บทที่ 2

การทดลอง

เครื่องมือ

Autoclave (Model HA-3D No. 80055118, Hirayama Manufacturing Corporation Tokyo, Japan)

Blender (Waring blender)

Centrifuge (Sigma, USA)

Ostwald Viscometer (Thomas, Philadelphia, U.S.A.)

pH meter (El-HAMA Instruments)

Pycnometer (Thomas U.S.A.)

Spectrophotometer (Spectronic 2000, Bausch + Lomb)

สารที่ใช้

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

   Chloroform GR. (E. Merck)

2. สารปรับ pH

   Hydrochloric acid และ Sodium hydroxide

3. สารถนอม

   Methyl paraben และ Propyl paraben (UNO, JAPAN)

   Sodium benzoate (เนเธอร์แลนด์)

   Potassium sorbate (E. Merck)

   Bronopol$^{(R)}$ (Boots)

Bronidox L(R) (Henkel International GmbH Dusseldorf Dehydag Products, Germany)

4. Chelating agents

Citric acid (Merck)

Ethylene diamine tetraacetic acid(Merck)

5. สารต้านออกซิเดชัน

L-Ascorbic acid or Vitamin C (Merck)

Sodium metabisulfite (Merck)

Sodium bisulfite (Mallinckrodt)

Sodium sulfite (Merck)

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Soybean Casein Digest Agar, Sabouraud Dextrose Agar, Fluid Soybean Casein Digest Medium, Mannitol Salt Agar, Cetrimide Agar, Fluid Lactose, MacConkey Agar, Fluid Selenite-Cystine, Fluid Tetrathionate, Brilliant Green Agar, Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar, Bismuth sulfite Agar, Triple Sugar-Iron-Agar, Levine-Eosin-Methylene Blue Agar, Pseudomonas Agar Medium for Detection of Fluorescin, Pseudomonas Agar Medium for Detection of Pyocyanin, Bacto Agar (จาก Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)

7. สีย้อมเชื้อ

Gram Crystal Violet, Gram Safranin, Gram Iodine

8. สารที่ใช้เตรียมยาพ่นขี้ผึ้ง

Cholesterol(จาก E. Merck, Darmstadt)

Propylene glycol (จากบริษัท วิทยาศรม จำกัด)

Triethanolamine (จากบริษัทวันรัต จำกัด)

Cetyl alcohol, Carbopol 934, Glyceryl monostearate, Hydrogenated castor oil, Isopropyl myristate, Myristic acid, Mineral oil, Polyethylene Glycol 4000, Polyethylene Glycol 400, Sorbitol, Sodium lauryl sulfate, Span 60, Span 80, Stearyl alcohol, Tween 80, Tween 60, White wax, White petrolatum (จาก ห้างหุ้นส่วนจำกัดเภสัชวิทยาศาสตร์)

Bronidox L(R), Cutina AGS(R), Cutina GMS(R), Cutina MD(R), Cetiol HE(R), Dehydag wax N(R), Dehydag wax SX(R), Eumulgin C 700(R), Eumulgin C 1000(R), Eumulgin C 1500(R), Eutanol G(R), Myritol 318(R) (จาก Henkel International GmbH Dusseldorf Dehydag Products, Germany)

9. เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli., Salmonella typhi.(จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

10. อื่น ๆ

Monobasic potassium phosphate (Merck)

Folin-ciocalteau's phenol reagent (E. Merck)

N,N-di-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA.)

Tannin (Merck)

ว่านหางจระเข้

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเจลจากต้นว่านหางจระเข้

1.1 ล้างใบต้นว่านหางจระเข้ให้สะอาด

1.2 ใช้มีดผ่านใบว่านหางจระเข้ออกเป็น 2 ส่วนตามความยาวของใบ

014544

แล้วใช้ช้อนขูดเจลออกจากใบ จะได้เจลที่มีลักษณะเป็นแท่งวุ้นและน้ำเมือกปนกันมา

1.3 นำแท่งวุ้นและน้ำเมือกที่ได้ไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นผสม (Blender) จนได้เป็นเจลที่มีลักษณะเหลวคล้ายน้ำ

1.4 นำเจลที่ได้ไป Centrifuge ด้วยความเร็ว 4500 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที แยกเฉพาะส่วนใสไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาเสถียรภาพของเจลจากต้นว่านหางจระเข้

เตรียมเจลตามวิธีในข้อ 1. แล้วนำมาศึกษาสมบัติต่าง ๆ ทันทีหลังจากเตรียมเสร็จและเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 ดังนี้

2.1 วัด pH

2.2 วัดความหนืด

2.3 สังเกตดูการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์, สีและกลิ่นที่เปลี่ยนแปลงไป

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาจำนวนและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในเจล

เตรียมเจลแล้วแบ่งเป็น 12 ส่วน ดังนี้

ก. เจลที่ไม่เติมสารถนอม

ข. เจลที่เติม Methyl paraben ร้อยละ 0.2 และ Propyl paraben ร้อยละ 0.02 ของเจล

ค. เจลที่เติม Sodium benzoate ร้อยละ 0.05, 0.075, 0.1w/v

ง. เจลที่เติม Potassium sorbate ร้อยละ 0.025, 0.05, 0.1 w/v

จ. เจลที่เติม Bronopol$^{(R)}$ ร้อยละ 0.01, 0.015, 0.02% w/v

ฉ. เจลที่เติม Bronidox L$^{(R)}$ ร้อยละ 0.2 w/v

ศึกษาจำนวนและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนใส่สารถนอมและภายหลังจากที่ใส่สารถนอมชนิดต่าง ๆ ในช่วงเวลา 1, 15, 30, 60 วัน ตามลำดับ โดยทดสอบ

ตามวิธีของ USP XXI[15]

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพของ Chelating agents

4.1 นำเจลใสที่มี Bronidox L[R] ร้อยละ 0.2 w/v มาแบ่งเป็น 7 ส่วน ดังนี้

ก. เจลที่ไม่เติม chelating agents

ข. เจลที่เติม Citric acid ร้อยละ 0.05, 0.075, 0.1 w/v

ค. เจลที่เติม EDTA ร้อยละ 0.05, 0.075, 0.1 w/v

วัด pH, ความหนืด, สังเกตการเปลี่ยนสี, และวิเคราะห์หาปริมาณของ phenolic compounds โดย Colorimetric method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ J.D.Box[25] แล้วเปรียบเทียบกับเจลที่ไม่ได้เติม chelating agents

ทำการทดสอบที่เวลา 0 ถึง 12 วัน ทั้งในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 40°C ห้องและอุณหภูมิ 40 °C

วิธีการ

1. เตรียมเจลที่มี chelating agents ชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันดังที่กล่าวมาแล้ว

2. นำเจลในข้อ 1 มา 3.0 ml เติมน้ำกลั่นจำนวน 7.0 ml, สารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 1 N จำนวน 1.5 ml และ Folin-ciocalteau's Phenol reagent 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง

3. นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย Spectronic 2000 ที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร

หมายเหตุ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนเจลแล้วเติม Bronidox L[R] ร้อยละ 0.2 w/v จากนั้นแบ่งเป็นส่วน ๆ นำมาเติม chelating agents ชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันเหมือนในเจล

4.2 ทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย tannin ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08 mg/ml ตามลำดับ แล้วนำมาเติม reagent วัดการดูดกลืนแสงที่ 720 นาโนเมตร เช่นเดียวกับข้อ 4.1

ขั้นตอนที่ 5 ศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน

5.1 นำเจลใสมาเติม Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2 w/v และ EDTA ร้อยละ 0.05 w/v แล้วแบ่งเป็น 13 ส่วน ดังนี้

ก. เจลที่ไม่เติมสารต้านออกซิเดชัน

ข. เจลที่เติม L-ascorbic acid ร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 w/v ของเจล

ค. เจลที่เติม Sodium metabisulfite ร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 w/v ของเจล

ง. เจลที่เติม Sodium bisulfite ร้อยละ 0.05, 0.1 0.2 w/v ของเจล

จ. เจลที่เติม Sodium sulfite ร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 w/v ของเจล

วัด pH, ความหนืด, การเปลี่ยนสี, และปริมาณ phenolic compounds โดย Spectrophotometric method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Disinger, J. and Manahan, S.E. (26) เปรียบเทียบกับเจลที่มีแต่สารถนอมและ chelating agents

ทำการทดสอบที่เวลา 0 ถึง 25 วัน ทั้งในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 40°C

วิธีการ

1. เตรียมเจลที่มีสารต้านออกซิเดชันชนิดและปริมาณต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว

2. นำเจลในข้อ 1 มา 5 ml เติมกรดไฮโดรคลอริค เพื่อให้ได้ pH ประมาณ 2 โดย pH paper

3. เติม Chloroform จำนวน 5 ml โดยแบ่งเติม 3 ครั้ง ๆ ละ 2, 2 และ 1 ml ตามลำดับ สกัดครั้งละ 10 นาที

4. นำชั้น Chloroform มารวมกันแล้วสกัดด้วยสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.01 N จำนวน 5 ml โดยแบ่งเติม 3 ครั้ง ๆ ละ 2, 2 และ 1 ml ตามลำดับ สกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.

5. นำชั้น Sodium hydroxide มารวมกันแล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

หมายเหตุ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนเจลเติม Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2 w/v และ EDTA ร้อยละ 0.05 w/v จากนั้น แบ่งเป็นส่วน ๆ นำมาเติมสารต้านออกซิเดชันชนิดและปริมาณต่าง ๆ เหมือนกับในเจล

5.2 ทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย tannin ใน Sodium hydroxide 0.01 N ให้มีความเข้มข้น 0.004, 0.008, 0.01, 0.012, 0.014, 0.016, 0.02 mg/ml นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร ทันที

ขั้นตอนที่6 การเตรียมยาขี้ผึ้งของเจลจากต้นว่านหางจระเข้

6.1 ศึกษาความเข้ากันได้ของเจลกับยาพื้นขี้ผึ้ง

ทดสอบดังนี้

วิธีการ

1. เตรียมยาพื้นขี้ผึ้งชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการในภาคผนวก ง. ปริมาณอย่างละ 25 กรัม ดังนี้

1.1 Hydrophilic Petrolatum USP (Absorption ointment bases)

1.2 Hydrophilic ointment USP (O/W Emulsion ointment bases)

1.3 Polyethylene Glycol ointment USP (Water soluble ointment bases)

2. ผสมเจล 25 ml เข้ากับยาพื้นแต่ละชนิดโดยใช้โกร่งและลูกโกร่ง วัดปริมาตรของเจลที่เข้ากันได้กับยาพื้นขี้ผึ้งแต่ละชนิด

6.2 การปรับปรุงสูตรยาพื้นขี้ผึ้งที่เข้ากันได้กับเจล

ปรับปรุงสูตรตำรับ o/w emulsion โดยใช้ emulsifying agents เป็นหลัก 6 กลุ่มคือ

1. ใช้ Tween 80 + Span 80
2. ใช้ Tween 60 + Span 60
3. ใช้ Eumulgin C 700
4. ใช้ Eumulgin C 1000
5. ใช้ Eumulgin C 700 + Eumulgin C 1000
6. ใช้ Eumulgin C 700 + Eumulgin C 1000 + Eumulgin C 1500

แล้วเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในตำรับแต่ละกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 จำนวน 22 ตำรับ, กลุ่มที่ 2 จำนวน 3 ตำรับ, กลุ่มที่ 3 จำนวน 3 ตำรับ, กลุ่มที่ 4 จำนวน 6 ตำรับ, กลุ่มที่ 5 จำนวน 23 ตำรับ, กลุ่มที่ 6 จำนวน 2 ตำรับ รวม 59 ตำรับ คัดเลือกตำรับที่ดีในแต่ละกลุ่มคือ A,B,C,D,E,F (ภาคผนวก ง หน้า 96) มาเตรียมยาขี้ผึ้งของเจลจากต้นว่านหางจระเข้โดยใช้เจลแทนที่น้ำในสูตรตำรับให้มีความเข้มข้นของเจลในตำรับสูงสุด มีเสถียรภาพดี, ลักษณะสวยงามน่าใช้ การทดสอบเสถียรภาพทำโดยวิธี Freeze and Thaw[27] 2 วงจร ดังนี้คือ อบยาขี้ผึ้งในตู้อบอุณหภูมิ 45°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 10°C นาน 24 ชั่วโมง เรียกเป็น 1 วงจร

ขั้นตอนที่ 7 การทดสอบความคงตัวของยาขี้ผึ้งของเจล

การทดสอบทำโดยนำยาขี้ผึ้งที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 6 และมีความเข้มข้นของเจลสูงที่สุด คือร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก มาปรับปรุงโดยเติมสารปรุงแต่งต่าง ๆ ได้แก่ สารถนอม, chelating agents, สารต้านออกซิเดชัน ทดสอบเสถียรภาพเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับยาขี้ผึ้งของเจลจากต้นว่านหางจระเข้ที่ไม่มีสารปรุงแต่งดังกล่าว

วิธีการ

1. การเปรียบเทียบผลของสารถนอมในยาขี้ผึ้ง

1.1 เตรียมยาขี้ผึ้งที่มีความเข้มข้นของเจลร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก 2 ตำรับ

โดยใช้ยาพื้นขี้ผึ้ง สูตร C ตำรับหนึ่งใช้ Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2 เป็นสารถนอม อีกตำรับไม่เติมสารถนอม

1.2 บรรจุยาขี้ผึ้งแต่ละตำรับ ลงในขวดแก้วปากกว้างขนาด 1 ออนซ์ ปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 สังเกตการเปลี่ยนแปลง สี, กลิ่น, และการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในยาขี้ผึ้งทั้งสองตำรับทุกวัน

2. การเปรียบเทียบผลของสารต้านออกซิเดชันและ chelating agents ในยาขี้ผึ้ง

2.1 เตรียมยาขี้ผึ้งที่มีความเข้มข้นของเจลร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ขั้น 2 ตำรับ ใช้ยาพื้นขี้ผึ้งสูตร C

2.1.1 ตำรับที่ 1 เติม Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2, EDTA ร้อยละ 0.05, และ Sodium metabisulfite ร้อยละ 0.1

2.1.2 ตำรับที่ 2 เติมสารปรุงแต่งเฉพาะ Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2

2.2 บรรจุยาขี้ผึ้งแต่ละตำรับ ลงในขวดแก้วปากกว้างขนาด 1 ออนซ์ ปิดฝาให้สนิท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น สี, กลิ่น ทุกวัน

2.4 วิเคราะห์หาปริมาณของ phenolic compounds ด้วยวิธีการเดียวกับขั้นตอนที่ 5

ทำการทดสอบที่เวลา 0 ถึง 60 วัน

หมายเหตุ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนเจลในการเตรียมยาขี้ผึ้ง โดย blank ที่ 1 เติม Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2, EDTA ร้อยละ 0.05 และ Sodium metabisulfite ร้อยละ 0.1 ส่วน blank ที่ 2 เติมเฉพาะ Bronidox L(R) ร้อยละ 0.2 แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย