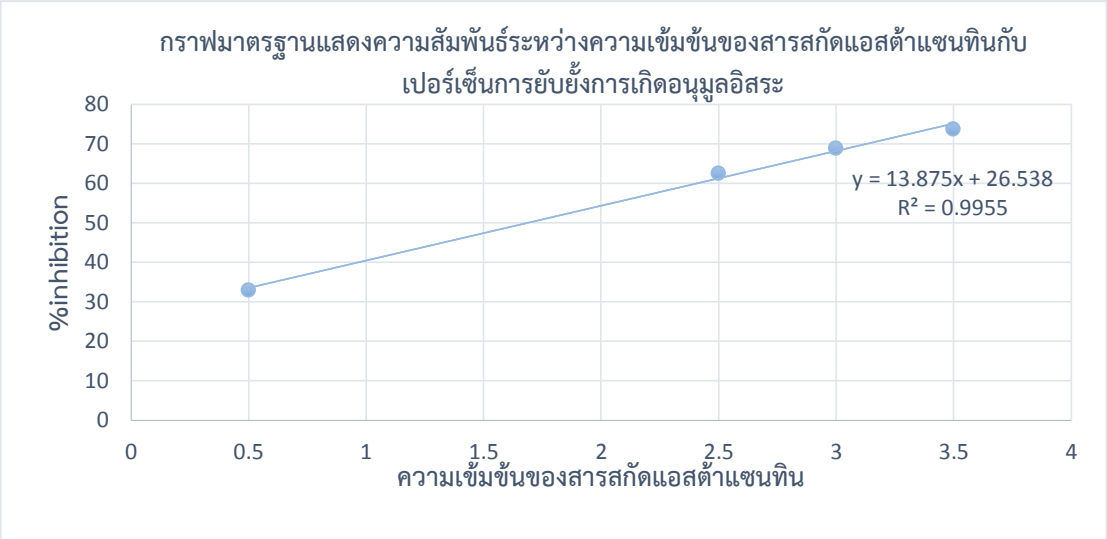
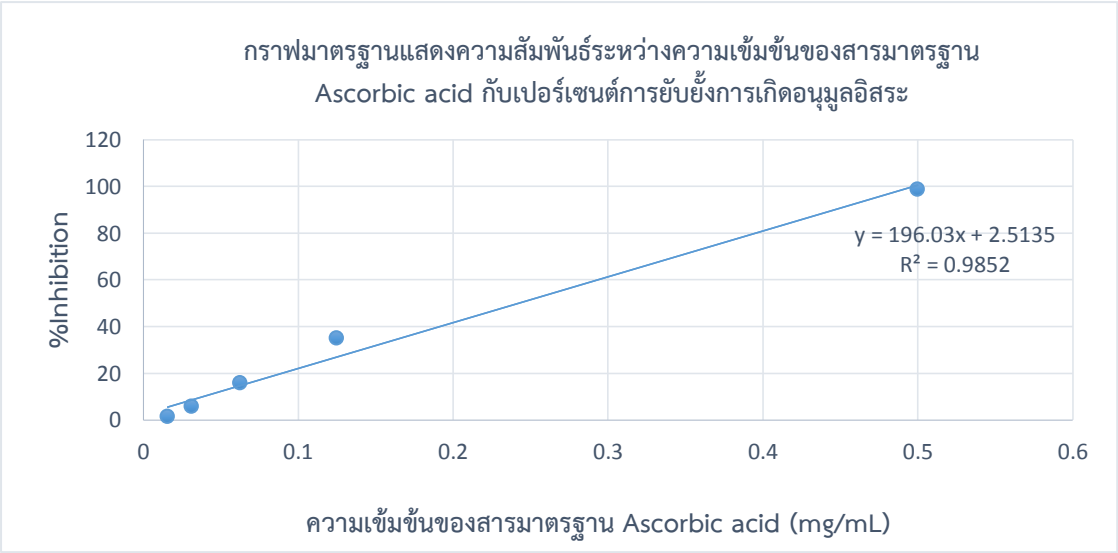
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอสต้าแซนทิน ด้วยวิธี DPPH scavenging assay



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดแอสต้าแซนทินกับเปอร์เซนต์การยับยังการเกิดอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ascorbic ac กับเปอร์เซนต์การยับยังการเกิดอนุมูลอิสระ

จากภาพที่ 4.1 พบว่าสารสกัดแอสต้าแซนทิน ที่ความเข้มข้น 0.5-3.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Inhibition เท่ากับ 9.42-73.66 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดแอสต้าแซนทินกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ค่าสมการเส้นตรง y = 13.875x + 26.538 และค่า R^2 = 0.9955 จากนั้นนำค่าสมการเส้นตรงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดแอสต้าแซนทินที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% จากการคำนวณได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0017 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี พบว่ามีค่าการยับยั้งน้อยกว่า 10 เท่า

จากภาพที่ 4.2 พบว่าสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.015625-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Inhibition เท่ากับ 1.36-98.73% ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ascorbic acid กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ได้ค่าสมการเส้นตรง y = 196.03x + 2.5135 และค่า R^2 = 0.9852 จากนั้นนำค่าสมการเส้นตรงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50% จากการคำนวณได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารสกัดจากการคำนวณค่า IC_{50} ไปเติมลงในตำรับครีมเบสชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) และตำรับครีมเบสชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ที่ได้ทำการทดสอบลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของครีมเบสในสภาวะเร่ง (Heating-Cooling cycle) มืด และที่มีแสงสว่าง (ริมหน้าต่าง) เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อครีม การไม่แยกชั้น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความหนืด แล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และมีความคงตัวดี

4.2 พัฒนาตำรับครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) และชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

4.2.1 พัฒนาตำรับครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) ทั้งหมด 4 ตำรับ โดยมีการเปลี่ยนแปลงการใช้น้ำมัน (oil) ที่แตกต่างกัน คือ สูตรที่ 1 ใช้ White oil และ Isopropyl palmitate เพิ่มในตำรับสูตร แต่ไม่มีการใช้ Safflower oil ในตำรับสูตร และสูตรที่ 2, 3 และ 4 ไม่มีการใช้ White oil และ Isopropyl palmitate เพิ่มในตำรับสูตร และมีการเปลี่ยนแปลงการใช้ Triethanolamine ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างกันในแต่ละตำรับสูตร คือ สูตร 1 และ 2 ใช้ Triethanolamine ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากัน คือ 0.1% สูตรที่ 3 ใช้ 0.3% และสูตรที่ 4 ใช้ 0.5%

4.2.2 พัฒนาตำรับครีมเบสอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ทั้งหมด 4 ตำรับ โดยมีการเปลี่ยนแปลงการใช้วัฏภาคน้ำมันที่แตกต่างกัน คือ สูตรที่ 1 และ 2 ไม่มีการใช้ DUB, Lexmeul 165, Wax C และ Lanoline สูตรที่ 3 และ 4 ไม่มีการใช้ Tween 80, Dimethicone และ Mineral oil มีการเปลี่ยนแปลงการใช้ Cabopol Ultrez ที่แตกต่างกัน คือ สูตรที่ 1 และ 2 ใช้ 0.5% สูตรที่ 3 และ 4 ใช้ 0.3% และมีการเปลี่ยนแปลงการใช้ Triethanolamine ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่

แตกต่างกันในแต่ล่ะตำรับสูตร คือ สูตร 1 ใช้ Triethanolamine ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากัน คือ 0.3% สูตรที่ 2 และ 3 ใช้ 0.5% และสูตรที่ 4 ใช้ 0.4%

4.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของครีมเบส

การทดสอบลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของครีมเบส โดยเก็บในสภาวะต่างๆ ได้แก่ สภาวะเร่ง (Heating-Cooling) ที่มืด และที่สว่าง (ริมหน้าต่าง) แล้วทำการคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุด โดยจะมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

4.3.1 ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สีสวยงามน่าใช้ มีกลิ่นหอม ลักษณะเนื้อครีมเนียนละเอียด ภายหลังการสัมผัสที่ผิวให้ความรู้สึกที่ดี

4.3.2 ลักษณะทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต้องมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสม ใกล้เคียงกับผิวหนัง ซึ่งผิวหนังมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 4-6 (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540) และค่าความหนืดที่เหมาะสมต่อการใช้งาน

4.3.3 ความคงตัว ต้องมีความคงตัวที่ดี ไม่แยกชั้น เนื้อครีมไม่เปลี่ยนแปลง

เมื่อนำครีมเบสไปประเมิณคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อครีม การไม่แยกชั้น ความหนืด และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของครีมแอสต้าแซนทิน

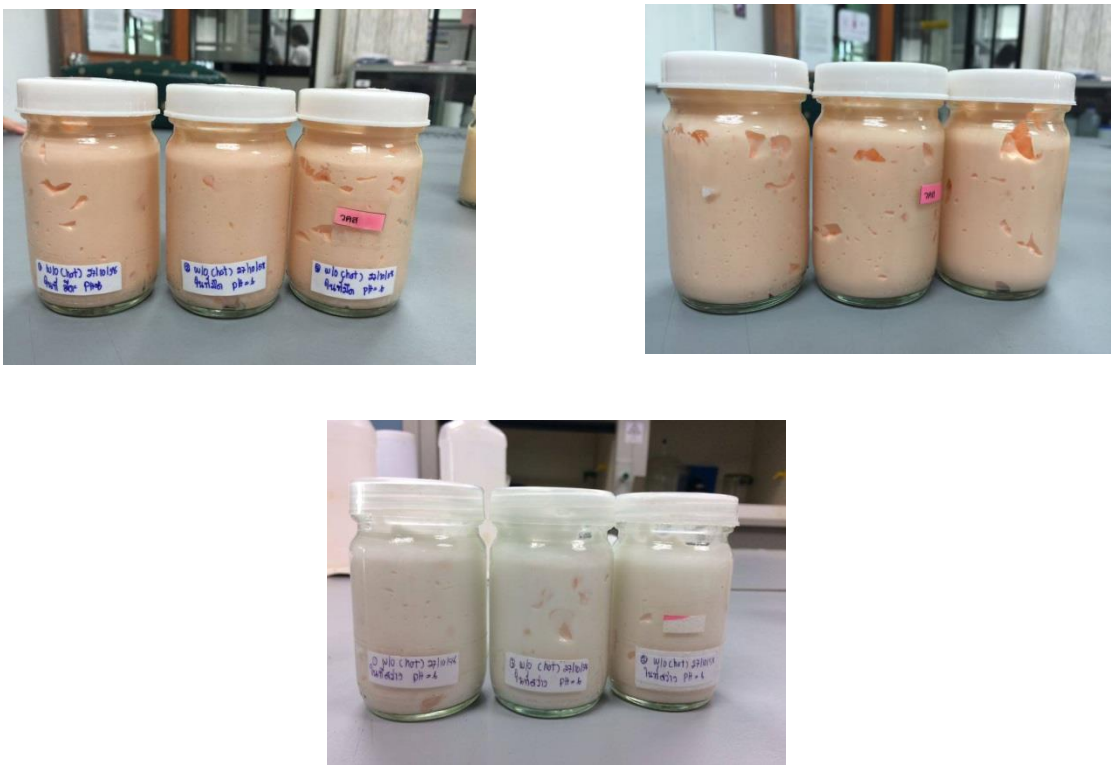
Part	Trade Name	INCI Name	Function	สูตรตำรับครีมแอสต้าแซนทิน	
				ชนิด o/w	ชนิด w/o
A	DI Water	Aqua	Diluent	69.45	53.75
	2 Na EDTA	Disodium EDTA	Chelating agent	0.05	0.05
	Glycerine	Glycerine	Humectant	3.00	4.00
	Carbopol Ultrez 21	Acrylatees/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Thickener	0.50	0.30
B	Safflower oil	Safflower oil	Emollient	12.00	-
	Olive oil		Emollient	6.00	-
	Dimethicone	Silicone 350	Emollient	-	-
	DUB	C12-15 alkyl benzoat	Emollient	-	23.00
	Lexmeul 561	Glyceryl stearate (and) PEG-100 stearate	Emollient	-	5.00
	Wax C	Cetyl alcohol	Emulsifier	-	5.00
	Lanoline	Lanoline	Bodying agent	-	3.00
	Tween 80	Polysorbate 80	Emulsifier	2.00	-
	PEG-400	PEG-100 stearate	Emulsifier	1.00	-
C	Astaxanthin	Astaxanthin	Active	0.50	0.40
D	TEA	Triethanolamine	Neutralizer	0.50	0.40
	Water	Aqua	Diluent	5.00	5.00
E	Uniphen P-23	Phenoxyethanol	Preservative	0.50	0.50
F	Fragrance	Fragrance	Perfume	1.00	1.00

จากนั้นนำครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) และครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) มาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของครีมแอสต้าแซนทิน แสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางเคมี และความคงตัวของตำรับครีมแอสต้าแซนทิน

สภาวะ	ก่อน						หลัง					
	คุณสมบัติ						คุณสมบัติ					
	สี	กลิ่น	ลักษณะเนื้อครีม	การแยกชั้น	ความหนืด	pH	สี	กลิ่น	ลักษณะเนื้อครีม	การแยกชั้น	ความหนืด	pH
สภาวะเร่ง o/w	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	26322.67	6	ส้ม	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	26392.45	6
สภาวะเร่ง w/o	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	24263.56	6	ส้ม	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	24089.89	6
ในที่มืด o/w	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	25649	6	ส้ม	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	26065.44	6
ในที่มืด w/o	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	24638	6	ส้ม	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	24908	6
ในที่สว่าง o/w	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	28384	6	ขาว	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	28384	6
ในที่สว่าง w/o	ส้ม	-	เป็นเนื้อเดียวกัน	ไม่แยกชั้น	24781.33	6	ขาว	-	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่แยกชั้น	28384	6

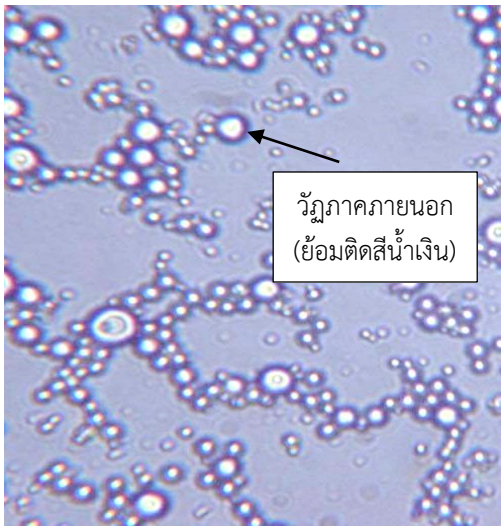
ภาพที่ 4.5 ครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w)



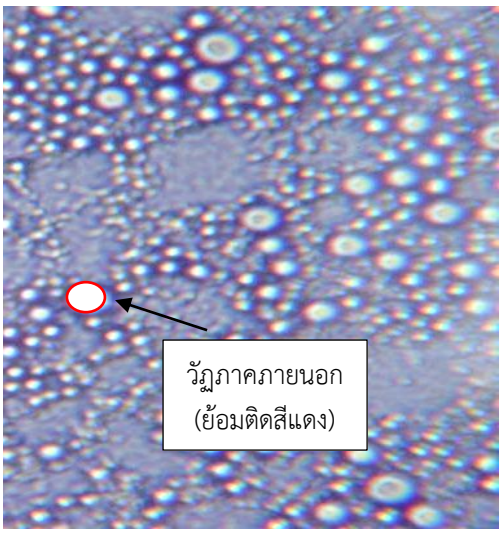
ภาพที่ 4.6 ครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

4.4 ศึกษาการทดสอบวัฏภาคของผลิตภัณฑ์

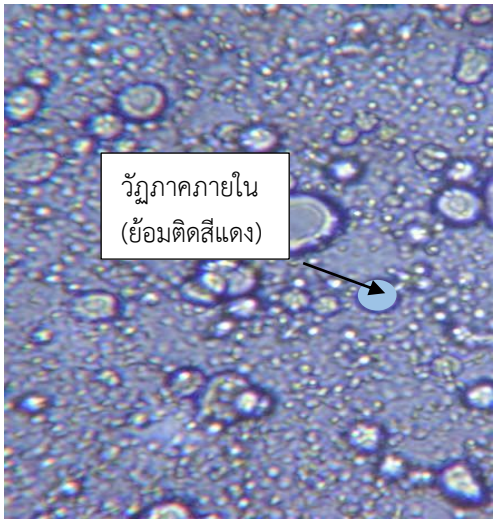
ภาพที่ 4.7 ก. การกระจายตัวของวัฏภาคภายในของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w)



ภาพที่ 4.7 ข แสดงการกระจายตัวของวัฏภาคภายนอกของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w)



ภาพที่ 4.8 ก การกระจายต้วของวัฏภาคภายนอกของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)



ภาพที่ 4.8 ข แสดงการกระจายตัวของวัฏภาคภายในของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o)

จากภาพที่ 4.7 ก และภาพที่ 4.7 ข ภาพแสดงการกระจายตัวของวัฏภาคภายในและภายนอกของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) ภาพที่ 4.8 ก และภาพที่ 4.8 ข แสดงการกระจายตัวของวัฏภาคภายนอกและภายในของครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) พบว่าทั้งวัฏภาคภายนอกและวัฏภาคภายในของครีมแอสต้าแซนทินทั้ง 2 ตำรับสูตร คือครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) และครีมแอสต้าแซนทินชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) มีการกระจายตัวที่ดีและจัดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบ มีประโยชน์ต่อตำรับสูตรอย่างมาก มีผลต่อลักษณะของเนื้อครีม ทำให้เนื้อครีมเนียนละเอียดน่าใช้ เป็นคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

4.5 การแพร่ซึมผ่านเยื่อสังเคราะห์

ในการทดสอบการแพร่ซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ของการสุ่มตัวอย่างจากตัวรับ (receptor) ที่เกิดการแพร่ซึมผ่านในช่วงเวลาปกติ ภายใต้ steady-state ในกระบวนการแพร่ซึมผ่านที่สอดคล้องกับกฎของ Fick's

$$\frac{dQ}{dt} = P_s(c_D - c_R) \qquad (1)$$

P_s (cm/h) เป็นค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ซึมผ่านผิวหนัง และ c_D และ c_R (µg/cm³) เป็นค่าความเข้มข้นของสารสำคัญในตัวให้ (donor) และตัวรับ (receptor) ค่า Q (µg/cm³) เป็นปริมาณของสารสำคัญที่แพร่ซึมผ่านผิวหนังต่อหนึ่งตารางเซนติเมตร

$$Q = P_s(c_D - c_R)t \qquad (2)$$

จำนวน Q ที่แตกต่างกันมีค่าความเป็นเส้นตรงกับเวลา สอดคล้องกับสมการที่ 2 ถ้าค่า c_D » c_R เบี่ยงเบนจากพฤติกรรมเชิงเส้น พบว่า ในช่วงการแพร่ซึมผ่านของวิตามินที่ละลายในน้ำจากอิมัลชันรูปแบบ o/w เนื่องจากการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วสมดุลกับสารสำคัญในอิมัลชัน

ผลของการแพร่ซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์ polyethersulfone ดังตารางที่ 4.3 สารสำคัญที่ละลายในน้ำจะถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสำคัญ (แอสตาแซนติน) ที่ละลายในไขมัน ในการปลดปล่อยวิของสารสำคัญจะขึ้นอยู่กับชนิดของสูตรตำรับ รูปแบบของตำรับที่มีน้ำอยู่ภายนอก (o/w) จะปลดปล่อยสารสำคัญอย่างมีนัยสำคัญมากขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าอิมัลชัน w/o โดยไม่คำนึงถึงโครงสร้างของแอสตาแซน แอสตาแซนตินมีขั้วน้อย ทั้งสองปัจจัยการไล่ระดับการแพร่ซึมผ่านนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในค่า P_s การทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่าเนื้อเยื่อสังเคราะห์ polyethersulfone จะถูกดูดซึมมากกว่าหนังกำพร้ามนุษย์สังเคราะห์ เยื่อสังเคราะห์ Polycarbonate (0.01 µm pore size) ภายใต้การตั้งค่าการทดลองที่เหมือนกันมีผลต่อการ การแพร่ซึมผ่านของแอสตาแซนติน เยื่อสังเคราะห์ polycarbonate จึงไม่ได้เป็นรูปแบบที่เหมาะสมกับการศึกษาการปลดปล่อยของสารสำคัญจากตำรับสูตรเครื่องสำอาง

ตารางที่ 4.3 การแพร่ซึมผ่านของวิตามินจากตำรับสูตรเครื่องสำอางสู่ผิวหนังสังเคราะห์ RHE และ Polyethersulfone

ตำรับ	สารสำคัญ	Polyethersulfone membrane			RHE menbrane		
		L_t (h)	$Jx10^3$ ($mg/cm^2/h$)	P_sx10^3 (cm^2/h)	L_t (h)	$Jx10^3$ ($mg/cm^2/h$)	P_sx10^3 (cm^2/h)
w/o emulsion	Control	0	209.6±3.20	19.13±0.53	6.83±0.23	52.34±8.76	146.1±2.35
	Astrasantrin	4.56±1.43	3.11±1.20	0.052±0.032	~0	~0	~0
o/w emulsion	Control	0	866.22±14.5	69.16±0.48	6.15±0.89	0.065±0.001	0.36±0.02
	Astrasantrin	0.45±0.09	6.90±0.14	0.34±0.02	>17	~0	~0

4.6 การแพร่ซึมผ่าน Reconstructed human epidermis (RHE)

จากการทดลองการแพร่ซึมผ่านด้วยเยื่อ RHE พบการซึมผ่านอย่างช้า ๆ กับการศึกษาเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวขยายเวลาเป็น 10 ชั่วโมง มีการติดตามผลในวันถัดไปได้ถึง 24 ชั่วโมง เปลี่ยนการเคลื่อนไหวโดยทั่วไปตามภาพที่ 12 แสดงให้เห็นรูปแบบการแพร่ซึมผ่านเชิงเส้นตามที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้สำหรับเยื่อสังเคราะห์ ซึ่งการซึมผ่านเกิดขึ้นเรื่อย ๆ โดยส่วนใหญ่การซึมผ่านเหมือนกระบวนการขนส่ง RHE ขนาดของดมเลกุลขนาดใหญ่ของแอสตาแซนติน จะส่งผลให้การแพร่ซึม RHE ช้า และเนื่องจากแอสตาแซนตินละลายได้ดีในไขมัน อาจเป็นเพราะมีสัมพรรคภาพสูงกับสตราตัมคอร์เนียมและชั้นไขมันใต้ผิวหนัง โดยทั่วไป RHE จะถูกคัดเลือกการแพร่ซึมผ่านของสารสำคัญมากกว่าเยื่อสังเคราะห์และค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ซึมผ่านได้ถึงสองเท่า ขนาดโมเลกุลที่เล็กต่ำกว่าทดสอบด้วยเนื้อเยื่อสังเคราะห์ polyethersulfone การเลือกที่จำเพาะเจาะจงของ RHE สูงทำให้เห็นว่ามีรูปแบบอื่นๆ มากมายที่จะเลียนแบบพฤติกรรมในร่างกายมากกว่าเยื่อสังเคราะห์ ดังนั้นโมเลกุลของแอสตาแซนตินจะมีการแพร่ซึมผ่านที่ลดลง การปลดปล่อยของสารที่แพร่ซึมผ่าน RHE คล้ายคลึงกับ polyethersulfone