บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

3.1 ตำรับยาเม็ดสมุนไพรต้านออกซิเดชัน

3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

1. ผักติ้ว เม็ก และกระโดนสด
2. 95% ethanol commercial grade A
3. 2,2-diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) AR grade
4. methanol AR grade
5. ascorbic acid BP grade
6. trolox AR grade
7. deionized water
8. น้ำกลั่น
9. 1N Folin-Ciodalteu reagent AR grade
10. 20% Sodium carbonate (w/v)
11. 0.1 mg/ml Tannic acid USP grade
12. Avicel® BP grade
13. 15% PVP®K30 AR grade
14. Magnesium stearate BP grade
15. talcum BP grade
16. colloidal silicon dioxide (Aerosil®) BP grade
17. sodium starch glycolate (Explotab®) BP grade

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดมีด – เขียง
2. เครื่องชั่ง รุ่น AT 400 บริษัท Mettler Toledo®
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มล.
4. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 50 และ 100 มล.
5. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 150, 200, 250 และ 600 มล.

6. ขวดสีชา ขนาด 2.5 ลิตร
7. กระบอกตวง ขนาด 5, 10, 20, 50 และ 100 มล.
8. แท่งแก้วคน, ช้อนเขา
9. กรวยกรอง, กระดาษกรอง เบอร์ 2
10. หลอดหยด
11. ลูกยางแดง
12. ผ้าขาวบาง
13. หลอดทดลอง
14. เทอร์โมมิเตอร์
15. อะลูมิเนียมฟลอยด์, แผ่นพาราฟิล์ม
16. นาฬิกาจับเวลา
17. ไมโครปิเปต ขนาด 0 – 0.2 และ 0.1 - 1 มล.
18. ปิเปต ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มล.
19. โกร่งและลูกโกร่ง
20. แร่ง เบอร์ 14, 16, 60 และ 80
21. sputula
22. เครื่อง rotary evaporator รุ่น Rotavapor R – 124 บริษัท Bushi ®
23. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 5900-02 บริษัท SCIENCTIFIC PROMOTION Co.,LTD
24. cuvette (Quatz)
25. เครื่อง Vortex รุ่น 604012-3 บริษัท SCIENCTIFIC PROMOTION Co.,LTD
26. Ultrasonic bath รุ่น B2210E-DTH บริษัท Bransonic ®
27. เครื่องเขย่าอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Maxi-shake บริษัท Heto ®
28. เครื่อง Shaking Water Bath รุ่น SDD-X บริษัท Labnet ®
29. เครื่องอบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น TS8000 บริษัท Termaks ®
30. เครื่อง single punch tablet machine รุ่น 1-9-97 บริษัท YEO HENG Co.,LTD
31. เครื่อง disintegration tester รุ่น ZT52 บริษัท Erweka ®
32. เครื่อง Friabilator รุ่น 45-1300 บริษัท Vankel ®
33. Stroke monsanto บริษัท YEO HENG Co.,LTD
34. micrometer caliper รุ่น SM – 112 บริษัท Teclock ®

3.1.3 **ขั้นตอนการวิจัย** แบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ

1. การสกัดสารจากผักติ้ว เม็ก และกระโดน
2. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดติ้ว เม็ก และกระโดน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu methods
3. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay
4. การเตรียมตำรับยาเม็ด
5. การควบคุมคุณภาพและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด
6. การทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดและตำรับยาเม็ด

1. **การสกัดสารในผักติ้ว ผักเม็ก และ ผักกระโดน**

ส่วนที่ใช้ : ใบและยอดอ่อน

วิธีทำ

ชั่งผักที่สับละเอียดแล้ว 200 กรัม หมักใน 70% ethanol 300 ml ใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath นาน 24 ชม. (ป้องกันแสง)

↓

เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารสกัดส่วนที่ 1)

↓

หมักกากที่ได้อีกครั้งด้วย 70% ethanol 300 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath นาน 24 ชม. (ป้องกันแสง)

↓

เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารสกัดส่วนที่ 2)

↓

นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยตั้งอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส

↓

เก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดติ้ว เม็ก และกระโดน (ตามข้อ 3.4.2) ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ตามข้อ 3.4.3) และเตรียมตำรับยาเม็ด (ตามข้อ 3.4.4) ต่อไป

2. **การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดติ้ว เม็ก และกระโดน ด้วยวิธี** Folin-Ciocalteu methods

2.1 การเตรียมสาร reagent

2.1.1 Folin-Ciodalteu reagent (1N)

- ละลาย Folin-Ciodalteu reagent (2N) ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1

2.1.2 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (20 %w/v)

- ชั่ง Sodium carbonate 20 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เขย่าให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน

2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

2.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน Tannic acid (0.1 mg/ml)

- ชั่ง Tannic acid 25 mg ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 25 ml จะได้สารละลาย Tannic acid 1 mg/ml (stock solution)
- ปิเปต stock solution มา 1 ml ปรับปริมาตรจนครบ 10 ml จะได้สารละลาย Tannic acid 0.1 mg/ml

2.2.2 เติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2 โดยทุกหลอดทดลองมีการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.2.3 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 725 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ย แล้วทำการเขียนกราฟกับปริมาณแทนนิน (mg)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

Tube	Std. Tannic Acid (0.1 mg/ml) (µl)	Distilled water (µl)	Folin reagent (µl)	Na_2CO_3 (µl)
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250

2.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดติ้ว เม็ก และกระโดน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu methods

2.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง 1 mg/ml

- ชั่ง crude extract 50 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml (stock solution)
- ปิเปต stock solution มา 2 ml ปรับปริมาตรจนครบ 10 ml จะได้สารละลายเข้มข้น 1 mg/ml

2.3.2 เติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 2 โดยทุกหลอดทดลองมีการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.3.3 ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 725 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณหาปริมาณแทนนิน ในตัวอย่าง 1 กรัม

