

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 สารสกัดแอสต้าแซนทิน (AstaREAL® oil 50FC) ผลิตโดยบริษัท Fuji Chemical industry จำกัด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ซีดีไอพี (ประเทศไทย) จำกัด

### 3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

#### 3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางกายภาพ

- 3.2.1.1 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.2.1.2 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 3.2.1.3 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 3.2.1.4 หลอดหยดสาร (Dropper)
- 3.2.1.5 กระจกนาฬิกา (Watch glass)
- 3.2.1.6 เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
- 3.2.1.7 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น 18715 ยี่ห้อ EGO ประเทศเยอรมนี
- 3.2.1.8 เครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง รุ่น FX-3000GD ยี่ห้อ AND ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.1.9 เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง รุ่น ME204E ยี่ห้อ Mettler Toledo สวิตเซอร์แลนด์
- 3.2.1.10 ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น CV250 ยี่ห้อ FRANCE ETUVES ประเทศเยอรมนี
- 3.2.1.11 ตู้เย็น รุ่น SBC-P3DB/ SRM-P3DB ยี่ห้อ Panasonic ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.1.12 เครื่องกวนผสมสาร (Overhead Stirrers) รุ่น RW 20 Digital ยี่ห้อ IKA ประเทศเยอรมนี
- 3.2.1.13 ขวดบรรจุครีม

#### 3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

- 3.2.2.1 เครื่อง UV-Visspectrophotometer รุ่น UV-2401PC ยี่ห้อ SHIMADZ ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.2.2 เครื่องวัดความชุ่มชื้นผิว (Derma® Moisture) ประเทศจีน
- 3.2.2.3 เครื่องวัดอิลาสติกของผิว (Derma® Elastic) ประเทศจีน
- 3.2.2.3 เครื่องวัดค่าการระเหยน้ำของผิว (Derma® TEWL) ประเทศจีน
- 3.2.2.4 เครื่องวัดสีของผลิตภัณฑ์ รุ่น P2132 Color meter ประเทศจีน

3.2.2.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Starter 2100 ยี่ห้อ OHAUS  
ประเทศจีน

3.2.2.6 เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) รุ่น DV-1 Prime ยี่ห้อ Brookfield  
ประเทศเยอรมนี

### 3.3 สารเคมี

#### 3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตครีม

- 3.3.1.1 น้ำกลั่น (Deionized water)
- 3.3.1.2 Astaxanthin (AstaREAL®oil 50FC บริษัท Fuji Chemical industry  
จำกัด
- 3.3.1.3 Disodium EDTA บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.4 Glycerin บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.5 Carbopol Ultrez 21 บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.6 Safflower oil บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.7 Olive oil บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.8 Mineral oil บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.9 Dimethicone บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.10 Tween 80 บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.11 Uniphen P-23 บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย
- 3.3.1.12 Triethanolamine บริษัท Namsiang international จำกัด ประเทศไทย

#### 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

- 3.3.2.1 น้ำกลั่น (Deionized water)
- 3.3.2.2 เอทานอล (99% Ethanol AR grade) บริษัท Merck ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา
- 3.3.2.3 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH AR grade) บริษัท Sigma-  
Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.2.4 Ascorbic acid AR grade บริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.2.5 Amaranth (สีแดง)
- 3.3.2.6 Ultramarine Blue (สีน้ำเงิน)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 ศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอสต้าแซนทินด้วย

วิธี DPPH scavenging assay (Shimada et al.1992 และ ประภาพรณ พรมหิรัญกุล 2551)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยปิเปตสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydra-zyl ) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมตัวอย่างสารสกัดแอสต้าแซนทินที่ 5 ความเข้มข้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ใส่ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที พร้อมกันนี้ทำตัวอย่างควบคุม (Control) หรือสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่างสารสกัดแอสต้าแซนทินทำโดยใช้เอทานอล จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างสารสกัด แอสต้าแซนทินวิเคราะห์ตามวิธีการเดียวกัน เมื่อครบ 30 นาที นำ ตัวอย่างและตัวอย่างควบคุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการปริมาณการต้านอนุมูลอิสระจะ รายงานผลเป็นค่า 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% (Aruoma, 2003) หรือออกรายงานเป็น % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Acontrol} - \text{Asample})}{\text{Acontrol}} \times 100$$

จากนั้นนำความเข้มข้นของสารสกัดแอสต้าแซนทินจากการหาค่า IC<sub>50</sub> มาเติมลงครีมเบส แล้วนำทดสอบความคงตัวของครีมแอสต้าแซนทินต่อไป

การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ทำได้โดยชั่ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl มา 0.0078 กรัม ละลายด้วยเอทานอล จนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

#### 3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Ascorbic acid ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยปิเปตสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydra-zyl ) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสาร มาตรฐาน Ascorbic acid ที่ 5 ความเข้มข้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.015625 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ใส่ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที พร้อมกันนี้ทำตัวอย่างควบคุม (Control) หรือสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารมาตรฐาน Ascorbic acid ทำโดยใช้เอทานอล จำนวน 1 มิลลิลิตร แทนสารมาตรฐาน Ascorbic acid วิเคราะห์ตามวิธีการเดียวกัน เมื่อครบ 30 นาที

นำตัวอย่างและตัวอย่างควบคุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition)

### 3.4.3 พัฒนาตำรับครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) และชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

พัฒนาตำรับครีมเบสแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพความคงตัวที่สภาวะต่างๆ จากนั้นคัดเลือกตำรับครีมเบสที่มีความคงตัว นำไปตั้งตำรับครีมแอสต้าแซนทิน ส่วนประกอบต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

#### 1. การเตรียมครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w)

1.1 แบ่งส่วนประกอบของตำรับสูตรออกเป็นวัฏภาคน้ำ (Part A) วัฏภาคน้ำมัน (Part B) สารกันเสีย (Part C) และสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (Part D)

1.2 ชั่งวัฏภาคน้ำ (Part A) รวมกัน ผสมจนเข้ากันดีแล้วค่อยๆ โปรย Carbopol Ultrez 21 รองจนพองตัว

1.3 ชั่งวัฏภาคน้ำมัน (Part B) รวมกัน ผสมจนเข้ากันดี

1.4 นำวัฏภาคน้ำ (Part A) และวัฏภาคน้ำมัน (Part B) ไปให้ความร้อนจนอุณหภูมิของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันอยู่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส โดยให้อุณหภูมิของวัฏภาคน้ำมากกว่าวัฏภาคน้ำมันประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส เพราะวัฏภาคของน้ำจะลดลงเร็วกว่าวัฏภาคน้ำมัน

1.5 ค่อยๆ เทวัฏภาคน้ำมัน (Part B) ลงในวัฏภาคน้ำ (Part A) พร้อมทั้งปั่นจนตลอดเวลาจนเกิดเป็นอิมัลชัน

1.6 ค่อยๆ เติมสารกันเสีย (Part C) และสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (Part D) ตามลำดับ ปั่นจนจนเข้ากันดีเป็นเนื้อเดียวกัน

#### 2. การเตรียมครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

2.1 แบ่งส่วนประกอบของตำรับสูตรออกเป็นวัฏภาคน้ำมัน (Part A) วัฏภาคน้ำ (Part B) สารกันเสีย (Part C) และสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (Part D)

2.2 ชั่งวัฏภาคน้ำ (Part B) รวมกัน ผสมจนเข้ากันดี ค่อยๆ โปรย Carbopol Ultrez 21 รองจนพองตัวแล้วปั่นจนจนเข้ากันดี

2.3 ชั่งวัฏภาคน้ำมัน (Part A) รวมกัน ผสมจนเข้ากันดี

2.4 นำวัฏภาคน้ำมัน (Part A) และวัฏภาคน้ำ (Part B) ไปให้ความร้อนจนอุณหภูมิของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันอยู่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส โดยให้อุณหภูมิของวัฏภาคน้ำมากกว่าวัฏภาคน้ำมันประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส เพราะวัฏภาคของน้ำจะลดลงเร็วกว่าวัฏภาคน้ำมัน

2.5 ค่อยๆ เทวัฏภาคน้ำ (Part B) ลงในวัฏภาคน้ำมัน (Part A) พร้อมทั้งปั่นจนตลอดเวลาจนเกิดเป็นอิมัลชัน

2.6 ค่อยๆ เติมสารกันเสีย (Part C) และสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (Part D) ตามลำดับ ปั่นจนจนเข้ากันดีเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบในตำรับครีมเบสน้ำมันในน้ำ (o/w)

Part	Trade Name	INCI Name	Function	สูตรตำรับครีมเบส (o/w)			
				1	2	3	4
A	DI Water	Agua	Diluent	69.84	69.85	69.65	69.45
	2 Na EDTA	Disodium EDTA	Chelating agent	0.05	0.05	0.05	0.05
	Glycerine	Glycerine	Humectant	3.00	3.00	3.00	3.00
	Carbopol Ultrez 21	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Thickener	0.50	0.50	0.50	0.50
B	White oil	Liquid paraffin	Emollient	8.00	-	-	-
	Isopropyl palmitate	Isopropyl palmitate	Emollient	5.00	-	-	-
	Safflower oil	Safflower oil	Emollient	-	12.00	12.00	12.00
	Olive oil	Sodium Olivatate and Potassium Olivatate	Emollient	5.00	6.00	6.00	6.00
	Tween 80	Polysorbate 80	Emulsifier	2.00	2.00	2.00	2.00
	PEG-400	PEG-8 distearate	Emulsifier	1.00	1.00	1.00	1.00
C	TEA	Triethanolamine	Neutralizer	0.10	0.10	0.30	0.50
	DI Water	Aqua	Diluent	5.00	5.00	5.00	5.00
D	Uniphen P-23	Phenoxyethanol	Preservative	0.50	0.50	0.50	0.50

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบในตำรับครีมเบสชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

Part	Trade Name	INCI Name	Function	สูตรตำรับครีมเบส (w/o)			
				1	2	3	4
A	Tween 80	Polysorbate 80	Emulsifier	3.00	3.00	-	-
	Dimethicone	Silicone 350	Emollient	8.00	8.00	-	-
	Mineral oil	Mineral oil	Emollient	17.00	17.00	-	-
	DUB	C12-15 alkyl benzoat	Emollient	-	-	27.00	23.00
	Lexmeul 561	Glyceryl stearate (and) PEG-100 stearate	Emulsifier	-	-	5.00	5.00
	Wax C	Cetyl alcohol	Bodying agent	-	-	8.00	5.00
	Lanoline	Lanoline	Conditioning agent	-	-	4.00	3.00
B	DI water	Agua	Diluent	62.65	62.45	45.65	53.75
	2 Na EDTA	Disodium EDTA	Chelating agent	0.05	0.05	0.05	0.05
	Glycerine	Glycerine	Humectant	3.00	3.00	3.00	3.00
	Carbopol Ultrez 21	Acrylatees/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Thickener	0.50	0.50	0.30	0.30
C	TEA	Triethanolamine	Neutralizer	0.30	0.50	0.50	0.40
	Water	Aqua	Diluent	5.00	5.00	5.00	5.00
D	Uniphen P23	Phenoxyethanol	Preservative	0.50	0.50	0.50	0.50

### 3. ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของตำรับครีมเบส

3.1 ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อครีม และการไม่แยกชั้นของตำรับ

3.2 ลักษณะทางเคมี ได้แก่

3.2.1 ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.2.2 ความหนืด ด้วยเครื่องวัดความหนืด (Viscometer)

3.3 ทดสอบความคงตัวของตำรับเครื่องสำอาง

3.3.1 เก็บที่สภาวะเร่ง (Heating-Cooling cycle) โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ (cycle) ทำทั้งหมด 6 รอบ (cycle) และประเมินความคงตัว

3.3.2 เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน และประเมินความคงตัว

3.3.3 เก็บไว้ในที่มีแสงสว่าง (ริมหน้าต่าง) เป็นเวลา 1 เดือน และประเมินความคง

ตัว

### 3.4.3 ศึกษาการทดสอบวัฏภาคของผลิตภัณฑ์

การตรวจสอบวัฏภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการย้อมสีผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 สี ได้แก่ สีที่ละลายน้ำ (Ultramarine) และสีที่ละลายน้ำมัน (Amaranth) เพื่อส่องดูวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอกของผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีการที่สำคัญในการบ่งชี้ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ ทดสอบด้วยวิธีการย้อมสีอิมัลชัน (Dye method) ละลายสีแดงของ Amaranth และสีน้ำเงินของ Ultramarine Blue ในประมาณ 3-4 หยด ลงในตำรับอิมัลชันปริมาณ 2 g ผสมให้เข้ากัน แล้วทาลงบนแผ่นสไลด์บางๆ ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip) แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

## 4. การเตรียมและการวิเคราะห์ตำรับสูตรเครื่องสำอางสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Franz diffusion cell

เตรียมครีมทั้ง 4 ในรูปแบบ o/w และ w/o ที่มีส่วนผสมของสารทำให้ผิวขาว นาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปทดลอง นาไปละลายด้วยเมทานอล 10 mL จากนั้นนำมา 1 mL เจือจางให้ได้ 10 mL ด้วยน้ำกับ TFA (0.25 mL/L) จากนั้นนำไปกรองด้วย syringe ที่ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD

### การศึกษาความคงตัวของสารทำให้ผิวขาว

เตรียมสารละลายมาตรฐานของอิมัลชัน o/w และ w/o ที่เติม DTT 0.4 mg/mL และสารทำให้ผิวขาว นาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด และอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสงปกติ แล้วนำไปวิเคราะห์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### การเตรียม Reconstructed human epidermis (RHE)

นำ Reconstructed human epidermis (RHE) อายุ 12 วัน มาตรึงด้วยโพลีคาร์บอเนตดิสก์ (polycarbonate disks) เติม growth medium (1.5 mM calcium chloride, 25 mg/mL gentamycin, 5 mg/mL insulin, 1ng/mL egf) 4 mL แล้วนำไปแช่และนาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปวิเคราะห์

### การทดลองการแพร่ซึมผ่านด้วยเครื่อง Franz cell diffusion

การทดลองการแพร่ซึมผ่านใช้ Magnetic stirrer เบอร์ 6 ต่อกับ water bath ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ตัว receptor medium ใช้ phosphate saline buffer pH 7.4 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCL, 0.2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ 1.15 g/L  $\text{NaHPO}_4$  in bi-distilled water), 3% w/w ของ polysorbate-20 และ 0.25% w/w ของ isopropanol และ DTT 0.4 mg/mL ตัวกรองที่ใช้ในการแพร่ซึมผ่านของสารได้แก่ RHE และเนื้อเยื่อสังเคราะห์อีก 2 ชนิด คือ polyethersulfone และ polycarbonate ในขณะทดลองตัว donor และ receptor จะปิดสนิท ตำรับสูตรเครื่องสำอางจะแพร่ซึมผ่านออกมาในปริมาณ 0.5-1.0 mL ที่ 30-60 นาที เป็นเวลา 5-24 ชั่วโมง จากนั้นก็จะนา

ปริมาณสารที่แพร่ซึมผ่านออกมาจนวน 100  $\mu\text{L}$  ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารต่อไป หากยังไม่ได้นำไปวิเคราะห์ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา ในที่มืด ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซไนโตรเจน

#### **การวิเคราะห์ข้อมูล**

ค่า Q คือปริมาณการแพร่ซึมผ่านต่อผิวหน้า 1 ตารางเซนติเมตร โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากตัวอย่างของ receptor medium