บทที่ 2

การทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือ

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

pH meter (PHM 61, 37R50N19, Made in Denmark by Radiometer A/S Copenhagen)

Spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch & Lomb)

สารที่ใช้

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวยา

Ethanol 95 % (จากโรงงานสุรา อยุธยา กรมสรรพสามิต)

Chloroform BP และ n-Butanol (จาก May & Baker Ltd. Dagenham England)

ตัวทำละลายทุกตัวเป็น Laboratory Reagent Grade

2. สารปรับ pH

Hydrochloric acid และ Sodium hydroxide

3. สารกันเสีย

Benzalkonium chloride, Methyl paraben และ Propyl paraben (จาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด เภสัชวิทยาคาสตร์)

Benzoic acid (จาก BDH Chemicals Ltd. Poole England)

Phenyl mercuric nitrate (จาก Wood Ridge Chemical Corporation Wood-Ridge, New Jersey)

4. อาหารเพาะเชื้อ

Bactopeptone, Bacto yeast extract, Glucose, และ Sabouraud Dextrose Agar (จาก Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)

5. สารที่ใช้เตรียมยาฟิ้นยีผึ้ง

Amerchol L-101$^{(R)}$ (จาก Amerchol)

Anhydrous lanolin, Cetyl alcohol, Cetyl esters wax, Glycerin BP, Mineral oil, Polyethylene glycol 400, Polyethylene glycol 4000, Polyethylene glycol 400 mono-stearate, Sodium lauryl sulfate, Span 80, Stearic acid, Stearyl alcohol, Tween 80, White petrolatum และ White wax (จาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด เภสัชวิทยาคำสิตร์)

Cetiol$^{(R)}$ V, Cutina$^{(R)}$KD 16, Emulgin$^{(R)}B_1$, Emulgin$^{(R)}B_2$ (จาก Henkel International GmbH Dusseldorf Dehydag Products, Germany)

Cholesterol (จาก E. Merck, Darmstadt)

Polawax$^{(R)}$ (จาก Croda Chemicals)

Propylene glycol (จาก บริษัท วิทยาคำรม จำกัด)

Triethanolamine (จาก บริษัท วันรัต จำกัด)

6. ยาขี้ผึ้งต้านเชื้อรา จากบริษัทต่างๆ ที่ใช้เปรียบเทียบ

Ezon -T ointment$^{(R)}$ (ประกอบด้วย Tolnaftate 2 %) Unison Laboratories Co., Ltd.

Fungisil Cream$^{(R)}$ (ประกอบด้วย Miconazole 2 %) Silom Medical Co., Ltd.

7. เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Trichophyton mentagrophytes (จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

Saccharomyces cerevisiae (จาก Gist-Brocades, Holland)

8. อื่น ๆ

Cellulose membrane D2130 (Cellulose dialyzer tubing, Arther H. Thomas Co.)

Sodium chloride powder (จาก บริษัท วิทยาศรม จำกัด)

Adhesive tape; Transpore(R) Surgical tape 3M, Made in U.S.A. by Medical Products Division/3M. St. Paul, MN 55144)

แต้โคว (กากเมล็ดชา) ซื้อจากร้านขายยาจีนทั่วไป

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดและการศึกษาฤทธิ์ของตัวยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

1. การสกัดตัวยาออกจากกากเมล็ดชา (แต้โคว) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

1.1 บดแต้โควให้เป็นผงละเอียดแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 2 เท่า นำไปต้มให้เดือดนาน 30 นาที

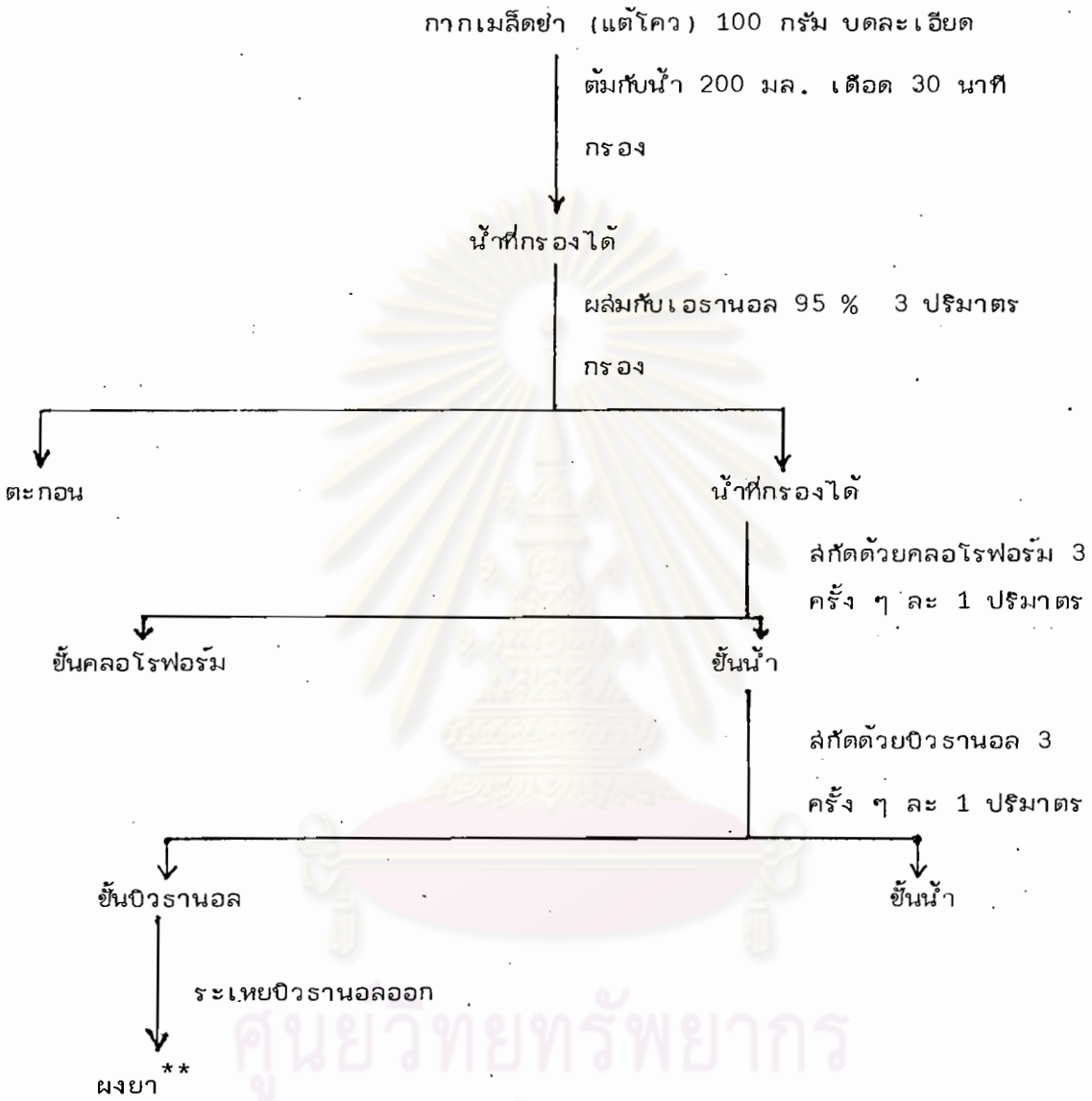
1.2 นำมากรองโดยใช้ผ้ายาวบาง 2 ชั้น มีแผ่นสำลีล่อดอยู่ตรงกลางระหว่างผ้ายาวบาง ทั้ง 2 แล้วนำน้ำที่กรองได้ไปเติมเอธานอล 95 % 3 ปริมาตรคนให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้ Suction

1.3 นำน้ำที่กรองได้ไประเหยเอาแอลกอฮอล์ออก โดยใช้ Vacuum evaporator เพื่อให้ปริมาตรลดลง เหลือเท่ากับเมื่อก่อนเติมเอธานอลหรือมากกว่าเล็กน้อย

1.4 นำน้ำยาที่ได้มาเติมคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ปริมาตร (1 ปริมาตร คือ ปริมาณน้ำยาที่ได้จากข้อ 1.3) เพื่อสกัดเอาสิ่งปลอมปน (Impurities) ออกไปอยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม ส่วนตัวยาจะอยู่ในชั้นน้ำ

1.5 นำชั้นน้ำจากข้อ 1.4 มาสกัดด้วยบิวธานอล 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ปริมาตร ตัวยาจะอยู่ในชั้นบิวธานอล

แผนภูมิที่ 2 แสดงการสกัดตัวยาออกจากแต้โคว *



* ตามวิธีของ ประภา เลาหไพบูลย์ และ ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ (29)

** ผงยาที่ได้ มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองน้ำตาล ชื้นง่ายมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.6 นำขั้นบิวธานอลไประเหยเอาบิวธานอลออกโดยใช้ Vacuum evaporator เพื่อให้ได้ตัวยาในลักษณะเป็นผง

1.7 ผงยาที่ได้ ต้องเก็บไว้ในขวดที่ปิดสนิท และควรเก็บใน Desiccator เพื่อป้องกันความชื้น

2. การศึกษาคุณสมบัติของตัวยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในห้องปฏิบัติการ

วิธีที่ใช้ทดสอบ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. Trichophyton mentagrophytes
2. Saccharomyces cerevisiae

ความเข้มข้นของตัวยา 1 % w/v ในน้ำกลั่น

สำหรับเชื้อ Trichophyton mentagrophytes ใช้ปริมาณน้ำยา 150 ไมโครลิตร ต่อ 1 cup

สำหรับเชื้อ Saccharomyces cerevisiae ใช้ปริมาณน้ำยา 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาความเข้ากันไม่ได้ของตัวยาต่อสารอื่น

1. ศึกษาผลของ pH ต่อฤทธิ์ของตัวยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

วิธีทดสอบใช้ Agar Diffusion Method

ความเข้มข้นของยาที่ใช้คือ 1 % w/v ในน้ำกลั่น

ปรับ pH ด้วยกรด HCl 1 N หรือ ด่าง NaOH 1 N

1.1 การทดสอบโดยใช้เชื้อ Saccharomyces cerevisiae

ช่วง pH ที่ใช้ทดลอง คือ pH 2.8-12.0

ปริมาณยาที่ใช้คือ 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายของตัวยา ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2 % w/v

2. นำสารละลายข้อ 1 มา 1 ml เติม HCl หรือ NaOH เพื่อให้ได้ pH อยู่ในช่วง 2 ถึง 12 โดยวัดด้วย pH meter

3. เติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละหลอด ให้สารละลายสุดท้ายมีปริมาตร 2 มล. จะได้ความเข้มข้นของตัวยา 1 % w/v แล้ววัด pH ของสารละลายอีกครั้งหนึ่ง บันทึกไว้ จะเป็น pH ที่ต้องการ พร้อมทั้งสังเกตลีของสารละลายที่ได้ในแต่ละ pH

4. นำสารละลายแต่ละหลอดเติมลงในหลุมซึ่งอยู่ในจานเพาะเชื้อ หลุมละ 50 ไมโครลิตร

5. Incubate และวัดผล ตามที่กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

1.2 การทดสอบโดยใช้เชื้อ Trichophyton mentagrophytes

ช่วง pH ที่ใช้ทดลอง คือ pH 3.61-9.39

ปริมาณยาที่ใช้คือ 150 ไมโครลิตร ต่อ 1 cup

วิธีการ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบโดยใช้เชื้อ Saccharomyces cerevisiae แต่แตกต่างกันที่ปริมาณยาที่ใช้ คือ 150 ไมโครลิตร ต่อ 1 cup

หมายเหตุ สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายของตัวยา แล้วปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH เช่นเดียวกัน

2. ศึกษาความเข้ากันไม่ได้ของตัวยาต่อตัวทำอีมัลชั่น

ตัวทำอีมัลชั่นที่ใช้ ได้แก่

Sodium lauryl sulfate 2 % w/v

Triethanolamine 1.5 % และ 2 % w/v

Tween 80 3 % w/v

เชื้อที่ใช้ทดสอบ Trichophyton mentagrophytes

วิธีทดสอบ Agar Diffusion Method

วิธีการ

1. เตรียม สารละลายของยา 2 % w/v ในน้ำกลั่น

2. เตรียม สารละลายของตัวทำอีมัลชั่นต่าง ๆ ในน้ำกลั่น ดังนี้

Sodium lauryl sulfate 4 % w/v

Triethanolamine 3 % และ 4 % w/v

Tween 80 6 % w/v

3. เตรียมสารละลายของตัวทำอีมัลชั่นที่มีตัวยาอยู่ด้วย, สารละลายตัวทำอีมัลชั่น และสารละลายของตัวยาเพียงอย่างเดียว ดังต่อไปนี้

สารละลายตัวทำอีมัลชั่นที่มีตัวยาอยู่ด้วย = สารละลายของตัวยาจาก ข้อ 1 และสารละลายตัวทำอีมัลชั่นจาก ข้อ 2 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1

สารละลายตัวทำอีมัลชั่น = น้ำกลั่น และสารละลายตัวทำอีมัลชั่นจาก ข้อ 2 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1

สารละลายของตัวยาเพียงอย่างเดียว = น้ำกลั่น และสารละลายของตัวยาข้อ 1 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1

4. วัด pH ของสารละลายในข้อ 3 โดยใช้ pH meter

5. นำสารละลายในข้อ 4 แต่ละชนิดเติมลงใน cup ซึ่งอยู่บนจานเพาะเชื้อ โดยใช้สารละลายแต่ละชนิดจำนวน 150 ไมโครลิตร ต่อ cup แล้วนำไป Incubate และวัดผลตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

3. ศึกษาผลของการใช้สารกันเสีย

3.1 การเจริญเติบโตของจุลชีพที่ทำให้ยาขี้ผึ้งเสีย

วิธีการ

1. เตรียมยาพื้นขี้ผึ้งชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการในภาคผนวก ง. ปริมาณอย่างละ 30 กรัม ดังนี้

1.1 White Ointment USP. (Oleaginous ointment base)

1.2 Hydrophilic Petrolatum USP. (Absorption ointment base)

1.3 Cold Cream USP (w/o Emulsion ointment base)

1.4 Beeler's base (o/w Emulsion ointment base)

1.5 Polyethylene Glycol Ointment USP (Water soluble ointment base)

2. ผสมตัวยาเข้ากับยาพื้นแต่ละชนิด ให้มีความแรง 1 % w/w แล้วนำไปบรรจุในขวดแก้วปากกว้างขนาด 1 ออนซ์ ซึ่งได้ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อเรียบร้อยแล้ว

3. สังเกตดูการเจริญของจุลชีพทุกวัน สังเกตสีและกลิ่นที่เปลี่ยนไปเป็นเวลานาน 2 เดือน

3.2 ศึกษาความเข้ากันไม่ได้ของตัวยาต่อสารกันเสีย

สารกันเสียที่ใช้[5][30] ได้แก่

Benzalkonium chloride 0.01 % w/v ในน้ำกลั่น

Benzoic acid 0.1 % w/v ในน้ำกลั่น

Methyl paraben 0.2 % w/v ในน้ำกลั่น

Phenyl mercuric nitrate 0.001 % w/v ในน้ำกลั่น

Propyl paraben 0.02 % w/v ในน้ำกลั่น

เชื้อที่ใช้ทดสอบ Saccharomyces cerevisiae

วิธีทดสอบ Agar Diffusion Method

ความเข้มข้นของยา 1 % w/v ในน้ำกลั่น

วิธีการ

1. เตรียม สารละลายของตัวยาในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2 % w/v

2. เตรียม สารละลายของสารกันเสีย ให้มีความเข้มข้นดังนี้

Benzalkonium chloride 0.02 % w/v ในน้ำกลั่น

Benzoic acid 0.2 % w/v ในน้ำกลั่น

Methyl paraben 0.4 % w/v ในน้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Phenyl mercuric nitrate 0.002 % w/v ในน้ำกลั่น

Propyl paraben 0.04 % w/v ในน้ำกลั่น

3. เตรียมสารละลาย Sample และ Control ดังนี้

Sample = สารละลายของตัวยา และสารละลายของสารกันเสียผสมกันในอัตราส่วน 1:1

Control = น้ำกลั่น และสารละลายของสารกันเสียผสมกันในอัตราส่วน 1:1

4. นำสารละลายแต่ละหลอด เติมลงในหลุมอาหารเพาะเชื้อ โดยใช้ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม

5. นำไป Incubate และ วัดผลตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาของยาพื้นยีฝังชนิดต่าง ๆ

1. การทดสอบกับเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคโดยตรง

ยาพื้นที่ใช้ได้แก่

1. White Ointment USP
2. Hydrophilic Petrolatum USP
3. Cold Cream USP
4. Beeler's base
5. Polyethylene Glycol Ointment USP

หมายเหตุ สูตรและวิธีเตรียมยาพื้นยีฝังชนิดต่าง ๆ นี้ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ง.

วิธีที่ใช้ทดสอบ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ Trichophyton mentagrophytes

วิธีการ

1. ผสมตัวยาเข้ากับยาพื้นยีฝังชนิดต่าง ๆ ให้มีความแรง 1 % w/w ในยาพื้นเหล่านั้น พร้อมทั้งสังเกตลีของยาพื้นยีฝังก่อนผสมตัวยาและยายีฝังที่ได้ภายหลังผสมตัวยาแล้ว

2. เติมยาขี้ผึ้งที่เตรียมได้ ลงใน cup ปริมาณ 0.25±0.02 กรัม ต่อ 1 cup ให้ผิวหน้าด้านล่างเรียบสัมผัสสนิทกับอาหารเพาะเชื้อ

3. Incubate และวัดผลตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

2. <u>การทดสอบการปลดปล่อยยาผ่านเซลลูโลสเมมเบรน</u>[31][32][33][34]

<u>วิธีการ</u>

1. ผสมตัวยาลงในยาพื้นขี้ผึ้งชนิดต่าง ๆ โดยให้มีความเข้มข้นของตัวยาในยาพื้นเท่ากับ 3,4 และ 5 % w/w ยาพื้นชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

1.1 White Ointment USP

1.2 Hydrophilic Petrolatum USP

1.3 Cold Cream USP

1.4 Beeler's base

1.5 Polyethylene Glycol Ointment base

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>หมายเหตุ</u> สูตรและวิธีเตรียมยาพื้นขี้ผึ้งชนิดต่าง ๆ นี้ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ง.

2. ชั่งยาขี้ผึ้งที่เตรียมได้ อย่างละ 20 กรัม บรรจุในภาชนะทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4 ซม. ปาดผิวให้เรียบสนิทเพื่อไม่ให้มีอากาศแทรกระหว่างตัวยาขี้ผึ้งกับเซลลูโลสเมมเบรน ปิดเซลลูโลสเมมเบรนรอบปากภาชนะ ดังรูปที่ 3 (เซลลูโลสเมมเบรนต้องนำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที เพื่อไล่อากาศออกก่อน จากนั้นซับน้ำที่ติดเมมเบรนออกแล้วจึงนำมาใช้ยะขึ้น ๆ ปิดปากภาชนะให้แนบสนิทกับยาขี้ผึ้ง)

3. ตัวทำละลายที่ใช้คือน้ำกลั่น 25 มล. บรรจุในบีกเกอร์ ขนาด 100 มล. มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในประมาณ 5.5 ซม. บีกเกอร์นี้จะจุ่มอยู่ใน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37±1° C คนน้ำกลั่นด้วย Magnetic stirrer เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำยาเป็นเนื้อเดียวกันทุกส่วนใช้ Clamp ยึดภาชนะที่มีเซลลูโลสเมมเบรนปิดที่กัน ให้ส่วนกันภาชนะอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำกลั่น 0.5 ซม. เริ่มจับเวลาทันทีที่จุ่มกันภาชนะลงในน้ำกลั่นที่มีการหมุนเวียนด้วยความเร็วสม่ำเสมอ เก็บตัวอย่างครั้งละ 150 ไมโครลิตร ในนาทีที่ 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรคงเดิมทุกครั้ง ที่เก็บตัวอย่างออกมาวิเคราะห์

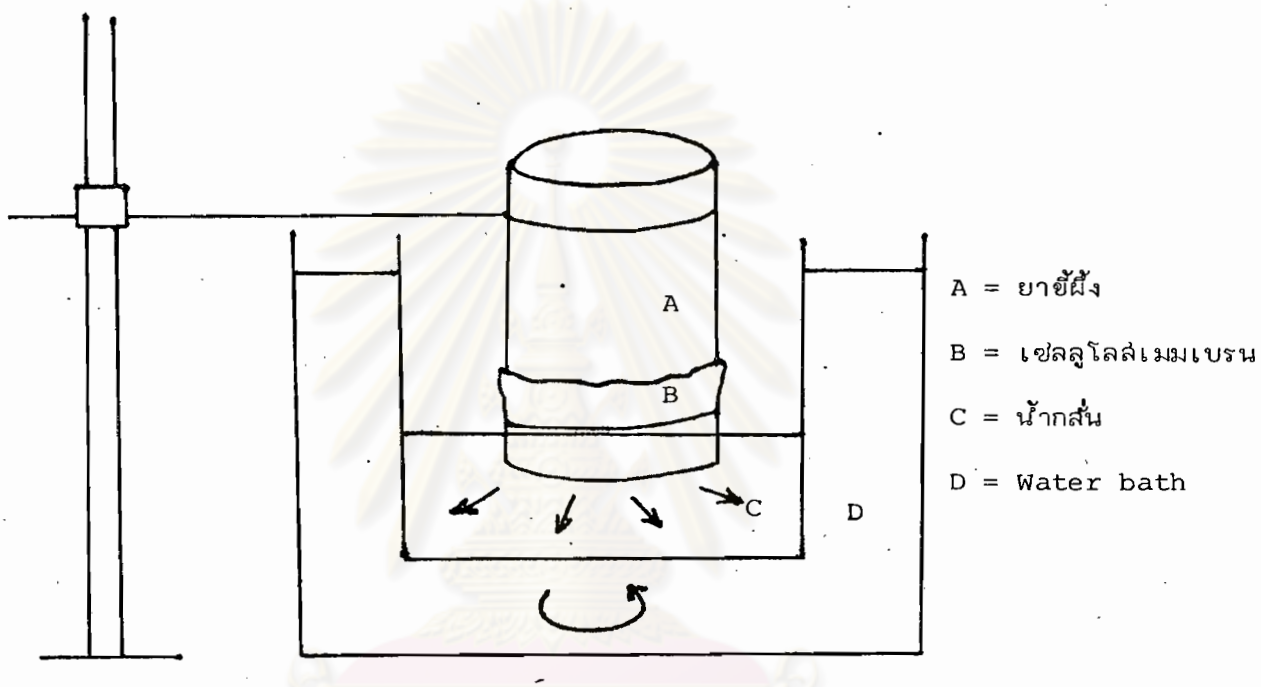
4. การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บมาได้

วิธีวิเคราะห์ใช้ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ คือ Saccharomyces cerevisiae

ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ เท่ากับ 50 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม

แปลผลตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.



รูปที่ 3 แสดงการจัดเครื่องมือในการทดลอง การปลดปล่อยตัวยาผ่านเซลลูโลส่-เมมเบรน

ขั้นตอนที่ 4 การปรับปรุงสูตรยาพื้นขี้ผึ้งที่ให้การปลดปล่อยตัวยาได้ดี

ยาพื้นขี้ผึ้งที่ใช้ ได้แก่

1. ยาพื้นชนิดอีมัลชั่น แบบน้ำมันในน้ำ ได้แก่

สูตรที่ 1 Vanishing cream 1 (A)

สูตรที่ 2 Polawax base (B)

สูตรที่ 3 Tween & Span base (C)

สูตรที่ 4 Vanishing cream 2 (D)

สูตรที่ 5 Cutina base 1 (E)

สูตรที่ 6 Cutina base 2 (E')

สูตรที่ 7 Cutina base 3 (F)

สูตรที่ 8 Beeler's base (G)

สูตรที่ 9 Emulgin B_1 & B_2 (H)

2. ยาพื้นชนิดละลายน้ำได้ ได้แก่

สูตรที่ 10 Polyethylene Glycol Ointment base 1 (J)

สูตรที่ 11 Polyethylene Glycol Ointment base 2 (K)

สูตรที่ 12 Polyethylene Glycol Ointment base 3 (L)

สูตรที่ 13 Polyethylene Glycol Ointment base 4 (M)

สูตรที่ 14 Polyethylene Glycol Ointment USP (N)

หมายเหตุ สูตรและวิธีการเตรียมยาพื้นยี้ผึ้งชนิดต่าง ๆ นี้ ได้กล่าวไว้แล้วในภาคผนวก ง.

วิธีการ

1. ผสมยาเข้ากับยาพื้นยี้ผึ้งทั้ง 14 ชนิดที่เตรียมได้ เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 3 และความเข้มข้นของยาในยาพื้น เท่ากับ 1 % w/w เช่นกัน

2. เลือกเอาเฉพาะยายี้ผึ้งตำรับที่ดี ส่วยงามน่าใช้ไปทดสอบการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นยี้ผึ้ง ดังนี้

วิธีที่ใช้ทดสอบ คือ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ คือ Trichophyton mentagrophytes

ปริมาณยายี้ผึ้งที่ใช้ 0.25±0.02 กรัม ต่อ 1 cup

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบความคงตัวของตำรับยายี้ผึ้งที่ปลดปล่อยตัวยาได้ดีที่สุด

การทดสอบทำโดยนำเอายาพื้นยี้ผึ้งที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 4 คือ ตำรับ E, G, J และ M มาปรับปรุงโดยเติมสารกันเสียชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ Benzoic acid (ใช้ 0.1 % w/w ของตำรับ), Phenyl mercuric nitrate (ใช้ 0.001 % w/w ของตำรับ) Methyl paraben (ใช้ 0.2 % w/w ของตำรับ) ร่วมกับ Propyl paraben (ใช้ 0.02 % ของตำรับ), และ Benzalkonium chloride (ใช้ 0.01 % w/w ของตำรับ) ซึ่งสูตรของ

ตำรับยาฟื้นยีผึ้งที่ใช้ ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก จ. จากนั้นนำมาผสมกับตัวยาให้มีความเข้มข้น 1 % w/w ในยาฟื้นยีผึ้ง แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Antifungal activity) และความคงตัวทางกายภาพ (Physical stability) ดังต่อไปนี้

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

วิธีที่ใช้ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ

Saccharomyces cereviseae

ปริมาณยายีผึ้งที่ใช้ทดสอบ 0.05 ± 0.01 กรัมต่อ 1 หลุม

วิธีการ

1. บรรจุยายีผึ้งที่จะทดสอบในขวดยายีผึ้ง ขวดละ 20 กรัม

2. ปิดฝาขวด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำยายีผึ้งมาหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในระยะเวลาต่าง ๆ คือ สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, และ 16 โดยถือว่า สัปดาห์ที่ 0 คือสัปดาห์แรกที่เตรียมยายีผึ้งเสร็จ

3. การวัด ผลทำตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

การทดสอบทำโดย สังเกตการเปลี่ยนแปลงของ ความแข็งของเนื้อยีผึ้ง, สี, กลิ่น และการแยกชั้นของยาเตรียม โดยวิธี Freeze and Thaw[35] 5 วงจร แต่ละวงจรทำดังนี้ อบยายีผึ้งในตู้อบ อุณหภูมิ 45° C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10° C นาน 24 ชั่วโมง เรียกเป็น 1 วงจร ทำเช่นนี้ 5 วงจร โดยในระหว่างทำการทดลองต้องไม่คนหรือเขย่าขวดยายีผึ้ง

วิธีการ

1. บรรจุยายีผึ้งที่จะทดสอบในขวดยายีผึ้ง ขวดละ 5 กรัม

2. นำมาทำการทดลองโดยวิธี Freeze and Thaw 5 วงจร แล้วเปรียบเทียบผลกับยายีผึ้งก่อนทำการทดลองโดยวิธีนี้

3. คัดเลือกยาขี้ผึ้งที่ผ่าน Freeze and Thaw 5 วงจร แล้วยังมีความคงตัวดี ไม่เปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ไปทดสอบดังต่อไปนี้

3.1 การปลดปล่อยตัวยา โดยวิธี Agar Diffusion Method และใช้เชื้อ Trichophyton mentagrophytes หรือ Saccharomyces cerevisiae โดยใช้ยาขี้ผึ้ง0.15±0.02 กรัม ต่อ 1 cup หรือ 0.05±0.01 กรัม ต่อ 1 หลุมตามลำดับ (เทียบกับยาขี้ผึ้งต้านเชื้อราที่มีขายตามท้องตลาด ได้แก่ Ezon-T Ointment(R) และ Fungisil cream)(R)

3.2 การระคายเคืองเบื้องต้น ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในการทดลองขั้นตอนที่ 6

ขั้นตอนที่ 6 การทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้น (Test of primary irritation)(36)(37)(38)(39)

จากผลการทดลองความคงตัวทางกายภาพในขั้นตอนที่ 5 ได้ยาขี้ผึ้งตำรับที่มีความคงตัวดี ไม่เปลี่ยนแปลงทางกายภาพ จึงนำยาขี้ผึ้งเหล่านี้มาทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้น ดังต่อไปนี้

เตรียมกระต่ายขลิบขนไว้ก่อนทดลอง 24 ชั่วโมง ใช้กระต่ายขาวครั้งละ 6 ตัว ขลิบขนบนหลังให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ ใช้แพตช์ (เป็น ผ้าลำลีอัดตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตร) นำยาขี้ผึ้งที่จะทดสอบมาทา โดยใช้ปริมาณยาขี้ผึ้งประมาณ 0.5 กรัม ต่อ 1 แผ่น แล้วปิดบริเวณผิวกระต่ายที่เตรียมไว้มีระยะห่างกันประมาณ 8 เซนติเมตร ยึดไว้ด้วยแถบเหนียว (Adhesive tape) และห่อลำตัวกระต่ายไว้ด้วยผ้าดิบ เพื่อยึดแพตช์ให้อยู่กับที่ และป้องกันไม่ให้ตัวยาที่ระเหยได้ระเหยเร็วนัก ปิดไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเอาแพตช์ออก แล้วให้สังเกตดูอาการผิดปกติ เช่น บวมแดง ตรงบริเวณที่ทดลองครึ่งชั่วโมงหลังจากเอาแพตช์ออก และทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน พร้อมทั้งบันทึกผลตามอาการที่ตรวจพบ

ขั้นตอนที่ 7 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา และทดสอบการการระคายเคืองเบื้องต้นของตัวยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในยาพื้นฐานที่ดีที่สุด

1. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของตัวยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในยาพื้นฐานที่ดีที่สุด

ยาพื้นยี้ฝังที่ใช้ คือ ตำรับ J_B ดังสูตรที่แสดงในภาคผนวก จ.

วิธีทดลองใช้ Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดลอง คือ Trichophyton mentagrophytes

ปริมาณยายี้ฝังที่ใช้ทดลอง 0.15±0.02 กรัม ต่อ 1 cup

ปริมาณสารละลายยาที่ใช้ทดลอง 0.15 มล. ต่อ 1 cup

วิธีการ

1. ผสมตัวยาลงในยาพื้นให้มีความเข้มข้นของตัวยาในยาพื้นยี้ฝัง 1, 2 3, 4 และ 5 % w/w

2. ละลายตัวยาในน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นของตัวยาในน้ำกลั่นเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 %

3. นำยายี้ฝังที่ได้ในข้อ 1 และสารละลายที่ได้ในข้อ 2 ไปทดลองการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น

4. Incubate และวัดผลตามที่ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ค.

2. การทดลองการระคายเคืองเบื้องต้นของตัวยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในยาพื้นชนิดที่ดีที่สุด

ยาพื้นยี้ฝังที่ใช้ คือ ตำรับ J_B

วิธีการทดลอง ทำเช่นเดียวกับการทดลองการระคายเคืองเบื้องต้นในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ความเข้มข้นของตัวยาในยาพื้น เท่ากับ 1 %, 2 %, 3 %, 4 % และ 5 % w/w แล้วบันทึกผลตามอาการที่ตรวจพบ เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 6

ขั้นตอนที่ 8 การทดลองความคงตัวของฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของตัวยาในยาพื้นยี้ฝังชนิดที่ดีที่สุด

ยาพื้นยี้ฝังที่ใช้ คือ ตำรับ J_B

วิธีการทดลอง Agar Diffusion Method

เชื้อที่ใช้ทดลอง Trichophyton mentagrophytes

ปริมาณยายี้ฝังที่ใช้ทดลอง 0.15±0.02 กรัม ต่อ 1 cup

วิธีการ

1. ผสมตัวยาเข้ากับยาพื้นยี้ฝังตำรับ J_B โดยให้มีตัวยา 1 % w/w ในยาพื้น ใส่ขวดยายี้ฝังที่นึ่งอัดแล้ว ปิดฝาให้สนิทแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. หลังจากนั้น 20 อาทิตย์ เตรียมยายี้ฝังเช่นเดียวกับข้อ 1 ขึ้นอีกครั้ง

3. เติมยายี้ฝังจากข้อ 1 ซึ่งเก็บไว้นาน 20 อาทิตย์ และยายี้ฝังจากข้อ 2 ซึ่งเตรียมขึ้นใหม่ทันที ลงใน Stainless steel cylindrical cup แล้ววางบนจานเพาะเชื้อ

4. Incubate และวัดผลตามที่ได้กล่าวไว้แล้วในภาคผนวก ค.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย