

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 3 เรื่อง

“การพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทย

ในอนุภาคนาโนเพื่อใช้รักษาผมหงอก”

(ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย”

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ อรัญญา มโนสร้อย และคณะ



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 3 เรื่อง

“การพัฒนากาเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทย
ในอนุภาคนาโนเพื่อใช้รักษาผมหงอก”

(Research and Development of Extracts from Thai Traditional
Medicinal Plants in Nanoparticles for White Hair Treatment)

(ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัด
สมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย”)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร. ภญ. อรัญญา มโนสร้อย | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. ศาสตราจารย์ ดร. ภก. จีระเดช มโนสร้อย | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. อาจารย์ผ่องพรรณ เหลี่ยมวานิช | มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง จังหวัดลำปาง |
| 4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2552-2554

คำนำ

ในปัจจุบัน ปัญหาผมหงอกก่อนวัยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญหนึ่งที่มีผลต่อบุคลิกภาพของทั้งผู้หญิงและผู้ชาย สาเหตุของผมหงอกก่อนวัย นอกจากปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น ความเครียดและสารเคมี รวมทั้งมลภาวะแล้ว ยังเกิดจากผลทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องของเมลานินไซโตในการสร้างเม็ดสีของเซลล์รากผม ในขณะนี้ ยังไม่มีวิธีการรักษาแต่เป็นการแก้ไขที่ปลายเหตุ โดยวิธีการย้อมผมซึ่งการย้อมผมด้วยผลิตภัณฑ์ยาย้อมส่วนใหญ่ที่เป็นสารเคมี โดยเฉพาะยาย้อมผมประเภทถาวร ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากยาย้อมจะไม่ใช้วิธีการแก้ปัญหที่ต้นเหตุแล้วยังอาจก่อการแพ้และระคายเคืองรวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็งต่อผู้บริโภคอีกด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศในภูมิภาคอาเซียนซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมุนไพรที่มีงานวิจัยและภูมิปัญญาพื้นบ้านที่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินหรือ melanogenesis และช่วยให้ผมดำได้ อย่างไรก็ตาม สารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ ไม่คงตัวและถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากผมได้ยากเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จุดประสงค์ของโครงการวิจัยที่ 3 นี้ (ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย”) จึงเป็นการพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกก่อนวัย ผลจากโครงการวิจัยนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยรวมทั้งช่วยลดการนำเข้าที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติออกสู่เชิงพาณิชย์ได้ ในที่สุดนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ในปีงบประมาณ 2552-2554 เป็นระยะเวลา 3 ปี จนได้ผลงานวิจัยตามวัตถุประสงค์

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2554

สารบัญ

ลำดับที่	รายการ	หน้า
1.	คำนำ	ก
2.	สารบัญ	๗
3.	บทสรุปผู้บริหาร	ง
4.	บทคัดย่อภาษาไทยและอังกฤษ	ฉ
5.	เนื้อหางานวิจัย	1
6.	ภาคผนวก	5
	ภาคผนวก 1 : การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก	6
	ภาคผนวก 2 : การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก	17
	ภาคผนวก 3 : การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก	25
	ภาคผนวก 4 : การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells (B ₁₆ F ₁₀)	32
	ภาคผนวก 5 : การเก็บกักสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบกในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)	39
	ภาคผนวก 6 : การจัดทำ Specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน(นีโอโซม)	51
	ภาคผนวก 7 : การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)	56
	ภาคผนวก 8 : การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)	61
	ภาคผนวก 9 : การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง B ₁₆ F ₁₀ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)	65
	ภาคผนวก 10 : การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก	72
	ภาคผนวก 11 : การทดสอบฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก	75
	ภาคผนวก 12 : การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก	85

สารบัญ (ต่อ)

ลำดับที่	รายการ	หน้า
	ภาคผนวก 13 : การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม	98
	ภาคผนวก 14 : การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2	100
	ภาคผนวก 15 : การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	119
	ภาคผนวก 16 : หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์ของโครงการวิจัยโดยความเห็นชอบของ คณะกรรมการจริยภาพรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	126
	ภาคผนวก 17 : การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2	131
6.	กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	134
7.	ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและ ผลที่ได้รับตลอดโครงการ	139
8.	รายงานการเงิน	143

บทสรุปผู้บริหาร

ในปัจจุบัน ปัญหาผมหงอกก่อนวัยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญหนึ่งที่มีผลต่อบุคลิกภาพของทั้งผู้หญิงและผู้ชาย สาเหตุของผมหงอกก่อนวัย นอกจากปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น ความเครียดและสารเคมี รวมทั้งมลภาวะแล้ว ยังเกิดจากผลทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องของเมลานินไซโตในการสร้างเม็ดสีของเซลล์รากผม ในขณะนี้ ยังไม่มีวิธีการรักษาแต่เป็นการแก้ไขที่ปลายเหตุ โดยวิธีการย้อมผมซึ่งการย้อมผมด้วยผลิตภัณฑ์ยาย้อมส่วนใหญ่ที่เป็นสารเคมี โดยเฉพาะยาย้อมผมประเภทถาวรที่ต้องนำเข้าสู่จากต่างประเทศ นอกจากยาย้อมจะไม่ใช้วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวแล้วยังอาจก่อการแพ้และระคายเคืองรวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็งต่อผู้บริโภคอีกด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศในภูมิภาคอาเซียนซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมุนไพรที่มีงานวิจัยและภูมิปัญญาพื้นบ้านที่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินหรือ melanogenesis และช่วยให้ผมดำได้ อย่างไรก็ตาม สารสำคัญจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้ ไม่คงตัวและยังถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากผมได้ยากเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จุดประสงค์ของโครงการวิจัยที่ 3 นี้ (ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย”) จึงเป็นการพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกก่อนวัย โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษา Specification ของสารสกัดต่างๆ ด้วยน้ำ เมธานอล เอทิลอะซิเตตและ เฮกเซนของสมุนไพรพื้นบ้านที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ กวาวเครือขาว หม่อน ย่านาง บัวบกและอัญชัน จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวมีความเป็นกรดและสารสกัดที่มีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ต่างแก่ ต่างอ่อน oxidizer และ reducer คือ สารสกัดกวาวเครือด้วยน้ำ เมธานอลและเฮกเซน สารสกัดหม่อนด้วยเมธานอลและเฮกเซนและสารสกัดย่านางด้วยเมธานอล สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับ glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารสกัดน้ำและเอทิลอะซิเตตของย่านางและสารสกัดเฮกเซนของอัญชันมีฤทธิ์สูง ส่วนสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารสกัดน้ำของอัญชัน ย่านางและบัวบก สารสกัดเมธานอลของบัวบก สารสกัดเอทิลอะซิเตตของบัวบกและกวาวเครือ และสารสกัดเฮกเซนของย่านาง ในการทดสอบกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนใน B₁₆F₁₀ สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัดเอทิลอะซิเตตของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง เมื่อนำสารสกัดหยาบเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิห้องและ 4 °C เป็นเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวที่ 45 °C จากการจัดทำ specification ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดเหล่านี้พบว่าสารแขวนตะกอนนีโอโซมมี pH เป็นกรดและ

ทุกสูตรมีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ต่างแก่ ต่างอ่อน oxidizing และ reducing agent สารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแต่ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีและวิตามินอี ทั้งสารสกัดที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมมีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสต่ำเมื่อเก็บกักสารสกัดในนีโอโซมไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน อาจเนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดไม่ถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซม ได้นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวข้างต้นมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกส่วนการละลายด้วยน้ำ เฮกเซนและเมทานอล ได้สารสกัดหยาบละ 3 fractions รวมเป็นทั้งสิ้น 15 fractions โดย fraction 1, 3 และ 3 ของสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วยเอทิลอะซิเตตและสารสกัดหยาบหม่อนด้วยเอทิลอะซิเตตได้ % yield สูงสุดเท่ากับ 77.55, 26.8 และ 26.76% ของสารสกัดหยาบตามลำดับ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระรองลงมาคือ ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation แต่มีจำนวน fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยที่สุด Fractions จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวและย่านางด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินประมาณ 113 และ 104% ตามลำดับโดย fraction จากกวาวเครือมีฤทธิ์ของเอ็นไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด (171%) ทั้งนี้ fractions ทั้งหมดมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบได้คัดเลือก fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือมาเก็บกักในนีโอโซม พบว่าสามารถเก็บกักได้สูงสุด 2% ได้สารแววนตะกอนขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน เมื่อเก็บกัก fraction จากกวาวเครือในนีโอโซมพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (27, 4, 45 °C) เป็นเวลา 3 เดือน มากกว่า fraction ที่ละลายใน propylene glycol นอกจากนี้ fraction ที่เก็บกักในนีโอโซมยังมีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่ประมาณ 2 เท่ามากกว่า fraction ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน ในการทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม พบว่า นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่ง linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ โดยมีค่าฟลักซ์และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขนมากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่าตามลำดับ ในการประเมินราคาต้นทุน ราคาาคัดคะเนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือมีค่าประมาณ 60,000 บาทต่อกิโลกรัม และสารแววนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ 2% มีราคาประมาณ 2,400 บาทต่อกิโลกรัม ผลจากโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนเพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย รวมทั้งช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาย้อมผมจากต่างประเทศที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่ 3 ที่อยู่ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย” ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโนเพื่อรักษาอาการผมหงอกก่อนวัย โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษา Specification ของสารสกัดต่างๆ ด้วยน้ำ เมธานอล เอทิลอะซิเตตและเฮกเซนของสมุนไพรพื้นบ้านที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ กวาวเครือขาว หม่อน ย่านาง บัวบกและอัญชัน จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวมีความเป็นกรดและสารสกัดที่มีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ต่างแก่ ต่างอ่อน oxidizer และ reducer คือ สารสกัดกวาวเครือด้วยน้ำ เมธานอล และเฮกเซน สารสกัดหม่อนด้วยเมธานอลและเฮกเซนและสารสกัดย่านางด้วยเมธานอล สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับ glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารสกัดน้ำและเอทิลอะซิเตตของย่านางและสารสกัดเฮกเซนของอัญชันมีฤทธิ์สูง ส่วนสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารสกัดน้ำของอัญชัน ย่านางและบัวบก สารสกัดเมธานอลของบัวบก สารสกัดเอทิลอะซิเตตของบัวบกและกวาวเครือและสารสกัดเฮกเซนของย่านาง ในการทดสอบกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนใน B₁₆F₁₀ สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัดเอทิลอะซิเตตของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง เมื่อนำสารสกัดหยาบเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมพบว่ามีผลคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิห้องและ 4 °C เป็นเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวที่ 45 °C จากการจัดทำ specification ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดเหล่านี้พบว่าสารแขวนตะกอนนีโอโซมมี pH เป็นกรดและทุกสูตรมีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ต่างแก่ ต่างอ่อน oxidizing และ reducing agent สารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแต่ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีและวิตามินอี ทั้งสารสกัดที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำ เมื่อเก็บกักสารสกัดในนีโอโซมไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน อาจเนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดไม่ถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซม ได้นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวข้างต้นมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกส่วนการละลายด้วยน้ำ เฮกเซนและเมธานอล ได้สารสกัดหยาบละ 3 fractions รวมเป็นทั้งสิ้น 15 fractions โดย fraction 1, 3 และ 3 ของสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วยเอทิลอะซิเตตและสารสกัดหยาบหม่อนด้วยเอทิลอะซิเตตได้ % yield สูงสุดเท่ากับ 77.55, 26.8 และ 26.76% ของสารสกัดหยาบตามลำดับ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ รองลงมาคือฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation แต่มีจำนวน fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยที่สุด Fractions จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวและย่านาง

ด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินประมาณ 113 และ 104% ตามลำดับโดย fraction จาก กวาวเครือมีฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด (171%) ทั้งนี้ fractions ทั้งหมดมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัด หยาบได้คัดเลือก fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือมาเก็บกักในนีโอโซม พบว่าสามารถเก็บกักได้ สูงสุด 2% ได้สารแขวนตะกอนขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน เมื่อเก็บกัก fraction จากกวาวเครือใน นีโอโซม พบว่ามีความคงตัวทางกายภาพเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (27, 4, 45 °C) เป็นเวลา 3 เดือน มากกว่า fraction ที่ละลายใน propylene glycol นอกจากนี้ fraction ที่เก็บกักในนีโอโซมยังมีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่ประมาณ 2 เท่ามากกว่า fraction ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็น เวลา 3 เดือน ในการทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม พบว่า นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่ง linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ โดยมี ค่าพีล็กซ์และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขนมากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่าตามลำดับ ในการประเมินราคาต้นทุน ราคาาคดคะเนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือมี ค่าประมาณ 60,000 บาทต่อกิโลกรัม และสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ กวาวเครือ 2% มีราคาประมาณ 2,400 บาทต่อกิโลกรัม ผลจากโครงการวิจัยนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่า ของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนเพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยรวมทั้งช่วยลดการนำเข้า ผลิตภัณฑ์ยาย้อมผมจากต่างประเทศที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project is the third research project of the project set of “Research and Development of Cosmetics Containing the Extracts from Thai Traditional Medicinal Plants Entrapped in Nanoparticles for White Hair Treatment”. This project has performed the specifications of the selected 20 extracts of the selected Thai traditional medicinal plants (Kwao Krua, Pennywort, Butterfly Pea, Mulberry and Yanang) that was extracted by methanol, ethyl acetate and hexane. All extracts had acidity property. The extracts which were stable in weak acid, weak base, strong acid, strong base, oxidizing and reducing agents were the Kwao Krua extracts with water, methanol and hexane, the Mulberry extracts with methanol and hexane and the Yanang extracts with methanol. Most extracts gave positive results with glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin and xanthone. For antioxidative activities, aqueous and ethyl acetate extracts of Yanang and the hexane extract of Butterfly Pea indicated high activity. The extracts which exhibited no tyrosinase inhibition activity were the aqueous extract of Butterfly Pea, Yanang and Pennywort, the ethyl acetate extract of Pennywort and Kwao Krua, and the hexane extract of Yanang. The extracts which had the tendency to stimulate the melanin and protein production in B₁₆F₁₀ were the ethyl acetate extracts of Kwao Krua, Mulberry, Yanang and Pennywort and the aqueous extract of Yanang. When these extracts were entrapped in niosomes, the niosomes were physically stable at room temperature and 4°C for 3 months, but not stable at 45°C. For the specification of the niosomes entrapped with these extracts, they were suspension with the acidic pH. All formulations were stable in weak acid, weak base, strong acid, strong base, oxidizing and reducing agent. All crude extracts not entrapped in niosomes indicated higher antioxidant activity than the extracts entrapped in niosomes, but lesser activity than vitamin C and vitamin E. Both extracts entrapped and not entrapped in niosomes gave low tyrosinase inhibition activity. When entrapped in niosomes, the extracts did not stimulate the melanin production. This may be due to the inability to be released from the niosomes of the bioactive compounds in the extracts. Fifteen semi-purified fractions were prepared from the 5 crude extracts by solvent partition method with water, hexane and methanol. Fractions nos. 1, 3 and 3 of the crude extracts of Pennywort by water, Kwao Krua by ethyl acetate and Mulberry by ethyl acetate showed the highest percentage yields of 77.55, 26.8 and 26.76% of the crude extract, respectively. Most semi-purified

extracts gave free radical scavenging activity, followed by lipid inhibition activity and the least number of the fractions exhibited chelating activity. Fractions from the crude extracts of Kwao Krua and Yanang by hexane indicated melanin production activity of about 113 and 104%, respectively. The fraction from Kwao Krua gave the highest tyrosinase activity (171%). All fractions showed higher activity than their corresponding crude extracts. The fraction 2 from the Kwao Krua crude extract was selected to entrap in niosomes. The maximum loading of this fraction in niosomes was 2%. The opaque white dispersion with no layer separation was obtained. Niosomes entrapped with this fraction showed chemical stability at 4, 27 and 45°C for 3 months higher than the fraction dissolved in propylene glycol. Also, the fraction entrapped in niosomes gave higher linoleic acid contents of 2 times more than the fraction not entrapped in niosomes when kept for 3 months at various temperatures. For transfollicular absorption study, when the fraction entrapped in niosomes, the transfollicular absorption was enhanced. The fluxes and cumulative amount per one follicle of the fraction entrapped in niosomes were more than the fraction in solution of 1.86 and 2.18 times, respectively. For cost estimation, the estimated cost of the semi-purified fraction of Kwao Krua (fraction2) was about 60,000 Baht per kilogram, while the niosomal dispersion entrapped with 2% of fraction 2 was about 2,400 Baht per kilogram. The results from this project can not only increase the value of the Thai traditional medicinal plants by nanotechnology for white hair treatment, but also the effective and safe cosmeceutical from natural products for hair darkening and the decrease of the imported hair darkening products from abroad to assist the Thai economics will be obtained, as well.

เนื้อหางานวิจัย

ผลงานวิจัยโดยสรุปมีดังต่อไปนี้ :

1. การจัดทำ specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบก ได้รับสารสกัด
กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ methanol, ethyl acetate และ hexane
จำนวน 20 ตัวอย่างจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และได้ทำการศึกษาสมบัติ
ทางเคมี กายภาพและ phytochemistry ของสารสกัดเหล่านี้ ดังรายละเอียดใน ภาคผนวก 1 และ 2
2. การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบก ได้
ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบก
ด้วยวิธี DPPH และ tyrosinase inhibition activity ซึ่งแต่ละสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีการที่ต่างกัน
ให้ผลแตกต่างกัน ทั้งนี้ สารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme tyrosinase น่าจะเป็นสารสกัดที่จะนำมา
พัฒนาสำหรับการรักษาอาการผมหงอกได้ ซึ่งได้แก่ สารสกัดน้ำจากอัญชัน ย่านางและบัวบก สาร
สกัดเมธานอลจากบัวบกและสารสกัดเอธิลอะซีเตทจากบัวบกและกวาวเครือและสารสกัดเฮกเซน
จากย่านาง ดังรายละเอียดใน ภาคผนวก 3
3. การทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการสร้างเม็ดสี melanin ใน melanoma cell (B₁₆F₁₀) ของสารสกัด
กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ methanol, ethyl acetate และ hexane
จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดที่มีแนวโน้มในการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัด
ethyl acetate ของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบกและสารสกัดน้ำของย่านาง ดังรายละเอียดใน
ภาคผนวก 4
4. การเก็บกักสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในอนุภาคนาโน
(นีโอโซม) ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัด
กวาวเครือด้วย ethyl acetate , สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate , สารสกัดย่านางด้วย ethyl
acetate และสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดี จึง
คัดเลือกสารสกัดทั้ง 5 ชนิดมาเก็บกักในนีโอโซมที่ประกอบด้วย Tween 61 และ cholesterol ใน
อัตราส่วนโมลาร์ 1 ต่อ 1 และทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บ
กักสารสกัดดังกล่าวเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า maximum loading ของสารสกัดในนีโอโซมมีค่าเท่ากับ
0.5, 0.25, 0.125, 0.25 และ 0.25% ตามลำดับ และอนุภาคนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดดังกล่าวมี
ความคงตัวดี ไม่ตกตะกอน มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 150-300 nm มีค่า zeta potential
เป็นลบในช่วง -20 ถึง -50 mV และมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5-5.5 ซึ่งทุกตำรับมีความคงตัวดีใน
อุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลา 3 เดือนแรกที่ดำเนินการศึกษา ส่วนในช่วงเดือนที่ 4-6 พบว่าตำรับนีโอ
โซมไม่มีความคงตัว (ภาคผนวก 5 และภาคผนวก 6)

5. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินด้วย DPPH assay พบว่า สารสกัดด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกและสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า SC_{50} เท่ากับ 4.24, 5.34, 5.95, 5.97 และ 4.73 mg/ml ตามลำดับ ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัด โดยมีค่า SC_{50} ของนีโอโซมมีค่า เท่ากับ 99.73, 138.23, 128.74, 112.64 และ 108.21 mg/ml ตามลำดับ (ภาคผนวก 7)
6. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 485.483 mg/ml ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 700.20 mg/ml (ภาคผนวก 8)
7. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมในเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ในการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม พบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนได้ แต่นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากเซลล์มะเร็งหนู B16F10 อาจไม่สามารถย่อยนีโอโซมแตกออก จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถนำสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมเข้าเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมยังอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ ซึ่งถ้าหากนำนีโอโซมไปทำการศึกษาใน *in vivo* ซึ่งมีเอนไซม์ในร่างกาย ที่สามารถย่อยให้ นีโอโซมแตกออกได้ นีโอโซมอาจสามารถปลดปล่อยสารสกัดออกมา เพื่อออกฤทธิ์ตามต้องการได้ (ภาคผนวก 9)
8. ได้นำสารสกัด 5 ตัว ซึ่งได้แก่สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือขาว บัวบก ย่านาง และหม่อน และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของบัวบกมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการแยกส่วนการละลายซึ่งได้สารสกัดละ 3 fractions รวมเป็น 15 fractions พบว่า fractions ที่ให้ yield สูงที่สุด คือ fraction ที่ 1 จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำโดยน้ำ (77.55%) และ fraction ที่ให้ yield น้อยที่สุด คือ fraction ที่ 3 จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำโดย methanol (0.09%) (ภาคผนวกที่ 10) จากการทดสอบฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol (SC_{50} =

- 0.16 ± 0.04 mg/ml) แต่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50} = 0.05 \pm 0.00$ mg/ml) 3.2 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50} = 0.09 \pm 0.02$ mg/ml) 1.77 เท่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับโลหะสูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50} = 1.06 \pm 1.03$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์จับโลหะต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50} = 0.30 \pm 0.22$ mg/ml) 3.53 เท่า ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50} = 0.03 \pm 0.01$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50} = 0.02 \pm 0.01$ mg/ml) 1.5 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50} = 0.48 \pm 0.22$ mg/ml) 16 เท่า (ภาคผนวกที่ 11) จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่า สารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ (ร้อยละ 100.86±3.8) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 112.99±8.93) และ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 103.82±19.60) จากการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase พบว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งเป็น fraction ที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (ร้อยละ 171.27±11.25) ในขณะที่สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ต่ำกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม (ร้อยละ 99.46±6.78) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบอีก 2 ตัวโดย hexane ที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate และสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate (ร้อยละ 122.14±30.59 และ 115.12±12.87 ตามลำดับ) จากการศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่า ทุกสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบมีจำนวนโปรตีนภายในเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ดังนั้น fraction ที่เลือกมาพัฒนาต่อ คือ fraction ที่ 2 จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งมี % yield เท่ากับ 20.99% แม้ไม่พบฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแต่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้สูงสุด (112.99%) และมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (171.27%) (ภาคผนวกที่ 12)
9. การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือขาว fraction 2 ในนีโอโซม พบว่าได้สารแขวนตะกอนของนีโอโซมที่มีสีขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน (ภาคผนวกที่ 13)
 10. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่าไว้ที่อุณหภูมิห้อง

($27 \pm 2^\circ\text{C}$), $4 \pm 2^\circ\text{C}$ และ $45 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบว่านี่โอโซมยังมีความคงตัวทางกายภาพ หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ภาคผนวกที่ 14)

11. การศึกษาความคงตัวทางเคมีของนี่โอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ($4 + 2$, $30 + 2$ และ $45 + 2$ องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 เดือน พบว่านี่โอโซมที่เก็บกักสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากกว่า 60% ทุกอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนในสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol มีปริมาณ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50% โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 42.50% (ภาคผนวกที่ 14)
12. การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนี่โอโซม พบว่านี่โอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญ (linoleic acid) ที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ได้ทั้งในผิวหนังและรีซีฟเวอร์ โดยมีปริมาณสะสม ค่าฟลักซ์ และ ปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขน มากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่า ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 15) ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้รับการอนุมัติให้ใช้สัตว์ทดลองตามความเห็นชอบของคณะกรรมการจริยภาพบรรณาการให้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาคผนวกที่ 16)
13. การคำนวณต้นทุนการผลิตของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือและนี่โอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ พบว่า ราคาาคาดคะเนของการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 58,800 บาท และราคาาคาดคะเนของการผลิตสารแขวนตะกอนนี่โอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 2,374.62 บาท (ภาคผนวกที่ 17)

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน
ย่านาง อัญชัน และบัวบก

การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

วัตถุประสงค์

เพื่อการจัดทำ specification ของสารสกัดต่างๆ

ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)

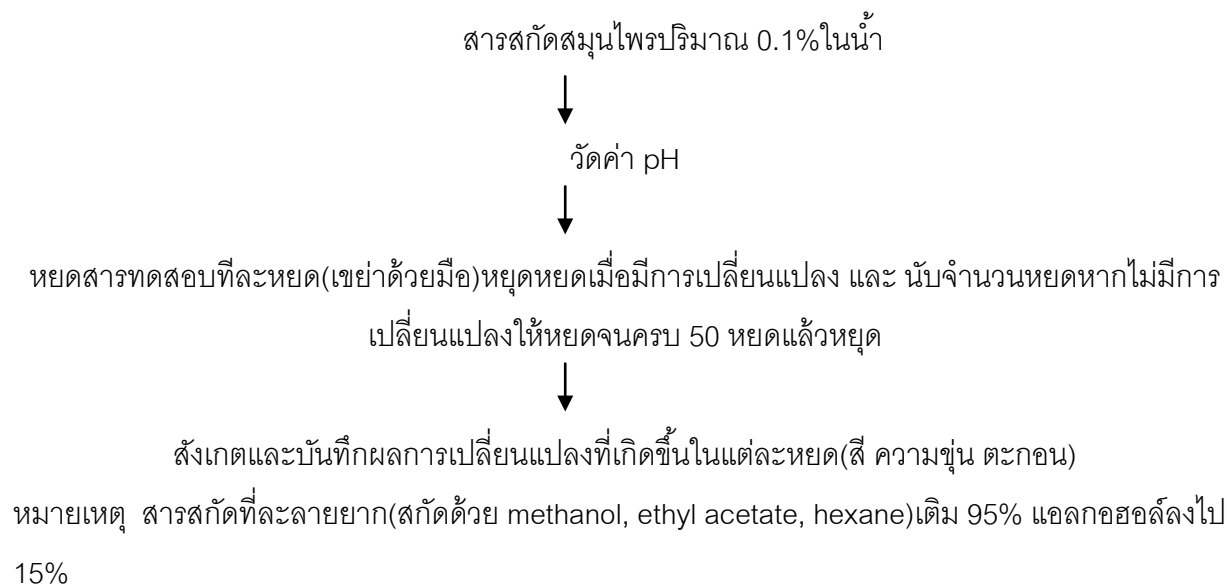
1. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
2. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
3. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
4. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
5. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
6. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
7. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
8. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
9. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
10. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
11. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
12. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
13. สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ
14. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
15. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate
16. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
17. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
18. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
19. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
20. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

