phuagphong P**, Lee E, Mori K, Baba A, Matsuda T. Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J. Biol. Chem.* **276**:48093-48099 (2001)

8.3 Presentations

- The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASRM) and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit) 16-18 December 2010, Fukuoka, Japan. "Sonneratia caseolaris Linn extraction prevent Ca^{2+} -reperfusion induced astrocytic cell injury". **Phuagphong P**, Punpae S, Phaechamud T.
- The 23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA). November 5-8, 2010. In Taipei, Taiwan. "Toxic Effects of Citrus Extracts on Pomacea Canaliculata". **Patamawan Phuagphong**, Nudchanart Kitcharoen, Srisombat Nawanopparatsakul
- 4th Asian Association of Schools of Pharmacy 9th Malaysian Pharmaceutical Society Pharmacy Scientific Conference 2009 (AASP-MPSPSC 2009) 10-13 June 2009, Penang, Malaysia. "Skin Irritation of the Extraction from Fruit Hull of Mangosteen". **Patamawan Phuagphong**, Chatchai Chinpaisal, Srisombat Nawanopparatsakul
- 14th Congress on Alternatives to Animal Testing-Linz 2007, 11th Annual Meeting of MEGAT-Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing 28-30 September 2007. Linz, Austria. "Fabrication and validation of corneal holders for porcine corneal opacity and permeability assay". Asavapichayont P, Ukong S, **Phuagphong P**, Meksuriyen D.
- การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 11-13 ตุลาคม 2550. ชลบุรี. "Eye irritation testing using porcine cornea: Fabrication and validation of corneal holders". Asavapichayont P, Yukong S, **Phuagphong P**, Meksuriyen D.
- International Workshop on Medicinal and Aromatic Plant. January 15-18, 2007, In Chiang Mai, Thailand. "Neuroprotective Effect of Thai Herbal Food Extracts Possessing High Antioxidant Activity" **Patamawan Phuagphong**, Chawarit Sittisombut
- The 21st Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA). November 18-21, 2006, In Yokohama, Japan "Neuroprotective activity of some medical herbs from Thailand" **Patamawan Phuagphong**, Tosak Intharapairoj, Tawatchai Phaechamud
- Abstracts of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Asia Pacific Regional Meeting. Neuro-Psychopharmacology: Challenging for Better Health. March 14-17,

2006 “Role of *Areca catechu* L., in Ca^{2+} reperfusion-induced cell death of cultured rat astrocyte” **P. Phuagphong**, T. Phaechamud, S. Keokitichai

- International Symposium of Pharmacology, 23 March – 25 March 2001, In Chiba, Japan. “Effect of T-588 in mitochondrial astrocytic death” **P. Phuagphong**, D. Wakamatsu, R. Kosaki, T. Matsuda, A. Baba.
- 6th Glia Research Meeting, 8 December 2001, In Osaka, Japan. “The role of mitochondrial membrane potential and astrocytic death” **P. Phuagphong**, R. Nakao, R. Kosaki, T. Matsuda, A. Baba.
- 53th Japan Pharmaceutical Symposium, 1 November 2003, In Osaka, Japan. “Alteration of mitochondria in apoptotic and necrotic astrocytic death” **P. Phuagphong**, A. Kasai, H. Hashimoto, T. Matsuda, A. Baba.

8.4 Invited Speaker

- ไม่มี

8.5 หนังสือ

- ไม่มี

8.6 บทความทางวิชาการ

- บทมวรรณ ผือกผอง, ตอศักดี อินทรไฟโรจน 2549 New antidiabetic agents: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor. วังการยา ปีที่ 6 ฉบับที่ 95 หน้า 7-13.
- ตอศักดี อินทรไฟโรจน, บทมวรรณ ผือกผอง 2549 Histamine and receptors: from H_1R to H_4R antagonists. วังการยา ปีที่ 6 ฉบับที่ 94 หน้า 5-15.
- ตอศักดี อินทรไฟโรจน, บทมวรรณ ผือกผอง 2549 บทบาทของสารยับยั้งโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ ทรานสเฟอร์โปรตีนต่อระดับ HDL. ไทยโภชนาณพนธ์ ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 หน้า 1-13.

8.7 รางวัลที่เคยได้รับ (เกยวกับงานวิจัย)

- ไม่มี

8.8 งานอ่น ๆ ที่เกยวข้อง

- ไม่มี

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ฤทธิ์ของ asiaticoside ในการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายด้วยเบต้าอไมลอยด์ (หัวหน้าโครงการ –รอมลทุนวิจัย)
- ความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรและการนำไปใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชชีวภาพ (หัวหน้าโครงการ)
- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิกจากส่วนผลของพืชสกุล *Citrus* (ผู้ร่วมโครงการ)
- ฤทธิ์และกลไกของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชแหนด (ผู้ร่วมโครงการ)
- ฤทธิ์เบ้องต้นของดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก็กฮวย) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนด (ผู้ร่วมโครงการ)

