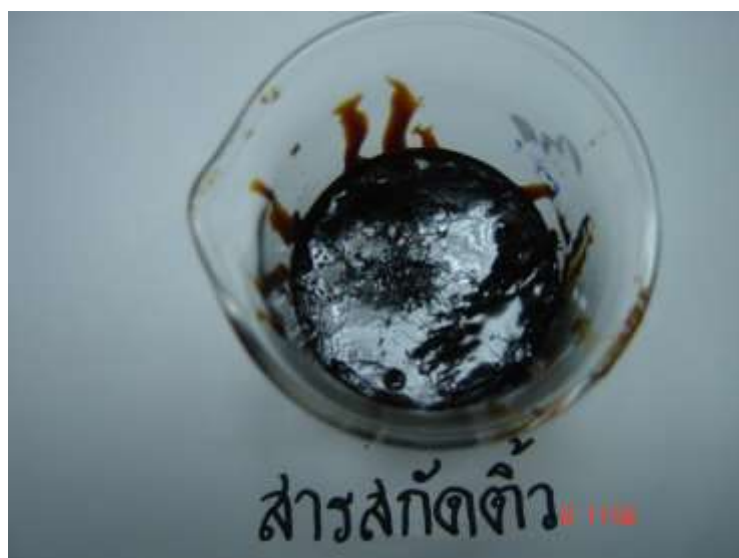


ภาคผนวก

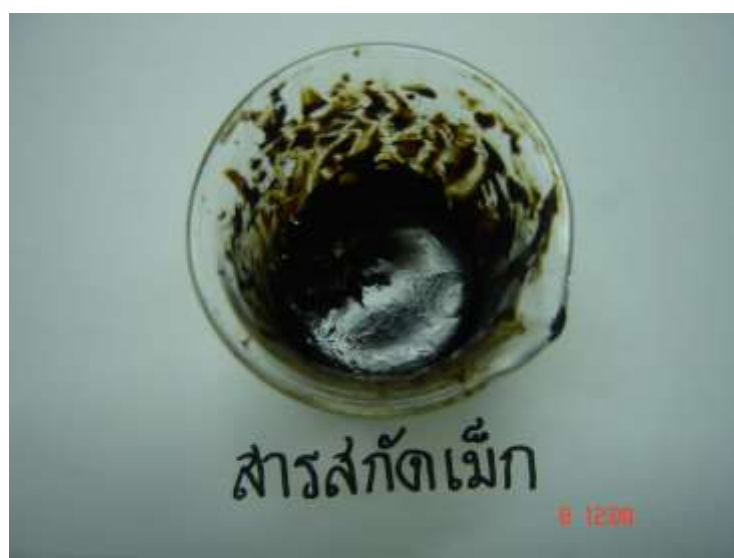
(Appendix)

1. ตำรับยาเม็ดสมุนไพรต้านออกซิเดชัน

1.1 การสกัดสารจากผักต้ว เม็ก และกระโดน



รูปที่ 23 สารสกัดต้ว



รูปที่ 24 สารสกัดเม็ก



รูปที่ 25 สารสกัดกระโดน

1.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดตัว เม็ก และกระโดน ด้วยวิธี
Folin-Ciocalteu



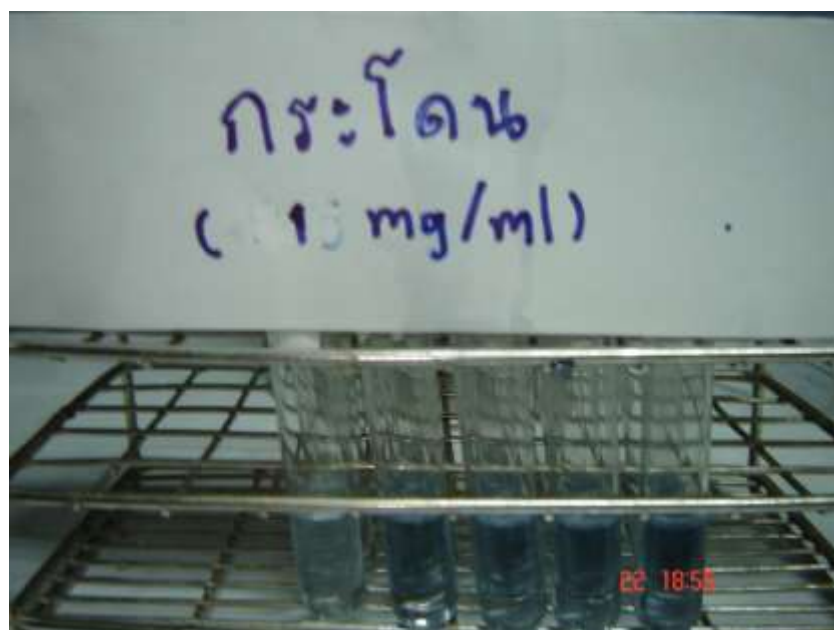
รูปที่ 26 แสดงสารละลาย tannic acid 0.1 mg/ml เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 27 แสดงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดตัว (1 mg/ml)



รูปที่ 28 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดแม็ก (5 mg/ml)



รูปที่ 29 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดกระโดน (1 mg/ml)

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay



รูปที่ 30 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของวิตามินซี (0.1 mg/ml)



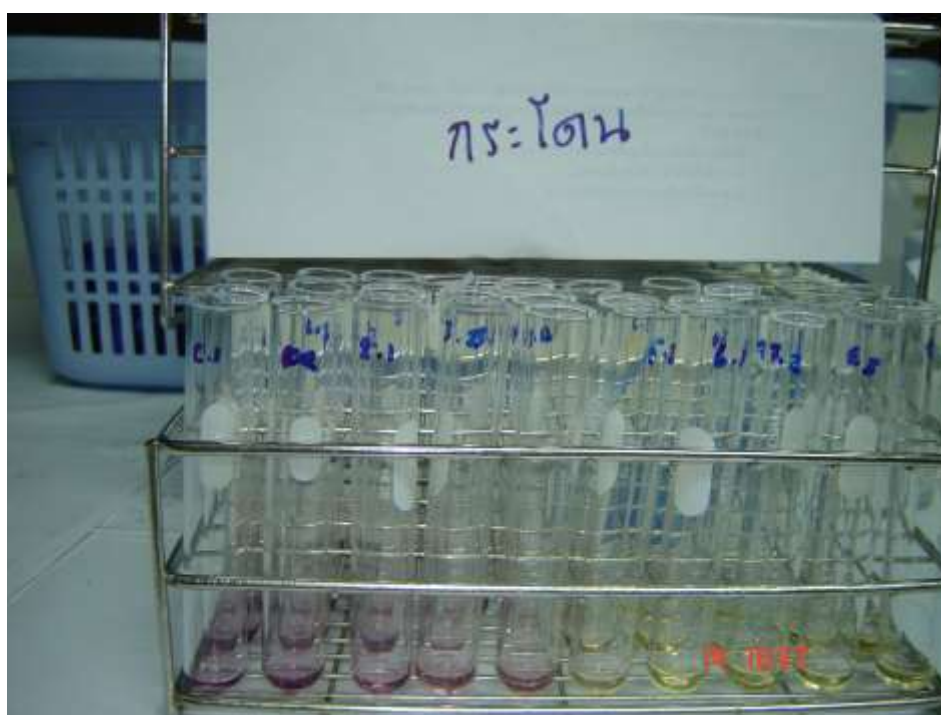
รูปที่ 31 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ trolox (0.1 mg/ml)



รูปที่ 32 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดตัว (1 mg/ml)



รูปที่ 33 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมือก (1 mg/ml)



รูปที่ 34 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระโดน (1 mg/ml)

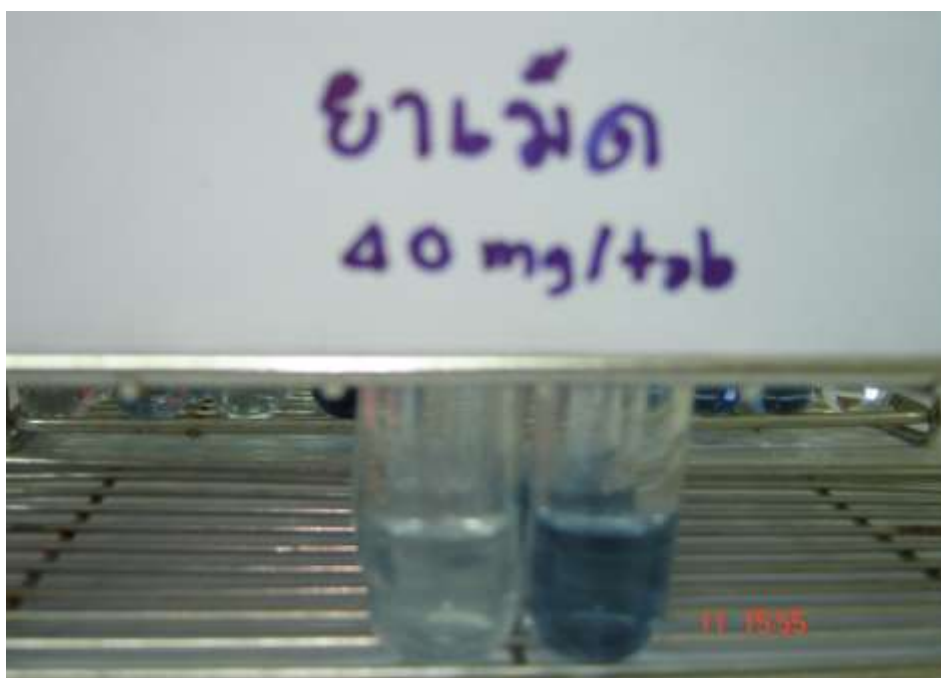
1.4 ตำรับยาเม็ด



รูปที่ 35 แสดงยาเม็ดตำรับที่ 1



รูปที่ 36 แสดงยาเม็ดตำรับที่ 2



รูปที่ 37 แสดงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด ตำรับที่ 1



รูปที่ 38 แสดงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด ตำรับที่ 2

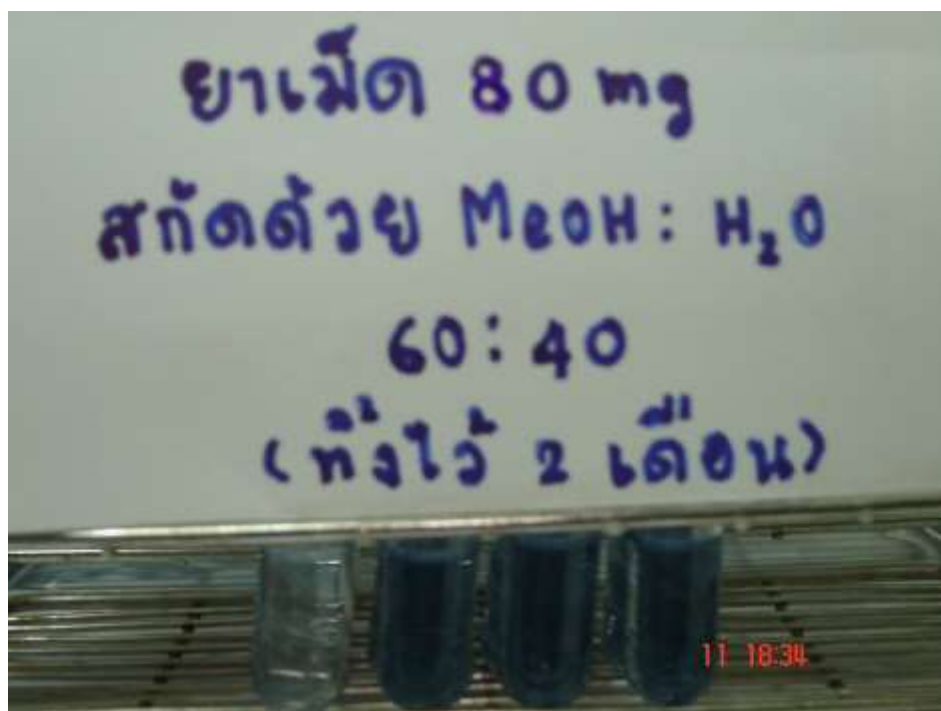
1.5 การทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดและตำรับยาเม็ด



รูปที่ 39 แสดงการทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิก
ในสารสกัดกระโดน (1 mg/ml)



รูปที่ 40 แสดงการทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ดตำรับที่ 1 (5 mg/ml)



รูปที่ 41 แสดงการทดสอบความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ดตำรับที่ 2 (5 mg/ml)

2. ดำรับลูกอมสมุนไพรกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

การเตรียมแอลกอฮอล์ 70 % จากแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาณ 1000 มล.

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 95 \times V_1 &= 70 \times 1000 \\ V_1 &= 736.8 \end{aligned}$$

ดังนั้นตวงแอลกอฮอล์ 95 % มา 736.8 มล. แล้วปรับด้วยน้ำให้ครบ 1000 มล.

การคำนวณ % Yield ของสารสกัดสมุนไพร

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{ปริมาณสารสกัดสมุนไพรที่ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้นของสมุนไพร 200 กรัม}}$$

การเตรียม Trypan blue 0.4 %

ชั่ง Trypan blue 0.4 กรัม ลงใน flask



เติม Distilled water 100 มล.



Swirl flask จน Trypan blue ละลายหมด



เก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม ACK lysing solution 1000 มล.

สารเคมี

1. NH_4Cl 8.29 กรัม

2. KCO_3 1.00 กรัม

3. Na_2EDTA 37.2 กรัม

วิธีเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณที่กำหนด



ละลายด้วย Distilled water ประมาณ 800 มล.

สูตรการคำนวณ ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว/มล. = จำนวนเซลล์เฉลี่ย x dilution factor x 10^4

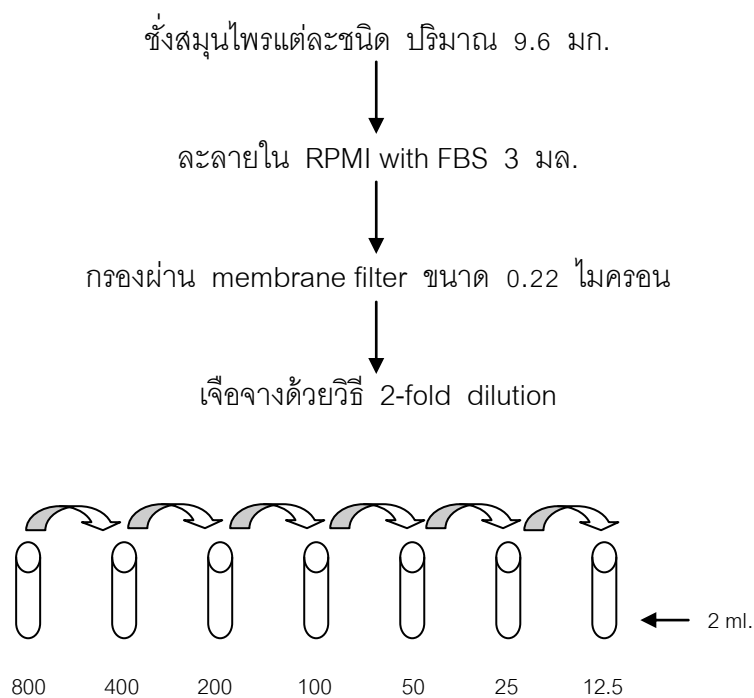
การคำนวณ % viable

$$\% \text{ viable} = \frac{\text{viable} \times 100}{\text{Total}}$$

การเตรียมสุมุนไพร

ความเข้มข้น : 800 , 400 , 200 , 100 , 50 , 25 , 12.5 , 0 $\mu\text{g/ml}$

วิธีเตรียม



ตารางที่ 51 แสดงค่าการเจือจางสารสกัดสมุนไพร

No.	Conc.($\mu\text{g/ml}$)	MTT (4x) (50 μl)
1	3,200	800
2	1,600	400
3	800	200
4	400	100
5	200	50
6	100	25
7	50	12.5
8	25	-

การเตรียม PHA Stock Solution

PHA + sterile PBS 10 ml aliquot tube ละ 1 ml เก็บที่ -20°C

การเตรียม PWM Stock Solution

PWM 5 mg + sterile PBS 5 ml = conc. 1 mg/ml aliquot tube ละ 0.5 ml เก็บที่ -20°C

การเตรียม PHA working Solution

PHA 1 : 100 (4x)

PHA 1 : 25 $\rightarrow$ PHA 120 μl + RPMI 2880 μl (2 plates)

การเตรียม PWM working Solution

PWM 1 $\mu\text{g/ml}$ (4x)

PWM 4 $\mu\text{g/ml}$ $\rightarrow$ PWM 12 μl + RPMI 2988 μl (2 plates)

การเติมสารลงใน 96 well plates

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Media 200 →	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Background
	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Media 100 + Cell 100 →	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Cytotoxic
	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Media 50 + PHA 50 + Cell 100 →	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PHA
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Media 50 + PWM 50 + Cell 100 →	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PWM
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

1. Background : extract 50 + media 50
2. Cytotoxic : extract 50 + media 50 + cell 100
3. PHA : extract 50 + PHA 50 + cell 100
4. PWM : extract 50 + PWM 50 + cell 10

3. ดำรับแผ่นฟิล์มสมุนไพรเพื่ออนามัยในช่องปาก

1.การสกัดสมุนไพรเม็ก (ธัญญาพร สุภักดีและคณะ, 2549)

ส่วนที่ใช้ : ใบและยอดอ่อน

วิธีการทดลอง

1. ชั่งผักเม็กที่สับละเอียดแล้ว 200 กรัม หมักใน 70%ethanol 300 ml ใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ป้องกันแสง)
2. เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 °C (สารสกัดส่วนที่ 1)
3. หมักอีกครั้งด้วย 70%ethanol 300 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaking Water Bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ป้องกันแสง)
4. เทสารละลายใน flask ออก แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 °C (สารสกัดส่วนที่ 2)
5. นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยตั้งอุณหภูมิไม่เกิน 40 °C ซึ่งจะได้สารสกัดเป็น crude drug
6. เก็บสารสกัดที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 °C

ผลการทดลอง

การใช้ผักเม็ก 200 g จะได้ crude drug ประมาณ 6.38 g

2.ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นของสมุนไพรเม็ก (เกศริน เงินหมื่นและคณะ, 2549)

ตารางที่ 52 Inhibition zone ที่พบในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดเม็ก

เชื้อ	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.fecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>PS.aruginosa</i>	<i>S.thyphimurium</i>	<i>C.albican</i>	<i>A.niger</i>
เม็ก	++	++	++	-	-	-	-	-
Tetracycline	++	++	++	++	++	++	N	N
Ampicillin	++	++	++	N	N	N	N	N
Amphotercin B	N	N	N	N	N	N	++	++
ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่เกิด clear zone

+

++ หมายถึง เกิด clear zone เกิน 7 mm

N หมายถึง ไม่ได้วาง disc

ตารางที่ 53 ผลการทดสอบ MIC (mg/ml) ของสมุนไพร

เชื้อ	MIC (mg/ml)		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. fecalis</i>
สมุนไพร	2.5	3.33	2.08

3.การคำนวณปริมาณสมุนไพรลงใน Base film

วิธีการคำนวณ

จาก Teflon plate ขนาด $5 \times 8 \text{ cm} = 40 \text{ cm}^2$ มี Base film น้ำหนักเฉลี่ย 6.5 g
 แผ่นฟิล์มขนาด $2 \times 3 \text{ cm} = 6 \text{ cm}^2$ มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ $\frac{6 \times 6.5}{40} = 0.975 \sim 1 \text{ g}$

ความเข้มข้นของสารละลายเม็ทต่อแผ่นฟิล์ม 1 แผ่น = 5 mg/ml

แผ่นฟิล์มน้ำหนัก 1 g มีสารละลายเม็ท 5 mg

แผ่นฟิล์มน้ำหนัก 1 g มีสารละลายเม็ท $5 \times 100 = 500 \text{ mg/1 แผ่น}$

4.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 TSB : Tryptic Soy Broth

วิธีการเตรียม

1. ชั่งผง Tryptic Soy Broth 30 g ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ $70-80^\circ\text{C}$ ปริมาตร 1,000 ml โดยคนตลอดเวลาจนได้สารละลายสีเหลืองใส
2. นำไป Autoclave ที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

4.2 TSA : Tryptic Soy Agar

วิธีการเตรียม

1. ชั่งผง Tryptic Soy Broth 30 g และผง Agar 15 g ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ $70-80^\circ\text{C}$ ปริมาตร 1,000 ml โดยคนตลอดเวลาจนได้สารละลายสีเหลืองใส
2. นำไป Autoclave ที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

5.การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบ คือ *S. aureus*, *S. faecalis* และ *B. subtilis*

วิธีการเตรียม

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน Tryptic Soy Agar แล้วเชยเชื้อจากหลาย Colony บน Agar plate ลงใน Tryptic Soy Broth 20 ml
2. นำไปเพาะบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นเจือจางด้วย Tryptic Soy Broth แล้ววัดให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 หรือ OD = 0.117 ที่ความยาวคลื่น 580 nm

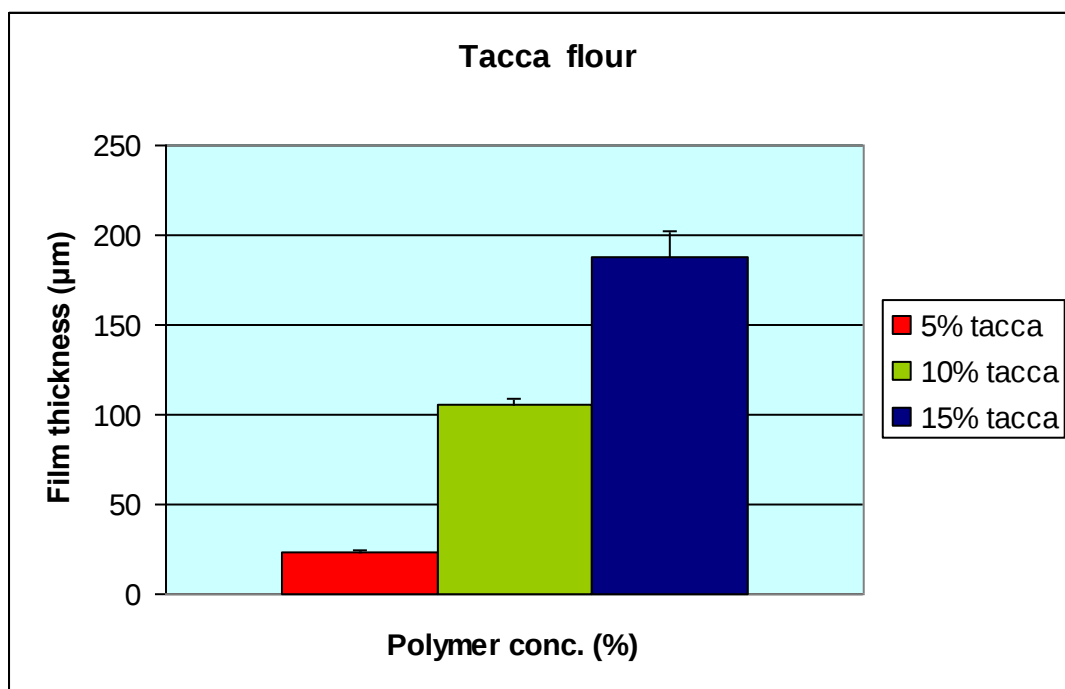
6.ผลการทดลองวัดปริมาตรน้ำลายในปากใน 1 นาที

น้ำหนักผ้าก๊อชก่อนอม = 0.48 g

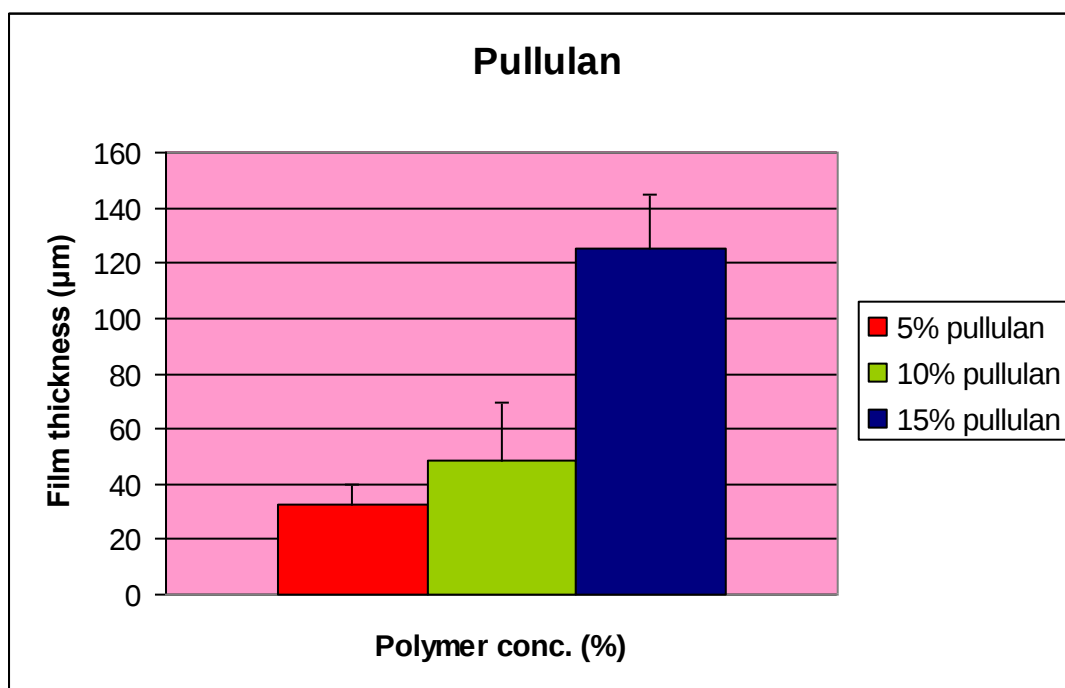
ตารางที่ 54 ผลการทดลองวัดปริมาตรน้ำลายในปาก

อาสาสมัคร	น้ำหนักผ้าก๊อชหลังอม(g)	น้ำหนักน้ำลายในปาก (g/min)
1	0.94	0.46
2	2.29	1.86
3	1.76	1.28
4	0.83	0.35
5	0.86	0.38
6	1.41	0.93
7	0.97	0.49
8	1.49	1.01
9	1.36	0.88
10	1.05	0.57
Mean	-	0.82

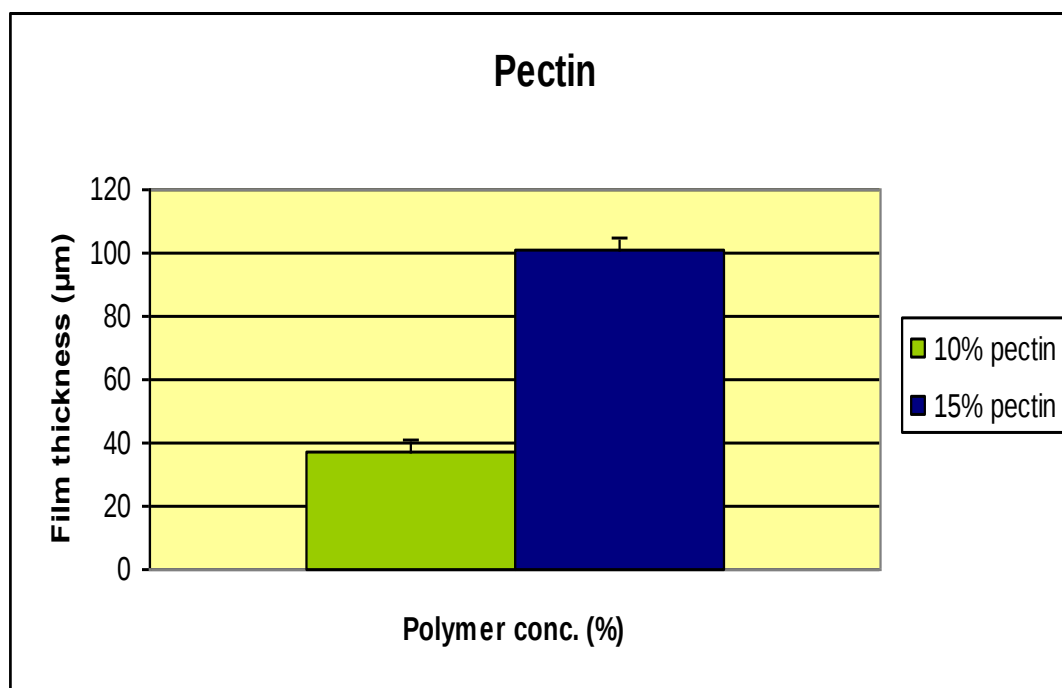
7. กราฟแสดงผลการทดลอง



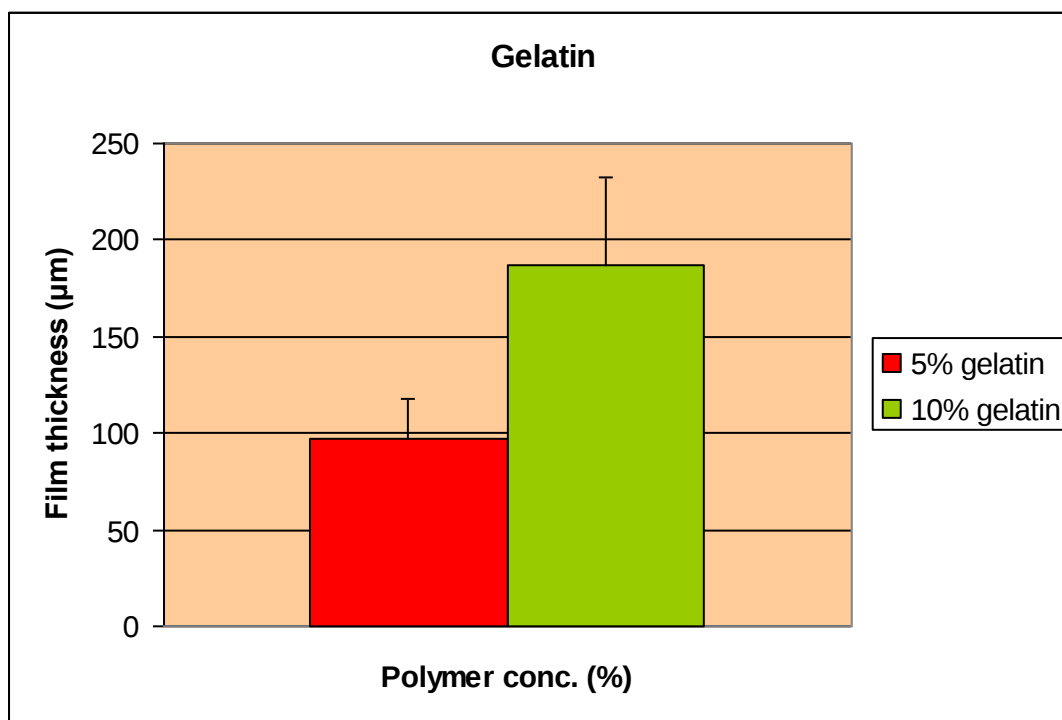
รูปที่ 42 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก Tacca flour
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



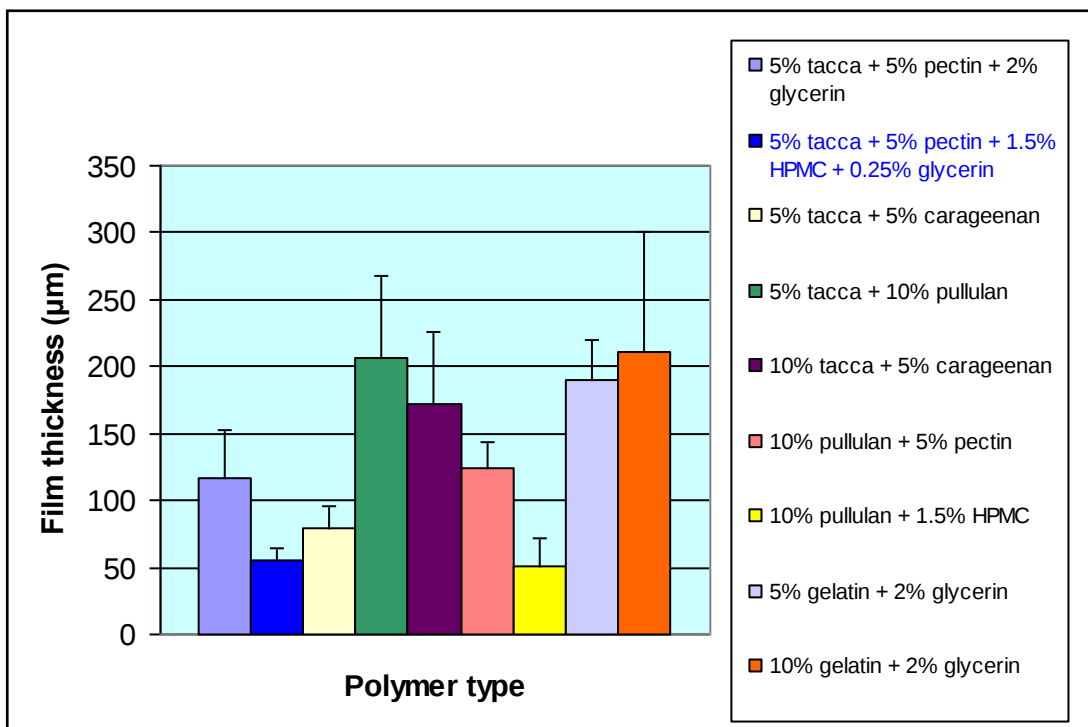
รูปที่ 43 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก Pullulan
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



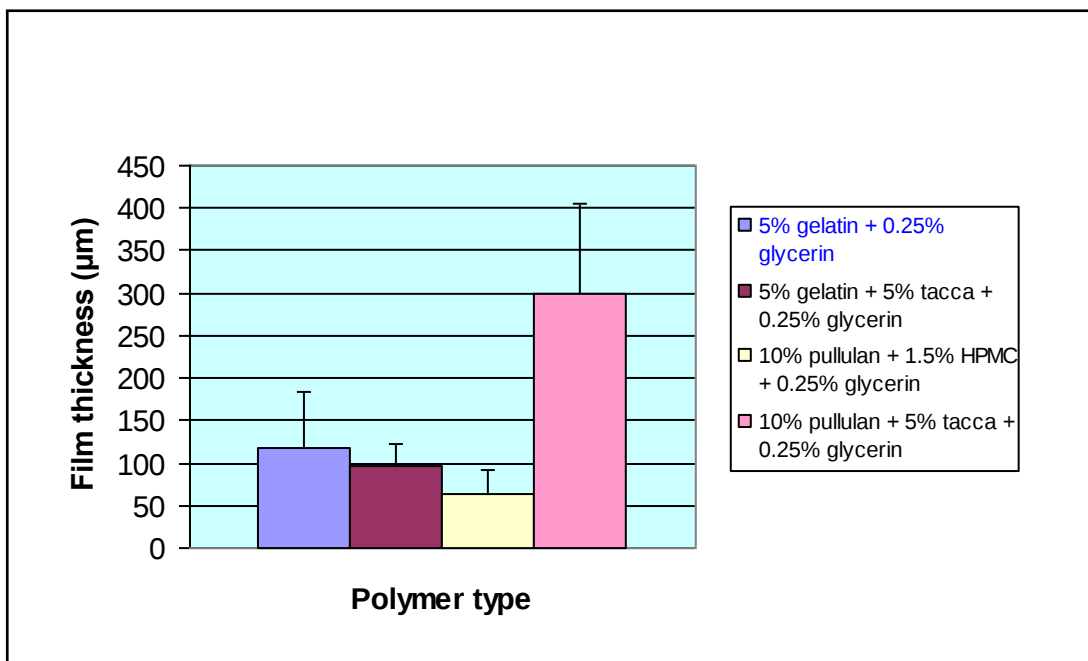
รูปที่ 44 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก Pectin
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



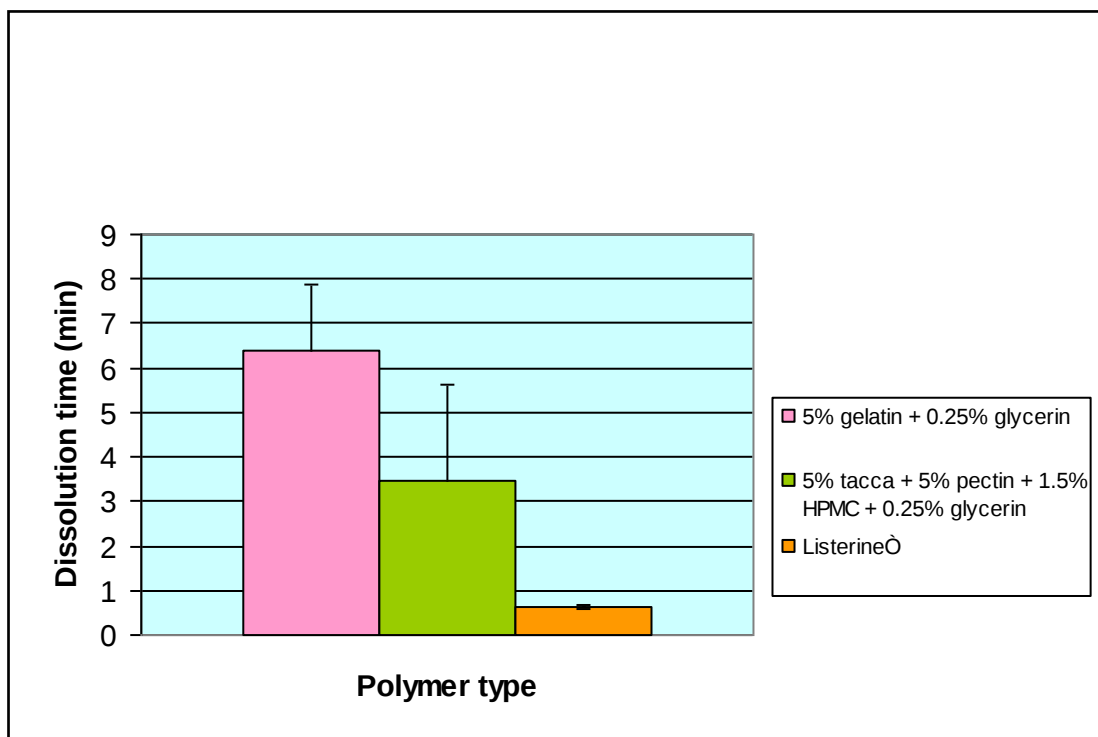
รูปที่ 45 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก Gelatin
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



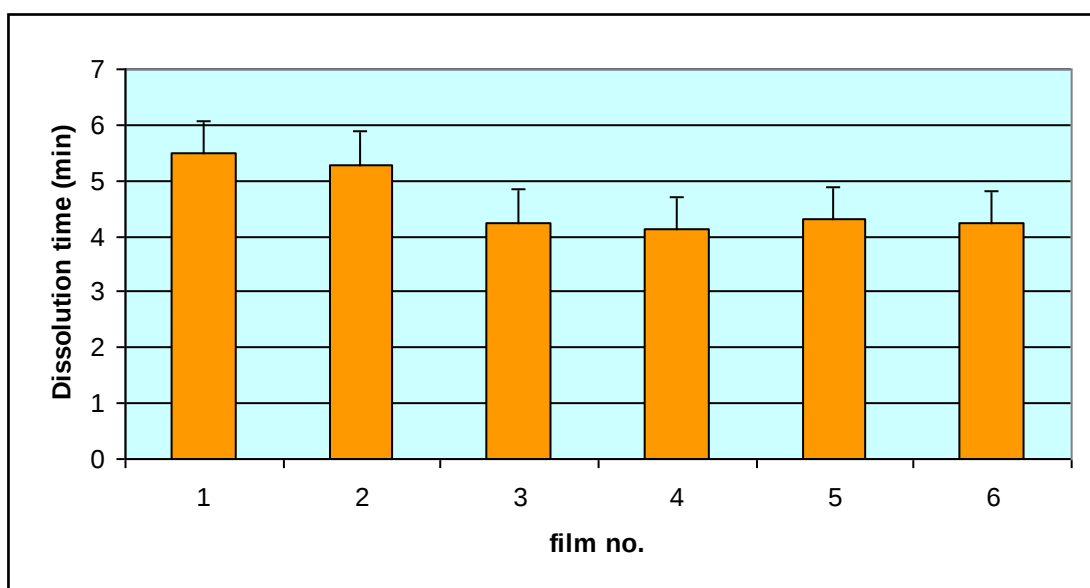
รูปที่ 46 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจากพอลิเมอร์
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



รูปที่ 47 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่เตรียมจากพอลิเมอร์
ความเข้มข้นต่างๆ (n = 5)



รูปที่ 48 กราฟแสดงระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการละลาย Base film (n=4)



รูปที่ 49 กราฟแสดงระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการละลายแผ่นฟิล์ม (n=6)

8.ฉลากแผ่นฟิล์มสมุนไพร

ส่วนประกอบ : สารสกัดเม็ก, Tacca flour, Pectin, HPMC, Glycerin, Equal[®], สารแต่งสีเขียว (50% Green Pea color) และสารแต่งกลิ่นชาเขียว

วิธีใช้ : ดึงแผ่นฟิล์มสมุนไพรออกจากตลับ จากนั้นวางแผ่นฟิล์มสมุนไพรลงบนลิ้นและปล่อยให้ละลาย สามารถใช้แผ่นฟิล์มมากกว่าหนึ่งแผ่นติดต่อกันได้ทันทีเพื่ออนามัยในช่องปาก

คำเตือน : ไม่เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคฟีนิลคีโตซูเรีย (Phenylketonuria)

การเก็บรักษา : เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 15 – 25 °C และหลีกเลี่ยงการเก็บในที่ชื้นหรือร้อนจัด



รูปที่ 50 แผ่นฟิล์มสมุนไพร