ตารางที่ 3 ปริมาณสารที่ใช้ในการหาปริมาณ total phenolic compound ในสารตัวอย่าง

Tube	Crude extract 0.1 mg/ml (µl)	Amount of Crude extract (mg)	Distilled water (µl)	Folin reagent (µl)	Na_2CO_3 (µl)
Control	0	0	500	250	1250
1	10	0.01	490	250	1250
2	20	0.02	480	250	1250
3	30	0.03	470	250	1250
4	40	0.04	460	250	1250

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

1. เตรียม stock solution DPPH 100 ul (DPPH = 2,2-diphenyl –picryl hydrazyl : MW=394.33) โดย ชั่ง DPPH 3.943 mg และเติม methanol ให้มีปริมาตรเป็น 100 ml (ป้องกันแสง) แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที
2. การวิเคราะห์

1. **vitamin C/Trolox** : stock solution 0.1 mg/ml (100 µg/ml) ใน methanol

Blank : MeOH

1) เติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 4 โดยทุกหลอดทดลองมีการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 517 nm

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

4) Plot linear regresstion graph ระหว่าง % inhibition (Y) กับ Concentration (X) แล้วนำไปหาค่า ED_{50}

ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

Tube	Final conc (µg/ml)	$V_{vit\ C\ /\ trolox}$ (µl)	V_{DPPH} (µl)	V_{MeOH} (µl)	V_{total} (µl)
Control	0	0	1600	400	2000
1	0.25	4	1600	396	2000
2	0.5	8	1600	392	2000
3	1	20	1600	380	2000
4	2	40	1600	360	2000
5	3	60	1600	340	2000
6	4	80	1600	320	2000

หมายเหตุ : เติม DPPH หลังตัวอื่นๆ โดยจะเริ่มเติมจากหลอดที่ 6 ไปยังหลอด Control

2. **สมุนไพร**: stock solution 1 mg/ml (1000 ug/ml) ใน deionized water

Blank : MeOH : Deionized water = 1:1

1) เติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 5 โดยทุกหลอดทดลองมีการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 517 nm

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

4) Plot linear regresstion graph ระหว่าง % inhibition (Y) กับ Concentration (X) แล้วนำไปหาค่า ED_{50}

ตารางที่ 5 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

Tube	Final conc (µg/ml)	V_{sample} (µl)	V_{DPPH} (µl)	V_{water} (µl)	V_{MeOH} (µl)
Control	0	0	1600	200	200
1	1	2	1600	198	200
2	2	4	1600	196	200
3	5	10	1600	190	200
4	10	20	1600	180	200
5	20	40	1600	160	200
6	30	60	1600	140	200
7	40	80	1600	120	200
8	50	100	1600	100	200
9	100	200	1600	0	200

4. การเตรียมตำรับยาเม็ด

นำสารสกัดกระโดน มาเตรียมตำรับยาเม็ด 2 ตำรับ คือ

- ตำรับที่ 1 ในหนึ่งเม็ดประกอบด้วยสารสกัดกระโดน 40 มิลลิกรัม จำนวน 200 เม็ด
- ตำรับที่ 2 ในหนึ่งเม็ดประกอบด้วยสารสกัดกระโดน 80 มิลลิกรัม จำนวน 300 เม็ด

ซึ่งมีส่วนประกอบในตำรับดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในตำรับที่ 1

ตำรับที่ 1 สารสกัดกระโดน 40 mg ในยาเม็ดปริมาณ 300 mg เตรียมจำนวน 200 เม็ด

ส่วนประกอบในตำรับ	**ปริมาณ 1 เม็ด (mg)**	**ปริมาณ 200 เม็ด (g)**	**ประโยชน์ในตำรับ**
สารสกัดกระโดน	40	8	Anti-oxidant
Avicel PH 102	244.4	48.88	Diluent
PVP K30	23.1	4.62	Binder
Magnesium stearate	1%	0.615	Lubricant
Talcum.	2%	1.230	Anti-adherent
Aerosil®	0.2%	0.123	Glidant
Explotab®	2%	1.230	Disintegrant
Total	300	64.698	

วิธีเตรียม

ชั่งสารสกัดกระโดน แล้วละลายในน้ำจนหมด

↓

ชั่ง Avicel PH 102 แล้วผสมกับสารละลายกระโดนในโกร่ง

↓

หยด PVPK30 จนเกิดเป็น damp mass แล้วนำไปผ่านแร่งเบอร์ 14

↓

นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. 40 นาที แล้วนำมาผ่านแร่งเบอร์ 16

↓

ชั่ง Magnesium stearate talcum Aerosil® และ Explotab® แล้วนำมาผสมกับแกรนูลแห้ง ด้วยวิธี rotomixir แล้วนำไปตอกตาม target weight ที่คำนวณไว้

วิธีคำนวณ target weight

คำนวณจากน้ำหนักรวมของปริมาณที่เตรียม (64.698 g)

target weight = 64.698 / 200

= 323.49 mg ประมาณ 323 mg

ตารางที่ 7 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในตำรับที่ 2

ตำรับที่ 2 สารสกัดกระโดน 80 mg ในยาเม็ดปริมาณ 300 mg ตอกจำนวน 300 เม็ด

ส่วนประกอบในตำรับ	**ปริมาณ 1 เม็ด (mg)**	**ปริมาณ 300 เม็ด (g)**	**ประโยชน์ในตำรับ**
สารสกัดกระโดน	80	24	Anti-oxidant
Avicel PH 102	204.4	61.32	Diluent
PVP K30	15	4.5	Binder
Magnesium stearate	3	0.898	Lubricant
Talcum.	6	1.796	Anti-adherent
Aerosil®	0.6	0.18	Glidant
Explotab®	6	1.796	Disintegrant
Total	300	94.49	

วิธีเตรียม

ชั่งสารสกัดกระโดน แล้วละลายในน้ำจนหมด

↓

ชั่ง Avicel PH 102 แล้วผสมกับสารละลายกระโดนในโกร่ง

↓

หยด PVPK30 จนเกิดเป็น damp mass แล้วนำไปผ่านแร่งเบอร์ 14

↓

นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชม. แล้วนำมาผ่านแร่งเบอร์ 16

