



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาและประเมินพลาสติกเฮอร์ปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ
Development and evaluation of liquid plaster loaded
Chromolaena odorata leaf extract

โดย

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 1. นสภ. ปริญญา มีบุญ | รหัสนิติ 59210176 |
| 2. นสภ. ปรีณดา พงษ์เสวลักษณ์ | รหัสนิติ 57210177 |
| 3. นสภ. ปารีฉัตร ประสงค์ดี | รหัสนิติ 57210179 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาและประเมินพลาสติกอร์ปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

Development and evaluation of liquid plaster loaded

Chromolaena odorata leaf extract

โดย

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| 1. นสภ. ปริญญา มีบุญ | รหัสบัณฑิต 59210176 |
| 2. นสภ. ปรีณดา พงษ์เสวลักษณ์ | รหัสบัณฑิต 57210177 |
| 3. นสภ. ปาริฉัตร ประสงค์ดี | รหัสบัณฑิต 57210179 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

สารสกัดจากใบสาบเสือ มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่พบว่า สารสำคัญมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการสมานแผล จากสมบัติดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น เจลสมานแผลจากใบสาบเสือ เป็นต้น ทางคณะผู้วิจัยเห็นถึงประโยชน์ และช่องทางในการพัฒนาสูตรตำรับสำหรับด้านเชื้อแบคทีเรีย และการสมานแผล ที่เตรียมเป็นพลาสติกปิดแผลแบบเหลว เพื่อบริหารยาผ่านทางผิวหนัง โดยใช้ Plastoid® B เป็น พอลิเมอร์สำหรับก้อฟิล์มในตำรับ ซึ่งระบบก้อฟิล์มเป็นรูปแบบการบริหารยาที่ใช้ง่าย สะดวก สามารถบริหารยาได้ด้วยตัวเอง มีข้อดีเหนือกว่าเภสัชภัณฑ์ที่บริหารทางผิวหนังรูปแบบอื่น ๆ คือ ไม่เหนียวเหนอะหนะ แห้งเร็ว ยึดติดผิวหนังได้นาน เป็นการลดข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ปิดแผลในรูปแบบเดิม ทำให้เพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย และเพิ่มคุณภาพชีวิตให้แก่ผู้ใช้ เพื่อให้ผู้บริโภคสามารถเข้าถึงได้ ลดต้นทุนค่าใช้จ่าย จึงเป็นที่มาของงานวิจัยที่มีการนำสมุนไพรภายในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพลาสติกปิดแผลแบบเหลว ศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบสาบเสือ และศึกษาความพึงพอใจของการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกปิดแผลแบบเหลวนำส่งสารสกัดใบสาบเสือทางผิวหนัง

คณะผู้วิจัย

นสภ. ปริญญา มีบุญ	รหัสனிสิต 59210176
นสภ. ปริญญา พงษ์เสวลักษณ์	รหัสனிสิต 57210177
นสภ. ปริญญา ประสงค์ดี	รหัสனிสิต 57210179

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การพัฒนาและประเมินพลาสติกอร์ปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. ปริญญา มีบุญ รหัสนิสิต 59210176
2. นสภ. ปรีณดา พงษ์เสวลักษณ์ รหัสนิสิต 57210177
3. นสภ. ปาริฉัตร ประสงค์ดี รหัสนิสิต 57210179

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.รศ.ดร. กัมปนาท หวลบุตตา (ที่ปรึกษาร่วม)
2. ภญ.ผศ.ดร. ธนิกานต์ แสงนิม (ที่ปรึกษาหลัก)

บทคัดย่อ

พลาสติกอร์ปิดแผลแบบเหลว คือ ผลิตภัณฑ์ปิดแผลในรูปแบบใหม่ที่สามารถปกปิดบาดแผลขนาดเล็ก หรือแผลบริเวณผิวหนังที่มีการเคลื่อนไหวบ่อยๆ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์พลาสติกอร์ปิดแผลที่มีขายอยู่ในท้องตลาดในปัจจุบันมีราคาสูงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ป่วยขาดโอกาสในการเข้าถึงผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ในรูปแบบพลาสติกอร์ปิดแผลที่มีสารสกัดใบสาบเสือเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ในการสมานแผล ในขั้นต้นสารสกัดจากใบสาบเสือถูกสกัดจากส่วนใบด้วยวิธีหมักในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการเปรียบเทียบกับสารสำคัญกับสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่ค่า MIC 0.25 mg/ml และ MBC 0.5 mg/ml และผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC₅₀ (inhibitory concentration ที่ 50%) ของการทดสอบ ABTS assay มีค่า 88.31 µg/mL และ IC₅₀ ของการทดสอบ DPPH assay มีค่า 143.92 µg/mL และทดสอบการแข็งตัวของเลือดสารสกัดใบสาบเสือตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0625 mg/mL ถึง 1 mg/mL แสดงมีฤทธิ์ช่วยให้เลือดแข็งตัวได้ จากนั้นปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์พลาสติกอร์ปิดแผลแบบเหลวอันประกอบด้วย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิเมอร์ การหาชนิดและปริมาณของตัวทำละลายและพลาสติกไซเซอร์ และการเติมสารสกัดใบสาบเสือลงในสูตรตำรับที่เหมาะสม ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาสูตรที่เหมาะสมที่สุด โดยตำรับที่ดีที่สุด (Plastoid® B 30: Ethyl acetate 41: Isopropyl alcohol 27: PEG400 2% w/w) สามารถก่อตัวเป็นฟิล์มได้เร็ว ฟิล์มที่ได้มีความยืดหยุ่น (0.001653 MPa ±0.000362) และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* ได้ที่ความเข้มข้นสารสกัด 2 mg/ml จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากใบสาบเสือ ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติในการใช้เป็นสารสำคัญสำหรับเติมในผลิตภัณฑ์พลาสติกอร์ปิดแผลแบบเหลว และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผล และต้านเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนังได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Senior project academic year 2020

: Development and evaluation of liquid plaster loaded *Chromolaena odorata* leaf extract by

1. Miss Parinya Meeboon ID 59210176
2. Miss Parinda Phongsewalak ID 59210177
3. Miss Parichat Prasongdee ID 59210179

Advisor

1. Assoc. Prof. Dr. Kampanart Huanbutta, Ph.D
 2. Asst. Prof. Dr. Tanikan Sangnim, Ph.D
-

ABSTRACT

Liquid plaster is recently developed as a latest type of wound dressing products. The liquid wound adhesive plaster can be addressed to cover the wounds on various parts of the body especially small injuries or wound in the of body-movement parts. However, the access to the available liquid plasters in the market has been limited to the patients due to the excessive price of the product. For the above reason, the objective of this study is to develop and to evaluate *Chromolaena odorata* extract loaded liquid plaster with antimicrobial, anti-inflammatory, and the wound healing effects that are suitable for wound care. The study was firstly conducted through the extraction of *Chromolaena odorata* leaf by using ethanol maceration technique and identifies the compound with high performance liquid chromatography compared with Gallic acid, Quercetin, and Apigenin standard compounds. The liquid plaster loaded with *Chromolaena odorata* leaf extract demonstrates an ability to inhibit *S. aureus* and *S. epidermidis* at MIC 0.25 mg/ml and MBC 0.5 mg/ml. The antioxidant activity test was performed, demonstrating the IC₅₀ (inhibitory concentration at 50%) of the ABTS assay at 88.31 µg/mL and IC₅₀ of the DPPH assay test at 143.92 µg/mL. The concentration of *Chromolaena odorata* leaf extract range from 0.0625 mg/ml to 1 mg/ml also illustrated the blood clotting effect. The study later determined the suitable concentration of solvent and plasticizers ratios as factors that affect the liquid plaster properties. In order to prepare a suitable film forming system of the loaded *Chromolaena odorata* leaf extract, the optimum formulation (Plastoid®B 30: Ethyl acetate 41: Isopropyl alcohol 27: PEG 400 2% w/w) were fabricated and evaluated. The formulation displayed fast elastic film forming system (elastic modulus of 0.001653 MPa ± 0.000362) with the escalation of effectiveness of wound healing and antibacterial effect on the skin at 2 mg/ml *Chromolaena odorata* leaf extract loading. As a result, the study demonstrates the possibility of introducing the *Chromolaena odorata* leaf extract loaded formulation on the liquid plaster to increase the effectiveness of wound healing and antibacterial effect on the skin.

Major Advisor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากเภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนิกันต์ แสงนิ่ม เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร. กัมปนาท หวลบุตรตา และเภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร. ฐิตินันท์ เอื้ออำนวย และเภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยคอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาววิภาดา ศิริตันหยง ที่คอยสนับสนุนให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดทำโครงการวิจัยครั้งนี้ให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสมบูรณ์
ลุล่วง

คณะผู้วิจัย

นสภ. ปริญญา มีบุญ	รหัสนิสิต 59210176
นสภ. ปรีณดา พงษ์เสวลักษณ์	รหัสนิสิต 57210177
นสภ. ปาริฉัตร ประสงค์ดี	รหัสนิสิต 57210179

สารบัญ

คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๙
1. บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
กรอบแนวคิด	2
สมมติฐาน	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
นิยามศัพท์	3
2. ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ปัจจัยและลักษณะของบาดแผล	4
2.2 แบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง	6
2.3 สาบเชื้อ	7
2.4 สารสำคัญของไบโسابเชื้อ	8
2.5 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	9
2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC)	10
2.7 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion method	10
2.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	11
2.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	12
2.10 การแข็งตัวของเลือด	12
2.11 ระบบก่อกฟิล์ม	12
2.12 การวัดการไหลและความหนืด	16
2.13 พลาสตอยด์ (Plastoid [®] B)	18
2.14 ระยะเวลาในการแห้ง	19
2.15 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส	19

2.16 การยอมให้น้ำผ่าน	20
3. วิธีดำเนินการวิจัย	21
อุปกรณ์และสารเคมี 3.1	21
3.2 การสกัดสารจากใบสาบเสือ	22
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบสาบเสือ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)	23
3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	24
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ	26
3.6 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)	28
3.7 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม	29
3.8 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ	31
3.9 การทดสอบหาระยะเวลาการแห้งของพลาสติกปิดแผลชนิดเหลว (time to dry)	32
3.10 การทดสอบการไหลและความหนืด (rheological properties)	32
3.11 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส	32
3.12 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย	33
4. ผลการวิจัย	34
4.1 การเตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือ	34
4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	42
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ	50
4.5 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)	56
4.6 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม	58
4.7 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ	68
4.8 การทดสอบการซึมผ่านของน้ำ	70
4.9 การทดสอบประสิทธิภาพของพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion method	72
5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	78
5.1 การเตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือ	78
5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบสาบเสือ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)	78

5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	79
5.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ	80
5.5 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)	80
5.6 การเตรียมระบบก่อฟิล์ม	80
5.7 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ	83
5.8 การซึมผ่านของไอน้ำ	84
5.9 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	85
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก ก	91
ภาคผนวก ข	101

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางทางเคมีของ Plastoid®B	19
ตารางที่ 2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Plastoid®B	29
ตารางที่ 3 การหาชนิดและปริมาณของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด	30
ตารางที่ 4 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิด และ เติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2 % w/w	30
ตารางที่ 5 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิด และ เติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5 % w/w	30
ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของแต่ละสูตรตำรับ	32
ตารางที่ 7 ปริมาณสาร Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือ	41
ตารางที่ 8 ปริมาณสาร Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือ	41
ตารางที่ 9 ปริมาณสาร Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือ	42
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้ง เชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=3)	43
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้ง เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	44
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้ง เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	46
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=3)	47
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	49
ตารางที่ 15 แสดง ค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	51
ตารางที่ 16 ค่า IC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	52
ตารางที่ 17 แสดง ค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดใบสาบเสือ ในตัวทำละลายเอทานอล	52
ตารางที่ 18 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดใบสาบเสือ	53
ตารางที่ 19 แสดง ค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	54
ตารางที่ 20 ค่า IC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	55
ตารางที่ 21 แสดง ค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดใบสาบเสือ ในตัวทำละลายเอทานอล	55
ตารางที่ 22 IC ₅₀ ของสารสกัดใบสาบเสือ	56
ตารางที่ 23 แสดงผลการทดสอบการแข็งตัวของเลือด (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์)	57
ตารางที่ 24 แสดง Shear rate ของระบบกึ่งฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine® (กำหนด Shear rate ที่ 1 s ⁻¹)	69

ตารางที่ 25 แสดง Shear rate ของระบบก่อก้อนฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine® (กำหนด Shear rate ที่ 1 s^{-1})	69
ตารางที่ 26 แสดงค่า Young's modulus ของระบบก่อก้อนฟิล์มที่เติมสารสกัด ใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine®	69
ตารางที่ 27 แสดงค่า Young's modulus ของระบบก่อก้อนฟิล์ม ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ ปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Plasta®	69
ตารางที่ 28 ตารางที่ 28 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัด ใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Blank	71
ตารางที่ 29 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine®	71
ตารางที่ 30 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ ปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Plasta®	71
ตารางที่ 31 แสดงค่าอัตราการซึมผ่านของน้ำ (WVTR)	72
ตารางที่ 32 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=3)	73
ตารางที่ 33 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	75

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของผิวหนัง	5
รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	6
รูปที่ 3 ลักษณะของเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
รูปที่ 4 ลักษณะของต้นและใบสาบเสือ	8
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay	12
รูปที่ 6 แสดงความเคঁน	17
รูปที่ 7 กราฟแสดงลักษณะการไหลของของเหลว	18
รูปที่ 8 โครงสร้าง Plastoid®B	18
รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสารที่เพิ่มและและระยะเวลาที่ผ่านไป	20
รูปที่ 10 ตำแหน่งการเติมสารต่างๆ ใน 96-well microplates	27
รูปที่ 11 ตำแหน่งการเติมสารต่างๆ ใน 96-well microplates	28
รูปที่ 12 สารสกัดจากใบสาบเสือ	34
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	35
รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	35
รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	36
รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	36
รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	36
รูปที่ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	37
รูปที่ 19 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ	37
รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC	38
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Quercetin จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC	38
รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Apigenin จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค HPLC	39
รูปที่ 23 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1	39
รูปที่ 24 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 2	40
รูปที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 3	40
รูปที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ %ABTS radical scavenging กับ ความเข้มข้น สารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยวิธีการทดสอบ ABTS assay	51
รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay	53
รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยวิธีการทดสอบ DPPH assay	54

รูปที่ 29	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay	56
รูปที่ 30	กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 %w/w	59
รูปที่ 31	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Shear viscosity และ Shear rate	59
รูปที่ 32	กราฟแสดง Shear rate ของระบบกึ่งฟิล์ม 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w เมื่อกำหนด Shear viscosity ที่ 1 s^{-1}	60
รูปที่ 33	กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด	61
รูปที่ 34	กราฟแสดง Shear viscosity ของระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ความเข้มข้น 30 % w/w และใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด เมื่อกำหนด Shear rate ที่ 1 s^{-1}	61
รูปที่ 35	กราฟแท่งแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ความเข้มข้น 30 % w/w และใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด	62
รูปที่ 36	กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ โดยใช้ Plastoid [®] B 30 % w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ Ethyl acetate และ Isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 2 %w/w	63
รูปที่ 37	กราฟแสดง Shear viscosity ของระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด 64และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2 %w/w เมื่อกำหนด Shear rate ที่ 1 s^{-1}	63
รูปที่ 38	กราฟแท่งแสดงค่า Breaking strain เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2 %w/w	64
รูปที่ 39	กราฟแท่งแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์	65
รูปที่ 40	กราฟระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิดและเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5 %w/w	66
รูปที่ 41	กราฟแสดง Shear viscosity ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5 %w/w เมื่อกำหนด Shear rate ที่ 1 s^{-1}	66
รูปที่ 42	กราฟแท่งแสดงค่า Breaking strain เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5 %w/w	67
รูปที่ 43	กราฟแท่งแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5 %w/w	66
รูปที่ 44	กราฟระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์มเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด	68
รูปที่ 45	กราฟแสดง Shear viscosity ของ Plastoid [®] B 30 : Ethyl acetate 41 : Isopropyl alcohol 27: PEG2 %w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาดเมื่อกำหนด Shear rate ที่ 1 s^{-1}	67
รูปที่ 46	กราฟแสดงค่า Young's Modulus ของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine [®] และ Plasta [®]	70
รูปที่ 47	แสดงอัตราการซึมผ่านของน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg, Blank, Betadine [®] และ Plasta [®]	70

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเกิดบาดแผลเกิดขึ้นได้จาก ถูกของมีคม ถูกกระแทก หรืออาจเกิดจากอุบัติเหตุ ที่ทำให้เนื้อเยื่อฉีกขาด ซึ่งเป็นสิ่งที่สามารถเกิดขึ้นได้ และเกิดขึ้นบ่อยครั้ง โดยบาดแผลส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นบริเวณผิวหนัง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคที่ผิวหนังได้ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* (1) เป็นต้น ดังนั้นการรักษาบาดแผลเบื้องต้นถือเป็นสิ่งสำคัญ นั่นคือ การล้างทำความสะอาดบาดแผลด้วยน้ำสะอาด และใช้ยาฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดบาดแผล ขั้นตอนสุดท้ายคือ การรักษาด้วยการสมานบาดแผลด้วยผลิตภัณฑ์ ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น พลาสเตอร์ปิดแผล แผ่นแปะผิวหนัง หรือครีม เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้งหลายนี้ล้วนยากต่อการใช้สมานแผลขนาดเล็ก แผลบริเวณข้อพับ หรือใช้กับแผลที่อยู่ในบริเวณที่มักมีการสัมผัสโดนน้ำบ่อยครั้ง เนื่องจากอาจเปียกน้ำ หลุดลอก และแปะได้ไม่สนิท ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ปกปิดบาดแผลที่พบได้ทั่วไป (2)

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ปิดแผลในรูปแบบใหม่ คือ พลาสเตอร์ปิดแผลแบบเหลว ซึ่งผลิตภัณฑ์จะอยู่ในรูปของเหลว และเปลี่ยนเป็นแผ่นฟิล์มเมื่อนำมาทาบนผิวหนัง พลาสเตอร์ปิดแผลแบบเหลวนี้อาจสามารถปกปิดบาดแผลตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ โดยเฉพาะแผลขนาดเล็ก และสามารถป้องกันแผลไม่ให้สัมผัสกับน้ำได้ แต่ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนี้ยังไม่เป็นที่รู้จักและนิยมใช้มากนัก และปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง (3)

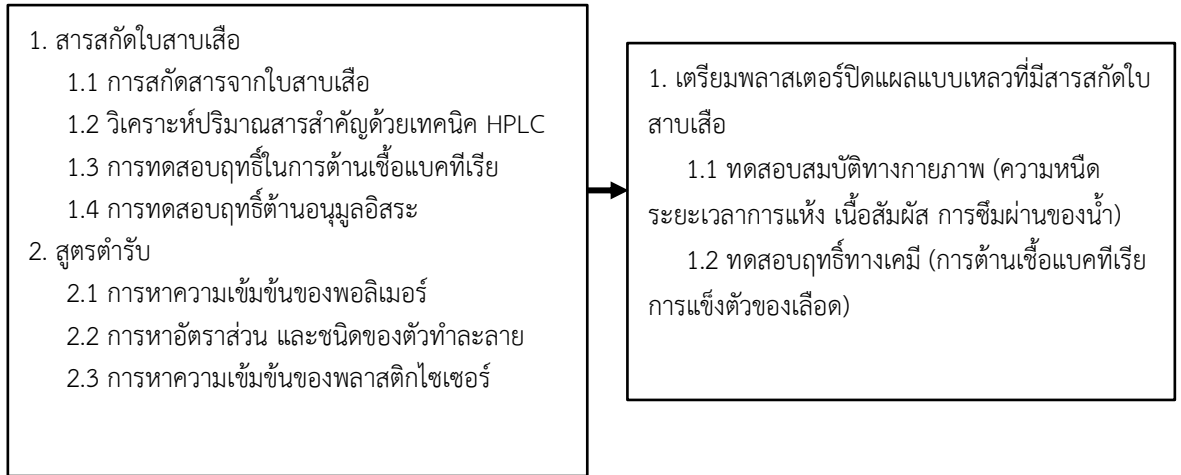
คณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ในรูปแบบพลาสเตอร์ปิดแผลแบบเหลว เพื่อให้สามารถผลิตเองในประเทศได้ ทำให้ผู้บริโภคสามารถเข้าถึงผลิตภัณฑ์ได้ และลดต้นทุนค่าใช้จ่าย นอกจากนี้งานวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะนำสมุนไพรสารสกัดมาใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ช่วยสมานแผล โดยใบสบาดเสื่อมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ห้ามเลือด และสมานแผล เป็นต้น การใช้สารสกัดใบสบาดเสื่อในผลิตภัณฑ์ปิดแผลจึงมีแนวโน้มเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาแผลได้

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พลาสเตอร์ปิดแผลแบบเหลวบรรจุสารสกัดใบสบาดเสื่อที่มีสมบัติทางกายภาพที่ดี มีความยืดหยุ่นสูง สามารถป้องกันน้ำไม่ให้สัมผัสโดนแผลเกาะติดผิวหนังได้ดี และลอกออกได้ง่าย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพลาสติกชนิดพีดีแอลแบบเหลว
2. ศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบสาบเสือ

กรอบแนวคิด



สมมติฐาน

1. ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ตัวทำละลาย และพลาสติกไซเซออร์ที่ต่างกัน ส่งผลต่อคุณสมบัติของ พลาสติกชนิดพีดีแอลแบบเหลว
2. ผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดพีดีแอลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือสามารถยับยั้งเชื้อที่อยู่ในบริเวณผิวหนังได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการเตรียม และผลของปัจจัยด้านสูตรตำรับ และกระบวนการเตรียมที่ส่งผลต่อสมบัติทางเคมี และกายภาพของพลาสติกชนิดพีดีแอลแบบเหลว
2. ส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยในอุตสาหกรรมทางยา เป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทย
3. เพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภค และลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ
4. ได้ต้นแบบนวัตกรรมผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดพีดีแอลชนิดกึ่งน้ำ ที่มีสมบัติรักษาแผลได้ดี และมีศักยภาพในการผลิตเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

นิยามศัพท์

1. พลาสตอยด์ (Plastoid® B) คือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ กลุ่มโพลีเมทาไคเลท (Polymethacrylates) ที่ประกอบด้วย มอนอเมอร์ 2 ชนิดได้แก่ เมทิล เมทาไคเลท (methyl methacrylate) และ บิวทิล เมทาไคเลท (butyl methacrylate)
2. Film-forming system คือ ระบบก่อฟิล์มเพื่อนำส่งสาร
3. *Chromolaena odorata* (CO) คือ สาบเสือ วงศ์ Asteraceae
4. Quercetin และ Apigenin คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ
5. Gallic acid คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic acid) ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ปัจจัยและลักษณะของบาดแผล

การศึกษาปัจจัยและลักษณะของบาดแผลดังนี้ ค่าความเป็นกรดต่าง โดยผิวหนังมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4-6 ค่านี้ส่งเสริมกระบวนการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) กระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (epithelialization) มีการปลดปล่อยออกซิเจนจากฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) และสามารถควบคุมแบคทีเรียได้ ค่าพีเอชของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังคือ 7.4 การเกิดบาดแผลอาจทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนี้เปลี่ยนเป็นกรดมากขึ้น และออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับกระบวนการรักษาแผลช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสร้างหลอดเลือด การสังเคราะห์คอลลาเจน และการป้องกันแบคทีเรีย นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับการรักษาบาดแผลที่แย่ลง และการติดเชื้อของแผลที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยของความชุ่มชื้นของแผล (moisturizer) โดยแบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดี ในสถานะที่มีความชื้น และเพิ่มความเสี่ยงจากการติดเชื้อได้ (4)

ปัจจัยของค่าพีเอช (pH value) ของผิวหนังมาจากน้ำ ชั้นไขมันที่เคลือบบนผิวหนัง ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับชั้นน้ำและไขมันที่เคลือบบนผิวหนัง ได้แก่

1. อุณหภูมิ ปริมาณน้ำที่เคลือบบนผิวหนังเป็นผลมาจากกลไกการปรับอุณหภูมิของร่างกาย โดยสภาวะปกติ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40-60 ร่างกายมีการปรับสมดุลอุณหภูมิ ผ่านการระเหยของน้ำที่ผิวหนังเพียงอย่างเดียว

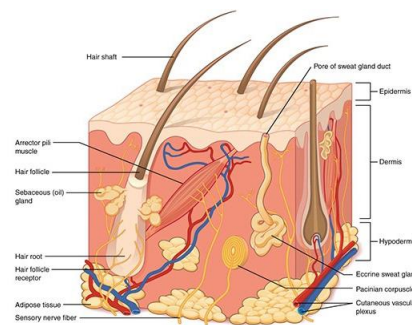
2. น้ำในร่างกาย โดยร่างกายจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก ร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักตัว และร่างกายสูญเสียน้ำจากการขับปัสสาวะ สูญเสียน้ำในรูปแบบของไอน้ำจากการหายใจ และทางผิวหนัง เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะขาดน้ำมีผลทำให้ ชั้นน้ำและไขมันที่เคลือบบนผิวหนังลดปริมาณลง

3. ตำแหน่งบนร่างกาย จากอัตราการขับเหงื่อ และความหนาของชั้นผิวหนังในแต่ละบริเวณ บนร่างกายแตกต่างกัน ความชื้นและปริมาณไขมันบนผิวหนัง ค่าพีเอชที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณ ซึ่งบริเวณที่มีความชื้นสูงมากคือ หน้าผาก และฝ่ามือ บริเวณที่แห้งที่สุดคือ แขนที่ห่างจากมือ 2-3 เซนติเมตร บริเวณที่พบต่อมไขมันมาก ได้แก่ หนังศีรษะ หน้าผาก จมูก คาง หน้าอก และหลังส่วนบน บริเวณที่มีค่าพีเอชสูงที่สุด คือ บริเวณรักแร้ และ บริเวณฝ่าเท้า

4.อายุ จะมีผลต่อค่าพีเอช ความชุ่มชื้น และปริมาณไขมันบนผิวหนังที่แตกต่างตามช่วงอายุ โดยค่าพีเอชจะสูงขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้น คนสูงอายุและเด็กจะมีความชุ่มชื้นในผิวหนังต่ำ และช่วงอายุ 20 -40 ปี จะมีความชุ่มชื้นในผิวหนังมากที่สุด

5.ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่นๆ จากการศึกษาพบว่าความชื้นของผิวหนังในฤดูร้อนมากกว่าฤดูหนาว ฤดูหนาวความชื้นในอากาศต่ำ ในฤดูร้อนมีอุณหภูมิสูงแต่ความชื้นในอากาศสูงส่งผลให้น้ำระเหยจากผิวหนังน้อย ส่งผลให้ผิวหนังมีความชื้นสูง

ชั้นของผิวหนัง ประกอบด้วย 3 ชั้นหลัก ได้แก่ Epidermis ปกคลุมผิวหนังภายนอก ชั้นถัดมาคือ Dermis มีแขนงเซลล์ประสาทปกคลุม และเป็นชั้นที่มีรูขุมขน (hair follicle) และชั้น Hypodermis มีหลอดเลือด ไขมันสะสม รวมถึงเซลล์ประสาทด้วย ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของผิวหนัง (5)

บาดแผลเกิดจากเนื้อเยื่อของร่างกายเมื่อได้รับบาดเจ็บ หรือมีสาเหตุจากของมีคม ถูกกระแทกถูกความร้อนหรือเย็นจัด ถูกสารเคมี หรืออาจเกิดจากอุบัติเหตุ ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อฉีกขาดได้ โดยลักษณะของบาดแผลนั้นหลายลักษณะ เช่น รอยแผลเรียบชิดกันจากการผ่าตัด หรือแผลถูกมีดบาด รอยแผลฉีกขาดหรือถูกทำลายของผิวหนังและเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังมักทำให้ขอบแผลไม่เรียบเป็นต้น

การตอบสนองของร่างกายเมื่อเกิดบาดแผล มี 4 ระยะ

1.ระยะ Bleeding จะเกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่วินาที เป็นขั้นตอนกระบวนการห้ามเลือดของร่างกาย เกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการหดตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดหยุดไหลและเลือดออกน้อยลง

2.ระยะ Inflammation ใช้เวลา 1-3 วัน เซลล์เม็ดเลือดขาว (macrophage) หลังสารเคมีที่ก่อการอักเสบ ทำให้เนื้อเยื่อโดยรอบเกิดการอักเสบ เมื่อผ่านระยะเวลา 3 วัน การอักเสบจะลดลงเข้าสู่ระยะที่ 3

3.ระยะ Proliferation ใช้เวลา 3 วันถึง 2 สัปดาห์ มี Fibroblast สร้างขึ้นมา ทำให้บาดแผลตื้นลงและการอักเสบลดลง

4.ระยะ Remodeling มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และ สร้างคอลลาเจน เกิดการสมานแผลและผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บกลายเป็นปกติ ระยะเวลาการสมานแผลขึ้นกับขนาดและความลึกของแผล

ลักษณะบาดแผล เนื้อเยื่อที่อยู่ที่พื้นบาดแผลมีทั้งหมด 4 ประเภท แยกตามลักษณะสีที่ต่างกัน

- 1.Narcotic tissue ลักษณะของเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว มีสีดำหรือสีน้ำตาล
- 2.Slough tissue ลักษณะเป็นเนื้อตายสีเหลือง และพบน้ำเหลืองหรือน้ำหนอง พบบ่อยในแผลเรื้อรัง เช่น แผลเบาหวาน
- 3.Granulation tissue ลักษณะภายนอกสังเกตเป็นเนื้อเยื่อสีแดง
- 4.Epithelial tissue ลักษณะภายนอกสังเกตเป็นเนื้อเยื่อสีชมพูอ่อน หรือเป็นส่วนขอบของบาดแผล

แผลกดทับ มี 4 ระยะ

ระยะที่ 1 ลักษณะของแผลมีสีชมพูหรือสีแดงมีขอบชัดเจน ปรากฏรอยแดงจากการกดทับ ไม่มีการหลุดลอกของผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ

ระยะที่ 2 บริเวณบาดแผล มีเลือดซึม ไม่มีน้ำหนองหรือน้ำเหลือง ไม่มีการตายของเนื้อเยื่อ

ระยะที่ 3 ลักษณะของแผลมีความลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง ลักษณะเป็นหลุมและมีน้ำหนองหรือน้ำเหลืองไหลเยิ้ม

ระยะที่ 4 ลักษณะมีน้ำหนองหรือน้ำเหลืองไหลเยิ้ม เกิดบาดแผลลึกถึงชั้นกระดูก, เส้นเอ็น และชั้นกล้ามเนื้อ (5)

2.2 แบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง

แบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง มีดังนี้

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

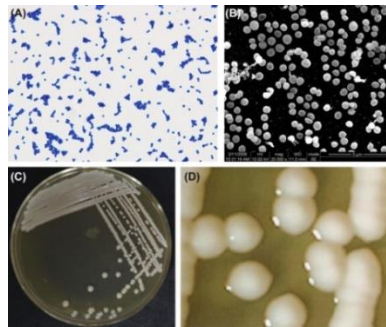


รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (1)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ลักษณะโคโลนีมีสีขาวถึงสีทอง ขุ่น กลม (ดังรูปที่ 2) ส่วนใหญ่ไม่สร้างแคปซูล สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส *S. aureus* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้บริเวณผิวหนัง รูจมูก หรือติดอยู่บนเสื้อผ้า การแพร่กระจายของเชื้อเกิดจากการสัมผัส (6)

การก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* เกิดจากสารพิษที่ถูกหลั่งออกมา ซึ่งจะขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อด้วย โดยจะก่อให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง การติดเชื้อนี้สามารถเกิดได้ตั้งแต่เด็กไปจนถึงผู้ใหญ่ โดยเฉพาะการติดเชื้อในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ

2.2.2 *Staphylococcus epidermidis*



รูปที่ 3 ลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (1)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว (ดังรูปที่ 3) สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่ไม่สร้าง coagulase นอกจากนี้ยังไม่สามารถสร้าง α -toxin, exfoliatin และ superantigen toxins

S. epidermidis พบเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหู และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย การติดเชื้อเกิดจากการใช้ catheters และ prosthesis มากขึ้น จึงพบว่ามีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น นอกจากนี้ยากต่อการรักษา เนื่องจาก *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ มีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน (7)

2.3 สาบเสือ

ต้นสาบเสือ (*Chromolaena odorata*; Siam weed) วงศ์ Asteraceae จัดเป็นวัชพืชที่พบได้ทั่วไปในหลายประเทศ เป็นพรรณไม้ล้มลุก ลำต้นแตกกิ่งก้านสาขามากมาย จนดูเป็นทรงพุ่ม มีขนนุ่มตามลำต้น และกิ่งก้านสาขา ลำต้นสูงประมาณ 3 - 5 ฟุต ใบสาบเสือเป็นไม้ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ลักษณะของใบเป็นรูปหอก ปลายแหลม โคนใบสอบแคบ ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อย ตัวใบจะมีขนปกคลุมทั่วทั้งใบ มีสีเขียวขนาดของใบกว้างประมาณ 1-2.5 นิ้ว ยาว 2-4 นิ้ว ก้านใบยาว 1-2 นิ้ว และมีขนปกคลุม ดอกสาบเสี้ออกเป็นช่ออยู่ตรงส่วนยอดของต้น ลักษณะของดอกที่โคนกลีบดอก จะเชื่อมติดกันเป็นหลอด และตรงปลายจะแยกออกเป็น 5 กลีบ สีน้ำเงินอมม่วงอ่อนๆ หรือสีขาวม่วง ผลสาบเสี้อมีขนาดเล็กแห้ง เรียวบาง มีสีดำ ซึ่งผลนี้จะเป็นสัน หรือเป็นเหลี่ยม 5 เหลี่ยม ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 4

ต้นสาบเสี้อมีสรรพคุณเป็นยาที่ถูกนำมาใช้ เพื่อการรักษามาแต่โบราณ ในสาบเสือสามารถนำมาพอกแผลสดเพื่อห้ามเลือด ใช้ปิดแผลเพื่อสมานแผล รักษาแผลไฟไหม้ และแผลเปื่อยพุพอง แก้อักเสบ แก้พิษน้ำเหลือง (8)



รูปที่ 4 ลักษณะของต้นและใบสบเสื่อ (8)

2.4 สารสำคัญของใบสบเสื่อ

การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่พบว่า สารสกัดใบสบเสื่อมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ ลดความดันโลหิต ลดเบาหวาน และฤทธิ์ในการสมานแผล (9) มีการรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสบเสื่อมากมายที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสบเสื่อมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมาก และมีสารกลุ่ม glycosides, steroids, saponins, phenols, flavonoids, terpenoids และ tannin ในปริมาณมาก (10) มีรายงานการแยกสารต่างๆ มากมายได้จากสารสกัดจากใบสบเสื่อ ได้แก่ himachalol, 7-isopropyl-1,4-dimethyl-2-azulenol, androencecalinol, 2-methoxy-6-(1-methoxy-2-propenyl) naphthalene, phenyl derivatives, oxygenated sesquiterpenes, long-chain hydrocarbons, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes monoterpene hydrocarbons ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

ใบสบเสื่อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้สามารถปกป้องเซลล์ผิวหนังเพราะเลี้ยง ได้แก่ human dermal fibroblasts และ human epidermal keratinocytes จากการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระได้ดี และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblasts และ endothelial cells ได้ดี ซึ่งอาจจะเป็นกลไกหนึ่งในการออกฤทธิ์รักษาแผลของใบสบเสื่อ นอกจากนี้สารสกัด และสารสำคัญที่แยกได้จากสบเสื่อมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี โดยพบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 gene และลดการสร้าง PEG2 และ nitric oxide โดยยับยั้งผ่าน NF-kB pathway (11) นอกจากนี้ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเอทานอลจากใบสบเสื่อในหนูเมาส์ พบว่า สารสกัดใบสบเสื่อไม่มีความเป็นพิษพลัน โดยมีค่า LD₅₀ มากกว่า 20 กรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ (1-20 กรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม)) ซึ่งไม่ทำให้เกิดการตายของหนูทดลอง (12)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า ใบสบเสื่อมีประโยชน์ในการรักษาแผลสด แก้อักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมานแผลได้ดี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความปลอดภัย สบเสื่อจึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นส่วนประกอบหรือสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และความงามได้

2.5 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ จำเป็นต้องนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและมีสารอาหารเหมาะสมกับความต้องการของแบคทีเรียชนิดนั้น และการศึกษาผลต่อเซลล์แบคทีเรียจำเป็นต้องแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ทำเพื่อการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ที่เรียกว่า pure culture ซึ่งหมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียชนิดเดียวที่มีลักษณะและคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ เนื่องจากโดยปกติแบคทีเรียเจริญเป็นกลุ่ม (colony) หรืออาจทำเพื่อการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (colony count)

2.5.1 เทคนิคการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

1) การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate method)

วิธีการในการแยกเชื้อ คือ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่สะอาดปราศจากเชื้อนำไปแตะเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนี ซึ่งมีเชื้อหลายชนิดผสมกันอยู่ แล้วนำมาขีด (streak) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และลากวนไปมาให้ยาวที่สุดเท่าที่ทำได้จนเต็มผิวหน้าอาหาร แล้วนำจานเพาะเชื้อ (petridish) จึงไปบ่มเชื้อ (incubate) โดยการวางคว่ำจานที่อุณหภูมิห้อง หรือในที่ที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด ทิ้งไว้ประมาณ 1 -2 วัน จะเห็นโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียเจริญขึ้นจนมีขนาดใหญ่พอที่จะถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารอื่นๆ เพื่อเก็บไว้ศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป (13)

2) การแยกเชื้อโดย Loop dilution technique

นำหลอดอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 หลอด ไปหลอมให้ละลายใน waterbath ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และนำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีเชื้อผสม แล้วนำไปใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ 1 เขย่าหลอดเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วหลอด จากนั้นนำ loop ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อผสมหลอดที่ถ่ายลงในหลอดอาหารที่ 2 เขย่าเพื่อให้เชื้อแพร่กระจายทั่วหลอดแล้ว นำ loop ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อผสมหลอดที่ 2 ถ่ายลงในหลอดอาหารที่เขย่าเพื่อให้เชื้อแพร่กระจายทั่วหลอด และนำอาหารในหลอดที่ 1 เทใส่จานเพาะเชื้อจานที่ 1 หมุนจานเบาๆ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายโดยทั่วจาน ปล่อยให้แห้งจนอาหารแข็งตัว จากนั้นนำอาหารในหลอดที่ 2 และ 3 เทใส่จานเพาะเชื้อจานที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หมุนจานเบาๆ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายโดยทั่วจาน ปล่อยให้แห้งจนอาหารแข็งตัว จึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสม ทิ้งไว้ประมาณ 24-48 ชม. จะเห็นโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียเจริญขึ้นจนมีขนาดใหญ่พอที่จะเขี่ยเชื้อ หรือนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป

2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC)

ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของสารสำคัญในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นค่าที่นิยมใช้บ่งบอกถึงความไวของเชื้อที่มีต่อยา และเป็นค่าที่ใช้ประกอบการพิจารณาถึงขนาดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด การทดสอบความไวของเชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบมี 2 วิธี คือ Broth dilution test และ Agar disk diffusion test

1. Broth dilution test เป็นวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาหรือ Minimum inhibition concentration (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ หาได้จากการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นต่างกันใส่ลงไปในหลอดกับเชื้อที่กำลังเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยทดสอบภายในหลอดทดลอง

2. Agar disk diffusion test เป็นการทดสอบโดยการวางแผ่นกระดาษกรองมาตรฐานที่อิมมัลด้วยสารละลายยาขนาดต่างๆ วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ผสมเชื้อที่ต้องการทดสอบ ทำการบ่มเพาะเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการตรวจกรองฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพของยาเบื้องต้น ซึ่งบอกผลในเชิงคุณภาพว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางจากบริเวณโซนใสของการยับยั้ง (clear zone inhibition)

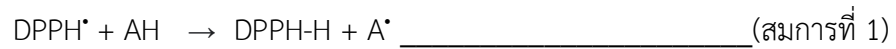
2.7 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion method

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการเจาะเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุม แล้วหยดสารลงไปหลุม ซึ่งผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่าง ๆ ก็รอบหลุม ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้ง โดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใด ๆ ก็เจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้หลุม ซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นพื้นที่การยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ขึ้น อัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่การยับยั้งเชื้อ ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียวัดได้จากขนาดของพื้นที่การยับยั้งเชื้อ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่การยับยั้งเชื้อจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration หรือ MIC) (14)

2.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.8.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay) (15)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้คือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการที่ 1) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณ ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100 \quad \text{(สมการที่ 2)}$$

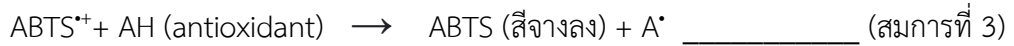
โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ Trolox หรือ Gallic acid ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย, สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง

2.8.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) (15)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติ จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจาง ซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการที่ 3) และตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการ คำนวณ และการเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox หรือ Gallic acid เช่นเดียวกับวิธี DPPH

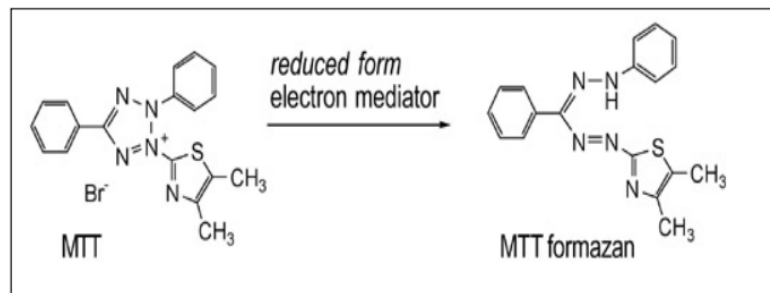
ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกาย หรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ



2.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay โดยแบ่งเป็น 2 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบเบื้องต้น (primary screening) โดยทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการหาค่า Inhibitory concentration (IC₅₀) ที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50%

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็น สีสันเคราะห์ ประเภท tetrazolium salt (ดังรูปที่ 5) ที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยา ในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี หลักการทำงานของ MTT คือ เซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่หรือ metabolically active เท่านั้นที่สามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกิริยา reduction ผลึกของ formazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน และมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่น ประมาณ 550-600 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสีม่วงน้ำเงิน หรือ ปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase enzyme ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan product ที่ เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์ (16)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay (16)

2.10 การแข็งตัวของเลือด

เกล็ดเลือดมีหน้าที่ในกลไกการห้ามเลือด โดยการหลั่งซีโรโทนิน ทำให้หลอดเลือดหดตัวปิดรอยฉีกขาดและเสริมสร้างความแข็งแรงของเยื่อหลอดเลือด ถ้าจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลง จะพบว่ามี การฝ่อของ endothelial cell เกิดจุดเลือดออกตามผิวหนัง เมื่อได้รับเกล็ดเลือดจำนวนเพียงเล็กน้อย ก็จะทำให้ endothelial cell เป็นปกติ นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังมีกลไกในการอุดรอยฉีกขาดของ หลอดเลือด (17)

2.11 ระบบก่อกอฟิล์ม

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกายมนุษย์ (ประมาณร้อยละ 17 ของน้ำหนัก ตัว) มีความหนาอยู่ที่ 3-5 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับบริเวณที่ปกคลุมร่างกาย หน้าที่หลักของผิวหนัง คือ ป้องกันไม่ให้อวัยวะภายในร่างกายถูกทำลายจากสิ่งกระตุ้นภายนอก เช่น การกระแทก รังสี สารเคมี

สารพิษหรือเชื้อโรคจากภายนอกร่างกาย นอกจากนี้ผิวหนังยังมีหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของ อุณหภูมิ และความชื้นภายในร่างกาย (18) นอกจากนี้ผิวหนังยังเป็นอวัยวะสำคัญที่ใช้นำส่งยาเข้าร่างกาย การนำส่งยาทางผิวหนังได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกในการบริหารยา ผู้ป่วยสามารถใช้ยาและหยุดยาได้ทันทีด้วยตนเอง ต่างจากการให้ยาทางอื่น ผู้ป่วยไม่เจ็บตัวเมื่อเทียบกับการให้ยาโดยการฉีด นอกจากนี้การนำส่งทางผิวหนัง ให้ระดับยาในเลือดค่อนข้างคงที่มากกว่าวิธีการรับประทาน ส่วนหนึ่งเนื่องจากยาไม่ถูกทำลายในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้ความถี่ในการให้ยาลดลง จากข้อดีดังกล่าวข้างต้นการให้ยาทางผิวหนังจึงสามารถช่วยเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วยได้ รูปแบบยาที่ใช้นำส่งทางผิวหนังมีหลายรูปแบบ เช่น ขี้ผึ้ง ครีม เจล อิมัลชัน (19)

2.11.1 กลไกของระบบก่อกฟิล์มและการซึมผ่าน

ระบบก่อกฟิล์ม (film-forming system) เป็นรูปแบบการนำส่งยารูปแบบใหม่ ที่ใช้การบริหารยาผ่านทางผิวหนังโดยตรง หลังจากที่ใช้บริหารไปแล้ว เมื่อเวลาผ่านไปตัวทำละลายในสารละลายจะระเหยออกไป เหลือเป็นฟิล์มบาง ใส เคลือบอยู่บนผิวหนัง ในขั้นนี้ความเข้มข้นของยาจะเพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดอิ่มตัว การที่สารถึงจุดอิ่มตัวเป็นผลทำให้เพิ่มการซึมผ่านยาเข้าสู่ผิวหนังได้มากขึ้น โดยหลักการของสารที่อิ่มตัว สามารถอธิบายได้จาก Fick's law of diffusion (20)

$$J = \frac{DKCv}{h} \text{ (สมการที่ 4)}$$

J (mol/m ² s)	= อัตราการซึมผ่านของยาต่อหน่วยพื้นที่ของผิวหนังต่อเวลา (Flux)
D (m ² /s)	= ค่า Diffusion coefficient ของยา
Cv (mol/m ³)	= ความเข้มข้นของยา
h (m)	= ความหนาของผิวหนัง
K	= ค่าคงที่การแพร่กระจาย

2.11.2 เกสซ์กัณฑ์รูปแบบก่อกฟิล์มและเกสซ์กัณฑ์รูปแบบต่าง ๆ (dosage form)

1) พลาสเตอร์ปิดแผล (adhesive plaster)

พลาสเตอร์ปิดแผลเป็นสิ่งที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถใช้ติดแผลได้ทนนาน (21) ช่วยปิดแผลได้สนิท มีส่วนประกอบที่ฆ่าเชื้อทำให้ไม่เกิดการอักเสบ และไม่มีหนองเกิดขึ้น (22) ข้อเสียที่พบบ่อย คือ เกิดความเจ็บปวดจากการลอก แกะพลาสเตอร์ปิดแผลออกและทำให้เกิดการระคายเคือง การหลุดลอกของผิวหนังออกมา

2) ยาเตรียมรูปแบบกึ่งของแข็ง (semisolids)

ยาเตรียมรูปแบบกึ่งของแข็งโดยทั่วไปจะอยู่ในรูป ครีม (creams) เจล (gels) เพสท์ (pastes) ขี้ผึ้ง (ointment) (23) เป็นยาที่ในสภาพปกติจะคงตัวในภาชนะบรรจุ เมื่อใช้ทาบนผิวจะหลอมตัวเป็นของเหลวซึ่งง่ายต่อการถูกดูดซึมของผิวหนัง เหมาะกับผู้ที่ไม่ต้องการให้ยาผ่าน first-pass metabolism ช่วยลดอาการข้างเคียง

จากยา ทำให้เพิ่มความร่วมมือในการใช้ยา ข้อเสียที่พบได้บ่อย คือ เกิดการแพ้ เป็นคราบจากยา มีข้อจำกัดในการควบคุมปริมาณยาที่ขนส่ง (24)

3) แผ่นแปะผิวหนัง (patches)

แผ่นแปะผิวหนังเป็นการนำส่งยาทางผิวหนังซึ่งสะดวกในการบริหารยา ทำให้ระดับยาในเลือดค่อนข้างคงที่ ควบคุมปริมาณยาที่นำส่งได้ดีกว่ายาเตรียมรูปแบบกึ่งแข็ง แต่การนำส่งยาทางผิวหนังก็ไม่สามารถใช้กับยาได้ทุกชนิด เนื่องจากผิวหนังมีคุณสมบัติเป็นตัวกั้นขวางที่ดี จึงเป็นอุปสรรคในการนำส่งยาที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และยาที่ละลายน้ำได้ดี

4) ยารูปแบบกึ่งฟิล์ม (liquid bandage)

ยารูปแบบกึ่งฟิล์มมีลักษณะกึ่งโปร่งแสง เมื่อสเปรย์หรือทาลงบนแผล โดยตรงจะเกิดฟิล์มใสเคลือบบนแผลที่ยากต่อการสังเกตเห็น เหมาะกับแผลขนาดเล็กที่การความยืดหยุ่นมากกว่าการใช้พลาสติกแบบแผ่น ซึ่งยารูปแบบนี้จะปกคลุมที่ปลายประสาททำให้ช่วยลดอาการปวดและช่วยรักษาแผล โดยการรักษาสมดุลของความชุ่มชื้นในผิว ป้องกันแผลจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเนื้อตาย ซึ่งยาจะปกป้องแผลโดยการกึ่งฟิล์มใสบางๆ คลุมรอบแผลและผิวหนังรอบๆ ซึ่งจะช่วยรักษาแผลและเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาอีกด้วย (25)

2.11.3 คุณสมบัติของระบบกึ่งฟิล์ม

ระบบกึ่งฟิล์มที่ดีควรมีคุณสมบัติที่ยืดหยุ่นได้ทำให้สามารถบริหารยาได้ทุกบริเวณของผิวหนัง และสามารถติดทนบนผิวหนังได้ยาวนาน แห้งเร็วบางเบา ไม่รู้สึกเหนอะหนะ ลอกออกง่าย ไม่ละอะเสื้อผ้า ทำให้ไม่ต้องสูญเสียตัวยาสำคัญไปกับเสื้อผ้า (26)

2.11.4 ส่วนประกอบของระบบกึ่งฟิล์ม

1) ตัวยาสำคัญรูปแบบกึ่งฟิล์ม (liquid bandage)

ยารูปแบบกึ่งฟิล์มมีลักษณะกึ่งโปร่งแสง เมื่อสเปรย์ หรือทาลงบนแผล โดยตรงจะเกิดฟิล์มใสเคลือบบน แผลที่ยากต่อการสังเกตเห็น เหมาะกับแผลขนาดเล็กที่มีความยืดหยุ่นมากกว่าการใช้พลาสติกแบบแผ่น ซึ่งยารูปแบบนี้จะปกคลุมที่ปลายประสาท คุณสมบัติของตัวยาสำคัญที่นิยมใช้มักช่วยลดอาการปวดและช่วยรักษาแผล โดยการรักษาสมดุลของความชุ่มชื้นในผิว ป้องกันแผลจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเนื้อตาย ซึ่งยาจะปกป้องแผลโดยการกึ่งฟิล์มใสบางๆ คลุมรอบแผลและผิวหนังรอบๆ ซึ่งจะช่วยรักษาแผลและเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาอีกด้วย (27)

2) พอลิเมอร์

พอลิเมอร์เป็นส่วนประกอบสำคัญของพลาสติกยาแบบเหลว ควรมีลักษณะสำคัญ คือ สามารถเข้ากันได้กับสารอื่นๆในตำรับได้, ปลอดภัย, ไม่เป็นพิษ, ไม่ระคายเคืองผิวหนัง, มีความคงตัวในสภาวะต่างๆ และมีความสามารถในการเกิดระบบกึ่งฟิล์ม

2.1) Polyvinylbutyral (PVB) โพลีไวนิลบิวทิลอะครีเลต มีชื่อทางเคมีว่า poly [(2-propyl-1,3-dioxane-4,6-diyl) methylene] สูตรโครงสร้างเคมีคือ $(C_8H_{14}O_2)_n$ มีความยืดหยุ่น ไม่เป็นพิษ และสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

2.2) Polyvinylpyrrolidone (PVP) โพลีไวนิลไพโรลิโดน หรือเรียกว่า Polyvidone , Povidone, Kollidon มีชื่อทางเคมีว่า ethenylpyrrolidin-2-one เป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำ และเอทานอล 95% ได้ มีคุณสมบัติเป็นสารยึดติด ไม่ระคายเคืองผิวหนัง มีความสามารถในการดูดซับน้ำ (28)

2.3) Ethyl cellulose (EC) เอทิลเซลลูโลส หรือเรียกว่า cellulose, ethyl ether, ethylated cellulose, ethylcellulose, E462 เอทิลเซลลูโลสที่มีหมู่เอทิลน้อยกว่า 46.5% สามารถละลายได้ในเอทานอล 95% ,คลอโรฟอร์ม และเมทานอลไม่เป็นพิษ และไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง มีคุณสมบัติเป็นสารก่อก่อฟิล์มที่ดี และเพิ่มความเหนียวทนทานแก่ฟิล์ม (28)

2.4) Nitrocellulose (NC) ไนโตรเซลลูโลส หรือเรียกว่า cellulose nitrate, flash paper, flash cotton, flash string, gun cotton, collodion; pyroxylin ไนโตรเซลลูโลสสามารถละลายได้ในสารทำละลายอินทรีย์ ด้วยสายโซ่โมเลกุลที่แข็งแรงจึงสามารถก่อตัวเป็นแผ่นฟิล์มยืดหยุ่นที่แข็งแรง (29)

2.5) Plastoid[®] B พลาสตอยด์บี เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์มอนอเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ methyl methacrylate และ butyl methacrylate มีความเป็นกลางไม่มีประจุ ใช้เป็นสารก่อก่อฟิล์ม (film former) สำหรับผลิตภัณฑ์พลาสติกเทอร์ปริดแบบเหลวในการใช้ภายนอก (30)

3) ตัวทำละลาย

การละลายตัวยา พอลิเมอร์ และสารปรุงแต่งในตัวทำละลายที่เหมาะสมมีความสำคัญ เนื่องจากตัวทำละลายมีผลต่อการซึมผ่านเช่น น้ำ,ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ ตัวทำละลายผสมต่างๆ ระบบก่อก่อฟิล์มชนิดบาง (thin film forming compositions) มีองค์ประกอบสำหรับเป็นตัวทำละลาย หรือ ตัวตัวละลายร่วม (co-solvent) คือ เอทานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) ไอโซโพรพานอล

(isopropyl) ไอโซเพนเทน (isopentane) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) อะซีโตน (acetone) หรือจากองค์ประกอบเหล่านั้นผสมรวมกัน

การออกแบบระบบขึ้นรูปฟิล์มสำหรับการบริหารทางผิวหนังของยาประเภทต่าง ๆ เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน, ยาชาเฉพาะที่, NSAID, ยาแก้ปวดและยาแก้แพ้ มีข้อบ่งชี้ว่าสูตรที่เหมาะสมควรแห้งบนผิวหนัง ฟิล์มที่เกิดขึ้นไม่ควรยึดติดกับเสื้อผ้าของผู้ป่วยและคุณสมบัติเชิงกลของมันควรจะเอาชนะความเค้นที่เกิดจากการเคลื่อนไหวร่างกาย (tangential stress) (31)

4) Plasticizer

พลาสติกไซเซอร์ คือ สารที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับพอลิเมอร์ ใช้เมื่อต้องการเพิ่มคุณสมบัติ flexibility ให้กับพอลิเมอร์ทำให้สามารถอยู่บนผิวหนังหรือบาดแผลได้เมื่อมีการเคลื่อนไหวอย่างต่อเนื่อง และควรเลือกพลาสติกไซเซอร์ที่เข้ากันได้กับพอลิเมอร์และมีการซึมผ่านผิวหนังต่ำและคงทนต่อแรงดึงของฟิล์ม ตัวอย่างพลาสติกไซเซอร์ที่ใช้ ได้แก่ dibutyl sebacate, diethyl phthalate, triethyl citrate, propylene glycol, polyethylene glycol เป็นต้น (32)

2.11.5 การประเมินระบบก้อฟิล์ม

ประเมินระบบก้อฟิล์มจาก การวัดการไหลและความหนืดเพื่อประเมินลักษณะฟิล์มเมื่อทาบนผิว สามารถยึดเกาะกับผิวและไม่ไหลเยิ้ม การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส การยอมให้น้ำผ่าน เวลาในการแห้ง ของพลาสติกปิดแผลแบบเหลว ลักษณะความชุ่มชื้น กลิ่น การระคายเคืองต่อผิวหนัง เป็นต้น

2.12 การวัดการไหลและความหนืด

การไหลและความหนืด (rheology) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแรงและการเสียรูปของวัตถุในช่วงเวลาที่สนใจโดยที่แรงนั้นจะทำให้วัตถุเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างถาวร และเกิดการไหลของสาร โดยความสัมพันธ์ระหว่างแรงและการเสียรูปของของไหลจะถูกทดสอบด้วยการไหลแบบเฉือน (shear test experiment) เพื่อหาสมบัติการไหลและความหนืดนั้นๆ การทดสอบการไหลแบบเฉือนที่ใช้ทดสอบกันมาก เช่น การทดสอบเฉือนคงตัว (steady shear) การทดสอบเฉือนไป-มา (oscillatory shear) เป็นต้น ความเค้น ทำให้เกิดความเครียด (strain) หรือระยะการเปลี่ยนรูป (deformation) ความเค้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด (ดังรูปที่ 6) ตามลักษณะของแรงที่มากระทำ ดังนี้

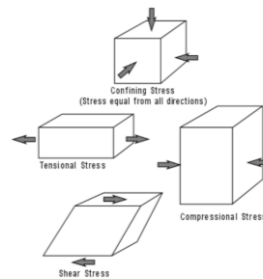
1. ความเค้นแรงดึง (tensile stress หรือ tensional stress) หมายถึง ความเค้นที่เกิดขึ้นเมื่อมีแรงดึงมากระทำตั้งฉากกับผิว ต่อพื้นที่ภาคตัดขวาง วัดค่าได้จากอัตราส่วนของแรงดึงที่ตั้งฉากกับผิว (F) ต่อพื้นที่ภาคตัดขวาง มีผลทำให้วัตถุยาวขึ้น

2. ความเค้นแรงอัด (compressive stress หรือ compressional stress) หมายถึงความเค้นที่เกิดขึ้นเมื่อมีแรงกดมากระทำ ตั้งฉากกับพื้นที่ภาคตัดขวาง เพื่อพยายามอัดให้วัสดุมีขนาดสั้นลง หา

ค่าได้จาก อัตราส่วนของแรงอัด (compressive force) ที่มากระทำตั้งฉากกับผิวต่อพื้นที่ภาคตัดขวาง มีผลทำให้วัตถุหดสั้นลง

3. ความเค้นแรงเฉือน (shear stress) หมายถึง ความเค้นที่เกิดขึ้นเมื่อมีแรงเฉือน ที่มากระทำให้ทิศทางขนานกับพื้นที่ภาคตัดขวาง เพื่อให้วัสดุเคลื่อนผ่านจากกัน หาค่าได้จากอัตราส่วนของแรงเฉือน (shear force) กับพื้นที่ภาคตัดขวาง ซึ่งขนาน กับทิศทางของแรงเฉือน (33)

การทดสอบการไหลและความหนืดของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (KINEXUS Lab+ รุ่น Mettler Toledo, Model : MS603S/01) เครื่องรีโอมิเตอร์จะทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบของตารางและกราฟ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยการ เปรียบเทียบกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate และ shear viscosity



รูปที่ 6 แสดงความเค้น (34)

ลักษณะการไหลของของไหลโดยทั่วไปสามารถแบ่งได้ 2 แบบ (ดังรูปที่ 7)

1. Newtonian fluid: เป็นลักษณะการไหลของของไหลที่เป็นไปตามการสันนิษฐานของ นิวตัน คือ ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ของไหลจะมีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงขึ้นกับอัตราเฉือน หรือ ความเร็ว ในการกวน ไม่ว่าจะกวนเร็วหรือกวนช้า ตัวอย่างเช่น น้ำมัน น้ำเชื่อม น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง นม กาแฟ กลีเซอริน แอลกอฮอล์ เป็นต้น

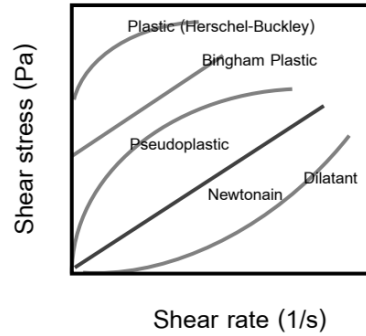
2. Non newtonian fluid: เป็นลักษณะการไหลของของไหลที่ไม่เป็นไปตามการสันนิษฐานของนิวตัน คือ ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ของไหลมีค่าความหนืดเป็นค่าไม่คงที่ การเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับอัตราเฉือน หรือ ความเร็วในการกวน ลักษณะการไหลแบบนี้แบ่งเป็น 4 แบบ

2.1 Pseudoplastic: ของไหลที่มีค่าความหนืดลดลง เมื่อเพิ่มอัตราเฉือน หรือ ยิ่งกวนเร็ว ยิ่งไหลง่าย พฤติกรรมแบบนี้แสดงสมบัติเป็น "shear thinning" เช่น น้ำผลไม้เข้มข้น กาวน้ำใส สารช่วยแขวนตะกอน สารละลายพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ สารละลายพอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นต้น

2.2 Diatant: ของไหลที่มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราเฉือน หรือ ยิ่งกวนเร็ว ยิ่งหนืด พฤติกรรมแบบนี้แสดงสมบัติเป็น "shear thickening" เช่น น้ำดินชั้น น้ำแป้ง เป็นต้น

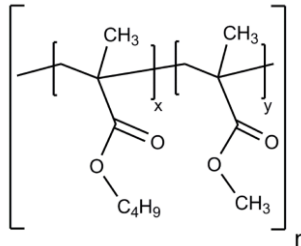
2.3 Bingham plastic: ของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอจึงจะเกิดลักษณะการไหลแบบ Newtonian fluid เช่น ยาสีฟัน นมช็อกโกแลต เป็นต้น

2.4 Plastic: ของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอเพื่อเอาชนะค่าความเค้น ณ จุดคราก (yield stress) ถึงจะเริ่มไหลได้ และจะไหลแบบ pseudoplastic หรือตามโมเดลของ Herschel-Buckley เช่น ซอสมะเขือเทศ สี ดินเหนียว มายองเนส เป็นต้น



รูปที่ 7 กราฟแสดงลักษณะการไหลของของเหลว (34)

2.13 พลาสตอยด์ (Plastoid[®] B)



รูปที่ 8 โครงสร้างพลาสตอยด์ (35)

พลาสตอยด์บี เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์มอนอเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ methyl methacrylate และ butyl methacrylate มีความเป็นกลาง ไม่มีประจุ (ดังรูปที่ 8) ใช้เป็นสารก่อฟิล์ม (film former) สำหรับผลิตภัณฑ์พลาสติกอปิดแผลแบบเหลวในการใช้ภายนอก

พลาสตอยด์เป็น matrix layers สำหรับการนำส่งยาในรูปแบบของการบริหารยาผ่านทางผิวหนัง (transdermal therapy system) มีลักษณะเป็นของแข็ง ผงละเอียดสีขาว มีปริมาณสารสำคัญอย่างน้อย 98% สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, butyl acetate, tetrahydrofuran, toluene, trichloroethylene และ methylene chloride (35)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางทางเคมีของพลาสติก (35)

Solvent	Dissolution rate (min)	Dynamic viscosity (mPa•s)	Haze of polymer solutions at 0 °C 23°C	
Plastoid [®] B	polymer conc.of the solution = 40%		$\eta_{sp/c} = 53 \text{ cm}^3/\text{g}$	
Ethyl alcohol	Insoluble	-	-	-
i-Butyl alcohol	25	91,000	0	0
i-propyl alcohol	20	234,000	1	5
Ethyl glycol	20	98,000	0	0
Methyl ethyl ketone	< 10	440	0	0
Methyl isobutyl ketone	10	1,075	0	0
Ethyl acetate	< 10	1,075	0	0
Butyl acetate, 98%	10	1,925	0	0
Ethyl glycol acetate	15	12,000	0	0
Toluene	< 5	500	0	0
Xylene	10	775	0	0

หมายเหตุ; internal haze scale, 0=no haze และ 5=milky-white and opaque appearance.

2.14 ระยะเวลาในการแห้ง

การประเมินระยะเวลาในการแห้งของตัวรับ โดยทำการกำหนดเวลาหากเมื่อเวลาผ่านไปตามเวลาที่กำหนดแล้ว ตัวรับที่นำมาประเมินมีความแห้งหรือปราศจากของเหลวแสดงว่าตัวรับใช้ระยะเวลานั้น ๆ ในการแห้ง หากเมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว ตัวรับยังไม่แห้งหรือยังมีของเหลวปรากฏอยู่ ให้ทำการประเมินซ้ำโดยเพิ่มระยะเวลาที่กำหนดในการแห้งของตัวรับ โดยระบบกึ่งฟิล์มที่ดีควรมีระยะเวลาในการแห้งที่น้อยที่สุด

2.15 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (texture analysis) เป็นวิธีหนึ่งในการศึกษาสมบัติเชิงกลของตัวรับ ซึ่งหมายถึง การวัดเนื้อสัมผัส (texture measurement) และการแปลความหมายของค่าที่วัดได้เป็นค่าสมบัติทางเนื้อสัมผัส (texture properties)

การทดสอบแรงดึง (tensile test หรือ tension test) โดยใช้ที่วัดค่าชนิด Tg ในการยึดตัวอย่างที่จะวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส จากนั้นกำหนดความสูงของเครื่องในการใช้ดึงตัวอย่างให้ขาด ซึ่งเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัสจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (stress) กับความเครียด (strain) (36)

โดยความเค้น (stress) หมายถึง แรงต้านภายในเนื้อวัสดุที่มีต่อแรงภายนอกที่มากระทำต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่

ความเครียด (strain) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวัสดุ (deformation) เมื่อมีแรงภายนอกมากระทำ (เกิดความเค้น)

การทดสอบแรงดึง แสดงถึง ความทนต่อแรงดึง (strength) และความยืดหยุ่นของระบบก่อกอฟิล์ม โดยแสดงในรูปของค่า ความเค้นสูงสุดต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของวัตถุที่ได้รับจนเกิดการฉีกขาด (tensile strength) มีหน่วยเป็น MPa และการยืดตัวค่าการยืดตัว ณ จุดขาด คิดเป็นร้อยละการยืดตัวของวัตถุที่จุดขาดเมื่อเปรียบเทียบกับความยาวเริ่มต้น (elongation at break) เป็นค่าที่บ่งบอกว่าฟิล์มมีความยืดหยุ่นหรือยืดตัวมากขึ้น และบ่งบอกความต้านแรงดึงขาดอ้างอิงมาจาก (37) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของระบบก่อกอฟิล์มที่เป็นวัสดุปิดแผลซึ่งต้องการคุณสมบัติที่ทนทานและต้องการความยืดหยุ่น

2.16 การยอมให้น้ำผ่าน

การแพร่ผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability; WVP) เป็นค่าที่ใช้วัดความสามารถของไอน้ำที่จะแพร่ผ่านวัสดุแผ่นบาง เช่น แผ่นฟิล์ม เป็นต้น โดยทำการศึกษาภายใต้อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ค่าหนึ่ง กลไกการแพร่ผ่านนี้ ประกอบด้วยกระบวนการละลาย (solubility) และการแพร่ (diffusion) โดยที่ไอน้ำจะแพร่เข้ามาที่ผิวด้านหนึ่งของแผ่นฟิล์ม แล้วเกิดการละลายบนผิวและแพร่ผ่านภายในแผ่นฟิล์มออกสู่อีกด้านหนึ่งของแผ่นฟิล์ม (38)

คำนวณค่า water vapor transmission rate (WVTR) จากความชันของกราฟดังรูปที่ 9 และสมการที่ 5

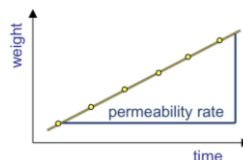
$$\text{Water Vapor Transmission Rate (WVTR)} = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1} \text{ _____ (สมการที่ 5)}$$

ซึ่ง W_1 คือ น้ำหนักของแคลเซียมคลอไรด์ที่เวลา t_1

W_2 คือ น้ำหนักของแคลเซียมคลอไรด์ที่เวลา t_2

t_1 คือ เวลาเริ่มต้น

t_2 คือ เวลาสิ้นสุด



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักสารที่เพิ่มและระยะเวลาที่ผ่านไป (39)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

- 1) สารสกัดใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata* extract) จังหวัดชลบุรี
- 2) พลาสตอยด์ บี (Plastoid®B, Lot No. G171110026)
- 3) เอทานอล (ethanol, Lot No. E702512501)
- 4) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate, Lot No. 1909051114)
- 5) ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol, Batch No. G201102)
- 6) โพลีเอทิลีนไกลคอล 400 (polyethylene glycol 400, Batch No. 00400010076736)
- 7) เมทานอล (methanol, Lot No. M209744001)
- 8) อะซิโตนไนไตรท์ (acetonitrile, Lot No. A113344001)
- 9) กรดอะซิติก (acetic acid, Lot No. 1666615)
- 10) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid, Lot No. O602112501)
- 11) น้ำเกลือ (0.9% normal saline, Lot No. 1108051)
- 12) ไดเมทิล ซัลโฟไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO, Lot No.18F294012)
- 13) สารมาตรฐาน Gallic acid (Lot No. AO405480)
- 14) สารมาตรฐาน Apigenin (Lot No. BCBZ4566)
- 15) สารมาตรฐาน Quercetin (Lot No. STBH0486)
- 16) สเตรปโตคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)
- 17) สเตรปโตคอคคัส อีพิดERMิดิส (*Staphylococcus epidermidis*)
- 18) คลินดามัยซิน (clindamycin, Azupharma)
- 19) โซเดียมคลอไรด์ 0.85% (sodium chloride, Lot No. 1830260592)
- 20) อาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (mueller hinton agar, Lot No. 7271779, Difco™)
- 21) อาหารแข็ง Mueller Hinton Broth (mueller hinton broth, Lot No. 7009699, Difco™)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balances, MS603S/01, METTLER-TOLEDO, Switzerland)
- 2) เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (texture analyzer, TA.XT.Plus, Stable Micro Systems Ltd., UK)
- 3) เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer, UC152D, BioCote[®], UK)
- 4) เครื่องเขย่าสาร (vortex, G560E, Scientific Industries, USA)
- 5) เครื่องบ่มเชื้อ (incubator, RI115, BINDER, Germany)
- 6) เครื่องล้างความถี่สูง (ultrasonic cleaner Set, WUC-D22H, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Korea)
- 7) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, SPD-M20A, Bara Scientific, Japan)
- 8) เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer, Labconco, Edwards limited, UK)
- 9) เครื่องวัดความหนืด (rheometer, Kinexus, Malvern, UK)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, MPW-260R, MPW MED. Instruments, USA)
- 11) ไมโครปิเปตต์ (micropipette, Pipet-Lite XLS+, Mettler Toledo, USA)
- 12) เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator, R-100, Buchi, Thailand)
- 13) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader, FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany)
- 14) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave, HVA-85/110, HIRAYAMA, Japan)

3.2 การสกัดสารจากใบสาบเสือ

3.2.1 การเตรียมใบสาบเสือ

ใบสาบเสือเก็บบริเวณตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนเมษายน- พฤษภาคม โดยใช้ส่วนของใบ ทั้งใบแก่และใบอ่อน ซึ่งจะนำใบสาบเสียดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วทิ้งไว้ รอกะทั่งน้ำระเหยจนหมด ในตู้ดูดไอสารเคมี จากนั้นนำใบสาบเสือบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบดใบสาบเสือที่แห้งแล้ว จนได้ผงหยาบของใบสาบเสือ (40)

3.2.2 การสกัดสารจากใบสาบเสือ

ซึ่งผงหยาบของใบสาบเสือ 20 กรัม ใส่ในปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายเอทานอล (95% Ethanol) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษพอยล์ แช่หมักไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการคนสารสกัดทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วทำการระเหยตัวทำละลายด้วย

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ด้วยความดันเริ่มต้น 200 mBar และลดความดันลงครั้งละ 5 mBar จนตัวทำละลายระเหยออกมา และคงความดันไว้ที่ 80 mBar โดยควบคุมอุณหภูมิของ water bath ที่ 45 องศาเซลเซียสระดับการหมุนที่ level 2.5 รอจนกว่าตัวทำละลายระเหยจนหมด จะได้สารสกัดสีเขียวเข้มข้น (crude extract) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (40)

การคำนวณร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบของสารสกัดใบสาบเสือ (percentage yield of crude extract powder) ดังสมการที่ 6

$$\text{ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดจากการระเหยแห้ง}}{\text{น้ำหนักใบสาบเสือที่ใช้}} \times 100 \quad \text{---(สมการที่ 6)}$$

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบสาบเสือ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ในช่วงความเข้มข้น 1.5625-100 µg/mL โดยชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานแต่ละชนิด ชนิดละ 1 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายภายในเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการปรับปริมาตร และผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากความเข้มข้น 100 µg/mL เป็น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 µg/mL ตามลำดับ จะได้สารละลายมาตรฐานทั้งหมด 7 ความเข้มข้น และกรองสารละลายด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm ก่อนบรรจุลงใน HPLC vial (41)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือ

เตรียมตัวอย่างสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยชั่ง crude extract ของสารสกัดใบสาบเสือ 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm ก่อนบรรจุลงใน HPLC vial (41)

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร ด้วยเทคนิค HPLC

เครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu ประกอบด้วย pump รุ่น LC-20AD ต่อกับเครื่องตรวจวัดยูวี รุ่น SPD-20A และใช้คอลัมน์ C₁₈ ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร เป็นคอลัมน์แยกตัวทำละลายภายในเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (isocratic conditions) คือ methanol : acetonitrile : acetic acid : phosphoric acid : water เท่ากับ 200:100:10:10:200 โดยปริมาตร

กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.6 mL/min ตรวจวัดสัญญาณที่ 272 นาโนเมตร ปริมาตรฉีดตัวอย่างสารเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ retention time เท่ากับ 30 นาที (41)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

3.4.1 การเตรียมสารสกัดใบสาบเสือในการทดสอบ

เตรียมตัวอย่าง (stock solution) ของสารสกัดใบสาบเสือ โดยชั่ง crude extract ของสารสกัดใบสาบเสือจำนวน 50 มิลลิกรัม ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายเอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ได้สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 50 mg/mL แล้วใช้เครื่องเขย่าสาร ผสมสารสกัดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด จากนั้นเจือจางสารสกัดใบสาบเสือให้ได้ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 mg/mL ตามลำดับ (42)

3.4.2 การเตรียมการเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยเชื้อแบคทีเรียจะต้องอยู่ในระยะที่เซลล์พร้อมที่จะเจริญหรือแบ่งเซลล์ได้ และควรเป็นแบคทีเรียที่มีอายุไม่มากนัก โดยทั่วไปควรใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่มากกว่า 24 ชั่วโมง และปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมประมาณ 10^8 CFU/ml โดยมีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

เชื้อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ mueller hinton agar (MHA) ประมาณ 2-3 โคโลนี ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mueller hinton broth (MHB) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้นำเชื้อมาเจือจางให้ได้ประมาณ 10^8 CFU/ml โดยเจือจางด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (normal saline solution, 0.85% NSS) ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 1×10^8 CFU/ml) (42)

3.4.3 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดทดลองพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดละ 19.8 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่ปรับความขุ่นแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 เชื้อ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตผสมให้เข้ากัน

นำหลอดทดลองจำนวน 26 หลอด ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง เขียนค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือกำกับไว้ที่หลอดทดลองที่ 1- 6 , 7-12 และ 13-18 ได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 mg/mL แล้วใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดสารสกัดใบสาบเสือลงในหลอดทดลองที่ 1-18 ที่เขียนกำกับไว้ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ลงในหลอดทดลองที่ 1-6 ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. epidermidis* ลงในหลอดทดลองที่ 7-12 ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร

ส่วนหลอดทดลองที่ 13-18 ปีเปิดอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ลงไป ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ 1- 6 และ 7-12 ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) จากนั้น ปีเปิดตัวทำละลายเอทานอลลงในหลอดทดลอง 3 หลอด ปริมาตร 80 ไมโครลิตร โดยหลอดแรกมีอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร, หลอดที่สอง มีอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. epidermidis* ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร และหลอดที่สามมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร แล้วปีเปิด clindamycin ความเข้มข้น 25 mg/mL ลงในหลอดทดลองอีก 2 หลอด ปริมาตร 80 ไมโครลิตร โดยหลอดที่หนึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร และหลอดที่สองมีอาหารเลี้ยงเชื้อ *S. epidermidis* ปริมาตร 1,920 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การอ่านผลการหา MIC คือ เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมงแล้ว ให้สังเกตหลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ ถือว่าเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ แสดงว่าหลอดทดลองนี้เป็นค่า MIC (42)

3.4.4 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวตามการทดลอง 3.3 สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดทดลองที่ทำการทดสอบหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมา streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การอ่านผลการหา MBC คือ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้จะพบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (42)

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion method

การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยระบุตำแหน่งที่จะเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 7 หลุม จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วกดกับข้างหลอดทดลอง ให้พอหมาดๆ จากนั้น swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยเริ่มจากเส้นผ่านศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถ้าให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อประมาณ 60 องศา แล้วป้ายด้วยวิธีการเดิม ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นใช้ปลายหลอดหยดด้านที่ต่อกับจุกยาง เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้เป็นหลุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 7 หลุม แล้วปีเปิด

สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 mg/mL ลงใน หลุมที่ 1-5 หลุมละ 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตตัวทำละลายเอทานอลลงในหลุมที่ 6 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และปิเปต clindamycin ความเข้มข้น 25 mg/mL ลงในหลุมที่ 7 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร สุดท้ายนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การอ่านผล คือ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบ การเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่ไม่สามารถ ฆ่าเชื้อได้ จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะของโคโลนี แล้วนำมาวัดเส้น ผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญ (inhibition zone) โดยวัดจากขอบโซน ข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหลุม บันทึกหน่วยเป็น มิลลิเมตร (42)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ

3.5.1 การเตรียมสารสกัดใบสาบเสือ

เตรียมสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยชั่ง crude extract ของสาร สกัดใบสาบเสือ 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลาย เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายจากความ เข้มข้น 1 mg/ml เป็น 0.5, 0.25, 0.125, 0.625 และ 0.3125 mg/mL ตามลำดับ จะได้ สารละลายทั้งหมด 6 ความเข้มข้น

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 100 µg/mL จากนั้นเจือจาง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจากความเข้มข้น 100 µg/mL เป็น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.03906 และ 0.1953 µg/mL ตามลำดับ โดยจะใช้ความ เข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพียง 7 ความเข้มข้น คือความเข้มข้นตั้งแต่ 12.5 µg/mL ถึง 0.1953 µg/mL

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS assay)

เตรียมสารละลายเอบีทีเอสความเข้มข้น 7 mM โดยเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (43) และแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่สารละลายมาตรฐาน gallic acid (ความเข้มข้น 12.5 - 0.1953 µg/mL) สารละลายสารสกัดใบสาบเสือ (ความ เข้มข้น 1 - 0.3125 mg/mL) และตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นผสมสารละลายใน 96-well microplates ดังรูปที่ 10 โดยทำแต่ละส่วน 3 ซ้ำทุกความเข้มข้นของสารละลาย เริ่ม จากปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ 0.1953 µg/mL ปริมาตร 40 µL ผสมกับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 160 µL และปิเปตสารละลาย

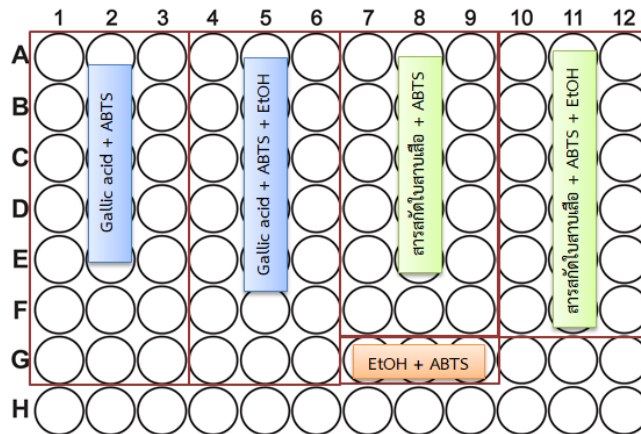
มาตรฐานความเข้มข้นถัดไปเรื่อยๆ ทำจนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้นตามลำดับ ต่อมาปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 μL ตามลำดับความเข้มข้น

ในส่วนของสารละลายสารสกัดสาบเสือ ทำการปิเปตสารละลายสารสกัดสาบเสือเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก ปริมาตร 40 μL ผสมกับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 160 μL ต่อมาปิเปตสารละลายสารสกัดใบสาบเสือ 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 μL ทำตามลำดับความเข้มข้น และสุดท้ายเตรียมชุดควบคุมโดยปิเปตเอทานอล 80 μL และเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 μL จากนั้นอ่านผลการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging activity) (44) ดังสมการที่ 7

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \text{ __ (สมการที่ 7)}$$

ซึ่ง Abs control (absorbance control) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุม

Abs sample (absorbance sample) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการศึกษา



รูปที่ 10 ตำแหน่งการเติมสารต่างๆ ใน 96-well microplates (44)

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

เตรียมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 60 μM (23) โดยเตรียมจากสารละลายความเข้มข้น 1 mmol และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 60 μM

แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่สารละลายมาตรฐาน gallic acid (ความเข้มข้น 12.5 - 0.1953 $\mu\text{g}/\text{mL}$) สารละลายสารสกัดใบสาบเสือ (ความเข้มข้น 1 - 0.3125 mg/mL) และตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นผสมสารละลายใน 96-well microplates ดังรูปที่ 11 โดยทำแต่ละส่วน 3 ซ้ำ ทุกความเข้มข้นของสารละลาย เริ่มจากปิเปตสารละลาย

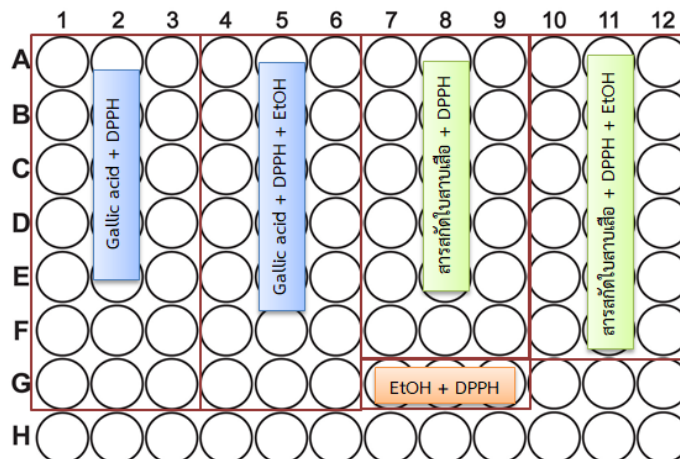
มาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ 0.1953 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 40 μL ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช ปริมาตร 160 μL และปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นถัดไปเรื่อยๆ ทำจนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้นตามลำดับ ต่อมาปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL ทำตามลำดับความเข้มข้นแบบเดิม

ในส่วนของสารละลายสารสกัดสาบเสือ ทำการปิเปตสารละลายสารสกัดสาบเสือเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก ปริมาตร 40 μL ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช ปริมาตร 160 μL ต่อมา ปิเปตสารละลายสารสกัดใบสาบเสือ 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL ทำตามลำดับความเข้มข้น และสุดท้ายเตรียมชุดควบคุมโดยปิเปตเอทานอล 80 μL และเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL จากนั้นอ่านผลการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) ดังสมการที่ 8

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \quad \text{(สมการที่ 8)}$$

ซึ่ง Abs control (absorbance control) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุม

Abs sample (absorbance sample) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการศึกษา



รูปที่ 11 ตำแหน่งการเติมสารต่างๆ ใน 96-well microplates (44)

3.6 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)

การทดสอบการแข็งตัวของเลือดของสารสกัดใบสาบเสือ โดยใช้เลือดวัวในการทดสอบ ซึ่งจะทำการแยกเกล็ดเลือดออกจากส่วนประกอบของเลือดทั้งหมดด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) นำเลือดวัวมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนใส (supernatant) ออกจากตะกอนด้านล่าง จากนั้นนำส่วนตะกอนมาทำการ

ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ใน 0.85% NaCl solution ที่ความเร็ว 400 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนใส่ออกจากตะกอนด้านล่าง ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำด้วย 0.85% NaCl solution จนกว่า ส่วน supernatant จะใส จากนั้นเก็บส่วนตะกอนด้านล่าง (platelets) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ (ไม่เกิน 5 วัน)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบสาบเสือ ทำโดยการเจือจางตัวอย่างเลือดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในสารละลายน้ำเกลือ (normal saline) ในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ มาผสมกับตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้วในอัตราส่วน 1:1 (v/v) และใช้ DMSO และ normal saline เป็นสารละลายควบคุม หลังจากนั้นสังเกตผลการทดสอบการแข็งตัวของเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (17)

การอ่านผล คือนำสารละลายผสมระหว่างสารสกัดใบสาบเสือและตัวอย่างเลือดส่องดูการแข็งตัวของเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเกิดการเกาะกลุ่มกันของเลือดแสดงว่าสารสกัดใบสาบเสือสามารถทำให้เลือดแข็งตัวได้

3.7 การเตรียมระบบก่อก้อนฟิล์ม

3.7.1 การหาความเข้มข้นของพอลิเมอร์

ใช้พอลิเมอร์ คือ Plastoid®B (35) โดยเตรียม 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w และใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Plastoid®B

Ingredients	formulations (%w/w)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Plastoid®B	5	10	15	20	25	30	35
ethyl acetate	95	90	85	80	75	70	65

3.7.2 การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของระบบก่อก้อนฟิล์ม

ละลาย Plastoid®B ใน ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 %w/w โดยการปั่นกวนด้วยเครื่อง magnetic bar จนพอลิเมอร์พองตัวสมบูรณ์

นำสารละลายพอลิเมอร์ที่พองตัวสมบูรณ์แล้ว มาทดสอบสมบัติการก่อก้อนฟิล์ม โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เช่น สี, กลิ่น, ความยาก-ง่ายในการทาลงบนผิวหนัง, ระยะเวลาการแห้งของตำรับ, ความยืดหยุ่นของฟิล์ม, การไหลและความหนืด

3.7.3 การหาชนิดและปริมาณตัวทำละลาย

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol ในการละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 3.7.2 ด้วยสัดส่วนต่างๆ ดังตารางที่ 3

นำตำรับที่เตรียมได้ มาทดสอบสมบัติการก่อฟิล์ม โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ความยาก-ง่ายในการทาลงบนผิวหนัง ระยะเวลาการแห้งของตำรับ ความยืดหยุ่นของฟิล์ม การไหลและความหนืด

ตารางที่ 3 การหาชนิดและปริมาณของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด

Ingredients	formulations (%w/w)				
	13	14	15	16	17
Plastoid®B	30				
ethyl acetate	70	56	42	28	14
isopropyl alcohol	0	14	28	42	56

3.7.4 การหาปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เหมาะสม

จากขั้นตอนที่ 3.7.3 ของการทดลองระบบก่อฟิล์ม นำมาเติมพลาสติกไซเซอร์ คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล 400 (polyethylene glycol 400) เพื่อเพิ่มคุณสมบัติยืดหยุ่นของระบบก่อฟิล์ม โดยใช้ PEG 400 2 ความเข้มข้น คือ 2 และ 5% w/w ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 การเตรียมระบบก่อฟิล์ม โดยใช้พอลิเมออร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิดและเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2% w/w

Ingredients	formulations (%w/w)				
	1	2	3	4	5
Plastoid®B	30				
ethyl acetate	68	55	41	27	13
isopropyl alcohol	0	13	27	41	55
polyethylene glycol 400	2	2	2	2	2

ตารางที่ 5 การเตรียมระบบก่อฟิล์ม โดยใช้พอลิเมออร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิดและเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5% w/w

Ingredients	formulations (%w/w)				
	7	8	9	10	11
Plastoid®B	30				
ethyl acetate	65	53.5	39.5	25.5	11.5
isopropyl alcohol	0	11.5	25.5	39.5	11.5
polyethylene glycol 400	5	5	5	5	5

3.8 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

3.8.1 การเตรียมตัวอย่าง

เลือกสูตรตำรับจากขั้นตอนที่ 3.7.3 และ 3.7.4 ที่มีระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง การไหลและความหนืด และเนื้อสัมผัสที่มีความใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด (reference product) มากที่สุดจำนวนสองสูตรตำรับ แล้วนำมาเติมสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ และฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นนำไปปั่นผสมด้วยเครื่อง Magnetic stirrer จนพอลิเมอร์พองตัวสมบูรณ์ วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะผิว ความใส ความยืดหยุ่น และการลอกออกจากผิวสัมผัส ทำโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion Method

การทดสอบจะทำตามขั้นตอนที่ 3.4.5 ด้วยวิธี Agar well diffusion Method และใช้ตัวอย่างจากตำรับที่เตรียมได้ในขั้นตอน 3.8.1 โดยใช้ปลายหลอดหยดด้านที่ต่อกับจุกยางเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้เป็นหลุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุม แล้วเปิดสารตัวอย่างที่มีสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยมีความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 mg/mL ตามลำดับ ลงในหลุมที่ 1-3 หลุมละ 0.2 มิลลิลิตร ส่วนในหลุมที่ 4 เปิดสารตัวอย่างในตำรับที่ไม่ได้เติมสารสกัดใบสาบเสือลงไป ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และหลุมที่ 5 เปิดสารตัวอย่างในตำรับที่ไม่ได้เติมสารสกัดใบสาบเสือ และผสมกับ clindamycin ความเข้มข้น 25 mg/mL ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (42)

3.8.3 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability)

วัดการซึมผ่านของไอน้ำของตำรับพลาสติกปิดแผลชนิดเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 3.8.1 โดยมีขั้นตอนคือ ใช้ขวดแก้วทรงกระบอก บรรจุแคลเซียมคลอไรด์ 15 กรัม ลงในขวด แล้วเกลี่ยให้เรียบ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มยึดกับฝาขวด (แผ่นฟิล์มมีความหนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตร) ปิดปากขวดให้สนิท ชั่งน้ำหนักที่เวลาเริ่มต้น แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 % ± 5 RH และทำการบันทึกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของขวด ทุกวันที่เวลาเดียวกัน จนครบ 5 วัน แล้วนำค่าน้ำหนักที่เพิ่มมาสร้างกราฟ และคำนวณค่า water vapor transmission rate (WVTR) จากความชันของกราฟ (39) ดังสมการที่ 9

$$\text{Water vapor transmission rate (WVTR)} = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1} \text{ (สมการที่ 9)}$$

ซึ่ง W_1 คือ น้ำหนักของแคลเซียมคลอไรด์ที่เวลา t_1

W_2 คือ น้ำหนักของแคลเซียมคลอไรด์ที่เวลา t_2

t_1 คือ เวลาเริ่มต้น

t_2 คือ เวลาสิ้นสุด

3.9 การทดสอบหาระยะเวลาการแห้งของพลาสติกปิดแผลชนิดเหลว (time to dry)

หาระยะเวลาการแห้งของพลาสติกปิดแผลชนิดเหลว ใน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเลือก ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของพอลิเมอร์ การหาชนิดและปริมาณตัวทำละลาย และการเลือก ปริมาณพลาสติกไซเซอร์ ที่เหมาะสม เพื่อเทียบระยะเวลาการแห้งกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด ทำ โดยนำตัวรับในที่เตรียมได้หยดลงใน plate ที่สะอาด ประมาณ 10-15 หยด (น้ำหนักสารที่ได้ ประมาณ 0.2-0.5 กรัม) หลังจากนั้นนำ plate ที่มีสารตัวอย่างไปขึ้นบนเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จับเวลา และจดบันทึกน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ได้ทุกๆ 5 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0 - 60 นาที เพื่อดู แนวโน้มของน้ำหนักสารตัวอย่างที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

3.10 การทดสอบการไหลและความหนืด (rheological properties)

ทดสอบการไหล และความหนืดด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (KINEXUS Lab + รุ่น Mettler Toledo, Model : MS603S/01) โดยเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างกันที่ความเข้มข้นของพลาสติกไซ เซอร์ คือ PEG 400 2%w/w และ PEG 400 5%w/w และปริมาณและความเข้มข้นของตัวทำละลาย เริ่มจากตัวอย่างลงบนจานวัดด้านล่างในปริมาณที่จานวัดด้านบนจะลงมาประกบที่พอดีในแนว ระนาบ จากนั้นเครื่องรีโอมิเตอร์จะทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบ ของตารางและกราฟ และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยการ เปรียบเทียบกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate และ shear viscosity โดยกำหนด shear rate เท่ากับ $1s^{-1}$ แล้วเลือกสูตรตัวรับที่มีค่า shear viscosity ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด

3.11 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

เตรียมตัวอย่างสารในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของแต่ละสูตรตัวรับ

ตัวอย่างที่	สูตรตัวรับ		
	ตัวทำละลาย (ethyl acetate : isopropyl alcohol)	Plastoid®B (%w/w)	PEG 400 (%w/w)
1	(68 : 0)	30	2
2	(55 : 13)	30	2
3	(41 : 27)	30	2
4	(27 : 41)	30	2
5	(13 : 55)	30	2
7	(65 : 0)	30	5
8	(53.5 : 11.5)	30	5
9	(39.5 : 25.5)	30	5
10	(25.5 : 39.5)	30	5

11	(11.5 : 11.5)	30	5
13	(70 : 0)	30	-
14	(56 : 14)	30	-
15	(42 : 28)	30	-
16	(28 : 42)	30	-
17	(14 : 56)	30	-

นำสารละลายที่เตรียมได้เทลงใน plate กระຈก ขนาด 5 x 15 X 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ให้ได้น้ำหนักเท่ากันทุกตัวอย่าง และมีความหนาของแผ่นฟิล์มใกล้เคียงกัน รอจนตัวอย่างแห้งสนิท นำแผ่นฟิล์มมาตัดให้มีขนาดเท่ากับ 1 x 10 เซนติเมตร จำนวน 6-8 ชิ้นต่อตัวอย่าง จากนั้นตัดเทปใสติดบริเวณด้านบนและล่างของฟิล์มขนาด 1 เซนติเมตรเท่ากันทุกชิ้น โดยกำหนดให้เหลือพื้นที่ในการวัด 8 เซนติเมตร จากนั้นนำไปศึกษาด้วยเครื่อง texture analyzer

3.12 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ระยะเวลาการแห้งของตำรับ, ความยืดหยุ่นของฟิล์ม, การไหลและความหนืด โดยทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (\pm SD) ในการเปรียบเทียบความแตกต่าง

การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทดสอบ โดยใช้สถิติ one way ANOVA และใช้การเปรียบเทียบด้วย p -value หรือ sig (probability) ของค่าสถิติที่คำนวณได้กับค่า α ที่กำหนดโดยใช้ โปรแกรมสถิติวิเคราะห์ SPSS และ โปรแกรม Excel

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือ

4.1.1 ลักษณะของสารสกัดจากใบสาบเสือ

สารสกัดมีลักษณะเป็นสารขุ่นหนืดสีเขียวเข้ม แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 สารสกัดจากใบสาบเสือ

4.1.2 การคำนวณหาปริมาณสารสกัดของใบสาบเสือ (% yield of crude extract powder)

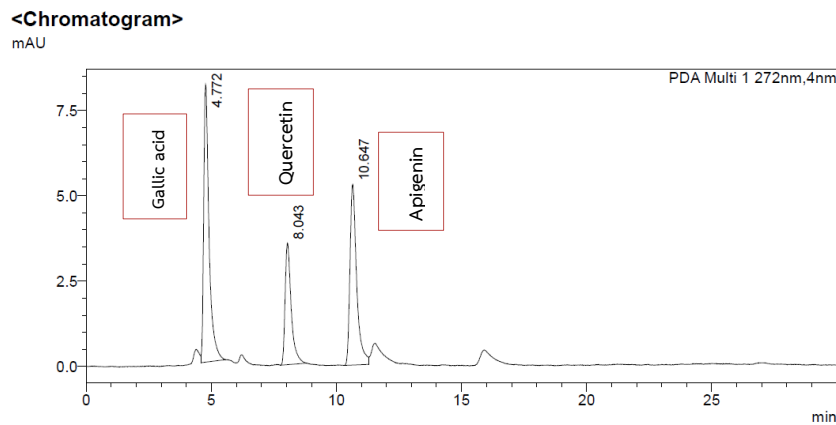
$$\text{จาก ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดจากการระเหยแห้ง}}{\text{น้ำหนักใบสาบเสือที่ใช้}} \times 100 \text{ (สมการที่ 6)}$$

การสกัดสารตัวอย่างจากใบสาบเสือ 3 ครั้ง พบว่าปริมาณสารสกัดมีค่า 12.40%, 10.55% และ 12.07% ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัด เท่ากับ 11.67% (± 0.99) สารสกัดสาบเสือที่ได้นำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและใช้ในการพัฒนาตำรับพลาสติกปิดแผลแบบเหลวต่อไป

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบสาบเสือ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

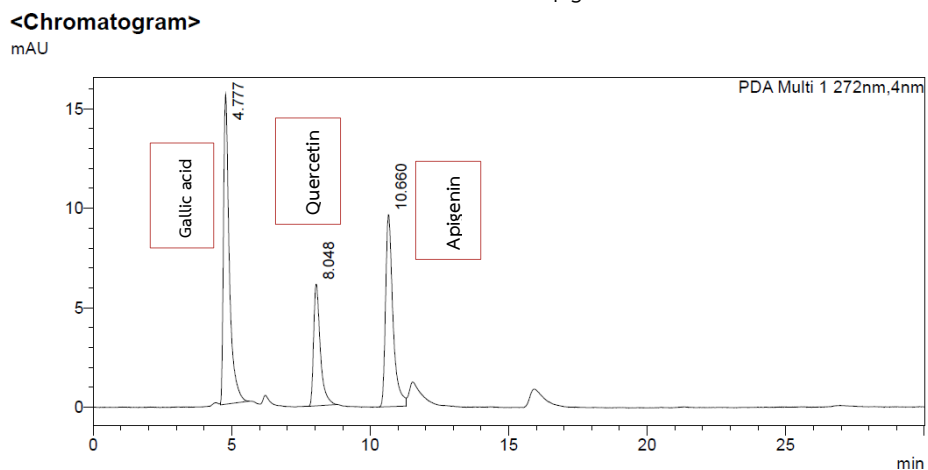
4.2.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารมาตรฐาน Gallic acid จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 4-5 นาที, สารมาตรฐาน Quercetin จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 8-9 นาที และสารมาตรฐาน Apigenin จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 10-11 นาที ดังโครมาโตแกรมในรูปที่ 13, 14, 15, 16, 17, 18 และ 19

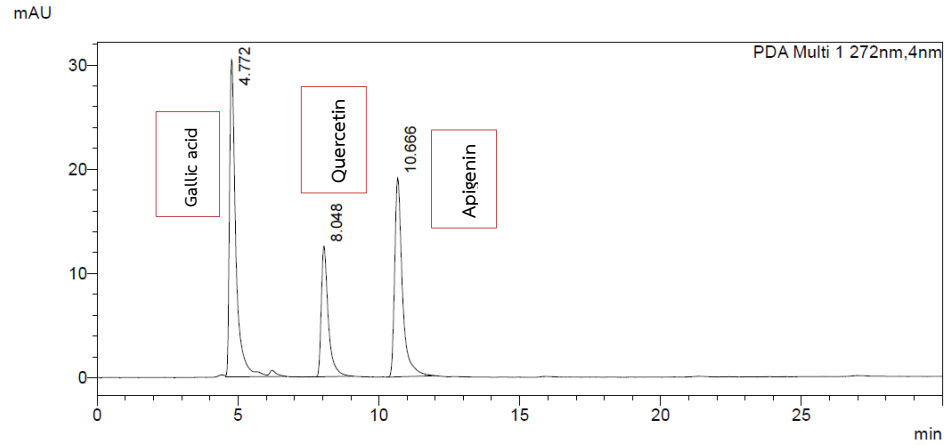


รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ

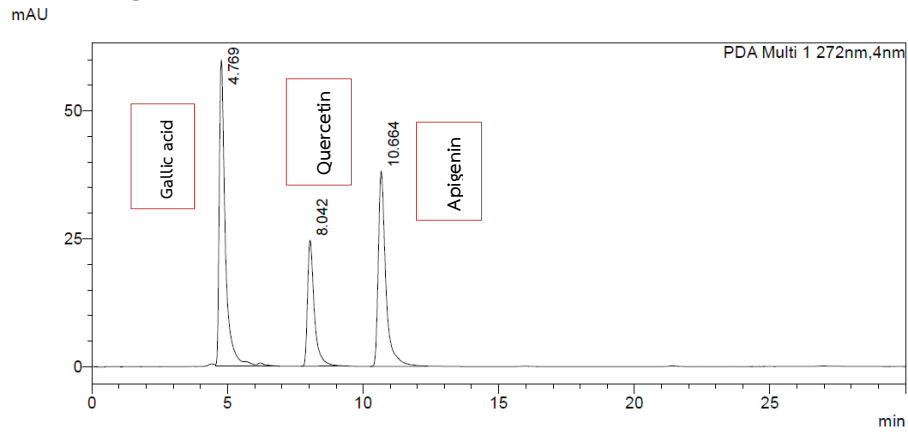
ที่ความเข้มข้น 1.5625 $\mu\text{g/mL}$



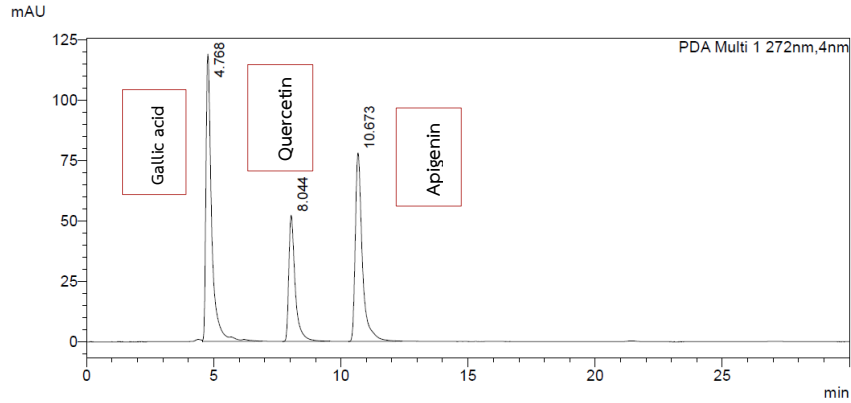
รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับที่ความเข้มข้น 3.125 $\mu\text{g/mL}$

<Chromatogram>

รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 6.25 µg/mL

<Chromatogram>

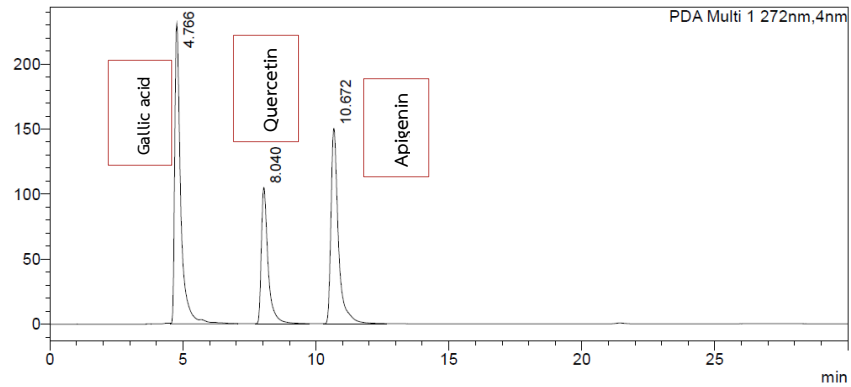
รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL

<Chromatogram>

รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 25 µg/mL

<Chromatogram>

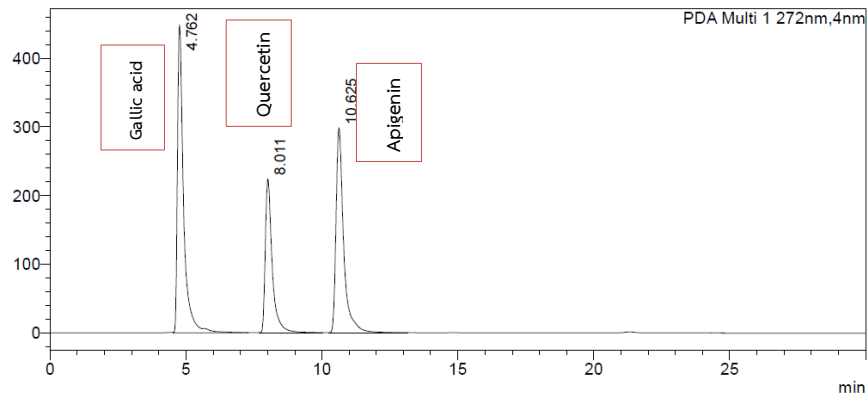
mAU



รูปที่ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL

<Chromatogram>

mAU

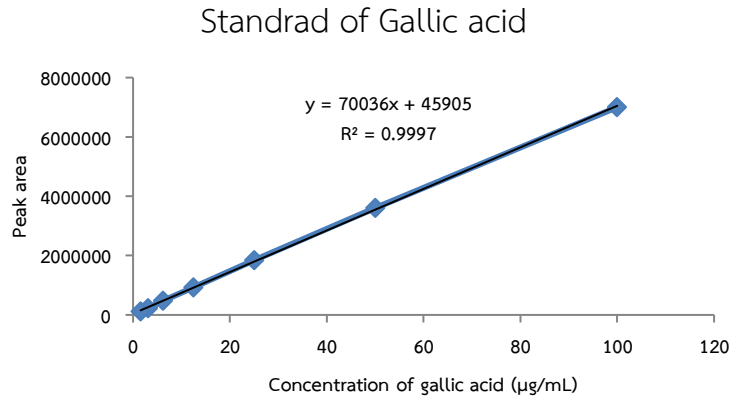


รูปที่ 19 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL

4.2.2 กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

1) สารละลายมาตรฐาน Gallic acid

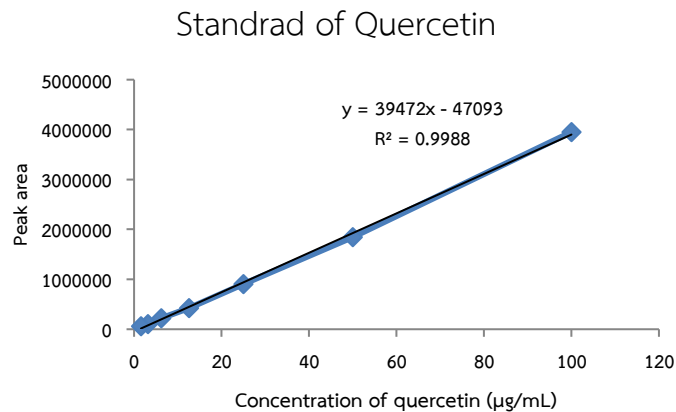
จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 1.5625-100 µg/mL พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid มีค่า correlation coefficient, R^2 เท่ากับ 0.9997 และสมการเส้นตรง คือ $y = 70036x + 45905$ ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2) สารละลายมาตรฐาน Quercetin

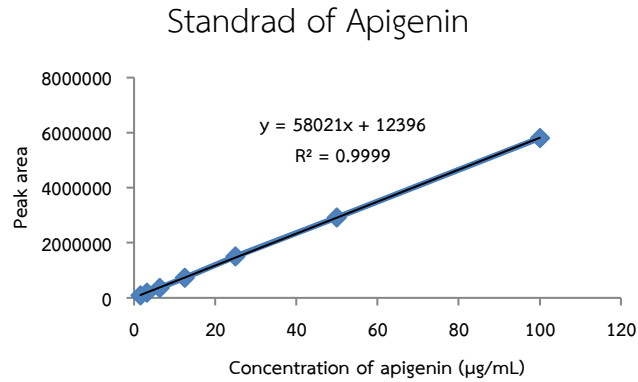
จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Quercetin ในช่วงความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Quercetin มีค่า correlation coefficient, R^2 เท่ากับ 0.9988 และสมการเส้นตรง คือ $y = 39472x - 47093$ ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Quercetin จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

3) สารละลายมาตรฐาน Apigenin

จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Apigenin ในช่วงความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Apigenin มีค่า correlation coefficient, R^2 เท่ากับ 0.9999 และสมการเส้นตรง คือ $y = 58021x + 12396$ ดังรูปที่ 22



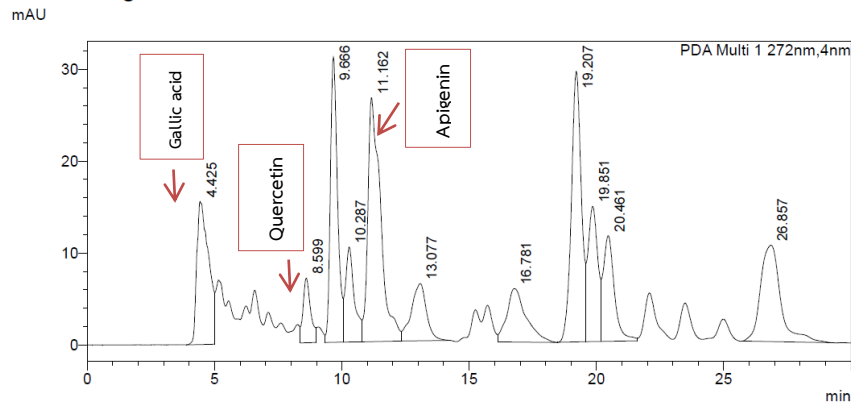
รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Apigenin จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

4.2.3 โครมาโตแกรมของสารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือ

1) การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือ

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือ 1 mg/ml (1000 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ ได้แก่ Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ซึ่งสารสำคัญ Gallic acid ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 4.4 นาที, สารสำคัญ Quercetin ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 8.5 นาที และสารสำคัญ Apigenin ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 11.1 นาที ดังรูปที่ 23, 24 และ 25

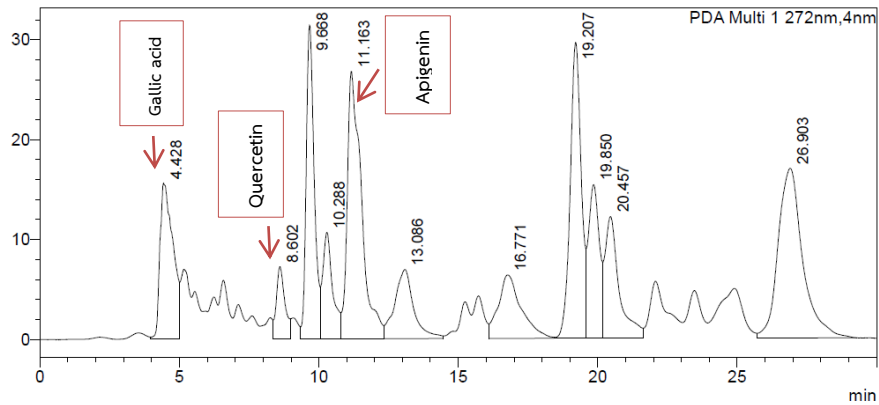
<Chromatogram>



รูปที่ 23 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

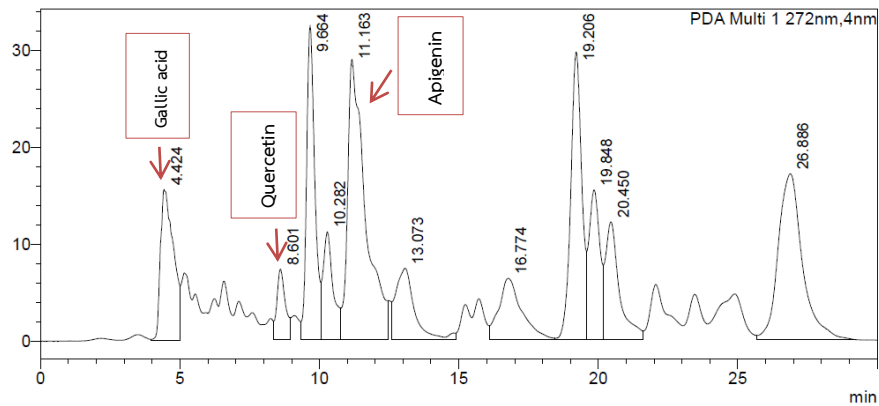
mAU



รูปที่ 24 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

mAU



รูปที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 3

4.2.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือ

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบสาบเสือ พบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด ซึ่งมีสารสำคัญที่สนใจ 3 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Quercetin และ Apigenin และแต่ละตัวมีปริมาณ ดังนี้

1) ปริมาณสาร Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณสาร Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือ

สารสกัดใบสาบเสือ 1 mg/ml (1000 ppm)	peak area	mg of Gallic acid	ปริมาณ Gallic acid ใน crude extract (g/100g)
ครั้งที่ 1	507549	6.59	0.077
ครั้งที่ 2	509491	6.62	0.077
ครั้งที่ 3	505970	6.57	0.077
ค่าเฉลี่ย	507670	6.59	0.077
S.D.	1764	0.03	0.000

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือ 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 70036x + 45905$ พบว่ามีปริมาณ Gallic acid เฉลี่ย เท่ากับ 6.59 mg of gallic acid และจาก %yield of crude extract เฉลี่ยมีค่า 11.67% เมื่อคำนวณหาปริมาณ Gallic acid ใน crude extract จะมีค่าเท่ากับ 0.077 g/100g crude extract

2) ปริมาณสาร Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสาร Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือ

สารสกัดใบสาบเสือ 1 mg/ml (1000 ppm)	peak area	mg of Quercetin	ปริมาณ Quercetin ใน crude extract (g/100g)
ครั้งที่ 1	146107	4.89	0.057
ครั้งที่ 2	153423	5.08	0.059
ครั้งที่ 3	153979	5.09	0.059
ค่าเฉลี่ย	151170	5.02	0.059
S.D.	4393	0.11	0.001

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือ 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 39472x - 47093$ พบว่ามีปริมาณ Quercetin เฉลี่ย เท่ากับ 5.02 mg of quercetin และจาก %yield of crude

extract เฉลี่ยมีค่า 11.67% เมื่อคำนวณหาปริมาณ Quercetin ใน crude extract จะมีค่าเท่ากับ 0.059 g/100g crude extract

3) ปริมาณสาร Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณสาร Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือ

สารสกัดใบสาบเสือ 1 mg/ml (1000 ppm)	peak area	mg of Apigenin	ปริมาณ Apigenin ใน crude extract (g/100g)
ครั้งที่ 1	923024	15.69	0.183
ครั้งที่ 2	944912	16.07	0.188
ครั้งที่ 3	1287829	21.98	0.257
ค่าเฉลี่ย	1051922	17.92	0.209
S.D.	204595	3.53	0.041


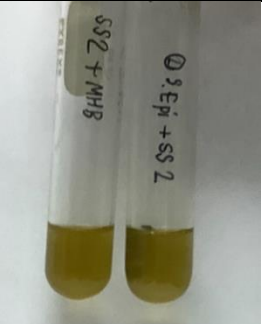
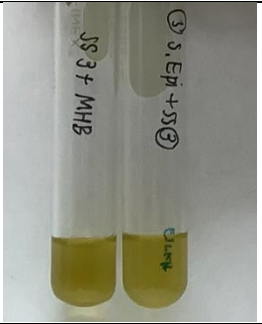
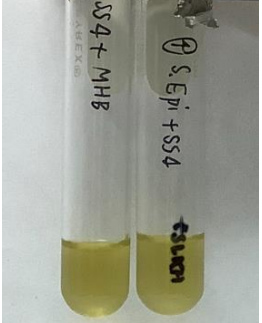
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือ 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 58021x + 12396$ พบว่ามีปริมาณ Apigenin เฉลี่ย เท่ากับ 17.92 mg of apigenin และจาก %yield of crude extract เฉลี่ยมีค่า 11.67% เมื่อคำนวณหาปริมาณ Apigenin ใน crude extract จะมีค่าเท่ากับ 0.209 g/100g crude extract

4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

4.3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หรือ minimal inhibitory concentration (MIC)

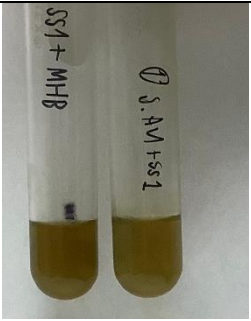
จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.25- 1.00 mg/mL หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเหมือนกับหลอดเปรียบเทียบ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ คือ 0.25 mg/mL แสดงในตารางที่ 10 และ 11


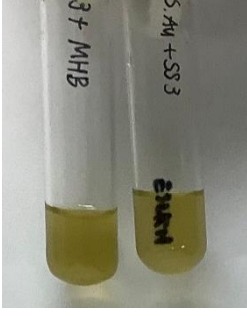
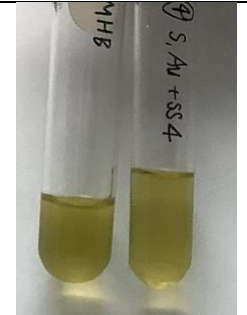
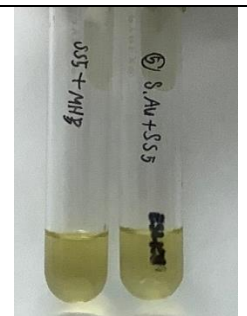
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (n=3)

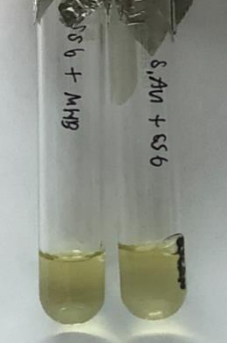
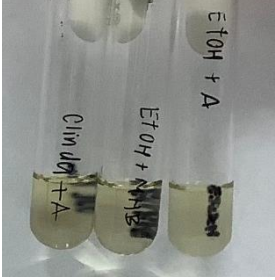
ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 1.00 mg/mL	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.50 mg/mL	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.25 mg/mL	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.125 mg/mL	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	

สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.0625 mg/mL	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.03125 mg/mL	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
หลอดทดลองเปรียบเทียบ	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสาบเสือที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (n=3)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 1.00 mg/mL	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	

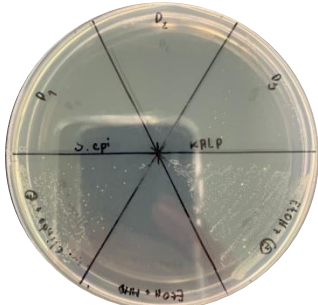
<p>สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.50 mg/mL</p>	<p>ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)</p>	
<p>สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.25 mg/mL</p>	<p>ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)</p>	
<p>สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.125 mg/mL</p>	<p>ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)</p>	
<p>สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.0625 mg/mL</p>	<p>ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)</p>	

สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.03125 mg/mL	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	
หลอดทดลองเปรียบเทียบ	ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดทดลองที่มีสีลักษณะไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ)	

4.3.2 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *S. aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.5- 1 mg/mL (ไม่มีโคโลนีขึ้นบริเวณที่กำหนดไว้บน plate) ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ คือ 0.5 mg/mL แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (n=3)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
<i>S. epidermidis</i>	สามารถยับยั้งเชื้อได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5-1 mg/mL (MBC= 0.5 mg/mL)	





<i>S. aureus</i>	สามารถยับยั้งเชื้อได้ตั้งแต่ ความเข้มข้น 0.5-1 mg/mL (MBC= 0.5 mg/mL)	
------------------	---	--


4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method ของสารสกัดใบสาบเสือ พบพื้นที่การยับยั้งเชื้อตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0625 - 1 mg/mL โดยมีพื้นที่การยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือตามลำดับ แสดงในตารางที่ 13 และ 14

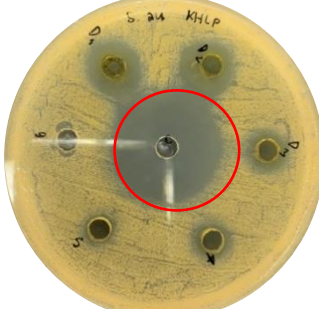


ตารางที่ 13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (n=3)




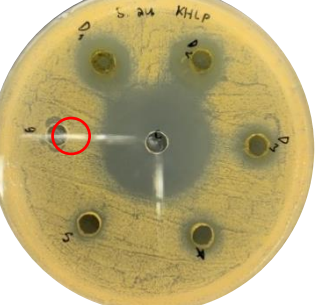
ตัวอย่างที่วิเคราะห์	พื้นที่การยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) \pm SD	ภาพประกอบ
clindamycin 25 mg/mL	32.50 ± 0.7071	
ตัวอย่างที่ 1 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 1 mg/mL	15.50 ± 0.7071	

<p>ตัวอย่างที่ 2 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.5 mg/mL</p>	<p>14.50 ± 0.7071</p>	
<p>ตัวอย่างที่ 3 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.25 mg/mL</p>	<p>12.00 ± 0.00</p>	
<p>ตัวอย่างที่ 4 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.125 mg/mL</p>	<p>11.00 ± 0.00</p>	
<p>ตัวอย่างที่ 5 : สารสกัดสาบเสือความ 0.0625mg/mL</p>	<p>10.00 ± 0.00</p>	

ตัวอย่างที่ 6 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.03125 mg/mL	0.00 ± 0.00	
---	-----------------	---

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (n=3)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	พื้นที่การยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) \pm SD	ภาพประกอบ
clindamycin 25 mg/mL	30.50 ± 0.7071	
ตัวอย่างที่ 1 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 1 mg/mL	15.50 ± 0.7071	
ตัวอย่างที่ 2 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.5 mg/mL	14.50 ± 0.7071	

ตัวอย่างที่ 3 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.25 mg/mL	11.00 ± 0.00	
ตัวอย่างที่ 4 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.125 mg/mL	10.00 ± 0.00	
ตัวอย่างที่ 5 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.0625 mg/mL	9.00 ± 0.00	
ตัวอย่างที่ 6 : สารสกัดสาบเสือความเข้มข้น 0.03125 mg/mL	0.00 ± 0.00	

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ

4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS assay)

1) สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

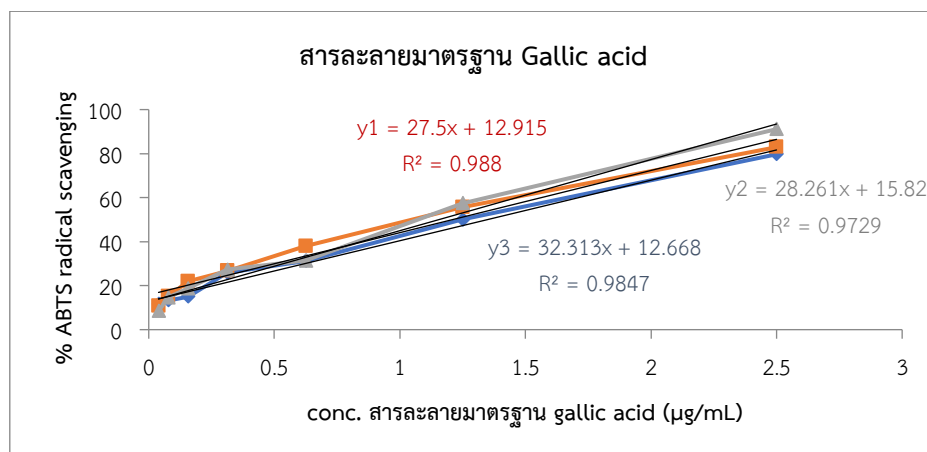
ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในตัวทำละลายเอทานอลโดยใช้วิธีการทดสอบ

ABTS assay ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.3 สามารถนำมาคำนวณหาค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734\text{ nm}}$ ได้ผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดง ค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

final conc. Gallic acid in ethanol ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
0.03906	11.62	10.71	8.48	10.27 ± 1.61
0.07812	13.37	15.09	14.60	14.35 ± 0.89
0.15624	15.07	21.95	18.76	18.59 ± 3.44
0.3125	25.82	26.64	27.24	26.56 ± 0.71
0.625	31.24	37.94	31.33	33.51 ± 3.86
1.25	50.02	55.66	57.45	54.38 ± 3.88
2.5	79.70	82.92	91.11	84.58 ± 5.89

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0.03906 - 2.5 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ %ABTS radical scavenging กับ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยวิธีการทดสอบ ABTS assay

จากสมการที่ได้จากกราฟข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ตารางที่ 16 ค่า IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

Test	equation	R ²	IC ₅₀
1	$y_1 = 27.5x + 12.915$	0.988	1.21
2	$y_2 = 28.261x + 15.82$	0.9729	1.35
3	$y_3 = 32.313x + 12.668$	0.9847	1.35
\bar{x}	1.24 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	0.0996		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เฉลี่ย เท่ากับ $1.24 \pm 0.0996 \mu\text{g/mL}$

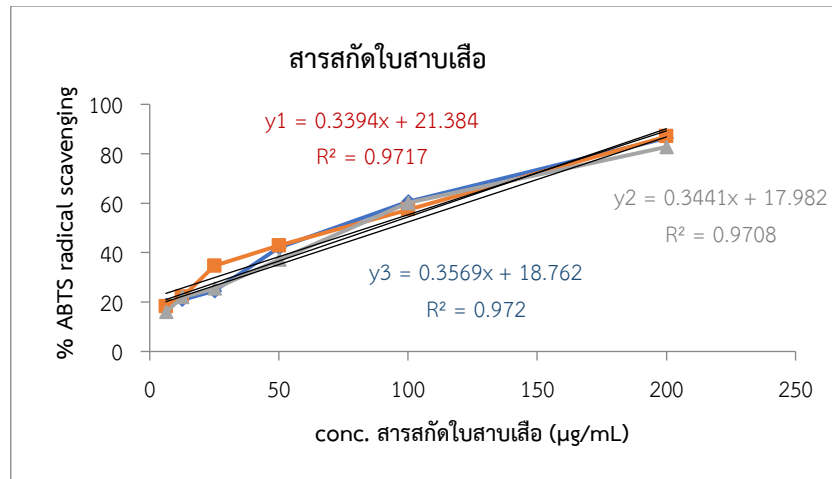
2) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้วิธีการทดสอบ ABTS assay ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.3 สามารถนำมาคำนวณหาค่า %ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดง ค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอล

Final conc.สารสกัดใบ สาบเสือ in Ethanol ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
6.25	18.88	18.27	15.99	17.71 ± 1.53
12.50	20.90	21.99	21.97	21.62 ± 0.62
25.00	24.44	34.60	25.45	28.16 ± 5.60
50.00	41.94	42.79	37.14	40.62 ± 3.04
100.00	60.59	57.34	60.09	59.34 ± 1.75
200.00	86.36	86.95	82.76	85.36 ± 2.26

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดใบสาบเสือ ในช่วงความเข้มข้น 6.25-200 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay

จากสมการที่ได้จากกราฟข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 18 ตารางที่ 18 ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบสาบเสือ

Test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y_1 = 0.3394x + 21.384$	0.9717	93.05
2	$y_2 = 0.3441x + 17.982$	0.9708	87.55
3	$y_3 = 0.3569x + 18.762$	0.972	84.31
\bar{x}	88.31 µg/mL		
S.D.	4.42		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดใบสาบเสือเฉลี่ย เท่ากับ 88.31 ± 4.42 µg/mL

4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH assay)

1) สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

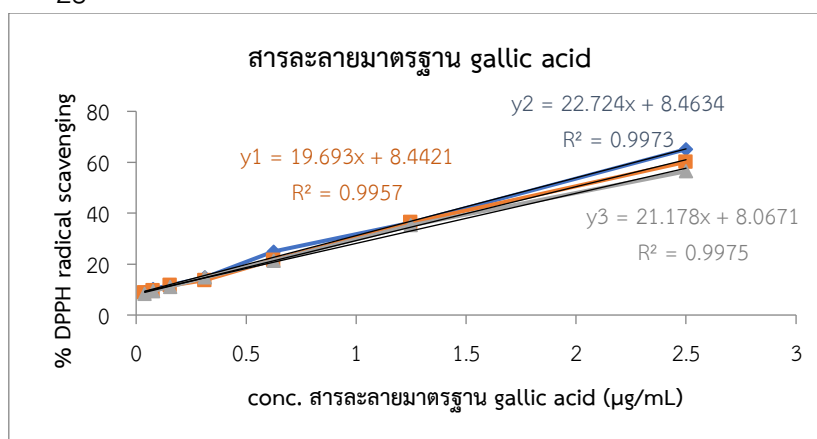
ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในตัวทำละลายเอทานอลโดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay

ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.3 สามารถนำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517\text{ nm}}$ ในแต่ละครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดง ค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

final conc. Gallic acid in ethanol ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
0.03906	8.94	8.66	8.41	8.67 ± 0.26
0.07812	10.20	9.52	9.39	9.70 ± 0.44
0.15624	11.70	11.58	11.10	11.46 ± 0.32
0.3125	14.77	13.64	14.77	14.39 ± 0.65
0.625	24.97	21.62	21.41	22.67 ± 1.99
1.25	36.25	36.35	35.26	35.96 ± 0.60
2.5	65.13	60.15	56.44	60.57 ± 4.36

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0.03906-2.5 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยวิธีการทดสอบ DPPH assay

จากสมการที่ได้จากกราฟข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

Test	equation	R ²	IC ₅₀
1	$y_1 = 19.693x + 8.4421$	0.9957	1.83
2	$y_2 = 22.724x + 8.4634$	0.9973	1.98
3	$y_3 = 21.178x + 8.0671$	0.9975	2.11
\bar{x}	1.97 µg/mL		
S.D.	0.14		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เฉลี่ย เท่ากับ 1.97 ± 0.14 µg/mL

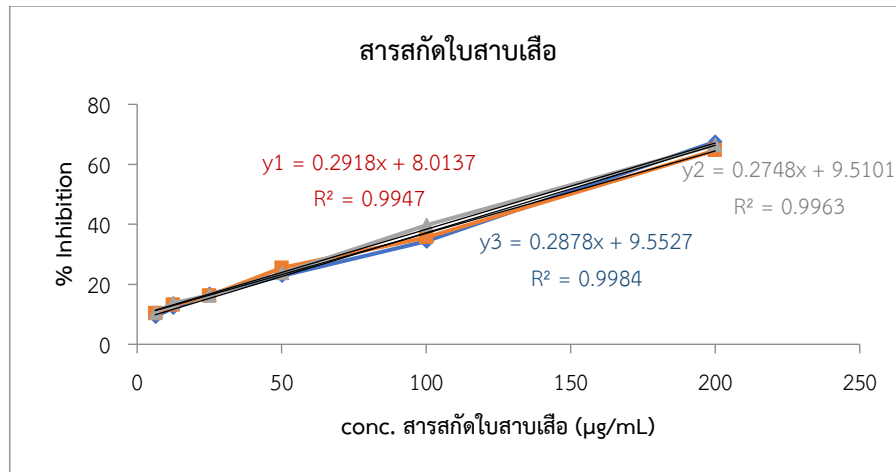
2) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.3 สามารถนำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า A_{517 nm} ในแต่ละครั้งได้ผล ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดง ค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดใบสาบเสือ ในตัวทำละลายเอทานอล

final conc.สารสกัดใบ สาบเสือ in Ethanol (µg/mL)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	(\bar{x}) ± S.D.
6.25	9.24	10.26	10.59	10.03± 0.70
12.50	12.18	13.07	13.80	13.02± 0.81
25.00	16.81	16.17	16.31	16.43± 0.33
50.00	22.87	25.46	23.70	24.01± 1.32
100.00	34.33	35.67	39.73	36.57± 2.80
200.00	67.53	64.62	66.51	66.22± 1.47

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดใบสาบเสือ ในช่วงความเข้มข้น 6.25-200 µg/mL โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับ ความเข้มข้นสารสกัดใบสาบเสือในตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay

จากสมการที่ได้จากกราฟข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 22 ตารางที่ 22 IC_{50} ของสารสกัดใบสาบเสือ

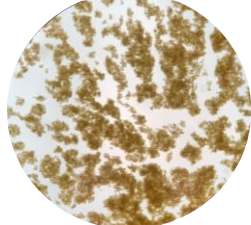
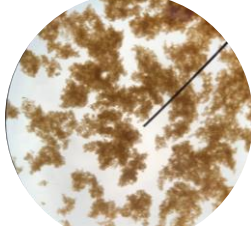
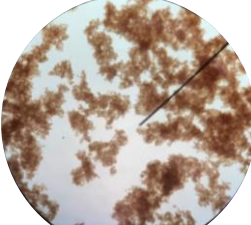
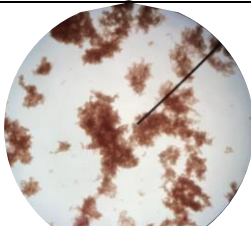
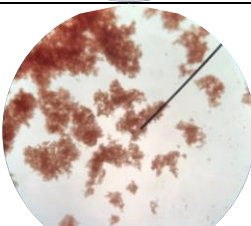
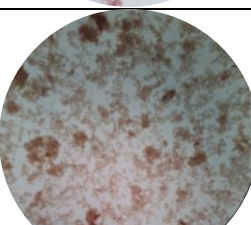
test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y_1 = 0.2918x + 8.0137$	0.9947	143.89
2	$y_2 = 0.2748x + 9.5101$	0.9963	147.34
3	$y_3 = 0.2878x + 9.5527$	0.9984	140.54
\bar{x}	143.92 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	3.40		

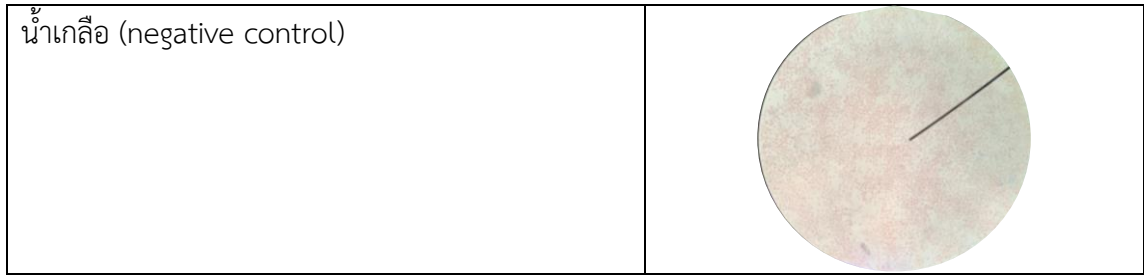
การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดใบสาบเสือเฉลี่ย เท่ากับ $143.92 \pm 3.40 \mu\text{g/mL}$

4.5 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)

ผลการทดสอบฤทธิ์การแข็งตัวของเลือดของสารสกัดใบสาบเสือ พบว่าสารสกัดใบสาบเสือ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0625 -1 mg/mL ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเลือด เมื่อเทียบกับ DMSO และ normal saline ซึ่งเป็นสารละลายควบคุม พบว่าไม่เกิดการเกาะกลุ่มดังแสดง ในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงผลการทดสอบการแข็งตัวของเลือด (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ภาพประกอบ
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 1 mg/mL	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.5 mg/mL	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.25 mg/mL	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.125 mg/mL	
สารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 0.0625 mg/mL	
DMSO (positive control)	



4.6 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม

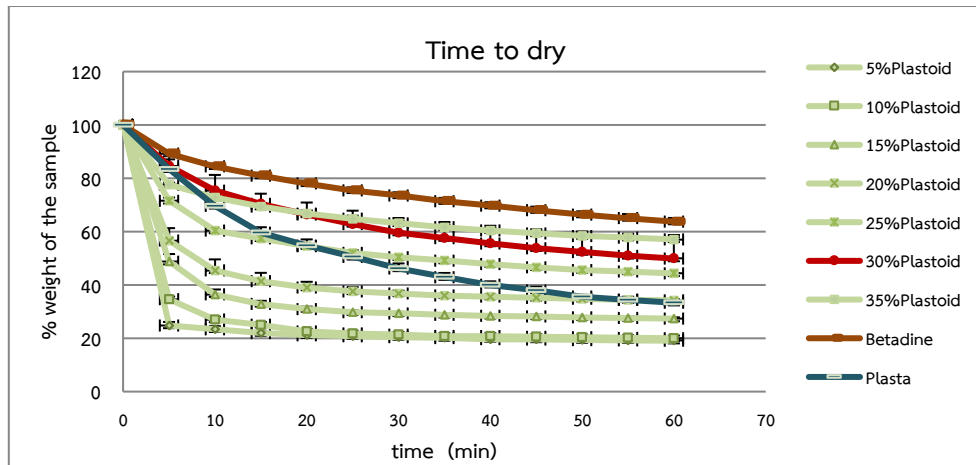
4.6.1 การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของระบบกึ่งฟิล์ม

1) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ที่เหมาะสมในการเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม โดยศึกษาในช่วง 5-35 %w/w พบว่าความเข้มข้นต่ำ (5, 10, 15, 20 %w/w) ฟิล์มที่ได้จะเกาะติดผิวหนังไม่ดี และลอกออกจากผิวหนังได้ง่าย แต่ที่ความเข้มข้นสูง (25, 30, 35 %w/w) จะสามารถเกาะติดผิวหนังได้ และลอกออกได้ง่าย โดยลักษณะของฟิล์มเมื่อแห้ง จะมีสีใส และมีกลิ่นของสารละลายอินทรีย์

2) การหาระยะเวลาการแห้ง (time to dry)

วัดเวลาในการแห้งของสูตรตำรับ Plastoid[®]B ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35%w/w ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol โดยชั่งน้ำหนักดูผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที จากผลการทดลองพบว่า สูตรตำรับมีน้ำหนักมากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไปตามลำดับ ดังนี้ Betadine[®], Plastoid[®]B ความเข้มข้น 35, 30, 25, 20, 15, 10 และ 5% w/w (รูปที่ 30) และพิจารณาลักษณะทางกายภาพร่วมด้วย จึงเลือกสูตรตำรับที่ความเข้มข้น 30 % w/w มีความเหมาะสมในการนำมาหาชนิด ปริมาณของตัวทำละลาย และปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เหมาะสมต่อไป

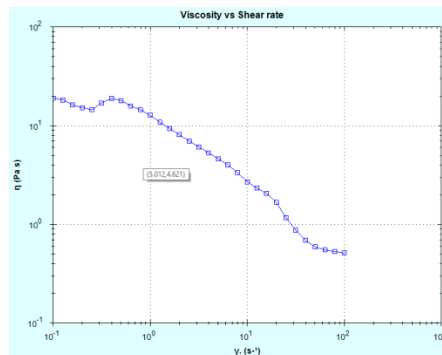


รูปที่ 30 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w

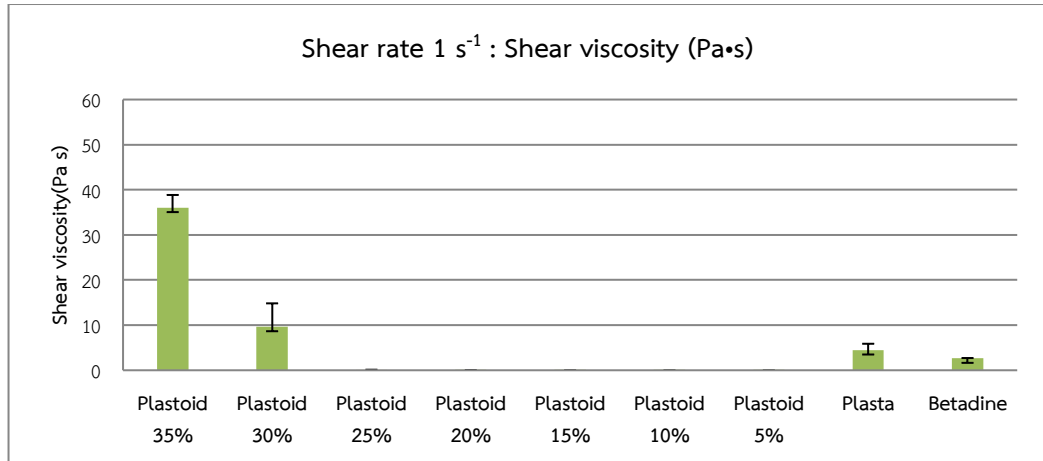
3) การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

นำสารละลายพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35% w/w มาทดสอบความหนืดด้วยเครื่อง rheometer

วัดค่า shear viscosity แต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ โดยวัดที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกำหนดค่า shear rate ในช่วง $0.01-10 \text{ s}^{-1}$ ดังรูปที่ 31 และใช้ความหนืด ณ จุดที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ (รูปที่ 32) และเลือกสูตร Plastoid®B 30% w/w เป็นสูตรตำรับที่เหมาะสม



รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear viscosity และ shear rate ของความเข้มข้น Plastoid®B 30% w/w



รูปที่ 32 กราฟแสดง shear viscosity ของระบบก่อก้อนฟิล์ม 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w เมื่อกำหนด shear rate ที่ 1 s⁻¹

4.6.2 การหาชนิดและปริมาณตัวทำละลาย

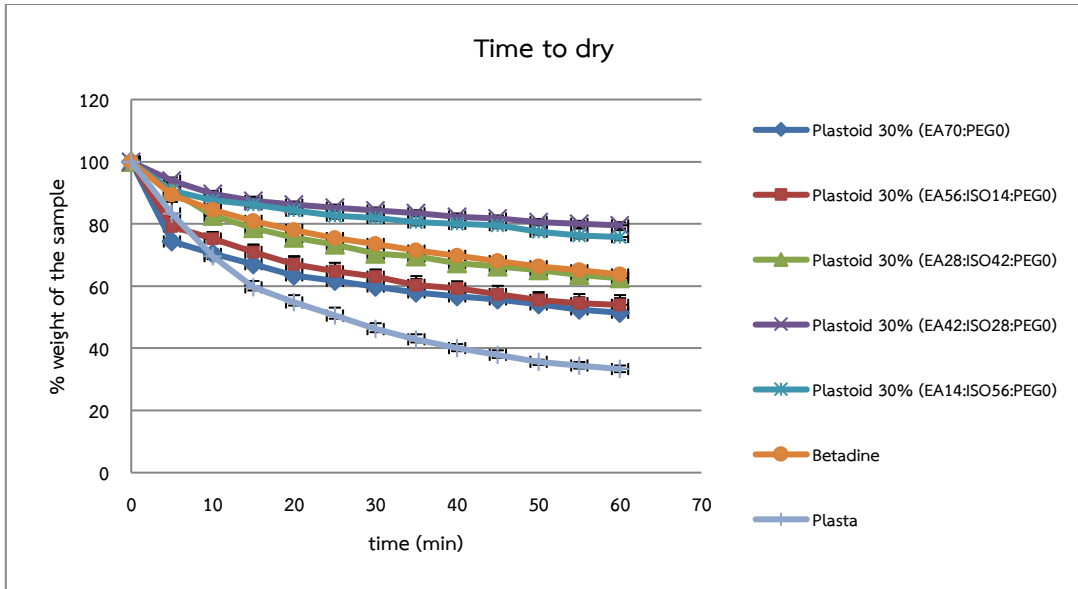
การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol ในการละลายพอลิเมอร์ Plastoid®B ความเข้มข้น 30 % w/w (ตำรับที่ 13-17) นำตำรับมาทดสอบสมบัติการก่อก้อนฟิล์มดังนี้

1) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในสูตรตำรับที่ 13-17 พบว่าฟิล์มเกาะติดผิวผนังดีขึ้น และตำรับที่สามารถลอกออกจากผิวผนังได้ง่าย คือตำรับที่ 15 โดยลักษณะของฟิล์มเมื่อแห้ง จะมีสีใส และมีกลิ่นไม่ฉุนมากเมื่อเทียบกับการใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลายตัวเดียว

2) การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

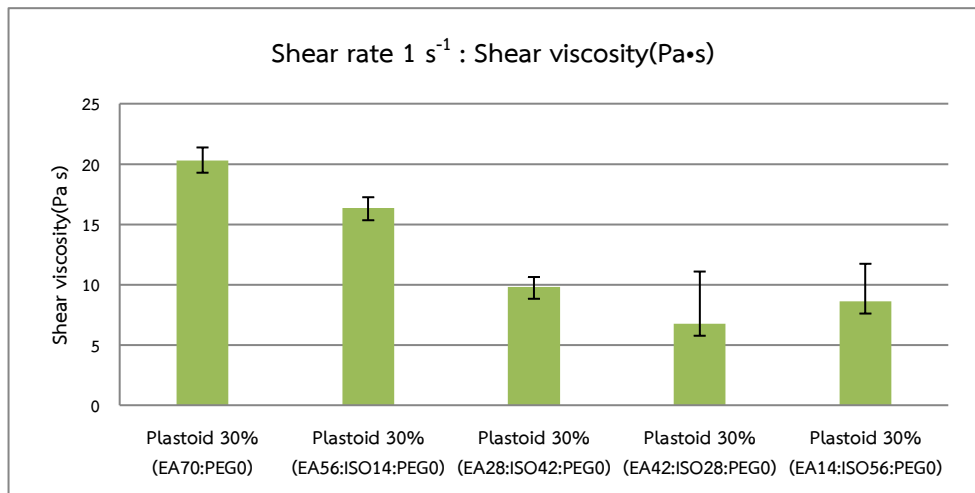
การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol ในการละลายพอลิเมอร์ที่ Plastoid®B ความเข้มข้น 30% w/w (ตำรับที่ 13-17) โดยชั่งน้ำหนักดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที ดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol

3) การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

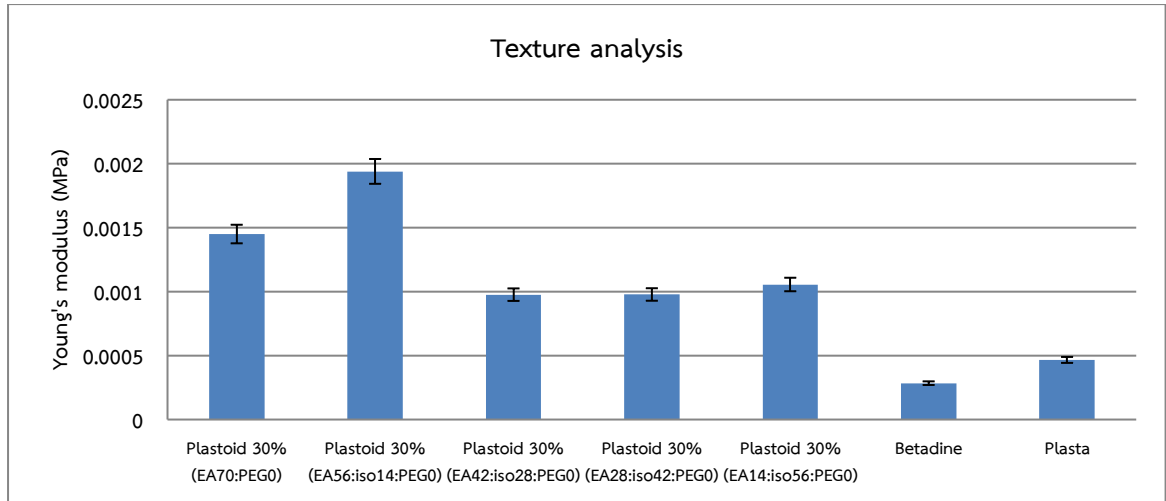
จากการวัดค่า shear viscosity แต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ โดยวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกำหนดค่า shear rate ในช่วง $0.01-10 \text{ s}^{-1}$ และใช้ความหนืด ณ จุดที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ ดังรูปที่ 34



รูปที่ 34 กราฟแสดง shear viscosity ของระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น 30% w/w และใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด เมื่อกำหนด shear rate ที่ 1 s^{-1}

4) การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของตัวอย่างที่ 13-17 (ทำ 3 ซ้ำ) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ ผลการวิเคราะห์ค่า Young's modulus แสดงดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 กราฟแท่งแสดงค่า Young's Modulus เฉลี่ย ของระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น 30% w/w และใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด

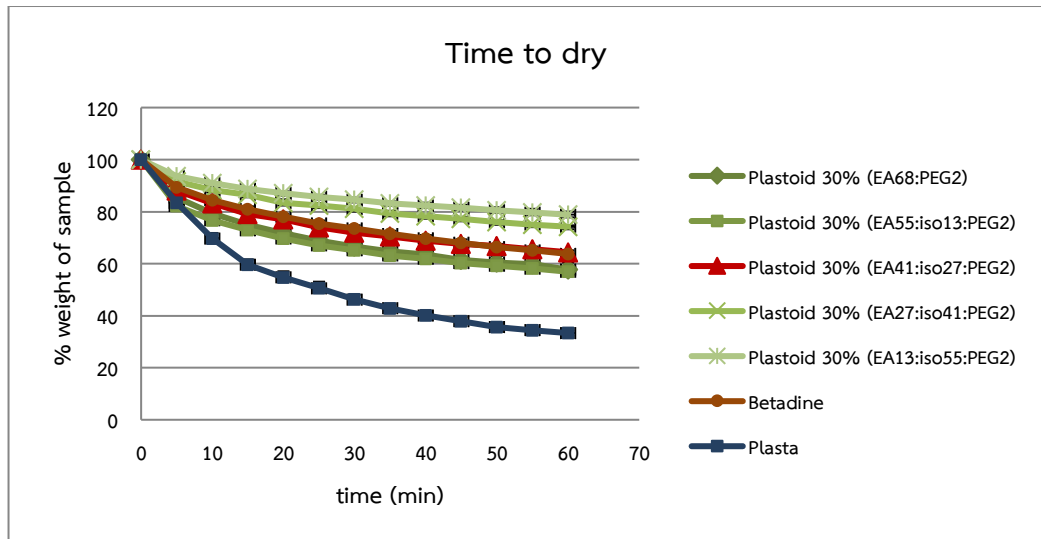
4.6.3 การหาชนิด ปริมาณตัวทำละลาย และปริมาณพลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสมโดยใช้พลาสติกไซเซออร์ 2 %w/w

1) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ของสูตรตำรับที่ 1-5 พบว่าฟิล์มเกาะติดผิวหนังดีขึ้นเมื่อเติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 2% w/w และสูตรตำรับที่สามารถลอกออกจากผิวหนังได้ง่าย ได้แก่ ตำรับที่ 3 และ 4 โดยฟิล์มจะมีสีใส และมีกลิ่นไม่ฉุนมาก

2) การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้ Plastoid®B ความเข้มข้น 30% w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2% w/w โดยชั่งน้ำหนักดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 36

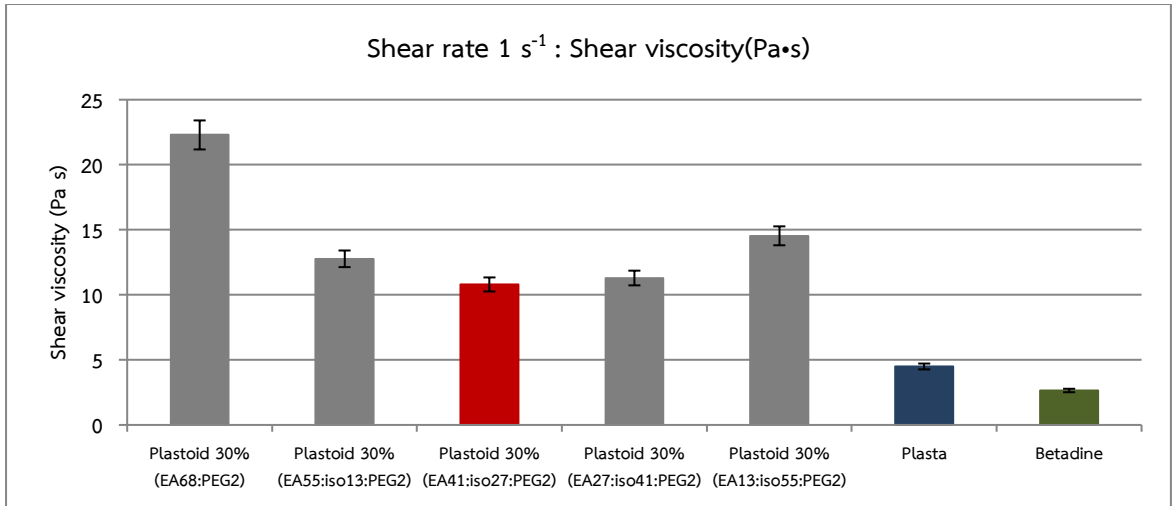


รูปที่ 36 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ Plastoid®B 30% w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 2% w/w

3) การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

การทดลองระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้ Plastoid®B ความเข้มข้น 30 %w/w และตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate, isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซอร์ คือ PEG 400 ความเข้มข้น 2%w/w เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์ม

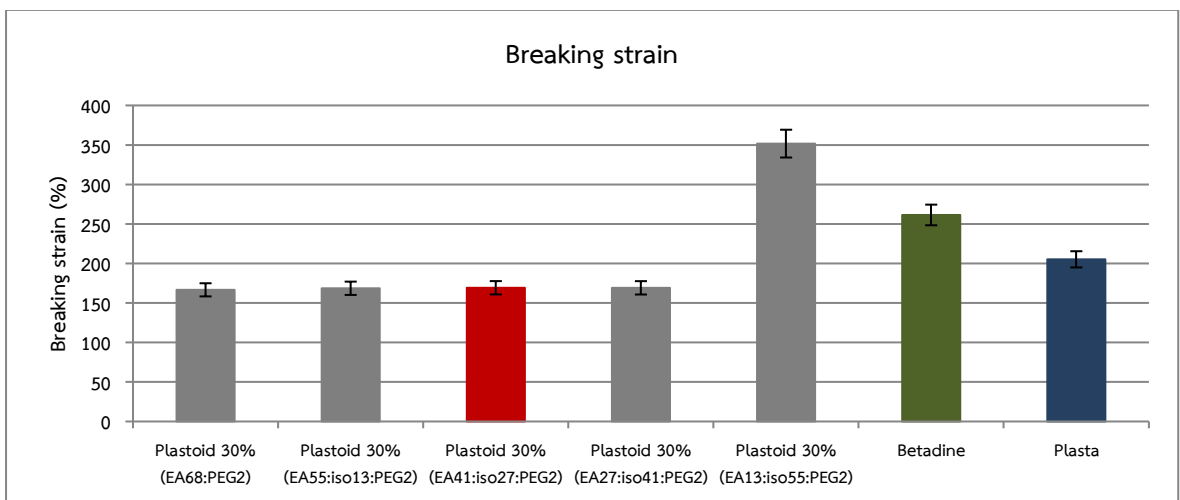
วัดค่า shear viscosity แต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ โดยวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกำหนดค่า shear rate ในช่วง $0.01-10 \text{ s}^{-1}$ และใช้ความหนืด ณ จุดที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ จากผลการทดลอง พบว่า Plastoid®B ความเข้มข้น 30%w/w โดยใช้สัดส่วนตัวทำละลาย ethyl acetate 41: isopropyl alcohol 27 และเติม PEG 400 2%w/w เป็นสูตรตำรับที่มีค่า shear Viscosity เหมาะสมและใกล้เคียงผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมากที่สุด ดังรูปที่ 37



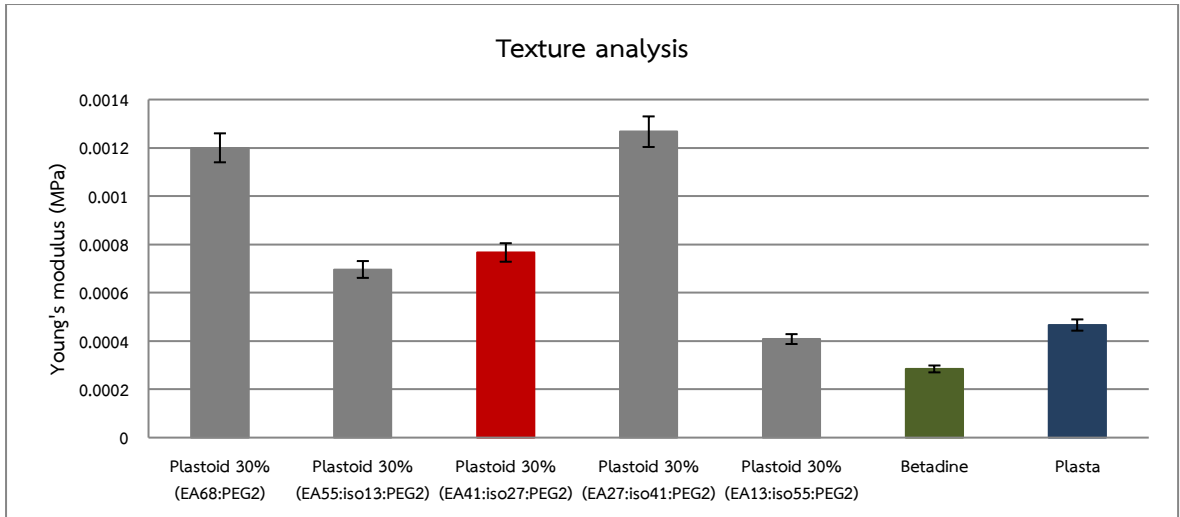
รูปที่ 37 กราฟแสดง shear viscosity ของระบบก่อกฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2%w/w เมื่อกำหนด shear rate ที่ 1 s^{-1}

4) การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของตัวอย่างที่ 1-5 (ทำ 3 ซ้ำ) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ และเลือกสูตร Plastoid®B ความเข้มข้น 30%w/w โดยใช้สัดส่วนตัวทำละลาย ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 และเติม PEG 400 2%w/w ผลการวิเคราะห์ Breaking strain แสดงดังรูปที่ 38 และการวิเคราะห์ค่า Young's modulus ดังรูปที่ 39



รูปที่ 38 กราฟแท่งแสดงค่า breaking strain เฉลี่ย ของระบบก่อกฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2%w/w



รูปที่ 39 กราฟแท่งแสดงค่า Young's Modulus เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์
ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซออร์ความเข้มข้น 2%w/w

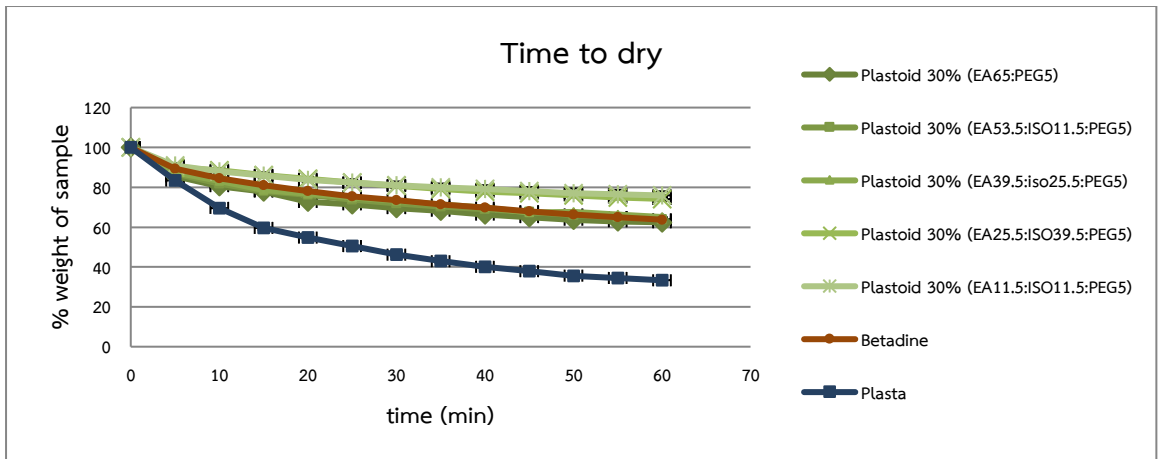
4.6.4 การหาชนิด ปริมาณตัวทำละลาย และปริมาณพลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสม โดยใช้ พลาสติกไซเซออร์ 5 %w/w

1) การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ของสูตรตำรับที่ 7-11 พบว่าฟิล์มเกาะติดผิวผนังดีขึ้นเมื่อเติมพลาสติกไซเซออร์ คือ PEG 400 5%w/w และสูตรตำรับที่สามารถลอกออกจากผิวผนังได้ง่าย ได้แก่ ตำรับที่ 8 และ 9 โดยฟิล์มจะมีสีใส และมีกลิ่นไม่ฉุนมากเมื่อเทียบกับการใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลายตัวเดียว

2) การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

การเตรียมระบบก่อก้อนฟิล์ม โดยใช้ Plastoid®B ความเข้มข้น 30%w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate, isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 5%w/w โดยใช้น้ำหนักดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 40

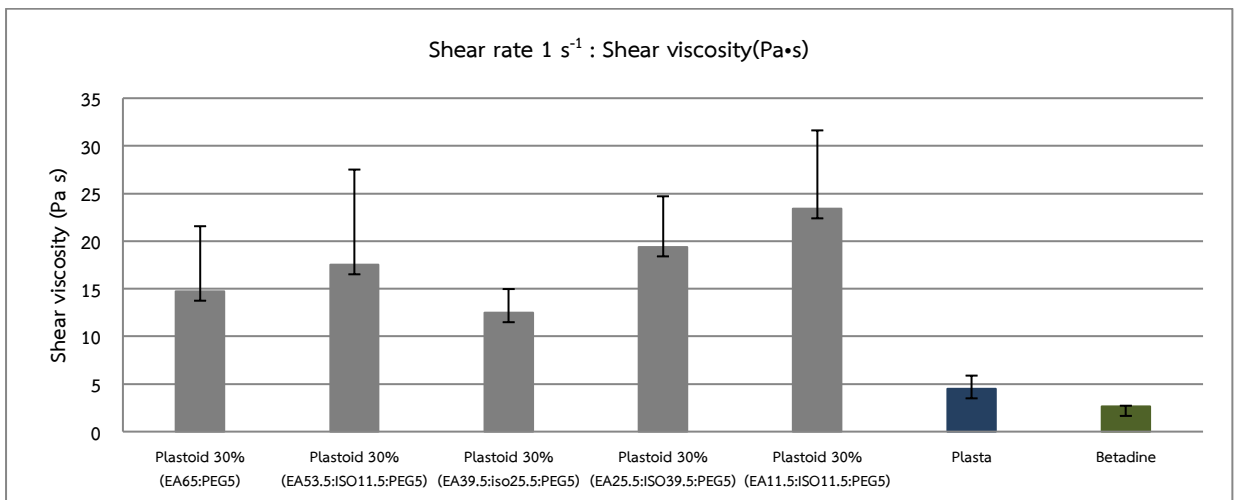


รูปที่ 40 กราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ Plastoid®B 30% w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol และเติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 5% w/w

3) การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

การทดลองระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้ Plastoid®B ความเข้มข้น 30% w/w, ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate, isopropyl alcohol และเติม PEG 400 ความเข้มข้น 5%w/w เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์ม

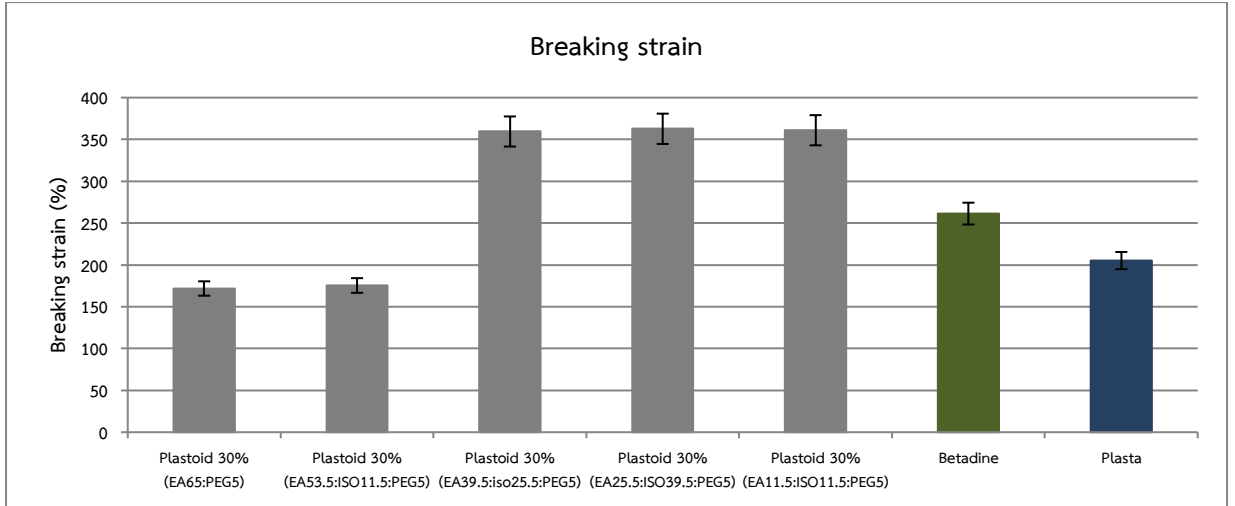
วัดค่า shear viscosity แต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ โดยวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกำหนดค่า shear rate ในช่วง $0.01-10 \text{ s}^{-1}$ และใช้ความหนืด ณ จุดที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ ดังรูปที่ 41



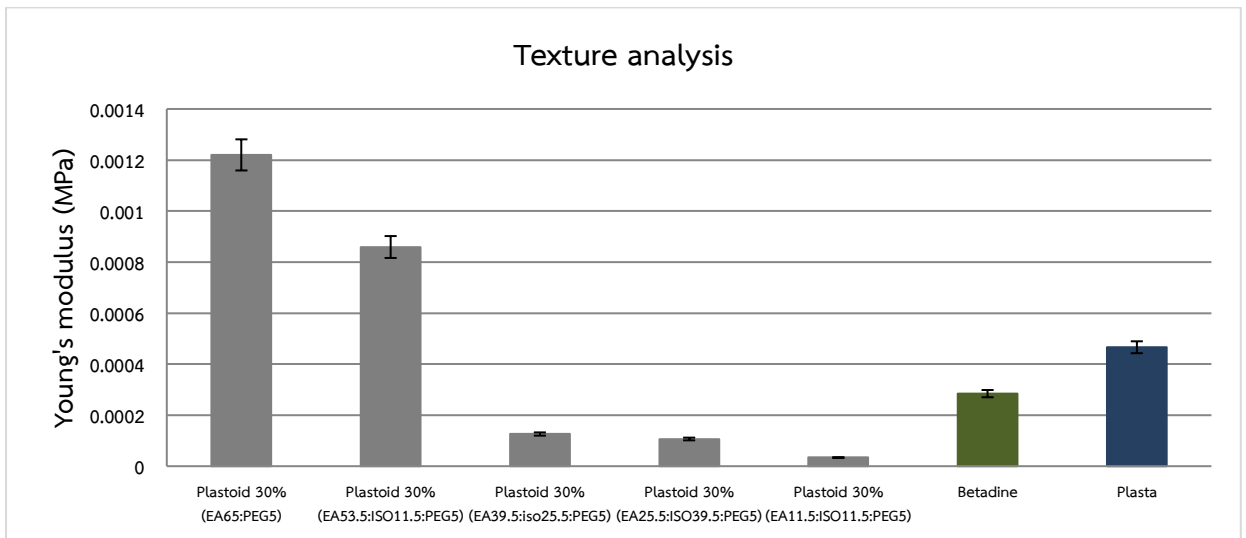
รูปที่ 41 กราฟแสดง shear viscosity ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5%w/w เมื่อกำหนด shear rate ที่ 1 s^{-1}

4) การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของตัวอย่างที่ 7-11 (ทำ 3 ซ้ำ) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับ ผลการวิเคราะห์ breaking strain แสดงดังรูปที่ 42 และการวิเคราะห์ค่า Young's modulus ดังรูปที่ 43



รูปที่ 42 กราฟแท่งแสดงค่า breaking strain เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5%w/w

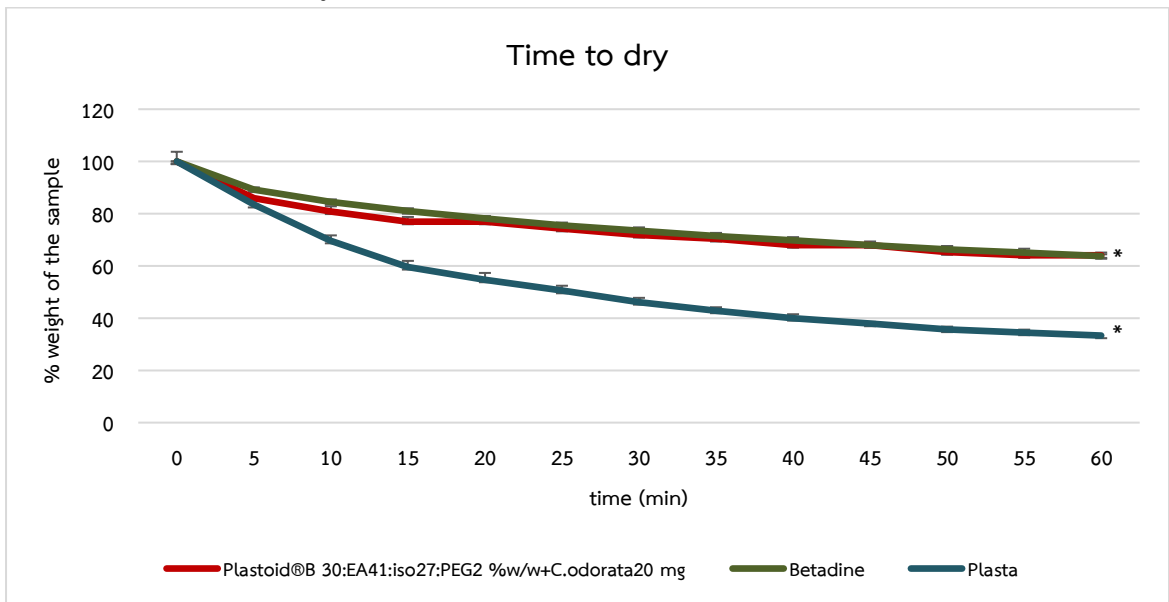


รูปที่ 43 กราฟแท่งแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5%w/w

4.7 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

4.7.1 การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

ทดสอบเวลาในการแห้งของสูตรตำรับที่มีสัดส่วนองค์ประกอบ ดังนี้ Plastoid®B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG2 % w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ ปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด ได้แก่ Betadine® และ Plasta® ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 44

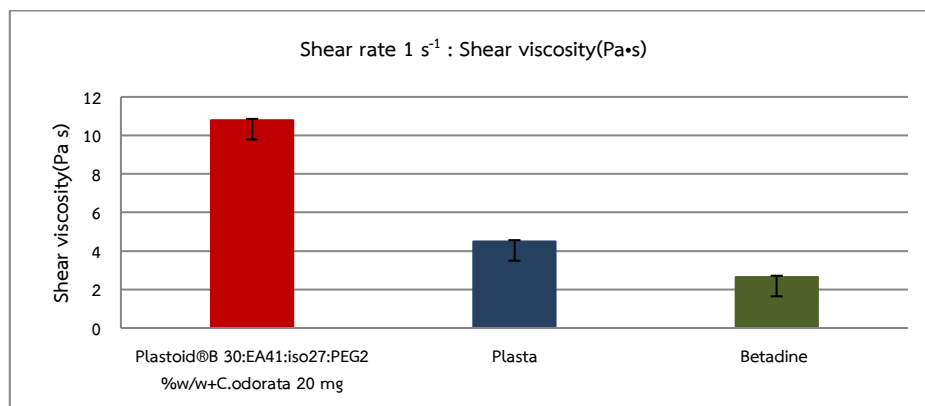


**p* value < 0.05; Time 0-50 minutes

รูปที่ 44 กราฟระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์มเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

4.7.2 การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

วัดค่าการไหลและความหนืด (ทำ 3 ซ้ำ) โดยกำหนดค่า shear rate ในช่วง 0.01-10 s⁻¹ และใช้ความหนืด ณ จุดที่ shear rate เท่ากับ 1 s⁻¹ เพื่อวิเคราะห์ และเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด ดังรูปที่ 45



รูปที่ 45 กราฟแสดง shear viscosity ของ Plastoid®B 30:ethyl acetate 41:isopropyl alcohol 27:PEG400 2 %w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาดเมื่อกำหนด shear rate เท่ากับ 1 s^{-1}

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสูตรตำรับ Plastoid®B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG2 % w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด ได้แก่ Betadine® ดังตารางที่ 24 และ Plasta® ดังตารางที่ 24 และ 25

ตารางที่ 24 แสดง shear rate ของระบบก่อกฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine® (กำหนด shear rate เท่ากับ 1 s^{-1})

สูตรตำรับ	shear rate ที่ 1 s^{-1}	S.D.	p-value
Plastoid®B 30:EA41:iso27:PEG2 %w/w + CO 20 mg	10.79	2.85	0.470
Betadine®	2.65	0.07	

ตารางที่ 25 แสดง shear rate ของระบบก่อกฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เปรียบเทียบกับ Plasta® (กำหนด shear rate เท่ากับ 1 s^{-1})

สูตรตำรับ	shear rate ที่ 1 s^{-1}	S.D.	p-value
Plastoid®B 30:EA41:iso27:PEG2 %w/w + CO 20 mg	10.79	2.85	0.470
Plasta®	4.49	1.38	

4.7.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

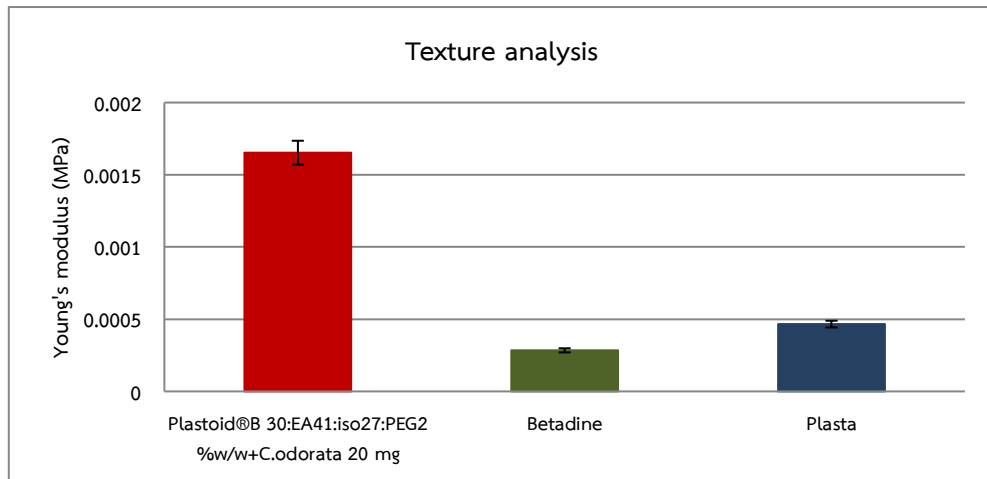
การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ เป็นจำนวน 3 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด ผลการศึกษา Young's modulus แสดงดังรูปที่ 46 และการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบกับ Betadine® ดังตารางที่ 26 และ Plasta® ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 26 แสดงค่า Young's modulus ของระบบก่อกฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine®

สูตรตำรับ	Young's modulus	S.D.	p-value
Plastoid®B30:EA41:iso27:PEG2 %w/w + CO 20 mg	0.00039969	0.00	0.782
Betadine®	0.00028442	0.00	

ตารางที่ 27 แสดงค่า Young's modulus ของระบบก่ofil์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ ปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Plasta®

สูตรตำรับ	Young's modulus	S.D.	p-value
Plastoid®B30:EA41:iso27:PEG2 %w/w + CO 20 mg	0.00039969	0.00	0.000*
Plasta®	0.00149309	0.0004	



รูปที่ 46 กราฟแสดงค่า Young's modulus ของระบบก่ofil์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Betadine® และ Plasta®

4.8 การทดสอบการซึมผ่านของน้ำ

การวัดการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg ควบคุม อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ $75 \% \pm 5$ RH บันทึกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของ ขวด ทุกวันในเวลาเดียวกัน จนครบ 5 วัน จากนั้นนำค่ามาคำนวณหาอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate; WVTR) ดังตารางที่ 30 และรูปที่ 47 จากนั้นวิเคราะห์ค่าทาง สถิติเปรียบเทียบกับ Blank ดังตารางที่ 28 และผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด ได้แก่ Betadine® ดังตารางที่ 29 และ Plasta® ดังตารางที่ 30

ตารางที่ 28 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg
เปรียบเทียบกับ Blank

วันที่	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	Plastoid®B 30:EA41:iso27: PEG2 %w/w + CO 20 mg		Blank		p-value
		mean	S.D.	mean	S.D.	
วันที่ 1		17.6933	0.078897	17.6327	0.029137	0.982
วันที่ 2		17.7493	0.080958	17.6803	0.035475	0.979
วันที่ 3		17.7927	0.086437	17.716	0.043194	0.856
วันที่ 4		17.8444	0.098006	17.7596	0.054967	0.801
วันที่ 5		17.8846	0.109873	17.7919	0.064566	0.773

ตารางที่ 29 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg
เปรียบเทียบกับ Betadine®

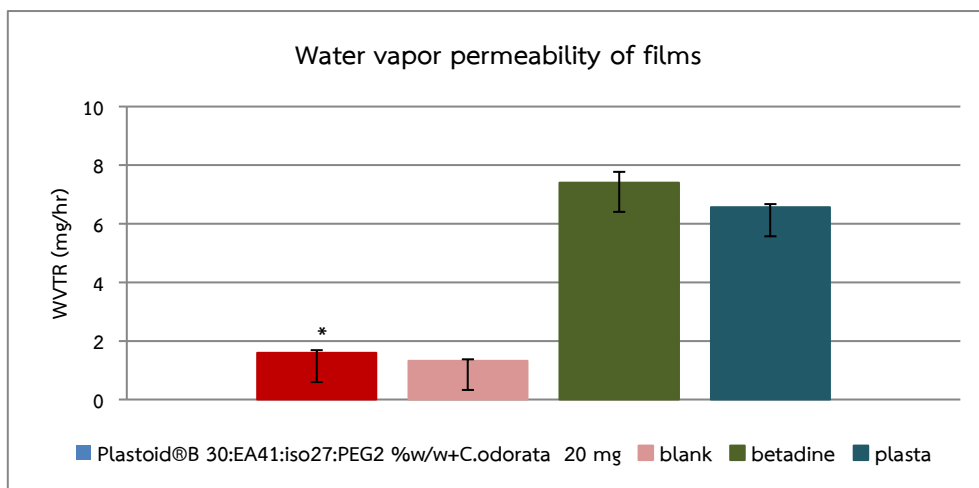
วันที่	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	Plastoid®B 30:EA41:iso27: PEG2 %w/w + CO 20 mg		Betadine®		p-value
		mean	S.D.	mean	S.D.	
วันที่ 1		17.6933	0.078897	19.0083	0.503766	0.000*
วันที่ 2		17.7493	0.080958	19.1775	0.540874	0.000*
วันที่ 3		17.7927	0.086437	19.5264	0.266285	0.000*
วันที่ 4		17.8444	0.098006	19.7107	0.259128	0.000*
วันที่ 5		17.8846	0.109873	19.8338	0.261771	0.000*

ตารางที่ 30 การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg
เปรียบเทียบกับ Plasta®

วันที่	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	Plastoid®B30:EA41:iso27: PEG2 %w/w +CO 20 mg		Plasta®		p-value
		mean	S.D.	mean	S.D.	
วันที่ 1		17.6933	0.078897	17.5129	0.10865	0.699
วันที่ 2		17.7493	0.080958	17.7349	0.09849	1.000
วันที่ 3		17.7927	0.086437	17.9506	0.11364	0.388
วันที่ 4		17.8444	0.098006	18.1208	0.08679	0.041*
วันที่ 5		17.8846	0.109873	18.3015	0.09004	0.003*

ตารางที่ 31 แสดงค่าอัตราการซึมผ่านของน้ำ (WVTR)