สารเคมี

1. 10%hydrochloric acid (กรดแก่)
2. 10%sodium hydroxide (ด่างแก่)
3. 10%acetic acid (กรดอ่อน)
4. 10%ammonium hydroxide (ด่างอ่อน)

5. 10%hydrogen peroxide (oxidizer)
6. 10%feric chloride (reducer)
7. 10%sodium acetate (ต่างข้ออื่น)

วิธีการทดลอง



ตารางที่ 1.1 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดกวาวเครือสกัดด้วยน้ำ

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำใส pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.2 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดกาวเครือสกัดด้วย methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำใส pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.3 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดกาวเครือสกัดด้วย ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ ขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	5 หยดขุ่นเล็กน้อย
10%NaOH	5 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	4 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดกาวเครือสกัดด้วย hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ ขุ่น pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.5 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดหม่อนสกัดด้วยน้ำ

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีน้ำตาลอ่อน pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดขุ่นเล็กน้อย
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	10 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.6 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดหม่อนสกัดด้วย methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวอ่อน pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.7 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดหม่อนสกัดด้วย ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนขุ่น pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.8 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดหม่อนสกัดด้วย hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนขุ่น pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.9 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดย่านางสกัดด้วยน้ำ

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีน้ำตาลอ่อน pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	5 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.10 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดย่านางสกัดด้วย methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนใส pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.11 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดย่านางสกัดด้วย ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	5 หยดขุ่นเล็กน้อย
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.12 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดย่านางสกัดด้วย hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	10 หยดขุ่นเล็กน้อย
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.13 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดอัญชันสกัดด้วยน้ำ

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำเงินใส pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีแดง
10%NaOH	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีแดง
10%CH ₃ COOH	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีม่วง
10%NH ₄ OH	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีคราม
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีม่วง
10%CH ₃ COONa	1 หยดเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

ตารางที่ 1.14 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดอัญชันสกัดด้วย methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลอ่อนใส pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COONa	5 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.15 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดอัญชันสกัดด้วย ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	3 หยดขุ่นขึ้น
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COONa	5 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.16 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดอัญชันสกัดด้วย hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	5 หยดขุ่นขึ้น
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 1.17 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดบัวบกสกัดด้วยน้ำ

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลอ่อนขุ่น pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	5 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.18 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดบัวบกสกัดด้วย methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5.5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	5 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.19 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดบัวบกสกัดด้วย ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	1 หยดขุ่นขึ้น
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	3 หยดสีเข้มขึ้น

ตารางที่ 1.20 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดบัวบกสกัดด้วย hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5

สารทดสอบ	ลักษณะของ สารสกัด
10%HCl	5 หยดขุ่นขึ้น
10%NaOH	1 หยดสีเข้มขึ้น
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	1 หยดขุ่นขึ้น
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	3 หยดสีเข้มขึ้น

สรุปผลการทดลอง

ตารางที่ 1.21 สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	pH	ความคงตัว
กาวเครือสกัดด้วยน้ำ	ใส	5.5	คงตัวในทุกสภาวะ
กาวเครือสกัด methanol	น้ำตาลอ่อนใส	5	คงตัวในทุกสภาวะ
กาวเครือสกัด ethyl acetate	น้ำตาลอ่อนขุ่น	5	คงตัวในกรดอ่อน ต่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ต่างแก่
กาวเครือสกัด hexane	น้ำตาลอ่อนขุ่น	5.5	คงตัวในทุกสภาวะ
หม่อนสกัดน้ำ	น้ำตาลอ่อนใส	5.5	คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน ต่างแก่ ต่างอ่อน
หม่อนสกัด methanol	เขียวอ่อนใส	5.5	คงตัวในทุกสภาวะ
หม่อนสกัด ethyl acetate	เขียวอ่อนขุ่น	5.5	คงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน ต่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน ต่างแก่
หม่อนสกัด hexane	น้ำตาลอ่อนขุ่น	5.5	คงตัวในทุกสภาวะ
ย่านางสกัด น้ำ	น้ำตาลอ่อนขุ่น	5.5	คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน ต่างแก่ ต่างอ่อน
ย่านางสกัด methanol	เขียวอ่อนใส	5.5	คงตัวในทุกสภาวะ
ย่านางสกัด ethyl acetate	เขียวแกมเหลืองขุ่น	5	คงตัวใน กรดอ่อน ต่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ต่างแก่
ย่านางสกัด hexane	น้ำตาลขุ่น	5	คงตัวใน กรดอ่อน ต่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ต่างแก่
อัญชันสกัด น้ำ	น้ำเงินใส	5.5	คงตัวใน oxidizer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ต่างแก่ กรดอ่อน ต่างอ่อน reducer

ตารางที่ 1.21 สรุปผลการทดลอง (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	pH	ความคงตัว
อีธานัสกัต methanol	น้ำตาลอ่อนใส	5.5	คงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน oxidizer ไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน กรดอ่อน reducer
อีธานัสกัต ethyl acetate	เขียวขุ่น	5	คงตัวใน ด่างอ่อน oxidizer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่าง แก่ กรดอ่อน reducer
อีธานัสกัต hexane	เขียวแกมเหลืองขุ่น	5	คงตัวใน ด่างอ่อน กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่ คงตัวในกรดแก่ ด่างแก่
บิวทกสัดน้ำ	น้ำตาลอ่อนขุ่น	5.5	คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คง ตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน
บิวทกสัด methanol	น้ำตาลอ่อนใส	5.5	คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คง ตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน
บิวทกสัด ethyl acetate	เขียวแกมเหลืองขุ่น	5	คงตัวใน กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ ด่างอ่อน
บิวทกสัด hexane	น้ำตาลขุ่น	5	คงตัวใน กรดอ่อน reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizer

โดยสรุป สารสกัดทุกตัวมี pH เป็นกรด สารสกัดที่มีความคงตัวในทุกสภาวะคือ สารสกัดกาวเครือ
ด้วยน้ำ สารสกัดกาวเครือด้วย methanol สารสกัดกาวเครือด้วย hexane สารสกัดหม่อนด้วย methanol
สารสกัดหม่อนด้วย hexane และสารสกัดย่านางด้วย methanol

ภาคผนวก 2

การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือ
หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบพิษเคมี (phytochemistry) ของสารสกัดต่าง ๆ

ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)

21. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
22. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
23. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
24. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
25. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
26. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
27. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
28. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
29. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
30. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
31. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
32. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
33. สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ
34. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
35. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate
36. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
37. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
38. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
39. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
40. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

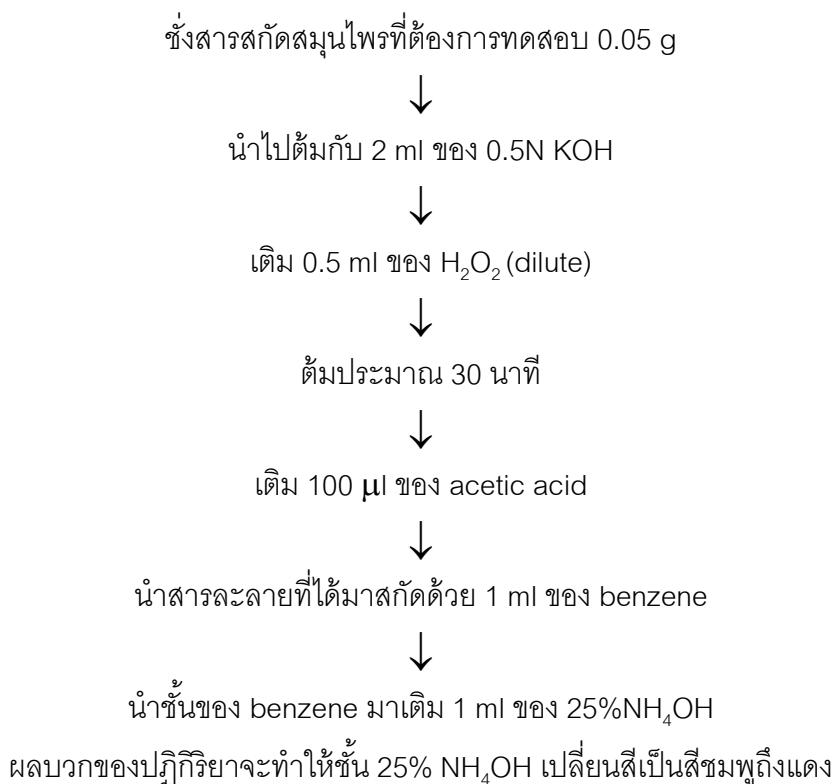
สารเคมี

- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1. butanol | 7. standard glucose |
| 2. acetic acid | 8. hydrogen peroxide |
| 3. diethyl ether | 9. potassium hydroxide |
| 4. sulfuric acid | 10. methanol |
| 5. standard sucrose | 11. benzene |
| 6. standard fructose | 12. ammonium hydroxide |

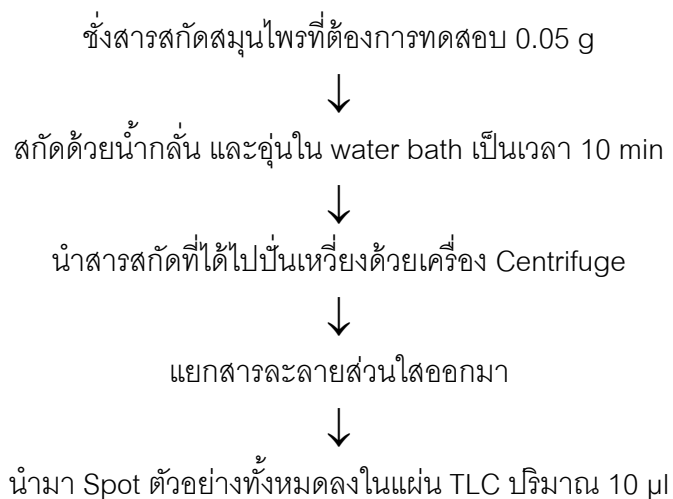
- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 13. potassium hydroxide | 18. sulfuric acid, Merck |
| 14. dragendroff's reagent | 19. chloroform |
| 15. hydrochloric acid | 20. ลวด magnesium |
| 16. nitric acid | 21. calcium hydrochloride |
| 17. potassium iodide | 22. ethanol |

วิธีการทดลอง

1 การทดสอบหา Anthraquinone



2 การทดสอบหา Glycoside



Condition ของ TLC:

Stationary phase: silica gel 60

Mobile phase : Butanol : Acetic acid : diethyl ether : water (9:6:1:3)

Detection : spraying with 10% H_2SO_4 และ heat**3 การทดสอบหา Xanthrone**

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g



เติม 2 ml ของ methanol และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min



นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge



แยกสารละลายใสออกมา

เติม 100 μl ของ 5% KOH

ผลบวกจะปรากฏตะกอนสีเหลืองขึ้น

4 การทดสอบหา Tannin

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g



สกัดด้วย 2 ml Ethanol และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min



นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

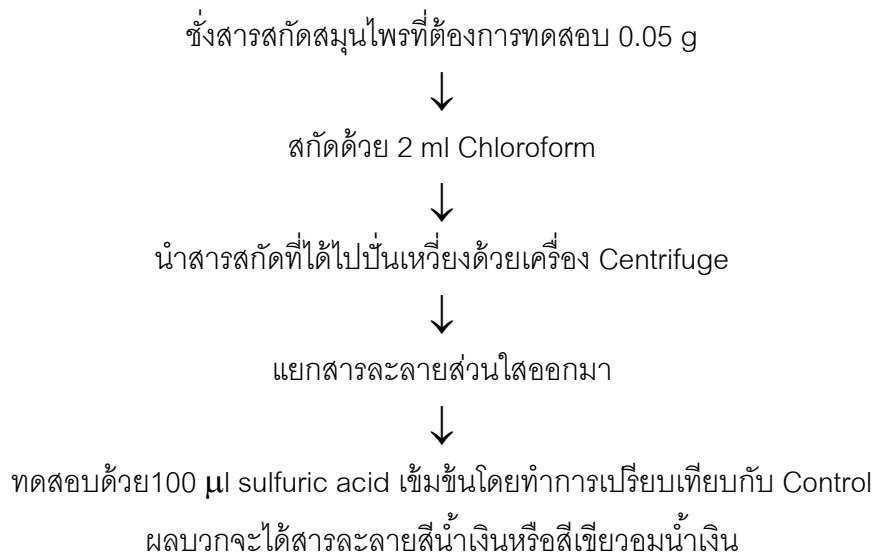


แยกสารละลายส่วนใสออกมา

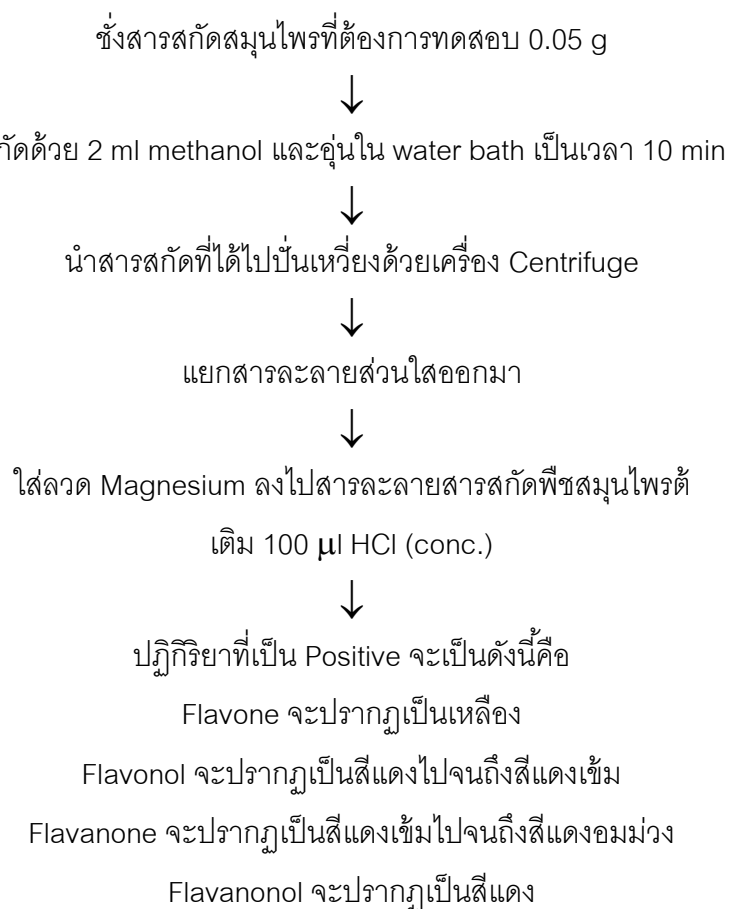
ทำการทดสอบด้วย 100 μl $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sat.)

ผลบวก คือ เกิดตะกอนสีเหลืองเทาเงิน

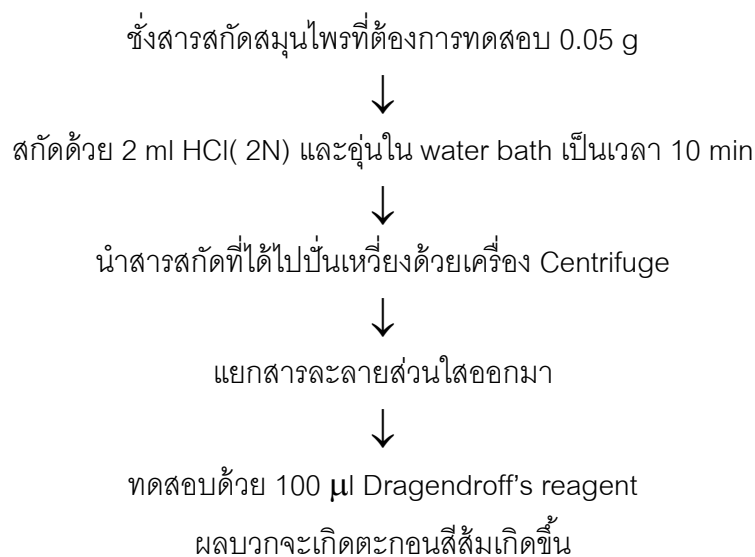
5 การทดสอบหา Carotenoid



6 การทดสอบหา Flavone



7 การทดสอบหา Alkaloid



วิธีการเตรียม Dragendorff ' s reagent

1. ละลาย Bismuth nitrate 8 g ใน nitric acid, 30% W/V 12 ml
2. ละลาย Potassium iodide 27.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml เทสารละลาย Potassium iodide ลงในสารละลาย Bismuth nitrate แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบทาง phytochemistry พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับสารสำคัญประเภท glycoside (glucose and sucrose), flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone มากกว่า ประเภท alkaloid แต่ไม่พบผลบวกกับสารประเภท anthraquinone และ glycoside (fructose)

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบพฤษเคมี (Phytochemistry) ของสารสกัดต่างๆ

ตัวอย่างสารสกัด		ผลการทดสอบพฤษเคมี (Phytochemistry)								
พืช	ตัวทำละลาย	Alkaloid	Anthraquinone	Glycoside			Flavonoid	Carotenoid	Tannin	Xanthone
				F	G	S				
-	Methanol	-	-	-	-	-	-	+	-	+++
ย่านาง	ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	++++	-	-
ย่านาง	Hexane	-	-	-	-	-	-	+	+	++++
ย่านาง	น้ำ	-	-	-	+	+	++	-	-	-
ย่านาง	methanol	-	-	-	+++	++	-	++++	-	+++
หม่อน	ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	++++	-	++
หม่อน	hexane	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
หม่อน	น้ำ	-	-	-	++++	++++	++	-	+	+
อัญชัน	ethyl acetate	-	-	-	-	-	+++	-	+	+
อัญชัน	hexane	-	-	-	-	-	++	-	+++	+
อัญชัน	น้ำ	-	-	-	+	+	++++	-	-	-
อัญชัน	methanol	-	-	-	++	++	-	-	++	+
กวาวเครือ	methanol	+	-	-	+++++	+++++	+++	-	-	++

หมายเหตุ: ให้คะแนนจากน้อยไปมาก เป็น +1 ถึง +5

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบพฤษเคมี (Phytochemistry) ของสารสกัดต่างๆ (ต่อ)

ตัวอย่างสารสกัด		ผลการทดสอบพฤษเคมี (phytochemistry)								
พืช	ตัวทำละลาย	Alkaloid	Anthraquinone	Glycoside			Flavonoid	Carotenoid	Tannin	Xanthone
				F	G	S				
กวาวเครือ	hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	+
กวาวเครือ	ethyl acetate	+	-	-	+++	+++++	-	-	-	-
กวาวเครือ	น้ำ									
บัวบก	methanol	-	-	-	-	-	-	++++	-	+
บัวบก	ethyl acetate									
บัวบก	น้ำ	-	-	-	-	-	+	-	-	+
บัวบก	hexane	-	-	-	-	-	-	++++	-	-

หมายเหตุ: ให้คะแนนจากน้อยไปมาก เป็น +1 ถึง +5

ภาคผนวก 3

การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัด
กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดอัลูชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว

วัตถุประสงค์

เพื่อฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดน้ำ เมธานอล เอธิลอะซีเตต และเฮกเซน จากอัลูชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว

ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)

41. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
42. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
43. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
44. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
45. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
46. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
47. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
48. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
49. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
50. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
51. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
52. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
53. สารสกัดอัลูชัน ด้วยน้ำ
54. สารสกัดอัลูชัน ด้วย methanol
55. สารสกัดอัลูชัน ด้วย ethyl acetate
56. สารสกัดอัลูชัน ด้วย hexane
57. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
58. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
59. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
60. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

สารเคมี

- | | |
|---------------------|-------------------------|
| 1. Ferrous chloride | 3. Ammonium thiocyanate |
| 2. Linoleic acid | 4. DPPH |

- | | |
|--------------------|-------------------------------|
| 5. Vitamin C | 11. 0.1M Phosphate buffer (pH |
| 6. Vitamin E | 6.8) |
| 7. Kojic acid | 12. Tyrosinase |
| 8. DMSO | 13. Tyrosine |
| 9. Distilled water | |
| 10. 99.8% Ethanol | |

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารสกัดจากขมิ้นชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาวที่เตรียมด้วยวิธี aqueous, methanol, ethyl acetate and hexane extraction ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้ 20%DMSO เป็นตัวทำละลาย

1.2 เตรียมสารมาตรฐานได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และกรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้ 20%DMSO เป็นตัวทำละลาย

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

เตรียมสารต่างๆตามตาราง

A (Blank)				B (Sample)			
1		2		3		4	
20% DMSO	50µl	20% DMSO	50µl	Sample	50µl	Sample	50µl
99.8% Ethanol	50µl	0.5 mg/ml DPPH	50µl	99.8% Ethanol	50µl	0.5 mg/ml DPPH	50µl



บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที



อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader



คำนวณค่า % scavenging activity จากสมการ

$$\%SC = [(A-B)/A] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample



คำนวณค่า SC₅₀ (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

2.2 ฤทธิ์ต้านการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยวิธี ferrous-thiocyanate methods

เติมสารต่างๆตามตาราง

A (Blank)				B (Sample)			
1		2		3		4	
0.1% Linoleic acid	50µl	0.1% Linoleic acid	50µl	0.1% Linoleic acid	50µl	0.1% Linoleic acid	50µl
20% DMSO	50µl	20% DMSO	50µl	Sample	50µl	Sample	50µl
2mM NH ₄ SCN	50µl	2mM NH ₄ SCN	50µl	2mM NH ₄ SCN	50µl	2mM NH ₄ SCN	50µl
10% HCl	50µl	2mM FeCl ₂	50µl	10% HCl	50µl	2mM FeCl ₂	50µl



บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที



อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader



คำนวณค่า % lipid peroxidation activity จากสมการ

$$\%LC = [(A-B)/A] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample



คำนวณค่า LC₅₀ (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

2.3 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี the modified dopachrome method

เติมสารต่างๆตามตาราง

A (Blank)				B (Sample)			
1		2		3		4	
2mM tyrosine	50µl	2mM tyrosine	50µl	2mM tyrosine	50µl	2mM tyrosine	50µl
20% DMSO	50µl	20% DMSO	50µl	Sample	50µl	Sample	50µl
0.1M Phosphate buffer	50µl	50 u/ml tyrosinase	50µl	0.1M Phosphate buffer	50µl	50 u/ml tyrosinase	50µl



อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader (T_0)



บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที



อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader (T_{60})



คำนวณค่า % tyrosinase inhibition activity จากสมการ

$$\%IC = \left[\frac{(B-A)_{60} - (B-A)_0}{(B-A)_0} \right] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample



คำนวณค่า IC_{50} (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

ผลการทดลอง

ตารางที่ 3.1 แสดงฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดน้ำ เมธานอล เอธิลอะซีเตต และเฮกเซน จากอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการสลายตัวของไขมันไม่อิ่มตัว โดยสารสกัดน้ำจากย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ($SC_{50} = 0.871 \pm 0.168$ mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 0.07 เท่าของสารมาตรฐานวิตามินซี ส่วนสารสกัดเอธิลอะซีเตตจากย่านางมีฤทธิ์ต้านการสลายตัวของไขมันสูงสุด ($LC_{50} = 0.001 \pm 0.000$ mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 3 เท่าของสารมาตรฐานวิตามินอี

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากอัญชันมีฤทธิ์สูงสุด ($IC_{50} = 0.005 \pm 0.001$ mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 17.5 เท่าของสารมาตรฐานกรดโคจิก ส่วนสารสกัดน้ำจากอัญชัน ย่านาง และบัวบก สารสกัดเมธานอลจากบัวบก สารสกัดเอธิลอะซีเตตจากบัวบกและกวาวเครือ และสารสกัดเฮกเซนจากย่านางไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

ตารางที่ 3.1 ค่า SC_{50} , LC_{50} และ IC_{50} (mg/ml) ของสารสกัดจากอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว

samples	Anti-oxidative activity		
	Free radical scavenging ($SC_{50} \pm SD$ mg/ml)	Lipid peroxidation ($LC_{50} \pm SD$ mg/ml)	Tyrosinase inhibition ($IC_{50} \pm SD$ mg/ml)
Vitamin C	0.063 ± 0.006	NT	NT
Vitamin E	NT	0.003 ± 0.002	NT
Kojic acid	NT	NT	0.074 ± 0.008
EDTA	NT	NT	NT
อัญชัน			
Butterfly Pea (Aqueous)	1.717 ± 0.329	0.093 ± 0.011	NA
Butterfly Pea (Methanol)	2.854 ± 0.612	0.032 ± 0.010	0.078 ± 0.012
Butterfly Pea (Ethyl acetate)	1.016 ± 0.292	0.002 ± 0.001	0.010 ± 0.004
Butterfly Pea (Hexane)	2.439 ± 0.307	2.292 ± 0.187	0.004 ± 0.004
ย่านาง			
Bamboo Glass (Aqueous)	0.871 ± 0.168	0.040 ± 0.008	NA
Bamboo Glass (Methanol)	0.897 ± 0.094	0.002 ± 0.002	0.329 ± 0.050
Bamboo Glass (Ethyl acetate)	2.071 ± 0.380	0.001 ± 0.000	0.184 ± 0.027
Bamboo Glass (Hexane)	1.735 ± 0.059	0.032 ± 0.008	NA
บัวบก			
Asiatic Pennywort (Aqueous)	1.281 ± 0.141	0.017 ± 0.007	NA
Asiatic Pennywort (Methanol)	2.912 ± 0.222	6.637 ± 0.657	NA
Asiatic Pennywort (Ethyl acetate)	1.988 ± 0.158	0.022 ± 0.043	NA
Asiatic Pennywort (Hexane)	6.052 ± 0.538	0.005 ± 0.002	0.118 ± 0.001
หม่อน			
Mulberry (Aqueous)	1.578 ± 0.207	0.564 ± 0.013	1.746 ± 0.153
Mulberry (Methanol)	3.008 ± 0.255	0.369 ± 0.068	0.026 ± 0.008
Mulberry (Ethyl acetate)	2.506 ± 0.474	0.345 ± 0.089	0.025 ± 0.003
Mulberry (Hexane)	3.068 ± 0.069	0.677 ± 0.022	0.068 ± 0.016
กวาวเครือขาว			
White Kwao Krua (Aqueous)	12.917 ± 1.260	0.022 ± 0.002	0.009 ± 0.002
White Kwao Krua (Methanol)	11.211 ± 0.777	0.045 ± 0.003	2.665 ± 0.424
White Kwao Krua (Ethyl acetate)	1.794 ± 0.104	0.009 ± 0.005	NA
White Kwao Krua (Hexane)	2.369 ± 0.023	0.483 ± 0.091	0.261 ± 0.203

หมายเหตุ : NT = Not tested, NA = No activity

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดน้ำและเอธิลอะซีเตตจากย่านางและสารสกัดเฮกเซนจากอัญชันมีฤทธิ์ antioxidant สูง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเสริมอาหารได้ต่อไป ในขณะที่สารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme tyrosinase น่าจะสามารถนำไปพัฒนาสำหรับการรักษาอาการผมหงอกได้

เอกสารอ้างอิง

- Jung BK, Jong BK, Kang JC, Gabriele MK, Anthony DW (2006): Antioxidant Activity of 3,4,5-Trihydroxy benzaldehyde Isolated from *Geum japonicum*. J. Food & Drug Anal. 14(2), 190-193.
- Gulcin I (2006): Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sciences* 78, 803 – 811.
- Long ZP, Hyang RP, Yun KP, Seung KL, Jeong HP, and Man KP (2000): Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. J. Chem. Pharm. Bull., 50(3), 309-311.