↓

ชั่ง Magnesium stearate talcum Aerosil® และ Explotab® แล้วนำมาผสมกับแกรนูลแห้ง ด้วยวิธี rotomixir แล้วนำไปตอกตามน้ำหนักที่กำหนด (target weight) ที่คำนวณไว้

วิธีคำนวณน้ำหนักที่กำหนด (target weight)

คำนวณจากน้ำหนักรวมของปริมาณที่เตรียม (64.698 g)

น้ำหนักที่กำหนด (target weight) = 94.49 / 300

= 315 mg

5. **การควบคุมคุณภาพและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด**

5.1 ลักษณะของเม็ดยา

สังเกตลักษณะทางกายภาพของเม็ดยา ได้แก่ ขนาด รูปร่าง และสี

5.2 การทดสอบความแปรปรวนของน้ำหนักยาเม็ด (Weight variation test)

<u>วิธีทำ</u> สุ่มตัวอย่างยาเม็ด 20 เม็ด ชั่งน้ำหนักยาทีละเม็ดและหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักยาทั้ง 20 เม็ด จากนั้นหาความแตกต่างของน้ำหนักยาแต่ละเม็ดโดยเทียบจากน้ำหนักเฉลี่ย แล้วคำนวณหาค่า %variation

<u>การประเมินผล</u> ยาเม็ดจะเข้ามาตรฐานตามกำหนดของ USP 27/NF22 ต้องมียา ≤ 2 เม็ดที่มี %variation มากกว่าที่กำหนด และต้องไม่มีเม็ดไหนที่มี %variation มากกว่า 2 เท่าของ %variation ที่กำหนด

ตารางที่ 8 แสดงเกณฑ์ weight variation tolerance ของยาเม็ด

น้ำหนักเฉลี่ยตาม USP 27/NF22[36] (mg)	ความแตกต่างของน้ำหนักจากค่าเฉลี่ย (%)
130 or less than	10.0
130-324	7.5
More than 324	5.0

5.3 **การทดสอบการแตกตัวของยาเม็ด** (Disintegration Test)

วิธีทำ เตรียม medium โดยใช้น้ำกลั่นใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มล. ตั้งอุณหภูมิของเครื่องที่ 37 องศาเซลเซียส และกำหนดเวลาไว้ 30 นาที สุ่มยา 6 เม็ด ใส่ Basket-rack Assemblyแล้วใส่ disk ทับลงบนเม็ดยาทุกเม็ด โดยสังเกตด้านข้าง disk จะเห็นเป็นรูปตัว V จากนั้นจึงเริ่มให้เครื่องทำงาน แล้วคอยสังเกตการแตกตัวของยาแต่ละเม็ดและบันทึกเวลาเมื่อถึงจุดสิ้นสุดของการแตกตัว คือ เมื่อไม่มีชิ้นส่วนใดของยาเม็ดค้างบนตะแกรงลวด

การประเมินผล ตำรับจะเข้ามาตรฐานตาม USP27/NF22 เมื่อ ยาทั้ง 6 เม็ด แตกตัวหมดภายใน 30 นาที หรือถ้ามียาเม็ด 1หรือ 2 เม็ดแตกตัวไม่หมด ให้นำยาเม็ดมาหาการแตกตัวเพิ่มอีก 12 เม็ด และจะต้องมีไม่น้อยกว่า 16 เม็ด จากทั้งหมด 18 เม็ดที่แตกตัวหมด จึงจะถือว่าการแตกตัวเข้ามาตรฐาน

5.4 **การวัดความหนา** (Thickness)

สุ่มยาเม็ด 6 เม็ด มาวัดความหนาด้วยเครื่อง Thickeness gate แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

5.5 **การวัดความแข็ง** (Hardness)

สุ่มยาเม็ด 6 เม็ด มาวัดความแข็งด้วยเครื่อง Stroke Hardness Tester แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

5.6 **การทดสอบความกร่อน** (Friability test)

วิธีทำ เครื่องมือใช้ทดสอบ คือ friabilator

- สุ่มเม็ดยามาทดสอบ 20 เม็ด นำไปชั่งน้ำหนักโดยปัดฝุ่นผงที่ติดเม็ดยาออกให้หมดก่อน (Wo)
- ใส่เม็ดยาทั้งหมดลงในเครื่อง friabilator และปิดฝา ตั้งให้เครื่องหมุน 100 ครั้ง ด้วยอัตรา 25 รอบ/นาที

- หลังจากที่เครื่องหยุดทำงาน นำเม็ดยาออกมาปัดฝุ่น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W) เพื่อหาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป และคำนวณหา % friability จากสูตร

$$\% \text{ friability} = 100x\,[1-(W/Wo)]$$

การประเมินผล ตำรับจะเข้ามาตรฐานตาม USP27/NF22 เมื่อมี % friability ไม่เกิน 1% แต่ถ้ามีเม็ดยาเกิดการบิ่น หรือแตกหัก จะถือว่ามี % friability เท่ากับ 100 ถือว่า ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

5.7 การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกในยาเม็ด

การสกัดสารสำคัญออกจากยาเม็ด

1. สุ่มยาเม็ดที่ตอกได้จากแต่ละตำรับมา 3 เม็ด บดให้ละเอียด แล้วแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน
2. ละลายผงยาด้วยสารละลาย เมทานอล :น้ำ (60:40) ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 5 mg/ml จากนั้นนำไป sonicate นาน 30 นาที และนำสารละลายใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 แล้วเตรียมสารเพื่อหาปริมาณ total phenolic compound ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเตรียมสารเพื่อหาปริมาณสารฟีนอลิกในยาเม็ด

หลอดที่	**ปริมาณสารสกัด** 5 mg/ml (µl)	Distilled water (µl)	Folin reagent (µl)	Na_2CO_3 (µl)
Control	0	500	250	1250
Sample	20	480	250	1250

6. การทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบและตำรับยาเม็ด

ทำการทดสอบหลังจากเก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในบีกเกอร์ที่หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมและตำรับยาเม็ดเก็บในกระปุกพลาสติกที่มีฝาปิดที่หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียม แล้วเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บทั้งสารสกัดหยาบและตำรับยาเม็ดเป็นเวลานาน 2 เดือน แล้วนำมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เหลืออยู่ โดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดกระโดนให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการทดลองการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดติ้ว เม็ก และกระโดน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu methods (ข้อ 2) ข้อ 2.3 ส่วนการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ดทำเช่นดังกับวิธีการทดลอง 5 (การควบคุมคุณภาพและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด) ข้อ 5.7

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2 ตำรับลูกอมสมุนไพรกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

1. Hanks Balance salt solution (HBSS)
2. Dyes : trypan blue
3. Medium : RPMI 1640 , Fetal bovine serum , antibiotics and antimycotic agent , Phosphate buffer solution
4. Mitogen : Phytohaemagglutinin (PHA)
5. Ethanol
6. Hydrochloric acid
7. Isopropanol
8. MTT 3 - (4,5 – dimethylthiazol – 2 - yl) - 2,5 – diphenyl - tetrazolium bromide
9. ACK lysing solution
10. Diethyl ether
11. Savlon

3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดมีด – เขียง
2. เครื่องชั่ง รุ่น AT 400 บริษัท Mettler Toledo®
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500, 1000, 2000 มล.
4. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 50 และ 100 มล.
5. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 150, 200, 250 และ 600 มล.
6. กระบอกตวง ขนาด 5, 10, 20, 50 และ 100 มล.
7. แท่งแก้วคน
8. กรวยกรอง
9. กระดาษกรอง เบอร์ 2
10. ช้อนเขาสแตนเลส
11. หลอดหยด
12. ลูกยางแดง
13. ผ้าขาวบาง
14. ขวดเก็บสารสกัดสมุนไพร
15. เทอร์โมมิเตอร์

16. อะลูมิเนียมฟลอยด์
17. แผ่นพาราฟิล์ม
18. ไมโครปิเปต ขนาด 0 – 0.2 และ 0.1 - 1 มล.
19. ปิเปต ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มล.
20. ปิเปตจาร์
21. ปิเปตทิป
22. ชุดผ่าตัด (กรรไกร forcep)
23. sterile vial
24. sterile petridish
25. ขวดใส่มีเดีย ขนาด 250, 500 มล.
26. หัวกรอง swinnex
27. เมมเบรนฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน
28. ฟองน้ำ
29. ผ้าขนหนู
30. ถุงมือ
31. หน้ากาก
32. Disposable syring ขนาด 10 มล.
33. Hot plate
34. CO_2 incubator (SL SHEL LAB , USA)
35. Laminar air flow (Astec , SC1200 , England and Microflow , England)
36. Hot air oven (Hearaeus Instrument , T6200 , Germany)
37. Autoclave (OMRON cooperation , H88LL , Japan)
38. Refrigerated Centrifuge (Hettick Zentrifugen , 1610 , Germany)
39. ELISA READER (BIO-TEK Instruments , Inc. , Elx 808 , USA)
40. Phase-contrast microscope (Nikon , 119 , Japan) , Reverted microscope (Nikon , ECLIPESE TE 300 , Japan)
41. Haemocytometer (Neubaure BOECO , Germany)
42. Cell counter (Hand Held Tally Counter , Diamond 24100 , Taiwon)

43. Glassware and Plasticware : 96-well microtiterplates (TPP , Switzerland) , cell separator , disposable 0.22 μm membrane filter , centrifuge tubes (TPP , Switzerland)
44. Microtiter plate shaker (ELMI shaker ST3)
45. Water bath (Heto-Holten A/S BWB22-2 , Denmark)
46. เครื่อง rotary evaporator รุ่น Rotavapor R – 124 บริษัท Bushi ®
47. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 5900-02 บริษัท SCIENCTIFIC PROMOTION Co.,LTD
48. เครื่อง Vortex รุ่น 604012-3 บริษัท SCIENCTIFIC PROMOTION Co.,LTD
49. Ultrasonic bath รุ่น B2210E-DTH บริษัท Bransonic ®
50. เครื่องเขย่าอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Maxi-shake บริษัท Heto ®
51. เครื่อง Shaking Water Bath รุ่น SDD-X บริษัท Labnet ®

3.1.3 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. การสกัดสารจากผักติ้ว เม็ก และกระโดน
2. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน T และ B-Lymphocytes ของสารสกัดจากติ้ว เม็ก กระโดน
3. การเตรียมตำรับเม็ดอมสมุนไพร
4. การประเมินตำรับเม็ดอมสมุนไพร

1. การสกัดสารจากผักติ้ว เม็ก และกระโดน

ส่วนที่ใช้ : ใบและยอดอ่อน

วิธีทำ

ชั่งผักที่สับละเอียดแล้ว 200 กรัม หมักใน 70% v/v ethanol 300 ml ใส่ลงใน Erlenmeyer flask

⇩

ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน โดยเขย่าด้วยมืออย่างสม่ำเสมอ

⇩

เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารสกัดส่วนที่ 1)

⇩

หมักกากที่ได้อีกครั้งด้วย 70% v/v ethanol 300 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 วัน เขย่าสม่ำเสมอ

⇩

เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารสกัดส่วนที่ 2)

⇩

นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยตั้งอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส

⇩

เก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทดสอบฤทธิ์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน T-Lymphocytes และเตรียมตำรับเม็ดอมต่อไป

2. **การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน** T และ B-Lymphocytes **ของสารสกัดจากติ้ว เม็ก กระโดน**

2.1 **การเตรียม** lymphocytes (Splenectomy)

