



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการออกแบบและพัฒนาตำรับยาใช้ภายนอกจากพืชท้องถิ่น
ของประเทศไทยในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนังเพื่อลดการอักเสบ
Design and development of transdermal patches as anti-
inflammatory formulations from local Thai plants

ภัทรวดี ศรีคุณ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 692906
สัญญาเลขที่ 78/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการออกแบบและพัฒนาตำรับยาใช้ภายนอกจากพืชท้องถิ่น
ของประเทศไทยในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนังเพื่อลดการอักเสบ
Design and development of transdermal patches as anti-
inflammatory formulations from local Thai plants

ภัทรวดี ศรีคุณ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 78/2561

ขอขอบพระคุณ Professor Seiji Okada (Kumamoto University, Kumamoto, Japan) ที่ให้ความเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการวิจัยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและปรึกษาเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงและแนวทางในการตีพิมพ์ผลงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เกษัชกรหญิง ดร.พรรณเพ็ญ วัฒนาอาชากิจ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการวิจัยในการศึกษาประเมินตำรับยาแผ่นแปะผิวหนัง พร้อมคำแนะนำด้านการพัฒนาตำรับ

ขอขอบพระคุณ เกษัชกรหญิง รศ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับสารประกอบ ECa 233 และการพัฒนาเพื่อต่อยอดสารสกัดดังกล่าว

ขอขอบคุณ นสภ.ปณิติกา เศรษฐ์บุญสร้าง นสภ.อัครมณี ตันตะผลิน นสภ.ธนกร เศรษฐ์สมบูรณ์ และ นสภ.ปาริฉัตร สุขมี นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และนางสาวสุจิตรา ศิลาวุธ ที่ช่วยในส่วนของปฏิบัติการวิจัยอย่างเรียบร้อย

คณะผู้วิจัย

11 มีนาคม 2562

บทคัดย่อ

บทนำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเป็นทางเลือกในการนำมาพัฒนาตำรับยาต่อไป ชัน (Propolis) จากชันโรงสายพันธุ์ขนเงิน (*Tetragonula pegdeni* Schwarz) ที่เพาะเลี้ยงในเขตสวนผลไม้ จ.จันทบุรี และผักชีลาว (*Dill, Anethum graveolens* L) และบัวบก (*Centella, Centella asiatica* L.) โดยมีสารสกัดมาตรฐาน คือ ECa ที่มีการใช้ทางภูมิปัญญาชาวบ้านและทางอายุรเวชเพื่อลดการอักเสบอย่างช้านาน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านการวิจัยบางส่วนยังไม่ชัดเจน รวมทั้งไม่มีการพัฒนาเป็นสูตรตำรับเพื่อใช้ในการลดการอักเสบในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเพื่อยืนยันผลของฤทธิ์ด้านการอักเสบที่พบ พร้อมทั้งหาวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุด เพื่อนำสารสกัดที่ได้นั้นมาออกแบบและพัฒนาให้ได้ตำรับยาต้นแบบที่มีความคงตัวและสะดวกต่อการใช้งานในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง

วิธีการและผลการทดลอง สารสกัดชันและสารสกัดผักชีลาวถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.5 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ได้ที่ IC₅₀ ของสารสกัดชัน สารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดิน (Ar Et/Pet) เท่ากับ 32.59±0.36 µg/ml และ 68.81±1.37 µg/ml ตามลำดับ พร้อมทั้งแสดงฤทธิ์ในการลดระดับของ pro-inflammatory cytokine ที่หลั่งจากเซลล์ด้วย นอกจากนี้ สารสกัดชันยังพบว่ามีฤทธิ์สูงกว่า α -mangostin ที่เป็นสารประกอบหลักในสารสกัดในขนาดสารที่เทียบเท่ากันถึง 5 เท่า โดยสารสกัด Ar Et/Pet นั้นพบว่ามีผลลดการแสดงออกของยีน *iNOS* ที่ relative mRNA expression เท่ากับ 0.62±0.11 และในการพัฒนาสูตรตำรับแผ่นแปะผิวหนังโดยมี ECa 233 เป็นส่วนประกอบนั้นมีส่วนประกอบในตำรับ คือ PVA ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทั้งลักษณะทางกายภาพ ความเข้ากันของตำรับ ความยืดหยุ่น การดูดซับของเหลวและการปลดปล่อยยา

สรุปและอภิปราย สารสกัดชันจากชันโรง สารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดิน นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งของกลไกการอักเสบ ซึ่งสารสกัดชันมีฤทธิ์สูงกว่าสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัดผักชีลาวจากส่วนลำต้นเหนือดินพบฤทธิ์โดยทำงานผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *iNOS* และต้นแบบตำรับแผ่นแปะผิวหนังที่บรรจุสารสกัดบัวบก ECa 233 นั้น สามารถรักษาคุณสมบัติของต้นแบบตำรับได้โดย โดยพบว่า SCMC อาจเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาต่อ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับหนองในอนาคตได้

Abstract

Introduction To study anti-inflammatory effect of natural compounds for development agent as drug of choice, propolis of *Tetragonula pegdeni* Schwarz from mangostin orchard in Chanthaburi province, dill (*Anethum graveolens* L) and centella (*Centella asiatica* L.) standardized extract is ECa were investigated in this study. These plants have been used in Ayurvedic and traditional medicine for a long time. However, the scientific evidence is still unclear in some parts including no dermal patch formula has been established with these plant extracts. This study aims to determined anti-inflammatory effect of these plant extracts for design and development of anti-inflammatory dermal patch. For being useful and convenience as a drug of choice.

Methods Propolis crude extract and dill extracts were determined the effect on NO production in macrophage RAW264.7 cells. Propolis crude extract and arial part of dill (Ar Et/Pet) were found to inhibit NO production significantly and further confirmed with reduction of pro— inflammatory cytokine production beyond LPS-stimulation with IC₅₀ at 32.59±0.36 µg/ml and 68.81±1.37 µg/ml, respectively. Propolis crude extract showed 5-fold higher potency than its comparable concentration purified compound- α -mangostin. Dill Ar Et/Pet was identified to down regulate the *iNOS* mRNA expression. For design and development of dermal patch with ECa 233, the main components needed to be concerned are PVA and other polymers which affects the properties of patch including physical, homogeneity, strength, absorption ability and drug release profile.

Results and Conclusion Propolis crude extract and arial part of dill extracts decreased NO production in RAW264.7 cells which is key inflammatory mediator. Propolis crude extract showed higher potential than α -mangostin. Arial part of dill extracts significantly downregulate *iNOS* mRNA expression which regulated NO production. ECa 233 was successfully formulated the dermal patch formulation as a prototype for dermal patch dosage form development.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 ทบทวนวรรณกรรม	2
1.2.1 การอักเสบ (Inflammation)	2
1.2.1.1 กระบวนการอักเสบ	2
1.2.1.2 วิธีการตรวจวัดฤทธิ์ต้านการอักเสบทางการวิจัย	9
1.2.1.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง (in vitro test)	9
1.2.1.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดง	11
1.2.1.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (in-vitro test cell culture test)	11
1.2.1.2.4 การทดลองฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง (in-vivo test)	14
1.2.2 ยาและสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ	15
1.2.2.1 ยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน	15
1.2.2.1.1 กลุ่มที่เป็นสารสเตียรอยด์ (Steroidal drugs)	16
1.2.2.1.2 กลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)	17
1.2.2.1.3 กลุ่ม Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)	17

	หน้า
1.2.2.2 รายงานการใช้สมุนไพรและสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ	18
1.2.2.3 ชัน (Propolis)	18
1.2.2.4 ผักชีลาว (Dill)	21
1.2.2.5 ใบบัวบก (Centella) และสารสกัด ECa 233	22
1.2.3 การออกแบบและพัฒนาตำรับแผ่นแปะผิวหนัง	24
1.2.3.1 วัสดุปิดแผลและพอลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง	24
1.2.3.2 การประเมินตำรับแผ่นแปะผิวหนัง	29
1.2.3.2.1 Loss on drying (LOD)	29
1.2.3.2.2 Differential scanning calorimeter (DSC)	30
1.2.3.2.3 Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)	31
1.2.3.2.4 Testometric materials testing machines	31
1.2.3.2.5 High-performance liquid chromatography (HPLC)	32
1.2.3.2.6 Scanning electron microscope (SEM)	33
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	34
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	34
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	34
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	35
2.1 การเก็บตัวอย่าง	35
2.2 การสกัดสาร	35
2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์	36
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	36
2.4.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)	36
2.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	37
2.4.3 การทดสอบการยับยั้งการสร้าง nitric oxide	37
2.4.4 การทดสอบผลต่อระดับ pro-inflammatory cytokines	38
2.4.5 การสกัด RNA และการทดสอบผลต่อการแสดงออกของ iNOS และ TNF- α gene	38

	หน้า
2.5 การเตรียมวัสดุปิดแผล (wound dressing) ด้วยวิธี Film casting	39
2.6 การคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีความเข้ากันทางกายภาพมาทำการศึกษา คุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ	39
2.7 การเตรียมวัสดุปิดแผลที่ได้จากการเลือกแล้วใส่สารสกัดบัวบก ECa 233 ด้วยวิธี Film casting	41
2.8 การคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีส่วนประกอบของสารสกัดบัวบก โดย ทำการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ	41
2.9 สถิติที่ใช้ทดสอบ	43
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	44
3.1 ผลการทดสอบการฤทธิ์ด้านการอักเสบ	44
3.1.1 ผลยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)	44
3.1.2 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์	45
3.1.3 ผลยับยั้งการสร้าง nitric oxide	47
3.1.4 ผลต่อระดับ pro-inflammatory cytokines	50
3.1.5 ผลต่อการแสดงออกของ iNOS และ TNF- α gene	52
3.2 ผลการเตรียมวัสดุปิดแผล	53
3.3 การประเมินคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของวัสดุปิด แผล	54
3.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง	54
3.3.2 ผลการศึกษาความเข้ากันของตำรับ ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry	56
3.3.3 ผลการศึกษาความเข้ากันของตำรับ ด้วยเครื่อง Fourier Trans- form Infrared Spectroscopy (FTIR)	58
3.3.4 ผลการศึกษาน้ำหนักของแผ่นฟิล์ม	61
3.3.5 ผลการศึกษาความต้านทานแรงดึง	61
3.3.6 ผลการศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ	64
3.3.7 ผลการศึกษาความคงตัว	69
3.4 ผลการเตรียมวัสดุปิดแผลที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233	70
3.5 การประเมินคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของวัสดุปิด แผลที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233	71
3.5.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของ สารสกัด ECa233	71

	หน้า
3.5.2 ผลการศึกษาพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	72
3.5.3 ผลการศึกษาน้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233	75
3.5.4 ผลการศึกษาความต้านทานแรงดึงของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของ สารสกัด ECa233	76
3.5.5 ผลการศึกษาความสามารถการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มที่มี ส่วนผสมของสารสกัด ECa233	77
3.5.6 ผลการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดบัวบก ECa233 ของ แผ่นฟิล์ม	83
3.5.7 ผลการศึกษาความคงตัวของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233	99
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	101
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	101
4.2 การพัฒนาและประเมินตำรับแผ่นแปะผิวหนัง	102
บทที่ 5 ผลผลิต	104
บรรณานุกรม	105
ประวัตินักวิจัยและคณะ	111
รายงานสรุปการเงิน	123
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	124

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงรายละเอียดของสารสื่อกลางในการอักเสบ	6
ตารางที่ 2	แสดงผลการวิเคราะห์ alpha-glucosidase inhibitory assays ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง 3 สายพันธุ์	19
ตารางที่ 3	แสดงสัดส่วนของ Mobile phase	42
ตารางที่ 4	แสดงผลการยับยั้งการเสีสภาพของโปรตีนของสารสกัดผักชีลาวความเข้มข้น 250 µg/ml	45
ตารางที่ 5	แสดงค่า % inhibition และค่า IC ₅₀ ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง และสารสกัดผักชีลาว	49
ตารางที่ 6	แสดงลำดับของ cytokines ที่ตรวจโดย LEGENDplex™ kit เรียงลำดับจากบนลงล่าง	51
ตารางที่ 7	แสดงสูตรตำรับในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (% w/v)	53
ตารางที่ 9	แสดงน้ำหนัก (g) ของแผ่นฟิล์ม (n=3)	61
ตารางที่ 10	แสดงผล Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์ม (n=3)	62
ตารางที่ 11	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F01, F02 และ F03 (n=3)	65
ตารางที่ 12	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F04, F05 และ F06 (n=3)	66
ตารางที่ 13	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 และ F07 (n=3)	67
ตารางที่ 14	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F10, F11 และ F12 (n=3)	68
ตารางที่ 15	แสดงสูตรตำรับในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 (% w/v) (n=3)	70
ตารางที่ 16	แสดงน้ำหนัก (g) ของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 (n=3)	75
ตารางที่ 17	แสดงผล Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 (n=3)	76
ตารางที่ 18	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00, FA01 และ FA03 (n=3)	77
ตารางที่ 19	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00, FA04 และ FA06 (n=3)	79
ตารางที่ 20	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 และ FA07 (n=3)	80
ตารางที่ 21	แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 และ FA10 (n=3)	81
ตารางที่ 22	แสดง Retention time ของ Madecassoside, Madecasic acid, Asiaticoside และ Asiatic acid	85
ตารางที่ 23	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA00 ที่เวลาต่างๆ	85

		หน้า
ตารางที่ 24	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA01 และ FA03 ที่เวลา ต่างๆ	86
ตารางที่ 25	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA04 และ FA06 ที่เวลา ต่างๆ	86
ตารางที่ 26	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA07 และ FA10 ที่เวลา ต่างๆ	87
ตารางที่ 27	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA00 ที่เวลาต่าง ๆ	87
ตารางที่ 28	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA01 ที่เวลาต่างๆ	88
ตารางที่ 29	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA03 ที่เวลาต่างๆ	88
ตารางที่ 30	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA04 ที่เวลาต่างๆ	88
ตารางที่ 31	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA06 ที่เวลาต่างๆ	89
ตารางที่ 32	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA07 ที่เวลาต่างๆ	89
ตารางที่ 33	แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA10 ที่เวลาต่างๆ	89
ตารางที่ 34	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA00 ที่เวลาต่างๆ	90
ตารางที่ 35	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA01 และ FA03 ที่เวลา ต่างๆ	90
ตารางที่ 36	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA04 และ FA06 ที่เวลา ต่างๆ	90
ตารางที่ 37	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA07 และ FA10 ที่เวลา ต่างๆ	91
ตารางที่ 38	แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA00 ที่เวลาต่าง ๆ	91
ตารางที่ 39	แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA01 ที่เวลาต่างๆ	91
ตารางที่ 40	แสดง % Asiaticoside ของสูตร FA03 ที่เวลาต่างๆ	92
ตารางที่ 41	แสดง % Asiaticoside ของสูตร FA04 ที่เวลาต่างๆ	92
ตารางที่ 42	แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA06 ที่เวลาต่างๆ	92
ตารางที่ 43	แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA07 ที่เวลาต่างๆ	93
ตารางที่ 44	แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA10 ที่เวลาต่างๆ	93

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสภาวะการเกิดการอักเสบเฉียบพลัน	3
ภาพที่ 2	การเคลื่อนตัวของ leukocyte จากภายในหลอดเลือดออกไปยังเนื้อเยื่อ	5
ภาพที่ 3	Production of arachidonic acid metabolites	5
ภาพที่ 4	แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ Macrophage (A) แสดงเซลล์ Monocyte และเซลล์ Macrophage ที่ถูกกระตุ้น (B)	8
ภาพที่ 5	แสดง Classical and alternative macrophage activation	8
ภาพที่ 6	โครงสร้างทางเคมีของยากลุ่มสเตียรอยด์	16
ภาพที่ 7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของชันจากชันโรง สายพันธุ์ <i>T. pagdeni</i> และ % Anti-protein denaturation จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เทียบกับสารละลายอ้างอิง Diclofenac sodium 5 mg/ml	21
ภาพที่ 8	ชนิดของแผ่นแปะผิวหนัง	26
ภาพที่ 9	กราฟแสดงผลเปรียบเทียบการพองตัวของแผ่นแปะที่เวลาต่างๆ	28
ภาพที่ 10	กราฟแสดงผลเปรียบเทียบการปลดปล่อยยา Ciprofloxacin จากแผ่นแปะผิวหนัง PVA (a) และ PVA-NaAlg (b) ที่เวลาต่างๆ	29
ภาพที่ 11	แสดงหลักการทำงานของ Differential scanning calorimeter	30
ภาพที่ 12	แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	33
ภาพที่ 13	แสดงผลการยับยั้งการเสียดสภาพของโปรตีนของสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions	44
ภาพที่ 14	แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ของสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions (A) ผลของสารสกัดชันจากชันโรงและสารมาตรฐาน diclofenac sodium (B) และผลของสารบริสุทธิ์ α -mangostin (C)	46
ภาพที่ 15	แสดงกราฟมาตรฐานเทียบความเข้มข้นของสารประกอบ nitrite ซึ่งเป็นฟอร์มที่เสถียรของ NO เพื่อใช้คำนวณหา NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7	47
ภาพที่ 16	แสดงผลการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดินทั้ง 3 fractions ได้แก่ Ar Et, Ar Et/Et, Ar Et/Pet (A) สารสกัดชันจากชันโรง(B) ผลของ α -mangostin (C) พร้อมทั้งสารมาตรฐาน diclofenac sodium	48

		หน้า
ภาพที่ 17	แสดงค่า % inhibition และค่า IC ₅₀ ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัดชั้นจางจากชั้นโรง และสารสกัดผักชีลาว	50
ภาพที่ 18	Histogram แสดงระดับของ pro-inflammatory cytokines ใน culture media ของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นและผลของสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet (เส้นสีน้ำเงิน) เทียบกับหลอดควบคุม (เส้นสีแดง) ด้วยเทคนิค flow cytometry	51
ภาพที่ 19	ผลของสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet ต่อการแสดงออกของ iNOS และ TNF- α mRNA expression ในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS	52
ภาพที่ 19	แสดงผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง	54
ภาพที่ 20	กราฟแสดงผล DSC thermogram ของ ECa233	56
ภาพที่ 21	กราฟแสดงผล DSC thermogram ของ ECa233 และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ	56
ภาพที่ 22	แสดงผล DSC thermogram ของแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วย ECa233 และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ	57
ภาพที่ 23	แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, Sodium alginate และสูตรผสมระหว่าง PVA + Sodium alginate ตามลำดับ	58
ภาพที่ 24	แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, SCMC และสูตรผสมระหว่าง PVA + SCMC ตามลำดับ	59
ภาพที่ 25	แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, HPMC E15 และสูตรผสมระหว่าง PVA + HPMC E15 ตามลำดับ	59
ภาพที่ 26	แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, Gelatin และสูตรผสมระหว่าง PVA + Gelatin ตามลำดับ	60
ภาพที่ 27	กราฟแสดงผล Tensile strength (N/mm ²) ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)	63
ภาพที่ 28	กราฟแสดงผล % Elongation at break ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)	63
ภาพที่ 29	กราฟแสดงผล Young's modulus (N/mm ²) ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)	64
ภาพที่ 30	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ Sodium alginate (n=3)	65
ภาพที่ 31	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ SCMC (n=3)	66

		หน้า
ภาพที่ 32	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ HPMC E15 (n=3)	67
ภาพที่ 33	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ Gelatin (n=3)	68
ภาพที่ 34	กราฟแสดงผล % Swelling Index ของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง (n=3)	69
ภาพที่ 35	แสดงแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 สูตรต่างๆ	71
ภาพที่ 36	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233)	72
ภาพที่ 37	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECa233)	73
ภาพที่ 38	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233)	73
ภาพที่ 39	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233)	73
ภาพที่ 40	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233)	74
ภาพที่ 41	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233)	74
ภาพที่ 42	แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233)	74
ภาพที่ 43	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)	78
ภาพที่ 44	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ SCMC ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)	79
ภาพที่ 45	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ HPMC E15 ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)	81
ภาพที่ 46	กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ Gelatin ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)	82
ภาพที่ 47	กราฟแสดงผล % Swelling Index ของแผ่นฟิล์มสูตรที่มีสารสกัด ECa233 เป็นส่วนประกอบ (n=3)	82
ภาพที่ 48	แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของสารสกัดบัวบก ECa233	83
ภาพที่ 49	แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Madecassoside	84
ภาพที่ 50	แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Madecasic acid	84

	หน้า
ภาพที่ 51	แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Asiaticoside 84
ภาพที่ 52	แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Asiatic acid 85
ภาพที่ 53	กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate (n=3) 93
ภาพที่ 54	กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate (n=3) 94
ภาพที่ 55	กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ SCMC 94
ภาพที่ 56	กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ SCMC (n=3) 95
ภาพที่ 57	กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ HPMC E15 (n=3) 96
ภาพที่ 58	กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ HPMC E15(n=3) 96
ภาพที่ 59	กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ Gelatin (n=3) 97
ภาพที่ 60	กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ Gelatin (n=3) 97
ภาพที่ 61	กราฟแสดงผล % Madecassoside release ของแผ่นฟิล์มที่มีสารสกัด ECa233 ที่ระยะเวลา 15 ถึง 180 นาที (n=3) 98
ภาพที่ 62	กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ของแผ่นฟิล์มที่มีสารสกัด ECa233 ที่ระยะเวลา 15 ถึง 180 นาที (n=3) 98

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบัน ยาที่ใช้ในการลดอักเสบมีอยู่ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นสเตียรอยด์ และกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย รวมทั้งเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบยาใช้ภายนอกซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่ายาในรูปแบบอื่น เช่น ยาเม็ด แคปซูล ยาสูดพ่น หรือยาฉีต เนื่องจากโอกาสในการถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดน้อยกว่ายาในรูปแบบอื่นนั่นเอง ยาในกลุ่มสเตียรอยด์จะถูกใช้ภายใต้การดูแลของแพทย์และเภสัชกรเนื่องจากผลข้างเคียงรุนแรงที่พบได้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความแรงสูง (High potency) การใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานานหรือมีการใช้ในบริเวณผิวหนังที่มีการซึมผ่านของยาได้สูง ส่วนยาในกลุ่มของ NSAIDs นั้นพบว่าผู้ป่วยบางส่วนมีอาการแพ้ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอัตราการใช้ยากลุ่มนี้สูง และมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดอาการข้างเคียง เช่น ผลต่อกระเพาะอาหาร ผลต่อการทำงานของไต เป็นต้น การใช้สมุนไพรนั้น มีมาอย่างยาวนานทั้งในทางอายุรเวชและการแพทย์ทางเลือก ซึ่งรวมถึงการรักษาภาวะที่เกิดการอักเสบ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเป็นทางเลือกในการนำมาพัฒนาตำรับยาต่อไป

ชัน (Propolis) เป็นโครงสร้างของรังผึ้งที่เกิดจากยางของพืชชนิดต่างๆ ที่ผึ้งนำไปใช้ในการสร้างรัง ในเขตจังหวัดจันทบุรีซึ่งมีการทำสวนผลไม้อย่างแพร่หลายนิยมเลี้ยงผึ้งจิ๋วหรือชันโรง (Stingless bee) เพื่อเป็นตัวช่วยผสมเกสรพืชสวน และมีรายงานสรรพคุณทางยาของชันจากผึ้งพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย รวมทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยที่ชันจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของแหล่งเกสรและชนิดของผึ้งแต่ละสายพันธุ์ โดยคณะผู้วิจัยได้พบว่าสารสกัดชันจากชันโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pegdeni* Schwarz แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองได้

ผักชีลาว (Dill) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Anethum graveolens* L อยู่ในวงศ์ Umbrelliferae ซึ่งเป็นพืชที่พบได้ในภูมิภาคเอเชียและเมดิเตอร์เรเนียนและเติบโตตามฤดูกาล พบการผักชีลาวถูกใช้ในการรักษาที่หลากหลาย โดยมีรายงานการวิจัยพบฤทธิ์ในผักชีลาว ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ทางระบบย่อยอาหาร ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดปวด โดยฤทธิ์ที่พบดังกล่าวได้จากสารสกัดในส่วนของเมล็ดและสกัดด้วยเอธานอล ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบหลัก โดยคณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาสารสกัดจากส่วนลำต้นเหนือดินและราก พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดด้วยสารละลายที่มีขี้วัวต่ำแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยเอธานอล

ใบบัวบก (Centella) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ Centella asiatica (L.) อยู่ในวงศ์ Umbrelliferae ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากทางการแพทย์แผนตะวันออกพบได้ทั่วไปในประเทศไทยเขตร้อนชื้นรวมทั้งประเทศไทย ว่ามีฤทธิ์ฝาดสมาน นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้อีกหลากหลาย เช่น รักษาโรคทางผิวหนัง ได้แก่ ผิวหนังอักเสบ โรคสะเก็ดเงิน เป็นต้น รวมทั้งอาการทางระบบประสาท เช่น นอนไม่หลับ ช่วยผ่อนคลาย และเพิ่มความจำ เป็นต้น สารมาตรฐาน ECa 233 เป็นสารสกัดบริสุทธิ์จากใบบัวบกที่ได้รับการยืนยันฤทธิ์ อาทิเช่น ลดการวิตกกังวล ลดปวด ลดการอักเสบ พร้อมทั้งรายงานความปลอดภัยด้านพิษวิทยาในสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นสูตรตำรับเพื่อใช้ในการลดการอักเสบในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง

ผลการศึกษาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเพื่อยืนยันผลของฤทธิ์ด้านการอักเสบที่พบ พร้อมทั้งหาวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุด เพื่อนำสารสกัดที่ได้นั้นมาออกแบบและพัฒนาให้ได้ตำรับยาต้นแบบที่มีความคงตัวและสะดวกต่อการใช้งานในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง เพื่อเพิ่มทางเลือกในการรักษาและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากพืชท้องถิ่นของประเทศไทย

1.2 ทบทวนวรรณกรรม

1.2.1 การอักเสบ (Inflammation)

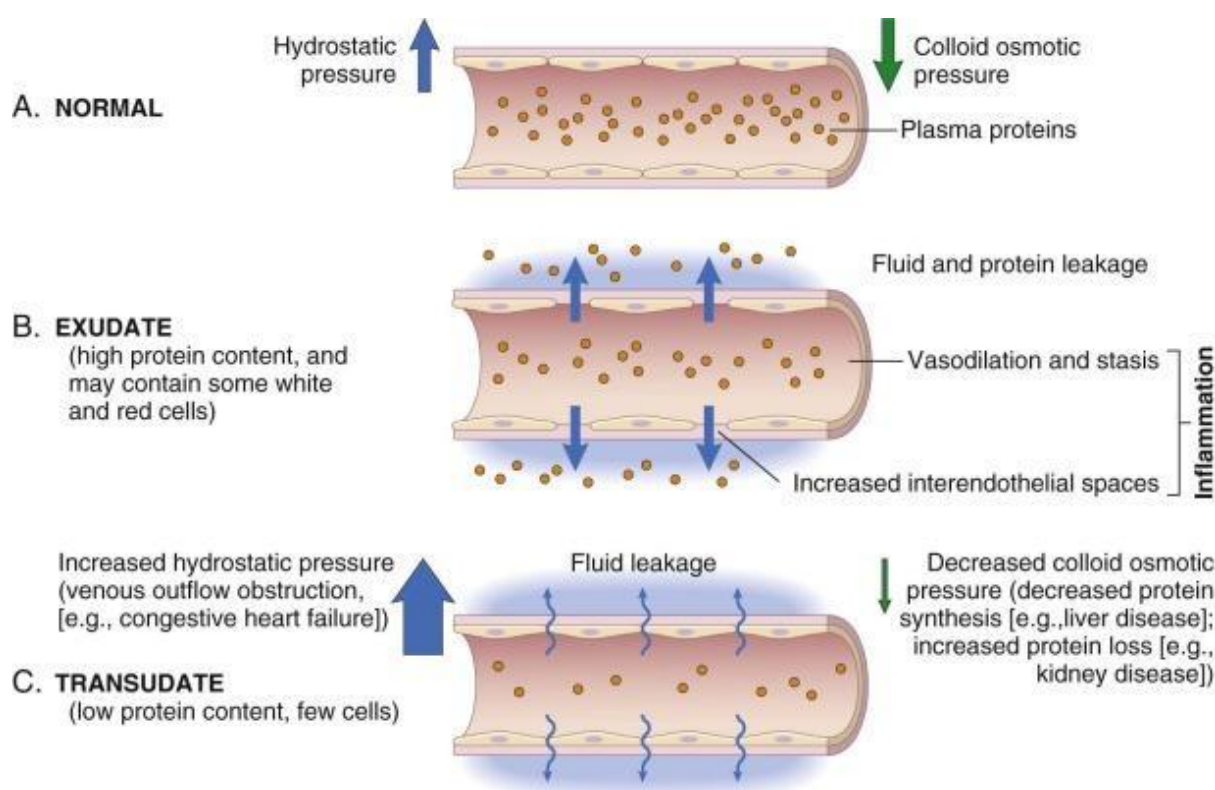
1.2.1.1 กระบวนการอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่มากระตุ้นเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้เกิดความเสียหาย โดยลักษณะสำคัญที่สามารถสังเกตได้ 5 อย่างหลักๆ คือ อาการปวดบริเวณที่อักเสบ (pain), บวมบริเวณที่อักเสบ (swelling), บริเวณที่อักเสบมีลักษณะแดงขึ้น (redness), บริเวณที่อักเสบมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น (heat), และมีการเสียหายที่การทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ (loss of function) หรือที่มักนิยามให้เข้าใจง่ายถึงพยาธิสภาพว่าเกิดการอักเสบ ประกอบด้วย ปวด บวม แดง ร้อน นั่นเอง การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ ประกอบไปด้วย 3 กระบวนการหลัก

- 1) การขยายหลอดเลือดขนาดเล็กทำให้การเพิ่มขึ้นของการไหลเวียนเลือด
- 2) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด โปรตีนและ เซลล์เม็ดเลือดขาวไหลออกจากการไหลเวียนเลือดได้
- 3) การเคลื่อนตัวของ เม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือดสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บและเริ่มกำจัดสิ่งแปลกปลอม

การตอบสนองของหลอดเลือดต่อภาวะการเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน จะทำให้เกิดการรั่วออกมาของโปรตีนและสารน้ำจากหลอดเลือด เนื่องจากการขยายตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดมากขึ้นเกิดได้จาก

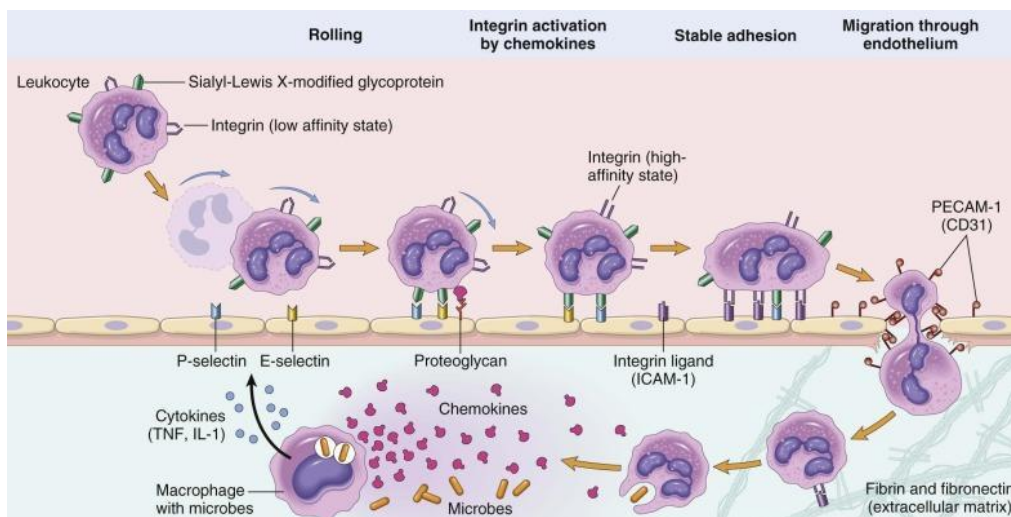
การหลั่งของสารตัวกลางการอักเสบต่างๆเช่น histamine ทำให้กล้ามเนื้อเรียบบริเวณหลอดเลือดขยายส่งผลให้การไหลเวียนของเลือดเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุของความร้อนและแดง บริเวณที่เกิดการอักเสบ การเพิ่มการซึมผ่านของผิวเซลล์บริเวณผนังของหลอดเลือด (endothelial cells) ช่วยให้ neutrophils ออกจากหลอดเลือดมาได้จากการที่ neutrophils สะสมอยู่ กล่าวคือการรั่วผ่านออกมาเกิดจาก vascular endothelial growth factor (VEGF)เพิ่มมากขึ้น การเพิ่มขึ้น hydrostatic pressure และการลดลงของ colloid osmotic pressure (Kumar JM, 2015) ดังแสดงในภาพที่ 1



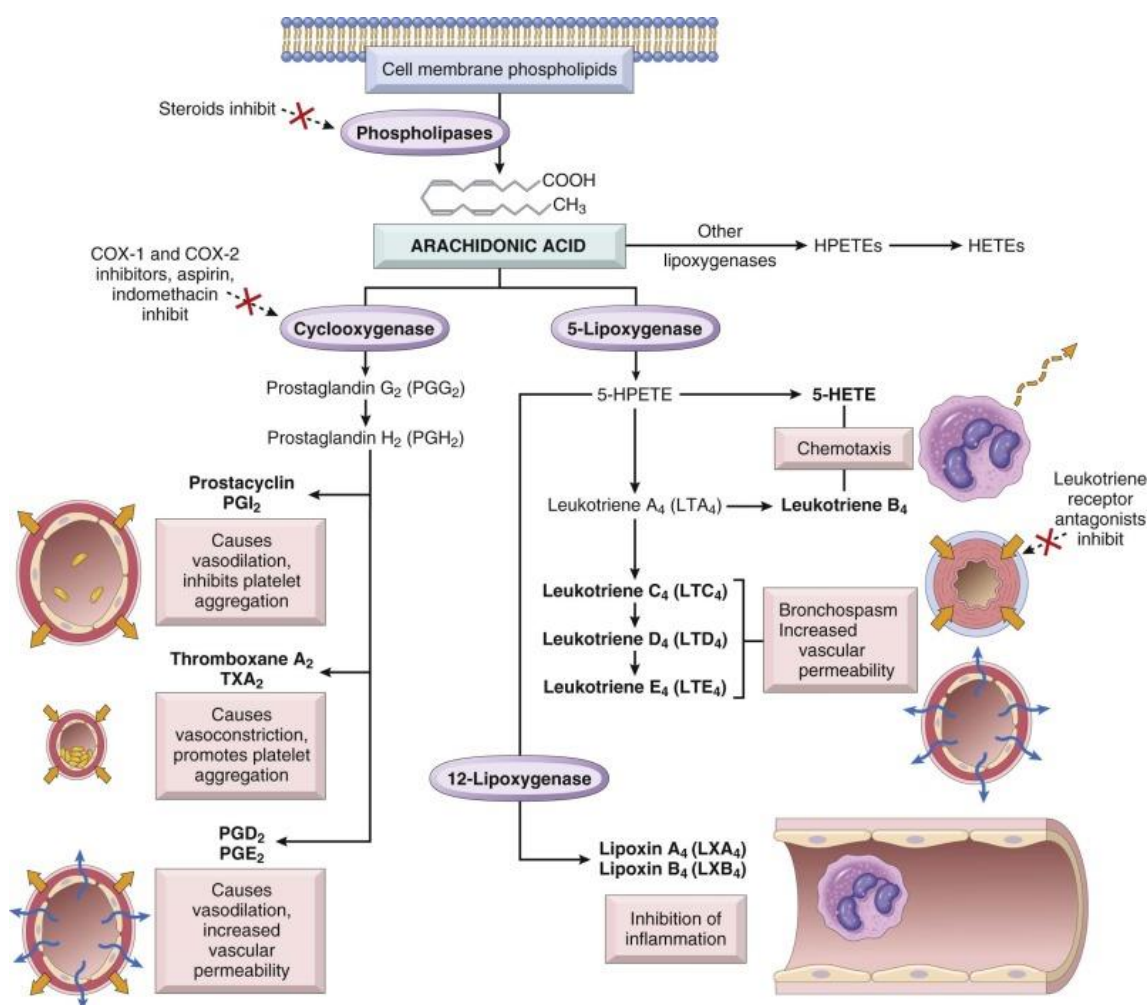
ภาพที่ 1 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสภาวะการเกิดการอักเสบเฉียบพลัน (Kumar JM, 2015)

การตอบสนองของเม็ดเลือดขาวที่สำคัญที่สุดในปฏิบัติการการอักเสบโดยทั่วไปคือ การการเกิดภาวะ phagocytosis ได้แก่ neutrophils และ macrophage การตอบสนองจะให้เกิดการเคลื่อนตัวของ เม็ดเลือดขาว จากภายในหลอดเลือดออกไปยังเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ โดยจะถูกควบคุมโดย adhesion molecules และ cytokines ซึ่งเรียกว่า chemokines โดยจะมีกระบวนการหลายขั้นตอน เริ่มจากการที่ เม็ดเลือดขาว เคลื่อนที่มาบริเวณผิวเซลล์

มีการหมุนไปบนผนังหลอดเลือด endothelium cell เพื่อให้ได้ตำแหน่งที่เหมาะสมของการยึดเกาะ โดยการใช้การจับกันของ integrin บน เม็ดเลือดขาว จับกับ selectin บน endothelium cell และ adhesion molecules ตัวต่างๆ เช่น CD31 (PECAM-1), ICAM-1 หลังจากเม็ดเลือดขาวออกมาจะทำการจับกินสิ่งแปลกปลอมแล้วหลั่ง cytokines เช่น TNF, IL-1 leukocytes ส่วนใหญ่ของการอักเสบเฉียบพลัน neutrophils จะตอบสนองต่อการอักเสบก่อนและออกไปก่อน ในช่วง ๖ ถึง ๒๔ ชั่วโมงแรกและในขณะที่ monocytes มาถึงใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปยังเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บด้วยกระบวนการที่เรียกว่า chemotaxis โดยอาศัยสารสื่อกลางในการอักเสบที่สร้างขึ้นในพลาสมา ได้แก่ cytokines , complement system โดยเฉพาะ C5a และ arachidonic acid (AA) metabolites การตอบสนองของเม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils และ monocytes เหล่านี้ประกอบด้วย การรับรู้ของสิ่งแปลกปลอม โดย TLRs และตัวรับอื่นๆ การเกิด phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว ทำลายสิ่งแปลกปลอม โดย lysosomal enzymes และ reactive oxygen, nitrogen species (ROS, NOS) เช่น superoxide (O_2^-) คือ hypochlorite ($HOCl^-$), hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$) และจาก nitric oxide (NO) เป็น peroxy nitrite ($OONO^-$) เป็นต้น Reactive Oxygen Species มีการผลิต ROS ภายใน lysosome และ phagolysosome ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุภาคที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไปได้โดยไม่ทำลายเซลล์ หลังจากนั้น superoxide (O_2^-) จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดย เม็ดเลือดขาว จะมีเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) เปลี่ยน H_2O_2 เป็น hypochlorite (OCl_2^-) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการอักเสบ Nitric Oxide (NO) สร้างจาก arginine โดยใช้ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมา 3 ชนิดคือ NOS: endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) และ inducible (iNOS) eNOS และ nNOS โดยใช้ iNOS ในการกำจัดเชื้อ จุลินทรีย์ซึ่งจะถูกกระตุ้นโดย cytokines (เช่น $IFN-\gamma$) หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ ภายใน macrophages NO จะทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้ peroxy nitrite ($ONOO^-$) โดยจะงานเหมือน ROS ทำให้เกิดการโจมตีไขมัน lipids โปรตีนและกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์และเซลล์สารสื่อกลางการอักเสบ ที่สำคัญที่สุดในการอักเสบเฉียบพลัน ได้แก่ amyloid vasoactive ผลิตภัณฑ์ lipid (prostaglandins และ leukotrienes), cytokines (รวม chemokines) และ complement activation ดังแสดงในภาพที่ 2 พร้อมทั้งแสดงรายละเอียดของสารสื่อกลางในการอักเสบและพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 การเคลื่อนตัวของ leukocyte จากภายในหลอดเลือดออกไปยังเนื้อเยื่อ (Kumar JM, 2015)



ภาพที่ 3 Production of arachidonic acid metabolites (Kumar JM, 2015)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของสารสื่อกลางในการอักเสบ (Kumar JM, 2015)

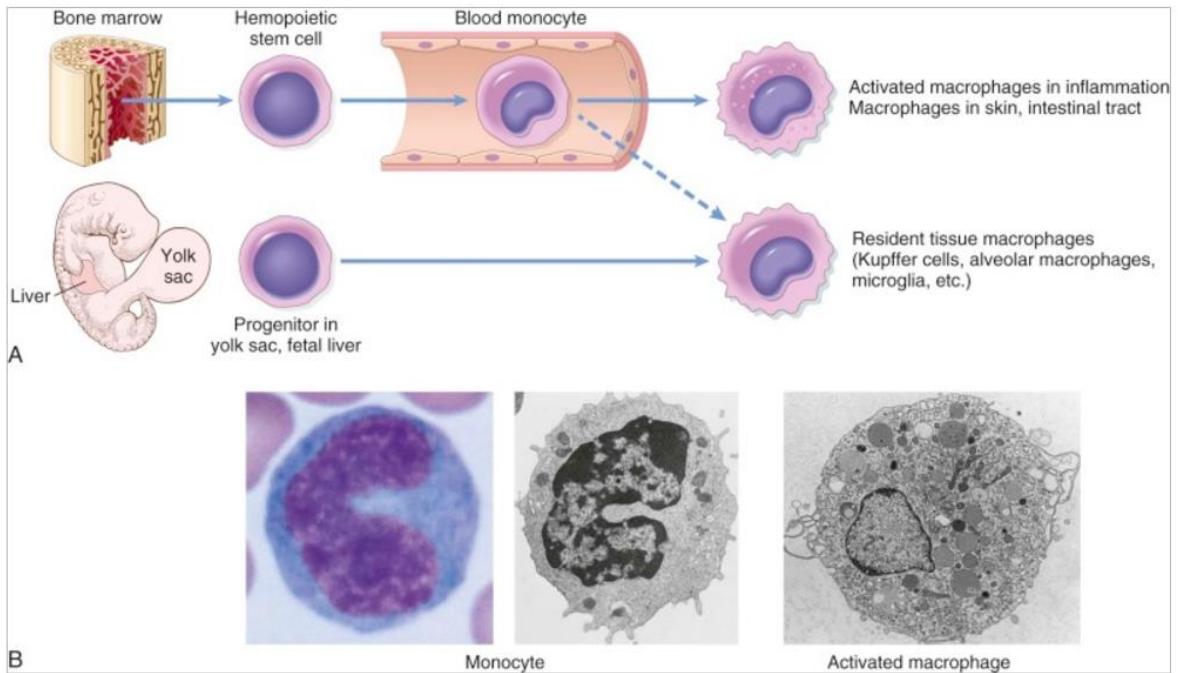
ชนิดของสาร	แหล่งที่มา	การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ
Histamine	Mast cells, basophils, platelets	ขยายหลอดเลือด เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด
Prostaglandins	Mast cells, leukocytes	ขยายหลอดเลือด อาการปวด ใช้
Leukotrienes	Mast cells, leukocytes	เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น การเกาะของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด
Cytokines (TNF, IL-1, IL-6)	Macrophages, endothelial cells, mast cells	กระตุ้นผนังหลอดเลือดแดง ใช้ ระบบเผาผลาญผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ (shock)
Chemokines	Leukocytes, activated macrophages	การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว
Platelet-activating factor	Leukocytes, mast cells	หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มการซึมผ่าน การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น สลายแกรนูล
Complement	Plasma (สร้างจากตับ)	การกระตุ้นและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวหาสิ่งกระตุ้น, ลายสิ่งแปลกปลอมโดยตรง (membrane attack complex), ขยายหลอดเลือด
Kinins	Plasma (สร้างจากตับ)	เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด, การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ, หลอดเลือดขยายตัว, อาการปวด

Arachidonic Acid Metabolites เป็น เกิดจาก arachidonic (AA) ใน phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้เอนไซม์ phospholipase A₂ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น prostaglandins (สร้างโดย cyclooxygenases: COX) และ

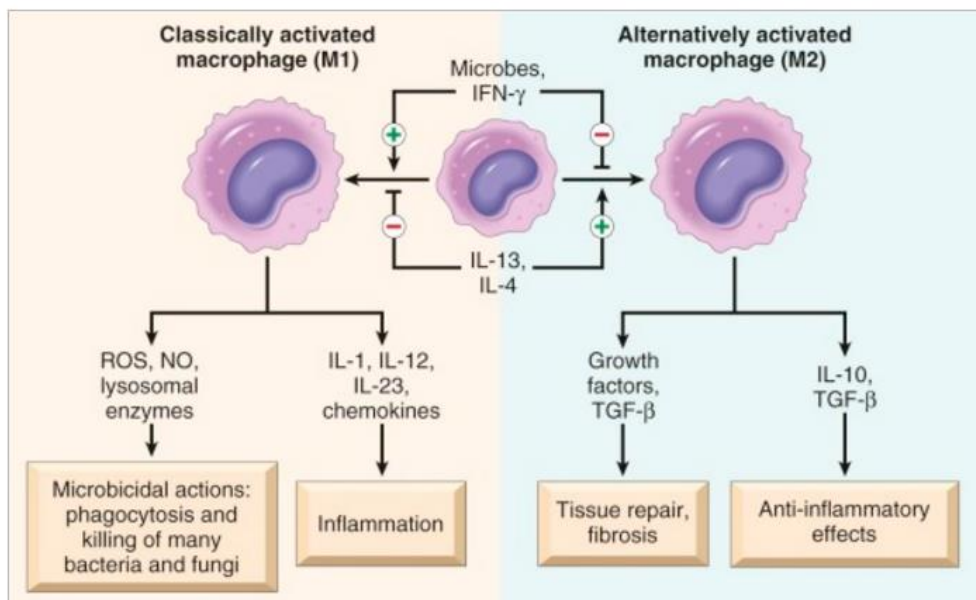
leukotrienes, lipoxins (สร้างโดย lipoygenases) ซึ่งมีส่วนในการเกิดการอักเสบ โดยตัวที่สำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบคือ prostaglandins โดยจะถูกกระตุ้นได้โดย COX-1 และ COX-2 แต่ COX-2 จะสามารถกระตุ้นได้ในช่วงของการอักเสบ ดังแสดงในภาพที่ 3

Cytokines เป็น โมเลกุลของ Messenger ของระบบภูมิคุ้มกัน การปฏิสัมพันธ์ของเซลล์และหน้าที่ของ leukocytes เป็นสื่อกลางโดยโปรตีนที่เรียกว่า cytokines จะถูกควบคุมโดย interleukins ซึ่งในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา (innate immune) จะสร้างขึ้นมากระตุ้นการอักเสบและยับยั้งการจำลองแบบของไวรัส cytokines เหล่านี้ ได้แก่ TNF, IL-1, IL-12, IFN ชนิด I, IFN- γ และ chemokines จะถูกสร้างจาก macrophages Tumor Necrosis Factor (TNF) และ Interleukin-1 (IL-1) เพิ่มการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวกับ endothelium และเคลื่อนตัวออกจากหลอดเลือด TNF เกิดจากสัญญาณผ่าน TLRs และตัวรับสัญญาณอื่นๆ การสังเคราะห์ IL-1 ถูกกระตุ้นโดยสัญญาณเดียวกัน TNF ช่วยเพิ่มการตอบสนองของ neutrophils ต่อสิ่งเร้าอื่น ๆ เช่นแบคทีเรีย endotoxin และกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ใน macrophages โดยกระตุ้นการผลิต NO

เซลล์และสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบเรื้อรังที่สำคัญ ได้แก่ Macrophage จะได้รับการกระตุ้นโดยสารหลายชนิดหลังจาก T-lymphocyte ถูกกระตุ้น จะหลั่งสารสื่อกลาง จำพวก cytokines ให้มากระตุ้น Macrophage ให้มีขนาดเซลล์ที่โตขึ้น ซึ่งจะมีความสามารถในการจับกินและทำลายเชื้อโรคเพิ่มสูง Classical macrophage activation จะถูกกระตุ้นโดยสิ่งที่จุลชีพผลิตออกมา เช่น endotoxin ซึ่งจะไปจับกับ Toll-Like Receptors (TLRs) ซึ่งได้รับสัญญาณที่สำคัญจาก T-cell ก็คือ IFN- γ macrophage จะหลั่ง NO, ROS และเอนไซม์ lysosomal ซึ่งทั้งจะสามารถฆ่าเชื้อจุลชีพและหลั่ง cytokine กระตุ้นกระบวนการอักเสบ ส่วน Alternative macrophage activation จะถูกกระตุ้นโดย cytokine นอกเหนือจาก IFN- γ เช่น IL-4 และ IL-13 ซึ่งหลั่งมาจาก T lymphocyte และเซลล์อื่น ๆ ซึ่ง Macrophage เหล่านี้จะยับยั้ง classical activation pathway โดย Macrophage จะหลั่ง growth factors ซึ่งส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่, กระตุ้นเซลล์ fibroblasts รวมถึงกระตุ้นกระบวนการสร้างคอลลาเจน ดังแสดงในภาพที่ 4 และภาพที่ 5



ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ Macrophage (A) แสดงเซลล์ Monocyte และเซลล์ Macrophage ที่ถูกกระตุ้น (B) (Kumar JM, 2015)



ภาพที่ 5 แสดง Classical and alternative macrophage activation (Kumar JM, 2015)

1.2.1.2 วิธีการตรวจวัดฤทธิ์ต้านการอักเสบทางการวิจัย

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบสามารถทำได้ทั้งทางอ้อมและทางตรง

1.2.1.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง (in vitro test)

1) Anti-denaturation activity

ในปี ค.ศ. 2008 Williams et al. และคณะ (Williams LA, 2018) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Anti-denaturation โดยใช้สารละลาย 0.2% w/v BSA (bovine serum albumin) ที่ถูกเตรียมใน Tris buffer และปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้ glacial acetic acid หลังจากนั้นทำเป็น stock solution ของทุกสารสกัดที่ได้จากการใช้ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย ให้ได้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 7 ความเข้มข้นคือ 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แบ่งสารละลายทุกความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง 150 μL และใส่ 2,850 μL ของ 0.2% w/v BSA ลงในทุกหลอดทดลอง ซึ่งหลอดควบคุมจะประกอบด้วย 150 μL ของ เมทานอล และ 2,850 μL ของ 0.2% w/v BSA .สารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 5 mg/mL diclofenac sodium ใน methanol ร่วมกับ ใส่ 2,850 μL ของ 0.2% w/v BSA. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV/Vis double beam spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm เพื่อวัดความขุ่นเนื่องจาก โปรตีน BSA จะเสียสภาพจากการที่โดนความร้อน ณ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส และหากสารที่เราสนใจสามารถต้านการเสียสภาพของโปรตีนได้จะทำให้ความขุ่นลดน้อยลง

๒) Proteinase Inhibitory Assay

ในปี ค.ศ. 2012 Mallikadevi T และคณะ (Mallikadevi T, 2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลจากแตงหนู (*mukia maderaspatana*) ทำการทดสอบได้โดยเตรียม 0.06 mg ของ trypsin ใน tris-HCl buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1 mL ผสมกับสารสกัด (ความเข้มข้น 200 และ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Casein ความเข้มข้น 0.8% w/v

จำนวน 1 ml หลังจากนั้นนำไปบดต่ออีก 20 นาที แล้วทำการเติม 70% perchloric acid 2 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จะได้สารละลายแขวนตะกอน และนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วน supernatant ไปทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ nm เทียบกับ buffer blank คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

3) β -glucosidase inhibition assay

ในปี ค.ศ. 2006 Gacche และคณะ (Gacche RN, 2006) ได้ทำ การศึกษาผลของสารสกัด Popolis ต่อการทำงานของ β -glucosidase โดยมีวิธีการทดลอง คือ นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 mL) จากนั้นเติม Phosphate buffer pH ๗.๔ และ *p*-nitrophenyl - β -D- glucopyranosiduronic acid 2.5 mM แล้วนำไปทำการอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม β -glucuronidase 0.1 mL นำไปบดต่ออีก 30 นาที จากนั้นเติม NaOH 0.5 N ปริมาณ 2 mL เพื่อหยุดปฏิกิริยา และหลังจากนั้นนำไปส่องการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm โดยความสามารถของเอนไซม์ β -glucuronidase ที่ไม่มีการยับยั้งคิดเป็น 100%, และปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบต้องสามารถยับยั้งได้ 50% คำนวณโดยใช้ค่า [IC₅₀] และใช้ Salicylic acid (1 mM, 0.053 mg/ml) เป็นสารอ้างอิง คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยสูตร $\% \text{ Inhibition} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$

4) การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase

ในปี ค.ศ. 2009 Chen CH และคณะ (Samud AM, 1999) ได้ทดสอบการต้านการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยใช้ linoleic acid เป็นส่วนประกอบและเอนไซม์ lipoxidase เพื่อทำการทดสอบตัวอย่าง. โดยการละลายกับ 0.25 mL 2 M borate buffer ที่ pH = 9.0 และเติม 0.25 mL ของเอนไซม์ lipoxidase (20,000 U/mL) แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม 1.0 mL ของ linoleic acid (0.6 mM) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 234

nm โดยใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย คำนวณ % การยับยั้งโดยใช้สมการ

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

1.2.1.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดง

1) การทดสอบการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ความร้อน (Heat induce hemolysis)

ในปี ค.ศ.1989 Sadique JARW และคณะ ได้ใช้วิธี กระตุ้นให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ความร้อน เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรต่อความคงตัวของเมมเบรนเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งใช้วิธี เช่นเดียวกับ Sakat S JA และ Gambhire MN. Gambhire MN (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลของส้มกบ

2) การเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ Hypotonicity (Hypotonic induce- hemolysis)

ในปี ค.ศ.2010 Azeem AK และคณะ (Emran T, 2012) ได้ใช้วิธี Hypotonicity-induced Hemolysis เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด glandular ของปลาหูฉลาม โดยนำสารควบคุม, สารทดลองและสารมาตรฐาน ใส่แยกหลอดทดลองกัน แต่ละหลอดมี 1 mL Phosphate buffer, 2 mL Hyposaline และ 0.5 mL HRBC suspension นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ centrifuges ที่ 3000 rpm. จากนั้นนำส่วน supernatant มาวัดการดูดกลืนแสงที่ 560 nm โดยใช้ Spectro photometer ใส่สารมาตรฐานเป็น Diclofenac sodium 100 µg/mL รายงานผลด้วยการวัดค่า % การเกิดแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้สมการ

$$\% \text{ Hemolysis} = 100 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

1.2.1.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (in-vitro test cell culture test)

1) การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7

ในปี ค.ศ. 2005 Srisook K และ Cha (Srisook K, 2005) ได้ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ ในปีต่อมา Lee HJ และคณะ (2006) (Lee HJ, 2006) ก็ได้ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์เดียวกัน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดการบูร (In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Cinnamomum camphora extracts) แต่ได้เปลี่ยนไปใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น RPMI1640 medium ซึ่งมี 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 10 % fetal bovine serum โดยทั้งสองงานวิจัยได้ทำการเลี้ยงเชื้อในตู้บอ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5 % CO₂ เหมือนกัน

2) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

ในปี ค.ศ. 2004 Srisook K และ Cha Y-N. (Dechayont B, 2017) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 เพื่อใช้ในการศึกษา Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide (LPS) โดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเอนไซม์ dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นสาร formazan ปริมาณสาร formazan ที่เกิดขึ้นนี้มีแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยมีวิธีการทดสอบคือ นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บอ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดใส่สารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm

$$\% \text{ความมีชีวิตรอด} = (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

ต่อมาในปี 2006, Lee HJ และคณะ (Lee HJ, 2006) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์เดียวกันทำได้โดยเตรียมสารสกัด (100 μ g/mL) นำไปประเมินโดยใช้ MTT assay ที่ 3 ชั่วโมงก่อนจะหยุดการเพาะเลี้ยงเซลล์ สารละลาย MTT (10 mg/mL in phosphate-buffered saline, pH 7.4) ปริมาณ 10 μ L ถูกเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นบ่มต่อจนถึงเวลาที่กำหนดไว้ แล้วเติม 15 % sodium dodesyl sulfate ลงในแต่ละหลุม (well) เพื่อละลาย formazan สุดท้ายนำไปวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 nm (OD₅₇₀₋₆₃₀) ด้วยเครื่อง Spectramax 250 microplate reader

3) การทดสอบ Interferon-gamma (INF- γ)

ในปี ค.ศ.1999, Lie-Chwen Lin Y-CK และคณะ (Lin LC, 1999) ได้ใช้ EIA; Quantikine IFN- γ test kit, R&D systems ในการทดสอบเพื่อใช้วัดเป็นตัวเปรียบเทียบกันระหว่าง Human mononuclear cells (HMNC) ปกติ กับ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย Phytochemagglutinin (PHA) ซึ่งถูกผสมกับ IL-2 หรือสารที่ต้องการจะทดสอบ โดยผสมกับ PBS buffer แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แล้วใส่สารมาตรฐานหรือสารที่ต้องการทดสอบ นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยการนำส่วน Supernatant ไปวัดความเข้มของสีที่เปลี่ยนไป โดยใช้ OD 450 nm ผลคือการเปลี่ยนแปลงของสีจะแสดงถึงการจับกันของ INF- γ

4) การทดสอบสารสื่อการอักเสบ และ cytokines ที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ.2017 Dong L และคณะ (Dong L, 2017) ได้ทำการทดสอบสารสื่อกลางในการอักเสบ ซึ่งประกอบด้วย Prostaglandin E2 (PGE2), Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), Interleukin (IL) 6, and IL-10 โดยการ ใช้ Western blot และ (ELISA) kit (RayBiotech Inc., USA)

5) การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ iNOS

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) เป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงการทำงานของเอนไซม์

iNOS และบ่งบอกปริมาณของไนตริกออกไซด์ (NO) ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess ในปี ค.ศ. 2005 Srisook และ Cha Y-N ได้ทำการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ iNOS โดยมีวิธีการคือ นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งใส่ Lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น $1\mu\text{g}/\text{mL}$ และเลี้ยงเซลล์ในตู้บอ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ $100\ \mu\text{L}$ ผสมกับสารละลาย Griess จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite(48) และในปีต่อมาพบว่า Lee HJ และคณะ(2006) ได้ทำการศึกษาโดยนำสารสกัดเฮกเซน และ เอทานอล ของการบูร ที่ความเข้มข้น ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) มาเติม LPS ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$) และ/หรือ IFN- γ ($50\text{U}/\text{mL}$) จากนั้นนำไปบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วมาเติมสารละลาย Griess ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สุดท้ายนำไปวิเคราะห์การทำงานของ iNOS โดยใช้ RT-PCR และ Western blotting(27) โดยทั้ง 2 งานวิจัยนี้ได้ใช้ $100\ \mu\text{L}$ ของสารละลาย Griess (0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid) ในการทดสอบเช่นเดียวกัน

1.2.1.2.4 การทดลองฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง (in-vivo test)

1) วิธีทดลอง Xylene -Induced Ear Edema

ในปี ค.ศ.2013 Bagad AS และคณะ (Bagad AS, 2013) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของขมิ้นชันโดยทำการศึกษาในหนู albino Swiss เพศผู้ อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 20-30 g จากนั้นนำสารสกัดที่จะใช้ทดสอบฉีดเข้าทางปากของหนู หลังจากนั้นประมาณ 1 ชั่วโมง ทา xylene ($50\ \mu\text{L}$) บริเวณด้านหน้าและด้านหลังของหูด้านขวาของหนู ในขณะที่ข้างซ้ายเป็น control เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงจะทำการฆ่าหนู แล้วทำการตัดหูหนูทั้งสองข้าง นำมาชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกันเปรียบเทียบความ

แตกต่างของน้ำหนักระหว่างหูขวาและหูซ้ายของหนู เพื่อประเมินการตอบสนองต่อการอักเสบ

2) Carragenan-induced paw edema

จากการศึกษาของ Costa G และคณะ (2016) (Costa G, 2016) เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารทดสอบโดยใช้ diclofenac sodium เป็นยาอ้างอิง ทำการทดสอบโดยแบ่งกลุ่มของหนูออกเป็นกลุ่มตามที่ต้องการจะศึกษา โดยแบ่งเป็น กลุ่ม negative control (vehicle), กลุ่ม positive control (1% diclofenac sodium) และกลุ่มทดสอบ โดยกลุ่มทดสอบจะได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1 mL กลุ่ม negative control และกลุ่มทดสอบจะได้รับยาก่อนการฉีด carragenan 0.1 mL (1%w/v) เข้าอุ้งเท้า 1 ชั่วโมง ส่วนกลุ่ม positive control จะได้รับยาก่อนฉีด carragenan เข้าอุ้งเท้า 30 นาที การฉีด carragenan จะฉีดเข้าอุ้งเท้าขวาด้านหลังของหนูแต่ละตัว วัดการบวมของอุ้งเท้าหนูโดยใช้เครื่อง plethysmometer หลังจากฉีด carragenan และหลังจากนั้นทุกๆ ชั่วโมง จนถึงสิ้นสุดชั่วโมงที่ 6 สำหรับกลุ่ม control ส่วนกลุ่มทดสอบจะประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ชั่วโมงที่ 4 (t_{max}) หลังจากฉีด carragenan โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการบวมได้ดังนี้

$$\% \text{ edema inhibition} = 1 - (V_t / V_c) \times 100$$

V_t ; ค่าเฉลี่ยการบวมของหนูกลุ่มที่รักษาด้วยตัวอย่าง หรือ diclofenac sodium

V_c ; ค่าเฉลี่ยการบวมของหนูกลุ่ม carragenan control

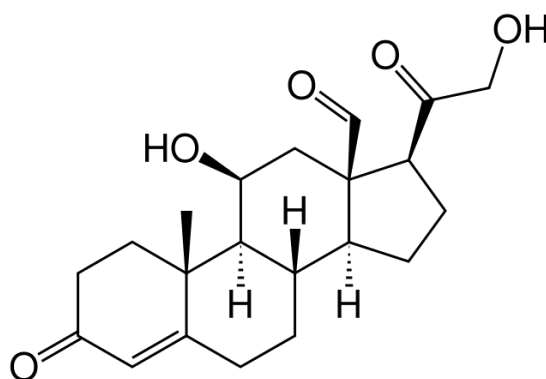
1.2.2 ยาและสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.2.2.1 ยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

ยาที่มีอยู่ในท้องตลาดปัจจุบัน ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศที่มีฤทธิ์และข้อบ่งใช้ในการต้านการอักเสบ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่เป็นสารสเตียรอยด์ (Steroidal drugs) กลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) และ กลุ่มที่มีกลไกจำเพาะในเซลล์ภูมิคุ้มกัน Disease-modifying anti-rheumatic drugs หรือ DMARDs นอกจากนี้ ยังมียาในกลุ่มอื่นๆ อีก ได้แก่ กลุ่มที่ยับยั้ง cytokine และการส่งสัญญาณภายในเซลล์จำเพาะ โดยแต่ละกลุ่ม อาศัยกลไกดังนี้

1.2.2.1.1 กลุ่มที่เป็นสารสเตียรอยด์ (Steroidal drugs)

สเตียรอยด์ (steroids) หรือ คอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 6 ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยอาศัยการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipases ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง arachidonic acids ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเอนไซม์ cyclooxygenases (COX) และ lipoxygenase (LOX) ดังแสดงในภาพที่ 3 และส่งผลให้ลดการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยการยับยั้งการสร้างลิมโฟไซต์ (lymphocyte) การยับยั้งการเคลื่อนย้ายของเม็ดเลือดขาวแกรนูโลไซต์ (granulocyte) จากเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งกักเก็บสำรองของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ไปยังบริเวณของเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ รวมทั้งผลที่มีต่อความสามารถในการการเลือกผ่านสารของผนังหลอดเลือดจากผลกระตุ้นผ่าน adrenergic ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Greaves MW, 1976) ตัวอย่างยา ได้แก่ prednisolone, betamethasone, triamcinolone เป็นต้น ซึ่งมีตำรับยาหลายรูปแบบ ได้แก่ ยาใช้ภายนอก เช่น ครีม เจล โลชั่น สำหรับทา หยอด ยาพ่น ยารับประทาน ยาฉีด เป็นต้น



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของยากลุ่มสเตียรอยด์

อย่างไรก็ตาม ยาในกลุ่มนี้ มีข้อควรระวังจากผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์หลายประการ โดยเฉพาะเมื่อใช้อย่างต่อเนื่องระยะเวลาหนึ่ง เช่น การเกิดกลุ่มอาการคุชชิง (Cushing's syndrome) เม็ดเลือดขาวต่ำมีโอกาสนในการติดเชื้อได้เพิ่มขึ้น กระดูกบางทำให้กระดูกหักหรือร้าวได้ง่าย มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือการซ่อมแซมร่างกาย รวมทั้งมีผลต่อระดับฮอร์โมนของร่างกาย เช่น อินซูลิน ไทรอยด์ เป็นต้น

1.2.2.1.2 กลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)

ยาในกลุ่มนี้ อาศัยการออกฤทธิ์โดยยับยั้งกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งทำหน้าที่สร้าง prostaglandins (PGs) และ thromboxane (TBX) ซึ่งมีผลต่อหลอดเลือด และควบคุมการทำงานของเกล็ดเลือด ในระหว่างการเกิดการอักเสบ (Rainford KD, 2007) ดังแสดงในภาพที่ 3 อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ COX นั้น มีบทบาททั้งเป็น constitutive enzyme ในการควบคุมการหลั่งของสารเมือกที่ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร และบทบาทของ inducible enzyme ที่ตอบสนองต่อการอักเสบ โดยควบคุมผ่านเอนไซม์จำเพาะ COX-1 และ COX-2 ตามลำดับ ทำให้มียาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ COX-2 ซึ่งมีลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาต่อทางเดินอาหาร คือ selective COX-2 inhibitors ได้แก่ celecoxib และ etoricoxib เป็นต้น ในขณะที่ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบบไม่จำเพาะเจาะจง คือ non-specific COX inhibitors ได้แก่ diclofenac, ibuprofen, naproxen เป็นต้น ปัจจุบัน ยาในกลุ่มที่เป็น specific COX-2 inhibitors นั้น ยังมีราคาแพงเมื่อเทียบกับกลุ่ม non-specific COX inhibitors และยังพบอาการข้างเคียงจากการใช้ยาอยู่

ทั้งนี้ ยังมียาในกลุ่มที่ยับยั้งการเข้าจับของสารกลุ่ม Leukotrienes กับตัวรับ เรียกว่า leukotriene receptor antagonist โดยบทบาทของ leukotrienes นั้น มีผลทั้งส่งเสริมและยับยั้งการเกิดการอักเสบ ดังแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างยา ได้แก่ montelukast (Aharony D, 1998)

นอกจากนี้ จากการพัฒนายาในกลุ่มนี้เพิ่มเติม ได้แก่ กลุ่ม Nitric oxide-donating NSAIDs กลุ่ม Resolvins หรือ Epilipoxins และ กลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ COX-3 (Rainford KD, 2007)

1.2.2.1.3 กลุ่ม Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)

ยาในกลุ่มนี้ จะมีกลไกในการยับยั้งการอักเสบจำเพาะในเซลล์ภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันออกไป เช่น การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของยา methotrexate หรือ การเข้าไปจับกับสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อมาลาเรีย ของยา hydroxychloroquine เป็นต้น นอกจากนี้ ยาอื่นๆ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ sulfasalazine และ leflunomide ซึ่งยาในกลุ่มนี้ มีอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาพบบ่อย และมีความรุนแรง จึงมีข้อควรระวังเมื่อต้องใช้อย่างเคร่งครัด

1.2.2.2 รายงานการใช้สมุนไพรและสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ด้านการ อักเสบ

จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะพบว่า มียาที่มีฤทธิ์และข้อบ่งใช้ในการ
ด้านการอักเสบที่ถูกใช้อยู่จำนวนมากไม่น้อย ซึ่งยาแต่ละกลุ่ม หรือยาแต่ละชนิด ก็จะมี
ข้อบ่งใช้ อาการข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ ข้อควรระวังที่แตกต่างกันไป
เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้มากยิ่งขึ้น นักวิจัยจึงยังค้นหาสารที่มีฤทธิ์อื่นๆ หรือ
พัฒนายาที่มีอยู่แล้วให้ดียิ่งขึ้น

โดยแนวทางในการหาสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ได้รับความสนใจหนึ่ง
คือ การค้นหาสารที่มาจากธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็น พืช สัตว์ หรือแร่ธาตุ โดยเฉพาะ
องค์ความรู้ที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษ ตำรับยาที่มีการใช้ในทางอายุรเวช หรือที่
เป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน ดังตัวอย่างพืชที่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบของ
Vishal V และคณะ ได้แก่ สะเดา (*Azadirachta indica*) ชุมเห็ดเล็ก (*Cassia
occidentalis*) ไอวี (*Hedera rhombea*) คว่ำตายหงายเป็น (*Bryophyllum
pinnatum*) หล้าดอกลาย (*Swertia chirata*) ขิง (*Zingiber offi cinale*) ศรีดา
(*Sida cordifolia*) ละหุ่ง (*Ricinus communis*) ขลุ่ (*Pluchea indica*) โปทะเล
(*Thespesia populnea*) ยาร์โรว (*Achillea millefolium*) โหระพาเด็ดยโก่
(*Aconitum heterophyllum*) มะตูม (*Aegle marmelos*) มะขามป้อม
(*Emblca officinalis*) *Piper ovatum* ซึ่งไม่พบในประเทศไทย ดีปลี (*Piper
longum*) น้อยหน่า (*Annona squamosa*) ราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) (Vishal
V, 2014) ซึ่งพบว่า พืชเกือบทั้งหมดพบได้ทั่วไปในประเทศไทย และประเทศต่างๆ
ในเขตร้อนชื้น

ในตำรับยาแผนไทย และภูมิปัญญาชาวบ้าน ที่ใช้ในการรักษาพยาธิสภาพที่
มีการอักเสบที่น่าสนใจ ได้แก่ ชันจากชันโรง (propolis) ผักชีลาว (dill) และใบ
บัวบก (celtella) โดยมีข้อมูลการศึกษาในระดับต่างๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.2.2.3 ชัน (Propolis)

ชันโรง (Stingless bee) เป็นผึ้งขนาดเล็กที่ไม่มีเหล็กใน มีหลายสายพันธุ์
ได้แก่ รุ่งอรุณ (*Tetragonula laeviceps* Smith) ชันโรงปากแตรใหญ่ (*lepidotri
gona terminate* Smith) ขนเงิน (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) เป็นต้น
ซึ่งพบการเพาะเลี้ยงชันโรงเพื่อการเกษตร ในพื้นที่สวนผลไม้ในเขต อำเภอมะขาม
จังหวัดจันทบุรี ผลผลิตของการเลี้ยงชันโรงจะคล้ายกับการเลี้ยงผึ้งหลวง (*Apis
Dorsata*) ซึ่งนิยมเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตของผึ้งโดยตรง ซึ่งมีการใช้

ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งทางเกษตรกรรม อุตสาหกรรมอาหารและทางยา รักษาโรค ได้แก่ น้ำผึ้ง (honey) ไข (wax) นมผึ้ง (royal jelly) และชัน (propolis) พร้อมกันนั้นได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากันอย่างแพร่หลาย (Viuda-Martos M, 2008) แต่ในผลผลิตของชันโรงนั้น ยังมีการศึกษาน้อย นอกจากนั้น ยังพบว่า เกษตรกรชาวสวน ได้มีภูมิปัญญาชาวบ้านในการใช้ชันในการรักษาตาอักเสบ แผลติดเชื้อ โดยการใช้สด หรือดองเหล้าและใช้น้ำเหล้าที่สกัดออกมานั้น ในการหยอดหูหรือหยอดตา เวลามีอาการปวดหู ตาแดงและปวดตา ตามลำดับ และมีความเชื่อว่าได้ผลดีกว่าชันของผึ้งหลวง และเชื่อว่าชันของชันโรงสายพันธุ์ชนเงิน มรฤทธิ์สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Vongsak B และคณะ (Vongsak B, 2015) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ alpha-glucosidase inhibitory assays ของสารสกัดชันจากชันโรง 3 สายพันธุ์ (Vongsak B, 2015)

Stingless bee species/standard	Total phenolics (g GAE/100 g extract)*	α -Glucosidase inhibitory assay IC ₅₀ (μ g/ml)*
<i>Tetragonula pagdeni</i>	12.83 \pm 0.72 ^a	70.79 \pm 6.44 ^a
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	3.15 \pm 0.25 ^b	387.97 \pm 38.71 ^b
<i>Lepidotrigona terminata</i>	2.16 \pm 0.10 ^c	469.66 \pm 76.55 ^b
Ascorbic acid	–	–
Acarbose	–	155.82 \pm 6.69 ^c (241.36 \pm 10.37 μ M)

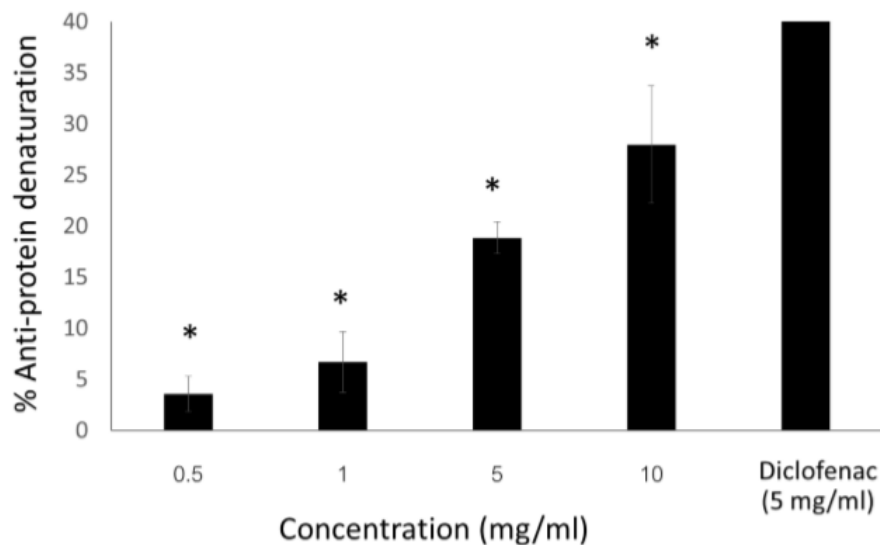
ชันเป็นส่วนที่ได้จากการที่ผึ้งเก็บสะสมสารคัดหลั่งจากต้นพืช ผลไม้เพื่อใช้ในการทำรัง องค์ประกอบที่ทางเคมีของชันนั้นแตกต่างจากน้ำผึ้งซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล (Gheldof N, 2002) แต่ชันมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเรซิน ไข (Gomez-Caravaca AM, 2006) โดยองค์ประกอบต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของน้ำผึ้งซึ่งอาจรวมทั้งผลผลิตอื่นๆจากผึ้งนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ แหล่งของเกสรที่มาสภาพภูมิอากาศ สภาพแวดล้อมต่างๆ กระบวนการสร้างการผลิตของแต่ละสายพันธุ์ เป็นต้น (Akbulut M, 2009; Khalil I, 2012)

ในปี 2014 Vongsak B และคณะ (Vongsak B, 2015) ได้ทำการศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของชันของชันโรงดังกล่าว โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนธันวาคม จากสวนผลไม้ในเขต อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี และสกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลแอลกอฮอล์และเฮกเซน ตามลำดับ พบว่า มีส่วนประกอบของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ gamma-mangostin และ alpha-mangostin เป็น 0.94 \pm 0.01 % (w/w) และ 2.77 \pm 0.08 % (w/w) ตามลำดับ

โดยสารทั้ง 2 isoforms นี้ มีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ได้แก่ Gutierrez-Orozco F และคณะ (Gutierrez-Orozco F, 2013) พบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของ alpha-mangostin โดยการทดสอบในเซลล์ macrophage-like THP-1 และ primary human monocyte-derived macrophages (MDM) ที่กระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ในการลดการหลั่ง TNF- α และ IL-8 ที่เป็น pro-inflammatory cytokines เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาของ Bumrungpert A และคณะ (Bumrungpert A, 2010) ที่พบว่าทั้ง alpha-mangostin และ gamma-mangostin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 cells โดยการยับยั้งผ่านกลไก mitogen-activated protein kinases (MAPK) และ activator protein (AP) และลดการแสดงออกของ PPAR-gamma gene ซึ่งเฉพาะ gamma-mangostin เท่านั้นที่มีผลต่อ nuclear factor-kB (NF-kB) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Chen L และคณะ (Chen L, 2008) พบว่า ทั้ง alpha-mangostin และ gamma-mangostin สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS gene ในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ผลิต nitric oxide ได้ โดยที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ COX-2 gene

อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดชั้นจากชั้นโรงสายพันธุ์เงินที่มีอยู่อย่างมากมายที่ไม่ได้รับการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ของสารสกัด นอกเหนือจาก alpha-mangostin และ gamma-mangostin อาจมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์จากผลการศึกษาก่อนหน้า คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดด้วย in vitro anti-protein denaturation ที่ประเมินความสามารถในการยับยั้งการเสถียรภาพของโปรตีนของสารสกัดดังกล่าว พบว่า สามารถยับยั้งการเสถียรภาพของโปรตีนได้ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น (ภัทรวดี ศรีคุณ และคณะ 2561) ดังแสดงในภาพที่ 7 พร้อมทั้งความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ของสารสกัดตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งได้จากการสกัดชุดเดียวกัน ของชั้นจากชั้นโรงสายพันธุ์เงิน (Vongsak B, 2015) ดังแสดงในตารางที่ 2

จากข้อมูลข้างต้นนี้ เห็นว่า สารสกัดชั้นจากชั้นโรงสายพันธุ์เงินดังกล่าว มีศักยภาพในการนำไปศึกษาต่อเพื่อต่อยอดงานวิจัยในการค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในขั้นต่อไป



ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของชัน จากชันโรง สายพันธุ์ *T. pagdeni* และ % Anti-protein denaturation จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เทียบกับสารละลายอ้างอิง Diclofenac sodium 5 mg/ml (ภัทรวิดี ศรีคุณ และคณะ 2561)

1.2.2.4 ผักชีลาว (Dill)

ผักชีลาว (dill) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Anethum graveolens* พบได้ทั่วไปในประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย ถูกใช้ในตำรับยาทางอายุรเวชและเป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหารของชาวตะวันออกมาอย่างยาวนาน ด้วยสรรพคุณหลายอย่าง ได้แก่ ช่วยขับลม (carminative) ช่วยเจริญอาหาร เสริมธาตุให้แข็งแรง (stomachic) หรือ ช่วยขับปัสสาวะ (diuretic) เป็นต้น รวมทั้ง เคยมีการรายงานฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และมีผลลดระดับไขมันในเลือดอีกด้วย (Jana S and Shekhawat GS, 2010; Alsnafi AE, 2014) อย่างไรก็ตาม ส่วนของพืชที่นำไปใช้ หรือมาสกัด และศึกษาส่วนมากเป็นส่วนของน้ำมันจากเมล็ดผักชีลาว (seed) ที่เป็นน้ำมันหอมระเหย โดยสารที่เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย เช่น ที่พบหลักๆ คือ carvone และ α -phellandren รวมทั้ง limonene, dill ether, myristicin ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นเอกลักษณ์จำเพาะของกลิ่นผักชีลาว พร้อมทั้งสารอื่นๆ เช่น coumarins, flavonoids, phenolic acids และ สารกลุ่ม steroids เป็นต้น

ฤทธิ์ในด้านการต้านการอักเสบนั้น ได้เคยมีการศึกษาจากส่วนของ essential oils ที่สกัดจากผักชีลาวมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ในเซลล์มาโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS (Kazemi M, 2015) พร้อมทั้งการเตรียมในรูปแบบของ

ยาทางภายนอก เช่น ขี้ผึ้ง (ointment) และ น้ำมันสกัด เพื่อศึกษาผลของการลดการอักเสบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบจากการติดเชื้อ MRSA (Manzuoerh R, 2019) และหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าจากการฉีด formalin (Naseri M, 2012) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในผู้ป่วย โดยใช้ส่วนของลำต้นและใบ ในผู้ป่วยเบาหวาน ชนิดที่ 2 พบว่า หลังการได้รับผงของผักชีตากแห้ง ซึ่งได้จากส่วนของลำต้นและใบ ควบคู่กับการรักษามาตรฐาน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น วัดระดับ cytokines ในซีรัมของ มีค่า C-reactive protein, IL-6 และ TNF- α ในซีรัมของผู้ป่วยลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับผงของผักชีตากแห้ง อย่างมีนัยสำคัญ (Payahoo L, 2014) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่บอกระดับการเกิดการอักเสบที่ตรวจพบได้ในเลือดนั่นเอง

จากข้อมูลข้างต้นนี้ เห็นว่า ฤทธิ์ต้านการอักเสบของผักชีลาวนั้น สามารถนำมาพัฒนาเพื่อศึกษาต่อยอดได้ทุกส่วน ไม่เพียงแต่เฉพาะส่วนของเมล็ด ซึ่งมีข้อจำกัดในการเก็บเกี่ยว ปริมาณวัตถุดิบที่ได้รับจากการเพาะปลูก ซึ่งหากสามารถใช้ส่วนอื่นได้แล้ว จะเพิ่มขีดความสามารถด้านการผลิตและเข้าถึงได้ง่ายขึ้น เช่น ในส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ซึ่งยังขาดข้อมูลการศึกษาสนับสนุน ในการวิจัยครั้งนี้ จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดที่ได้จากแต่ละส่วนของผักชีลาวต่อไป

1.2.2.5 ใบบัวบก (Centella) และสารสกัด ECa 233

บัวบก (*Centella asiatica*) หรือที่นิยมเรียกว่า ใบบัวบก เนื่องจากส่วนที่นำมาใช้ประกอบอาหาร หรือนำมาใช้ทางยาคือส่วนใบ มีประสิทธิภาพในการรักษาแผล เช่น บาดแผลติดเชื้อ บาดแผลไฟไหม้ หรือบาดแผลหลังผ่าตัด โดยสารสกัดบัวบก ประกอบไปด้วย สารกลุ่ม Triterpenoid หลายชนิด เช่น asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid และ madecassoside จากผลงานวิจัยของ Bylka W และคณะ (Bylka W, 2013) พบว่าสารในกลุ่ม Triterpenoids ช่วยเพิ่มการสร้าง collagen, cell layer fibronectin และมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการซ่อมแซมแผล ลดการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลงานวิจัยของ Shukla A และคณะ (Shukla A, 1999) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ Asiaticoside ในสารสกัดบัวบก พบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาแผล (wound healing) ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน สามารถเร่งการสร้าง Collagen และ cell layer fibronectin ใน guinea pig และหนูทดลอง โดยใช้ Asiaticoside solution (20 μ l/wound) ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.1% และ 0.2% ทาวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน เทียบกับกลุ่ม control group ซึ่งจะได้รับแค่น้ำกระสายยาในขนาดที่

เท่ากัน ผลการศึกษาพบว่าการใช้ Asiaticoside 0.2% สามารถลดขนาดของแผลให้เหลือ 56% ในวันที่ 7 และเหลือ 54% ในวันที่ 10 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในการลดขนาดของแผล และในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าการใช้ Asiaticoside 0.4% สามารถลด tissue necrosis, infiltration of PMNLs และ mononuclear leukocytes ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งการรักษาแผลด้วย Asiaticoside รูปแบบยาทา ไม่ได้มีผลกระทบต่อระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง

จากผลงานวิจัยของ HOU Q และคณะ (Qiang Hou ML, 2016) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของ Madecassoside ในการรักษาแผลไฟไหม้ (burn wounds) ในหนู โดยการทดลองใช้ Madecassoside 500 μ l ทาลงบนแผลวันละ 1 ครั้ง โดยเปรียบเทียบกับการทำแผลด้วย Vaseline และแผลที่ไม่ได้รับการรักษา พบว่า การใช้ Madecassoside มีประสิทธิภาพในการรักษาแผลไฟไหม้ ช่วยให้แผลสมานตัว (% Degree of wound healing) มากกว่าการใช้ Vaseline และแผลที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 8, 10 และ 14 และเมื่อเปรียบเทียบ madecassoside ที่ความเข้มข้น 1 pg/ml, 10 pg/ml และ 100 pg/ml พบว่า madecassoside ความเข้มข้น 10 pg/ml มีผลช่วยสร้าง VEGF (vascular endothelial growth factor) มากกว่าการรักษาด้วย Vaseline (Control) ตั้งแต่วินาที 6 เป็นต้นไป

ECa233 คือ สารสกัดบัวบกมาตรฐาน (*Centella asiatica*) ที่มีการควบคุมกระบวนการการผลิต ทำให้สารสกัด Eca233 มีปริมาณสารกลุ่ม triterpenoid glycosides มากกว่า 80 % ประกอบด้วย madecassoside และ asiaticoside ในอัตราส่วน 1.5 \pm 0.5 : 1 มีลักษณะเป็นผงสีขาว โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาและพัฒนาฤทธิ์ของสารสกัด ECa 233 พบว่าช่วยในเรื่องของความจำและการเรียนรู้ รวมถึงสามารถเพิ่มการสมานแผลไฟไหม้ในหนูทดลองได้ โดยมีการเตรียมเป็นยาทาภายนอก ในรูปแบบเจล ที่มีส่วนผสมสารสกัด ECa233 0.05 % พบว่า เพิ่มการไหลเวียนของเลือด และช่วยลดระยะเวลาการหายของแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการศึกษาพบว่าสารสกัด ECa233 ไม่มีพิษเฉียบพลันและเรื้อรังในหนูทดลอง (Chivapat S, 2011) แม้ผลการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ ECa233 จะชัดเจนว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ แต่การพัฒนาเพื่อต่อยอดให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้ป่วยนำไปใช้ และเข้าถึงได้ง่ายนั้น ยังสามารถต่อยอดได้อีกหลายทาง ในการวิจัยครั้งนี้ ต้องการที่จะตั้งตำรับยาใช้ภายนอก ชนิดแผ่นแปะผิวหนัง ที่ประกอบไปด้วยสารสกัด ECa233 เป็นองค์ประกอบหลัก และพัฒนาสูตรตำรับให้สามารถใช้งานได้จริงและมีประสิทธิภาพ มุ่งเน้นทั้งการรักษาและความงาม

1.2.3 การออกแบบและพัฒนาตำรับแผ่นแปะผิวหนัง

ในการพัฒนาตำรับแผ่นแปะผิวหนังนั้น จะต้องคำนึงถึงเป้าหมายในการใช้งานว่าจะนำไปใช้ประเภทใด ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นการพัฒนาสูตรตำรับแผ่นแปะผิวหนังที่สามารถใช้กับแผลเปิดได้

1.2.3.1 วัสดุปิดแผลและพอลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง

วัสดุปิดแผล (wound dressing) คือ วัสดุปราศจากเชื้อ ใช้ปกปิดแผล เพื่อใช้ในการดูแลบาดแผล ซึ่งอาจมีตัวยาสำคัญเป็นส่วนประกอบหรือไม่มีตัวยาสำคัญก็ได้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีที่ช่วยในการรักษาบาดแผลมากขึ้น ทำให้มีวัสดุปิดแผลหลายรูปแบบ สามารถเลือกใช้ได้ตามลักษณะและความรุนแรงของบาดแผลได้ ซึ่งการใช้ wound dressing มีวัตถุประสงค์ เพื่อลดความเจ็บปวดของบาดแผล ช่วยให้หลุดเลือดไม่เกิดการทำลายเพิ่มขึ้น ลดการเกิดเลือดออกที่บาดแผล ช่วยปกป้องบาดแผลจากบริเวณรอบข้าง และช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้บาดแผลได้ โดยลักษณะ ของวัสดุปิดแผลที่ดีต้องมีลักษณะ ดังนี้

- 1) สะอาด
- 2) สามารถให้ความชุ่มชื้นกับบาดแผล (rehydrate) ในกรณีที่แผลแห้งหรือตกสะเก็ด
- 3) สามารถดูดซึมและเก็บกักสารคัดหลั่ง (exudate) ที่ออกมาจากแผลได้
- 4) น้ำและอากาศสามารถซึมผ่านออกมาได้
- 5) ไม่ทำให้เกิดการบาดเจ็บเมื่อทำการเปลี่ยนวัสดุทำแผล
- 6) ไม่มีสารตกค้างอยู่ภายในบาดแผล และไม่ระคายเคือง
- 7) กระตุ้นการหายของบาดแผล
- 8) ไม่ต้องเปลี่ยนวัสดุทำแผลบ่อย
- 9) ใช้ง่าย
- 10) ราคาไม่แพง

มีการพัฒนาวัสดุปิดแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง เพื่อให้สามารถบริหารยาได้ง่าย และบางครั้งใช้เป็นการรักษาเฉพาะที่ได้ แต่ยาที่จะนำมาพัฒนาให้อยู่ในรูปของวัสดุปิดแผลนั้น จะต้องมีความสมบัติในการซึมผ่านผิวหนัง ซึ่งควรมีลักษณะตาม Lipinski rule of five (Christopher A, 1997) ดังนี้

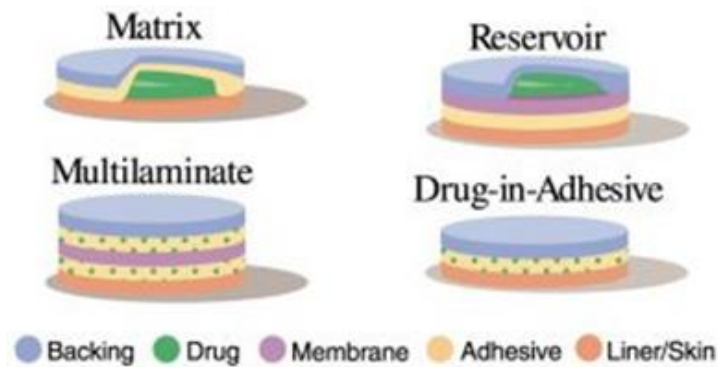
- 1) มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 500 Dalton
- 2) ความชอบทั้งน้ำ (hydrophobic) และ ชอบไขมัน (lipophilic) หรือค่า $\text{Log P} = 1-5$
- 3) มีพันธะ hydrogen bond ไม่เกิน 5 พันธะ ที่ให้อิเล็กตรอนได้

- 4) มีพันธะ hydrogen bond ไม่เกิน 10 พันธะ ที่สามารถรับอิเล็กตรอนได้

อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยทางด้านกายภาพที่มีผลต่อการดูดซึมยาผ่านผิวหนังเช่น ขนาดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างยากับผิวหนัง ระยะเวลาในการบริหารยา รูปแบบแผ่นแปะ และ ความสามารถในการเป็น barrier ของผิวหนังชั้น Epidermis ในกรณีของแผ่นแปะแผลเปิด ผิวหนังบริเวณแผลจะสูญเสียกลไกในการป้องกันสารไปเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของผิวหนังชั้น Epidermis ส่งผลให้การนำส่งยาทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งยาที่นิยมนำมาบรรจุลงแผ่นแปะผิวหนังมักจะเป็นยาที่ไม่ระคายเคืองผิวหนัง (non irritate) มีขนาดความแรงสูง (high potent) เพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา และมีค่าครึ่งชีวิตสั้น (short half-life) เพื่อยืดระยะเวลาที่ยาอยู่ในกระแสเลือด

โดยแผ่นแปะผิวหนัง จะประกอบไปด้วย ชั้น Adhesives คือชั้นที่มีสารช่วยในการยึดติดผิวหนัง ควรมีคุณสมบัติในการยึดเกาะผิวที่ดี ไม่ระคายเคืองผิว และสามารถเข้ากันกับตัวยาหรือสารช่วยอื่นในตำรับได้ ชั้น Backing คือชั้นสารช่วยด้านบนแผ่นแปะ ทำหน้าที่ป้องกันการสูญเสียตัวยาออกสู่ด้านบนของแผ่นแปะ ช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาสู่ด้านที่ติดผิวหนังเท่านั้น และอาจมีชั้น semi-permeable membrane ที่ช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาให้เป็นไปอย่างเหมาะสม โดยแผ่นแปะผิวหนังแบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ (Robinson JR and Lee VHL, 1987)

- 1) Matrix เป็นแผ่นแปะรูปแบบ semisolid matrix ที่บรรจุยาในรูปแบบน้ำ (solution) หรือแขวนตะกอน (suspension) ซึ่งจะสัมผัสผิวโดยตรง และถูกปกคลุมด้วยชั้น adhesive และ ชั้น backing
- 2) Reservoir เป็นรูปแบบที่คล้ายคลึงกับ matrix บรรจุยาในรูปแบบน้ำ (solution) หรือแขวนตะกอน (suspension) แต่ตัวยาไม่ได้สัมผัสผิวหนังโดยตรง ตัวยาถูกขวางกั้นโดย semi-permeable membrane และ adhesive ตามลำดับ และปิดทับด้วยชั้น backing ด้านบน
- 3) Drug-in-Adhesive เป็นรูปแบบที่ตัวยาสำคัญกระจายตัวแทรกอยู่ในชั้น Adhesive และปิดทับด้วยชั้น backing ด้านบน
- 4) Multi-layer Drug-in-Adhesive เป็นรูปแบบที่คล้ายคลึงกับ Drug-in-Adhesive คือ มีตัวยาสำคัญกระจายตัวแทรกอยู่ในชั้น Adhesive ถึง 2 ชั้น ซึ่งระหว่างชั้นนั้นถูกขวางกั้นโดย semi-permeable membrane และปิดทับด้วยชั้น backing ด้านบน



ภาพที่ 8 ชนิดของแผ่นแปะผิวหนัง (Robinson JR and Lee VHL, 1987)

วัสดุปิดแผลอาจแบ่งได้ตามลักษณะขององค์ประกอบ เช่น สารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) collagen เป็นต้น หรือแบ่งตามลักษณะของวัสดุ เช่น ขี้ผึ้ง (ointment) ฟิล์ม (film) โฟม (foam) ไฮโดรเจล (Hydrogel) เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีใช้ทั่วไปในท้องตลาด โดยเฉพาะ รูปแบบ ไฮโดรเจล (Hydrogel) ที่มีการพัฒนาจากหลากหลายบริษัท โดยไฮโดรเจล (Hydrogel) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ที่มี glycerin หรือ water-based gels ที่เคลือบไปยังแผ่นวัสดุ ทำแผล มีคุณสมบัติให้ความชุ่มชื้นบาดแผล (rehydrate) สามารถลอกเปลี่ยนวัสดุได้ โดยไม่ติดบาดแผล และไม่เจ็บ สามารถเอาเนื้อตายออกมาจากบาดแผลได้ โดยการดูดซึมเนื้อตาย เอาไว้ที่วัสดุทำแผล แต่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อผิวหนังปกติเหมาะสำหรับแผลที่มีขนาดไม่ลึกมาก หรือมีสารคัดหลั่ง (The Royal Children's Hospital Melbourne, 2017)

พอลิเมอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Polyvinyl alcohol (PVA) (Rowe RC, 2009) โดยมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- Nonproprietary Names

PhEur: Poly (vinyl alcohol)

USP: Polyvinyl alcohol

- Synonyms

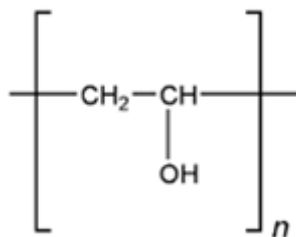
Airvol; Alcotex; Celvol; Elvanol; Gelvatol; Gohsenol; Lemol;

Mowiol; poly(alcohol vinylicus); Polyvinol; PVA; vinyl alcohol polymer.

- Chemical Name and CAS Registry Number

Ethenol, homopolymer [9002-89-5]

- สูตรโครงสร้าง



- สูตรอย่างง่าย $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$

- มวลโมเลกุล 20,000–200,000

- ความหนืด (Viscosity)

High viscosity จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 200,000

Medium viscosity จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 130,000

Low viscosity จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 20,000

- ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

Polyvinyl alcohol ใช้เป็นสารประกอบใน topical และ ophthalmic formulations โดยใช้เป็น stabilizing agent สำหรับ emulsions (0.25–3.0% w/v) Polyvinyl alcohol ยังใช้เป็น viscosity-increasing agent เพื่อเพิ่มความหนืดให้ตำรับ เช่น ตำรับยาหยอดตา น้ำตาเทียม และในน้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ และใช้ควบคุมการปลดปล่อยยาแบบออกฤทธิ์เนิ่น (sustained-release) สำหรับตำรับยารับประทาน และในตำรับยานำส่งรูปแบบแผ่นแปะ (transdermal patches) Polyvinyl alcohol สามารถเกิด microspheres เมื่อผสมกับ glutaraldehyde solution

- จุดหลอมเหลว (Melting point)

228 °C (fully hydrolyzed grades)

180 –190 °C (partially hydrolyzed grades)

- การละลาย (Solubility)

สามารถละลายในน้ำและละลายได้น้อยหรือไม่ละลายใน ethanol (95%) การเตรียมสารละลาย Polyvinyl alcohol ทำได้โดยกระจายผงยาในน้ำที่อุณหภูมิห้อง และให้ความร้อน (heating) สารละลาย 90 °C ประมาณ 5 นาที และควรทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- ความคงตัวและการเก็บรักษา

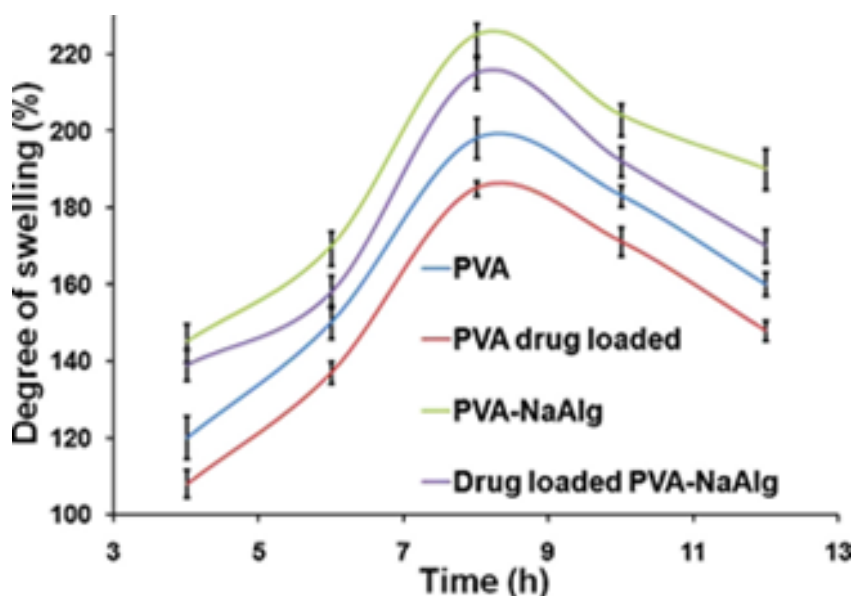
Polyvinyl alcohol คงตัวในสภาวะแห้งและเย็น ทนต่อแสงได้ สลายตัวอย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิ 100 °C และ สลายตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 200 °C ดังนั้น Polyvinyl alcohol จึงควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ส่วนสารละลาย Polyvinyl

alcohol ควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท สามารถทนต่อสารกัดกร่อนได้ อาจใส่ Preservative เพื่อช่วยให้เก็บสารละลายได้นานมากขึ้น

- ความปลอดภัย

Polyvinyl alcohol เป็นสารไม่มีพิษ ไม่ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตาที่ความเข้มข้นถึง 10% และในความเข้มข้น 7% มักใช้ในตำรับเครื่องสำอาง (cosmetics)

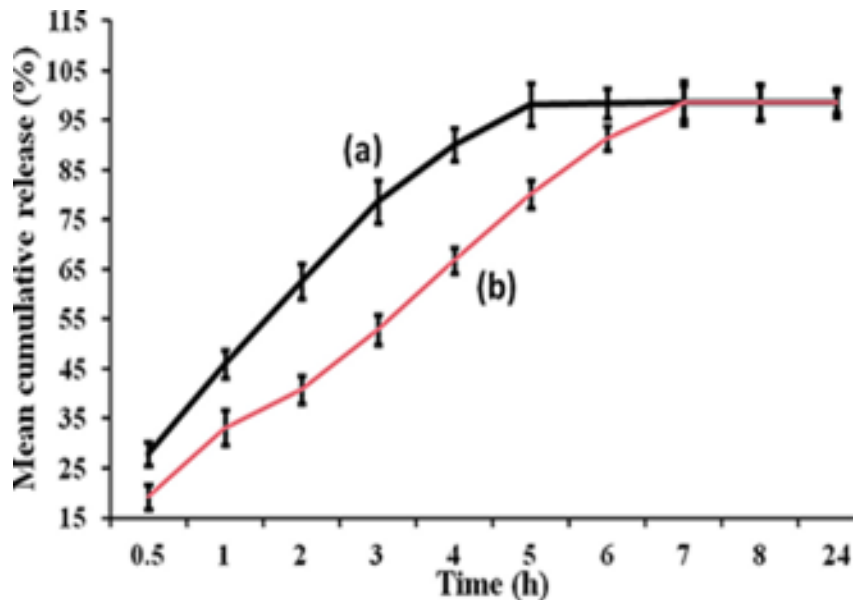
ในการศึกษาวิจัยพัฒนาแผ่นแปะ PVA ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ต้องมีวิธีการศึกษาเพื่อประเมินตำรับแผ่นแปะผิวหนัง เนื่องจากมีการนำ PVA มาผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น งานวิจัยของ K. Kataria และคณะ (Kataria K, 2014) ทำการผสม PVA ร่วมกับ Sodium alginate ในอัตราส่วนพอลิเมอร์ PVA : Sodium alginate ที่ 8 : 2 (%W/W) โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพ ผลการปลดปล่อยยา และผลการรักษาด้วยยา Ciprofloxacin ในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบการพองตัวของแผ่นแปะที่เวลาต่างๆ (Kataria K, 2014)

ผลการศึกษาการพองตัวของแผ่นแปะผิวหนัง พบว่า การเติมพอลิเมอร์ Sodium alginate ในแผ่นแปะร่วมกับ PVA ช่วยเพิ่มความสามารถในการพองตัวของแผ่นแปะผิวหนังได้ ทั้งในรูปแบบที่มีตัวยา Ciprofloxacin และไม่มีตัวยา ดังแสดงในภาพที่ 10 และพบว่าผลการควบคุมการปลดปล่อยยา Ciprofloxacin พบว่าเมื่อเติม Sodium alginate ในแผ่นแปะ ร่วมกับ PVA สามารถชะลอการ

ปลดปล่อยยา ciprofloxacin ได้ และผลการรักษาแผลด้วยแผ่นแปะผิวหนัง พบว่าแผ่นแปะผิวหนังที่มีการเติม Sodium alginate ร่วมกับ PVA และยา Ciprofloxacin สามารถลดระยะเวลาในการรักษาแผลมากกว่าแผ่นแปะผิวหนังสูตรอื่นๆ ที่เปรียบเทียบในการทดลอง ส่งผลให้แผลหายได้เร็วขึ้น



ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลเปรียบเทียบการปลดปล่อยยา Ciprofloxacin จากแผ่นแปะผิวหนัง PVA (a) และ PVA-NaAlg (b) ที่เวลาต่างๆ (Kataria K, 2014)

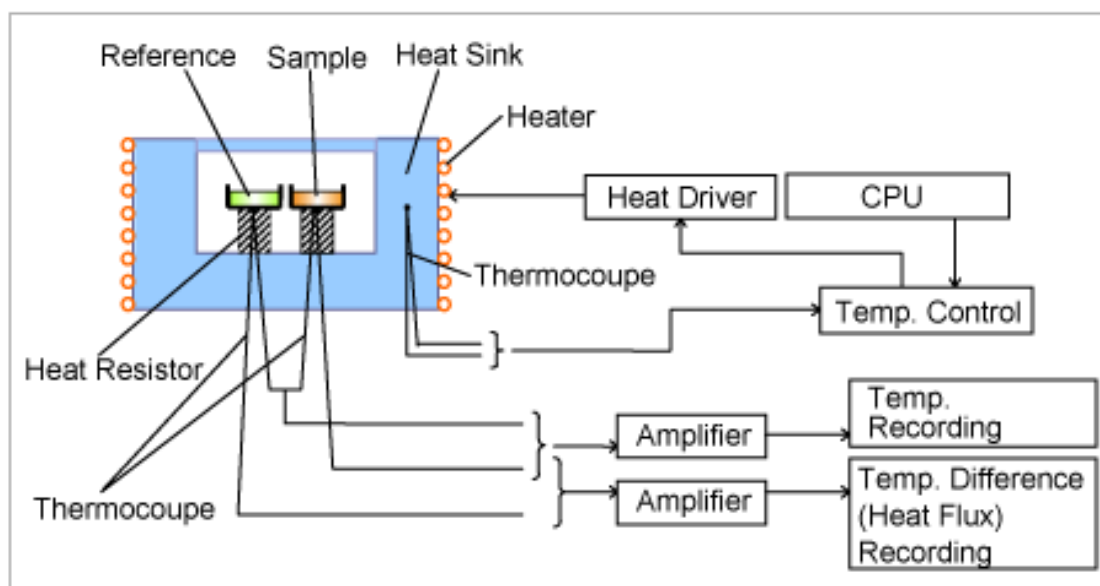
1.2.3.2 การประเมินตำรับแผ่นแปะผิวหนัง

1.2.3.2.1 Loss on drying (LOD)

การสูญเสียน้ำหนักจากการทำแห้ง (Loss on drying) คือการวิเคราะห์ความชื้นโดยดูน้ำหนักที่หายไป จากการระเหยของน้ำ หรือสารละลาย ภายใต้สภาวะที่จำเพาะ โดยเครื่องวัดความชื้นประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ให้ความร้อน และส่วนที่ใช้ชั่งน้ำหนัก หลักการทำงานของเครื่องคือการบันทึกน้ำหนักสารเริ่มต้น แล้วอบสารด้วยการให้ความร้อน โดยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละน้อย จนกระทั่งน้ำหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงนำน้ำหนักที่หายไปมาคำนวณเป็นปริมาณความชื้น และแสดงผลเป็น % w/w (METTLER TOLEDO, 2017; Pharmaceutical Guideline, 2017)

1.2.3.2.2 Differential scanning calorimeter (DSC)

Differential scanning calorimeter คือเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร โดยการวัดค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี เช่น การหลอมเหลว การเปลี่ยนสถานะ เป็นต้น โดยพื้นที่ใต้กราฟแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงความร้อนของสาร (ศุภยนาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2017) ในขั้นตอนการวิเคราะห์สาร สารจะถูกวางบนจานอะลูมิเนียมที่อยู่ภายในเตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยภายในเตาจะมีสารอ้างอิงซึ่งเป็นจานอะลูมิเนียมเปล่า เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบภายใต้สภาวะเดียวกัน



ภาพที่ 11 แสดงหลักการทำงานของ Differential scanning calorimeter

การวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ผลต่างๆ ได้ดังนี้

1. วิเคราะห์จุดหลอมเหลว (Melting points)
2. วิเคราะห์ความร้อนจำเพาะ (Specific heat)
3. วิเคราะห์ค่าพลศาสตร์ (Kinetics)
4. วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของวัสดุ (Purity of materials)
5. วิเคราะห์ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (Thermal stability)
6. วิเคราะห์การเปลี่ยนสถานะ (Phase transition)
7. วิเคราะห์สภาพเป็นผลึก (Crystallinity)

8. วิเคราะห์สารที่มีหลายโครงสร้าง (Polymorphism)

1. การดูด หรือคายพลังงาน (Desorption/Adsorption)
2. การระเหย (Vaporization)

การประยุกต์ใช้งาน สามารถใช้เครื่อง DSC ในการวิเคราะห์ ตัวอย่างพอลิเมอร์ ยา เครื่องสำอาง ตัวอย่างสารเคมี สี ตัวอย่างทางปิโตรเคมี สารอินทรีย์ หรือแม้กระทั่งส่วนประกอบในอาหาร

1.2.3.2.3 Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

เป็นเครื่องมือที่วิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อตรวจสอบหาชนิด functional group ในโมเลกุลสาร วิเคราะห์โครงสร้างเคมีเบื้องต้นได้ และสามารถใช้ในการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ เช่น การหาสัดส่วนหรือองค์ประกอบใน พอลิเมอร์ร่วม การหาปริมาณหมู่แทนที่ เป็นต้น

หลักการของเครื่องวิเคราะห์ อาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีช่วงกลางอินฟราเรด (Middle infrared region) ประมาณ $400-4000\text{ cm}^{-1}$ เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรด ที่มีความถี่ตรงกับ ความถี่ของการสั่น (Stretching) หรือ การหมุน (Bending) ของพันธะโคเวเลนต์ในโมเลกุล จะทำให้โมเลกุลดังก่อกเกิดการดูดกลืนแสง IR และมีการเปลี่ยนแปลงค่าโมเมนต์ขั้วคู่ (Dipole moment) ของโมเลกุล จากนั้น เครื่องมือจะวัด ค่าความเข้มแสงต่อความถี่หรือความยาวคลื่น (Wave number) ได้เป็นสเปคตรัมที่เรียกว่า “Interferogram” ซึ่งในแต่ละพันธะของ functional group จะแสดงค่าความยาวคลื่นเฉพาะต่างกัน (Department of Environmental Engineering, 2017)

1.2.3.2.4 Testometric materials testing machines

Tensile machine เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดคุณสมบัติการต้านทานของวัสดุต่อแรงดึง หลักการของเครื่องคือ ใช้แรงดึง (Tensile force) ที่เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ดึงวัสดุอย่างช้า ทำให้วัสดุยืดมากขึ้น จนกระทั่งวัสดุที่นำมาทดสอบขาด แล้วบันทึกความสัมพันธ์ระหว่าง ความเค้น ความเครียด ที่ใช้ในการดึงวัสดุในแต่ละครั้ง ค่าที่บันทึกได้สามารถนำมาแปลงเป็นหน่วยวัดทางฟิสิกส์ต่างๆ เช่น Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus เป็นต้น

1.2.3.2.5 High-performance liquid chromatography (HPLC)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารผสม บนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน การที่สารผสมในตัวอย่างจะสามารถถูกแยกออกจากกันได้จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่หรือเฟสคงที่ โดยสารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) (ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, 2017)

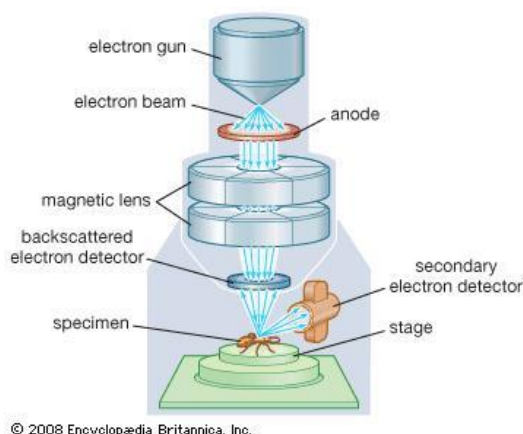
- 1) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลวทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
- 2) ดีแกสเซอร์ (degasser) ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ ที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
- 3) ปั๊ม (pump) จะทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC ด้วยอัตราเร็วคงที่ เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมากจึงทำให้เกิดความต้านทานในการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญในการทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน
- 4) อินเจคเตอร์ (injector) ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC
- 5) คอลัมน์ (column) หรือ stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจลที่บรรจุด้วยอนุภาคตัวกลางที่มีลักษณะเป็นรูพรุนและมีขนาดเล็ก โดยอนุภาคตัวกลางนี้จะทำให้เกิดการแยกของสารผสมในสารตัวอย่าง ทั้งนี้ผิวหน้าอนุภาคตัวกลางรวมทั้งในรูพรุนจะสัมผัสกับของเหลวที่ไหลผ่านด้วยอัตราที่ต่างกันของสาร

ต่างๆ ในตัวอย่างที่มากับ mobile phase ทำให้สารเหล่านี้แยกออกจากกันและไหลออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน

- 6) ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่ได้จากกระบวนการแยก โดยการทำงานของตัววัดสัญญาณนั้น จะเปลี่ยนคุณสมบัติที่วัดได้เป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งสัญญาณไปยังเครื่องประมวลผล โดยเครื่องประมวลผลที่ใช้ทั่วไปคือเครื่องตรวจหาอัลตราไวโอเล็ต (UV detector)

1.2.3.2.6 Scanning electron microscope (SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ใช้ในการศึกษาพื้นผิวของวัตถุโดยการยิงลำแสงอิเล็กตรอน (primary electron) ส่องกราดไปบนวัตถุที่ต้องการศึกษา ทำให้เกิดการชนกันของอิเล็กตรอน ส่งผลให้เกิดการหลุดออกของอิเล็กตรอนบนผิววัตถุ (secondary electron) และทำการวัดอิเล็กตรอนที่หลุดออกจากผิววัตถุ (secondary electron) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แปลงออกมาเป็นสัญญาณภาพ นอกจากนี้อิเล็กตรอนที่หลุดออกมา (secondary electron) ยังเกิดการกระเจิงกลับ ส่งผลให้เกิดสัญญาณเอ็กรเรย์ จึงสามารถวิเคราะห์ธาตุและองค์ประกอบของวัตถุได้อีกด้วย (ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, 2017)



ภาพที่ 12 แสดงหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดกับพืชท้องถิ่นแต่ละชนิดให้ได้องค์ประกอบที่ดีที่สุดในการต้านการอักเสบ
- 2) เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดพืชท้องถิ่นแต่ละชนิด เพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการต้านการอักเสบ
- 3) เพื่อผลิตตำรับยาต้นแบบเพื่อลดการอักเสบสารสกัดจากพืชท้องถิ่น ในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างพืชท้องถิ่น เช่น ชันของชันโรงในเขตสวนผลไม้จังหวัดจันทบุรี; ผักชีลาว จากการปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ จังหวัดเชียงใหม่ ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการวิจัย สกัดสาร ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดชันจากชันโรงสายพันธุ์ขนเงิน และสารสกัดผักชีลาว ในหลอดทดลอง และในเซลล์มาโครฟาจนถึงระดับโมเลกุลเป้าหมาย เพื่อคัดเลือกส่วนประกอบที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป พร้อมทั้งการสร้างและพัฒนาตำรับสารสกัดมาตรฐานจากใบบัวบก ECa 233 ออกแบบและผลิตแผ่นแปะผิวหนังจากสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุด พร้อมประเมินคุณภาพของตำรับยา ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยคุมาโมโตะ ประเทศญี่ปุ่น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ส่วนของสารสกัดที่มีศักยภาพในการขยายผลต่อยอดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดชันจากชันโรงสายพันธุ์ขนเงิน และสารสกัดผักชีลาว
- 2) ได้ตำรับยาต้นแบบเพื่อลดการอักเสบสารสกัดจากพืชท้องถิ่นในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง
- 3) จดสิทธิบัตรกระบวนการและวิธีสกัด และตำรับยาแผ่นแปะผิวหนังต้นแบบ

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

ชันโรง สายพันธุ์ขนเงิน (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) ได้ถูกเก็บในส่วนของชัน ซึ่งถูกเลี้ยงไว้ในกล่องไม้ จากสวนผลไม้ ใน อ.มะขาม จ.จันทบุรี ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 จากนั้น ทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่าและปั่นเป็นก้อนให้สะเด็ดน้ำ และห่อไว้ด้วยพลาสติกห่ออาหาร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

ผักชีลาว (*Anethum graveolens* Linn) ถูกเก็บในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 จากหมู่บ้านศรีเจริญ ตำบลศรีเตี้ย อำเภอบ้านฮ้อย จังหวัดลำพูน ตัวอย่างผักชีลาวได้รับการระบุสายพันธุ์จากนักอนุกรมวิธาน และระบุรหัสตัวอย่าง No. Phoowieng 7.1 และเก็บตัวอย่างพืชไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างถูกเก็บโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนลำต้นเหนือดิน (ลำต้นและใบ, Ar Et) และส่วนราก (Root) จากนั้นทำให้แห้งและบดหยาบเก็บไว้ในที่แห้ง อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

2.2 การสกัดสาร

ทำการสกัดชัน โดยการนำชันที่เก็บไว้ น้ำหนัก 10 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และ นำมาสกัดด้วยสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร โดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วสูง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บสารละลายส่วนบน และทำการสกัดซ้ำในส่วนของตะกอนด้วยวิธีเดียวกัน และนำสารละลายส่วนบนของการสกัดแต่ละครั้งมารวมกัน และทำการกำจัดไขด้วยสารละลายเฮกเซน และทำการระเหยแห้งภายใต้ความร้อน เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในภาชนะมิดชิด กันแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตลอดการวิเคราะห์ (Vongsak B, 2015)

ทำการสกัดผักชีลาว โดยการนำตัวอย่างที่แห้งและทำให้ละเอียด น้ำหนัก 10 กรัม มาสกัดด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol ปริมาณ 200 ml เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้น กรองเอาส่วนของสารละลาย และทำให้แห้งภายใต้ความดันต่ำจนกว่าจะได้สารสกัดชั้นหนืด (crude ethanolic extract, Et) ซึ่งจะมาจากส่วนเหนือดิน (Ar Et) และส่วนราก (Rt Et)

จากนั้น นำสารสกัดที่ได้ ไปทำการสกัดต่อ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยสกัดด้วยเทคนิค dry vacuum column chromatographic technique โดยตัวทำละลาย petroleum ether (Et/Pet) และ ethanol (Et/Et) เป็น mobile phase เพื่อชะสารสกัดจากคอลัมน์ จากนั้น สารสกัดที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์จะถูกนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสารสกัด ได้แก่ Ar Et/Pet, Ar Et/Et, Rt Et/Pet และ Rt Et/Et สารสกัดทั้งหมดถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ในภาชนะมิดชิด กันแสงตลอดการวิเคราะห์ ตัวอย่างสารสกัด with light protection until use. Test samples were prepared at 2,000 $\mu\text{g/ml}$ in complete media and kept in 4°C with light protection.

