



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาเจลไวต์ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชันชันโรงสำหรับช่องปาก

Development of thermal sensitive in situ gel loading stingless bee's propolis
extract for buccal cavity

โดย

นสภ.ภัทราวดี	เวียงจันทา	55210073
นสภ.มาริสสา	เผือกพิพัฒน์	55210074
นสภ.นรพนธ์	เอกภูธร	55210094

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาเจลไวต์ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชันชันโรงสำหรับช่องปาก

Development of thermal sensitive in situ gel loading stingless bee's propolis
extract for buccal cavity

โดย

นสภ.ภัทราวดี	เวียงจันทา	55210073
นสภ.มาริสสา	เผือกพิพัฒน์	55210074
นสภ.นรพนธ์	เอกภูธร	55210094

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ปัจจุบันมีการนำเจลที่ไวต่ออุณหภูมิมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆมากยิ่งขึ้น เช่น เครื่องสำอาง ยา และเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษของเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ สามารถก่อตัวเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิร่างกาย เกาะติดเยื่อผิวได้ดี จึงได้นำคุณสมบัติพิเศษดังกล่าวมาใช้ในพัฒนาตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ เพื่อความสะดวกและความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย มีการศึกษาที่มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาบรรจุในเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ เช่น ชันชันโรง ซึ่งมีสารสำคัญหลักคือ แอลฟาแมงโกสติน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ เป็นต้น

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชันชันโรงสำหรับช่องปาก ที่บรรจุสารสกัดชันชันโรง ศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยสารสกัดจากตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญคือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นทางเลือกทางการแพทย์ในอนาคต

คณะผู้วิจัย

วันที่ 9 ธันวาคม 2559

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การพัฒนาเจลไวต์ต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงสำหรับช่องปาก

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-----------------|-------------|---------------|
| 1. นสภ.ภัทราวดี | เวียงจันทน์ | รหัส 55210073 |
| 2. นสภ.มาริสสา | เผือกพัฒนา | รหัส 55210074 |
| 3. นสภ.นรพนธ์ | เอกภูธร | รหัส 55210094 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์
2. ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการพัฒนาออกแบบระบบการนำส่งยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยของยาและทำให้ยาออกฤทธิ์เนิ่น โดยความน่าสนใจของ Poloxamer 407 (P407) เป็นเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิในการก่อเจลและมีความเข้ากันได้กับร่างกาย อย่างไรก็ตาม P407 ยังมีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อไม่เพียงพอ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การพัฒนาตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิโดยใช้ P407 และพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อ เช่น sodium carboxymethylcellulose (SCMC), chitosan-hydroxybenzotriazole (CS-HOBt) and carbopol 940 (C940) ร่วมกับสารสกัดชั้นชั้นโรง (SBP) ในเอทานอลร้อยละ 0.2 สำหรับช่องปาก ตำรับยาเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมนำไปประเมินอุณหภูมิในการก่อเจล คุณสมบัติทางกายภาพ การปลดปล่อยสารสำคัญ คุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ตำรับที่เหมาะสมจะประกอบไปด้วย 0.2% SBP ใน 15% P407/0.05% SCMC, 0.2% SBP ใน 15% P407/1.5 % CS-HOBt และ 0.2% SBP ใน 15% P407/0.025% C940 โดยตำรับ 0.2% SBP ใน 15% P407/1.5 % CS-HOBt มีค่า pH เท่ากับ 4.47 และมีรูปแบบของการปลดปล่อยเป็น Korsmeyer – Peppas ส่วนตำรับอื่น ๆ รูปแบบของการปลดปล่อยเป็น Higuchi นอกจากนี้ 0.2% SBP ใน 15% P407/1.5 % CS-HOBt มีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตำรับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิซึ่งบรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงร้อยละ 0.2 และมีคุณสมบัติยึดติดเนื้อเยื่อนี้ อาจจะมีศักยภาพที่จะประยุกต์ใช้ในการนำส่งยาในช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2016

Title: Development of thermal sensitive in situ gel loading stingless bee's propolis extract for buccal cavity

By

- | | | |
|--------------------|--------------|-------------|
| 1. Miss.Patrawadee | Wiangchanda | ID 55210072 |
| 2. Miss. Marissa | Phuekphiphut | ID 55210074 |
| 3. Mr. Noraphon | Eakputor | ID 55210094 |

Advisor:

1. Dr.Natthan Charernsriwilaiwat
2. Assistant prof. Dr. Boonyadist Vongsak

.....

Abstract

Recently, controlled and sustained drug delivery has become the standard in modern pharmaceutical design. This interest has been shown by in situ gel forming polymeric delivery systems like a Poloxamer 407 (P407), which has excellent thermo-sensitive gelling properties and biocompatibility. However, this gel was inadequate mucoadhesive property. Hence the aim of recent study was to develop thermosensitivity gel by used P407 and mucoadhesive polymer such as sodium carboxymethylcellulose (SCMC), chitosan-hydroxybenzotriazole (CS-HOBt) and carbopol 940 (C940) with 0.2% ethanoic stingless bee's propolis extract (SBP) for buccal cavity. The in situ gel formulation had produced to assess thermoresponsive behaviour ($T_{Sol-Gel}$), physical properties, release, mucoadhesive and antioxidant property. Most of formulation display suitable use for oral application that only compose of 0.2% SBP in 15% P407/0.05% SCMC, 0.2% SBP in 15% P407/1.5 % CS-HOBt and 0.2% SBP in 15% P407/0.025% C940. Among the formulation 0.2% SBP in 15% P407/1.5 % CS-HOBt showed a pH value of 4.47 and release profile fit to Korsmeyer – Peppas model that others was release profile fit to Higuchi model. Furthermore, 0.2% SBP in 15% P407/1.5 % CS-HOBt was the most mucoadhesive and antioxidant properties ($P \leq 0.05$) more than the others. In conclusion, these mucoadhesive thermo-sensitive gels with 0.2% SBP extract may have potential to apply in buccal drug delivery.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ภก.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษาเพิ่มเติมและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบุคลากรคณะเภสัชศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยทุกๆ ด้าน และขอขอบพระคุณที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และสุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนและการทำวิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
Abstract	๙
กิตติกรรมประกาศ	๑๑
สารบัญเรื่อง	๑๓
สารบัญตาราง	๑๕
สารบัญภาพ	๑๖
สารบัญภาคผนวก	๑๗
สารบัญตารางภาคผนวก	๑๘
สารบัญภาพผนวก	๑๙
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	43
บทที่ 4 ผลการวิจัย	56
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	75
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	85

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งจุลชีพของชั้น ชั้นโรงแ	7
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบ mucoadhesive พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็น bioadhesive	18
ตารางที่ 3 การเตรียมความเข้มข้น standard curve โดยใช้สารมาตรฐาน แอลฟาแมงโก สติน	52
ตารางที่ 4 Mobile phase ของเครื่อง HPLC	53
ตารางที่ 5 Gradients Programmed	53
ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) ของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)	57
ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้น %w/w ของเอทานอล ที่ส่งผลต่อความขุ่น - ใสที่ความเข้มข้น ของ P407 15 % และ 16 %w/w ตามลำดับ	58
ตารางที่ 8 แสดงสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$)	59
ตารางที่ 9 แสดงสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) ที่ บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงแ	60
ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) ของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS	61
ตารางที่ 11 แสดงรหัสตามสูตรตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ	62
ตารางที่ 12 แสดงสูตรตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ	62

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะความใส สีของตำรับ	63
ตารางที่ 14 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงเปรียบเทียบกับ ascorbic acid ด้วยวิธี DPPH ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})	67
ตารางที่ 15 แสดงความเข้มข้นของตำรับยาเจลไวต์ต่ออนุมูลอิสระที่บรรจุและไม่ได้บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรง ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})	68
ตารางที่ 16 แสดงปริมาณสาระสำคัญของแอลฟาแมงโกสติน (Alpha mangostin) ในตำรับยาเจลที่ไวต์ต่ออนุมูลอิสระ	69
ตารางที่ 17 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์การคำนวณปลดปล่อยสะสมของสารแอลฟาแมงโกสติน	70
ตารางที่ 18 แสดงแรงในการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลที่ไวต์ต่อการเปลี่ยนแปลงของอนุมูลอิสระ	73

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสาร Alpha-mangostin และ Beta-mangostin	8
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม Flavonoids ที่พบในชั้นชั้นโรง	8
รูปที่ 3 พอลิเมอร์ที่มี (a) อุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบต่ำสุด (LCST) และ (b) อุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบสูงสุด (UCST)	14
รูปที่ 4 เครื่องทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อสำหรับ Texture Analyzer เทคนิค	34
รูปที่ 5 เครื่องมือ Smart สำหรับทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อสำหรับ	35
รูปที่ 6 .According to Parodi : a: disc; b: glass beaker; c: gel; d: moving platform; e: stopper; f: counterbalance; g: preload; h: pump	36
รูปที่ 7 .According to Park and Robinson a modified surface tensiometer for an in vitro evaluation of bioadhesion	36
รูปที่ 8 แผนภาพของ Tensile apparatus ในการกำหนดความแข็งแรงของแรงยึดติด	37
รูปที่ 9 Schematic drawing of the tensile stress tester	38
รูปที่ 10 ส่วนประกอบของ AFM และที่ดัดแปลงสำหรับการวัดแรงยึดติดแรงระหว่างพอลิเมอร์และพื้นผิวเยื่อเมือก	39
รูปที่ 11 Cone and plate rheometer	40
รูปที่ 12 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการปล่อยปลดของ Adamo F. et al; A) Dropper, B) Porcine Mucosa and gel, C) Receiving Compartment, D) Pump, E) UV Detector	41
รูปที่ 13 แสดง modified Franz diffusion cell	42

ญ

รูปที่ 14 แสดง 96 well plate ที่บรรจุสารทดสอบ DPPH radical	51
รูปที่ 15 แสดงลักษณะความใส สีของตำรับ	63
รูปที่ 16 กราฟแสดงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดชั้น ชั้นโรงแตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	64
รูปที่ 17 กราฟแสดงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงแ ตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	65
รูปที่ 18 กราฟแสดงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดชั้น ชั้นโรงแตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	66
รูปที่ 19 กราฟแสดงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงแ ตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	66
รูปที่ 20 แสดงรูปแบบการปลดปล่อยยาของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ	70
รูปที่ 21 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในน้ำลายเทียมที่ pH 6.8 ± 0.05	72
รูปที่ 22 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในน้ำลายเทียมที่ pH 6.8 ± 0.05	72

สารบัญภาคผนวก

เรื่อง	หน้า
1. เตรียมสารสกัดชั้นชั้นโรง	86
2. การตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออนุมูลอิสระของ P407	86
3. การศึกษาหาอนุมูลอิสระที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล (T _{sol-gel}) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออนุมูลอิสระของตำรับยาเจลที่ไวต่ออนุมูลอิสระ	89
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงเปรียบเทียบกับ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH) radical assay โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid	93
5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงในตำรับยาเจลที่ไวต่ออนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical assay	95
6. การศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)	96

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 1 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงใน ethanol โดยการหาผลผลิตร้อยละ (yield)	86
ตารางที่ 2 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงจากการ dewax ใน hexane โดยการหาผลผลิตร้อยละ (%yield)	86
ตารางที่ 3 แสดงการตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407	86
ตารางที่ 4 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS	87
ตารางที่ 5 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 16 %w/w	87
ตารางที่ 6 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15 %w/w	88
ตารางที่ 7 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w	89
ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด – ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)	90
ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด – ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS	90
ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด – ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS	91
ตารางที่ 11 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด – ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS	92

<p>ตารางที่ 12 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด – ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS</p>	93
<p>ตารางที่ 13 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุและไม่ได้บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงด้วยวิธี DPPH radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50})</p>	96
<p>ตารางที่ 14 แสดง Area under the curve ปริมาณสาระสำคัญ แอลฟา แมงโกสติน (alpha-mangostin) ในสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)</p>	96
<p>ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสาระสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ในตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ</p>	98
<p>ตารางที่ 16 แสดงร้อยละการปลดปล่อยสะสมของปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในแต่ละเวลา</p>	99

สารบัญภาพภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ครั้งที่ 1,2 และ 3	93
รูปที่ 2 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ครั้งที่ 1,2 และ 3	94
รูปที่ 3 กราฟแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงของตำรับยาเจลดที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุและไม่ได้บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงด้วยวิธี DPPH radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC50)	95
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน (standard alpha-mangostin)	97
รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน ที่ได้จากเครื่อง high performance liquid chromatography โดยแกน X คือ เวลาและแกน Y คือ ค่าการดูดกลืนแสง	97
รูปที่ 6 ตัวอย่างกราฟของสูตรตำรับที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงที่ได้จากเครื่อง high performance liquid chromatography โดยแกน X คือ เวลาและแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง	98

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวัตถุดิบธรรมชาติกำลังได้รับความนิยม เนื่องจากการให้ความสำคัญกับสุขภาพที่เพิ่มมากขึ้น เพราะผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติประจำถิ่นสามารถหาได้ง่าย ต้นทุนและการผลิตต่ำ จึงริเริ่มใช้ตั้งแต่การใช้ปรุงอาหาร เครื่องสำอาง การใช้ในทางสาธารณสุข เป็นต้น จนมาถึงการใช้ทางการแพทย์เพื่อรักษาโรค อาทิเช่น ยา หรือเวชภัณฑ์ต่างๆ เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ นั้นมีความปลอดภัย จึงคาดหวังจะนำมาใช้แทนสารที่ได้จากการสังเคราะห์ สำหรับชั้นโรงเป็นผึ้งชนิดหนึ่งที่ไม่มีเหล็กไน (stingless bees) ที่มีความสำคัญในการผสมเกสรดอกไม้ตามธรรมชาติ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชั้นโรงคือ ชั้นโรงเป็นวัตถุดิบที่เหลือจากน้ำผึ้งออกจากรังชั้นโรง ซึ่งคุณสมบัติของชั้นโรงนั้นละลายในไขมันได้ดี เป็นผลผลิตจากการเก็บยางต้นไม้ที่ชั้นโรงนั้นไปทำรัง เพื่อใช้ป้องกันรังของชั้นโรงและประสานช่องว่างระหว่างรังให้มีความแข็งแรง มีกลิ่นเฉพาะตัว ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายใน โดยทั่วไปแล้วชั้นโรงเป็นการผสมผสานของส่วนประกอบหลายๆชนิดตามทั่วไปจะประกอบด้วยเรซินประมาณร้อยละ 50 ไขร้อยละ 10 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 เกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และส่วนประกอบอื่นๆอีกเล็กน้อย (1,2) และจากการศึกษาของพบว่าชั้นโรงแต่ละสายพันธุ์นั้นมียังองค์ประกอบของสารสำคัญที่แตกต่างกัน ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavones) ฟลาโวนอน (flavanones) เทอร์ปีน (terpenes) และสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) (1, 2) โดยองค์ประกอบของสารขึ้นอยู่กับพื้นที่ลักษณะทางภูมิประเทศที่ชั้นโรงนั้นอาศัยอยู่ซึ่งจะแตกต่างกันออกไป (3) จึงส่งผลต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันออกไปเช่นกัน

ชั้นโรงในแต่ละพื้นที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง สบู่ และยาสีฟัน เป็นต้น (4) จึงได้นำมาดัดแปลงใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์กับชุมชน ซึ่งชั้นโรงที่เก็บมาจากสวนมังคุด พบสารสำคัญ คือ แอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) เป็นสารสำคัญที่มีคุณสมบัติช่วยในการสมานแผลได้ดี นอกจากนี้ยังพบสารอื่นอีกหลายชนิด เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) กลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านเนื้องอก (anti-

tumor activity) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidative activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial activity) เป็นต้น (5-8)

ประชากรทั่วไปมักมีอุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปากร้อยละ 5-25 ซึ่งมักเกิดซ้ำในทุกๆ 3 เดือน สูงถึงร้อยละ 50 ของประชากรทั้งหมด (9, 10) ซึ่งรอยโรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดในช่องปาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรับประทานอาหาร การกลืนอาหาร และการพูดลดลง ซึ่งรบกวนคุณภาพชีวิตของผู้ที่เป็นแผลในช่องปาก โดยสาเหตุของการเกิดแผลในปากเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย แผลจากอุบัติเหตุ หรือการรับประทานอาหารที่มีลักษณะแข็ง เป็นต้น ปัจจุบันแนวทางการรักษาแผลในช่องปากมักรักษาตามอาการและตามสาเหตุของการเกิดแผล โดยยาตัวเลือกแรกที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน คือ chlorhexidine mouth wash ซึ่งไม่เหมาะในผู้ป่วยที่มีปัญหาในการกลืน และ topical corticosteroid paste ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม สเตียรอยด์ ที่ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นระยะเวลานาน หรือใช้บ่อยครั้งโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (11) เนื่องจากมีการศึกษาว่าการใช้ chlorhexidine mouth wash และ topical corticosteroid paste สามารถลดความรุนแรงและระยะเวลาของการเป็นแผลในช่องปากได้แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิด หรือลดความถี่ในการเกิดแผลในช่องปากซ้ำได้ (12) จึงเป็นที่มาของการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในปากซ้ำของชันชันโรงซึ่งพบว่าการใช้สารสกัดจากชันชันโรงในตำรับยาแคปซูล สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยที่เป็นแผลในช่องปากได้เนื่องจากสามารถลดความถี่ในการเกิดแผลในช่องปากซ้ำได้มากกว่าร้อยละ 50 (13) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่าการใช้สารสกัดจากชันชันโรงในตำรับยาเจลป้ายปากที่ไวต่อสภาพแวดล้อม (In situ gel) สามารถรักษาแผลในช่องปากในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดได้อีกด้วย (14) เจลที่ไวต่อสภาพแวดล้อม (In situ gel) เป็นรูปแบบหนึ่งของตำรับยาเจล ที่สะดวกในการเตรียม โดยอาศัยปัจจัยต่างๆในการกระตุ้นเพื่อเปลี่ยนแปลงสถานะ เช่น ความเป็นกรด-เบส การพองตัว การแพร่ การกระตุ้นด้วยแสง หรือการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เป็นต้น โดยเมื่อพอลิเมอร์มีการสัมผัสกับปัจจัยกระตุ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล นอกจากนี้การก่อก้อนของพอลิเมอร์บางชนิดสามารถเพิ่มคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อ (mucoadhesive) ส่งผลให้เพิ่มระยะเวลาการปลดปล่อยและสามารถทำให้ยาหรือสารสำคัญออกฤทธิ์ได้ในตำแหน่งที่ต้องการนานขึ้น จากการศึกษาพบว่าพอลิเมอร์ที่อาศัยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในการก่อก้อน ประกอบด้วย poly(N-isopropylacrylamide) , poly(N,N-diethylacrylamide), poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)

หรือ poloxamer เป็นต้น โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์เนื่องจากสามารถย่อยสลายและเข้าได้กับสารต่างๆในร่างกาย คือ poloxamer เมื่อใช้ร่วมกับพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการเกาะติดเนื้อเยื่อ เช่น carbomer, chitosan ,hydroxypropyl methylcellulose และ sodium alginate เป็นต้น (2, 15-17) สามารถก่อเจลได้ในอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิภายในช่องปากและเป็นสารละลายเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าร่างกาย โดยการก่อเจลในที่อุณหภูมิร่างกายนอกจากจะเพิ่มความหนืดแล้วยังทำให้ยาหรือสารสำคัญในตำรับออกฤทธิ์ได้ในตำแหน่งที่ต้องการได้นานมากขึ้น ซึ่งในที่นี้คือ เยื่อในช่องปาก (3,4,11,19) ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือก poloxamer มาใช้ในการพัฒนาตำรับยาเจลที่ไวต่อสภาพแวดล้อมมาประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลช่องปาก

คณะผู้วิจัยมีความสนใจพัฒนาตำรับยาเจลที่ไวต่อสภาพแวดล้อมสำหรับรักษาแผลในช่องปากเพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาด้านการใช้ยาป้ายปากกลุ่มสเตียรอยด์ และยาแบบยาบ้วนปาก จึงได้เลือกใช้พอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิผสมกับพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อ (mucoadhesive) มาพัฒนาตำรับยารักษาแผลในช่องปากที่บรรจุสารสกัดชันชันโรง ด้วยการเลือกพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ พอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิคือ poloxamer 407 และ พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อ (mucoadhesive) ได้แก่ carbomer, chitosan และ carboxymethylcellulose sodium โดยการประเมินในด้านต่างๆเช่น อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล($T_{sol-gel}$) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญที่อยู่ในชันชันโรง และคุณภาพของการเกาะติดเนื้อเยื่อ

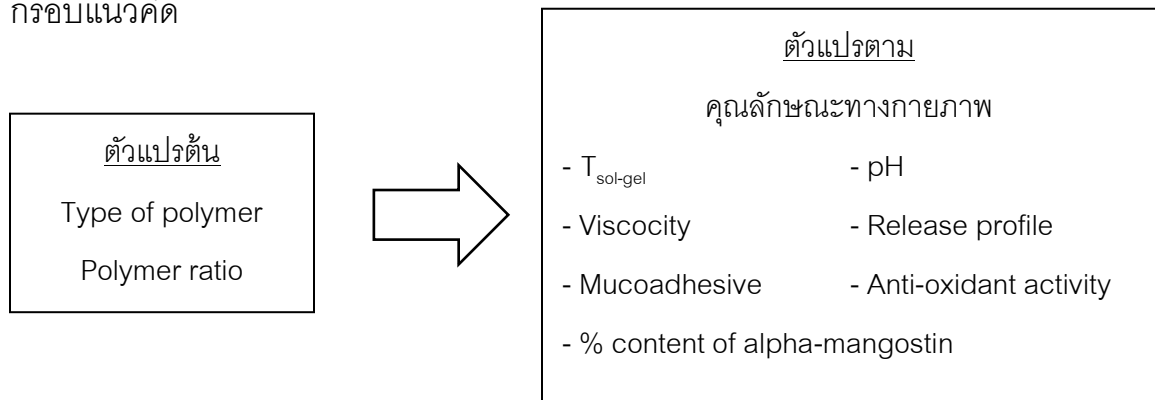
วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาตำรับยาเจลจากพอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิรวมกับพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อที่บรรจุสารสกัดชันชันโรง สำหรับรักษาแผลในช่องปาก
2. เพื่อประเมินคุณสมบัติของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ เช่น ค่า pH ค่า $T_{sol-gel}$ ความหนืด เป็นต้น
3. เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปลดปล่อยของสารสกัดชันชันโรงจากตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิบรรจุสารสกัดชันชันโรง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาตำรับยาเจลจากพอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงร่วมกับพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อสำหรับรักษาแผลในช่องปาก
2. สามารถพัฒนาตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ เช่น ค่าpH ค่า $T_{sol-gel}$ ความหนืด เป็นต้น
3. สามารถพัฒนาตำรับยาเจลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปลดปล่อยสารสกัดจากชั้นชั้นโรง

กรอบแนวคิด



นิยามศัพท์

1. In-situ gel คือ เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ
2. ความเป็นกรด-เบส การพองตัว การแพร่ หรือการกระตุ้นด้วยแสง เป็นต้น
3. Mucoadhesive property คือ คุณสมบัติในการยึดติดระหว่างระหว่างวัสดุสองชนิดซึ่งจะต้องมีหนึ่งชนิดที่เป็นพื้นผิวเยื่อเมือกโดยสามารถวัดได้ออกมาแรงในการยึดติดของวัสดุทั้งสองชนิด
4. Sol - gel คือ การเปลี่ยนแปลงสถานะจากสารละลายไปเป็นเจล
5. $T_{sol-gel}$ คือ อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล
6. รอยโรคในช่องปาก คือ แผลในช่องปาก เกิดจากเยื่อเมือกในช่องปากเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติซึ่งมาจากสาเหตุหลายประการ
7. ชั้นโรง คือ ผิวน้ำหนึ่งที่ไม่ใช่เซลล์ใน
8. ชั้นชั้นโรง คือ เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากรังของชั้นโรง เหลือจากการนำน้ำผิวน้ำออกแล้วซึ่งมีส่วนประกอบจำนวนมาก เช่น ชีวฟิล์ม เกล็ดดอกไม้ และสารสำคัญต่างๆ เป็นต้น

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเตรียมตัวรับ และการประเมินตัวรับของเจลในรูปแบบ In situ gel ในการใช้รักษาแผลในปาก ด้วยสารสกัดชันชันโรง ต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจ เรื่องลักษณะ คุณสมบัติ ชนิดและส่วนประกอบของตัวรับยาเจล คุณสมบัติของชันชันโรง สารสำคัญที่พบในชันชันโรง รวมทั้งวิธีในการสกัดสาร การตรวจสอบตัวรับยาเจล เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ สำหรับวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องมีดังต่อไปนี้

1. ชันโรง (stingless bee)

ชันโรง (stingless bee) หรือ ผึ้งจิ๋ว ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของไทยที่อาศัยอยู่ทั่วทุกภาค โดยแต่ละภาคจะมีชื่อเรียกชันโรงแตกต่างกันไป ภาคเหนือเรียกชันโรงชนิดตัวเล็กกว่า “ขี้ตั้งนี่ ขี้ตัวนี่ หรือขี้ตั้ง” (*Trigona laveiceps*) ถ้าชนิดตัวใหญ่จะเรียกว่า “ขี้ย้าดำ” (*T. apicalis* และ *T. collina*) ส่วนชันโรงที่มีขนาดใหญ่มากจะเรียกว่า “ชันโรงยักษ์ หรือขี้ย้าแดง” (*T. fimbriata*) ภาคใต้เรียกชันโรงไม่ว่าเล็กหรือใหญ่กว่า “แมลงอุง” ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกชันโรงว่า “ตัวขำมะโรง โรมหรืออีโลม” และภาคตะวันตกเรียกชันโรงว่า “ตัวตั้งตั้ง” หรือ “ตั้ง” เป็นต้น ชันโรงจะมีลักษณะแตกต่างไปจากผึ้ง คือ มีขนาดเล็กกว่า ไม่มีเหล็กใน จัดอยู่ในจำพวกผึ้งที่มีวิวัฒนาการสูง สามารถให้ผลผลิตน้ำผึ้งได้เช่นเดียวกับผึ้งทั่วไป แต่จะมีราคาแพงกว่า เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง หายาก และให้ปริมาณน้ำผึ้งน้อย(12-13) สำหรับสายพันธุ์ที่พบได้และนำมาใช้ประโยชน์ได้บ่อยมี 4 สายพันธุ์ คือ *Tetragonula pegdeni* Schwarz, *Tetragonula laeviceps* Smith, *Lepidotrigona terminata* Smith และ *Lepidotrigona ventralis* Schwarz ชันโรงเป็นที่นิยมใช้ในการผสมเกสร อาทิ ภาคใต้ จังหวัดสงขลา ที่เลี้ยงชันโรงในกระบอกไม้ไผ่ ช่วยในการเพิ่มผลผลิตของไม้ผลทั่วไป เช่น ชมพู่ และมะพร้าว เป็นต้น ส่วนภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี มีการส่งเสริมให้ใช้ชันโรงเพื่อผสมเกสรให้แกไม้ผล เช่น เงาะ เป็นต้น (6) นอกจากนี้ ยังมีการใช้ประโยชน์จากน้ำผึ้ง ยางไม้และไขผึ้งจากชันโรง (18)

1.1 ลักษณะทางกายภาพและส่วนประกอบของชันชันโรง

ชันโรงหรือ stingless's bee เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนรังของชันโรงผึ้ง ซึ่งชันชันโรงมีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี เป็นผลผลิตจากการเก็บยางต้นพีชของชันโรง เพื่อใช้ป้องกันรังของชันโรง ประสานช่องว่างระหว่างรังให้มีความแข็งแรง ส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองออกเขียวไปจนถึงสีน้ำตาลดำ ส่วนกลิ่นก็เป็นกลิ่นเฉพาะตัว นอกจากนี้ อุณหภูมิส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพ เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่เย็นจะแข็ง เปราะ แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่ร้อนจะนิ่ม ยืดหยุ่น และเหนียวมาก จึงเรียกว่า ชีผึ้ง หรือ beewax ชันชันโรงเป็นการผสมผสานของส่วนประกอบหลายๆ ชนิดโดยทั่วไปจะประกอบด้วย เรซินประมาณร้อยละ 50 ไขร้อยละ 10 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 เกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และส่วนประกอบอื่น ๆ อีกเล็กน้อย (6,9) สำหรับส่วนประกอบหลักของชันชันโรงนั้น จะมีความสำคัญต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และกลุ่มฟีนอลิกเป็นหลัก ดังนั้น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาส่วนใหญ่ของชันชันโรงจึงเป็นฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาโวนส์ (flavones) ฟลาโวนอนส์ (flavanones) และ เทอร์ปีน (terpenes) เป็นต้น และยังมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ภูมิประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของชันชันโรงที่แตกต่างกัน ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความแตกต่างกันของส่วนประกอบ สารสำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันชันโรง (7-9)

1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันชันโรง (13)

1.2.1 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial activity) เนื่องจาก ชันชันโรงที่สะสมในรังผึ้งจะมีหน้าที่ในการป้องกันการรุกรานของแมลงหรือเชื้อจุลชีพ ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ได้แก่ cupressic acid , acetylcupressic acid, imbricatoloic acid, communis acid และ syringaldehyde เป็นต้น มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สำหรับโรคแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากสาเหตุของ *Helicobacter pylori* ได้แก่ p-coumaric acid, 3-prenyl-4-dihydrocinnamolyoxycinnamic acid, และ artepillin C ส่วนสารที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium spp.* ได้เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ acetylviscidone, conifery aldehyde และ dihydrobenzofuran lignan aldehyde เป็นต้น และสามารถยับยั้งเชื้อ *Trypanosoma cruzi* เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ 3-(2,2-dimethyl-8-prenylbenzopyran-6-yl) propenoic acid, 3-prenyl-4-

hydroxycinnamic acid, artepillin C และ 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า CAPE ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 integrase ได้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งจุลชีพของชันชันโรง (8)

แหล่งกำเนิดพรอพอลิส	กลุ่มสารที่ออกฤทธิ์	เชื้อจุลชีพที่ยับยั้งได้	คณะผู้วิจัย
บราซิล	Phenolic compounds	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bankova et al. (1995)
	Labdane-type diterpenes	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bankova et al. (1996)
	Phenolic compounds	<i>Helicobacter pylori</i>	Hashimoto et al. (1998)
	Phenolic compounds	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Macucci et al. (2001)
ชิลี	Phenolic compounds	<i>Mycobacterium spp.</i>	Valcic et al. (1999)
บัลแกเรีย	Ester of substituted cinnamic acid	A/H1N1, A/H3N2 (influenza virus)	Serkedjieva et al. (1992)

1.2.2 ฤทธิ์ต้านเนื้องอก (antitumor activity) สารสำคัญที่มีคุณสมบัติในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) คือ CAPE, PMS-1, 13Z-symphoreticolic acid, 13E-symphoreticolic acid และ artepillin C เป็นต้น

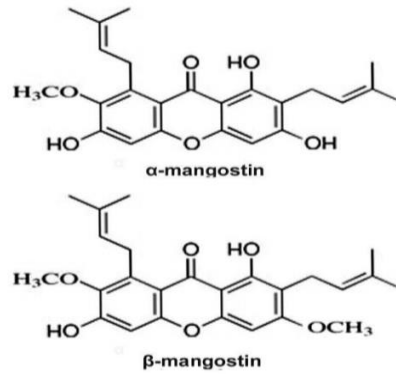
1.2.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidative activity) จะเห็นว่าชันชันโรงมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรง ได้แก่ อนุพันธ์ของ dicaffeoylquinic acid

1.2.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) จากการศึกษาในหนู โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบจาก croton oil พบว่า CAPE มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีซึ่งจากการศึกษาของ Kumazawa และคณะในปี ค.ศ.2004 (19) พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างชันชันโรงทั้ง 16 ชนิดพบว่า ชันชันโรงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแรงที่สุด เนื่องจากในชันชันโรงมีสารมีประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น quercetin, kaempferol, caffeic acid และ caffeic acid phenethyl ester หรือเรียกว่า CAPE เป็นหลัก แต่อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันชันโรงย่อมก็เป็นไปตามองค์ประกอบทางเคมีของชันชันโรงนั้นๆ (8)

1.3 สารสำคัญของชันชันโรง

1.3.1 สารแมงโกสติน (mangostin) เป็นสารกลุ่มสารแซนโทน (xanthone) ที่มักพบเป็นได้มากในต้นมังคุด ซึ่งสารแมงโกสตินมี 2 ชนิด คือ เบต้า แมงโกสติน (beta-mangostin) และ อัลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) จากการศึกษาพบว่า อัลฟา แมงโกสติน (alpha-mangostin) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า เบต้า แมงโกสติน (Beta-mangostin) (13) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อื่น เช่น anti-

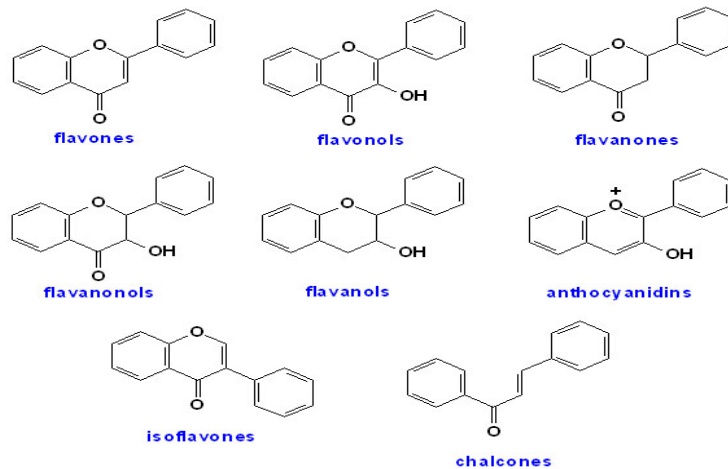
oxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-parasitic และ anti-anthelmintic (20)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสาร alpha-mangostin และ beta-mangostin (21)

1.3.2 สารสำคัญอื่นในชั้นชั้นโง (13)

1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบหลักที่พบในชั้นชั้นโง ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส และต้านการอักเสบ โดยฟลาโวนอยด์ ที่พบสามารถแบ่งตามโครงสร้างทางเคมี ออกได้เป็น 11 กลุ่ม คือ flavones flavonols flavanones flavanonols chalcones dihydrochalcones isoflavones isodihydroflavones flavans isoflavans และ neoflavonoids



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม flavonoids ที่พบในชั้นชั้นโง (22)

2) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) (20) เป็นสารระเหยหลักที่พบในชั้นชั้นโรง ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพ และช่วยในการตัวแยกชั้นชั้นโรงแท้ ออกจากชั้นชั้นโรงปลอมหรือสิ่งรบกวนอื่นๆ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

(1) โมโนเทอร์พีน (monoterpenes) ที่พบในชั้นชั้นโรง ได้แก่ acyclic monocyclic dicyclic monoterpenes และอนุพันธ์ของ monoterpenes ซึ่งสารที่เป็น primary acyclic และ monocyclic monoterpenes ที่พบ คือ myrcenes, p-menthanes และ cineoles ตามลำดับ ส่วนสารที่เป็น dicyclic monoterpenes ที่พบสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ thujanes, caranes pinanes, fenchanes และ camphenes

(2) เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) เป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดที่ชั้นชั้นโรง สามารถจัดแบ่งได้ 4 กลุ่ม คือ acyclic monocyclic dicyclic และ tricyclic โดย acyclic sesquiterpenes ที่พบจะเป็นอนุพันธ์หลักของ farnesane ส่วน monocyclic sesquiterpenes ที่พบในชั้นชั้นโรงมี 4 ชนิด dicyclic sesquiterpenes พบ 5 ชนิด และ tricyclic sesquiterpenes พบ 10 ชนิด diterpenes ที่พบ คือ cembrane labdane abietane pimarane และ totarane ซึ่งสารบางชนิดได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสำคัญทางเภสัชวิทยาที่กว้าง tetracyclic triterpenes ที่พบ คือ lanostanes และ cycloartane ส่วน pentacyclic triterpenes ที่พบคือ oleanane, ursane และ lupine

(3) ฟีนอลิก (phenolics) ที่พบมากใน Brazilian green propolis คือ cinnamic acid , p- coumaric acid caffeic acid ferulic acid และอนุพันธ์ของ phenylpropanoids ระหว่างสารเหล่านี้ cinnamic acids เป็นสารเด่นที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของ green propolis มีการพบอนุพันธ์ของ caffeic acid และ isoferulic acid ใน poplar propolis ส่วน chlorogenic acid เป็นสารที่พบมากใน Brazilian propolis ได้มาจากดอกไม้ Citrus spp. พบอนุพันธ์ของ quinic acid 3 ชนิด ส่วนในกลุ่มอื่นๆของ phenolics มีการพบ stilbenes ในชั้นโรงที่ประเทศเคนยา เกาะ Solomon และประเทศออสเตรเลีย

(4) น้ำตาล (sugars) ที่ได้ยังไม่ทราบแหล่งที่มาแน่ชัด โดยส่วนใหญ่แล้วน้ำจากเกสรดอกไม้และน้ำผึ้งจะเป็นแหล่งของ glucose fructose และ sucrose และมีบางส่วนได้มาจากกระบวนการไฮโดรไลซิส flavonoid glycosides ในชั้นชั้นโรง นอกจากนี้มี การบันทึกว่า ยางต้นไม้

บรจุ sugars sugar alcohols และ acids เป็นจำนวนมาก และยังพบ galactitol gluconic acid galacturonic acid และ 2-O-glycerylgalactose ในชั้นชั้นโรง ด้วย

(5) Hydrocarbonsที่พบในชั้นชั้นโรงจะเป็นสารในกลุ่ม alkanes alkenes alkadienes monoesters diesters aromatic esters fatty acids และ steroids

(6) Mineral elementsg เช่น ธาตุเหล็ก (Fe) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) โซเดียม (Na) และฟอสฟอรัส (P) มีการตรวจพบวิตามินบี 1 วิตามินบี6 และไนอะซินในชั้นชั้นโรง

1.4 การพัฒนาชั้นชั้นโรง เนื่องจากชั้นชั้นโรงมีสารประกอบจำนวนมากและหลากหลายทำให้มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ซึ่งชั้นชั้นโรงได้มีการใช้มาตั้งแต่สมัยอียิปต์ กรีก โรมัน เพราะเชื่อว่ามีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ รักษาแผล โดยเริ่มใช้ในการรักษาแผลภายในปาก ในรูปแบบน้ำยาบ้วนปาก จากนั้นได้มีการพัฒนามาเป็นขี้ผึ้งและครีมทารักษาแผลเรื่อยมา (6) จนปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ได้จากน้ำผึ้งและชั้นชั้นโรง เช่น สบู่ น้ำผึ้งชั้นโรง สบู่เหลว น้ำผึ้งชั้นโรง แชมพูสมุนไพรน้ำผึ้งชั้นโรง ยาหม่อง ขี้ผึ้ง (ขี้ผึ้งสมุนไพร) ลิบบาล์ม ขี้ผึ้ง ครีมบำรุงผิวหน้า สารสกัดชั้นผึ้ง (พรวดพอลิส) ครีมทาसनเท้า ผสมสารสกัดพรวดพอลิส เป็นต้น (20) ด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง เช่น ยาสีฟัน ครีมบำรุงผิว น้ำยาบ้วนปาก หรือยาลม เป็นต้น (5) นอกจากนี้ ยังมีการนำชั้นชั้นโรงมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อาทิ การนำชั้นชั้นโรงมาใช้ในรูปแบบเจลในปาก สำหรับรักษาการอักเสบของช่องปาก ในผู้ป่วยที่โรคมะเร็งช่องปากได้รับการฉายแสง (15) การพัฒนาสูตรตำรับการนำชั้นชั้นโรงมาใช้ในรูปแบบ mucoadhesive thermoresponsive system ในการรักษาแผลในปากสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ herpes Simplex Type I (23) และ การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดชั้นโรงผึ้งในตำรับยาเจลสำหรับรักษาแผลจากการติดเชื้อราในผู้ป่วยที่ใส่ฟันเทียม พบว่า ตำรับยาเจลมีประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการ เพดานบวมและการเกิดแผลในช่องปากได้เทียบเท่ากับ การใช้ Daktarin® (Miconazole gel) (26) เป็นต้น

ดังนั้น ชั้นชั้นโรงและชั้นผึ้งจึงมีผลช่วยในการรักษาแผลในช่องปากได้จากหลายสาเหตุ เช่น การอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รวมทั้งการใช้ร่วมกับการฉายแสงในผู้ป่วยมะเร็ง ซึ่งรูปแบบยาที่นิยมนำมาศึกษา จะเป็นรูปแบบยาเจลเป็นส่วนใหญ่ เป็นต้น

1.5 เทคนิคการสกัดชั้นโรง

1.5.1 Vongsak B et al., 2015 (7) นำชั้นชั้นโรงที่บดแล้ว 10 กรัม ผสมกับสารละลาย 80% ethanol 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 3000xg นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายใสส่วนบน (supernatant) มาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำไปกำจัดส่วนที่เป็นไข (dewaxed) ออกด้วยวิธี sonication ด้วยสารละลาย hexane 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไป centrifuge อีกครั้งที่ภายใต้สภาวะเดิม โดยทิ้งส่วน supernatant และเก็บสารสกัดหยาบชั้นล่างภายใต้ อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสในที่มืด

1.5.2 Siripatrawan U et al., 2013 (24) นำชั้นชั้นโรงที่บดแล้ว 30 กรัม ผสมกับสารละลาย 70% ethanol 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยคนผสมในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

1.5.3 Asawahame, 2015 (28) นำชั้นโรงที่บดแล้ว 30 กรัม มาผสมกับ 70% เอทานอล 300 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดโดยใช้เครื่อง ultrasonic cleaners เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปกรอง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วย rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส สกัดที่ได้จะนำไปทำให้แห้งโดยการ freeze dry นำผงชั้นโรงที่ได้เก็บในภาชนะปิดสนิท และป้องกันแสง

1.6 การหาปริมาณสาร Alpha-mangostins

1.6.1 Vongsak B et al., 2015 (25) เตรียมสารละลายตัวอย่างจากการนำชั้นชั้นโรง 30 กรัม ละลายในสารละลาย methanol 5 มิลลิลิตร แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร สำหรับ stock solution ของสารละลายมาตรฐาน alpha-mangostins เตรียมจนได้ความเข้มข้นเป็น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ใช้เฟสคงที่เป็นคอลลัมน์ C₁₈ และเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลาย 0.2% formic acid ในน้ำ (A) และสารละลาย methanol (B) โดยใช้เทคนิคการชะของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution คือ ชะด้วยสารละลายผสม 75%BในA เพิ่มความเข้มข้นจนถึงระดับ 90%BในA ภายในระยะเวลา 10 นาที จากนั้นชะด้วยสารละลายผสม 90%BในA เพิ่มความเข้มข้นจนถึงระดับ 100%B

ใน A ภายในระยะเวลา 5 นาที และสุดท้ายชะด้วยสารละลาย 100% B เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มี detector เป็นเครื่อง UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร

1.6.2 Abdalrahim F. A. et al, 2012 (21) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย alpha beta และ gamma mangostin ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL ใน methanol แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 200, 100, 25, 10, 5, 1, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ และนำสารสกัดชั้นชั้นรองที่เตรียมความเข้มข้น 1 mg/mL ใน methanol มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 200 mg/mL แล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ชนิด reverse phase โดยใช้วัฏภาคหนึ่งเป็น C18 column (5 μm , 4.6 \times 250 mm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย สาร A คือ acetonitrile และ สาร B คือ 0.1% H_3PO_4 ใน water โดยใช้เทคนิค isocratic elution คือการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบคงที่ ในอัตราส่วน สาร A 95% และ สาร B 5% อัตราการไหล 1 ml/min เป็นเวลา 10 นาที ฉีดสารในปริมาณ 10 ไมโครลิตร จากนั้น detector ด้วยเครื่อง UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 44, 254, 316 and 320 นาโนเมตร

2. เจล (Gel)

เจล (gel) คือ เป็นเภสัชภัณฑ์รูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือส่วนที่เป็นของเหลวหรือตัวกลาง (liquid compartment) และสารก่อเจลหรือพอลิเมอร์ก่อเจล (gelling agent) โดยอาจจะมีลักษณะเป็นโมเลกุลอินทรีย์ขนาดเล็ก หรือ โมเลกุลอินทรีย์ขนาดใหญ่ซึ่งกระจายตัวอยู่ในตัวกลางที่เป็นของเหลว ซึ่งโมเลกุลของสารเกิดปฏิกิริยา ทำให้ของเหลวที่เป็นตัวกลางนั้นไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ (26-28)

2.1 ประเภทของเจล(Gel)

2.1.1 เจล (gel) สามารถแบ่งตามวัฏภาคได้สองระบบ (27-29) คือ

1) เจลระบบหนึ่งวัฏภาค (single-phase gel) คือ โมเลกุลเจลที่มีการกระจายตัวในสารละลายของเหลวที่ไม่เกิดการแยกชั้นระหว่างโมเลกุลเจลและสารละลาย ซึ่งมาจากโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์หรือได้จากธรรมชาติ (synthetic or natural macromolecules) หรือเรียกว่า mucilages

2) เจลระบบสองวัฏภาค (two-phase gel) คือ โมเลกุลของเจลที่คุณสมบัติเป็น thixotropic เมื่อมีการเขย่าจะทำให้สารกึ่งของแข็งกลายเป็นสารละลายเรียกว่า magma

2.1.2 เจล(gel) สามารถแบ่งตามลักษณะของยาพื้นได้ 2 ชนิด (19)

1) Hydrophobic gels หรือ oleogels คือ เจลที่ไม่ชอบน้ำด้วยยาพื้นมักเป็น liquid paraffin, fatty oils, colloidal silica, aluminum หรือ zinc soaps

2) Hydrophilic gels หรือ hydrogels คือ เจลที่ชอบน้ำด้วยยาพื้นมากเป็น น้ำ glycerol หรือ propylene glycol ร่วมกับสารก่อเจล

3. In-situ gel

In-situ gel คือ เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ ทำให้สถานะการละลายของเจลเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา(อุณหภูมิ และ ความชื้น) เป็นกรด-เบส) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ(ชนิดตัวทำละลาย และ การพองตัว) การเกิดปฏิกิริยาเคมี (การเหนี่ยวนำด้วย เอมไซม์ หรือแสง) เป็นต้น (2, 27)

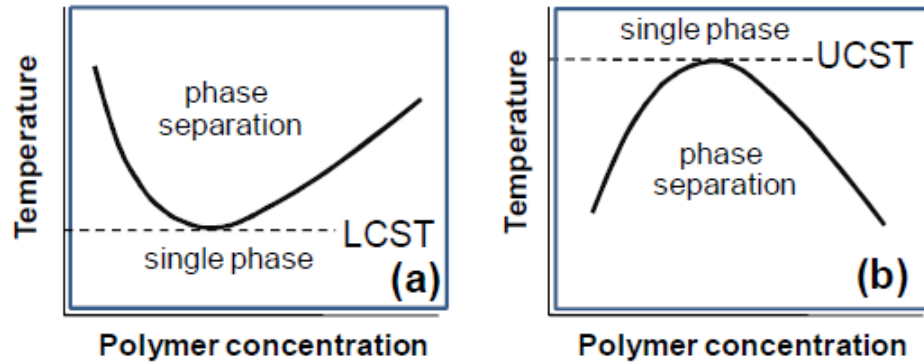
3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อ in-situ gel สามารถแบ่งได้ดังต่อไปนี้ (2, 30)

3.1.1 อุณหภูมิ คือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้เกิดปฏิกิริยาเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลง สถานะของพอลิเมอร์ระหว่าง sol-gel โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) พอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิกวติของสารละลายแบบต่ำสุด(lower critical solution temperature, LCST) เป็นพอลิเมอร์สามารถสารละลายในน้ำแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ตกตะกอนเป็นเจลในน้ำ (sol-gel) โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ poly-Nisopropylacrylamide(PNIPAAm), polyN-(L)-(1-hydroxymethyl)propylmethacrylamide [P(LHMPMAAm)], polyN,N diethylacrylamide(PDEAAm), poly-2-(dimethylamino) ethylmethacrylate (PDMAEMA)และ poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO, Pluronics)

2) พอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิกวติของสารละลายแบบสูงสุด(upper critical solution temperature, UCST) เป็นพอลิเมอร์ที่ลักษณะเป็นเจลแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้พอลิเมอร์

สามารถสารละลายในน้ำ โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ polyacrylic acid(PAA), polyacrylamide (PAAm) และ polyacrylamide-co-butyl methacrylate ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับการพองตัว



รูปที่ 3 พอลิเมอร์ที่มี (a) อุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบต่ำสุด (LCST) และ (b) อุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบสูงสุด (UCST) (30)

3.1.2 ความเป็นกรด-เบส คือ พอลิเมอร์ที่หมู่เป็นกรดหรือเบสเป็นส่วนประกอบซึ่งทำหน้าที่ให้หรือรับโปรตอนจากสภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งมีลักษณะการเกิดเจลของพอลิเมอร์ขึ้นกับการพองตัวโดยที่การพองตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้นในพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ(anionic) เช่น หมู่ฟังก์ชันเป็นกรดอ่อน แต่การพองตัวจะลดลงในพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก(cationic) เช่นหมู่มฟังก์ชันที่เป็นเบสอ่อน โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ polyacrylic acid(PAA, Carbopol[®], carbomer), polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA) โดยมีสถานะเป็น sol ที่ pH 4 และเป็น gel ที่ pH 7.4

3.1.3 การพองตัว (swelling) คือ เกิดจากการที่พอลิเมอร์ดูดซับน้ำบริเวณรอบข้างเช่น myverol 18-99 (glycerol mono-oleate) ซึ่งเป็นไขมันที่มีหัวจะพองตัวในน้ำจากผลึกเหลวชนิดไลโอทรออปิก (lyotropic liquid crystals)

3.1.4 การแพร่ (diffusion) คือ เกิดจากการแพร่ของตัวทำละลายระหว่างพอลิเมอร์และสิ่งแวดล้อมที่เป็นเนื้อเยื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของเจล เช่น N-methylpyrrolidone (NMP)

3.1.5 การเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ผ่านพันธะไอออนิก(ionic crosslinking) คือ พอลิเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงสถานะขึ้นกับจำนวนของประจุโดยเฉพาะ anionic polysacchride ที่มีความไวต่อประจุที่เป็น mono และ divalent cations(Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ และ Na^+) เช่น k-carrageenan จะเป็นเจลที่แข็งและเปราะแตกเมื่อจำนวนของ K^+ น้อย ส่วน i-carrageenan จะเป็นเจลที่มีความยืดหยุ่น

เมื่อจำนวนของ Ca^{2+} มาก หรือ พอลิเมอร์ที่มีหมู่ methoxy และ alginic acid จะเกิดขึ้นอยู่กับ Ca^{2+} เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ methoxy และ guluronic acid ตามลำดับ

3.1.6 การเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ผ่านเอนไซม์ (enzymatic cross-linking) คือ พอลิเมอร์ไวต่อเอนไซม์เช่น การปลดปล่อย insulin (ยาฉีด) ของร่างกายโดยเป็นใช้พอลิเมอร์ที่ไวต่อ cationic และ pH ซึ่งประกอบด้วย insulin และ glucose oxidase โดยจะตอบสนองต่อระดับน้ำตาล ในกระแสเลือดทำให้เกิดการพองตัวขึ้น และปลดปล่อยตัวยาออกมา (ซึ่งในปัจจุบันไม่เป็นที่แพร่หลาย มากนัก)

3.1.7 การเกิดพอลิเมอร์เซชันผ่านการกระตุ้นด้วยแสง (photo-polymerisation) คือ การทำให้พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงสถานะโดย การใช้ electromagnetic radiation โดยจะใช้ long wavelength ultraviolet ซึ่งทำให้ polymer ไวต่อการกระตุ้น แต่ Short wavelength ultraviolet จะมีผลต่อการซึม ผ่านของเนื้อเยื่อที่ลดลง เช่น 2,2 dimethoxy-2-phenyl

4. คุณสมบัติ mucoadhesive

คุณสมบัติ mucoadhesive คือ การยึดเกาะกันระหว่างวัตถุสองชนิดซึ่งจะต้องมีหนึ่งชนิดที่เป็น พื้นผิวเยื่อเมือก ซึ่งความสามารถของการเป็น mucoadhesive นั้นขึ้นกับลักษณะของเนื้อเยื่อเยื่อเมือก และสมบัติทางเคมีกายภาพของพอลิเมอร์โดยปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติ mucoadhesive (1, 2, 30, 31)

4.1 การเกิดปฏิกิริยาของพื้นผิวเยื่อเมือกกับพอลิเมอร์

4.1.1. น้ำหนักโมเลกุล

ความเหมาะสมสำหรับคุณสมบัติ mucoadhesive ของน้ำหนักโมเลกุลขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์โดยแรง mucoadhesive จะเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเพิ่มขึ้นตามไปโดยเป็นลักษณะ linear เมื่อน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 100,000 g/mol เมื่อน้ำหนักโมเลกุลมากกว่านี้จะมีความสัมพันธ์เป็น non-linear

4.1.2 การเกิดพันธะไฮโดรเจน

พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติ mucoadhesive ขึ้นกับจำนวนหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำในสายพอลิเมอร์ เช่น hydroxyl, carboxyl หรือ amine เป็นต้น โดยจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับพื้นผิวที่สัมผัส

นอกจากนี้ หากพอลิเมอร์มีความยาวและหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำจะทำให้พอลิเมอร์สามารถพองตัวได้ดี ในตัวกลางที่เป็นน้ำทำให้มีระยะเกิดระยะห่างระหว่างสายของพอลิเมอร์ทำให้เพิ่มความยืดหยุ่นและ ประสิทธิภาพในการแพร่ผ่านของ substrate

4.1.3 Cross-linking และการพองตัว

ความหนาแน่นของการ cross-linking ของพอลิเมอร์เป็นสัดส่วนที่แปรผกผันกับการพองตัว โดยที่ความหนาแน่นของ cross-linking ต่ำจะทำให้พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นและมีอัตรา hydration ที่มากทำให้มีการพองตัวที่ดีส่งผลให้พอลิเมอร์มีพื้นผิวสัมผัสมากขึ้นทำให้มีการยึดติดที่ดี แต่ถ้าหากมีความชื้นมากเกินไปจะส่งผลต่อการพองตัวที่มากเกินไปด้วยจะเป็นของเหลวเยื่อเมือกระหว่างผิวสัมผัสทำให้พอลิเมอร์ไม่สามารถยึดติดกับผิวสัมผัสได้ อย่างไรก็ตามการเพิ่มการยึดติดกับผิวสัมผัส นั้นรวมถึงการเกิด cross-linking ระหว่างพอลิเมอร์ทำให้พอลิเมอร์สร้างเป็นลักษณะของ network

4.1.4 ประจุ

พอลิเมอร์บางชนิด เช่น carrageenan, alginic acid และ chitosan เป็นต้น เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจาก Cross-linking เนื่องจากประจุ mono และ divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ และ Na^+) ทำให้พอลิเมอร์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นไปรวมไปถึงคุณสมบัติในการยึดติดกับผิวสัมผัส

4.1.5 ความเข้มข้นของพอลิเมอร์

ความเข้มข้นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมจะทำให้มีคุณสมบัติในการยึดติดที่ดี โดยหากใช้ความเข้มข้นสูงจะทำให้แรงยึดติดของพอลิเมอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากจะทำให้พอลิเมอร์มีโมเลกุลที่ขัดตัวจะทำให้ไปจำกัดการแพร่ผ่านของตัวกลางในพอลิเมอร์ที่เป็นไฮโดรเจล

4.2 สิ่งแวดล้อมภายในเนื้อเยื่อช่องปาก

4.2.1 กรด-เบส

กรด-เบส นั้นมีผลต่อพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันในการแตกตัวของประจุ เช่น หมู่ เมื่อ pH สูงขึ้นจะทำให้เกิดการแตกตัวของประจุมากขึ้น แต่เมื่อ pH ต่ำลงจะทำให้เกิดการแตกตัวของประจุลดลงไปด้วย พอลิเมอร์ในตระกูล poly(acrylic acid) จะมีการยึดเกาะที่ดีในช่วง pH 4 ถึง 5 แต่เมื่อเพิ่ม pH สูงมากกว่า 6 จะทำให้การยึดเกาะลดลง โดยจะเกี่ยวกับ โปรตอน ของหมู่ carboxylic acid ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับเยื่อเมือก

4.2.2 ภาวะโรค

ภาวะโรคจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเปลี่ยนทางกายภาพและเคมีของเยื่อเมือกโดยจะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของโรค

4.2.3 ระยะเวลาในการสัมผัส

ในการสัมผัสระหว่างพอลิเมอร์กับชั้นเยื่อเมือกจะเกิดจากการพองตัวในการแทรกตัวของสายพอลิเมอร์เข้าไปในเยื่อเมือกโดยถ้าหากมีการยึดเกาะที่ดีจะทำให้ระยะเวลาในการสัมผัสเพิ่มมากขึ้นไปด้วย

4.3 ชนิดของพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติ mucoadhesive แบ่งออกเป็น 2 ประเภท (3, 32) คือ

4.3.1 Natural polymers

- 1) พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโปรตีน เช่น collagen, albumin และ gelatin
- 2) พอลิเมอร์ที่เป็น polysaccharides เช่น alginates, cyclodextrines, chitosan, dextran, agarose, hyaluronic acid, starch, cellulose

4.3.2 Synthetic polymers

- 1) พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ในร่างกาย
 - (1) Polyesters เช่น polylactic acid, polyglycolic acid, polyhydroxyl butyrate, polycaprolactone, polydoxanones
 - (2) Polyanhydrid เช่น polyadipic acid, polyterphthalicacid, polysebacic acid and various copolymers
 - (3) Polyamides เช่น poly iminocarbonates, poly amino acids.
 - (4) Phosphorous based polymers เช่น polyphosphates, polyphosphonates, Polyphosphazenes.
 - (5) พอลิเมอร์อื่นๆ เช่น poly cyanocrylates, poly urethanes, poly ortho esters, polyacetals.
- 2) พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายไม่ได้ในร่างกาย
 - (1) Cellulose derivatives เช่น carboxymethylcellulose, ethyl cellulose, cellulose acetate HPMC.

(2) Silicones เช่น polydimethyl siloxanes, colloidal silica, Polymethacrylate

(3) พอลิเมอร์อื่นๆ เช่น Poly Vinyl Pyrrolidone, Ethylene Vinyl Acetate,

Poloxamines

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบ mucoadhesive พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็น bioadhesive (33)

พอลิเมอร์	คุณสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อ
1. CMC Sodium, Carbopol 934, Polycarbophil, Tragacanth, Poly (acrylic acid/divinyl benzene), Sodium Alginate และ Hydroxy Ethyl Cellulose	+++
2. HPMC, Gum Karaya และ Gelatin	++
3. Guar Gum, Thermally Modified Starch, Pectin, PVP, Acacia, Psyllium, Amberlite-200 resin, Hydroxy Propyl Cellulose และ Chitosan	+

หมายเหตุ : +++ = ดีมาก, ++ = ปานกลาง, + = น้อย

ดังนั้นการพัฒนาสูตรตำรับยาเจลจากคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อของพอลิเมอร์แต่ละชนิด จากการประเมินคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อและการปลดปล่อยยา rasagiline ในช่องปากรูปแบบของฟิล์ม ที่เปรียบเทียบระหว่าง carbopol P 940 และ sodium alginate พบว่า carbopol P 940 มีคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อได้ดีกว่า sodium alginate และการปลดปล่อยยาจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (34) และการศึกษาเปรียบเทียบการใช้พอลิเมอร์ชนิดเดียว คือ poloxamer 407 (P407), carbopol 934P (C934P) หรือ gelatin (GELA) และ การใช้พอลิเมอร์ร่วมกัน คือ P407 ร่วมกับ C934P และ P407 ร่วมกับ GELA พบว่าการใช้พอลิเมอร์ร่วมกันระหว่าง 15% P407 ร่วมกับ 0.2% C934P หรือ 15% P407 ร่วมกับ 1% GELA สามารถกักเจลได้ที่อุณหภูมิในช่วง 29-30°C (35) ซึ่งการพัฒนาตำรับยาเจลจึงนิยมเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการกักเจล และการเกาะติด

เนื้อเยื่อได้ดี โดยส่วนใหญ่จะใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิดรวมกัน คือ poloxamer, carbopol หรือ sodium alginate เพื่อคุณสมบัติการเกาะติดและการปลดปล่อยยาที่ดี

5. แผลในช่องปาก

5.1 พยาธิสภาพในช่องปาก

สุขภาพช่องปากที่ดีมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตหลายประการ ทั้งช่วยในการบดเคี้ยวอาหารให้มีขนาดเล็กลงก่อนกลืน สามารถรับรสอาหารและเพิ่มความอยากอาหารได้ รวมถึงช่วยให้การออกเสียงพูดชัดเจน และเสริมสร้างบุคลิกภาพและความมั่นใจมากขึ้น โดยองค์ประกอบที่สำคัญในช่องปาก ประกอบด้วย เยื่อเมือก น้ำลาย และฟัน ฟันประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 4 ชนิด คือ เนื้อเยื่อโพรงฟันทำหน้าที่ให้ความรู้สึกและให้อาหารเนื้อเยื่อฟัน เนื้อฟันเป็นองค์ประกอบป้องกันเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เคลือบฟันเป็นเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก และเป็นเนื้อเยื่อเพียงชนิดเดียวในร่างกายที่มีการแคลซิไฟล์มากที่สุด และ เคลือบรากฟันทำหน้าที่สำคัญในการยึดเกาะติดแน่นของตัวฟันกับขากรรไกร น้ำลายเป็นสารคัดหลั่งที่สร้างมาจากต่อมน้ำลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 คู่ในร่างกาย คือ ต่อมน้ำลายพาโรติค(parotid gland) ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร(submandibular gland) และต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual gland) ซึ่งสารคัดหลั่งจากแต่ละต่อมก็มีองค์ประกอบของสารเคมีที่แตกต่างกันไป โดยรวมมักประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม คลอไรด์ โบคาร์โบเนท และฟอสเฟต ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์สามารถลดการก่อฟันผุของกรดที่เกิดจากการผลิตของแบคทีเรีย โดยความเป็นกรด-เบสของน้ำลายโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 6.75 นอกจากนี้ น้ำลายยังมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ เช่น มิวซิน และโปรตีน (36)

โครงสร้างของเยื่อเมือกในช่องปากมักมีความชุ่มชื้นติดต่อรหว่างเยื่อเมือกที่ปกคลุมทางเดินอาหารและเยื่อเมือกที่ติดกับผิวหนังบริเวณริมฝีปาก เยื่อเมือกในช่องปากมีหน้าที่หลายประการ ได้แก่ การป้องกันเนื้อเยื่อระดับลึก รับความรู้สึกที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ รวมถึงยังมีปุ่มรับรส และต่อมน้ำลายเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น โดยสีของเยื่อเมือกนั้นสัมพันธ์กับปริมาณและการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็ก ความหนาเยื่อเมือก ระดับการสร้างเคราติน (keratin) รวมถึงปริมาณของเมลานิน โดยอาจพบต่อมไขมันที่ริมฝีปากบนและกระพุ้งแก้มประมาณ 3 ใน 4 ของผู้ใหญ่ (11)

สามารถแบ่งประเภทของเยื่อเมือกในช่องปาก คือ เยื่อเมือกที่ตาดช่องปาก (lining mucosa) เป็นบริเวณที่ไม่มีเคอราติน จึงทำให้ผิวบางกว่า สามารถยืดหยุ่นได้เนื่องจากมีเส้นใยยืดหยุ่น มักพบบริเวณริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม เยื่อเมือกเบาฟัน เพดานอ่อน ลิ้นด้านล่าง และพื้นช่องปาก เยื่อเมือกบดเคี้ยว (masticatory mucosa) เป็นบริเวณที่มีการสร้างเคอราติน จึงมักไม่ค่อยยืดหยุ่นและยึดแน่นกับเยื่อหุ้มกระดูก มักพบที่เพดานแข็งและเหงือก ซึ่งต้องรับแรงกด แรงเฉือน รวมถึงการเสียดสีจากอาหาร และเยื่อเมือกพิเศษ (specialized mucosa) เป็นเยื่อเมือกที่มีการปรับตัวเพื่อรับรสและทำหน้าที่ในการบดเคี้ยว มีการสร้างเคอราตินรวมถึงมีความยืดหยุ่นสูงด้วยเยื่อจากมีเส้นใยยืดหยุ่นและเส้นใยคอลลาเจน (collagen lining) มักพบที่ด้านบนของลิ้น (12) นิเวศวิทยาภายในช่องปากดังข้างต้นมีส่วนควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ทั้งด้านชนิดและปริมาณ ซึ่งสัมพันธ์กับโรคในช่องปาก ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากประกอบด้วยหลายสปีชีส์หลายชนิด ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส และปรสิต โดยส่วนมากมักพบเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดและเชื้อแบคทีเรียที่เด่นชัดที่สุด คือ เชื้อสายพันธุ์ streptococci เช่น *S. sanguis* *S. mitior* *S. milleri* *S. salivarius* และ *S. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคฟันผุในคนมากที่สุด โดยเชื้อ streptococci ตัวอื่นๆก็สามารถก่อโรคในช่องปากได้เช่นกันหากมีโอกาส นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดแท่งก็เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่พบในช่องปาก เช่น เชื้อสายพันธุ์ *Actinomyces* (36, 37)

5.2 อุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปาก

ในประชากรทั่วไปมีอุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปากหรือรอยโรคในช่องปากราว 5-25% โดยมีอัตราการเกิดรอยโรคซ้ำทุกๆ 3 เดือน สูงถึง 50% ของประชากรทั้งหมด ซึ่งเพศชาย และเพศหญิงมีแนวโน้มในการเป็นรอยโรคในช่องปาก คือ 48.3% และ 57.2% ตามลำดับ (9) โดยรอยโรคชนิดทุติยภูมิ (Recurrent aphthous stomatitis:RAS) หรือ รอยโรคในช่องปากที่เกิดเป็นซ้ำมีอุบัติการณ์ในการเกิดมากที่สุดเมื่อเทียบกับรอยโรคในช่องปากชนิดอื่นๆ ซึ่ง 80 - 85% ของผู้ป่วยที่เป็นรอยโรคในช่องปากที่เกิดเป็นซ้ำมักมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคต่ำกว่า 1 cm ซึ่งรอยโรคขนาดนี้สามารถหายได้เองภายใน 7 - 10 วันโดยที่ไม่ทิ้งแผลเป็นไว้ (10)

5.3 ความหมายของแผลในช่องปาก

รอยโรคในช่องปาก (oral Lesion) หรือแผลในช่องปาก เกิดจากเยื่อเมือกในช่องปากมีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติซึ่งมาจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การได้รับบาดเจ็บ การใช้ยาบาง

ชนิด ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน การติดเชื้อไวรัส การติดเชื้อรา และการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (11) ซึ่งรอยโรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดในช่องปาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกิน กลืนอาหาร และการพูดลดลง ซึ่งรบกวนคุณภาพชีวิตของผู้ที่เป็น (38)

5.4 การวินิจฉัยแผลในช่องปาก

โดยสามารถจำแนกรอยโรคที่มีอาการแสดงแผลและตุ่มพองในช่องปาก โดยใช้ข้อมูล 3 ประการ ซึ่งสามารถจัดประเภทของโรคได้ และนำไปสู่การวินิจฉัยโรค (12) คือ

5.4.1 ช่วงเวลาดังแต่รอยโรคเริ่มปรากฏจนถึงปัจจุบัน ซึ่งบางครั้งระยะแรกรอยโรคอาจยังไม่ปรากฏ หากประเมินแล้วพบว่า เป็นมาไม่เกิน 3 สัปดาห์ จัดว่าเป็นรอยโรคชนิดเฉียบพลัน (acute lesion) หากเป็นมานานมากกว่า 3 สัปดาห์จะจัดว่าเป็นรอยโรคชนิดเรื้อรัง (chronic lesion)

5.4.2 ประวัติการเป็นโรคที่รอยโรคคล้ายปัจจุบัน สามารถแยกรอยโรคที่เกิดขึ้นในครั้งแรก หรือรอยโรคปฐมภูมิ (primary disease) และรอยโรคกลับเป็นซ้ำหรือรอยโรคทุติยภูมิได้ (recurrent disease)

5.4.3 จำนวนของรอยโรค โดยสามารถแยกเป็นรอยโรคที่เกิดขึ้นเพียงรอยโรคเดียว (single lesion) หรือเกิดหลายรอยโรค (multiple lesion)

5.5 สาเหตุของแผลในช่องปาก

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคช่องปากหลายตำแหน่งเฉียบพลัน ได้แก่ โรคเริ่มในช่องปากปฐมภูมิ โรคงูสวัด โรคอีสุกอีใส คอหอยอักเสบเฉียบพลัน โรคมือ-เท้า-ปาก โรคเหงือกอักเสบเนื้อตาย แผลในช่องปากที่เกิดจากการใช้ยาเคมีบำบัด herpangina erythema multiform และ contact allergic stomatitis เป็นต้น

โรคที่เป็นสาเหตุของแผลกลับเป็นซ้ำในช่องปากซึ่งเป็นรอยโรคที่เป็นแล้วหายได้เองและกลับมาเป็นซ้ำโดยลักษณะของแผลเช่นเดิม แต่ตำแหน่งของแผลอาจเปลี่ยนไปจากเดิม ได้แก่ recurrent aphthous stomatitis Behcet's disease และการติดเชื้อไวรัสเริ่มซ้ำที่ช่องปาก

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคในช่องปากหลายตำแหน่งชนิดเรื้อรัง ได้แก่ pemphigus vulgaris bullous pemphigoid mucous membrane pemphigoid erosive and bullous lichen planus และการติดเชื้อไวรัสเริ่มเรื้อรังในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคเดี่ยวในช่องปาก ได้แก่ แผลบาดเจ็บ histoplasmosis blastoplasmosis และ mucomycosis (11)

5.6 การรักษาโรคในช่องปากสามารถรักษาตามอาการและตามสาเหตุของการเกิดรอยโรคซึ่งสามารถแบ่งประเภทของยาที่ใช้ในการรักษาโดยสังเขป คือ

5.6.1 น้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ เนื่องจากมีหลักฐานแสดงว่าการมีเอนามัยในช่องปากที่ดีส่งผลต่อการบรรเทาของรอยโรคในช่องปากบางชนิด (39) เช่น รอยโรค lichen planus หรือในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งสารสำคัญที่อยู่ในน้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ประกอบด้วย chlorhexidine gluconate 0.1-0.2% Povidone iodine 1% cetylpyridium chloride 0.05% เป็นต้น

5.6.2 สารเฉพาะที่มีฤทธิ์ระงับปวด เป็นการรักษาตามอาการโดยมีทั้งในรูปแบบของสารละลาย ยาป้าย ยาผง หรือเจล ซึ่งมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ระงับปวด คือ benzydamine, hydrochloride และ lidocain เป็นต้น

5.6.3 ยาด้านเชื้อรา ใช้สำหรับการติดเชื้อราในช่องปากและคอหอย โดยมีทั้งในรูปแบบยา น้ำแขวนตะกอน ยาทา ยาอม ยาเจล ยาครีม ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เฉพาะที่ และในรูปแบบยาเม็ด และยาแคปซูล ซึ่งออกฤทธิ์ทั่วทั้งร่างกาย ได้แก่ ยา nystatin, clotrimazole, miconazole และ fluconazole เป็นต้น

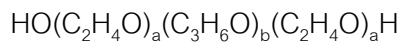
5.6.4 ยาด้านไวรัส มักใช้ทั้งในการรักษาและการป้องกันการติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสโรคเริม ไวรัสโรคงูสวัด โดยประกอบด้วยยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่ และออกฤทธิ์ทั่วทั้งร่างกาย เช่น ยา acyclovira, penciclovir และ valaciclovir เป็นต้น

5.6.5 ยากดภูมิคุ้มกันและสารปรับภูมิคุ้มกัน มักเป็นสารจำพวก corticosteroid ที่ใช้เฉพาะที่ที่ถูกดูดซึมน้อยมาก เช่น triamcinolone acetonide oral paste 0.1% beclomethasone spray เป็นต้น และสารปรับภูมิคุ้มกัน เช่น cyclosporin tacrolimus เป็นต้น (11) นอกจากนี้มีการศึกษาการรักษาโรคในช่องปากชนิดที่เกิดเป็นซ้ำ ด้วย propolis capsule ในผู้ป่วย (40)

6. คุณสมบัติของสารที่ใช้ในการพัฒนาสูตรตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีคุณสมบัติยึดเกาะเนื้อเยื่อ (mucoadhesive in situ gel) (41)

6.1 Poloxamer407

6.1.1 สูตรโมเลกุล



Poloxamer407 (a = 80, b = 27)

Poloxamer188 (a = 101, b = 56)

6.1.2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุล

Poloxamer407 = 7,680 – 9,510

Poloxamer188 = 9,840 – 14,600

6.1.3 ลักษณะทางกายภาพ

มีเป็นลักษณะเป็นสีขาว มัน ไหลง่ายในรูปแกรนูลหรือของแข็ง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส

6.1.4 หน้าที่ในตำรับ

Dispersing agent, emulsifying agent, solubilizing agent, tablet lubricant, wetting agent

6.1.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Poloxamer ใช้ในการเตรียมเภสัชตำรับ เป็น emulsifying หรือ solubilizing agents เนื่องจากมีส่วนที่ชอบน้ำ polyoxyethylene และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ polyoxypropylene นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้เป็น gelling agent ในตำรับที่เป็นเจลในความเข้มข้นร้อยละ 15 - 50

6.1.6 ความคงตัว

สามารถละลายได้ในสารละลายกรด ต่าง และมีประจุของโลหะ ซึ่งเชื่อว่าสามารถโต้ได้

6.1.7 การเก็บรักษา

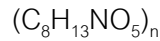
เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในที่แห้งและเย็น

6.1.8 ความไม่เข้ากัน

ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและอุณหภูมิ Poloxamer407 ที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่ละลายใน propylene glycol และ xylene

6.2 Chitosan (53)

6.2.1 สูตรโมเลกุล



6.2.2 ค่าน้ำหนักน้ำหนัโมเลกุล

10,000 – 1,000,000

6.2.3 ลักษณะทางกายภาพ

มีเป็นลักษณะเป็นสีขาวหรือสีครีมขาวหรือเกล็ด

6.2.4 หน้าที่ในตำรับ

Coating agent, disintegrant, film-forming agent, mucoadhesive, tablet binder, viscosity increasing agent

6.2.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Chitosan ใช้ในการเตรียมเภสัชตำรับหรือในเครื่องสำอางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยา เช่น การนำส่งไปที่ลำไส้ใหญ่หรือไปที่อื่น ควบคุมการปลดปล่อยยาในการใช้สำหรับตำรับ mucoadhesive สามารถทำให้ยาปลดปล่อยออกจากได้เร็วขึ้น ใช้เป็น gelling agent เป็นต้น chitosan สามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเภสัชตำรับต่างๆ เช่น gels, films, beads, microspheres, tablets และ coatings for liposomes

6.2.6 ความคงตัว

มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องถึงแม้จะสามารถดูดความชื้นหลังจากการอบแห้ง

6.2.7 การเก็บรักษา

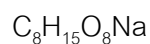
เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในที่เย็นและแห้ง 2-8 องศาเซลเซียส

6.2.8 ความไม่เข้ากัน

ไม่คงตัวใน strong oxidizing agents.

6.3 Carboxymethylcellulose sodium (53)

6.3.1 สูตรโมเลกุล



6.3.2 น้ำหนักโมเลกุล

262.19

6.3.3 ลักษณะทางกายภาพ

มีลักษณะเป็นผงแกรนูลสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส สามารถดูดความชื้นได้หลังอบแห้ง

6.3.4 หน้าที่ในตำรับ

Coating agent, stabilizing agent, suspending agent, tablet and capsule disintegrant, tablet binder, viscosity - increasing agent, water - absorbing agent

6.3.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Carboxymethylcellulose sodium ใช้ในการเตรียมเภสัชตำรับเพื่อเพิ่มความหนืดให้ในตำรับที่เป็นยาแขวนตะกอนเพื่อให้ผงยากระจายตัว สามารถใช้เป็น binder และ disintegrant ในยาเม็ด และเพิ่มความคงตัวของ emulsions ในความเข้มข้น ร้อยละ 3 - 6 สามารถใช้เป็น gelling agent นอกจากนี้ก็ยังเป็น mucoadhesive

6.3.6 ความคงตัว

สามารถดูดความชื้นได้สูงทำให้ลดความแข็งของเม็ดยาและเพิ่มเวลาในการแตกตัว ละลายในสารละลายที่ pH 2-10 และตกตะกอนที่ pH ต่ำกว่า 2 และ pH มากกว่า 10 ความหนืดของสารละลายจะลดลง โดย pH ที่ทำให้ที่ความหนืดของสารละลายมาที่สูงสุด คือ pH 7-9 มีความคงตัวที่ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะทำให้ความหนืดลดลงร้อยละ 25

6.3.7 การเก็บรักษา

เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในที่เย็นและแห้ง

6.3.8 ความไม่เข้ากัน

ไม่คงตัวในสารละลายที่มีความเป็นกรดสูงและสารละลายที่มีเกลือ เช่น aluminum, mercury และ zinc และไม่คงตัวกับ xanthan gum และเมื่อผสมกับ ethanol (95%) เกิดเป็นสารประกอบ cocervates กับ gelatin, pectin และ collagen นอกจากนี้ยังตกตะกอนกับโปรตีนที่มีประจุ

6.4 Carbomer (53)

6.4.1 สูตรโมเลกุล



6.4.2 น้ำหนักโมเลกุล

Carbopol 940 = 104,400

6.4.3 ลักษณะทางกายภาพ

มีลักษณะเป็นผงสีขาว (fluffy) สามารถดูดความชื้นได้ มีกลิ่นเล็กน้อย

6.4.4 หน้าที่ในตำรับ

Bioadhesive material, controlled-release agent, emulsifying agent, emulsion stabilizer, rheology modifier, stabilizing agent, suspending agent, tablet binder

6.4.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Carbomer ใช้ในการเตรียมเภสัชตำรับที่เป็นสารละลาย หรือ กึ่งของแข็ง เช่น creams, gels, lotions และ ointments ใช้สำหรับ ตา ทวารหนัก ช่องคลอด หรือ ในช่องปากเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น mucoadhesive ในการควบคุมการปลดปล่อย

Carbomer ใช้ในตำรับยาสำหรับ รับประทาน เช่น suspensions, capsules หรือ tablets โดยในตำรับ tablets สามารถใช้ในควบคุมการปลดปล่อยของตัวยา หรือ binders ในกระบวนการ wet granulation สามารถใช้เป็น granulating fluid

Carbomer ใช้ในการเตรียมเภสัชตำรับที่เป็น oil - in - water emulsions สำหรับใช้ภายนอก

6.4.6 ความคงตัว

สามารถดูดความชื้น มีความคงตัวที่ 104 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยมีผลต่อความหนืดน้อยมากแต่เมื่ออุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส 30 นาที จะทำให้เกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ เชื้อราไม่มีการเจริญเติบโตเมื่อ carbomer เป็นผงแห้ง แต่เมื่ออยู่ในรูปสารละลายจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี สามารถใช้ antimicrobial หรือ preservative ร่วมกันได้เช่น 0.1% w/v chlorocresol, 0.18% w/v methylparaben, 0.02% w/v propylparabens หรือ 0.1% w/v thimerosal แต่ไม่ควรใช้ benzalkonium chloride หรือ sodium benzoate ในความเข้มข้นสูง (0.1% w/v) เพราะจะทำให้ความหนืดในตำรับลดลง carbomer สามารถกระจายตัวได้ดีที่อุณหภูมิห้องและยังรักษาความหนืดของตำรับได้นาน แต่แสงจะทำให้ความหนืดลดลงเล็กน้อย

6.4.7 การเก็บรักษา

เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันอากาศ ป้องกัน ความชื้น ภาชนะที่ใช้ควรเป็นพลาสติก หรือ resin – lined

6.4.8 ความไม่เข้ากัน

เปลี่ยนสีได้โดย resorcinol และไม่คงตัวกับ phenol, cationic polymers, strong acids และ high levels of electrolytes เกิดประกอกับ หมู่ amino และ pH ทำให้เกิดสารประกอบส่งผลต่อ ความหนืดและการละลาย

6.5 Saccharin sodium(53)

6.5.1 สูตรโมเลกุล

$C_7H_4NNaO_3S \cdot 1/2H_2O$ (84%)

6.5.2 น้ำหนักโมเลกุล

217.24

6.5.3 ลักษณะทางกายภาพ

มีลักษณะเป็นผลึกผงสีขาว ไม่มีกลิ่นหรือมีกลิ่นจางๆ มีรสชาติดีหวานกับรสชาติดีที่ขมเล็กน้อย ที่สามารถพบในประชากรร้อยละ 25 หลังจากได้รับรสชาติดี

6.5.4 หน้าที่ในตำรับ

Sweetening agent.

6.5.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Saccharin Sodium เป็นสารให้ความหวานที่ใช้ในการปรุงแต่งเครื่องดื่ม อาหาร ของหวาน และ ในตำรับยาเช่น ยาเม็ด ยาผง ยาเจล ยาน้ำแขวนตะกอน ยาน้ำ น้ำยาบ้วนปาก หรือใช้ในการเตรียมวิตามิน ซึ่ง saccharin sodium นิยมนำมาใช้เนื่องจากให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส 300 ถึง 600 เท่าและสามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้ยังใช้ในเพิ่มรสชาติดีและยังสามารถกลบรสที่ไม่พึงประสงค์ได้

6.5.6 ความคงตัว

Saccharin sodium มีความคงตัวสูงแต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 125 องศาเซลเซียสที่ pH 2 ในเวลา 1 ชั่วโมงจะทำให้ saccharin sodium สลายตัวร้อยละ 76 ถึง 84 ในรูปสารละลายยาฉีดสามารถ autoclave ได้

6.5.7 การเก็บรักษา

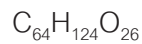
เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในที่แห้ง

6.5.8 ความไม่เข้ากัน

saccharin sodium ไม่เกิด Maillard browning reaction

6.6 Tween 80 (Polysorbate 80)(53)

6.6.1 สูตรโมเลกุล



6.6.2 น้ำหนักโมเลกุล

1310

6.6.3 ลักษณะทางกายภาพ

Tween 80 (polysorbate 80) มีกลิ่นและมีรสชาติขม ที่ 25 องศาเซลเซียสที่จะมีลักษณะเป็นของ หลวมมันสีเหลือง

6.6.4 หน้าที่ในตำรับ

Dispersing agent, emulsifying agent, nonionic surfactant, solubilizing agent, suspending agent, wetting agent

6.6.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

Tween 80 (polysorbate 80) เป็น nonionic surfactants ที่มีการใช้อย่างมากมายเช่น ใช้เป็น emulsifying agents ในการเตรียมตำรับอิมัลชัน (น้ำมันในน้ำ) solubilizing agents สำหรับน้ำมันหอมระเหย และวิตามิน wetting agents ในตำรับยาแขวนตะกอนและนอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่ม bioavailability ของยารับประทาน ผ่าน P-glycoprotein ยังนำไปใช้ในด้าน เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อาหาร

6.6.6 ความคงตัว

Tween 80 (polysorbate 80) คงตัวใน electrolytes กรดอ่อน และ เบสอ่อน แต่สามารถดูดความชื้นแะหากเก็บไว้นานจะเกิด peroxides

6.6.7 การเก็บรักษา

เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท กันแสงในที่แห้งและเย็น

6.6.8 ความไม่เข้ากัน

เกิดการเปลี่ยนสีหรือตกตะกอนกับ phenols, tannins, tars, and tarlike materials และ สารในกลุ่ม paraben เช่น Methylparaben จะลด คุณสมบัติของ Polysorbate

6.7 Peppermint oil (54)

6.7.1 สูตรโมเลกุล

-

6.7.2 น้ำหนักโมเลกุล

-

6.7.3 ลักษณะทางกายภาพ

เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนถึงสีเหลืองใส

6.7.4 หน้าที่ในตำรับ

Flavoring agent

6.7.5 การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม

นำมาใช้ในการแต่งกลิ่นของ อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง

6.7.6 ความคงตัว

ไม่มีกำหนดขึ้นอยู่กับการเก็บรักษา

6.7.7 การเก็บรักษา

เก็บที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส ที่แห้งและเย็นในภาชนะป้องกันแสงที่ปิดสนิท

6.7.8 ความไม่เข้ากัน

ไม่คงตัวกับ oxidizing agents

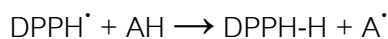
7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

7.1 Voltammeter technic (42)

เป็นเทคนิควิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่มีฟินอลเป็นองค์ประกอบ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์บริเวณพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าเฉื่อย โดยสามารถวิเคราะห์ในสิ่งมีชีวิต สารสกัดจากพืช เป็นต้น โดยวัดจากการกวาดศักย์ไฟฟ้าของขั้วที่ใช้งานเป็นฟังก์ชันเทียบกับเวลา ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าของ oxidation peak จะเป็นลักษณะเฉพาะของสารที่วัด เปรียบได้กับความแรงของการต้านอนุมูลอิสระ

7.2 Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)-scavenging assay (43, 44)

เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารสังเคราะห์ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระในสารละลาย ethanol แล้วจะทำให้สีม่วงจางลง ดังสมการ



สีม่วง สีเหลือง

เนื่องจาก DPPH[·] เป็นสารที่เสถียรจึงเกิดปฏิกิริยาที่ช้า จึงทำให้ก่อนวัดการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาด้านอนุมูลอิสระโดยสมบูรณ์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จางลงเป็นการวัดปริมาณของ DPPH[·] ที่เหลือจากการต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ $\mu\text{M}/\text{mg}$ มีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition DPPH}^{\cdot} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

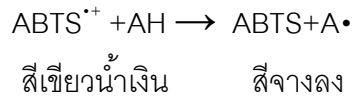
โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีสำหรับวิธีนี้ คือ ง่ายและสะดวก สำหรับข้อเสีย คือ DPPH[·] ไม่ไวต่อปฏิกิริยาทำให้ค่าที่วัดออกมาต่ำกว่าความเป็นจริง ถูกรบกวนได้ง่ายจากโลหะซึ่งมีผลทำให้สีของสารทดสอบจางลงจึงอาจแปรผลผิดพลาด รวมทั้งทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่อยู่ในแอลกอฮอล์แล้วเท่านั้น

7.3 ABTS radical scavenging assay (42, 43)

เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารสังเคราะห์ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจาก ABTS^{·+} ดูดกลืนแสงสูง จึงต้องเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer โดย

จะทำปฏิกิริยาด้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลาย ethanol เจือจาง หรือสารละลายน้ำ ซึ่งส่งผลให้สีของสารทดสอบมีความเข้มขึ้นต่ำลง ดังสมการ



สามารถวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารตัวอย่าง โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox เช่นกัน ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

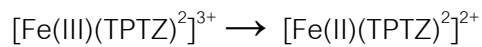
$$\% \text{ Inhibition ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีวิเคราะห์นี้คือ ทำปฏิกิริยาด้านอนุมูลอิสระได้เร็วทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์ และในช่วง pH ที่กว้าง สำหรับข้อเสีย คือ ต้องทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนจึงเกิดอนุมูลอิสระ เช่น enzyme reaction หรือ chemical reaction

7.4 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (43, 44)

เป็นวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยคุณสมบัติของอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน ในที่นี้ คือ สารเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดิวชันเปลี่ยนจากสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ เป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังสมการ



โดยการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนจากสารเฟอร์รัสซัลเฟต คือสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striaizine) ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก มาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซีเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (FeCl_3) จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ซึ่งสามารถหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ FRAP value โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเฟอร์รัสซัลเฟต

ข้อดีสำหรับวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก ไม่เสียเวลา ผลการทดสอบแม่นยำ และข้อเสีย คือ สารละลายอ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน และปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะในร่างกาย

7.5 Lipid peroxidase inhibition (43)

วิธีการวิเคราะห์นี้อาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันลูกโซ่ของอนุมูลอิสระกระทำกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งทำให้เกิดโมเลกุลของลิพิดเปอร์ออกไซด์ หรือ ปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตส่งผลให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจึงเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคต่างๆ

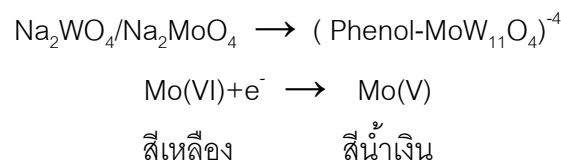
โดยวิธีนี้เป็นการทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ในตับหนู เมื่อตับของหนูเกิดปฏิกิริยา lipidperoxidation ทำให้มีการสร้างสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) เมื่อเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก ทำให้เกิดสารมีสี ชื่อ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) เมื่อเติมสารยับยั้งอนุมูลอิสระลงไปมีผลทำให้สารที่มีสีจางลง โดยมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ซึ่งสามารถคำนวณหา% inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532 \text{ control}} - A_{532 \text{ test sample}}) / A_{532 \text{ control}}] \times 100$$

สำหรับข้อดีของวิธีวิเคราะห์นี้ คือ ทำการศึกษาง่าย สะดวก ไม่แพง และข้อเสีย คือ เนื่องจากต้องทดสอบในตับของสิ่งมีชีวิต วิธีวิเคราะห์นี้จึงไม่เป็นที่นิยม

7.6 Folin-Denis method (42)

เป็นวิธีในการหาปริมาณ total phenolic compound ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งใช้ reagent คือ Sodium tungstate Phosphomolybdic Orthopgopholic acid และ Sodium bicarbonate โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสีจากการเกิดปฏิกิริยาของไอออน Mo(VI) มีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะอยู่ในรูป Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดังสมการ



โดย Mo(V) สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ซึ่งใช้การเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (+)-catechin ในการเทียบหาปริมาณ total phenolic compound

สำหรับข้อดีของวิธีวิเคราะห์นี้ คือ สะดวก ง่าย ให้ผลทดสอบแม่นยำ

7.7 Folin-Ciocalteu method (44)

เป็นวิธีในการหาปริมาณ total phenolic compound ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ เช่นเดียวกันกับวิธีวิเคราะห์แบบ Folin-Denis method แต่ใช้ reagent บางตัวต่างกันซึ่งประกอบด้วย Sodium tungstate Sodium molybdate Phosphoric acid และ Sodium carbonate ซึ่งอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์กับ Molybdotungstate ion ในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน

8. การทดสอบการต้านอักเสบ

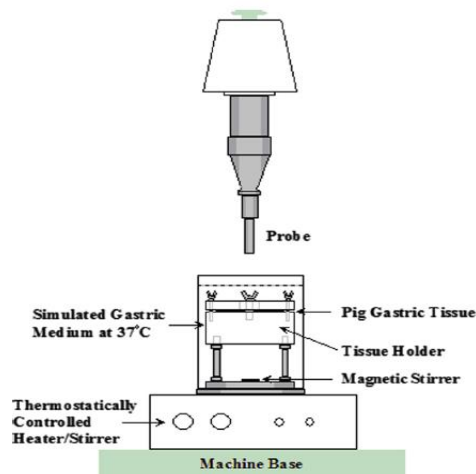
8.1 Liu HS.et al,2012 (45) ทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบของสาร alpha mangostin ต่อยีนส์ที่ควบคุมกระบวนการอักเสบ ซึ่งเป็นเซลล์ myeloid leukemic ของมนุษย์ ซึ่งถูกเหนี่ยวนำจากการเลี้ยงต่างกัน คือ เซลล์ U937 ถูกเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ซึ่งประกอบด้วย fetal calf serumเข้มข้น 10% glutamine เข้มข้น 2 นาโนโมล penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO₂ 5% และเซลล์ EL-4 เป็นเซลล์ที่ถูกเติม phorbol-12-myristate-13-acetate ลงไปในอาหาร RPMI 1640 จนมีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองเซลล์ U937 ถูกเติมสารละลาย alpha mangostin เข้าไปด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 7.6, 12.5, 30.5 นาโนโมล ตามลำดับลงไปในการเลี้ยงเซลล์ และเซลล์ EL4 ถูกเติมสารละลาย alpha-mangostin เข้าไปด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 3.0, 6.1, 12.2 นาโนโมล แล้วบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO₂ 5%จากนั้นจึงเติมสารละลาย lipopolysaccharide เข้มข้น 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วบ่มเซลล์ต่อภายใต้สภาวะเดิม 4 ชั่วโมง

โดยระดับการต้านอักเสบของสาร alpha-mangostin ประเมินจากระดับของสารก่ออักเสบ tumor necrosis factor (TNF)- α และ interleukin (IL)-4 ในสารละลายที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ซึ่งหาปริมาณสารก่ออักเสบเหล่านี้ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay kits แล้ววัดออกมาในค่าของความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 50% (IC₅₀; หน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรม GraFit software

9. การทดสอบ mucoadhesive เป็นเครื่องมือที่วัดแรงที่เกิดการแยกกันของพันธะยึดติด

9.1 Texture Analyzer เทคนิค

Texture Analyser เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการวัดแรงในการแยกออกจากกันและแรงในการยึดติด เป็นผลมาจากพื้นที่ใต้กราฟของแรงกับระยะทาง การทำงานของ texture Analyser จะมีส่วน tissue holder จะสามารถใส่ mucosal tissue ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 14 มิลลิเมตร และมี probe เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร(double-sided adhesive tape) ที่ใช้ในการกดทับลงไป ใน mucosal tissue ตามระยะเวลาและแรงที่กำหนด จากนั้น probe จะเคลื่อนที่ขึ้นจนแยกออกจาก mucosal tissue ในอัตราเร็วที่คงที่ที่กำหนด ซึ่งจะสามารถวัดแรงที่เกิดระหว่างที่เกิดแยกออกจากกันของ probe และ mucosal tissue โดยสามารถควบคุมอุณหภูมิ สารละลาย ความเร็วของการหมุน magnetic stir bar ได้ตามต้องการ texture analyser ข้อดีคือนิยมใช้ในการทดสอบกับตัวรับที่มีความเป็น mucoadhesive หรือไม่เป็น mucoadhesive นอกจากนี้ยังใช้ในการประเมิน compressibility และ hardness

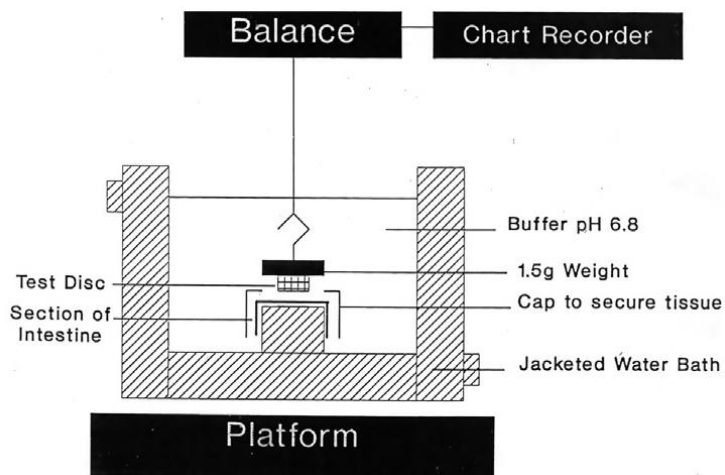


รูปที่ 4 เครื่องทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อสำหรับ Texture Analyzer เทคนิค (46)

9.2 Modified balance/surface tensiometer เทคนิค

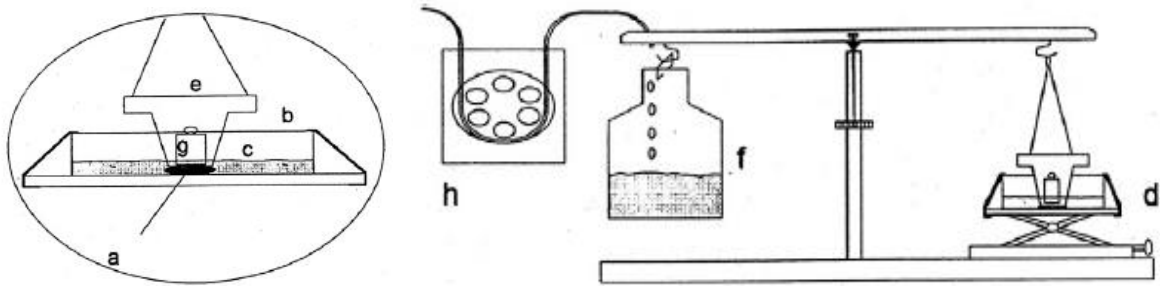
Modified balance/surface tensiometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หลักการวัดความสมดุลและแรงตึงผิว แบ่งออกเป็น

9.2.1 เครื่องมือ Smart เตรียม test disc ที่บรรจุ carbomer, hypromellose, gelatin และ macrogol 6000 ที่ติดอยู่กับ 1.5 กรัม ซึ่งผูกกับ balance ด้านบน สามารถปรับระดับของ balance ให้ลดลงมาติดกับ mucosal tissue เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ พอลิเมอร์ และ mucosal tissue เกิดแรงยึดติด หลังจากนั้นจะเลื่อน platform ลงมาช้าที่สุดในอัตราเร็วที่คงที่(1 มิลลิเมตรต่อวินาที) เกิดแรงระหว่างพอลิเมอร์กับเยื่อเมือกที่แยกออกจากกัน



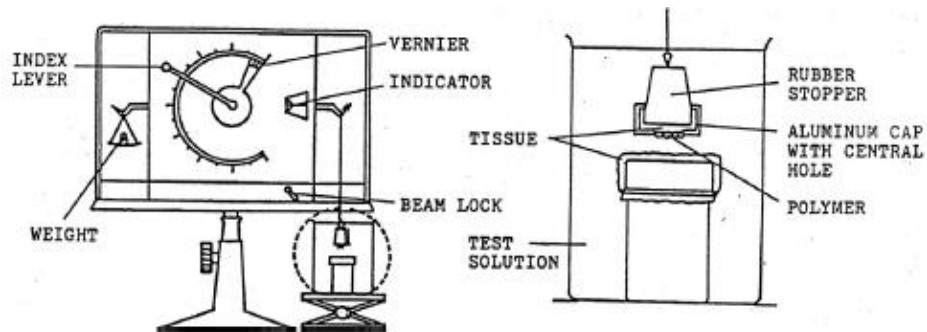
รูปที่ 5 เครื่องมือ Smart สำหรับทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อสำหรับ (46)

9.2.2 เครื่องมือ Parodi เป็นเครื่องที่ใช้หลักการวัดความสมดุลและแรงตึงผิวแบบ two-arm balance โดยจะใช้ alginate gel แทน mucosal tissue (c) ที่ใช้ยึดติดกับ disc (a) อยู่ในบีกเกอร์ (b) ที่วางอยู่บน platform ซึ่งมีแก้ว (e) ที่ภายในจะมีน้ำหนักถ่วง (g) และภาชนะสำหรับใส่น้ำ (f) เพื่อให้เกิดสมดุลทั้งสองข้าง แรงยึดติดที่แยกออกจากกันเกิดจากการใช้ปั๊ม (h) เติมน้ำลงไป ในภาชนะสำหรับใส่น้ำ (f) โดยจะใช้น้ำหนักของน้ำที่ทำให้เกิดการแยกออกจากกัน



รูปที่ 6 .According to Parodi : a: disc; b: glass beaker; c: gel; d: moving platform; e: stopper; f: counterbalance; g: preload; h: pump (46)

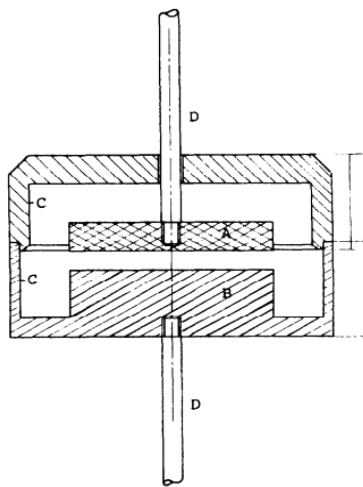
9.2.3 เครื่องมือของ Park และ Robinson มีขวดแก้วที่วางอยู่ในบีกเกอร์มีสารละลาย test solution ที่ตั้งอยู่บน platform โดยมี mucosal tissue ติดกับ rubber stopper และวางติดกับขวดแก้ว โดย platform ถูกยกขึ้นให้ mucosal tissue ทั้ง 2 ติดกัน โดยมีพอลิเมอร์ที่ขอบน้ำอยู่ระหว่างกลาง หลังจาก que mucosal tissue ทั้ง 2 ติดกัน 1 นาที จะเพิ่มน้ำหนัก 10 มิลลิกรัมต่อวินาทีจน mucosal tissue ทั้ง 2 แยกออกจากกัน



รูปที่ 7 According to Park and Robinson a modified surface tensiometer for an in vitro evaluation of bioadhesion (46)

9.3 Tensile apparatus

Tensile apparatus เครื่องมือที่ประกอบด้วย Plexiglas discs 2 ชิ้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร (A,B) ที่ยึดกับแผ่นโลหะ(D) ซึ่ง discs ทั้งสองชิ้นจะถูกปิดด้วย cylindrical chamber ในการวัดแรงยึดติดจะใส่ตัวรับที่ต้องการวัดระหว่างช่องว่างของ discs 2 มิลลิเมตร กับเยื่อเมือกที่ต้องการจะใช้ในการทดลอง เช่นการรักษาแผลในปากจะให้ตัวรับที่ต้องการวัดน้ำลายหรือน้ำลายเทียมเป็นเวลา 120 นาที เพื่อให้ได้อยู่สภาพจะใกล้เคียงกับในช่องปาก และจะใช้ strain rate 0.1 มิลลิเมตรต่อวินาที กดลงไปเพื่อให้ discs ทั้ง 2 แนบติดกันซึ่งจะบันทึกแรงที่ได้เป็นกราฟของ stress-strain curves เป็นเครื่องสำหรับวัดตัวรับที่เป็น pastes ที่มีความหนืดสูง เช่น polyethylene และ sodium carboxymethylcellulose หรือ ตัวรับ gelatin เป็นต้น จากการศึกษพบว่าเครื่องนี้มีสัมประสิทธิ์การแปรปรวน ถึง 41 เปอร์เซ็นต์ สำหรับข้อดีคือไม่ต้องใช้ เยื่อเมือกจากสัตว์

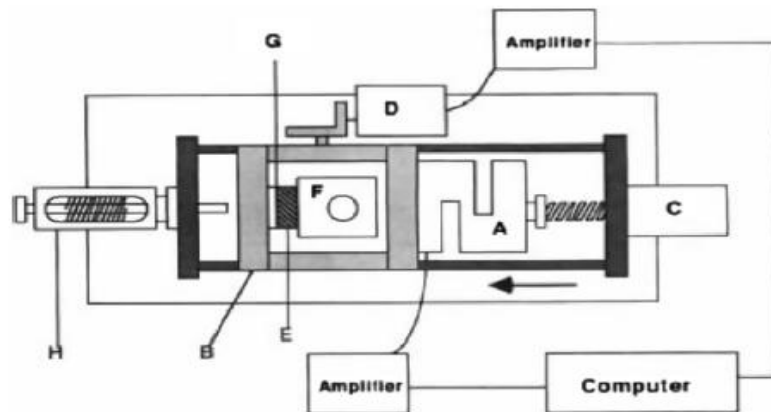


รูปที่ 8 แผนภาพของ Tensile apparatus ในการกำหนดความแข็งแรงของแรงยึดติด (47)

9.4 Tensile stress tester

Tensile stress tester เครื่องมือประกอบด้วย load cell (A) จะถูกทำให้เคลื่อนที่โดยมอเตอร์ (C) ที่มีตัววัดระยะ (D) ที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ในการแปลผล การเตรียมคือการทำให้ sample discs และ sample holder ติดกัน (F) การดาซกรอง (G) จะถูกยึดไว้ (B) ที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำ การวัดการเคลื่อนที่และแรงของเครื่องมือจะเคลื่อนที่จนกระทั่ง sample holder (F) ติดกับกระดาซกรองและให้แรง preload (H) (300mN, 3 นาที) หลังจากนั้นมอเตอร์ (C) จะเคลื่อนที่ออกในอัตรา 4 มิลลิเมตรต่อวินาทีจน

เกิดการแยกออกจากกันของโดยสมบูรณ์ระหว่าง sample holder กับกระดาศกรอง ผลที่ได้จะเป็นการ ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มระยะทางและการเพิ่ม Tensile strength ซึ่ง dressing(E) เป็นส่วนที่มี tackifying resin และ butyl rubber (non-dispersive preparation) หากไม่มี resin อยู่ใน dressing(E) จะทำให้แรงที่แยกออกจะลดลงและแรงที่ยึดติดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำเข้าไปซึ่ง dressing(E) ดูดกับน้ำเป็นค่าคงที่ 1 กรัมต่อเซนติเมตร เป็นเครื่องมือที่วัดค่ารับที่เป็น hydrocolloid base เช่น gelatin, pectin และ carmellose เป็นต้น ข้อดีคือไม่ต้องใช้เยื่อเมือกจากสัตว์และไม่ต้องเตรียมภาวะ ในช่องปาก

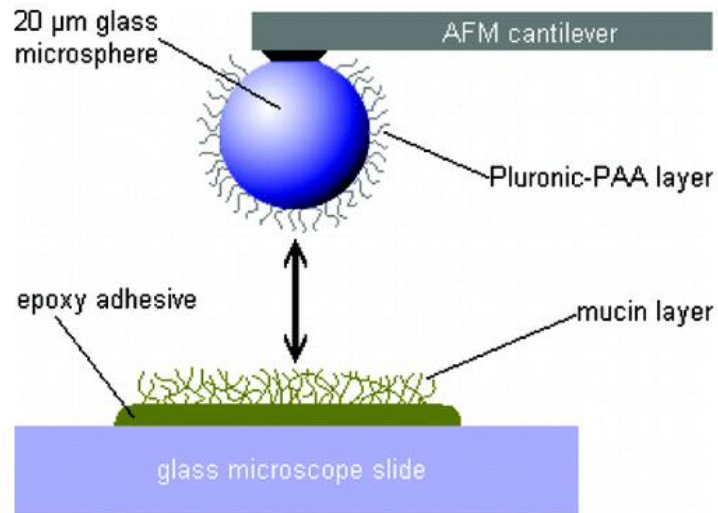


รูปที่ 9 Schematic drawing of the tensile stress tester (46)

9.5 Atomic Force Microscopy (AFM) เทคนิค (46, 48)

Atomic Force Microscopy เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดแรงยึดติดกับการเปลี่ยนแปลงที่พื้นผิวสัมผัส ระหว่างพอลิเมอร์และเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้ในการศึกษาแรงยึดติดของตัวรับหรือพอลิเมอร์กับเนื้อเยื่อ โดย เครื่องมือจะอธิบายลักษณะการสร้างภาพของโครงสร้างพื้นผิวที่เกิดการสัมผัสกันระหว่างพอลิเมอร์ และเนื้อเยื่อในรูปแบบ 3 มิติ และเครื่องมือ AFM วัดแรงยึดติดของพอลิเมอร์และเนื้อเยื่อที่ใช้ใน การศึกษา โดยการความสัมพันธ์ของแรงและระยะทาง ตัวอย่างการศึกษาของ Cleary et al., 2004 โดยการใช้พอลิเมอร์ Pluronic-PAA copolymer และ mucin-coated surfaces โดยอนุภาคคอลลอยด์ ขนาดอนุภาคทรงกลมจะถูก AFM cantilever กดลงไปเพื่อให้สัมผัสกับ mucin-coated surfaces ที่อยู่ บน epoxy adhesive layer เห็นได้ชัดว่าพื้นผิวของพอลิเมอร์และเนื้อเยื่อมีความแตกต่าง โดยความเร็ว ที่แยกพอลิเมอร์และเนื้อเยื่อออกจากกันมีผลต่อการวัดกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความเร็วที่

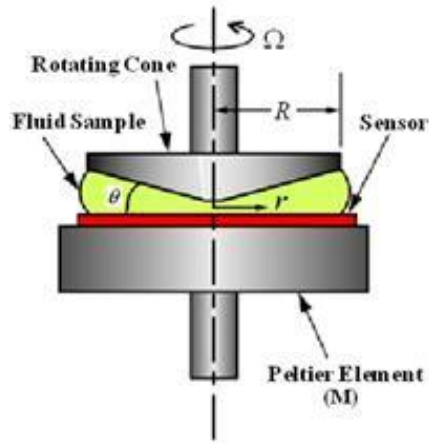
เหมาะสมคือ 0.02 ไมโครเมตรต่อวินาที ข้อดีคือสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว แต่มีข้อจำกัดกับการใช้ในตำรับที่หลากหลายและต้องใช้เวลา



รูปที่ 10 ส่วนประกอบของ AFM และที่ดัดแปลงสำหรับการวัดแรงยึดติดแรงระหว่างพอลิเมอร์และพื้นผิวเยื่อเมือก (48)

9.6 Rheometer

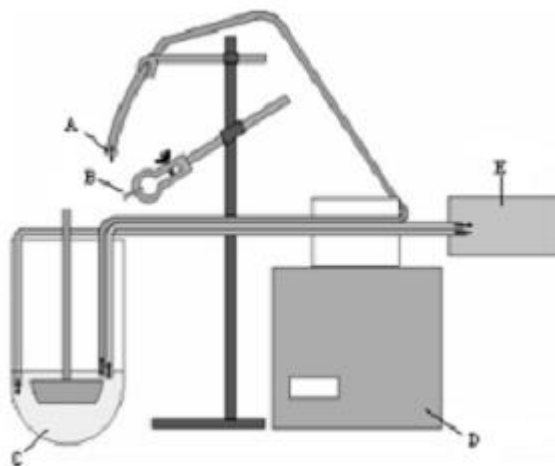
Rheometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดการยืดเกาะเนื้อเยื่อและวัดความหนืด โดยใช้ประโยชน์ในการอธิบายคุณสมบัติการไหลของสาร ตัวอย่างการศึกษาของ Groo AC. et al, 2013 (61) สำหรับ rheometer แบบ cone-plate ที่ใช้ในวัดคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อของยา Paclitaxel โดยตั้งค่าอุณหภูมิเครื่องไว้ที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส strain amplitude 0.01%-100% ความถี่ 0.1-100 Hz และควบคุมค่า shear rate แสดงค่า viscosity ข้อดีคือ ใช้ตัวอย่างในการทดสอบปริมาณน้อย ไม่ต้องใช้เยื่อเมือกจากสัตว์



รูปที่ 11 Cone and plate rheometer (61)

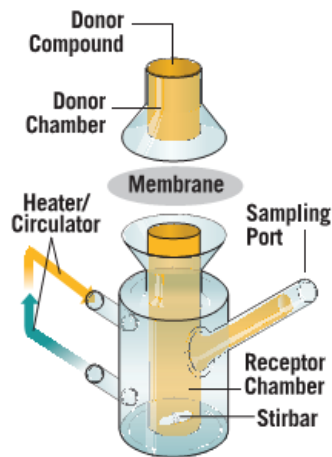
10. การทดสอบการปลดปล่อยยาจากตำรับยาเจลป้ายปาก

10.1 Adamo F. et al, 2011 (51) ทดสอบการปลดปล่อยของยา chorhexidine ในหลอดทดลอง (In vitro) จากตำรับยาเจลป้ายปากในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยใช้ USP 26/NF paddle ที่มีความเร็วในการหมุน 50 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 0.2 °C โดยเจลป้ายปาก chorhexidine ถูกวางไว้ในที่กั้นของ dissolutor เมื่อถึงระยะเวลา (time interval) มีการสุ่มสารละลายบัฟเฟอร์มาหาปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาด้วยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับการทดลองการปลดปล่อยของยาจากการใช้ New Developed Apparatus (Carlo CG. et al, 2008) ซึ่งเป็น apparatus ที่ออกแบบมาเลียนแบบสภาพแวดล้อมในช่องปาก ซึ่งประกอบด้วย Gilson 305 membrane pump ที่หยดสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 0.2 °C ลงบนเจลป้ายปาก chorhexidine ซึ่ง pump จะมีระยะห่างจากเจล 2 เซนติเมตร ด้วยอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเจลป้ายปาก chorhexidine ถูกวางไว้บนเยื่อบุกระพุ้งแก้มของหมูซึ่งแขวนอยู่บนแท่น PVC ที่ทำมุม 45 องศา โดยบนแท่น PVC มีรูเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 2 รู เพื่อหยดและดูดสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อนำไปหาปริมาณยา Chorhexidine ที่ปลดปล่อยออกมา ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง UV (49)



รูปที่ 12 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการปล่อยปลดของ Adamo F. et al; A) Dropper, B) Porcine Mucosa and gel, C) Receiving Compartment, D) Pump, E) UV Detector (50)

10.2 นอกจากนี้ Adamo F. และคณะ ยังทดสอบการปลดปล่อยและการแพร่ของ Chorhexidine ในหลอดทดลอง (In vitro) จากตำรับยาเจลป้ายปากโดยการใช้ modified Franz diffusion cell ซึ่งส่วนของ chamber ด้านล่างบรรจุสารละลายน้ำลายเทียม ปริมาตร 4.8 ลิตร pH 7.0 คือ สารละลายผสมของ Na_2HPO_4 2.38 กรัม KH_2PO_4 0.19 กรัม NaCl 8 กรัม ต่อ 1 ลิตรของน้ำกลั่น ซึ่งปรับ pH ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีค่า pH 6.8 ± 0.05 (51) เพื่อเลียนแบบสิ่งแวดล้อมในช่องปาก ขณะที่ chamber ด้านบนบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร pH 7.4 เพื่อเลียนแบบระบบหมุนเวียนเลือด ซึ่งมีเยื่อบุกระพุ้งแก้มของหนูคั่นระหว่าง chamber ด้านบนและด้านล่างโดยวางเจล Chorhexidine ตัวอย่างไว้ด้านบนกระพุ้งแก้มหนูด้าน chamber ล่าง โดยมีแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ช่วยคนด้วยความเร็ว 600 rpm เพื่อเลียนแบบการเคลื่อนไหวของช่องปาก โดยสารละลายใน chamber ล่างจะถูกดูดออกไป 20 ไมโครลิตร ทุกๆ 30 นาที เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยา Chorhexidine ที่ถูกปลดปล่อยออกมา ในขณะที่สารละลายใน chamber ด้านบนถูกดูดออกมาในปริมาณเท่ากัน ที่เวลา 0 นาที 5 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 7 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของยา Chorhexidine ที่แพร่ผ่านเยื่อบุกระพุ้งแก้ม ด้วยเครื่องมือ HPLC (52)



รูปที่ 13 แสดง modified Franz diffusion cell (53)

10.3 Preeti K. et al, 2014 ทดสอบการปลดปล่อยของยา Fluconazole ในตำหรับ bioadhesive gel โดยการใช้ modified Franz diffusion cell ซึ่งเป็นการออกแบบการศึกษาการแพร่ของยาผ่านเยื่อ cellophane ขนาด 2 เซนติเมตร ในหลอดทดลอง โดยเจล Fluconazole ตัวอย่างขนาด 2 กรัม ถูกแปะไว้ด้านหนึ่งของหลอดทดลอง ซึ่งบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส โดยมีแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ช่วยคนด้วยความเร็ว 300 rpm ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่างจะถูกดูดขึ้นมา 2 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตรเท่ากันลงไปทดแทน โดยสารละลายตัวอย่างที่ถูกดูดขึ้นมาจะถูกหาปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV (54)

10.4 Anoop NV., Prakash RB., 2014 ทดสอบการปลดปล่อยในหลอดทดลอง (In vitro) ของสาร curcumin จากตำรับยาเจลป้ายปากที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อรา *Candida albicans* โดยทดสอบใน USP dissolution apparatus 2 ซึ่งใช้ simutae saliva เป็นสารละลาย medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 0.2 °C มีความเร็วในการหมุน 25 รอบต่อนาที โดยสารละลายตัวอย่างจะถูกสุ่มดูดออกมา 5 มิลลิลิตร และถูกแทนที่ด้วยสารละลาย medium ใหม่ในปริมาตรเดียวกัน ซึ่งสารละลายตัวอย่างที่ถูกดูดออกมาจะถูกวิเคราะห์ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (49)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และ วัสดุ อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 ชันชันโรง (Propolis) จากสวนมังคุด ในอำเภอมะขาม ตำบลป้อวี จังหวัดจันทบุรี
- 1.2 Ethanol (RCL labscanlimited)
- 1.3 Hexane (RCL labscanlimited)
- 1.4 Orthophosphoric acid (RCL labscanlimited)
- 1.5 Acetonitrile (RCL labscanlimited)
- 1.6 Poloxamer 407 (Sigma)
- 1.7 Chitosan (low molecular weight) (Sigma)
- 1.8 Ethylene diaminetetraacetic acid (Sigma)
- 1.9 Carboxymethylcellulose sodium (Sigma)
- 1.10 Carbomer940 (TC เคมีคอลจำกัด)
- 1.11 Saccharin sodium (CHN)
- 1.12 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma)
- 1.13 Mucin from porcine stomach Type II (Sigma)
- 1.14 Na_2HPO_4 (Di-sodium hydrogen phosphate) (QReC)
- 1.15 KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogenphosphate) (QRec)
- 1.16 Phosphoric acid (RCL labsean)
- 1.17 Mucin from porcine stomach (Sigma)
- 1.18 Alpha-mangostin reference standard (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.)
- 1.19 Triethanolamine (TC เคมีคอลจำกัด)

2. วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 2.1 Beaker ขนาด 10, 50 , 100, 500 ml (Durun)
- 2.2 Centrifuge (Thermofisher)
- 2.3 Micropipettes 50-1000 μ L (RAININ)
- 2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (agilent)
- 2.5 HPLC vial (agilent)
- 2.6 Hot plate
- 2.7 Magnetic stirrer and stirrer bar 2 cm (IKA C-MAG HS)
- 2.8 Sonicator (wise clean)
- 2.9 Vortex (2Genie)
- 2.10 Test tube 10, 50 ml (Wise clean)
- 2.11 Bottle glass 10, 25, 60 ml (duran)
- 2.12 Mortar and pestle
- 2.13 ตักรอง 0.22 ไมโครเมตร (Verticlean)
- 2.14 Volume metric flask 10, 100 ml (duran)
- 2.15 อะลูมิเนียมฟอยด์(Diamand)
- 2.16 Microplate (thermo)
- 2.17 Microplate reader (Accur reader)
- 2.18 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (sartorius)
- 2.19 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (meter toledo)
- 2.20 Compact pH meter pH 33 (Laqua)
- 2.21 Shaking incubator (TT-60-SI Hercuvan)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาข้อมูล ทบทวนวรรณกรรม

- 1.1 ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติและประเภทของพอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิที่นำมาใช้ตำรับ in situ gel
- 1.2 ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่นำมาทดลอง (ชั้นชั้นโรงและพอลิเมอร์)
- 1.3 ศึกษาประเภทของพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็น mucoadhesive
- 1.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติ mucoadhesive
- 1.5 ศึกษาเกี่ยวกับเครื่องมือและวิธีการตรวจสอบคุณสมบัติ mucoadhesive
- 1.6 ศึกษาวิธีตรวจคุณลักษณะของตำรับ in situ gel ที่ได้จากสารสกัดชั้นชั้นโรง (ทดสอบการปลดปล่อยของสาร alpha-mangostin)
- 1.7 ศึกษาฤทธิ์และทดสอบฤทธิ์ของตำรับ in situ gel ที่ได้จากสารสกัดชั้นชั้นโรง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การปลดปล่อยสารสำคัญ
- 1.8 ศึกษาพยาธิสภาพในช่องปาก
- 1.9 ศึกษาประเภทรอยโรคและสาเหตุของรอยโรคในช่องปาก

2. เตรียมและทดสอบคุณสมบัติสารสกัดจากชั้นชั้นโรง

2.1 เตรียมสารสกัดชั้นชั้นโรง

- 2.1.1 นำชั้นชั้นโรงมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้ง (อบที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง)
- 2.1.2 นำชั้นโรง 4 กรัม หมักในเอทานอล 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10) ลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml จำนวน 3 หลอด
- 2.1.3 นำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมชั้นชั้นโรงในเอทานอล ไปเข้าเครื่อง Sonicator ที่อุณหภูมิ 40 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.1.4 ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที 2 ครั้ง

2.1.5 เก็บส่วนที่ใส (supernatant) มาระเหยใน hood ที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืนจนกว่าจะแห้ง

2.1.6 นำสารสกัดที่ได้มาทำการสกัดเอาส่วนที่เป็นไข (wax) ออกด้วยเฮกเซน จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร (จนสารละลายที่ทำการ partition ใส) แล้วนำไประเหยใน hood ที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืนจนกว่าจะแห้ง

2.1.7 หาผลผลิตร้อยละที่ได้จากการ dewaxing กับ Hexane (% yield) จากสูตรที่ 1

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{ผลผลิตที่ได้จริง}}{\text{ผลผลิตตามทฤษฎี}} \times 100\% \text{ -----(1)}$$

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ P407

2.2.1 เตรียมสารละลายโดยนำ P407 ในน้ำเย็น (5 องศาเซลเซียส) ตามความเข้มข้นที่ต้องการ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w) (15)

2.2.2 คนจนได้สารละลายใสแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2.2.3 นำขวดที่บรรจุสารละลายตัวอย่างมาวางบน water bath และ นำไปวางบน magnetic stirrer bar โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียสและ magnetic bar หมุนด้วยความเร็ว 50 rpm

2.2.4 ใช้ thermometer วัดอุณหภูมิจากนั้นสังเกตและบันทึกอุณหภูมิที่ทำให้ magnetic bar หยุดหมุนซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$)

2.2.5 การทดลองหา $T_{\text{sol-gel}}$ ที่เหมาะสมของความเข้มข้น P407 ต้องการอยู่ระหว่าง 32 - 37 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียม P407 ร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

2.3.1 วิธีเตรียมใช้ poloxamer 407 (P407) ร่วมกับ sodium carboxymethylcellulose (SCMC)

1) ชั่ง SCMC ตามน้ำหนักที่ต้องการ

2) นำ SCMC ที่ชั่งได้ไปละลายในน้ำเย็นที่ 5 องศาเซลเซียสจนจนละลาย

- 3) เติม P407 ตามน้ำหนักที่ต้องการลงคนจนละลาย
- 4) เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปวิเคราะห์

2.3.2 วิธีเตรียมใช้ poloxamer 407 (P407) ร่วมกับ carbomer 940 (C940) (17)

- 1) ชั่ง C940 ตามน้ำหนักที่ต้องการ
- 2) นำ C940 ที่ชั่งได้ไปละลายในน้ำเย็นที่ 5 องศาเซลเซียส คนจนละลาย
- 3) เติม P407 ตามน้ำหนักที่ต้องการลงคนจนละลาย
- 4) ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 ด้วย triethanolamine (TEA)
- 5) เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปวิเคราะห์

2.3.3 วิธีเตรียมใช้ poloxamer 407 (P407) ร่วมกับ chitosan (CS) (55)

- 1) ชั่ง CS และ Hydroxybenzotriazole (HOBt) ตามน้ำหนักที่ต้องการ
- 2) นำ CS และ HOBt ที่ชั่งได้ไปละลายในน้ำเย็นที่ 5 องศาเซลเซียส จนละลาย
- 3) เติม P407 ตามน้ำหนักที่ต้องการลงคนจนละลาย
- 4) เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปวิเคราะห์

หมายเหตุ: กำหนดให้ poloxamer 407 = P407, sodium carboxymethylcellulose = SCMC, carbomer 940 = C940 และ chitosan = CS

2.4 การตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรง

2.4.1 การตั้งตำรับโดยใช้ P407 ที่ 15-16 %w/w

- 1) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 15-16 %w/w ประกอบด้วย
 - (1) P407 15 - 16 % w/w
 - (2) Saccharin sodium 0.1 % w/w
 - (3) Tween 80 0.75 % w/w
 - (4) Peppermint oil 0.2 %w/w
 - (5) สารสกัดชั้นชั้นโรง 0.2 %w/w
 - (6) Ethanol 2 %w/w
 - (7) น้ำที่ 5 °C qs to 100 g

ประกอบด้วย

2) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 15 - 16 %w/w ร่วมกับ SCMC

- (1) P407 15-16 %w/w
- (2) SCMC 0.05, 0.025, 0.0125 %w/w ตามลำดับ
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ซ้อย่อยที่ (1)

3) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 15-16 %w/w ร่วมกับ C940

- (1) P407 15-16 %w/w
- (2) C940 0.0125, 0.025, 0.005 %w/w ตามลำดับ
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ซ้อย่อยที่ (1)

4) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 15-16 %w/w ร่วมกับ CS

- (1) P407 15-16 %w/w
- (2) CS และ HOBt อัตราส่วน 1:1 เข้มข้น 1.8, 1.5, 1.2 %w/w ตามลำดับ
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ซ้อย่อยที่ (1)

2.4.2 การตั้งตำรับโดยใช้ P407 ที่ 13 และ 14 %w/w

1) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 13 %w/w ประกอบด้วย

- (1) P407 13 และ 14 %w/w
- (2) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ซ้อย่อยที่ (1)

2) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 13 %w/w ร่วมกับ SCMC

- (1) P407 13 และ 14 %w/w
- (2) SCMC 0.05 %w/w
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ซ้อย่อยที่ (1)

3) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 13 %w/w ร่วมกับ C940

- (1) P407 13 และ 14 %w/w
- (2) C940 0.05 %w/w
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆเข้มข้นตามข้อ 2.7.1 ซ้อย่อยที่ (1)

4) ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ใช้ P407 ที่ 13 %w/w ร่วมกับ CS

- (1) P407 13 และ 14 %w/w
- (2) CS และ HOBt อัตราส่วน 1:1 เข้มข้น 1.8 %w/w
- (3) ส่วนประกอบอื่นๆ เข้มข้นตามข้อ 2.3.1 ข้อย่อยที่ (1)

2.5.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและ เจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของตำรับ in situ gel และอื่นๆ ที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรง

1) การทดลองหา $T_{\text{sol-gel}}$ ที่เหมาะสม โดยเปรียบกับการใช้ P407 ร่วมกับ SCMC C940 หรือ CS โดยที่ $T_{\text{sol-gel}}$ ที่ต้องการอยู่ระหว่าง 32 - 37 องศาเซลเซียส

2) นำขวดที่บรรจุสารละลายตัวอย่างมาวางบน water bath และ นำไปวางบน magnetic stirrer bar โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียสและ magnetic bar หมุนด้วยความเร็ว 50 rpm

3) ใช้ thermometer วัดอุณหภูมิจากนั้นสังเกตและบันทึกอุณหภูมิที่ทำให้ magnetic bar หยุดหมุนซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$)

2.6 การทดสอบคุณลักษณะทางกายของตำรับ in situ gel

2.6.1 วัดค่า pH

1) แบ่งสารละลาย in situ gel ที่อุณหภูมิห้องมา 5 มิลลิลิตร ใส่ปิเปตอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร

2) นำหลอดหยดดูดสารละลาย in situ gel ในปิเปตอร์แล้วหยดลงบนช่องทดสอบสารตัวอย่างบนเครื่องวัด pH 2-3 หยด

3) รอจนเครื่องวัดค่า pH จนได้ค่าคงที่ จึงบันทึกผลทดลอง

4) กลั้วช่องหยดสารทดสอบบนเครื่องวัด pH ด้วยน้ำกลั่นจนกว่าจะได้ค่า pH เป็นกลาง จึงซับหยดน้ำกลั่นออกด้วยกระดาษทิชชู

5) วัดค่า pH ดังวิธีข้างต้น ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยบันทึกผล

2.6.1 ทดสอบความใสของตำรับ

1) ประเมินความใสของตัวรับหลังจากเตรียมโดยใช้สายตาซึ่งกำหนดให้ระดับความใสแทนด้วยตัวเลข ดังนี้

- 0 = ใส
- +1 = ขุ่นเล็กน้อย
- +2 = ขุ่นปานกลาง
- +3 = ขุ่นมาก

2) การทดสอบ ความขุ่น-ใส ของตัวรับ โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้น %w/w ของ ethanol ที่ส่งผลต่อความขุ่น-ใสที่ความเข้มข้นของ P407 15 และ 16 %w/w ตามลำดับ

2.6.2 ทดสอบสีของตัวรับ

1) ประเมินสีของตัวรับซึ่งกำหนดให้ระดับสีแทนด้วยตัวเลข ดังนี้

- 0 = ไม่มีสี
- +1 = สีเหลืองอ่อน
- +2 = สีเหลืองปานกลาง
- +3 = สีเหลืองเข้ม

2.7 การศึกษาการวัดความหนืดของตัวรับ

2.7.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวัดประกอบด้วยตัวรับยาเจลที่มีและไม่มีสารสกัด (51, 56)

2.7.2 ใช้เครื่องมือ Kinexus Malvern Rheometer, type KNX2100 ใช้ cylindrical probe ขนาด 25 มิลลิเมตร

2.7.3 ใช้ปริมาตรที่ใช้วัดตัวอย่างละ 15 g วัดซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

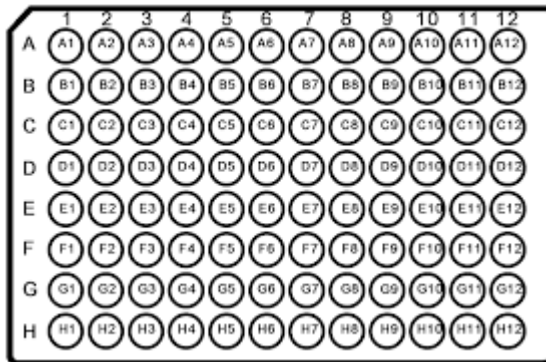
2.7.4 กำหนด shear rate (0-25 s⁻¹) : 1, 5, 10, 15, 25 s⁻¹ วัดที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส

2.8 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นรองด้วยวิธี 2,2 - diphenyl -1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid

2.8.1 เตรียม DPPH (MW 394.32) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 7.89 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วสามารถแช่ตู้เย็นไว้ได้ 2-8 องศาเซลเซียสและป้องกันแสง)

2.8.2 เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นต่างๆโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เช่น 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.8.3 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไปหยอดใน 96 well ความเข้มข้นละ 6 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร



รูปที่ 14 แสดง 96 well plate ที่บรรจุสารทดสอบ DPPH radical

- 1) โดย 3 หลุมแรก (A-B) จะใส่ DPPH หลุมละ 100 ไมโครลิตร (A1)
- 2) อีก 3 หลุม (D-F) จะใส่เอทานอล หลุมละ 100 ไมโครลิตร (A2)
- 3) อีก 2 หลุม (G-H) เป็น control ซึ่งแต่ละหลุมจะใส่ DPPH 100 ไมโครลิตร + เอทานอล 100 ไมโครลิตร (A3)

2.8.4 นำไป incubate อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.8.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

2.8.6 คำนวณหาค่า %Inhibition ตามสูตรที่ 2

$$\%Inhibition = \frac{(A3) - [(A3) - (A1)]}{A3} \times 100 \% \text{ -----(2)}$$

2.8.7 นำ %Inhibition และความเข้มข้นที่ทดสอบไปสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50}

หมายเหตุ: ความเข้มข้นสุดท้ายที่นำไปสร้างกราฟ IC_{50} จะเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น (dilution factor = 2)

2.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับ in situ gel ด้วยวิธี DPPH radical assay

2.9.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เป็นเจล base และเจลที่มีสารสำคัญตามตำรับ in situ gel โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

2.9.2 นำตำรับ in situ gel มาละลายด้วยเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.9.3 ปฏิบัติตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 2.8.3

2.10 หาปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

2.10.1 ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้สารมาตรฐาน แอลฟาแมงโกสติน (standard alpha-mangostin)

1) นำสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน (standard alpha-mangostin) 10 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายเอทานอล

2) เจือจางสารโดยให้ได้ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 10, 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียมความเข้มข้น standard curve โดยใช้สารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	นำมาจากความเข้มข้น	ปริมาตรที่นำมา (ไมโครลิตร)	เติมเอทานอล (ไมโครลิตร)
200	1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	600	2400
100	1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	300	2700
50	1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	150	2850
25	200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	375	2625
10	100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	300	2700
1	10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	300	2700

3) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ C18 column reverse phase (4.6 x 250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) มี condition ดังต่อไปนี้ อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที , Injection volume เท่ากับ 20 ไมโครลิตร (stop time 20 นาทีต่อ vial), Detector = UV-VIS 320 นาโนเมตร ใช้ mobile phase ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 mobile phase ของเครื่อง HPLC

Mobile phase	สารละลาย
Mobile A	Acetonitrile (80%)
Mobile B	0.05% Orthophosphoric acid (20%)

ตารางที่ 5 Gradients Programmed

สารละลาย	เวลาที่ใช้
70% A	0-15 นาที
70% A to 75% A	ภายใน 3 นาที
75% A to 80% A	ภายใน 1 นาที
80% A	6 นาที
80% A to 70% A	ภายใน 1 นาที

2.10.2 หาปริมาณสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในสารสกัดชั้น
ชั้นโรง

- 1) เจือจางให้สารสกัดมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในเอทานอล
- 2) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition เดียวกับสารมาตรฐาน
- 3) คำนวณปริมาณสารสำคัญที่มีในสารสกัดชั้นชั้นโรง

2.11 หาปริมาณสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในตำรับเจล (%
content)

2.11.1 แบ่งตำรับเจลต่างๆมา 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล 2 มิลลิลิตร

2.11.2 ดูดสารละลายที่ได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ละลายในเอทานอล 900 ไมโครลิตร

2.11.3 ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วมา 1000 ไมโครลิตร กรองผ่านตัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร

2.11.4 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition เดียวกับสารมาตรฐาน

2.11.5 คำนวณปริมาณสารสำคัญที่มีในสารสกัดชั้นชั้นโรงตามสูตรที่ 3

$$\%Content = \frac{\text{ปริมาณของสารแอลฟาแมงโกสตินที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ปริมาณของสารแอลฟาแมงโกสตินในสารละลายชั้นชั้นโรงที่บรรจุในตำรับ}} \times 100 \text{ ----(3)}$$

2.12 การทดสอบการปลดปล่อยของสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ของตำรับยาเจล

2.12.1 บรรจุตำรับยาเจล 5 กรัม ลงขวดแก้ว แล้วนำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.12.2 นำขวดที่บรรจุยาเจลและน้ำลายเทียมวางบนแท่นของเครื่อง shaking incubator ซึ่งมี condition คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 50 rpm และ ความเร็วในการหมุนของพัดลมระบายอากาศ 1400 rpm

2.12.3 ใส่ น้ำลายเทียมปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วที่บรรจุตำรับยาเจล แล้วปิดฝาภาชนะทำการจับเวลา

2.12.4 สุ่มน้ำลายเทียมตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร และใส่น้ำลายเทียมใหม่กลับคืนในปริมาตรเท่าเดิมที่เวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง

2.12.5 นำน้ำลายเทียมตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสติน ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition เดียวกับสารมาตรฐาน ทดสอบตำรับละ 3 ซ้ำ (n = 3)

2.13 การทดสอบสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อ (mucoadhesive) ของตำรับ in situ gel (56, 57)

2.13.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวัด ประกอบด้วย ตำรับยาเจลที่มีสารสกัด ตำรับยาเจลที่ผสมกับ mucin และ mucin (51, 56)

1) การเตรียมน้ำลายเทียม

(1) สารละลายผสมของ Na_2HPO_4 2.38 กรัม KH_2PO_4 0.19 กรัม NaCl 8 กรัม ต่อ 1 ลิตรของน้ำกลั่น

(2) ปรับ pH ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก ที่มีค่า pH 6.8 ± 0.05

2) การเตรียม mucin

(1) นำผง mucin 0.36 กรัม ละลายลงในน้ำลายเทียม 5.64 กรัม (6%w/w)

3) การเตรียมตำรับยาเจลที่ผสมกับ mucin

(1) แบ่ง mucin ที่เตรียมได้มาครึ่งหนึ่ง (3%)

(2) ผสมกับตำรับยาเจลที่ใช้ทดสอบ 3 กรัม

(3) คนให้เข้ากัน 15 นาที

2.13.2 ใช้เครื่องมือ Kinexus Malvern Rheometer, type KNX2100 โดยใช้ cylindrical probe ขนาด 25 มิลลิเมตร

2.13.3 ปริมาตรที่ใช้วัดตัวอย่างละ 15 g วัดซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

2.13.4 โดยวัดที่ปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1) กำหนด shear rate ($0-25 \text{ s}^{-1}$): 1, 5, 10, 15, 25 s^{-1} วัดที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยค่าที่วัดออกมา คือ ความหนืดของ mucin (η_m), ความหนืดของตำรับยาเจล (η_{gel}) และความหนืดของ ตำรับยาเจลที่ผสมกับ mucin (η_{total})

2.13.5 นำค่าความหนืดที่ได้มาคำนวณหาแรงในการเกาะติดเนื้อเยื่อ (F) จากข้อ 2.13.4 มาคำนวณตามสูตรที่ 4 5 และ 6 ตามลำดับสูตร

$$\eta_{adhesion} = \eta_{total} - \eta_m - \eta_{gel} \quad \text{-----(4)}$$

$$F = \eta_{adhesion} \sigma \quad \text{-----(5)}$$

$$\sigma = k \gamma^n \quad \text{-----(6)}$$

หมายเหตุ: γ = shear stress (Pa), σ = shear rate (s^{-1})

2.13.6 นำค่า $\eta_{adhesion}$ กับ σ มาสร้างกราฟการทดสอบสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดชั้นชั้นโรง

1.1 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงในตัวทำละลายเอทานอลโดยการหาผลผลิตร้อยละ (%yield)

จากการสกัดชั้นจากชั้นโรงสายพันธุ์ *Trigona laeviceps* ด้วยวิธีการหมัก (maceration) ในตัวทำละลายเอทานอลได้ผลผลิตร้อยละ (%yield) ของปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรง เท่ากับ 26.57 ± 2.81 (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จากงานวิจัยของ Nuttawan Y.et al,2015 ทำการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95% v/v ได้ %yield ร้อยละ 28.13 และร้อยละ 31.62 ตามลำดับ (58) อธิบายได้จากปกติตัวถูกละลายสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน ตามกฎ like dissolve like คือ ตัวถูกละลายที่มีขั้วมักละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เพราะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole) และตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วมักละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเช่นกัน เพราะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) สำหรับตัวถูกละลายที่มีขั้วต่ำกว่าตัวทำละลาย ความสามารถในการละลายจะลดลงหรือสามารถละลายได้บางส่วนเท่านั้น ดังนั้น ตัวทำละลายเอทานอลสามารถละลายสารสำคัญในชั้นชั้นโรง คือ สารแอลฟาแมงโกสทิน ออกมาได้

1.2 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงจาก dewaxing ในเฮกเซน โดยการหา ผลผลิต ร้อยละ (%yield) ได้สารสกัดชั้นชั้นโรงผลผลิตร้อยละ 11.45 ± 1.06 (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

การทำ dewaxing ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนหลังการหมักในตัวทำละลายเอทานอลได้ผลผลิตร้อยละ (%yield) ของปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงที่เหลืออยู่ เท่ากับ 11.45 ± 1.06 (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) อธิบายได้จากตัวทำละลายเฮกเซนมีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้วจึงสามารถละลายส่วนที่เป็นไขซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ไม่มีขั้วของชั้นชั้นโรงออกมาได้เช่นกัน จึงทำให้ผลผลิตร้อยละ (%yield) ของปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงลดลงเหลือ 11.45 %

2. การตั้งตำรับ

2.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)

Rx (% w/w)	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)
15% P407	>40
16% P407	35.33 ± 0.42
17% P407	31.40 ± 1.44
18% P407	27.17 ± 1.26
19% P407	23.50 ± 0.50
20% P407	21.67 ± 0.58

จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) พบว่า $T_{\text{sol-gel}}$ ของ P407 ขึ้นกับความเข้มข้น โดยเมื่อความเข้มข้นของ P407 มากขึ้นส่งผลให้ $T_{\text{sol-gel}}$ ของ ตำรับเจลต่ำลงตาม ตารางที่ 6 เนื่องจาก P407 ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ คือ polyoxyethylene และ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ polyoxypropylene เมื่อ P407 ละลายในน้ำอุณหภูมิที่สูงถึงจุด critical micelle concentration (CMC) โครงสร้างของ polyoxyethylene จะหันออกด้านนอกและโครงสร้างของ polyoxypropylene หันเข้าด้านในในรูปแบบ micelle จากนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงถึงจุด critical gelation concentration (CGC) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล (59)

2.2 ปริมาณเอทานอลที่ส่งผลต่อความขุ่น-ใสของตำรับ
 ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้น %w/w ของเอทานอล ที่ส่งผลต่อความขุ่น-ใสที่ความเข้มข้นของ P407
 15 % และ 16 %w/w ตามลำดับ

EtOH	P407 (%w/w)	
	15 %	16%
0	Control	Control
2.5 %	0	0
5 %	+	0
10 %	++	+
20 %	+++	++

หมายเหตุ: Control = P407 15 % และ 16 % ใช้ในการเปรียบเทียบ

0 = ใส +1 = ขุ่นเล็กน้อย +2 = ขุ่นปานกลาง +3 = ขุ่นมาก

จากการทดสอบหาปริมาณเอทานอลสูงสุดที่สามารถใส่ในตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรดิง ตารางที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เริ่มทำให้เจลขุ่น คือ 5% ของตำรับ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายน้ำมากขึ้น จะส่งผลต่อค่าการละลายที่ต่ำลงของเอทานอล

2.3 การศึกษาสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ตารางที่ 8 แสดงสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$)

Rx without SBP	$T_{\text{sol-gel}}$ ($^{\circ}\text{C}$)
P407/0.025% SCMC	38.07 ± 0.12
P407/0.05% SCMC	35.83 ± 0.76
P407/0.10% SCMC	30.83 ± 0.85
P407/0.025% C940	> 40
P407/0.05% C940	31.67 ± 0.58
P407/0.10% C940	29.2 ± 1.04
P407/0.20% C940	< 5
P407/1.20% CS-HOBt	> 40
P407/1.50% CS-HOBt	> 40
P407/1.80% CS-HOBt	36.27 ± 0.64

หมายเหตุ: P407 = Poloxamer 407, SCMC = Sodium carboxymethylcellulose, CS = Chitosan, HOBt = Hydroxybenzotriazole, C940 = Carbopol 940, SBP = Stingless bee's propolis extracts

จากการทดลองพบว่าสัดส่วนและปริมาณของพอลิเมอร์ SCMC, C940 และ CS ที่ส่งผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ 16% P407 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อปริมาณของพอลิเมอร์ SCMC, C940 และ CS เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้อุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ลดลงไปด้วย คือ สามารถเปลี่ยนสถานะจากสารละลายกลายเป็นเจลได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิต่ำลง ซึ่งสัดส่วนและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ส่งผลต่อ ($T_{\text{sol-gel}}$) เรียงจากน้อยไปมากคือ C940, SCMC และ CS ตามลำดับดังตารางที่ 8

โดยจะนำชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ SCMC, C940 และ CS ที่ส่งผลให้ $T_{\text{sol-gel}}$ ที่มากกว่า 32 องศาเซลเซียส ไปทำการศึกษาร่วมกับการบรรจุสารสกัดชันชันโรงบรรจุในตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

เพื่อให้ได้คุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ให้อยู่ในช่วง 32 – 37 องศาเซลเซียสในหัวข้อ 2.4

2.4 การศึกษาสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่อคุณสมบัติที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ที่บรรจุสารสกัดชันโรง

ตารางที่ 9 แสดงสัดส่วนและปริมาณของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่มีผลต่อคุณสมบัติที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ที่บรรจุสารสกัดชันโรง

Rx with 0.2 % SBP	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)
P407/0.05% SCMC	27.83 ± 0.76
P407/0.025% SCMC	27.60 ± 0.53
P407/0.0125% C940	27.93 ± 0.75
P407/0.025% C940	27.83 ± 0.35
P407/1.8% CS-HOBt	24.67 ± 1.52
P407/1.5% CS-HOBt	27.60 ± 0.53
P407/1.2% CS-HOBt	25.83 ± 0.76

หมายเหตุ: P407 = Poloxamer 407, SCMC = Sodium carboxymethylcellulose, CS = Chitosan, HOBt = Hydroxybenzotriazole, C940 = Carbopol 940, SBP = Stingless bee's propolis extracts

จากการทดลองพบว่าสัดส่วนและปริมาณของพอลิเมอร์ SCMC, C940 และ CS ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ 16% P407 ที่บรรจุสารสกัดชันโรง 0.2 % พบว่าสารสกัดชันโรงมีผลต่อคุณสมบัติที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ลดลงต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส จึงพิจารณาลดปริมาณ P407 จาก 16 % w/w เป็น 15 % w/w เพื่อให้ได้ช่วงคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ให้อยู่ในช่วง 32 – 37 องศาเซลเซียส

2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)	
	Without SBP	With 0.2 % SBP
15% P407	39.17 ± 0.62	34.83 ± 0.29
15% P407/0.05% SCMC	39.33 ± 1.25	34.20 ± 0.20
15% P407/1.5 % CS-HOBt	39.50 ± 0.41	35.00 ± 1.56
15% P407/0.025% C940	36.83 ± 0.24	32.83 ± 0.29

หมายเหตุ: P407 = Poloxamer 407, SCMC = Sodium carboxymethylcellulose, CS = Chitosan, HOBt = Hydroxybenzotriazole, C940 = Carbopol 940, SBP = Stingless bee's propolis extracts

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ P407 ที่ส่งผลให้อุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) ใกล้เคียงอุณหภูมิร่างกายมากที่สุดเมื่อใช้ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS คือ 15% P407 เนื่องจากตำรับเจลไวต่ออุณหภูมิที่มีองค์ประกอบของ P407 ร่วมกับพอลิเมอร์ต่างๆ จะทำให้มี $T_{\text{sol-gel}}$ ที่ลดลง คือ สามารถเปลี่ยนสถานะจากสารละลายกลายเป็นเจลได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิต่ำลง (15)

โดยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ก่อเจลใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกายมากที่สุด (37 องศาเซลเซียส) คือ 15% P407/0.05% SCMC 15% P407/0.025% C940 และ 15% P407/1.5% CS ซึ่งมีอุณหภูมิก่อเจลอยู่ในช่วง 36.59 – 40.58 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อบรรจุสารสกัดชันชันโรงเข้าไปในตำรับจะส่งผลให้ $T_{\text{sol-gel}}$ ลดลงอีกซึ่งมีอุณหภูมิก่อเจลอยู่ในช่วง 32.54 – 36.56 องศาเซลเซียส โดยผลจากการลด $T_{\text{sol-gel}}$ สามารถอธิบายได้จากการสร้างพันธะของพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อเกี่ยวกับส่วนสาย polyoxyethylene ของโมเลกุล P407 ส่งผลให้เกิด dehydration และเป็นสาเหตุให้โมเลกุลของพอลิเมอร์อยู่ชิดติดกันมากขึ้นด้วยแรงระหว่างโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นจากการสร้างพันธะไฮโดรเจน นำไปสู่การก่อก่อเจลที่อุณหภูมิต่ำลง (60) ตามตารางที่ 10 จึงนำตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ได้ไปทำการทดสอบด้านต่างๆต่อไป

ตารางที่ 11 แสดงรหัสตามสูตรตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

Rx	Code
15% P407	P407
15% P407/0.05% SCMC	P407/ SCMC
15% P407/1.5 % CS-HOBt	P407/ CS-HOBt
15% P407/0.025% C940	P407/ C940
15% P407/0.2 % SBP	0.2 % SBP in P407
15% P407/0.05% SCMC/0.2 % SBP	0.2 % SBP in P407/ SCMC
15% P407/1.5 % CS-HOBt/0.2 % SBP	0.2 % SBP in P407/ CS-HOBt
15% P407/0.025% C940/0.2 % SBP	0.2 % SBP in P407/ C940

ตารางที่ 12 แสดงสูตรตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

RX	P407	P407/ SCMC	P407/C S-HOBt	P407/ C940	0.2%SBP in P407	0.2%SBP in P407/ SCMC	0.2%SBP in P407/ CS-HOBt	0.2%SBP in P407/ C940
P407(g)	15	15	15	15	15	15	15	15
SCMC(g)	-	0.05	-	-	-	0.05	-	-
CS-HOBt(g)	-	-	1.5	-	-	-	1.5	-
C940(g)	-	-	-	0.025	-	-	-	0.025
Tween 80(g)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Saccharin sodium(g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Peppermint oil(g)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
0.2 %SBP (g)	-	-	-	-	0.2	0.2	0.2	0.2
Water q.s. to 100(g)								

3. การทดสอบทางกายภาพของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชันชันโรง

3.1 ลักษณะความใส สีของตำรับและความเป็นกรด - ด่างของตำรับ



รูปที่ 15 แสดงลักษณะความใส สีของตำรับ

หมายเหตุ: Formulation 1 (P407), Formulation 5 (0.2 % SBP in P407), Formulation 2 (P407/ SCMC), Formulation 6 (0.2 % SBP in P407/ SCMC), Formulation 3 (P407/ CS-HOBt), Formulation 7 (0.2 % SBP in P407/ CS-HOBt), Formulation 4 (P407/ C940), Formulation 8 (0.2 % SBP in P407/ C940)

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะความใส สีของตำรับ

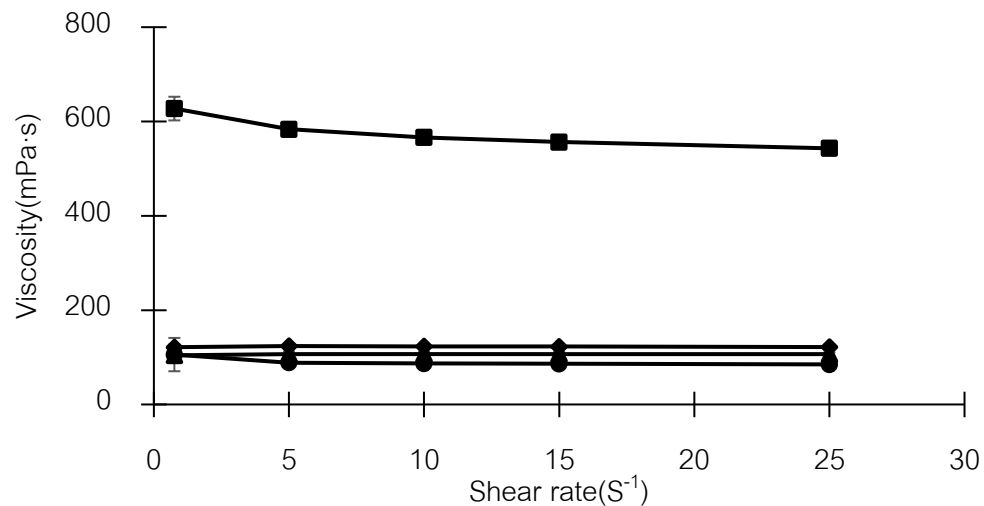
Rx	pH		Transparency		Color	
	Without SBP	With 0.2 % SBP	Without SBP	With 0.2 % SBP	Without SBP	With 0.2 % SBP
P407	5.19 ± 0.02	5.39 ± 0.01	Control	Control	Control	Control
P407/SCMC	5.23 ± 0.09	5.33 ± 0.02	0	0	0	+1
P407/CS-HOBt	4.52 ± 0.08	4.47 ± 0.01	+2	+2	+3(brown yellow)	+3(brown black)
P407/C940	7.23 ± 0.09	7.13 ± 0.03	0	0	0	+2

หมายเหตุ: P407 = Poloxamer 407, SCMC = Sodium carboxymethylcellulose, CS = Chitosan, HOBt = Hydroxybenzotriazole, C940 = Carbopol 940, SBP = Stingless bee's propolis extracts

Control = ตำรับ 15% P407 ใช้ในการเปรียบเทียบ Transparency: 0 = ใส +1 = ขุ่นเล็กน้อย +2 = ขุ่นปานกลาง +3 = ขุ่นมาก Color : 0 = ไม่มีสี +1 = สีเหลืองอ่อน +2 = สีเหลืองปานกลาง +3 = สีเหลืองเข้ม

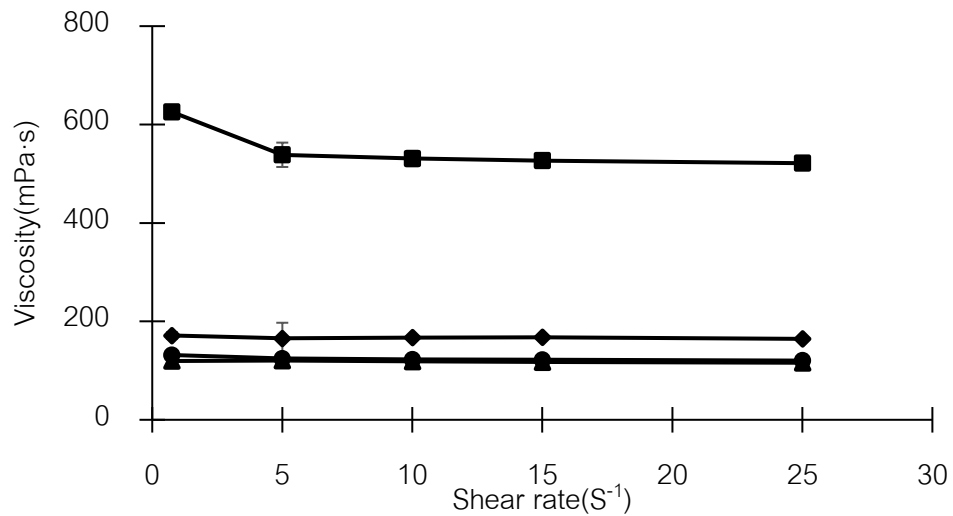
พบว่าค่าความเป็นกรด - ต่างของตำรับโดยพิจารณาจากค่า pH ของตำรับ P407 สถานะสารละลายที่ 25 องศาเซลเซียส มีค่าประมาณ 4 (61) โดยตำรับที่มีส่วนประกอบของ P407 ร่วมกับ CS มีความเป็นกรดอ่อน รองลงมา คือ ตำรับที่มีส่วนประกอบของ P407 ร่วมกับ SCMC และตำรับที่มีส่วนประกอบของ P407 ร่วมกับ C940 มีความเป็นกลางมากที่สุดดังตารางที่ 13 สามารถอธิบายได้เนื่องจากในตำรับที่มี CS มีส่วนผสมของ HOBt ซึ่งมีความเป็นกรดช่วยให้ CS ละลายได้ดีขึ้น (62) จึงทำให้ตำรับมีความเป็นกรดอ่อน สำหรับตำรับที่มี C940 เป็นองค์ประกอบมีความเป็นกลางมากที่สุดเนื่องจากถูกสะเทินด้วย triethanolamine (TEA) เพื่อให้ C940 เป็นเกลือแล้วก่อเป็นไฮโดรเจล สำหรับความใสของตำรับพบว่าตำรับ P407/CS-HOBt มีลักษณะใสน้อยกว่าตำรับอื่น คือ ขุ่นระดับปานกลาง รวมถึงมีสีของตำรับเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล เนื่องจาก CS เป็นสารธรรมชาติที่มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน

4. การศึกษาการวัดความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS



รูปที่ 16 กราฟแสดงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดชั้นชั้นรองตาม shear rate ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

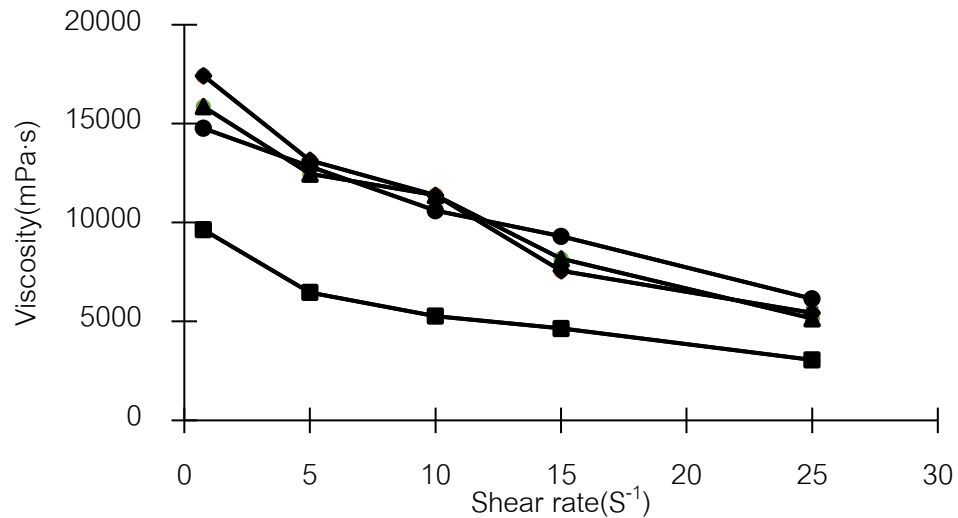
หมายเหตุ: (●) Without SBP in P407, (▲) Without SBP in P407/SCMC, (■) Without SBP in P407/CS-HOBt, (◆) Without SBP in P407/C940



รูปที่ 17 กราฟแสดงความหนืดของตัวรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

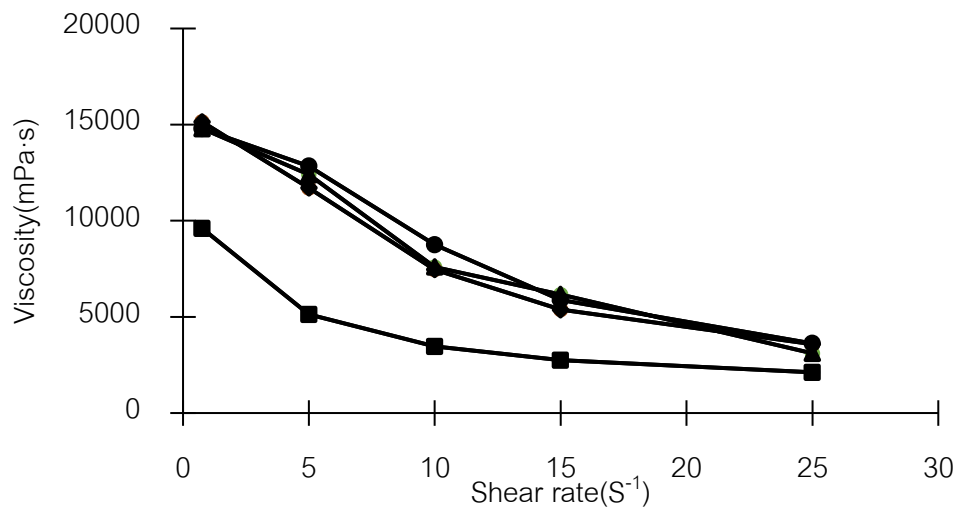
หมายเหตุ: (●) 0.2 % SBP in P407, (▲) 0.2 % SBP in P407/SCMC, (■) 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT, (◆) 0.2 % SBP in P407/C940

จากผลการศึกษาความหนืดของตัวรับที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุและบรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่ 25 องศาเซลเซียสพบว่าเมื่อ shear rate เพิ่มขึ้นค่าความหนืดของการไหลจะมีค่าคงที่โดยจะมีแนวโน้มเป็นเส้นตรงแสดงให้เห็นว่าค่าความหนืดจะไม่ขึ้นอยู่กับการไหลแบบ Newtonian flow (17, 63)



รูปที่ 18 กราฟแสดงความหนืดของตัวรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: (●) Without SBP in P407, (▲) Without SBP in P407/SCMC, (■) Without SBP in P407/CS-HOBT, (◆) Without SBP in P407/C940



รูปที่ 19 กราฟแสดงความหนืดของตัวรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงตาม shear rate ต่างๆที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: (●) 0.2 % SBP in P407, (▲) 0.2 % SBP in P407/SCMC, (■) 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT, (◆) 0.2 % SBP in P407/C940

จากผลการศึกษาความหนืดของตำรับของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ไม่ได้บรรจุสารและบรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS ที่ 37 องศาเซลเซียสพบว่า เมื่อ shear rate เพิ่มมากขึ้นค่าความหนืดจะมีค่าลดลงจึงมีลักษณะการไหลแบบ pseudoplastic flow (17, 63)

5. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงเปรียบเทียบกับ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงเปรียบเทียบกับ Ascorbic Acid ด้วยวิธี DPPH ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ascorbic acid	3.90 ± 0.02
สารสกัดชั้นชั้นโรง	66.96 ± 2.93

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical assay โดยมีหลักการคือ สาร DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถดูดกลืนแสงได้ และสามารถมองเห็นเป็นสีม่วงด้วยตาเปล่า เมื่อได้รับโปรตอนจะถูกรีดิวซ์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้การดูดกลืนแสงลดลง ดังนั้นการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH จึงเป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรง

โดยสารสกัดชั้นชั้นโรงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 66.96 ± 2.93 และ 4.90 ± 1.73 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับดังตารางที่ 14 และค่า IC_{50} ของ ascorbic acid มีค่ามากกว่าสารสกัดชั้นชั้นโรงประมาณ 17.17 เท่า

6. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรจุและไม่ได้บรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay ตารางที่ 15 แสดงความเข้มข้นของตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรจุและไม่ได้บรจุสารสกัดชั้นชั้นโรง ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

Rx	IC_{50} (mg/ml)	
	Without SBP	With 0.2 % SBP
P407	N/A	91.1 ± 2.43
P407/SCMC	N/A	79.27 ± 1.69
P407/CS-HOBt	83.35 ± 0.98*	50.61 ± 3.45**
P407/C940	N/A	69.97 ± 0.97

หมายเหตุ: *, * The mean difference is significant at 0.05 level in without SBP group, ** The mean difference is significant at 0.05 level in with 0.2 % SBP group N/A = inhibition concentration not more than 50%

จากการการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical assay ของตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรจุและไม่ได้บรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงดังตารางที่ 15 พบว่าตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรจุและไม่ได้บรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงมีเพียงสูตรตำรับของ P407 / CS-HOBt ที่สามารถวัดค่า IC_{50} ได้และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สูงกว่าสูตรตำรับอื่นที่ไม่ได้บรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 83.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nathan et al,2012 (62) อธิบายได้จากสาร CS-HOBt มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging assay

สำหรับตำรับยาเจดไวต่ออนุมูลอิสระที่บรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงพบว่าสูตรตำรับ 0.2 % SBP in P407/CS-HOBt มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับตำรับอื่นที่บรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงโดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด ซึ่งตำรับที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา คือ 0.2 % SBP in P407/C940, 0.2 % SBP in P407/SCMC และ 0.2 % SBP in P407 ตามลำดับ

7. หาปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน (alpha mangostin) ในสารสกัดชั้นชั้นโรง ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

7.1 ปริมาณสารแอลฟาแมงโกสทินของสารสกัดชั้นชั้นโรงคำนวณได้จาก linear regression equation ของ standard curve ของกราฟ แอลฟาแมงโกสทิน (alpha mangostin)

$$Y = 59.4031x + 2.55040$$

Y คือ Area under the curve

X คือ ปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

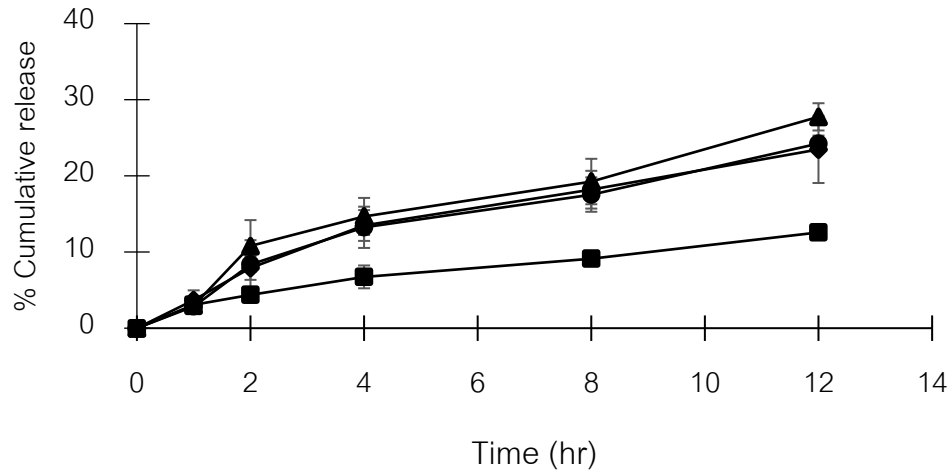
สารสกัดชั้นชั้นโรงจาก partition ในเฮกเซน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน (alpha mangostin) 5.27 ± 0.18 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

7.2 ปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน (alpha mangostin) ในตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ ตารางที่ 16 แสดงปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน (alpha mangostin) ในตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

Rx	% content
0.2 % SBP in P407	99.37 \pm 1.08
0.2 % SBP in P407/SCMC	98.42 \pm 2.03
0.2 % SBP in P407/CS-HOBt	98.71 \pm 1.30
0.2 % SBP in P407/C940	98.54 \pm 1.94

ปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทิน ในตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิทุกสูตรตำรับมีปริมาณใกล้เคียงกัน เนื่องจากแต่ละสูตรตำรับมีองค์ประกอบของสารสกัดจากชั้นชั้นโรงเท่ากัน คือ 0.2%SBP ของตำรับ แสดงให้ทราบว่าองค์ประกอบของสารต่างๆในสูตรตำรับที่แตกต่างกันไม่เกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญแอลฟาแมงโกสทินจึงทำให้แต่ละตำรับมีปริมาณสารสำคัญ (% content) ใกล้เคียงกัน

8. การทดสอบการปลดปล่อยของสารสกัดสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ



รูปที่ 20 แสดงรูปแบบการปลดปล่อยยาของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

หมายเหตุ: * The mean difference is significant at 0.05 level, (●) 0.2 % SBP in P407, (▲) 0.2 % SBP in P407/SCMC, (■) 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT, (◆) 0.2 % SBP in P407/C940

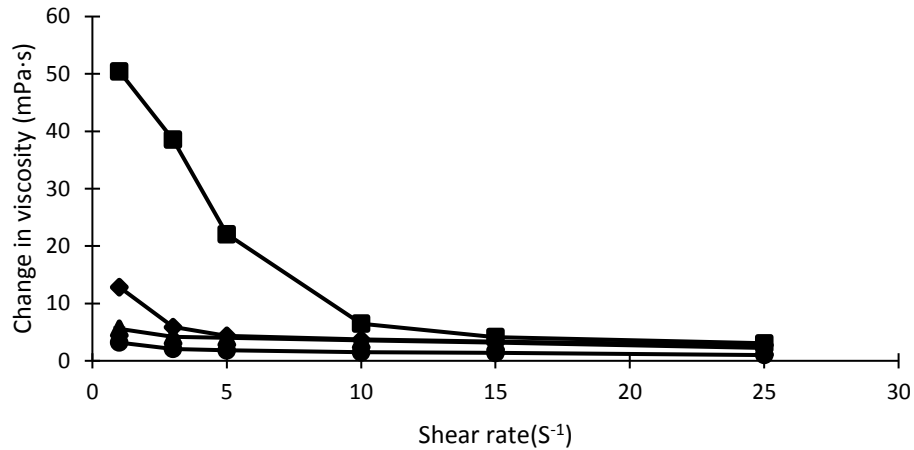
ตารางที่ 17 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์การคำนวณปลดปล่อยสะสมของสารแอลฟาแมงโกสติน

Rx	Curve fitting constant (R ²)			
	Zero	First	Higuchi	Peppas(n)
0.2 % SBP in P407	0.9458	0.7394	0.9804	0.9332 (0.59)
0.2 % SBP in P407/SCMC	0.9298	0.6932	0.9599	0.8911 (0.61)
0.2 % SBP in P407/CS-HOBT	0.9867	0.9168	0.9894	0.9955 (0.50)
0.2 % SBP in P407/C940	0.9496	0.7910	0.9901	0.9688 (0.61)

การทดสอบการปลดปล่อยของสารสกัดสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ในน้ำลายเทียมที่ pH 6.8 ± 0.05 พบว่าตำรับ 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT นั้นมีการปลดปล่อยปริมาณของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินน้อยกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งลักษณะการปลดปล่อยของตำรับ 0.2 % SBP in

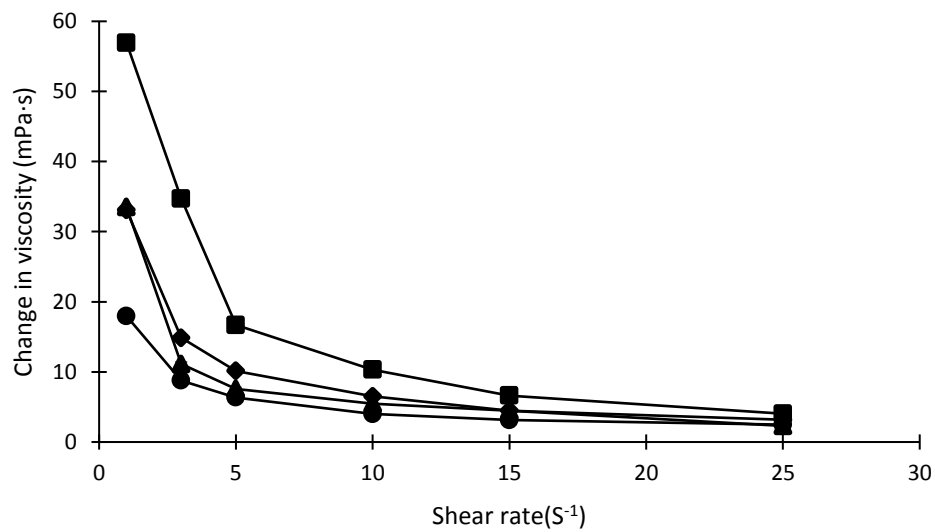
P407/CS-HOBt เมื่อพิจารณาจากค่า R^2 (0.9955) ใกล้เคียงกับแบบจำลอง Korsmeyer-Peppas โดยมีการปลดปล่อยสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินขึ้นอยู่กับการแพร่และการกร่อนของพอลิเมอร์ (พิจารณาจากค่า n) เนื่องจาก CS สามารถละลายได้ดีในสภาวะกรดอ่อน (ละลายที่ \leq pH 6.5) (64) ซึ่งน้ำลายเทียมมีค่าความเป็นกรดประมาณ pH 6.8 ทำให้ CS ตกตะกอนเป็นของแข็งซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา metoprolol tartrate, doxycycline และ flufenamic acid จาก P407 ร่วมกับ chitosan พบว่ามีการปลดปล่อยยา ถูกควบคุมด้วยกระบวนการกร่อนและการแพร่ของเจล (65) และนอกจากนี้ส่วนของ D-glucose residues ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่ไม่ชอบน้ำของ chitosan ทำพันธะกับส่วน polypropyloxyethylene block ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ P407 เมื่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นทำให้โมเลกุลของน้ำที่อยู่รอบๆส่วนที่ไม่ชอบน้ำจัดเรียงตัวใหม่เกิดการแบ่งพื้นที่ของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำหนาแน่นยิ่งขึ้น จนเกิดเป็นโครงสร้างของ micelle ที่มีขนาดและปริมาณมากขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นนำมาสู่โครงสร้างของเจลที่ค่อนข้างแข็งแรง จึงเป็นเหตุผลการปลดปล่อยของยาออกมาจากโมเลกุลของเจลช้าลงและขึ้นอยู่กับ การแพร่ (61) สำหรับตำรับอื่นๆเมื่อพิจารณาจากค่า R^2 ใกล้เคียงกับแบบจำลอง Higuchi โดยการปลดปล่อยสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินขึ้นอยู่กับการแพร่ เนื่อง P407/SCMC เป็นพอลิเมอร์ที่มีกลไกการก่อเจลขึ้นกับการพองตัวเมื่อมีปริมาณของของเหลวเพิ่มขึ้น (66) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bansal K. et al. 2009 (67) ที่มีการปลดปล่อยตามแบบจำลอง Higuchi และ P407/C940 มีกลไกการปลดปล่อยยา คือ carbomer ที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 0.25 %w/w) มีผลต่อการพองตัวและเกิด hydrogen bonding ในสารละลายของเหลว (17, 68)

9. การทดสอบสมบัติการยืดหดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ



รูปที่ 21 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิตาม shear rate ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในน้ำลายเทียมที่ $\text{pH } 6.8 \pm 0.05$

หมายเหตุ: (●) 0.2 % SBP in P407, (▲) 0.2 % SBP in P407/SCMC, (■) 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT, (◆) 0.2 % SBP in P407/C940



รูปที่ 22 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิตาม shear rate ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในน้ำลายเทียมที่ $\text{pH } 6.8 \pm 0.05$

หมายเหตุ: (●) 0.2 % SBP in P407, (▲) 0.2 % SBP in P407/SCMC, (■) 0.2 % SBP in P407/CS-HOBT, (◆) 0.2 % SBP in P407/C940

ตารางที่ 18 แสดงแรงในการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

Rx	แรงในการยึดติดเนื้อเยื่อ(N/m ²) rate ที่ shear 25 s ⁻¹	
	25 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
0.2 % SBP in P407	25.03 ± 0.27	61.93 ± 0.05
0.2 % SBP in P407/SCMC	56.05 ± 0.27	57.55 ± 0.06
0.2 % SBP in P407/CS-HOBt	76.58 ± 0.25	100.95 ± 0.19
0.2 % SBP in P407/C940	68.58 ± 0.27	79.48 ± 0.13

จากสมการ $F = \eta_{\text{adhesion}} \sigma$ แสดงความสัมพันธ์ของ shear rate ที่แปรผันตรงตามแรงในการยึดติดเนื้อเยื่อซึ่งแสดงออกมาในรูปของค่าความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไป อธิบาย คือ เมื่อใช้ shear rate ที่มากขึ้นส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงความหนืดทำให้แรงในการยึดติดเนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย (46)

การศึกษาคุณสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิตาม shear rate ต่างๆ ในน้ำลายเทียม pH 6.8 ± 0.05 ดังรูปที่ 21 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ณ shear rate 0-5 S⁻¹ ตำรับที่มีคุณสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อมากที่สุด คือ 0.2 % SBP in P407/CS-HOBt รองลงมา คือ ตำรับ 0.2 % SBP in P407/SCMC และ 0.2 % SBP in P407/C940 โดยตำรับ 0.2 % SBP in P407 มีสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อต่ำที่สุด เมื่อพิจารณา ณ shear rate 5 S⁻¹ เป็นต้นไปพบว่าสูตรตำรับ 0.2 % SBP in P407/CS-HOBt ยังคงมีสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อมากที่สุด เช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาการทดสอบสมบัติยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 22 พบว่าแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกันกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ ตำรับ 0.2 % SBP in P407/CS-HOBt มีสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อมากที่สุดรองลงมา คือ ตำรับ 0.2 % SBP in P407/SCMC, 0.2 % SBP in P407/C940 และ 0.2 % SBP in P407 ตามลำดับ อธิบายได้จากโมเลกุลของ CS เป็นประจุบวกจึงเกิดการสร้างพันธะอย่างแน่น และ CS มีความไวต่ออุณหภูมิ anionic และ pH ในการเกิดเจล นอกจากนี้ยังมีหมู่ -OH และ -NH₂ ในการเกิดพันธะ hydrogen bond กับ sialic acid ในเยื่อเมือก อันประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีประจุเป็นลบ สอดคล้องกับงานวิจัย Ivarsson D et al.,2012 และ Cafaggi S et al.,2005 พบว่า CS มีสมบัติการยึดติดเนื้อเยื่อมากกว่า SCMC (56, 69) และสมบัติยึดติดเนื้อเยื่อที่ 37 องศาเซลเซียสมีแนวโน้มสูงกว่าที่ 25 องศาเซลเซียสเนื่องมาจากตำรับมีการ

เปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจลที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิของร่างกาย สอดคล้องกันเมื่อพิจารณาแรงในการยืดติดเนื้อเยื่อตั้งตารางที่ 18 ที่ shear 25 s^{-1} พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสตำรับที่มีแรงในการยืดติดเนื้อเยื่อมากที่สุด คือ 0.2% SBP in P407/ CS-HOBt/SBP

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการพัฒนาตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงเพื่อรักษาแผลในช่องปากโดยใช้สารก่อเจลเป็น poloxamer 407 ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการก่อเจลขึ้นกับระดับความเข้มข้นและอุณหภูมิซึ่งมีข้อดี คือ เข้าได้กับร่างกายและก่อเจลที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม poloxamer มีคุณสมบัติยึดติดเนื้อเยื่อต่ำจึงเป็นที่มาของการบรรจุพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อเพิ่มเข้าไปในตำรับ โดยพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา ได้แก่ sodium carboxymethylcellulose, chitosan-hydroxybenzotriazole และ carbopol 940 พบว่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่สามารถก่อเจลใกล้เคียงกับอุณหภูมิของร่างกายอยู่ในช่วง 32.54 – 36.56 องศาเซลเซียส คือ 15% P407/0.05% SCMC, 15% P407/1.5 % CS-HOBT และ 15% P407/0.025% C940 โดยพบว่าตำรับที่มีองค์ประกอบของ chitosan มีความเป็นกรดอ่อนและมีลักษณะสีเหลืองน้ำตาลขุ่นเล็กน้อย สำหรับตำรับที่มี sodium carboxymethylcellulose และ carbopol 940 เป็นองค์ประกอบมักมีลักษณะสีเหลืองอ่อนใสและค่อนข้างมีความเป็นกลาง ส่วนคุณสมบัติการไหลจะเป็นแบบ newtonian flow pseudoplastic flow ที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ(จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical assay พบว่าสารแอลฟาแมงโกสตินซึ่งเป็นสารสำคัญในชั้นชั้นโรง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ถึง 13.66 เท่า) โดยตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ ตำรับยาเจลที่มี chitosan เป็นองค์ประกอบ (p-value ≤ 0.05) รองลงมา คือ ตำรับที่ประกอบด้วย carbopol 940 และ sodium carboxymethylcellulose ตามลำดับ สำหรับการศึกษากการปลดปล่อยสารสำคัญจากตำรับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ในน้ำลายเทียม พบว่าตำรับยาเจลที่มี chitosan เป็นองค์ประกอบนั้นมีการปลดปล่อยปริมาณของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินน้อยกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งลักษณะการปลดปล่อย ใกล้เคียงกับแบบจำลอง Korsmeyer - Peppas ส่วนตำรับยาเจลที่มีองค์ประกอบของ sodium carboxymethylcellulose และ carbopol 940 เป็นองค์ประกอบมีลักษณะการปลดปล่อยสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินใกล้เคียงกับแบบจำลอง

Higuchi นอกจากนี้พบว่าตำรับที่ประกอบด้วย chitosan มีคุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อสูงที่สุดทั้งที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสในน้ำลายเทียมที่ $\text{pH } 6.8 \pm 0.05$ เมื่อเทียบกับอีกสองตำรับ
ข้อเสนอแนะ

หากมีการนำการวิจัยนี้ไปต่อยอดในอนาคตคณะผู้วิจัยเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาเพิ่มทั้งในด้านของความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ต้านอักเสบซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดแผลในช่องปาก รวมถึงการศึกษาความคงตัวของตำรับหรือพัฒนาตำรับให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น ใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการยึดติดเยื่อเมือกมากกว่าหนึ่งชนิดเพิ่มเข้ามาในตำรับเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการยึดติดเยื่อเมือกมากขึ้น หรือศึกษาอัตราส่วนของพอลิเมอร์ที่มีผลต่ออุณหภูมิในการก่อเจลของ poloxamer 407 ใกล้เคียงกับร่างกายมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2011;3(1):89-100.
2. Nirmal H.B. BSR, Pawar S.P. In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2:1398-408.
3. Rao NGR, Shravani B, Reddy MS. Overview on Buccal Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2013;5(4):80 - 8.
4. บุญเกิด ส. "ชันโรง" แมลงเศรษฐกิจคลั่งลูกใหม่. *สัตวเศรษฐกิจ*. 2552;600:53-6.
5. Santos VR. Propolis: alternative medicine for the treatment of oral microbial diseases: *InTech*; 2012.
6. สวัสดิ์ธรรม อ. มหัศจรรย์ชันโรง. พิมพ์ครั้งที่ 1. สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี: ทริปเพิ้ล กรุ๊ป; สิงหาคม 2556.
7. Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S, Pattarapanich C. In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(5):445-50.
8. Atikomtheeranatheekulchai S. Propolis: A Gift from Nature. *Thai Pharm Health Sci Journal*. 2008;3(2):286-95.
9. Barrons RW. Treatment strategies for recurrent oral aphthous ulcers. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2001;58(1):41-50; quiz 1-3.
10. Mirowski GW. Aphthous Stomatitis [Internet]. 2016 [cited 2016 July 16]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1075570-overview#showall>.
11. บัวจวบ ว. การวินิจฉัยและการรักษาโรคช่องปาก Oral ulcerative and vesiculobullous lesion. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2553.

12. Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. *Journal of the American Dental Association* (1939). 2003;134(2):200-7.
13. Sanpa S, Popova M, Bankova V, Tunkasiri T, Eitssayeam S, Chantawannakul P. Antibacterial Compounds from Propolis of *Tetragonula laeviceps* and *Tetrigona melanoleuca* (Hymenoptera: Apidae) from Thailand. *PLoS ONE*. 2015;10(5):1-11.
14. Noronha VR, Araujo GS, Gomes RT, Iwanaga SH, Barbosa MC, Abdo EN, et al. Mucoadhesive propolis gel for prevention of radiation-induced oral mucositis. *Current clinical pharmacology*. 2014;9(4):359-64.
15. Yuan Y, Cui Y, Zhang L, Zhu H-p, Guo Y-S, Zhong B, et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;430(1-2):114-9.
16. Ur-Rehman T, Tavelin S, Gröbner G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;409(1-2):19-29.
17. Jones DS, Bruschi ML, de Freitas O, Gremião MPD, Lara EHG, Andrews GP. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;372(1-2):49-58.
18. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน. การเลี้ยงและแปรรูปผลิตภัณฑ์จากผึ้งและชันโรง. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักงานคณะกรรมการพิเศษประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ 2556.
19. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004;84(3):329-39.
20. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2014;19(12):19610-32.

21. Aisha AFA, Abu-Salah KM, Siddiqui MJ, Ismail Z, Majid AMSA. Quantification of α -, β - and γ -mangostin in *Garcinia mangostana* fruit rind extracts by a reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(29):4526-34.
22. Antioxidant Supplements 2016 [cited 2016 July 16]. Available from: <http://supplementscience.org/antioxidants.html>.
23. Mazia RS, de Araújo Pereira RR, de Francisco LMB, Natali MRM, Dias Filho BP, Nakamura CV, et al. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2016;105(1):113-21.
24. Siripatrawan U, Vitchayakitti W, Sanguandeeikul R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013;48(1):22-7.
๒๕. Kongkiatpaiboon S, Vongsak B, Machana S, Weerakul T, Pattarapanich C. Simultaneous HPLC quantitative analysis of mangostin derivatives in *Tetragonula pagdeni* propolis extracts. *Journal of King Saud University - Science*. 2016;28(2):131-5.
26. Allen L, Ansel H. *ansel's pharmaceutical dosage forms and drug deliver systems*. 10 ed. Philadelphia, USA Wolters Kluwer; 2014.
27. Setthajindalert O, Phaechamud T. Solvent Exchanged In Situ Forming Gel. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2012;7(3):137-42.
28. Gandra SC. *The preparation and characterization of poloxamer based temperature-sensitive hydrogels for topical drug delivery*: Toledo; 2013.
29. Felton L. *Remington: Essentials of pharmaceutics*. Philadelphia: Philadelphia College of Pharmacy; 2013.
30. ยะสารวรรณ ณ. Temperature-Responsive Polymers for Biomedical Applications. *KKU Science Journal*. 2014;42(3):499-513.

31. Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F, et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;32, Part B:113-25.
32. Saraswathi B, Umashankar ABMS. polymers in mucoadhesive drug delivery system- latest updates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;5:423-30.
33. Yadav VK, Gupta AB, Kumar R, Yadav JS, Kumar B. Mucoadhesive Polymers: Means of Improving the Mucoadhesive Properties of Drug Delivery System. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2010;2(5):418-32.
34. Bukka R, Prakasam K, Patel CD. Preparation and Evaluation of Intraoral Drug Delivery System for Rasagiline mesylate *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2010;2(4):294-301.
35. Farmacia Cd. Development and characterisation of semisolid systems to deliver propolis in the oral cavity. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2010;31(1).
36. คูวัฒนสุขชาติ. จ. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.
37. เถียรไพศาล ร. แบคทีเรียในช่องปาก *Oral bacteriology*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2550.
38. Krisdapong S, Sheiham A, Tsakos G. Impacts of recurrent aphthous stomatitis on quality of life of 12- and 15-year-old Thai children. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*. 2012;21(1):71-6.
39. C. S. *Handbook of Oral Disease: Diagnosis and Management* London: Martin Dunitz; 2001.

40. Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinsteen N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clinical oral investigations*. 2007;11(2):143-7.
41. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press; 2009.
42. Bausod P. Antioxidant capacity test of tea beverage by cyclic voltammetry: Silpakorn; 2006.
43. Phansawan B. *Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination*: Phayao; 2013.
44. Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoulae LM, Visentainera JV. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Braz Chem Soc*. 2011;22(5):929-35.
45. Liu SH, Lee LT, Hu NY, Huang KK, Shih YC, Munekazu I, et al. Effects of alpha-mangostin on the expression of anti-inflammatory genes in U937 cells. *Chinese medicine*. 2012;7(1):19.
46. Woertz C, Preis M, Breitzkreutz J, Kleinebudde P. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(3, Part B):843-53.
47. Gurny R, Meyer J-M, Peppas NA. Bioadhesive intraoral release systems: design, testing and analysis. *Biomaterials*. 1984;5(6):336-40.
48. Cleary J, Bromberg L, Magner E. Adhesion of Polyether-Modified Poly(acrylic acid) to Mucin. *Langmuir*. 2004;20:9755-62.
49. Narayanan VA, Rao BP. Buccal in situ gel containing curcumin for the treatment of oral thrush. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2014;3(11):633-45.
50. Carlo Ceschel G, Bergamante V, Calabrese V, Biserni S, Ronchi C, Fini A. Design and evaluation in vitro of controlled release mucoadhesive tablets containing chlorhexidine. *Drug development and industrial pharmacy*. 2006;32(1):53-61.

51. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC. Mucoadhesive Gels Designed for the Controlled Release of Chlorhexidine in the Oral Cavity. *Pharmaceutics*. 2011;3(4):665-79.
52. Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Panomsuk S, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis. *Carbohydrate polymers*. 2015;132:173-9.
53. In vitro release testing methods for semisolid formulations. *Particle Sciences - Technical Brief*: Bethlehem; 2009.
54. Suresh PK, Manhar S. Bioadhesive buccal gels impregnated with fluconazole: Formulation, invitro and ex vivo characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014;4:14-9.
55. Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. In vitro antioxidant activity of chitosan aqueous solution: effect of salt form. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2012;11(2):235-42.
56. Ivarsson D, Wahlgren M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2012;92:353-9.
57. Hassan EE, Gallo JM. A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(5):491-5.
58. Yoswathana N, Eshtiaghi MN. Optimization of Subcritical Ethanol Extraction for Xanthone from Mangosteen Pericarp. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2015;6(2):115-9.
59. UPENDRA C. PD. PREFORMULATION STUDY OF POLOXAMER 407 GELS: EFFECT OF ADDITIVES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(1):130-3.

60. Garala K, Joshi P, Shah M, Ramkishan A, Patel J. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2013;3(1):29-41.
61. Varshosaz J, Tabbakhian M, Salmani Z. Designing of a Thermosensitive Chitosan/Ploxamer In Situ Gel for Ocular Delivery of Ciprofloxacin The Open Drug Delivery Journal. 2008;2:61-70.
62. Natthan Charernsriwilaiwat PO, Theerasak Rojanarata, Ngawhirunpat aT. In Vitro Antioxidant Activity of Chitosan Aqueous Solution: Effect of Salt Form. *Trop J Pharm Res.* 2012.
63. De Souza Ferreira SB, Moço TD, Borghi-Pangoni FB, Junqueira MV, Bruschi ML. Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016;55:164-78.
64. Nirmal H.B. BSR, Pawar S.P. In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(2):1398-408.
65. Ur-Rehman T. Controlled Release Gel Formulations and Preclinical Screening of Drug Candidates Sweden. Doctoral Thesis 2011; 2011.: Department of Chemistry Umeå University; 2011.
66. Priprem A, Nukulkit C, Johns NP, Damrongrungruang T, Wongsangta N, Benjavongkulchai E-o. Effect of Polymeric Combinations on Mucoadhesive and Swelling Properties of Orabase Gel Formulations. *Advanced Materials Research*. 2014;853:3-8.
67. Bansal K, Rawat MK, Jain A, Rajput A, Chaturvedi TP, Singh S. Development of Satranidazole Mucoadhesive Gel for the Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(3):716.

68. Gonzalez YM, Ghaly ES. Modified drug release of poloxamer matrix by including water-soluble and water-insoluble polymer. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010;36(1):64-71.
69. Cafaggi S, Leardi R, Parodi B, Caviglioli G, Russo E, Bignardi G. Preparation and evaluation of a chitosan salt-poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005;102(1):159-69.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. เตรียมสารสกัดชั้นชั้นโรง

ตารางที่ 1 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงในเอทานอลโดยการหาผลผลิตร้อยละ (%yield)

Sample	น้ำหนัก ตามการ ทดลอง	น้ำหนัก ที่ได้ตาม ทฤษฎี	%yield	Mean±SD
Sample1	1.19	4	29.75	
Sample2	0.978	4	24.45	26.57 ± 2.81
Sample3	1.02	4	25.50	

ตารางที่ 2 การหาปริมาณสารสกัดชั้นชั้นโรงจากการ dewax ในเฮกเซนโดยการหาผลผลิตร้อยละ (% yield)

Sample	น้ำหนัก ตามการ ทดลอง	น้ำหนักที่ ได้ตาม ทฤษฎี	%yield	Mean±SD
Sample1	0.4992	4	12.48	
Sample2	0.4144	4	10.36	11.45 ± 1.06
Sample3	0.4604	4	11.51	

2. การตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407

2.1 การตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407

ตารางที่ 3 แสดงการตั้งตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407

Rx	1	2	3	4	5	6
P407 (%)	15	16	17	18	19	20
water 5 °C qs to				100		

หมายเหตุ: P407=Poloxamer 407

2.2 การตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

ตารางที่ 4 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
P407 (%)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
SCMC (%)	0.025	0.05	0.10	-	-	-	-	-	-	-
C940 (%)	-	-	-	0.025	0.05	0.1	0.2	-	-	-
CS (%)	1.2	1.5	1.8	-	-	-	-	1.2	1.5	1.8
HOBt (%)	1.2	1.5	1.8	-	-	-	-	1.2	1.5	1.8
water 5 °C qs to	100									

หมายเหตุ : P407=Poloxamer 407, SCMC=Sodium carboxymethylcellulose, C940= Carbopol 940, CS=Chitosan, HOBt= Hydroxybenzotriazole

2.3 การตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชันชันโรง

2.3.1 การตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 16 %w/w

ตารางที่ 5 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 16 %w/w

Rx	P407 (%)	CMC (%)	C940 (%)	CS (%)	HOBt (%)	SS (%)	T80 (%)	Pep oil (%)	E (%)	SBP (%)	W
17	16	-	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
18	16	0.05	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
19	16	0.025	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
20	16	0.0125	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
21	16	-	0.0125	-	-	0.1	0.75	0.2			
22	16	-	0.025	-	-	0.1	0.75	0.2	2	0.2	100
23	16	-	0.005	-	-	0.1	0.75	0.2			
24	16	-	-	1.8	1.5	0.1	0.75	0.2			
25	16	-	-	1.5	1.5	0.1	0.75	0.2			
26	16	-	-	1.2	1.2	0.1	0.75	0.2			

หมายเหตุ : P407=Poloxamer 407, SCMC=Sodium carboxymethylcellulose, C940= Carbopol 940,
CS=Chitosan, HOBt= Hydroxybenzotriazole ,SS = Saccharin sodium, T80 = tween 80, pep oil =
Peppermint oil, E = Ethanol, w = water 5 °C qs to

ตารางที่ 6 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15 %w/w

Rx	P407 (%)	CMC (%)	C940 (%)	CS (%)	HOBt (%)	SS (%)	T80 (%)	Pep oil (%)	E (%)	SBP (%)	W
27	15	-	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
28	15	0.05	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
29	15	0.025	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
30	15	0.0125	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
31	15	-	0.0125	-	-	0.1	0.75	0.2			
32	15	-	0.025	-	-	0.1	0.75	0.2	2	0.2	100
33	15	-	0.005	-	-	0.1	0.75	0.2			
34	15	-	-	1.8	1.5	0.1	0.75	0.2			
35	15	-	-	1.5	1.5	0.1	0.75	0.2			
36	15	-	-	1.2	1.2	0.1	0.75	0.2			

หมายเหตุ : P407=Poloxamer 407, SCMC=Sodium carboxymethylcellulose, C940= Carbopol 940,
CS=Chitosan, HOBt= Hydroxybenzotriazole ,SS = Saccharin sodium, T80 = tween 80, pep oil =
Peppermint oil, E = Ethanol, w = water 5 °C qs to

2.3.3 การตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w

ตารางที่ 7 แสดงการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w

Rx	P407 (%)	CMC (%)	C940 (%)	CS (%)	HOBt (%)	SS (%)	T80 (%)	Pep oil (%)	E (%)	SBP (%)	W
37	14	-	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
38	14	0.05	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
39	14	-	0.05	-	-	0.1	0.75	0.2			
40	14	-	-	1.8	1.8	0.1	0.75	0.2			
41	13	-	-	-	-	0.1	0.75	0.2	2	0.2	100
42	13	0.05	-	-	-	0.1	0.75	0.2			
43	13	-	0.05	-	-	0.1	0.75	0.2			
44	13	-	-	1.8	1.8	0.1	0.75	0.2			

หมายเหตุ : P407=Poloxamer 407, SCMC=Sodium carboxymethylcellulose, C940= Carbopol 940, CS=Chitosan, HOBt= Hydroxybenzotriazole ,SS = Saccharin sodium, T80 = tween 80, pep oil = Peppermint oil, E = Ethanol, w = water 5 °C qs to

3. การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

3.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ที่ 15,16,17,18,19 และ 20 (%w/w)

Rx	$T_{sol-gel}$ (°C)			Mean±SD	pH			Mean±SD
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3	
1	> 40	> 40	> 40	> 40	6.86	6.88	6.87	6.87 ± 0.01
2	35.2	35.8	35.0	35.33 ± 0.42	6.89	6.89	6.87	6.88 ± 0.01
3	31.2	30.2	33.0	31.40 ± 1.44	6.86	6.89	6.86	6.87 ± 0.02
4	28.5	27.0	26.0	27.17 ± 1.26	6.90	6.91	6.88	6.90 ± 0.02
5	23.5	23.0	24.0	23.50 ± 0.50	6.89	6.86	6.90	6.88 ± 0.02
6	21.5	20.5	21.5	21.67 ± 0.58	6.85	6.88	6.89	6.87 ± 0.02

3.2 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

ตารางที่ 9 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	$T_{sol-gel}$ (°C)			Mean±SD	pH			Mean±SD
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3	
7	38.0	38.2	38.0	38.07 ± 0.12	6.86	6.87	6.86	6.85 ± 0.12
8	36.5	35.0	36.0	35.83 ± 0.76	6.86	6.88	6.87	6.87 ± 0.10
9	30.2	30.5	31.8	30.83 ± 0.85	6.84	7.02	7.04	6.97 ± 0.11
10	> 40	> 40	> 40	> 40	6.84	6.88	7.04	6.92 ± 0.11
11	31.0	32.0	32.0	31.67 ± 0.58	7.30	7.13	7.25	7.22 ± 0.08
12	29.8	29.8	28.0	29.2 ± 1.04	7.40	7.32	7.30	7.34 ± 0.05
13	< 5	< 5	< 5	< 5	6.89	6.90	6.92	6.90 ± 0.01
14	> 40	> 40	> 40	> 40	4.25	4.28	4.28	4.26 ± 0.02

15	> 40	> 40	> 40	> 40	4.26	4.31	4.20	4.26 ± 0.06
16	37.0	36.0	35.8	36.27 ± 0.64	4.28	4.19	4.27	4.25 ± 0.05

3.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต์ต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

3.3.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต์ต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$) และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต์ต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 16 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)			Mean±SD	pH			Mean±SD
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3	
17	26	25.5	26	25.83 ± 0.29	5.25	5.20	5.35	5.27 ± 0.08
18	27	28.5	28.0	27.83 ± 0.76	5.05	5.06	5.03	5.05 ± 0.02
19	27	27.8	28	27.60 ± 0.53	5.25	5.17	5.17	5.20 ± 0.05
20	29.8	28.5	27.5	28.60 ± 1.15	5.10	5.05	4.90	5.02 ± 0.14
21	28.8	27.5	27.5	27.93 ± 0.75	7.16	7.22	7.20	7.19 ± 0.31
22	28.2	27.5	27.8	27.83 ± 0.35	7.08	7.30	7.10	7.16 ± 0.12
23	28	28	27.8	27.93 ± 0.12	7.25	7.31	7.28	7.28 ± 0.03
24	26	25	23	24.67 ± 1.52	4.65	4.64	4.65	4.65 ± 0.01
25	27	27.8	28	27.60 ± 0.53	4.56	4.52	4.52	4.53 ± 0.02
26	26	25	26.5	25.83 ± 0.76	4.62	4.63	4.59	4.61 ± 0.02

3.3.2 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลาย และ เจล ($T_{\text{sol-gel}}$)และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้น ชั้นโรงของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

ตารางที่ 11 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$)และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 15 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	$T_{\text{sol-gel}}$ (°C)			Mean±SD	pH			Mean±SD
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3	
27	34.5	35	35	34.83± 0.29	5.40	5.38	5.39	5.39±0.01
28	34	34.2	34.4	34.20 ± 0.20	5.30	5.32	5.34	5.33 ± 0.02
29	30.5	32.0	32.0	31.50 ± 0.87	5.32	5.17	5.25	5.25 ±0.08
30	30	29.8	29	29.60 ± 0.53	5.01	5.02	5.04	5.03 ± 0.01
31	32	30	31	32.00 ± 1.00	7.14	7.16	7.10	7.13 ±0.03
32	33	32.5	33	32.83 ± 0.29	7.32	7.38	7.40	7.37 ±0.04
33	28	28	29	29.00 ± 0.58	7.32	7.40	7.30	7.34 ± 0.05
34	32	32.8	35	33.27 ± 0.58	4.40	4.42	4.38	4.40 ±0.02
35	36	35	34	35.00 ± 1.56	4.47	4.46	4.48	4.47 ± 0.01
36	32.5	31.2	31	31.57 ± 0.81	4.50	4.65	4.55	4.57 ± 0.08

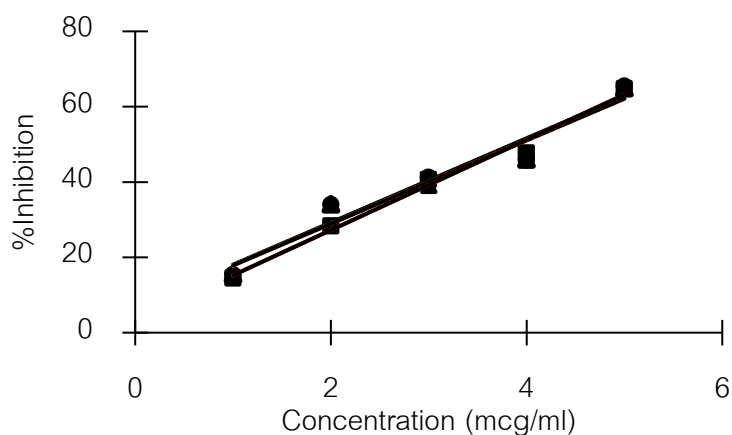
3.3.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและ เจล ($T_{\text{sol-gel}}$)และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้น ชั้นโรงของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

ตารางที่ 12 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{\text{sol-gel}}$)และความเป็นกรด - ด่าง ตำรับยาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงของ P407 ที่ 14 และ 13 %w/w ร่วมกับ SCMC, C940 และ CS

Rx	T _{sol-gel} (°C)			mean±SD	pH			mean±SD
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3	
37	> 40	> 40	> 40	> 40	5.19	5.12	5.10	5.14 ± 0.04
38	> 40	> 40	> 40	> 40	5.19	5.20	5.24	5.18 ± 0.03
39	> 40	> 40	> 40	> 40	7.29	7.26	7.34	7.29 ± 0.03
40	> 40	> 40	> 40	> 40	4.57	4.56	4.55	4.56 ± 0.01
41	> 40	> 40	> 40	> 40	5.03	4.97	4.98	4.99 ± 0.03
42	> 40	> 40	> 40	> 40	5.21	5.26	5.27	5.24 ± 0.03
43	> 40	> 40	> 40	> 40	4.48	4.49	4.46	4.48 ± 0.02
44	> 40	> 40	> 40	> 40	7.63	7.68	7.60	7.64 ± 0.04

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดชั้นชั้นโรงเปรียบเทียบกับ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH) radical assay โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid

4.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl (DPPH) radical assay



หมายเหตุ: ● (ครั้งที่ 1), ▲ (ครั้งที่ 2), ■ (ครั้งที่ 3)

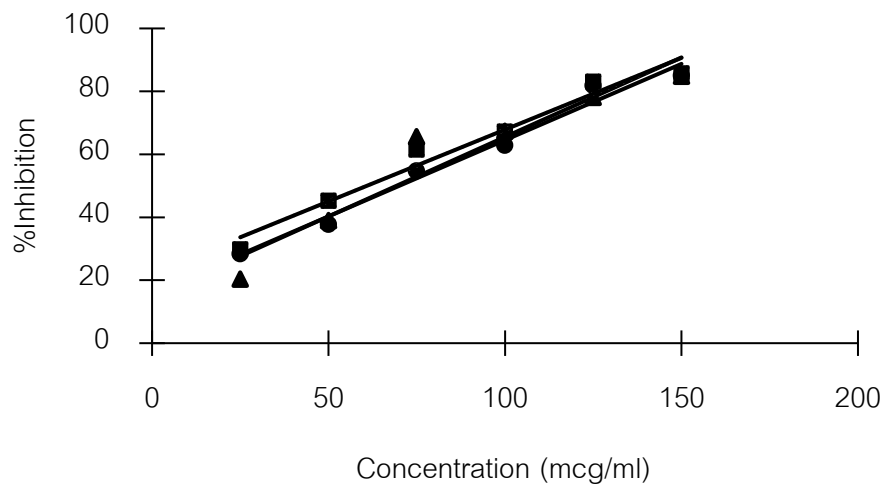
รูปที่ 1 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic Acid ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ครั้งที่ 1,2 และ 3

ครั้งที่ 1 linear regression equation $y = 11.184x + 6.876$ $R^2 = 0.9454$ $IC_{50} = 3.86$ mcg/ml

ครั้งที่ 2 linear regression equation $y = 11.067x + 6.795$ $R^2 = 0.9488$ $IC_{50} = 3.90$ mcg/ml

ครั้งที่ 3 linear regression equation $y = 11.992x + 3.244$ $R^2 = 0.9870$ $IC_{50} = 3.90$ mcg/ml

4.2 ศึกษาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay



หมายเหตุ: ● (ครั้งที่ 1), ▲ (ครั้งที่ 2), ■ (ครั้งที่ 3)

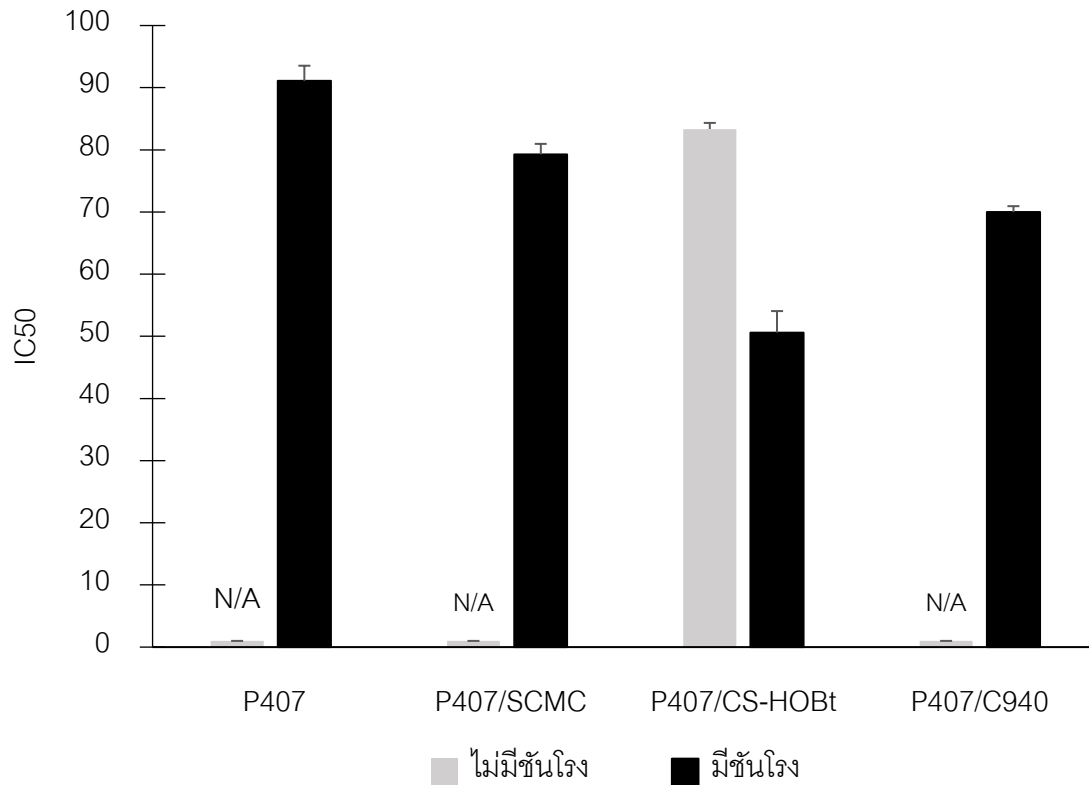
รูปที่ 2 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ครั้งที่ 1,2 และ 3

ครั้งที่ 1 linear regression equation $y = 0.4845x + 16.067$ $R^2 = 0.9787$ $IC_{50} = 70.04$ mcg/ml

ครั้งที่ 2 linear regression equation $y = 0.5052x + 15.024$ $R^2 = 0.9164$ $IC_{50} = 69.23$ mcg/ml

ครั้งที่ 3 linear regression equation $y = 0.4560x + 22.247$ $R^2 = 0.9660$ $IC_{50} = 60.06$ mcg/ml

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงในตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระ
ด้วยวิธี DPPH radical assay



รูปที่ 3 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงของตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรรจุและไม่ได้บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงด้วยวิธี DPPH radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC₅₀)

ตารางที่ 13 แสดงผลการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นชั้นโรงของตำรับยาเจดที่ไวต่ออนุมูลอิสระที่บรรจุและไม่ได้บรรจุสารสกัดจากชั้นชั้นโรงด้วยวิธี DPPH radical assay ในรูปค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

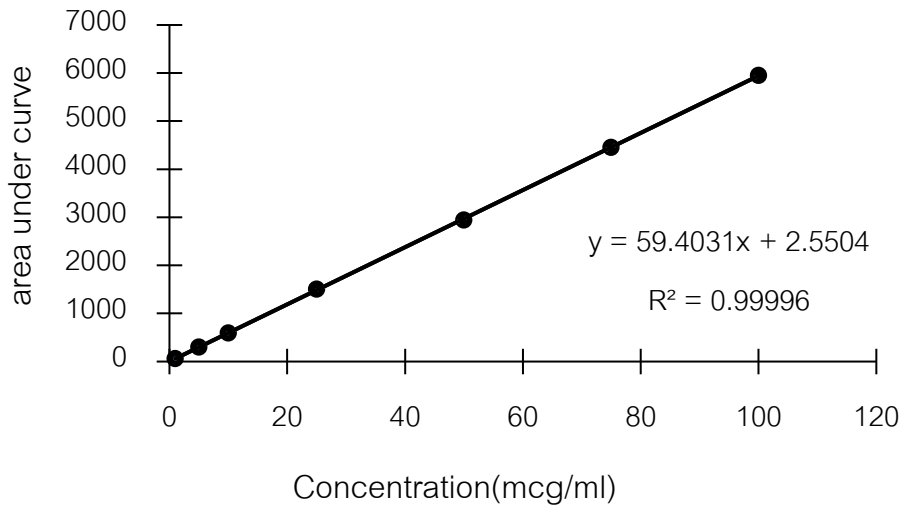
ตำรับ	ไม่มีมีชั้นโรง				มีชั้นโรง			
	n=1	n=2	n=3	IC_{50} (mg/ml)	n=1	n=2	n=3	IC_{50} (mg/mL)
0.2 % SBP in P407	N/A	N/A	N/A	N/A	92.01	88.35	92.95	91.10 ± 2.43
0.2 % SBP in P407/SCMC	N/A	N/A	N/A	N/A	81.15	78.77	77.89	79.27 ± 1.69
0.2 % SBP in P407/CS-HOBt	79.06	87.46	83.52	83.35 ± 0.98 [*]	52.70	46.63	52.49	50.61 ± 3.45 [*]
0.2 % SBP in P407/C940	N/A	N/A	N/A	N/A	68.22	71.62	70.08	69.97 ± 0.97

หมายเหตุ: N/A = inhibition concentration not more than 50%

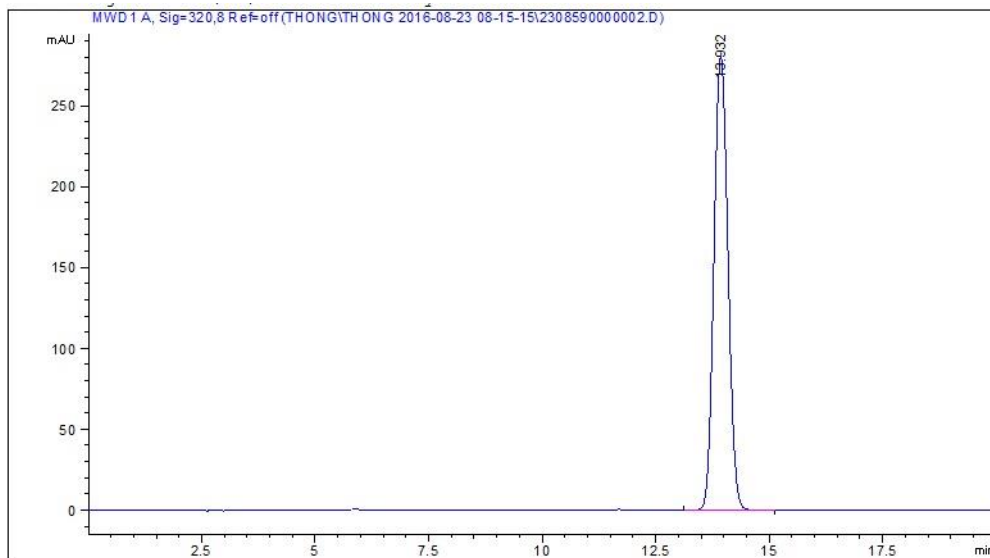
6. การศึกษาหาปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

ตารางที่ 14 แสดง Area under the curve ปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในสารสกัดชั้นชั้นโรงด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

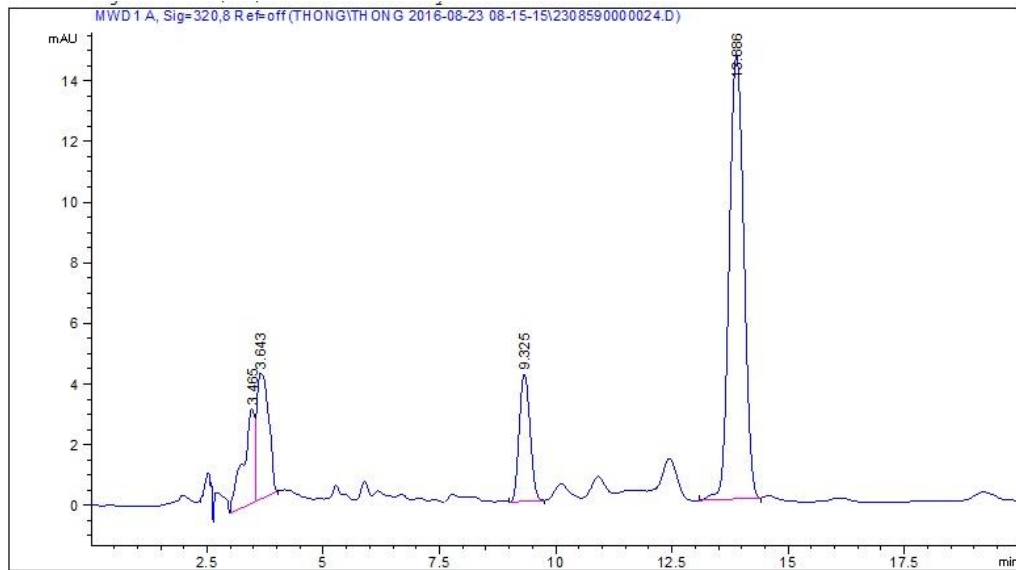
Concentration (μ g/mL)	Area(1)	Area(2)	Area(3)	Mean
100	5872.8	6005.1	5984.4	5954.1
75	4435.6	4484.2	4447.8	4455.867
50	2978	2862.5	2991.7	2944.067
25	1531.5	1504.4	1482.8	1506.233
10	608.4	567.7	608.4	594.8333
5	309.9	296.3	293.1	299.7667
1	61.7	65.3	65.6	64.2



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน (standard alpha-mangostin)



รูปที่ 5 ตัวอย่างกราฟของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน ที่ได้จากเครื่อง high performance liquid chromatography โดยแกน X คือ เวลาและแกน Y คือ ค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 6 ตัวอย่างกราฟของสูตรตำรับที่บรรจุสารสกัดชั้นชั้นโรงที่ได้จากเครื่อง high performance liquid chromatography โดยแกน X คือ เวลาและแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง

6.1 การหาปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ในตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

Rx	น้ำหนักของ ตำรับเจล (g)	ปริมาณตาม การทดลอง (μg)	ปริมาณที่ได้ ตามทฤษฎี (μg)	% content	Mean \pm SD
0.2 % SBP in P407	2	8.13	8.24	98.68	99.37 \pm 1.08
	2	8.31	8.24	100.90	
	2	8.12	8.24	98.54	
0.2 % SBP in P407/SCMC	2.0008	8.02	8.24	97.33	98.42 \pm 2.03
	2.0008	7.97	8.24	96.66	
	2.0008	8.35	8.24	101.27	
0.2 % SBP in P407/CS-HOBt	2.0012	7.95	8.24	96.40	98.54 \pm 1.94

	2.0012	8.33	8.24	101.11	
	2.0012	8.09	8.24	98.13	
0.2 % SBP in P407/C940	2.001	8.22	8.24	99.76	98.71 ± 1.30
	2.001	8.20	8.24	99.50	
	2.001	7.99	8.24	96.89	

7. การทดสอบการปลดปล่อยของสารสกัดสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha mangostin) ของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

ตารางที่ 16 แสดงร้อยละการปลดปล่อยสะสมของปริมาณสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ในแต่ละเวลา

Rx	ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของ alpha-mangostin ในแต่ละเวลา (%)				
	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	12 hr
0.2 % SBP in P407	2.87 ± 0.47	8.38 ± 3.18	13.25 ± 2.71	17.55 ± 2.26	24.248 ± 1.05
0.2 % SBP in P407/ SCMC	2.98 ± 0.29	10.79 ± 3.40	14.68 ± 2.43	19.26 ± 2.99	27.76 ± 1.79
0.2 % SBP in P407/CS- HOBt	3.07 ± 1.05	4.38 ± 1.05	6.74 ± 1.50	9.14 ± 0.85	12.58 ± 0.74
0.2 % SBP in P407/ C940	3.69 ± 1.28	7.92 ± 1.57	13.48 ± 2.02	18.19 ± 2.48	23.48 ± 4.41