การเตรียม Lymphocytes

1. นำหนู Balb/c mice เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ ทำ cervical dislocation
2. แช่หนูในบีกเกอร์ที่มี 70 % v/v alcohol ให้ชุ่ม 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
3. จับหนูนอนตะแคงซ้าย ใช้กรรไกรตัดม้ามออกมาแช่ใน RPMI + 10 % FBS ที่วางบนถาดน้ำแข็ง ครูดผ่าน sieve sterile ที่มี RPMI + 10 % FBS 10 ml จะได้ cell suspension ออกมา
4. นำ cell suspension ที่ได้ใส่ใน centrifuge tube ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทิ้ง supernatant
5. เติม ACK lysing buffer ที่อุ่นใน water bath ที่ 37 °C 10 ml นาน 1-2 นาที เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant ทำซ้ำ 3 ครั้ง
6. เติม HBSS 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant 3 ครั้ง จากนั้นเติม RPMI 2 ml จะได้ cells stock
7. ปิเปต cell suspension จำนวน 20 µl ผสมกับ Trypan blue 180 µl นำไปนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer และหา %viability ซึ่งไม่ควรต่ำกว่า 90-95% แล้วปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ตามต้องการ

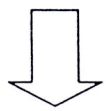
2.2 **การทดสอบฤทธิ์** T **และ** B-Lymphocytes Proliferation **ด้วยวิธี** MTT assay

ตอนที่ 1 การ titrate หาจำนวนเซลล์ lymphocyte ที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของเซลล์ : 0.5×10^5 1×10^6 2×10^6 3×10^6 5×10^6 cells/ml

การทดสอบ

1. Control : เติม media 100 µl
2. Cytotoxic : เติม cell 50 µl + media 50 µl
3. T-Lymphocytes Proliferation : cells 50 µl + PHA 50 µl (PHA ใช้ความเข้มข้น 1 : 100)
4. B-Lymphocytes Proliferation : cells 50 µl + PWM 50 µl



บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 48 ชั่วโมง

เติม MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 5 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant

เติม 0.04 M HCl in isopropanol หลุมละ 100 µl เขย่าด้วย microtiter plate shaker ที่ 300 rpm 1 ชั่วโมง เพื่อละลาย formazan product ที่เกิดขึ้น

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA READER ที่ความยาวคลื่น 562 nm และใช้ความยาวคลื่น 620 nm เป็น reference wavelength

ตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน T และ B-lymphocyte ของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน (ติ้ว เม็ก กระโดน) โดยใช้วิธี MTT assay

สารสกัดจากพืชเข้มข้น 0 12.5 50 200 400 800 µg/ml

การทดสอบ

1. Cytotoxic

เติม Lymphocyte ความเข้มข้น 3×10^6 cells/ml จำนวน 100 µl มาเติมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 100 µl ลงใน 1 well

2. T-Lymphocytes Proliferation

เติม PHA (PHA ใช้ความเข้มข้น 1 : 100) 50 µl cell lymphocyte 100 µl และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ (เตรียม 4x) 50 µl ต่อ 1 well (control ; PHA + cell + media)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 48 ชั่วโมง

เติม MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 5 ชั่วโมงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant

เติม 0.04 M HCl in isopropanol หลุมละ 100 µl เขย่าด้วย microtiter plate shaker ที่ 300 rpm 1 ชั่วโมง เพื่อละลาย formazan product ที่เกิดขึ้น

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA READER ที่ความยาวคลื่น 562 nm และใช้ความยาวคลื่น 620 nm เป็น reference wavelength

3. B-Lymphocytes Proliferation

เติม PWM 50 µl cell lymphocyte 100 µl และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ (เตรียม 4x) 50 µl ต่อ 1 well (control ; PWM + cell + media)

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 48 ชั่วโมง

เติม MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % นาน 5 ชั่วโมงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้ง supernatant

เติม 0.04 M HCl in isopropanol หลุมละ 100 µl เขย่าด้วย microtiter plate shaker ที่ 300 rpm 1 ชั่วโมง เพื่อละลาย formazan product ที่เกิดขึ้น

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA READER ที่ความยาวคลื่น 562 nm และใช้ความยาวคลื่น 620 nm เป็น reference wavelength

การแปลผล

คำนวณหาค่า Lymphocyte proliferation index (P.I.) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสมุนไพรกับค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีสมุนไพร โดย คำนวณหาค่า Lymphocyte proliferation index จาก

$$\frac{\text{OD (cell + extract + mitogen) - OD (extract + media)}}{\text{OD (cell + mitogen + media) - OD (media)}}$$

หากค่า Lymphocyte proliferation index มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ T-Lymphocytes

หากค่า Lymphocyte proliferation index มีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรมีผลต่อการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของ T-Lymphocytes

หากค่า Lymphocyte proliferation index มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T-Lymphocytes หรือเป็นพิษต่อเซลล์

3. การเตรียมตำรับเม็ดอมสมุนไพร

การตรียมตำรับลูกอมสมุนไพรใช้วิธี Molding method โดยเตรียมเป็น 3 แบบ ดังนี้

3.1 Hard cand

ตารางที่ 10 แสดงสูตรตำรับการเตรียมเม็ดอมสมุนไพร (Hard candy)

สารในตำรับ	ปริมาณที่เตรียม (กรัม)
สารสกัดสมุนไพร	-
Sucrose	30.0
Glucose syrup (แบะแซ)	20.0
Water	qs.

