



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและเจลฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า

Development of a topical spray and topical gel containing volatile oil

from *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin

โดย

นสภ. ณัฐมน	วิเศษสันติกุล	รหัส 60210191
นสภ. วนัสนันท์	ศิริมงคล	รหัส 60210216
นสภ. อรภาณี	สิทธิโสภณ	รหัส 60210257

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและเจลฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอองฟ้า

Development of a topical spray and topical gel containing volatile oil

from *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin

โดย

นสภ. ณัฐมน	วิเศษสันติกุล	รหัส 60210191
นสภ. วันสนันท์	ศิริมงคล	รหัส 60210216
นสภ. อรภาณี	สิทธิโสภณ	รหัส 60210257

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและเจลฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดได้จากใบสอ่งฟ้า และเพื่อพัฒนาสูตรตำรับยาสำหรับใช้กับแผลติดเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าเป็นสารออกฤทธิ์ โดยศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ของตำรับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาตำรับยาฆ่าเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันใบสอ่งฟ้า ให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความทันสมัยและน่าใช้ขึ้นกว่าการใช้ในรูปแบบยาแผนโบราณ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยและเป็นการสร้างทางเลือกให้กับผู้ป่วยในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ในการรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังได้ ผู้วิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนารูปแบบตำรับยาในอนาคต

คณะผู้จัดทำ

11 เมษายน 2565

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา ๒๕๖๔

เรื่อง การพัฒนาตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและเจลฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบ
สอ่งฟ้า

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-------------------|---------------|---------------|
| 1. นสภ. ณัฐมน | วิเศษสันติกุล | รหัส 60210191 |
| 2. นสภ. วนัสนันท์ | ศิริมงคล | รหัส 60210216 |
| 3. นสภ. อรภาณี | สิทธิโสภณ | รหัส 60210257 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ผศ.ดร.ณิกานต์ ภิระคำ
2. ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง
3. ภญ.ดร.พุดิพร คงแก้ว

บทคัดย่อ

การด้อยาต้านจุลชีพในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาได้มีความรุนแรงมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มจะ
ลดลง อัตราการด้อยาเพิ่มขึ้นในขณะที่จำนวนยาปฏิชีวนะชนิดใหม่กลับลดลง และการบาดเจ็บ
เนื่องจากแผลติดเชื้อส่วนใหญ่มีกรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ ศึกษาฤทธิ์
ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Methicillin-resistant Staphylococcus*
aureus ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบสอ่งฟ้า ด้วยวิธี *Broth-dilution method* เพื่อหา
ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ(MIC) แล้วทำการศึกษาต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้น
ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้(MBC) จากนั้นทำการพัฒนาสูตรตำรับยาสำหรับใช้กับแผลติดเชื้อที่มีน้ำมัน
หอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าเป็นสารออกฤทธิ์ 2 รูปแบบ คือ เจลฆ่าเชื้อโดยมี *Aristroflex avc* เป็นสาร
ก่อเจล และสเปรย์ฆ่าเชื้อโดยมี *PVP-K30* และ *Ethyl cellulose* เป็นสารก่อฟิล์ม จากผลการศึกษา
พบว่าค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus* และ *MRSA* คือ 0.03125 µl/mL , 0.0625 µl/mL ตามลำดับ
และค่า MBC ของเชื้อ *S. aureus* และ *MRSA* คือ 0.0625 µl/mL, 0.125 µl/mL ตามลำดับ
นอกจากนี้ตำรับเจลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเมื่อเทียบกับ control คือ มีเชื้อขึ้นน้อยลงหรือไม่ขึ้นเลย ส่วน
ตำรับสเปรย์เมื่อทดสอบฤทธิ์เทียบกับ control พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ ไม่มีเชื้อขึ้นในการ

ทดสอบ ควรมีการศึกษา และปรับปรุงสูตรตำรับเพิ่มเติมเพื่อการพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม
ต่อไปในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.ณิชนันต์ ภิระคำ

Senior Project Academic Year 2021

: Development of a topical spray and topical gel containing volatile oil from
Clausena harmandiana (Pierre) Guillaumin

By

- | | | |
|--------------------|---------------|-------------|
| 1. Miss Natthamon | Wisetsantikul | ID 60210191 |
| 2. Miss Wanatsanan | Sirimongkol | ID 60210216 |
| 3. Miss Onpanee | Sittisophon | ID 60210257 |

Advisor:

1. Assist. Prof. Dr. Nichakan Peerakam
2. Assist. Prof. Dr. Watcharapong Chaemsawang
3. Lecturer, Dr. Putthiporn Khongkaew

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has gotten worse over the last 30 years and hasn't tended to go down. Drug resistance is on the rise, while the number of new antibiotics is on the decline. Antibiotics are used to treat the majority of damage caused by infected wounds. The objective of this study to investigate the antibacterial activity of essential oils extracted from *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin leaves a native plant of Thailand. The essential oil of *harmandiana* was tested for the Minimum inhibitory concentration (MIC, by using Broth dilution method) and Minimum bactericidal concentration (MBC). After that the essential oil was applied to be bioactive compound for the topical spray and gel products. The results presented that *Clausena harmandiana* essential oil showed the MIC to *S. Aureus* and MRSA were 0.03125 µl/mL and 0.0625 µl/mL, and also showed the MBC to both bacteria were 0.0625 µl/mL and 0.125 µl/mL respectively. For the application of essential oil for the topical spray and gel found that the gel formulation has antibacterial activity compared to control, implying that infections are reduced or eliminated. In the case

of the spray formulation, it was discovered that it showed antibacterial action when compared to the control, indicating that there was no bacterial growth in the test. For future industrial progress, more education and improved formulations are required.

Major Advisor Assist. Prof. Dr. Nichakarn Peerakam

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผศ.ดร.ณิชนันต์ ภิระคำ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง และ ภาญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาพร้อม ซึ่งทุกท่านได้เสียสละเวลาในการให้คำชี้แนะและอบรมสั่งสอนและให้ความช่วยเหลือรวมถึงดูแลเอาใจใส่ในการดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอน นับตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนสำเร็จเป็นรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยซาบซึ้งในความกรุณา จึงขอกราบขอพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวทุกท่านที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้คำแนะนำ รวมทั้งเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	39
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงชนิดสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า	6
ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในแผลเรื้อรัง	9
ตารางที่ 3 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับเจล	17
ตารางที่ 4 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับสเปรย์	17
ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นของสาร ในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าและสาร Standard anethole	22
ตารางที่ 6 แสดงค่าAbsorbance ที่ความยาวคลื่น 255 nm ของ anethole ที่วัดได้ ณ ความเข้มข้นต่างๆ	29
ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักของ Standard anethole และน้ำมันหอมระเหย จากใบสอ่งฟ้าปริมาตร 1 ml	30
ตารางที่ 8 แสดงค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 255 nm ปริมาณ anethole และ% anethole ที่หาได้ของน้ำมันหอมระเหย จากใบสอ่งฟ้าความเข้มข้น 0.004 ml/ml ตำรับเจลความเข้มข้น 0.006 mg/ml และสเปรย์ความเข้มข้น 0.006 ml/ml	30
ตารางที่ 9 แสดงผลความเป็นกรด-เบส ของตำรับ	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะของต้นสอ่งฟ้า	5
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของสาร anethole	7
รูปที่ 3 เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	11
รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า โดยใช้วิธี Dilution test	23
รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้าโดยใช้วิธี Dilution test	23
รูปที่ 6 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S. aureus</i> และ MRSA ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า	24
รูปที่ 8 แสดงลักษณะของเนื้อเจลที่เตรียมโดยมี Aristoflex avc เป็นสารก่อเจลโดยใช้ความเข้มข้นที่ 2%, 1%, 0.75% และ 0.5% ของตำรับ	25
รูปที่ 9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> และ MRSA ของตำรับเจลผสมน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า	25
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet	26
รูปที่ 11 แสดงลักษณะของฟิล์มที่ได้จากตำรับสเปรย์ซึ่งใช้สารก่อฟิล์มเป็น PVP-K30 และ Ethyl cellulose	27
ภาพที่ 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> และ MRSA ของตำรับสเปรย์ผสมน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า	28
ภาพที่ 13 แสดงความยาวคลื่นของ standard anethole	29

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แผลติดเชื้อ (Infected wound) คือ บาดแผลที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial contamination) อาจมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นจนทำให้ขัดขวางกระบวนการสมานแผล ทำลายเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล และสามารถลุกลามไปทำลายเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง หรือเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อ ทางระบบเลือดได้ (systemic infection)

ซึ่งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (20%), *Coagulase-negative staphylococci* (14%), *Enterococci* (12%), *Escherichia coli* (8%)

โดยหลักการสำคัญในการรักษาแผลติดเชื้อคือการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียบริเวณแผล และจากแนวทาง การรักษาแผลติดเชื้อ World Union Wound Healing Societies (WUWHS)^[1] แนะนำให้ใช้ยาต้านจุลชีพชนิด ภายนอก (Topical antimicrobial therapy) เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดแผลติดเชื้อ โดยยาต้านจุลชีพสามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคได้จากกลไกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ หรือการทำลายโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารระงับเชื้อ (Antiseptic) และ ยาปฏิชีวนะชนิดใช้ภายนอก (Topical antibiotics)

Antiseptic คือ สารที่มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อหลายชนิด ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยมีกลไกทำลายเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้หลายตำแหน่ง แนะนำให้ทารอบบาดแผลวันละ 3-4 ครั้ง นาน 2-4 สัปดาห์หรือจนกว่าแผลจะหาย ตัวอย่างเช่น ethyl alcohol, chlorhexidine gluconate, iodine-base, hydrogen peroxide

Topical antibiotics มีข้อบ่งใช้สำหรับรักษาบาดแผลที่ถูกวินิจฉัยว่าเกิด การติดเชื้อเท่านั้น และควรพิจารณาเลือกใช้ตามฤทธิ์ที่ครอบคลุมเชื้อของยาปฏิชีวนะและชนิดของเชื้อบริเวณแผล แนะนำให้ทายาต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 7-10 วัน ตัวอย่างยาปฏิชีวนะ เช่น silver sulfadiazine cream, sodium fusidate ointment และ mupirocin ointment ใช้กับการติดเชื้อ MRSA เท่านั้น เพื่อป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพ

การดื้อยาต้านจุลชีพ หมายถึง ความสามารถของจุลชีพที่สามารถ เจริญเติบโต หรืออยู่รอดได้ แม้สัมผัส กับยาต้านจุลชีพที่มีความเข้มข้นเพียงพอในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance : AMR) ได้มีความรุนแรงมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มจะลดลง ขณะที่อัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้น แต่จำนวนยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ที่ออกสู่ท้องตลาดกลับลดลงและแทบไม่มี ปัจจุบัน ทั่วโลกมีคนเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาประมาณ ปีละ 700,000 ราย และในประเทศไทย คาดว่ามีการติดเชื้อ ดื้อยาประมาณปีละ 87,751 ครั้ง เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยา 38,481 ราย (ร้อยละ 40 ของผู้ติดเชื้อดื้อยา) มูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาคิด เป็น 2,539-6,084 ล้านบาท สูญเสียทางเศรษฐกิจโดยรวมไม่ต่ำกว่า 40,000 ล้านบาท^[2]

จากปัญหาดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสำหรับรักษาการติดเชื้อที่มาจาก สมุนไพรเพื่อลดปัญหาการดื้อยาในอนาคต โดยจากงานวิจัยมีรายงานว่า พืชในวงศ์ Rutaceae มี สารสำคัญคือ anethole ซึ่งจากรายงานการการศึกษาวิจัยเรื่อง Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed โดย Isao Kubo และคณะ^[3] และจากการศึกษาเรื่อง Anethole, a Potential Antimicrobial Synergist, Converts a Fungistatic Dodecanol to a Fungicidal Agent โดย Ken-ichi Fujita และคณะ^[15] และในปี 2013 จากการ ศึกษาเรื่อง Study of antimicrobial activity of anethole and carvoneloaded PLGA nanoparticles โดย Mehdi Esfandyari-Maneshcและคณะ^[16] โดยทั้ง3การศึกษาได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาร anethole พบว่า สาร anethole สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ที่มีอยู่ในแผลติดเชื้อได้ โดยมีค่า MIC มากกว่า 1600 µg/mL นอกจากนี้ยังมีงานวิจัย เรื่อง Chemical Profiling Revealed a Dominant Compound *trans*-Anethole and Biological Evaluation of an Edible Plant *Clausena harmandiana* Containing Essential Oil โดย Nichakan และคณะ^[5] ได้รายงานถึง สารสำคัญ anethole ว่าถูกค้นพบว่าเป็นองค์ประกอบหลักในใบสะอ้งฟ้า ที่เป็นพืชท้องถิ่นของ ประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมี แนวคิดในการพัฒนาตำรับยาฆ่าเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันใบสะอ้งฟ้า ให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีความทันสมัยและน่าใช้ขึ้นกว่าการใช้ในรูปแบบยาแผนโบราณ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยและ เป็นการสร้างทางเลือกให้กับผู้ป่วยในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ในการรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดได้จากใบส่องฟ้า
2. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับยาสำหรับใช้กับแผลติดเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้าเป็นสารออกฤทธิ์

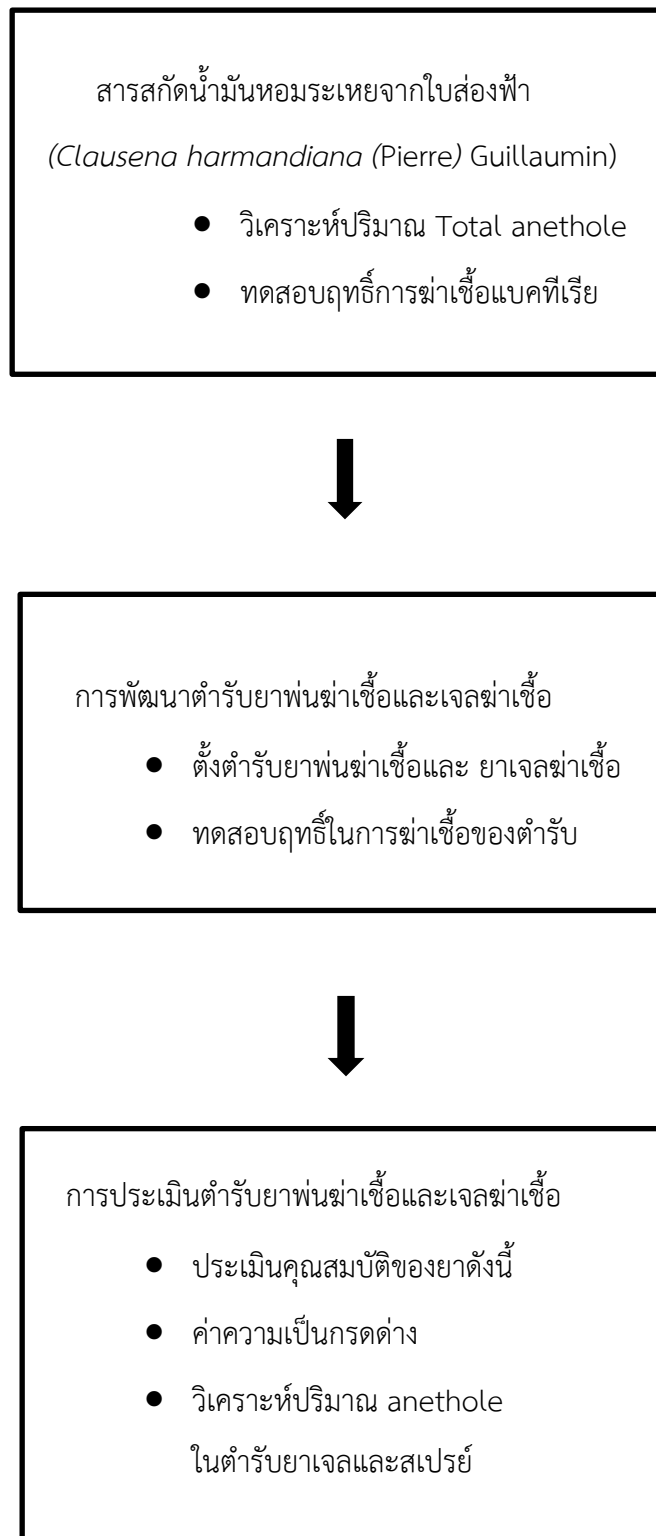
สมมติฐานงานวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยของใบส่องฟ้ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้จริง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลิตภัณฑ์เจลฆ่าเชื้อและสเปรย์ฆ่าเชื้อซึ่งได้จากน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า
2. สามารถนำผลิตภัณฑ์ไปพัฒนาต่อยอดและใช้งานจริงเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วย

กรอบแนวคิด



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของต้นสอ่งฟ้า^[4]

1. ข้อมูลทั่วไปของต้นสอ่งฟ้า^[4]

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin

ชื่อวงศ์ : Rutaceae

ชื่อสามัญ: -

ชื่อพื้นเมือง: สอ่งฟ้า (อุดรธานี) , สอ่งฟ้าตง (เลย) , เหม็น (จันทบุรี) , สมุยหอม (นครศรีธรรมราช)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์:

ลำต้น เป็นไม้ต้นขนาดเล็กแต่ยังคงมีลำต้นเดี่ยวสูง 5 เมตร

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนกมีใบย่อยเรียงตัวสองข้างของแกนกลาง ติดเรียงแบบสลับ แกนกลางที่ต่อจากก้านใบของใบประกอบเป็นที่ติดของใบย่อยยาว 15-55 cm ใบย่อย 5-7 ใบ ลักษณะใบย่อยเป็นรูปไข่ส่วนกว้างที่สุดจะอยู่ต่ำกว่าจุดกึ่งกลางขนาด 4-8 cm x 2-7 cm สออบแคบ เป็นรูปลิ้นที่ฐานใบ แผ่นใบปกคลุมด้วย translucent oil cell

ดอก ดอกขนาดเล็ก มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ และกลีบดอกมี 5 กลีบรูปไข่ ยาวขนาด 0.3 cm สีขาวอมเขียว

ผล ผลลักษณะ berry มีเนื้อเมล็ดมาก รูปทรงไข่ ยาวขนาด 1.5 cm สีแดงและภายในบรรจุ 1-3 เมล็ดพันธุ์

1.1 สารที่พบในน้ำมันหอมระเหย^[5]

1.1.1 สารกลุ่ม phenylpropenes

1.1.2 สารกลุ่ม monoterpenes

1.1.3 สารกลุ่ม sesquiterpenes

1.1.4 สารกลุ่ม phenolic compound ได้แก่ trans-anethole (91.44%), estragole (2.98%) and cis-anethole (2.55%) phenylpropanoids.

ตารางที่ 1 แสดงชนิดสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากต้นสอ่งฟ้า^[5]

Table 1. Chemical composition of *C. harmandiana* essential oil.

Compound	Exp.-RI ^a	Ref.-RI ^b	Ref.-RI ^c	%Relative abundance (Average $\pm$ SD)
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	859	857	851-858	0.02 $\pm$ 0.00
Sabinene	979	974	954-977	0.03 $\pm$ 0.00
<i>cis</i> -3-Hexenyl-1-acetate	1008	1005	1005-1009	0.02 $\pm$ 0.00
<i>cis</i> - β -Ocimene	1034	1038	1027-1044	0.14 $\pm$ 0.01
<i>trans</i> - β -Ocimene	1045	1049	1032-1054	0.10 $\pm$ 0.01
Linalool	1106	1099	1080-1104	0.08 $\pm$ 0.01
2-Octyl acetate	1108	1115	-	0.04 $\pm$ 0.00
Nonanal	1113	1112	1089-1110	0.01 $\pm$ 0.00
Estragole	1211	1196	1195-1203	2.98 $\pm$ 0.01
<i>cis</i> -Anethole	1267	1254	1245-1262	2.55 $\pm$ 0.07
<i>p</i> -Anisaldehyde	1277	1251	1251-1277	0.05 $\pm$ 0.01
Unknown	1297	-	-	0.12 $\pm$ 0.02
<i>trans</i> -Anethole	1304	1286	1283-1301	91.44 $\pm$ 0.31
β -Elemene	1396	1386	1362-1410	0.06 $\pm$ 0.02
<i>trans</i> -Caryophyllene	1431	1419	1410-1451	0.08 $\pm$ 0.01
α -Humulene	1468	1454	1424-1488	0.03 $\pm$ 0.00
allo-Armadendrene	1472	1461	1442-1474	0.02 $\pm$ 0.00
α -Curcumene	1489	1488	1479-1493	0.03 $\pm$ 0.01
Germacrene-D	1493	1482	1453-1519	0.24 $\pm$ 0.01
α -Zingiberene	1502	1500	1474-1509	0.27 $\pm$ 0.02
Bicyclogermacrene	1508	1507	1484-1532	1.07 $\pm$ 0.06
δ -Cadinene	1529	1522	1486-1563	0.09 $\pm$ 0.01
Unknown	1592	-	-	0.04 $\pm$ 0.01
Spathulenol	1594	1582	1548-1622	0.24 $\pm$ 0.03
Aromadendrane-4,1-diol	1603	*ND	-	0.06 $\pm$ 0.00
Unknown	1652	-	-	0.03 $\pm$ 0.01
<i>r</i> -Cadinol	1660	1640	1635-1665 ^d	0.05 $\pm$ 0.01
α -Cadinol	1675	1653	1632-1673 ^d	0.06 $\pm$ 0.01
Unknown	1681	-	-	0.02 $\pm$ 0.01

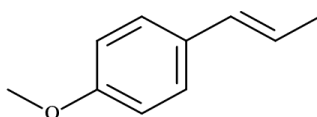
tr: Retention time, Exp.-RI^a: Retention indices from analysis, Ref.-RI^b: Retention indices from the references with similar column analysis, Ref.-RI^c: Retention indices data references on non-polar column from NIST chemistry webbook (www.webbook.nist.gov) [23], ^d[24], *ND: Not detected.

1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาของ Chemical Profiling Revealed a Dominant Compound *trans*-Anethole and Biological Evaluation of an Edible Plant *Clausena harmandiana* Containing Essential Oil โดย Nichakan และคณะ^[5] พบว่าต้นสอ่งฟ้า เมื่อนำใบสอ่งฟ้ามาสกัดจะพบสารสำคัญ ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา สารสำคัญแต่ละชนิดที่พบมีปริมาณที่แตกต่างกัน ในใบสอ่งฟ้าพบว่ามีปริมาณสารประกอบ *trans*-anethole อยู่มาก ซึ่งสารประกอบ *trans*-anethole จัดอยู่ในกลุ่ม

phenylpropanoids มีบทบาทสำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดย anethole ช่วยในการเพิ่ม oxidative stress-dependent ภายในเซลล์ ทำให้เพิ่มการ apoptosis ของเชื้อแบคทีเรียในผู้ป่วยที่มี การติดเชื้อเรื้อรังได้ จากโครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยที่มีลักษณะเป็น lipophilic และ hydrophobic ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับ fungal membrane จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อรา นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้ายังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลาย collagen จึงมีส่วนช่วยในการฟื้นฟูบาดแผลให้หายเร็วขึ้น ซึ่งทำให้ไม่พัฒนาต่อไปเป็นแผลเรื้อรัง

1.2.1 สาร anethole ^[6]



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของสาร anethole

สารกลุ่ม anethole เป็นสารประกอบอินทรีย์ สามารถพบได้ในพืชวงศ์ Apiaceae, Myrtaceae, Fabaceae และ Illiciaceae ตามธรรมชาติจะพบได้ในน้ำมันหอมระเหยบางชนิด มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{10}H_{12}O$ มีลักษณะเป็นของแข็งอยู่ในรูปผลึกที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีรสหวาน สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งรสชาติ เป็นยาขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ลดอาการปวดเกร็งช่องท้อง ลดสารคัดหลั่ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย บรรเทาอาการปวด ต้านการอักเสบ เป็นยาฆ่าพยาธิ และยาฆ่าแมลง

2. แผลเรื้อรัง (Chronic wound) ^[7,8]

หมายถึง แผลที่หายยากหรือหายช้ากว่าระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากขบวนการหายของแผลถูกขัดขวาง จึงไม่สามารถดำเนินไปตามขั้นตอนปกติที่บาดแผลธรรมดาควรจะหายได้ และส่วนใหญ่บาดแผลใดไม่สามารถหายได้นานเกินกว่า 3-4 เดือน จะเรียกบาดแผลนี้ว่า แผลเรื้อรัง ซึ่งแผลเรื้อรังมักพบใน ผู้สูงอายุหรือวัยกลางคน เช่น แผลเบาหวานที่นิ้วเท้า ฝ่าเท้า หรือแผลกดทับ

2.1 ขั้นตอนการหายของแผล (Phase of wound healing) ในคนปกติที่แข็งแรง เวลาเกิดบาดแผล (มีการบาดเจ็บต่อผิวหนังถึงชั้น dermis) จะมีกลไกการหายของแผลเกิดขึ้นได้เอง โดยธรรมชาติดังนี้

2.1.1 Phase of coagulation เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้น จะมีการฉีกขาดของเส้นเลือดทำให้เกิด bleeding ร่างกายจะมีปฏิกิริยาต่อเส้นเลือดทำให้เกิด vasoconstriction และมี platelet aggregation ซึ่งเกิดขึ้น ได้โดยอาศัย chemical substance จาก cell ที่เกิด injury เป็นตัวกระตุ้น นำไปสู่การเกิด blood clot (Coagulation cascade)

2.1.2 Inflammatory Phase เริ่มเกิดขึ้นภายใน 10-30 นาที หลังจากเกิดบาดแผล ซึ่งจะมีการเกิด vasodilation, increased capillary permeability, Complement Activation, White Blood Cell (PMN, Monocyte) Migration ทำให้เกิดอาการ ปวด บวม แดง ร้อน ที่บริเวณ แผล

2.1.3 Proliferation Phase บาดแผลจะมีการเกิด granulation tissue, angiogenesis, wound contracture และ epithelization ซึ่งจะมี cell ต่าง ๆ เข้ามาแทนที่ inflammatory cell เกิดกระบวนการสร้าง collagen และในทุกกระบวนการของ wound healing จะหลั่ง สารพวก transforming growth factor มากกระตุ้น endothelial cell มีการสร้างเส้นเลือด ใหม่ การเกิด wound contraction fibroblast นอกจากจะสร้าง collagen และ extracellular matrix อื่น ๆ แล้ว (fibronectin, proteoglycan) ยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด wound contracture โดยตัวมันเองจะเคลื่อนไปที่ขอบของแผล และเปลี่ยนเป็น myofibroblast ซึ่งทำหน้าที่ดึงขอบแผลเข้าหากัน ในแผลที่ปล่อยให้หายเอง

2.1.4 Remodelling Phase หรือ Maturation Phase เป็นระยะสุดท้ายของกระบวนการ wound healing ซึ่งจะเริ่มประมาณ 20 วัน หลังการเกิดบาดแผล และดำเนินต่อไปได้ตั้งแต่หลายเดือนไปจนถึงหลายปีขึ้นอยู่กับบาดแผลนั้น ๆ เช่น ตำแหน่ง, ระยะเวลา การหายของแผล, ความรุนแรงของบาดแผล ระยะนี้แผลจะมีความแข็งแรงขึ้น (Increase Tensile Strength) โดยมีการเกิด collagen cross link และ มีการลดจำนวน cell ต่าง ๆ ของบาดแผลลง (Decreasing Cellularity)

ซึ่งช่วงนี้แผลเป็น (Scar) จะมี blood supply ลดลงและมีการสร้าง collagen ลดลง

3. เชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในแผลเรื้อรัง^[9] มีหลายชนิด ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในแผลเรื้อรัง

เชื้อที่พบในแผลเรื้อรัง	
<i>E. Coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Proteus</i>	MRSA

โดยบาดแผลเรื้อรังจะมีค่า pH ของแผลอยู่ที่ 7.2 อ้างอิงจากงานวิจัยเรื่อง Elevated wound fluid pH correlates with increased risk of wound infection โดย Daniel G. Metcalf และคณะ^[18]

4. ยาเตรียมเจล (Gels)^[10]

เป็นยาเตรียมรูปแบบกึ่งแข็งที่มีลักษณะเหมือนเจลลี่ เนื้อเจลเกิดจากการกระจายสารก่อเจลที่เป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ในปริมาณพอเหมาะลงในตัวทำละลาย ทำให้ได้ห้วงโซ่พอลิเมอร์ ในลักษณะร่างแหสามมิติในตัวทำละลายได้ความหนืดที่สูง และเป็นพันธะระหว่างพอลิเมอร์กับตัวทำละลายที่คงสภาพมาก เนื้อเจลที่ค่อนข้างโปร่งใส โดยตัวทำละลายส่วนใหญ่จะเป็นน้ำ แต่อาจเป็นแอลกอฮอล์หรือสารพวกโพลีออล (Polyol) และน้ำมันได้ โดยสารก่อเจลแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. สารก่อเจลชนิดธรรมชาติ เช่น Tragacanth, Xantangum
2. สารก่อเจลชนิดกึ่งสังเคราะห์ เช่น Hydroxyethyl cellulose, Hydroxymethyl cellulose
3. สารก่อเจลชนิดสังเคราะห์ เช่น Carbomer

5. Wound Spray Plaster

เป็นรูปแบบเภสัชภัณฑ์รูปแบบใหม่ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ซึ่งเป็นสารทางเภสัชที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะคล้ายฟิล์ม มีลักษณะใส คล้ายแผ่นพลาสติก มีความยืดหยุ่นสูง ติดผิวหนังได้นานขึ้น และตัวยายซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น ช่วยปกป้องบาดแผลจากเชื้อแบคทีเรียและสิ่งสกปรก จึงถือเป็นทางเลือกใหม่ที่จะช่วยให้ผู้ป่วยโรคสามารถใช้งานได้สะดวกขึ้น

6. โพลิเมอร์ที่ใช้ในสูตรตำรับ

ตำรับยาเจล

Polymer	Properties
Aristoflex® avc	● Synthetic polymer used as gelling agent for aqueous systems and as texturizer, thickener for oil-in-water emulsions ● pH value 4.0 - 6.0 (1% in dist. water) ● Pre-neutralized and does not need to be pH adjusted ● Soluble in water, gel formation (68 °F / 20 °C), dispersible in fat

ตำรับ Film-forming spray

Polymer	Properties
PVP K30	● Soluble in water and organic solvent ● PVP K30 forms hard glossy transparent films and has adhesive, cohesive and dispersive properties. ● High polarity ● pH = 6.0-9.0

	● Film Density (g/cc) 1.207
Ethyl cellulose	● Insoluble in water and soluble in many organic solvents ● pH value is within the range of 2-12 ● Forms films of good thermostability and excellent flexibility and toughness.

7. หลักการทำงานของเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

UV-VIS Spectrophotometer



รูปที่ 3 เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

หลักการทำงาน

UV-VIS Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วงUltra violet (UV) และVisible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm

โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ใน ตัวอย่าง เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิด ที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1. แหล่งกำเนิดแสง

แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง

2. Monochromator

ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์(กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

3. เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง

เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา ใช้ได้เฉพาะช่วง visible และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วง uv และ visible

4. Detector

ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็น พลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง

คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้
เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์
(photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon
diode detector)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) โดยทำการทดลองหาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า และพัฒนาสูตรตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและเจลฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า

2. ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาข้อมูลทั่วไปของต้นสอ่งฟ้า ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากต้นสอ่งฟ้าโดยใช้วิธีการทดสอบเชื้อเพื่อหาค่า MIC, MBC จากนั้นพัฒนาสูตรตำรับยาพ่นฆ่าเชื้อและ เจลฆ่าเชื้อรวมทั้งประเมินคุณภาพและทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ

3. อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 Beaker

3.1.2 Mortar and pestle

3.1.3 Centrifuge tube

3.1.4 Test tube

3.1.5 Glass stirring rod

3.1.6 Pipette 1 ml

3.1.7 Pipette 5 ml

3.1.8 Petri dish

3.1.9 Micropipette 200 μ l

3.1.10 Micropipette 1000 μ l

3.1.11 Micropipette 5 ml

3.1.12 Inoculation loop

3.1.13 Alcohol Burner

3.2 เครื่องมือ

- 3.2.1 Incubator
- 3.2.2 UV-spectrophotometer
- 3.2.3 Laminar flow cabinet
- 3.2.4 Vortex
- 3.2.5 Balance
- 3.2.6 pH paper strips

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 Aristoflex avc
- 3.3.2 Propylene glycol
- 3.3.3 Propyl paraben
- 3.3.4 Methyl paraben
- 3.3.5 PVP-K30
- 3.3.6 Ethyl cellulose
- 3.3.7 Isopropyl alcohol
- 3.3.8 Distilled water

3.4 ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

- 3.4.1 *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin essential oil
- 3.4.2 Standard Anethole

4. เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

- 4.1 *Staphylococcus aureus*
- 4.2 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

5. วิธีดำเนินการศึกษา

5.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า

5.1.1 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) ด้วยวิธี Dilution test โดยทำในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเชื้อจากน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 7 ความเข้มข้น ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) คือ 0.25%, 0.125%, 0.0625, 0.03125, 0.0156%, 0.0078% และ 0.0039% มีหลอดควบคุม 3 หลอดดังนี้ หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (blank), หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเชื้อที่ใช้ทดสอบ, หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงหลังการบ่ม ซึ่งหากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ อาหารเลี้ยงเชื้อหลอดนั้นจะใสแสดงว่าไม่มีเชื้อเจริญเติบโต ในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจะเปลี่ยนเป็นขุ่น

5.1.2 หาค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration) โดยทำการทดสอบต่อหลังจากได้ผลของ MIC โดยทำการเลือกผลของ MIC นำหลอดทดลองที่ใสมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยผลของเชื้อที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC

5.2 การเตรียมสูตรตำรับยาฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า

5.2.1 Topical antiseptic clear gel

ตารางที่ 3 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับเจล

สูตรตำรับที่ 1

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	สูตร1	สูตร2	สูตร3	สูตร4
น้ำมันหอมระเหย จากใบส่องฟ้า (%w/w)	Antiseptic	0.24	0.24	0.24	0.24
Aritoflex avc (%w/w)	Gelling agent	0.5	0.75	1	2
Propylene glycol (%w/w)	Humectant	5	5	5	5
Conc.paraben (%w/w)	Preservative	1	1	1	1
Purified water	Solvent	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

เตรียมตำรับเจลฆ่าเชื้อ โดยใช้สารก่อเจล คือ Aristoflex avc ทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารก่อเจล ที่ให้คุณลักษณะ ของยาพื้นที่เหมาะสม เช่น ความหนืด ความยากง่ายในการทำ รวมถึงการเกิดปื้นขาว หลังจากนั้นเมื่อได้สูตรตำรับที่เหมาะสม จะทำการเติมน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า 250 μ l ลงไปในตำรับ

5.2.2 Topical antiseptic spray

ตารางที่ 4 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับสเปรย์

สูตรตำรับที่ 2

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	สูตร1	สูตร2	สูตร3
น้ำมันหอมระเหย จากใบส่องฟ้า (%w/w)	Antiseptic	0.24	0.24	0.24

Ethyl cellulose (%w/w)	Film-forming agent	5	10	20
Conc.paraben (%w/w)	Preservative	1	1	1
Isopropyl alcohol	Solvent	q.s.	q.s.	q.s.

สูตรตำรับที่ 3

ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	สูตร1	สูตร2	สูตร3
น้ำมันหอมระเหย จากใบสอ่งฟ้า (%w/w)	Antiseptic	0.24	0.24	0.24
PVP-K30 (%w/w)	Film-forming agent	5	10	20
Conc.paraben (%w/w)	Preservative	1	1	1
Isopropyl alcohol	Solvent	q.s.	q.s.	q.s.

สเปรย์พ่นแผลเป็นรูปแบบยาที่มีข้อดี คือ สามารถใช้กับแผลเปิดโดยไม่ต้องใช้มือสัมผัสกับแผล เมื่อพ่นน้ำยาลงไปบนแผลตัวทำละลายจะระเหยและเกิดเป็นฟิล์มเคลือบบนแผลไว้ในการศึกษานี้จะใช้สารก่อฟิล์มในกลุ่ม PVP-K30 และ Ethyl cellulose จากนั้นเติม Isopropyl alcohol เพื่อละลาย polymer และทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของตำรับ การเกิดฟิล์มหลังพ่นลงบนผิวหนัง รวมถึงความยืดหยุ่นของฟิล์มหลังฟิล์มแห้ง เมื่อได้สูตรตำรับที่เหมาะสมทำการเติมน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 250 μ l ลงไปในตำรับ

5.3 การวิเคราะห์หาสาระสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบส่่งฟ้าด้วยวิธี

UV-spectrophotometer

5.3.1 หา $\lambda_{\max}$ ของสาร standard anethole โดยปิเปต anethole 1 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย Isopropyl alcohol และนำมาเจือจาง 5 ml ปรับปริมาตรด้วย Isopropyl alcohol 25 ml จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาความยาวคลื่นที่มากที่สุด โดยสแกนความยาวคลื่น 200 – 700 nm ($\lambda_{\max}$ 255 nm)

5.3.2 สร้าง standard curve ของ anethole เตรียม stock solution โดยปิเปต anethole 5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย Isopropyl alcohol จากนั้นแบ่ง stock solution มาเจือจางเป็น 5 ความเข้มข้น คือ 100, 125, 150, 175 และ 200 μl ใน Isopropyl alcohol 25 ml จากนั้น นำสารละลายที่เตรียมได้ 5 ความเข้มข้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer โดยสแกนที่ความยาวคลื่น 255 nm และนำค่าที่ได้ทั้ง 5 ค่าไปสร้างกราฟ standard curve ของ anethole

5.3.3 เตรียม stock solution โดยปิเปตน้ำมันหอมระเหยจากใบส่่งฟ้า 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Isopropyl alcohol จนครบ 50 ml

5.3.4 เจือจางน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 0.004 ml/ml โดยปิเปต stock solution มา 5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml ด้วย Isopropyl alcohol

5.3.5 นำน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ anethole ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer โดยสแกนที่ความยาวคลื่น 255 nm ทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง

5.3.6 คำนวณหาปริมาณสาร anethole ในน้ำมันหอมระเหยจากใบส่่งฟ้า เปรียบเทียบกับ standard anethol

5.4 วิเคราะห์ปริมาณ anethole ในตำรับยาเจลและสเปรย์ ด้วยวิธี

UV-spectrophotometer

5.4.1 เตรียม Stock solution ของตำรับทั้ง 3 โดยชั่งตำรับเจลดมา 5 g ปรับมาตรฐานให้ครบ 50 ml ด้วย Isopropyl alcohol และปิเปตตำรับสเปรย์มาตำรับละ 5 mL ปรับมาตรฐานให้ครบ 50 ml ด้วย Isopropyl alcohol

5.4.2 เจือจาง Stock solution ของทั้ง 3 ตำรับให้มีความเข้มข้น 0.006 g/ml และ 0.006 ml/ml (เลือกความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง stand curve ของ anethole) โดยปิเปต Stock solution มาตำรับละ 1500 μ l ปรับปริมาตรด้วย Isopropyl alcohol จนครบ 25 ml

5.4.3 จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่เหมาะสม ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer โดยแสกนที่ความยาวคลื่น 255 nm ทำการวัดทั้งหมด 3 ซ้ำ

5.4.4 นำค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ anethole ในตำรับยาเจลดและยาพ่นฆ่าเชื้อ

5.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของตำรับยาเจลดและสเปรย์

นำตำรับยาที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้ามาทำการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับโดยนำตำรับดังกล่าวมาทดสอบดังนี้

5.5.1 ทำการศึกษาโดยนำตำรับยา

และเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าหลอดทดลองใสแสดงว่าตำรับยา

มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

5.5.2 ทำการศึกษาต่อจากหลอดทดลองที่ใส นำหลอดทดลองที่ใสไม่มีเชื้อขึ้น

ไปเพาะเชื้อลงบน agar disc จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงถ้า agar disc

ไม่มีโคโลนีเชื้อขึ้นแสดงว่าตำรับยาที่ทดสอบมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่ทดสอบได้จริง

5.6 ทดสอบความเป็นกรด-เบส ของตำรับ

5.6.1 วัดค่า pH ของตำรับด้วย กระดาษ pH paper

5.6.2 บันทึกผลค่า pH ที่วัดได้ของแต่ละตำรับ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ส่องฟ้าเป็นสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น ได้แก่ ทางภาคเหนือ และภาคอีสาน จากการศึกษาพบว่ามิถุธิฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา[5] ในการศึกษาวิจัยนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์ ต่ำรับเจล และต่ำรับสเปรย์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย จากส่องฟ้าเพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถฆ่าเชื้อได้

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากส่องฟ้า

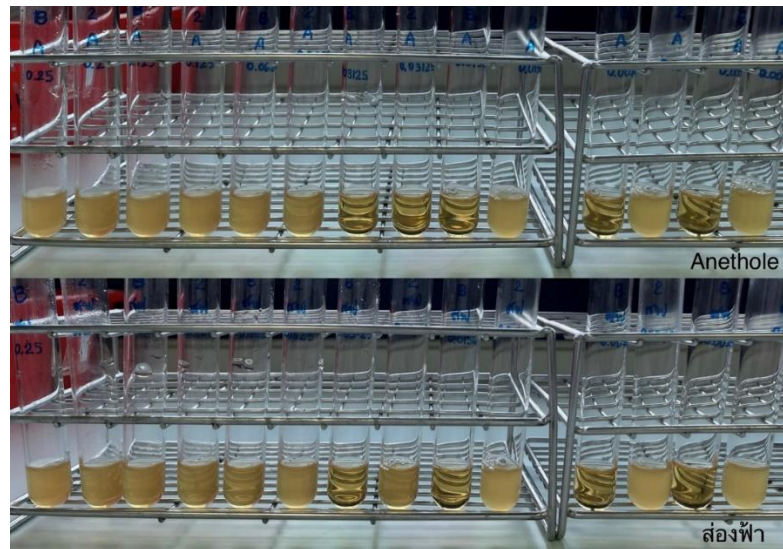
จากการทดสอบการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (หาค่า MIC) ด้วยวิธี Broth-dilution method โดยทำในหลอด ทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเชื้อจากน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้นที่แตก ต่างกัน 7 ความเข้มข้น ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) คือ 0.25 $\mu\text{L/ml}$, 0.125 $\mu\text{L/ml}$, 0.0625 $\mu\text{L/ml}$, 0.03125 $\mu\text{L/ml}$, 0.0156 $\mu\text{L/ml}$, 0.0078 $\mu\text{L/ml}$ และ 0.0039 $\mu\text{L/ml}$ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยทำการทดสอบต่อหลังจากได้ผลของ MIC โดยเลือกผล ของ MIC และหลอดที่ใสมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC 0.03125 $\mu\text{L/ml}$ และมีค่า MBC 0.0625 $\mu\text{L/ml}$ โดยใช้ ความเข้มข้นเท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบกับ standard anethole อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยมีค่า MIC 0.0625 $\mu\text{L/ml}$ และมีค่า MBC 0.125 $\mu\text{L/ml}$ ตามลำดับ จากข้อมูลนี้จะเห็นได้ว่าได้น้ำมันหอมระเหย จากใบส่องฟ้าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า MRSA จากนั้นทำการคำนวณปริมาณน้ำมัน หอมระเหยจากใบส่องฟ้าเพื่อใส่ในต่ำรับโดยคำนวณเป็น 20 เท่าของ MBC โดยอ้างอิงจากการศึกษา เรื่อง Therapeutic drug monitoring of antibiotics in critically ill patients โดย Dagmar Horn และคณะ[17] ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใส่ลงไปในต่ำรับเท่ากับ 2.5 $\mu\text{L/ml}$ เพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อในต่ำรับผลิตภัณฑ์เจล และสเปรย์ต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า และสาร standard anethole

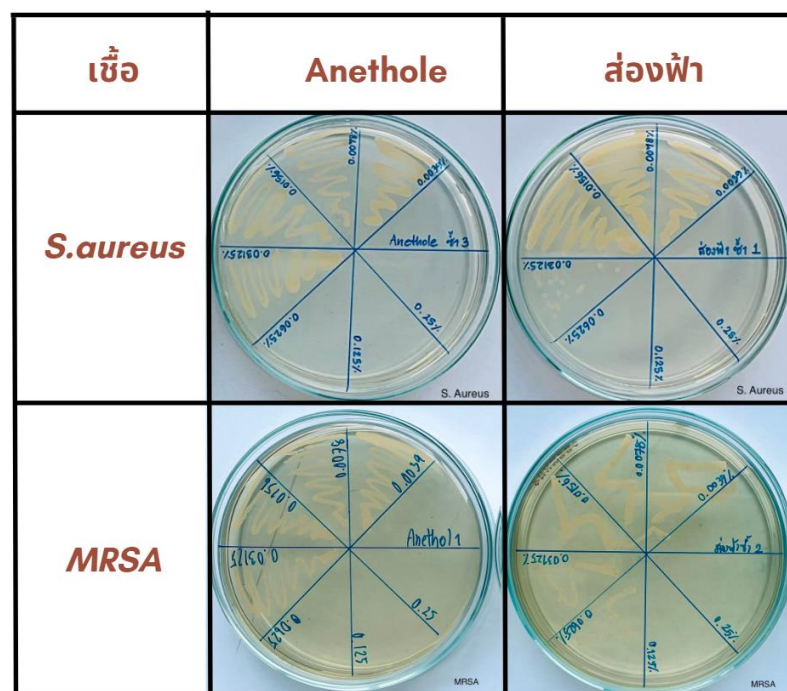
ชนิดของเชื้อ	น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า		Standard anethole		Controls
	MIC ($\mu\text{L/ml}$)	MBC ($\mu\text{L/ml}$)	MIC ($\mu\text{L/ml}$)	MBC ($\mu\text{L/ml}$)	Amoxicillin (5 $\mu\text{g/ml}$)
<i>S.aureus</i>	0.03125	0.0625	0.03125	0.0625	สามารถยับยั้งเชื้อได้
MRSA	0.0625	0.125	0.03125	0.0625	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้



รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้าโดยใช้วิธี Dilution test ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ความเข้มข้น คือ 0.25%, 0.125%, 0.0625, 0.03125, 0.0156%, 0.0078% และ 0.0039% เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ



รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสื่องฟ้าโดยใช้วิธี Dilution test ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ความเข้มข้น คือ 0.25%, 0.125%, 0.0625, 0.03125, 0.0156%, 0.0078% และ 0.0039% เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ

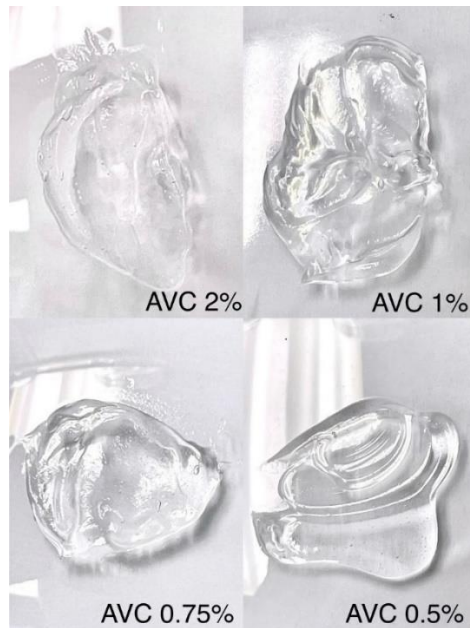


รูปที่ 6 แสดงผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ของสาร standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากสื่องฟ้า

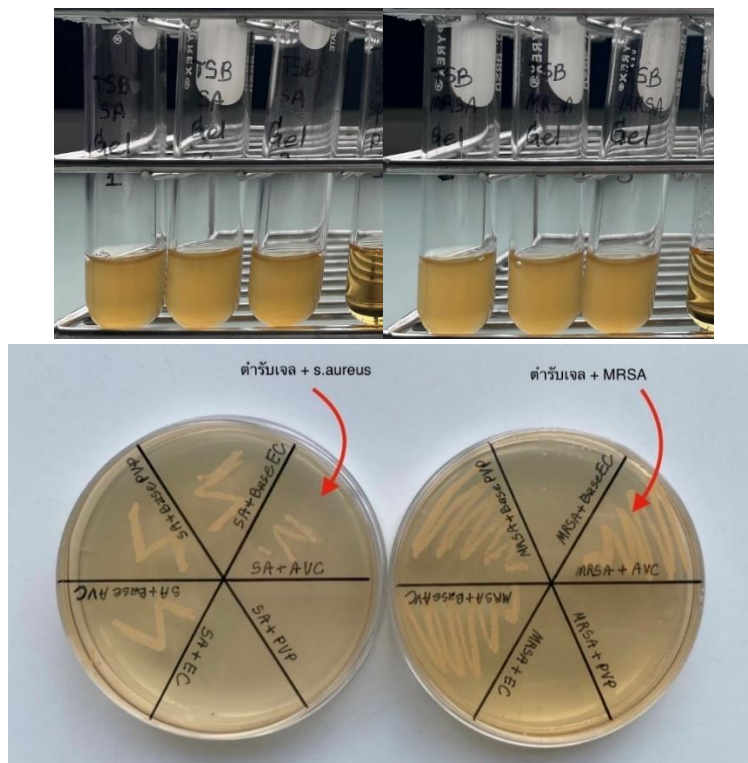
2. ตำรับเจลผสมสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส่่องฟ้าและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อของตำรับ

จากการตั้งตำรับเจลผสมน้ำมันหอมระเหยจากส่่องฟ้า โดยมี Aristoflex avc เป็นสารก่อเจลโดยใช้ความเข้มข้นที่ 2%, 1%, 0.75% และ 0.5% ของตำรับ พบว่า เนื้อเจลมีความหนืดที่ลดลงตามลำดับ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สุดในการนำมา เตรียมตำรับคือ 0.75% เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอกพบว่าเนื้อเจลที่ได้มีลักษณะใส มีความหนืดพอเหมาะ เมื่อทาลงบนผิวให้ความรู้สึกเย็น ชื่นลงสู่ผิวหนังได้เร็วโดยไม่ทิ้งความ เหนอะหนะไว้ ตำรับมีความคงตัวดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ไม่เกิดการแยกชั้นของตำรับเจล

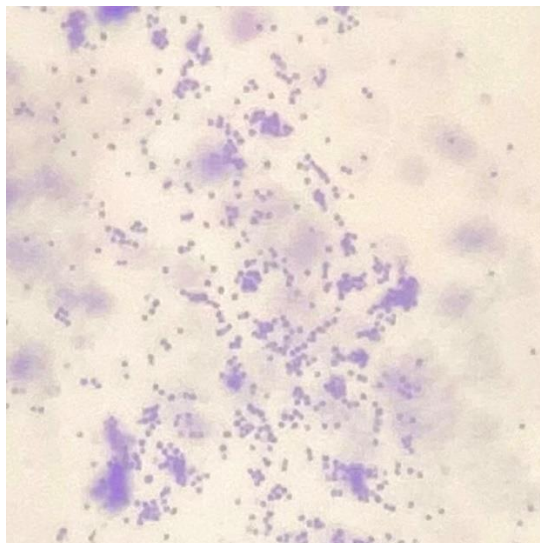
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากใบส่่องฟ้าพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใส่ลงไปในตำรับเท่ากับ $2.5 \mu\text{L/ml}$ เมื่อเตรียมตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจากใบส่่องฟ้าตามความเข้มข้นที่คำนวณได้แล้วจึงนำตำรับที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อโดยเติมตำรับรับลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้ออยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลที่ได้ คือ อาหารในหลอดทดลอง เปลี่ยนเป็นสีขุ่น เมื่อนำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อที่ขึ้นมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับ control ซึ่งไม่ได้เติมตำรับ และจากการนำเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาย้อมสีด้วย crystal violet เพื่อสังเกตลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าตรงกับลักษณะของเชื้อที่นำมาทดสอบ จึงสรุปได้ว่าตำรับสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้แต่ไม่สามารถ ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของเนื้อเจลที่เตรียมโดยมี Aristoflex avc เป็นสารก่อก่อเจลโดยใช้ความเข้มข้นที่ 2%, 1%, 0.75% และ 0.5% ของตำรับ



รูปที่ 9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ Methicillin-resistant *S. aureus* ของตำรับเจลผสมสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า



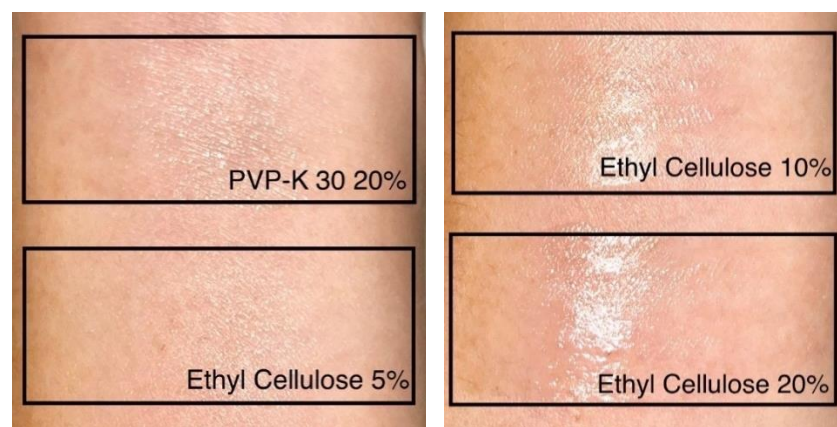
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet

3. ตำรับสเปรย์ผสมน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้าและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ และฆ่าเชื้อของตำรับ

จากการตั้งตำรับสเปรย์ผสมน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า โดยใช้ PVP-K30 และ Ethyl cellulose เป็นสารก่อฟิล์มโดยใช้ความเข้มข้นที่ 20%, 10% และ 5% ของตำรับ โดยมี isopropyl alcohol เป็นตัวทำละลาย พบว่าเนื้อฟิล์มที่ได้มีความเหนียว และมีความยืดหยุ่นที่ลดลงตามลำดับ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเตรียมตำรับโดยใช้ PVP-K30 คือ 20% เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอกพบว่าสเปรย์มีสีเหลืองอ่อนใส เมื่อสเปรย์ลงบนผิวแล้วแห้งเร็ว เนื้อฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส บาง มีความยืดหยุ่นพอเหมาะ เมื่อขยี้บรู้สึกตึงผิว(จากการทดสอบโดยใช้ความรู้สึกของผู้ทำการวิจัย) ไม่สามารถกันน้ำได้และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในการนำมาเตรียมตำรับโดยใช้ Ethyl cellulose คือ 5% เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอกพบว่าสเปรย์มีสีขาวขุ่น เมื่อสเปรย์ลงบนผิวแล้วแห้งเร็ว เนื้อฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส หนากว่าเนื้อฟิล์มที่ได้จาก PVP-K30 มีความยืดหยุ่นพอเหมาะ เมื่อขยี้บรู้สึกตึงผิวเล็กน้อย สามารถกันน้ำได้ ตำรับทั้งสองมีความคงตัวดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ไม่เกิดการแยกชั้นของตำรับ

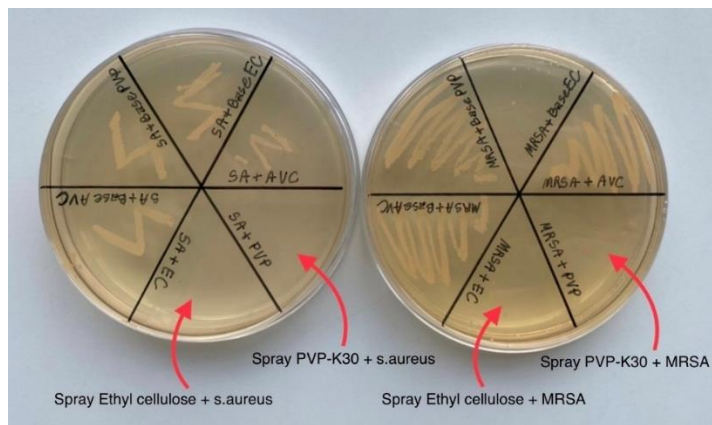
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใส่ลงไปในตำรับเท่ากับ $2.5 \mu\text{L/ml}$ เมื่อเตรียมตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าตามความเข้มข้นที่คำนวณได้แล้วจึงนำตำรับที่ได้มาทดสอบ

สอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อ โดยเติมตำรับรับลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้ออยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลที่ได้ คือ อาหารในหลอดทดลองเป็นสีใสในตำรับที่ใช้ PVP-K30 และเป็นสีขุ่นในตำรับที่ใช้ Ethyl cellulose เนื่องจากสีของตำรับ เมื่อนำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าตำรับสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้และสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด ไม่พบเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของฟิล์มที่ได้จากตำรับสเปรย์ซึ่งใช้สารก่อฟิล์มเป็น PVP-K30 และ Ethyl cellulose โดยใช้ความเข้มข้นที่ 20%, 10% และ 5% ของตำรับ



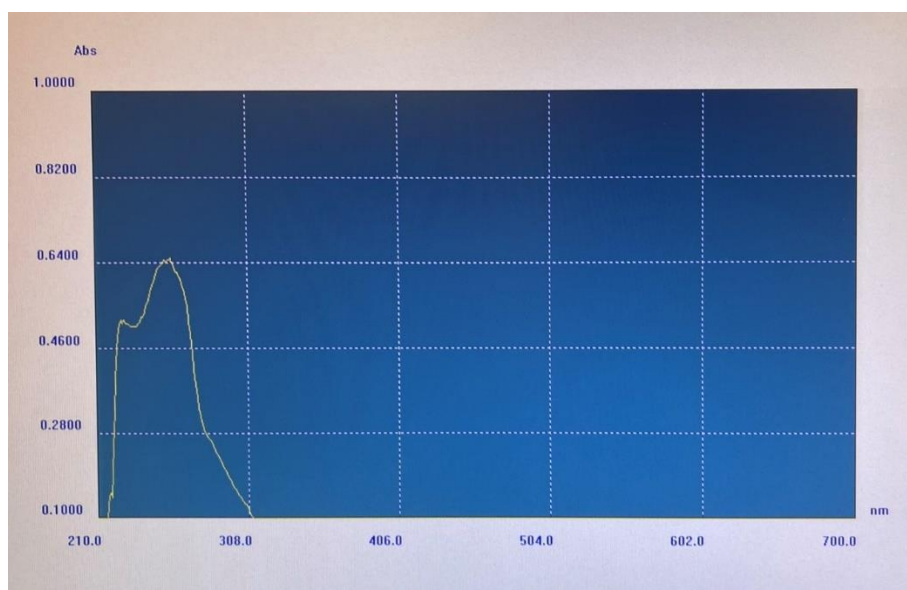


ภาพที่ 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และMethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ของตำรับสเปรย์ผสมสารสกัดน้ำมันหอมระเหย จากใบสอ่งฟ้า

4. การวิเคราะห์หาสารสำคัญ anethole ในสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าและในตำรับยาเจลและสเปรย์ ด้วยวิธี UV-spectrophotometer

ปกติการวิเคราะห์หาปริมาณ anethole จะใช้วิธี Gas Chromatography แต่ทางผู้วิจัยได้สนใจที่จะเปลี่ยนมาใช้ UV-spectrophotometer เนื่องจากมีความสะดวก ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า และสาร anethole ยังมี chromophore ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วย UV ได้ ซึ่งจากการศึกษาเรื่อง Analysis of Eugenol content in ethanolic extract of galangal rhizome (*Alpinia galanga* L. Willd) ointment using UV-VIS spectrophotometry method ของ Yugatama A และคณะ และจากการศึกษาเรื่อง Development and Validation of UV-Vis Spectrophotometric Method for Estimation of Black Seeds and Peppermint Oil in Emulsion ของ Azad AK และคณะ ที่พยายามพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารสำคัญในน้ำมันระเหย ด้วยวิธี UV-spectrophotometer

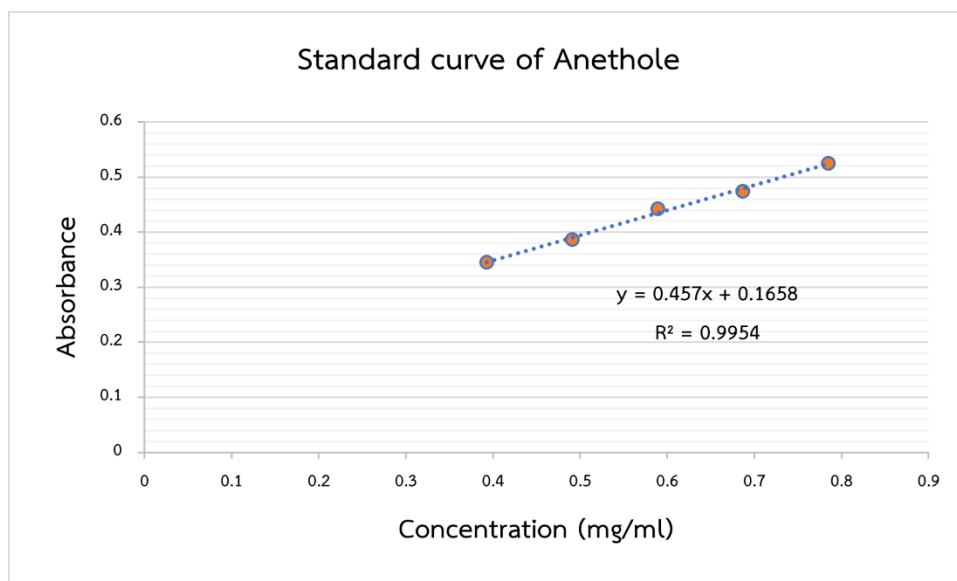
ทำการวัดหาค่า λ_{max} ของสาร standard anethole พบว่า มีค่า 255 nm



ภาพที่ 13 แสดงความยาวคลื่นของ standard anethole

ตารางที่ 6 แสดงค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 255 nm ของ anethole ที่วัดได้ ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

Concentration (mg/ml)	Absorbance (nm)
0.3926	0.3452
0.4908	0.3869
0.5889	0.4424
0.6871	0.4746
0.7852	0.5256



ภาพที่ 14 แสดงกราฟ Standard curve ของ Anethole

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักของ Standard anethole และน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้าปริมาตร 1 ml

สาร	ปริมาตร (ml)	น้ำหนัก (g)
standard anethole	1	0.9749
สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า	1	0.9815

ตารางที่ 8 แสดงค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 255 nm ปริมาณ anethole และ% anethole ที่หาได้ของน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้าความเข้มข้น 0.004 ml/ml ดำรับเจลดความเข้มข้น 0.006 mg/ml และสเปรย์ความเข้มข้น 0.006 ml/ml

สาร	ครั้งที่	Abs (nm)	ปริมาณ anethole (mg)	% anethole
น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า ความเข้มข้น 0.004 ml/ml	1	0.65240	266.2	
	2	0.63246	255.275	
	3	0.64767	263.6	
	เฉลี่ย		261.6917	26.84 %
ตำรับยาเจลสูตรที่ 1 ความเข้มข้น 0.006 mg/ml	1	0.51522	637.1667	
	2	0.50808	624.0833	
	3	0.51454	635.9167	
	เฉลี่ย		632.3889	12.65 %w/v
ตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 (Ethyl cellulose เป็นสาร ก่อฟิล์ม) ความเข้มข้น 0.006 ml/ml	1	0.67665	931.5	
	2	0.67654	931.3333	
	3	0.68466	946.1667	
	เฉลี่ย		936.3333	18.73 %v/v
ตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 (PVP-K30 เป็นสารก่อกฟิล์ม) ความเข้มข้น 0.006 ml/ml	1	0.73675	1,041.0833	
	2	0.74164	1,050	
	3	0.73861	1,044.5	
	เฉลี่ย		1046.8611	20.94 %v/v

เมื่อนำค่า Absorbance ที่วัดได้ทั้ง 3 เข้าไปแทนค่าในสมการ $y = 0.457x + 0.165$

ที่ได้จากกราฟ standard curve ของ anethole คำนวณหาปริมาณ anethole

โดยเทียบความเข้มข้นย้อนกลับ พบว่า

น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า มี anethole คิดเป็น 26.84 %

ตำรับเจลสูตรที่ 1 ความเข้มข้น 0.006 mg/ml มี anethole คิดเป็น 12.65 % w/v

ตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 ความเข้มข้น 0.006 ml/ml มี anethole คิดเป็น 18.73 %v/v

ตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 ความเข้มข้น 0.006 ml/ml มี anethole คิดเป็น 20.94 %v/v

5. ทดสอบความเป็นกรด-เบส ของตำรับ

ตารางที่ 9 แสดงผลความเป็นกรด-เบส ของตำรับ

ตำรับ	ค่า pH	pH paper
เจลสูตรที่ 1	5	
Blank เจลสูตรที่ 1	5	
สเปรย์สูตรที่ 2 Ethyl cellulose	4	
Blank สเปรย์สูตรที่ 2 (Ethyl cellulose)	4	

สเปรย์ สูตรที่ 3 (PVP-K30)	4	
Blank สเปรย์ สูตรที่ 3 (PVP-K30)	4	

จากผลการทดลองพบว่า ตำรับยาเจลมีค่า pH เป็น 5 และตำรับยาสเปรย์ทั้ง 2 สูตร มีค่า pH เป็น 4 ดังนั้นตำรับทั้ง 3 ตำรับมีคุณสมบัติเป็นกรด

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดได้จากใบสอ่งฟ้า ด้วยวิธี Dilution test โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบคือ *S. aureus* และ MRSA พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 0.03125 $\mu\text{L/ml}$ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 0.0625 $\mu\text{L/ml}$ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA โดยมีความเข้มข้นต่ำสุด 0.0625 $\mu\text{L/ml}$ และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 0.125 $\mu\text{L/ml}$ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้จริง และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า MRSA

จากการพัฒนาสูตรตำรับยาสำหรับใช้กับแผลติดเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้าเป็นสารออกฤทธิ์ สามารถพัฒนาสูตรตำรับยาได้เป็น 2 รูปแบบคือ ตำรับเจลผสมน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า และ ตำรับสเปรย์ผสมน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า สำหรับการพัฒนาดำรับเจล เตรียมตำรับโดยใช้ Aristoflex avc เป็นสารก่อเจล และทดสอบด้วยความเข้มข้นของสารก่อเจลที่เหมาะสม โดยทดสอบความเข้มข้นที่ 2%, 1%, 0.75% และ 0.5% ของตำรับ พบว่าความเข้มข้นของสารก่อเจลที่เหมาะสมคือ 0.75% ของตำรับ จะทำให้ตำรับมีลักษณะเนื้อเจลใส มีความหนืดที่เหมาะสม ชี้นำสู่ผิวหนังได้รวดเร็วและตำรับมีความคงตัวที่ดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ไม่เกิดการแยกชั้น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับเจลโดยจะใช้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 20 เท่าของค่า MBC คือ 2.5 $\mu\text{L/ml}$ พบว่าเชื้อยังมีการเจริญเติบโตแต่มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับ control ในการพัฒนาดำรับสเปรย์ผสมน้ำมันหอมระเหยจากสอ่งฟ้า เป็นรูปแบบยาที่สามารถใช้กับแผลเปิด โดยไม่ต้องใช้มือสัมผัสกับแผล เมื่อพ่นน้ำยาลงไปบนแผลตัวทำละลายจะระเหยและเกิดเป็นฟิล์มเคลือบบนแผล ในงานวิจัยนี้จะศึกษาความสามารถของ polymer ที่ใช้เป็น Film-forming agent โดยใช้ PVP-K30 และ Ethyl cellulose เป็นสารก่อฟิล์ม ศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 20%, 10% และ 5% ของตำรับ และมี isopropyl alcohol เป็นตัวทำละลาย พบว่าตำรับที่ใช้ PVP-K30 ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 20% ของตำรับทำให้ลักษณะสเปรย์ มีสีเหลืองอ่อนใส เมื่อสเปรย์ลงบนผิวแล้วแห้งเร็ว เนื้อฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส บาง มีความยืดหยุ่นพอเหมาะ ส่วนตำรับที่ใช้ Ethyl cellulose เป็นสารก่อฟิล์มความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 5% ของตำรับซึ่งทำให้ตำรับสเปรย์ มีสีขาวขุ่น เมื่อสเปรย์ลงบนผิวแล้วแห้งเร็ว เนื้อฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส หนากว่าเนื้อฟิล์มที่ได้จาก PVP-K30 มีความยืดหยุ่นพอเหมาะ เมื่อขยี้บรู๊สึกถึงผิวเล็กน้อย สามารถกันน้ำได้ และตำรับทั้งสองมีความคงตัวที่ดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ไม่เกิด

การแยกชั้นของตำรับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับสเปรย์โดยจะใช้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า 20 เท่าของค่า MBC คือ $2.5 \mu\text{L/ml}$ พบว่าตำรับสเปรย์ทั้งคู่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด ทั้งนี้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของตำรับอาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า และ isopropyl alcohol ทำให้ตำรับสเปรย์ที่เตรียมได้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเหนือกว่าตำรับเจลซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

จากการวิเคราะห์หาสาระสำคัญในสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส่องฟ้าด้วยวิธี UV-spectrophotometer พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบส่องฟ้า 100 g จะมี Anethole 26.84 g คิดเป็น 26.84 % เมื่อนำตำรับยามาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ anethole พบว่าตำรับยาเจลมีปริมาณสาร anethole คิดเป็น 12.65 % ของตำรับ ตำรับยาสเปรย์สูตร 2 มีปริมาณสาร anethole คิดเป็น 18.73 %w/v ของตำรับ และตำรับยาสเปรย์สูตรที่ 3 มีปริมาณสาร anethole คิดเป็น 20.94 %w/v ของตำรับ เนื่องจากผลการทดลองที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ค่าที่วัดได้อาจจะไม่จำเพาะเท่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography และทางผู้วิจัยได้ใช้ solvent เป็น isopropyl alcohol ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน ในอนาคตหากมีเวลาศึกษาเพิ่มเติม ผู้วิจัยอยากพัฒนาปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

และเมื่อนำตำรับยามาทดสอบคุณสมบัติความเป็นกรด-เบส โดยใช้กระดาษ pH พบว่า ตำรับยาเจลมีค่า pH เท่ากับ 5 มีคุณสมบัติเป็นกรด ส่วนตำรับยาสเปรย์ทั้งสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 มีค่า pH เท่ากับ 4 มีคุณสมบัติเป็นกรดเช่นเดียวกัน ซึ่งถ้านำตำรับไปทดลองใช้จริงอาจจะเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ ในอนาคตควรมานำสูตรตำรับไปพัฒนา ปรับค่า pH ให้ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เพื่อให้สามารถนำไปใช้กับผิวหนังได้โดยไม่เกิดการระคายเคือง

บรรณานุกรม

1. Queen D, Harding K. World Union of Wound Healing Societies Meeting, 2020. International wound journal. 2020;17(2):241.
2. นิธิมาสู่ประดิษฐ์ , สิตานันท์ พูลผลทรัพย์,รุ่งทิพย์ ขวนชื่น,ภูษิต ประคองสาย. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิค แอนด์ดีไซน์; 2015 [cited 2021 8 November].
3. Kubo I, Fujita Ki, Nihei Ki. Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008;88(2):242-7.
4. Wiart C. Lead compounds from medicinal plants for the treatment of cancer. Academic Press; 2012 Nov 5.
5. Peerakam N, Phoowiang P, Chansakaow S, Thongpoon C, Hadpech S. Chemical Profiling Revealed a Dominant Compound trans-Anethole and Biological Evaluation of an Edible Plant Clausena harmandiana Containing Essential Oil. Records of Natural Products. 2022;16(2):118-27.
6. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 637563, Anethole; [cited 2021 Nov. 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov /compound/Anethole>
7. สำโรวาท . WOUND HEALING AND WOUND CAREสาขาวิชาศัลยศาสตร์ตกแต่ง ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล [cited 2021 1 october]. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fmed.mahidol.ac.th%2Fsurgery%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fpublic%2Fpdf%2FWound%2520%2520Healing%2520abd%2520Wound%2520Care.pdf&cflen=1389888&chunk=true.

8. Barone EJ, Yager DR, Pozez AL, Olutoye OO, Crossland MC, Diegelmann RF, et al. Interleukin-1alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plastic and reconstructive surgery*. 1998;102(4):1023-7;
9. Steele A, Stacey HJ, de Soir S, Jones JD. The safety and efficacy of phage therapy for superficial bacterial infections: a systematic review. *Antibiotics*. 2020;9(11):754.
10. Orn Setthajindalert TP. Solvent exchanged in situ forming gel. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2012; 7:137-42.
11. Adriano J, Bresolin TM, Netz DJ, de Freitas RA, Couto A, G e. Development of a topical gel containing dried extract of *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2014;8(34):1074-80.
12. PONGWIRAT N, Sareedenchai V. DEVELOPMENT OF FILM SPRAY CONTAINING PLAI EXTRACT: Srinakharinwirot University; 2020.
13. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2017;12(6):487-97.
14. Munir M, Shah SNH, Almas U, Khan FA, Zaidi A, Bukhari SM, et al. An assessment of the wound healing potential of a herbal gel containing an *Azadirachta indica* leaf extract. *Veterinárni medicína*. 2021;66(3):99-109.
15. Fujita KI, Fujita T, Kubo I. Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2007 Jan;21(1):47-51.
16. Esfandyari-Manesh M, Ghaedi Z, Asemi M, Khanavi M, Manayi A, Jamalifar H, Atyabi F, Dinarvand R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *journal of pharmacy research*. 2013 Apr 1;7(4):290-5.

17. Horn D, Klaas C, Fobker M, Köck R, Lanckohr C. Therapeutic drug monitoring of antibiotics in critically ill patients. *Handbook of Analytical Separations*. 7: Elsevier; 2020. p. 169-83.
18. Metcalf DG, Haalboom M, Bowler PG, Gamerith C, Sigl E, Heinzle A, et al. Elevated wound fluid pH correlates with increased risk of wound infection. *Wound Medicine*. 2019;26(1):100166.
19. Yugatama A, Rohmani S, Apriliani R, editors. Analysis of Eugenol content in ethanolic extract of galangal rhizome (*Alpinia galanga* L. Willd) ointment using UV-VIS spectrophotometry method. 1st Muhammadiyah International Conference on Health and Pharmaceutical Development (MICH-PhD 2018); 2018.
20. Azad AK, Al-Mahmood SMA, Doolaanea AA. Development and Validation of UV-Vis Spectrophotometric Method for Estimation of Black Seeds and Peppermint Oil in Emulsion. *Analytical Chemistry Letters*. 2021;11(5):607-17.

ภาคผนวก

บรรจุภัณฑ์

ตำรับเจลสูตรที่ 1

FORMULATION

Clausena harmandiana (Pierre) Guillaumin extract	250 µl
Aritoflex avc	0.75 g
Propylene glycol	5 g
Conc.paraben	1 g
Purified water	q.s.

MANUFACTURED BY

BUU Faculty of Pharmaceutical Science
Bangsaen Road Tambon Saensuk Amphoe Muang Chonburi 20131

LOT NO. 791591 G27
EXP. 03/2024

Net Wt. 100g



Clausena
HARMANDIANA
(PIERRE) GUILLAUMIN
ANTISEPTIC
GEL

Indication

As an Antiseptic for treatment of skin lesion, cuts and infected wounds.

Net Wt. 100g

Direct of Use
Clean and dry the affected area.
Then apply the gel 3 times.

ตำรับสเปรย์สูตรที่ 2

FORMULATION

Clausena harmandiana (Pierre) Guillaumin extract	250 µl
Ethyl cellulose	5 g
Conc.paraben	1 g
Isopropyl alcohol	q.s.

MANUFACTURED BY

BUU Faculty of Pharmaceutical Science
Bangsaen Road Tambon Saensuk Amphoe Muang Chonburi 20131

LOT NO. 791591 G27
EXP. 03/2024

Net Wt. 100g



Clausena
HARMANDIANA
(PIERRE) GUILLAUMIN
ANTISEPTIC
SPRAY

Indication

As an Antiseptic for treatment of skin lesion, cuts and infected wounds.

Net Wt. 100g

Direct of Use
Clean and dry the affected area.
Then spray the solution 3 times.

ตำรับสเปรย์สูตรที่ 3

FORMULATION

Clausena harmandiana (Pierre) Guillaumin extract	250 µl
PVP-K30	20 g
Conc.paraben	1 g
Isopropyl alcohol	q.s.

MANUFACTURED BY

BUU Faculty of Pharmaceutical Science
Bangsaen Road Tambon Saensuk Amphoe Muang Chonburi 20131

LOT NO. 791591 G27
EXP. 03/2024

Net Wt. 100g



Clausena
HARMANDIANA
(PIERRE) GUILLAUMIN
ANTISEPTIC
SPRAY

Indication

As an Antiseptic for treatment of skin lesion, cuts and infected wounds.

Net Wt. 100g

Direct of Use
Clean and dry the affected area.
Then spray the solution 3 times.

วิธีการคำนวณหาปริมาณ anethole จาก Standard curve

1. คำนวณหาปริมาณ anethole ในน้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า ความเข้มข้น 0.004 ml/ml

1.1 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 1 ลงใน y

$$0.65240 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.0648 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.0648 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 26.62 mg

สารละลาย 5 ml มี anethole อยู่ 26.62 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 266.2 mg

ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 1 ml มี 266.2 mg

1.2 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 2 ลงใน y

$$0.63246 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.0211 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.0211 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 25.5275 mg

สารละลาย 5 ml มี anethole อยู่ 25.5275 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 135.5625 mg

ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 1 ml มี anethole 255.275 mg

1.3 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 3 ลงใน y

$$0.64767 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.0544 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.0544 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 26.36 mg

สารละลาย 5 ml มี anethole อยู่ 26.36 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 263.6 mg

ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 1 ml มี anethole 263.6 mg

นำปริมาณ anethole ที่หาได้ทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย

$$(266.2 + 255.275 + 263.6)/3 = 261.6917 \text{ mg}$$

ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 0.9749 g จะมี anethole 0.2617 g

น้ำมันหอมระเหยจากใบสอ่งฟ้า 100 g จะมี Anethole 26.8438 g คิดเป็น 26.8438 %

2. คำนวณหาปริมาณ anethole ในตำรับยาเจลสูตรที่ 1

2.1 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 1 ลงใน y

$$0.51522 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 0.7646 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 0.7646 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 19.115 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 19.115 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 637.1667 mg

ดังนั้น ในตำรับเจล 5 g มี anethole 637.1667 mg

2.2 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 2 ลงใน y

$$0.50808 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 0.7489 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 0.7489 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 18.7225 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 18.7225 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 624.0833 mg

ดังนั้น ในตำรับเจล 5 g มี anethole อยู่ 624.0833 mg

2.3 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 3 ลงใน y

$$0.51454 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 0.7631 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 0.7631 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 19.0775 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 19.0775 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 635.9167 mg

ดังนั้น ในตำรับเจล 5 g มี anethole 635.9167 mg

นำปริมาณ anethole ที่หาได้ทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย

$$(637.1667 + 624.0833 + 635.9167)/3 = 632.3889 \text{ mg}$$

ดังนั้น ตำรับยาเจล 5 g มี anethole 0.6324 g

ถ้าตำรับยาเจล 100 g มี anethole 12.648 g คิดเป็น 12.65 % w/v

3. คำนวณหาปริมาณ Anethole ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 (Ethyl cellulose เป็นสารก่อฟิล์ม)

3.1 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 1 ลงใน y

$$0.67665 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.1178 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.1178 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 27.945 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 27.945 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 931.5 mg

ดังนั้น ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 ปริมาณ 5 ml มี anethole 931.5 mg

3.2 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 2 ลงใน y

$$0.67654 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.1176 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.1176 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 27.94 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 27.94 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 931.3333 mg

ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 ปริมาณ 5 ml มี anethole 931.3333 mg

3.3 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 3 ลงใน y

$$0.68466 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.1354 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.1354 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 28.385 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 28.385 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 946.1667 mg

ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 2 ปริมาณ 5 ml มี Anethole 946.1667 mg

นำปริมาณ anethole ที่หาได้ทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย

$$(931.5 + 931.3333 + 946.1667)/3 = 936.3333 \text{ mg}$$

ดังนั้น ตำรับยาสเปรย์สูตรที่ 2 5 ml จะมี anethole 0.9363 g

ถ้าตำรับยาสเปรย์สูตรที่ 1 100 ml จะมี anethole 18.726 g คิดเป็น 18.73 %v/v

4. คำนวณหาปริมาณ anethole ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 (PVP-K30 เป็นสารก่อฟิล์ม)

4.1 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 1 ลงใน y

$$0.73675 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.2493 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.2493 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 31.2325 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 31.2325 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 1,041.0833 mg

ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 ปริมาณ 5 ml จะมี anethole 1,041.0833 mg

4.2 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 2 ลงใน y

$$0.74164 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.2600 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.2600 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 31.5 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 31.5 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 1,050 mg

ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 ปริมาณ 5 ml จะมี anethole 1,050 mg

4.3 จากสมการ $y = 0.457x + 0.1658$; แทนค่า Abs. ที่วัดได้ซ้ำที่ 3 ลงใน y

$$0.73861 = 0.457x + 0.1658$$

$$X = 1.2534 \text{ mg/ml}$$

คิดเทียบความเข้มข้นย้อนกลับก่อนเจือจาง

สารละลาย 1 ml มี anethole อยู่ 1.2534 mg

สารละลาย 25 ml มี anethole อยู่ 31.335 mg

สารละลาย 1500 μl มี anethole อยู่ 31.335 mg

ใน stock solution 50 ml มี anethole อยู่ 1,044.5 mg

ดังนั้น ในตำรับสเปรย์สูตรที่ 3 ปริมาณ 5 ml จะมี anethole 1,044.5 mg

นำปริมาณ anethole ที่หาได้ทั้ง 3 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย

$$(1,041.0833 + 1,050 + 1,044.5)/3 = 1046.8611 \text{ mg}$$

ดังนั้น ตำรับยาสเปรย์สูตรที่ 3 5 ml จะมี anethole 1.0468 g

ถ้าตำรับยาสเปรย์สูตรที่ 1 100 ml จะมี anethole 20.936 g คิดเป็น 20.94 %v/v