



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมตำรับยาสมานแผลเพื่อรักษาแผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน Development of Ya-Sa-Marn-Phlae-containing dressings for diabetic ulcer treatment

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.ศศิธร ชูศรี	คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รองศาสตราจารย์ ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อาจารย์อรพรรณ สกุลแก้ว	คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ	คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อาจารย์กชกร สุขจันทร์	คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
แพทย์แผนไทยธีรวัฒน์ สูดขาว	โรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดย

แผนงานส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยที่มุ่งเป้าตอบสนองความต้องการในการพัฒนาประเทศ
กลุ่ม สมุนไพรไทย อาหารเสริม และสปา
สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

ชื่อผลงานวิจัย

(ภาษาไทย): การพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมตำรับยาสมานแผลเพื่อรักษาแผลในผู้ป่วยเบาหวาน

(ภาษาอังกฤษ): Development of Ya-Sa-Marn-Phlae-containing dressing for diabetic ulcer treatment

โดย: ผศ.ดร.ศศิธร ชูศรี อาจารย์อรรถพรธณ สกุลแก้ว รศ.ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล และดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

หน่วยงานต้นสังกัด: คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทสรุปผลงาน 1 ปี (ปี2558) เทียบแผนและผลการดำเนินงาน

ปีที่	เดือนที่	ผลงานที่สำเร็จ
1	1-6	ผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพรในรูปแบบและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน
	7-12	ผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพร ที่มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสม มีความคงตัว และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

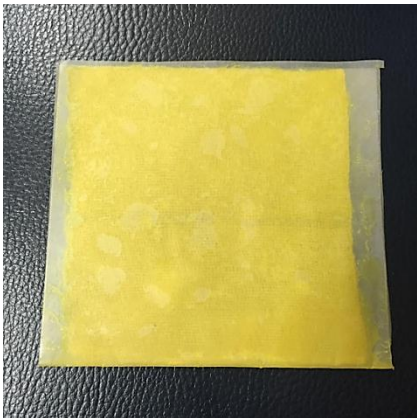
กิจกรรม	ระยะเวลาในการดำเนินงาน (เดือน)						ผู้รับผิดชอบ
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	
1. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นปิดแผลสมุนไพร - การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล - การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นปิดแผลสมุนไพร - การประเมินลักษณะทางกายภาพของแผ่นปิดแผลสมุนไพร - การทดสอบความคงตัว	↔	↔					สนั่น อรรถพรธณ
2. ตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลของแผ่นปิดแผลสมุนไพร	↔	↔					สุรศักดิ์ ศศิธร

คุณลักษณะสำคัญของผลงาน/จุดเด่น

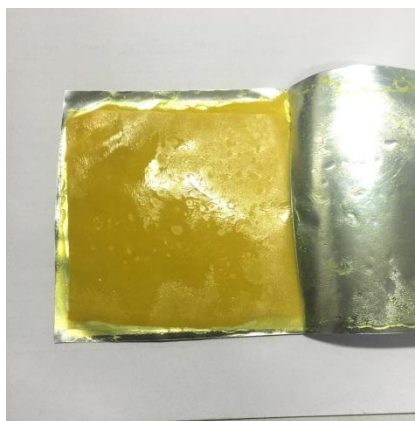
เป็นแผ่นปิดแผลที่เตรียมจากตำรับยาแผนไทย คือ “ตำรับยาสมานแผล” ซึ่งเตรียมจากสมุนไพรที่มีการควบคุมคุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย ต้านการก่อตัวของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดแผลติดเชื้อเรื้อรัง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพระบุชัดเจน แผ่นบรรจุอยู่ในซองปราศจากเชื้อ มีความสะดวกในการนำไปใช้ และเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การนำไปใช้ประโยชน์ (เชิงสังคม และ/หรือเชิงเศรษฐกิจ)

สามารถนำไปใช้ปิดบริเวณแผลทั้งแผลทั่วไปและแผลในผู้ป่วยเบาหวาน โดยแผ่นปิดแผลดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ส่งเสริมการหายของแผลและป้องกันการเกิดแผลติดเชื้อเรื้อรัง โดยสมุนไพรองค์ประกอบที่นำมาผลิตเป็น “ตำรับยาสมานแผล” นั้น เป็นวัตถุดิบสมุนไพรท้องถิ่น ซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะมีผลต่อการพัฒนาและส่งเสริมการใช้ตำรับยาสมานแผล ส่งเสริมการจำหน่ายวัตถุดิบสมุนไพรท้องถิ่น



ลักษณะแผ่นตัวอย่างผลิตภัณฑ์ gauze ที่เคลือบด้วยยาพื้นสมานแผลบนกระดาษไขก่อนบรรจุบรรจุภัณฑ์ที่บับแสง



แสดงแผ่นปิดแผลในบรรจุภัณฑ์ที่บับแสง ซึ่งปิดปากถุงแบบสุญญากาศและแผ่นปิดแผล เมื่อเปิดบรรจุภัณฑ์ที่บับแสง

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมตำรับยาสมานแผลเพื่อรักษาแผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

(ภาษาอังกฤษ) Development of Ya-Sa-Marn-Phlae-containing dressings for diabetic ulcer treatment

ชื่อคณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี (หัวหน้าโครงการ)

คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 07428-2722 โทรสาร 074-282709 E-mail sasitorn.chu@psu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัยประกอบด้วย

รองศาสตราจารย์ ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาจารย์อรพรรณ สุกุลแก้ว คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาจารย์กชกร สุขจันทร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

แพทย์แผนไทยธีรวัฒน์ สุขขาว โรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งบประมาณทั้งโครงการ

957,000.

บาท

ระยะเวลาดำเนินงาน

1.

ปี

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะพัฒนารูปแบบของยาสมานแผลให้อยู่ในรูปของแผ่นปิดแผล ทดแทนรูปแบบซึ่งคณะผู้วิจัยเคยทำไว้ในรูปแบบยาน้ำมันสกัด ซึ่งอาจจะสามารถทดแทนการปิดด้วยผ้าก๊อซ หรือผลิตภัณฑ์ hydrocolloid ทำให้ผู้ป่วยสามารถใช้ผลิตภัณฑ์นี้ปิดแผลที่ผลิตได้เอง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศ และใช้วัตถุดิบในท้องถิ่น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยแล้ว จะสามารถจัดทรัพย์สินทางปัญญาในส่วนของผู้ผลิตผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลที่มีส่วนผสมของตำรับยาสมานแผลเบื้องต้นนั้นคณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย กลไกการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษและฤทธิ์อื่นๆ ในการสมานแผลของตำรับยาไทยต่อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของติดเชื้อทางผิวหนังที่สำคัญ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในการรักษาด้วยตำรับยาไทย อันก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการส่งเสริมและพัฒนาสุขภาพของประชาชนให้ดีขึ้นตามนโยบายสาธารณสุขของประเทศ จากผลการศึกษาตำรับยารักษาบาดแผลจำนวน 11 ตำรับ พบว่า สารสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลของตำรับยาสมานแผล ประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด คือ มังคุด, ขมิ้นชัน, หมากรุก และข้าวสาร มีฤทธิ์ในการต้าน *S. aureus* สายพันธุ์ MRSA, MSSA และ ATCC 25923 ได้ผลดี โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 4, 8 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าตำรับยาดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ไม่มีความสามารถในการฆ่า *S. aureus* และเมื่อนำไปทดสอบหาผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยทดสอบความสามารถในทนเกลือของเชื้อหลังจากให้สารสกัด พบว่า ตำรับยาดังกล่าวไม่มีผลต่อความสามารถในการทนเกลือของ MRSA NPRC R001 และ MSSA NPRC S003 แต่มีผลต่อความสามารถในการทนเกลือของ *S. aureus* ATCC 25923 เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป นอกจากนี้ตำรับยาดังกล่าวยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 71.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 193.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ hydroxyl ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับอีก 2 ตำรับ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.24 และ 13.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการศึกษาความเป็นพิษ ซึ่งทดลองใน vero cell พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ ellipticine ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาสูตรตำรับรักษาบาดแผลเรื้อรัง ตำรับยาสมานแผลซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหมอสุมพร ชาญวนิชย์สกุล (รหัสตำรับยาที่ใช้ในการศึกษาคือ THR-SK010) ประกอบด้วยพืชสมุนไพรท้องถิ่นจำนวน 4 ชนิด คือ เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.), เมล็ดหมากสง (*Areca catechu* L.), ข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) และ เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) หมอพื้นบ้านจะใช้โดยการตำพอกบริเวณบาดแผล โดยคณะผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) เพื่อพัฒนาสูตรตำรับยาสมานแผลในการใช้รักษาแผลติดเชื้อเรื้อรังในผู้ป่วยเบาหวาน โดยจากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าตำรับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน (hot oil extraction) และสารสกัดจากตำรับยานี้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง สามารถยับยั้งและทำลายไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพช่วยสมานแผลในผู้ป่วยเบาหวาน โดยผลงานการวิจัยดังกล่าวได้เผยแพร่เป็นนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 3 เรื่อง ใน

วารสารซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล ISI โดยยาน้ำมันสมานแผลและกรรมวิธีเตรียมยาน้ำมันดังกล่าว ได้ยื่นขอจดอนุสิทธิบัตรเรียบร้อยแล้ว

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ของตำรับยาสมานแผลเพื่อใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อเรื้อรังในผู้ป่วยเบาหวาน

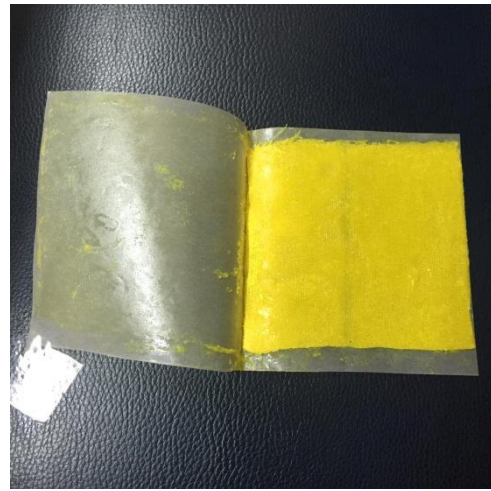
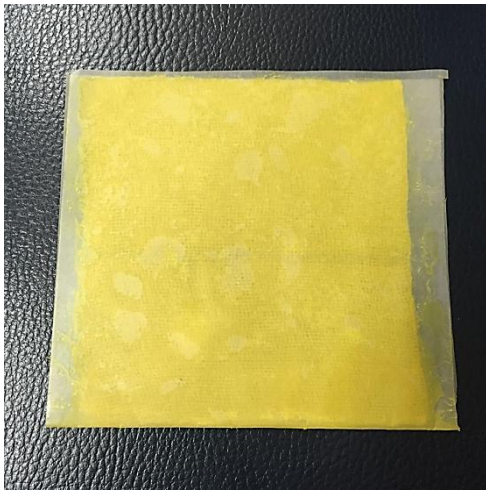
ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (* แผนในปีที่ 2 และ 3 ยังไม่ได้รับสนับสนุน)

กิจกรรม	ระยะเวลาในการดำเนินงาน (เดือน)						ผู้รับผิดชอบ
	1-6	7-12	13-18*	19-24*	25-30*	31-36*	
<p>1. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นปิดแผลสมุนไพร</p> <p>- การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล</p> <p>- การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นปิดแผลสมุนไพร</p> <p>- การประเมินลักษณะทางกายภาพของแผ่นปิดแผลสมุนไพร</p> <p>- การทดสอบความคงตัว</p>	<p>↔</p> <p>↔</p> <p>↔</p> <p>↔</p> <p>↔</p>	<p>↔</p> <p>↔</p>					<p>สนั่น</p> <p>อรพรรณ</p>
2. ตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแผ่นปิดแผลสมุนไพร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		<p>↔</p> <p>↔</p>	<p>↔</p>				<p>สุรศักดิ์</p> <p>ศศิธร</p>
3. การศึกษาฤทธิ์ของแผ่นปิดแผลสมุนไพรต่อการหายของแผลติดเชื้อในสัตว์ทดลอง			<p>↔</p>				<p>กชกร</p> <p>นงลักษณ์</p>
4. ประเมินประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลสมุนไพรในระดับคลินิก					<p>↔</p>	<p>↔</p>	<p>ศศิธร</p> <p>ธีรวัฒน์</p>
5. นำเสนอผลงานวิจัย		<p>↔</p>		<p>↔</p>		<p>↔</p>	ศศิธรและคณะ
6. จัดเตรียมและตีพิมพ์ข้อมูลจากการวิจัย		<p>↔</p>		<p>↔</p>		<p>↔</p>	ศศิธรและคณะ

ตารางผลงานในแต่ละช่วงเวลา (* แผนในปีที่ 2 และ 3 ยังไม่ได้รับสนับสนุน)

ปีที่	เดือนที่	ผลงานที่คาดว่าจะสำเร็จ	ดำเนินการแล้วเสร็จ
1	1-6	ผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพรในรูปแบบและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	100%
	7-12	ผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพร ที่มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสม มีความคงตัว และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี	100%
2*	1-6	ประเมินประสิทธิภาพการรักษาแผลเบาหวานในสัตว์ทดลอง	NA
	7-12	ประเมินประสิทธิภาพการรักษาแผลเบาหวานที่มีการติดเชื้อในสัตว์ทดลอง	NA
3*	1-6	ประเมินประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยของผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพรเป็นกรณีศึกษา	NA
	7-12	ประเมินประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยของผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลสมุนไพรในโรงพยาบาลต้นแบบ	NA

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการวิจัยโดยสังเขป



รูปที่ R1 แสดงแผ่นตัวอย่างผลิตภัณฑ์ gauze ที่เคลือบด้วยยาพื้นสमानแผล และแผ่นปิดแผลในบรรจุภัณฑ์ที่บ่งแสง ด้วยวิธีปิดปากถุงแบบสุญญากาศ

ตอนที่ 1 การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล

1.1 การหาปริมาณสิ่งปนเปื้อน (Determination of foreign matter)

สุ่มตรวจผงสมุนไพรในตำรับ THR-SK010 แต่ละชุดการทดลอง จำนวน 100 กรัม นำมาเกลี่ยในภาชนะแบนราบ ตรวจหาและคัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยแว่นขยาย ชั่งน้ำหนักสิ่งแปลกปลอมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วคำนวณหาร้อยละของสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ปริมาณสิ่งแปลกปลอมตามสูตร

$$\text{ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (\% w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม (g)}}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น (g)}} \times 100$$

1.2 การหาปริมาณความชื้น (Loss of drying)

ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ใน plate ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เเผาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ตู้ดูดความชื้นด้วยโถดูดความชื้น (desiccators) 30 นาที ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณความชื้นตามสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\% w/w)} = \frac{(W1 - W2)}{(W1 - W)} \times 100$$

1.3 การหาปริมาณเถ้ารวม (Total ash)

เผาเบ้าเคลือบและฝา (crucible) ที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccators) เป็นเวลานาน 30 นาทีและชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ และบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำผงสมุนไพรปริมาณ 4 กรัมใส่ใน crucible จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccators) เวลา 30 นาที ชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนัก ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณเถ้ารวมทั้งหมดของผงสมุนไพรตามสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้ารวมทั้งหมด (\% w/w)} = \left[\frac{A - B}{W} \right] \times 100$$

1.4 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid-insoluble ash)

นำ Total ash จากการข้อ 2.3. เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 10 มิลลิลิตรในปิ๊กเกอร์ ปิดฝาแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองส่วนที่ไม่ละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนตะกอนเป็นสีขาวหรือไม่มีสี นำกระดาษกรองที่กรองแล้วใส่ใน crucible ที่มีน้ำหนักที่แน่นอน นำเข้าเตาเผา อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่ใน โถดูดความชื้น (desiccators) เวลา 30 นาที ชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนัก ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของผงสมุนไพร ตามสูตร

$$\text{ปริมาณเอ้ารวมทั้งหมด (\% w/w)} = [(A - B) / W] \times 100$$

1.5 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล (Ethanol-soluble extractive)

ชั่งผงสมุนไพร 5 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บรรจุในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 95% เอธานอล 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) เชย่ต่อเนือ่ง 6 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองอย่างรวดเร็วด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอลที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล (\%W/W)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดในภาชนะ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น(g)}}$$

1.6 การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (water-soluble extractive)

ชั่งผงสมุนไพร 5 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บรรจุในขวดวัดปริมาตร (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม chloroform water 100 มิลลิลิตร ปิดด้วย พาราฟิล์ม (parafilm) เชย่ต่อเนือ่ง 6 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองอย่างรวดเร็วด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยบน water bath แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (\%W/W)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดในภาชนะ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น(g)}}$$

1.7 การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย (volatile oil content)

ใช้ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยตามที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ชั่งผงสมุนไพร 10 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บรรจุในขวดก้นกลม เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร เชย่เบาๆเข้ากัน ประกอบชุดกลั่น โดยเติมน้ำลงใน graduate tube จนถึงระดับปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม xylene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และต้มด้วยความร้อนที่ 130-150 องศาเซลเซียส จนน้ำเริ่มเดือด ปรับความร้อนให้ได้อัตราเร็วในการกลั่น 2-3 มิลลิลิตรต่ออนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปิดเครื่อง ทำความร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง (ประมาณ 15 นาที) ไซให้น้ำใน graduate tube ไหลออกซ้าๆ จนกระทั่งระดับของสารละลายผสม xylene และน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ preparation line ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ระดับของสารละลายผสม xylene และน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ระดับ 0 อ่านปริมาตรของสารละลายผสมของ xylene และน้ำมันหอมระเหยเป็น มิลลิลิตร นำปริมาตรของ xylene (เป็นมิลลิลิตร) หักลบออกจากปริมาตรของสารละลายผสม xylene และน้ำมันหอมระเหย ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (\%V/W)} = \frac{[\text{ปริมาตรน้ำที่อ่านได้} - 2 \text{ (mL)}] \times 100}{\text{น้ำหนักผงขมิ้นชันเริ่มต้น (g)}}$$

1.8 การหาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid content)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน 2 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 5.0 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) หา Standard curve ของเคอร์คูมิน โดยดูดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette) ปริมาตร 20, 40, 50, 60 และ 80 ไมโครลิตรตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (methanol) จนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมตัวอย่าง ชั่งผงขมิ้นชันน้ำหนัก 300 มิลลิกรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรจากนั้นเติม Tetrahydrofuran จนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง โดยเขย่าบ่อยๆ ดูดสารละลายใสของสารละลายตัวอย่างด้วย เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (methanol) จนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลาย มา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (methanol) จนครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเคอร์คูมินอยด์โดยใช้กราฟมาตรฐาน

1.9 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซน (hexane-soluble extractive)

ชั่งผงสมุนไพร 2 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ในหลอดกระดาษสำหรับการสกัด (thimble) เติมเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดแก้วกันกลมสำหรับรองรับการสกัด ทำการสกัดสารอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 ชม. นำสารสกัดที่ได้ใส่ในภาชนะกระเบื้องเคลือบ (porcelain dish) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน วางให้เกิดการระเหยอย่างอิสระและนำมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) 18 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซนที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซน (\%w/w)} = \frac{[(\text{น้ำหนักภาชนะ} + \text{น้ำหนักสารสกัด}) - \text{น้ำหนักภาชนะ}] \text{ (g)} \times 5}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น (g)}}$$

1.10 การหาปริมาณแทนนิน (determination of tannin)

ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (เรียกว่า W) ใส่ใน conical flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบนหม้ออังไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็น ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งให้ตกตะกอน จากนั้นจึงกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ปิเปต สารละลายสารสกัดข้างต้น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไป

ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง ชนิดสูญญากาศ (evaporator) จากนั้นนำเข้าสู่อบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ที่ได้ เรียกว่า T1 ปิดเตา สารละลายสารสกัดข้างต้น 80 มิลลิลิตร เติม hide powder 6 กรัม เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปิดเตาสารที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วย evaporator จากนั้นนำเข้าสู่อบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ที่ได้ เรียกว่า T2

ชั่ง hide powder 6 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ใน conical flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปิดเตาสารที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วย evaporator จากนั้นนำเข้าสู่อบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ที่ได้ เรียกว่า T0

คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณแทนนินตามสูตร

$$\text{ปริมาณแทนนิน (\%w/w)} = \frac{[T1-T2+T0] \times 5 \times 100}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น (g)}}$$

จากผลการทดสอบพบว่า *C. longa* และ *A. catechu* มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานของสมุนไพรใน Thai Herbal Pharmacopoeia และ *O. sativa* มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานของสมุนไพรใน Ayurvedic pharmacopoeia of India ในส่วนของ *G. mangostana* ไม่พบเกณฑ์มาตรฐานของสมุนไพร แต่อย่างไรก็ตามได้ทำการทดลองโดยอ้างอิงวิธีการจาก Thai Herbal Pharmacopoeia แสดงดัง ตารางที่ 1 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

จากการตรวจสอบมาตรฐานของขมิ้นชัน พบว่า มีลักษณะเป็นไปตามข้อกำหนดใน Thai Herbal Pharmacopoeia ร้อยละปริมาณสิ่งปนเปื้อนเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 0.0648 % w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 2.0 %w/w) การหาปริมาณความชื้นเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 7.1015 % v/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 10.0 % v/w) การหาปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ทั้งหมดจากการเผาผงขมิ้นชันในภาวะควบคุม พบว่า ร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 5.6908 % w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 8.0 % w/w) การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 0.1858 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 1.0 %w/w) การหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 24.3941 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 10.0 %w/w) การหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำเทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 27.99 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 9.0 %w/w) การหาปริมาณร้อยละของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 7.33 %v/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 6.0 %v/w) และการหาปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ เทียบกับน้ำหนักผงขมิ้นชันเท่ากับ 6.69 %v/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 5.0 %v/w)

จากการตรวจสอบมาตรฐานหมากพบว่า มีลักษณะเป็นไปตามข้อกำหนดใน Thai Herbal Pharmacopoeia ร้อยละปริมาณสิ่งปนเปื้อนเทียบกับน้ำหนักผงหมาก เท่ากับ 0.0150 ± 0.0201 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 0.1 %w/w) การหาปริมาณความชื้น เทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 3.8634 ± 0.6412 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 2.0 %w/w) การหาปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ทั้งหมดจากการเผาผงหมากในภาวะควบคุม พบว่า ร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 1.7325 ± 0.0241 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 2.0 %w/w) การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 0.1350 ± 0.0109 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≤ 1.0 %w/w) การหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลเทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 26.2826 ± 1.7163 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 25.0 %w/w) การหาปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยน้ำเทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 22.7329 ± 0.7521 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 10.0 %w/w) การหาปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยเฮกเซนเทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 11.7417 ± 0.9104 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 5.0 %w/w) และการหาปริมาณสารแทนนิน เทียบกับน้ำหนักผงหมากเท่ากับ 49.9174 ± 0.953 %w/w ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (≥ 24.0 %w/w)

จากการตรวจสอบมาตรฐานมังคุดพบว่า ร้อยละปริมาณสิ่งปนเปื้อนเทียบกับน้ำหนักผงมังคุด เท่ากับ 0.0281 ± 0.0054 %w/w การหาปริมาณความชื้น เทียบกับน้ำหนักผงมังคุดเท่ากับ 3.4896 ± 0.0450 %w/w การหาปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ทั้งหมดจากการเผาผงมังคุดในภาวะควบคุม พบว่า ร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงมังคุดเท่ากับ 2.8983 ± 0.6616 %w/w การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงมังคุดเท่ากับ 0.2208 ± 0.0350 %w/w การหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลเทียบกับน้ำหนักผงมังคุดเท่ากับ 11.9666 ± 0.4136 %w/w การหาปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยน้ำเทียบกับน้ำหนักผงมังคุดเท่ากับ 20.0135 ± 0.2793 %w/w

จากการตรวจสอบมาตรฐานข้าวพบว่า ร้อยละปริมาณสิ่งปนเปื้อนเทียบกับน้ำหนักผงข้าว เท่ากับ 0.0125 ± 0.0063 %w/w การหาปริมาณความชื้น เทียบกับน้ำหนักผงข้าวเท่ากับ 5.4397 ± 0.5826 %w/w การหาปริมาณเถ้าที่เหลืออยู่ทั้งหมดจากการเผาผงข้าวในภาวะควบคุม พบว่า ร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงข้าวเท่ากับ 2.2633 ± 0.1233 %w/w การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักผงข้าวเท่ากับ 0.1433 ± 0.0314 %w/w การหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลเทียบกับน้ำหนักผงข้าวเท่ากับ 4.0760 ± 0.4712 %w/w การหาปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยน้ำเทียบกับน้ำหนักผงข้าวเท่ากับ 3.5190 ± 0.5286 %w/w

ตารางที่ 1 Physicochemical parameters of herbal components of Ya-Samarn-Phlae (YSP).

Parameters	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Areca catechu</i> L.	<i>Garcinia mangostana</i> L.	<i>Oryza sativa</i> L.
Foreign matter (%w/w)	0.06±0.03 (≤2.00) ^a	0.01±0.02 (≤1.00) ^a	0.03±0.01	0.01±0.01 (≤2.00) ^b
Loss on drying (%v/w)	7.10±0.16 (≤10.00) ^a	3.86±0.64 (≤12.00) ^a	3.49±0.04	NA
Total ash content (%w/w)	5.69±0.74 (≤8.00) ^a	1.73±0.02 (≤2.00) ^a	2.90±0.66	2.26±0.12 (≤6.00) ^b
Acid-insoluble ash (%w/w)	0.19±0.01 (≤1.00) ^a	0.14±0.01 (≤1.00) ^a	0.22±0.03	0.14±0.03 (≤5.00) ^b
Ethanol-soluble extractive (%w/w)	24.09±0.54 (≥10.00) ^a	26.28±1.71 (≥25.00) ^a	11.97±0.41	4.08±0.47 (≥1.00) ^b
Water-soluble extractive (%w/w)	27.99±1.08 (≥9.00) ^a	24.75±0.09 (≥10.00) ^a	20.01±0.28	3.38±0.05 (≥1.00) ^b
Hexane-soluble extractive (%w/w)	NA	11.74±0.91 (≥5.00) ^a	NA	NA
Tannin content (%w/w)	NA	49.91±0.93 (≥24.00) ^a	NA	NA
Volatile oil content (%v/w)	7.33±0.58 (≥6.00) ^a	NA	NA	NA
Curcuminoid content (%w/w)	6.69±0.43 (≥5.00) ^a	NA	NA	NA

NA=Not applicable

^aStandard parameters described in Thai Herbal Pharmacopoeia; ^b Standard parameters described in Ayurvedic pharmacopoeia of India.

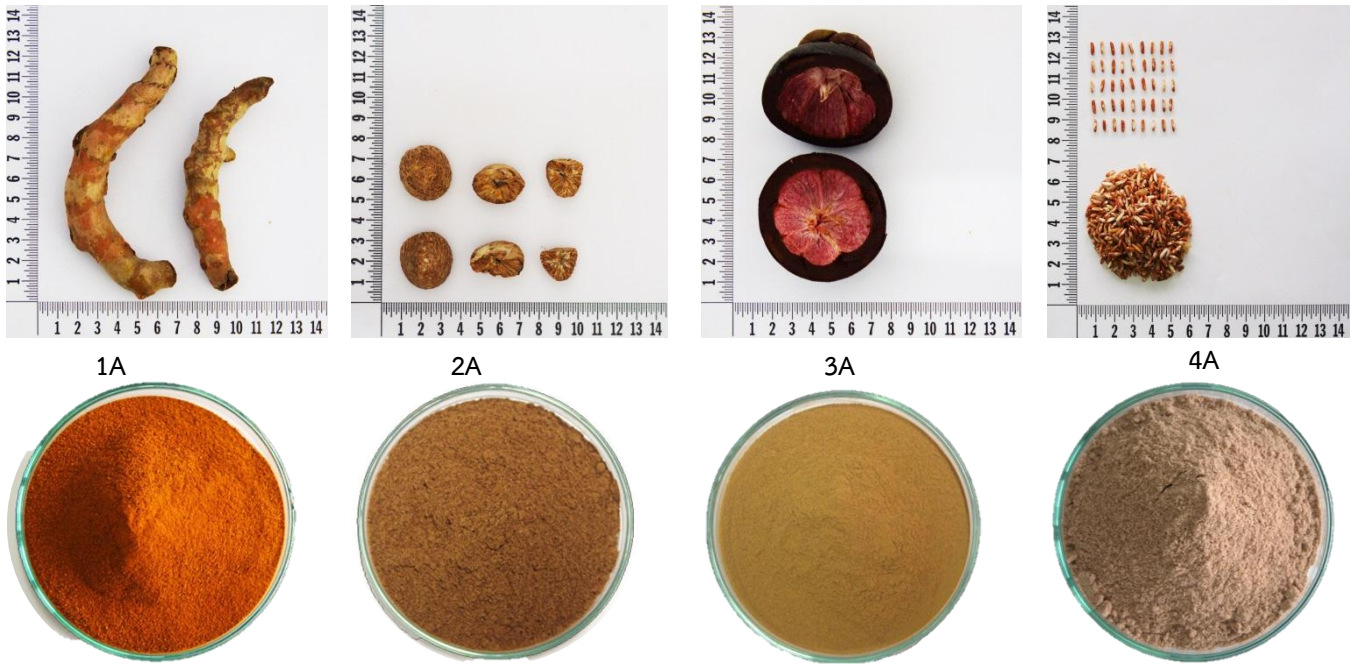
จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของสมุนไพร ได้แก่ รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี กลิ่น รส พบว่า

1. เหง้าขมิ้นชัน ลักษณะรูปไข่ โค้งเล็กน้อย ยาวประมาณ 10-13 ซม. หนาประมาณ 1-2 ซม. และมีแงแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้งสองด้านเป็นปุ่มเล็กๆ ลักษณะภายนอกมีสีเหลืองอมน้ำตาล ภายในสีเหลืองเข้มหรือสีส้ม เมื่อบดเป็นผงมีสีเหลืองทอง มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีรสขมฝาด เผ็ดเล็กน้อย

2. เมล็ดหมาก ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 ซม. ผิวของเมล็ดหมากจะมีลายเส้นสีเหลืองถึงสีน้ำตาล ลักษณะลายเส้นเป็นร่องเชื่อมต่อกันเป็นร่างแหรอบๆ เมล็ด เนื้อในเมล็ดแข็ง เมื่อบดเป็นผงมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นหอมฉุน และมีรสฝาด

3. เปลือกมังคุด ลักษณะเปลือกผลกลมและแข็ง หนาประมาณ 0.5-1 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 ซม. พื้นผิวภายนอกเปลือกสีม่วงเข้ม และภายในเปลือกมีสีม่วงอมแดง เมื่อบดเป็นผงมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหอม และมีรสฝาด

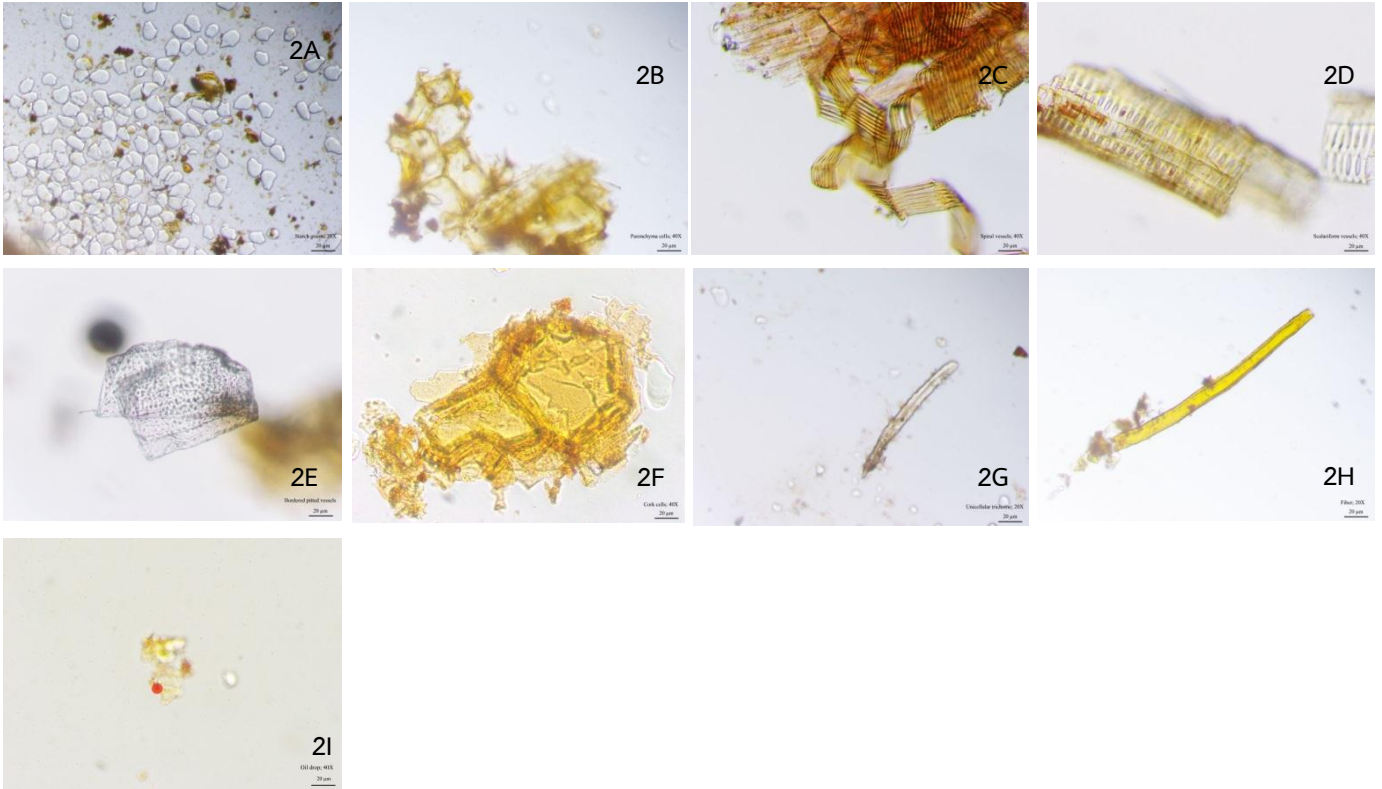
4. เมล็ดข้าวสาร (สายพันธุ์ สังข์หยดพัทลุง) เมล็ดยาวประมาณ 0.5-0.7 ซม. และกว้างประมาณ 0.1 ซม. มีสีน้ำตาล เมื่อบดเป็นผงมีสีขาวอมน้ำตาล มีกลิ่นหอม และมีรสหวาน



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผงยาสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล 1A คือ *Curcuma longa* L., 2A คือ *Areca catechu* L., 3A คือ *Garcinia mangostana* L. และ 4A คือ *Oryza sativa* L.

จากการศึกษาทางจุลทรรศน์ลักษณะของผงสมุนไพร ได้แก่ ศึกษารูปร่าง ลักษณะของเซลล์ และโครงสร้างของเนื้อเยื่อ พบว่า

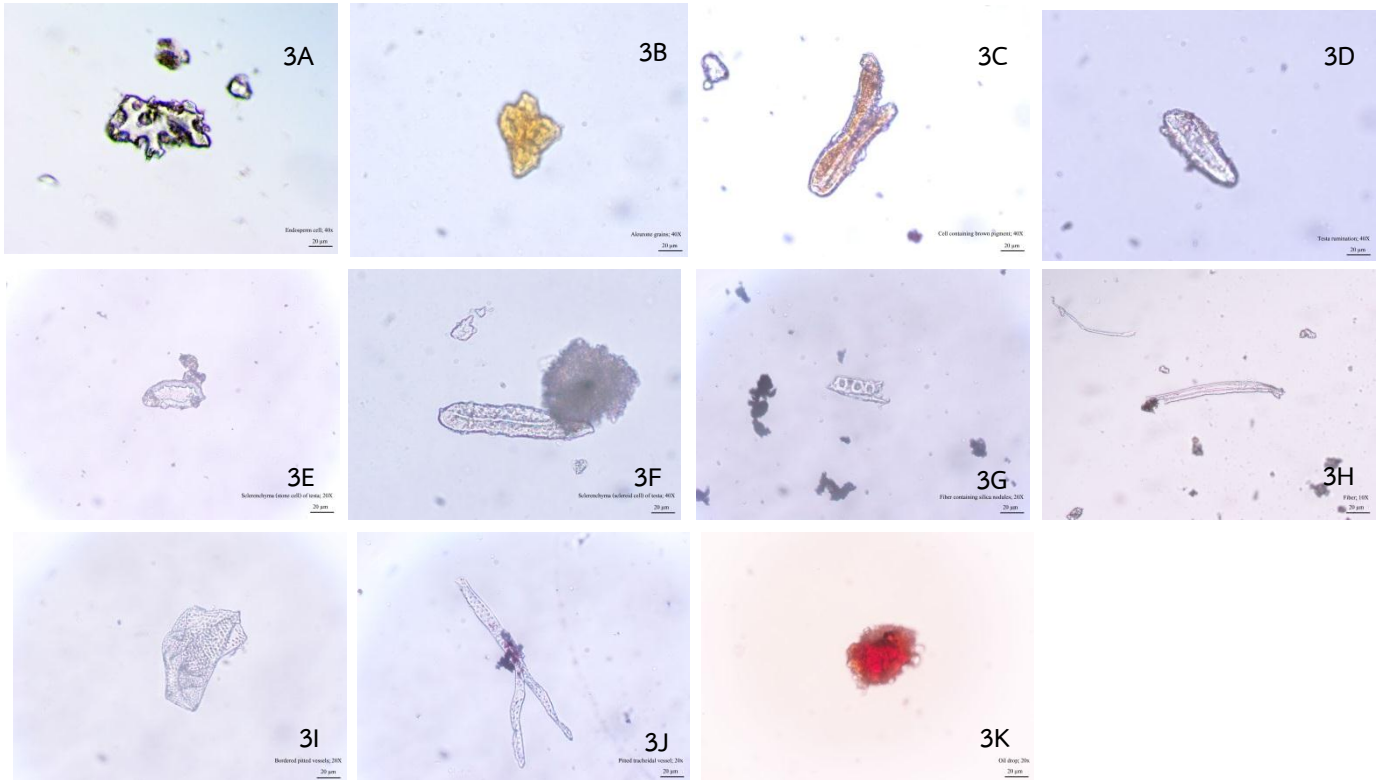
1. *Curcuma longa* L. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ Starch granules (รูปที่ 2A), Parenchyma cell (รูปที่ 2B), เวสเซลล์ต่างๆ มีทั้งแบบ Spiral vessel, Scalariform vessel และ Bordered pit vessel (รูปที่ 2C, 2D และ 2E), Cork cell (รูปที่ 2F), Unicellular trichome (รูปที่ 2G), Fiber (รูปที่ 2H) และ Oil drop (รูปที่ 2I)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางจุลทรรศน์ลักษณะของผง *Curcuma longa* L.

2. *Areca catechu* L.

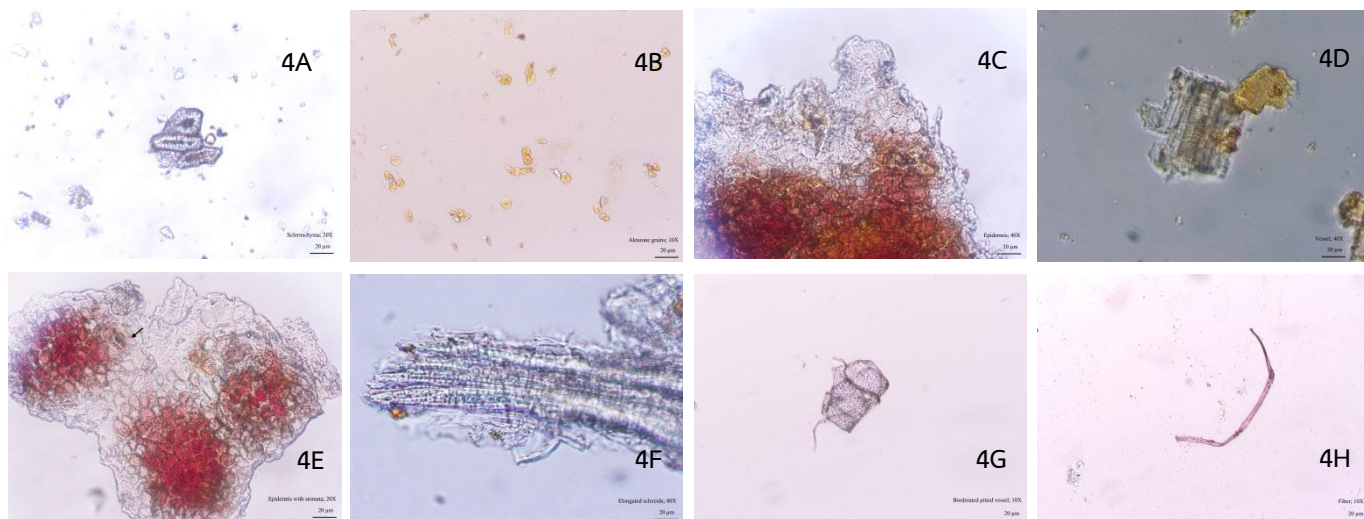
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ Endosperm cell (รูปที่ 3A), Aleurone grains (รูปที่ 3B), Cell containing brown pigment (รูปที่ 3C), Testa rumination (รูปที่ 3D), Stone cell (รูปที่ 3E), Sclereid cell (รูปที่ 3F), Fiber containing silica nodules (รูปที่ 3G), Fiber (รูปที่ 3G), Bordered pitted vessels (รูปที่ 3I), Pitted tracheidal vessel (รูปที่ 3J) และ Oil drop (รูปที่ 3K)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางจุลทรรศน์ลักษณะของฝอง *Areca catechu* L.

3. *Garcinia mangostana* L.

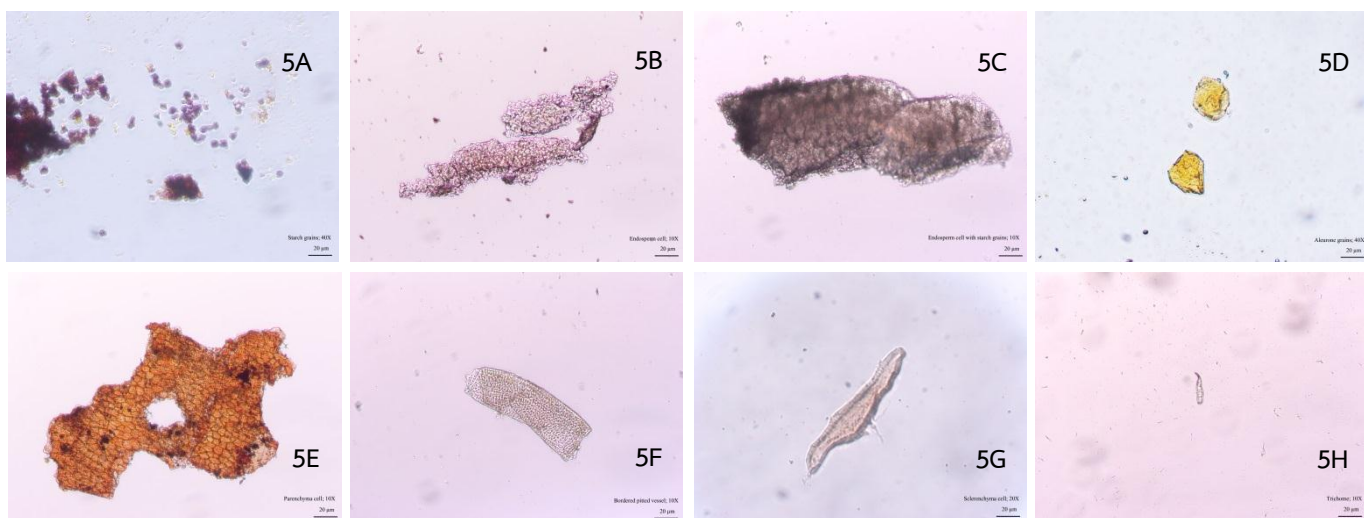
ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ Sclerenchyma cell (รูปที่ 4A), Aleurone grains (รูปที่ 4B), Epidermis cell (รูปที่ 4C), Vessels (รูปที่ 4D), Epidermis cell with stomata (รูปที่ 4E), Elongated sclereids cell (รูปที่ 4F), Bordered pitted vessels (รูปที่ 4G) และ Fiber (รูปที่ 4H)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะทางจุลทรรศน์ลักษณะของฝง *Garcinia mangostana* L.

4. *Oryza sativa* L.

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ Starch granules (รูปที่ 5A), Endosperm cell (รูปที่ 5B), Endosperm cell with starch granules (รูปที่ 5C), Aleurone grains (รูปที่ 5D), Epidermis cell (รูปที่ 5E), Bordered pitted vessels (รูปที่ 5F), Sclerenchyma cell (รูปที่ 5G) และ Trichome (รูปที่ 5H)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะทางจุลทรรศน์ลักษณะของฝง *Oryza sativa* L.

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ปริมาณสารฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตำรับยาสมานแผล พบว่า

การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิก (phenolic) ตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วย เมทานอล (methanol) ให้ผลสูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำ (water) รองลงมาคือ น้ำ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับ เอทานอล (ethanol) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) ส่วนเอทานอล และคลอโรฟอร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น การทดสอบหาปริมาณสารวิธีฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วยอะซิโตน (acetone) ให้ผลสูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสารสกัดชนิดอื่น รองลงมาคือ เอทานอล (ethanol) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับ เมทานอล (methanol) ส่วนเมทานอล แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วย เอทิล อะซิเตต (ethyl acetate) ให้ผลสูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดชนิดอื่น รองลงมาคือ เฮกเซน (hexane) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับเมทานอล (methanol) ส่วนเมทานอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับ อะซิโตน (acetone) เอทานอล (ethanol) และน้ำ (water)

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอิสระด้วยวิธี ABTS ตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วย เมทานอล (methanol) ให้ผลสูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดชนิดอื่น รองลงมาคือ เอทานอล (ethanol) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ เอทิล อะซิเตต (ethyl acetate) ส่วนเอทิล อะซิเตต แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น แสดงดัง ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า %yield ความสามารถในการกำจัดอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตำรับยาสมานแผล

Extraction solvent	Extraction yield (%)	Total contents (mg/g extract) ^A		Scavenging capacities (%±SD) ^B	
		Phenolics	Flavonoids	DPPH radical	ABTS radical
Hexane	1.23	580.23±128.47 ^a	10.75±0.00 ^a	17.44±2.21 ^c	21.09±0.14 ^b
Ethyl acetate	2.52	842.80±172.29 ^b	66.30±11.19 ^c	20.84±1.17 ^d	30.12±0.45 ^d
Chloroform	3.95	1068.35±50.37 ^c	57.35±8.21 ^c	11.03±2.44 ^a	19.36±0.24 ^a
Acetone	6.01	790.29±160.31 ^b	132.61±8.21 ^e	12.74±0.60 ^{ab}	26.11±0.92 ^c
Ethanol	6.45	1098.48±54.75 ^c	111.11±12.42 ^d	12.00±1.59 ^{ab}	31.24±0.90 ^d
Methanol	6.13	1361.05±31.31 ^d	100.35±3.10 ^d	14.73±1.47 ^{bc}	34.31±0.58 ^e
Water	3.43	1211.26±131.36 ^{cd}	35.84±3.10 ^b	12.70±0.99 ^{ab}	21.79±0.92 ^b

^A Data of total phenolic content compounds and total flavonoids content expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram extract and milligram of catechin equivalents per gram extract, respectively.

^B The extracts exhibited DPPH and ABTS radical scavenging activities at concentrations of 1.5 µg/mL.

^(a-e) Values in the same column followed by a different letter are significantly different ($p < 0.05$).

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตำรับยาสมานแผล พบว่าตำรับที่สกัดด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984, *Staphylococcus aureus* ATCC25932, Methicillin resistant *S. aureus*, Methicillin susceptible *S. aureus*, Coagulase positive staphylococci และ Coagulase negative staphylococci ได้ดีที่สุดในลำดับแรก โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) เท่ากับ 1.30, 6.30, 6.30-12.50, 3.13-25.00, 12.50-50.00 และ 3.13-25.00 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 90% หรือ MIC_{90} ต่อเชื้อ Methicillin resistant *S. aureus*, Methicillin susceptible *S. aureus*, Coagulase positive staphylococci และ Coagulase negative staphylococci เท่ากับ 12.50, 25.00, 25.00 และ 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* spp. (minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตำรับยาสมานแผล

Tested pathogens	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of YSP extracts						
	Solvent for the extraction of YSP						
	Hexane	Ethyl acetate	Chloroform	Acetone	Ethanol	Methanol	Water
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984	>100.00	1.30	50.00	25.00	12.50	12.50	>100.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25932	>100.00	6.30	25.00	25.00	6.30	6.30	>100.00
Methicillin resistant <i>S. aureus</i> (n=10)	50.00->100.00 ^a 100.00 ^b	6.30-12.50 ^a 12.50 ^b	6.30->100.00 ^a >100.00 ^b	25.00 ^a 25.00 ^b	6.25-12.50 ^a 12.50 ^b	6.25-12.50 ^a 6.25 ^b	>100.00 ^a >100.00 ^b
Methicillin susceptible <i>S. aureus</i> (n=10)	50.00->100.00 ^a >100.00 ^b	3.13-25.00 ^a 25.00 ^b	12.50-100.00 ^a 100.00 ^b	6.25-100.00 ^a 50.00 ^b	6.25-12.50 ^a 12.50 ^b	3.13-50.00 ^a 25.00 ^b	>100.00 ^a >100.00 ^b
Coagulase positive staphylococci (n=10)	>100.00 ^a >100.00 ^b	12.50-50.00 ^a 25.00 ^b	25.00->100.00 ^a 100.00 ^b	25.00-100.00 ^a 25.00 ^b	12.50-100.00 ^a 12.50 ^b	6.25-50.00 ^a 25.00 ^b	>100.00 ^a >100.00 ^b
Coagulase negative staphylococci (n=10)	25.00->100.00 ^a 50.00 ^b	3.13-25.00 ^a 6.25 ^b	12.50-100.00 ^a 12.50 ^b	25.00-100.00 ^a 100.00 ^b	6.25-25.00 ^a 12.50 ^b	3.13-25.00 ^a 6.25 ^b	>100.00 ^a >100.00 ^b

^a; MIC_{range}

^b; MIC₉₀

ตอนที่ 2 การหาปริมาณสารเพิ่มความแข็งที่เหมาะสมสำหรับเตรียมแผ่นปิดแผลสมุนไพร

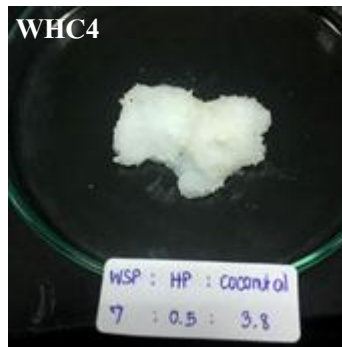
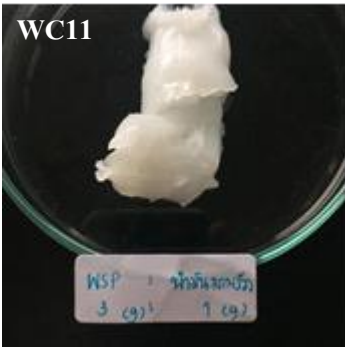
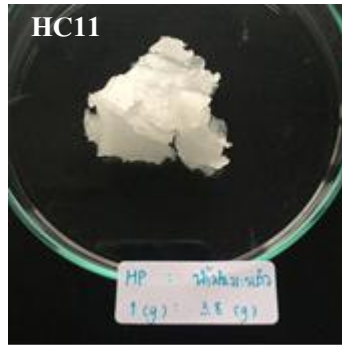
2.1 การหาปริมาณสารเพิ่มความแข็งที่เหมาะสมสำหรับเตรียมแผ่นปิดแผลสมุนไพร

วัดความหนืดของแผ่นปิดแผลทางการค้า Sofra-tulle[®] (Sanofi Aventis, UK) ซึ่งระบุว่าเป็นส่วนผสมระหว่าง White soft paraffin 90%W/W และ Lanolin 10%W/W ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer Model RVT ; Spindle T-Fmeter ที่ความเร็วรอบ 5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นค่าความหนืดมาตรฐานในการเตรียมยาเตรียมสำหรับเคลือบแผ่นปิดแผลสมุนไพร ทำชุดการทดสอบละ 3 ซ้ำ

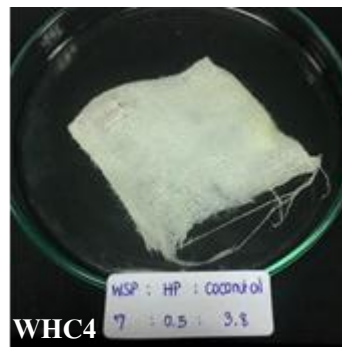
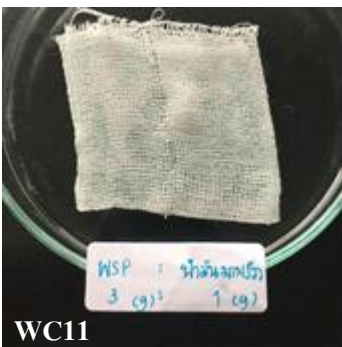
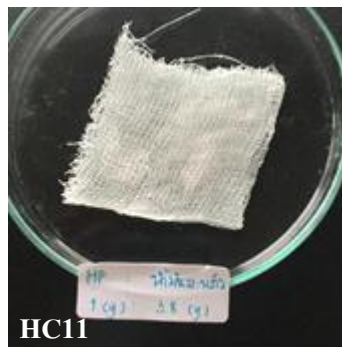
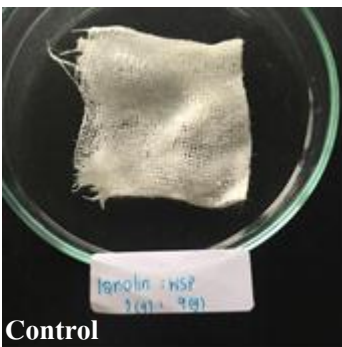
หาสัดส่วนของของผสมสารระหว่างสารเพิ่มความแข็งซึ่งเมื่อนำมารวมกับ Virgin coconut oil แล้วมีความหนืดเท่ากับค่าความหนืดมาตรฐาน วัดความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer Model RVT ; Spindle T-Fmeter ที่ความเร็วรอบ 5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำชุดการทดสอบ 3 ซ้ำ

จากการหาค่าความหนืดของสารเพิ่มความแข็งทั้งหมด 29 ตำรับ ที่มีความแตกต่างกันของสัดส่วนของสารเพิ่มความแข็ง (ดังแสดงในตารางที่ 2) ปรากฏว่า มียาพื้น 3 ตำรับ คือ ตำรับ WC11 มีค่าความหนืด 885 ± 3.055 cP ($\times 10^3$) ตำรับ HC11 มีค่าความหนืด 897 ± 4.163 cP ($\times 10^3$) และ ตำรับ WHC4 มีค่าความหนืด 1042 ± 4.056 cP ($\times 10^3$) มีความหนืดที่ใกล้เคียงกับค่าความหนืดที่วัดได้ของส่วนผสมระหว่าง White soft paraffin 90%W/W และ Lanolin 10%W/W ซึ่งใช้เป็นค่าความหนืดมาตรฐาน คือ 894 ± 2.000 cP ($\times 10^3$) โดยลักษณะของยาพื้นทั้ง 3 ตำรับ และยาพื้นมาตรฐาน ที่เตรียมขึ้นก่อนเคลือบบนแผ่นปิดแผลและลักษณะของแผ่นปิดแผลซึ่งเคลือบตำรับยาพื้น เป็นดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

จากตำรับยาพื้นทั้ง 3 ตำรับ พบว่ายาพื้น HC11 แม้ว่าจะมีค่าความหนืดที่ใกล้เคียงกับตำรับยาพื้นมาตรฐาน แต่ยาพื้นตำรับนี้ไม่ค่อยอุ้มน้ำมันมะพร้าวทำให้เกิดการเยิ้มเหลวของน้ำมันออกมามาก จึงไม่เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาใช้เป็นยาพื้นในการเคลือบแผ่นปิดแผล ส่วนอีก 2 ตำรับคือ WC11 และ WHC4 พบว่ามีความสามารถอุ้มน้ำมันมะพร้าวได้ดี



รูปที่ R2 แสดงลักษณะของตำรับยาพื้นก่อนเคลือบบนแผ่นปิดแผล



รูปที่ R3 แสดงลักษณะแผ่นปิดแผลซึ่งเคลือบตำรับยาพื้น

ตารางที่ R2 สัดส่วนของสารเพิ่มความแข็งและค่าความหนืดของตำรับยาพื้น

Samples	Ratio of coated bases				Viscosity of coated bases (cP×10 ³)
	Lanolin	White soft paraffin	Hard paraffin	Coconut oil	
Control	1	9	-	-	894± 2.000
WC1	-	1	-	4	114± 5.292
WC2	-	1	-	3	233± 3.055
WC3	-	3	-	7	309± 7.572
WC4	-	1	-	2	375± 4.163
WC5	-	2	-	3	448± 5.292
WC6	-	1	-	1	590± 6.000
WC7	-	4	-	3	629± 5.033
WC8	-	3	-	2	683± 6.110
WC9	-	2	-	1	755± 4.619
WC10	-	7	-	3	824± 6.000
WC11	-	3	-	1	885± 3.055
WC 12	-	4	-	1	1105± 6.429
WC13	-	9	-	1	1273± 3.055
HC1	-	-	1	3	4720± 60.000
HC2	-	-	1	4	407± 3.060
HC3	-	-	1	5	212± 9.170
HC4	-	-	1	6	127± 6.430
HC5	-	-	1	7	107± 6.430
HC6	-	-	1	8	81± 4.160
HC7	-	-	1	9	66± 4.000
HC8	-	-	1	3.5	1473± 30.550
HC9	-	-	1	3.6	1245± 4.163
HC10	-	-	1	3.7	1094± 5.291
HC 11	-	-	1	3.8	897± 4.163
HC12	-	-	1	3.9	682± 4.000
WHC1	-	1	0.5	3.8	1504± 4.666
WHC2	-	5	0.5	3.8	1273± 3.055
WHC3	-	6	0.5	3.8	1084± 3.060
WHC4	-	7	0.5	3.8	1042± 4.056

2.2. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันสมานแผลต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของแผลติดเชื้อในผู้ป่วยเบาหวาน

2.2.1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกมา 3-5 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland No. 0.5 ด้วยสารละลาย 0.85% NSS

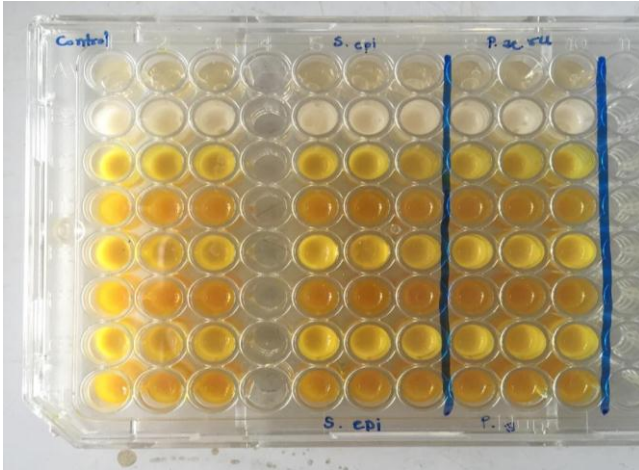
2.2.2 การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Agar dilution method เตรียมอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) ที่ผสมน้ำมันสมานแผล โดยชั่ง MHA 2.1 กรัม ผสมกับ Agar 1.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มจนใส จากนั้นดูอาหารที่หลอมเหลวใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 4.950 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave หลังจากฆ่าเชื้อแล้วนำมาปรับอุณหภูมิด้วย Water bath ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำมันสมานแผลทั้ง 6 สูตรที่เจือจางด้วยน้ำมันมะพร้าวจำนวน 3 เข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิลิตร และ Tween 80 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vertex mixture โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันสมานแผลเท่ากับ 50, 25 และ 125% ตามลำดับ และใช้น้ำมันมะพร้าวอย่างเดียวเป็น Control ดูอาหารที่ผสมแล้วลงใน 96 well microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นรอให้แข็งตัวดี แล้วจึงนำดูเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 ใส่ลงใน Well ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยจะมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^4 CFU/spot จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธี Resazurin test

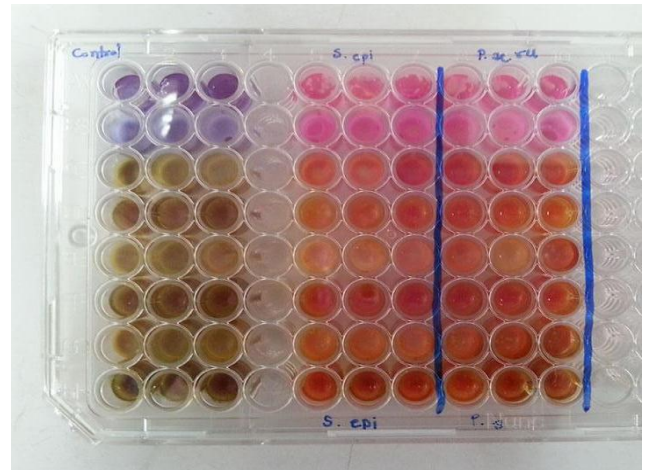
ผสม Resazurin sodium salt 2 มิลลิกรัม กับน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายไปหยดทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อใน 96 well microtiter plate ที่เตรียมไว้ในขั้นตอน 2.1 หลุมละ 10 ไมโครลิตร สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสี หากมีการเจริญเติบโตของเชื้อจะเปลี่ยนสี Resazurin จากสีม่วงเป็นสีชมพู เมื่อทิ้งไว้ 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Agar dilution method

จากการทดลองไม่พบค่า MIC ของน้ำมันสมานแผลทั้ง 6 สูตร โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 50% (รูปที่ R4)



ก่อนหยด Resazurin



หลังหยด Resazurin

รูปที่ R4 การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Agar dilution method และ Rasazurin test

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Crystal violet staining

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *P. aeruginosa* ATCC 10145 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 นำเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 colony เพาะเลี้ยงใน TSB ที่ประกอบด้วย 2% Glucose (TSBGlc) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อให้ได้ปริมาณ 1.5×10^8 CFU/ml ด้วย TSBGlc ซึ่งมี Tween 80 ปริมาตร 0.5% v/v

3.2 การทดสอบเจือจางสารทดสอบทั้ง 6 สูตรแบบ Two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 50-1.56% v/v ด้วยน้ำมันมะพร้าว เติมน้ำทดสอบแต่ละความเข้มข้นลงใน 96 well microtiter plate หลุมละ 100 μ l และเติมเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.1 หลุมละ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้าง Biofilm ด้วย 0.85% NSS หลุมละ 280 μ l จำนวน 2 ครั้ง นำไปวางในตู้อบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย 0.1% crystal violet หลุมละ 210 μ l ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วย 0.85% NSS หลุมละ 280 μ l จำนวน 2 ครั้ง และทิ้งไว้ให้แห้ง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO หลุมละ 200 μ l เขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำสอบซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวเพียงอย่างเดียว

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Crystal violet staining

Manner และคณะ (2013) ได้แบ่งเกณฑ์การจัดกลุ่มฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Highly active สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Biofilm ได้มากกว่า 85 %
2. Moderately active สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Biofilm ได้มากกว่า 40 %
3. Inactive สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Biofilm ได้น้อยกว่า 40 %

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ของน้ำมันสมานแผลด้วยวิธี Crystal violet staining เมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 พบว่า ที่ความเข้มข้น 50% มีสูตร Herb 60 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 5 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 25 และ 12.5% มีสูตร Herb 60 °C และ Herb 95 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 4 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 6.25% มีสูตร Herb 60 °C และ 3Herb 60 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 4 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 3.12% มีสูตร Herb 60 °C, Herb 95 °C, 2Herb 60 °C และ 3Herb 60 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 2 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active และที่ความเข้มข้น 1.56% มีสูตร Herb 60 °C, Herb 95 °C และ 2Herb 60 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 3 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active (ตารางที่ 3) และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่า ที่ความเข้มข้น 50% ทุกสูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Highly active, ที่ความเข้มข้น 25 % มีสูตร Herb 60 °C, 2Herb 60 °C, 2Herb 95 °C, 3Herb 60 °C และ 3Herb 95 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active ส่วน Herb 95 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 12.5 % มีสูตร 2Herb 95 °C และ 3Herb 95 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 4 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 6.25% มีสูตร 3Herb 95 °C จัดอยู่ในกลุ่ม Highly active และอีก 5 สูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active, ที่ความเข้มข้น 3.12 และ 1.56% ทุกสูตรจัดอยู่ในกลุ่ม Moderately active (ตารางที่ 4) จาก

การทดสอบในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างBiofilmของน้ำมันสมานแผลทั้ง 6 สูตร ต่อเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ มีฤทธิ์อยู่ในกลุ่ม Moderately active และ Highly active

ตารางที่ R3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Concentration (%)	% Biofilm formation inhibition					
	Herb, 60 °C	Herb, 95 °C	2Herb, 60 °C	2Herb, 95 °C	3Herb, 60 °C	3Herb, 95 °C
50	91.00±1.62	80.76±2.92	84.02±5.24	84.00±2.11	82.27±2.61	67.17±3.19
25	88.17±1.07	90.82±1.71	75.80±14.59	70.60±13.75	81.84±4.08	66.17±18.96
12.5	95.11±0.47	86.20±2.85	77.67±10.16	83.80±9.45	76.70±8.24	69.05±10.66
6.25	90.21±2.77	82.16±7.49	76.87±11.35	70.34±3.42	85.27±5.65	68.62±14.26
3.12	87.43±3.62	93.09±5.12	90.19±8.43	80.36±12.33	85.46±5.35	62.96±10.66
1.56	92.86±3.02	89.89±6.77	86.71±13.33	74.62±0.50	77.00±8.18	58.83±3.08
Coconut oil	75.64±7.01					

ตารางที่ R4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Biofilm ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

Concentration (%)	% Biofilm formation inhibition					
	Herb, 60 °C	Herb, 95 °C	2Herb, 60 °C	2Herb, 95 °C	3Herb, 60 °C	3Herb, 95 °C
50	94.08±1.71	87.64±0.14	95.94±0.46	89.93±0.62	89.70±4.95	87.12±0.04
25	85.64±1.03	75.89±0.51	86.09±1.52	89.23±0.44	87.05±1.71	87.86±3.47
12.5	80.28±0.88	74.96±4.90	79.47±0.39	88.34±2.40	79.83±3.82	86.63±0.98
6.25	80.19±2.26	73.32±1.71	79.87±3.22	84.97±4.69	78.32±0.82	86.65±0.19
3.12	66.31±2.94	70.85±2.53	77.31±0.52	83.92±1.55	78.58±0.21	74.43±1.10
1.56	64.11±3.70	70.71±6.64	74.52±1.87	78.44±3.05	70.57±2.12	72.49±1.47
Coconut oil	75.50±5.76					

ตอนที่ 3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบแผ่นปิดแผลสมุนไพร

1. การเตรียมวัสดุพื้นสำหรับทำแผ่นปิดแผล

ผ้าโปร่งดูดซึม (Adsorbent gauze) ขนาด 10x10 เซนติเมตร (10 ตารางเซนติเมตร) ที่ปราศจากเชื้อเป็นวัสดุพื้นในการทำแผ่นปิดแผลสมุนไพร

2. การเคลือบยาเตรียมบนแผ่นปิดแผล

การเตรียมยาสมานแผล THR-SK010 รูปแบบ Hot oil extract ใช้เปลือกมังคุด 62.5 กรัม ขมิ้นชัน 62.5 กรัม หมาก 62.5 กรัม และข้าวสาร 62.5 กรัม เคี้ยวใน Virgin coconut oil 1500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังนั้นยาสมานแผล THR-SK010 รูปแบบ Hot oil extract คิดเป็นความเข้มข้นของสมุนไพร 16.67% W/V การเตรียมยาเตรียมสำหรับเคลือบบนแผ่นปิดแผล ผสมสารเพิ่มความแข็งที่ผ่านการหาสัดส่วนที่เหมาะสมคือ White soft paraffin : ยาสมานแผล THR-SK010 รูปแบบ Hot oil extract ในอัตราส่วน 3:1 โดยน้ำหนัก เตรียมปริมาณที่มากเกินพอ โดยผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนยาเตรียมผสมเข้ากันดี การเคลือบยาเตรียมบน Adsorbent gauze จะทำการจุ่ม Adsorbent gauze ลงในยาเตรียม โดยจะใส่แผ่น Adsorbent gauze ลงไปดูดซับตัวยามากกว่ายาเตรียมเคลือบบน Adsorbent gauze หมด เป็นเวลา 10 วินาที และยกขึ้นมาให้สะเด็ด 40 วินาที โดยทำในสภาวะปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำการชุบทั้งหมด 40 แผ่น แล้วจึงนำแผ่นปิดแผลที่เคลือบแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที บรรจุแผ่นปิดแผลในถุงอะลูมิเนียมฟรอยด์สุญญากาศ

เตรียมยาเตรียมสำหรับเคลือบและทำการเคลือบยาเตรียมบน Adsorbent gauze ดังอธิบายไว้ข้างต้นอีก 2 ชุด

3. การหาความแปรผันของน้ำหนักยาเตรียมบนแผ่นปิดแผล

ทำการสุ่มแผ่นปิดแผลจากทั้ง 3 ชุด จากข้อ 2. ชุดละ 20 แผ่น เพื่อหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze

4. การทดสอบความคงตัวของแผ่นปิดแผล

ประเมินลักษณะทางกายภาพของแผ่นปิดแผลหลังเตรียมเสร็จ และหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง (freeze thaw) เก็บแผ่นปิดแผลไว้ที่อุณหภูมิ -39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะนับเป็น 1 รอบ นำมาทำเช่นเดิมอีก 4 รอบ รวมเป็น 5 รอบ นับเป็น 1 ชุดการทดสอบ ทำการประเมิน 3 ชุดการทดสอบ โดยแผ่นปิดแผลแต่ละชุดทดสอบทำการประเมิน

1) การประเมินสีของแผ่นปิดแผล วัดสีของแผ่นปิดแผลด้วยแถบวัดระดับสี

2) การประเมินความหนืดของยาเตรียม วัดความหนืดของยาเตรียมด้วยเครื่อง Dial Reading Viscometer, Brookfield®

3) การประเมินความหืนของยาเตรียม ตรวจสอบความหืนด้วยวิธี Thiobarbituric acid (TBA)

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของแผ่นปิดแผล

โดยหาปริมาณสาร Alpha-mangostin และปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผลก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ทำการวิเคราะห์ 3 ชุดการทดสอบ

เครื่องมือทดสอบ : High Performance Liquid Chromatograph, 1100, Agilent Technologies, Germany (HPLC 1)

เทคนิคการทดสอบ : Reverse phase high performance liquid chromatograph

สภาวะการทดสอบ : High Performance Liquid Chromatograph-Diode Array Detector (HPLC-DAD)

Column : Hypersil ODS (4.6x250mm, 5µm)

Mobile phase : Methanol (A), Acetic acid (B), Acetonitrile (C)

Flow rate : 1.00 mL/min

Detector Wavelength : 320 nm for α -mangostin, 425 nm for curcumin

Column temperature : 25 °C

Injection volume : 20 µL

Run time : 15 min

6. การทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลต่อเชื้อแบคทีเรีย

6.1) การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกเชื้อมา 3-5 colony เลี้ยง

ในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย MHB จะมีเชื้ออยู่ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

6.2) การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion (สอาด ริยะจันทร์, 2555)

ใช้ cotton swab จุ่มเชื้อจากข้อ 1) นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร MHA 3 แฉว วางแผ่นปิดแผล แผ่น gauze ผสมยาพื้น และ Absorbent gauze ขนาด 2x2 เซนติเมตร โดยแบ่งผิวหน้าของอาหาร MHA เป็น 3 ส่วน บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone)

6.3) การหาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดภายใต้แผ่นปิดแผล (สอาด ริยะจันทร์, 2555)

เมื่ออ่านผลข้อ 6.2) แล้วไม่พบ inhibition zone ให้นำแผ่นปิดแผลที่ทดสอบไปหาการมีชีวิตรอดของเชื้อภายใต้แผ่นปิดแผล โดยการนำแผ่นปิดแผล แผ่น gauze ผสมยาพื้น และ Absorbent gauze จากข้อ 6.2) ใส่ลงในหลอดทดลอง ที่มี 0.85% NaCl ปริมาตร 10 mL ปั่นด้วย Vortex Mixer นาน 2 นาที ทดสอบหาจำนวนเชื้อด้วยวิธี drop plate (ศิริลักษณ์ หอมละเอียด, 2557) โดยดูดสารละลายในหลอดทดลองมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 กับ 0.85% NaCl ทำการ drop plate ลงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลโดยการนับจำนวน colony ที่เกิดขึ้น และเขียนกราฟ log ของจำนวน colony

จากการเคลือบยาเตรียมบน Adsorbent gauze จำนวน 3 ชุด และทำการสุ่มแผ่นปิดแผลชุดละ 20 แผ่น เพื่อหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze ชุดที่ 1 มีค่าเท่ากับ 6.82 ± 0.29 กรัม ชุดที่ 2 มีค่าเท่ากับ 6.79 ± 0.33 กรัม และชุดที่ 3 มีค่าเท่ากับ 6.80 ± 0.24 กรัม โดยน้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze ในทุกแผ่นอยู่ในช่วง $\pm 10\%$ โดยน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละชุด และน้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze ทั้ง 3 ชุดการทดสอบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

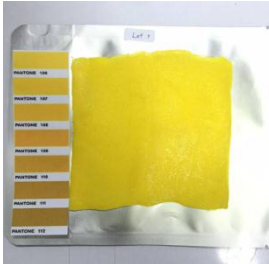

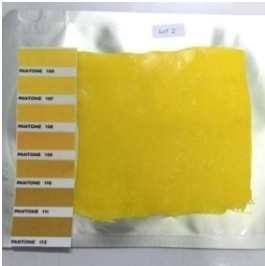
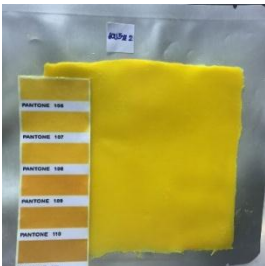

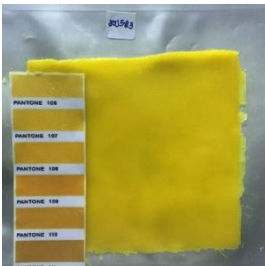
ตารางที่ R5 น้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze

ชุดทดสอบที่	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักยาเตรียมบนแผ่นปิดแผล ($g \pm SD$)
1	6.82 ± 0.29 (n=20)
2	6.79 ± 0.33 (n=20)
3	6.80 ± 0.24 (n=20)

การทดสอบความคงตัวของแผ่นปิดแผล

การประเมินสีของแผ่นปิดแผล จากการประเมินสีของแผ่นปิดแผลด้วยแถบวัดระดับสี พบว่า สีของแผ่นปิดแผลหลังเตรียมเสร็จ และหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง (freeze thaw) จำนวน 5 รอบ ไม่มีความเปลี่ยนแปลง โดยแผ่นปิดแผลยังคงอยู่ที่ระดับ Pantone 105 ของแถบวัดระดับสี

ตารางที่ R6 สีของแผ่นปิดแผลหลังเตรียมเสร็จและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง(freeze thaw) 5 รอบ

ชุดทดสอบที่	หลังเตรียมเสร็จ (ก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบ สภาวะเร่ง)	หลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะ เร่ง
1		
	Pantone 105	Pantone 105
2		
	105	Pantone 105
	Pantone	
3		
	105	Pantone 105
	Pantone	

การประเมินความหนืดของยาเตรียม

ค่าความหนืดเฉลี่ยของยาเตรียมระหว่างหลังเตรียมเสร็จและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง และระหว่างชุดทดสอบทั้ง 3 ชุด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ R7 ค่าความหนืดเฉลี่ยของยาเตรียมหลังเตรียมเสร็จและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบ สภาวะเร่ง (freeze thaw) 5 รอบ

ค่าความหนืดเฉลี่ยของยาเตรียม ($\times 10^3$ cP \pm SD)		
ชุดทดสอบที่	หลังเตรียมเสร็จ (ก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง)	หลังผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง
1	896.67 \pm 4.16 (n=3)	896.67 \pm 3.06 (n=3)
2	890.67 \pm 3.06 (n=3)	894.00 \pm 4.00 (n=3)
3	896.00 \pm 4.00 (n=3)	894.67 \pm 4.16 (n=3)

3) การประเมินความหืนของยาเตรียม

จากการประเมินความหืนของยาเตรียมก่อนเคลือบบน Adsorbent gauze ทั้ง 3 ชุด ด้วยวิธี TBA พบว่า ค่า TBA ของยาเตรียมหลังเตรียมเสร็จน้อยกว่าความสามารถในการตรวจสอบ แต่หลังจากยาเตรียมผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง 5 รอบ พบค่า TBA ของยาเตรียมทั้ง 3 ชุดทดสอบเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ R8 ค่า TBA ของยาเตรียมหลังเตรียมเสร็จและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง(freeze thaw) 5 รอบ

ชุดทดสอบที่	ค่า TBA ของยาเตรียม (mg malonaldehyde/kg \pm SD)	
	หลังเตรียมเสร็จ (ก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง)	หลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง
1	< 0.002*	0.50 \pm 0.0052 ^a
2	< 0.002*	0.50 \pm 0.0074 ^a
3	< 0.002*	0.49 \pm 0.0016 ^a

* Limit of detection = 0.002 mg malonaldehyde/kg

a เปรียบเทียบกับกลุ่มหลังเตรียมเสร็จ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของแผ่นปิดแผล

1) วิเคราะห์หาปริมาณสาร Alpha-mangostin ของแผ่นปิดแผล

ปริมาณสาร Alpha-mangostin ของแผ่นปิดแผลก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง และระหว่างชุดทดสอบทั้ง 3 ชุด ไม่มีความแตกต่างโดยนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ R9 ปริมาณสาร Alpha-mangostin ของแผ่นปิดแผลก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง

ชุดทดสอบที่	ปริมาณ Alpha-mangostin (mg/g \pm SD)	
	หลังเตรียมเสร็จ (ก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง)	หลังผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง
1	0.35 \pm 0.01 (n=3)	0.35 \pm 0.01 (n=3)
2	0.36 \pm 0.01 (n=3)	0.35 \pm 0.01 (n=3)
3	0.36 \pm 0.01 (n=3)	0.37 \pm 0.01 (n=3)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผล

ปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผลระหว่างชุดทดสอบทั้ง 3 ชุด ไม่มีความแตกต่างโดยนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ปริมาณสาร Curcumin หลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่งไม่มีผลต่อปริมาณสาร Alpha-mangostin แต่ส่งผลต่อปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผลโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้สาร Curcumin เกิดการเสื่อมสภาพได้

ตารางที่ R10 ปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผลก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง

ชุดทดสอบที่	ปริมาณ Curcumin (mg/g \pm SD)	
	หลังเตรียมเสร็จ (ก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง)	หลังผ่านการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง
1	0.48 \pm 0.01 (n=3)	0.41 \pm 0.02 ^{a1} (n=3)
2	0.49 \pm 0.02 (n=3)	0.43 \pm 0.03 ^{a2} (n=3)
3	0.47 \pm 0.02 (n=3)	0.42 \pm 0.02 (n=3)

a1 เปรียบเทียบกับกลุ่มก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่งชุดทดสอบที่ 1

a2 เปรียบเทียบกับกลุ่มก่อนผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่งชุดทดสอบที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลต่อเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อของแผ่นปิดแผลต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ด้วยวิธี Agar diffusion แล้วนำแผ่นปิดแผลที่ทดสอบไปหาการมีชีวิตรอดของเชื้อภายใต้แผ่นปิดแผลด้วยวิธี drop plate พบว่าแผ่นปิดแผลสามารถลดจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า Adsorbent gauze (Negative control) โดยทั้งก่อนและหลังผ่านอุณหภูมิแบบสภาวะแรงจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิดใต้แผ่นปิดแผลลดลงประมาณ 90% (1 logCFU/ml) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าแผ่นปิดแผลสามารถลดจำนวนเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ได้มากกว่าเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984

ตารางที่ R11 แสดงจำนวนเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ภายใต้แผ่นปิดแผล

การเปลี่ยนแปลง	จำนวนเชื้อ (Log CFU/mL \pm SD)		
	แผ่นปิดแผล	ยาพื้น	Adsorbent gauze
ก่อนผ่านสภาวะแรง	6.99 \pm 0.12	7.15 \pm 0.04	7.80 \pm 0.01
หลังผ่านสภาวะแรง	7.11 \pm 0.10	7.16 \pm 0.02	8.13 \pm 0.02

ตารางที่ R12 แสดงจำนวนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ภายใต้แผ่นปิดแผล

การเปลี่ยนแปลง	จำนวนเชื้อ (Log CFU/mL \pm SD)		
	แผ่นปิดแผล	ยาพื้น	Adsorbent gauze
ก่อนผ่านสภาวะแรง	6.78 \pm 0.10	7.16 \pm 0.02	8.57 \pm 0.09
หลังผ่านสภาวะแรง	6.94 \pm 0.14	7.80 \pm 0.07	8.66 \pm 0.06

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนาตำรับยาแผนไทยสมานแผล (THR-SK010) ให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผล พบว่าสัดส่วนของ White soft paraffin : Virgin coconut oil ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยน้ำหนัก มีค่าความหนืดเท่ากับ $894.67 \times 10^3 \pm 5.03 \times 10^3$ cP ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความหนืดของสารเคลือบแผ่นปิดแผลทางการค้า Sofra-tulle® ($885.33 \times 10^3 \pm 4.16 \times 10^3$ cP) มากที่สุด และสารเพิ่มความแข็งทั้งสองมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็ง สีขาวขุ่น เป็นมัน มีลักษณะใกล้เคียงกัน

การเคลือบยาเตรียมบน Adsorbent gauze ขนาด 10x10 เซนติเมตร จำนวน 3 ชุด และทำการสุ่มแผ่นปิดแผล ชุดละ 20 แผ่น พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze ทุกแผ่นอยู่ในช่วง $\pm 10\%$ โดยน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละชุด และน้ำหนักเฉลี่ยของยาเตรียมที่เคลือบติดบน Adsorbent gauze ทั้ง 3 ชุดการทดสอบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการประเมินความคงตัวของแผ่นปิดแผล เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง (freeze thaw) จำนวน 5 รอบ 3 ชุดทดสอบ พบว่า 1.) สีของแผ่นปิดแผลไม่เปลี่ยนแปลงยังคงอยู่ที่ระดับ Pantone 105 2.) ความหนืดของยาเตรียมที่เคลือบบนแผ่นปิดแผล ก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง และระหว่างชุดทดสอบทั้ง 3 ชุด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) 3.) ความหืน เมื่อทดสอบด้วยวิธี TBA พบว่าหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง มีความหืนเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของปิยนุสรณ์ น้อยดวง (2557) ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid oxidation จึงทำให้เกิดความหืนขึ้นหลังผ่านสภาวะเร่ง ดังนั้นจึงควรมีการพิจารณาเติมสารกันหืนลงในแผ่นปิดในอนาคต

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของแผ่นปิดแผลด้วยวิธี HPLC พบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่งไม่มีผลต่อปริมาณสาร Alpha-mangostin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่มีผลให้ปริมาณสาร Curcumin ของแผ่นปิดแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้สาร Curcumin เกิดการเสื่อมสภาพซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม (2548) ที่รายงานว่าอุณหภูมิสูงปริมาณสาร Curcumin ที่สกัดได้จะลดลงทั้งในกรณีที่ใช้เมธานอลหรือเอธานอลเป็นตัวสกัด ดังนั้นการสกัดสาร Curcumin จากขมิ้นชันจึงควรทำที่อุณหภูมิห้องมากกว่าที่อุณหภูมิสูง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *P. aeruginosa* ATCC 10145 พบว่าแผ่นปิดแผลสามารถลดจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า Adsorbent gauze โดยจำนวนเชื้อลดลงประมาณ 90% ($1 \log_{10} \text{CFU/ml}$) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อ *S. epidermidis* สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555) และเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน (นงลักษณ์ สุวรรณพิณีจ, 2544) ดังนั้นการที่ยาเตรียมเคลือบติดบน Adsorbent gauze จึงเป็นการปิดกั้นออกซิเจน ซึ่งอาจจะส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ และจากการทดสอบพบว่ายาพื้นสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ใกล้เคียงกับแผ่นปิดแผล ($<1 \log_{10} \text{CFU/ml}$) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งก่อนและหลังผ่านการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง

เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาระยะสั้น จึงควรมีการศึกษาด้านกายภาพของแผ่นปิดแผลในระยะยาว และควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลในการรักษาแผลเบาหวานในสัตว์ทดลองและการรักษาทางคลินิกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 117, 1219-1222.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R., 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods.* 82, 64-70.
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L., Ben-Shabat, S., 2015. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair Regen.* 23, 171-183.
- Candel González, F.J., Alramadan, M., Matesanz, M., Diaz, A., González-Romo, F., Candel, I., Calle, A., Picazo, J.J., 2003. Infections in diabetic foot ulcers. *Eur J Intern Med.* 14, 341-343.
- Carvalho, F.G., Puppim-Rontani, R.M., Fucio, S.B., Negrini Tde, C., Carlo, H.L., Garcia-Godoy, F., 2012. Analysis by confocal laser scanning microscopy of the MDPB bactericidal effect on *S. mutans* biofilm CLSM analysis of MDPB bactericidal effect on biofilm. *J Appl Oral Sci.* 20, 568-575.
- Chavan, Y.V., Singhal, R.S., 2013. Separation of polyphenols and arecoline from areca nut (*Areca catechu* L.) by solvent extraction, its antioxidant activity, and identification of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 93, 2580-2589.
- Chusri, S., Jittanon, W., Maneenoon, K., Voravuthikunchai, S.P., 2013a. An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional Thai herbal recipes used for wound treatments. *Microb Drug Resist.* 19, 337-343.
- Chusri, S., Settharaksa, S., Chokpaisarn, J., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S.P., 2013b. Thai herbal formulas used for wound treatment: a study of their antibacterial potency, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxicity effects. *J Altern Complement Med.* 19, 671-676.
- Chusri, S., Sompetch, K., Mukdee, S., Jansrisewangwong, S., Srichai, T., Maneenoon, K., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S.P., 2012. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional Thai herbal recipes used for wound treatment. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 159797.
- Clinton, A., Carter, T., 2015. Chronic wound biofilms: Pathogenesis and potential therapies. *Lab Med.* 46, 277-284.
- Fey, P.D., Olson, M.E., 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 5, 917-933.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., O'gara, J.P., 2005. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect.* 11, 967-973.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 8, 623-633.

- Gadepalli, R., Dhawan, B., Sreenivas, V., Kapil, A., Ammini, A.C., Chaudhry, R., 2006. A clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care*. 29, 1727-1732.
- Galkowska, H., Podbielska, A., Olszewski, W.L., Stelmach, E., Luczak, M., Rosinski, G., Karnafel, W., 2009. Epidemiology and prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in patients with diabetic foot ulcers: focus on the differences between species isolated from individuals with ischemic vs. neuropathic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract*. 84, 187-193.
- Gardner, S.E., Haleem, A., Jao, Y.L., Hillis, S.L., Femino, J.E., Phisitkul, P., Heilmann, K.P., Lehman, S.M., Franciscus, C.L., 2014. Cultures of diabetic foot ulcers without clinical signs of infection do not predict outcomes. *Diabetes Care*. 37, 2693-2701.
- Gould, L., Abadir, P., Brem, H., Carter, M., Conner-Kerr, T., Davidson, J., Dipietro, L., Falanga, V., Fife, C., Gardner, S., Grice, E., Harmon, J., Hazzard, W.R., High, K.P., Houghton, P., Jacobson, N., Kirsner, R.S., Kovacs, E.J., Margolis, D., Mcfarland Horne, F., Reed, M.J., Sullivan, D.H., Thom, S., Tomic-Canic, M., Walston, J., Whitney, J.A., Williams, J., Zieman, S., Schmader, K., 2015. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *J Am Geriatr Soc*. 63, 427-438.
- Hou, Q., He, W.J., Chen, L., Hao, H.J., Liu, J.J., Dong, L., Tong, C., Li, M.R., Zhou, Z.Z., Han, W.D., Fu, X.B., 2015. Effects of the four-herb compound ANBP on wound healing promotion in diabetic mice. *Int J Low Extrem Wounds*. 14, 335-342.
- Jain, A.K.C., Joshi, S., 2013. Diabetic Foot Classifications: Review of Literature. *Med-Science*. 2, 715-721.
- James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 16, 37-44.
- Kassab, N.H., Mustafa, E.A., Al-Saffar, M.T., 2007. The ability of different curcumine solutions on reducing *Candida albicans* biofilm activity on acrylic resin denture base material. *Al-Rafidain Dental Journal*. 7, 32-37.
- Koh, K.H., Tham, F.Y., 2011. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *J Microbiol Immunol Infect*. 44, 144-148.
- Lee, K.H., Kim, B.S., Keum, K.S., Yu, H.H., Kim, Y.H., Chang, B.S., Ra, J.Y., Moon, H.D., Seo, B.R., Choi, N.Y., You, Y.O., 2011. Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J Food Sci*. 76, H226-230.
- Li, S., Zhao, J., Liu, J., Xiang, F., Lu, D., Liu, B., Xu, J., Zhang, H., Zhang, Q., Li, X., Yu, R., Chen, M., Wang, X., Wang, Y., Chen, B., 2011. Prospective randomized controlled study of a Chinese herbal medicine compound Tangzu Yuyang Ointment for chronic diabetic foot ulcers: a preliminary report. *J Ethnopharmacol*. 133, 543-550.

- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathog. 5, e1000354.
- Mahatma, M.K., Thawait, L.K., Bishi, S.K., Khatediya, N., Rathnakumar, A.L., Lalwani, H.B., Misra, J.B., 2016. Nutritional composition and antioxidant activity of Spanish and Virginia groundnuts (*Arachis hypogaea* L.): a comparative study. J Food Sci Technol. 53, 2279-2286.
- Maneenoon, K., Khuniad, C., Teanuan, Y., Saedan, N., Prom-In, S., Rukleng, N., Kongpool, W., Pinsook, P., Wongwiwat, W., 2015. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in Phatthalung Province, Peninsular Thailand. J Ethnobiol Ethnomed. 11, 43.
- Mathew, S.M., Suchithra, T.V., 2014. A threatening approach of wound microflora to diabetic ulcer foot management. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3, 640-646.
- Mendes, J.J., Leandro, C.I., Bonaparte, D.P., Pinto, A.L., 2012. A rat model of diabetic wound infection for the evaluation of topical antimicrobial therapies. Comp Med. 62, 37-48.
- Naves, C.C., 2016. The diabetic foot: A historical overview and gaps in current treatment. Adv Wound Care (New Rochelle). 5, 191-197.
- Nguyen, P.T., Falsetta, M.L., Hwang, G., Gonzalez-Begne, M., Koo, H., 2014. alpha-Mangostin disrupts the development of *Streptococcus mutans* biofilms and facilitates its mechanical removal. PLoS One. 9, e111312.
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 7, 555-567.
- Packiavathy, I.A., Priya, S., Pandian, S.K., Ravi, A.V., 2014. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. Food Chem. 148, 453-460.
- Packiavathy, I.A., Sasikumar, P., Pandian, S.K., Veera Ravi, A., 2013. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. Appl Microbiol Biotechnol. 97, 10177-10187.
- Pattiyathane, P., Vilaichone, R.K., Chaichanawongroj, N., 2009. Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation. African Journal of Biotechnology. 8, 5106-5115.
- Percival, S.L., Cutting, K.F., 2009. Biofilms: possible strategies for suppression in chronic wounds. Nurs Stand. 23, 64, 66, 68 passim.
- Putranti, N.a.R., Hendrawan, R.D., Rahardjo, M.B., 2013. Effect of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp extract on biofilm formation of *Streptococcus mutans* on orthodontic wire (*In-vitro*). Conference of Indonesian Students Association in Korea. NA, 42.

- Rybtke, M., Hultqvist, L.D., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: Community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J Mol Biol.* 427, 3628-3645.
- Shankar, E.M., Mohan, V., Premalatha, G., Srinivasan, R.S., Usha, A.R., 2005. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur J Intern Med.* 16, 567-570.
- Suwankhong, D., Liamputtong, P., Rumbold, B., 2011a. Existing roles of traditional healers (mor baan) in southern Thailand. *J Community Health.* 36, 438-445.
- Suwankhong, D., Liamputtong, P., Rumbold, B., 2011b. Traditional healers (mor pheun baan) in Southern Thailand: the barriers for cooperation with modern health care delivery. *J Community Health.* 36, 431-437.
- Syed, H.K., Liew, K.B., Loh, G.O., Peh, K.K., 2015. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chem.* 170, 321-326.
- Tam, J.C., Lau, K.M., Liu, C.L., To, M.H., Kwok, H.F., Lai, K.K., Lau, C.P., Ko, C.H., Leung, P.C., Fung, K.P., Lau, C.B., 2011. The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action. *J Ethnopharmacol.* 134, 831-838.
- Wei, Q., Ma, L.Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 14, 20983-21005.
- Werdin, F., Tennenhaus, M., Schaller, H.E., Rennekampff, H.O., 2009. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty.* 9, e19.
- Yazdanpanah, L., Nasiri, M., Adarvishi, S., 2015. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J Diabetes.* 6, 37-53.
- Yodhnu, S., Sirikatitham, A., Wattanapiromsakul, C., 2009. Validation of LC for the determination of alpha-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. *J Chromatogr Sci.* 47, 185-189.
- Zhao, G., Usui, M.L., Lippman, S.I., James, G.A., Stewart, P.S., Fleckman, P., Olerud, J.E., 2013. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2, 389-399.