ภาคผนวก 4

การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน
ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อการกระตุ้นการสร้าง
เม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells
(B₁₆F₁₀)

การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อ การกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells ($B_{16}F_{10}$)

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบผลของสารสกัดต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ
เซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$

สารสกัดที่ทดสอบ (20 ตัวอย่าง)

61. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
62. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
63. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
64. สารสกัดย่านาง ด้วย น้ำ
65. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
66. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
67. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
68. สารสกัดหม่อน ด้วย น้ำ
69. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethanol
70. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
71. สารสกัดอัญชัน ด้วย น้ำ
72. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
73. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
74. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
75. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
76. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย น้ำ
77. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
78. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
79. สารสกัดบัวบก ด้วย น้ำ
80. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

สารเคมี

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. DMSO

3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. 2 N Sodium hydroxide
6. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
7. Bovine serum albumin (BSA)

Cell culture

1. Mouse melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม cell culture plate¹

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้



เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน culture medium และเปลี่ยน culture medium ทุกๆ 3 วัน



ประเมิน culture cell จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การทดสอบผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ ⁽¹⁻³⁾

Seed เซลล์ 4×10^4 เซลล์/หลุม ลงใน 24-well plate



Incubate plate 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)



Treat เซลล์แต่ละหลุมด้วยสารทดสอบ 72 ชั่วโมง

(แต่ละสารทดสอบในแต่ละขนาด ทำ 3 ซ้ำ)



ละลายเซลล์ใน 2 N NaOH 1000 ul/well ที่ 60°C 1 ชั่วโมง



นำไปหาปริมาณเมลานินในเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละเซลล์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และใช้สารละลายเมลานินสังเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน (0.0001-1 mg/ml)



หาความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละเซลล์ โดยใช้ Bradford protein assay และใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน (0-50 mg/ml)

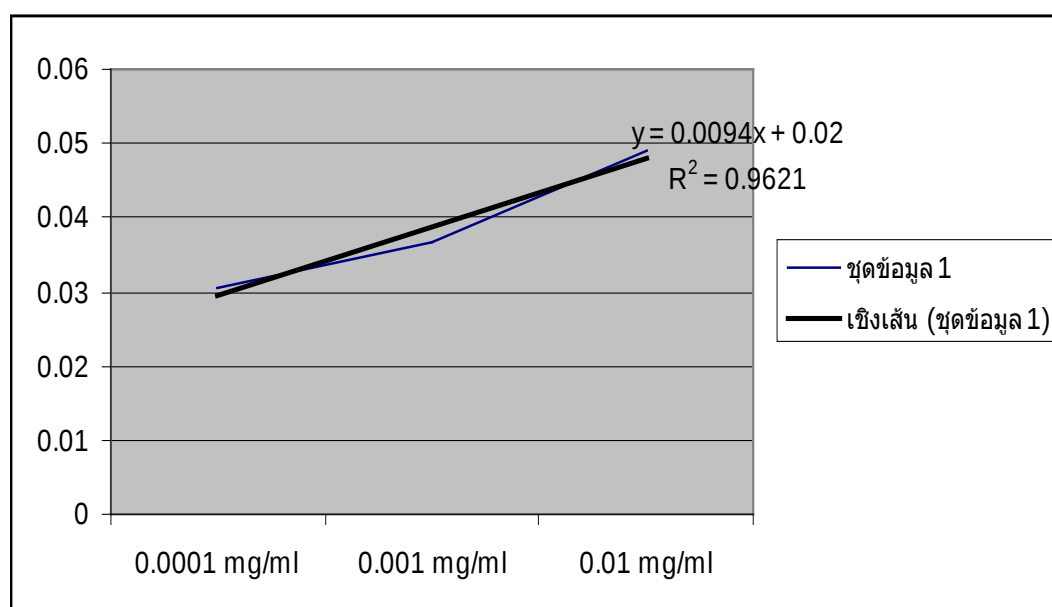


แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ในรูปปริมาณ intracellular melanin ต่อปริมาณโปรตีน โดยเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลง ให้เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

ผลการทดลอง

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเมลานิน (มก./มล.)

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน เมลานิน (มก./มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm
0.0001	0.0304
0.001	0.03655
0.01	0.04915



กราฟมาตรฐานของเมลานินมาตรฐาน

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและการเจริญของเซลล์มะเร็งหนู

B₁₆F₁₀

ลำดับ	สาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm สำหรับหาปริมาณ เมลานิน	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm สำหรับหาปริมาณ โปรตีน	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อ ปริมาณโปรตีน)
1	Control (2%DMSO+Medium)	0.02939	0.09258	-
2	Blank (Medium)	0.0343	0.10675	16.71/15.30
3	สารสกัดกวาวเครือ ด้วย น้ำ	0.02865	0.1023	-2.52/10.5
4	สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol	0.02505	0.11035	-14.77/19.19
5	สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate	0.08735	0.0995	197.21/7.47
6	สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane	0.02955	0.11035	0.54/19.19
7	สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ	0.0361	0.1048	22.83/13.20
8	สารสกัดหม่อน ด้วย methanol	0.0387	0.10705	31.68/15.63
9	สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate	0.1751	0.1013	495.78/9.42
10	สารสกัดหม่อน ด้วย hexane	0.0312	0.10705	6.16/15.63
11	สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ	0.04125	0.12095	40.35/30.64
12	สารสกัดย่านาง ด้วย methanol	0.0323	0.1021	9.90/10.28
13	สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate	0.2006	0.11385	582.55/22.97

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและการเจริญของเซลล์มะเร็งหนู

$B_{16}F_{10}$ (ต่อ)

ลำดับ	สาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm สำหรับหาปริมาณ เมลานิน	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 nm สำหรับหาปริมาณ โปรตีน	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อ ปริมาณโปรตีน)
14	สารสกัดย่านาง ด้วย hexane	0.0315	0.1021	7.18/10.28
15	สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ	0.0185	0.1026	-37.05/10.82
16	สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol	0.01975	0.0977	-32.8/5.53
17	สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate	0.02345	0.09375	-20.21/1.26
18	สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane	0.0216	0.0977	-26.51/5.53
19	สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ	0.03375	0.12155	14.83/31.29
20	สารสกัดบัวบก ด้วย methanol	0.0291	0.10095	-0.99/9.04
21	สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate	0.10525	0.11025	258.12/19.09
22	สารสกัดบัวบก ด้วย hexane	0.031	0.10095	5.48/9.04

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของสารสกัดต่างๆ ต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ พบว่า สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate สารสกัดย่านางด้วยน้ำ สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate และสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate

เอกสารอ้างอิง

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15:4897-902.
2. ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน. ใน: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.
3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

ภาคผนวก 5

การเก็บกักสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน
และบัวบกในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

การเก็บกักสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกเก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

วัตถุประสงค์ : เพื่อเตรียมอนุภาคนาโน (นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ)

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. กระดาษขี้สารถ | 11. Beaker |
| 2. ขั้วตักสาร | 12. Tween 61 |
| 3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง | 13. Cholesterol |
| 4. ขวดกั้นกลม | 14. Chloroform |
| 5. หลอดทดลอง | 15. Methanol |
| 6. เครื่องระเหยแห้ง rotavapor | 16. สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate |
| 7. เครื่อง ultrasonic probe | 17. สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate |
| 8. Water bath | 18. สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate |
| 9. เครื่อง centrifuge | 19. สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate |
| 10. Ice bath | 20. สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ |

วิธีการเตรียม

เตรียมนีโอโซมจาก Tween 61 และ cholesterol อัตราส่วน 1:1 (20mM) จำนวน 100 กรัม

1. ชั่ง Tween 61 และ cholesterol ใส่ในขวดกั้นกลม
2. ละลายด้วย chloroform 50 ml แล้วเขย่าจนละลายหมด
3. ชั่งสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย chloroform 5 ml (ยกเว้นสารสกัดกวาวเครือ ละลายด้วย methanol) และเติมลงในขวดกั้นกลมที่มี Tween 61 และ cholesterol อยู่
4. ระเหย chloroform ออกด้วยเครื่อง rotavapor จนแห้งเกิดฟิล์มเคลือบผิวขวดกั้นกลม และตั้งทิ้งไว้ 1 คืน
5. กระจายตัวฟิล์มด้วยน้ำกลั่น 100 ml โดยใช้ความร้อนจาก water bath อุณหภูมิ 50 – 55°C ช่วยในการกระจายตัวฟิล์มจนหมด
6. นำสารไปลดขนาดอนุภาคด้วย ultrasonic probe 10 นาที
7. นำไป centrifuge ที่ 5000 rpm นาน 1 นาที แล้วเก็บนีโอโซมที่เตรียมได้ใส่ในขวด

8. ประเมินลักษณะนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า
9. ประเมินขนาดอนุภาคและค่า zeta potential ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยเครื่อง zetasizer
10. ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดโดยประเมินลักษณะภายนอก การตกตะกอน ค่า pH ขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ (4, อุณหภูมิห้อง (27 ± 2) และ 45°C) เป็นเวลา 6 เดือน

สูตรที่เตรียมได้

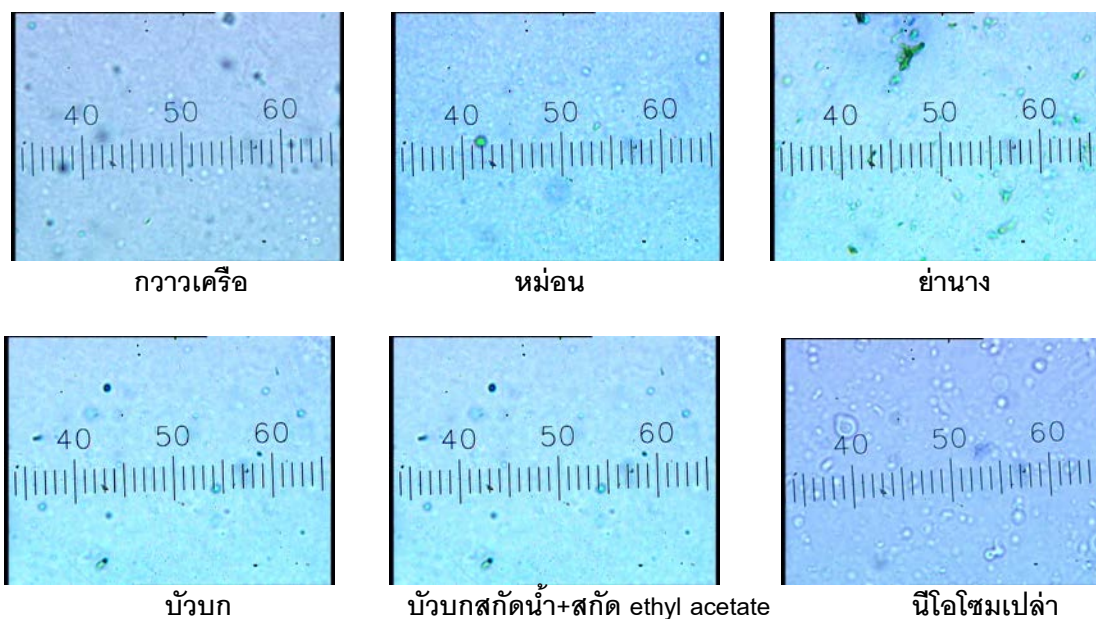
- ตำรับ 1 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.5% สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
 ตำรับ 2 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
 ตำรับ 3 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.125% สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
 ตำรับ 4 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
 ตำรับ 5 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate
 ตำรับ 6 นีโอโซมเปล่า

ผลการทดลอง (รูปที่ 5.1-5.4 และตารางที่ 5.1-5.13)



รูปที่ 5.1 ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเตรียมทันที ($t = 0$ เดือน)

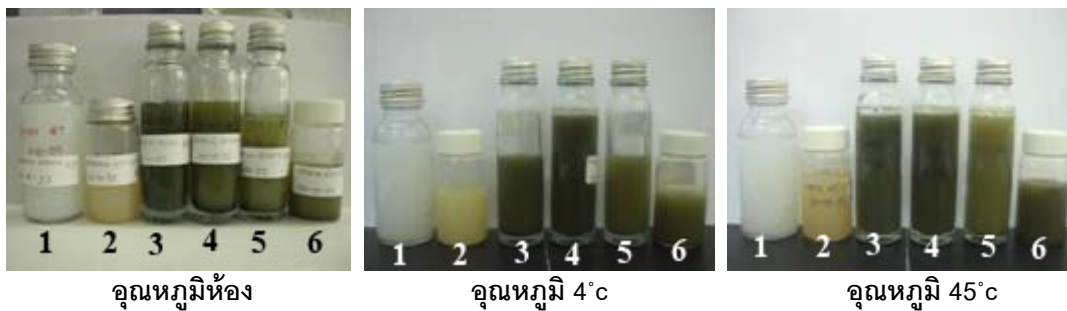
- ตำรับที่ 1. นีโอโซมเปล่า
 ตำรับที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
 ตำรับที่ 3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
 ตำรับที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
 ตำรับที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
 ตำรับที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate



รูปที่ 5.2 ลักษณะอนุภาคนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

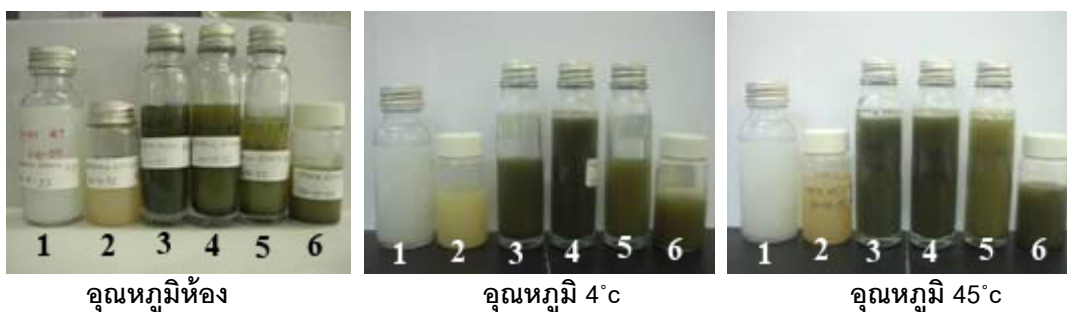
ตารางที่ 5.1 ลักษณะภายนอก ขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้าของนีโอโซมสูตรต่างๆหลังเตรียมทันที (t = 0 เดือน)

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	ศักย์ซีต้า (mv)	ตะกอน	ลักษณะ ภายนอก	pH
ตำรับ 1	308.3±88.49	-20.9±0.24	ไม่มี	สีน้ำตาลอ่อน	4.5
ตำรับ 2	172.8±8.22	-28.4±2.57	ไม่มี	สีเขียวเข้ม	5.0
ตำรับ 3	176.6±28.59	-31.1±0.78	ไม่มี	สีเขียวเข้ม	5.5
ตำรับ 4	213.9±33.48	-26.8±0.81	ไม่มี	สีเขียว	5.5
ตำรับ 5	231.7±4.53	-21.9±0.79	ไม่มี	สีเขียว	5.5
ตำรับ 6	154.10±0.95	-50.2±1.29	ไม่มี	สีค่อนข้างใส	5.5



รูปที่ 5.3 ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

- ตัวอย่างที่ 1. นีโอโซมเปล่า
 ตัวอย่างที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
 ตัวอย่างที่ 3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
 ตัวอย่างที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
 ตัวอย่างที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
 ตัวอย่างที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate



รูปที่ 5.4 ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

- ตัวอย่างที่ 1. นีโอโซมเปล่า
 ตัวอย่างที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
 ตัวอย่างที่ 3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
 ตัวอย่างที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
 ตัวอย่างที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
 ตัวอย่างที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate

ตารางที่ 5.2 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อนมีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	4.5
ตำรับ 2	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้มมีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้มมีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.5	5.0	5.5
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียวมียเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	4.5	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียวมียเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	4.5	5.5
ตำรับ 6	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	5.0	5.0	5.0

ตารางที่ 5.3 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	454.9±66.4	286.6±14.14	615.6±147.3	-25.6±0.15	-17.5±4.2	-18.2±0.68
ตำรับ 2	352±131.5	168.6±7.98	263.1±58.57	-23.4±0.86	-24.3±0.56	-18.9±1.1
ตำรับ 3	147.6±14.68	146.5±9.78	121.1±35.9	-29.1±0.85	-29.9±1.09	-33.6±0.36
ตำรับ 4	386.3±51.74	310.2±157.5	882.8±364.9	-12.5±0.81	-12.8±0.94	-11.0±0.24
ตำรับ 5	245.4±39.85	219.0±21.42	243.3±40.47	-25.7±0.89	-18.3±0.98	-26.4±0.51
ตำรับ 6	144.8±22.78	185.5±57.09	127.7±7.26	-13.6±0.37	-19.1±0.85	-18.7±0.49

ตารางที่ 5.4 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	4.5
ตำรับ 2	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีน้ำตาลอมเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.5
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.5	5.0	5.5
ตำรับ 6	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	5.0	5.0	5.0

ตารางที่ 5.5 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	353.1±71.19	226.4±3.806	226.4±30.66	-23.8±0.983	-17.2±0.597	-16.5±0.559
ตำรับ 2	273.4±27.24	191.0±19.73	311.0±74.53	-26.7±1.49	-23.6±1.0	-22.3±1.33
ตำรับ 3	151.3±5.271	123.0±9.162	140.7±16.7	-29±0.865	-31.6±1.17	-47.2±1.14
ตำรับ 4	338.6±87.85	245.1±65.41	436.5±53.82	-12.1±0.324	-13.2±0.147	-29.9±0.12
ตำรับ 5	277.2±14.44	224.4±13.56	243.3±40.47	-25.4±0.787	-28.0±0.731	-30.5±1.14
ตำรับ 6	159.9±10.73	160.8±18.37	207.5±5.893	-20.5±0.933	-14.6±0.912	-19.5±0.536

ตารางที่ 5.6 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C
ตำรับ 1	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	4.5
ตำรับ 2	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีน้ำตาลอมเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.5
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.5	5.0	5.5
ตำรับ 6	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	สีค่อนข้างใส	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	5.0	5.0	5.0

ตารางที่ 5.7 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C
ตำรับ 1	352.5±127.1	243.3±27.30	673.8±126.4	-26.1±1.09	-16.4±0.49	-14.8±0.90
ตำรับ 2	319.7±37.07	185.3±21.68	300.5±9.80	-24.7±1.03	-29.8±1.40	-23.2±1.42
ตำรับ 3	138.1±11.42	147.9±19.12	132.4±15.11	-23.5±0.75	-32.4±1.14	-48.4±1.48
ตำรับ 4	367.4±45.26	264.7±15.82	809.2±319.6	-11.8±0.51	-11.2±0.52	-9.77±0.33
ตำรับ 5	433.7±54.98	189.0±4.91	230.5±11.76	-18.0±0.79	-33.9±0.56	-27.8±0.68
ตำรับ 6	160.6±23.35	151.0±17.22	331.9±20.17	-21.4±1.51	-16.9±0.36	-19.4±0.70

ตารางที่ 5.8 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C
ตำรับ 1	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาล มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	5.0	5.0	4.5
ตำรับ 2	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+3	+1	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีน้ำตาลอมเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+3	+2	+1	5.0	5.0	5.5
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+2	+1	+3	5.0	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+4	+2	+1	5.5	5.0	5.5
ตำรับ 6	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	4.5	5.0	4.5

ตารางที่ 5.9 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	45 °C
ตำรับ 1	302.2±8.14	231.9±28.22	516.6±87.2	-25.2±1.4	-18.8±0.67	-14.7±0.45
ตำรับ 2	288.6±25.92	195.7±32.75	331.9±61.7	-28.9±0.89	-27.5±1.34	-24.2±0.89
ตำรับ 3	296.7±96.1	129.8±7.75	242.0±16.74	-22.0±1.02	-34.1±1.47	-47.0±0.95
ตำรับ 4	571.5±8.55	294.8±55.48	515.0±35.63	-11.5±0.58	-15.2±0.89	-8.98±0.50
ตำรับ 5	875.2±83.1	198.8±21.6	310.7±15.1	-16.17±0.63	-27.1±0.94	-37.8±2.0
ตำรับ 6	166.8±23.9	145.7±15.66	418.4±27.27	-33.2±0.29	-17.5±0.49	-18.0±0.23

ตารางที่ 5.10 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 5 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาล มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	4.5	4.5	4.5
ตำรับ 2	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+4	+2	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+4	+2	+3	4.5	5.5	5.0
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+2	+1	+3	4.5	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+5	+2	+2	4.5	5.5	5.5
ตำรับ 6	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	4.5	5.0	4.5

ตารางที่ 5.11 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 5 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	481.9±54.62	306.0±48.97	680.8±90.08	-17.9±1.06	--6.77±0.16	-16.0±1.64
ตำรับ 2	305.6±23.09	196.1±19.53	360.0±31.03	-35.3±3.34	-29.5±1.06	-22.2±0.74
ตำรับ 3	382.1±83.99	247.4±35.30	166.8±17.60	-20.4±0.03	-40.2±0.59	-55.5±3.97
ตำรับ 4	627.5±91.93	370.3±15.10	671.4±44.68	-9.62±0.96	-12.7±0.21	-5.68±0.56
ตำรับ 5	351.6±39.30	214.3±55.30	338.9±70.05	-20.5±1.59	-30.77±0.58	-42.3±1.81
ตำรับ 6	184.4±21.35	174.2±25.40	465.2±12.19	-23.2±2.49	-5.09±2.58	-16.2±0.44

ตารางที่ 5.12 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 6 เดือน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก			การตกตะกอน			ค่า pH		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาล มีเม็ด oil	+1	+1	ไม่มี	4.5	4.5	4.5
ตำรับ 2	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+4	+2	ไม่มี	5.0	5.0	5.0
ตำรับ 3	สีเขียว	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil	+4	+2	+3	4.5	5.5	5.0
ตำรับ 4	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+2	+1	+3	4.5	4.5	4.5
ตำรับ 5	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว มีเม็ด oil	+5	+2	+2	4.5	5.5	5.5
ตำรับ 6	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	4.5	5.0	4.5

ตารางที่ 5.13 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 6 เดือน

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าศักย์ซีต้า (mV)		
	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C	อุณหภูมิห้อง	4 ° C	45 ° C
ตำรับ 1	553.6±72.80	256.4±56.73	699.8±63.19	-22.7±3.45	-14.3±2.47	-17.9±0.55
ตำรับ 2	230.6±8.34	203.6±20.53	315.2±89.83	-28.6±0.86	-30.4±0.66	-20.3±2.99
ตำรับ 3	377.0±16.30	289.20±25.51	353.3±22.30	-16.5±1.88	-35.5±0.92	-42.8±0.72
ตำรับ 4	696.0±39.40	303.10±45.10	840.3±27.10	-26.3±4.07	-14.8±0.96	-33.7±1.83
ตำรับ 5	773.6±66.7	271.8±7.83	855.0±66.70	-18.3±0.60	-28.7±0.88	-21.0±1.29
ตำรับ 6	184.8±9.39	202.1±56.30	507.6±80.50	-34.9±0.72	-28.2±1.73	-27.3±1.35

สรุปผลการทดลอง

นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง ที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก สกัดด้วย ethyl acetate และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วย ethyl acetate มีตะกอนเล็กน้อยในเดือนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 4°C และ อุณหภูมิห้อง ไม่ตกตะกอนที่ 45°C แต่มีเม็ดลอยล้อยอยู่ด้านบน และตกตะกอนเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 4-6 ในทั้ง 3 อุณหภูมิ โดยเริ่มเปลี่ยนสีในเดือนที่ 3 ที่ 45°C pH ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงโดยอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 ขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 4°C ทั้ง 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและ 45°C มีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นในเดือนที่ 1-6 ค่าศักย์ซีต้าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในทุกอุณหภูมิ โดยสรุปนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดในทุกตัวอย่างค่อนข้างคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวในเดือนที่ 4-6 และไม่คงตัวที่อุณหภูมิ 45°C

ภาคผนวก 6

การจัดทำ Specification ของสารสกัดกาวแวเครีอ หม่อน
ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักในอนุภาคนาโน
(นีโอโซม)

การจัดทำ Specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง บัวบกที่เก็บกักใน อนุภาคนาโน (นีโอโซม)

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดต่างๆ

ความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

วัสดุ / อุปกรณ์ / เครื่องมือ

- | | |
|---------------|-------------------------------------|
| 1. หลอดทดลอง | 3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง |
| 2. หลอดหยดสาร | 4. vortex |

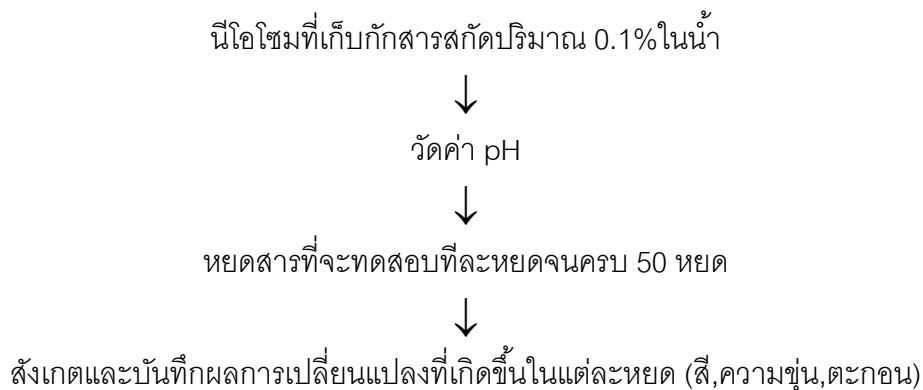
สารเคมี

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1. 10% hydrochloric acid | 5. 10% hydrogen peroxide |
| 2. 10% sodium hydroxide | 6. 10% ferric chloride |
| 3. 10% acetic acid | 7. 10% sodium acetate |
| 4. 10% ammonium hydroxide | |

ตำรับที่ทดสอบ

1. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate
6. นีโอโซมเปล่า

วิธีการทดลอง



ผลการทดลอง

ความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

ตารางที่ 6.1 ลักษณะของตัวอย่างเมื่อกระจายในน้ำกลั่น (0.1% ในน้ำ)

ตัวอย่าง	ค่า pH	ลักษณะของตัวอย่างเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่น
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ	5.5	ค่อนข้างใส
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน	5.5	ค่อนข้างใส
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง	6.0	ค่อนข้างใส
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ	5.0	ค่อนข้างใส
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยบัวบกน้ำและethyl acetate	5.0	ค่อนข้างใส
นีโอโซมเปล่า	5.5	ค่อนข้างใส

ตารางที่ 6.2 ความคงตัวของนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรในสารทดสอบต่าง ๆ

สารทดสอบ	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงเมื่อหยดสารทดสอบ					
	นิโอโซมที่เก็บกัก สารสกัด กวาวเครือ	นิโอโซมที่เก็บกัก สารสกัดหม่อน	นิโอโซมที่เก็บกัก สารสกัดย่านาง	นิโอโซมที่เก็บกัก สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ	นิโอโซมที่เก็บกัก สารสกัดด้วย บัวบกน้ำและ ethyl acetate	นิโอโซมเปล่า
10%HCl	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%NaOH	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COOH	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%NH ₄ OH	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%H ₂ O ₂	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%FeCl ₃	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
10%CH ₃ COONa	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง

สรุปผลการทดลอง

นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากหม่อนเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 6.0 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ เมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.0 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยบัวบกน้ำและ ethyl acetate เมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.0 และนีโอโซมเปล่าเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมทุกตัวอย่างมีความคงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน ต่างแก่ ต่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent

ภาคผนวก 7

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือ
หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกัก
ในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (วิตามิน C และ E)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) ของสารสกัดกวาวเครือ, ย่านาง, หม่อน, และ บัวบก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน C และวิตามิน E
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ, ย่านาง, หม่อน, และบัวบก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน C และวิตามิน E

สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

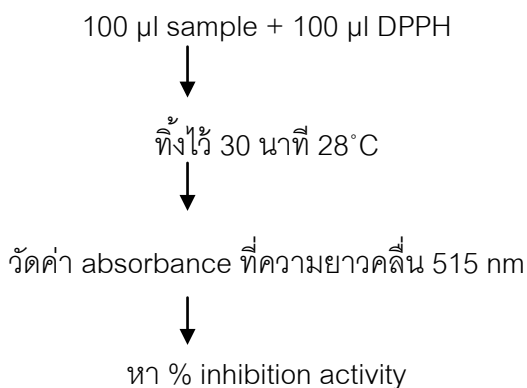
1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Fluka
2. 96 well plate
3. microplate reader
4. absolute ethanol
5. auto pipette 10-100 μ l
6. beaker 50, 1000 ml (Pyrex)
7. distilled water
8. filter apparatus
9. freeze dryer (Christ, Alpha 1-2 LD)
10. hot plate
11. test tube 15 ml
12. tip 10-100 μ l
13. top load balance (Sartorius CP3202S)
14. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)
15. ตัวอย่างสารสกัดกวาวเครือ, ย่านาง, หม่อน, บัวบกและบัวบกน้ำ
16. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

วิธีการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) (รูปที่ 7.1 และ 7.2)

1. เตรียมสารละลาย DPPH 0.25 mg/ml ใน absolute methanol
2. เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 mg/ml แล้วนำไป centrifuge และนำสารสกัดส่วนใสมาทดสอบ ดังนี้:

วิธีการทดสอบ



เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระหาได้โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition activity} = (A-B/A) \times 100$$

โดยที่ A = blank ก่อนเติม DPPH – blank หลังเติม DPPH

B = sample ก่อนเติม DPPH – sample หลังเติม DPPH

คำนวณค่า SC_{50} จากกราฟที่ plot ระหว่าง %Inhibition และความเข้มข้น (mg/ml)

โดยค่า SC_{50} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50 %

ผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์สูงกว่านีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ (ตารางที่ 7.1) แต่สารสกัดสมุนไพรทุกตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid (vitamin C) และ alpha-tocopherol (vitamin E)

ตารางที่ 7.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ที่เก็บกักในนีโอโซม

ตัวอย่าง	SC ₅₀ (mg/ml) ^a
สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate	4.24
สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate	5.34
สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate	5.95
สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate	5.97
สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ	4.73
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate	99.73
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate	138.23
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน	128.74
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก Ethyl acetate	112.64
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก	108.21
นีโอโซมเปล่า	-32.02
วิตามิน C	0.036
วิตามิน E	0.049

สรุปผลการทดลอง

สกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า SC₅₀ เท่ากับ 4.24, 5.34, 5.95, 5.97 และ 4.73 mg/ml ตามลำดับ ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า SC₅₀ เท่ากับ 99.73, 138.23, 128.74, 112.64 และ 108.21 mg/ml ตามลำดับ



รูปที่ 7.1 การทดสอบ DPPH ของสารสกัดใน 96 well plate ในแต่ละความเข้มข้น ที่ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm



รูปที่ 7.2 การทดสอบ DPPH ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดใน 96 well plate ในแต่ละความเข้มข้น ที่ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

ภาคผนวก 8

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร
สกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและ
ไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

**การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของของสารสกัดกวางเครือ หม่อน
ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (วิตามิน C และ กรดโคจิก)**

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดกวางเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบก
ที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน(วิตามิน C
และกรดโคจิก)

วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี/ตัวอย่าง

1. tyrosine
2. mushroom tyrosinase
3. distilled water
4. 0.1 M phosphate buffer pH 6.8
5. test tubes
6. เครื่องชั่งละเอียด (Precisa 240)
7. autopipette
8. beaker
9. well reader
10. ตัวอย่างสารสกัดจากกวางเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate และ
สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
11. ตัวอย่างนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากกวางเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกที่สกัดด้วย ethyl
acetate และสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ

วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมที่ความ
เข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลาย ดังแสดงในตาราง ใน 96-well microplate reader

A		B		C		D	
Tyrosine	50µl	Tyrosine	50µl	Tyrosine	50µl	Tyrosine	50µl
Distilled water	40µl	Distilled water	40µl	Sample	40µl	Sample	40µl
Phosphate buffer	100µl	Phosphate buffer	100µl	Phosphate buffer	100µl	Phosphate buffer	100µl
Distilled water	50µl	Tyrosinase	50µl	Distilled water	50µl	Tyrosinase	50µl

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ 0 นาที

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ 60 นาที

คำนวณ % Inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100$$

โดยที่ A ค่าการดูดกลืนแสงของ blank หลังจากบ่ม, B ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ก่อนบ่ม
C ค่าการดูดกลืนแสงของ sample หลังจากบ่ม, D ค่าการดูดกลืนแสงของ sample ก่อนบ่ม

คำนวณค่า IC_{50} จากกราฟที่ plot ระหว่าง %Inhibition และความเข้มข้น (mg/ml)
โดยค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 %

ผลการทดลอง (ตารางที่ 8.1)

ตารางที่ 8.1 ค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม

ตัวอย่าง	IC_{50} (mg/ml) ^a
สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate	ND
สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate	485.483
สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate	1269.902
สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate	ND
สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate	5062.740
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate	ND
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate	4271.101
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate	2722.989
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate	700.1978
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ	ND
วิตามิน C	0.24
กรดโคจิก	0.049

หมายเหตุ ND คือ ไม่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่ไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 485.483 mg/ml ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 700.1978mg/ml.

ภาคผนวก 9

การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ด
สีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของ
สารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บ
กักและไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกัก ในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคนาโน (นีโอโซม)

สารทดสอบ

81. สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
82. สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
83. สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
84. สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
85. สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
86. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
87. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
88. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
89. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
90. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate และน้ำ
91. นีโอโซมเปล่า

สารเคมี

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. DMSO
3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. 2 N Sodium hydroxide
6. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
7. Bovine serum albumin (BSA)

Cell culture

1. Mouse melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม cell culture plate⁽¹⁾

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้



เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน culture medium และเปลี่ยน culture medium ทุก 3 วัน



ประเมิน culture cell จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การทดสอบผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ ⁽¹⁻³⁾ ของ สารสกัดและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด

Seed เซลล์ 50×10^4 เซลล์/หลุม ลงใน flask



Incubate ใน CO_2 incubator 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)



Treat เซลล์แต่ละ flask ด้วยสารทดสอบ และ incubate 72 ชั่วโมง



เก็บเซลล์แต่ละ flask เพื่อวัดปริมาณเม็ดสีเมลานินและปริมาณโปรตีน โดยวิธีต่อไปนี้ :

- ก. การหาปริมาณเม็ดสีเมลานิน: ละลายเซลล์ใน 2 N NaOH ที่ $60^\circ C$ 1 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเมลานิน

(0-0.1 มก./มล.)

- ข. การหาปริมาณโปรตีน: ปิเปต Bradford reagent ลงในสารละลายเซลล์ที่ได้ แล้วนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน bovine serum

albumin



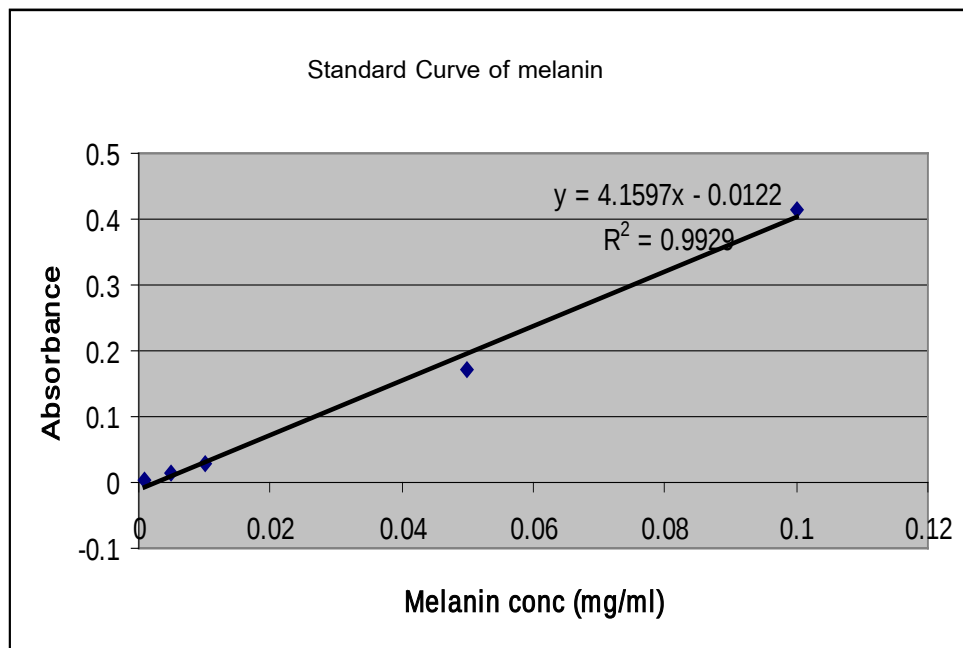
แสดงผลการศึกษาในรูปเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบเซลล์

ที่ทดสอบกับเซลล์กลุ่ม control

ผลการทดลอง

ตารางที่ 9.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเมลานิน (มก./มล.)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมลานิน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
0	0
0.001	0.002
0.005	0.0125
0.01	0.028
0.05	0.171
0.1	0.416



ตารางที่ 9.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรต่อกระบวนการสร้างเม็ด

สีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง B₁₆F₁₀

ลำดับ	สารทดสอบ	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน)
1	สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	+11.13/+86.27
2	สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	+14.17/+66.67

ตารางที่ 9.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง B₁₆F₁₀ (ต่อ)

ลำดับ	สารทดสอบ	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน)
3	สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-*
4	สารสกัดย่านางด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-*
5	สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	+51.09/+11.76
6	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-34.02/-68.08
7	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	-31.96/-65.26
8	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล.	-15.46/-33.80
9	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-29.39/-64.79
10	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	-3.19/+95.93
11	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล.	-9.43/+7.20
12	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-*
13	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	-*
14	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล.	-*
15	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-28.11/-55.46
16	นีโอโสมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	-29.54/-53.69

ตารางที่ 9.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง B₁₆F₁₀ (ต่อ)

ลำดับ	สารทดสอบ	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน)
17	นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบวบกับด้วยน้ำและ ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล.	-9.96/+0.59
18	นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบวบกับด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล.	-30.93/-66.67
19	นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบวบกับด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.	-25.03/-15.49
20	นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบวบกับด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล.	-1.95/+69.64
21	นีโอโซมเปล่าความเข้มข้น 1 มก./มล.	+1.03/+128.32

หมายเหตุ

1. + หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ - หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
2. *สารสกัดย่านางด้วยน้ำและ ethyl acetate มีสี ซึ่งอาจทำให้ผลการทดสอบผิดพลาด จึงไม่ได้รายงานผลการทดสอบ

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B₁₆F₁₀ พบว่า สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate สารสกัดย่านางด้วยน้ำ และ ethyl acetate และ สารสกัดบวบกับด้วย ethyl acetate
2. ได้นำสารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B₁₆F₁₀ มาเก็บกักในนีโอโซม เพื่อเพิ่มการนำส่งเข้าสู่เซลล์ แล้วนำนีโอโซมที่เตรียมได้ไปประเมินผลการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B₁₆F₁₀ เปรียบเทียบกับสารสกัดที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซม พบว่าสารสกัดสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนได้ แต่นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้
3. จากผลการศึกษา นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์ พบว่าสารสกัดอาจถูกเก็บกักอยู่ในนีโอโซม ทำให้ไม่สามารถถูกปลดปล่อยออกมา เพื่อเข้าสู่

เซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เช่น สารลดแรงตึงผิว อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้

เอกสารอ้างอิง

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15:4897-902.
2. ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน. ใน: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.
3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

ภาคผนวกที่ 10

การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของ
ย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

1. **วัตถุประสงค์** เพื่อเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

วัสดุ/อุปกรณ์

1. กรวยแยก (separatory funnel)
2. ปีกเกอร์
3. Hot plate stirrer
4. Magnetic stirrer
5. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ
6. ขวดกั่นกลม

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. Hexane
2. Ethyl acetate
3. Methanol
4. น้ำกลั่น
5. สารสกัดหยาบของกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate
6. สารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วย ethyl acetate
7. สารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วยน้ำ
8. สารสกัดหยาบของใบย่านางด้วย ethyl acetate
9. สารสกัดหยาบของใบหม่อนด้วย ethyl acetate

3. วิธีการทดลองและผลการทดลอง

ได้ทำการเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวอย่างด้วยวิธีการแยกส่วนการละลาย ดังนี้ :

3.1 การแยกสารสกัดหยาบของกวาวเครือขาวที่สกัดด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.2 การแยกสารสกัดหยาบของใบบัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (ethyl acetate) และ fraction 3 (methanol)

3.3 การแยกสารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วยน้ำ

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.4 การแยกสารสกัดหยาบของย่านางด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.5 การแยกสารสกัดหยาบของหม่อนด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

4. สรุปผลการทดลอง

การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและ บัวบก จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 10.1 ต่อไปนี้

ตารางที่ 10.1 ผลการเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสมุนไพรต่างๆ

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	Fractions (%yield)		
		1	2	3
1	สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate	11.09	20.99	26.8
2	สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate	1.8	2.07	11.6
3	สารสกัดหยาบบัวบกด้วย น้ำ	77.55	1.58	0.09
4	สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate	13.8	2.8	20.66
5	สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate	21.99	0.3404	26.76

เอกสารอ้างอิง

1. Hideaki Otsuka., Purification by solvent extraction using partition coefficient, [Methods in Biotechnology](#), Volume 20, 269-273, 2005

ภาคผนวกที่ 11

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง
หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์ (fraction) จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเครื่องสำอาง โดยการทดสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ (DPPH free radical scavenging activity) ฤทธิ์จับโลหะ (ferrous metal ion chelating activity) และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation activity) รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก จำนวน 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ascorbic acid, EDTA, และ α -tocopherol และ kojic acid)

2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

2.1 สารสกัดและ fraction ของสารสกัดที่ทดสอบ

1. สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate
2. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
3. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
4. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
5. สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate
6. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
7. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
8. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
9. สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วย ethyl acetate
10. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
11. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
12. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
13. สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate
14. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
15. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
16. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
17. สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ

- | | |
|---|--------------|
| 18. fraction สารสกัดบับวกด้วยน้ำ (โดยน้ำ) | (fraction 1) |
| 19. fraction สารสกัดบับวกด้วยน้ำ (โดย hexane) | (fraction 2) |
| 20. fraction สารสกัดบับวกด้วยน้ำ (โดย methanol) | (fraction 3) |

2.2 สารเคมี

- | | |
|---|--|
| 1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) | (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 2. Absolute ethanol | (องค์การสุรา, Bangkok, Thailand) |
| 3. Ascorbic acid | (Carlo Erba Reagenti SPA, Milatino, Italy) |
| 4. α -tocopherol | (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 5. EDTA | (Promega Corporation, Medison, WI, U.S.A.) |
| 6. Ferrosine | (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 7. Ferric chloride (FeCl_2) | (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 8. Linoleic acid | (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 9. Ammonium thiocyanate (NH_4SCN) | (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, U.S.A.) |
| 10. Dimethyl sulfoxide (DMSO) | (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, U.S.A.) |

2.3 วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Microcentrifuged tube | (Hycon, BIOMED Co., Ltd., Bangkok, Thailand) |
| 2. Balance | (Sartorius AG, Goettingen, Germany) |
| 3. Microplate reader | (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, U.S.A) |
| 4. 96-well plates | (Sterilin, Newport, United Kingdom) |
| 5. Beaker | (Pyrex, Scilabware Limited, Staffordshire, UK) |
| 6. Autopipette | (Biohit Group, Helsinki, Finland) |

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสารสกัด

- 3.1.1 ละลายสารมาตรฐาน ascorbic acid และ EDTA ด้วยน้ำกลั่น ส่วนสารมาตรฐาน α -tocopherol ละลายด้วย absolute ethanol เจือจางด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 mg/ml

- 3.1.2 นำตัวอย่างจากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบกทั้ง 20 ตัว มาละลายด้วย absolute ethanol และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 mg/ml

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

- 3.2.1 ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ free radical scavenging activity ด้วยวิธี DPPH assay มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลายลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตารางที่ 11.1

ตารางที่ 11.1 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ DPPH ลงใน 96-well plate

A	B	C	D
EtOH	DPPH	EtOH	DPPH
100µl	100µl	100µl	100µl
EtOH	EtOH	Sample	Sample
100µl	100µl	100µl	100µl



บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 30 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm



คำนวณ % free radical scavenging activity จากสมการ

$$\% \text{ free radical scavenging activity} = [(A-B)/(A)] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถ scavenging อนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50})

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ chelating activity ด้วยวิธี ferrous iron–ferrozine complex

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาดน้ำค้าง หม่อน

กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลาย ลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตารางที่ 11.2

ตารางที่ 11.2 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ chelating inhibition ลงใน 96-well plate

A	B	C	D
Ferrozine	Ferrozine	Ferrozine	Ferrozine
10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
น้ำกลั่น	น้ำกลั่น	Sample	Sample
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
2.4% HCl	FeCl ₂	2.4% HCl	FeCl ₂
10 µl	10 µl	10 µl	10 µl



บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28±2°C เป็นเวลา 10 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm



คำนวณ % chelating effect จากสมการ

$$\% \text{ chelating effect} = [(A-B)/A] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถจับโลหะได้ 50% (IC₅₀)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ lipid peroxidation inhibition ด้วยวิธี ferric iron-thiocyanate complex

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหย่านาง หม่อน
กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลายลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตารางที่ 11.3

ตารางที่ 11.3 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ lipid peroxidation activity ลงใน 96-well plate

A	B	C	D
Linoleic acid	Linoleic acid	Linoleic acid	Linoleic acid
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
น้ำกลั่น	น้ำกลั่น	น้ำกลั่น	น้ำกลั่น
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
NH ₄ SCN	NH ₄ SCN	NH ₄ SCN	NH ₄ SCN
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
2.4% HCl	FeCl ₂	10% HCl	FeCl ₂
50 µl	50 µl	50 µl	50 µl



บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นเวลา 60 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm



คำนวณ % Lipid peroxidation inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Lipid peroxidation inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 50% (IC₅₀)

4. ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50} = 0.16 \pm 0.04$ mg/ml), สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ($SC_{50} = 0.21 \pm 0.14$ mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50} = 0.23 \pm 0.09$ mg/ml) แต่มีฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50} = 0.05 \pm 0.00$ mg/ml) 3.2, 4.2 และ 4.6 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50} = 0.09 \pm 0.02$ mg/ml) 1.77, 2.33 และ 2.55 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50} = 1.06 \pm 1.03$ mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50} = 18.35 \pm 7.10$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50} = 0.30 \pm 0.22$ mg/ml) 3.53 และ 61.17 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50} = 0.03 \pm 0.01$ mg/ml), สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ($IPC_{50} = 0.06 \pm 0.02$ mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ($IPC_{50} = 0.08 \pm 0.06$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50} = 0.02 \pm 0.01$ mg/ml) 1.5, 3.0 และ 4.0 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50} = 0.48 \pm 0.22$ mg/ml) 16, 8 และ 6 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11.4

ตารางที่ 11.4 ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ [SC_{50} (mg/ml)] ฤทธิ์ยับยั้ง [CC_{50} (mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [IPC_{50} (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	DPPH	Metal chelating	Lipid peroxidation
	SC_{50} (mg/ml)	CC_{50} (mg/ml)	IPC_{50} (mg/ml)
1. สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate	0.21 ± 0.14	-	0.09 ± 0.06
2. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)	0.66 ± 0.32	-	-
3. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)	*ND	*ND	*ND

ตารางที่ 11.4ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ [SC_{50} (mg/ml)] ฤทธิ์จับโลหะ [CC_{50} (mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [IPC_{50} (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต่อ)

ตัวอย่าง	DPPH	Metal chelating	Lipid peroxidation
	SC_{50} (mg/ml)	CC_{50} (mg/ml)	IPC_{50} (mg/ml)
4. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)	0.16 ± 0.04	-	-
5. สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate	2.27 ± 0.10	-	0.06 ± 0.02
6. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)	-	-	-
7. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)	-	-	0.03 ± 0.01
8. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)	0.32 ± 0.05	-	0.08 ± 0.06
9. สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate	1.31 ± 0.58	-	-
10. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)	2.10 ± 0.95	-	-
11. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)	-	-	-
12. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)	-	1.06 ± 1.03	-
13. สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate	2.65 ± 0.74	-	-
14. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)	*ND	*ND	*ND
15. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)	*ND	*ND	*ND
16. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)	0.23 ± 0.09	18.35 ± 7.10	-
17. สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ	71.71 ± 6.83	-	-

ตารางที่ 11.4ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ [SC_{50} (mg/ml)] ฤทธิ์จับโลหะ [CC_{50} (mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [IPC_{50} (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต่อ)

ตัวอย่าง	DPPH	Metal chelating	Lipid peroxidation
	SC_{50} (mg/ml)	CC_{50} (mg/ml)	IPC_{50} (mg/ml)
18. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ (fraction ที่ 1)	0.27 ± 0.08	-	-
19. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane (fraction ที่ 2)	*ND	*ND	*ND
20. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol (fraction ที่ 3)	0.51 ± 0.07	-	-
21. วิตามินซี	0.05 ± 0.00		0.02 ± 0.01
22. วิตามินอี	0.09 ± 0.02		0.48 ± 0.22
23. EDTA		0.30 ± 0.22	

หมายเหตุ :

SC_{50} : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถ scavenging radicals ได้ 50%

CC_{50} : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถ chelating โลหะ ได้ 50%

IPC_{50} : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ 50%

- : ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

*ND : ไม่ได้ทำการทดสอบ เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณไม่เพียงพอ

5. อภิปรายผลการทดลอง

สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบบัวบก หอมอ่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ รองลงมา คือ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation แต่ให้ฤทธิ์จับโลหะมีจำนวนน้อยที่สุด ซึ่งสารละลายที่ใช้ในการแยก fraction สารสกัดหยาบ เพื่อให้ได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์พบว่าสารละลายที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระสูงลดลงตามลำดับ ดังนี้ methanol > น้ำ > hexane และจากผลการทดลอง สารสกัดหยาบให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ นอกจากนี้สารสกัดหยาบบัวบกที่สกัดด้วยน้ำยังให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารสกัด

หยาบบวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate เมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบวบก มาเปรียบเทียบกัน สามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ ดังนี้ ย่านาง > หม่อน > บวบก (สกัดด้วย ethyl acetate) > กวาวเครือขาว > บวบก (สกัดด้วยน้ำ) ส่วนฤทธิ์จับโลหะสามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์ได้ดังต่อไปนี้ กวาวเครือขาว > บวบก (สกัดด้วย ethyl acetate) ส่วนสารสกัดอื่นไม่มีฤทธิ์จับโลหะ นอกจากนี้สามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ดังนี้ หม่อน > ย่านาง ส่วนสารสกัดอื่นไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation

6. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50} = 0.16 \pm 0.04$ mg/ml) แต่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50} = 0.05 \pm 0.00$ mg/ml) 3.2 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50} = 0.09 \pm 0.02$ mg/ml) 1.77 เท่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับโลหะสูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50} = 1.06 \pm 1.03$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์จับโลหะต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50} = 0.30 \pm 0.22$ mg/ml) 3.53 เท่า ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50} = 0.03 \pm 0.01$ mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50} = 0.02 \pm 0.01$ mg/ml) 1.5 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50} = 0.48 \pm 0.22$ mg/ml) 16 เท่า

7. เอกสารอ้างอิง

1. Gulcin I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. Life Sci. 78, 803 – 811.
2. Bong K.J., Bum K.J., Jin C.K., Konig G.M., Wright A.D. 2006. Antioxidant activity of 3,4,5-trihydroxy benzaldehyde isolated from Geum japonicum. J Food Drug Anal. 14(2), 190-193.

ภาคผนวกที่ 12

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสาร
สกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ
ของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัด หยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสี
เมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$

2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

สารสกัดหยาบและ fraction ของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบ

1. สารสกัดหยาบของย่านางด้วย ethyl acetate
2. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
3. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
4. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
5. สารสกัดหยาบของหม่อนด้วย ethyl acetate
6. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
7. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
8. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
9. สารสกัดหยาบของกวาวเครือด้วย ethyl acetate
10. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
11. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
12. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
13. สารสกัดหยาบของบัวบกด้วย ethyl acetate
14. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
15. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
16. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
17. สารสกัดหยาบของบัวบกด้วยน้ำ
18. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
19. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane (fraction ที่ 2)
20. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol (fraction ที่ 3)

สารเคมี

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. Absolute ethanol
3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. Mushroom tyrosinase
6. 2 N Sodium hydroxide
7. Bradford dye reagent สำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
8. Bovine serum albumin (BSA)
9. Dopa
10. Cell lysis buffer
11. Cocktail protease inhibitor

Cell culture

1. Mous7e melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

3. วิธีการทดลอง

1. การเตรียม cell culture plate⁽¹⁾

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้



เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน culture medium และเปลี่ยน culture medium ทุกๆ 3 วัน



ประเมิน culture cells จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การศึกษาผลของสารสกัดและ fraction ของสารสกัดต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน⁽¹⁻³⁾

Seed เซลล์จำนวน 10×10^5 เซลล์/well ลงใน 6-well plate



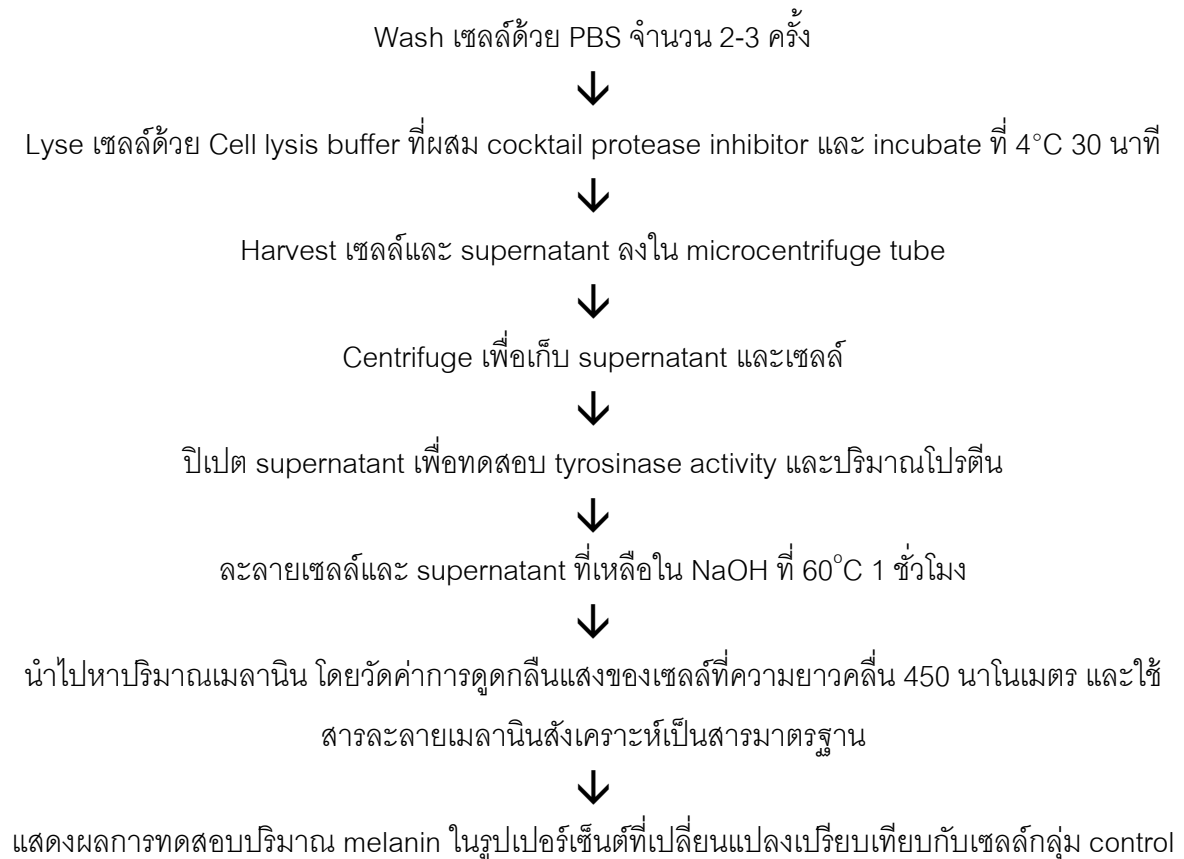
Incubate plate 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)



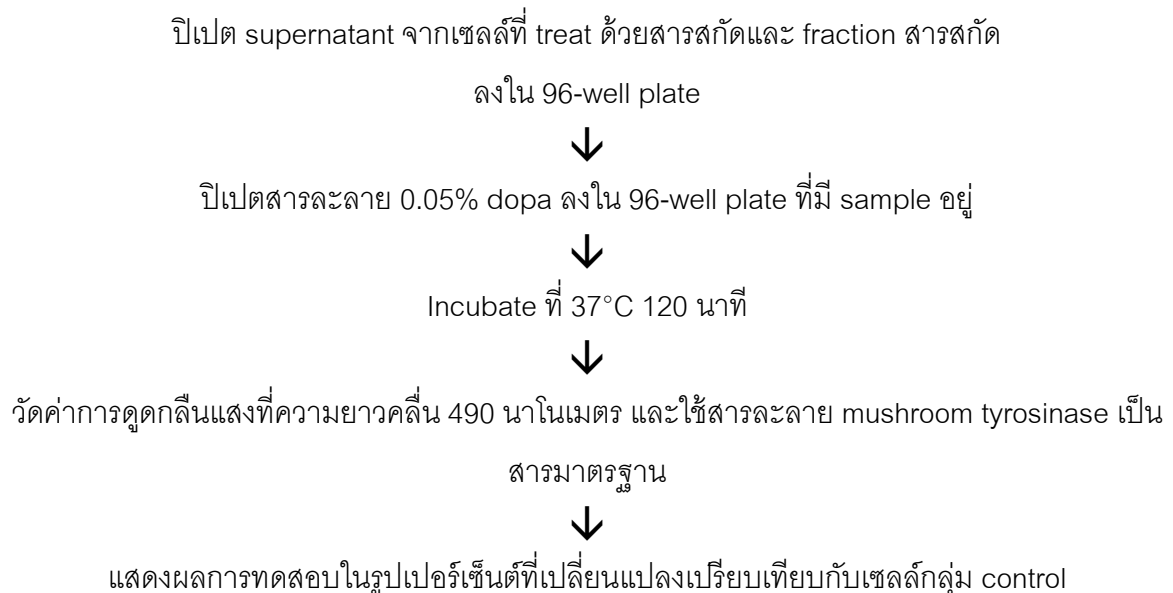
Treat เซลล์แต่ละหลุมด้วยสารทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(แต่ละสารทดสอบในแต่ละขนาด ทำ 3 ซ้ำ)

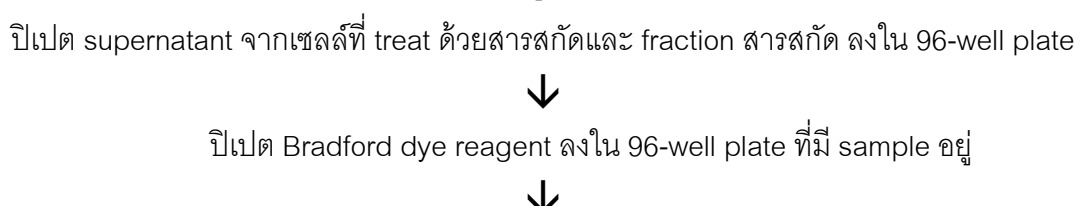




3. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase⁽¹⁻³⁾



4. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B₁₆F₁₀⁽¹⁻³⁾



Incubate 5 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และใช้สารละลาย bovine serum albumin เป็น

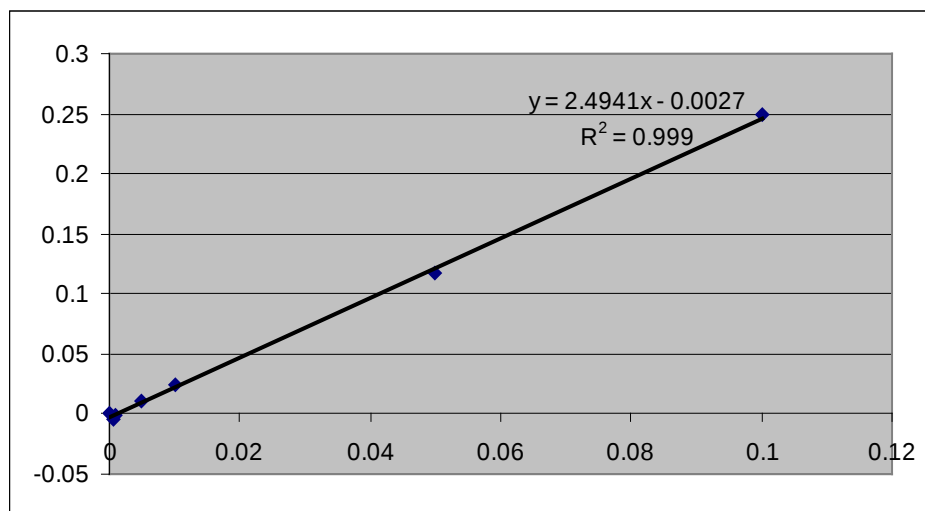
สารมาตรฐาน (0 – 1 mg/ml)



แสดงผลการทดสอบในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

4. ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดและ fraction ของสารสกัดต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน



รูปที่ 12.1 กราฟมาตรฐานของเมลานินมาตรฐาน (ug/ml)

ตารางที่ 12.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณเม็ดสีเมลานิน (ug/ml)	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control
1	Control (absolute ethanol + DMEM)	34	100
2	สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	26	73.27±3.59
3	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	23	65.46±4.60

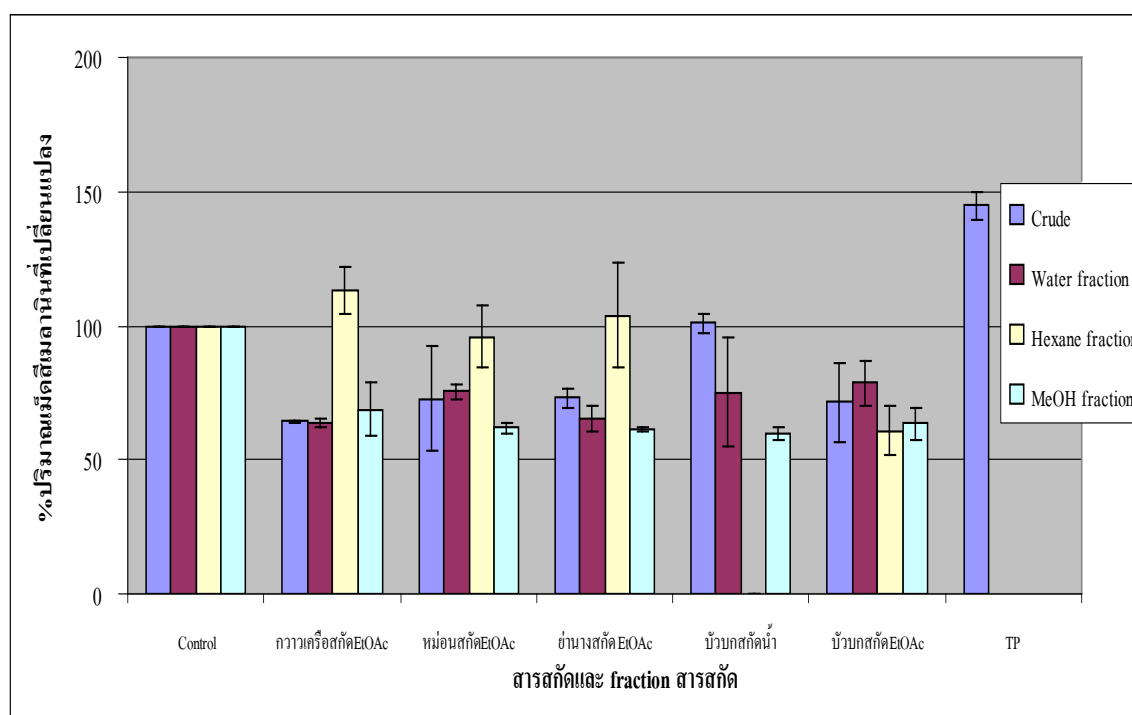
ตารางที่ 12.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน
(ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณเม็ด สีเมลานิน (ug/ml)	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control
4	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	31	103.82±19.60
5	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	21	61.02±0.81
6	สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	29	72.79±19.28
7	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	26	75.37±3.11
8	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	33	95.87±11.80
9	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	21	61.93±2.09
10	สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	22	64.30±0.40
11	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	22	63.69±1.26
12	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	38	112.99±8.93
13	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	26	68.70±10.05
14	สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate	28	71.34±14.65
15	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	25	78.50±7.99
16	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	23	60.90±9.38
17	fraction จากสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	20	63.48±5.95

ตารางที่ 12.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณเม็ดสีเมลานิน (ug/ml)	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control
18	สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml	35	100.86±3.80
19	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	30	75.18±20.07
20	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	-*	-
21	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	20	59.84±2.47
22	Theophylline ความเข้มข้น 50 μ g/ml	48	144.81±5.07

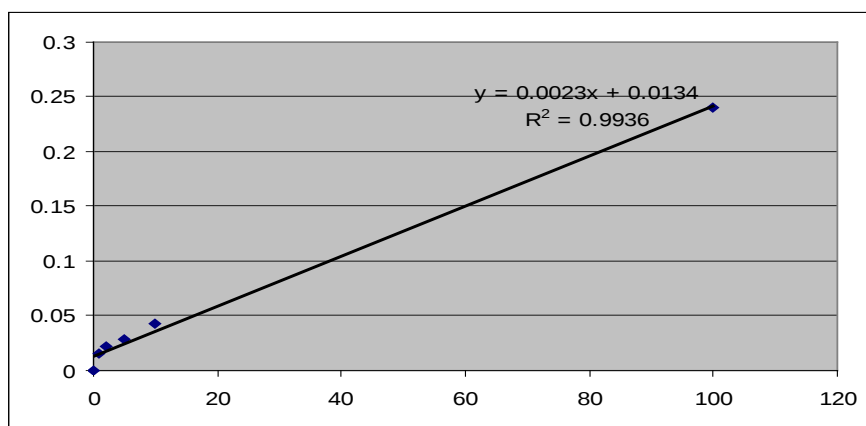
หมายเหตุ *มีปริมาณสารน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ



รูปที่ 12.2 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อปริมาณเม็ดสีเมลานิน

TP = Theophylline

2. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase



รูปที่ 12.3 ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase มาตรฐาน (ug/ml)

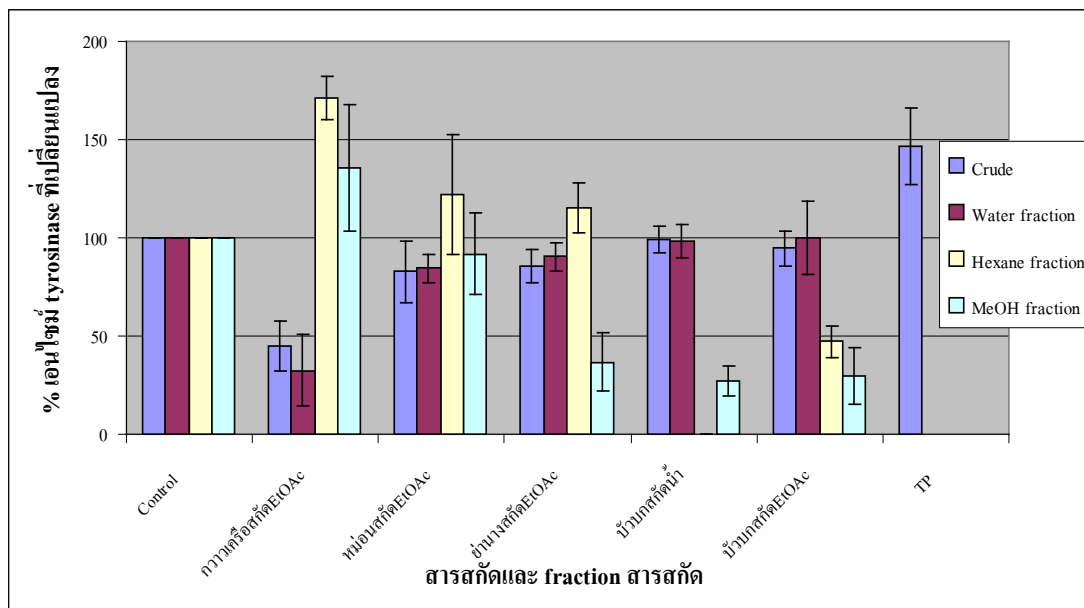
ตารางที่ 12.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของตัวอย่างต่อเอนไซม์ tyrosinase

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase (ug/ml)	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control
1	Control (absolute ethanol + DMEM)	40.26	100
2	สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	34.39	85.42±8.53
3	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	36.35	90.28±7.25
4	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	46.35	115.12±12.87
5	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	14.83	36.83±14.54
6	สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	33.30	82.72±15.48
7	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	33.96	84.34±6.84
8	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	49.17	122.14±30.59
9	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	37.00	91.90±20.51
10	สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	18.09	44.92±12.53

ตารางที่ 12.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของตัวอย่างต่อเอนไซม์ tyrosinase (ต่อ)

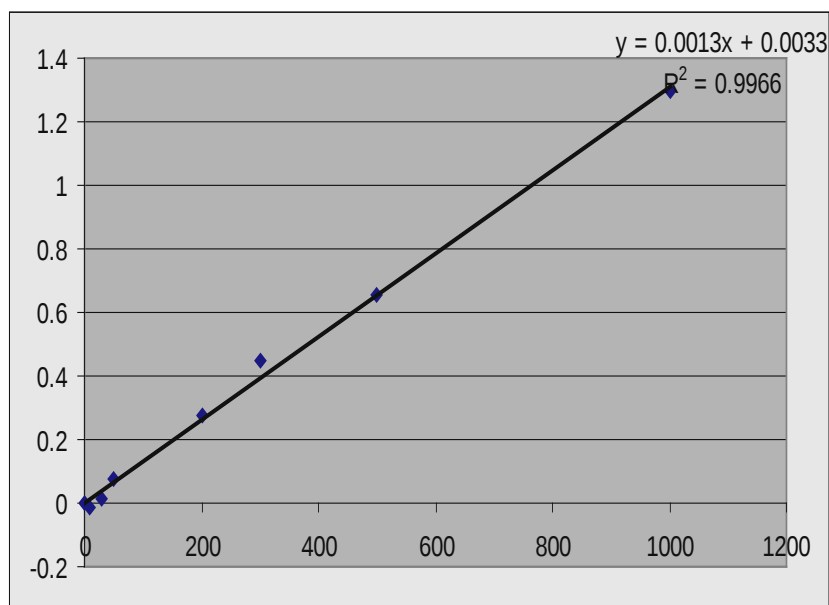
ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase (ug/ml)	% การเปลี่ยนแปลงเมื่อ เปรียบเทียบกับ control
11	fraction จากสารสกัดหยาบบกขาวครีมขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	13.09	32.51±18.52
12	fraction จากสารสกัดหยาบบกขาวครีมขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	68.96	171.27±11.25
13	fraction จากสารสกัดหยาบบกขาวครีมขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	45.48	135.64±32.07
14	สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate	38.09	94.60±9.16
15	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	40.26	100.00±18.64
16	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	18.96	47.08±8.25
17	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	12.00	29.81±14.67
18	สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml	40.04	99.46±6.78
19	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	39.61	98.38±8.26
20	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	-*	-
21	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	10.91	27.11±7.85
22	Theophylline ความเข้มข้น 50 µg/ml	67.00	146.86±19.50

หมายเหตุ *ปริมาณสารที่ได้มีน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ



รูปที่ 12.4 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase

3. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B₁₆F₁₀



รูปที่ 12.5 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin มาตรฐาน (mg/ml)

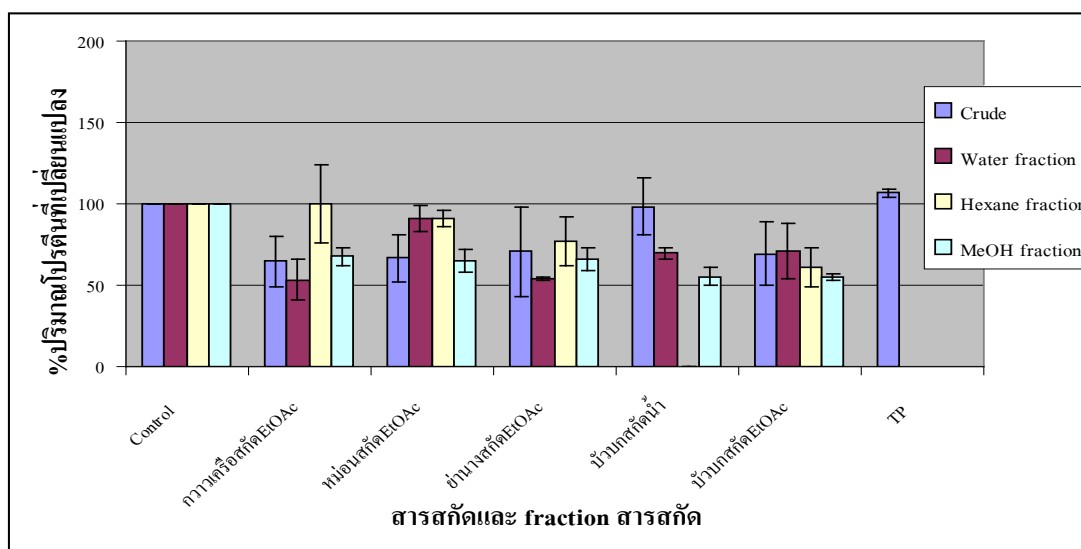
ตารางที่ 12.3 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน

ลำดับ	สาร	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control
1	Control (absolute ethanol + DMEM)	2,221.69	100
2	สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	1,999.77	70.60±27.45
3	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	1,216.69	54.068±1.00
4	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	1,940.92	76.89±14.81
5	fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	1,359.38	66.28±7.19
6	สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	1,701.31	66.51±14.24
7	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	1,893.23	90.82±7.92
8	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	1,941.69	91.04±5.15
9	fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	1,329.77	64.87±7.09
10	สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml	1,189.00	64.53±15.56
11	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	985.92	53.41±12.77
12	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	1,849.77	100.02±23.70
13	fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	1,593.23	67.89±5.40
14	สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate	1,850.15	69.36±19.69
15	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	1,847.08	71.01±17.15
16	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	1,535.92	60.82±11.75

ตารางที่ 12.3 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน (ต่อ)

ลำดับ	สาร	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	% การเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ control
17	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	1,250.92	54.84±2.07
18	สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml	1,904.00	98.20±17.68
19	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย น้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1)	1,605.92	69.55±3.87
20	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2)	-*	-
21	fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3)	1,144.00	55.31±5.40
22	Theophylline ความเข้มข้น 50 µg/ml	1,981.88	146.86±19.50

หมายเหตุ *ปริมาณสารที่ได้มีน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ



รูปที่ 12.6 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อปริมาณโปรตีน

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่า สารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ (ร้อยละ 100.86±3.8) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน

ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 112.99 ± 8.93) และ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 103.82 ± 19.60)

2. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase พบว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งเป็น fraction ที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (ร้อยละ 171.27 ± 11.25) ในขณะที่สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ต่ำกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม (ร้อยละ 99.46 ± 6.78) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบอีก 2 ตัวโดย hexane ที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate และสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate (ร้อยละ 122.14 ± 30.59 และ 115.12 ± 12.87 ตามลำดับ)

3. การศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่า ทุกสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบมีจำนวนโปรตีนภายในเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม

4. สารมาตรฐาน theophylline ในความเข้มข้น $50 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งใช้เป็น positive control พบว่า theophylline สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้สูงกว่าสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบ ในร้อยละ 144.81 ± 5.07 แต่สารมาตรฐานมีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase ต่ำกว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 146.86 ± 19.50)

5. Fraction จากสารสกัดมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินสูงกว่าสารสกัดหยาบ อาจเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการ fraction สามารถละลายสารสำคัญออกจากสารสกัดหยาบและทำให้สารสำคัญออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดรวมกันอยู่

เอกสารอ้างอิง

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15:4897-902.
2. ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน. ใน: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.
3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

ภาคผนวกที่ 13

การเก็บกักสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2
ในนีโอโซม

การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม

วัตถุประสงค์ เพื่อเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. ขวดกั่นกลม | 8. water bath |
| 2. ปีกเกอร์ | 9. สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาว fraction2 |
| 3. เครื่องชั่งไฟฟ้า | 10. Tween 61 |
| 4. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ | 11. Cholesterol |
| 5. เครื่อง Ultrasonic probe | 12. Chloroform |
| 6. หลอด centrifuge ขนาด 50 มล. | 13. น้ำกรอง |
| 7. เครื่อง centrifuge | |

วิธีการเตรียม (เตรียม 100 กรัม ด้วยอัตราส่วน Tween 61 / Cholesterol = 1.1)

1. ชั่ง Tween 61 และ Cholesterol ใส่ในขวดกั่นกลมละลายด้วย 50 ml. ของ chloroform
2. ชั่งสารสกัดกวาวเครือขาว fraction2 ปริมาณ 2.0 กรัมละลายด้วย chloroform 10 มล. ผสมลงในสารละลายข้อ 1
3. ระเหยเอา chloroform ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศอุณหภูมิ 50°C จนหมด กระจายตัวฟิล์มด้วยน้ำกรอง 100 มล. หมุนใน water bath อุณหภูมิ 50°C จนกระจายตัวหมด
4. นำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Ultrasonic probe นาน 10 นาที
5. นำไป centrifuge 5000 rpm นาน 1 นาที
6. แบ่งบรรจุขวดเพื่อนำไปศึกษาความคงตัวทางเคมีและกายภาพและทดสอบการซึมผ่านรูขุมขนทางผิวหนังเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาว fraction2 2% ใน propylene glycol

ผลการทดลอง

นีโอโซมที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอนสีขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน

ภาคผนวกที่ 14

การศึกษาคงตัวทางกายภาพและเคมีของ
นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ

fraction 2

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

ตอนที่ 1: การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

บทนำ

การนำสารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์มักเกิดปัญหาความไม่คงตัว มีกลิ่นหรือมีรสชาติไม่ดี ก่อการระคายเคือง ไม่ติดผิว ไม่ละลายน้ำ ดูดซึมผ่านผิวหนังไม่ดี มีปัญหาความไม่เข้ากันกับส่วนประกอบต่างๆ ในตำรับและหมดฤทธิ์เร็ว ในปัจจุบัน มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ต่างๆ มาใช้ในการแก้ปัญหา เช่น การใช้เทคโนโลยีเอนแคปซูเลชัน ได้แก่ การนำแคปซูลขนาดเล็ก อนุภาคนาโน (ไลโปโซมและนีโอโซม) และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ทริน (cyclodextrin) เป็นต้น มาเก็บกักสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่างๆ ในอนาคตเหล่านี้แล้วนำมาผสมเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความคงตัวของสารสกัดและผลิตภัณฑ์

นีโอโซม (niosomes) เป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นถุงกลมที่เก็บกักสารละลายน้ำไว้ภายในช่องตรงกลางเช่นเดียวกับไลโปโซม และเก็บกักสารละลายไขมันในผนังนีโอโซมโดยผนังนีโอโซมประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) ซึ่งมีราคาถูกกว่าฟอสโฟลิพิดที่ใช้เตรียมไลโปโซม นอกจากนี้นีโอโซมยังมีความคงตัวกว่าและมักมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าไลโปโซม

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความคงตัวทางกายภาพ (การแยกชั้น สี กลิ่น ค่าความเป็นกรดด่าง ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า) ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ [4°C, อุณหภูมิห้อง (27±2°C) และ 45°C] เป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกับเมื่อเวลาเริ่มต้น

สารตัวอย่าง

1. นีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซน
2. สารละลาย 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol
3. นีโอโซมเปล่า

สารเคมี

1. Distilled water (NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. Particle size analyzer (Zetasizer ZS, Malvern, England)
2. Microcentrifuge tube (Eppendorf, Hamburg, Germany)
3. Micropipettes (BIO-RAD, Milan, Italy)
4. Automatic balance 4 digits (Satoruis, Canada)
5. Vortex mixers (Scientific industry, USA)
6. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)
7. Insulin syringe (Nipro corp., Osaka, Japan)
8. Tissue paper (Scott, Thailand)
9. pH-indicator strips (Merck, England)

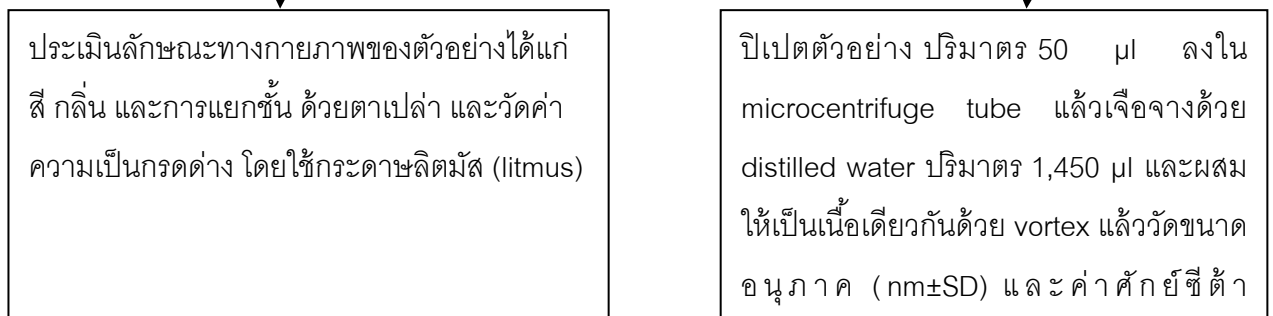
วิธีการทดลอง

แบ่งนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด นีโอโซมเปล่า และสารสกัดที่ละลายใน propylene glycol

ใส่ขวดแก้ว ปิดฝาให้แน่นสนิท



ประเมินลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง



ประเมินเป็นเวลา 3 เดือนโดยให้:

- T0 คือ เวลาเริ่มต้นหลังจากเตรียมเสร็จทันที
 T1 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน
 T2 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน
 T3 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol พบว่านีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่ามีความคงตัวทางกายภาพ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และไม่เกิดการแยกชั้น ที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน แต่สารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol ไม่มีความคงตัวทางกายภาพ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองขี้ด และขุ่น กลิ่นเหม็นหืน และเกิดการตะกอนเล็กน้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (วัดด้วยกระดาษลิตมัส) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ส่วนที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แต่มีกลิ่นเหม็นหืน และเกิดการตะกอนเล็กน้อย และค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (วัดด้วยกระดาษลิตมัส) เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 14.1 – 14.3 และตารางที่ 14.1 – 14.3 เมื่อวัดขนาดอนุภาค (nm) พบว่านีโอโซมมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน ขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดอนุภาคลดลงน้อยกว่านีโอโซมเปล่า ในขณะที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดลดลง แต่ขนาดอนุภาคของนีโอโซมเปล่าเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของตัวอย่างนีโอโซมทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบ นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีค่าศักย์ซีต้าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า ซึ่งมีค่าศักย์ซีต้าลดลง แต่ที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีค่าศักย์ซีต้าลดลง แต่นีโอโซมเปล่ามีค่าเป็นลบเพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากเมื่อเวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจากนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือเกิดการสลายตัว เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูง ($45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลานาน ดังแสดงในตารางที่ 14.1 – 14.3 และรูปที่ 14.4 – 14.9 ทั้งนี้ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิต่ำ ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ช่วยชะลอการเพิ่มขนาดอนุภาคนีโอโซมได้ดีกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง ($45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดอนุภาคใหญ่นีโอโซมเปล่าประมาณ 1 เท่า และมีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบใกล้เคียงกับนีโอโซมเปล่า อย่างไรก็ตาม การเก็บนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่าไว้ที่

อุณหภูมิห้อง ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$), $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน นีโอโซมยังมีความคงตัวทางกายภาพหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 14.1 นีโอโซมเปล่า ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$), $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน



รูปที่ 14.2 นีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ที่ partition ด้วย เฮกเซน ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$), $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน



รูปที่ 14.3 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซน ละลายใน propylene glycol ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$), $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

ตารางที่ 14.1 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 3 เดือน

ตัวอย่าง	T0 (0 เดือน)						T1 (1 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	152.20 ± 10.22	-29.03 ± 1.77	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$97.25 \pm 2.00^*$	- $40.07 \pm 1.89^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและจุน	5.0	ไม่แยกชั้น	196.53 ± 2.76	-56.30 ± 1.61	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและจุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$180.90 \pm 1.97^*$	- $49.80 \pm 1.56^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-
ตัวอย่าง	T2 (2 เดือน)						T3 (3 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$106.63 \pm 1.80^*$	-40.63 ± 1.27	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$104.17 \pm 0.95^*$	- $37.10 \pm 1.23^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและจุน	5.0	ไม่แยกชั้น	195.93 ± 4.19	$-42.20 \pm 0.92^*$	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและจุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$199.45 \pm 5.23^*$	- $39.61 \pm 4.14^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อน ขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อน ขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-

หมายเหตุ : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 14.2 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน

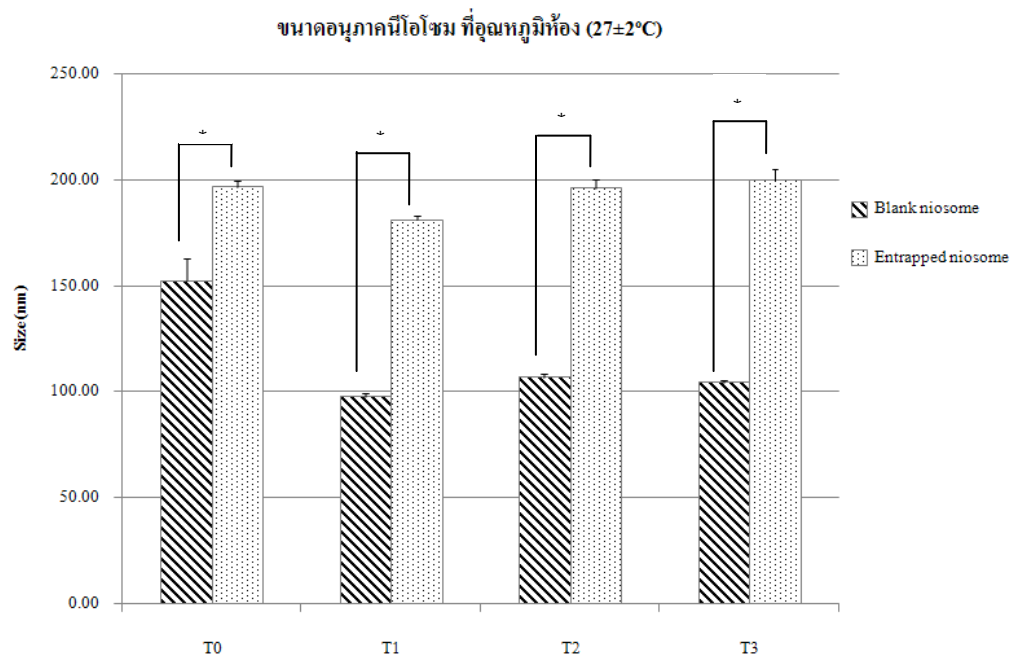
ตัวอย่าง	T0 (0 เดือน)						T1 (1 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	152.20 ± 10.22	-29.03 ± 1.77	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$103.10 \pm 1.11^*$	- $44.67 \pm 4.15^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	196.53 ± 2.76	-56.30 ± 1.61	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$176.57 \pm 4.55^*$	-51.6 ± 1.85
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-
ตัวอย่าง	T2 (2 เดือน)						T3 (3 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$108.3 \pm 0.95^*$	$-40.87 \pm 1.46^*$	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$185.33 \pm 1.36^*$	- $45.50 \pm 0.46^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$182.80 \pm 1.18^*$	$-46.93 \pm 1.00^*$	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$516.10 \pm 63.54^*$	- $16.83 \pm 0.61^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-

หมายเหตุ : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

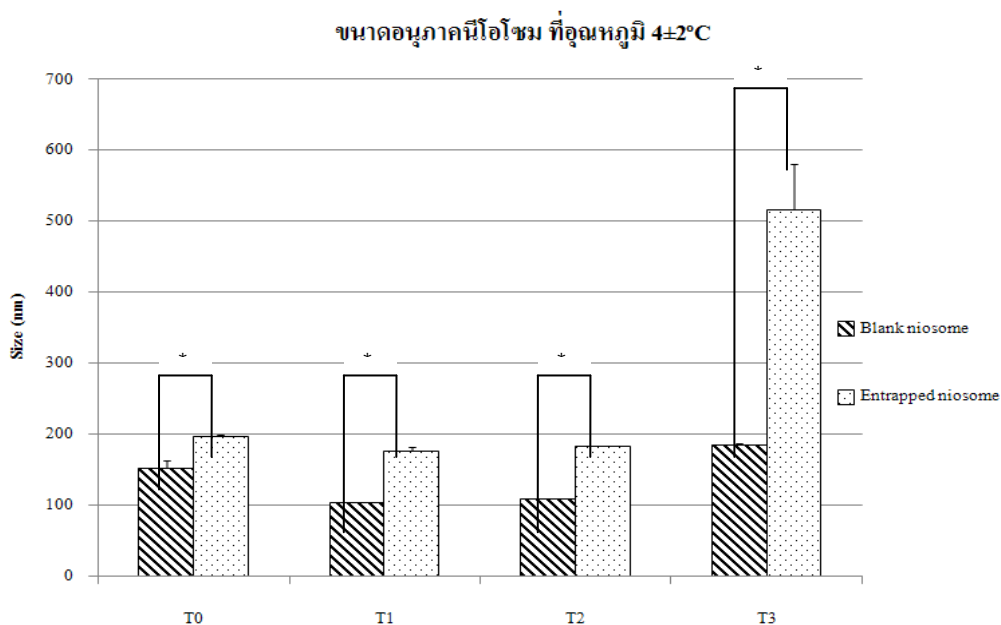
ตารางที่ 14.3 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน

ตัวอย่าง	T0 (0 เดือน)						T1 (1 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	152.20 ± 10.22	-29.03 ± 1.77	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$193.17 \pm 4.12^*$	- $42.53 \pm 1.99^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	196.53 ± 2.76	-56.30 ± 1.61	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$174.57 \pm 0.85^*$	- $47.43 \pm 1.50^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-
ตัวอย่าง	T2 (2 เดือน)						T3 (3 เดือน)					
	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)	สี	กลิ่น	pH	แยกชั้น	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้า (mV)
นีโอโซมเปล่า	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$260.47 \pm 2.96^*$	$3.37 \pm 2.70^*$	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	5.0	ไม่แยกชั้น	$253.83 \pm 10.14^*$	- $33.98 \pm 1.63^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$169.47 \pm 5.07^*$	$37.30 \pm 2.23^*$	ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน	เขียวและฉุน	5.0	ไม่แยกชั้น	$178.43 \pm 88.16^*$	- $36.80 \pm 0.98^*$
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-	เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย	propylene glycol	5.0	ไม่แยกชั้น	-	-

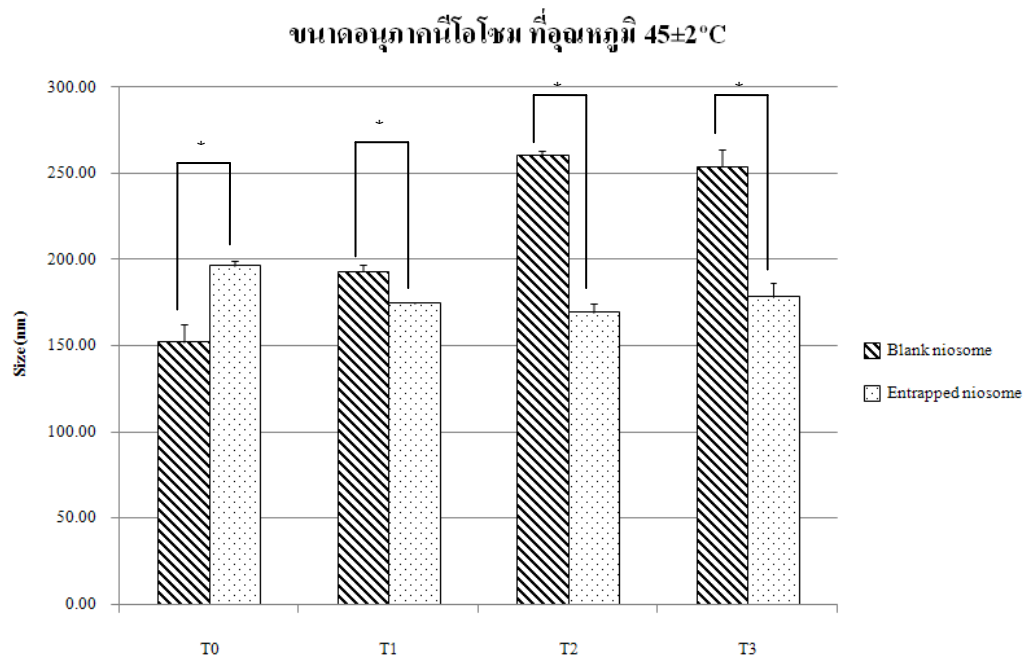
หมายเหตุ : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



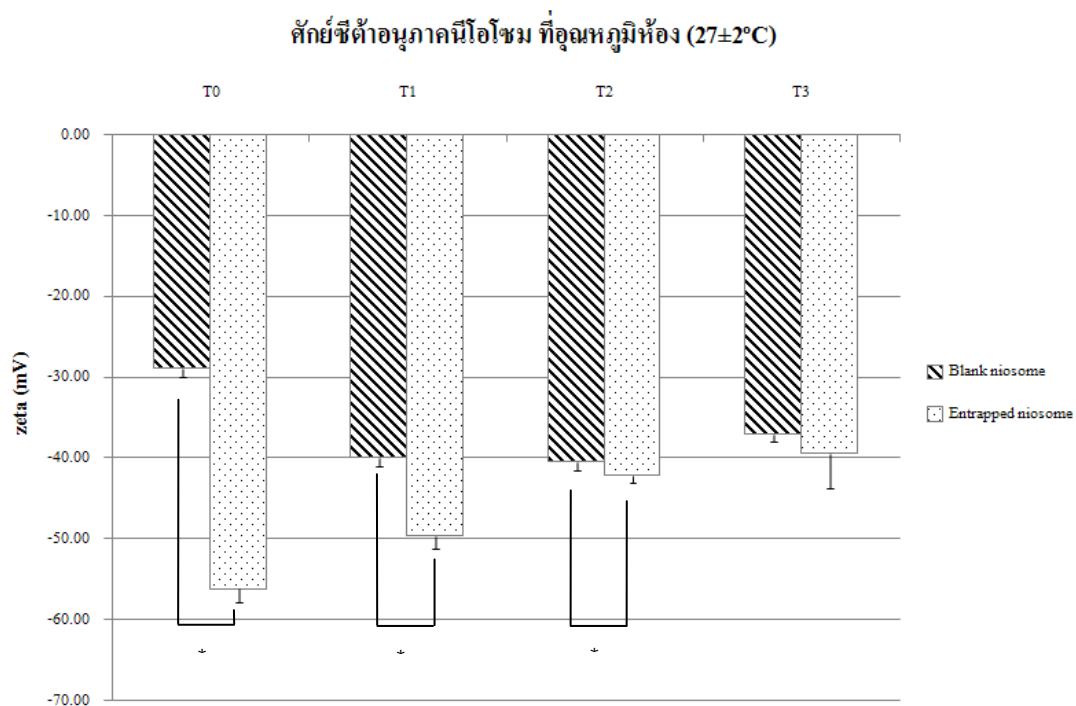
รูปที่ 14.4 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 3 เดือน



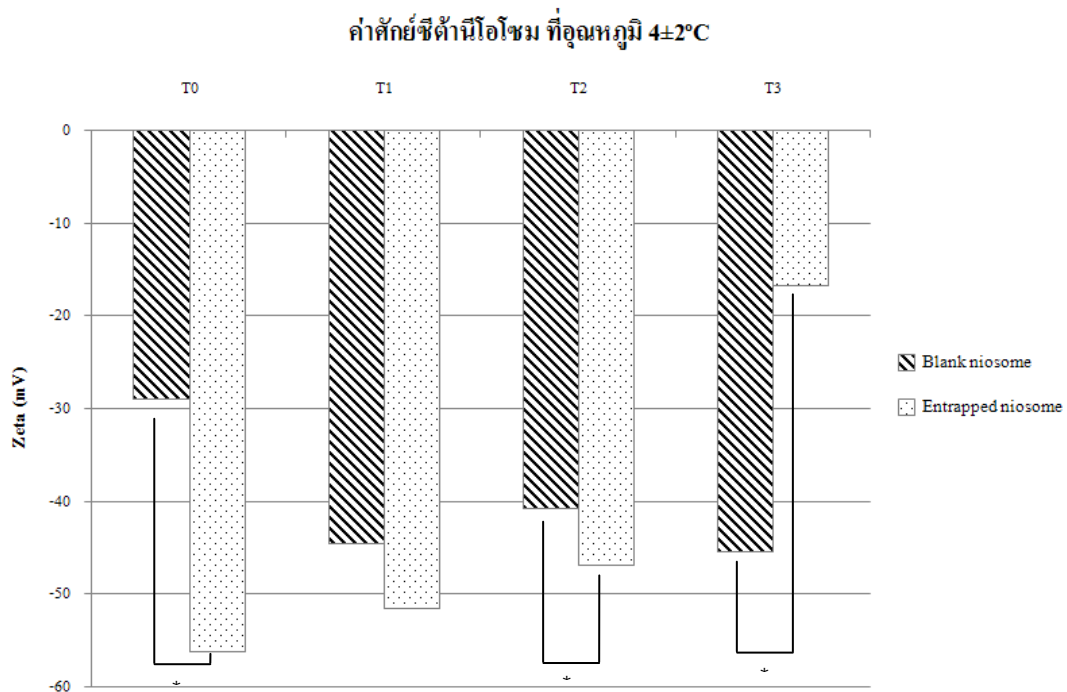
รูปที่ 14.5 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน



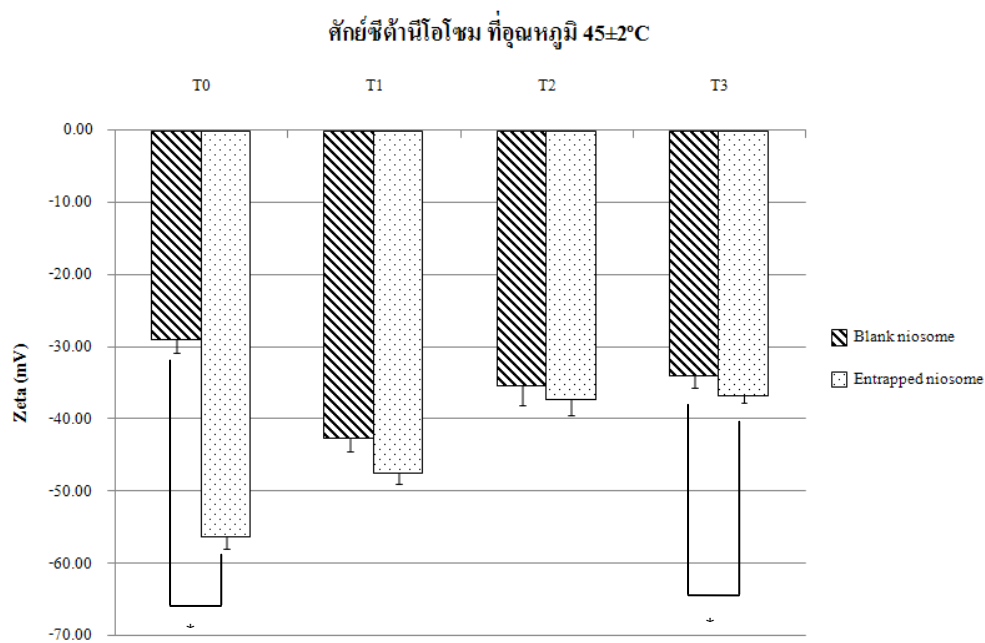
รูปที่ 14.6 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45±2°C เป็นเวลา 3 เดือน



รูปที่ 14.7 ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง; 27±2°C เป็นเวลา 3 เดือน



รูปที่ 14.8 ค่าศักย์ซีต่า (mV) ของของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน



รูปที่ 14.9 ค่าศักย์ซีต่า (mV) ของของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 เดือน

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความคงตัวของตัวทางกายภาพพบว่าไนโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซน และไนโอโซมเปล่า มีความคงตัวของตัวทางกายภาพมากกว่าสารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol ทั้งเก็บในอุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน นอกจากนี้การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนในไนโอโซมทำให้สารสกัดมีความคงตัวของตัวทางกายภาพเพิ่มขึ้น โดยไม่เกิดการแยกชั้น มีค่าความเป็นกรดต่าง กลิ่น และสี ไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 3 เดือน แต่ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จึงควรเก็บตัวอย่างให้พ้นแสงหรือในตู้เย็น (อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$)

เอกสารอ้างอิง :

1. Manosroi, A., Chutoprapat, R., Masahiko., A., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2011) Anti-aging efficacy of topical formulations containing niosomes entrapped with rice bran bioactive compounds, **Pharmaceutical biology**, in press.
2. Manosroi, A., Chutoprapat, R., Sato, Y., Miyamoto, K., Hsueh, K., Abe, Masahiko., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2010), Antioxidant Activities and Skin Hydration Effects of Rice Bran Bioactive Compounds Entrapped in Niosomes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 10: 1-9.

**ตอนที่ 2: การศึกษาความคงตัวของนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก
กวาวเครือ fraction 2**

สารตัวอย่าง

1. นิโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2
2. สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol

สารเคมี

1. Acetonitrile (Labscan, Bangkok, Thailand)
2. Acetic acid (Labscan, Bangkok, Thailand)
3. Methanol (Labscan, Bangkok, Thailand)
4. Linoleic acid (Tokyo Chemical Industrial, Tokyo, Japan)

เครื่องมือ/อุปกรณ์

2. Micro centrifuge tube (Eppendorf, Hamburg, Germany)
3. Micropipettes (BIO-RAD, Milan, Italy)
4. เครื่อง Centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchenger, Germany)
5. Volumetric flask (Pyrex, Asbash, Germany)
6. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)

วิธีการทดลอง

HPLC condition สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของ linoleic acid

HPLC	:	LC 1200 UV/VIS Detector, LC 1100 HPLC Pump
Column	:	Luna C18 10 micron 250×4.0 mm “Phenomenex U.S.A”
Mobile phase	:	0.1% acetic acid in acetonitrile /water (95:5)
Flow rate	:	1 ml/min
Detection	:	205 nm.

การเตรียมสารมาตรฐาน

วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐาน 0.010 g ละลายใน mobile phase ปริมาตร 1 ml



นำสารละลายไป centrifuge 7,000 rpm เป็นเวลา 10 min



ดูดสารละลายใสออกมา 100 ไมโครลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ml (1 mg/ml)



นำสารละลายไป centrifuge 7,000 rpm เป็นเวลา 10 min



นำสารละลายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml

นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดปริมาณ 20 ไมโครลิตร



นำ peak area ที่ได้มาสร้าง standard curve

วิธีการเตรียมตัวอย่างสารสกัด

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 100 mg



นำไปละลายใน methanol ปริมาตร 1 ml



นำสารละลายไป centrifuge 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min



นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดปริมาณ 20 ไมโครลิตร

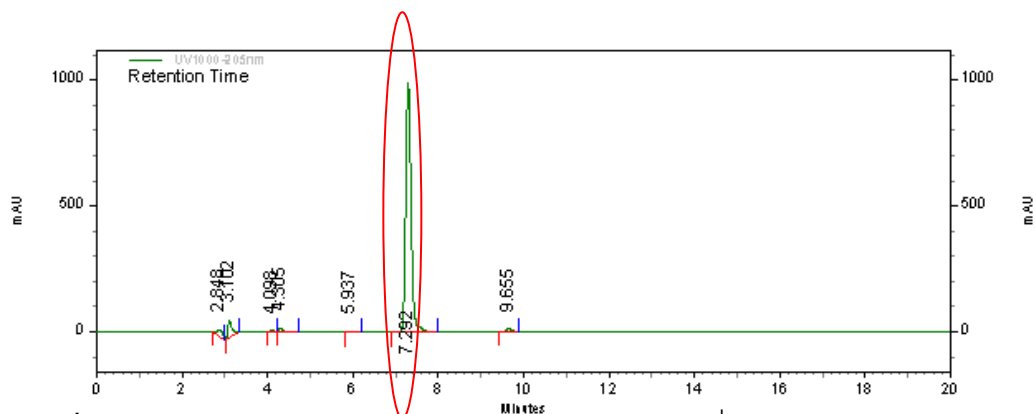
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของ linoleic acid

สารมาตรฐาน linoleic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 14.10 นำพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน linoleic acid ที่นำไปวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 14.11 แล้วนำสมการของกราฟมาตรฐานที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ รูปที่ 14.12 แสดงโครมาโทแกรมของนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกาวเครือ fraction 2

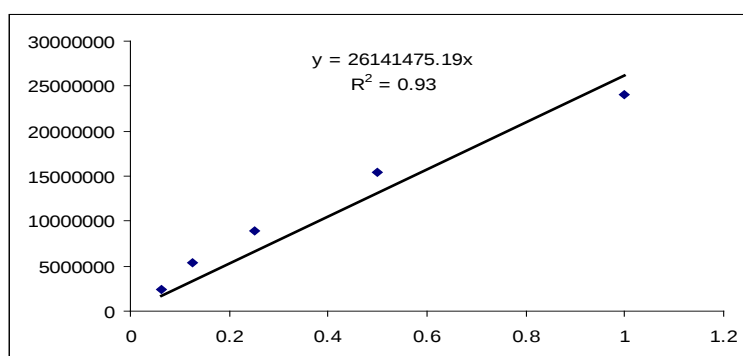
Sample ID: 0.25 mg lino

Vial: B03

Injection Volume: 20



รูปที่ 14.10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน linoleic acid ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml

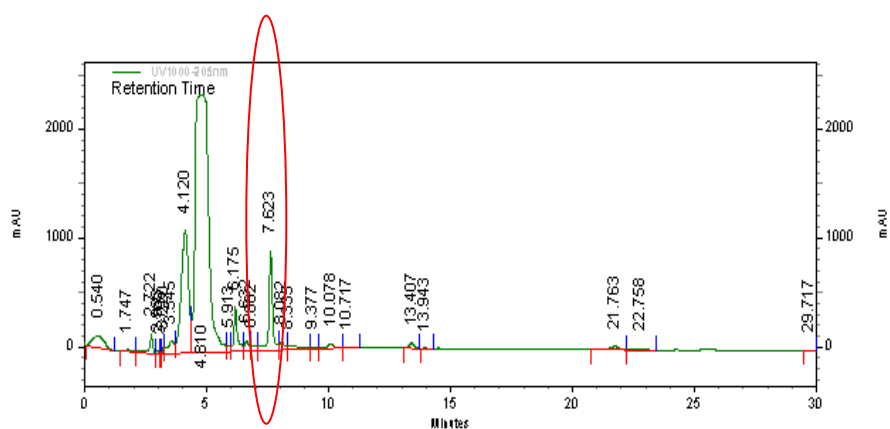


รูปที่ 14.11 calibration curve ของสารมาตรฐาน linoleic acid

Sample ID: niosome 2%

Vial: A03

Injection Volume: 20



รูปที่ 14.12 โครมาโทแกรมของนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ที่เวลาเริ่มต้น

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในตัวอย่าง

จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 14.12 ที่ retention time = 7.623 มี peak area = 2968972

แทนค่าลงในสมการจาก calibration curve: $y = 26141475.19x$

เมื่อ $y=2968972$ จะได้ $x = 0.11 \text{ mg/ml}$

ฉีดสารละลายนีโอโซม 20 μL

ในสารละลายนีโอโซม 1000 μL จะมี linoleic acid เท่ากับ 0.11 mg

นำสารละลายนีโอโซมไปฉีด 20 μL จะมี linoleic acid เท่ากับ 0.0022 mg

เตรียมสารละลายนีโอโซม 100 mg/ml

ในตัวทำละลาย 1000 μL มีนีโอโซม 100 mg

เมื่อนำไปฉีด 20 μL มีนีโอโซม 2 mg

ดังนั้น นีโอโซม 2 mg มี linoleic acid 0.0022 mg

นีโอโซม 100 mg จะมี linoleic acid 0.11 mg

จากการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ที่เวลาเริ่มต้นพบว่าปริมาณ linoleic acid เท่ากับ 0.11% สำหรับตัวอย่างอื่นๆสามารถคำนวณได้เช่นเดียวกัน ผลการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ได้แสดงไว้ในตารางที่ 14.4

ตารางที่ 14.4 ปริมาณ linoleic acid ในนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือน

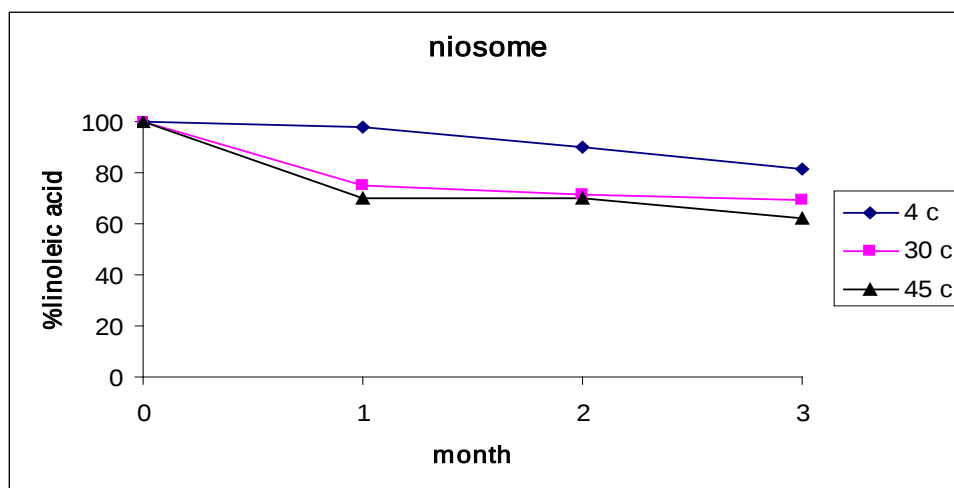
ตัวอย่าง	อุณหภูมิ	linoleic acid (mg/100 g)			
		เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน
นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก กวาวเครือ fraction 2	$4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.11	0.11	0.10	0.09
	$30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.11	0.08	0.08	0.08
	$45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.11	0.08	0.08	0.07
สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก กวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol	$4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.10	0.06	0.04	0.04
	$30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.10	0.05	0.04	0.04
	$45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	0.10	0.05	0.04	0.03

นำปริมาณ linoleic acid มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ linoleic acid ที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับปริมาณ linoleic acid เริ่มต้นในช่วงเวลาต่างๆเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือนได้แสดงไว้ใน **ตารางที่ 14.5**

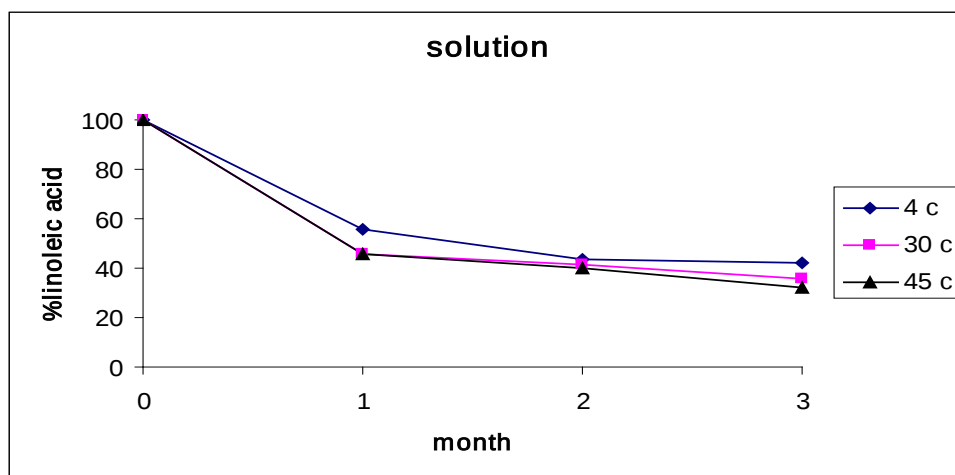
ตารางที่ 14.5 เปอร์เซ็นต์ของ linoleic acid ที่เหลืออยู่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ linoleic acid เริ่มต้นใน นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือน

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ	% linoleic acid ที่เหลืออยู่			
		เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน
นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2	$4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	97.64	90.12	81.76
	$30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	74.89	71.47	69.38
	$45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	69.75	69.69	62.04
สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol	$4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	55.87	43.91	42.50
	$30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	45.37	41.69	35.85
	$45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	100.00	45.63	39.93	32.12

จากกราฟรูปที่ 14.13-14.14 พบว่าที่เวลาผ่านไป 3 เดือนในนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่มากกว่า 60 % ในทุกอุณหภูมิ และที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนในสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50% ตั้งแต่เดือนแรกทั้ง 3 อุณหภูมิ ดังนั้นการเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซมจึงเป็นการเพิ่มความคงตัวให้กับ linoleic acid ที่มีอยู่ในสารสกัดกวาวเครือ fraction 2 ได้โดยเฉพาะการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 14.13 เปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่ในนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก กวาวเครือ fraction 2 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาเริ่มต้น 1, 2 และ 3 เดือน



รูปที่ 14.14 เปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลือในสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol เก็บที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาเริ่มต้น 1, 2 และ 3 เดือน

สรุปผลการทดลอง

เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (4 ± 2 , 30 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส) 3 เดือน พบว่านิโอโซมที่เก็บกักสกัดกั้นบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากกว่า 60% ทุกอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนสารละลายของสารสกัดกั้นบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol มีปริมาณ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50% โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 42.50%

เอกสารอ้างอิง

1. Aranya Manosroi, Warintorn Ruksiriwanich, Masahiko Abe, Hideki Sakai, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi., Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid, Journal of Supercritical Fluids, 54, 137–144, 2010

ภาคผนวกที่ 15

การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่ง
บริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในน้ำไอโซม

การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม

1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม โดยวิธี Franz diffusion cell และใช้เทคนิค follicular closing technique ปิดรูขุมขนบนผิวหนังของหนู และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน linoleic acid โดย HPLC

2. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

- Franz diffusion cell (diffusion cells and systems, Permeagear, USA)
- Centrifuge (Univertal 32 R, Hettich Zentrifugen, Germany)
- Stainless scissors (Mira, Germany)
- Forcep (Mira, Germany)
- Transfer-pipette (Brand, Wertheim, Germany)
- Vortex (Scientific Industries, New York, U.S.A.)
- Sonicate bath (Tru-sweep, Crest ultrasonic, Malaysia)
- Analytical balance (Precisa gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland)

2.2 สารเคมี

- น้ำยาทาเล็บ (Lab 2000, Samutprakarn, Thailand)
- Acetonitrile (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Linoleic acid standard (Sigma Co, St. Louis, Mo, USA)
- Acetic acid (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Distilled water

3. ผิวหนังที่นำมาทดสอบ

ผิวหนังของลูกหนูบริเวณด้านหลัง โดยใช้ลูกหนูที่มีอายุไม่เกิน 7 วัน น้ำหนักไม่เกิน 2 กิโลกรัม เมื่อตายแล้วต้องแช่เย็นเพื่อเตรียมนำมาใช้ทำแลบ (ฟาร์มเบทาโกร อ.บ้านไธสง จ.ลำพูน)

4. ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

1. นิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 (fraction 2)
2. สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 (fraction 2)

5. วิธีการทดลอง [1]

5.1 การเตรียมผิวหนังของลูกหนู

นำผิวหนังด้านหลังของลูกหนูมาเลาะเอาชั้นไขมันออกจนหมด เก็บใน Incomplete DMEM ที่ 4 °C เมื่อต้องการใช้จึงนำออกมาล้างในน้ำกลั่น โกลนจนออกจนหมด และเปิดรูขุมขนบนผิวหนังทั้งหมดโดยใช้กาวยตราข้าง หยดลงบนผิวหนังแล้วใช้แผ่นสไลด์ปิดลงบนผิวหนัง ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วจึงดึงแผ่นสไลด์ออก

5.2 การปิดรูขุมขนโดยใช้ follicular closing technique

นำสีกาเล็มมาปิดบนรูขุมขนแต่ละรู พร้อมกับนับจำนวนรูขุมขนที่ทำการบล็อกไว้ [2] โดยบล็อกจนหมดทั้งพื้นที่ที่กำหนดไว้ (ขนาดประมาณ 3x3 ซม.) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที และนับจำนวนรูขุมขนของผิวหนังอีกแผ่นหนึ่งที่มีพื้นที่เท่ากับแผ่นที่บล็อกไว้ ผิวหนังที่มีจำนวนรูขุมขนใกล้เคียงกับแผ่นแรก จะนำมาจับคู่กันเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.3 การศึกษาการนำส่งผ่านสารทางรูขุมขน

การนำส่งผ่านสารทางรูขุมขนของสารตัวอย่างโดย vertical Franz diffusion cells ซึ่งทำการศึกษาเป็นคู่ เพื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านของสารผ่านทางผิวหนังที่มีการปิดกั้นรูขุมขนและไม่ได้ปิดกั้น ผลต่างของการซึมผ่านระหว่างผิวหนังคู่นี้จึงเป็นปริมาณสารที่สามารถผ่านทางรูขุมขน โดยสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ นิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2

ผิวหนังแต่ละคู่ที่ทำการปิดกั้นรูขุมขนและนับจำนวนรูขุมขนของผิวหนังแต่ละคู่ไว้แล้ว จะถูกนำมาซึ่งบน Franz diffusion cells และทำการบล็อกไว้โดยใช้ donor โดยหันด้าน dermis ให้สัมผัสกับ PBS (pH 7.4) ที่อยู่ใน receiver จากนั้นใส่สารตัวอย่างปริมาณ 500 ul ลงไปบนผิวหนังในช่อง donor ของ Franz diffusion cells เปิด magnetic bar เพื่อให้มีการไหลเวียนของ PBS ภายใน receiver (100 rpm) และควบคุมอุณหภูมิของ receiver ไว้ที่ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จากนั้นเมื่อครบเวลา 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง จึงหยุดการทดลองของผิวหนังแต่ละคู่ ดูดสารตัวอย่างที่เหลืออยู่ด้านบนออก คลายล็อกที่ยึด donor ไว้ นำผิวหนังที่ผ่านการทดลองแล้วมาล้างในน้ำกลั่น ซับให้แห้ง strip สาร

ตัวอย่างที่เหลือนบนผิวหนังออก 1 ครั้ง โดยใช้เทป (3M Scotch Magic™) และน้ำหนักกดทับประมาณ 300 กรัม นาน 10 วินาที

5.4 การสกัดกรดไขมัน linoleic acid จากผิวหนังที่ผ่านการทดลอง

นำผิวหนังไปสกัดเอากรดไขมัน linoleic acid ที่ใช้เป็น marker ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ กวาวเครือ F2 โดยใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดย่อยหนังบริเวณที่มีการซึมผ่านของสารตัวอย่าง แล้วสกัดกรดไขมัน linoleic acid โดยใช้สารละลายที่ใช้สกัด 1 ml ซึ่งประกอบด้วย 10 % triton-X100 500 ul และ mobile phase (95% acetonitrile +0.1 % acetic acid) 500 ul โดยนำไป sonicate นาน 10 นาที นำมากรองให้ได้สารละลายใส จากนั้นจึงไปวิเคราะห์โดย HPLC

5.5 การสกัดกรดไขมัน linoleic acid จาก receiver

เมื่อสิ้นสุดการทดลองแต่ละคู่ของผิวหนัง ดูดเอาสารละลายที่อยู่ใน receiver ออกมา นำไปแช่แข็งที่ - 40°C และนำไป freeze-dry จนแห้ง จากนั้นนำมาละลายกลับด้วยสารละลายที่ใช้สกัด 1 ml ซึ่งประกอบด้วย 10 % triton-X100 จำนวน 500 ul และ mobile phase (95% acetonitrile +0.1 % acetic acid) จำนวน 500 ul และ vortex ให้ละลายจนหมด จากนั้นนำมากรองให้ได้สารละลายใส แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดย HPLC

5.6 การวิเคราะห์กรดไขมัน linoleic acid โดย HPLC

HPLC	:	LC 1200 UV/VIS Detector, LC 1100 HPLC Pump
Column	:	Luna C18 10 micron 250×4.0 mm “Phenomenex U.S.A”
Mobile phase	:	acetonitrile/distilled water ผสม 0.1% acetic acid 95:5+0.1% acetic acid
Flow rate	:	1 ml/min
Detection	:	205 nm

การคำนวณหาปริมาณสะสม (cumulative amounts) ค่าฟลักซ์ (flux) และปริมาณสารที่ซึมผ่าน 1 รูขุมขน (transfollicular penetration per one hair follicle) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Cumulative amounts (ng/cm}^2\text{)} = \frac{(FA_{\text{open}} - FA_{\text{block}})}{2.46}$$

$$\text{Fluxes (ng/cm}^2\text{/hour)} = \frac{(FA_{\text{open}} - FA_{\text{block}})}{2.46 \times 6}$$

$$\text{Transfollicular penetration per one HF (ng/one HF)} = \frac{(\text{FA}_{\text{open}} - \text{FA}_{\text{block}})}{\text{numbers of HF}}$$

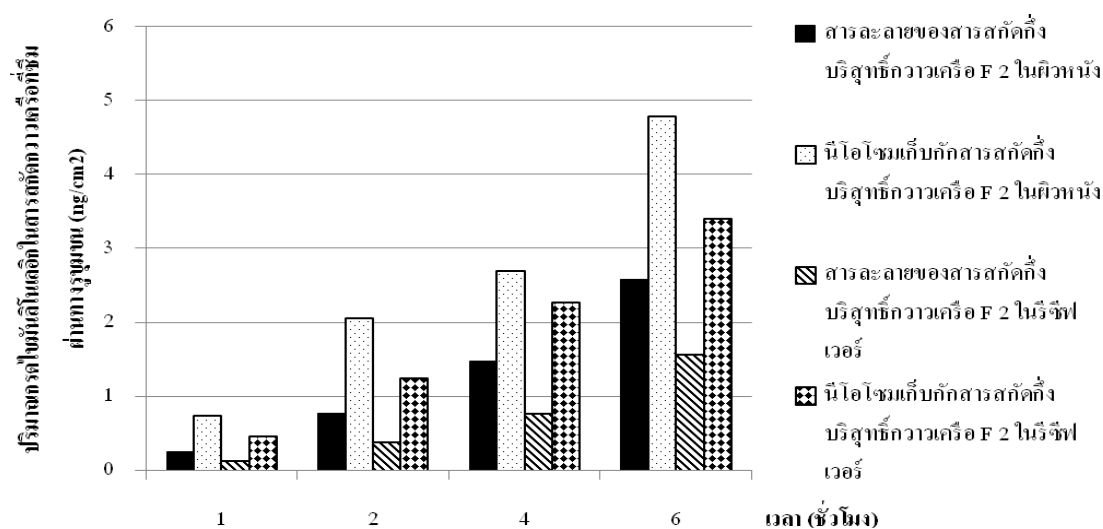
ซึ่ง FA_{open} คือปริมาณของกรดไขมัน linoleic acid ในผิวหนังที่ไม่มีการปิดกั้นรูขุมขน FA_{block} คือปริมาณของกรดไขมัน linoleic acid ในผิวหนังที่มีการปิดกั้นรูขุมขนและ HF คือ รูขุมขน (hair follicle)

6. ผลการทดลอง

จากการทดสอบการซึมผ่านของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กาวเครือ F2 ที่อยู่ในนีโอโซม และสารละลาย พบว่า นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กาวเครือ F2 สามารถนำส่งสารสำคัญกรดไขมัน linoleic acid ได้ดีกว่า ในรูปแบบสารละลาย ดังแสดงในตารางที่ 15.1 และรูปที่ 15.1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารได้ เนื่องจากมีขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมในการผ่านทางรูขุมขน โดยพบว่า อนุภาคที่มีขนาดประมาณ 200 nm ซึ่งใกล้เคียงกับอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กาวเครือ F2 สามารถซึมผ่านทางรูขุมขนได้ดีเท่ากับ อนุภาคขนาด 20 nm [3] และนีโอโซมยังมีองค์ประกอบที่มีสมบัติใกล้เคียงกับผิวหนังโดยมีความเป็น non polar มากกว่ากรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการซึมผ่านมากขึ้นนอกจากนี้นีโอโซมยังช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กาวเครือ F2 ด้วย เนื่องจากมีการเก็บกักสารสำคัญไว้ภายในอนุภาค ทำให้ลดการทำลายจากแสงและความร้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการซึมผ่านทางรูขุมขนของนีโอโซมที่อยู่ในผิวหนัง พบว่ามีปริมาณสะสม (4.785 ng/cm^2) ค่าฟลักซ์ ($0.797 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$) และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขน 1 รูขุมขน ($0.074 \text{ ng/1 hair follicle}$) มากกว่าในรูปแบบสารละลาย (2.577 ng/cm^2 , $0.429 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$ และ $0.040 \text{ ng/1 hair follicle}$) โดยเฉลี่ยเป็น 1.86 เท่า ในทำนองเดียวกันกับในรีซีฟเวอร์ที่การซึมผ่านทางรูขุมขนของกรดไขมันที่เก็บกักในนีโอโซมดีกว่ารูปแบบสารละลาย แต่มีปริมาณสารน้อยกว่าที่อยู่ในผิวหนัง โดยมากกว่า 2.18 เท่า ดังตารางที่ 15.1 เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับเวลาที่ใช้ในการซึมผ่าน พบว่า เมื่อเวลานานขึ้น สารตัวอย่างสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น ดังรูปที่ 15.1

ตารางที่ 15.1 การซึมผ่านของสารผ่านทางรูขุมขนของ linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ กวาวเครือ F2 ที่อยู่ในนีโอโซม และสารละลาย

สารตัวอย่าง	ผิวหนัง			รีซีฟเวอร์		
	ปริมาณสะสม (ng/cm ²)	ค่าฟลักซ์ (ng/cm ² /h)	ปริมาณการ ซึมผ่านใน 1 รู ขุมขน (ng/number of HF)	ปริมาณ สะสม (ng/cm ²)	ค่าฟลักซ์ (ng/cm ² /h)	ปริมาณการ ซึมผ่านใน 1 รูขุมขน (ng/number of HF)
สารละลายของ สารสกัดกึ่ง บริสุทธิ์ กวาวเครือ F 2	2.577	0.429	0.040	1.560	0.260	0.024
นีโอโซมเก็บกัก สารสกัดกึ่ง บริสุทธิ์ กวาวเครือ F 2	4.785	0.797	0.074	3.408	0.568	0.052



รูปที่ 15.1 ปริมาณสะสมของกรดไขมัน linoleic acid ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนของหนังหมู ที่เวลา 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ในผิวหนังและรีซีฟเวอร์

7. สรุปผลการทดลอง

นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญ (linoleic acid) ที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 ได้ทั้งในผิวหนังและรีซีฟเวอร์ โดยมีปริมาณสะสม ค่าฟลักซ์ และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขน มากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่า ตามลำดับ

8. เอกสารอ้างอิง

- [1] A. Manosroi, W. Ruksiriwanich, M. Abe, W. Manosroi, J. Manosroi, Transfollicular enhancement of gel containing cationic niosomes loaded with unsaturated fatty acids in rice (*Oryza sativa*) bran semi-purified fraction Eur. J. Pharm. Biopharm., Submitted (2011).
- [2] N. Otberg, A. Patzelt, U. Rasulev, T. Hagemeister, M. Linscheid, R. Sinkgraven, W. Sterry, L. J, The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine, Br. J. Clin. Pharmacol., 65 (2008) 488-492.
- [3] R. Alvarez-Roman, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, Journal of Controlled Release, 99 (2004) 53-62.

ภาคผนวกที่ 16

หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์ของโครงการวิจัย
โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจริยภาพรรณ
การใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หมายเลขโครงการ: 38/2552

ชื่อโครงการวิจัย: การพัฒนาการเก็บกักสารสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษา
ผมหงอกก่อนวัย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ ธีรธัญญา มโนสร้อย

สังกัด: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
ได้พิจารณาโครงการวิจัย แล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางการปฏิบัติเกี่ยวกับการใช้สัตว์ทดลองและ
จรรยาบรรณการใช้สัตว์สภาวะวิจัยแห่งชาติ

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมานี้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่

29 กรกฎาคม 2553 และให้หมดอายุในวันที่ 30 ธันวาคม 2554

(รองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร มรกต)

ประธานคณะกรรมการ

จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

วันที่ 29 ก.ค. 53

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต)

คณบดี

วันที่ 4 ก.ค. 53

ชื่อคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง (20 ตุลาคม 2552 – 19 ตุลาคม 2554)

ชื่อ	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	อยู่ในที่ประชุมพิจารณา
1. รศ.ดร. นิมิตร มรกต, ประธานกรรมการ	Ph.D.	ปรสศวิทยา	อยู่
2. รศ.ดร.พญ.นิรัช เลิศประเสริฐสุข	M.D., Ph.D.	พยาธิวิทยา	อยู่
3. ผศ.ดร.ธวัช เต้โสสถกุล	Ph.D.	เภสัชวิทยา	ไม่อยู่
4. ผศ.ดร.ชัชวาลย์ อภิชาติพิบูล	Ph.D.	จุลชีววิทยา	อยู่
5. ผศ.ดร.ชูชีพ ประพุทธิพิทยา	Ph.D.	สรีรวิทยา	อยู่
6. ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย	Ph.D.	วิทยาศาสตร์ การแพทย์	อยู่
7. ดร.ฉายสุรีย์ สุกวิไล	Ph.D.	ภูมิคุ้มกันวิทยา	อยู่
8. นางจิตราภรณ์ อุดตโม	B.Ed	ภาษาอังกฤษ	อยู่
9. สพ.ญ.ทัศนีย์ ไหลมา, เลขานุการ	D.V.M	สัตวแพทย์	อยู่
10. นางสันทจุฑา วงศ์แก้ว	B.Ag.Tech	สัตวศาสตร์	อยู่



Certificate of Approval
For Use of Animals
Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: **38/2552**
 Title of project: **The Development of Thai Traditional Medicinal
Plants Extracts in Nanoparticles for Grey Hair
Treatment**
 Principal investigator: **Professor Aranya Manosori**
 Affiliation: **Faculty of Pharmacy**

The Faculty of Medicine, Chiang Mai University, supported by the results of Animal Ethics committee review, approved that the use of animals in the project conforms with international and national guidelines for ethical conduct on the care and use of animals,

Hereby approves the research proposal to be conducted under its proposed scheme. The approval is effective from **29 July 2010** and expired on **30 December 2010**

Nimit Morakote
.....

Nimit Morakote, Ph.D.

Associate Professor

Chair

Date... 2 Aug 2010

N. Nantachit
.....

Niwes Nantachit, M.D.

Associate Professor

Dean

Date... 4 Aug 2010

Animal Ethics Committees (AECs) (20 Oct. 2009 – 19 Oct 2011)

Name/Surname	Qualification	Field of Study	Present/Absent
Assoc. Professor Dr. Nimit Morakote, Chair	Ph.D.	Parasitology	Present
Assoc. Professor Dr. Nirush Lertprasertsuke	M.D.,Ph.D.	Pathology	Present
Assist. Professor Dr. Chatchawann Apichartpiyakul	Ph.D.	Microbiology	Present
Assist. Professor Dr. Chucheeep Praputhpitaya	Ph.D.	Physiology	Present
Assist. Professor Dr. Tawat Taesotikul	Ph.D.	Pharmacology	Absent
Assist. Professor Dr. Rawiwan Wongpoomchai	Ph.D.	Medical Science	Present
Ms. Chaisuree Suphavitai	Ph.D.	Tropical Health	Present
Ms. Chitraporn Uttamo	B.Ed	English	Present
Ms. Tassanee Secretary Laima,	D.V.M	Veterinary Medicine	Present
Ms. Sanhajuta Wongkaew	B.Ag.Tech	Animal Science	Present

ภาคผนวกที่ 17

การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก
 กวาวเครือ fraction 2 และนีโอไฮมที่เก็บกักสารสกัดกึ่ง
 บริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และ
 นิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

การคำนวณต้นทุนมีรายละเอียด ดังตารางที่ 17.1 และ 17.2 ดังนี้

ตารางที่ 17.1 การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ
 1 กิโลกรัม

วัตถุดิบ / ตัวทำละลาย	ปริมาณที่ใช้	ราคา / กิโลกรัม	ต้นทุน (บาท)
กวาวเครือขาว	250 กิโลกรัม	150	37,500
ตัวทำละลายที่ใช้	Ethyl acetate 100 L	80/L	8,000
	Hexane 100 L	64/L	6,400
	MeOH 100 L	19/L	1,900
ค่าไฟฟ้า + แรงงาน			5,000
ต้นทุนการผลิตสารสกัด 1 กิโลกรัม			58,800

ตารางที่ 17.2 การคำนวณต้นทุนการผลิตสารแขวนตะกอนนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์
 กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม

ตัวอย่าง / สาร	ปริมาณที่ใช้	ราคา / กิโลกรัม	ต้นทุน (บาท)
สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์	20 g	58,800	1,176
Tween 61	13.12 g	1,000	13.12
Cholesterol	3.867 g	6,600	25.5
Chloroform	500 ml	800 / 2.5 L	160
ค่าไฟฟ้า + แรงงาน			1,000
รวม			2,374.62

* ต้นทุนการผลิตสารแขวนตะกอนนิโอโซม 1 กิโลกรัม

สรุปผลการคำนวณ :

- ราคาาคาดคะเนของการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 58,800 บาท
- ราคาาคาดคะเนของการผลิตสารแขวนตะกอนนิโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 2,374.62 บาท

หมายเหตุ : % yield ของสารสกัดหยาบจากผงกวาวเครือเท่ากับ 2% ในขณะที่สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ fraction 2 จากสารสกัดหยาบเท่ากับ 20 % ดังนั้นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ fraction 2 มาจากผงกวาวเครือเท่ากับ 0.4 % เพราะฉะนั้นสารสกัด fraction 2 ปริมาณ 20 กรัม มาจากสารสกัดกวาวเครือขาว 100 กรัม ถ้าต้องการสารสกัด fraction 2 ปริมาณ 1,000 กรัม ต้องใช้สารสกัดกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ประมาณ 5 กิโลกรัม กวาวเครือขาวปริมาณ 1,000 กรัม สกัดด้วย ethyl acetate ได้สารสกัดประมาณ 20 กรัม ถ้าต้องการสารสกัดกวาวเครือปริมาณ 5 กิโลกรัมต้องใช้กวาวเครือขาว 250 กิโลกรัม สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ เช่น ethyl acetate, methanol และ hexane สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจาก โครงการไปใช้ประโยชน์

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. ได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการประจำปีการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือกแห่งชาติ ครั้งที่ 7 งานมหกรรมสมุนไพรแห่งชาติครั้งที่ 7 ระหว่างวันที่ 1-3 กันยายน 2553 ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี จ. นนทบุรี ในหัวข้อเรื่อง “ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่เก็บกักในน้ำไอโซม”
2. ได้นำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ Natpro 4 ที่จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 28-30 พฤศจิกายน 2555 เรื่อง Effects of crude extracts, fractions and fractions loaded in niosomes on melanogenesis in B16F10 melanoma cells
3. ได้นำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ Natpro 4 ที่จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 28-30 พฤศจิกายน 2555 เรื่อง Inhibition of 5- α reductase and MMP-2 activity of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatav) extracts prepared by scCO₂ fluid

ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีน ของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่เก็บกักในนีโอโซม

อัญญาณันท์^๑, ภัททิยา^๒, ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริ^๓, ลักษณณเจษฎ์^๔, วรดิษฐ์วิจิตรประภา^๕, วรณามันต์^๖, จิรพัฒน์^๗

^๑ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

^๒คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

^๓คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

^๔คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หลักการและเหตุผล ผมหงอกเป็นลักษณะทางกายภาพที่มีเส้นผมสีขาวยาวบนหนังศีรษะ เกิดจากเมลานินในเซลล์รูขุมขนที่หยุดการผลิตเมลานิน ในปัจจุบัน ยังไม่มียาที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษา มีเพียงการรักษาด้วยผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทน้ำยาย้อมผมเพื่อปิดผมขาว ซึ่งก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ การใช้สมุนไพรโดยเฉพาะตามตำรายาสมุนไพรเป็นทางเลือกที่มีความปลอดภัยมากกว่า อย่างไรก็ตาม การใช้สมุนไพรต่างๆ ในการรักษาอาการผมหงอกยังไม่มีข้อมูลที่สามารถยืนยันประสิทธิผลในการกระตุ้นการสร้างเมลานิน

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่ไม่เก็บกักและเก็บกักในนีโอโซม

วิธีดำเนินการ นำสารสกัดกวาวเครือ หม่อนย่านาง อัญชัน และบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ เอธิลอะซิเตท เมทานอล และเฮกเซน ในความเข้มข้น ๒๕๐ มก./มล. มาทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนโดยใช้เซลล์มะเร็งหนู B16F10 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน theophylline ในขนาด ๒๕๐ มก./มล. แล้วนำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินมาเก็บกักในนีโอโซมที่ประกอบด้วย Tween 61/cholesterol ในอัตราส่วนโมลาร์ ๑ ต่อ ๑ และประเมินลักษณะทางกายภาพ ตลอดจนการกระตุ้นการสร้างเมลานินและปริมาณโปรตีนของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพร โดยทำการทดสอบ ๓ ซ้ำ

ผลการศึกษา สารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ได้สูง คือ สารสกัดบัวบกด้วยเอธิลอะซิเตท (ร้อยละ ๕๑.๐๙, ๑๑.๗๖) สารสกัดย่านางด้วยน้ำ (ร้อยละ ๔๐.๓๕, ๓๐.๖๔) สารสกัดย่านางด้วยเอธิลอะซิเตท (ร้อยละ ๓๖.๕๐, ๒๒.๙๗) สารสกัดกวาวเครือด้วยเอธิลอะซิเตท (ร้อยละ ๑๔.๑๗, ๗.๔๗) และสารสกัดหม่อนด้วยเอธิลอะซิเตท (ร้อยละ ๑๑.๑๓, ๙.๔๒) ซึ่งสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน theophylline (ร้อยละ ๕๕.๐๕, -๖.๖๒) เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาเก็บกักในนีโอโซมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา ๓ เดือน พบว่านีโอโซมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส มีความคงตัวทางกายภาพดีที่สุด การประเมินฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีน พบว่านีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานิน เนื่องจากเซลล์มะเร็งหนู B16F10 อาจไม่สามารถอยู่เหนียวในนีโอโซม จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถนำสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมเข้าเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมยังอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเมลานินได้ อย่างไรก็ตาม หากนำนีโอโซมไปทดสอบใน *in vivo* ซึ่งมีเนื้อเยื่อในร่างกายที่สามารถอยู่เหนียวในนีโอโซม อาจสามารถปลดปล่อยสารสกัดออกมา เพื่อออกฤทธิ์ตามต้องการได้

ข้อสรุป สารสกัดสมุนไพรไทยสามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนูได้เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ สารสกัดบัวบกด้วยเอธิลอะซิเตท สารสกัดย่านางด้วยเอธิลอะซิเตท สารสกัดย่านางด้วยน้ำ สารสกัดกวาวเครือด้วยเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหม่อนด้วยเอธิลอะซิเตท ในขณะที่เมื่อนำสารสกัดเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมไม่พบการกระตุ้นการสร้างเมลานิน ซึ่งสารสกัดอาจมีความคงตัวสูงในนีโอโซม แต่อาจถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซมได้ในการศึกษา *in vivo* ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

Effects of crude extracts, fractions and fractions loaded in niosomes on melanogenesis in B16F10 melanoma cells

Aranya Manosroi^{1,2}, Puxvadee Chaikul¹, Pisit Chainonthee², Laksana Charoenchai³, Chutinun Prasitpuripreecha³, Wandee Rungseevijitprapa³, Worapaka Manosroi⁴ and Jiradej Manosroi^{1,2}

¹Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

⁴Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail addresses: a.manosroi@gmail.com

Introduction and Objective

Melanogenesis, the pigment formation process in melanocytes, involves the enzymatic oxidation of tyrosine to melanin. The decreased melanogenesis leads to the hypopigmentation state occurring both in the skin and hair. The objective of this study was to perform the *in vitro* melanogenesis effects of plant crude extracts, the semi-purified fractions of the plant crude extracts and the semi-purified fraction of the plant crude extract loaded in niosomes in B16F10 melanoma cells.

Methods

The 20 crude extracts prepared by different extraction processes of *Pueraria mirifica* (White Kwao Krua), *Clitoria ternatea* (Blue Pea), *Centella asiatica* (Asiatic Pennywort), *Morus alba* (Mon) and *Tiliacora triandra* (Ya Nang) were evaluated for *in vitro* melanogenesis stimulation. The five top crude extracts were selected for the semi-purified plant fraction preparation. The semi-purified plant fractions were then investigated for melanogenesis induction activity in comparing to their crude extracts. The fraction with the highest melanogenesis induction was selected to load in niosomes composing of Tween61 and cholesterol. The semi-purified fraction loaded in niosomes and the blank niosomes were evaluated for melanogenesis effects in comparing to theophylline (a positive reference).

Results

The top five crude extracts which gave high melanogenesis stimulation were the aqueous and ethyl acetate extracts of Asiatic Pennywort, the ethyl acetate extract of Ya Nang, the ethyl acetate extract of White Kwao Krua and the ethyl acetate extract of Mon. The crude extract and its semi-purified fractions, especially the hexane fraction, of White Kwao Krua showed the highest melanin induction and tyrosinase activity of 1.46 and 2.06 folds of the control, respectively. Also, the hexane fraction of White Kwao Krua extract loaded in niosomes demonstrated higher melanin induction than the free fraction and crude extract, but lower than the blank niosomes.

Conclusion

The crude extract and semi-purified fractions of White Kwao Krua demonstrated the high *in vitro* melanogenesis induction activity. This may be from the biological active compounds, such as saturated fatty acids and the phytoestrogenic compounds, in White Kwao Krua. The lower melanin induction of White Kwao Krua fraction loaded in niosomes may be from the tightly entrapped of the bioactive compounds in the niosomal vesicles that cannot be released to penetrate into the cells.

Keywords: Melanogenesis, White Kwao Krua, Niosomes, Plant extracts, Hypopigmentation

Inhibition of 5- α reductase and MMP-2 activity of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatab) extracts prepared by scCO₂ fluid

Aranya Manosroi^{1,2}, Korawinwich Boonpisuttinant¹, Worapaka Manosroi³, and Jiradej Manosroi^{1,2}

¹Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

³Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail addresses: pmpti005@chiangmai.ac.th, wataru_dream@hotmail.com
peng_tle@hotmail.com, pmpti006@chiangmai.ac.th

Introduction and Objective

The main cause of hair loss is from the high expression of testosterone 5- α reductase type 1 (SRD5A1) gene predominated in human scalp skin, especially in the dermal papilla as well as the imbalance of the MMP-2 level which causes inflammatory response around the lower portion of the hair follicles and scalps. The objective of this study was to compare the 5- α reductase type 1 mRNA expression and MMP-2 activities of the White Kwao Krua (WKK) extract prepared by ethyl acetate maceration (WKK1) and the supercritical carbon dioxide fluid (scCO₂) extraction.

Methods

The bioactive contents (daidzein, genistein, puerarin, flavone and linoleic acid) of the extracts from the tuberous roots of WKK prepared by ethyl acetate maceration (WKK1) and the supercritical carbon dioxide fluid (scCO₂) with the fluid carbon dioxide at the flow rate of 20 g/min and ethanol as a co-solvent at 1% w/v (WKK2), 5% w/v (WKK3) and 10% w/v (WKK4) were investigated by HPLC. The free radical scavenging activity of the WKK extracts were determined by the DPPH assay. The inhibition of SRD5A1 mRNA expression on DU-145 cell line and MMP-2 on human skin fibroblasts were also investigated.

Results

The WKK1 and WKK3 extracts gave the highest extraction yields (1.08 and 0.24%), the bioactive compound contents (daidzein, genistein, puerarin, flavone and linoleic acid of 0.36, 0.17, 0.00, 0.61 and 0.45%; 0.06, 0.02, 2.04, 0.02 and 13.20%) and free radical scavenging activity (SC₅₀ of 2.32 $\pm$ 0.35 and 3.30 $\pm$ 0.60 mg/ml). The WKK3 (0.5 mg/ml) which gave no cytotoxicity (90% cell viability) on human skin fibroblasts exhibited the highest testosterone 5 α -reductase type 1 (SRD5A1) mRNA expression, and MMP-2 inhibitions at 24 hr ($p < 0.05$) of 23.31 and 48.69%, respectively. The linoleic acid together isoflavone and flavone contents in the WKK extracts appeared to be responsible for these inhibition effects.

Conclusion

This study has demonstrated that the WKK extract prepared by scCO₂ with 5% ethanol as a co-solvent (WKK3) has the potential to be developed as a cosmetic product for anti-hair loss treatment.

Keywords: Testosterone 5- α reductase type 1, Matrix metalloproteinase-2, *Pueraria mirifica*, White Kwao Krua, Supercritical carbon dioxide, Anti-hair loss

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้
กิจกรรมที่ดำเนินการมาและ
ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้กิจกรรมที่ดำเนินการมาและ
ผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	1-6	7-12	1-6	7-12	1-6	7-12
1. การคัดเลือกสมุนไพร	←→					
2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	←→	←→				
3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร	←→	←→				
4. การพัฒนาอนุภาคนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโน		←→	←→	←→		
5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนที่พัฒนาได้		←→	←→	←→	←→	←→
6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ		←→	←→	←→	←→	←→
7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน			←→	←→	←→	←→
8. การคำนวณต้นทุนการผลิต						←→
9. การนำเสนอผลงาน		←→		←→		←→

หมายเหตุ ←→ แผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้
 ← - - → งานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง

ตารางแผนงานเปรียบเทียบกับ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

กิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ	กิจกรรมที่ได้ทำจริง
1. การคัดเลือกสมุนไพร	ได้คัดเลือกสมุนไพร 5 ตัว คือ กวาวเครือขาว หม่อน ยานาง อัญชันและบัวบก แล้วนำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบแล้วจัดทำ specification และ phytochemistry ของสารสกัดหยาบ (ภาคผนวกที่ 1,2)
2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	ได้นำสมุนไพรที่คัดเลือกมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์ (ภาคผนวกที่ 10)
3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร	ได้ทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ antioxidant, ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีและฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส (ภาคผนวกที่ 3, 4, 8, 11, 12)
4. การพัฒนาอนุภาคนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโน	ได้นำสารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกมาเก็บกักในอนุภาคนาโนแล้วศึกษาฤทธิ์และคุณสมบัติต่างๆ รวมทั้งการจัดทำ specification ของตำรับที่พัฒนาได้ (ภาคผนวกที่ 5, 6, 7, 8, 9, 13)
5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนที่พัฒนาได้	ได้ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของอนุภาคนาโน (นีโอโซม) ที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของกวาวเครือ เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน (ภาคผนวกที่ 13)
6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ	ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกทั้งที่ไม่ได้เก็บกักและเก็บกักในนีโอโซม โดยได้ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง B ₁₆ F ₁₀ (ภาคผนวกที่ 4,9,12)
7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน	ได้ศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือขาวที่เก็บกักในนีโอโซมบนผิวหนังของหนูหนูโดยใช้ Franz diffusion cells (ภาคผนวกที่ 15) และได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาคผนวกที่ 16)
8. การคำนวณต้นทุนการผลิต	ได้คำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาวที่ไม่ได้เก็บกักและเก็บกัก 2% ในนีโอโซมโดยมีราคาต่อกิโลกรัมเท่ากับประมาณ 60,000 และ 2,400 บาทตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 17)
9. การนำเสนอผลงาน	ได้นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติทั้งในกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานโครงการไปใช้ประโยชน์

ตารางแผนงานเปรียบเทียบกับ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

output		กรณีที่ล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1. การคัดเลือกสมุนไพร	100 %	-
2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	100 %	-
3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร	100 %	-
4. การพัฒนาอนุภาคนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโน	100 %	-
5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนที่พัฒนาได้	100 %	-
6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ	100 %	-
7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน	100 %	-
8. การคำนวณต้นทุนการผลิต	100 %	-
9. การนำเสนอผลงาน	100 %	-

รายงานการเงิน

สรุปค่าใช้จ่ายโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ “การพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโนเพื่อใช้รักษาผมหงอก” (Research and Development of Extracts from Thai Traditional Medicinal Plants in Nanoparticles for White Hair Treatment)

1. ปีงบประมาณ 2552

1.1. งบประมาณที่ได้รับ 320,500 บาท

1.2. การใช้เงิน

หมวด	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
- ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย	ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 10,000 บาท เพื่อ : - เตรียมสารสกัด - ศึกษาสมบัติและฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัด - จัดทำรายงาน - วิเคราะห์/ประเมินผล - เตรียมผลงานวิจัยเพื่อนำเสนอผลงาน	240,000
- ค่าวัสดุ	ค่าสมุนไพรต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย (ใบแทนใบเสร็จ)	20,500
- ค่าใช้สอย	ค่าจ้างเหมาเตรียม ล้างและอบสมุนไพรและ ล้างเครื่องแก้ว 1 คน เดือนละ 5,000 บาท	60,000
	รวมปีที่ 1	320,500

2. ปีงบประมาณ 2553

2.1 งบประมาณที่ได้รับ 347,200 บาท

2.2 การใช้เงิน

หมวด	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
- ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย	ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 12,000 บาท เพื่อ : - พัฒนาอนุภาคขนาดนาโน - ศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพของอนุภาค ขนาด นาโน - ศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำในเซลล์เพาะเลี้ยงใน หลอดทดลอง - ศึกษาการดูดซึมผ่านหนังหมู - เตรียมสารสกัดสมุนไพร - เขียนรายงาน/ วิเคราะห์/ ประเมินผล - เตรียมผลงานวิจัย/ นำเสนอผลงานวิจัย	288,000
- ค่าวัสดุ	สารเคมีต่างๆ เช่น Tween 61, Cholesterol, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI, อาหารหมู, ลูกหมู, เครื่องแก้วต่างๆ (ไบแทนไบเสิร์จ)	29,200
- ค่าใช้สอย	ค่าจ้างเหมาเตรียมหนังหมู /ล้างเครื่องมือ เครื่องแก้วต่างๆ 1 คน 6 เดือนๆ ละ 5,000 บาท	30,000
	รวมปีที่ 2	347,200

3. ปีงบประมาณ 2554

3.1 งบประมาณที่ได้รับ 370,800 บาท

3.2 การใช้เงิน

หมวด	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
- ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย	ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 12,000 บาท เพื่อ : - พัฒนาอนุภาคขนาดนาโน - ศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพของอนุภาค ขนาดนาโน - ศึกษาฤทธิ์ช่วยให้อาการในเซลล์เพาะเลี้ยงใน หลอดทดลอง - ศึกษาการดูดซึมผ่านผนัง - เตรียมสารสกัดสมุนไพร - การคำนวณต้นทุนการผลิต - เขียนรายงาน/ วิเคราะห์/ ประเมินผล - เตรียมผลงานวิจัย/ นำเสนอผลงานวิจัย	288,000
- ค่าวัสดุ	สารเคมีต่างๆ เช่น Tween 61, Cholesterol, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI, อาหารหมู, ลูกหมู, เครื่องแก้วต่างๆ (ไบแทนไบสรีจ)	22,800
- ค่าใช้สอย	ค่าจ้างเหมา 1 คน เพื่อเตรียมสมุนไพร/ อบ/ ล้างเครื่องแก้ว/ เตรียมผนังหมู ฯลฯ เดือนละ 5,000 บาท	60,000
	รวมปีที่ 3	370,800

ลงชื่อ _____

(ศาสตราจารย์ ดร.ภญ. อรุณญา มโนสร้อย)

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3