

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมี

- Liquid paraffin USP.XIX (Lot number 102145, Srichand United Dispensary CO.,Ltd.,Thailand)
- Cetomacrogol 1000
- Span 80 (บริษัทศรีจันทร์ สหโอสถ จำกัด)
- Tween 80 (บริษัทศรีจันทร์ สหโอสถ จำกัด)
- Isopropyl myristate (บริษัท SNP general จำกัด, ประเทศไทย)
- EDTA (Schalau chemie S.A)
- Stearyl alcohol (Scichand United Dispensary CO, Ltd)
- Cetyl alcohol (Scichand United Dispensary CO, Ltd)
- Propylene glycol (Vidhyasom Co.,Ltd., Thailand)
- Carbopol 940
- Propyl paraben USP XXII (Vidhyasom Co.,Ltd., Thailand)
- Methyl paraben USP XXII (Vidhyasom Co.,Ltd., Thailand)
- Butylated Hydroxyanisole (BHA)
- Sodium Metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)
- 95% Ethanol (โรงงานสุรา กรมสรรพสามิต)
- Triethanolamine (TEA)
- Methanol (Labscan Asua Co.,Ltd)
- Acetonitrile
- Phosphoric acid (Riedel- de Haenag Ltd., Germany)

เครื่องมือ

- Rotary evaporator
- Hot plate
- ชุดกรองสูญญากาศ
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
 - ◆ System Gold Programmable Detector Module 166
 - ◆ Injection port loop 20 μl
 - ◆ Column Alltech C18 (Length 250 nm, Lot No. 1150)
 - ◆ Guard colume C18

- กระดาษวัด pH (Schleicher & Schell ยี่ห้อ Panpeha®)
- Sonicator
- Centrifuge

วิธีการดำเนินการทดลอง

การดำเนินการทดลองแบ่งเป็นส่วนใหญ่ๆ คือ

1. การสกัดสารสำคัญจากใบมะม่วง
2. ตั้งตำรับยาครีมตำรับต่างๆ ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบมะม่วง และเพิ่มส่วนประกอบของสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน 2 ชนิด
3. การทดสอบความคงตัวของสารแมงจิเฟอรินในตำรับครีมสารแมงจิเฟอรินบริสุทธิ์และตำรับครีมสารสกัดจากใบมะม่วงมะม่วง

การสกัดสารสำคัญจากใบมะม่วง

- 1.1 ชั่งใบมะม่วงสดที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ 2 กก. ใส่ ethanol 95% พอท่วม นำไปปั่นใน blender
- 1.2 นำส่วนที่ปั่นได้เข้าเครื่องเขย่า 2 วัน จากนั้นนำไปกรอง
- 1.3 กากที่เหลือจากสารสกัดใน 95% ethanol ให้ท่วมกากอีก 1 คืน
- 1.4 รวมสารสกัดเข้าด้วยกันแล้วนำไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator
- 1.5 ได้สารสกัดใบมะม่วงในรูปสีเขียวเข้ม

การตั้งตำรับยาครีมตำรับต่างๆ ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบมะม่วง และเพิ่มส่วนประกอบของสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน 2 ชนิด

ตารางที่ 3-1 แสดงสูตรตำรับที่ 1 (สารแมงจิเฟอรินบริสุทธิ์), ตำรับที่ 2 (สารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วง), ตำรับที่ 3 (สูตรผสม ตำรับที่ 2 + Sodium Metabisulfite) และตำรับที่ 4 (สูตรผสม ตำรับที่ 2 + Butylated Hydroxyanisole [BHA])

สารเคมี	หน้าที่	Rx1	Rx2	Rx3	Rx4
กลุ่ม A					
Pure Mangiferin / Mango Leave Extracts	Active Ingredient	0.117	5.59	5.59	5.59
Stearyl Alcohol	Stiffening agents	2.34	16.38	16.38	16.38
Cetyl alcohol	Stiffening agents	8.19	57.33	57.33	57.33
Liquid paraffin	Emollients	5.85	40.95	40.95	40.95
Isopropyl myristate	Stiffening agents	2.34	16.38	16.38	16.38
Cetomacrogol 1000	Emulsifiers	0.63	5.08	5.08	5.08
Methyl paraben	Preservatives	0.023	0.16	0.16	0.16
Propyl paraben	Preservatives	0.234	1.64	1.64	1.64
Span80	Emulsifiers	0.73	5.08	5.08	5.08
BHA	Antioxidants	-	-	-	0.0819
กลุ่ม B					
Propylene glycol	Humectants	11.7	81.9	81.9	81.9
EDTA	Antioxidants	0.059	0.41	0.41	0.41
Carbopol	Viscosity agents	0.234	1.64	1.64	1.64
Tween80	Emulsifiers	4.40	30.79	30.79	30.79
TEA	pH adjusters	0.35	2.46	2.46	2.46
Sodium metabisulfite	Antioxidants	-	-	0.819	-
H ₂ O	Solvents	79.71	553.03	552.95	552.21

