

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง (skin toxicity test) มีความสำคัญในงานพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทยา เครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ต้องสัมผัสกับผิวหนังเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อประเมินผลกระทบของผลิตภัณฑ์ต่อผิวหนังทั้งในแง่ความเป็นพิษ อาการข้างเคียงหรือการกระตุ้นให้เกิดผลใด ๆ ต่อผิวหนัง การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังมีลักษณะเฉพาะแตกต่างจากการทดสอบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับอวัยวะส่วนอื่นของร่างกาย เนื่องจากผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีลักษณะเฉพาะคือมีเซลล์ที่ตายแล้วเป็นชั้นผิวหนัง และมีเซลล์หลายชนิดอยู่รวมกันเป็นโครงสร้างของอวัยวะปกคลุม การพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีผลิตภัณฑ์ที่ทำด้วยนาโนเทคโนโลยี ด้วยอนุภาคนาโนขนาดเล็กมากกว่าช่องว่างระหว่างเซลล์ผิวหนังทำให้มีโอกาสที่จะผ่านเข้าผิวหนังได้ ทำให้มีความตระหนักต่อผลกระทบของเทคโนโลยีที่อุบัติขึ้นใหม่

วิธีดั้งเดิมในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังและให้คำตอบที่เชื่อถือและยอมรับได้เป็นการทดสอบโดยใช้แผ่นปิดผิวหนัง (patch test) ของสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ผลเบื้องต้นก่อนที่จะทำการทดสอบในคนต่อไป สัตว์ที่นิยมใช้ทดสอบความเป็นพิษได้แก่ กระต่าย หนูตะเภา (Draize, Woodard, & Calvery, 1944) ต่อมาเงื่อนไขการค้าระหว่างประเทศโดยเฉพาะกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (European Union) ซึ่งมีข้อกำหนดห้ามการทดสอบสารที่ใช้ทำผลิตภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางในสัตว์ทดลองตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เป็นต้นมา ทำให้มีการพัฒนาการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบ องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) เป็นองค์การที่จัดทำแนวปฏิบัติ (guidelines) ต่าง ๆ เพื่อเป็นกติการ่วมกันในการปฏิบัติที่ได้รับการยอมรับในวิธีการทดสอบต่าง ๆ

หนึ่งในแนวปฏิบัติที่องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา กำหนดคือแนวปฏิบัติในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังซึ่งกำหนดให้ใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่ได้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง (differentiation) เป็นอวัยวะปกคลุมเต็มรูปคือมีเซลล์ชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ที่ไม่มีชีวิตและเซลล์ชั้นอื่น ๆ ของหนังกำพร้า (epidermis) ที่ยังมีชีวิตอยู่ หนึ่งในข้อจำกัดของการใช้เซลล์ดังกล่าวคือ แหล่งของการจัดซื้อเซลล์ผิวหนังอยู่ในทวีปอเมริกา และยังไม่สามารถจัดส่งเซลล์ข้ามทวีปโดยควบคุมให้เซลล์มีชีวิตและดำรงอยู่ในสภาพพร้อมใช้ในการทดสอบทันทีที่จัดส่งถึงปลายทางตามเงื่อนไขของการทดสอบ ดังนั้นการปฏิบัติตามแนวทางของ OECD แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ดีแต่ยังเป็นไปไม่ได้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง (skin toxicity test) โดยใช้เซลล์ผิวหนังและเซลล์อื่นขึ้นควบคู่ไปกับการทดสอบฤทธิ์ระคายเคืองและฤทธิ์กัดกร่อนผิวหนัง (skin/dermal irritation and skin/dermal corrosion tests) โดยคาดว่าจะแนวทางส่วนหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ต่อการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปใช้กับผิวหนัง (Chunthapong, Canton, & Kemp, 2008) โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ

การทดสอบประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่ยังมีชีวิตอยู่ในชั้นหนังกำพร้า และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast cell) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังแท้ (Maria, 1992)

อนุภาคนาโนมีการศึกษาพัฒนาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งสารสำคัญต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย และยังพบว่ามีส่วนช่วยให้ยาหรือสารอาหารรวมทั้งสารที่ใช้เป็นเวชสำอางมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นได้ เป็นผลให้มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายชนิด ในปัจจุบันมีความสนใจใช้อนุภาคนาโนในการนำส่งสารทางผิวหนังเพิ่มขึ้น การรับรองความปลอดภัยจำเป็นต้องมีข้อมูลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง

นาโนซิลิโกลด์เป็นวัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์อุปโภคหลายชนิด มีความสามารถในการทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับที่ดี อีกทั้งเมื่อทำให้มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร หรือนาโนซิลิโกลด์ก็ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้เสริมคุณสมบัติการดูดซับ มีแนวคิดในการนำนาโนซิลิโกลด์มาใช้ในเครื่องสำอางเพื่อดูดซับสารสำคัญเพื่อปลดปล่อยอย่างช้า ๆ ทำให้มีสารสำคัญซึมอยู่บริเวณผิวหนังที่ทาได้นานขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้นาโนซิลิโกลด์ที่ทาผิวหนังยังมีความสามารถในการเคลือบผิวอย่างเบาบาง ช่วยดูดซับสารส่วนเกินอื่น เช่น ไขมันหรือน้ำเหงื่อ นาโนซิลิโกลด์เป็นวัสดุที่มีการศึกษามากมายและได้แสดงด้วยการทดสอบบนผิวหนังคนด้วยโดยใช้แผ่นปิดผิวหนังไม่พบปฏิกิริยาใดอีกทั้งไม่กระตุ้นภูมิแพ้เมื่อทดสอบที่ผิวหนังของหนูตะเภาด้วย แต่หากเมื่อทำในรูปวัสดุนาโนซึ่งมีขนาดเล็กกลั่นนั้นอาจมีผลต่อผิวหนังในทางใดทางหนึ่งก็เป็นได้รวมถึงเพิ่มการซึมผ่านหรือการกระตุ้นอนุมูลอิสระ (Fruijtier-Pöllöth, 2009)

การวัดการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ช่วยให้อธิบายผลกระทบของสารจากภายนอกต่อเซลล์ ทำได้โดยใช้วิธีทดสอบด้วยวิธีการเอ็มทีที เทียบกับวิธีการติดตามเซลล์ทุกช่วงเวลา (real time monitoring) ด้วยวิธีทางฟิสิกส์ด้วยระบบที่มีชื่อเฉพาะว่าระบบเอกเซลลิเจนซ์ XCelligence ในภาวะที่มีสารทดสอบ (ตัวควบคุมเชิงบวก) และเทียบกับเมื่อไม่มีสารทดสอบ (ตัวควบคุมเชิงลบ) วิธีการเอ็มทีทีเป็นวิธีการที่นิยมใช้เนื่องจากทำได้ง่ายและเป็นที่ยอมรับ แต่การอ่านผลที่เวลาใดเวลาหนึ่งอาจไม่สามารถอธิบายผลของสารที่ให้จากภายนอกซึ่งกระทำต่อเซลล์แต่ละชนิด การใช้วิธีการติดตามเซลล์ทุกช่วงเวลาช่วยให้อธิบายผลของสารต่าง ๆ ที่สัมผัสเซลล์ได้ชัดเจน แต่เมื่อนำไปใช้กับผิวหนังยังต้องเข้าใจผลของสารต่าง ๆ ที่ให้จากภายนอกในการกระตุ้นการอักเสบด้วยระบบภูมิแพ้ (OECD, 2008)

วิธีการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นตัวแทนของผิวหนังโดยใช้เกณฑ์พิจารณาที่สำคัญคือการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ณ ช่วงเวลาหนึ่งโดยใช้วิธีเอ็มทีที เทียบกับวิธีการติดตามเซลล์ทุกช่วงเวลาด้วยระบบเอกเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ในภาวะที่มีสารทดสอบ (ตัวควบคุมเชิงบวก) และเทียบกับเมื่อไม่มีสารทดสอบ (ตัวควบคุมเชิงลบ) เพื่อเปรียบเทียบวิธีการและดูผลของสารต่าง ๆ ต่อเซลล์ การวัดการมีชีวิตของเซลล์ช่วยให้อธิบายผลกระทบของสารจากภายนอกต่อเซลล์ อีกทั้งทำการตรวจวัดระดับสารอักเสบที่ชนิดหนึ่งคือ อินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา (interleukin-1 α , IL-1 α) ที่เซลล์หลั่งในภาวะที่มีสารทดสอบ

อัญชันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Clitoria ternatea* L. ชื่อวงศ์ Leguminosae เป็นพืชล้มลุกที่มีประวัติเป็นสมุนไพรมาแต่เดิมโดยมีบันทึกในตำราอายุเวทถึงสรรพคุณต่าง ๆ ดอกอัญชันสีน้ำเงินให้สารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญ ภูมิปัญญาเดิมของไทยมีการใช้ดอกอัญชันในการสกัดเอาสีมาใช้เสริมความงามหรือใช้เป็นสีแต่งอาหารแต่ก็ยังขาดข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษโดยเฉพาะเมื่อผ่านกระบวนการผลิต (Castaneda – O, Lourdes Pacheco-H, Elena Paez-H, Jose, & Andres Galan-V, 2009)

ฤทธิ์ที่เกิดจากการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินเป็นฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพปานกลางแต่การนำมาใช้เสริมความงามมักเกี่ยวข้องกับการซ่อมสัฟมหรือชนคิ้ว ซึ่งมักใช้ในความเข้มข้นสูงและอาจสัมผัสบ่อย ๆ หรือเป็นเวลานานจึงต้องการข้อมูลที่ให้คำตอบทางวิทยาศาสตร์ว่าสารสกัดจากดอกอัญชันมีความปลอดภัย การศึกษานี้จึงเลือกใช้สารสกัดจากดอกอัญชันในกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นตัวแทนของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งนอกจากจะได้พัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังแล้วยังทำให้เข้าใจผลของสารสกัดสมุนไพรในความเข้มข้นสูงต่อเซลล์ผิวหนังโดยตรง เป็นข้อมูลที่ช่วยให้เข้าใจผลของสมุนไพรต่อเซลล์และกำหนดวิธีการใช้สมุนไพรอย่างเหมาะสมด้วย

นอกจากนี้การใช้สารสกัดสีน้ำเงินเข้มทำให้ประอบเป็นส่วนอื่น ๆ ของร่างกายหรือเสื้อผ้า หากมีการใช้สารช่วยดูดซับแอนโทไซยานินและกักเก็บไว้ทำให้ปลดปล่อยออกมาเฉพาะบริเวณ การเลือกใช้นาโนซีโอไลต์เป็นสารช่วยดูดซับหรือตัวดูดซับแอนโทไซยานินที่สกัดจากดอกอัญชันจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะกักเก็บรงควัตถุสีน้ำเงินไว้ ทำให้ไม่ประอบเป็นบริเวณที่ไม่ต้องการและปลดปล่อยแอนโทไซยานินในบริเวณเฉพาะที่ทา อีกทั้งศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของนาโนซีโอไลต์ที่กักเก็บสารแอนโทไซยานินไว้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน กับสารเคียวคือนาโนซีโอไลต์หรือแอนโทไซยานินจากสารสกัดดอกอัญชัน กรอบแนวคิดการวิจัยกำหนดขึ้นจากการพัฒนาวิธีทดสอบความเป็นพิษด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง 2 วิธี และใช้สาร 3 ชนิดคือนาโนซีโอไลต์ แอนโทไซยานิน และสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากการดูดซับแอนโทไซยานินของนาโนซีโอไลต์ ด้วยสมมติฐาน 2 ประการ กล่าวคือการมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสสารเคียวแต่ละตัวแตกต่างจากสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นผลจากการดูดซับระดับของสารอีกเสบที่เซลล์ผลิตขึ้นเมื่อสัมผัสสารเคียวแต่ละตัวแตกต่างจากสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นผลจากการดูดซับ หากสารประกอบเชิงซ้อนนี้ช่วยลดการตายของเซลล์ (หรือการมีชีวิตของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มขึ้น) หรือลดการหลังสารอีกเสบได้ก็แสดงถึงความปลอดภัยและการเสริมประโยชน์ระหว่างนาโนซีโอไลต์กับสารแอนโทไซยานิน และทำให้ได้วัสดุชนิดใหม่ที่มีคุณค่าต่อสุขภาพเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ อีกทั้งการศึกษานี้ใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณซึ่งจะทำให้ทราบระดับที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างปลอดภัยของสารที่ทำการศึกษา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก เพื่อศึกษาความเป็นพิษของแอนโทไซยานินที่ได้จากสารสกัดอัญชัน นาโนซีโอไลต์ และนาโนซีโอไลต์ที่ดูดซับแอนโทไซยานินสกัดจากดอกอัญชัน

วัตถุประสงค์รองที่ 1 เพื่อกำหนดระดับความปลอดภัยของการใช้นาโนซีโอไลต์ แอนโทไซยานินและสารที่เกิดจากการดูดซับระหว่างนาโนซีโอไลต์กับแอนโทไซยานินสำหรับใช้กับผิวหนัง

วัตถุประสงค์รองที่ 2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของนาโนซีโอไลต์ในการดูดซับแอนโทไซยานินที่สกัดจากดอกอัญชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นงานวิจัยในเชิงทดลอง (experimental study) ที่ได้ทำการทดลองในหลอดทดลอง ทำการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับอนุภาคนาโนกับการดูดซับสารสำคัญโดยมุ่งที่จะทำการศึกษากความเป็นพิษของแอนโทไซยานินจากสารสกัดอัญชัน นาโนซีโอไลต์ และแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์ รวมไปถึง

ผลของสารทดสอบที่มีต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง และทำการศึกษาฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินที่ดูดซับในนาโนซีโอไลต์

ข้อจำกัดการศึกษาในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เซลล์ผิวหนังในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังสองชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์ และ เซลล์อีพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่พบมากที่สุดผิวหนังชั้นหนังแท้ และชั้นหนังกำพร้าตามลำดับ ทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาถึงการซึมผ่านชั้นผิวหนังชั้นต่าง ๆ ของสารทดสอบได้ หากแต่ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญของวัตถุดิบ ที่จะนำไปใช้เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูปแบบอนุภาคนาโนต่อไปในอนาคต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 แนวทางในการใช้นาโนซีโอไลต์ดูดซับแอนโทไซยานินมาใช้กับผิวหนังอย่างปลอดภัย
- 1.4.2 การส่งเสริมการใช้สารสกัดจากธรรมชาติของไทยที่มีข้อจำกัดการใช้งานด้วยนวัตกรรม