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มาโครฟาจ Murine monocyte-derived macrophage RAW264.7 cell line ได้รับจาก RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยง RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 3.7 mg/ml NaHCO_3 (Wako Chemical Co., Osaka, Japan), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin G (Meiji Seiko Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Wako Chemical Co., Osaka, Japan) และ 10% fetal bovine serum (HyClone, UT, USA) ภายใต้อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 5% ที่สภาวะมี CO_2 ก่อนการนำเซลล์มาใช้ทดสอบ ทำการเก็บเซลล์ซึ่งเป็นชนิดเกาะติด โดยการ trypsinization ด้วย trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich Inc., MO, USA)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

2.4.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดความสามารถในการยับยั้ง Protein denaturation ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Williams และ คณะ (2008) สังเกตดังต่อไปนี้ เติมสารละลายเริ่มต้น BSA (0.2% w/v) ในสารละลาย Tris-acetate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 2850 μl และเติมสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจ หรือสารละลายยาสี่พัน หรือน้ำยาบ้วนปากที่ได้จากโครงการย่อยที่ 2 ปริมาตร 150 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 72°C องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 20 นาทีเพื่อให้เย็นลง จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 660 nm ด้วยเครื่อง UV/Vis Double beam spectrometer (Elico SL-196, Mettler Teledo, Thailand) (28) ค่าที่ได้รายงานเป็น %inhibition ใน

การยับยั้งการตกตะกอนของโปรตีน เทียบกับตัวควบคุม โดยใช้ Diclofenac sodium เป็นสารมาตรฐาน

2.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 นั้น เพื่อทำการคัดเลือกสถานะที่เหมาะสมของสารทดสอบ เช่น ความเข้มข้น ระยะเวลาในการทดสอบ ไม่ให้มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์อันเนื่องมาจากการความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัด cell viability ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide method หรือ MTT assay ผลของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง และสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions (Ar Et, Ar Et/Pet, Ar Et/Et, Rt Et, Rt Et/Pet, Rt Et/Et) ต่อ cell proliferation ของ เซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 และตรวจวัด mitochondrial dehydrogenase activity ด้วย MTT ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา (Srikoon P, 2013) อธิบายคร่าวๆ ดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 50,000 เซลล์ใน 100 μ l ใน 96-well flat-bottomed plates แล้วบ่มในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะกันภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้น เติมสารทดสอบ 100 μ l ที่ความเข้มข้นสุทธิ 3, 10, 30, 100, 300 μ g/ml หรือ α -mangostin ที่ความเข้มข้นสุทธิ 1.67, 3.34, 6.68, 13.37, 26.72 μ g/ml ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้น ทำการบ่มในตู้ CO₂ incubator ต่ออีก 48 ชั่วโมง จากนั้น ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อและเติม 10 μ l MTT solution (5 mg/ml in PBS) และบ่มในตู้ CO₂ incubator ต่ออีก 2 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม 100 μ l 0.04 N HCl เตรียมใน isopropanol เพื่อละลายตะกอนสี formazan ที่เกิดขึ้น และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ELISA plate reader (Bio-Rad, Richmond, CA) ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาค่า %viability เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ

2.4.3 การทดสอบการยับยั้งการสร้าง nitric oxide

การสร้าง nitric oxide (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 นั้น จะถูกกระตุ้นด้วย 10 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) และวิเคราะห์ปริมาณ nitrite (NO₃) ซึ่งเป็น NO product ในรูปที่เสถียร ในสารละลาย supernatant (Okada S, 1998) อธิบายได้คร่าวๆ ดังนี้ ในการทดสอบ เติมสารสกัดชั้นจากชั้นโรง ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 μ g/ml หรือ สารสกัดผักชีลาว ที่ความเข้มข้นสุทธิ 3, 10, 30, 100 μ g/ml ทำการบ่มในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บ 100 μ l supernatant เพื่อนำไปผสม

กับ 100 μ l Griess reagent (0.5% sulfanilamide, 0.05% *N*-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H_3PO_4) ใน 96-well tissue culture plate ที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง ELISA plate reader (Bio-Rad, Richmond, CA) ค่าที่ได้นำมาคำนวณโดยหักลบค่าในหลุมควบคุมที่ไม่มีการเติม LPS และคำนวณค่า IC50 หรือ ค่า relative NO production เทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ หรือ เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้ sodium nitrite เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ Diclofenac sodium เป็น positive control

2.4.4 การทดสอบผลต่อระดับ pro-inflammatory cytokines

ในการตรวจสอบระดับ pro-inflammatory cytokines ที่ถูกหลั่งออกมาใน culture supernatant ที่เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 นั้น วิเคราะห์โดย flow cytometry (FACSCelesta™ flow cytometer, BD Biosciences, CA, USA) ด้วยชุดตรวจสอบ LEGENDplex™ kit (Biolegend, San Diego, CA) ผลการทดลอง วิเคราะห์โดยโปรแกรม FlowJo software (Tree Star, OR, USA)

2.4.5 การสกัด RNA และการทดสอบผลต่อการแสดงออกของ iNOS และ TNF- α gene

ระดับการแสดงออกของ mRNA ใน LPS-stimulated RAW264 cells ที่เป็นผลจากสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่บ่มในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมสารทดสอบ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR

RNA ทั้งหมด ถูกสกัดโดยใช้ชุดสกัด RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) และ cDNA ถูกเตรียมโดยใช้ PrimeScript RT-PCR kit (Takara Bio Inc., Japan) ตามคู่มือของผลิตภัณฑ์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ quantitative RT-PCR โดยใช้ชุดทดสอบ Applied Biosystems Step One real-time PCR system (Life Technologies, Foster City, CA, USA) ค่า Ct ของแต่ละยีนจะถูกคำนวณเทียบกับค่า Ct ของ β -actin (internal control) โดยแสดงเป็นค่า relative gene expressions ซึ่งเทียบการแสดงออกเป็นเท่าเทียบกับหลอดควบคุม ลำดับของ oligonucleotide primers ของ iNOS, TNF- α และ β -actin ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ดังนี้

iNOS

Forward primer: 5'-ATCTGGATCAGGAACCTGAA-3'

Reverse primer: 5'-CCTTTTTTGTCCCATAGGAA-3'

TNF- α

Forward primer: 5'- TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC -3'

Reverse primer: 5'- CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC -3'

 β -actin

Forward primer: 5'-TGTGATCGTGGGAATGGGTCAG-3'

Reverse primer: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'

2.5 การเตรียมวัสดุปิดแผล (wound dressing) ด้วยวิธี Film casting

โดยประยุกต์จากวิธีเตรียมแผ่นแปะของ Shankar SJ และคณะ (2015)

- 1) เตรียมสารละลาย PVA 8% โดยทำการชั่ง PVA ละลายในน้ำกลั่น
- 2) ให้ความร้อนแล้วปั่นด้วยเครื่อง Hot plate ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 3) ตวงสารละลาย 8% w/v PVA ปริมาตร 28 มิลลิลิตร ในปิกเกอร์ ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส
- 4) ชั่งพอลิเมอร์ อื่นๆตามที่กำหนดไว้ ได้แก่ Sodium Alginate, SCMC, HPMC E15 และ Gelatin
- 5) ค่อยๆกระจาย พอลิเมอร์ แต่ละชนิดลงในปิกเกอร์ข้อ 3.1.3 จะได้สารผสมใน ปิกเกอร์ที่มี 2 พอลิเมอร์ ในสัดส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน
- 6) เมื่อสารผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว เติม Glycerin 5 % เพื่อใช้เป็น Plasticizer
- 7) ปรับปริมาตรให้ได้ 40 มิลลิลิตร แล้วหยดใส่ เพื่อให้สังเกตความเข้ากันของ แผ่นฟิล์มได้ง่าย
- 8) เทสารละลายที่ได้ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลง Petri dish
- 9) นำไปอบที่ตู้ Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.6 การคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีความเข้ากันทางกายภาพมาทำการศึกษาคคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

- 1) ศึกษาความเข้ากันของตำรับ ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) เพื่อตรวจสอบหาความไม่เข้ากัน ร่วมกับวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาเลือกตำรับที่

เหมาะสม โดยแผ่นฟิล์มที่ใช้ทดสอบจะประกอบด้วย พอลิเมอร์ 2 ชนิด โดยเตรียมพอลิเมอร์ ทั้ง 2 ชนิด ในความเข้มข้นที่ต่ำ

- 2) ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ของแผ่นแปะที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 โดย ประเมินด้วยสายตา ผิวนสัมผัส เช่น ความเรียบเนียนของวัสดุปิดแผล ความใส เพื่อเลือกวัสดุปิดแผลที่มีคุณลักษณะทางกายภาพที่ดี
- 3) ศึกษาน้ำหนักของวัสดุปิดแผล ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ประยุกต์จากวิธีของ Shankar SJ และคณะ (2015) เพื่อคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีความกระจายของน้ำหนักน้อย ส่งผลให้มีการควบคุมคุณภาพได้ง่าย
- 4) ศึกษาความต้านทานแรงดึง ด้วยเครื่องวัด Tensile Strength เพื่อศึกษาคุณสมบัติความยืดหยุ่นของแผ่นแปะผิวหนัง อ้างอิงจากวิธีของ Prabhu P และคณะ (2011) โดยตัดแผ่นวัสดุปิดแผลให้มีด้านกว้าง 1 เซนติเมตร และยาว 3 เซนติเมตร แล้วใช้แรงดึง 50 N ในอัตราเร็ว 100 mm/min จากนั้นวัดแรงและความยืดขณะที่แผ่นแปะขาด เพื่อหาค่า Tensile Strength, Elongation at break และ Young's modulus ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Tensile strength (N/mm}^2\text{)} = \frac{\text{Break force}}{\text{Initial cross sectional area of the sample (mm}^2\text{)}}$$

$$\% \text{ Elongation at break} = \frac{\text{Increase in Length} \times 100}{\text{Original length}}$$

$$\text{Young's modulus (N/mm}^2\text{)} = \frac{\text{Force} \times \text{Length}}{\text{Extension} \times \text{Area}}$$

- 5) ศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ (Swelling) ประยุกต์จากวิธีของ Shabbir M และคณะ (2017) โดยนำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้ขนาด 2x2 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น จากนั้นหยดด้วยสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีการดูดซับสารละลายเข้าแผ่นแปะตลอดเวลา ทำการประเมินที่เวลา 15, 30, 60, 180 และ 360 นาที เมื่อครบแต่ละช่วงเวลา ดูดสารละลายส่วนเกินออก นำออกไปชั่งน้ำหนัก แล้วหาค่า Swelling index จากสูตร

$$\% \text{ Swelling index} = \frac{(W2 - W1) \times 100}{W1}$$

เมื่อ W1 คือ น้ำหนักเริ่มต้นของวัสดุปิดแผลก่อนทำการหยดน้ำ

W2 คือ น้ำหนักของวัสดุปิดแผลหลังจากหลังจากดูดซับน้ำ

- คัดเลือกสูตรที่มีค่า % Swelling index มาก เพื่อเลือกแผ่นวัสดุปิดแผลที่สามารถดูดซับน้ำได้ดี เพื่อให้มีคุณลักษณะในการดูดซับหนองจากแผลได้ดี
- 6) ศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 วัน อ้างอิงตามวิธีของ Sarath chandran C และคณะ (2014) เพื่อเป็นการคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีความคงตัวดี เช่น ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ไม่ดูความชื้นจากการเก็บรักษา โดยเก็บผลเป็นค่า Loss on drying เพื่อเลือกสูตรที่สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน

2.7 การเตรียมวัสดุปิดแผลที่ได้จากการเลือกแล้วใส่สารสกัดบัวบก ECa 233 ด้วยวิธี Film

Casting

- 1) เตรียมสารละลาย PVA 8% โดยทำการชั่ง PVA ละลายในน้ำกลั่น
- 2) ให้ความร้อนแล้วปั่นด้วยเครื่อง Hot plate ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 3) ตวงสารละลาย 8% w/v PVA ปริมาตร 28 มิลลิลิตร ในปิ๊กเกอร์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส
- 4) ชั่งพอลิเมอร์ อื่นๆตามที่กำหนดไว้ ได้แก่ Sodium Alginate, SCMC, HPMC E15 และ Gelatin
- 5) ค่อยๆกระจาย พอลิเมอร์ แต่ละชนิดลงในปิ๊กเกอร์ข้อ 3.1.3 จะได้สารผสมในปิ๊กเกอร์ที่มี 2 พอลิเมอร์ ในสัดส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน ค่อยๆผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6) ชั่ง Glycerin 2 กรัม ผสมกับ Ethanol 2 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น Plasticizer และ Co-solvent จากนั้นนำไปละลาย สารสกัด ECA233 ที่ชั่งมาด้วยเครื่อง ชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 7) ปรับปริมาตรให้ได้ 40 มิลลิลิตร
- 8) เทสารละลายที่ได้ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลง Petri dish
- 9) นำไปอบที่ตู้ Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.8 การคัดเลือกวัสดุปิดแผลที่มีส่วนประกอบของสารสกัดบัวบก โดยทำการศึกษาคูณสมบัติ

เชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

- 1) ศึกษาลักษณะทางกายภาพ เช่นเดียวกับข้อ 2.6 (2)
- 2) ศึกษาพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) กำหนดลำแสงอิเล็กตรอนขนาด 10.00 kV ที่ระยะห่างจากวัตถุ 10.0 mm ใช้กำลังขยาย 35 X และ 350 X ตามลำดับ

- 3) ศึกษาน้ำหนักของแผ่นวัสดุปิดแผลเช่นเดียวกับข้อ 2.6 (3)
- 4) ศึกษาความต้านทานแรงดึง เช่นเดียวกับข้อ 2.6 (4)
- 5) ศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกับข้อ 2.6 (5)
- 6) ศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดบวบจากวัสดุปิดแผลโดยประยุกต์วิธีของ Mendes AC และคณะ (2016)
 - 6.1) นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ขนาด 2x2 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ลงใน Erlenmeyer flask
 - 6.2) เติมสารละลาย phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเขย่าในเครื่อง Orbital shaker ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ความแรงในการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที
 - 6.3) เก็บตัวอย่างออกมาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ คือ 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที ลงใน HPLC vial ที่ป้องกันแสง
 - 6.4) นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณยาด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประยุกต์วิธีการจาก M.H. Rafamantanana และคณะ (30) โดยสภาวะที่ใช้ทดลอง ดังนี้
 - Mobile phase Acetonitrile : water ในอัตราส่วน โดยทำแบบ gradient
 - Stationary phase : Reverse phase column C18 ขนาด ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร
 - Flow rate : 1 มิลลิลิตร/นาที
 - Detection : UV detector wavelength 206 นาโนเมตร

ตารางที่ 3 แสดงสัดส่วนของ Mobile phase

นาที	Acetonitrile %	Water %
0	30	70
12	100	0
15	30	70
30	30	70

การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาออกจากวัสดุปิดแผล จากสูตรตำรับที่คัดเลือกไว้ มีหลักเกณฑ์สำคัญคือ มีระยะเวลาการปลดปล่อยยาที่เหมาะสม ทำให้เวลานำไปใช้ไม่จำเป็นต้องใช้บ่อย

2.9 สถิติที่ใช้ทดสอบ

ในการทดลองทำการทดสอบ 3 ซ้ำและรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดลองกับตัวควบคุม ใช้สถิติ Student's *t*-test และ ANOVA โดยใช้เครื่องมือ SPSS version 17.0 software (SPSS Inc., IBM, US) และยอมรับสมมติฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P -value < 0.05

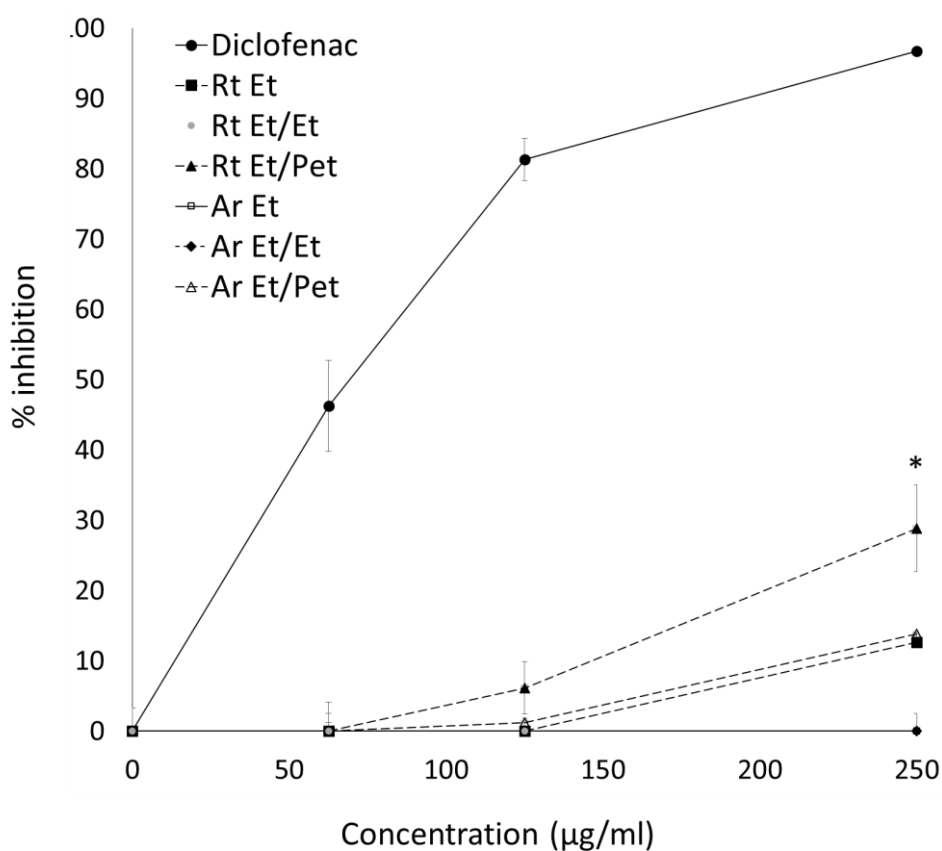
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 ผลการทดสอบการฤทธิ์ด้านการอักเสบ

3.1.1 ผลยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)

ผลการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ของสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions ที่ความเข้มข้นสุทธิ 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ แสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 13 แสดงผลการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions (*, $p\text{-value} < 0.05$ ANOVA test)

สารสกัดผักชีลาวมีความสามารถในการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนต่ำ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน diclofenac sodium ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบกลุ่ม NSAIDs ที่ความเข้มข้นเท่ากัน อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่า สารสกัดทั้ง 6 fractions สามารถยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความ

เข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ ที่ $p\text{-value} < 0.05$ ด้วย ANOVA test ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้โดยที่สีของสารสกัดไม่รบกวนการวิเคราะห์ โดยเมื่อทำ post hoc analysis แล้วพบว่า สารสกัด Rt Et/Pet มีความสามารถยับยั้งสูงสุดที่ $28.86 \pm 6.16\%$ ดังแสดงในตารางที่ และค่า IC_{50} ของ diclofenac sodium ที่ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น มีค่า $75.96 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$ พร้อมกันนั้น พบว่า สารสกัดทั้งส่วนราก (Rt) และส่วนเหนือดิน (Ar) ที่สกัดด้วย Et/Et นั้น ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว รวมทั้ง สารสกัด Ar Et ด้วย

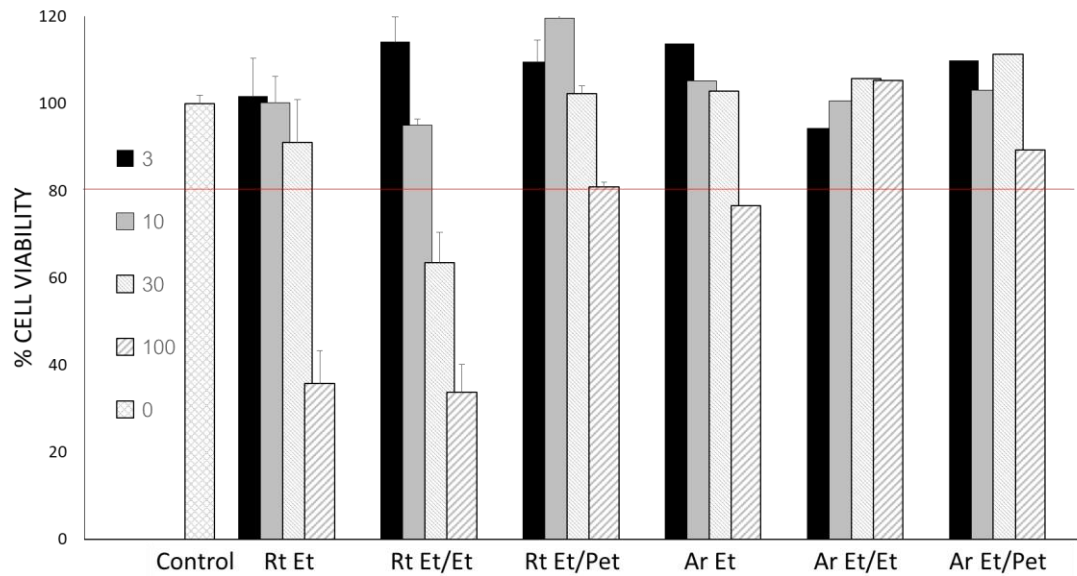
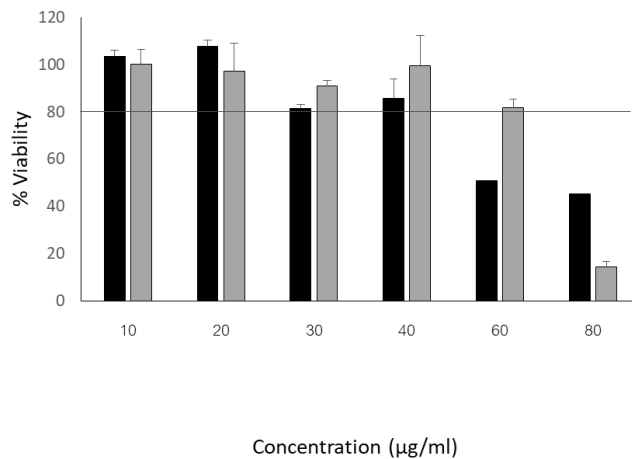
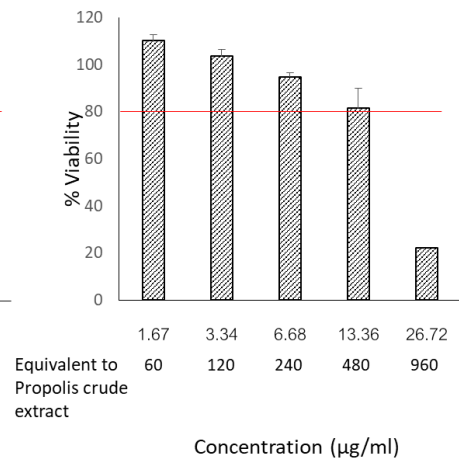
ตารางที่ 4 แสดงผลการยับยั้งการเสียดสภาพของโปรตีนของสารสกัดผักชีลาวความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$

สารทดสอบ	% inhibition	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Root part		
Rt Et	12.65 ± 0.35	n.d.
Rt Et/Pet	28.86 ± 6.16	n.d.
Rt Et/Et	0.00 ± 1.45	n.d.
Arial part		
Ar Et	0.00 ± 0.53	n.d.
Ar Et/Pet	13.80 ± 0.27	n.d.
Ar Et/Et	0.00 ± 0.41	n.d.
Diclofenac sodium (positive control)	96.76 ± 0.24	75.96 ± 1.29

n.d., not detectable

3.1.2 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง และสารสกัดผักชีลาว แสดงโดยค่า % Cell viability ดังภาพที่ 13 โดยแสดงผลของ สารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions ในภาพ A ผลของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงและสารมาตรฐาน diclofenac sodium ในภาพ B และสารบริสุทธิ์ $\alpha\text{-mangostin}$ ซึ่งเป็นสารที่พบมากในสารสกัดชั้น ในภาพ C ตามลำดับ ซึ่งเปรียบเทียบขนาดความเข้มข้นของ $\alpha\text{-mangostin}$ ที่ใช้จากสัดส่วนองค์ประกอบในสารสกัด ของผลที่รายงานใน Vongsak B และคณะ (2015)

A**B****C**

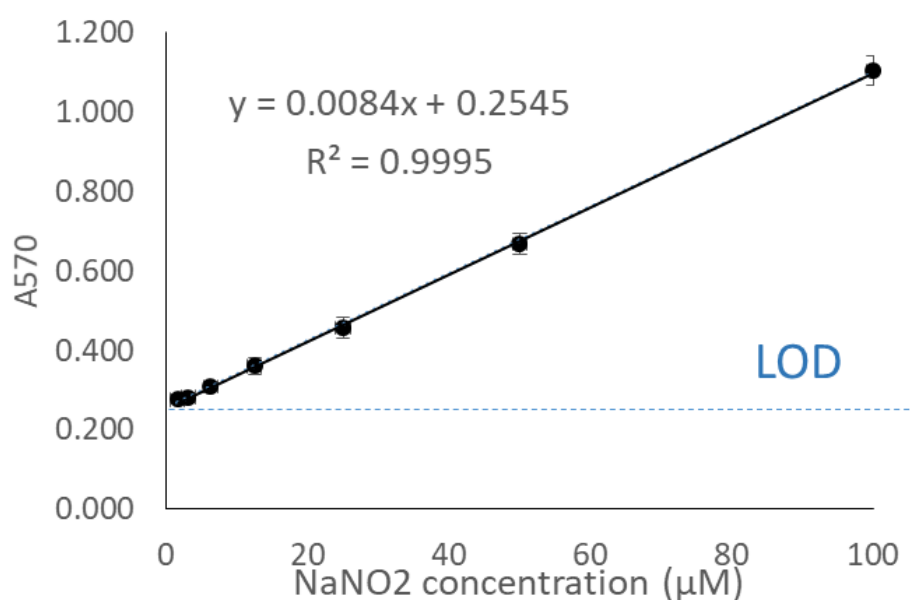
ภาพที่ 14 แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ของสารสกัดผักชีลาวทั้ง 6 fractions (A) ผลของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแและสารมาตรฐาน diclofenac sodium (B) และผลของสารบริสุทธิ์ α -mangostin (C)

จากผลการทดสอบดังกล่าว ความเข้มข้นของสารสกัดที่เซลล์สามารถอยู่รอดได้มากกว่า 80% จะถูกนำมาศึกษาต่อ รวมทั้งคัดเลือกสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าเป็นองค์ประกอบในการตัดสินใจคัดเลือกสารสกัดที่จะทดสอบต่อในขั้นต่อไป ได้แก่

สารสกัดผักชีลาวในส่วนของลำต้นเหนือดินทั้ง 3 fractions คือ Ar Et, Ar Et/Et, Ar Et/Pet ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 100 $\mu\text{g/ml}$ (ยกเว้นสารสกัด Ar Et ที่จะศึกษาที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 30 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากมีความเป็นพิษใกล้เคียง 80% viability ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่ความเข้มข้นไม่เกิน 60 $\mu\text{g/ml}$ และ α -mangostin ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 13.36 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีความเข้มข้นเทียบเท่ากับสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่ 480 $\mu\text{g/ml}$ โดยจะเห็นว่าความเข้มข้นของ α -mangostin ที่ใช้นั้น มีค่าเทียบเท่าสูงกว่า สารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ ภายในสารสกัดที่ทำให้เกิดพิษ หรือส่งเสริม (synergistic) ความเป็นพิษได้

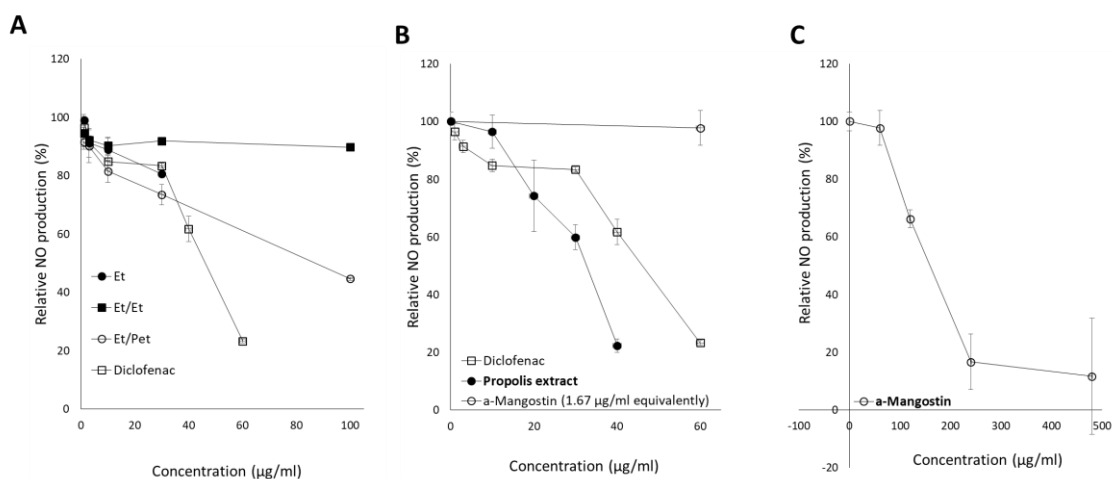
3.1.3 ผลยับยั้งการสร้าง nitric oxide

ผลการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) นั้น สามารถวัดได้โดยคำนวณค่าการยับยั้ง (% inhibition) หรือ ค่า IC_{50} หรือ ค่า relative NO production หรือแม้แต่นำมาคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยการสร้างกราฟมาตรฐานก็ได้ โดยกราฟมาตรฐาน สามารถหาได้จากการใช้สารละลาย sodium nitrite ทำปฏิกิริยากับ Griess reagent ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานเทียบความเข้มข้นของสารประกอบ nitrite ซึ่งเป็นฟอร์มที่เสถียรของ NO เพื่อใช้คำนวณหา NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7

ผลการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจ และสารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดินทั้ง 3 fractions ได้แก่ Ar Et, Ar Et/Et, Ar Et/Pet และผลของ α -mangostin พร้อมทั้ง ผลของสารมาตรฐาน diclofenac sodium ดังแสดงในภาพที่ 15 โดยแสดงค่า % inhibition และค่า IC_{50} ในตารางที่ 5



ภาพที่ 16 แสดงผลการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดินทั้ง 3 fractions ได้แก่ Ar Et, Ar Et/Et, Ar Et/Pet (A) สารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจ (B) ผลของ α -mangostin (C) พร้อมทั้งสารมาตรฐาน diclofenac sodium

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet มีความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ได้ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 68.81 ± 1.37 µg/ml โดยที่สารสกัดผักชีลาว Ar Et และ Ar Et/Et นั้น ไม่พบการยับยั้งการสร้าง NO แต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับผลของการยับยั้งการเสียบางของโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4

ส่วนสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจนั้น พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ได้ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 32.59 ± 0.36 µg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet โดยเมื่อเทียบกับสาร α -mangostin ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 4.35 ± 0.28 µg/ml ซึ่งเมื่อคำนวณแล้วเทียบเท่ากับปริมาณของ α -mangostin ที่มาจากสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจ ประมาณ 156 µg/ml ในขณะที่ค่า IC_{50} นี้ คิดเป็น 5 เท่าของค่าที่ได้ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแจ ซึ่งอาจเกิดจากสารอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชั้นนี้ เช่น γ -mangostin ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบสูงกว่า α -mangostin หลายเท่า แต่มีส่วนที่พบในสารสกัดน้อยกว่า

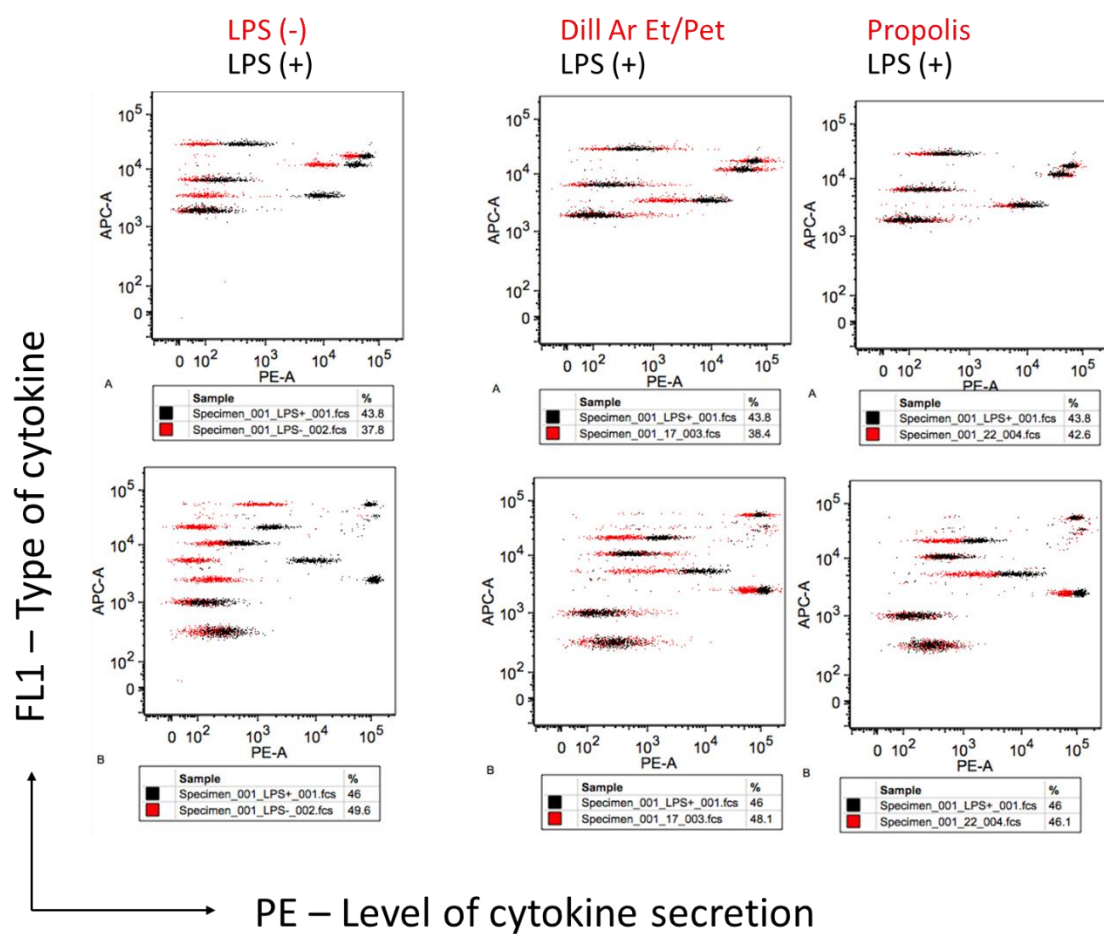
ตารางที่ 5 แสดงค่า % inhibition และค่า IC₅₀ ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของ สารสกัดชั้นจากชั้นโรง และสารสกัดผักชีลาว

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/ml)	% inhibition	IC ₅₀ (µg/ml)
Untreated control	0	100.00±5.63	n.a.
Ar Et	1	99.01±1.90	n.d.
	3	91.23±4.91	
	10	88.92±3.96	
	30	80.63±0.65	
Ar Et/Pet	1	91.45±1.59	68.81±1.37
	3	90.14±5.62	
	10	81.52±3.86	
	30	73.55±3.48	
	100	44.67±0.50	
Ar Et/Et	1	94.65±5.67	n.d.
	3	92.25±0.63	
	10	90.30±2.89	
	30	91.93±0.76	
	100	89.82±1.17	
สารสกัดชั้นจากชั้นโรง	10	96.49±5.77	32.59±0.36
	20	74.26±12.43	
	30	59.92±4.28	
	40	22.41±2.32	
α-mangostin	1.67	97.82±6.02	4.35±0.28
	3.34	66.29±3.05	
	6.68	16.67±9.63	
	13.36	11.68±20.23	
Diclofenac sodium	1	96.54±2.75	46.02±1.53
	3	91.45±2.16	
	10	84.82±2.16	
	30	83.38±0.83	
	40	61.77±4.13	
	60	23.37±0.71	

n.a., not available; n.d., not detectable

3.1.4 ผลต่อระดับ pro-inflammatory cytokines

Pro-inflammatory cytokines ที่ถูกสร้างและหลังจากเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 จากการกระตุ้นด้วย LPS นั้น ได้แก่ IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN-g, TNF, TGF-b, G-CSF, M-CSF, VEGF, MIP-1a, MIP-2, MCP-1 ดังนั้น เพื่อ ตรวจวัดระดับของ cytokines เหล่านี้ จึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง flow cytometry โดยชุดตรวจ cytokine array และใช้ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เห็นผลยับยั้งการสร้าง NO จากตารางที่ 5 เพื่อใช้ทดสอบผล ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 16 โดยที่แสดงชนิดของ cytokine ที่ตรวจในตารางที่ 6

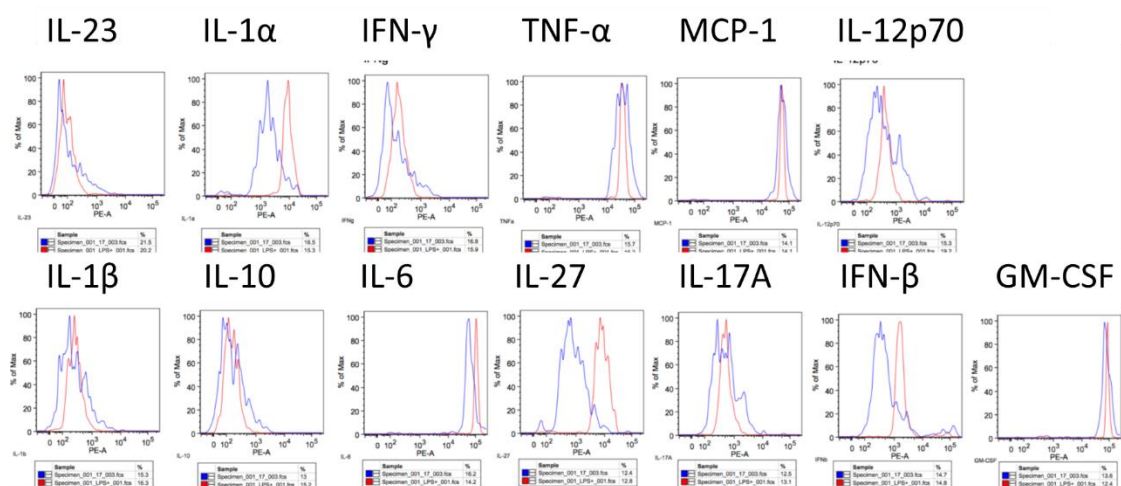


ภาพที่ 17 Dot plot แสดงระดับของ pro-inflammatory cytokines ใน culture media ของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นและผลของสารสกัด ผักชีลาว Ar Et/Pet และ สารสกัดชันจากชันโรง ด้วยเทคนิค flow cytometry

ตารางที่ 6 แสดงลำดับของ cytokines ที่ตรวจโดย LEGENDplex™ kit เรียงลำดับจากบนลงล่าง (Biolegend, San Diego, CA)

กรอบบน	กรอบล่าง
1. IL-12p70	1. GM-CSF
2. MCP-1	2. IFN- β
3. TNF- α	3. IL-17A
4. IFN- γ	4. IL-27
5. IL-1 α	5. IL-6
6. IL-23	6. IL-10
	7. IL-1 β

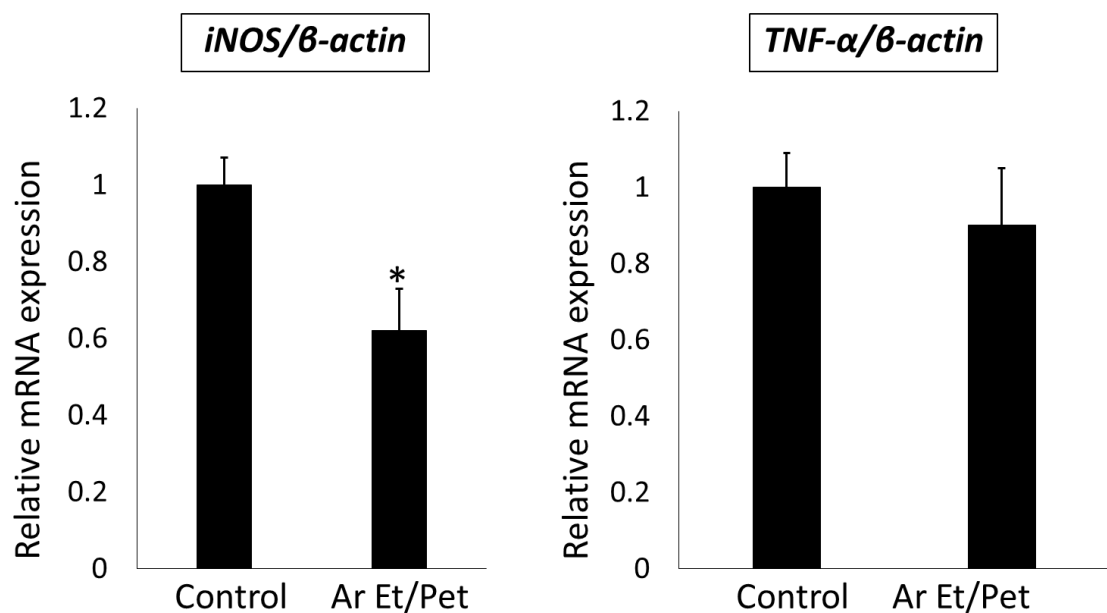
จากผลการทดลองกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ด้วย 10 μ g/ml แล้ววัดระดับ pro-inflammatory cytokines ที่หลั่งออกมา พบว่า สารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet สามารถลดระดับการหลั่งของ IL-1 α , IFN- β , IL-27 และ IL-6 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 17 ส่วนสารสกัดชันจากชันโรงนั้น สามารถลดระดับการหลั่งของ IFN- β , IL-27 และ IL-6 ได้ อย่างไรก็ตาม จะพบว่า cytokines บางส่วนไม่ลดระดับลง อาจเกิดจากการที่ใช้ความเข้มข้นของ LPS ที่สูงเกินไป ทำให้ไม่สามารถเห็นฤทธิ์ของสารสกัดได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 18 Histogram แสดงระดับของ pro-inflammatory cytokines ใน culture media ของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นและผลของสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet (เส้นสีน้ำเงิน) เทียบกับหลอดควบคุม (เส้นสีแดง) ด้วยเทคนิค flow cytometry

3.1.5 ผลต่อการแสดงออกของ *iNOS* และ *TNF- α* gene

จากผลการวิเคราะห์ระดับ pro-inflammatory cytokines ในข้อ 3.1.4 นั้น ในการศึกษาผลต่อการแสดงออกของ *iNOS* และ *TNF- α* gene ได้ใช้การกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ด้วย 1 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อลดระดับการกระตุ้น ดังที่เคยรายงานในการศึกษา มาก่อน โดย Okada S และคณะ (1998) และทำการศึกษาเฉพาะผลของสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet เนื่องจากตัวอย่างของสารสกัดชั้นโรงไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ ได้ผล ดังแสดงในภาพที่ 18 ซึ่งพบว่า *iNOS* gene ถูกยับยั้งการแสดงออก โดยพบว่าค่า relative mRNA expression ของยีนดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 0.62 ± 0.11 ที่ $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อเติมสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet ความเข้มข้นสุทธิ 100 $\mu\text{g/ml}$ และบ่ม ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่ไม่เห็นผลต่อ *TNF- α* gene ในการทดลอง ครั้งนี้



ภาพที่ 19 ผลของสารสกัดผักชีลาว Ar Et/Pet ต่อการแสดงออกของ *iNOS* และ *TNF- α* mRNA expression ในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (*, $p\text{-value} < 0.05$, student t test)

3.2 ผลการเตรียมวัสดุปิดแผล

ตารางที่ 7 แสดงสูตรตำรับในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (% w/v)

สูตร	F0	F0	F0	F0	F0	F0	F0	F0	F0	F0	F1	F1	F1
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2
PVA	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Sodium alginate	-	0.5	1.0	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCMC	-	-	-	-	0.5	1.0	3.0	-	-	-	-	-	-
HPMC E15	-	-	-	-	-	-	-	0.5	1.0	3.0	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	1.0	3.0
Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Methylen e blue	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs
Water	qs	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

จากการเตรียมแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง 12 สูตร ซึ่งทำการเปลี่ยนแปลงสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ Sodium alginate (0.5%, 1.0% และ 3.0%), SCMC (0.5%, 1.0% และ 3.0%), HPMC E15 (0.5%, 1.0% และ 3.0%), Gelatin (0.5%, 1.0% และ 3.0%) โดยผสมกับ PVA 8% พบว่าได้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน

โดยสูตรที่ทำการผสมมีดังนี้ F00 เป็นสูตร Control ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 1 ชนิด คือ PVA 8% ส่วนสูตรทดลองอื่นๆจะมีการผสมพอลิเมอร์อีก 1 ชนิด และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ได้แก่ F01 ประกอบด้วย PVA และ Sodium alginate ในความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), F02 ประกอบด้วย PVA และ Sodium alginate ในความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%), F03 ประกอบด้วย PVA และ Sodium alginate ในความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%)

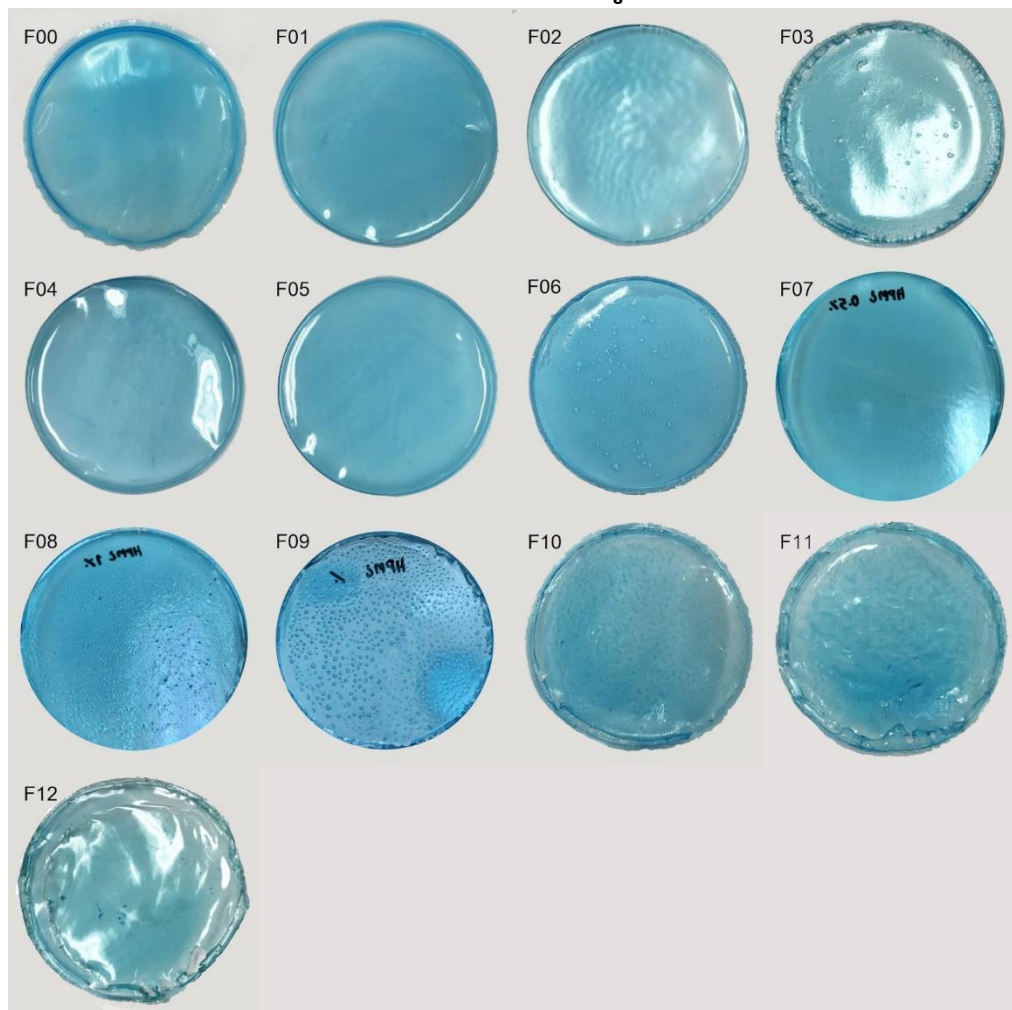
อีก 3 สูตรทดลองถัดมา ประกอบด้วย PVA และ SCMC ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%), F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%) และ F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%)

3 สูตรทดลองถัดมา ประกอบด้วย PVA และ HPMC E15 ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ F07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%), F08 (PVA 8% + HPMC 1.0%) และ F09 (PVA 8% + HPMC E15 3.0%)

ส่วน 3 สูตรทดลองสุดท้ายประกอบด้วย PVA และ Gelatin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%), F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%) และ F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%)

3.3 การประเมินคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของวัสดุปิดแผล

3.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง



ภาพที่ 19 แสดงผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง

จากการทดลองเตรียมแผ่นฟิล์มด้วยสูตรทดลองทั้ง 13 สูตร พบว่าสูตรทดลองที่ประกอบด้วย HPMC E15 ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 3.0% พบว่ามีความไม่เข้ากัน ผิวไม่เรียบ เกิดเป็นก้อนพอลิเมอร์กระจายอยู่ทั่วแผ่นฟิล์มหลังจากที่อบแห้งแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bianchia SE และคณะ (2011) ที่ได้ทำการศึกษาความเข้ากันของการเตรียม HPMC/PVA ที่สัดส่วนต่างๆ โดยเตรียมเป็นสารละลายพอลิเมอร์ 5% w/w พบว่า

ที่สัดส่วนของ HPMC/PVA มากกว่า 25/75 HPMC จะเกิดความไม่เข้ากันกับ PVA ดังนั้น จึงตัดสูตร F08 และ F09 ออกจากการประเมินในขั้นถัดไป

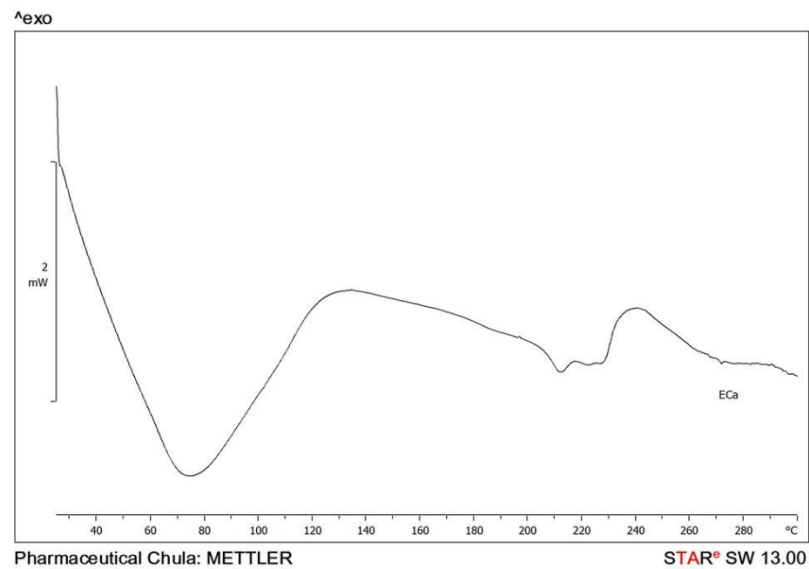
ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม จะมีการประเมิน 3 ด้านคือ ความใส ความเรียบเนียน และ ความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าความใสเมื่อเทียบกับ PVA 8% (F00) พบว่า สูตร F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%) และ F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) มีความใสมากที่สุด สูตรที่มีความใสรองลงมาคือ F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%), F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%), F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%), F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%) และ F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) ตามลำดับ

ส่วนของความเรียบเนียนเมื่อเทียบกับ PVA 8% (F00) พบว่าสูตร F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%) และ F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%) มีความเรียบเนียนมากที่สุด สูตรที่มีความเรียบเนียนรองลงมาคือ F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%), F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%), F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%), F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%), F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) และ F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) ตามลำดับ

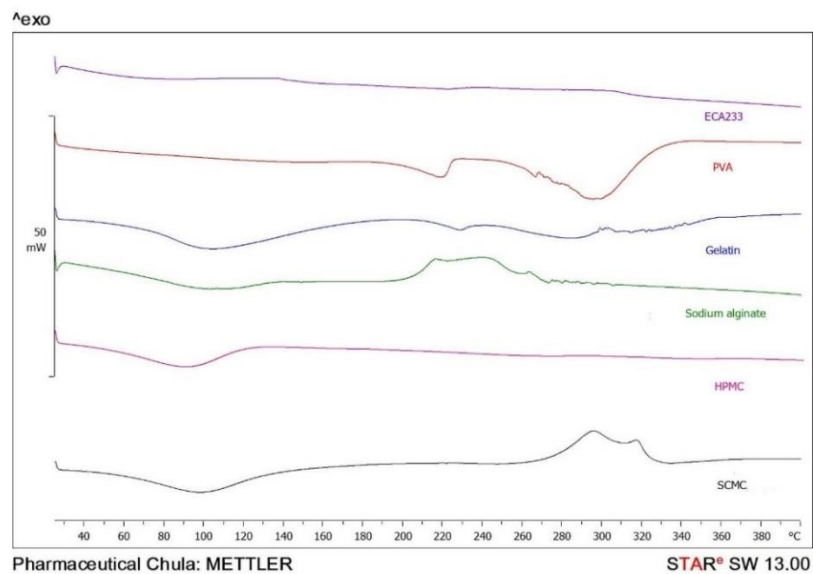
และความเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเทียบกับ PVA 8% (F00) พบว่าสูตร F01 (PVA 8% + Sodium Alginate 0.5%), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%), F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%) และ F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%) มีความเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด สูตรที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันรองลงมาคือ F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%), F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%), F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%), F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%) และ F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) ตามลำดับ ซึ่งพบว่า Gelatin ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 3.0% มีการรวมตัวของพอลิเมอร์ที่ตรงกลาง Petri dish ที่หนากว่าบริเวณขอบ อาจเกิดจาก อัตราส่วนของพอลิเมอร์ Gelatin ที่เพิ่มมากขึ้น หรืออุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสม ทำให้อัตราการระเหยของตัวทำละลายเร็วเกินไป โมเลกุลของพอลิเมอร์เชื่อมกันไม่สมบูรณ์ ส่งผลทำให้เกิดรูหรือเกิดความหนาไม่สม่ำเสมอ (Xiping G, 2004)

3.3.2 ผลการศึกษาความเข้ากันของตำรับ ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry

การศึกษาคุณสมบัติการเปลี่ยนสถานะเชิงความร้อน ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของสารแต่ละชนิด โดยนำสารตัวอย่างต่างๆ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 20 และ 21



ภาพที่ 20 กราฟแสดงผล DSC thermogram ของ ECa233

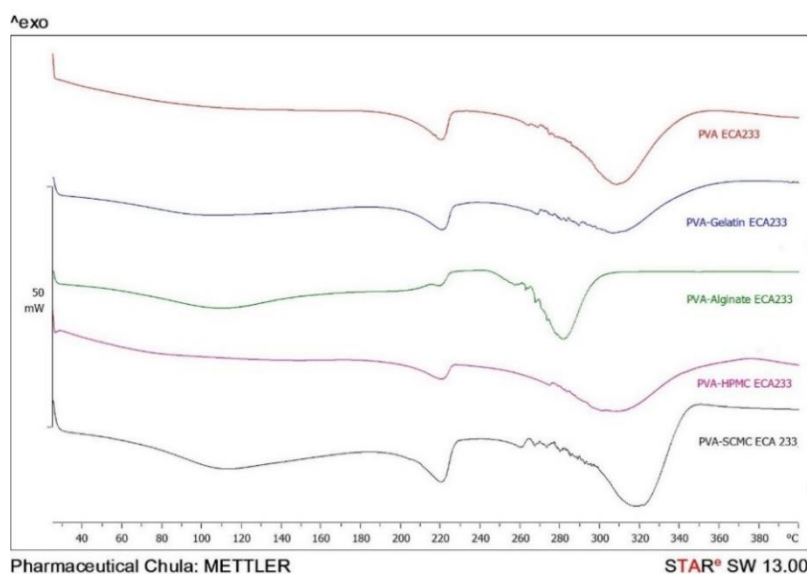


ภาพที่ 21 กราฟแสดงผล DSC thermogram ของ ECa233 และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

ภาพที่ 20 ลักษณะ thermogram ของ ECa233 ในความละเอียด 2 mW พบว่ามีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature, Tg) ที่ประมาณ 70 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิการหลอมตัวของผลึก (crystalline melting temperature, Tm) ที่ประมาณ 220 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิลายตัวที่ 270 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 21 ลักษณะ thermogram ของ ECa233 เมื่อเทียบกับ พอลิเมอร์อื่นๆ ในความละเอียด 50 mW พบว่ามีความชันของกราฟต่ำ จึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นตำแหน่ง Tg บน thermogram ของสารต่างๆ ได้

โดยพบว่ากราฟ thermogram ของ PVA มี Tm ที่ 220 องศาเซลเซียส และมี Td ที่ 300 องศาเซลเซียส กราฟ thermogram ของ Gelatin มีจุด Tm ที่ 100 องศาเซลเซียส และมีจุด Td ที่ 230 องศาเซลเซียส กราฟ thermogram ของ Sodium alginate ไม่สามารถมองเห็น Tg ที่ความละเอียดนี้ มีจุด Tm ที่ 100 องศาเซลเซียส และมี Td ที่ 210 องศาเซลเซียส กราฟ thermogram ของ HPMC E 15 ไม่สามารถมองเห็น Tg ที่ความละเอียดนี้ มีจุด Tm 90 องศาเซลเซียส และไม่เห็นจุด Td และกราฟ thermogram ของ SCMC ไม่สามารถมองเห็น Tg ที่ความละเอียดนี้ มีจุด Tm 90 องศาเซลเซียส และมีจุด Td ที่ 290 องศาเซลเซียส



รูปภาพที่ 22 แสดงผล DSC thermogram ของแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วย ECa233 และ พอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 22 ทุกตำรับมีลักษณะสำคัญของ thermogram PVA อยู่ครบถ้วน ทั้ง Tm และ Td ซึ่งบ่งบอกถึงความเข้ากันของสูตร คือ สูตร PVA + ECa233, สูตร PVA + Gelatin + ECa233, สูตร PVA + Sodium alginate + ECa233, สูตร PVA + HPMC

E15 + ECa233 และ สูตร PVA + SCMC+ ECa233 โดยสูตรผสมดังกล่าวยังคงมีจุด Tm ของ PVA เท่าเดิมแต่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ Td ในทุกสูตรผสมคือ

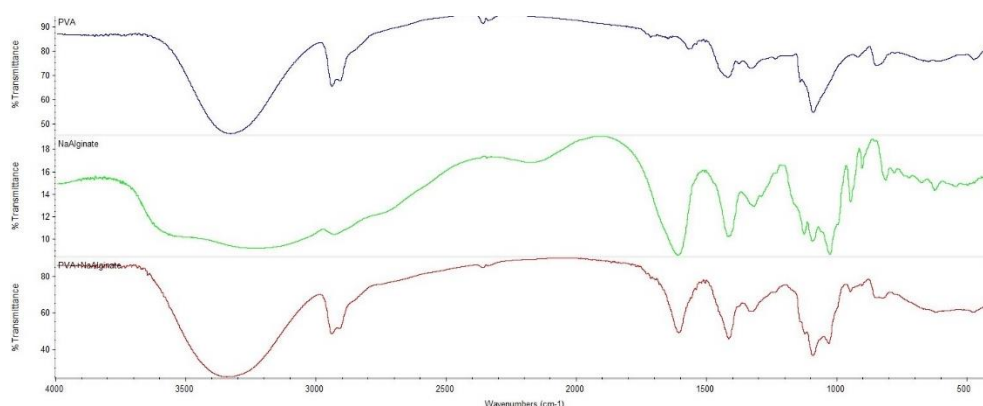
สูตร PVA + ECa233, สูตร PVA + HPMC E15 + ECa233 และ สูตร PVA + Gelatin + ECa233 แสดงถึงตำรับ F00, F07 และ F10 ตามลำดับ ทั้งสามสูตรมีการเปลี่ยนแปลง Td สูงขึ้นจาก 300 องศาเซลเซียส เป็น 310 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสลายตัวยากขึ้น

สูตร PVA + Sodium alginate + ECa233 แสดงถึงตำรับ F01 และ F03 มีการเปลี่ยนแปลง Td ลดลงจาก 310 องศาเซลเซียส เป็น 280 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสลายตัวได้ง่ายขึ้น

สูตร (PVA + SCMC + ECa233) แสดงถึงตำรับ F04 และ F06 มีการเปลี่ยนแปลง Td สูงขึ้นจาก 300 องศาเซลเซียส เป็น 320 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสลายตัวยากขึ้น

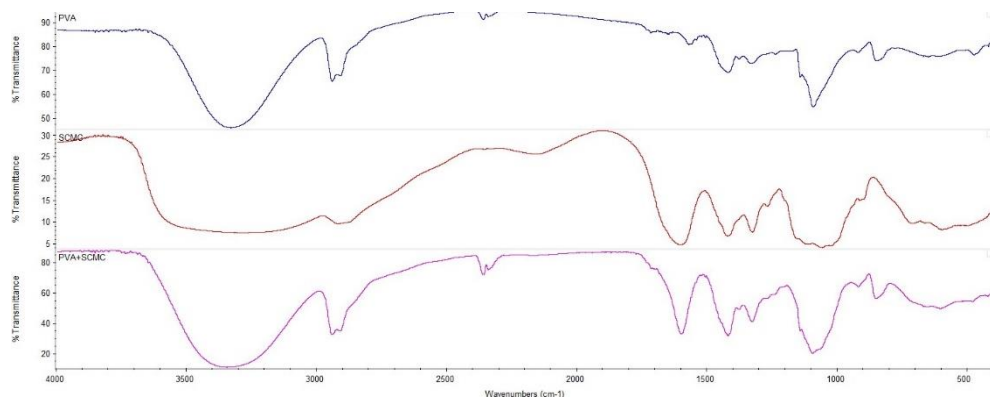
3.3.3 ผลการศึกษาความเข้ากันของตำรับ ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

การศึกษาความเข้ากันของตำรับด้วยเครื่อง FTIR สามารถวิเคราะห์ functional group ของสารตัวอย่างได้จากการดูดกลืนหรือปลดปล่อยพลังงาน เพื่อใช้ในการสันของโมเลกุลนั้นๆ โดยการทดสอบนี้ จะใช้สารตัวอย่างเป็นสารเดี่ยว และสารผสม ซึ่งจะเป็นสารผสมของคู่พอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม มีการเปรียบเทียบเพื่อศึกษาความไม่เข้ากัน หรือการทำปฏิกิริยากันระหว่างพอลิเมอร์ โดยดูจาก functional group ที่เปลี่ยนไป ซึ่งกราฟที่ได้ในครั้งนี้จะแสดงผลของการปลดปล่อยพลังงาน ที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ได้ผลดังนี้



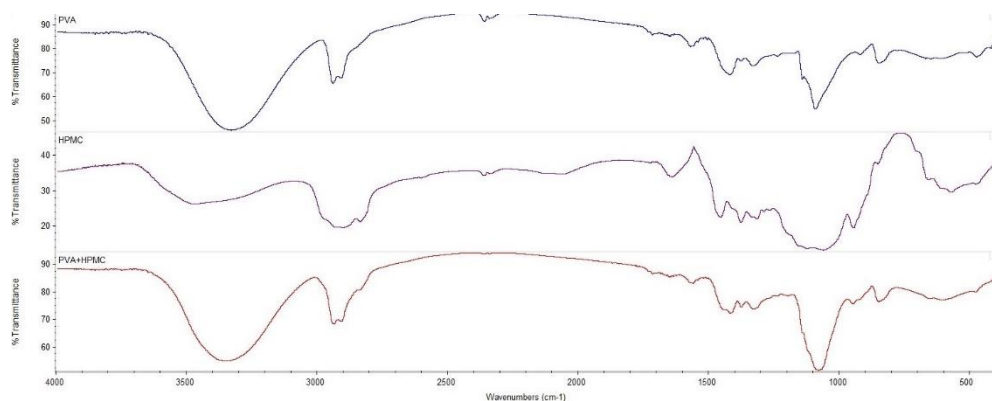
ภาพที่ 23 แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, Sodium alginate และสูตรผสมระหว่าง PVA + Sodium alginate ตามลำดับ

จากรูปที่ 23 ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบ IR Spectrum ของ PVA, Sodium alginate และสารผสมระหว่าง PVA กับ Sodium alginate พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสม ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (Spectrum เส้นล่างสุดของกราฟ) ไม่พบ functional group ที่เพิ่มขึ้น หรือแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มที่เตรียมโดยการผสมระหว่าง PVA กับ Sodium alginate ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน



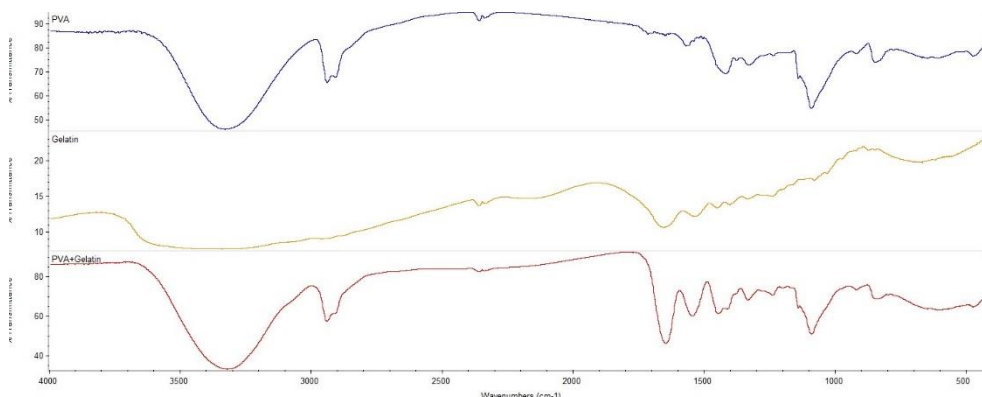
ภาพที่ 24 แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, SCMC และสูตรผสมระหว่าง PVA + SCMC ตามลำดับ

จากรูปที่ 24 ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบ IR Spectrum ของ PVA, SCMC และสารผสมระหว่าง PVA กับ SCMC พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสม ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (Spectrum เส้นล่างสุดของกราฟ) ไม่พบ functional group ที่เพิ่มขึ้น หรือแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มที่เตรียมโดยการผสมกันระหว่าง PVA กับ SCMC ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน



ภาพที่ 25 แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, HPMC E15 และสูตรผสมระหว่าง PVA + HPMC E15 ตามลำดับ

จากภาพที่ 25 ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบ IR Spectrum ของ PVA, HPMC E15 และ สารผสมระหว่าง PVA กับ HPMC E15 พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสม ที่ใช้ในการเตรียม แผ่นฟิล์ม (Spectrum เส้นล่างสุดของกราฟ) ไม่พบ functional group ที่เพิ่มขึ้น หรือแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มที่เตรียมโดยการผสมกันระหว่าง PVA กับ HPMC E15 ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน



ภาพที่ 26 แสดงผลการเปรียบเทียบแผ่นฟิล์มโดยใช้ IR Spectrum ระหว่าง PVA, Gelatin และสูตรผสมระหว่าง PVA + Gelatin ตามลำดับ

จากรูปที่ 26 ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบ IR Spectrum ของ PVA, Gelatin และสารผสมระหว่าง PVA กับ Gelatin พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสม ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (Spectrum เส้นล่างสุดของกราฟ) ไม่พบ functional group ที่เพิ่มขึ้น หรือแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มที่เตรียมโดยการผสมกันระหว่าง PVA กับ Gelatin ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน

ดังนั้นผลการทดสอบความเข้ากันของตำรับด้วยเครื่อง FTIR ซึ่งแสดงผลเปรียบเทียบ IR Spectrum ของสารเดี่ยว และสารผสม พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสม ที่ใช้ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม (Spectrum เส้นล่างสุดของกราฟของแต่ละภาพ) ไม่พบ functional group ที่เพิ่มขึ้นจากเดิม ซึ่งสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ที่ผสม แล้วเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มในสูตรต่าง ๆ นั้น มีความเข้ากัน ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน ซึ่งสอดคล้องกับผล DSC Chromatogram

3.3.4 ผลการศึกษาน้ำหนักของแผ่นฟิล์ม

ตารางที่ 9 แสดงน้ำหนัก (g) ของแผ่นฟิล์ม (n=3)

สูตรที่	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
F00	2.1061 \pm 0.0732
F01	2.0637 \pm 0.0698
F02	2.0924 \pm 0.0554
F03	2.1634 \pm 0.1723
F04	1.9420 \pm 0.0787
F05	2.1326 \pm 0.1108
F06	2.2186 \pm 0.2028
F07	2.0705 \pm 0.0241
F10	2.0484 \pm 0.0406
F11	2.1846 \pm 0.0756
F12	2.3708 \pm 0.0512

จากตารางแสดงน้ำหนักของแผ่นฟิล์ม ที่ชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง พบว่าสูตรที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยที่สุดคือสูตร F07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) รองลงมาคือสูตร F10 และ F12 ตามลำดับ ส่วนสูตรที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากที่สุดคือสูตร F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) อาจเนื่องมาจากความหนืดของพอลิเมอร์ที่มากขึ้นตามปริมาณของพอลิเมอร์รวม (SCMC 3.0%) ที่ใส่ลงไปใ้ในสูตร ทำให้เทจากกระบอกตวงยาก ปริมาตรสารละลายที่เตรียมลง Petri dish ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน จึงอาจส่งผลให้สูตร F06 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากที่สุด

3.3.5 ผลการศึกษาความต้านทานแรงดึง

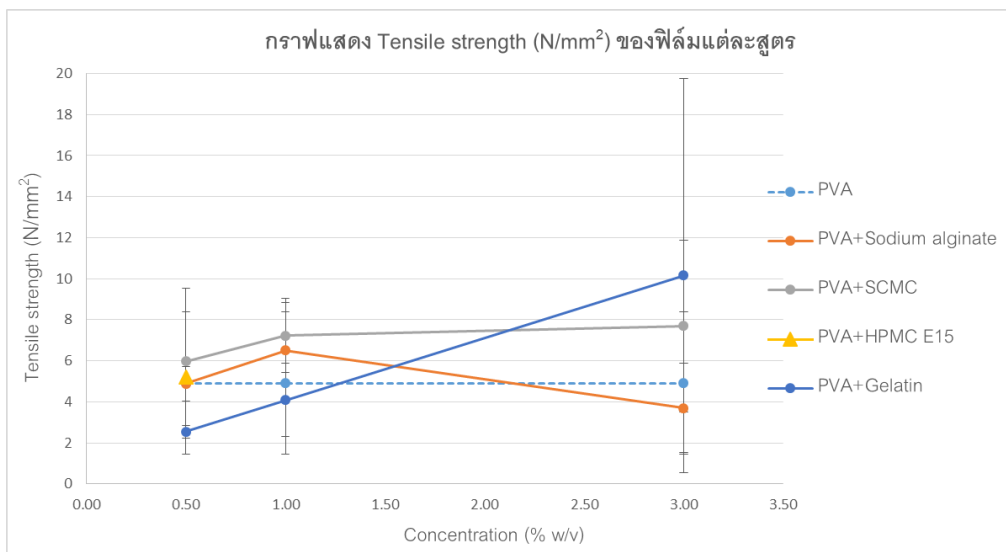
การทดสอบความต้านทานแรงดึง เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถของแผ่นฟิล์มที่ทนต่อแรงจากภายนอกที่มากกระทำได้ดีมากน้อยเพียงใด โดยใช้แรงดึงแผ่นฟิล์มอย่างช้าๆ ทำให้แผ่นฟิล์มยืดขึ้น จนกระทั่งแผ่นฟิล์มขาด แล้วบันทึกค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นดึง (tensile stress) กับความเครียดตามแนวตั้ง (tensile strain) เพื่อนำมาพิจารณาความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์มไปประยุกต์ใช้ในการแปะผิวหนัง โดยจะมีการวัดค่าของ Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์ม ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 10 แสดงผล Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์ม (n=3)

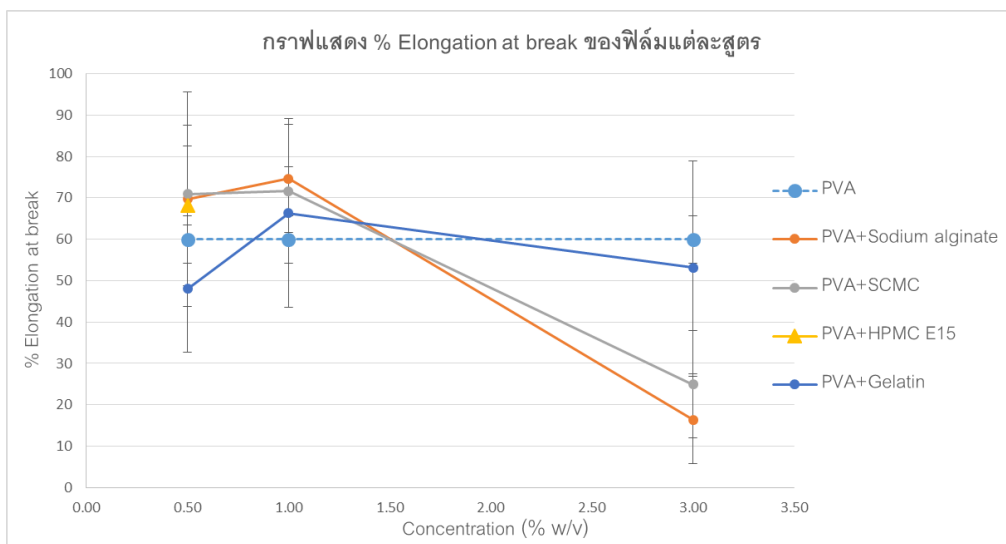
สูตรที่	Tensile strength (N/mm ²)	Elongation of break %	Young's modulus (N/mm ²)
F00	4.91 + 3.47	60.00 + 5.75	37.07 + 19.29
F01	4.88 + 0.84	69.74 + 25.96	27.76 + 2.39
F02	6.50 + 2.33	74.70 + 13.10	30.04 + 5.34
F03	3.70 + 2.19	16.34 + 10.51	57.2 + 27.86
F04	5.98 + 3.56	70.93 + 11.57	33.98 + 4.41
F05	7.23 + 1.82	71.60 + 5.85	25.78 + 4.28
F06	7.69 + 4.17	24.96 + 13.02	25.70 + 2.58
F07	5.21 + 2.71	68.25 + 19.41	38.626 + 1.70
F10	2.54 + 0.32	48.02 + 15.37	27.77 + 4.16
F11	4.08 + 1.79	66.29 + 22.78	28.57 + 3.58
F12	10.16 + 9.61	53.18 + 25.70	52.5 + 32.4

จากตารางแสดงผล Tensile Strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์ม พบว่า สูตรที่มีค่า Tensile Strength มากที่สุดคือ F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) รองลงมาคือ F06 (PVA 8% + HPMC E15 3.0%) ในส่วนของ สูตรที่มีค่า Tensile Strength น้อยที่สุดคือ F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%) จึงสรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Gelatin และ HPMC E15 จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงมากกว่าการใช้พอลิเมอร์ที่เป็น PVA ชนิดเดียว

ผลของการเติมพอลิเมอร์ร่วมที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ Gelatin แผ่นฟิล์มจะมีคุณสมบัติต้านทานแรงดึงได้มากขึ้นในแนวโน้มที่เป็นเส้นตรง ส่วนการเพิ่มปริมาณ Sodium alginate พบว่าฟิล์มจะมีคุณสมบัติต้านทานแรงดึงได้ที่ความเข้มข้นหนึ่ง แต่หากเพิ่มปริมาณมากถึง 3.0% จะทำให้ลดผลด้านนี้ลงได้

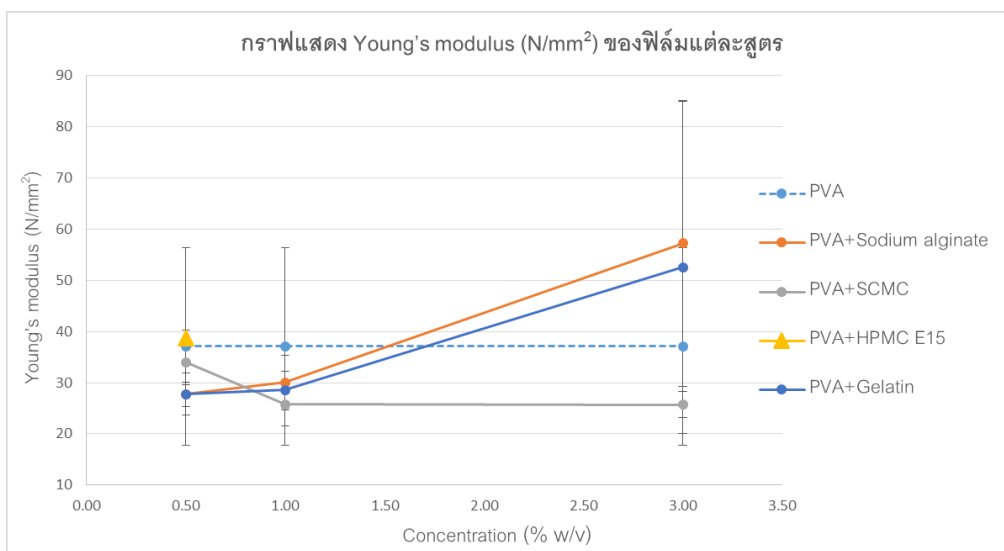


ภาพที่ 27 กราฟแสดงผล Tensile strength (N/mm²) ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)



ภาพที่ 28 กราฟแสดงผล % Elongation at break ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)

ส่วนผลของ Elongation at break พบว่าสูตรที่ให้ค่ามากที่สุดคือ F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%) รองลงมาคือ F04 (PVA 8% + SCMC 1.0%) และ F02 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%) สรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Sodium alginate, SCMC ในปริมาณที่น้อย (0.5 และ 1.0%) จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นได้มากขึ้น แต่การเติมในปริมาณที่มากซึ่งก็คือ 3.0% หรือการเติม Gelatin จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นได้น้อยลงเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ที่เป็น PVA ชนิดเดียว โดยการเติมพอลิเมอร์ร่วมในปริมาณ 1.0% จะทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากที่สุด



ภาพที่ 29 กราฟแสดงผล Young's modulus (N/mm²) ของฟิล์มแต่ละสูตร (n=3)

และผลของค่า Young's modulus มากที่สุดคือ F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) รองลงมาคือ F12 (PVA 8% + SCMC 3.0%) สรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Sodium alginate, Gelatin ในปริมาณที่มากขึ้นจะส่งผลให้แผ่นฟิล์มทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับสูตรผสมในสารคู่เดียวกัน แต่สูตรผสมที่มีการเติมพอลิเมอร์ SCMC พบว่าการเติมในปริมาณที่มากขึ้นจะส่งผลให้แผ่นฟิล์มทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้น้อยลง

แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบในหัวข้อนี้ ผลที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากอาจเกิดจากแผ่นฟิล์มที่เตรียมในแต่ละครั้ง มีการเก็บไว้ในระยะเวลาต่างกัน แผ่นฟิล์มบางสูตร (โดยเฉพาะสูตรที่ผสมพอลิเมอร์ในปริมาณ 3.0%) เมื่อเตรียมแล้วเกิดฟองทั่วแผ่นฟิล์ม อาจส่งผลต่อการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพในหัวข้อนี้

3.3.6 ผลการศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ

การดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์ม (Swelling) จะทดสอบโดยหยดสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 ลงบนแผ่นฟิล์ม จากนั้นคำนวณน้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่เพิ่มขึ้น โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักเริ่มแรก (% Swelling Index) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งแสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 (PVA 8%), F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%) และ F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sodium alginate มากขึ้น ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวมาก แสดงถึงการดูดซับน้ำมากขึ้น แต่ทำให้เวลาในการกร่อนตัวเร็วขึ้น โดยสูตร F03 (PVA 8% + Sodium

alginate 3.0%) มีการพองตัวดีที่สุด ณ นาทีที่ 15 โดยมี % Swelling Index $339.16 \pm 74.37\%$ และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 30

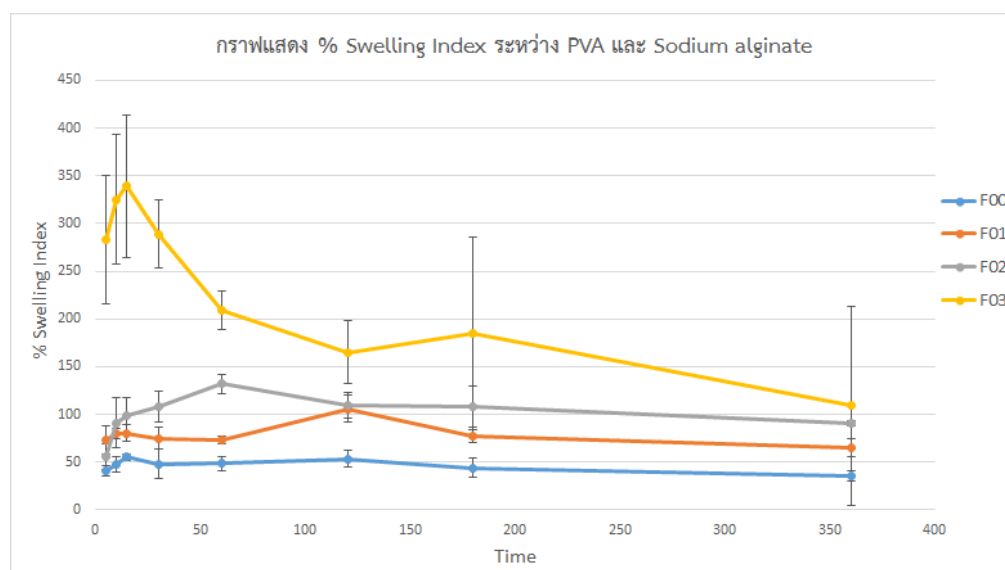
เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) มี % Swelling Index ที่ดีกว่าสูตร F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%), F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%) และ F00 (PVA 8%) ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F01, F02 และ F03 (n=3)

เวลา (นาที)	F00	F01	F02	F03
5	41.19 ± 5.40	73.12 ± 15.18	55.93 ± 13.25	$282.77 \pm 67.43^{**}$
10	47.78 ± 7.92	79.39 ± 5.27	91.17 ± 25.82	$325.10 \pm 67.94^{**}$
15	55.00 ± 2.83	80.18 ± 8.80	98.31 ± 19.46	$339.16 \pm 74.37^{**}$
30	48.16 ± 15.60	74.86 ± 11.60	$108.07 \pm 15.90^*$	$288.58 \pm 35.61^{**}$
60	48.52 ± 7.31	72.77 ± 4.24	$131.91 \pm 9.79^{**}$	$209.11 \pm 19.96^{**}$
120	53.64 ± 9.22	$106.09 \pm 14.03^*$	$109.23 \pm 13.34^*$	$165.04 \pm 33.09^{**}$
180	44.03 ± 9.70	77.24 ± 7.34	108.16 ± 20.95	$184.51 \pm 101.14^*$
360	35.01 ± 5.40	65.05 ± 9.01	90.85 ± 2.49	109.09 ± 104.00

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.01 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)



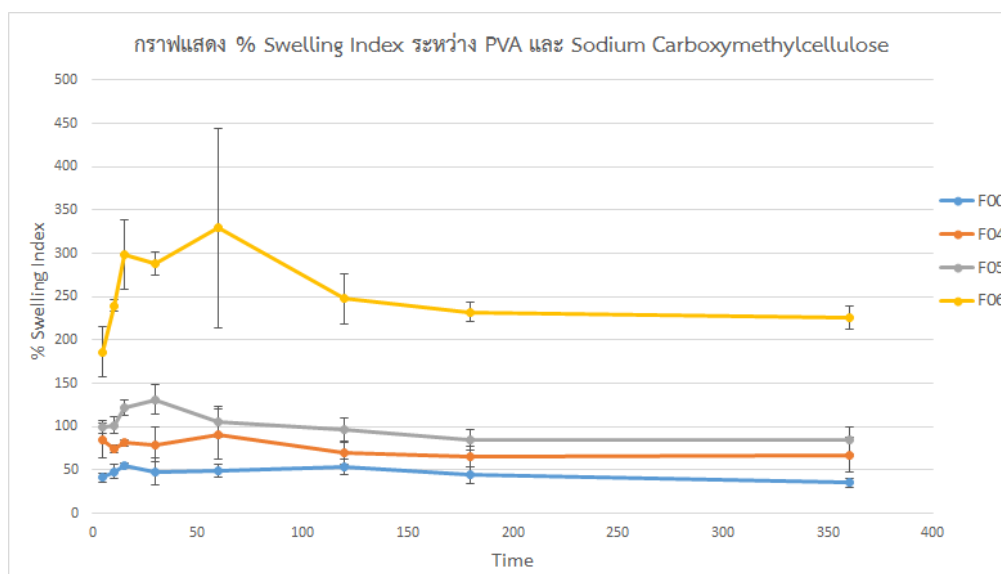
ภาพที่ 30 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ Sodium alginate (n=3)

ตารางที่ 12 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F04, F05 และ F06 (n=3)

เวลา (นาที)	F00	F04	F05	F06
5	41.19 ± 5.40	84.21 ± 20.46	99.28 ± 7.01*	186.36 ± 28.41**
10	47.78 ± 7.92	73.90 ± 4.57*	101.35 ± 9.53**	239.33 ± 6.65**
15	55.00 ± 2.83	81.13 ± 3.95	121.53 ± 9.08*	298.29 ± 40.20**
30	48.16 ± 15.60	78.84 ± 19.93	131.21 ± 17.58**	288.28 ± 13.75**
60	48.52 ± 7.31	91.29 ± 28.84	105.82 ± 17.93	329.16 ± 114.99*
120	53.64 ± 9.22	69.58 ± 12.58	96.41 ± 13.58	247.52 ± 29.21**
180	44.03 ± 9.70	66.03 ± 11.92	84.90 ± 11.88*	232.37 ± 11.50**
360	35.01 ± 5.40	67.31 ± 20.10	84.01 ± 15.64*	225.94 ± 13.17**

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.01 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)



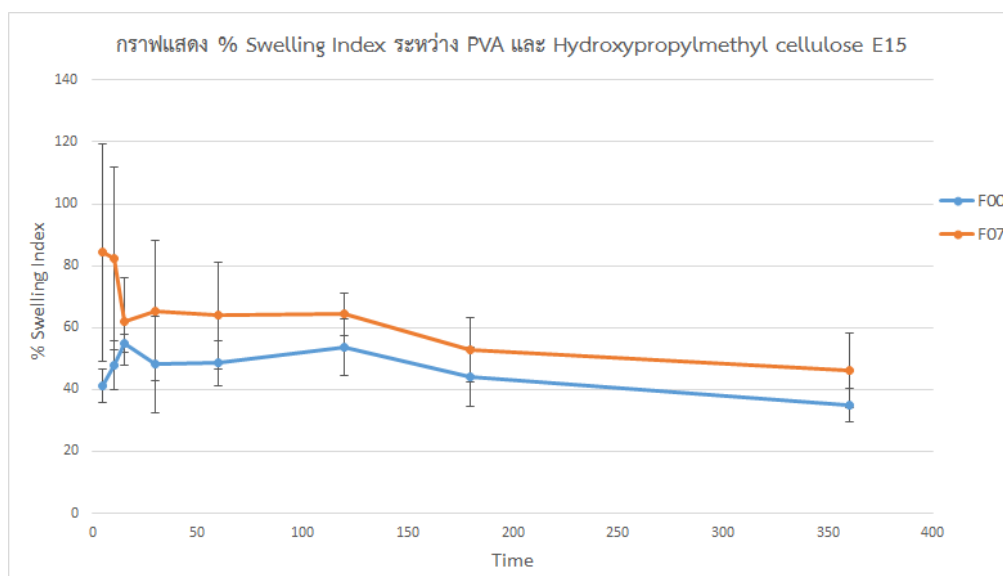
ภาพที่ 31 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ SCMC (n=3)

จากตารางแสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 (PVA 8%), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%), F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%) และ F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SCMC มากขึ้น ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวมากขึ้น โดยพบว่าสูตร F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) มีการพองตัวดีที่สุด ณ นาทีที่ 60 โดยมี % Swelling Index 329.16 ± 114.99 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 120

เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร F06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) มี % Swelling Index ที่ดีกว่าสูตร F05 (PVA 8% + SCMC 1.0%) , F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%) และ F00 (PVA 8%) ตามลำดับ

ตารางที่ 13 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 และ F07 (n=3)

เวลา (นาท)	F00	F07
5	41.19 ± 5.40	84.33 ± 35.16
10	47.78 ± 7.92	82.42 ± 29.56
15	55.00 ± 2.83	62.14 ± 14.15
30	48.16 ± 15.60	65.48 ± 22.49
60	48.52 ± 7.31	63.97 ± 17.23
120	53.64 ± 9.22	64.26 ± 7.02
180	44.03 ± 9.70	52.75 ± 10.50
360	35.01 ± 5.40	46.06 ± 12.11



ภาพที่ 32 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ HPMC E15 (n=3)

จากตารางที่ 13 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 (PVA 8%) และ F07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) พบว่าสูตร F07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) มีการ

พองตัวดีกว่า F00 (PVA 8%) และพองตัวดีที่สุดใน นาทีที่ 5 โดยมี % Swelling Index 84.33 ± 35.16 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 10

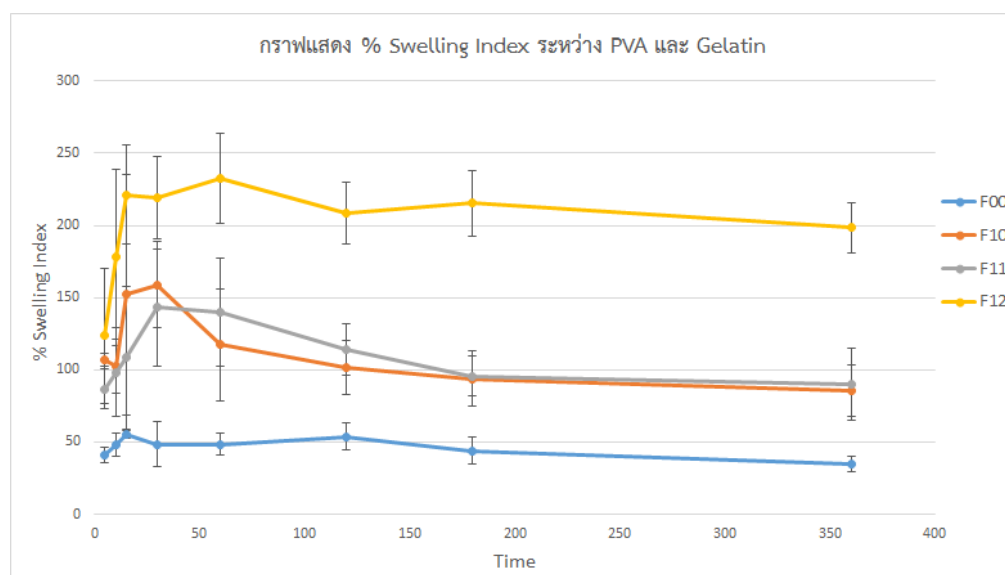
เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร F07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) มี % Swelling Index ที่ดีกว่าสูตร F00 (PVA 8%)

ตารางที่ 14 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00, F10, F11 และ F12 (n=3)

เวลา (นาที)	F00	F10	F11	F12
5	41.19 ± 5.40	$106.67 \pm 4.36^*$	86.67 ± 13.76	$123.52 \pm 46.56^*$
10	47.78 ± 7.92	102.17 ± 18.57	98.13 ± 30.65	$177.90 \pm 60.93^*$
15	55.00 ± 2.83	151.95 ± 83.21	108.27 ± 49.80	$221.38 \pm 34.70^*$
30	48.16 ± 15.60	$158.93 \pm 30.11^*$	$143.11 \pm 40.77^*$	$219.18 \pm 28.25^{**}$
60	48.52 ± 7.31	117.24 ± 38.61	$139.97 \pm 37.46^*$	$232.46 \pm 31.12^{**}$
120	53.64 ± 9.22	$101.36 \pm 18.88^*$	$114.03 \pm 17.80^*$	$208.70 \pm 21.26^{**}$
180	44.03 ± 9.70	$93.93 \pm 18.98^*$	$95.70 \pm 13.91^*$	$215.24 \pm 22.83^{**}$
360	35.01 ± 5.40	$85.52 \pm 17.54^*$	$90.00 \pm 25.14^*$	$198.33 \pm 17.66^{**}$

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.01 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

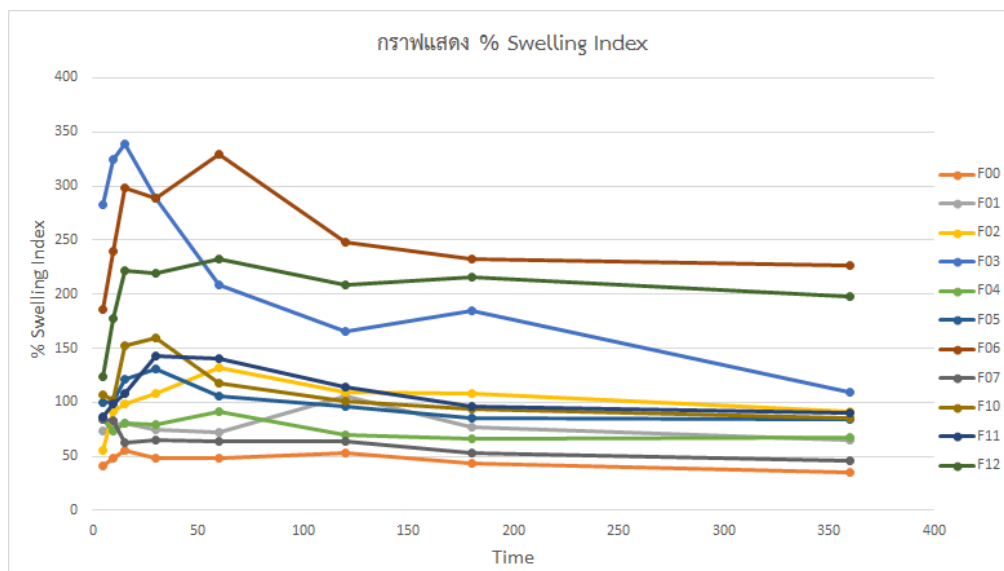


ภาพที่ 33 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA และ Gelatin (n=3)

จากตารางที่ 14 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร F00 (PVA 8%), F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%), F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%) และ F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) พบว่า โดยพบว่าสูตร F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) มีการพองตัวดี

ที่สุด ณ นาทีที่ 60 โดยมี % Swelling Index 232.46 ± 31.12 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 120

เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร F12 (PVA 8% + Gelatin 3.0%) มี % Swelling Index ที่ดีกว่าสูตร F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%) , F11 (PVA 8% + Gelatin 1.0%) และ F00 (PVA 8%) ตามลำดับ



ภาพที่ 34 กราฟแสดงผล % Swelling Index ของแผ่นฟิล์มสูตรทดลอง (n=3)

พบว่าพอลิเมอร์ ที่มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวสูงที่สุดคือ sodium alginate และ SCMC โดย sodium alginate มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวสูง และพองตัวได้รวดเร็ว แต่ในขณะเดียวกันก็มีการกร่อนตัวได้เร็วกว่า SCMC ซึ่งอาจเกิดจากความไม่ทนต่อสภาวะกรด อันเนื่องมาจากสารสกัด ECa233 ที่มีความเป็นกรดอ่อน (Sanli O, 2007)

สูตรที่เติม SCMC มีการพองตัวใกล้เคียงกับ sodium alginate แต่มีการพองตัวช้ากว่า และในขณะเดียวกันก็มีการกร่อนที่ช้ากว่า อาจเนื่องมาจากชนิดของพอลิเมอร์ที่มีความทนต่อสภาวะกรดมากกว่า

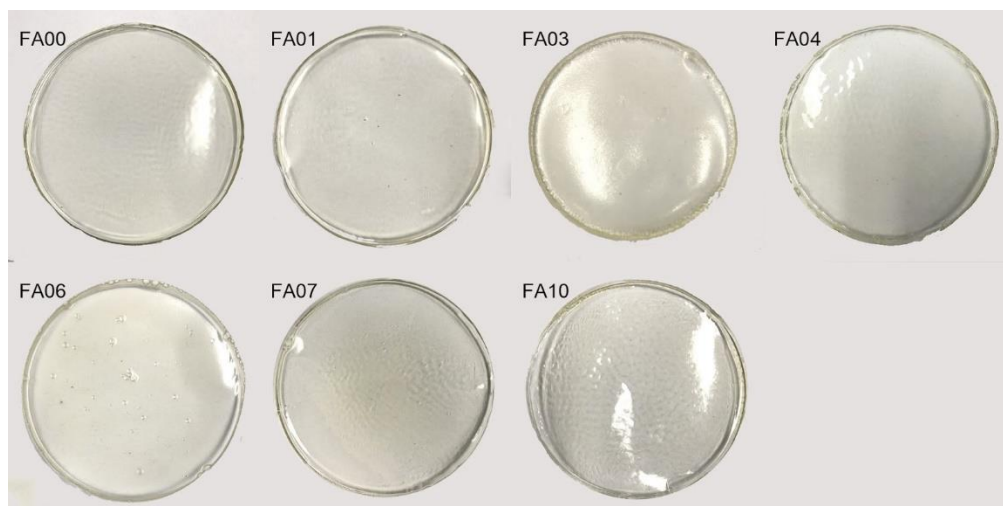
3.3.7 ผลการศึกษาความคงตัว

ลักษณะทางกายภาพ พบว่าแผ่นฟิล์มมีความใสลดลง แต่ความเรียบเนียนนั้นยังคงเหมือนเดิม และพบว่ามีการดูดความชื้น เกิดการเยิ้มเหลวบนแผ่นฟิล์มซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละสูตร โดยสูตรที่มีความเยิ้มเหลวสูงคือ F00 (PVA 8%), F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), F02 (PVA 8% + Sodium alginate 1.0%), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5%) ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์มากขึ้น การเยิ้มเหลวจะลดลง แสดงถึงการดูดความชื้นที่ลดลง

จากตารางที่ 15 แสดงสูตรตำรับในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 โดยผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 โดยสูตรที่ทำการคัดเลือกมีทั้งหมด 7 สูตร คือ FA00 (PVA 8% + ECa233), FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECa233), FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233), FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233), FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233) และ FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233)

3.5 การประเมินคุณสมบัติเชิงกลและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของวัสดุปิดแผลที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233

3.5.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233



ภาพที่ 35 แสดงแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 สูตรต่างๆ

ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม จะมีการประเมิน 3 ด้านคือ ความใส ความเรียบเนียน และ ความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าความใสเมื่อเทียบกับ PVA 8% + ECa233 (FA00) พบว่าสูตร FA07 (PVA 8% + HPMC 0.5% + ECa233) และ FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) มีความใสมากที่สุด สูตรที่มีความใสรองลงมาคือ FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233) และ FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) ตามลำดับ

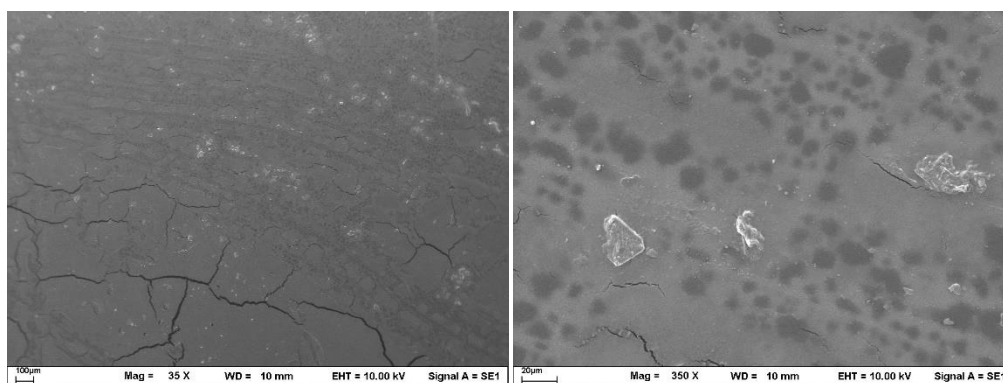
ในส่วนของความเรียบเนียนเมื่อเทียบกับ PVA 8% + ECa233 (FA00) พบว่าสูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%), มีความเรียบเนียนมากที่สุด สูตรที่มีความ

เรียบเนียนรองลงมาคือ F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233), FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233), FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233), FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233) และ FA07 (PVA 8% + HPMC 0.5% + ECa233) ตามลำดับ

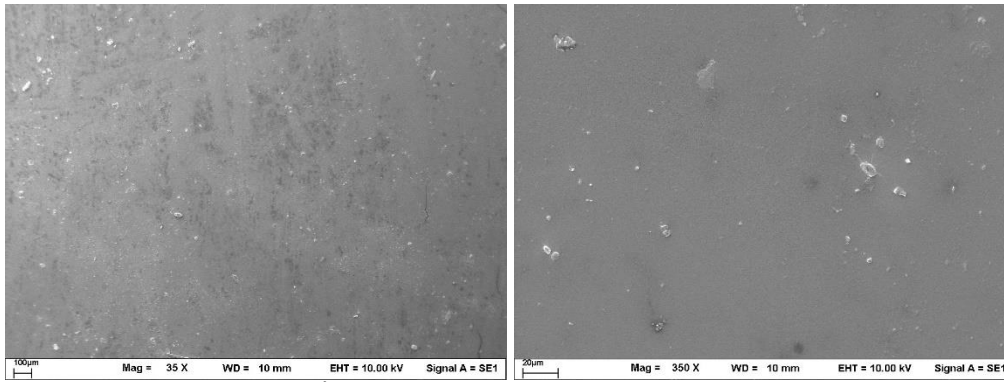
และความเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเทียบกับ PVA 8% + ECa233 (FA00) พบว่าสูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECa233) มีความเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด สูตรที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันรองลงมาคือ F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233), FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233), FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233), FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) และ FA07 (PVA 8% + HPMC 0.5% + ECa233)

3.5.2 ผลการศึกษาพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

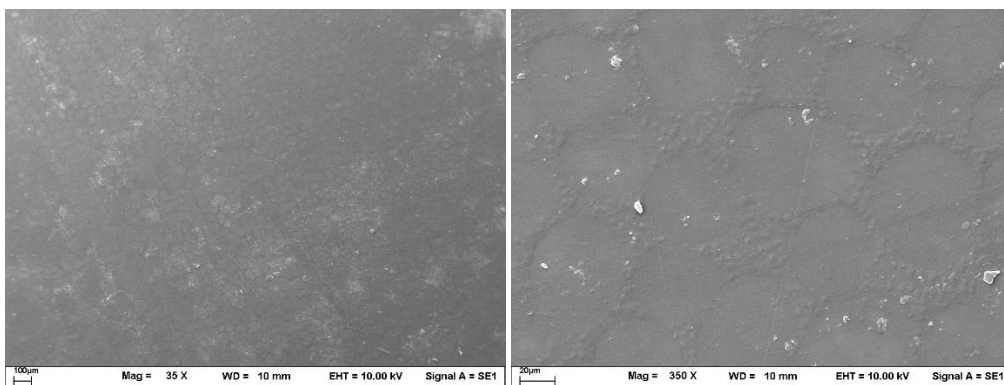
จากการศึกษาพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ยิงลำแสงอิเล็กตรอนขนาด 10.00 kV ที่ระยะห่าง 10.0 mm แล้วส่องผลของอิเล็กตรอนบนแผ่นฟิล์มที่กำลังขยาย 35 X และ 350 X ตามลำดับ ได้ผลดังนี้



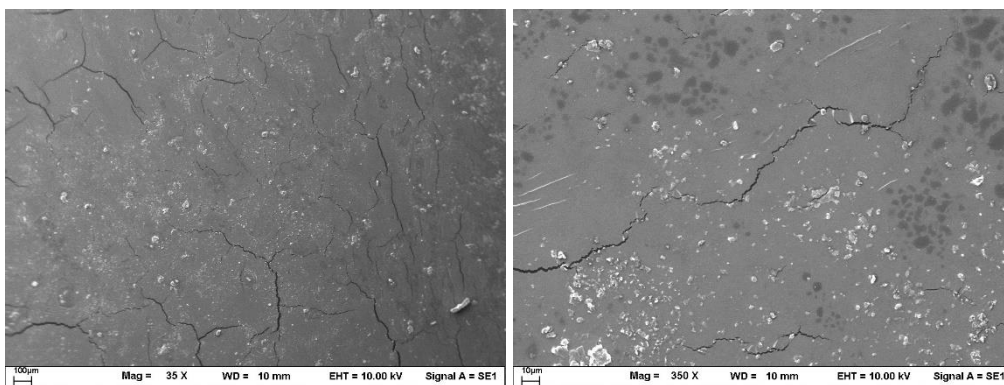
ภาพที่ 36 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233)



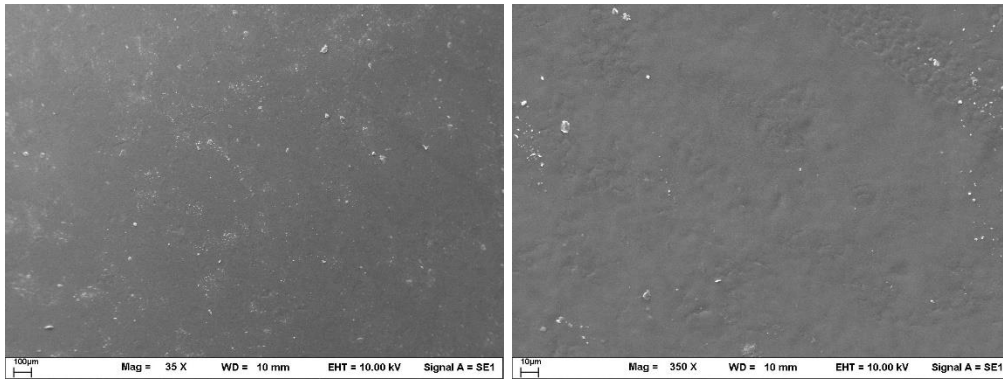
ภาพที่ 37 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECa233)



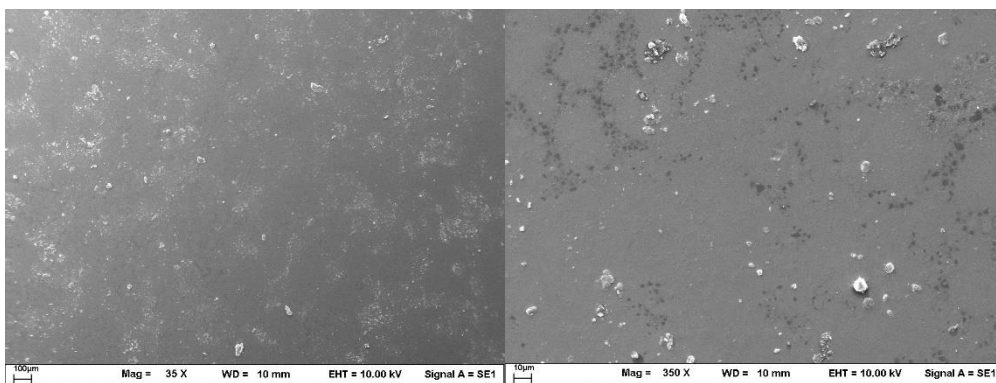
ภาพที่ 38 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233)



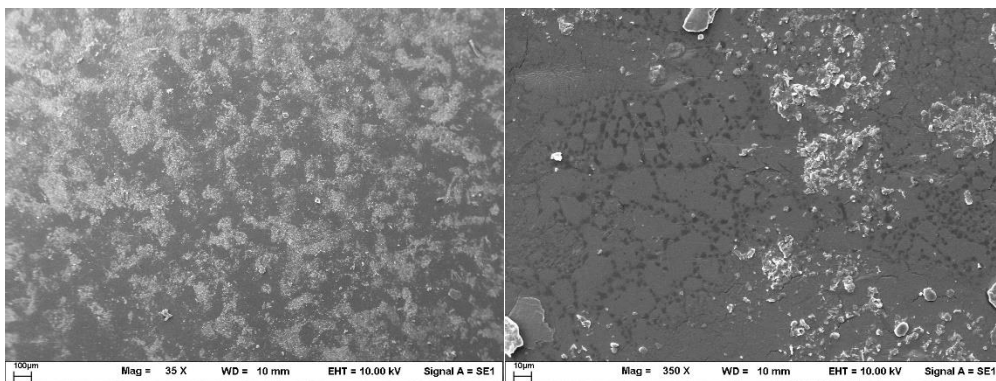
ภาพที่ 39 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233)



ภาพที่ 40 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233)



ภาพที่ 41 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233)



ภาพที่ 42 แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มสูตร FA06 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233)

พบว่าแผ่นฟิล์มมีลักษณะพื้นผิวที่แตกต่างกัน จากรูปที่ 36 และ 39 ซึ่งก็คือสูตร FA00 ที่ประกอบด้วย PVA 8% + ECa233 และสูตร FA04 ที่ประกอบด้วย PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233 มีรอยแตกที่พื้นผิว ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่แผ่นฟิล์มมีความแห้งเกินไป แผ่นไม่มีความยืดหยุ่นเท่าที่ควร โดยเฉพาะในขั้นตอนการแกะแผ่นฟิล์มออกจาก

Petri dish หลังจากทึบแห้ง จึงอาจทำให้แผ่นฟิล์มเกิดรอยร้าวที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

จากรูปที่แสดง พบลักษณะสีบนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มที่ไม่เท่ากัน จุดสีดำ ทึบ ซึ่งเกิดจากการที่อิเล็กตรอนบนแผ่นฟิล์มไม่สะท้อนออกมา คาดว่าเป็นผลมาจากพื้นผิวบริเวณนั้นมีสารที่ไม่นำไฟฟ้า เช่น น้ำมัน กลีเซอริน เป็นต้น

ลักษณะความเรียบเนียนของพื้นผิวแผ่นฟิล์มพบว่าสูตร FA00 ซึ่งก็คือ PVA มีความเรียบเนียนมากที่สุด รองลงมาคือ สูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) สูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%) สูตร FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) สูตร FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) สูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5%) และสูตร FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%) ตามลำดับ

3.5.3 ผลการศึกษาน้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233

ตารางที่ 16 แสดงน้ำหนัก (g) ของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 (n=3)

สูตรที่	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
FA00	2.2295 \pm 0.2265
FA01	2.1586 \pm 0.2181
FA03	2.2914 \pm 0.2016
FA04	2.2259 \pm 0.4270
FA06	2.2782 \pm 0.3108
FA07	2.3119 \pm 0.2889
FA10	2.2555 \pm 0.1467

จากตารางแสดงน้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง พบว่าสูตรที่มีความเบี่ยงเบนค่ามาตรฐานน้อยที่สุดคือสูตร FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) รองลงมาคือ FA03 และ FA01 ตามลำดับ ส่วนสูตรที่มีความเบี่ยงเบนค่ามาตรฐานมากที่สุดคือสูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233) อาจเนื่องมาจากความหนืดของพอลิเมอร์ที่มากขึ้นตามปริมาณของพอลิเมอร์รวม (SCMC) ที่ใส่ลงไป สูตร ทำให้เทจากกระบอกตวงยาก ปริมาตรสารละลายที่เตรียมลงใน Petri dish ในแต่ละครั้งมีความไม่เท่ากัน หรือการอบแผ่นฟิล์มในเครื่อง Hot air oven ในแต่ละครั้งวาง Petri dish ในตำแหน่งที่ต่างกัน ความร้อนของตู้อบมีความไม่สม่ำเสมอ

ขณะให้ความร้อนเพื่อไล่น้ำออกจากสูตร ส่งผลให้แต่ละแผ่นแห้งไม่เท่ากัน จึงอาจส่งผลให้สูตร FA04 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากที่สุด

3.5.4 ผลการศึกษาความต้านทานแรงดึงของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด

ECa233

ตารางที่ 17 แสดงผล Tensile strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233 (n=3)

สูตรที่	Tensile strength (N/mm ²)	Elongation at break (%)	Young's modulus (N/mm ²)
FA00	5.0003 ± 1.5962	45.7903 ± 8.9064	30.5047 ± 2.1151
FA01	2.6193 ± 1.0705	51.3370 ± 30.2360	37.5473 ± 8.5424
FA03	3.7883 ± 3.2958	9.7720 ± 8.4380	73.2333 ± 22.2909
FA04	2.9183 ± 2.4215	42.1827 ± 11.2538	24.5327 ± 6.3472
FA06	5.3223 ± 3.4468	17.2183 ± 5.5559	43.9047 ± 8.9027
FA07	7.3453 ± 6.7389	55.0333 ± 12.8464	34.7277 ± 18.1980
FA10	6.4900 ± 2.5543	67.8563 ± 4.0430	27.9397 ± 7.4972

จากตารางแสดงผล Tensile Strength, Elongation at break และ Young's modulus ของแผ่นฟิล์ม พบว่า สูตรที่มีค่า Tensile Strength มากที่สุดคือ FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) รองลงมาคือ FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%) จึงสรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Gelatin และ HPMC E15 จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงมากกว่าการใช้พอลิเมอร์ที่เป็น PVA ชนิดเดียว

ส่วนผลของ Elongation at break พบว่าสูตรที่ให้ค่ามากที่สุดคือ FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5%) รองลงมาคือ FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5%) และ FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5%) สรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Gelatin, HPMC E15, Sodium alginate, ในปริมาณที่น้อย (0.5%) จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นได้มากขึ้น แต่การเติมในปริมาณที่มากซึ่งก็คือ 3.0% จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นได้น้อยลงเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ที่เป็น PVA ชนิดเดียว

และผลของค่า Young's modulus มากที่สุดคือ FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0%) รองลงมาคือ FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0%) สรุปได้ว่าการเติมพอลิเมอร์ Sodium alginate, Sodium carboxymethylcellulose ในปริมาณที่มากขึ้นจะ

ส่งผลให้แผ่นฟิล์มทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับสูตรผสมในสารคู่เดียว

แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบในหัวข้อนี้ ผลที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากอาจเกิดจากแผ่นฟิล์มที่เตรียมในแต่ละครั้ง มีการเก็บไว้ในระยะเวลาต่างกัน แผ่นฟิล์มบางสูตร (โดยเฉพาะสูตรที่ผสมพอลิเมอร์ในปริมาณ 3.0%) เมื่อเตรียมแล้วเกิดฟองทั่วแผ่นฟิล์ม อาจส่งผลต่อการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพในหัวข้อนี้ได้

สรุปได้ว่าการเติมสารสกัด ECa233 ในแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันระหว่างก่อนใส่สารสกัด ECa233 กับ หลังใส่สารสกัด ECa233 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

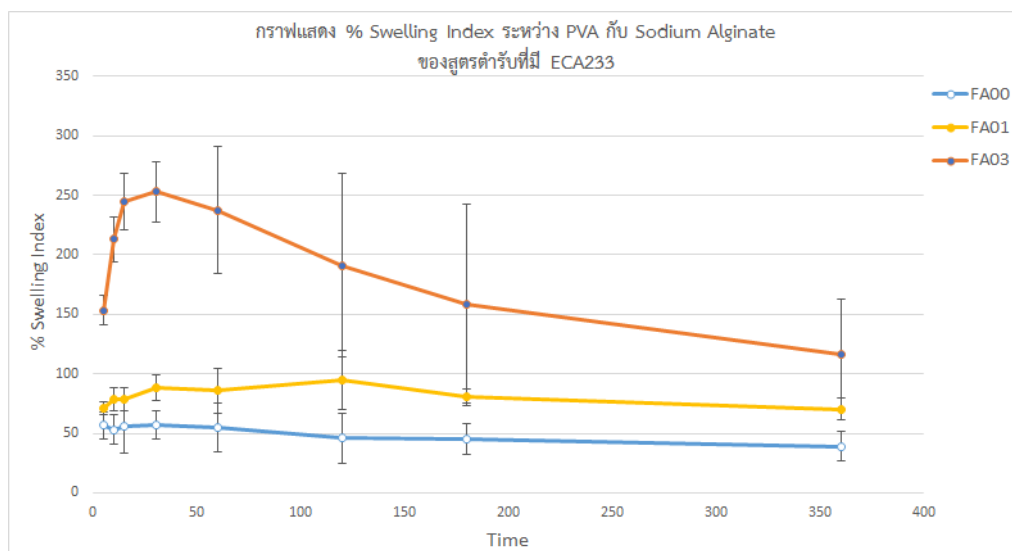
3.5.5 ผลการศึกษาความสามารถการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233

ตารางที่ 18 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00, FA01 และ FA03 (n=3)

นาที่	FA00	FA01	FA03
5	56.75 ± 11.10	71.08 ± 5.63	153.55 ± 12.81**
10	53.11 ± 12.66	78.33 ± 9.62	213.14 ± 18.78**
15	56.40 ± 22.93	78.62 ± 9.22	244.99 ± 23.92**
30	57.05 ± 11.36	88.40 ± 11.28	252.92 ± 25.12**
60	54.82 ± 20.58	86.03 ± 18.72	237.35 ± 53.47*
120	45.87 ± 20.80	94.90 ± 25.21	190.98 ± 76.97*
180	45.39 ± 12.89	81.14 ± 6.09	158.04 ± 84.71
360	39.00 ± 12.28	70.13 ± 9.14	116.12 ± 46.56*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.01 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)



ภาพที่ 43 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate ของสูตรตำรับที่มี ECA233 (n=3)

จากตารางแสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECA233), FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECA233), F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECA233) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sodium alginate มากขึ้น ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวมากขึ้น ดูดซับน้ำมากขึ้น โดยสูตร F03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECA233) มีการพองตัวดีที่สุด ณ นาทีที่ 30 โดยมี % Swelling Index 252.92 ± 25.12 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 60

โดยเมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECA233) มี % Swelling Index ที่ดีกว่า F01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECA233) และ F00 (PVA 8% + ECA233) ตามลำดับ

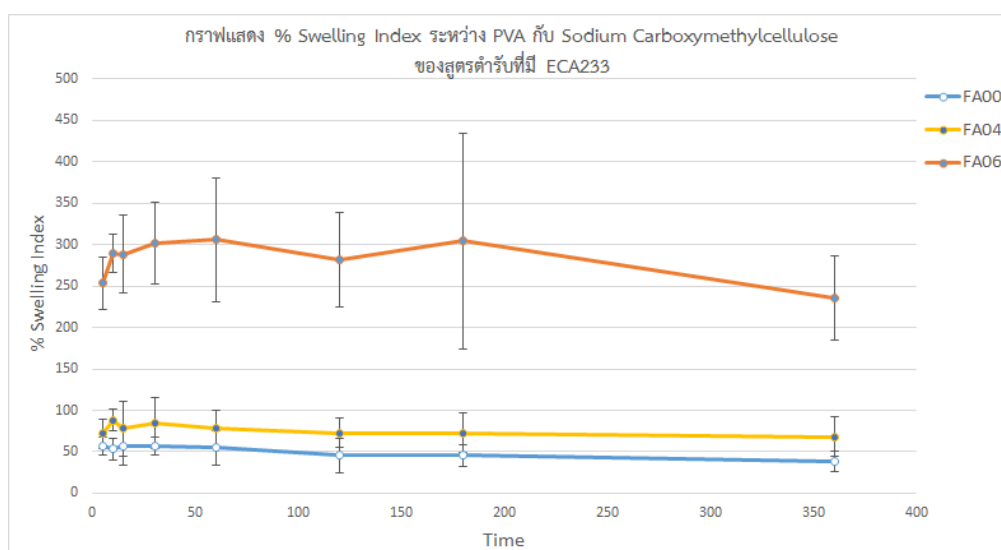
พบว่าเมื่อเปรียบเทียบสูตรของ Sodium alginate 0.5%, 1.0% และ 3.0% ก่อนทำการใส่ยา (F01, F03) เปรียบเทียบกับหลังใส่ยา ECA233 (FA01, FA03) พบว่าเมื่อทำการใส่ยา ECA233 แล้วจะมีค่า % Swelling Index ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ใส่ยา คล้ายกับการทดลองของ K. Kataria ที่ได้ทำการศึกษา Degree of swelling ของ PVA-NaAlg เปรียบเทียบกับ PVA-NaAlg (drug loaded patch) พบว่า % Swelling Index PVA-NaAlg มีค่ามากกว่า PVA-NaAlg (drug loaded patch) แสดงถึงการใส่ยาทำให้ % Swelling Index มีค่าลดลง

ตารางที่ 19 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00, FA04 และ FA06 (n=3)

เวลา (นาที)	Swelling Index (%)		
	FA00	FA04	FA06
5	56.75 ± 11.10	71.71±17.62	253.42±31.90**
10	53.11 ± 12.66	88.31±13.47	289.56±23.06**
15	56.40 ± 22.93	78.30±33.25	288.49±47.17**
30	57.05 ± 11.36	84.35±30.46	302.51±49.42**
60	54.82 ± 20.58	77.82±22.56	306.36±74.85**
120	45.87 ± 20.80	72.80±18.11	282.30±56.45**
180	45.39 ± 12.89	72.75±23.47	304.72±128.96*
360	39.00 ± 12.28	68.19±24.11	235.42±51.05**

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value ≤ 0.01 เมื่อเทียบกับสูตร control (PVA)



ภาพที่ 44 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ SCMC ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)

จากตารางแสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233), F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233 และ FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SCMC มากขึ้นส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวมากขึ้น ดูดซับน้ำมากขึ้น โดยสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) มีการ

พองตัวดีที่สุดใน 60 นาที โดยมี % Swelling Index 306.36 ± 74.85 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 120

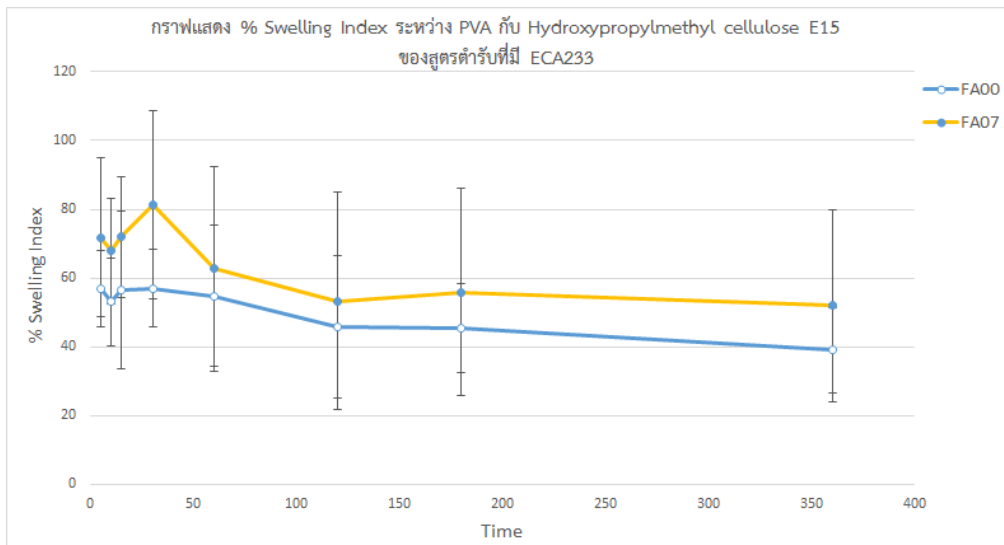
เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) มี % Swelling Index ที่ดีกว่า F04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233) และ F00 (PVA 8% + ECa233) ตามลำดับ

ตารางที่ 20 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 และ FA07 (n=3)

เวลา (นาที)	Swelling Index (%)	
	FA00	FA07
5	56.75 ± 11.10	71.83 ± 23.23
10	53.11 ± 12.66	67.92 ± 15.29
15	56.40 ± 22.93	71.98 ± 17.52
30	57.05 ± 11.36	81.33 ± 27.42
60	54.82 ± 20.58	62.73 ± 29.82
120	45.87 ± 20.80	53.34 ± 31.55
180	45.39 ± 12.89	55.87 ± 30.09
360	39.00 ± 12.28	52.01 ± 27.88

จากตารางแสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) และ FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233) พบว่าสูตร FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233) มีการพองตัวดีกว่ FA00 (PVA 8% + ECa233) และพองตัวดีที่สุดใน 30 นาที โดยมี % Swelling Index 81.33 ± 27.42 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 60

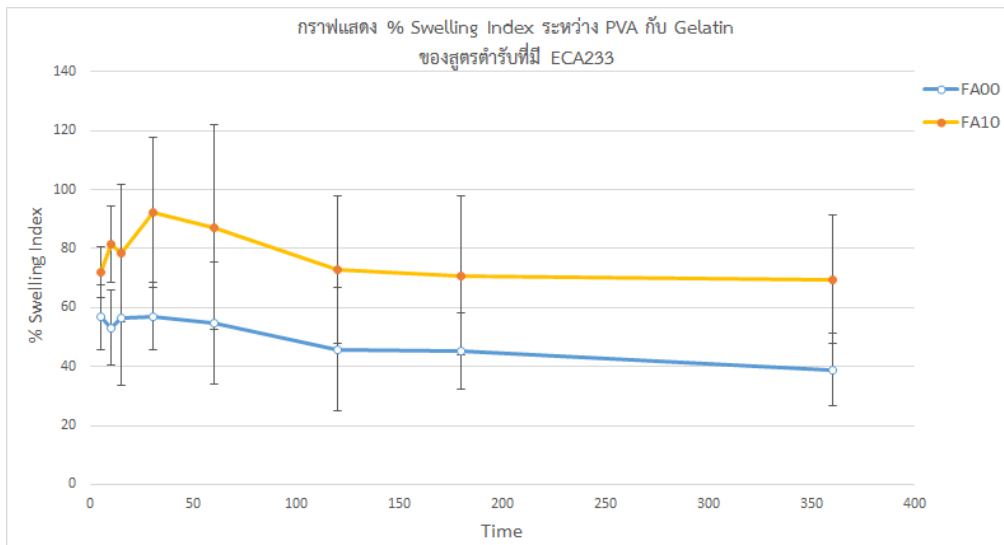
เมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233) มี % Swelling Index ที่ดีกว่า FA00 (PVA 8% + ECa233)



ภาพที่ 45 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ HPMC E15 ของสูตรตำรับที่มี ECA233 (n=3)

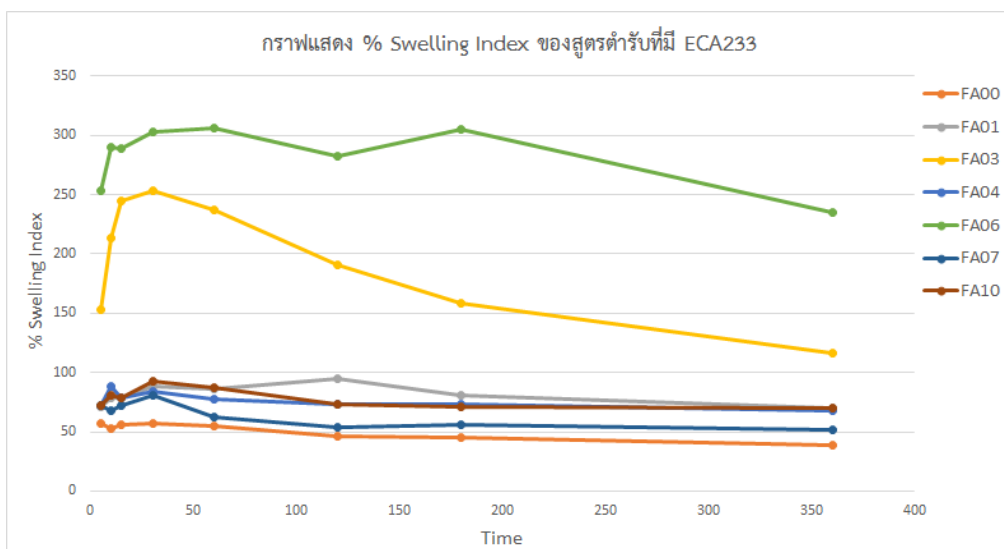
ตารางที่ 21 แสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 และ FA10 (n=3)

นาที	FA00	FA10
5	56.75 ± 11.10	71.99±8.75
10	53.11 ± 12.66	81.32±12.95
15	56.40 ± 22.93	78.37±23.22
30	57.05 ± 11.36	92.19±25.55
60	54.82 ± 20.58	87.30±34.75
120	45.87 ± 20.80	72.80±24.97
180	45.39 ± 12.89	70.87±27.05
360	39.00 ± 12.28	69.64±21.83



ภาพที่ 46 กราฟแสดงผล % Swelling Index ระหว่าง PVA กับ Gelatin ของสูตรตำรับที่มี ECa233 (n=3)

จากตารางแสดงผล % Swelling Index ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233), FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) พบว่า สูตร F10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) มีการพองตัวดีกว่า FA00 (PVA 8% + ECa233) และพองตัวดีที่สุด ณ นาทีที่ 30 โดยมี % Swelling Index 92.19 ± 25.55 และเริ่มกร่อนตัว ณ นาทีที่ 60 โดยเมื่อเรียงลำดับ % Swelling Index พบว่าสูตร FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) มี % Swelling Index ที่ดีกว่า FA00 (PVA 8% + ECa233) ตามลำดับ

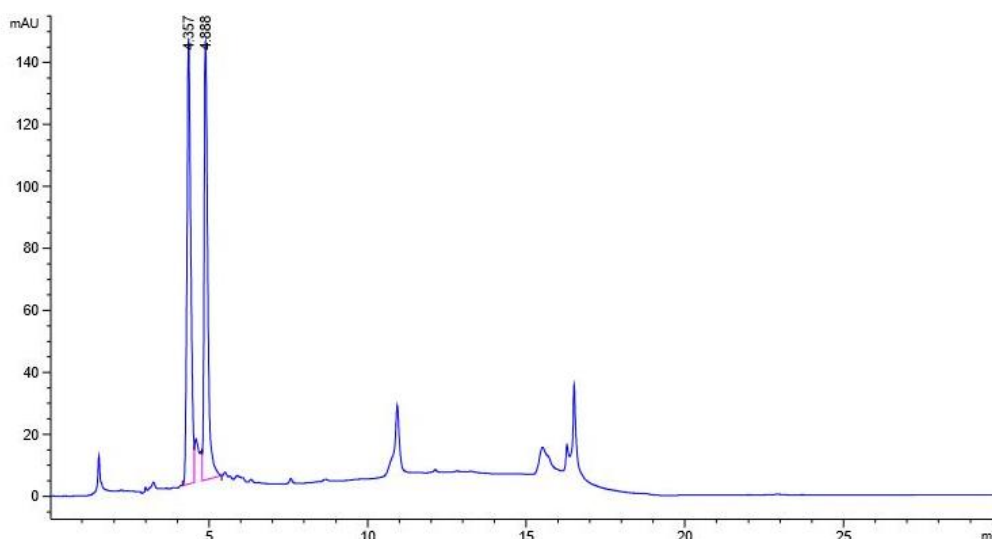


ภาพที่ 47 กราฟแสดงผล % Swelling Index ของแผ่นฟิล์มสูตรที่มีสารสกัด ECa233 เป็นส่วนประกอบ (n=3)

จากรูปที่ 47 สรุปได้ว่าแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของพอลิเมอร์ร่วม (Sodium alginate, SCMC, HPMC E15 และ Gelatin) จะทำให้แผ่นฟิล์มมีความสามารถในการดูดซับน้ำและพองตัว ได้มากกว่าแผ่นฟิล์มที่มีแค่ PVA เพียงอย่างเดียว โดยพบว่า การใช้ SCMC 3.0% มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้มากที่สุด รองลงมาคือ การเพิ่ม Sodium alginate 3.0%

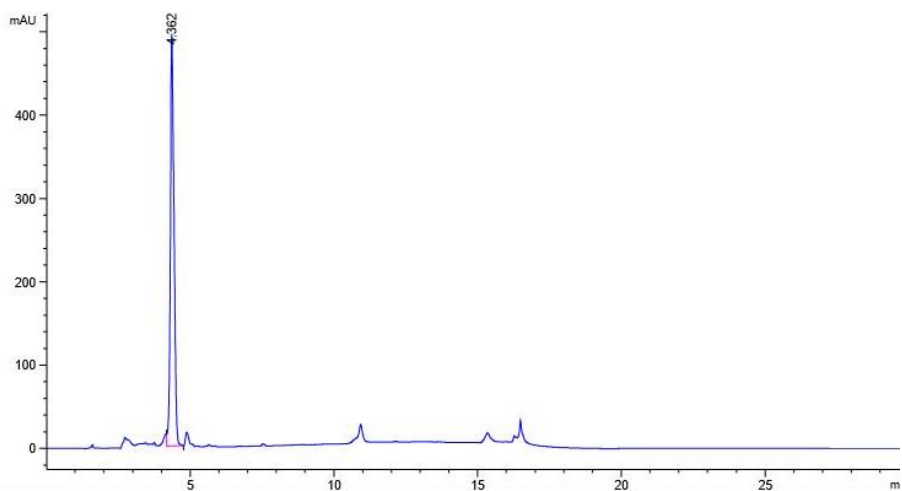
3.5.6 ผลการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดบัวบก ECa233 ของแผ่นฟิล์ม

จากการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัด ECa233 จากแผ่นฟิล์มที่เตรียมทั้ง 7 สูตร ซึ่งในการทดสอบนี้จะศึกษาปริมาณของ Madecassoside และ Asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ โดยจะมีการนำแผ่นฟิล์มใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 พร้อมกับมีการเขย่าตลอดเวลา จากนั้นเก็บตัวอย่างออกมาที่เวลาต่างๆ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งผลที่ได้จะบันทึกเป็นพื้นที่ใต้กราฟ (Area Under the Curve) ของ Madecassoside และ Asiaticoside

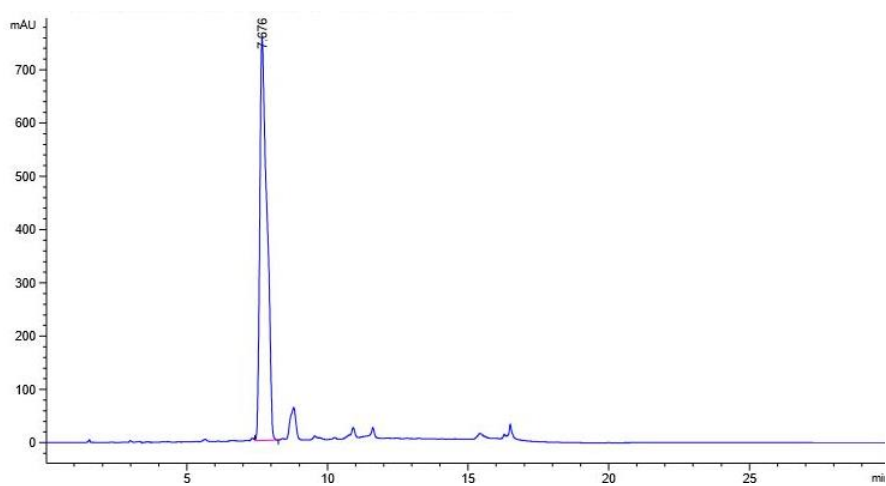


ภาพที่ 48 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของสารสกัดบัวบก ECa233

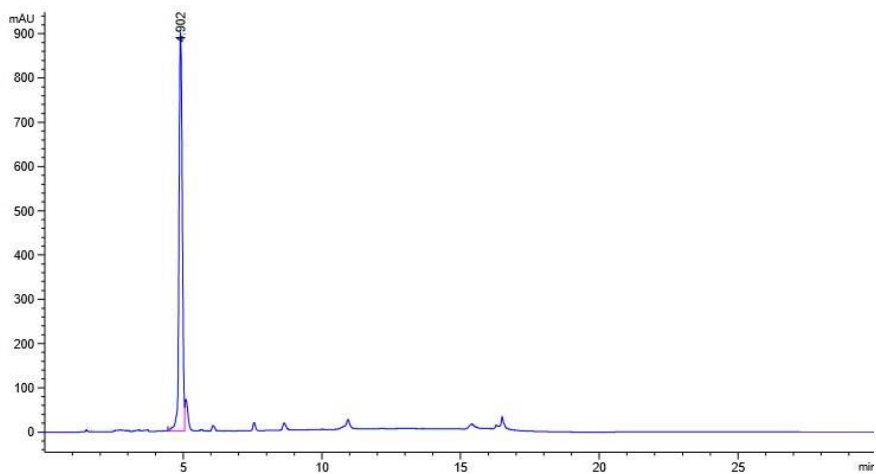
จากรูปข้างต้น พบว่าพีคของ Madecassoside แสดงที่เวลาประมาณ 4.357 นาที ส่วน Asiaticoside แสดงพีคที่เวลาประมาณ 4.888 โดยทั้ง 2 พีค สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน และเมื่อฉีดสาร Standard ของ Madecassoside, Madecasic acid, Asiaticoside และ Asiatic acid แสดงพีคที่จำเพาะดังนี้



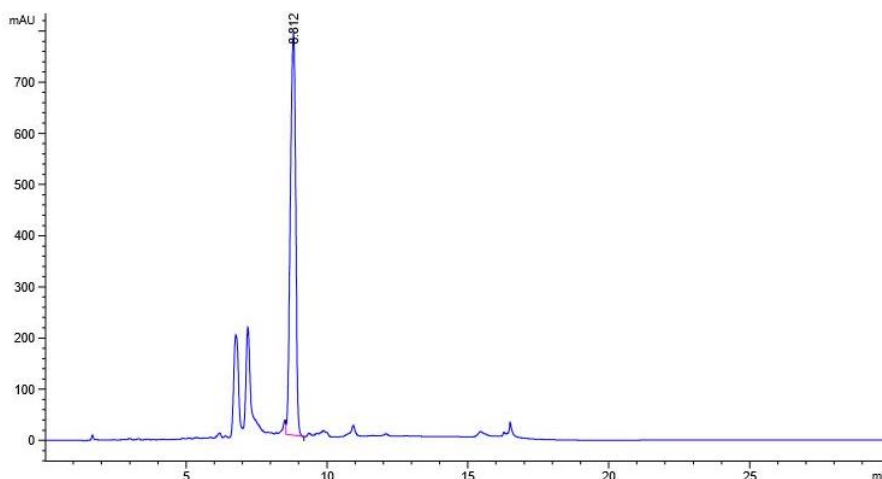
ภาพที่ 49 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Madecassoside



ภาพที่ 50 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Madecasic acid



ภาพที่ 51 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Asiaticoside



ภาพที่ 52 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของ Asiatic acid

ตารางที่ 22 แสดง Retention time ของ Madecassoside, Madecasic acid, Asiaticoside และ Asiatic acid

สาร	เวลา (นาที)
Madecassoside	4.362
Madecasic acid	7.676
Asiaticoside	4.906
Asiatic acid	8.812

โดยแผ่นฟิล์มที่เตรียมทั้ง 7 สูตร เมื่อนำมาวิเคราะห์ ค่าที่ได้จาก HPLC Chromatogram ณ เวลาต่างๆ ที่เก็บสารละลายตัวอย่าง ได้ผลตามตารางดังนี้

ตารางที่ 23 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA00 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	FA00		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	89.0	116.3	92.7
30	121.2	161.2	112.4
60	155.9	202.8	119.9
180	154.9	190.4	113.8
360	166.8	183.6	104.8
720	145.8	164.9	103.6
1440	131.9	159.6	93.3

ตารางที่ 24 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA01 และ FA03 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	FA01			FA03		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	103.2	129.0	115.0	76.4	74.7	113.6
30	151.3	164.7	157.2	115.4	130.3	134.2
60	205.5	170.4	163.6	176.5	177.9	148.7
180	197.1	140.6	145.7	171.6	191.9	147.7
360	186.4	128.6	134.4	154.2	188.9	135.6
720	163.2	113.7	131.8	142.6	164.0	134.9
1440	149.3	106.9	119.9	129.0	162.5	114.3

ตารางที่ 25 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA04 และ FA06 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	FA04			FA06		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	121.6	117.8	120.3	110.2	80.0	73.1
30	166.4	181.1	142.1	154.1	133.4	81.0
60	196.5	184.0	157.4	170.0	151.2	95.9
180	170.5	157.1	156.2	140.0	145.7	99.6
360	151.5	147.1	149.2	118.5	139.8	90.7
720	135.9	131.7	141.5	109.7	126.3	89.1
1440	124.8	116.4	132.6	101.1	124.7	72.8

ตารางที่ 26 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Madecassoside ของสูตร FA07 และ FA10 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	FA07			FA10		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	112.2	109.6	123.7	76.3	101.6	62.5
30	134.0	133.5	141.1	98.4	137.9	111.2
60	168.3	180.2	172.1	156.1	182.1	152.0
180	140.7	190.0	183.4	183.0	184.7	178.6
360	129.4	193.1	173.0	200.1	177.6	159.2
720	116.6	191.6	158.7	181.2	174.5	159.1
1440	107.0	176.1	147.3	167.2	158.0	144.4

เมื่อได้พื้นที่ใต้กราฟของแต่ละเวลา แต่ละตำรับ จะมีการคำนวณกลับไปเป็นปริมาณที่ปลดปล่อยออกมาโดยเทียบกับ Standard Curve ของ Madecassoside ได้ผล % Madecassoside release ดังนี้

ตารางที่ 27 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA00 ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	28.93	47.48	47.09	41.17 ± 10.60
30	47.77	76.75	66.28	63.60 ± 14.68
60	66.89	102.38	73.39	80.89 ± 18.90
180	67.80	97.24	69.09	78.04 ± 16.64
360	73.86	92.82	61.65	76.11 ± 15.70
720	63.58	81.90	60.15	68.54 ± 11.69
1440	55.59	78.05	52.01	61.88 ± 14.11

ตารางที่ 28 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA01 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	26.79	66.23	36.31	43.11 ± 20.58
30	47.19	96.05	57.81	67.02 ± 25.70
60	69.22	101.93	62.11	77.75 ± 21.24
180	67.67	81.77	54.45	67.97 ± 13.66
360	63.36	71.89	48.84	61.36 ± 11.65
720	54.23	61.00	47.30	54.17 ± 6.85
1440	48.25	55.50	41.96	48.57 ± 6.78

ตารางที่ 29 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA03 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	20.91	13.98	51.95	28.95 ± 20.22
30	41.20	33.56	69.31	48.03 ± 18.83
60	71.86	50.84	79.67	67.46 ± 14.91
180	71.85	56.75	79.77	69.46 ± 11.70
360	63.36	56.13	71.96	63.82 ± 7.93
720	57.16	47.78	70.89	58.61 ± 11.62
1440	50.22	46.62	57.65	51.50 ± 5.62

ตารางที่ 30 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA04 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	32.21	46.74	50.51	43.15 ± 9.66
30	51.00	85.20	67.10	67.77 ± 17.11
60	63.19	89.57	76.92	76.56 ± 13.19
180	54.65	74.94	76.93	68.84 ± 12.33
360	47.02	68.28	72.84	62.71 ± 13.78
720	40.83	59.39	68.09	56.10 ± 13.92
1440	36.36	50.32	62.61	49.76 ± 13.13

ตารางที่ 31 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA06 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	43.07	37.86	33.80	38.24 ± 4.65
30	70.88	83.54	43.09	65.84 ± 20.69
60	81.65	101.17	56.05	79.62 ± 22.63
180	65.71	97.91	60.13	74.59 ± 20.40
360	52.45	92.85	52.95	66.08 ± 23.18
720	46.61	81.69	51.02	59.77 ± 19.11
1440	41.44	79.55	37.32	52.77 ± 23.28

ตารางที่ 32 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA07 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	44.37	34.67	45.76	41.60 ± 6.04
30	60.07	48.20	58.15	55.47 ± 6.37
60	80.16	70.08	74.42	74.89 ± 5.06
180	66.31	76.17	81.34	74.61 ± 7.64
360	58.78	77.92	76.57	71.09 ± 10.68
720	51.14	77.36	68.97	65.82 ± 13.39
1440	45.22	70.33	62.67	59.41 ± 12.87

ตารางที่ 33 แสดง % Madecassoside release ของสูตร FA10 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาทีก)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	20.57	32.85	16.67	23.36 ± 8.45
30	32.62	52.76	45.14	43.50 ± 10.17
60	60.60	75.18	70.05	68.61 ± 7.39
180	75.44	78.10	86.69	80.08 ± 5.88
360	84.50	74.82	77.06	78.79 ± 5.06
720	76.25	73.08	76.14	75.15 ± 1.80
1440	68.94	65.10	67.95	67.33 ± 1.99

จากข้อมูล % Madecassoside release ของแต่ละสูตรตำรับที่เวลาต่างๆ พบว่าเมื่อถึงเวลาที่ 180 นาที ปริมาณ Madecassoside ที่ออกมามีปริมาณลดลงจากเวลาก่อนหน้า และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป ดังนั้นข้อมูลของ Asiaticoside จึงเก็บผลถึงนาทีที่ 180 ดังนี้

ตารางที่ 34 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA00 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	FA00		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	74.8	88.5	73.6
30	93.8	122.4	87.4
60	120.7	156.2	93
180	120.4	160.8	98.6

ตารางที่ 35 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA01 และ FA03 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	FA01			FA03		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	76.9	100.5	90.4	57.7	61.2	88.5
30	124	130.8	128.3	95	130.3	112.5
60	165.9	140.2	140.1	146.2	149.6	126.2
180	168.5	125.3	134.6	143.1	170.7	131.8

ตารางที่ 36 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA04 และ FA06 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	FA04			FA06		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	93.8	89.8	91.6	89.4	63.7	58.4
30	129.4	144.7	119.3	122.8	111.2	74.2
60	157.4	159.1	135.5	141.1	128.8	86.4
180	147.4	140	139.5	140.3	130.9	91.2

ตารางที่ 37 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Asiaticoside ของสูตร FA07 และ FA10 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	FA07			FA10		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
15	91.3	86.9	95.5	60.7	69.8	41.3
30	103.3	112.6	120.1	77.8	98.8	78.5
60	133.9	142.2	142.4	112.7	131.6	110.9
180	116.6	161.1	161.8	133	154.6	143.4

เมื่อได้พื้นที่ใต้กราฟของแต่ละเวลา แต่ละตำรับ จะมีการคำนวณกลับไปเป็นปริมาณที่ปลดปล่อยออกมาโดยเทียบกับ Standard Curve ของ Asiaticoside ได้ผล % Asiaticoside release ดังนี้

ตารางที่ 38 แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA00 ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	21.3082	35.1505	37.9967	31.49 ± 8.93
30	32.9656	59.8760	54.3188	49.05 ± 14.21
60	47.8529	83.4779	60.7713	64.03 ± 18.04
180	48.8230	88.1993	66.5924	67.87 ± 19.72

ตารางที่ 39 แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA01 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	18.1572	54.3566	29.9529	34.16 ± 18.46
30	39.6015	83.5177	52.5207	58.55 ± 22.70
60	58.9855	93.2004	60.4148	70.87 ± 19.35
180	61.5119	81.6146	57.9900	67.04 ± 12.75

ตารางที่ 40 แสดง % Asiaticoside ของสูตร FA03 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	12.3703	10.3205	43.4704	22.05 ± 18.58
30	32.9297	37.4833	66.1340	45.52 ± 18.00
60	61.3579	46.9464	78.6209	62.31 ± 15.86
180	61.8805	55.5770	83.9738	67.14 ± 14.91

ตารางที่ 41 แสดง % Asiaticoside ของสูตร FA04 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	33.4418	36.3004	40.9369	36.89 ± 3.78
30	56.0664	74.9978	63.9405	65.00 ± 9.51
60	73.3527	87.2496	77.0568	79.22 ± 7.20
180	69.0043	75.5480	80.8287	75.13 ± 5.92

ตารางที่ 42 แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA06 ที่เวลาต่างๆ

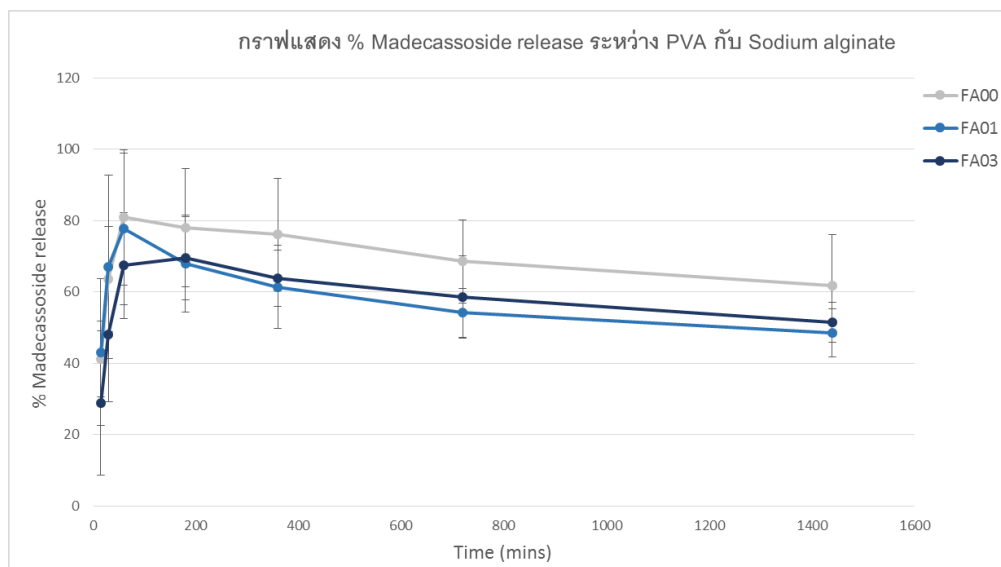
เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	34.6235	28.7784	25.3712	29.59 ± 4.68
30	58.3137	77.2971	43.9126	59.84 ± 16.75
60	71.4497	98.1188	57.9830	75.85 ± 20.43
180	71.8656	101.5320	64.0192	79.14 ± 19.79

ตารางที่ 43 แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA07 ที่เวลาต่างๆ

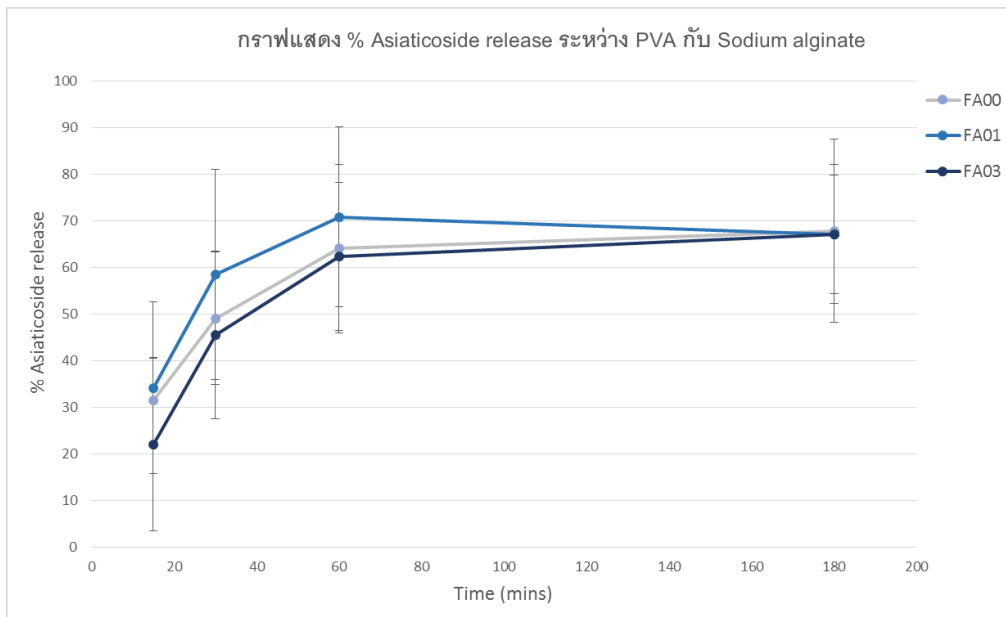
เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	36.8844	27.5302	38.3240	13.51 ± 8.04
30	47.5762	43.1385	56.7500	32.06 ± 7.46
60	67.9350	59.6511	71.9028	53.80 ± 8.21
180	58.3542	70.7450	85.1300	71.21 ± 12.41

ตารางที่ 44 แสดง % Asiaticoside release ของสูตร FA10 ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
15	14.4575	21.0243	5.0270	34.25 ± 5.86
30	24.9160	39.7955	31.4825	49.15 ± 6.94
60	44.6447	60.4911	56.2584	66.50 ± 6.25
180	57.2060	75.5909	80.8353	71.41 ± 13.40



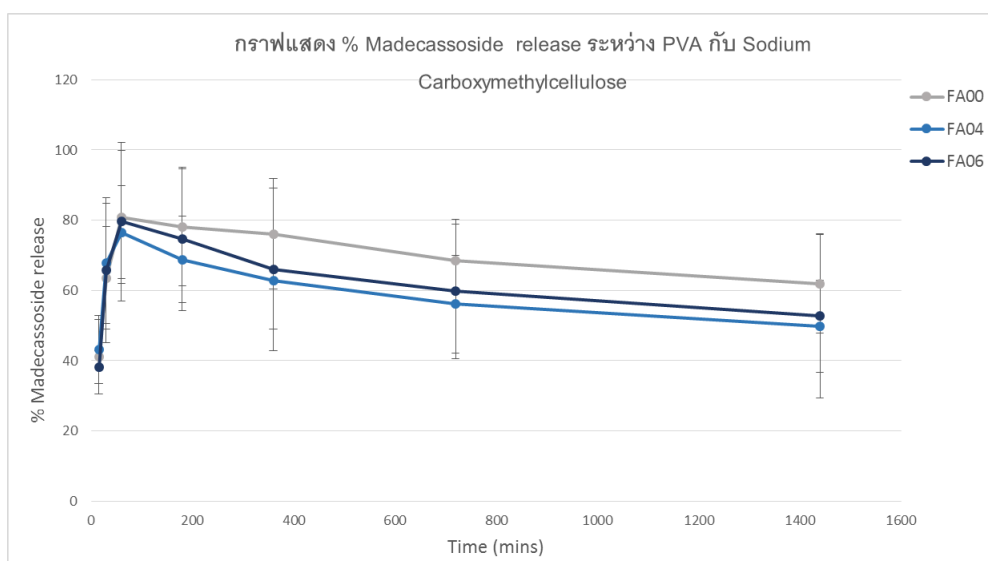
ภาพที่ 53 กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate (n=3)



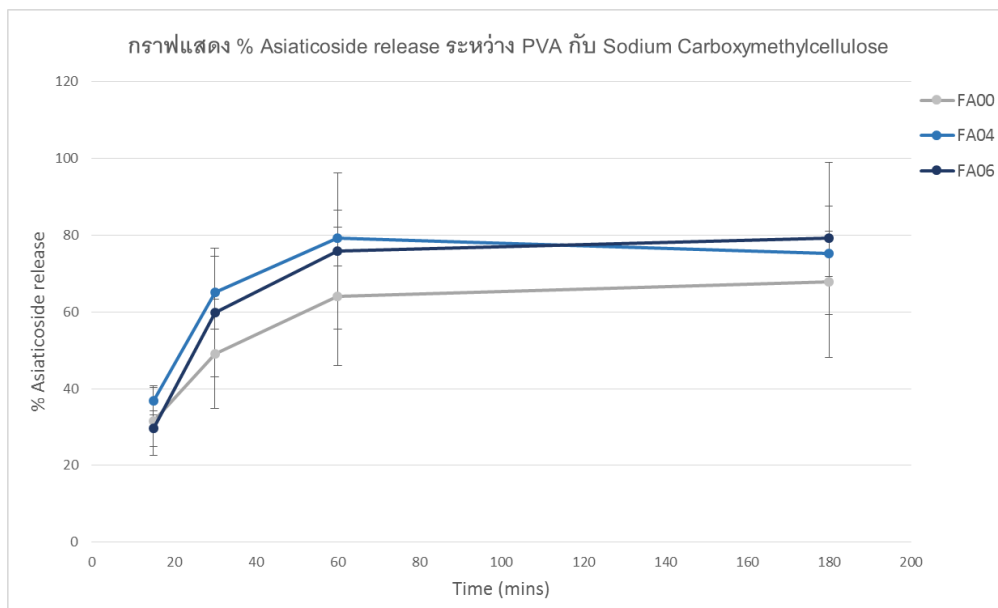
ภาพที่ 54 กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ Sodium alginate (n=3)

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) กับสูตร FA01 (PVA 8% + sodium alginate 0.5% + ECa233) และ FA03 (PVA 8% + sodium alginate 3.0% + ECa233)

พบว่าสูตร FA03 มีการปลดปล่อยยาที่น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ สูตร FA01 และ FA00 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามมีนัยสำคัญ ซึ่งความเข้มข้นยาที่ปลดปล่อยลดลงในช่วงหลัง 60 นาที อาจเกิดจากการสลายตัวของตัวยาสำคัญ โดยสูตร FA03 มีการสลายตัวช้ากว่าสูตร FA01 จึงส่งผลให้มีกราฟแสดงเหมือนสูตร FA03 มีการปลดปล่อยยาได้ดีกว่า FA01 ในช่วงหลังจากเวลา 120 นาทีเป็นต้นไป



ภาพที่ 55 กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ SCMC



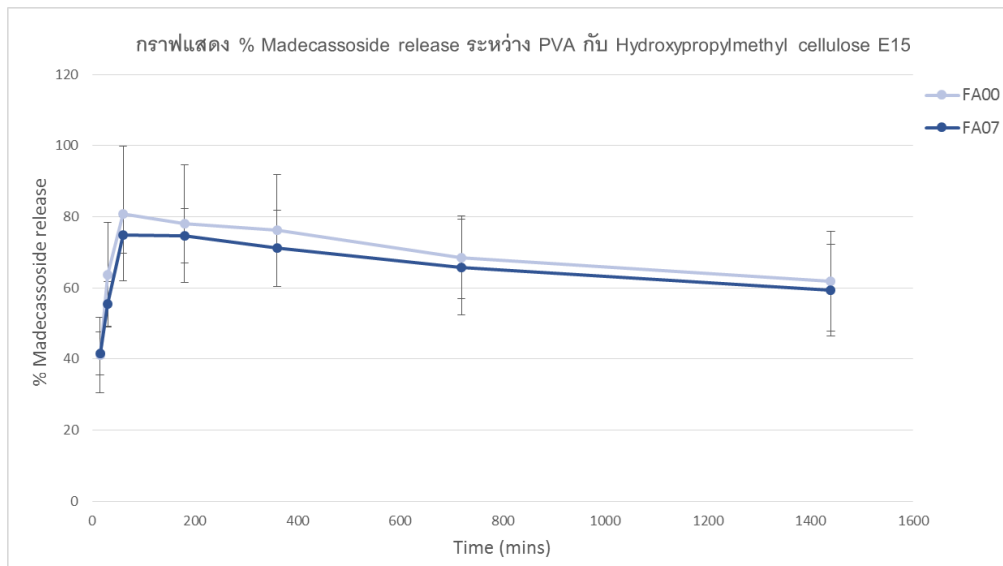
ภาพที่ 56 กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ SCMC (n=3)

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) กับสูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233) และ FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233)

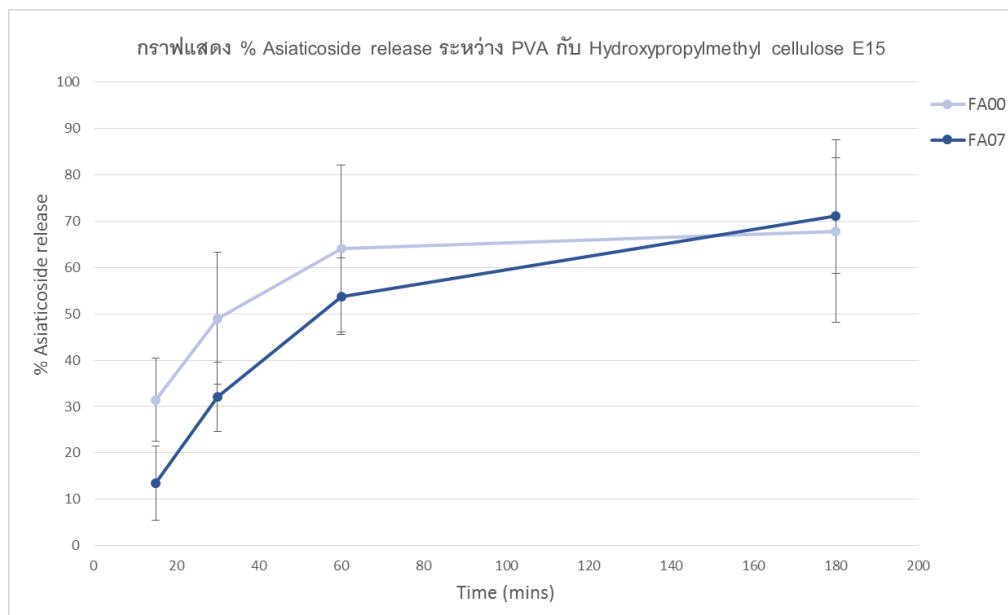
พบว่าสูตร FA04 มีการปลดปล่อยยาที่น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ สูตร FA06 และ FA00 ตามลำดับ อย่างไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งความเข้มข้นของตัวยาสำคัญ ที่ปลดปล่อยลดลงในช่วงหลัง 60 นาที อาจเกิดจากการสลายตัวของตัวยาสำคัญ

จากภาพที่ 57 และ 58 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) กับสูตร FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233)

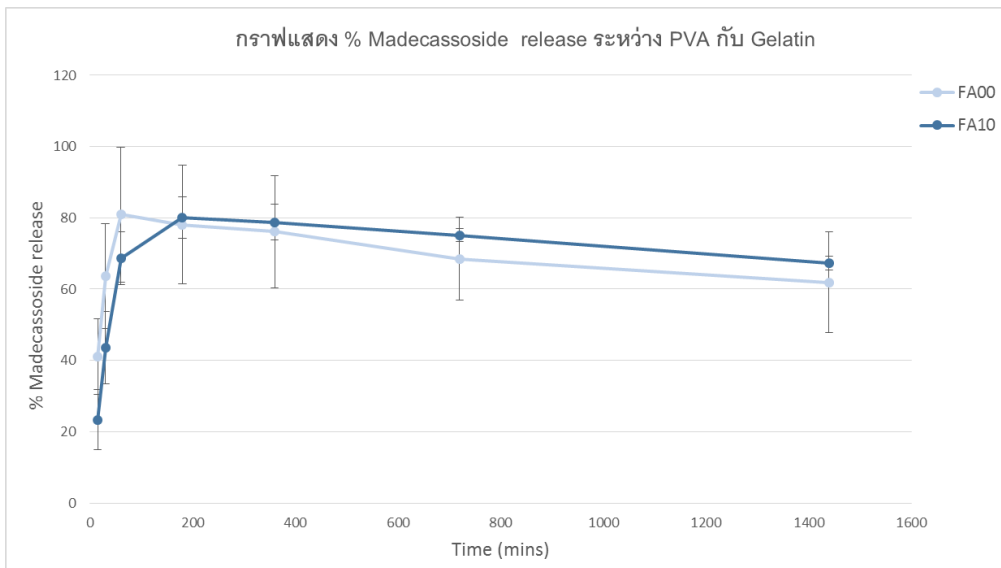
พบว่า การปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA07 ลดลงเล็กน้อย ซึ่งความเข้มข้นของตัวยาสำคัญ ที่ปลดปล่อยลดลงในช่วงหลัง 60 นาที อาจเกิดจากการสลายตัวของสารตัวยาสำคัญ



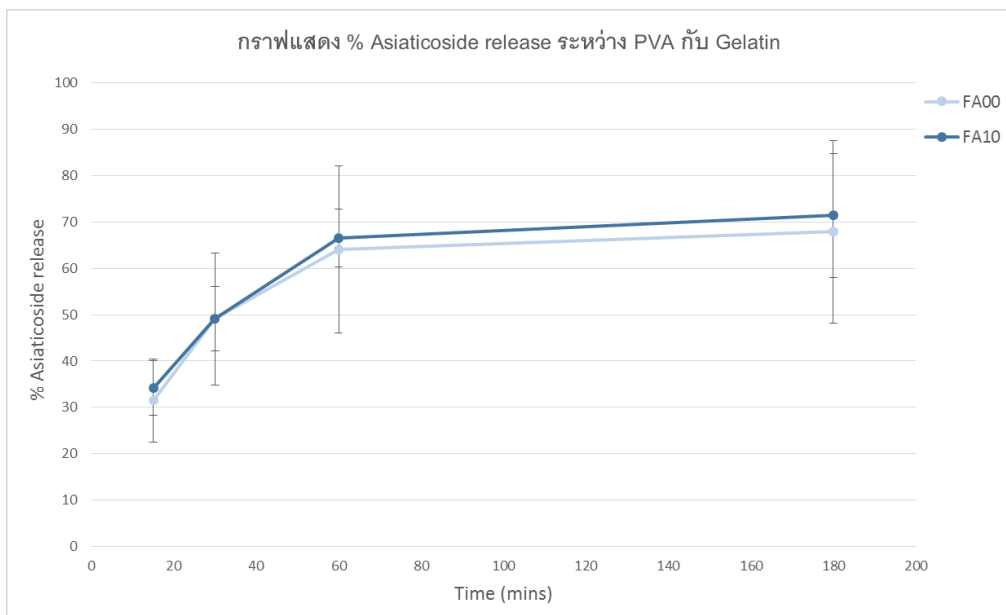
ภาพที่ 57 กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ HPMC E15 (n=3)



ภาพที่ 58 กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ HPMC E15(n=3)



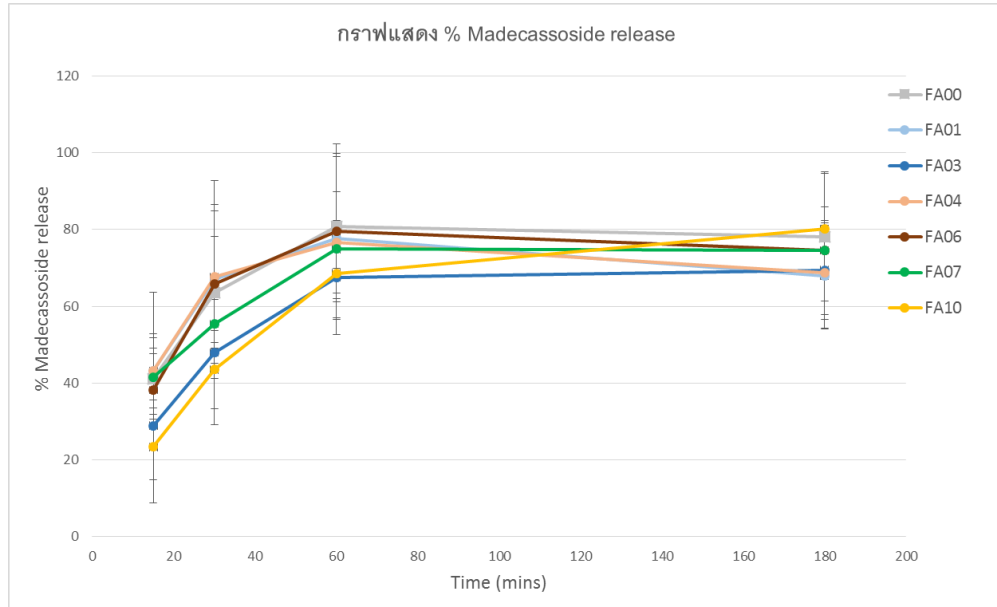
ภาพที่ 59 กราฟแสดงผล % Madecassoside release ระหว่าง PVA กับ Gelatin (n=3)



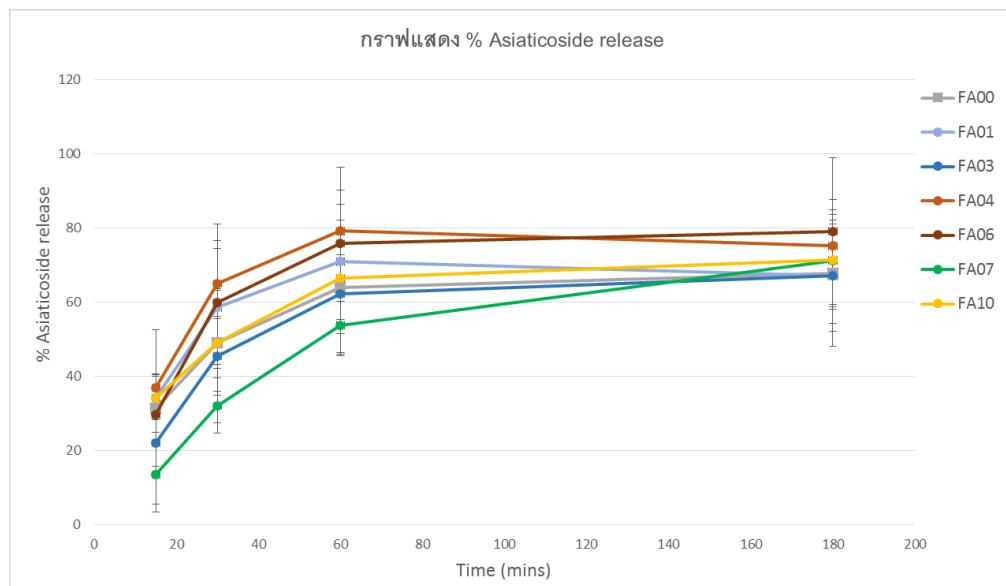
ภาพที่ 60 กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ระหว่าง PVA กับ Gelatin (n=3)

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) กับสูตร FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233)

พบว่า การปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ของสูตร FA10 ลดลงเล็กน้อย แต่สลายตัวช้ากว่าสูตร FA00 ซึ่งความเข้มข้นของตัวยาสำคัญ ที่ปลดปล่อยลดลงในช่วงหลัง 60 นาที อาจเกิดจากการสลายตัวของตัวยาสำคัญ



ภาพที่ 61 กราฟแสดงผล % Madecassoside release ของแผ่นฟิล์มที่มีสารสกัด ECa233 ที่ระยะเวลา 15 ถึง 180 นาที (n=3)



ภาพที่ 62 กราฟแสดงผล % Asiaticoside release ของแผ่นฟิล์มที่มีสารสกัด ECa233 ที่ระยะเวลา 15 ถึง 180 นาที (n=3)

จากกราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยตัวยาสำคัญของแต่ละสูตร พบว่า สูตร FA06 และ FA10 สามารถปลดปล่อยยา ได้ถึง 80% โดยเทียบเท่ากับ สูตร FA00 แต่ FA10 มีคุณสมบัติที่ค่อยๆปลดปล่อยตัวยา จึงสรุปได้ว่า การเพิ่ม Gelatin ลงในการเตรียมแผ่นฟิล์มจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติให้แผ่นฟิล์มค่อยๆปลดปล่อยตัวยาได้

ส่วนการเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ สูตร FA01 FA03 FA04 FA06 และ FA07 พบว่าให้ผลปลดปล่อยตัวยาออกมาได้ช้ากว่า และน้อยกว่า สูตร FA00 จึงสรุปได้ว่าการเติม Sodium alginate, SCMC หรือ HPMC E15 จะส่งผลให้แผ่นฟิล์มค่อยๆปลดปล่อยยาได้ช้าและลดลง เมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ PVA เพียงตัวเดียว

จากการวิเคราะห์โดยใช้สถิติพบว่าผลที่ได้ของแต่ละสูตร ในแต่ละเวลา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณการปลดปล่อยยาในแต่ละสูตรไม่แตกต่างกันมาก และการทดลองมีความแปรปรวนจากเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์

โดยจากรูปที่ 66 แสดงกราฟ % Drug release จะเริ่มเห็นได้ว่าเมื่อเวลาประมาณ 60 นาทีขึ้นไป ปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมามีค่าลดลง ซึ่งในการทดลองในครั้งนี้ได้มีการทดสอบเพิ่มเติม พบว่าสารสกัด ECa233 มีการสลายตัวเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ อาจเนื่องมาจากใช้เวลานานระหว่างรอการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.5.7 ผลการศึกษาความคงตัวของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารสกัด ECa233

ลักษณะทางกายภาพความใสมีการเปลี่ยนแปลงลดลง แต่ในส่วนของความเรียบเนียนยังคงเหมือนเดิม มีการดูความชื้น ส่งผลให้เกิดการเยิ้มเหลวบนแผ่นฟิล์มซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละสูตร โดยสูตร FA00 (PVA 8% + ECa233) เป็นสูตรที่มีความเยิ้มเหลวมากที่สุด ซึ่งมากกว่าสูตร FA07 (PVA 8% + HPMC E15 0.5% + ECa233) และ สูตร FA10 (PVA 8% + Gelatin 0.5% + ECa233) ตามลำดับ

สูตร FA01 (PVA 8% + Sodium alginate 0.5% + ECa233) มีการเยิ้มเหลวใกล้เคียงกับสูตร FA07 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร FA03 (PVA 8% + Sodium alginate 3.0% + ECa233) พบว่า FA03 มีการเยิ้มเหลวลดลงอย่างเห็นได้ชัด

สูตร FA04 (PVA 8% + SCMC 0.5% + ECa233) มีการเยิ้มเหลวใกล้เคียงกับสูตร FA10 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233) พบว่า FA06 มีการเยิ้มเหลวลดลงอย่างชัดเจน

แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มพอลิเมอร์ที่สูงขึ้น ส่งผลให้มีการเยิ้มเหลวลดลง และ สูตรที่มีการเติม SCMC เป็นสูตรที่มีการเยิ้มเหลวน้อยที่สุดโดยเฉพาะสูตร FA06 (PVA 8% + SCMC 3.0% + ECa233)

เมื่อดูประกอบกับ การวิเคราะห์ Loss on drying (LOD) พบว่า เมื่อเติมพอลิเมอร์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.5%) จะส่งผลให้มีการดูความชื้นมากขึ้นเมื่อเทียบกับ PVA แต่

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์มากขึ้น (1.0% และ 3.0%) การดูดความชื้นจะลดลง ส่วนการใส่ยาไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงการดูดความชื้นในพอลิเมอร์ทุกชนิด

อย่างไรก็ตามการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมอาจต้องมีการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมที่สามารถป้องกันความชื้นได้

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ถูกทดสอบทั้งในหลอดทดลองและในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 รวมทั้งกลไกในการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ โดยทดสอบผลของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง และสกัดผักชีลาว

ผลของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง

สารสกัดชั้นจากชั้นโรงสายพันธุ์ขุนเงินนั้น ได้ถูกทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบและในครั้งนี้ ได้ยืนยันผลการต้านการอักเสบในระดับเซลล์โดยการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) และส่งผลกระทบต่อระดับ pro-inflammatory cytokines ได้ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารประกอบบริสุทธิ์ α -mangostin ที่เป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์หลักแล้วนั้น พบว่าสารสกัดชั้นจากชั้นโรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง NO ได้มากกว่าถึง 5 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่มาจากองค์ประกอบโดยรวมของสารสกัด ดังนั้น แนวทางในการพัฒนาต่อไป สามารถทำได้หลายทิศทาง ได้แก่ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลเช่นเดียวกับสารสกัดจากผักชีลาว ทำการสกัดสารมาตรฐานจากชั้นของชั้นโรงเพื่อนำไปศึกษาต่อได้อย่างกว้างขวางและเป็นมาตรฐานเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์สารสกัดชั้นจากชั้นโรง พัฒนาสูตรตำรับที่ใช้ในทางยาและเวชสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำไปพัฒนาต่อในการเตรียมแผ่นแปะผิวหนังเช่นเดียวกับสารสกัดมาตรฐาน ECa 233 เป็นต้น

ผลของสารสกัดผักชีลาว

ตัวอย่างผักชีลาวถูกเก็บแยกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ราก (Root, Rt) และลำต้นเหนือดิน (Aerial, Ar) และสกัดด้วยตัวทำละลายจนได้เป็นสารสกัดทั้งหมด 6 fractions ได้แก่ Rt Et, Rt Et/Et, Rt Et/Pet, Ar Et, Ar Et/Et, Ar Et/Pet และนำมาทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง พบฤทธิ์ในส่วนของ Rt Et/Pet, Ar Et และ Ar Et/Pet แต่ฤทธิ์ไม่สูงนัก และหลังทดสอบในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 พบว่าสารสกัดในส่วนของรากนั้น มีพิษต่อเซลล์สูง จึงทำการศึกษาต่อเฉพาะในส่วนของลำต้นเหนือดิน ซึ่งผลที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลการทดลองในหลอดทดลอง ที่สารสกัด Ar Et/Pet ซึ่งมีฤทธิ์สูงสุดนั้น สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ และสามารถลดระดับ pro-inflammatory cytokines ที่สร้างมาจากเซลล์ได้ จากนั้น จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมกลไกการสร้าง NO ของเซลล์ พบว่า มีการยับยั้งการแสดงออกของ *iNOS* gene จึงสรุปได้ว่า สารสกัดผักชีลาว มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในระดับเซลล์ ผ่านกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ด้วยการยับยั้งการแสดงออกของ *iNOS* gene นั้นเอง

4.2 การพัฒนาและประเมินตำรับแผ่นแปะผิวหนัง

สารที่เลือกนำมาพัฒนาตำรับแผ่นแปะผิวหนัง คือ สารสกัดมาตรฐานจากบัวบก ECa233 ซึ่งมีรายงานฤทธิ์และความปลอดภัย พร้อมทั้งการใช้ตัวอย่างแพร่หลายทั้งทางอายุรเวชและภูมิปัญญาชาวบ้าน

ลักษณะทางกายภาพ

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพพบว่าสูตรที่มีการเติม HPMC มีความใส และเรียบเนียนมากที่สุด แต่ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 3.0% เกิดความไม่เข้ากัน พอลิเมอร์จับกันเป็นก้อนทั่วแผ่นฟิล์ม สูตรที่มีการเติม Gelatin เป็นสูตรที่มีความใสมาก แต่มีความเรียบเนียนต่ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Gelatin พบว่ามีความใส และความเรียบเนียนมากขึ้น แต่ Gelatin ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 3.0% เกิดการรวมตัวของพอลิเมอร์ที่ตรงกลาง Petri dish ซึ่งอาจเกิดจากอัตราส่วนที่เพิ่มมากขึ้น หรืออุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสม ดังนั้นการพัฒนาสูตรตำรับในอนาคต อาจปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสม ส่วนสูตรที่มีการเติม Sodium alginate และ SCMC เป็นสูตรที่มีความใสต่ำ แต่มีความเรียบเนียนและมีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sodium alginate และ SCMC พบว่ามีความใส และความเรียบเนียนลดลง ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sodium alginate และ SCMC จนถึง 3.0% ส่งผลให้สารละลายขณะเตรียม มีความหนืดมาก จึงเกิดฟองอากาศในแผ่นฟิล์ม ส่งผลให้การประเมินมีการแปรปรวน แต่อย่างไรก็ตาม ในทางอุตสาหกรรม จะมีวิธีแก้ปัญหาเรื่องการเตรียมแล้วเกิดฟองได้ เมื่อผสมสารสกัด ECa233 พบว่าความใส ความเรียบเนียน และความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีความเปลี่ยนแปลงแต่สีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะสีของ ECa233

ความเข้ากันของตำรับ

เมื่อวิเคราะห์ความเข้ากันของตำรับด้วยเครื่อง FTIR และ DSC พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสมต่างๆ ไม่มี functional group Tm Td ที่แตกต่างจากเดิม จึงสรุปได้ว่าตำรับแผ่นฟิล์มแต่ละสูตรนั้น ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน

ความต้านทานแรงดึง

Tensile strength: เมื่อมีการผสมพอลิเมอร์ต่างๆร่วมกับ PVA ส่งผลให้มีความต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้น และมีคุณสมบัติต้านทานแรงดึงได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.0% ยกเว้น Gelatin ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น แผ่นฟิล์มที่ได้จะมีคุณสมบัติต้านทานแรงดึงได้มากขึ้นในแนวโน้มที่เป็นเส้นตรง โดยหลังใส่สารสกัด ECa233 พบว่า พอลิเมอร์ที่เป็นสูตร Gelatin และ HPMC มีค่า Tensile strength เพิ่มขึ้น แสดงว่ามีความต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้น

Elongation at break: พบว่าการเติมพอลิเมอร์ต่างๆร่วมกับ PVA ส่งผลให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ยกเว้น Gelatin 0.5% ที่มีความยืดหยุ่นลดลง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นความยืดหยุ่นจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้น 1.0% นั้นให้ความยืดหยุ่นดีที่สุด และหลังใส่สารสกัด ECa233 พบว่าทุกพอลิเมอร์มีค่าความยืดหยุ่นลดลง ยกเว้น Gelatin ที่มีค่าเพิ่มมากขึ้น

Young's modulus: การเติมพอลิเมอร์ Sodium alginate และ Gelatin ในปริมาณน้อย ส่งผลให้แผ่นฟิล์มทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้น้อยลงเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจนถึง 3.0% แผ่นฟิล์มจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้สูงขึ้น แต่สูตร SCMC พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 3.0% ส่งผลให้แผ่นฟิล์มทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้น้อยลง และหลังใส่สารสกัด ECa233 พบว่าพอลิเมอร์ Sodium alginate มีค่าการทนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากขึ้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาในหัวข้อนี้ มีความแปรปรวนของเครื่องมือ แผ่นฟิล์มที่ทดสอบไม่ขาดตรงกลาง ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติม ควรประเมิน 3 ครั้งในเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ความสามารถในการดูดซับน้ำและพองตัว

จากการศึกษาการดูดซับน้ำ พบว่าพอลิเมอร์สูตรผสมที่มีเปอร์เซ็นต์การพองตัวสูงที่สุดคือ Sodium alginate และ SCMC โดย Sodium alginate มีอัตราการพองตัวและกร่อนตัวได้เร็ว แต่ SCMC มีอัตราการพองตัวและการกร่อนที่ช้ากว่า โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นในพอลิเมอร์ทุกชนิด จะส่งผลให้มีการพองตัวดีขึ้น สำหรับแผ่นฟิล์มที่มีการผสมสารสกัด ECa233 พบว่าแนวโน้มของการพองตัวยังคงเหมือนเดิม โดยพอลิเมอร์ที่มีการพองตัวสูงที่สุดคือ SCMC แต่พบว่าค่า % Swelling Index ลดลงในพอลิเมอร์ทุกชนิด ดังนั้น SCMC อาจเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาต่อ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับหนองในอนาคตได้

การปลดปล่อยสารสกัดบัวบก ECa233 จากวัสดุปิดแผล

จากการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัด ECa233 พบว่าการเพิ่ม Gelatin ในแผ่นฟิล์มจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติชะลอการปลดปล่อยตัวยาได้ โดยยังสามารถปลดปล่อยยาได้สูงสุดเทียบเท่ากับ PVA การเติม HPMC E15 จะส่งผลให้แผ่นฟิล์มค่อยๆปลดปล่อยยา แต่การปลดปล่อยยาสูงสุด (Cmax) ลดลง การเติม Sodium alginate และ SCMC ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่งผลให้ยาปลดปล่อยได้ช้าลง และปลดปล่อยยาสูงสุด (Cmax) ลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับ PVA แต่ SCMC ที่ความเข้มข้น 3.0% การปลดปล่อยยานั้นใกล้เคียงกับ PVA อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ พบว่าผลการปลดปล่อยยาที่ได้แต่ละสูตร แต่เวลา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณการปลดปล่อยยาในแต่ละสูตรไม่แตกต่างกันมาก การทดลองมีความแปรปรวนจากเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ รวมถึงปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมามีค่าลดต่ำลง ซึ่งในการทดลองในครั้งนี้ได้มีการทดสอบเพิ่มเติม พบว่าตัวยามีการสลายตัวเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ อาจเนื่องมาจากกระบวนการวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง HPLC ต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์ สาร ECa233 อาจสลายตัวในระหว่างรอการตรวจวิเคราะห์

ความคงตัวของแผ่นฟิล์มที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อเติมพอลิเมอร์ร่วมที่ความเข้มข้นต่ำ จะส่งผลให้มีการดูดความชื้นมากขึ้นเมื่อเทียบกับ PVA แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์ร่วมมากขึ้นการดูดความชื้นจะลดลง โดยสูตร SCMC 3.0% มีการดูดความชื้นที่ใกล้เคียงกับ PVA และมีการเยิ้มเหลวน้อยที่สุด ซึ่งการใส่ยาไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงการดูดความชื้นในพอลิเมอร์ทุกชนิด

บทที่ 5

ผลผลิต

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ
อยู่ในระหว่างการรอตีพิมพ์

5.2 การจดสิทธิบัตร

อยู่ในระหว่างการเตรียมยื่นขอจดอนุสิทธิบัตรการออกแบบแผ่นแปะผิวหนังที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากใบบัวบก

5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์

ไม่มี

5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ

มีการเผยแพร่รูปแบบการนำเสนอแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The 11th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2019 (NEPhReC2019) ชื่อเรื่อง Screening of selected Eastern Thai herbs usage in traditional medicine remedies on inhibition of nitric oxide production-related anti-inflammation and cytotoxic effects in cholangiocarcinoma cell line ณ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม วันที่ 16-17 มีนาคม พ.ศ. 2562

บรรณานุกรม

- ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec). Differential Scanning Calorimetry (DSC) [Online]. 2017 [Cite 2017 Nov 5]; Available from: https://www2.nanotec.or.th/th/?page_id=559.
- ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [Online]. 2017 [Cite 2017 Nov 10]; [Available from: http://science.skru.ac.th/ShowToolCame.php?id_skru=skru1234567890].
- ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) [Online]. 2016 [Cite 2017 Nov 5]; Available from: <http://science.buu.ac.th/part/mc/index.php/service-tools/sem.html>
- Akbulut M, Ozcan MM, Coklar H. Evaluation of antioxidant activity, phenolic, mineral contents and some physicochemical properties of several pine honeys collected from Western Anatolia. *Int J Food Sci Nutr*. 2009 Nov;60(7):577-89.
- Aharony D. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *American Journal of Respiratory Critical Care and Medicines*. 1998;15:S214-9.
- Al-snafi AE. The pharmacological importance of *Anethum graveolens*: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(4): p.1-13.
- Bagad AS, Joseph JA, Bhaskaran N, Agarwal A. Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of *Curcuma longa*. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013;2013:805756.
- Bianchia SE, Borges de Souza KC, et al,. Evaluation of the Solubility of the HPMC/PVA Blends in Biological Fluids in vitro. *Materials Research*. 2011;14(2):166-71.
- Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Chuang C, Overman A, Martinez K, Kennedy A, McIntosh M. Xanthones from mangosteen Inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *The Journal of Nutrition*. 2010;140:842-7.
- Bylka W, Znajdek-Awizen P, Studzinska-Sroka E, Brzezinska M. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013;30(1):46-9.
- Chen L, Yang L, Wang C. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia*

- mangostana. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):688-93.
- Chivapat S, Chavalittumrong P, Tantisira MH. Acute and sub-chronic toxicity studies of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233. *Thai Journal Pharmaceutical Science*. 2011;35:55-64.
- Christopher A. Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W. Dominy, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*. 1997;23:3-25.
- Costa G, Ferreira JP, Vitorino C, Pina ME, Sousa JJ, Figueiredo IV, et al. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;178:222-8.
- Dechayont B, Ruamdee P, Poonnaimuang S, Mokmued K, Chunthornng-Orn J. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth 2017. 1-6 p.
- Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering CU. Fourier Transform InfraRed Spectrometer [Online]. 2017 [Cite 2017 Nov 10]; Available from: <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/fourier-transform-infrared-spectrometer>.
- Dong L, Zhang Y, Wang X, Dong Y-x, Zheng L, Li Y-j, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of ethanol fraction from *Periploca forrestii* Schltr. Lin Emran T. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Leaf extract of *Crinum asiaticum* 2012. 5553-6 p.
- Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. Coumarin Schiff-bases: As Antioxidant and Possibly Anti-inflammatory Agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2006;21(2):157-61.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem*. 2002;9;50(21):5870-7.
- Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;16;41(4):1220-34.
- Greaves MW. Anti-inflammatory action of corticosteroids. *Postgraduate of Medical*

- Journal. 1976;52:631-3.
- Gutierrez-Orozco F, Chitchumroonchokchai C, Lesinski GB, Suksamrarn S, Failla ML. **α**-Mangostin: Anti-Inflammatory activity and metabolism by human cell. Journal of Agricultural and Food Chemistry. . 2013;61(16):3891–900.
- Jana S and Shekhawat GS. Anethum graveolens: An Indian traditional medicinal herb and spice. Pharmacognosy Review. 2010;4(8):179–84.
- Kataria K, Gupta A, Rath G, Mathur RB, Dhakate SR. In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. Int J Pharm. 2014;469(1):102-10.
- Kazemi M. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of Achillea millefolium L., Anethum graveolens L., and Carum copticum L. essential oils. Journal of Herbal Medicine. 2015;5(4):217-22.
- Khalil I, Moniruzzaman M, Boukraa L, Benhanifia M, Islam A, Islam N, et al. Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. Molecules. 2012;17(9):11199-215.
- Kumar JM, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and Repair. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Ninth Edition ed. Saunders: an imprint of Elsevier Inc.; 2015. p. 69-111.
- LC and Chou CJ. Immunomodulatory Principles of Dichrocephala bicolor. Journal of natural products 1999;62:405–8.
- Chinese Journal of Integrative Medicine. 2017:1-7.
- Lee HJ, Hyun E-A, Yoon WJ, Kim BH, Rhee MH, Kang HK, et al. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Cinnamomum camphora extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2006;103(2):208-16.
- Manzuoerha R, Farahpourb MR, Oryanc A, Sonboli A. Effectiveness of topical administration of Anethum graveolens essential oil on MRSA-infected wounds.
- Naseria M, Mojab F, Khodadoosta M, Kamalinejad M, Davatic A, Choopanid R, Hasheminejada A, Bararpoo Z, Shariatpanahic S, Emtiazy M. The study of anti-inflammatory activity of oil-based dill (Anethum graveolens L.) extract used topically in formalin-induced inflammation male rat paw. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2012;11(4):1169-74.
- Mallikadevi T, Paulsamy S., Karthika, K. and Jamuna, S. . In vitro and in vivo anti-

- inflammatory activity of whole plant methanolic extract of *Mukia maderaspatana* (L.) M.Roem. (Cucurbitaceae). *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012;4:435-9.
- Mendes AC, Gorzelanny C, Halter N, Schneider SW, Chronakis IS. Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery. *Int J Pharm*. 2016;510(1):48-56.
- METTLER TOLEDO. เครื่องวัดความชื้น 2017 [Online]. 2017 [Cite 2017 Sep 9]; Available from: <https://www.mt.com/th/th/home/library/FAQ/laboratory-weighing/what-is-a-moisture-analyzer.html>.
- Okada S, Zhang H, Hatano M, Tokuhisa T. A Physiologic role of Bcl-xL induced in activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 1998;160:2590–6. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1650–65.
- Payahoo L, Ostradahimi A, Mobasser M, Bishak YK, Jafarabadi MA, Mahdavi AB, Mahluji S. *Anethum graveolens* L. supplementation has anti-inflammatory effect in type 2 diabetic patients. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 2014;13(3):461-5.
- Pharmaceutical Guideline. Loss on drying 2016-2017 [Online]. 2017 [Cite 2017 Sep 9]; Available from: <http://www.pharmaguideline.com/2011/08/what-is-loss-on-drying-and.html?m=1>.
- Prabhu P, Shah S, Gundad S. Formulation development and investigation of domperidone transdermal patches. *Int J Pharm Investigation*. 2011;1(4):240-6.
- Qiang Hou ML, Yan-Hua Lu, Dong-Hong Liu, Cheng-Cun Li. Burn wound healing properties of asiaticoside and madecassoside. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016;12(3):1269–74.
- Rainford KD. Chapter 1 Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*. R. E. Harris (ed.): an imprint of Springer; 2007. P. 3–27.
- Robinson JR and Lee VHL. *Controlled Drug Delivery*. 2nd edition. New York: MARCEL DEKKER; 1987.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 9th edition. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2009.

- Samud AM, Asmawi MZ, Sharma JN, Yusof AP. Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* plant and its effect on bradykinin-induced contractions on isolated uterus. *Immunopharmacology*. 1999;43(2-3):311-6.
- Sanlı O, Isiklan N. Release characteristics of diclofenac sodium from poly(vinyl alcohol)/sodium alginate and poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide)/sodium alginate blend beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;65:204-14.
- Sarath chandran C, Vipin KV, Ann Rose Augusthy, Shahin Muhammed TK. Effectiveness of Sodium CMC as a Polymer for the Development of Transdermal Patches Containing Paracetamol IP in Paediatric Category. *Academy of Pharmaceutical Sciences Pariyaram*. 2014:174-86.
- Shabbir M, Dali S, Raza S, Sharif A, Furqan M, Akhtar SA, Peerzada S, et al. Effect of hydrophilic and hydrophobic polymer on in vitro dissolution and permeation of bisoprolol fumarate through transdermal patch. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*. 2017;74:187-97.
- Shankar SJ, Prabhu M, Raju PB. Formulation and evaluation of Transdermal Patch of an Anti-Diabetic Drug of Glibenclamide World. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 2015;5(1):522-41.
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan BN. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999;65:1-11.
- Srikoon P, Kariya R, Kudo E, Goto H, Vaeteewoottacharn K, Taura M, Wongkham S, Okada S. Diethyldithiocarbamate suppresses an NF- κ B dependent metastatic pathway in cholangiocarcinoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(7):4441-6.
- Srisook K, Cha Y-N. Super-induction of HO-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide*. 2005;12(2):70-9.
- The Royal Children's Hospital Melbourne. Wound dressings - acute traumatic wounds 50 [Online]. 2017 [Cite 2017 Sep 10]; Available from: https://www.rch.org.au/clinicalguide/guideline_index/Wound_dressings_acute_traumatic_wounds/#objectives-of-wound-dressing.

- Vishal V, Ganesh S., Mukesh G, Ranjan B. A review on some plants having anti-inflammatory activity. *The Journal of Phytopharmacology*. 2014;3(3):214-21.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008 ;73(9):R117-24.
- Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S, Pattarapanich C. In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25:445-50.
- Williams LA, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, et al. The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J*. 2008;57(4):327-31.
- Xiping G, Jie L, Xuejing Z, Yuqing Z. *Compatibility and Properties of Biodegradable Blend Films with Gelatin and Poly(vinyl alcohol)*. Wuhan University of Technology and SpringerVerlag Berlin Heidelberg. 2004.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารวิจัย 692976 สัญญาเลขที่ 78/2561
โครงการวิจัยประเภทเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ โครงการออกแบบและพัฒนาตำรับยาใช้ภายนอกจากพืชท้องถิ่นของประเทศไทยใน
รูปแบบแผ่นแปะผิวหนังเพื่อลดการอักเสบ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน เกษัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 4 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	302,700	บาท	เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2560
งวดที่ 1 (40%)	242,160	บาท	เมื่อวันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2561
งวดที่ 1 (10%)	60,540	บาท	เมื่อวันที่ -
รวม	605,400	บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	106,400	168,400	-53,200
2. ค่าจ้าง	20,000	0	20,000
3. ค่าวัสดุ	382,640	400,000	-17,360
4. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	26,780	26,780	0
6. ค่าธรรมเนียม อุดหนุนสถาบัน	60,540	60,540	0
รวม	605,400	655,960	50,560

เภสัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า เกษัชกรหญิง ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล๗ มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง โครงการออกแบบและพัฒนาตำรับยาใช้ภายนอกจากพืชท้องถิ่นของประเทศไทยในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนังเพื่อลดการอักเสบ

Design and development of transdermal patches as anti-inflammatory formulations from local Thai plants

รหัสโครงการ 692976 สัญญาเลขที่ 78/2561

ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 605,400 บาท (หกแสนห้าพันสี่ร้อยบาทถ้วน)

ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 4 เดือน

(ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562)

บทคัดย่อ

บทนำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเป็นทางเลือกในการนำมาพัฒนาตำรับยาต่อไป ชัน (Propolis) จากชันโรงสายพันธุ์ชันเงิน (*Tetragonula pegdeni* Schwarz) ที่เพาะเลี้ยงในเขตสวนผลไม้ จ.จันทบุรี และผักชีลาว (Dill, *Anethum graveolens* L) และบัวบก (*Centella asiatica* L.) โดยมีสารสกัดมาตรฐาน คือ ECa ที่มีการใช้ทางภูมิปัญญาชาวบ้านและทางอายุรเวชเพื่อลดการอักเสบมาอย่างช้านาน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านการวิจัยบางส่วนยังไม่ชัดเจน รวมทั้งไม่มีการพัฒนาเป็นสูตรตำรับเพื่อใช้ในการลดการอักเสบในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเพื่อยืนยันผลของฤทธิ์ต้านการอักเสบที่พบ พร้อมทั้งหาวิธีการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุด เพื่อนำสารสกัดที่ได้นั้นมาออกแบบและพัฒนาให้ได้ตำรับยาต้นแบบที่มีความคงตัวและสะดวกต่อการใช้งานในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง

วิธีการและผลการทดลอง สารสกัดชันและสารสกัดผักชีลาวถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.5 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ได้ที่ IC₅₀ ของสารสกัดชัน สารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดิน (Ar Et/Pet) เท่ากับ 32.59±0.36 µg/ml และ 68.81±1.37 µg/ml ตามลำดับ พร้อมทั้งแสดงฤทธิ์ในการลดระดับของ pro-inflammatory cytokine ที่หลั่งจากเซลล์ด้วย นอกจากนี้ สารสกัดชันยังพบว่ามีฤทธิ์สูงกว่า α -mangostin ที่เป็นสารประกอบหลักในสารสกัดในขนาดสารที่เทียบเท่ากันถึง 5 เท่า โดยสารสกัด Ar Et/Pet นั้นพบว่ามีผลลดการแสดงออกของยีน iNOS ที่ relative mRNA expression เท่ากับ 0.62±0.11 และในการพัฒนาสูตรตำรับ

แผ่นแปะผิวหนังโดยมี ECa 233 เป็นส่วนประกอบนั้นมีส่วนประกอบในตำรับ คือ PVA ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทั้งลักษณะทางกายภาพ ความเข้ากันของตำรับ ความยืดหยุ่น การดูดซับของเหลวและการปลดปล่อยยา

สรุปและอภิปราย สารสกัดชันจากชันโรง สารสกัดผักชีลาวส่วนลำต้นเหนือดิน นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งของกลไกการอักเสบ ซึ่งสารสกัดชันมีฤทธิ์สูงกว่าสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัดผักชีลาวจากส่วนลำต้นเหนือดินพบฤทธิ์โดยทำงานผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *iNOS* และต้นแบบตำรับแผ่นแปะผิวหนังที่บรรจุสารสกัดบัวบก ECa 233 นั้น สามารถรักษาคุณสมบัติของต้นแบบตำรับได้โดย โดยพบว่า SCMC อาจเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาต่อเพื่อเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับหนองในอนาคตได้

Output/Outcome

- อยู่ในระหว่างการรอตีพิมพ์
- อยู่ในระหว่างการเตรียมยื่นขอจดอนุสิทธิบัตรการออกแบบแผ่นแปะผิวหนังที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากใบบัวบก
- มีการเผยแพร่รูปแบบการนำเสนอแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The 11th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2019 (NEPhReC2019) ชื่อเรื่อง Screening of selected Eastern Thai herbs usage in traditional medicine remedies on inhibition of nitric oxide production-related anti-inflammation and cytotoxic effects in cholangiocarcinoma cell line ณ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม วันที่ ๑๖-๑๗ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

ข้อเสนอแนะ

ในการทำปฏิบัติการวิจัยด้านเซลล์และโมเลกุล มีความจำเป็นอย่างมากในเรื่องของเครื่องมือและสถานที่ เพื่อเพิ่มศักยภาพด้านการวิจัยภายในองค์กร จึงใคร่ขอความสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในด้านดังกล่าว ทั้งนี้ ในขณะนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องนี้ การมีความร่วมมือกับสถาบันอื่นถือเป็นเรื่องจำเป็นมาก เพื่อให้เกิดความคล่องตัวในการทำวิจัยของอาจารย์ผู้ทำวิจัยและมีภาระงานด้านอื่นๆ ซึ่งต้องใช้เวลาส่วนหนึ่งในการเดินทางเพื่อทำวิจัยให้สำเร็จ