ตัวอย่าง	WVTR (mg/hr)	Temperature (°C)	Relative humidity (%)
Plastoid®B 30:EA41:iso27:PEG2 %w/w +CO 20 mg	1.5943	28.82	74
Blank	1.32717		
Betadine®	7.40556		
Plasta®	6.57167		

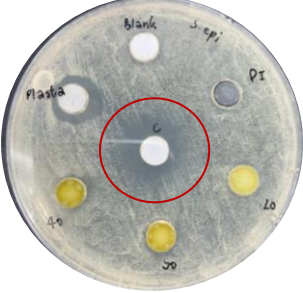

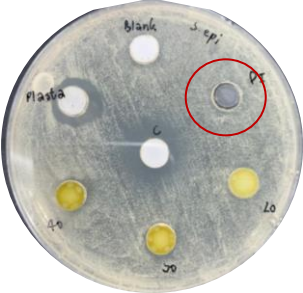
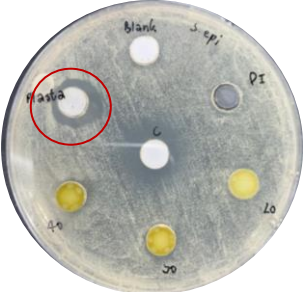


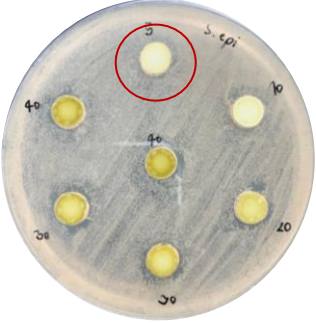
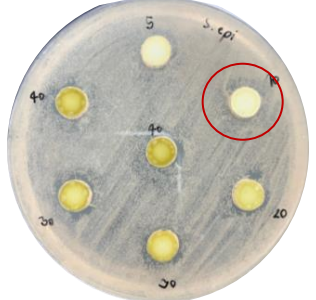



รูปที่ 47 แสดงอัตราการซึมผ่านของน้ำฟิล์มที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg, Blank, Betadine® และ Plasta®


4.9 การทดสอบประสิทธิภาพของพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ พบพื้นที่การยับยั้งเชื้อในพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือความเข้มข้น 20 - 50 mg ของสูตรตำรับ แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ดังตารางที่ 32 และ *S. aureus* ดังตารางที่ 32

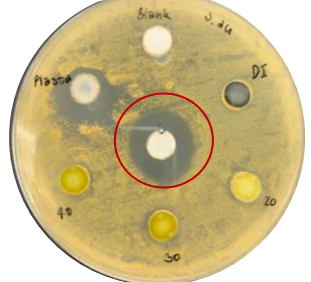
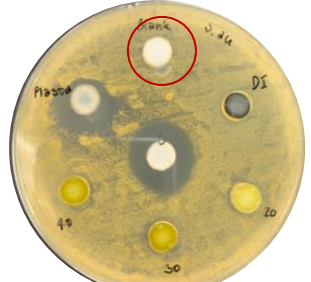
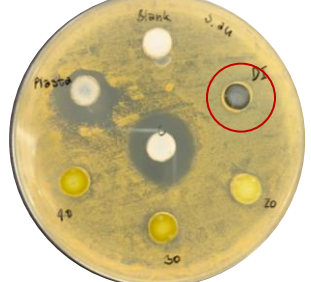
ตารางที่ 32 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (n=3)

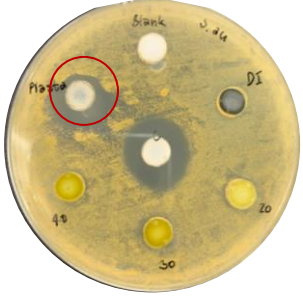
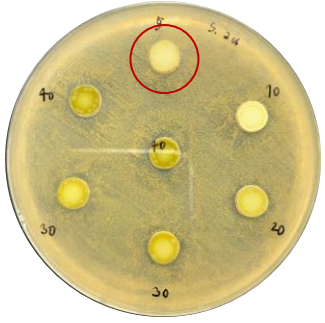
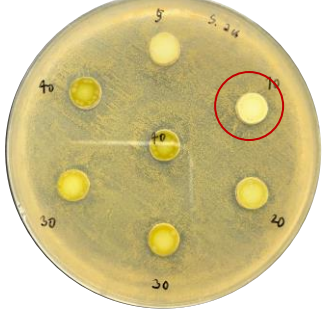
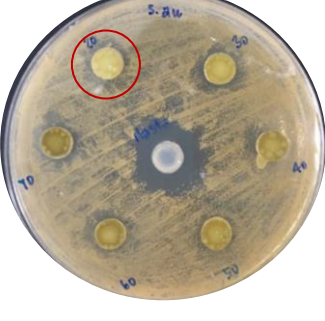

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	พื้นที่การยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) \pm SD	ภาพประกอบ
clindamycin 25 mg/mL	16.88 ± 0.55	
Blank (Plastoid®B 30: ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG2 % w/w)	0.00 ± 0.00	
น้ำกลั่น	0.00 ± 0.00	
reference product (Plasta®)	13.27 ± 0.23	

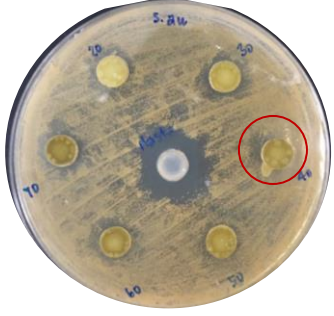

<p>ตัวอย่างที่ 1 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 5 mg ของสูตรตำรับ (MBC เท่ากับ 0.5 mg/mL)</p>	0.00 ± 0.00	
<p>ตัวอย่างที่ 2 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 10 mg ของสูตรตำรับ (2 เท่าของ MBC)</p>	0.00 ± 0.00	
<p>ตัวอย่างที่ 3 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 20 mg ของสูตรตำรับ (4 เท่าของ MBC)</p>	11.00 ± 0.18	
<p>ตัวอย่างที่ 4 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 30 mg ของสูตรตำรับ (6 เท่าของ MBC)</p>	11.94 ± 0.16	
<p>ตัวอย่างที่ 5 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 40 mg ของสูตรตำรับ (8 เท่าของ MBC)</p>	13.03 ± 0.19	

<p>ตัวอย่างที่ 6 : พลาสเตอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สدابเสื่อความเข้มข้น 50 mg ของสูตรตำรับ (10 เท่าของ MBC)</p>	<p>14.00 ± 0.00</p>	
--	---------------------	--

ตารางที่ 33 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (n=3)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	พื้นที่การยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ± SD	ภาพประกอบ
<p>clindamycin 25 mg/mL</p>	<p>16.63 ± 0.79</p>	
<p>Blank (Plastoid®B 30: ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG2 % w/w)</p>	<p>0.00 ± 0.00</p>	
<p>น้ำกลั่น</p>	<p>0.00 ± 0.00</p>	

reference product (Plasta [®])	16.57 ± 0.42	
ตัวอย่างที่ 1 : พลาสติกปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 5 mg ของสูตรตำรับ (MBC เท่ากับ 0.5 mg/mL)	0.00 ± 0.00	
ตัวอย่างที่ 2 : พลาสติกปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 10 mg ของสูตรตำรับ (2 เท่าของ MBC)	0.00 ± 0.00	
ตัวอย่างที่ 3 : พลาสติกปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 20 mg ของสูตรตำรับ (4 เท่าของ MBC)	10.42 ± 0.09	
ตัวอย่างที่ 4 : พลาสติกปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 30 mg ของสูตรตำรับ (6 เท่าของ MBC)	11.65 ± 0.13	

<p>ตัวอย่างที่ 5 :</p> <p>พลาสติกอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 40 มก ของสูตรตำรับ (8 เท่าของ MBC)</p>	<p>12.28 ± 0.16</p>	
<p>ตัวอย่างที่ 6 :</p> <p>พลาสติกอร์ปิดแผลแบบ เหลวที่มีสารสกัดใบ สาบเสือความเข้มข้น 50 มก ของสูตรตำรับ (10 เท่าของ MBC)</p>	<p>14.00 ± 0.00</p>	

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือ

สกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล และระเหยสารสกัดจนแห้งจะได้สารสกัดมีลักษณะขุ่นหนืด สีเขียวเข้ม และมีปริมาณสารสกัดใบสาบเสือ เท่ากับ 11.67% (± 0.99) อ้างอิงมาจาก Thophon และคณะ (45) พบว่าการสกัดส่วนของใบสาบเสือดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ให้ปริมาณสารสกัด 12.16 mg ($\pm 0.13\%$) , 8.42 mg ($\pm 0.11\%$), 10.45 mg ($\pm 0.01\%$) และ 2.37 mg ($\pm 0.21\%$) ตามลำดับ แม้ว่าการสกัดด้วยน้ำจะให้ปริมาณสารมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล แต่จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid) จากการสกัดส่วนใบสาบเสือดด้วยเอทานอล พบว่ามีสารสำคัญฟลาโวนอยด์ปริมาณ 10.16 mg ซึ่งมีค่ามากที่สุด และมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ เมทานอล และเฮกเซน คือ 2.25, 2.64 mg และตรวจไม่พบฟลาโวนอยด์ (not detected) ตามลำดับ

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของใบสาบเสือด ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดใบสาบเสือดความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่ามีสารสำคัญ ได้แก่ Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ซึ่งสารสำคัญถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 4.4 , 8.5 , 11.1 นาที ตามลำดับ จากการอ้างอิง Chen และ คณะ (46) พบว่าในการสกัดสารสำคัญจาก *Marchantia Convolvata* โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-DAD) ใช้คอลัมน์ C_{18} และตัวทำละลายภายในเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ได้แก่ methanol : acetonitrile : acetic acid : phosphoric acid : water เท่ากับ 200: 100: 10: 10: 200 โดยปริมาตร ที่ความยาวคลื่น 352 นาโนเมตร พบว่า Gallic acid, Quercetin และ apigenin ถูกชะออกมาในเวลา 4.2, 7-9 และ 12-15 นาที ตามลำดับ และมีปริมาณสาร Quercetin อยู่ในช่วง 2.0 - 20.8 $\mu\text{g/mL}$ และ Apigenin อยู่ในช่วง 1.6 - 20.0 $\mu\text{g/mL}$

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีปริมาณ Gallic acid, Quercetin และ Apigenin ในสารสกัดใบสาบเสือด เท่ากับ 6.59 mg (± 0.03), 5.02 mg (± 0.11) และ 17.92 mg (± 3.53) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณใน crude extract พบว่ามี Gallic acid, Quercetin และ Apigenin เท่ากับ 0.077 g (± 0.00), 0.059 g (± 0.001) และ 0.209 g (± 0.041)

/100g crude extract ตามลำดับ จากการอ้างอิง Thophon และคณะ (45) พบว่ามีปริมาณ Gallic acid ในสารสกัดใบสาบเสือ 0.154 g/100g crude extract, Quercetin ในสารสกัดใบสาบเสือ 0.031 g/100g crude extract และพบสารสำคัญในกลุ่มกลุ่มฟลาโวนอยด์ 1.016 g/100g crude extract ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดใบสาบเสือพบว่ามีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Quercetin และ Apigenin) มากกว่าสารในกลุ่มฟีนอลิก (Gallic acid)

5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) *S. aureus* และ *S. epidermidis* คือ 0.25 mg/ml และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *S. aureus* และ *S. epidermidis* คือ 0.5 mg/ml ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับผลการทดลองของ Thophon และคณะ (45) ที่รายงานว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) *S. aureus* คือ 0.81 mg/ml และ *S. epidermidis* คือ 6.25 mg/ml และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบสาบเสือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *S. aureus* คือ 1.62 mg/ml และ *S. epidermidis* คือ 12.5 mg/ml

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method พบพื้นที่การยับยั้งเชื้อตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0625 - 1 mg/ml โดยมีพื้นที่การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ตั้งแต่ 9.00 mm (± 0.00) ถึง 15.50 mm (± 0.71) และมีพื้นที่การยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ตั้งแต่ 10.00 mm (± 0.00) ถึง 15.50 mm (± 0.71) ซึ่งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Thophon และคณะ (45) ที่พบว่าพื้นที่การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* คือ 16.0 mm (± 0.50) และ *S. epidermidis* คือ 13.0 mm (± 1.00) จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าสารสกัดใบสาบเสือจึงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.5 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ มาใช้ในการเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดใบสาบเสือสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) คือ 0.5 mg/ml และเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือขึ้นเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 เท่าของความเข้มข้น MBC เริ่มต้น ซึ่งเทียบเท่ากับ 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมของสารสกัดใบสาบเสือในตำรับ ตามลำดับ (เมื่อเตรียมตำรับปริมาตร 10 กรัม) ซึ่งพบพื้นที่การยับยั้งเชื้อความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4, 6, 8 และ 10 เท่าของค่า MBC จึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดใบสาบเสือที่ 2 mg/ml (คิดเป็น 4 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้) ในการเติมในสูตรตำรับที่เหมาะสม คือ สูตรตำรับ Plastoid® B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG400 2% w/w

5.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ ด้วยวิธี ABTS assay พบว่ามี IC₅₀ ของสารสกัดใบสาบเสือ เท่ากับ 88.31 (\pm 4.42) μ g/mL และวิธี DPPH assay พบว่ามี IC₅₀ ของสารสกัดใบสาบเสือเฉลี่ย 143.92 (\pm 3.40) μ g/mL โดยทั้งสองวิธีใช้สารมาตรฐาน คือ Gallic acid ซึ่งสารสกัดจากใบสาบเสือมีสารสำคัญคือ Gallic acid ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (47) สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระให้เสถียรมากขึ้น จึงสามารถต้านออกซิเดชันได้ หากสารมีค่า IC₅₀ มากกว่า บ่งบอกว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า จากการทดลองของ Omokhua และคณะ (23) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสาบเสือ ด้วยวิธี ABTS assay พบว่ามี IC₅₀ เท่ากับ 1.69 μ g/mL และวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มี IC₅₀ เท่ากับ 24.60 μ g/mL ซึ่งสอดคล้องกันว่าสารสกัดใบสาบเสือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.5 การทดสอบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting test)

การศึกษาฤทธิ์การแข็งตัวของเลือดของสารสกัดใบสาบเสือ พบว่าสารสกัดใบสาบเสือ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0625 -1 mg/mL ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเลือด ดังนั้นสารสกัดใบสาบเสือจึงสามารถทำให้เลือดแข็งตัวได้ ส่วน DMSO ที่เป็น positive control สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ จึงสามารถทำให้เลือดจับตัวกันได้ และ normal saline ที่เป็น negative control ไม่สามารถทำให้เลือดแข็งตัวได้ โดยผลการทดลองสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ สุวรรณ และคณะ (48) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5 และ 31.25 μ g/mL พบว่าร้อยละการเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (%platelet aggregation) เพิ่มขึ้นในชุดทดสอบที่มีการเติมสารสกัดใบสาบเสือเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มี DMSO ความเข้มข้น 1% โดยสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 250 μ g/mL มี %platelet aggregation เท่ากับ 143 (\pm 5.44) และที่ความเข้มข้น 125, 62.5 และ 31.25 μ g/mL มี %platelet aggregation เท่ากับ 126% (\pm 4.27), 118% (\pm 3.80) และ 106% (\pm 1.02) ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดสอบนี้จึงยืนยันได้ว่าสารสกัดใบสาบเสือสามารถทำให้เลือดรวมกลุ่มกัน และเกิดการแข็งตัวของเลือดได้

5.6 การเตรียมระบบกึ่งฟิล์ม

5.6.1 การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของระบบกึ่งฟิล์ม

1) การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

เมื่อชั่งน้ำหนักดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสูตรตำรับที่มีน้ำหนักมากที่สุด หรือการลดลงของน้ำหนักมากที่สุด เมื่อเวลาผ่านไป เรียงลำดับได้ดังนี้ Betadine[®] Plastoid[®]B ความเข้มข้น 35, 30, 25, 20, 15, 10 และ 5% w/w รวมกับการพิจารณาลักษณะทางกายภาพเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด คือ Betadine[®] และ Plasta[®] จากกราฟเส้นแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างพบว่า Plastoid[®]B ความเข้มข้น 30 % w/w มีแนวโน้มน้ำหนักที่ลดลงมากกว่าผลิตภัณฑ์ Betadine[®] จากน้ำหนักเฉลี่ยที่เวลา 60 นาทีของผลิตภัณฑ์ Betadine[®] มีน้ำหนัก 63.74 mg (\pm 1.37) ,

ผลิตภัณฑ์ Plasta[®] มีน้ำหนัก 33.32 mg (± 1.13) และสูตรตำรับ Plastoid[®]B ความเข้มข้น 30 % w/w มีน้ำหนัก 49.89 mg (± 8.83) จึงเลือกสูตรตำรับ Plastoid[®]B ความเข้มข้น 30 % w/w เพื่อใช้ในการพิจารณาเลือกปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เหมาะสมต่อไป

2) การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

จากรูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate และ ค่า shear viscosity (ช่วง shear rate เท่ากับ $0.01-10 \text{ s}^{-1}$) เมื่อพิจารณาลักษณะความชันของเส้นกราฟ (flow curve) พบว่าตัวอย่างสูตรตำรับที่ 3 มีพฤติกรรมการไหลเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด คือ เมื่อให้แรงกระทำจะส่งผลให้ความหนืดของสารตัวอย่างลดลงเรื่อยๆ ซึ่งตรงกับสมบัติของการไหลแบบ pseudoplastic (49) โดยค่าความหนืดจะลดลง เมื่อเพิ่มอัตราเฉือน หรือยิ่งคนยิ่งเหลว เป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับตำรับ film forming และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์ความหนืดจะมากขึ้น

ที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมเมื่อทาผลิตภัณฑ์ลงบนผิว (50) พบว่า ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ Plastoid[®]B 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 % w/w มี ค่า shear viscosity เท่ากับ 0.0035 (± 0.0001), 0.0074 (± 0.0009), 0.0162 (± 0.0006), 0.0500 (± 0.0041), 0.1187 (± 0.0099), 9.6583 (± 5.1763), 36.0600 (± 21.7939) Pa·s ตามลำดับ พบว่าสูตรตำรับ Plastoid[®]B 30 % w/w มีค่า shear viscosity เท่ากับ 9.66 Pa·s (± 5.18) ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ Betadine[®] ที่มีค่า shear viscosity เท่ากับ 2.647 Pa·s (± 0.07) และผลิตภัณฑ์ Plasta[®] ที่มีค่า shear viscosity เท่ากับ 4.49 Pa·s (± 1.38) จึงเลือกสูตรตำรับ Plastoid[®]B 30%w/w เป็นสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับการทดลองเลือกปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เหมาะสมต่อไป

3) การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

จากรูปที่ 35 กราฟแท่งแสดงการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของสูตรตำรับ Plastoid[®]B 30 %w/w โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol ในปริมาณต่างๆ ซึ่งจากสูตรตำรับที่ 15 ที่มี Plastoid[®]B 30 : ethyl acetate 42 : isopropyl alcohol 28 %w/w มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.001460 M·Pa และมีค่า breaking strain เท่ากับ 169.41 % (± 4.7) เปรียบเทียบกับ Betadine[®] มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000284 M·Pa และมีค่า breaking strain เท่ากับ 261.361 % (± 3.61) และ Plasta[®] มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000467 (± 3.30) มีค่า breaking strain เท่ากับ 205.19% (± 7.30) พบว่าสูตรตำรับที่ 15 มีค่า Young's modulus ลดลงใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ Betadine[®] และ Plasta[®] จึงนำสูตรตำรับนี้มาใช้ในการหาชนิด ปริมาณตัวทำละลาย และปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เหมาะสมต่อไป

5.6.2 การหาชนิด ปริมาณตัวทำละลาย และปริมาณพลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสมโดยใช้พลาสติกไซเซออร์ 2% และ 5%w/w

พิจารณาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง เมื่อเพิ่มปริมาณพลาสติกไซเซออร์ จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการแห้งช้าลง เนื่องจากเมื่อพิจารณาน้ำหนักสุดท้ายของตัวรับที่เติมพลาสติกไซเซออร์จะมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติม และตัวอย่างที่เติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 2% w/w มีน้ำหนักน้อยกว่า ตัวอย่างที่เติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 5% w/w จึงสรุปได้ว่าการเติมพลาสติกไซเซออร์ทำให้ตัวอย่างแห้งช้าลง ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2 %w/w ในสูตรตำรับที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย Plastoid®B 30 : ethyl acetate 41: isopropyl alcohol 27: PEG 400 2% w/w มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เวลา 60 นาที มีน้ำหนักเท่ากับ 64.40 mg (± 2.23) ซึ่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ Betadine® ที่มีน้ำหนัก 63.74 mg (± 1.37) และผลิตภัณฑ์ Plasta® มีน้ำหนัก 33.32 mg (± 1.13)

การพิจารณาสมบัติการไหลของสารตัวอย่าง ที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} พบว่าเมื่อเติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2 % w/w ทำให้ shear viscosity เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างที่ไม่ได้เติม PEG 400 และมีค่าความหนืดมากขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองของ Aho, Padmanaban และคณะ (24, 51) เมื่อเพิ่ม PEG 400 ในตำรับจะส่งผลทำให้พอลิเมอร์เกิดความไม่เข้ากันลดความเป็นเนื้อเดียวกันและทำให้ความหนืดของผลิตภัณฑ์มากขึ้นตามความเข้มข้นของ PEG 400 ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 5 % w/w พบว่า Plastoid®B มีค่า shear viscosity เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ความหนืดจะเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลาย isopropyl acetate จะส่งผลให้ความหนืดของผลิตภัณฑ์ลดลง โดยสูตรตำรับประกอบด้วย Plastoid®B 30: ethyl acetate 41: isopropyl alcohol 27: PEG 400 2 %w/w มีค่า shear viscosity เท่ากับ 10.80 Pa•s (± 1.07) ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ Betadine® มีค่า shear viscosity เท่ากับ 2.65 Pa•s (± 0.07) และผลิตภัณฑ์ Plasta® มีค่า shear viscosity เท่ากับ 4.49 Pa•s (± 1.38) มากที่สุดจากทุกสูตรตำรับ จึงเลือกสูตรตำรับนี้เป็นสูตรตำรับที่เหมาะสม

จากการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของสูตรตำรับที่เติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2 %w/w (สูตรตำรับที่ 3) พบว่ามีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000767 M•Pa และค่า breaking strain ที่ 169.20 % (± 4.70) และสูตรตำรับที่เติมพลาสติกไซเซออร์ PEG 400 ความเข้มข้น 5 %w/w (สูตรตำรับที่ 8) มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000126 M•Pa และค่า breaking strain ที่ 359.52 % (± 63.62) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ Betadine® มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000284 M•Pa และมีค่า breaking strain เท่ากับ 261.361 % (± 3.61) และ Plasta® มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000467 มีค่า breaking strain เท่ากับ 205.19% (± 7.30) เนื่องจาก PEG 400 เป็นพลาสติกไซเซออร์ซึ่งช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับฟิล์ม ซึ่งมีผลต่อค่าความต้านทานแรงดึงขาด (tensile) และการยืดตัว (elongation) โดยค่าความสามารถในการต้านแรงดึงขาดแปรผกผันกับปริมาณ PEG

400 ส่วนความสามารถในการยึดตัวจะแปรผันตามปริมาณ PEG 400 ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Park et al. (52) เนื่องจากปริมาณพลาสติกไซเซอร์ที่เติมลงไปสามารถเกิดพันธะที่มีขั้วหรือพันธะไฮโดรเจนกับพอลิเมอร์ได้ ทำให้แรงระหว่างโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้กันอ่อนลง พิล์มจึงมีความยืดหยุ่นหรือยึดตัวมากขึ้น แต่จะมีความต้านแรงดึงขาดลดลง พบว่าสูตรตำรับที่เติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2 % w/w มีค่า Young's modulus ลดลงใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ Betadine® และ Plasta® มากขึ้น จึงเลือกสูตรตำรับที่เติม PEG 400 ความเข้มข้น 2 %w/w สำหรับพิจารณาเพื่อใส่สารสกัดจากใบสาบเสือและทดลองในขั้นต่อไป

จากการพิจารณาสมบัติทางกายภาพ ของสูตรตำรับที่เติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 ความเข้มข้น 5 %w/w (ตำรับที่ 7-11) พบว่าฟิล์มเกาะติดผิวผนังดี แต่เนื่องจากการปริมาณพลาสติกไซเซอร์สูง ทำให้ฟิล์มมีความมัน และลื่นมากขึ้น จึงไม่เหมาะสมในการใช้งาน ถึงแม้ว่าจากการพิจารณาระยะเวลาการแห้ง การไหล และเนื้อสัมผัสของสูตรตำรับที่เติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 ความเข้มข้น 5 %w/w จะใกล้เคียงกับตำรับที่เติมพลาสติกไซเซอร์ PEG 400 ความเข้มข้น 2 %w/w

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทั้งหมด ทั้งระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง,ศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ วิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส และการพิจารณาลักษณะทางกายภาพ จึงเลือก สูตรตำรับ Plastoid®B 30: ethyl acetate 41: isopropyl alcohol 27: PEG 400 2 %w/w สำหรับใส่สารสกัดจากใบสาบเสือและทดลองในขั้นต่อไป

5.7 การเตรียมพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ

5.7.1 การหาระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง (time to dry)

การหาระยะเวลาการแห้ง โดยชั่งน้ำหนักดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก ที่ลดลงทุก 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที ของสูตรตำรับ Plastoid®B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG 400 2% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg พบว่าเมื่อเติมสารสกัดใบสาบเสือแล้ว ไม่ส่งผลกระทบต่อระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด Betadine® ที่เวลา 0-50 นาที พบว่ามีระยะเวลาการแห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงมากกว่า Betadine® ส่วนที่เวลา 55-60 นาที ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด Plasta® ที่เวลา 0-50 นาที มีระยะเวลาการแห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่ลดลงน้อยกว่า Plasta® ส่วนที่เวลา 55-60 นาที ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

5.7.2 การศึกษาสมบัติการไหลของสารตัวอย่างด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

วัดค่า shear viscosity แต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กำหนด shear rate ในช่วง $0.01-10 \text{ s}^{-1}$ เมื่อพิจารณาที่ shear rate เท่ากับ 1 s^{-1} พบว่า สูตรตำรับ Plastoid®B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 :

PEG 400 2% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg มีค่า shear viscosity เท่ากับ 10.7900 (± 2.8505) Pa•s เปรียบเทียบ Blank มีค่า shear viscosity เท่ากับ 10.7986 (± 1.0701) Pa•s จึงสรุปได้ว่าสารสกัดใบสาบเสือส่งผลลดความหนืดของผลิตภัณฑ์เล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Johanna (24) ที่พบว่าหากสารสำคัญละลายโดยสมบูรณ์กับพอลิเมอร์ การเพิ่มปริมาณสารสำคัญจะลดความหนืดของสารละลาย เนื่องจากสารประกอบระหว่างพอลิเมอร์และสารสำคัญทำให้เกิดช่องว่างระหว่างสายโซ่ของพอลิเมอร์ทำให้เคลื่อนไหวได้มากขึ้นจึงส่งผลลดค่าความหนืดของสารละลาย หากเพิ่มสารสำคัญจนถึงจุดอิ่มตัว (saturation level) สารสำคัญส่วนที่เกินจากจุดอิ่มตัว และไม่สามารถละลายได้จะเพิ่มความหนืดให้กับผลิตภัณฑ์แทน และเมื่อเปรียบเทียบความหนืดของตำรับที่พัฒนาขึ้น กับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดได้แก่ Betadine[®] และ Plasta[®] พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

5.7.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัส ของสูตรตำรับที่ประกอบด้วย Plastoid[®]B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG 400 2% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg พบว่ามีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.001660 M•Pa และค่า breaking strain มีค่า 174.3425% (± 3.484) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดได้แก่ Betadine[®] ค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000284 M•Pa และ มีค่า breaking strain เท่ากับ 261.361 % (± 3.61) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด ได้แก่ Plasta[®] มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.000467 M•Pa และมีค่า breaking strain เท่ากับ 205.19% (± 7.30) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.8 การซึมผ่านของไอน้ำ

จากการคำนวณอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate ; WVTR) สูตรตำรับที่ประกอบด้วย Plastoid[®]B 30: ethyl acetate 41: isopropyl alcohol 27: PEG 400 2% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg มีค่า WVTR เท่ากับ 1.5943 mg/hr ส่วน Blank, Betadine[®] และ Plasta[®] มีค่า WVTR เท่ากับ 1.3272, 7.4056 และ 6.5717 mg/hr ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะการทดลอง ดังนี้ อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 28.82 องศาเซลเซียส (± 2.37) และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 74 (± 0.15) %RH จากผลการทดลองสรุปได้ว่าไอน้ำสามารถซึมผ่านแผ่นฟิล์มได้ แต่มีปริมาณไอน้ำที่ซึมผ่านน้อยกว่าเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ ของพลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่เติมสารสกัดใบสาบเสือปริมาณ 20 mg เปรียบเทียบกับ Blank พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 1-5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ขายในท้องตลาด Betadine[®] พบว่า มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 1-5 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ Plasta[®] พบว่า มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 1-3 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนในวันที่ 4-5 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.9 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สารสกัดใบสาบเสือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางผิวหนังได้แก่ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ได้เท่ากับ 0.25 mg/mL และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ได้เท่ากับ 0.5 mg/mL ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ค่า IC₅₀ (inhibitory concentration ที่ 50%) ของการทดสอบ ABTS assay มีค่า 88.31 µg/mL และ IC₅₀ ของการทดสอบ DPPH assay มีค่า 143.92 µg/mL และสารสกัดใบสาบเสือตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0625 - 1 mg/mL สามารถทำให้เลือดเกิดการเกาะกลุ่ม แสดงว่ามีฤทธิ์ช่วยให้เลือดแข็งตัวได้

การพัฒนาสูตรตำรับของระบบก่อฟิล์มที่เตรียมด้วยพอลิเมอร์ Plastoid[®]B จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ Plastoid[®]B ที่ 30 % w/w และเติมพลาสติกไซเซออร์ คือ PEG 400 เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่ตำรับ การประเมินผลของความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ที่มีต่อสมบัติของระบบก่อฟิล์ม โดยประเมิน 3 ด้าน ได้แก่ เนื้อสัมผัส การไหล และความหนืด และระยะเวลาการแห้ง พบว่าสูตรตำรับที่ดีที่สุด ประกอบด้วย Plastoid[®]B 30 : ethyl acetate 41 : isopropyl alcohol 27 : PEG 400 2% w/w จากนั้นนำมาเติมสารสกัดใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 4 เท่าของความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ซึ่งเท่ากับ 2 mg/mL และจากงานวิจัยของ Thapsingkaew และคณะ (54) ได้รายงานค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลต่อเซลล์ (IC₅₀) เท่ากับ 3 mg/mL และสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ มี IC₅₀ เท่ากับ 10 mg/mL และจากงานวิจัยของ R.N. Asomugha และคณะ (55) พบว่าการสกัดสาบเสือด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ในการทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (LC₅₀) มากกว่าหรือเท่ากับ 5,000 และ 2,154 mg/kg body weight ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดสาบเสือที่เติมลงในสูตรตำรับจึงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ต้องการ และมีความปลอดภัย

จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์พลาสติกปิดแผลแบบเหลวที่พัฒนาขึ้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สมานแผล ต้านการอักเสบ มีระยะเวลาในการแห้งที่เร็ว มีความยืดหยุ่น ดีทน มีความสะดวกในการใช้งาน และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยเห็นว่าสูตรตำรับที่พัฒนาขึ้น มีข้อจำกัด ได้แก่ สีของผลิตภัณฑ์อาจสังเกตเห็นได้ชัดเมื่อทาลงบนผิว อีกทั้งยังคงมีกลิ่นของตัวทำละลายอยู่ด้วยเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด คณะผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะในการพัฒนาตำรับโดยอาจเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย หรือพิจารณาสารแต่งกลิ่นเพิ่มเติมในสูตรตำรับต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:25-64.
2. Derakhshandeh H, Kashaf SS, Aghabaglou F, Ghanavati IO, Tamayol A. Smart Bandages: The Future of Wound Care. *Trends in biotechnology*. 2018;36(12):1259-74.
3. Evrard A, Flory-Celini C, Claeys-Bruno M, De Herde A. Influence of liquid absorption coefficient on hygrothermal behaviour of an existing brick wall with Lime-Hemp plaster. *Building and Environment*. 2014;79:90-100.
4. Derakhshandeh H, Kashaf SS, Aghabaglou F, Ghanavati IO, Tamayol A. Smart bandages: the future of wound care. *Trends in biotechnology*. 2018;36(12):1259-74.
5. Gonzalez ACdO, Costa TF, Andrade ZdA, Medrado ARAP. Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2016;91(5):614-20.
6. Siriwong N, Chukeatirote E. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Journal of Health Science and Medical Research*. 2009;27(4):347-58.
7. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*. 2009;7(8):555-67.
8. Afolabi C. MA, Ibukun E. O., Dan-ologe I. A. Phytochemical constituents and antioxidants properties of extract from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Sci Res Essays*. 2007;2:191-4.
9. Onkaramurthy M. VVP, Thippeswamy B. S., Madhusudana Reddy T. N., Rayappa H., Badami S. keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage. *Burns*. 2001;27:319-27.
10. Vijayaraghavan K. ASM, Maruthi R. Studies on phytochemical screening and antioxidant activity of Anti-diabetic and anti-cataract effects of *Chromolaena odorata* Linn., in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ethnopharmacol*. 2013;145:363-72.
11. Pandith H. ZX, Thongpraditchote S., Wongkrajang Y., Gritsanapan W., Baek S. J. Effect of Siam weed extract and its bioactive component scutellareintetramethyl ether on anti-inflammatory activity through NF-kB pathway. *J Ethnopharmacol*. 2013;147:434-41.
12. Ngane A. N. ERE, Ndifor F., Biyiti L., Zollo P. H. A., Bouchet P. Antifungal activity of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson (Asteraceae) of Cameroon. *Chemotherapy*. 2006;52:103-6.
13. Waksman SA, Reilly HC. Agar-streak method for assaying antibiotic substances. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. 1945;17(9):556-8.

