บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

สารเคมี

1. 2,2-Bipyridine (Sigma chemical Co., USA)
2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma chemical Co., Germany)
3. 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, Fluka chemical Co., Switzerland)
4. Absolute ethanol (Merck, Germany)
5. Alpha tocopherol (Fluka chemical Co., Switzerland)
6. Butanol (Labscan LTD, Ireland)
7. Curcuminoid standard (Fluka chemical Co., Switzerland)
8. Ferric chloride ($FeCl_3$, Merck, Germany)
9. Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$, Merck, Germany)
10. Ferrous sulphate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma chemical Co., Germany)
11. Glacial acetic acid (Labscan LTD, Ireland)
12. Hexane (Labscan LTD, Ireland)
13. Hydrochloric acid (HCl, Labscan LTD, Ireland)
14. Iodine (Sigma chemical Co., USA)
15. Methanol (Labscan LTD, Ireland)
16. Potssium hydroxide (Labscan LTD, Ireland)
17. Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$, Merck, Germany)
18. Tetrahydrofuran (Merck, Germany)
19. Toluene (Labscan LTD, Ireland)

เครื่องมือ

1. ตู้อบ (Memmert, Germany)
2. ตู้เย็น (Toshiba, Japan)
3. เครื่องหีบชนิดอัดเกลียว (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

4. เครื่องหีบชนิดอัดด้วยแรงไฮโดรลิก (Toyo press®, Japan)
5. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield®, model R/S Rheometer, Scientific promotion Co., Ltd., England)
6. เครื่องปั่นชนิดใบพัด (Heidolph® model RZR-200, Germany)
7. Abbe Refractrometer (Atago® 3T, Japan)
8. Centrifuge (Sigma® model 302K, Japan)
9. Extruder (G.B. Caleva®, model 10, England)
10. Spheronizer (G.B. Caleva®, model 120, England)
11. Microplate UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter®, DTX 800 multimode detector)
12. pH meter (Eutech®, Singapore)
13. Polytron® (PT-MR 3000, Kinematic AG, Switzerland)
14. UV spectrophotometer (Shimadzu® model uv2450, Japan)
15. Skin visiometer (Skin visiometer® SV 600, CK Electronic GmbH, Germany)
16. Corneometer (Corneometer® CM 825, CK Electronic GmbH, Germany)
17. Mexameter (Mexameter® MX18, CK Electronic GmbH, Germany)

อุปกรณ์

1. ผ้าก๊อซและเทปปิดแผล
2. Micropipet ขนาด 100, 200, 1000 ไมโครลิตร (Boeco®, Germany)
3. Microplate (Corning®, USA)
4. Pycnometer
5. Round bottom flask
6. Thermometer
7. Soxhlet apparatus
8. Volumetric flask ขนาด 5, 10, 25, 50, 100 mL

พืชสมุนไพร

1. เมล็ดเสาวรส (จากโรงงาน "น้ำเสาวรสตราครูอุไร" จ.แม่ฮ่องสอน)
2. เหง้าขมิ้นชัน (จากหมู่บ้านเชิงดอย ต.เชิงดอย อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเมล็ดเสาวรส

1. นำเมล็ดเสาวรสที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำเสาวรสมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆครั้ง จนเส้นใยที่ติดมากับเมล็ดหลุดออกจนหมด

2. นำเมล็ดที่ล้างสะอาดแล้วไปตากบนตะแกรงให้พอหมาด แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จนเมล็ดทั้งหมดแห้งสนิท

3.2.2 การสกัดน้ำมันจากเมล็ดเสาวรสโดยใช้เครื่องหีบชนิดอัดเกลียวและชนิดอัดด้วยแรงไฮโดรลิก

ชั่งน้ำหนักเมล็ดเสาวรสแห้งก่อนการหีบและน้ำหนักน้ำมันที่ได้จากการหีบแต่ละวิธีเพื่อคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (% yield)

1. สกัดโดยใช้เครื่องหีบชนิดอัดเกลียว เป็นวิธีการสกัดแยกน้ำมันที่มีความร้อนมาเกี่ยวข้อง โดยให้ความร้อนช่วง 2 - 3 นาทีแรกของการสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C หลังจากนั้นหยุดให้ความร้อน ในขณะเครื่องทำงานจะเกิดความร้อนขึ้น คอยตรวจสอบอุณหภูมิระหว่างการสกัดไม่ให้เกิน 80 °C

2. สกัดโดยใช้เครื่องหีบชนิดอัดด้วยแรงไฮโดรลิก เป็นวิธีการสกัดแยกน้ำมันโดยไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง เป็นการใช้แรงดันไฮโดรลิกบีบอัดน้ำมันที่อยู่ภายในเมล็ดออกมา ในการทดลองนี้ควบคุมแรงบีบอัดให้อยู่ที่ประมาณ 25 ตัน

จากนั้นนำน้ำมันที่สกัดได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สิ่งเจือปนหยาบตกตะกอน รินเอาน้ำมันใสที่ได้ข้างบน จากนั้นฟอกสีและกลิ่นของน้ำมัน โดยเติมถ่านกัมมันต์ในปริมาณร้อยละ 5 กำจัดผงถ่านออกโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำน้ำมันเมล็ดเสาวรสมาตั้งไว้ที่ 0°C แยกส่วนที่เป็นไขแข็งออก นำส่วนที่เป็นของเหลวมาใช้ศึกษา

3.2.3 การวิเคราะห์สมบัติเคมีและกายภาพของน้ำมัน [40,41,42]

1. การหาค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) ทดลองตามวิธีที่ระบุใน USP 31 โดยใช้เครื่อง Abbe refractometer พร้อมบันทึกอุณหภูมิขณะวัด

2. การหาค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ทดลองตามวิธีที่ระบุใน USP 31 โดยใช้ Pycnometer ขนาด 10 mL

3. การหาค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer model LVDV III

4. การหาค่า acid value ใช้วิธีที่ระบุใน USP 31 ค่าที่รายงานคือจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องการทำให้กรดอิสระที่มีอยู่ 1 กรัมของน้ำมันเป็นกลาง

5. การหาค่าสะพอนิฟิเคชัน ใช้วิธีวิเคราะห์ใน USP 31 ค่าที่รายงานคือจำนวนมิลลิกรัมของ potassium hydroxide ที่ต้องการทำให้กรดไขมันอิสระเป็นกลางและ saponify เอสเตอร์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ใน 1 กรัมของน้ำมัน

6. การหาค่าไอโอดีน ใช้วิธี Hanus method ตามวิธีที่ระบุใน USP 31 ค่าที่รายงานคือจำนวนมิลลิกรัมของ iodine ที่ถูกน้ำมันจำนวน 100 กรัม ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่กำหนดให้

7. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน โดยใช้เทคนิค Gas chromatography ด้วยเครื่อง GC-FID ที่มีรายละเอียดเครื่องมือและสภาวะดังต่อไปนี้

GC	GC 2010 (SHIMADZU, Japan)
Injector	AOC 20i auto sampler (SHIMADZU, Japan)
	Split mode (1:100)
	Injection volume = 1 microlitre (split mode 1 : 100)
Column	Capillary column, Fused silica DB-23 (30m, 0.25 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Fisons, Folsom, CA)
	Temperature Injector = 250 °C
	Detector= 300 °C
Gas	Carrier gas (He) = 138.0 kpa ,Total flow = 49.2 mL/min
	Make up gas (N_2) = 80 kpa ,Make up gas flow = 30.0 mL/min
FID Detector	H_2 flow = 47.0 mL/min, air flow = 400 mL/min

3.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเมล็ดเสาวรส

1. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี โดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีดังนี้ [43,44]

เติมโทลูอีน 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วปิเปตน้ำมันที่ต้องการวิเคราะห์มา 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้นเติมสารละลาย 2,2′-bipyridine (0.07%) 3.5 mL และสารละลาย $FeCl_3$ (0.2%) 0.5 mL ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วยเอทานอล 95% หลังจากครบ 1 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ทำเช่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายวิตามินอีมาตรฐานเพื่อหาปริมาณวิตามินอีในน้ำมัน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีดังนี้ [45]

ชั่งน้ำมันเมล็ดเสาวรสมาประมาณ 3-5 g ใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติมเฮกเซนจำนวนเล็กน้อยเพื่อละลายน้ำมัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL ด้วยเฮกเซน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 446 nm แล้วคำนวณหา Total carotenoids จากสูตร

$$Total\ carotenoids = \frac{383 \times Absorbance \times Volume(ml)}{100 \times weight(g)} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots 1$$

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันจากเมล็ดเสาวรสที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้เลือกทำการทดลองสองวิธีที่มีกลไกต่างกันเพื่อยืนยันผลการทดลอง

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH [23,24,25] เป็นการวัดความสามารถในการขจัด DPPH radical ในการทดลองนี้มีการดัดแปลงวิธีการดังต่อไปนี้

เติมสารละลายน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ละลายด้วยบิวทานอลปริมาณ 150 µL ในไมโครเพลต

↓

เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 500 µM ปริมาณ 50 µL

ผสมให้เข้ากันและเริ่มจับเวลาทันที

↓

ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, A)

ที่ความยาวคลื่น 540 nm

↓

นำค่าที่ได้ คำนวณ % inhibition

↓

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition

และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

↓

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50 (IC_5)

การคำนวณ % inhibition

$$\% \ inhibition = \frac{\left[\left(A\ positive\ control - A\ negative\ control\right)\left(A\ sample - A\ blank\right)\right] \times 100}{\left[\left(A\ positive\ control - A\ negative\ control\right)\right]} \text{---2}$$

หมายเหตุ

1. Positive control ประกอบด้วยบิวทานอล 150 µL และ สารละลาย DPPH 50 µL
2. Negative control ประกอบด้วยบิวทานอล 200 µL
3. Sample ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 150 µL และสารละลาย DPPH 50 µL
4. Blank ประกอบด้วย สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 150 µL และบิวทานอล 50 mL
5. สารมาตรฐาน ได้แก่ alpha-tocopherol
6. ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP [16,26,27] เป็นการวัดค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ ในการทดลองนี้มีการดัดแปลงวิธีการดังต่อไปนี้

สร้างกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4.7H_2O$

เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 50 µL ในไมโครเพลต

↓

เติม FRAP reagent ปริมาณ 150 µL ผสมให้เข้ากันและเริ่มจับเวลาทันที

↓

นำไมโครเพลต ไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, A)
ที่ความยาวคลื่น 595 nm ทุกๆ 5 นาที จนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่

↓

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง
และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

หมายเหตุ

1. ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่นำไปสร้างกราฟคิดจาก

A standard = A standard – A blank – (A positive control- A negative control) -----3

2. Positive control ประกอบด้วย absolute ethanol + FRAP reagents
3. Negative control ประกอบด้วย absolute ethanol
4. Standard ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐาน+ FRAP reagents
5. Blank ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐาน+absolute ethanol

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันตัวอย่าง

เติมสารละลายน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ละลายในบิวทานอล ที่ความเข้มข้นเหมาะสม
ปริมาณ 50 µL ใน microplate

↓

เติม FRAP reagent ปริมาณ 150 µL ผสมให้เข้ากันและเริ่มจับเวลาทันที

↓

นำไมโครเพลต ไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, A)
ที่ความยาวคลื่น 595 nm ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 150 นาที

↓

นำผลที่ได้ไปคำนวณค่า EC1

หมายเหตุ

1. Positive control ประกอบด้วย absolute ethanol + FRAP reagent
2. Negative control ประกอบด้วย absolute ethanol
3. Standard ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่าง+ FRAP reagent
4. Blank ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่าง+absolute ethanol
5. ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

การคำนวณค่า EC1 ของสารตัวอย่าง

1. จากข้อมูลการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงได้จาก

A standard = A standard – A blank – (A positive control- A negative control) -----4

2. หาน้ำหนักของสารตัวอย่างในปริมาตร 50 µL
3. คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงต่อน้ำหนักของสารสกัด 1 mg (A/mg)
4. นำค่า A/mg ไปแทนค่า y ในสมการของกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (y=mx) แล้วจึงคำนวณหาค่า x ซึ่งหมายถึงค่า EC1

3.2.6 การหาค่า HLB (Hydrophile–Lipophile Balance value) ของน้ำมันเมล็ดเสาวรส [9,37,46]

HLB (Hydrophile – Lipophile Balance value) เป็นค่าที่แสดงความสมดุลระหว่างส่วนที่ละลายได้ในน้ำและส่วนที่ละลายได้ในน้ำมัน หากมีค่า HLB สูงแสดงถึงสมบัติละลายน้ำได้ดี หรือละลายในไขมันได้น้อย ในทางกลับกันถ้าค่า HLB ต่ำแสดงถึงสมบัติละลายน้ำได้น้อยหรือละลายในไขมันได้น้อย ค่า HLB ของน้ำมันเป็นข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการเลือกชนิดและสัดส่วนของตัวทำอิมัลชันในการพัฒนาตำรับเพื่อให้ได้อิมัลชันชนิดที่ต้องการและมีความคงตัว

การหาค่า HLB ของน้ำมันทำได้โดยเตรียมตำรับอิมัลชันที่มีน้ำมันชนิดนั้นเป็นวัฏภาคน้ำมันโดยมีตัวกระทำอิมัลชันผสมที่มีค่า HLB ต่าง ๆ กัน และสังเกตเสถียรภาพของอิมัลชัน เลือกตำรับที่เสถียรที่สุด ค่า HLB ของน้ำมันจะใกล้เคียงกับค่า HLB ของตัวกระทำอิมัลชันที่ใช้ในตำรับ ในการทดลองนี้ทำโดยเตรียมอิมัลชันของ mineral oil กับน้ำและของน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันเมล็ดเสาวรสและ mineral oil กับน้ำ ตามสูตรในตาราง 1 โดยใช้ตัวทำอิมัลชันผสมที่มีค่า HLB ต่าง ๆ ดังตาราง 2

ตาราง 1 สูตรอิมัลชันที่เตรียมเพื่อหาค่า HLB ของน้ำมัน

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (mL)	
	สูตร 1	สูตร 2
Mineral oil	10.0	5
Passion fruit oil	-	5
Purified water	10	10
Emulsifier (%w/v)	3-5	3-5

ตาราง 2 ชนิดตัวทำอิมัลชันและปริมาณที่ใช้เพื่อหาค่า HLB ของน้ำมัน

HLB	ปริมาณตัวทำอิมัลชันที่ใช้ (%w/v)					
	3% w/v		5% w/v		7% w/v	
	Span 20	Tween 20	Span 20	Tween 20	Span 20	Tween 20
10	2.34	0.66	4.14	0.864	5.79	1.21
12	1.88	1.12	2.90	2.10	4.06	2.94
14	1.41	1.59	1.67	3.33	2.33	4.67
16	0.26	2.74	0.43	4.57	0.60	6.40

ละลาย Span 20ในน้ำมันและ Tween 20ในน้ำ นำไปให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 70 °c

↓

รินวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ พร้อมคนตลอดเวลาจนเกิดอิมัลชัน

↓

นำอิมัลชันที่เตรียมได้ไปผ่านเครื่อง Polytron® ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

↓

สังเกตลักษณะและทดสอบชนิดของอิมัลชันที่เตรียมได้

↓

นำอิมัลชันไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

↓

สังเกตการแยกชั้นของอิมัลชันหลังการปั่นเหวี่ยง

อิมัลชันตำรับที่มีลักษณะดีคือ มีสีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน รวมถึงมีความเสถียรไม่แยกชั้นหลังการปั่นเหวี่ยง เมื่อทราบค่า HLB ของตัวทำอิมัลชันในตำรับ จะสามารถนำมาคำนวณค่า HLB ของน้ำมันในตำรับ จึงทำให้สามารถหาค่า HLB ของน้ำมันเมล็ดเสาวรสได้โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Required } HLB = \left[HLB1 \times \frac{O1}{OT} \right] + \left[HLB2 \times \frac{O2}{OT} \right] \quad \text{----5}$$

Required HLB = HLB ของน้ำมันที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชัน

HLB1, HLB2 = ค่า HLB ของ mineral oil และน้ำมันเมล็ดเสาวรสตามลำดับ

O1, O2 = ปริมาณของ mineral oil และน้ำมันเมล็ดเสาวรสโดยน้ำหนักตามลำดับ

OT = ปริมาณรวมทั้งหมดของน้ำหนักน้ำมันในตำรับโดยน้ำหนัก

3.2.7 การพัฒนาสูตรตำรับโลชันบำรุงผิวชะลอริ้วรอยจากน้ำมันเมล็ดเสาวรส

1. การเตรียมตำรับโลชันและพัฒนาสูตรตำรับโลชัน

งานวิจัยนี้ได้ทดลองพัฒนาสูตรตำรับโลชันบำรุงผิวจากน้ำมันเมล็ดเสาวรสทั้งหมด 5 สูตร โดยเลือกใช้สารในวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับเตรียมโลชัน ใช้น้ำมันเมล็ดเสาวรสเป็นส่วนหนึ่งของวัฏภาคน้ำมันในความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยอ้างอิงจากผลงานวิจัยของยุวธิดา มูลธงและคณะ[11] ที่พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจตำรับอิมัลชันที่มีน้ำมันเมล็ดเสาวรสเป็นส่วนประกอบร้อยละ 10 นอกจากนี้ในการพัฒนาตำรับยังเลือกใช้ตัวทำอิมัลชันต่างชนิดกันในแต่ละตำรับโดยคำนึงถึงค่า HLB ของน้ำมันเสาวรสที่คำนวณได้ข้างต้น พัฒนาให้ได้โลชันชนิดน้ำมันในน้ำ มีสีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน เนื้อเนียน ไม่มีฟอง ความหนืดเหมาะสม เมื่อทาแล้วให้ความรู้สึกชุ่มชื้น ไม่มันจนเกินไป ไม่เหนอะหนะ ไม่เกิดเป็นปื้นขาว ลักษณะโดยรวมดี การเตรียมโลชันทำโดยการหลอมวัฏภาคน้ำและน้ำมันแยกกันที่อุณหภูมิ 75 °C แล้วเติมวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ คนให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นแบบใบพัดจนได้อิมัลชัน จากนั้นนำอิมัลชันที่เตรียมได้ไปผ่านเครื่อง Polytron® ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

ตาราง 3 องค์ประกอบของตำรับโลชัน

องค์ประกอบ	ปริมาณสารในตำรับ (%W/W)				
	สูตร A	สูตร B	สูตร C	สูตร D	สูตร E
วัฏภาคน้ำมัน					
Passion fruit seed oil	10	10	10	10	10
Mineral oil	2	3	-	3	-
Silicone oil	2	2	1	2	2
Butylated hydroxytoluene	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Stearic acid	3	2.5	1.5	-	3
Stearyl alcohol	-	-	-	3	-
Cetyl alcohol	1.5	-	-	2	-
Cetostearyl alcohol	-	-	-	-	1.5
Squalane	-	-	2	-	-
Isopropyl myristate	-	-	2	-	2
Polyethylene glycol 600	-	-	-	-	0.5
วัฏภาคน้ำ					
Propylene glycol	4		2	-	-
Glycerin	4	5	3	3	3
Triethanolamine	0.3	0.5	-	-	0.3
Carbopol 940 0.2% w/v	-	4	-	-	-
Conc. paraben	1	1	1	1	1
Purified water	qs.	qs.	qs.	qs.	qs.
Emulsifier	11	4	6	0.5	4.5

2. การประเมินลักษณะทางกายภาพและความรู้สึกหลังใช้ของตำรับโลชันตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1) ลักษณะภายนอก เช่น ความเป็นเนื้อเดียว และสี

2) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

3) ความหนืด โดยสังเกตเบื้องต้นได้จากการไหลของโลชันออกจากภาชนะบรรจุ

4) การแยกชั้นหลังการปั่นเหวี่ยง โดยการนำตำรับโลชันมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5) ความเหนอะหนะ ประเมินโดยนำตำรับโลชันมาทาบนผิวหนัง

6) การแผ่กระจายบนผิว ประเมินโดยนำตำรับโลชันมาทาบนผิวหนัง

7) ความรู้สึกเป็นมันเมื่อทาผิว ประเมินโดยนำตำรับโลชันมาทาบนผิวหนัง

8) การเกิดปื้นขาวเมื่อทาผิว ประเมินโดยนำตำรับโลชันมาทาบนผิวหนัง

3. การทดสอบความคงตัวที่สภาวะต่าง ๆ ของตำรับ

นำตำรับโลชันที่พัฒนาขึ้นทั้ง 5 สูตรไปทดสอบความคงตัวที่สภาวะดังต่อไปนี้

1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน

2) เก็บไว้ที่ตู้อบ (40°C) เป็นเวลา 3 เดือน

3) เก็บไว้ที่ตู้เย็น (4°C) เป็นเวลา 3 เดือน

4) เก็บไว้ที่ 4 และ 40°C สลับกันทุกๆ 48 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ (สภาวะ heating-cooling cycle)

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำตำรับไปประเมินความคงตัวโดยพิจารณาจาก

1) ลักษณะภายนอก เช่น สี การแยกชั้น

2) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

3) ความหนืด โดยใช้เครื่องวัดความหนืด Brookfield Rheometer โดยใช้ model R/S Rheometer

ตำรับที่มีลักษณะดีตามต้องการและมีความคงตัวดีที่สุดจะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อและเตรียมตำรับโลชันพื้นสูตรเดียวกันนี้ที่มีส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำมันเมล็ดเสาวรสโดยจะใช้ น้ำมันแร่แทน เพื่อนำไปทดสอบการใช้ผลิตภัณฑ์ในผิวหนังอาสาสมัครต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH ทำเช่นเดียวกับการทดสอบในน้ำมันเมล็ดเสาวรส

3.2.8 การพัฒนาเม็ดกลมเล็กจากสารสกัดขมิ้นชัน

1. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน [12]

   1) คัดเลือกวัตถุดิบเหง้าขมิ้นชันที่มีอายุปลูกประมาณ 1 ปีขึ้นไปแล้วนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง หั่นเหง้าขมิ้นชันเป็นชิ้นบาง ๆ ชั่งน้ำหนักขมิ้นชัน

   2) นำขมิ้นชันที่หั่นแล้วไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 40 °C หมั่นกลับบ่อย ๆ อบจนแห้ง ชั่งน้ำหนักไว้

   3) นำขมิ้นชันที่แห้งแล้วไปบดให้เป็นผงละเอียด

   4) ควบคุมคุณภาพของผงขมิ้นชันก่อนการสกัดโดยหาปริมาณ total เคอร์คิวมินอยด์ ดังนี้

<u>สร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์คิวมินอยด์</u>

ชั่งสารมาตรฐานเคอร์คิวมินอยด์ อย่างละเอียด 2 mg

↓

ละลายด้วยเมทานอล ใน volumetric flask ขนาด 5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

↓

แยกดูดสารละลายมาตรฐาน 20, 40, 50, 60, 80 µL

ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL จำนวน 5 ขวด

↓

ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 10 mL

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

↓

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

<u>หาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ ในสารตัวอย่าง</u>

นำผงขมิ้นชัน 300 มิลลิกรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
บรรจุใน volumetric flask ขนาด 10 mL

↓

ปรับปริมาตรด้วย tetrahydrofuran จนครบปริมาตร 10 mL
เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง โดยเขย่าบ่อยๆ

↓

ดูดสารละลายใสที่ได้มา 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL
ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน

↓

ดูดสารละลายที่ได้มา 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL
ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล เขย่าให้เข้ากัน

↓

นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

↓

คำนวณหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

5) นำผงขมิ้นชันไปสกัดด้วยเอทานอล (absolute) โดยใช้ Soxhlet apparatus เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
6) นำสารสกัดขมิ้นชันที่ได้ไปทำให้เป็นสารสกัดเข้มข้น (concentrate extract) โดยระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator บันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้
7) หาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์รวมที่มีใน concentrate extract โดยทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ ในผงขมิ้นชัน ปริมาณสารสกัดที่ใช้จะใช้น้อยกว่าผงสมุนไพร โดยชั่งน้ำหนักให้ทราบอย่างละเอียด 30 มิลลิกรัม

2. การพัฒนาสูตรเม็ดกลมเล็กสารสกัดขมิ้นชัน

ชั่งแลกโทสตามจำนวนที่ต้องการ ใส่ลงไปในเครื่องช่วยผสม
จากนั้นค่อยเติม Avicel® ลงไปทีละส่วน ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
ตามเทคนิค geometric dilution

↓

ค่อยๆเติมน้ำและ/หรือสารช่วยยึดเกาะลงไปในเครื่องช่วยผสม
ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้แกรนูลเปียก

↓

นำแกรนูลเปียกที่ได้ไปผ่านเครื่อง extruder
จะได้แกรนูลขนาดเล็กมีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ

↓

นำแกรนูลที่ผ่านเครื่อง extruder แล้วมาวางพักไว้ประมาณ 10 นาที
แล้วจึงนำไปผ่านเครื่อง spheronizer เพื่อทำให้เป็นเม็ดกลมเล็กลักษณะกลม
โดยทำที่ความเร็ว 100-500 รอบ/นาที และระยะเวลา 1-5 นาที เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

ตาราง 4 องค์ประกอบในสูตรเม็ดกลมเล็ก

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (g)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
Avicel®	60	60	60
Lactose	30	30	30
1% HPMC	-	60	20
Purified water	72	-	46

3. นำเม็ดกลมเล็กที่ได้มาประเมินลักษณะ โดยดูจากความกลม ความสม่ำเสมอของผิว ความสม่ำเสมอของขนาดเม็ดกลมเล็กแต่ละเม็ด และที่สำคัญคือความสามารถในการแตกตัวของเม็ดกลมเล็กหลังนำไปผสมในโลชัน เม็ดกลมเล็กที่ต้องการคือต้องสามารถแตกตัวได้ดีเมื่อออกแรงกดขณะทาโลชัน

4. หลังจากได้สูตรเม็ดกลมเล็กที่ต้องการแล้วจึงนำมาพัฒนาต่อโดยเพิ่มส่วนประกอบอัน ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชัน วิตามินอี น้ำมันซิลิโคน น้ำมันโจโจบา และทวีน 20 ซึ่งจะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่เม็ดกลมเล็ก

5. นำเม็ดกลมเล็กที่ได้ไปหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ โดยปริมาณเม็ดกลมเล็กที่ใช้วิเคราะห์ให้คำนวนจากปริมาณสารสกัดเข้มข้นที่ใส่ในตำรับเม็ดกลมเล็ก

6. นำเม็ดกลมเล็กที่เตรียมได้ไปคัดขนาดโดยผ่านแร่งเบอร์ 16 และ 18 ซึ่งมีขนาดรูเปิดเฉลี่ยเท่ากับ 1.19 และ 1.00 mm ตามลำดับ คัดเฉพาะเม็ดกลมเล็กที่ค้างอยู่บนแร่งเบอร์ 18 ซึ่งเป็นเม็ดกลมเล็กขนาดเหมาะสมมาใช้ผสมในตำรับ เมื่อได้เม็ดกลมเล็กตามต้องการแล้วจึงนำไปผสมในโลชันตำรับที่ได้คัดเลือกไว้ในปริมาณร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นปริมาณเหมาะสมที่ทำให้ตำรับมีลักษณะภายนอกสวยงาม และน่าใช้ เนื่องจากหากผสมในอัตราส่วนมากกว่านี้สารสกัดขมิ้นชันในเม็ดกลมเล็กจะทำให้ผิวหนังเป็นสีเหลืองได้ จากนั้นนำตำรับโลชันที่ผสมเม็ดกลมเล็กแล้วไปศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH เช่นเดียวกับในโลชันและน้ำมันเมล็ดเสาวรส

3.2.9 การประเมินการระคายเคือง ประสิทธิภาพและความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

1. การยื่นข้อเสนอโครงการต่อคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

จัดเตรียมเอกสารคำขอการรับรองเชิงจริยธรรมในการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับคน ข้อมูลพื้นฐานจริยธรรม ข้อมูลสำหรับอาสาสมัคร หนังสือแสดงความยินยอมของอาสาสมัคร ประวัติหัวหน้าโครงการ และแบบสอบถาม เพื่อยื่นเรื่องต่อคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการขอรับการพิจารณาอนุมัติให้มีการดำเนินการวิจัยในมนุษย์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในวิธีการวิจัยของวิทยานิพนธ์

2. การคัดเลือกอาสาสมัคร

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ชะลอริ้วรอย จึงเลือกใช้อาสาสมัครอายุ 32 ปีขึ้นไป จำนวน 20 คน ไม่มีอาการหรือลักษณะดังต่อไปนี้

1) เป็นโรคเกี่ยวกับผิวหนัง เช่น ผื่นแพ้

2) อยู่ระหว่างการรับประทานยาแก้แพ้หรือยาใดๆ

3) มีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้ทางผิวหนัง

4) มีสีผิวไม่สม่ำเสมอ (ในบริเวณที่ต้องการวัด)

5) ผิวหนังถลอก, เป็นแผล หรืออยู่ในสภาพที่ผิดปกติ

3. การทดสอบการระคายเคืองในอาสาสมัคร[47]

นำตำรับที่ต้องการทดสอบมาทดสอบด้วยวิธี human 4-h patch test โดยใช้แผ่นผ้าก๊อซกว้างยาวขนาด 2x2 เซนติเมตร ชุบตำรับยาที่ทดสอบปริมาณ 0.5 กรัม แล้วปิดไว้บนผิวหนังบริเวณด้านในแขนของอาสาสมัคร หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพลาสติกบาง ๆ ปิดทับเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผ้าก๊อซ ออก เช็ดด้วยน้ำอุ่น ทิ้งให้แห้ง สังเกตผลที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วประเมินผลการระคายเคืองจากการอ่านผลการเกิดการบวมหรือแดงตามค่าระดับคะแนนดังนี้คือ

0 = ไม่เกิดอาการบวมแดง

1 = เกิดอาการบวมแดงน้อยมาก

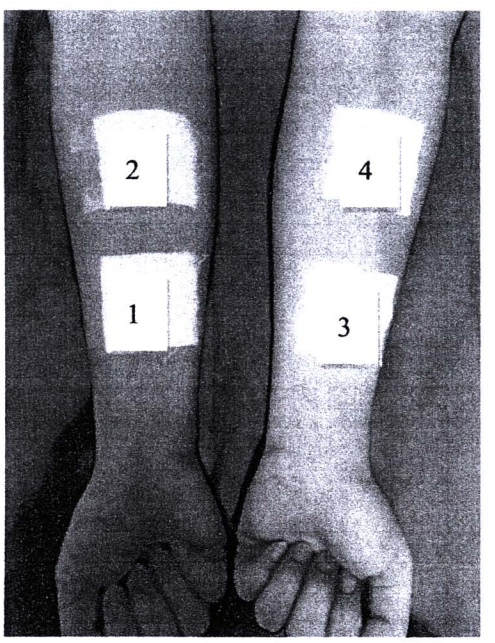
2 = เกิดอาการบวมแดงชัดเจน

3 = เกิดอาการบวมแดงปานกลางถึงมาก

4 = เกิดอาการบวมแดงรุนแรง

ตำรับที่จะนำมาทดสอบมีจำนวน 4 ตำรับ

1. โลชันที่มีวางขายในท้องตลาดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอกและสารสกัดขมิ้นชัน
2. โลชันพื้นแบบไม่มีน้ำมันเมล็ดเสาวรส
3. โลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ไม่ผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน
4. โลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน



รูป 1 การทดสอบการระคายเคืองของตำรับต่อผิวหนังในอาสาสมัคร

4. ทดสอบประสิทธิภาพในการลดริ้วรอยของผิวหนังในอาสาสมัคร

ทำการวัดความชุ่มชื้น ริ้วรอยและความหยาบละเอียดของผิวบริเวณแขนด้านในของอาสาสมัครก่อนการใช้และวันที่ 30 หลังการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์วันละ 2 เวลา เช้าและเย็นหลังอาบน้ำติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน ทั้งหมด 4 ตำรับได้แก่ ทาผลิตภัณฑ์ในบริเวณที่กำหนดดังรูป 2

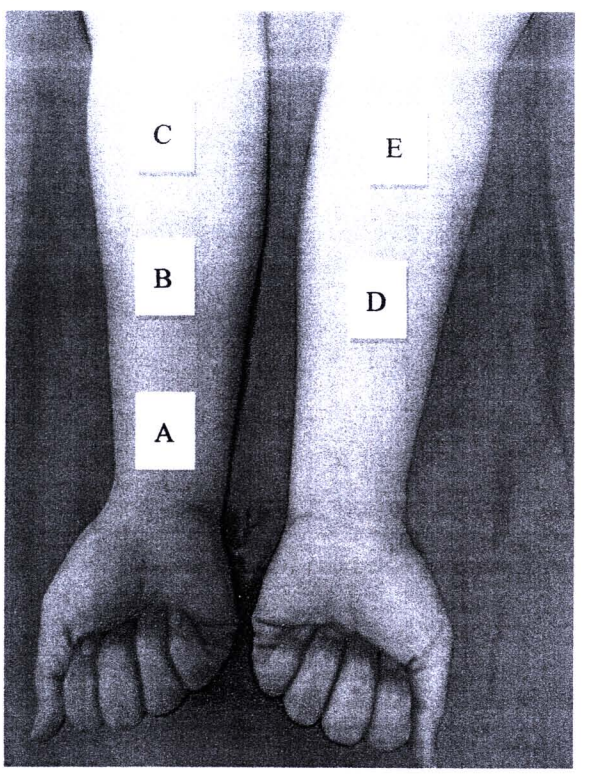
1. โลชันชะลอริ้วรอยที่มีวางขายในท้องตลาด
2. โลชันพื้นแบบไม่มีน้ำมันเมล็ดเสาวรส
3. โลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ไม่ผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน
4. โลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน

ทำการวิเคราะห์สภาพผิวโดยใช้เครื่องมือดังนี้

ก. เครื่อง Corneometer วัดความชุ่มชื้นของผิว เพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการชะลอริ้วรอย

ข. เครื่อง Skin-Visiometer SV 600 FW เพื่อวิเคราะห์ริ้วรอย ความหยาบละเอียดของผิวหนังโดย ผลการวัดจะแสดงถึงปริมาตรน้ำที่เติมในร่องผิว และค่าพื้นที่ของผิวหนัง

การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Wilcoxon signed-rank test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%



รูป 2 การทดสอบประสิทธิภาพของตำรับต่อผิวหนังในอาสาสมัคร

โดยกำหนด A = บริเวณที่ไม่ทาผลิตภัณฑ์ใด ๆ

B = บริเวณที่ทาโลชันชะลอริ้วรอยที่มีวางขายในท้องตลาด

C = บริเวณที่ทาโลชันพื้นแบบไม่มีน้ำมันเมล็ดเสาวรส

D = บริเวณที่ทาโลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสที่ไม่ผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน

E = บริเวณที่ทาโลชันแบบมีน้ำมันเมล็ดเสาวรสผสมเม็ดกลมเล็กขมิ้นชัน

5. การประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์

ให้อาสาสมัครประเมินผลิตภัณฑ์เพื่อสำรวจความพึงพอใจหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ครั้งแรก และเมื่อครบระยะเวลา 1 เดือน โดยใช้แบบสอบถามความพึงพอใจ (ดังแสดงในภาคผนวก)

3.2.10 การเก็บรวบรวมข้อมูลและเขียนรายงาน

เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อสรุปผลในการศึกษาและเขียนรายงานผลการวิจัย