วิธีการเตรียม

1. แยกหกลอมวัตถุดิบน้ำมัน คือ ส่วน A บนอ่างไอน้ำจนวัตถุดิบน้ำมันหลอมหมด จากนั้นเติมสารสกัดใบมะม่วง แล้วคนจนสารสกัดละลายหมด โดยควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 65 °C
2. แยกหกลอมวัตถุดิบน้ำ คือ ส่วน B บนอ่างไอน้ำจนได้อุณหภูมิ 70 °C โดยหกลอมทุกส่วน (ยกเว้น TEA)
3. เทวัตถุดิบลงในวัตถุดิบน้ำมัน คนให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอแล้วค่อยๆ เติม TEA จากนั้นคนต่อจนเกิดเป็นเนื้อครีม
4. บันทึกลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสูตรตำรับก่อนและหลังทดสอบความคงตัว

ซึ่งการบันทึกลักษณะของสูตรตำรับทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวทางเคมีโดยเครื่อง HPLC และการทดสอบความคงตัวทางกายภาพโดยใช้แบบทดสอบ Physical Quality ได้แก่

a. pH

Calibration the pH meter, then determine the pH of the product.

b. Color of product

It may be advisable to use a color chart for for determining the actual color of product.

c. Clarity

Evaluate clarity by visual inspection

d. Texture – Surface

Observe the product in a container to determine smoothness of the surface.

e. Texture – Spatula Spread

Spread a small portion of the product out on pill tile or other flat surface and evaluate for smoothness.

f. Appearance (Dry, Weeping)

Determine whether the product appears “dry” or “wet” and oozing with liquid.

g. Feel (tacky, Plastic, Elastic)

Touch the product to determine whether it is sticky (tacky) or hard (plastic) or bounces back.

h. Rheological properties

Place a small quantity of the product on glass plate. Lift one edge of the glass plate up to a 45 angle. Visually determine whether the product flow easily or remains stationary.

ซึ่งการพิจารณาลักษณะต่างๆ จะให้คะแนนตั้งแต่ 1-5 ซึ่ง 1 หมายถึง น้อยที่สุด และ 5 หมายถึง มากที่สุด

การวิเคราะห์หาแอมจีเฟอรินจากครีม

การสกัดสารแอมจีเฟอรินจากตำรับยาครีมด้วย methanol ทำได้โดยชั่งครีมให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม methanol 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนที่ใสเก็บไว้ จากนั้นนำครีมดังกล่าวในหลอดทดลองไปสกัดซ้ำด้วย methanol อีกจนครบ 5 รอบด้วยวิธีการแบบเดิมดังข้างต้น แล้วเก็บสารละลายส่วนที่ใสทั้งหมดที่สกัดได้มารองผ่านกระดาษกรองใสใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรจนครบด้วย methanol จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยแสดงเป็นแผนภาพการสกัดดังนี้

ขิงครีม 1 กรัม (บันทึกน้ำหนัก) ใส่หลอดทดลอง



เติม methanol 5 ml



นำไป sonicate 7 นาที



นำไป centrifuge 7 นาที (3000 rpm)



Dropper คูดสารสกัดใส่ volumetric flask 25 ml กรองผ่านกระดาษกรอง

(ทำการสกัดซ้ำจนครบ 5 รอบ)



ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 ml

การเตรียม standard curve

การเตรียม standard curve ของ standard mangiferin ในระบบ การวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังกล่าว ทำ triplicate โดยมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. ชั่ง standard mangiferin 1 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ละลายและปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol ใน flask ขนาด 50 ml ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ (Stock solution)
2. เปิด stock solution มาเจือจาง (dilution) ให้สารละลายของ standard mangiferin มีความเข้มข้นประมาณ 1, 5, 7, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$
3. นำสารละลาย standard mangiferin ที่เตรียมขึ้นความเข้มข้นต่างๆ กัน ไปวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 254 nm ใช้ mobile phase เป็น acetonitrile: H_2O : Phosphoric acid = 14: 85: 1 โดยวัดปริมาณของ mangiferin ในรูป peak area
4. นำผลที่ได้มาสร้าง standard curve ระหว่างความเข้มข้นของ standard mangiferin ($\mu\text{g/ml}$) กับ peak area ของ mangiferin โดยปริมาณสารสำคัญที่ตำรับยาครีมที่ผ่านการทดสอบความคงตัวทางเคมี สามารถคำนวณได้จาก standard curve นี้