14. Brantner A, Pfeiffer, K., Brantner, H. Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. *Pharmazie*. 1994;49(7):512-6.
15. พันธุ์สุวรรณค์ บ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 2013;3:282-3.
16. Mosmon T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55-63.
17. Pandith H, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. In vivo and in vitro hemostatic activity of *Chromolaena odorata* leaf extract. *Pharmaceutical biology*. 2012;50(9):1073-7.
18. Afolabi C. MA IEO, Dan-ologe I. A. Phytochemical constituents and antioxidants properties of extract from the leaves of *Chromolaenaodorata*. *Sci Res Essays*. 2007;2:191-4.
19. Zurdo Schroeder I FP SU, Lehr C-M. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65(1):111-21.
20. Mcauley WJ CF HNF-fahsIDR, Singh TRR, editors. Novel delivery systems for transdermal and intradermal drug delivery.
21. Fuhrman CL. Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. Columbia2005. p. 325.
22. Davis J, McLister A. *History and Evolution of Bandages, Dressings, and Plasters*. 2016. p. 63-92.
23. Omokhua AG, Ondua M, Van Staden J, McGaw LJ. Synergistic activity of extracts of three South African alien invasive weeds combined with conventional antibiotics against selected opportunistic pathogens. *South African Journal of Botany*. 2019;124:251-7.
24. Aho J, Boetker JP, Baldursdottir S, Rantanen J. Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. *International journal of pharmaceutics*. 2015;494(2):623-42.
25. Swick LL, Mencke D, Suah MJ. Novel Liquid Bandage as a Topical Treatment for Post-Surgical Wound Care. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*. 2017;6.
26. Mcauley WJ CF, Hoboken NJ. Film-forming and heated systems. In: Donnelly RF, Singh TRR, editors. Novel delivery systems for transdermal and intradermal drug delivery.

27. Schuren J, Becker A, Gary Sibbald R. A liquid film-forming acrylate for peri-wound protection: a systematic review and meta-analysis (3M™ Cavilon™ no-sting barrier film). *International wound journal*. 2005;2(3):230-8.
28. Rowe. RC, Sheskey. PJ, Quinn. ME. Handbook Of Pharmaceutical Excipients 6th Edition. In: 6, editor. povidone. london: Pharmaceutical Press; 2009. p. 581-5.
29. McKeen. LW. C2. In: Urban PG, editor. Bretherick's Handbook of Reactive Chemical Hazards (Eighth Edition): Elsevier; 2017. p. 1189-204.
30. Cilurzo F, Selmin F, Gennari CG, Montanari L, Minghetti P. Application of methyl methacrylate copolymers to the development of transdermal or loco-regional drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*. 2014;11(7):1033-45.
31. Gennari CG, Selmin F, Minghetti P, Cilurzo F. Medicated foams and film forming dosage forms as tools to improve the thermodynamic activity of drugs to be administered through the skin. *Current drug delivery*. 2019;16(5):461-71.
32. Roy A, Ghosh A, Datta S, Das S, Mohanraj P, Deb J, et al. Effects of plasticizers and surfactants on the film forming properties of hydroxypropyl methylcellulose for the coating of diclofenac sodium tablets. *Saudi pharmaceutical journal*. 2009;17(3):233-41.
33. Ritchie RO, Knott JF, Rice J. Relationship between critical tensile stress and fracture toughness in mild steel. Brown Univ., Providence, RI (USA). Div. of Engineering; 1973.
34. Nelson. PSA. Stress and Strain. EENS 1110 Physical Geology. 2015.
35. Minghetti P, Cilurzo F, Liberti V, Montanari L. Dermal therapeutic systems permeable to water vapour. *International journal of pharmaceutics*. 1997;158(2):165-72.
36. Shri. K. Sharma SJM, Syed S. H. Rizvi. Food Process Engineering: Theory and Laboratory Experiment. A John Wiley&Sons. 2000.
37. Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J Pharm Pharm Sci*. 2000;3(3):303-11.
38. Hu Y, Topolkaraev V, Hiltner A, Baer E. Measurement of water vapor transmission rate in highly permeable films. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;81(7):1624-33.
39. Kołodziejska I, Piotrowska B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*. 2007;103(2):295-300.

40. Hanphanphoom S, Krajangsang S. Antimicrobial Activity of *Chromolaena odorata* Extracts against Bacterial Human Skin Infections. *Modern Applied Science*. 2016;10:159.
41. Chen X, Xiao J. RP-HPLC-DAD determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and apigenin in *Marchantia Convoluta*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2010;Volume 4(Number 3):175-81.
42. Alderman DJ, Smith P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*. 2001;196(3):211-43.
43. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9):1231-7.
44. Boudjeko T, Megnekou R, Woguia AL, Kegne FM, Ngomoyogoli JEK, Tchapoum CDN, et al. Antioxidant and immunomodulatory properties of polysaccharides from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L.) King and H.E. Robins leaves. *BMC Research Notes*. 2015;8(1):759.
45. Thophon SHS, Waranusantigul P, Kangwanrangsan N, Krajangsang S. Antimicrobial activity of *Chromolaena odorata* extracts against bacterial human skin infections. *Modern Applied Science*. 2016;10(2).
46. Chen X-q, Xiao J-b. RP-HPLC-DAD determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and apigenin in *Marchantia convoluta*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2010(3):175-81.
47. Kahkeshani N, Farzaei F, Fotouhi M, Alavi SS, Bahramsoltani R, Naseri R, et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2019;22(3):225.
48. วงศา สวรรณเมศแสพหว.ฤทธิ์ ของ สาร สกัด ใบ กะเม็ง ใบ สาบเสือ ใบ บัวบก และ ลูก เบนญกานี่ ต่อ ระบบ การ แข็งตัว ของ เลือด. วารสาร วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี หัวเฉียว เฉลิม พระเกียรติ ISSN 2651-2483 (Online)(TCI Tier 2). 2017;3(2):42-53.
49. Franck A. Understanding rheology of structured fluids. *Book of TA instruments*. 2004:1-17.
50. Cristiano MC, Froiio F, Mancuso A, De Gaetano F, Ventura CA, Fresta M, et al. The Rheolaser Master™ and Kinexus Rotational Rheometer® to Evaluate the Influence of Topical Drug Delivery Systems on Rheological Features of Topical Poloxamer Gel. *Molecules*. 2020;25(8):1979.
51. Padmanaban R, Venkatramanan K, Girivel S, Kasthuri K, Usharani A, Vellaichamy R. Thermal and rheological studies of aqueous solutions of PEG 400 and

PEG 1500 having pharmaceutical applications. *Recent Trends in Materials Science and Applications*: Springer; 2017. p. 723-30.

52. Park HJ, C.L. Weller, P.J. Vergano and R.F. Testin. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible film. *Journal of Food Science*. 1993;58(6):1361-4.

53. Bajpai S, Navin C, Ruchi L. Water vapor permeation and antimicrobial properties of sago starch based films formed via microwave irradiation. *International Food Research Journal*. 2011;18(1).

54. Thapsingkaew O, Thongchuai B, Pornprasert S. Radical Scavenging Activities of Crude Leaf Extracts from *Eupatorium odoratum* Linn. and *Ageratum conyzoides* Linn. *Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences*. 2011;44(3):195.

55. Asomugha R. Acute and Cytotoxicity Studies of Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2015;18(1):46-9.

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid®B ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w ที่ตั้งตั้งแต่เวลา 0 - 60 นาที

time (min)	5%Plastoid		10%Plastoid		15%Plastoid		20%Plastoid		25%Plastoid		30%Plastoid		35%Plastoid	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
5	24.78	1.34	34.66	3.73	48.71	2.88	56.67	4.64	71.52	1.26	84.58	4.73	77.62	0.72
10	23.36	1.16	27.05	0.29	36.48	1.81	45.47	4.12	60.38	0.39	75.35	5.91	72.73	1.08
15	21.94	0.85	25.08	0.57	32.87	1.17	41.42	3.11	57.48	0.16	70.41	3.81	69.38	1.23
20	21.12	0.68	22.55	3.68	30.94	0.91	39.04	2.14	54.55	0.29	66.42	4.49	66.72	1.22
25	20.77	0.52	21.81	3.73	29.79	0.66	37.55	1.61	52.01	0.22	62.83	5.01	64.85	1.14
30	20.42	0.54	21.36	3.71	29.31	0.61	36.79	1.07	50.41	0.29	59.63	5.47	63.09	1.05
35	20.08	0.63	20.87	3.52	28.79	0.50	36.06	0.65	49.10	0.22	57.54	6.06	61.66	1.04
40	19.67	0.70	20.85	3.58	28.42	0.49	35.62	0.79	47.83	0.20	55.52	6.68	60.45	0.98
45	19.53	0.68	20.54	3.93	28.19	0.65	35.14	0.63	46.60	0.18	53.75	7.13	59.31	1.03
50	19.32	0.60	20.40	3.80	27.85	0.52	34.82	0.55	45.58	0.18	52.33	7.71	58.34	1.01
55	19.22	0.52	20.12	4.24	27.63	0.60	34.38	0.48	45.05	0.19	50.89	8.34	57.73	1.05
60	19.08	0.60	20.01	3.78	27.38	0.46	34.21	0.38	44.34	0.15	49.89	8.83	57.08	0.80

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้สัดส่วนต่างๆของตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ethyl acetate และ isopropyl alcohol ที่ตั้งแต่เวลา 0 – 60 นาที

time (min)	Plastoid 30% (EA70:PEG0)		Plastoid 30% (EA56:ISO14:PEG0)		Plastoid 30% (EA28:ISO42:PEG0)		Plastoid 30% (EA42:ISO28:PEG0)		Plastoid 30% (EA14:ISO56:PEG0)	
	สูตรตำรับที่ 13		สูตรตำรับที่ 14		สูตรตำรับที่ 15		สูตรตำรับที่ 16		สูตรตำรับที่ 17	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
5	74.36	6.95	79.21	1.65	90.71	0.07	93.92	4.07	90.75	2.60
10	70.36	6.88	75.31	2.10	82.55	1.03	89.64	6.96	87.52	2.48
15	67.04	6.37	70.98	2.01	78.62	1.15	87.40	8.37	86.27	2.49
20	63.45	6.18	67.03	2.39	75.67	1.38	86.21	9.40	84.25	2.52
25	61.69	5.80	64.74	1.80	73.40	1.45	85.21	10.13	82.64	2.30
30	59.88	5.47	63.02	2.17	70.36	1.75	84.30	10.63	81.91	2.30
35	57.98	5.23	60.39	1.89	69.53	1.54	83.41	11.32	80.49	2.18
40	56.70	4.83	59.29	2.12	67.42	1.81	82.35	12.10	80.03	2.17
45	55.74	4.35	57.43	1.64	66.36	1.75	81.72	12.44	79.60	2.24
50	54.09	3.99	55.56	1.86	65.04	1.63	80.56	13.24	77.51	2.13
55	52.51	4.94	54.52	1.88	63.64	1.74	79.99	13.58	76.28	2.22
60	51.42	5.68	53.96	2.18	62.51	1.73	79.54	13.88	75.78	2.21

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดและเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 2% w/w ตั้งแต่เวลา 0 – 60 นาที

time (min)	Plastoid 30% (EA68:PEG2)		Plastoid 30% (EA55:iso13:PEG2)		Plastoid 30% (EA41:iso27:PEG2)		Plastoid 30% (EA27:iso41:PEG2)		Plastoid 30% (EA13:iso55:PEG2)	
	สูตรตำรับที่ 1		สูตรตำรับที่ 2		สูตรตำรับที่ 3		สูตรตำรับที่ 4		สูตรตำรับที่ 5	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
0	100	0.00	100	0.00	100	0.00	100	0.00	100	0.00
5	85.44	3.80	82.17	0.85	88.12	2.18	91.51	1.39	93.62	0.16
10	79.34	4.27	76.71	0.56	83.10	1.50	88.39	1.19	90.94	0.40
15	74.90	3.98	72.84	0.62	79.08	1.42	86.52	0.15	88.77	0.41
20	71.71	3.76	69.70	0.76	77.10	1.62	83.36	1.38	87.14	0.65
25	68.78	3.62	67.06	0.49	73.89	1.43	82.38	0.96	85.67	0.81
30	66.49	3.39	65.18	0.53	71.98	1.87	81.04	0.37	84.55	0.84
35	64.73	3.08	63.18	0.39	70.55	1.49	79.22	1.12	83.25	0.66
40	63.44	3.44	61.91	0.51	68.87	1.56	78.29	0.62	82.38	1.06
45	61.45	2.72	60.25	0.49	67.64	1.19	77.29	0.73	81.50	1.10
50	60.50	2.50	59.22	0.44	66.75	1.74	75.96	0.70	80.52	1.15
55	59.85	3.03	58.08	0.44	65.62	1.56	75.04	0.49	79.61	1.48
60	57.73	2.70	56.90	0.47	64.40	2.23	74.22	0.50	78.80	1.22

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดและเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5% w/w ตั้งแต่เวลา 0 – 60 นาที

time (min)	Plastoid 30% (EA65:PEG5)		Plastoid 30% (EA53.5:ISO11.5:PEG5)		Plastoid 30% (EA39.5:iso25.5:PEG5)		Plastoid 30% (EA25.5:ISO39.5:PEG5)		Plastoid 30% (EA11.5:ISO11.5:PEG5)	
	สูตรตำรับที่ 7		สูตรตำรับที่ 8		สูตรตำรับที่ 9		สูตรตำรับที่ 10		สูตรตำรับที่ 11	
	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.	mean	S.D.
0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
5	85.44	1.09	86.87	0.78	87.40	1.10	89.98	1.18	91.02	1.15
10	80.58	0.95	81.89	0.92	83.05	1.26	88.60	0.86	87.98	1.48
15	77.85	1.29	78.11	0.96	78.61	1.72	86.21	0.46	85.90	1.60
20	72.63	0.90	76.21	1.01	76.64	1.67	84.24	0.38	83.58	1.61
25	71.44	0.99	73.91	1.00	74.98	1.62	82.28	0.21	82.37	1.67
30	69.55	0.49	71.99	0.93	73.16	1.67	80.68	0.41	81.12	1.80
35	68.24	0.55	70.21	1.00	71.37	1.67	79.27	0.49	79.94	1.94
40	66.29	0.49	68.85	1.01	69.70	1.73	77.83	0.48	79.06	1.98
45	65.05	0.33	67.58	0.93	67.43	0.78	76.98	0.68	78.13	1.99
50	63.73	0.43	66.04	1.00	67.52	1.66	75.98	0.73	77.14	2.28
55	62.94	0.17	65.06	0.86	66.26	1.76	74.94	0.91	76.57	2.14
60	62.42	0.46	63.88	1.03	65.08	2.23	74.18	1.02	75.90	2.08

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid®B 30% : ethyl acetate 42% : isopropyl alcohol 28% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด Betadine®

time (min)	สูตรตำรับที่ 3 + สารสกัดใบสาบเสือ		Betadine®		p-value
	mean	S.D.	mean	S.D.	
60	100	0	100	0	1.000
55	85.93074	0.374903	89.2686	0.800355	0.530
50	80.84416	1.974923	84.47317	0.991776	0.001*
45	76.94805	1.807716	80.98853	1.079287	0.000*
40	76.94805	1.807716	78.07183	1.008676	0.000*
35	74.24242	1.31216	75.45726	1.143773	0.000*
30	71.86147	0.749806	73.54303	1.207029	0.000*
25	70.34632	1.874514	71.39948	1.241717	0.000*
20	67.96537	0.187451	69.73684	1.279532	0.000*
15	67.96537	0.187451	68.03946	1.313367	0.000*
10	65.25974	2.272727	66.36411	1.237091	0.000*
5	64.06926	0.374903	65.08365	1.503177	0.000*
0	64.06926	0.374903	63.74204	1.369485	0.000*

ตารางแสดงระยะเวลาการแห้งของสารตัวอย่างระบบกึ่งฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid®B 30% : ethyl acetate 42% : isopropyl alcohol 28% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg เทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด เทียบกับ Plasta®

time (min)	สูตรตำรับที่ 3 + สารสกัดใบสาบเสือ		Plasta®		p-value
	mean	S.D.	mean	S.D.	
60	100	0	100	0	1.000
55	85.93	0.37	83.38	3.70	0.530
50	80.84	1.97	69.64	2.15	0.001*
45	76.94	1.80	59.59	2.04	0.000*
40	76.94	1.80	54.74	2.33	0.000*
35	74.24	1.31	50.51	2.56	0.000*
30	71.86	0.74	46.17	1.89	0.000*
25	70.34	1.87	42.88	1.60	0.000*
20	67.96	0.18	40.06	1.28	0.000*
15	67.96	0.18	37.91	1.43	0.000*
10	65.25	2.27	32.45	3.44	0.000*
5	64.06	0.37	34.47	1.10	0.000*
0	64.06	0.37	33.32	1.12	0.000*

การทดสอบการไหลและความหนืดของสารตัวอย่าง (Rheological properties)
 ตารางแสดงค่าความหนืด (shear viscosity) โดยใช้พอลิเมอร์ความเข้มข้น
 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 %w/w

Conc.	shear rate 1 s^{-1} : shear viscosity (Pa•s)	S.D.
Plastoid [®] B 35%	36.060	2.79
Plastoid [®] B 30%	9.658	5.17
Plastoid [®] B 25%	0.118	0.01
Plastoid [®] B 20%	0.049	0.01
Plastoid [®] B 15%	0.016	0.00
Plastoid [®] B 10%	0.007	0.00
Plastoid [®] B 5%	0.003	0.00
Plasta [®]	4.494	1.38
Betadine [®]	2.647	0.07

ตารางแสดงค่าความหนืด (shear viscosity) โดยใช้สัดส่วนต่างๆของตัวทำละลาย

สูตรตำรับ		shear rate 1 s^{-1} : shear viscosity (Pa•s)	S.D.
สูตรตำรับที่ 13	Plastoid [®] B 30% (EA70:PEG0)	20.27	1.09
สูตรตำรับที่ 14	Plastoid [®] B 30% (EA56:ISO14:PEG0)	16.33	0.91
สูตรตำรับที่ 15	Plastoid [®] B 30% (EA28:ISO42:PEG0)	9.82	0.80
สูตรตำรับที่ 16	Plastoid [®] B 30% (EA42:ISO28:PEG0)	6.76	4.32
สูตรตำรับที่ 17	Plastoid [®] B 30% (EA14:ISO56:PEG0)	8.60	3.12

ตารางแสดงค่าความหนืด (shear viscosity) ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิด
 และเติมพลาสติกไซเซออร์ความเข้มข้น 2% w/w

สูตรตำรับ	shear rate 1 s^{-1} : shear viscosity (Pa•s)	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA68:PEG2)	22.29	2.96
Plastoid [®] B 30% (EA55:iso13:PEG2)	12.77	2.68
Plastoid [®] B 30% (EA41:iso27:PEG2)	10.79	1.07
Plastoid [®] B 30% (EA27:iso41:PEG2)	11.29	1.96
Plastoid [®] B 30% (EA13:iso55:PEG2)	14.53	1.83
Plasta [®]	4.49	1.38
Betadine [®]	2.64	0.07

ตารางแสดงค่าความหนืด (shear viscosity) ของระบบกึ่งฟิล์ม โดยใช้พอลิเมอร์, ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5%w/w

สูตรตำรับ	shear rate 1 s^{-1} : shear viscosity (Pa•s)	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA65:PEG5)	14.74	6.81
Plastoid [®] B 30% (EA53.5:ISO11.5:PEG5)	17.51	9.99
Plastoid [®] B 30% (EA39.5:iso25.5:PEG5)	12.48	2.47
Plastoid [®] B 30% (EA25.5:ISO39.5:PEG5)	19.39	5.30
Plastoid [®] B 30% (EA11.5:ISO11.5:PEG5)	23.38	8.23
Plasta [®]	4.49	1.38
Betadine [®]	2.64	0.07

ตารางแสดงค่าความหนืด (shear viscosity) ของระบบกึ่งฟิล์มเทียบกับ Betadine[®] และ Plasta[®]

สูตรตำรับ	shear rate 1 s^{-1} : shear viscosity(Pa•s)	
	mean	S.D.
Plastoid [®] B 30:EA41:iso27:PEG2 %w/w +C.odorata 20 mg	10.79	2.85
Plasta [®]	4.49	1.38
Betadine [®]	2.64	0.07

ตารางแสดงค่า breaking strain เฉลี่ย ของสารตัวอย่างโดยใช้สัดส่วนต่างๆของตัวทำละลาย

สูตรตำรับ		mean	S.D.
สูตรตำรับที่ 13	Plastoid [®] B 30% (EA70:PEG0)	169.40	4.70
สูตรตำรับที่ 14	Plastoid [®] B 30% (EA56:iso14:PEG0)	199.39	37.16
สูตรตำรับที่ 15	Plastoid [®] B 30% (EA42:iso28:PEG0)	216.85	70.13
สูตรตำรับที่ 16	Plastoid [®] B 30% (EA28:iso42:PEG0)	190.87	12.31
สูตรตำรับที่ 17	Plastoid [®] B 30% (EA14:iso56:PEG0)	194.81	15.44

ตารางแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของสารตัวอย่างโดยใช้สัดส่วนต่างๆของตัวทำละลาย

สูตรตำรับ	Young's modulus	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA70:PEG0)	0.00145	0.00051
Plastoid [®] B 30% (EA56:iso14:PEG0)	0.00194	0.00048
Plastoid [®] B 30% (EA42:iso28:PEG0)	0.00097	0.00025
Plastoid [®] B 30% (EA28:iso42:PEG0)	0.00097	0.00016
Plastoid [®] B 30% (EA14:iso56:PEG0)	0.00105	0.00017
Betadine [®]	0.00028	0.00000
Plasta [®]	0.00046	0.00010

ตารางแสดงค่า breaking strain เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซออร์ความเข้มข้น 2% w/w

สูตรตำรับ	mean	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA68:PEG2)	166.60	7.46
Plastoid [®] B 30% (EA55:iso13:PEG2)	168.55	1.63
Plastoid [®] B 30% (EA41:iso27:PEG2)	169.20	1.55
Plastoid [®] B 30% (EA27:iso41:PEG2)	169.13	1.55
Plastoid [®] B 30% (EA13:iso55:PEG2)	351.64	73.86

ตารางแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid[®]B 30% w/w และตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซออร์ความเข้มข้น 2%w/w

สูตรตำรับ	mean	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA68:PEG2)	0.001200	0.00024
Plastoid [®] B 30% (EA55:iso13:PEG2)	0.000696	0.00015
Plastoid [®] B 30% (EA41:iso27:PEG2)	0.000767	0.00016
Plastoid [®] B 30% (EA27:iso41:PEG2)	0.001267	0.00045
Plastoid [®] B 30% (EA13:iso55:PEG2)	0.000408	0.00011
Betadine [®]	0.000284	0.00006
Plasta [®]	0.000466	0.00010

ตารางแสดงค่า breaking strain เฉลี่ย ของระบบก่อก้อนฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซออร์ความเข้มข้น 5%w/w

สูตรตำรับ	mean	S.D.
Plastoid [®] B 30% (EA68:PEG5)	171.8060	1.672
Plastoid [®] B 30% (EA55:iso13:PEG5)	175.4053	6.042
Plastoid [®] B 30% (EA41:iso27:PEG5)	359.5213	63.62
Plastoid [®] B 30% (EA27:iso41:PEG5)	362.7154	3.610
Plastoid [®] B 30% (EA13:iso55:PEG5)	361.0047	43.822

ตารางแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของระบบก่อก่อฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid®B30%
ตัวทำละลาย 2 ชนิด และเติมพลาสติกไซเซอร์ความเข้มข้น 5%w/w

สูตรตำรับ	mean	S.D.
Plastoid®B 30% (EA65:PEG5)	0.00122000	0.00031
Plastoid®B 30% (EA53.5:ISO11.5:PEG5)	0.00085898	0.00016
Plastoid®B 30% (EA39.5:iso25.5:PEG5)	0.00012607	0.00001
Plastoid®B 30% (EA25.5:ISO39.5:PEG5)	0.00010655	0.00000
Plastoid®B 30% (EA11.5:ISO11.5:PEG5)	0.00003380	0.00000
Betadine®	0.00028442	0.00006
Plasta®	0.00046616	0.00010

ตารางแสดงค่า Young's modulus เฉลี่ย ของตัวอย่างระบบก่อก่อฟิล์มโดยใช้พอลิเมอร์ Plastoid®B
30 : ethyl acetate 42 : isopropyl alcohol 28% w/w ที่เติมสารสกัดใบสาบเสือ 20 mg

สูตรตำรับ	mean	S.D.
Plastoid®B 30:EA41:iso27:PEG2 %w/w+C.odorata 20 mg	0.001653	0.000362
Betadine®	0.000284	0.000056
Plasta®	0.000466	0.000101

ภาคผนวก ข

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาและประเมินพลาสติกเปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดใบสาบเสือ
 ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน(อ./ดร./ผศ./รศ./ศ) ภก.รศ.ดร.กัมปนาท หวลบุตตา
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1/เมษายน/2563 ถึงวันที่ 9/เมษายน/2564
 ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ 1/เมษายน/2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100 %) 9000 บาท เมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายงาน	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1.ค่าตอบแทน	0	0	0
2.ค่าจ้าง	0	0	0
3.ค่าวัสดุ	8,000	8,000	0
4.ค่าใช้สอย	1,000	1,000	0
5.ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	0	0	0
รวม	9,000	9,000	0

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

เอกสารการตรวจสอบการคัดลอกของจุลินิพนธ์

Plagiarism Checking Report

Created on Apr 5, 2021 at 09:31 AM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2018697	Apr 5, 2021 at 09:31 AM	59210177@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	โครงการวิจัยการพัฒนาและประเมินพลาสเดอร์ปิดแผลแบบเหลวที่มีสารสกัดในสามเสือ.docx	Completed	0.56 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	การสกัดสารสีจากพืชบางชนิด และการหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อพัฒนาเป็นสีผสมอาหารธรรมชาติ, Extraction of pigments from some plants and antioxidant assays for natural food colorant development	ภัทรพร วงศ์ตะนา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	0.29 %
2	รายงานการวิจัยการพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพิษสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน, A basic development of immunotoxicological assays as a screening tool for detecting immuno-modulating activities of tha	เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	0.26 %