วิธีเตรียม

1. ชั่ง Sucrose , Glucose syrup ตามปริมาณที่กำหนด
2. หลอม Sucrose บนกระทะ Teflon (ป้องกันการติดภาชนะหลอม) จน Sucrose มีลักษณะข้นหนืด (สีน้ำตาลอ่อน)
3. เติม Glucose syrup (แบะแซ) และคนอย่างต่อเนื่อง แล้วทิ้งให้อุณหภูมิต่ำลง
4. เติมสารสกัดสมุนไพรในปริมาณที่กำหนด
5. หยอดใส่แม่พิมพ์
6. ทิ้งไว้ให้เย็น

3.2 Jelly (เยลลี่)

ตารางที่ 11 แสดงสูตรตำรับการเตรียมเม็ดอมสมุนไพร (Jelly)

ส่วนที่ 1

สารในตำรับ	ปริมาณที่เตรียม (กรัม)
Sucrose	18.25
Glucose syrup (แบะแซ)	20.0
Water	24.30
Citric acid	0.51
Sodium chloride	qs.

ส่วนที่ 2

สารในตำรับ	ปริมาณที่เตรียม (กรัม)
สารสกัดสมุนไพร	0.50
Gelatin	8.0
Water	14.24

วิธีเตรียม

1. ชั่ง Sucrose , Glucose syrup ตามปริมาณที่กำหนดแล้วละลายน้ำโดยใช้ความร้อนช่วย (1)
2. แบ่งน้ำมาส่วนหนึ่งเพื่อละลาย Citric acid และ Sodium chloride (2)
3. ค่อยๆ โปรยเจลาตินลงในน้ำเย็น ตั้งทิ้งไว้สักพัก แล้วกระตุ้นด้วยความร้อน (3) จนละลาย
4. ผสม (3) ลงใน (1) คนให้เข้ากันอย่างต่อเนื่อง
5. ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิต่ำลง
6. เติม (2) และสารสกัดสมุนไพรโดยเติมกรดเป็นลำดับสุดท้ายเสมอ
7. นำแม่พิมพ์มาทาด้วยกลีเซอรีนเตรียมไว้หยอดใส่แม่พิมพ์
8. ทิ้งไว้ให้เย็น (ถ้ามีฟองอากาศก็ให้ช้อนฟองออก)

3.3 Chocolate (**ช็อคโกแลต**)

ตารางที่ 12 แสดงสูตรตำรับการเตรียมเม็ดอมสมุนไพร (Chocolate)

สารในตำรับ	ปริมาณที่เตรียม (กรัม)
สารสกัดสมุนไพร	0.25
Chocolate base	7.71
Sucrose	10.00

วิธีเตรียม

1. หลอม Sucrose จนละลาย แล้วทิ้งให้อุณหภูมิต่ำลงเล็กน้อย (1)
2. หลอม Chocolate base โดยใช้ความร้อนจากไอน้ำ แล้วนำไปเทลงใน (1)
3. ทิ้งให้อุณหภูมิต่ำลงเล็กน้อย
4. เติมสารสกัดสมุนไพรตามปริมาณที่กำหนด
5. หยอดใส่แม่พิมพ์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4. การประเมินตำรับเม็ดอมสมุนไพร

ทำการประเมินลักษณะทางกายภาพ โดยประเมินรูปร่าง , สี , กลิ่นและรสของตำรับที่เตรียมได้ โดยอาสาสมัคร

3.3 ตำรับแผ่นฟิล์มสมุนไพรเพื่ออนามัยในช่องปาก

3.3.1 วัตถุดิบและสารเคมีในการเตรียมและพัฒนาแผ่นฟิล์มสมุนไพร

1. Tacca flour (ตราหอนาฬิกา) ของเจริญชัย จำหน่าย
2. Xanthan gum (Keltrol®) ของบริษัท ฟาร์ม่า (ไทย) จำกัด
3. Gelatin160 Bloom BP. ของบริษัท วิทยาศรม จำกัด
4. Pectin (Pectin Powder 150®) ของบริษัท ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด
5. Pullulan ของบริษัท Hayashibara จำกัด
6. Carrageenan ของบริษัท วิทยาศรม จำกัด
7. HPMC 4000 BP. ของบริษัท เอกตรงเคมีภัณฑ์ (1985) จำกัด
8. HEC ของบริษัท ฟาร์ม่า (ไทย) จำกัด
9. Glycerin ของบริษัท Italmar จำกัด

10. Listerine® ของบริษัท Pfizer จำกัด
11. น้ำกลั่น
12. สารแต่งสีเขียว (50% Green Pea color)
13. สารแต่งกลิ่นชาเขียว
14. Equal® ของบริษัท เมอร์ริซันท์ (ประเทศไทย) จำกัด
15. สมุนไพรเม็ก

3.3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเตรียมและพัฒนาแผ่นฟิล์มสมุนไพร

1. Magnetic stirrer and magnetic bar
2. Beaker and stirring rod
3. Cylinder
4. Dropper
5. ช้อนเขา
6. Analytical balance (Mettler Toledo)
7. Teflon plate
8. ตู้อบ (Termaks® Model TS 8000)
9. Desiccator (Patron® Dry-Cabinet)
10. Sonicator (Bransonic® Ultresonic Cleaner)
11. Disintegration tester (Erweka® รุ่น ZT52)
12. Thermometer
13. เครื่องวัดความหนาผิวเคลือบ (MINITEST® 600)

3.3.3 วัตถุดิบและสารเคมีในการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก

1. สมุนไพรเม็ก
2. Listerine® ของบริษัท Pfizer จำกัด
3. Base film ที่คัดเลือก
4. Tryptic Soy Broth ของ MERCK
5. Agar ของ MERCK
6. น้ำกลั่น

3.3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก

1. Magnetic stirrer and magnetic
2. Autoclave (Tomy® ES-135)
3. Incubator (Heraeus B 6420)
4. ตู้ Laminar air flow
5. Bunsen burner
6. Micropipette (Transferpipette®)
7. Pipette และลูกยางแดง
8. 0.45 µm Millipore filter
9. Sterile forcep
10. Sterile paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm
11. Cotton swab
12. Inoculating loop and needle
13. Test tube
14. Bottle
15. Beaker and stirring rod
16. Cylinder
17. ช้อนเขา
18. Analytical balance (Mettler Toledo)
19. Petridish
20. Aluminium foil
21. Agar plate
22. Culture tube
23. Foggy
24. Cool room
25. UV Spectrophotometer (Jenway® 6305 UV/Vis Spectrophotometer)
26. Quatz cuvette
27. ไม้บรรทัด

3.3.5 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ

1. การเตรียม Base film ของแผ่นฟิล์ม
2. การพัฒนา Base film ของพอลิเมอร์
3. การประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์ม
4. การบรรจุสมุนไพรลงในแผ่นฟิล์ม
5. การประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก
6. ประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก

1. การเตรียม Base film ของแผ่นฟิล์ม

การเตรียม Base film ของแผ่นฟิล์ม โดยทำการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ได้แก่ Tacca flour, Pectin, Pullulan, Gelatin, HPMC และ Xanthan gum ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียม Base film

วิธีการทดลอง

1. ชั่ง Tacca flour, Pectin, Pullulan และ Gelatin ที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ Tacca flour, Pullulan ร้อยละ 5, 10 และ15 โดยน้ำหนัก Pectin ร้อยละ 10 และ15 โดยน้ำหนักและ Gelatin ร้อยละ 5 และ10 โดยน้ำหนัก ส่วน HPMC ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและ Xanthan gum ร้อยละ 1.67 โดยน้ำหนัก เตรียมพอลิเมอร์ชนิดละ 30 g
2. นำไปต้มและปั่นบน Magnetic stirrer
3. นำสารละลายพอลิเมอร์ที่มีฟองอากาศไปไล่ฟองด้วยวิธีการแช่เย็น หรือ Degas ด้วยเครื่อง Sonicator
4. เทพอลิเมอร์แต่ละชนิดที่ได้ลงใน Teflon plate ขนาด 5 x 8 cm โดยเกลี่ยสารละลายให้มีความหนาสม่ำเสมอกันและบางที่สุด
5. อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ลอกแผ่นฟิล์มออกจาก Teflon plate
7. บันทึกคุณสมบัติทางกายภาพและความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้
8. เก็บแผ่นฟิล์มที่ได้ไว้ภายในตู้ดูดความชื้น

2. **การพัฒนา Base film ของพอลิเมอร์**

ทำการเลือกความเข้มข้นพอลิเมอร์เดี่ยวๆ ที่เหมาะสมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปมาผสมกัน โดยทำการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและความเข้มข้น เพื่อพัฒนาสูตรตำรับได้ Base film ที่เหมาะสม

วิธีการทดลอง

1. ตั้งสูตรตำรับ Base film ที่เหมาะสม และชั่งสารเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักตามที่กำหนดในสูตรตำรับ เตรียมตำรับละ 30 g ซึ่งมีสูตรตำรับดังนี้

ตารางที่ 13 สูตรตำรับ Base film

สูตรตำรับที่	ส่วนประกอบใน Base film							
	Tacca flour	Pectin	Xanthan gum	Gelatin	HPMC	Carrageenan	HEC	Glycerin
1	5%	5%	-	-	-	-	-	-
2	5%	5%	-	-	-	-	-	2%
3	5%	5%	-	-	1.5%	-	-	0.25%
4	10%	5%	-	-	-	-	-	-
5	5%	-	1.67%	-	-	-	-	-
6	10%	-	1.67%	-	-	-	-	-
7	5%	-	-	-	-	5%	-	-
8	5%					5%		2%
9	10%	-	-	-	-	5%	-	-
10	5%	-	-	5%	-	-	-	-
11	5%	-	-	5%	-	-	-	0.25%
12	5%	-	-	5%				2%
13	5%	-	-	10%	-	-	-	-
14				5%				2%
15				5%			5%	2%
16				5%				0.25%
17				10%				2%
18				10%			2%	2%

ตารางที่13 สูตรตำรับ Base film (ต่อ)

สูตรตำรับที่	ส่วนประกอบใน Base film							
	Tacca flour	Pectin	Pullulan	Gelatin	HPMC	PVP90	HEC	Glycerin
19	5%	-	10%	-	-	-	-	-
20	5%	-	10%	-	-	-	-	0.25%
21	-	5%	10%	-	-	-	-	-
22	-	-	10%	2%	-	-	-	-
23	-	-	10%	-	-	2%	-	-
24	-	-	10%	-	-	-	2%	-
25	-	-	10%	-	1.5%	-	-	-
26			10%	-	1.5%	-	-	0.25%
27	-	-	10%	-	1.5%	-	-	1%
28	-	-	10%	-	1.5%	-	-	2%
29	-	-	-	5%	-	5%	-	2%
30	-	-	-	10%	-	2%	-	2%

2. นำไปต้มและปั่นบน Magnetic stirrer
3. นำตำรับที่มีฟองอากาศไปไล่ฟองด้วยวิธีการแช่เย็น หรือ Degas ด้วยเครื่อง Sonicator
4. เทแต่ละตำรับที่ได้ลงใน Teflon plate ขนาด 5 x 8 cm โดยเกลี่ยสารละลายให้มีความหนาสม่ำเสมอกันและบางที่สุด
5. อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ลอกแผ่นฟิล์มออกจาก Teflon plate
7. บันทึกคุณสมบัติทางกายภาพและความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้
8. เก็บแผ่นฟิล์มที่ได้ไว้ภายในตู้ดูดความชื้น

3. การประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์ม

3.1 วัดความหนาของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องวัดความหนาผิวเคลือบ (MINITEST® 600) การวัดความหนาของแผ่นฟิล์มวัดเป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.2 วัดความร่อน โดยดูจากความสามารถในการลอกออกจาก Teflon plate ได้ง่าย

3.3 วัดอัตราเร็วการละลายของแผ่นฟิล์มในน้ำ โดยใช้เครื่อง Disintegration tester

การวัดอัตราเร็วการละลายของแผ่นฟิล์มในน้ำ โดยใช้เครื่อง Disintegration tester เนื่องจากแผ่นฟิล์มจัดเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในการทดสอบการละลายที่แน่นอน แต่สภาวะการละลายของแผ่นฟิล์มมีความคล้ายคลึงกับการแตกตัวของยาเม็ดชนิดแตกตัวเร็วในปาก ดังนั้น การใช้เครื่อง Disintegration tester ทดสอบเช่นเดียวกับยาเม็ดชนิดแตกตัวเร็วในปากจะช่วยให้สังเกตการละลายของแผ่นฟิล์มได้อย่างชัดเจน และวัดอัตราเร็วได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้การใช้เครื่อง Disintegration tester ยังสามารถควบคุมปัจจัยได้หลายทางให้คล้ายคลึงกับร่างกาย ทั้งทางด้านการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เท่ากับอุณหภูมิร่างกาย และมีการใช้น้ำเป็น medium ซึ่งมี pH ใกล้เคียงกับน้ำลาย

วิธีการทดลอง

1. เติมน้ำกลั่นใน Beaker ที่ใช้เฉพาะกับเครื่อง Disintegration tester (Erweka® รุ่น ZT52) ตามมาตรฐานเภสัชตำรับอังกฤษ (BP) ปริมาตร 600 ml
2. ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 $\pm$ 0.5 °C
3. นำแผ่นฟิล์มตำรับที่ต้องการทดสอบ ขนาด 2 x 3 cm และแผ่นฟิล์ม Listerine® มาตำรับละ 3 แผ่น ใส่ลงใน Basket rack ช่องละ 1 แผ่น และใส่ Disk ลงไปด้วย เพื่อป้องกันการลอยตัวของแผ่นฟิล์ม
4. เริ่มการทำงานของเครื่อง และสังเกตการละลายของแผ่นฟิล์ม
5. บันทึกเวลาที่แผ่นฟิล์มแต่ละแผ่นละลายหมด

4. การบรรจุสมุนไพรลงในแผ่นฟิล์ม

วิธีการทดลอง

1. คัดเลือกตำรับ Base film พอลิเมอร์ที่เหมาะสม คือ มีความหนาแผ่นฟิล์มอยู่ในช่วง 40-60 μm มีความร่อนง่าย มีความกรอบและแข็งน้อย-ปานกลาง โดยเตรียมปริมาณประมาณ 95 g

2. บรรจุสารสกัดสมุนไพรเม็กที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายลง Base film พอลิเมอร์ที่คัดเลือก โดยใช้ความเข้มข้นของสมุนไพรเม็กเท่ากับ 2 เท่าของ MIC คือ 5 mg/ml
3. แต่งกลิ่น และรส ถ้าตำรับมีฟองอากาศให้ไล่ฟองด้วยเครื่อง Sonicator
4. เทตำรับที่ได้ลงใน Teflon plate ขนาด 5 x 8 cm โดยเกลี่ยสารละลายให้มีความหนาสม่ำเสมอกันและบางที่สุด
5. อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ลอกแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กออกจาก Teflon plate
7. บันทึกคุณสมบัติทางกายภาพและความหนาของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กที่ได้
8. เก็บแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กที่ได้ไว้ภายในตู้ดูดความชื้น

5. **การประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก**

1.5.1 วัดความหนาของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กด้วยเครื่องวัดความหนาผิวเคลือบ (MINITEST® 600)

การวัดความหนาของแผ่นฟิล์มวัดเป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

1.5.2 วัดความร่อน โดยดูจากความสามารถในการลอกออกจาก Teflon plate ได้ง่าย

1.5.3 วัดอัตราเร็วการละลายของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กในน้ำ โดยใช้เครื่อง Disintegration tester

การวัดอัตราเร็วการละลายของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กในน้ำ เพื่อเปรียบเทียบว่าหลังจากที่มีการเติมสมุนไพรเม็กลงใน Base film แล้วอัตราการละลายของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กแตกต่างจากเดิมหรือไม่

วิธีการทดลอง

1. เติมน้ำกลั่นใน Beaker ที่ใช้เฉพาะกับเครื่อง Disintegration tester (Erweka® รุ่น ZT52) ตามมาตรฐานเภสัชตำรับอังกฤษ (BP) ปริมาตร 600 ml
2. ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 $\pm$ 0.5 °C
3. นำแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก ขนาด 2 x 3 cm มาทดสอบการละลาย โดยใส่ลงใน Basket rack ช่องละ 1 แผ่น และใส่ Disk ลงไปด้วย เพื่อป้องกันการลอยตัวของแผ่นฟิล์ม
4. เริ่มการทำงานของเครื่อง และสังเกตการละลายของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก
5. บันทึกเวลาที่แผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กแต่ละแผ่นละลายหมด

6. การประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Streptococcus faecalis* ATCC 29212
3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

วิธีการทดลอง

นำแผ่นฟิล์มสมุนไพรมาประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ โดยใช้วิธี Disc-diffusion assay เพื่อประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. faecalis* และ *B. subtilis* ได้เช่นเดียวกับสมุนไพรเม็ก

1. นำ Base film, แผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก, สารสกัดเม็ก และ Listerine® มาละลายด้วยน้ำ จากนั้นกรองด้วย 0.45 µm Millipore filter ในตู้ Laminar air flow
2. ทำสัญลักษณ์แทนตำแหน่งต่างๆ บน Agar plate โดย

   1 = Base film (Negative control)

   2 = แผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็ก

   3 = สารสกัดเม็ก (Positive control)

   4 = Listerine®
3. จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 25 µl ลง Sterile paper disc ปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วกลับด้านพร้อมหยดสารลายซ้ำอีกครั้งด้วยปริมาณ 25 µl และปล่อยไว้ให้แห้ง
4. เตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบ โดยเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth (TSB) แล้วปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5
5. ทำการ Swab โดยใช้ Cotton swab จุ่มเชื้อ แล้ว spread ลงบน Tryptic Soy Agar (TSA)
6. วาง Paper disc ที่แห้งแล้วลงบน Plate จากนั้นนำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 24 ชั่วโมง
7. วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone