



การศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ
เพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

STUDY OF EFFICACY AND STABILITY OF CASSIA ALATA GEL
FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

สุชาดา เตียศรีพัฒนสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ
เพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

STUDY OF EFFICACY AND STABILITY OF *CASSIA ALATA* GEL
FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ

เพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ของ

สุชาดา เตียศรีพัฒนสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล) (รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.นริศ คำแก่น)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรพจน์ สิทธิถาวร) (อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ เพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
ผู้วิจัย	สุชาดา เตยศรีพัฒนสุข
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพวรรณ สิทธิถาวร

ชุมเห็ดเทศเป็นสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติที่มีรายงานในการช่วยยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ที่ผิวหนัง วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้จึงต้องการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากชุมเห็ดเทศ เพื่อ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และเพื่อพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศที่มีประสิทธิภาพตลอดจนเสถียรภาพ โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ 50% isopropyl alcohol, 50% ethanol และ 95% ethanol ในการสกัดสาร ออกฤทธิ์ด้วยวิธีการหมัก พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศด้วย 95% ethanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด โดยเมื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ emodin ในสารสกัดชุมเห็ดเทศด้วยวิธี HPTLC พบว่ามีสาร emodin อยู่ร้อยละ 2.27 ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดชุมเห็ดเทศ ในการยับยั้งเชื้อและการฆ่าเชื้อในจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดีกว่าเชื้อรา *C. albicans* และความเข้มข้น ของสารสกัดชุมเห็ดเทศมีผลต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อตั้งตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ ความเข้มข้นร้อยละ 4 พบว่าการเติมโพลอกซาเมอร์ในปริมาณมากขึ้นทำให้ความหนืดของตำรับเจลเพิ่มขึ้น มี การซึมผ่านที่ดี และการปลดปล่อยสารสกัดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ เมื่อทดสอบเสถียรภาพของ ตำรับเจลไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและ pH พบเพียงการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตำรับเจลที่ ลดลง และฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศยังคงอยู่ ถ้าเพิ่ม เสถียรภาพด้านความหนืดเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศน่าจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการศึกษาเชิงคลินิก ต่อไป

คำสำคัญ : เจลชุมเห็ดเทศ, ประสิทธิภาพและเสถียรภาพ, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Title	STUDY OF EFFICACY AND STABILITY OF CASSIA ALATA GEL FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES
Author	SUCHADA TIASRIPATTANASUK
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Dr. Duangratana Shuwisitkul
Co Advisor	Associate Professor Dr. Worapan Sitthithaworn

Cassia alata Linn. (Chumhetthet) is a Thai herbal medicine on the National List of Major Medicines. It has been reported for the treatment of fungi and bacteria infection on the skin. The purpose of this study were to obtain a suitable solvent for the extraction of *C.alata* and to develop an effective and stable gel formulation for antimicrobial activity. Three solvents, 50% isopropyl alcohol, 50% ethanol and 95% ethanol, were used to extract *C.alata* by the fermentation method. It was found that the extract using 95% ethanol showed the best antimicrobial activity. Emodin content in 95% ethanol extract by using HPTLC was 2.27%. When comparing MIC and MBC, the extract was able to inhibit and kill *S.aureus* better than *C.albicans*. The concentration of the *C.alata* extract had an effect on the survival rate of the HaCaT cell line. The gels were formulated with 4% w/w *C.alata* extract. The increase in poloxamer 407 concentration resulted in an increase in the viscosity of gels. The extract release depends on the concentration of poloxamer and emodin and could permeate well through newborn pig skin when formulating the extract of gel formulation. The gels were stable with no physical and pH changes. Only the decrease in the viscosity of the gel formulation was observed. The antimicrobial activity against *S.aureus* and *C.albicans* of the gel formulations was persisted after stability study at the elevated temperature. If the stability of gel viscosity is enhanced, the gel containing *C.alata* extract can be further developed and studied in humans as a potential herbal gel for antimicrobial activity.

Keyword : Efficacy and stability, Antimicrobial activities, Cassia alata gel

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ สิทธิถาวร ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาพร้อม ซึ่งทุกท่านได้เสียสละเวลา ให้คำแนะนำชี้แนะ อบรมสั่งสอน และให้ความช่วยเหลือ รวมถึงดูแลเอาใจใส่ในการดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอน นับตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนสำเร็จเป็นปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยซาบซึ้งในความกรุณา จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.นริศ คำแก่น ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการพิจารณาเค้าโครงปริญญานิพนธ์ และการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ทั้งนี้ยังได้ให้ข้อเสนอแนะต่างๆ เพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์สาขาเทคโนโลยีเภสัชกรรม และคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณรงค์ มูลศรี คุณสมชาย หลวงสนาม คุณนิตา อุลทพิพย์ คุณทัน พันธุ์ ปวนกัน และพี่ เพื่อน น้องที่เรียนร่วมหลักสูตรทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจ และคอยช่วยเหลือเกี่ยวกับงานห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ งานเอกสาร เทคโนโลยีสารสนเทศที่ใช้ในงานวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวทุกท่านที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้คำแนะนำ รวมทั้งเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

สุชาดา เตียศรีพัฒนสุข

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ตัวแปรที่ศึกษา.....	2
กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
สมมุติฐานในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. ชุมเห็ดเทศ	4
1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
1.2 องค์ประกอบทางเคมี.....	5
1.3ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	6
1.4 ความเป็นพิษทั่วไปและต่อระบบสืบพันธุ์.....	8
2. เจล	9
2.1 ชนิดของเจล.....	9

2.2 กลไกการเกิดเจล.....	10
2.3 ตัวสารก่อเจล	10
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยาเจลผสมสารสกัดสมุนไพร.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
1.อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	13
2. วิธีการศึกษา.....	14
2.1 การสกัดสารโดยวิธีการหมัก (Maceration).....	14
2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดและดำรับด้วย Agar well diffusion	14
2.3 การแยกสารสกัดหุ้มเห็ดเทศ	16
2.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT	16
2.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory	17
2.6 การวิเคราะห์สารสำคัญ emodin ด้วย HPTLC.....	17
2.7 การเตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดหุ้มเห็ดเทศ	18
2.8 การทดสอบการซึมผ่าน	19
2.9 การศึกษาการปลดปล่อยยา.....	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	20
1. การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัด	20
2. ตำรับเจลและเสถียรภาพของตำรับเจลผสมสารสกัดหุ้มเห็ดเทศ	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	35
ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม	37
ภาคผนวก.....	41
ประวัติผู้เขียน.....	49



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับเจล	18
ตาราง 2 การแสดงร้อยละผลผลิต (yield) ของปริมาณสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ	20
ตาราง 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัด.....	21
ตาราง 4 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ	24
ตาราง 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับ	26
ตาราง 6 ค่าความหนืดของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3)	27
ตาราง 7 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศทั้ง 3 ตำรับ.....	29
ตาราง 8 ค่าความหนืดของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3) หลังทดสอบเสถียรภาพ	30
ตาราง 9 แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	31
ตาราง 10 แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>Candida albicans</i>	32

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ชุดเห็ดเทศ <i>Cassia alata</i> Linn.	4
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ในใบชุมเห็ดเทศ	5
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ poloxamer 407	11
ภาพประกอบ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างกัน	22
ภาพประกอบ 5 High-performance thin-layer chromatography fingerprinting of emodin	23
ภาพประกอบ 6 แสดงกราฟร้อยละการรอดชีวิตของสารสกัดต่อเซลล์ human keratinocyte.....	25
ภาพประกอบ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับ.....	26
ภาพประกอบ 8 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืด ค่าความเค้นเฉือนและอัตราเค้นเฉือนหลังเตรียมเสร็จใหม่ ของ ตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของพอลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3)	28
ภาพประกอบ 9 แสดงการปลดปล่อยของสารสกัดจากตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ด	33
ภาพประกอบ 10 แสดงการซึมผ่านของสารสกัดจากตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ด	34

บทที่ 1

บทนำ

สมุนไพรไทยมีบทบาทและความสำคัญต่อประเทศไทยในทั้งในภาคอุตสาหกรรม และภาคเกษตรกรรม รวมทั้งด้านการใช้รักษาและดูแลสุขภาพเสริมฟื้นฟูสุขภาพ ในยุค Thailand 4.0 ได้เกิดแนวคิด Herb 4.0 เพื่อพัฒนาพืชสมุนไพรไทยและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสมุนไพร (โกสินทร์ บุญยวัฒน์ในภาส, 2560) เพื่อให้ประชาชนเข้าถึงผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพิ่มขึ้นและได้ใช้ยาสมุนไพรไทยที่มีคุณภาพ ลดการนำเข้ายาแผนปัจจุบัน และพึ่งพาตนเองโดยยึดหลักเศรษฐกิจพอเพียง (สุเทพ วัชรปิยานันท์, 2560) ตามนโยบายยุทธศาสตร์ชาติ ด้วยเหตุผลดังกล่าวประชาชนจึงให้ความสนใจยาสมุนไพร และศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรไทยมากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่มีการอ้างอิงจากตำรายาแผนโบราณ

ปัจจุบันยาสมุนไพรที่ได้ขึ้นในบัญชียาหลักแห่งชาติประกอบด้วย ยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ และยาพัฒนาจากสมุนไพร ซึ่งยาจากชุมเห็ดเทศจัดอยู่ในหมวดของยาที่พัฒนาจากสมุนไพร ปัจจุบันมีจำหน่ายในรูปแบบยาขง ยาแคปซูล มีข้อบ่งใช้ในการบรรเทาอาการท้องผูก ในงานสาธารณสุขมูลฐานมีการใช้ชุมเห็ดเทศ โดยใช้ส่วนของใบ และดอก ในการบรรเทาอาการท้องผูก และส่วนของใบ ในการรักษาอาการกลากเกลื้อน และฝี สำหรับการนำมาใช้ภายนอกเพื่อรักษาการกลากเกลื้อนและฝี ยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากยังไม่มีตำรับยาสำหรับใช้ภายนอกออกวางจำหน่ายในประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบเจล อิมัลเจล หรือครีม

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดชุมเห็ดเทศ เพื่อพัฒนาตำรับยาที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางผิวหนังและมีเสถียรภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรและเกิดเป็นตำรับยาที่สามารถนำไปต่อยอดให้เกิดเป็นตำรับยาใช้รักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังได้หรือสามารถนำไปศึกษาทางคลินิกในการรักษาโรคผิวหนังต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์จากชุมเห็ดเทศ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์และเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดใบชุมเห็ดเทศ

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมสกัดสารสำคัญจากผงใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ 50% Ethanol, 50% isopropyl alcohol, 95% ethanol แล้วระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดและตำรับ
3. การแยกสกัดสารสกัดชุมเห็ดเทศเพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์
4. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT
5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC)
6. การวิเคราะห์สารสำคัญ emodin ด้วย HPTLC
7. เตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ
 - 7.1 วัด pH สังเกตลักษณะสี และความหนืด
 - 7.2 ศึกษาความเสถียรภาพทางกายภาพของตำรับผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ
 - 7.3 ศึกษาฤทธิ์หลังการเตรียมตำรับ เทียบกับหลังจากการเก็บตำรับ เป็นเวลา 2 เดือน
8. ศึกษาการปลดปล่อยยา
9. การทดสอบการซึมผ่านโดยใช้หนังหมู

ตัวแปรที่ศึกษา

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

ตัวแปรต้น : ชนิดของตัวทำละลาย

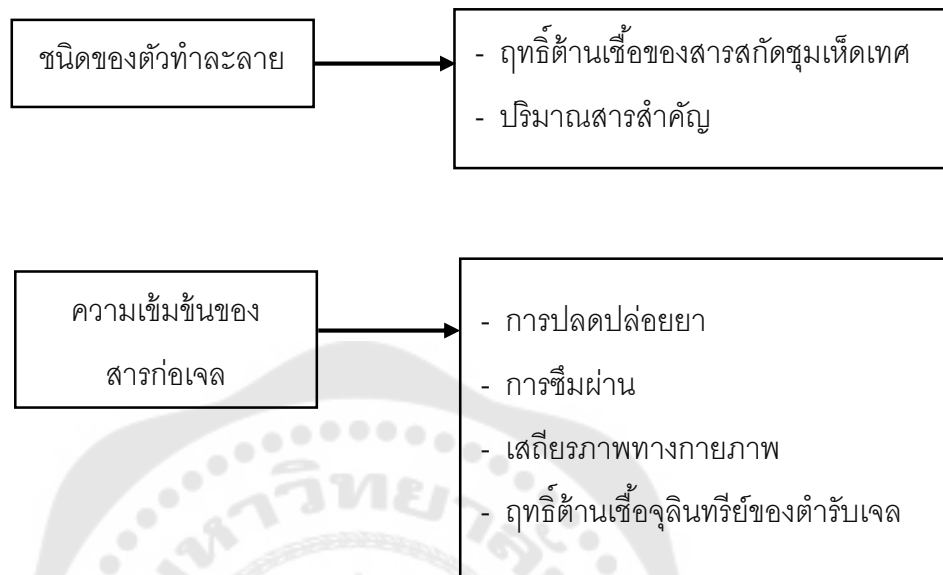
ตัวแปรตาม : ฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัด และปริมาณสารสำคัญ

2. การพัฒนาตำรับ

ตัวแปรต้น : ความเข้มข้นของสารก่อกวน

ตัวแปรตาม : การปลดปล่อยยา การซึมผ่าน เสถียรภาพทางกายภาพและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

กรอบแนวคิดในการวิจัย



สมมุติฐานในการวิจัย

สารสกัดชุมเห็ดเทศมีประสิทธิภาพด้านฤทธิ์จุลินทรีย์ และรูปแบบตำรับที่มีผลต่อประสิทธิภาพและเสถียรภาพของตำรับยาผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รูปแบบตำรับยาใช้ภายนอกผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศที่มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพสามารถนำไปต่อยอดใช้ในทางคลินิกต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยเพื่อพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดชุมเห็ดเทศครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ชุมเห็ดเทศ

ชุมเห็ดเทศ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia alata* Linn. อยู่ในวงศ์ Caesalpiniaceae ชื่อสามัญ Ringworm Bush, Candelabra Bush ชื่ออื่น ได้แก่ ชุมเห็ด (ใต้) ชี้คาก ลับมันหลวง (เหนือ) ชุมเห็ดใหญ่ (กลาง) ส้มเห็ด (เชียงใหม่) จุมเห็ด (มหาสารคาม) (เพ็ญภา ทรัพย์เจริญ, 2542)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้พุ่มสูง 3 เมตร ใบรูปรี ใบประกอบจับเรียงแบบขนนก ยาว 30-60 ซม. และปลายใบมนเว้าเล็กน้อย ฐานใบจะมนไม่เท่ากัน ขอบใบเรียบมีสีแดง ใบมีความกว้าง 5-7 ซม. ยาว 5-15 ซม. ก้านใบสั้น ก้านดอกสั้น ดอกเป็นช่อใหญ่มีสีเหลือง มีกลีบรองกลีบดอก 5 กลีบ เป็นรูปขอบขนาน สีเขียวตรงปลายจะแหลม ผลเป็นฝักรูปไม้บรรทัด ฝักแก่มีสีดำแตกตามยาว เมล็ดมีลักษณะแบนเป็นรูปสามเหลี่ยม ผิวขรุขระสีดำ

สรรพคุณ ใบ ชงดื่มเป็นยาระบาย บดผสมกระเทียมหรือน้ำปูนใส แก้กกลากเกลื้อน และแมลงสัตว์กัดต่อย ใบสด ตำพอกเพื่อเร่งหัวฝี ฝัก เป็นยาช่วยขับพยาธิ ต้นและราก เป็นยาแก้กษัยเส้น แก้ท้องผูก และบำรุงหัวใจ

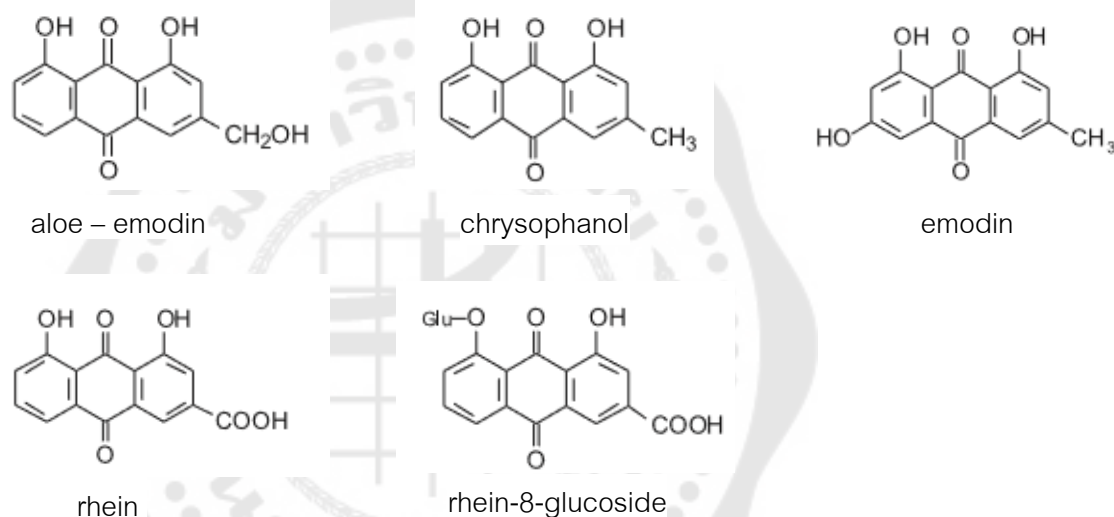


ภาพประกอบ 1 ชุมเห็ดเทศ *Cassia alata* Linn.

ที่มา: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=40>

1.2 องค์ประกอบทางเคมี

ใบมีสารแอนทราควิโนนหลายชนิด เช่น aloe – emodin, chrysophanol, emodin, rhein และสารกลุ่มแทนนิน สารฟลาโวนอยด์ เช่น kaemferol เป็นต้น ชุมเห็ดเทศเป็นยาระบายที่ดี เนื่องจากมีทั้งแอนทราควิโนน ซึ่งเป็นยาระบาย และแทนนิน ซึ่งเป็นยาฝาดสมาน จึงเป็นยาระบายที่สมานธาตุในตัว (ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี) ใบชุมเห็ดเทศควรมีสาร hydroxyanthracene derivatives ไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก (โดยคำนวณเป็น rhein-8-glucoside)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ในใบชุมเห็ดเทศ

ที่มา : <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14810/1/IJNPR%203%283%29%20291-319.pdf>

Emodin เป็นอนุพันธ์แอนทราควิโนนธรรมชาติที่เกิดขึ้นในสมุนไพรจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum* และ *Polygonum multiflorum* ถูกใช้เป็นยาจีนโบราณมานานกว่า 2,000 ปี และยังคงมีอยู่ในการเตรียมสมุนไพรต่างๆ หลักฐานที่เกิดขึ้นใหม่บ่งชี้ว่าอีโมดินมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายรวมถึงยาดำนมะเร็งตับ ด้านการอักเสบ การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านจุลชีพ (Dong et al., 2016)

1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1.3.1 ฤทธิ์รักษาอาการท้องผูก

การศึกษาผู้ป่วยจำนวน 80 ราย ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาสมุนไพรแบบชาชง ใบชุมเห็ดเทศ ในเวลาก่อนนอน 1 ครั้ง มีผลช่วยในการบรรเทาอาการท้องผูก โดยผู้ป่วยมีการถ่ายภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีผลดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก ซึ่งได้ผลการศึกษาไม่แตกต่างกันไปจากกลุ่มที่ได้รับยาระบายมีลท์แอลบา (Thamlikitkul et al., 1990)

เมื่อใช้สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำร้อนกับหนูแรทโดยให้ทางปากด้วยขนาด 500 และ 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลช่วยในการระบาย (Ogunti & Elujoba, 1993) และเมื่อให้สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำของใบชุมเห็ดเทศกับหนูเม้าส์โดยผ่านช่องทางปาก ด้วยขนาดเท่ากับใบแห้งรูปแบบผงของชุมเห็ดเทศขนาด 20, 10 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้หนูเม้าส์ถ่ายเหลว โดยการให้ขนาดที่สูง (20 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัม) จะทำให้ผลการออกฤทธิ์เป็นไปได้เร็วกว่าขนาดที่ต่ำ (5 กรัม/กิโลกรัม) กลุ่มสารแอนทราควิโนนไกลโคไซด์จากใบ ประกอบด้วย rhein, emodin, aloe-emodine, isocrysophanol, physcion-l-glycoside และ chrysophanol ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาระบาย

1.3.2 ฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้

สารสกัดใบชุมเห็ดเทศที่สกัดด้วยน้ำขนาดเทียบเท่ากับใบแห้งชุมเห็ดเทศ 5 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภามีการหดตัว สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำขนาดเทียบเท่ากับใบแห้งรูปแบบผงของใบชุมเห็ดเทศ 10 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้มีการเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้ของหนูเม้าส์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายน้ำขนาด 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ส่วนปลายของลำไส้เล็กหนูตะเภามีการหดตัวได้ในหลอดทดลอง (Akah, 1994) ขณะที่สารไกลโคไซด์ในใบชุมเห็ดเทศ มีผลช่วยกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ (Seshagiri-Rao, Sastry, & Krishna-Rao, 1975)

1.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์และครีมชุมเห็ดเทศเข้มข้นร้อยละ 20 มีผลในการรักษาผู้ป่วยโรคกลาก 30 ราย และโรคเกลื้อน 10 ราย ได้ดีเมื่อเทียบกับยา whitfield แต่ไม่มีผลในการรักษาเชื้อราที่เล็บและผิวหนังที่ศีรษะ ยาเตรียมชุมเห็ดเทศในรูปแบบทิงเจอร์และครีม ให้ผลในการรักษาผู้ป่วยโรคกลากเกลื้อนที่ผิวหนังได้เช่นเดียวกับยาครีมความเข้มข้นร้อยละ 1 โคลไตรมาโซล สารสกัดใบสดจากชุมเห็ดเทศสดด้วยน้ำ (โดยมีสัดส่วน

ไบสด 100 กรัมต่อปริมาตรน้ำ 50 มิลลิลิตร) ความเข้มข้นร้อยละ 100 ทาบริเวณแขน และขา ความเข้มข้นร้อยละ 90 ทาบริเวณคอ และมือ และความเข้มข้นร้อยละ 80 ทาบริเวณหน้า 1 ครั้ง ก่อนนอน 2 ชั่วโมง มีผลต่อการรักษาโรคกลากเกลื้อนและเชื้อรา ในผู้ป่วยจำนวน 200 คนได้ (Damodaran & Venkataraman, 1994)

สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำ (Fuzellier, Mortier, & Lectard, 1982) สารสกัดด้วยเอทานอล (Ibrahim & Osman, 1995) สารสกัดด้วยเมทานอล (Phongpaichit, Pujenjob, Rukachaisirikul, & Ongsakul, 2004) และสาร aloe-emodin, rhein, emodol, 4,5-dihydroxy-1-hydroxymethylantrone, 4,5-dihydroxy-methylantraquinone และ chrysophanol จากใบชุมเห็ดเทศ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ผิวหนัง ได้แก่ *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* (วันดี กฤษณพันธ์, แม้นสรวง วุฒิชูดมเลิศ, มัลลิกา ไตรเดช, & สุภาวี อาชวาคม, 2541) และ *M. canis* (Ibrahim & Osman, 1995) เมื่อเทียบกับยา tolnaftate โดยสารสำคัญ rhein ให้ผลยับยั้งเชื้อราได้ดี และสารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.104 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีพอกับยา ketoconazole และ itraconazole (โชติกา บุญ-หลง & กาญจนา พฤษพันธ์, 2543) นอกจากนี้สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ แอลกอฮอล์ และน้ำ และสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 จากทุกส่วนของชุมเห็ดเทศ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุก่อโรคกลากได้

สารสกัดจากเปลือกต้นชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลมีผลยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับยา ticonazole 30 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (Somchit, Reezal, Nur, & Mutalib, 2003) ส่วนสารสกัดที่ได้จากใบด้วยตัวทำละลายจากน้ำและเอทานอลไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ (Ibrahim & Osman, 1995) น้ำมันหอมระเหยจากใบชุมเห็ดเทศ สารสกัดจากเปลือกต้นด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Benjamin, 1980) สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้นมากกว่า 21.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Kanbutra et al.)

1.4 ความเป็นพิษทั่วไปและต่อระบบสืบพันธุ์

1.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบพิษชนิดกึ่งเรื้อรัง พบว่าขนาดร้อยละ 2 และ 10 ของอาหารในการผสมผงใบชุมเห็ดเทศลงในอาหารให้หนูแรทกินเป็นเวลานาน 28 วัน พบว่าเกิดแผลในลำไส้ ตับ และไต และมีระดับฮีโมโกลบิน และ packed cell volume (PCV) สูงขึ้น จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงใน 14 วันแรก หลังจากใส่สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายเอทานอลขนาด 100 มิลลิกรัม ลงในน้ำดื่มให้หนูแรทกินเป็นเวลานาน 14 วัน ทำให้เกิดแผลในตับ มีการตายของเซลล์ตับ และพบเส้นเลือดดำการคั่งของเลือด สำหรับการฉีดสาร emodin และ kaemferol ขนาด 10 มิลลิกรัม เข้าช่องท้องหนูแรทติดต่อกันนาน 14 วัน หรือฉีดสาร aloe-emodin ขนาด 100 มิลลิกรัม สาร rhein ขนาด 70 มิลลิกรัม เข้าช่องท้องเป็นเวลา 4 วัน ทำให้เกิดแผลในตับของหนูทุกกลุ่ม กลุ่มที่ได้รับ aloe-emodin จะพบเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจถูกทำลาย หนูทุกกลุ่มมีระดับฮีโมโกลบิน และ PCV ลดลงภายใน 14 วัน (Yagi, Tigani, & Adam, 1998) เมื่อป้อนสารสกัดจากใบที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายขนาด 250, 100, 50 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้หนูแรทเป็นเวลา 14 วัน ส่งผลให้ระดับฮีโมโกลบินและเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันหนูมีอาการผอมแห้ง เบื่ออาหาร และน้ำหนักลด (Sodipo, Effraim, & Emmagun, 1998) การทดสอบพิษเรื้อรัง เมื่อป้อนสารสกัดจากใบด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 ให้หนูแรทในขนาด 0.75 กรัม/กิโลกรัม/วัน คิดเป็น 25 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ซึ่งคิดเป็น 1.5 กรัม/คน/วัน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าไม่มีความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษชนิดเฉียบพลันของหนูเมาส์เมื่อให้สารทางปากและฉีดเข้าใต้ผิวหนัง พบว่าสารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 ไม่มีความเป็นพิษ แต่เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูเมาส์ พบว่ามีความเป็นพิษเล็กน้อย และสารสกัดจากส่วนเหนือดินของชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูเมาส์ พบว่ามีความเป็นพิษปานกลาง (Dhawan, Dubey, Mehrotra, & Tandon, 1980)

1.4.2 ความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์

สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 ฉีดเข้าช่องท้องหนูแรทขนาด 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าไม่มีผลต่อการทำให้เกิดการแท้งและไม่พบผลต่อตัวอ่อน แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของรอบเดือนที่ไม่ชัดเจน สำหรับสารสกัดจากใบด้วยน้ำขนาด 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้มดลูกหนูแรทหดตัวในหลอดทดลอง และช่วยกระตุ้นฮอร์โมน oxytocin (Rao, Menezes, & Gadelha, 1988)

1.4.3 พิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ brine shrimp พบว่าสารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำขนาด 7.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ brine shrimp ตายไปครึ่งหนึ่ง (Parra, Yhebra, Sardiñas, & Buella, 2001) และสารสกัดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero โดยความเข้มข้น 1,414 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ Vero ตายไปครึ่งหนึ่ง (Yoosook, Bunyapraphatsara, Boonyakiat, & Kantasuk, 2000)

1.4.4 ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยเอทานอล มีผลก่อกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* strain TA98 และพบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศด้วยแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ *S. typhimurium* strain TA98 และ TA100 โดยในการออกฤทธิ์ต้องการเอนไซม์จากตับหนูกระตุ้นการออกฤทธิ์

2. เจล

เจลเป็นยาเตรียมกึ่งแข็งที่โปร่งใส (transparent) หรือโปร่งแสง (translucent) ประกอบด้วยอนุภาคกระจายตัวของสารก่อเจล (gelling agent) ที่กระจายตัวอยู่ในตัวกลาง อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เจลลี่ (jelly) เป็นเภสัชภัณฑ์เพื่อบริหารยาเฉพาะที่หรือภายในช่องร่างกาย ได้แก่ ทาหรือป้ายผิวหนัง ตา ช่องจมูก ช่องคลอดและช่องทวารหนัก เป็นยาพื้นที่เหมาะสมสำหรับตัวยาที่ละลายน้ำเนื่องจากมีปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบสูงเจลที่ดีมีลักษณะนุ่ม เรียบเนียน ให้ความรู้สึกเย็น (cooling effect) จากการระเหยของน้ำ เกิดเป็นฟิล์มยึดติดผิวหนังได้ดี และล้างออกง่ายได้ด้วยน้ำ (ลลนา คงคาเนนมิตร, 2547)

2.1 ชนิดของเจล

2.1.1 แบ่งตามวัฏภาค จะแบ่งเจลออกได้เป็น 2 ประเภท คือ single-phase system และ two-phase system

ก. Single-phase system (Single-phase gel)

ประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ หรือคอลลอยด์ของสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุล ขนาดใหญ่กระจายอย่างสม่ำเสมอในของเหลว มักจะมี van der waal force เชื่อมโยงระหว่างหน่วยของโมเลกุลอย่างแน่นหนาทำให้เกิดเป็น crystalline และ amorphous region ขึ้น

ไม่สามารถแบ่งแยกระหว่างโมเลกุลที่กระจายตัวอยู่ (dispersed molecule) กับ dispersion medium ได้ จึงเรียกว่าเป็น one phase system เจลที่ได้จะมีความเป็นเนื้อเดียวกันตลอด (homogenous) Single phase gel อาจประกอบด้วย synthetic macromolecule เช่น carbopol หรือ gum เช่น tragacanth gel หรือ carboxymethylcellulose gel หรืออาจเรียกว่า mucilage

ข. Two-phase system (Two-phase gel)

เป็นเจลที่เตรียมจากคอลลอยด์อินทรีย์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กๆ กระจายตัวอยู่ เช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์เจล ถ้าหากอนุภาคมีขนาดค่อนข้างใหญ่ หรืออนุภาคขนาดเล็กมารวมกลุ่มกันเป็น floccules เรามักเรียกระบบนี้ว่า magma หรือ milk เช่น bentonite magma หรือ magnesia magma ซึ่งเจลในระบบนี้มีความคงตัวไม่ค่อยดีนัก แต่สามารถกระจายตัวใหม่ได้อีก และมีคุณสมบัติเป็น thixotropic คือ เมื่อตั้งทิ้งไว้จะมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว แต่ถ้ามีแรงไปกระทำหรือเกิดการเขย่าจะกลายเป็นของเหลว ซึ่งจำเป็นจะต้องเขย่าก่อนจะนำไปใช้เพื่อให้ได้เจลที่มีความสม่ำเสมอ (homogeneity) (ปลื้มจิตต์ วจนพันธุ์, 2537)

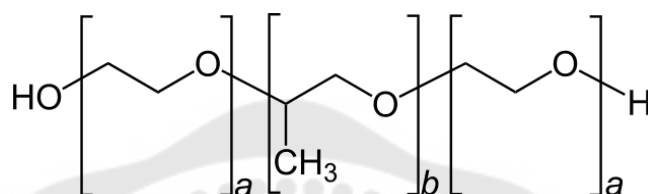
2.2 กลไกการเกิดเจล

พอลิเมอร์สามารถทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้นได้ โดยโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำ กล่าวคือ เกิดไฮเดรชัน (Hydration) พันธะดังกล่าวอาจเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เช่น พันธะระหว่าง hydroxyl group บนโมเลกุลของอนุพันธ์เซลลูโลสกับโมเลกุลน้ำ หรืออาจเป็น ion-dipole interaction เช่น ระหว่าง carboxyl group ของ sodium carboxymethyl-cellulose กับน้ำ นอกจากนี้พอลิเมอร์ยังสามารถกักโมเลกุลของน้ำจำนวนหนึ่งไว้ภายในสายโซ่โมเลกุลที่ขดเป็นก้อนได้ บางครั้งจะเรียกพอลิเมอร์ที่ละลายในน้ำว่า ไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) พอลิเมอร์จะทำให้สารละลายมีการไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic flow) และบางชนิดยังให้การไหลแบบพลาสติก (plastic flow) คือมี yield point หรือเป็นระบบคีนรูปช้า (thixotropy) ซึ่งล้วนมีประโยชน์ต่อการตั้งตำรับ (ลลนา คงคาเนนมิตร, 2547)

2.3 ตัวสารก่อเจล

2.3.1 Poloxamers เป็น block โพลีเมอร์ของ polyoxyethylene (a) ที่ชอบน้ำ, polyoxypropylene (b) ที่ไม่ชอบน้ำ poloxamers ทั้งหมดมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันและองค์ประกอบของ (a) และ (b) ที่ใช้กันมากที่สุด 2 ชนิด คือ

poloxamer 188 ($a = 80$, $b = 27$) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ 7680 ถึง 9510 Da และ poloxamer 407 ($a = 101$, $b = 56$) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 9840 ถึง 14600 Da สามารถละลายในน้ำ กรดอ่อน และแอลกอฮอล์ ไม่ละลายใน propylene glycol, glycerin และ mineral oil มีชื่อพ้องหลายชื่อคือ pluronic, poloxalkol, monolan และ supronic ถ้าใช้เป็นสารก่อเจล ต้องใช้เปอร์เซ็นต์สูงขนาด 15-50% เจลที่ได้จะมีความคงทนต่ออิเล็กโตรไลต์



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ poloxamer 407

ที่มา: https://www.wikiwand.com/en/Poloxamer_407

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยาเจลผสมสารสกัดสมุนไพรร

Capsaicinoid ใช้ในการรักษาเฉพาะและแผ่นแปะความเข้มข้นสูง เพื่อบรรเทาอาการปวดของเส้นประสาทส่วนปลาย เช่น post-herpetic neuralgia อาจใช้เป็นครีมเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยเล็กน้อยและปวดของกล้ามเนื้อและข้อต่อที่เกี่ยวข้องกับโรคข้ออักเสบ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อวัดความสามารถในการซึมผ่านของ capsaicinoid ผ่านผิวหนังหน้าท้อง Sprague-Dawley rat เป็นการแพร่กระจายของเมมเบรน Capsaicinoid กำหนดประเมินการเจาะของ capsaicinoid จากแต่ละรูปแบบของยาโดยใช้ Franz diffusion cell กับ Sprague-Dawley rat abdomen ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ รวมถึงอิทธิพลของอุณหภูมิ การทดสอบทางประสาทสัมผัส ค่าความเป็นกรด – เบส เส้นผ่านศูนย์กลางทรงกลม ความหนืดและความสอดคล้อง (consistency) ผลการวิจัยพบว่า chili fructus extract มี capsaicinoid $1.93 \pm 0.2\%$ ผลรวมของการซึมผ่าน capsaicinoid จากรูปแบบเจลและอิมัลเจลเท่ากับ $153.11 \pm 2.42 \mu\text{g cm}^{-2}$ และ $321.22 \pm 4.67 \mu\text{g cm}^{-2}$ ตามลำดับ ค่าร้อยละ capsaicinoid ที่ได้จากการซึมผ่านของเจลและอิมัลเจลมีขนาด $19.39 \pm 0.31\%$ และ $40.69 \pm 0.59\%$ ตามลำดับ การไหลของ capsaicinoid จากเจลและรูปแบบขนาดของอิมัลเจลคือ $11.26 \pm 0.20 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ และ $24.28 \pm 0.52 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าปริมาณความสามารถในการซึมผ่าน

ของรูปแบบ อิมัลเจลสูงกว่าเจล และรูปแบบทั้งสองมีความคงสภาพทางกายภาพ (Effionora & Ramadon, 2014)

การศึกษาสูตรเจลสมุนไพรที่มีส่วนผสมของว่านหางจระเข้สารสกัดจาก *Azadirachta indica* และ *Lycopersicon esculentum* ความเข้มข้นต่าง ๆ ของโพลีเมอร์ถูกนำไปใช้ในสูตรเจลเจลยังถูกประเมินเพิ่มเติมจากคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น สี, ค่า pH, ความสามารถในการแพร่กระจาย และความหนืด การประเมินผลสำหรับด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทำโดยใช้ cup plate method สำหรับ HPMC ที่ความเข้มข้น 2-3% มีความสอดคล้องและความหนืดที่ต้องการสำหรับการบริหารเฉพาะโซนของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 15-23 mm สำหรับ *S. aureus*, 18-22 mm สำหรับ *E.coli*, 15-25 mm สำหรับ *A.niger* และ *A.Varis* เจลแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ด้านเชื้อราที่มีแนวโน้มต่อสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้สำหรับการศึกษาเจลมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง (Pandey, Jagtap, Polshettiwar, & Kuchekar, 2011)

งานวิจัยการพัฒนารับเจลสารสกัดชะเอมเหนือ (*Derris reticulata*) ในการพัฒนารับเจลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์โดยใช้สารก่อเจล 6 ชนิด ได้แก่ 4% methylcellulose 5% sodium carboxymethylcellulose 3% hydroxyethyl cellulose 3% hydroxylpropyl cellulose 1% Carbopol 941 และ 20% Poloxamer 407 พบว่าสารก่อเจลที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีคือสูตร C-F และการพัฒนารับสูตรตำรับอีก 8 ตำรับโดยใช้สารก่อเจลสูตร C-F พบว่าสูตรตำรับที่ดีที่สุดคือสูตรตำรับที่มีเจลพื้เป็น 15% Poloxamer 407 และตำรับที่มีปริมาณสารสกัด 3% และ 5% เมื่อนำไปทดสอบการต้านเชื้อ HSV-1 พบว่าตำรับเจลที่ใส่ปริมาณสารสกัด 5% มีผลในการต้านเชื้อ HSV-1 ได้ในระดับปานกลาง ส่วนตำรับเจลที่ใส่ปริมาณสารสกัด 3% ไม่มีผลในการต้านเชื้อ HSV-1 (สมิตา วิเศษสุทธิชัย, 2005)

งานวิจัยการศึกษาและประเมินศักยภาพในการรักษาบาดแผลในแบบจำลองหนูที่มีการติดเชือบริเวณแผลผ่าตัดในบริเวณหลัง โดยการศึกษาเจลสมุนไพรชุมเห็ดเทศช่วยเพิ่มการหายของแผลได้อย่างมีนัยสำคัญ ประเมินจากการหดตัวของความยาวของแผลและลักษณะภาวะทางชีวภาพ (Iraqui, Chakraborty, Das, & Yadav, 2019)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. Rotary Evaporator	Buchi, Thailand
2. Incubator	Thermo stable IF-50, USA
3. Hot air oven	Memmert, Germany
4. Rheometer	Thermo scientific, Germany
5. UV spectrophotometer	Shimadzu UV1800, Japan
6. Franz diffusion cell	Perme gear, USA
7. Digital pH-meter	Model 320 log R, USA
8. Autoclave	TOMY SD-320, Japan
9. Sonicator	Wisd, Korea
10. Vortex mixer	Wise Mix VM-10, Korea
11. เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง	Precisa XT 120A, Switzerland
12. Sample autospot	Linomat 5, Camag, Switzerland
13. TLC visualizer 2	Camag, Switzerland
14. TLC Scanner 3	Camag, Switzerland
15. TLC silica gel 60 F254 plates	Merck, Germany

1.2 สารเคมี

1. ผงใบชุมเห็ดเทศ	ร้านหลานหลวงสมุนไพร
2. 50% ethanol	
3. 95% ethanol	EMSURE, Germany
4. 50% isopropyl alcohol	
5. DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Merck, Germany
6. Hexane	J.T.Bake, USA
7. Poloxamer 407	
8. Propylene glycol	บริษัทซีพี ดรัก เซ็นเตอร์, ประเทศไทย
9. Clotrimazole	บริษัทซีพี ดรัก เซ็นเตอร์, ประเทศไทย

- | | |
|-------------------------------|----------------|
| 10. Amoxicillin 500 มิลลิกรัม | |
| 11. Toluene | Fisher, UK |
| 12. Ethyl acetate | Fisher, UK |
| 13. Formic acid | Fisher, UK |
| 14. Methanol (AR Grade) | Merck, Germany |
| 15. น้ำกลั่น | |

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสารโดยวิธีการหมัก (Maceration)

- ชั่งผงใบชุมเห็ดเทศ ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 1000 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ใบละ 100 กรัม เติมน้ำ 50% ethanol หรือ 95% ethanol หรือ 50% isopropyl alcohol ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- ปิดฝาให้สนิทด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน
- นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 1 รอบ แล้วกรองด้วยชุดกรองสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
- นำสารละลายที่ได้มาระเหย เอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความดัน 71 มิลลิเมตรปรอท จนสารสกัดแห้ง
- ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักที่ได้
- สำหรับสารสกัดที่หมักด้วยตัวทำละลาย 50% ethanol และ 50% isopropyl alcohol เมื่อนำไประเหยตัวทำละลายออก แต่ไม่สามารถระเหยส่วนที่เป็นน้ำออกได้ จึงต้องทำมาระเหยด้วย water bath จนสารสกัดแห้ง ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักที่ได้
- คำนวณหาร้อยละของน้ำหนัก (%yield) ของสารสกัด เก็บสารสกัดหยาบในขวดแก้วแล้วห่อด้วยฟอยล์เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดและดำรับด้วย Agar well diffusion

2.2.1 การเตรียมสารสกัด

- นำสารสกัดหยาบที่หมักด้วยตัวทำละลาย 50% ethanol , 95% ethanol และ 50% isopropyl alcohol ซึ่งอย่างละ 20 มิลลิกรัม และ 40 มิลลิกรัม
- ละลายด้วย DMSO 1 มิลลิลิตร นำไป vortex จนสารสกัดละลายจนหมด
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร (ต้องการละลายด้วย 1% DMSO)

2.2.2 การเตรียม positive control

นำผงยา clotrimazole 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย DMSO ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร (โดยดูจาก stock solution 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร) การเตรียมยา amoxicillin 500 มิลลิกรัม ก็ทำเช่นเดียวกัน แต่ละลายด้วยน้ำกลั่น และกรองด้วย syringe filter ขนาดรูเปิด 0.22 ไมครอน ก่อนนำไปทดสอบ

2.2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำผง Nutrient agar 9.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 400 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาพักให้หายร้อน เทลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ

2.2.4 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *S.aureus*, *B.subtilis*, *C.albicans* และ *A.niger* ไปเพาะเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัด

- ใช้ไม้พีดก้านสำลี จุ่มเชื้อที่ใช้ในการทดลองมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวอาหาร
- เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หลุม
- เติมสารสกัดปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะเอาไว้ แล้วเติมหลุมควบคุมด้วยยา และ 1% DMSO ในปริมาตรที่เท่ากัน

- ป้มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง อ่านผลด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น

2.2.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของตำรับเจล

- ใช้ไม้พีดก้านสำลี จุ่มเชื้อที่ใช้ในการทดลองมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวอาหาร
- เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หลุม
- เติมตำรับเจลลงในหลุมที่เจาะเอาไว้ แล้วเติมหลุมควบคุมด้วยยา และตำรับเจลเปล่า
- ป้มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง อ่านผลด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น

2.3 การแยกสารสกัดชุมเห็ดเทศ

- ละลายสารสกัดชุมเห็ดเทศ ปริมาณ 1 กรัม ด้วย น้ำ 150 มิลลิลิตร
- เทสารละลายลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติม hexane ลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า 1 นาที แล้วหยุดพัก 3 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง รอจนสารแยกออกเป็น 2 ชั้น
- โขเอาสารสกัดชุมเห็ดเทศในชั้น hexane และสกัดชุมเห็ดเทศในชั้นน้ำ ที่แยกกันเป็น 2 ชั้นออก โดยต้องเปิดฝาไว้ขณะที่ไข
- นำสารสกัดชุมเห็ดเทศในชั้น hexane ระเหยในตู้ดูดควันจนแห้งสนิท และบันทึกน้ำหนักที่ได้
- นำสารสกัดชุมเห็ดเทศในชั้นน้ำ ระเหยบน water bath ในตู้ดูดควันจนแห้งสนิทและบันทึกน้ำหนักที่ได้

2.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT

การทดสอบความเป็นพิษในเซลล์โดยมีความเข้มข้นของสารสกัด 80, 40, 20, 10, 5 และ 2.5 mg/ml โดยใช้สารละลาย MTS ทดสอบในเซลล์ HaCaT (human epidermal keratinocyte) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 490 nm. ทำการลงเซลล์ใน 96-well cell plate 100 μL บ่มต่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารสกัดชุมเห็ดเทศบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTS 20 μL บ่มต่อจนครบ 4 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ค่าการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 490 nm. และคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{A_{\text{sample 490}}}{A_{\text{control 490}}} \times 100$$

โดย $A_{\text{sample 490}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ HaCaT ที่ทำการทดสอบกับสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ 490 นาโนเมตร

$A_{\text{control 490}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ HaCaT กลุ่มควบคุมที่ 490 นาโนเมตร

2.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ ได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว คือ Tryptic Soy Broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S.aureus* และ *C.albican* นำสารสกัดชุมเห็ดเทศที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยเตรียมสารสกัด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับส่วนจะได้ความเข้มข้นของสารสกัด เป็น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน positive control คือหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรือสังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการหาค่า MIC นำหลอดที่ไม่มีมีความขุ่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเพาะเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยพิจารณาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้โดยจะสังเกตไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย บนจานอาหารเพาะเชื้อ

2.6 การวิเคราะห์สารสำคัญ emodin ด้วย HPTLC

นำสารสกัดชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 10 mg/ml และสารมาตรฐานอีโมดิน 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายเมทานอล spot ลงบน TLC silica gel 60 F254 plate 10x10 เซนติเมตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง CAMAG Automatic TLC Linomat 5 ขนาดแบน 0.6 เซนติเมตร โดยเว้นระยะจากปลายด้านล่าง 1 เซนติเมตร เว้นด้านข้างแผ่นทั้งสองด้านด้านละ 1.5 เซนติเมตร ใช้ mobile phase คือ Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (10:2:1v/v) ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ 8 เซนติเมตร นำแผ่น TLC plate มาทำการสังเกตลักษณะโครมาโทแกรมของสารที่แยกโดยตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 บันทึกภาพ นำแผ่นไปสแกนด้วยเครื่อง TLC Scanner 3 บันทึกผลปริมาณสารสำคัญ (Narayanan & Jadhav, 2015)

2.7 การเตรียมตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ

2.7.1 การเตรียมเจล

- กระจาย poloxamer 407 ลงในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- เตรียมสารสกัดชุมเห็ดเทศละลายในแอลกอฮอล์
- เติม propylene glycol และสารละลายสารสกัดชุมเห็ดเทศ ตามลำดับลงในสารละลาย poloxamer 407
- ปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่1)

ตาราง 1 แสดงสูตรอัตราส่วนของตำรับเจล

Ingredient	%w/w
Crude extract	4
Poloxamer 407	10-20
Propylene Glycol	5
Ethanol	5
Purified water	q.s.

a. ศึกษาเสถียรภาพตำรับ

i. การศึกษาเสถียรภาพทางกายภาพ

ศึกษาเสถียรภาพด้วยวิธี heating-cooling cycle จำนวน 6 วัฏจักร โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 วัฏจักร ทำการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพหลังเตรียมเสร็จกับหลังศึกษาเสถียรภาพทุก 2 วัฏจักร

ก. การศึกษาความหนืด

ศึกษาความหนืดและพฤติกรรมการไหลโดยใช้เครื่องวัดพฤติกรรมการไหลด้วยเครื่อง rheometer หัววัดเป็นชนิด plate-plate ใช้เทคนิคในการวัดแบบขึ้นบันได กำหนดช่วงในการวัดค่า shear rate ในช่วง 0.01-500 1/s. ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาพฤติกรรมการไหลและวัดด้วยเทคนิคในการวัดแบบจุด กำหนดจุดในการวัดค่า shear rate เป็น 0.1, 1, 10 และ 100 1/s. ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาค่าความหนืดของตำรับ

ข. การศึกษาความเป็นกรด-ด่าง

ทดสอบความเป็นกรด-ด่างของแต่ละสูตรตำรับ โดยใช้เครื่องวัดกรด-ด่างอัตโนมัติ แล้วจดบันทึก

ii. เสถียรภาพของฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion หลังเตรียมตำรับเจลเสร็จและหลังจากเก็บเจลที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาเสถียรภาพของฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

2.8 การทดสอบการซึมผ่าน

2.8.1 การเตรียมหนังเพื่อใช้ในการศึกษาการซึมผ่าน

หนังลูกหมูแรกเกิด นำหนังมาโกนขน ลอกคาบเอาชั้นที่มีไขมันออก แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นนำหนังห่ออลูมิเนียมฟอยด์ เก็บภายใต้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.8.2 การศึกษาการซึมผ่านด้วย Franz diffusion cell

เตรียมตำรับสูตรต่างๆ เพื่อทดสอบการซึมผ่านด้วย Franz diffusion cell โดยใช้หนังลูกหมูแรกเกิด และส่วน receptor จะบรรจุฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทดสอบโดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ตัวอย่างน้ำหนัก 0.3 กรัม ที่ใน donor และจะเก็บตัวอย่างออกมาศึกษาในเวลาที่ต่างๆ (30, 60, 120, 240, 360 นาที) จนครบ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของการซึมผ่านที่ถูกผลักดันผ่านมายัง receptor chamber ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS โดยใช้ความยาวคลื่นของแสง UV ที่ช่วง 200-600 nm และนำมาเทียบค่าความเข้มข้นของตำรับที่ได้จากการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Standard curve)

2.9 การศึกษาการปลดปล่อยยา

เตรียมตำรับสูตรต่างๆ เพื่อทดสอบการปลดปล่อยยาด้วย Franz diffusion cell โดยใช้ membrane และส่วนของ receptor จะบรรจุด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทดสอบโดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ตัวอย่างน้ำหนัก 0.3 กรัม ที่ใน donor และจะเก็บตัวอย่างออกมาศึกษาในเวลาที่ต่างๆ (30, 60, 120, 240, 360 นาที) จนครบ 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวัดปริมาณยาที่ซึมผ่านมาด้วยเทคนิค UV-VIS ที่ความยาวคลื่น 266 nm แล้วนำไปคำนวณปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมา

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ชุมเห็ดเทศเป็นสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติมีการศึกษาสามารถต้านฤทธิ์ของเชื้อราและแบคทีเรียสำหรับรักษาผิวหนัง (Makinde, Igoli, Ta'Ama, Shaibu, & Garba, 2007) ในการศึกษาวิจัยนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศเพื่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และทำการตั้งตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรของตำรับด้วยการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ การปลดปล่อยและการซึมผ่านของตำรับผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเพื่อดูความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด keratinocyte ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังชนิดหนึ่ง

1. การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัด

จากการสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ 50% isopropyl alcohol, 50% ethanol และ 95% ethanol คำนวณปริมาณร้อยละผลผลิต (yield) จากตัวทำละลายต่างๆ ได้ ดังตาราง 2 สารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่า จะทำให้ร้อยละของผลผลิตมากกว่า โดยการสกัดด้วย 50% isopropyl alcohol จะให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุด เพราะในใบชุมเห็ดเทศมีสารจำพวกแอนทราควิโนน (Singh, Singh, & Yadav, 2013) ซึ่งเป็นสารกึ่งมีขั้วและมีขั้วน้อย จึงทำให้ 95% ethanol และ 50% isopropyl alcohol ให้ร้อยละผลผลิตมาก

ตาราง 2 การแสดงร้อยละผลผลิต (yield) ของปริมาณสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

	น้ำหนักสมุนไพรแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (%)
50% isopropyl alcohol	100	9.24	9.24
50% ethanol	100	4.02	4.02
95% ethanol	100	8.82	8.82

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดที่สกัดด้วย 50% isopropyl alcohol, 50% ethanol และ 95% ethanol พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ และสารสกัดที่สกัดด้วย 95% ethanol มี Inhibition Zone ในการต้านเชื้อได้กว้างที่สุดในเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* (ตาราง 3 และ ภาพประกอบ 4) เนื่องจากสารในกลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Wuthi-Udomlert, Prathantharug, & Soonthornchareonnon, 2001) ซึ่งอยู่ในชุมชนเห็ดเทศถูกสกัดออกด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และการใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลายได้ร้อยละผลผลิตการสกัดมากที่สุด จึงทำให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส่มากมากที่สุด

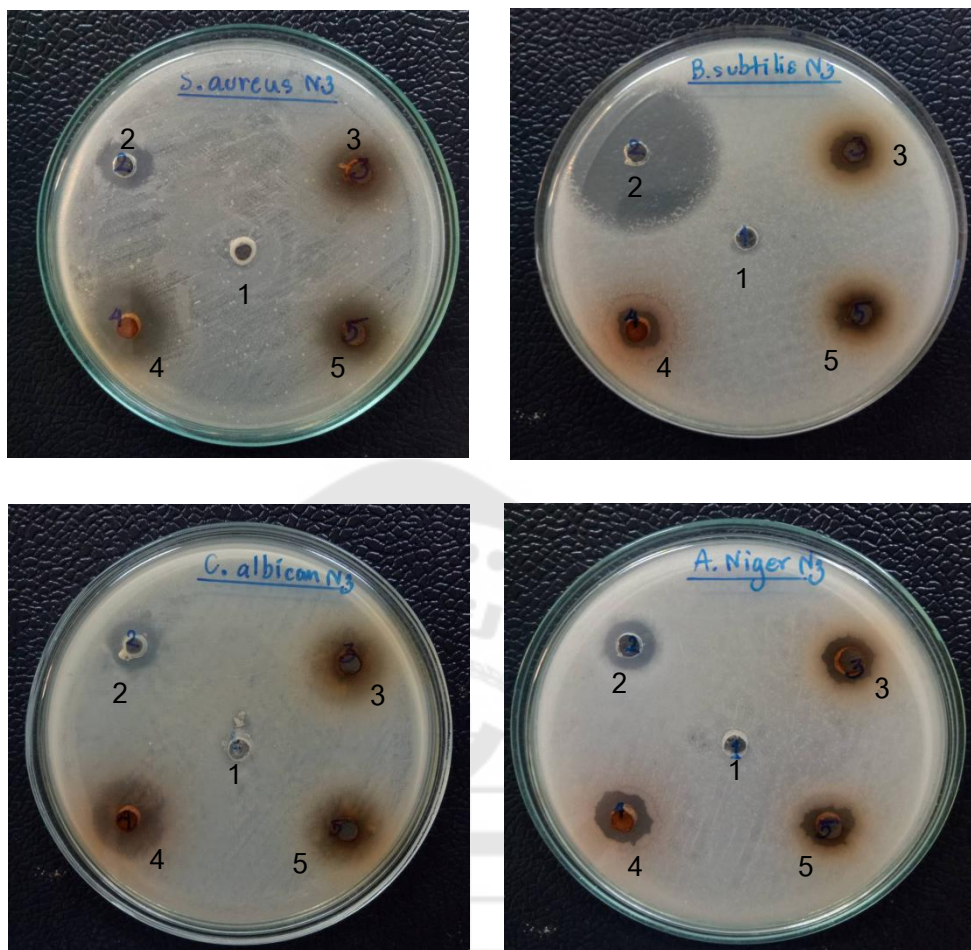
ตาราง 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัด

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของการต้านเชื้อ (mm) n=3				
	Positive control	Negative control	ตัวทำละลาย		
			50% isopropyl alcohol	50% ethanol	95% ethanol
<i>S.aureus</i>	12.33±1.15*	NA*	15.00±0.00	17.67±2.31	17.67±0.58
<i>B.sublitis</i>	35.00±0.00*	NA*	15.33±0.58	14.67±0.58	16.33±0.58
<i>C.albicans</i>	11.33±0.58**	NA*	15.67±2.08	16.33±0.58	19.33±2.08
<i>A.niger</i>	12.67±1.53**	NA*	14.00±1.73	14.67±3.21	15.67±2.31

หมายเหตุ NA = No activity

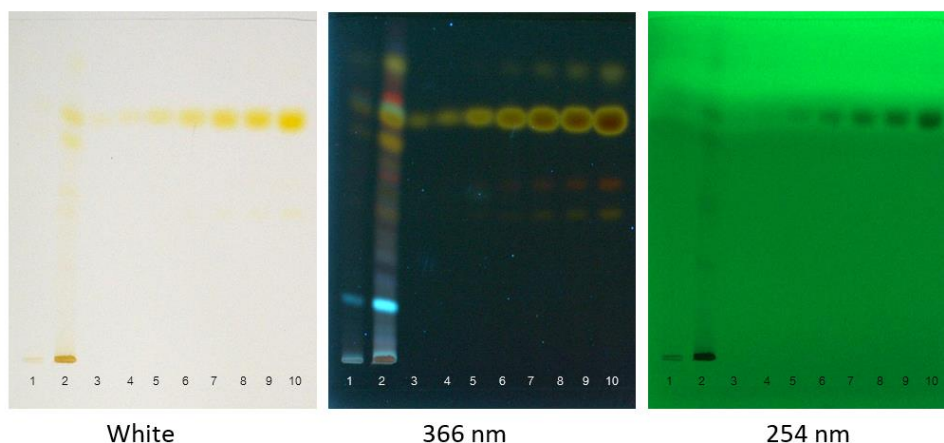
Positive control: * = Amoxicillin 500 mg, ** = Clotrimazole

Negative control: * = 1%DMSO



ภาพประกอบ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างกัน
 หมายถึง หมายเลข 1 negative control, หมายเลข 2 positive control, หมายเลข 3
 50% ethanol, หมายเลข 4 95% ethanol และหมายเลข 5 50% isopropyl alcohol

เพื่อทำการยืนยันว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศที่สกัดได้มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์จึงทำการวิเคราะห์หารสารสำคัญด้วยเทคนิค HPTLC พบว่า emodin ในสารสกัดจาก 95% ethanol มีปริมาณ emodin เท่ากับ 2.27% และได้ TLC ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 High-performance thin-layer chromatography fingerprinting of emodin

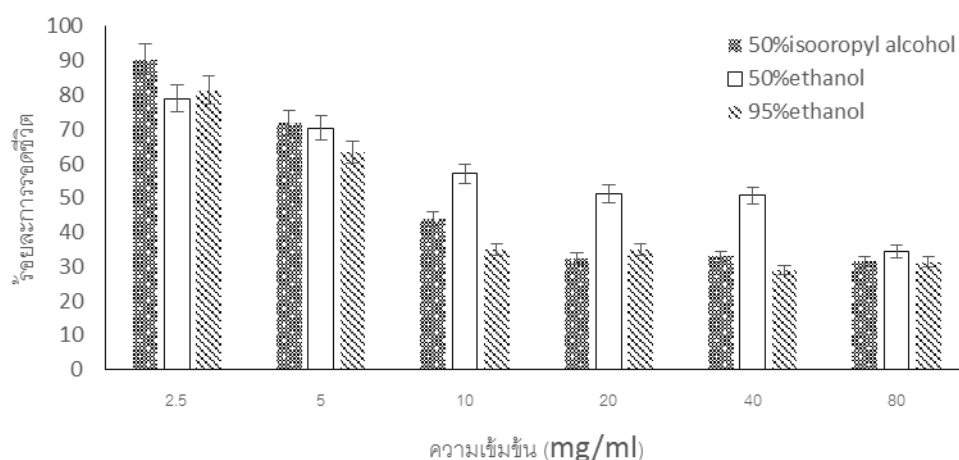
หมายเหตุ หมายเลข 1-2: สารสกัด หมายเลข 3-10: สารมาตรฐาน emodin

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดชุมเห็ดเทศที่สกัดด้วยการใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลายโดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อและการฆ่าเชื้อในจุลินทรีย์ที่ได้ผลเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส่มากสูง จากตาราง 3 จึงเลือกสารสกัดที่ผ่านการสกัดด้วย 95% ethanol มาหาค่า MIC และ MBC ได้แสดงในตาราง 4 พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อรา *C. albicans* เนื่องจากตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ทำการศึกษาดูต้องการฤทธิ์ในการรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา จึงนำค่า MBC ที่ได้ค่ามากที่สุดมาคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใส่สารสกัดใบชุมเห็ดเทศที่สกัดจาก 95% ethanol ลงในตำรับเจล จึงได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใส่ลงไปในเจลเท่ากับ 2.5% w/w

ตาราง 4 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

เชื้อจุลินทรีย์	สารสกัดชุมเห็ดเทศ	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>S.aureus</i>	3.13	6.25
<i>C.albicans</i>	6.25	25

การศึกษาค่าความเป็นพิษของสารสกัดชุมเห็ดเทศต่อเซลล์ผิวหนัง human keratinocyte (HaCaT) โดยพิจารณาจากค่าร้อยละการรอดชีวิต พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดชุมเห็ดเทศมีผลต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม โดยที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลงมากกว่าร้อยละ 50 (ภาพประกอบ 5) โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันส่งผลต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ การใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างชนิดจะทำให้ปริมาณและชนิดสารที่ถูกสกัดออกมาต่างกัน จึงทำให้ผลความเป็นพิษของเซลล์แตกต่างกัน การสกัดด้วย 50% ethanol ให้ผลความเป็นพิษต่อ HaCaT ต่ำที่สุด เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่ได้ yield ในการสกัดต่ำ ดังนั้นผลความเป็นพิษต่อ HaCaT จึงสอดคล้องกับผลร้อยละของผลผลิตจากการสกัด (ตาราง 2) แม้ที่ 2% และ 4% w/w (20 mg/ml และ 40 mg/ml) จะมีความเป็นพิษค่อนข้างมาก แต่การใช้เจลเพื่อการรักษาเชื้อราหรือแบคทีเรียจะสัมผัสผิวหนังบริเวณไม่กว้างนัก จึงน่าจะพอใช้ความเข้มข้นนี้กับผิวหนังได้ หากต้องการนำไปใช้จริงในมนุษย์ต่อไป ควรทำการทดสอบการระคายเคืองอีกครั้ง เพื่อให้เกิดความมั่นใจในพิษต่อเซลล์มนุษย์จริง



ภาพประกอบ 6 แสดงกราฟร้อยละการรอดชีวิตของสารสกัดต่อเซลล์ human keratinocyte

2. ตำรับเจลและเสถียรภาพของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ

จากการตั้งตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ สังเกตลักษณะทางกายภาพภายนอกพบว่า ตำรับเจลมีลักษณะสีน้ำตาลเหลือง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีแม้ทำการเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ รวมถึงไม่มีการแยกชั้นของตำรับเจล

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดพบว่า สารสกัดที่สกัดด้วย 95% ethanol มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อและมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสมากที่สุด จึงได้นำสารสกัดที่สกัดด้วย 95% ethanol มาตั้งตำรับเป็นเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดชุมเห็ดเทศ 2%, 4% และ 6% w/w พบว่าสามารถต้านเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ทุกความเข้มข้น (ตาราง 5) โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจาก 2% เป็น 4% ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสมากขึ้น แต่การเพิ่มเป็น 6% สารสกัดในเจลไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสแตกต่างจากเจลผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4% มากนัก เนื่องจากที่ 4% และ 6% เป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่มากกว่า MBC ของทั้งสองเชื้อจุลินทรีย์ จึงอาจเป็นผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสไม่ต่างกันมากนัก และจากการศึกษาอื่นก็พบว่า ความเข้มข้น 4% ของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศก็สามารถช่วยต้านการอักเสบได้เช่นกัน และยังสามารถยับยั้งการบวม น้ำที่อุ้งเท้าหนูอย่างมีนัยสำคัญ (Dixit, Misal, Gulkari, & Upadhye, 2013) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ 4% ของสารสกัด เพื่อทำการทดสอบต่อไป

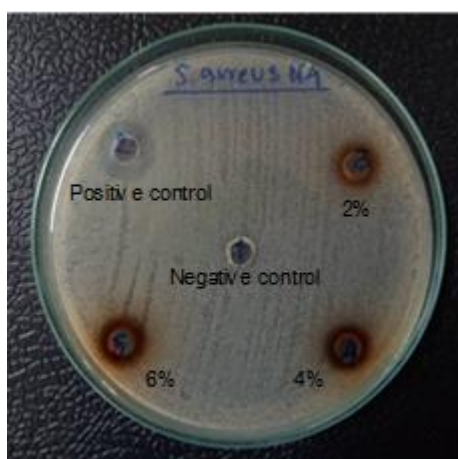
ตาราง 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับ

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของการต้านเชื้อ (mm) n=3				
	Positive control	Negative control	ความเข้มข้นของสารสกัด		
			2%	4%	6%
<i>S.aureus</i>	13.00±1.00*	NA*	10.33±0.58	11.00±1.00	11.67±0.58
<i>C.albicans</i>	16.00±1.00**	NA*	9.67±0.58	10.67±0.58	11.67±0.58

หมายเหตุ NA = No activity

Positive control: * = Amoxicillin 500 mg, ** = Clotrimazole

Negative control: * = base gel

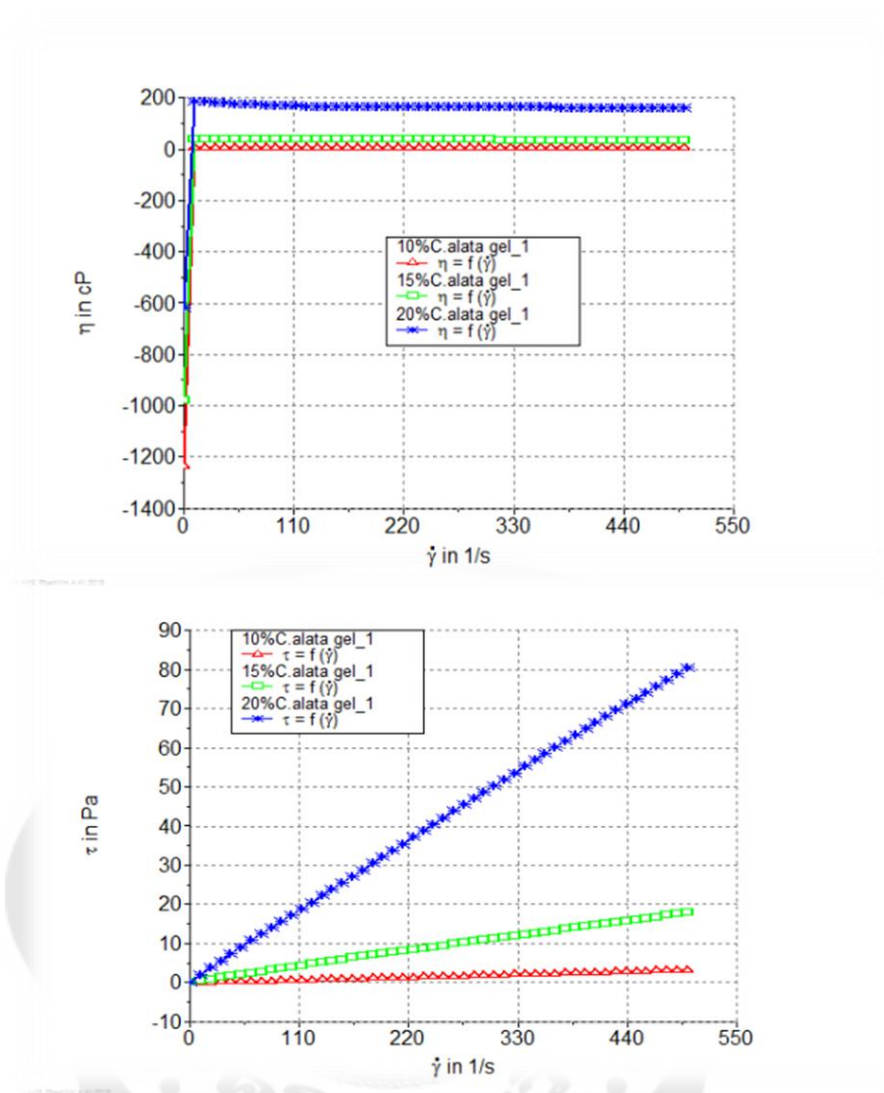


ภาพประกอบ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของตำรับ

จากการประเมินความหนืดและพฤติกรรมการไหลของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ ร้อยละ 4 ที่มีโพลอกซาเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3) ตามลำดับ พบว่าเมื่อวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเค้นเฉือน (shear stress) และ อัตราความเค้นเฉือน (rate of shear) ของตำรับเจลทั้ง 3 เป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นพฤติกรรมการไหล แบบ Newtonian fluid ที่มีค่าความหนืดเป็นค่าคงที่ (ภาพประกอบ 8) และเมื่อเปรียบเทียบค่า ความหนืดของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีโพลอกซาเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10-20% w/w พบว่า การเติมโพลอกซาเมอร์ในปริมาณที่มากขึ้นทำให้ความหนืดของตำรับเจลเพิ่มขึ้น ตามลำดับ เนื่องด้วยการเพิ่มขึ้นของพอลิเมอร์ทำให้การเคลื่อนที่ด้วยแรงเฉือนลดลง พอลิเมอร์ที่ มากขึ้นจะสามารถรับแรงเฉือนได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้อยลง จึงพบความหนืดที่มากขึ้น (ตาราง 6)

ตาราง 6 ค่าความหนืดของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3)

shear rate (1/s)	Viscosity (cP)		
	เจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4		
	ตำรับ 1 (10.0% w/w)	ตำรับ 2 (15.0% w/w)	ตำรับ 3 (20.0% w/w)
10	10.48±0.56	39.00±1.04	189.93±5.01
50	9.28±1.70	37.99±0.38	181.06±5.60
100	9.25±1.87	37.98±0.29	168.80±1.04
250	9.28±1.88	37.44±0.36	164.90±0.36
500	9.35±1.89	36.45±1.00	161.53±0.32



ภาพประกอบ 8 รีโอแกรมความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืด ค่าความเค้นเฉือนและอัตราเค้นเฉือนหลังเตรียมเสร็จใหม่ ของ ตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3)

จากการทดสอบเสถียรภาพของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3) ตามลำดับ ด้วยวิธี heating-cooling cycle พบว่าลักษณะทางด้านกายภาพของเนื้อเจลทั้ง 3 ตำรับมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จะอยู่ในช่วง 3.5-4.1 pH ของทุกตำรับเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ตาราง 7)

ตาราง 7 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศทั้ง 3 ตำรับ

ตำรับ	วัฏจักร 0	วัฏจักร 2	วัฏจักร 4	วัฏจักร 6
ตำรับ 1	3.92±0.01	3.62±0.05	3.68±0.03	3.69±0.01
ตำรับ 2	3.96±0.01	3.78±0.02	3.59±0.03	3.69±0.01
ตำรับ 3	4.01±0.02	3.92±0.03	3.85±0.02	3.80±0.03

แต่เมื่อทำการประเมินความหนืดและพฤติกรรมการไหลของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10-20% w/w พบว่า พฤติกรรมการไหลไม่เปลี่ยนหลังการศึกษาเสถียรภาพ โดยตำรับเจลทั้งสามตำรับมีพฤติกรรมการไหลเป็นแบบ Newtonian fluid ดังเดิม (ภาพประกอบ 17) เมื่อเปรียบเทียบค่าความหนืดของตำรับเจลหลังเตรียมเสร็จกับหลังการทดสอบความเสถียรภาพที่ วัฏจักรที่ 2-6 พบว่าความหนืดของทั้ง 3 ตำรับเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศมีความหนืดลดลง (ตาราง 8)

ตาราง 8 ค่าความหนืดของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ที่มีความเข้มข้นของโพลกซาเมอร์ 10.0% w/w, 15.0% w/w และ 20.0% w/w (ตำรับ 1, 2 และ 3) หลังทดสอบเสถียรภาพ

ตำรับ	shear rate (1/s)	ตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4			
		วันแรก	2 วัน	4 วัน	6 วัน
1	10	10.48±0.56	10.93±1.71	7.72±3.23	1.55±0
	50	9.28±1.70	8.41±0.06	6.27±2.70	1.18±0
	100	9.25±1.87	8.38±0.09	6.27±2.75	1.15±0
	250	9.28±1.88	8.41±0.07	6.30±2.77	1.19±0
	500	9.35±1.89	8.45±0.14	6.36±2.78	1.06±0
2	10	39.00±1.04	26.14±0.86	23.89±1.06	26.11±0.66
	50	37.99±0.38	24.66±0.09	24.23±1.18	25.37±0.51
	100	37.98±0.29	24.36±0.02	24.30±1.22	24.89±0.21
	250	37.44±0.36	23.84±0.16	24.34±1.19	24.27±0.06
	500	36.45±1.00	22.88±0.04	24.35±1.10	23.47±0.08
3	10	189.93±5.01	90.66±1.88	90.58±1.66	96.66±1.54
	50	181.06±5.60	91.82±2.05	90.15±0.58	91.71±0.58
	100	168.80±1.04	92.51±2.48	89.29±3.36	89.29±1.64
	250	164.90±0.36	86.31±0.60	87.69±4.68	86.69±2.75
	500	161.53±0.32	85.02±1.00	83.76±0.04	84.52±1.48

จากการทดสอบเสถียรภาพของฤทธิ์การต้านเชื้อ *S.aureus* และ *C.albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion ของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C พบว่า ตำรับเจลยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้ (ตาราง 9 และ 10) หลังจาก 2 สัปดาห์ของการเก็บรักษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อศึกษาที่สัปดาห์ที่ 4 มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นหรือมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสมากขึ้น อาจเนื่องจากการระเหยของตัวทำละลายเล็กน้อย

ร่วมกับความหนืดที่ลดลงของเจล เมื่อทำการทดสอบความคงสภาพในระยะเร่งทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในตำรับ ร่วมกับความหนืดที่ลดลงทำให้สารสกัดแพร่ลงไปยัง agar ได้ง่ายขึ้น

ตาราง 9 แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ตำรับ	สัปดาห์	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของการต้านเชื้อ (mm) n=3		ตำรับเจลผสมสารสกัด ชุมเห็ดเทศ
		Positive control	Negative control	
10% Poloxamer407	1	18.33±1.53	NA	13.00±1.00
	2	18.00±0.00	NA	13.50±0.54
	4	19.00±1.73	NA	15.33±0.58
15% Poloxamer407	1	18.33±0.58	NA	14.00±1.00
	2	18.00±0.71	NA	14.33±0.71
	4	18.67±1.53	NA	16.67±0.58
20% Poloxamer407	1	16.50±2.12	NA	11.00±0.00
	2	17.00±2.83	NA	11.33±1.15
	4	18.67±0.58	NA	18.00±1.00

หมายเหตุ NA = No activity

Positive control = Amoxicillin 500 mg

Negative control = base gel

ตาราง 10 แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านเชื้อ *Candida albicans*

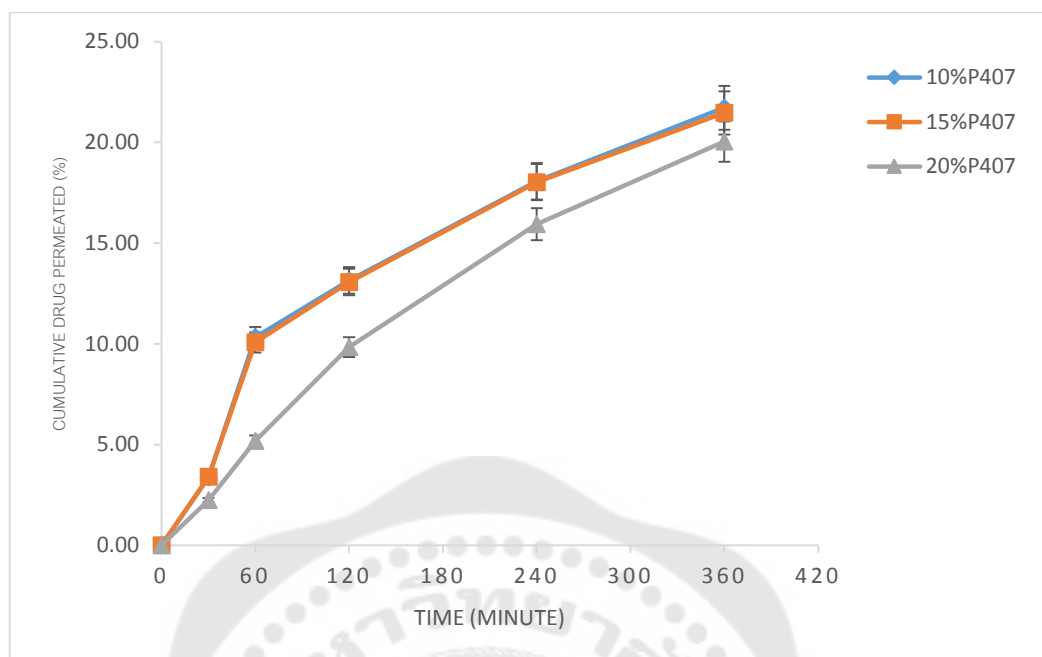
ตำรับ	สัปดาห์	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของการต้านเชื้อ (mm) n=3		ตำรับเจลผสมสารสกัด ชุมเห็ดเทศ
		Positive control	Negative control	
10% Poloxamer407	1	12.67±0.58	NA	12.33±0.58
	2	12.67±1.15	NA	11.67±1.53
	4	12.33±0.58	NA	18.00±1.73
15% Poloxamer407	1	14.00±0.00	NA	12.33±0.58
	2	13.33±0.58	NA	12.00±1.73
	4	13.00±1.00	NA	17.33±2.08
20% Poloxamer407	1	12.00±1.00	NA	9.67±1.53
	2	12.33±1.53	NA	10.67±0.58
	4	12.00±0.00	NA	17.67±2.31

หมายเหตุ NA = No activity

Positive control = Clotrimazole

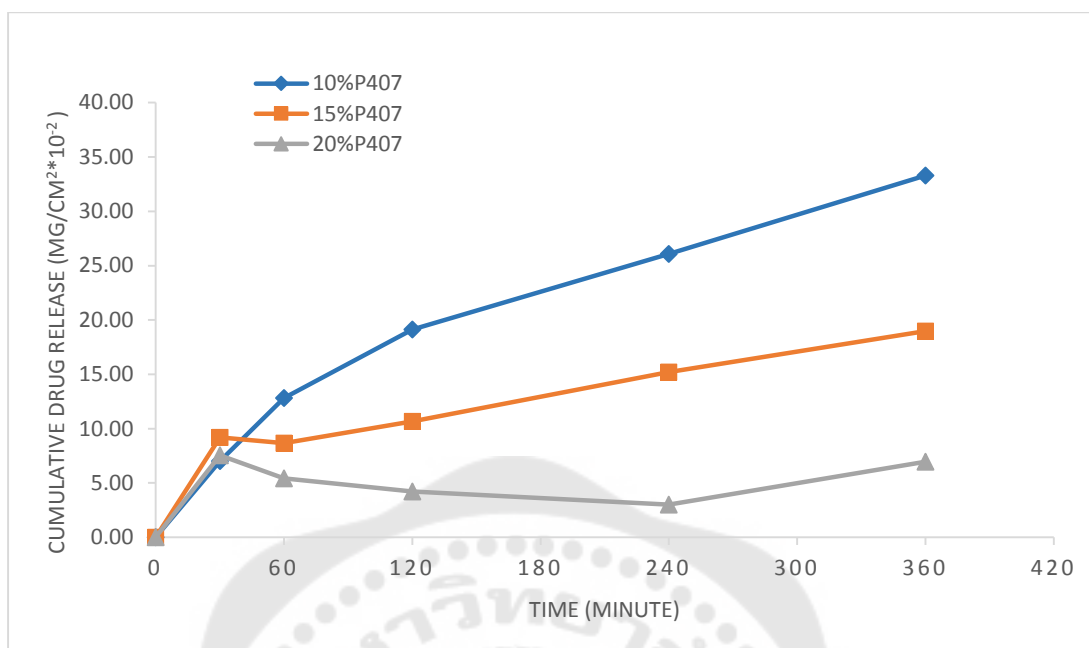
Negative control = base gel

จากการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดชุมเห็ดเทศโดยเปรียบเทียบตำรับที่ผสมตัวสารก่อเจล Poloxamer 407 ความเข้มข้น 10%w/w, 15%w/w และ 20%w/w พบว่าการปลดปล่อยของสารสกัดนาที่ที่ 30 ของตำรับเจลทั้ง 3 ความเข้มข้นมีการปลดปล่อยที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเวลาผ่านไปนาที่ที่ 60 พบว่าความเข้มข้นที่ 10% และ 15% w/w ของโพลอกซาเมอร์ มีการปลดปล่อยมากกว่าเท่าตัวเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 20% w/w อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารก่อเจลโพลอกซาเมอร์และความหนืดของตำรับ เมื่อความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ที่มากจะทำให้การปลดปล่อยของสารสกัดในตำรับได้น้อย เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ในสัดส่วนที่น้อยกว่ามีการปลดปล่อยได้ดีกว่า (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 แสดงการปลดปล่อยของสารสกัดจากตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ด

จากการศึกษาการซึมผ่าน โดยใช้ผิวหนังลูกหมูแรกคลอด พบว่านาที่ที่ 30 มีการซึมผ่านของสารสกัดในแต่ละตำรับในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อเวลาผ่านไปนาที่ที่ 60 พบว่าตำรับที่มีความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 10% มีการซึมผ่านได้ดีที่สุด และความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์ 20% มีการซึมผ่านได้น้อย อาจเพราะความเข้มข้นของสารก่อเจลที่สูงขึ้นทำให้การปลดปล่อยสารสกัดช้าลง จึงส่งผลให้การซึมผ่านผิวหนังช้าลงตามไปด้วย



ภาพประกอบ 10 แสดงการซึมผ่านของสารสกัดจากตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ ด้วยวิธีการหมักโดยการสกัดจากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน และการใช้โพลอกซาเมอร์เป็นสารก่อเจล ในการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดพบว่า สารสกัดจาก 95% ethanol ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 50% isopropyl alcohol และ 50% ethanol พบในสารสกัดมีปริมาณสารสำคัญ emodin ร้อยละ 2.27 เมื่อทำการตั้งตำรับโดยการนำสารสกัด 95% ethanol มาตั้งตำรับที่ความเข้มข้น 2-4% w/w ยังสามารถต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้ และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดีกว่าเชื้อรา *C. albicans* จากผลของการหาค่า MIC และ MBC การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง HaCaT พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดชุมเห็ดเทศมีผลต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยง จากการทดสอบความเข้มข้นมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลงมากกว่าร้อยละ 50 แม้ที่ 2% และ 4% w/w (20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะมีความเป็นพิษค่อนข้างมาก แต่การใช้เจลเพื่อการรักษาเชื้อราหรือแบคทีเรียจะสัมผัสผิวหนังบริเวณไม่กว้างนัก จึงน่าจะพอใช้ความเข้มข้นนี้กับผิวหนังได้ เมื่อตั้งตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ด้วยโพลอกซาเมอร์ความเข้มข้น 10-20% w/w พบว่าการเติมโพลอกซาเมอร์ในปริมาณมากขึ้นทำให้ความหนืดของตำรับเจลเพิ่มขึ้น แต่มีการซึมผ่านผิวหนังถูกหุ้มแรกคลอดได้ดี การปลดปล่อยของสารสกัดจากตำรับเจลขึ้นกับความเข้มข้นของโพลอกซาเมอร์

จากผลการทดสอบเสถียรภาพของตำรับเจล พบว่าลักษณะทางกายภาพของตำรับเจลไม่เปลี่ยนแปลง ตำรับเจลมีลักษณะสีน้ำตาลเหลือง มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่พบการลดลงของความหนืดของตำรับเจล หลังจาก 2 สัปดาห์ของการเก็บรักษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อศึกษาที่สัปดาห์ที่ 4 มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นหรือมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสมากขึ้น อาจเนื่องจากการระเหยของตัวทำละลายเล็กน้อยร่วมกับความหนืดที่ลดลงของเจล เมื่อทำการทดสอบความคงสภาพในระยะเร่งทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในตำรับ ร่วมกับความหนืดที่ลดลงทำให้สารสกัดแพร่ลงไปยัง agar ได้ง่ายขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ได้ตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศ เพื่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราต่อไป จึงควรพัฒนาให้ตำรับมีเสถียรภาพในความหนืดมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. เมื่อตั้งตำรับเจล เจลยังมีความเหลว หากเพิ่มความเข้มข้นของสารก่อเจล อาจทำให้เจลมีความเป็นเจลเพิ่มขึ้น และมีความหนืดเพิ่มขึ้น
2. ตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศสามารถนำไปศึกษาต่อในทางคลินิกเพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคต่อไป



บรรณานุกรม

- Akah, P. (1994). Abortifacient activity of some Nigerian medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 8(2), 106-108.
- Benjamin, T. (1980). Analysis of the volatile constituents of local plants used for skin disease. *J Afr Med Pl*, 3, 135-139.
- Damodaran, S., & Venkataraman, S. (1994). A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata*, Linn. leaf extract against Pityriasis versicolor. *Journal of ethnopharmacology*, 42(1), 19-23.
- Dhawan, B., Dubey, M., Mehrotra, B., & Tandon, J. (1980). Screening of Indian plants for biological activity: Part IX. *Indian Journal of Experimental Biology*, 18, 594-602.
- Dixit, G., Misal, G., Gulkari, V., & Upadhye, K. (2013). Formulation and evaluation of polyherbal gel for anti-inflammatory activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and research*, 4(3), 1186.
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., . . . Ni, J. (2016). Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1207-1218.
- Effionora, A., & Ramadan, D. (2014). Formulation and evaluation of gel and emulgel of chili extract (*Capsicum frutescens* L.) as topical dosage forms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(SUPPL. 3), 13-16.
- Fuzellier, M., Mortier, F., & Lectard, P. (1982). *Antifungal activity of Cassia alata* L. Paper presented at the Annales pharmaceutiques francaises.
- Ibrahim, D., & Osman, H. (1995). Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. *Journal of ethnopharmacology*, 45(3), 151-156.
- Iraqi, P., Chakraborty, T., Das, M. K., & Yadav, R. (2019). Herbal antimicrobial gel with leaf extract of *Cassia alata* L. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(3), 82-94.
- Kanbutra, P., Borisutpeth, P., Porntrakulpipat, S., Sarachoo, K., Jivaganon, J., Aromdee, C., & Wongkham, S.).ฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพร ไทยที่สกัดด้วย

แบคทีเรียชื่อ Escherichia coli F18.

- Makinde, A., Igoli, J., Ta'Ama, L., Shaibu, S., & Garba, A. (2007). Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *African Journal of Biotechnology*, 6(13).
- Narayanan, S., & Jadhav, A. P. (2015). Simultaneous estimation of aloe emodin and emodin from *Rheum emodi*, *Cassia alata* and *Aloes* by HPTLC. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(6), 783.
- Ogunti, E., & Elujoba, A. (1993). Laxative activity of *Cassia alata*. *FITOTERAPIA-MILANO*, 64, 437-437.
- Pandey, A., Jagtap, J. V., Polshettiwar, S., & Kuchekar, B. (2011). Formulation and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Herbal Gel Containing Aloe vera, *Azadirachta indica* and *Lycopersicon esculentum* Seed Extract. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 4(4), 552-554.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395-400.
- Phongpaichit, S., Puenjob, N., Rukachaisirikul, V., & Ongsakul, M. (2004). Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(5), 741-748.
- Rao, V., Menezes, A., & Gadelha, M. (1988). Antifertility screening of some indigenous plants of Brazil. *Fitoterapia*, 59(1), 17-20.
- Seshagiri-Rao, J., Sastry, P., & Krishna-Rao, R. (1975). Occurrence of kaempferol and aloe-emodin in the leaves of *Cassia alata* Linn. *Current science*.
- Singh, S., Singh, S. K., & Yadav, A. (2013). A review on *Cassia* species: Pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(3), 291-312.
- Sodipo, O., Effraim, K., & Emmagun, E. (1998). Effect of aqueous leaf extract of *Cassia alata* (Linn.) on some haematological indices in albino rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological*

Evaluation of Natural Product Derivatives, 12(6), 431-433.

Somchit, M., Reezal, I., Nur, I. E., & Mutalib, A. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of ethnopharmacology*, 84(1), 1-4.

Thamlikitkul, V., Bunyapraphatsara, N., Dechatiwongse, T., Theerapong, S., Chantrakul, C., Thanaveerasuwan, T., . . . Gingsungneon, V. (1990). Randomized controlled trial of *Cassia alata* Linn. for constipation. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het thangphaet*, 73(4), 217-222.

Wuthi-Udomlert, M., Prathanturarug, S., & Soonthornchareonnon, N. (2001). *Antifungal activities of Senna alata extracts using different methods of extraction*. Paper presented at the International Conference on Medicinal and Aromatic Plants (Part II) 597.

Yagi, S., Tigani, S. E., & Adam, S. (1998). Toxicity of *Senna obtusifolia* fresh and fermented leaves (kawal), *Senna alata* leaves and some products from *Senna alata* on rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(5), 324-330.

Yoosook, C., Bunyapraphatsara, N., Boonyakiat, Y., & Kantasuk, C. (2000). Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine*, 6(6), 411-419.

โกสินทร์ บุญยวัฒน์โนภาส. (2560). Herb 4.0 พัฒนาสมุนไพรไทย สืบค้นจาก

<https://thaibizchina.com/%E0%B9%84%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B9%83%E0%B8%8A%E0%B9%89-herbs-4-0-B8%99%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B8%A1%E0%B8%B8%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B9%84%E0%B8%97%E0%B8%A2/>

83%E0%B8%8A%E0%B9%89-herbs-4-0-B8%99%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%

B8%A1%E0%B8%B8%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B9%

84%E0%B8%97%E0%B8%A2/

โชติกา บุญ-หลง , & กาญจนา พฤษพันธ์. (2543). การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อเชื้อราโรคผิวหนัง. การประชุมวิชาการ "วิทยาศาสตร์การแพทย์ไทยกับกติกาใหม่ของโลก" กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ชุมเห็ดเทศ. สืบค้นจาก

<http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=53>

ป्लीมจิตต์ ไรจนพันธุ์. (2537). การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจล : ตำรับยาทางผิวหนังและเครื่องสำอาง.

เพ็ญภา ททรัพย์เจริญ. (2542). เภสัชกรรมแผนไทย (Vol. 1). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

ลลนา คงคาเนนมิตร. (2547). เทคโนโลยีเภสัชกรรม 2.

วันดี กฤษณพันธ์, แม้นสรวง วุฒิชูดมเลิศ, มัลลิกา ไตรเดช, & สุภาวี อาชวาคม. (2541). การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารแอนทราควิโนนจากใบชุมเห็ดเทศ. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สมिता วิเศษสุทธิชัย, แ. (2005). การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนือเป็นยาต้านริณ.

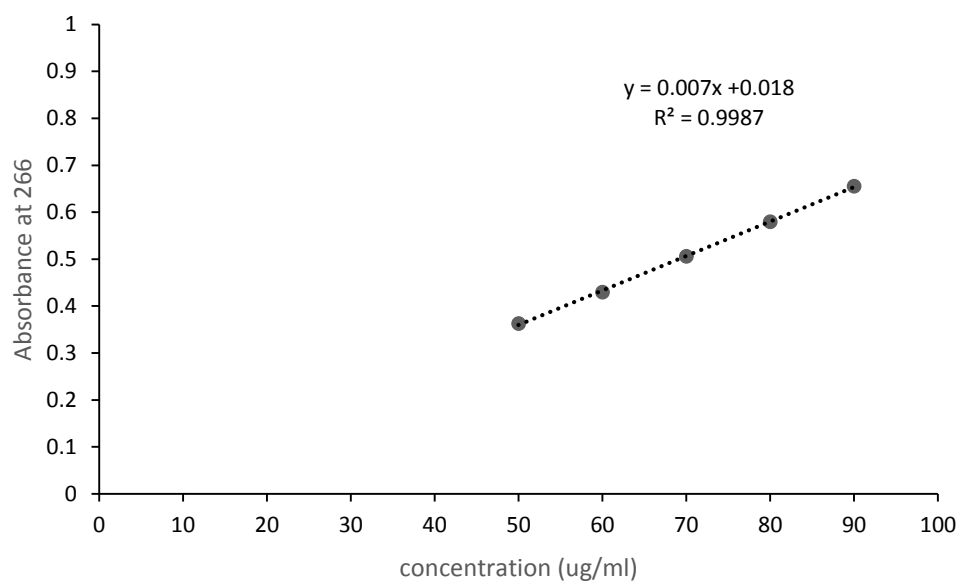
สุเทพ วัชรปียานันท์. (2560). Smart Herb 4.0 สืบค้นจาก

http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/3.11%20Herb%204.0.pdf

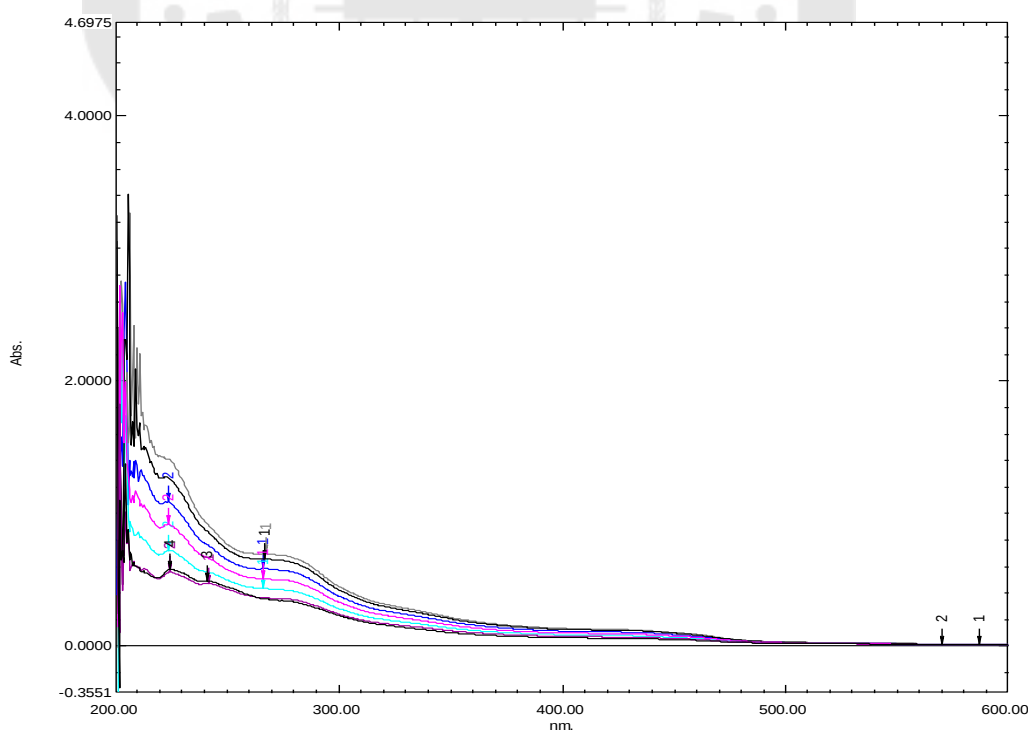




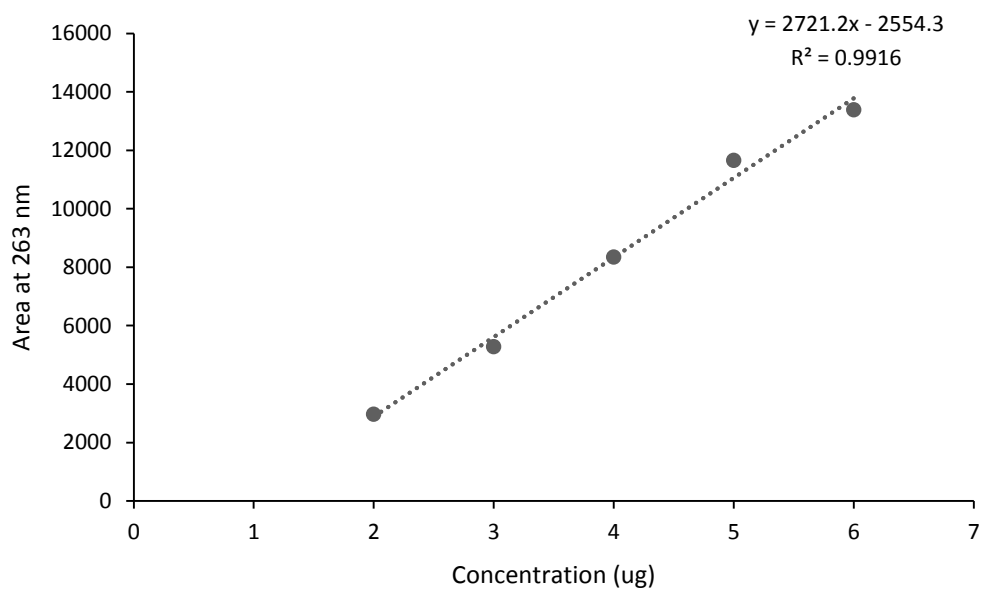
ภาคผนวก ก
ข้อมูลงานวิจัย



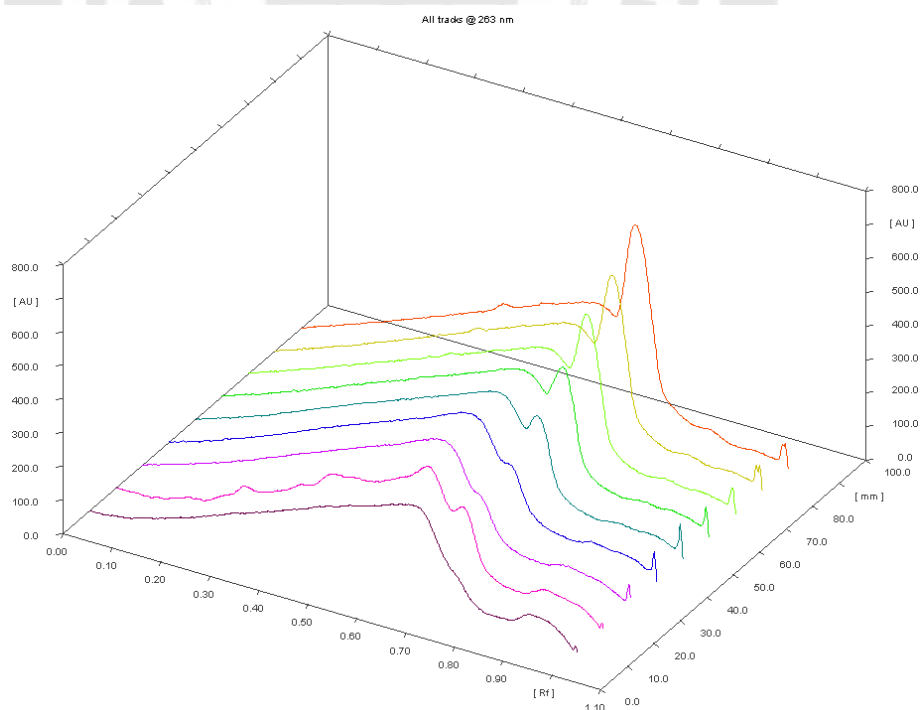
ภาพประกอบ 1 แสดง Calibration curve ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ ด้วยเทคนิค UV-VIS spectrophotometer ที่ 266 nm



ภาพประกอบ 2 แสดงสเปกตรัมของสารสกัดชุมเห็ดเทศ ที่ 266 nm



ภาพประกอบ 3 แสดง Calibration curve ของสารมาตรฐานอีไมดิน ด้วยเทคนิค High Performance Thin layer chromatography ที่ 263 nm



ภาพประกอบ 4 แสดงสเปกตรัมของสารมาตรฐานอีไมดิน ที่ 263 nm

วิธีคำนวณปริมาณอีโมดินของสารสกัดชุมเห็ดเทศ

จากสมการเส้นตรง $y = 2721.2X - 2554.3$

แทนค่า y ด้วยค่า Peak area $3622.63 = 2721.2X - 2554.3$

$$X = (3622.63 + 2554.3)/2721.63$$

$$X = 2.2698 \mu\text{g}$$

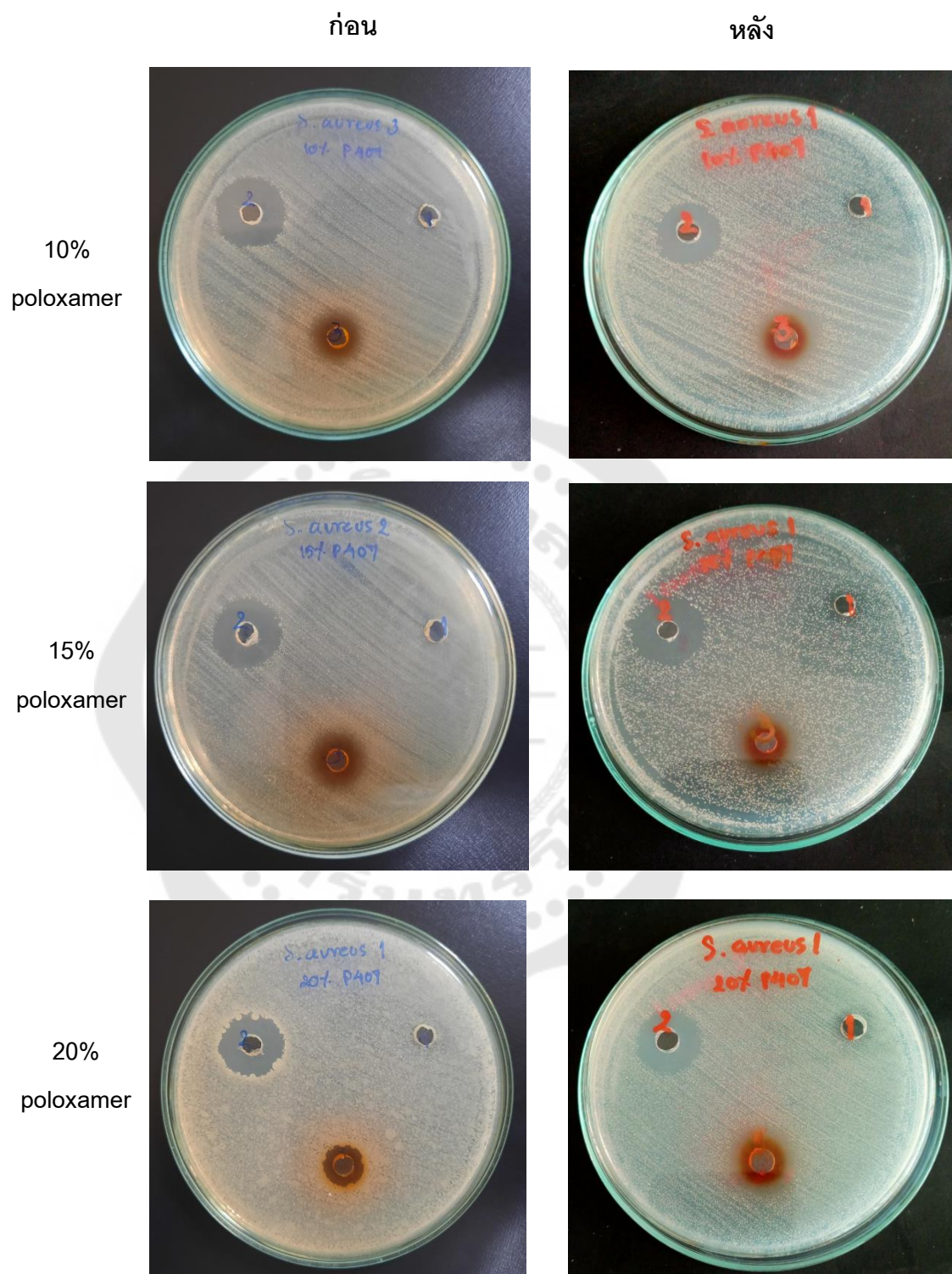
สารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.0107 g ละลายใน Methanol 1.07 ml ความเข้มข้น 10 mg/ml

สารสกัดชุมเห็ดเทศ 1000 μl มีเนื้อสารสกัด 10,000 μg

สารสกัดชุมเห็ดเทศ 10 μl มีเนื้อสารสกัด 100 μg

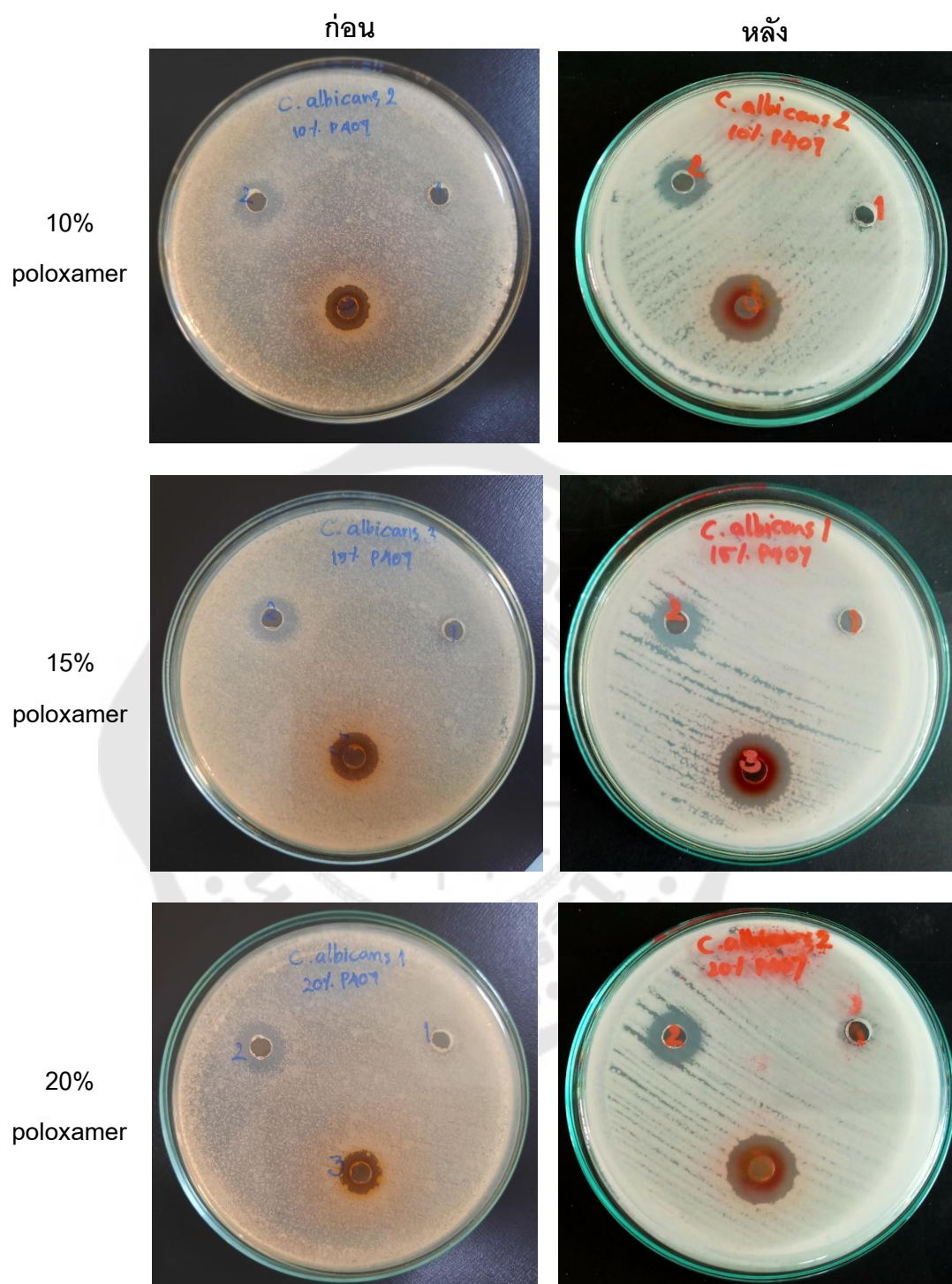
สารสกัดชุมเห็ดเทศ 100 μg มี emodin 2.27 μg คิดเป็น 2.27 %



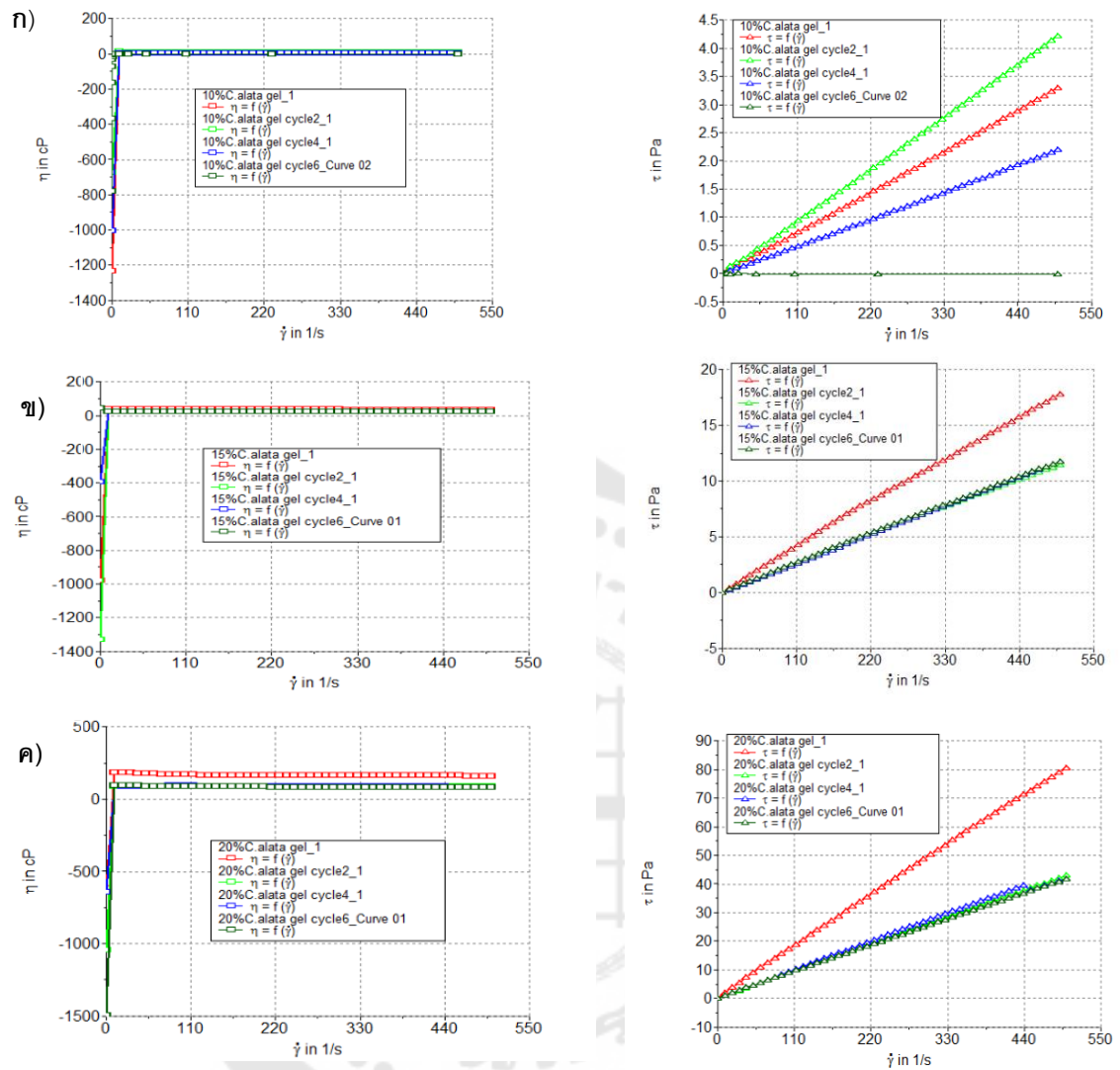


ภาพประกอบ 5 แสดงการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ก่อนและหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 40°C

หมายเหตุ หมายเลข 1: base gel, หมายเลข: 2 Amoxicillin 500 mg, หมายเลข: 3 ตำรับเจล



ภาพประกอบ 6 แสดงการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ก่อนและหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 40°C
หมายเหตุ หมายเลข 1: base gel, หมายเลข: 2 Clotrimazole, หมายเลข: 3 ตำรับเจด



ภาพประกอบ 7 รีโอแกรมความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืด ค่าความเค้นเฉือนและอัตราเค้นเฉือนของตำรับเจลผสมสารสกัดชุมเห็ดเทศร้อยละ 4 ทั้ง 3 ตำรับ หลังการทดสอบเสถียรภาพของ

ก) ตำรับ 1; ข) ตำรับ 2; ค) ตำรับ 3

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว สุชาดา เตียศรีพัฒนสุข
วัน เดือน ปี เกิด	30 สิงหาคม 2534
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.สิงห์บุรี
วุฒิการศึกษา	ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสิงห์บุรี ปริญญาตรี การแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 86 หมู่ที่ 6 ตำบลถอนสมอ อำเภอท่าช้าง จังหวัดสิงห์บุรี

