รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน

Study of porcine skin as the barrier membrane in vitro permeation of flavonoids in *Pluchae indica* leaf extract from the microemulsion formula

นางสาวขวัญจิต อิสระสุข
นางสาวปิยนุช พรมภมร
นางสาวกัลยาภรณ์ จันตรี
รศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
นายธรรมนูญ รุ่งสังข์

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน

Study of porcine skin as the barrier membrane in vitro permeation of flavonoids in *Pluchae indica* leaf extract from the microemulsion formula

นางสาวขวัญจิต อิสระสุข
นางสาวปิยนุช พรมภมร
นางสาวกัลยาภรณ์ จันตรี
รศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
นายธรรมนูญ รุ่งสังข์
(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561)

หัวข้อวิจัย	ศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน
ผู้ดำเนินการวิจัย	นางสาวขวัญจิต อิสระสุข นางสาวกัลยาภรณ์ จันตรี นางสาวปิยนุช พรมภมร นายธรรมนูญ รุ่งสังข์ รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ
หน่วยงาน	หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2562

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน สกัดใบขลู่ด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 99 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay และAluminium chloride method ตามลำดับ พบว่า สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 54.61±0.53 mgGAE/กรัมสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 536.18±2.31 mgQE/กรัมสารสกัด วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ในสารสกัดใบขลู่ด้วยวิธี High performance liquid chromatography พบว่าสารสกัดใบขลู่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid เท่ากับ 9.359 ug/mL การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดที่สกัดมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่กำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% เท่ากับ 0.4638±0.058 mg/mL เทียบกับสารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี สารสกัดใบขลู่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์ ทดสอบด้วยวิธี SRB assay เตรียมตำรับไมโครอิมัลชันในรูปแบบน้ำมันในน้ำด้วยแบบจำลองภาพ pseudo-ternaryphase diagrams พบว่า ตำรับที่เหมาะสมประกอบด้วยสารสกัดใบขลู่ 0.2 ร้อยละโดยน้ำหนัก ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่ด้วยเครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 24.397±1.20 nm และมีค่าการกระจายตัวเฉลี่ยเท่ากับ 0.397±0.05 ประเมินตำรับไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่ทางเคมีกายภาพ พบว่า ไมโครอิมัลชันมีสีเขียวใส เป็นเนื้อเดียวกัน และมีความหนืด

เล็กน้อย มีค่าสี L*a*b* เท่ากับ +8.29±0.76, +2.27±0.07, +0.26±0.09 ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 6.08 ประเมินความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ที่สภาวะอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน อุณหภูมิร้อนสลับเย็นเป็นเวลา 6 รอบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน ผลการประเมิน พบว่า ไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดมีความคงตัวดี ไม่เปลี่ยนแปลงทุกสภาวะที่ทดสอบโดยเทียบกับสภาวะเริ่มต้น และผลการประเมินการแพร่ซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดใบขลู่ที่เตรียมในรูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถแพร่ผ่านชั้นผิวหนัง Stratum corneum ได้ จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดจากใบขลู่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวหนังได้

Research Title	Study of porcine skin as the barrier membrane in vitro permeation of flavonoids in *Pluchae indica* leaf extract from the microemulsion formula
Researcher	Miss Khwunjit Itsarasook Miss Kanlayaporn Chantree Miss Piyanuch Prompamorn Mr. Tammanoon Rungsang Assoc. Prof. Tasanee Panichakul, Ph.D
Research Consultants	Prof. Apichart Suksamrarn, Ph.D
Organization	Cosmetic Science Program Faculty of Science and Technology Suan Dusit University
Year	2019

This study was aimed to study the porcine skin as the barrier membrane in vitro permeation of flavonoids in *Pluchae indica* leaf extract from the microemulsion formula. Dried leaves of *P. indica* was extracted with ethanol 99% using a maceration technique. The total phenolics and total flavonoids content in the crude extract were determined by Folin-Ciocalteu assay and Aluminium chloride method, respectively. Total phenolic and total flavonoid contents in the extract were 54.61±0.53 mg GAE/g extract and 536.18±2.31 mg QE/g extract, respectively. The 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid content in the crude extract was 9.359 µg/mL, determined by HPLC method. The antioxidant potential of extract determined by DPPH assay. Result found that the extract showed a possessed the antioxidant activity with an EC_{50} value of 0.4638±0.058 mg/mL compared with L-ascorbic acid, used as a positive control. The extract had not cytotoxicity to normal human skin fibroblast cell, according to SRB assay. The formulation of microemulsion containing the extract was prepared by pseudo-ternary phase diagrams. The optimal formula consisted of the extract 0.2 %w/w. The prepared formula provided a mean particle size of 24.397±1.20 nm with average minimum polydispersity index (PDI)

of 0.397±0.05. The morphology of the prepared microemulsion was assessed by transmission electron microscopy (TEM) result found that prepared microemulsion shown a spherical shape. The physical appearance of prepared microemulsion showed a dark green color with homogeneously formula and slightly viscosity. The color L*a*b* values was +8.29±0.76, +2.27±0.07, +0.26±0.09, respectively. The pH value was 6.08. Physiochemical stability of the prepared microemulsion was evaluated; storage at room temperature for 3 months, heating-cooling cycle for 6 cycles, 50 ^{0}C and 4 ^{0}C for 1 month. The results found that the prepared microemulsion showed a good stability. Finally, the extract prepared in microemulsion could penetrate the stratum corneum as a skin barrier. The sum of the findings indicated that possible applications for the microemulsion containing *P. indica* extract in skin cosmetic products.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสถาบันวิจัยและพัฒนา (สวพ.) มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง “ศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน”

ขอขอบคุณ นางสาวพนิตชญา รัตนสมบัติทวี นางสาวสุภาวดี แก้วหาญ และนางสาวชลธิชา สุนัน นักศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ผู้มีส่วนร่วมทำให้โครงการนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี และห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต สำหรับความอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

คณะผู้วิจัย

2562

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
โครงสร้างผิวหนัง (Skin structure)	5
การซึมผ่านผิวหนัง (Permeation)	7
ขลู่ (*Pluchea indica* (L) Less.)	12
ไมโครอิมัลชัน (Microemulsions)	14
กรอบแนวคิดในการวิจัย	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย	19
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	19
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	19
วิธีการดำเนินการวิจัย	20
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	23

บทที่ 4 ผลการวิจัย 24
การสกัดใบขลู่ (Extraction) 24
การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) 24
การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) 24
การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบใบขลู่ 25
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) 28
การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของสารสกัดใบขลู่ 31
การเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำกักเก็บสารสกัดใบขลู่ 31
การประเมินลักษณะของไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดใบขลู่ 33
การประเมินความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันทางเคมีกายภาพ 36
การทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง (In vitro permeation) 38

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 39
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 39
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 41
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 41

บรรณานุกรม 42
บรรณานุกรมภาษาไทย 42
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ 42

ภาคผนวก 47
ภาคผนวก ก การคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%Yield) 48
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบขลู่ 50
ภาคผนวก ค การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 53

ประวัติผู้วิจัย 56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ข้อแตกต่างระหว่างไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชัน และอิมัลชัน	16
4.1	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบขลู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	28
4.2	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) วิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	29
4.3	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์	31
4.4	ผลการประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่	34
4.5	ผลการประเมินความคงตัวทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่	37
ข-1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร	51
ข-2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบขลู่	51
ข-3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอซิทินที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร	52
ข-4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบขลู่	52
ค-1	ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบขลู่	54
ค-2	ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของผิวหนัง	5
2.2	ส่วนประกอบของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (Epidermis layer)	6
2.3	เส้นทางการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนัง	8
2.4	ลักษณะโครงสร้างที่เป็นอิฐ (brick) และปูน (mortar)	9
2.5	แผนภาพของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม แสดง A เป็นลักษณะของคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเหมือนก้อนอิฐ B แสดงคอร์นีโอไซต์และส่วนไขมันที่อยู่ในช่องว่างระหว่างคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar 2-3 ชั้นสลับกับชั้นน้ำ C แสดงความหนาของ ชั้น lipid lamellar D แสดงตำแหน่งของชั้นไขมันมีขั้วและไม่มีขั้วที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และE แสดงส่วนประกอบของ lipid lamellar ที่มีไขมัน 85% และมีโครงสร้าง desmosomes 15% ของพื้นที่ทั้งหมด	10
2.6	กระบวนการแบ่งส่วน (partition) และการแพร่ (diffusion) ของสารผ่านคอร์นีโอไซต์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม	11
2.7	ลักษณะของใบขลู่	13
2.8	โครงสร้างทางเคมีของ 4,5-O-dicaffeoylquinic acid	14
2.9	ไมโครอิมัลชันชนิดต่าง ๆ; (ก) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) (ข) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) และ(ค) ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous)	15
4.1	ลักษณะของสารสกัดหยาบใบขลู่	24
4.2	โครมาโทแกรมของสารสกัดใบขลู่	26
4.3	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid	27
4.4	ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบขลู่	29
4.5	ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของวิตามินซี	30
4.6	แผนภาพเฟสไดอะแกรมของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ	32
4.7	ลักษณะทางกายภาพภายนอกของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่	32

		หน้า
4.8	ลักษณะลำแสงที่ส่องผ่านระบบคอลลอยด์ไมโครอิมัลชัน	33
4.9	ขนาดและการกระจายตัวของหยดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่	35
4.10	ลักษณะรูปร่างของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 25000 เท่า	36
ข-1	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	51
ข-2	กราฟมาตรฐานของเควอซิทิน	52

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การประเมินการซึมผ่านสารสำคัญผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง จะอาศัยหลักการแพร่และใช้อุปกรณ์ทดสอบที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนให้ (donor) ส่วนรับ (receptor) โดยมีแผ่นกั้น (barrier) ซึ่งมักจะเป็นผิวหนังหรือแผ่นจำลองเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นแนวทางเบื้องต้นก่อนการคัดสรรสูตรตำรับที่ให้การปลดปล่อยสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง ซึ่งนอกจากจะใช้หาปริมาณและอัตราเร็วการซึมผ่านแล้วยังช่วยให้ได้ข้อมูลรับรองความปลอดภัย (safety) ก่อนการทดสอบในคนได้ระดับหนึ่ง ดังนั้นจึงบรรจุเป็นหนึ่งในข้อปฏิบัติการทดสอบขององค์กรระหว่างประเทศเช่น สมาคมผู้ผลิตอุตสาหกรรมและผู้ค้าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในยุโรป (COLIPA, 1997) การเลือกแผ่นกั้น (barrier) ที่ใช้ในการทดสอบจะเน้นให้เลียนแบบความสามารถของเซลล์ผิวหนังชั้นบนสุดของคน คือ ชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งต้องประกอบด้วยชั้นไขมันเรียงตัวเป็นสองชั้นที่บรรจุแน่นหนา (densely-packed lipid bilayers) ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังมีลักษณะเป็นช่องแคบและคดเคี้ยว (narrow and tortuous tunnels) ทำให้จำกัดอัตราการซึมผ่านผิวหนัง (rate limiting) ได้ แต่ขณะเดียวกันก็สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยตัวทำละลายจำพวกไกลคอล (glycol) หรือแอลกอฮอล์ (alcohols) (Barry, 2001; Williams & Barry, 2004) หากสารสามารถซึมผ่านส่วนกั้นนี้ไป จะมีโอกาสผ่านเข้าไปสู่ระบบภายในร่างกายได้ การใช้ผิวหนังของคนมีข้อจำกัดหลายประการ (Gabbanini et al., 2009) อาทิเช่น ผิวหนังที่ใช้ต้องได้จากคน ซึ่งขณะตัดออกต้องยังมีชีวิตอยู่ อายุการใช้งานไม่นานและต้องเก็บรักษาด้วยการควบคุมอย่างดี ความแตกต่างระหว่างผิวหนังบริเวณต่าง ๆ ทำให้มีความนิยมใช้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องของอาสาสมัครที่เข้ารับการผ่าตัดและมีการตัดผิวหนังบริเวณหน้าท้องออก ด้วยข้อจำกัดต่าง ๆ ดังกล่าวจึงมีความพยายามในการสรรหาแผ่นกั้นสังเคราะห์หรือผิวหนังอื่น ๆ เช่น คราบงู (Priprem et al., 2008) ผิวหนังหนูหรือหนังหมู (Diembeck et al., 1999; Meyer et al., 1987) ผิวหนังหมูมีโครงสร้างและส่วนประกอบใกล้เคียงกับผิวหนังคน จึงมีงานวิจัยแสดงคุณลักษณะของการซึมผ่านผิวหนังเทียบได้ใกล้เคียงกับผิวหนังคน (Kanikkannan et al., 2000; อรุณศรี ปรีเปรม และคณะ, 2554) แม้จะมีข้อตกลงระงับการจำหน่ายผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง (6 th Amendment to the Cosmetics Directive 93/35/EEC) ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2531 เป็นต้นมา แต่ก็มีข้อแนะนำให้ใช้ได้ในกรณีการประเมินการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองโดยมิได้เป็นผลกระทบต่อสัตว์โดยตรง (COLIPA, 1997)

การนำพืชสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้รับความนิยมเพิ่มสูงขึ้น สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) จะเป็นความต้องการในการคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์ เพื่อหวังผลในการเป็นสารต้านการอักเสบ ชะลอวัย (Malhotra & Subban, 2008; Javanmardi et al., 2003) การลดริ้วรอยและลดความหมองคล้ำที่ผิวหนังทำให้เครื่องสำอางที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชได้รับความนิยมของผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด สารสำคัญในสมุนไพรที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ สารในกลุ่มโพลีฟีนอล สารกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Zheng & Wang, 2001) การที่มีสารในกลุ่มเหล่านี้ในปริมาณที่สูงก็มีส่วนทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นด้วย และน่าจะมีผลที่ดีต่อผิวหนังเพิ่มขึ้นด้วย ขลู่มีชื่อภาษาอังกฤษ คือ Indian Marsh Fleabane ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pluchea indica* Less. จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีรายงานวิจัย พบว่า ในสารสกัดใบขลู่พบองค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วยสาร Caffeoylquinic derivatives (Arsiningtyas et al., 2014), กลุ่ม flavonol aglycones (quercetin, kaempferol, myricetin) (Traithip, 2005; Andarwulan et al., 2010) และกลุ่ม terpenoid (10*S*,11*S*-himachala3(12)-4-diene) (Widyawati et al., 2013) ซึ่งจากรายงานวิจัย พบว่าองค์ประกอบ ทางเคมีหลักที่พบในสารสกัดใบขลู่ ได้แก่ อนุพันธ์ของ caffeoylquinic เช่น 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid และ 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid (Shukri et al., 2011; Kongkiatpaiboon et al., 2018) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสำคัญกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity), ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity), ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase และเอนไซม์ alpha-glucosidase (Xu et al., 2012; Vongsak et al., 2013; Chen et al., 2014; Arantes et al., 2016; Motaal et al., 2016)

นอกจากการค้นพบสารสำคัญใหม่ ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่แยกสกัดมาจากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพตรงกับความต้องการแล้ว การเตรียมให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์โดยใช้หลักการของระบบนำส่ง (delivery system) เพื่อส่งเสริมการออกฤทธิ์ และ/หรือประสิทธิภาพของสารสำคัญ ช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านของสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังช่วยรักษาความคงตัวของสารสำคัญ และความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ให้คงไว้ได้นานยิ่งขึ้น ระบบนำส่งในรูปแบบไมโครอิมัลชัน เป็นอิมัลชันที่มีขนาดหยดวัฏภาคภายในขนาดเล็ก โดยมีขนาดอยู่ที่ 10 ถึง 100 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งใส หรือโปร่งแสง สามารถเพิ่มการละลายและสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี เช่น ทางปาก ทางผิวหนัง เป็นต้น ไมโครอิมัลชันแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันในน้ำ (oil in water) น้ำในน้ำมัน (water in oil) ไบคอนทินิวอัส (bicontinuous) และมีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) เป็นตัวทำให้เกิดความคงตัวด้วยฟิลม์ระหว่างผิว (interfacial film) และการที่ขนาดหยดของวัฏภาคภายในนั้นเล็ก จะส่งผลให้สารสำคัญที่ถูกกักเก็บอยู่ในหยดของวัฏภาคภายใน

สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นในมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ปัญหาการเกิดการแยกชั้นของวัฏภาคน้ำหรือน้ำมันลดลง

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการสกัดสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบขลู่ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบความปลอดภัย (cytotoxicity) แล้วตั้งตำรับกักเก็บสารสำคัญให้อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชัน แล้วศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง โดยควบคุมปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นต้น ตามวิธีการในข้อกำหนดการผ่านผิวหนังของ COLIPA

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบขลู่
3. เพื่อทดสอบความปลอดภัยของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์
4. เพื่อตั้งตำรับไมโครอิมัลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบขลู่
5. เพื่อศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง

ขอบเขตการวิจัย

1. เตรียมสารสกัดใบขลู่ ด้วยวิธีการหมัก (maceration technique) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 99%
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ด้วยวิธี DPPH assay
3. วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบขลู่ Folin-Ciocalteu assay และ Aluminium chloride method ตามลำดับ
4. ทดสอบความปลอดภัยของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ด้วยวิธี SRB assay
5. ตั้งตำรับไมโครอิมัลชันในรูปแบบน้ำมันในน้ำด้วยแบบจำลองแผนภาพ pseudo-ternary phase diagrams
6. ทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cell

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

การซึมผ่าน (permeation) ในการนำส่งสารทางผิวหนัง เป็นปรากฏการณ์ที่โมเลกุลของสารสำคัญเคลื่อนที่สู่ผิวหนัง โมเลกุลของสารนี้ต้องละลายอยู่ในกระสายยาที่เป็นของเหลว หรืออาจเป็นโมเลกุลของสารที่สามารถเกิดการไหลได้ด้วยตัวเอง การถ่ายโอนของมวลสารเป็นตามกฎการแพร่ของฟิคส์ (Fick's diffusion law) แรงขับที่ต้องการเพื่อให้เกิดการแพร่นี้เป็นพลังงานทางเทอร์โมไดนามิกส์ของเกรเดียนส์ความเข้มข้น (concentration gradient)

ไมโครอิมัลชัน เป็นระบบตัวพานาโนชนิดไขมันชนิดหนึ่งที่มีส่วนประกอบเป็น น้ำมัน น้ำ และสารลดแรงตึงผิว ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่ดึงดูดผู้ใช้จากการที่มีลักษณะโปร่งแสง มีความหนืดต่ำ มีความคงตัวทางอุณหพลวัต (thermodynamic) ที่ดี และมีวิธีการเตรียมที่ง่ายจากการผสมสารเข้าด้วยกัน

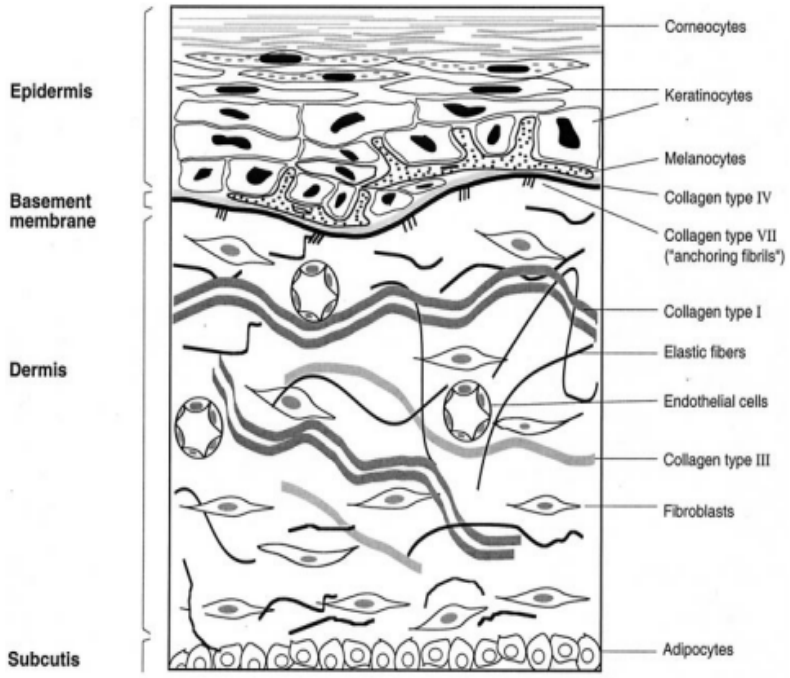
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตำรับไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดใบขลู่ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสารฟลาโวนอยด์และมีความปลอดภัยต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แล้วทดสอบการแพร่ผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างของผิวหนัง (Skin structure)

ผิวหนังคนเป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ผิวมากที่สุดในร่างกาย ทำหน้าที่สำคัญในการปกป้อง ควบคุมอุณหภูมิ และการสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย และยังทำหน้าที่ในการป้องกันไม่ให้สารแปลกปลอม เช่น สารเคมี และจุลินทรีย์จากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย (Sinko, 2006) โดยทั่วไปผิวหนังประกอบด้วย สตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) (10-20 ไมโครเมตร) ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่มีชีวิต (ประมาณ 100 ไมโครเมตร) ชั้นหนังแท้ (dermis) (0.1-0.5 เซนติเมตร) และเนื้อเยื่อไขมัน (subcutis) ซึ่งติดอยู่กับชั้นของกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2.1) (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2552)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของผิวหนัง
ที่มา: Scharffetter et al. (2000)

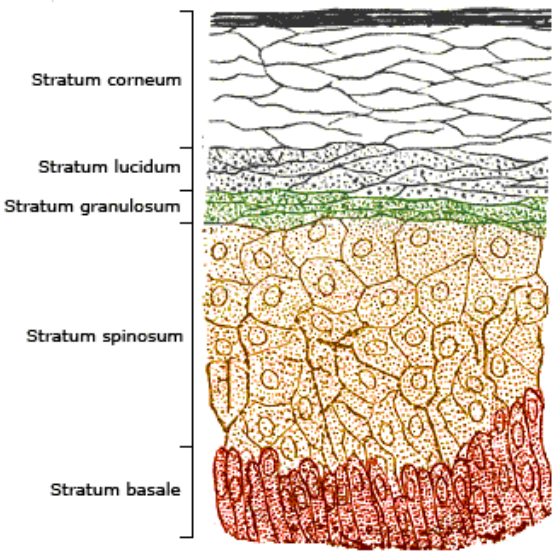
ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis layer)

ส่วนของชั้นหนังกำพร้าประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ ดังนี้ สตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum หรือ honey layers) สตราตัมลูซิดัม (stratum lucidum) สตราตัมแกรนูโลซัม (stratum

granulosum) สตราตัมสไปโนซัม (stratum spinosum) และสตราตัมบาเซล (stratum basale) ดังแสดงในภาพที่ 2.2

ชั้นสตราตัมคอร์เนียม หรือ honey layers เป็นเซลล์หนังชั้นนอกที่ไม่มีชีวิต ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนัง ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์คอร์นีโอไซต์ (corneocyte cells) ซึ่งเป็นเซลล์หกเหลี่ยม มีลักษณะแบน เรียงตัวซ้อนกัน 15-35 เซลล์ โดยมีโครงสร้างแบบอิฐและปูน (brick and mortar model) คือ เซลล์เรียงต่อกันเหมือนก้อนอิฐ โดยมีไขมันระหว่างเซลล์ทำหน้าที่เป็นปูนยึดเซลล์ให้ติดกัน แต่ละเซลล์ประกอบด้วยมัดของเคราติน (keratin) (ประมาณ 70%) และไขมัน (ประมาณ 20%) ที่ถูกห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์ ระหว่างเซลล์เป็นไขมันและเดสโมโซม (desmosomes) ซึ่งทำให้เซลล์ยึดติดกัน การจัดเรียงโครงสร้างเช่นนี้ทำให้เนื้อเยื่อส่วนนี้ทนต่อแรงเฉือนที่มากระทำ (Walters & Roberts, 2002) ส่วนของไขมันระหว่างเซลล์ประกอบด้วยคอเลสเตอรอล (cholesterol) ประมาณ 27% เซราไมด์ (ceramides) ประมาณ 4% กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ประมาณ 9% คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) ประมาณ 10% และคอเลสเตอรอลซัลเฟต (cholesterol sulfate) ประมาณ 2% ซึ่งสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้มีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งบนร่างกาย

ชั้นสตราตัมบาเซล (stratum basale) ประกอบด้วยเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocytes cells) เซลล์แลงเกออานส์ (Langerhans cells) เซลล์เมอเคิล (merkel cells) และเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte cells) 2 ชนิด ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) และยึดผิวหนังชั้นนอกให้ติดกับเมมเบรนชั้นพื้น (basement membrane)



ภาพที่ 2.2 ส่วนประกอบของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (Epidermis layer)
ที่มา: Gray (1918)

ชั้นหนังแท้ (Dermis layer)

ชั้นหนังแท้มีความหนาประมาณ 0.1-0.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยชั้นร่างแหของคอลลาเจน (collagen) เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ประกอบด้วยคอลลาเจน (collagen) ลามินิน (laminin) ไฟโบรอิน (fibroin) และไฟโบรเนคติน (fibronectin) (ภาพที่ 2.1) ชั้นหนังแท้เป็นแหล่งสารอาหาร ระบบคุ้มกัน และระบบค้ำจุนชั้นหนังกำพร้า รวมทั้งเกี่ยวข้องในการควบคุมอุณหภูมิ ความดัน และความเจ็บปวด ชั้นหนังแท้ติดต่อกับเส้นเลือดแดง ต่อมน้ำเหลือง ปลายประสาท ต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อ ร่างแหของเส้นเลือดจำนวนมากทำหน้าที่ในการเป็นแหล่งสารอาหาร ออกซิเจน ซ่อมแซม และการตอบสนองภูมิคุ้มกันให้กับผิวหนัง

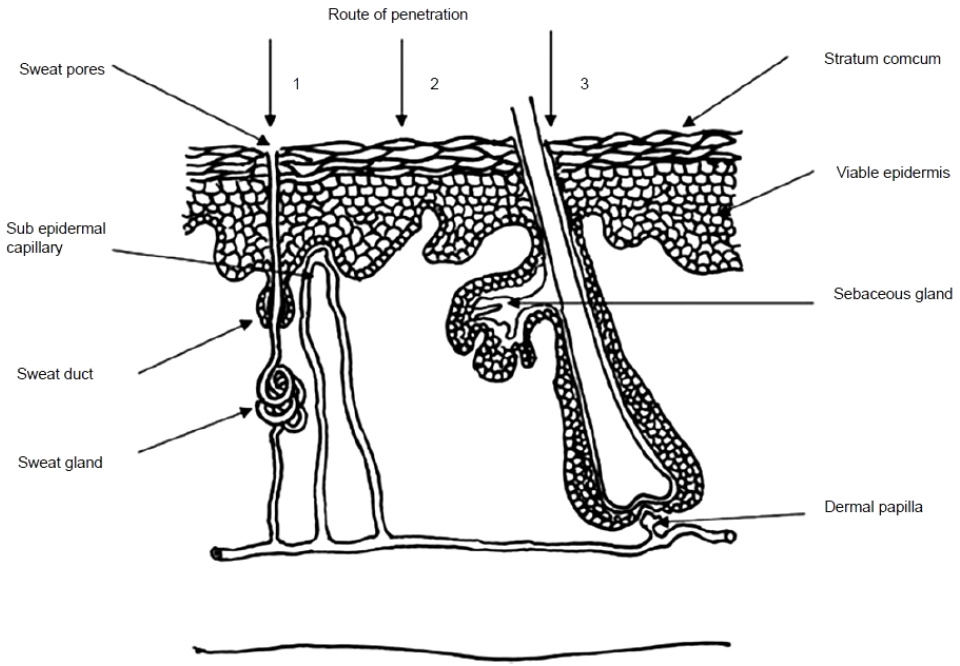
ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous fat layer)

ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง หรือไฮโปเดอร์มิส (hypodermis) เป็นผิวหนังชั้นลึกที่สุด ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน (fat cells) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) และแมคโคฟาจ (macrophage) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฉนวนร่างกาย และปกป้องผิวหนังจากแรงกระแทกภายนอก

การซึมผ่านผิวหนัง (Permeation)

การซึมผ่าน (Permeation) ในการนำส่งสารทางผิวหนัง เป็นปรากฏการณ์ที่โมเลกุลของสารสำคัญเคลื่อนที่สู่ผิวหนัง โมเลกุลของสารนี้ต้องละลายอยู่ในกระสายยาที่เป็นของเหลว หรืออาจเป็นโมเลกุลของสารที่สามารถเกิดการไหลได้ด้วยตัวเอง การถ่ายโอนของมวลสารเป็นตามกฎการแพร่ของฟิคส์ (Fick’s diffusion law) แรงขับที่ต้องการเพื่อให้เกิดการแพร่นี้เป็นพลังงานทางเทอร์โมไดนามิกส์ของเกรดเดียนส์ความเข้มข้น (concentration gradient)

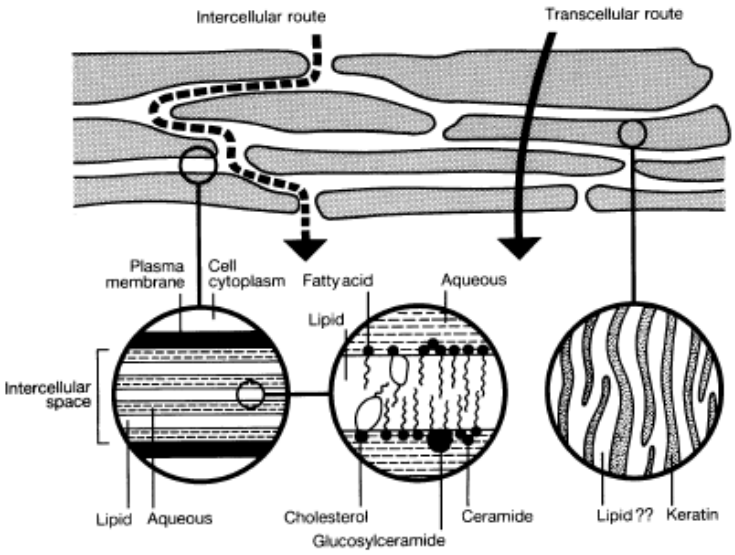
ส่วนบนของผิวหนังที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเศษเซลล์ที่ยึดติดอยู่จุลินทรีย์ ซีบัม และสารอื่นมีผลไม่มากนักต่อการซึมผ่านของสาร สารที่ซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ 3 เส้นทาง ได้แก่ 1) ผ่านทางต่อมเหงื่อ 2) ข้ามผ่านสตราตัมคอร์เนียมที่อยู่ระหว่างท่อบนผิวหนัง 3) ผ่านทางรูขุมขนที่ติดอยู่กับต่อมไขมัน (Barry, 2001) ตามที่แสดงให้เห็นในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 เส้นทางการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนัง
ที่มา: Mathur et al. (2010)

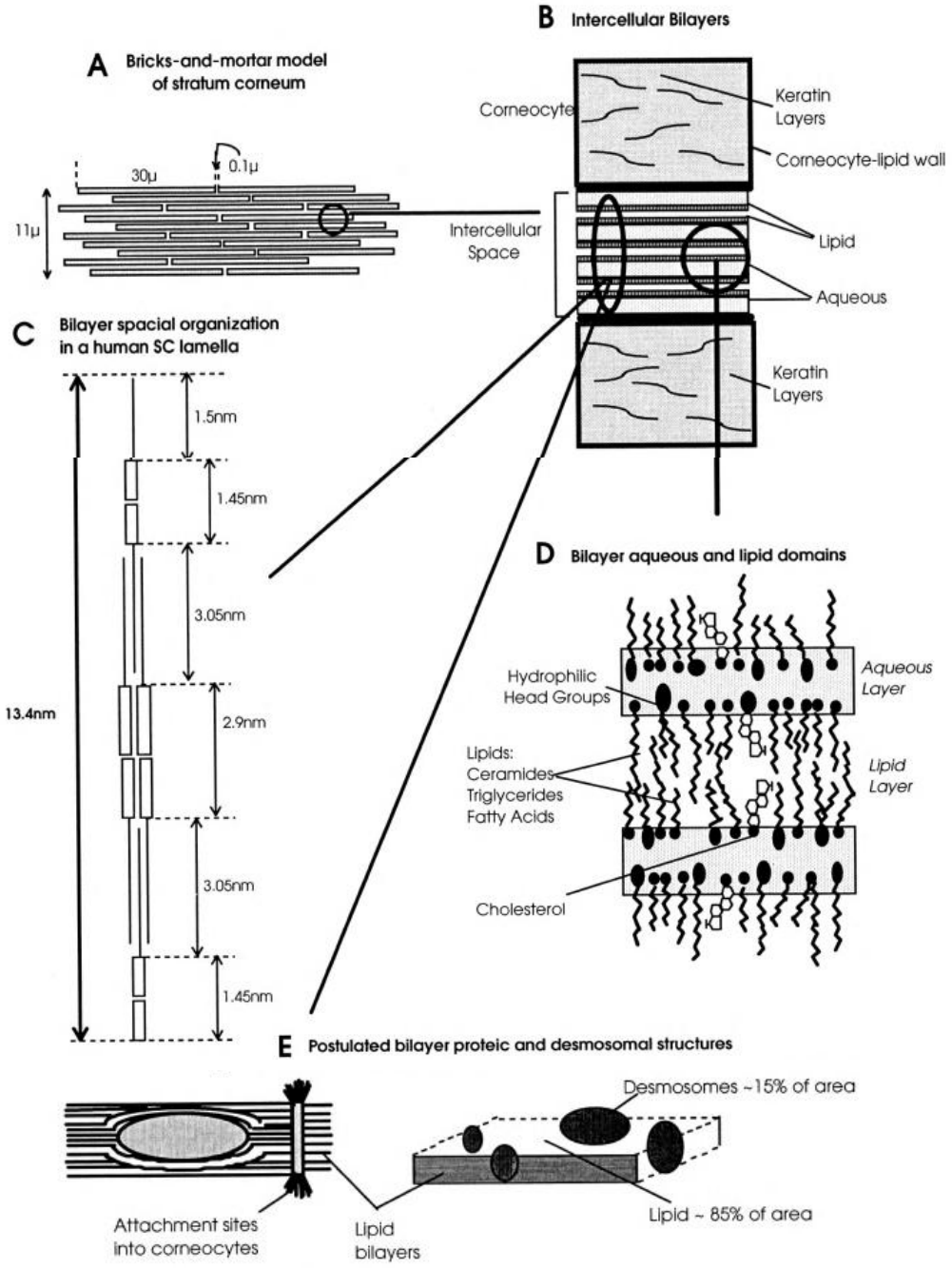
พื้นที่ที่เป็นส่วนท่อบนผิวหนังที่เอื้อต่อการขนส่งสารมีเพียงร้อยละ 0.1 ดังนั้นเส้นทางนี้จึงส่งผลน้อยต่อการทำให้เกิดการแพร่ผ่านในสภาวะที่คงที่ แต่เส้นทางนี้อาจเป็นเส้นทางที่สำคัญของการซึมผ่านผิวของสารประเภทไอออนและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีขั้วที่ไม่สามารถซึมผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ท่อบนผิวหนังทั้งหลายอาจใช้เป็นช่องทางที่มีความสำคัญในช่วงเวลาสั้น ๆ ก่อนที่จะเกิดการแพร่ผ่านอย่างคงที่ นอกจากนั้นพอลิเมอร์ (polymers) และอนุภาคคอลลอยด์ (colloids) สามารถนำส่งสู่เป้าหมายทางช่องรูเปิดเหล่านี้ (Barry, 2001)

ชั้นสตราตัมคอร์เนียมเป็นตัวกั้นที่สำคัญจากโครงสร้างที่เป็นอิฐ (brick) และปูน (mortar) คล้ายผนังตามที่ได้กล่าวมาแล้ว คอร์นีโอไซต์ (corneocytes) ของคีราตินที่ชุ่มชื้นประกอบเป็น “ก้อนอิฐ (brick)” ที่ฝังตัวอยู่ในส่วนที่เป็น “ปูน (mortar)” ที่ประกอบด้วยไขมันสองชั้นหลาย ๆ ชั้น ของเซราไมด์ (ceramides) กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) คอเลสเตอรอล (cholesterol) และคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) ชั้นสองชั้นนี้จะสร้างเป็นบริเวณกึ่งผลึก เจล และผลึกเหลว (liquid crystal) โมเลกุลสารส่วนใหญ่แทรกผ่านผิวหนังทางเส้นทางขนาดเล็กระหว่างเซลล์ (intercellular microroute) (ภาพที่ 2.4) ดังนั้นเทคนิคส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเพิ่มการส่งผ่านเมมเบรน (membrane) มีเป้าหมายที่จะเปลี่ยนแปลง หรือสร้างเส้นทางลัดต่อโครงสร้างอิฐและปูนของผิวหนัง (Barry, 2001)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างที่เป็นอิฐ (brick) และปูน (mortar)
ที่มา: Barry (2001)

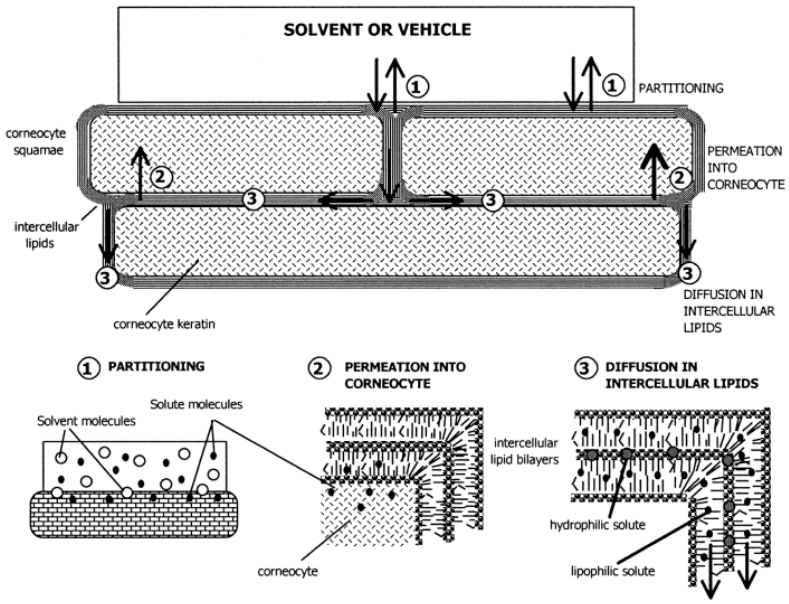
ช่องทางผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intercellular route) คือ การดูดซึมผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งมีไขมันที่มีขั้วหลายชนิดเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ (lipid lamellar) และมีน้ำเก็บกักอยู่ระหว่างชั้นเหล่านี้ สารจะต้องละลายได้บ้างในไขมันเหล่านี้ แต่ต้องไม่ละลายดีจนเกินไป มิฉะนั้นสารจะถูกกักไว้ในชั้นนี้ไม่ถูกปล่อย และถูกดูดซึมหรือกระจายตัวไปยังผิวหนังชั้นถัดไป สารที่ถูกดูดซึมผ่านช่องทางนี้ควรมีความสมดุลระหว่างการละลายในน้ำและน้ำมัน ดังแสดงในภาพที่ 2.5 แสดงแผนภาพของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมโดย A เป็นลักษณะของคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเหมือนก้อนอิฐ B แสดงคอร์นีโอไซต์และส่วนไขมันที่อยู่ในช่องว่างระหว่างคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar 2-3 ชั้นสลับกับชั้นน้ำ และ C แสดงความหนาของชั้น lipid lamellar และ D แสดงตำแหน่งของชั้นไขมันมีขั้วและไม่มีขั้วที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และ E แสดงส่วนประกอบของ lipid lamellar ที่มีไขมัน 85% และมีโครงสร้าง desmosomes 15% ของพื้นที่ทั้งหมด จะเห็นว่าช่องว่างระหว่างเซลล์มีสมบัติทั้งที่ไม่มีขั้วและมีขั้วจากสมบัติของชั้นไขมัน lipid lamellar และน้ำที่เก็บกักในระหว่างชั้นไขมัน ดังนั้นสารที่จะถูกดูดซึมผ่านช่องนี้ ควรมีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนการละลาย (partition coefficient) ระหว่าง octanol และน้ำ ประมาณ 1



ภาพที่ 2.5 แผนภาพของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม แสดง A เป็นลักษณะของคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเหมือนก้อนอิฐ B แสดงคอร์นีโอไซต์และส่วนไขมันที่อยู่ในช่องว่างระหว่างคอร์นีโอไซต์ที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar 2-3 ชั้นสลับกับชั้นน้ำ C แสดงความหนาของ ชั้น lipid lamellar D แสดงตำแหน่งของชั้นไขมันมีขั้วและไม่มีขั้วที่เรียงตัวเป็น lipid lamellar ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และE แสดงส่วนประกอบของ lipid lamellar ที่มีไขมัน 85% และมีโครงสร้าง desmosomes 15% ของพื้นที่ทั้งหมด

ที่มา: Roberts & Cross (2002)

ช่องทางผ่านเซลล์ (Transcellular route) คือ การที่สารผ่านเข้าผิวหนัง โดยผ่านทางเซลล์คอร์นีโอไซต์ (corneocytes) ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม และถูกดูดซึมผ่านเซลล์ชั้นต่าง ๆ ต่อไปเรื่อย ๆ ซึ่งต้องผ่านทั้งส่วนชอบน้ำมันและชอบน้ำ (lipophilic and hydrophilic compartment) สลับกันไป คอร์นีโอไซต์ของชั้นสตราตัมคอร์เนียมเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว มีโปรตีนประเภทคีราติน และคีราโตไฮยาลีน (keratohyaline) สารที่ละลายในน้ำมันจะถูกดูดซึมผ่านโปรตีนเหล่านี้ ในขณะที่สารที่มีขั้ว หรือละลายน้ำจะผ่านบริเวณที่มีน้ำรอบ ๆ โปรตีนเหล่านี้ ดังแสดงที่ภาพที่ 2.6 ซึ่งแสดงกระบวนการการแบ่งส่วน (partition) และการแพร่ (diffusion) ของสารผ่านคอร์นีโอไซต์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมโดย (1) คือ สารแบ่งส่วน (partition) จากยาพื้น (base) มาอยู่บนผิวหนัง (2) คือ สารซึมผ่าน (permeation) คอร์นีโอไซต์ และ (3) คือ สารแพร่ (diffusion) เข้าไปในช่องว่างระหว่างคอร์นีโอไซต์ ดังนั้นความสามารถของสารในการซึมผ่านคอร์นีโอไซต์จึงขึ้นอยู่กับการละลาย (solubility) ซึ่งเกี่ยวข้องกับค่า partition coefficient และความสามารถในการแพร่ (diffusivity) รวมทั้งความแรงของปฏิกิริยาการจับกันระหว่างสารกับยาพื้น และสารกับโปรตีนของคอร์นีโอไซต์และไขมันในช่องว่างระหว่างเซลล์ สารที่จะแพร่ผ่านช่องทางนี้ได้ดีควรละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน



ภาพที่ 2.6 กระบวนการแบ่งส่วน (partition) และการแพร่ (diffusion) ของสารผ่านคอร์นีโอไซต์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม

ที่มา: Rugh et al. (1998)

ขลู่ (*Pluchea indica* (L) Less.)

1. ข้อมูลทั่วไป

ขลู่มีชื่อท้องถิ่น เช่น หนวดงั่ว หนวดงิ้ว หนาดงัว หนาดวัว (อุดรธานี) ขี้ป้าน (แม่ฮ่องสอน) คลู ขลู (ภาคใต้) ชื่อภาษาอังกฤษ คือ Indian Marsh Fleabane ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อพ้อง คือ *Pluchea foliolosa* DC., *Corymbosa Roxb*., *Conyza indica* Mig., *Baccharis indica* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขลู่เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ขึ้นเป็นกอ แตกกิ่งก้านสาขามาก ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดง หรือเขียว ลำต้นและกิ่งก้านมีขนละเอียดปกคลุม ใบเดี่ยว ออกแบบสลับ รูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน ปลายใบมีขนาดใหญ่กว่าโคนใบ โคนใบสอบ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย โดยรอบมีขนขาว ๆ ปกคลุม ก้านใบสั้นมาก เนื้อใบบาง แผ่นใบเรียบเป็นมัน ใบค่อนข้างแข็งและเปราะ ใบมีกลิ่นหอมฉุน ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลาย ๆ ช่อมารวมกัน ดอกเป็นฝอยสีขาวนวลหรือสีขาวอมม่วง กลีบดอกแบ่งออกเป็นวงนอกกับวงใน กลีบดอกวงนอกสั้นกว่าวงใน กลีบดอกวงในเป็นรูปท่อ ดอกวงนอกกลีบดอกยาวประมาณ 3-3.5 มิลลิเมตร ดอกวงในกลีบดอกจะเป็นรูปท่อมีความยาวประมาณ 4-6 มิลลิเมตร ปลายจักเป็นซี่ฟันประมาณ 5-6 ซี่ ภายในมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียสีขาวอมม่วงขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก ปลายกลีบดอกหยักเป็นซี่ฟัน 5-6 หยัก อับเรณูตรงโคนเป็นรูปหัวลูกศรสั้น ๆ เกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉกสั้น ๆ ก้านช่อดอกยาวประมาณ 5-6 มิลลิเมตร ไม่มีก้านดอกย่อย ริ้วประดับมีลักษณะแข็ง สีเขียว และเรียงกันประมาณ 6-7 วง วงนอกเป็นรูปไข่ วงในคล้ายรูปหอกแคบ ปลายแหลม ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก รูปทรงกระบอก ขนาดเล็ก ยาวประมาณ 0.7 มิลลิเมตร ผลเป็นสัน มีขนาดเล็กมาก มีเหลี่ยม 10 สัน มีรยางค์ไม่มาก สีขาว ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร เมล็ดมีลักษณะเป็นฝอยเล็ก ๆ เมื่อแก่จะปลิวไปตามลม ยอดมีรสมันใช้รับประทานเป็นผักสด พบชอบขึ้นตามธารน้ำ ที่ชื้นแฉะ โดยเฉพาะที่ที่น้ำเค็มขึ้นถึง ใบอ่อนใช้รับประทานเป็นผักจิ้มได้ ใบเมื่อนำมาผึ่งให้แห้ง จะมีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นน้ำผึ้ง ใช้ชงดื่มแทนชา (นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539; สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล, 2553)

ภาพที่ 2.7 ลักษณะของใบขลู่
ที่มา: สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล (2553)

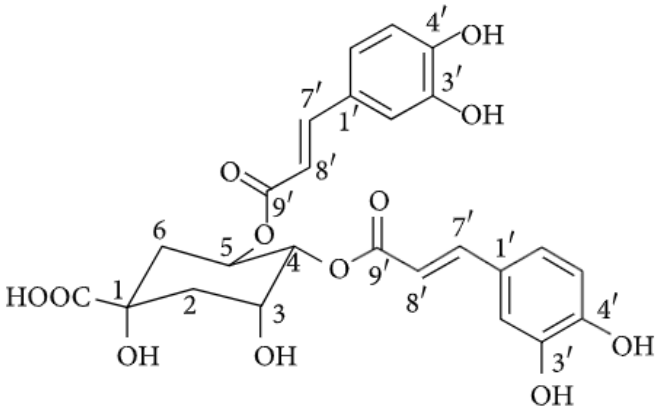
3. สรรพคุณทางยา

ขลู่เป็นพืชที่ชอบขึ้นตามธารน้ำโดยเฉพาะที่น้ำเค็มขึ้นถึง พบทั่วไปในเขตร้อน เช่น ประเทศอินเดีย จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ไทย เป็นต้น เป็นพืชที่ปลูกง่าย โดยใช้กิ่งแก่ปักชำ ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด ในตำรายาไทยใช้ทั้งต้นต้มกินเป็นยาขับปัสสาวะ แก้เบาหวาน ต้มน้ำอาบแก้ผื่นคันน้ำคั้น ใบสดรักษาริดสีดวงทวาร ทั้งต้นสด หรือแห้ง เตรียมเป็นยาต้มรับประทานขับปัสสาวะ แก้โรคนิ่วในไต แก้ปัสสาวะพิการ เป็นยาช่วยย่อย แก้ริดสีดวงทวารหนัก ริดสีดวงจมูก แก้เบาหวาน แก้ประดง แก้เลือดลม และผื่นคันตามผิวหนัง เปลือกต้น เมล็ด แก้ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย เป็นยาอายุวัฒนะ โดยนำมาต้มน้ำรับประทาน หรือต้มน้ำแล้วใช้ไอรมทวารหนัก แก้ริดสีดวงจมูก โดยตากแห้งแล้วเตรียมเป็นยาสูบ ใบ มีกลิ่นหอม ต้มน้ำดื่ม แทนเป็นน้ำชา ฝาดสมาน แก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับเหงื่อ แก้กระหายน้ำ แก้บิด แก้ประดง แก้เลือดลม แก้ริดสีดวงทวาร แก้แผลอักเสบอาจใช้ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็น และต้มน้ำอาบบำรุงประสาท รากรับประทานเป็นยาฝาดสมาน แก้บิด แก้ไข้ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ ใช้รากสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล (นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539; สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล, 2553)

4. องค์ประกอบทางเคมีที่พบในใบขลู่

มีรายงานวิจัย พบว่า ในสารสกัดใบขลู่มีองค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วยสาร Caffeoylquinic derivatives (Arsiningtyas et al., 2014), กลุ่ม flavonol aglycones (quercetin, kaempferol, myricetin) ((Traithip, 2005; Andarwulan et al., 2010) และกลุ่ม terpenoid (10S,11S-himachala3(12)-4-diene) (Widyawati et al., 2013) ซึ่งจากรายงานวิจัย พบว่าองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในสารสกัดใบขลู่ ได้แก่ อนุพันธ์ของ caffeoylquinic เช่น 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid,

3,5-O-dicaffeoylquinic acid และ 4,5-O-dicaffeoylquinic acid (Shukri et al., 2011; Kongkiatpaiboon et al., 2018)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ 4,5-O-dicaffeoylquinic acid
ที่มา: Tabassum et al. (2016)

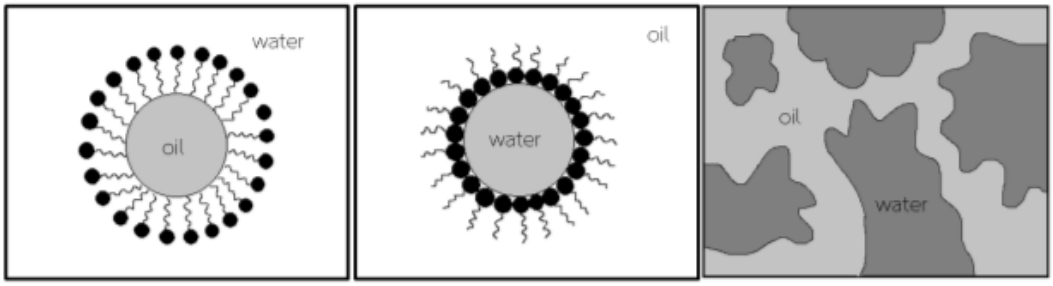
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสำคัญกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase และเอนไซม์ alpha-glucosidase (Xu et al., 2012; Vongsak et al., 2013; Chen et al., 2014; Arantes et al., 2016; Motaal et al., 2016)

ไมโครอิมัลชัน (Microemulsions)

ระบบอิมัลชันนำมาใช้ทางเภสัชกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เพิ่มการละลาย ด้วยการทำให้เกิดการเพิ่มการละลาย (solubilisation) ของตัวยาหรือสารที่ไม่ละลายน้ำ โดยตัวยาส่วนใหญ่เป็นสารที่ละลายน้ำมากและอยู่ในรูปสารชอบลิปิด ไมโครอิมัลชันยังได้นำมาพัฒนาใช้เป็นระบบนำส่งสำหรับช่องทางต่าง ๆ เช่น ทางปาก ทางผิวหนัง และทางตา เป็นต้น ไมโครอิมัลชันสามารถใช้เป็นระบบนำส่งยาสามารถเพิ่มการดูดซึมสารผ่านผิวหนังเมนเบรนและผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (bioavaiability) ของสาร ทำให้มีการพัฒนาและศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำระบบไมโครอิมัลชันเพื่อใช้ในการนำส่งสารต่าง ๆ อย่างมากมายทั้งยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง

ไมโครอิมัลชัน คือ อิมัลชันที่มีขนาดหยดวัฏภาคภายใน 10-100 นาโนเมตร (Burguera & Burguera, 2012) มีลักษณะโปร่งแสงหรือโปร่งใส เป็นระบบที่มีความเสถียรภาพดีทางอุณหพล-ศาสตร์ (thermodynamic) (Ashara et al., 2014) และสามารถเกิดได้เองโดยไม่ต้องอาศัยแรง หรือ

ความร้อนในการเตรียม ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบไปด้วย น้ำมัน (oil) น้ำ (Water) และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) (Abbasi & Radi, 2016) แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) และไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous) (Lawrence & Rees, 2000) ซึ่งเป็นไมโครอิมัลชันที่ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นชนิดใดเนื่องจากมีปริมาณของน้ำ และน้ำมันใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดรูปแบบของสารลดแรงตึงผิวแผ่กระจายต่อเนื่องกันไป ไมโครอิมัลชันทั้ง 3 ชนิดแสดงดังภาพที่ 2.9



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 2.9 ไมโครอิมัลชันชนิดต่าง ๆ; (ก) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) (ข) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) และ (ค) ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous)

ที่มา: Lawrence & Rees (2000)

ระบบไมโครอิมัลชันมีหลายแบบ โดยจะเกี่ยวข้องกับระบบสารละลายไมเซลล์ เนื่องจากทั้งสองระบบมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก เมื่อดูจากส่วนประกอบของระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำมัน น้ำและสารลดแรงตึงผิวจะคล้ายกับระบบอิมัลชันมากแตกต่างกันที่ขนาดและรูปร่างของหยดของเหลวที่กระจายในวัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่งสะท้อนถึงความแตกต่างระหว่างความคงตัวทางอุณหพลวัตของทั้งสองระบบ ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic) แต่ไม่คงตัวทางจลนศาสตร์ และหลังเก็บไว้ระยะหนึ่งอาจเกิดการรวมตัวของหยดของเหลวที่นำไปสู่การแยกชั้นได้ ในทางตรงข้ามไมโครอิมัลชันมีความคงตัวทางอุณหพลวัตจึงไม่เกิดการแยกชั้นของอิมัลชันขนาดเล็ก

ตารางที่ 2.1 ข้อแตกต่างระหว่างไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชัน และอิมัลชัน

สมบัติ	อิมัลชัน		
	นาโนอิมัลชัน	**แมคโครอิมัลชัน**	**ไมโครอิมัลชัน**
ลักษณะที่มองเห็น	โปร่งแสง	ทึบแสงเป็นน้ำนม	โปร่งใส
ขนาดหยดของเหลวภายใน	20-200 นาโนเมตร	> 1 ไมโครเมตร	10-100 นาโนเมตร
ความคงตัว	จลนศาสตร์	-	อุณหพลวัต
การสร้าง	ต้องการพลังงาน	-	เกิดขึ้นได้เอง
ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว	ต่ำ	-	สูง

ที่มา: วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ (2552)

การเตรียมไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันจะเกิดขึ้นเมื่อแรงตึงระหว่างผิวอยู่ในช่วง 104 หรือ 105 dyne/cm^3 อัตราส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ มีความสำคัญต่อการเตรียมไมโครอิมัลชันมาก ไมโครอิมัลชันส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสารก่ออิมัลชัน 10-30% วิธีที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน คือเตรียมเป็นอิมัลชันก่อนแล้วทำการไทเทรตด้วยตัวก่ออิมัลชันร่วมด้วยการกวนผสมธรรมดาจนได้ลักษณะตำรับที่ใส การเตรียมไมโครอิมัลชันต้องมีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคน้ำมันโดยใช้สารก่ออิมัลชันร่วมที่มีค่า HLB (Hydrophile-lipophile balance) เท่ากับน้ำมันที่ใช้ ในกรณีที่ใช้สารก่ออิมัลชันไม่มีประจุอุณหภูมิจะส่งผลต่อค่า HLB โดยมีผลต่อการแทรกตัวของสารก่ออิมัลชันระหว่างวัฏภาค การเพิ่มอุณหภูมิของระบบจะลดค่าการละลายของสารก่ออิมัลชันที่ไม่มีประจุในน้ำและทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันที่ไม่มีประจุไปอยู่ระหว่างวัฏภาคหรือในวัฏภาคน้ำมันมากขึ้น ในกรณีนี้ค่า HLB ของสารทำอิมัลชันจะลดลง แต่ในทางกลับกันถ้าอุณหภูมิมีค่าต่ำลงผลที่ได้จะตรงข้ามกับที่ได้กล่าวมา สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ระหว่าง 3-6 จะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB 8-18 จะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) สารลดแรงตึงผิวควรมีลักษณะ ดังนี้

1) สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำมาก

2) ทำให้ฟิล์มยืดหยุ่นและก่อตัวรอบหยดของเหลว

3) มีค่า HLB เหมาะสมที่จะทำให้เกิดความโค้งระหว่างรอยต่อ เพื่อให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิด w/o, o/w หรือ bicontinuous

Zhu et al. (2008) ได้พัฒนาการตั้งตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งยา penciclovir ซึมผ่านทางผิวหนังที่ประกอบไปด้วย oleic acid, cremorphor EL และ ethanol ที่แทรกซึมผ่านผิวหนังหนู ผลการศึกษา พบว่า ไมโครอิมัลชันดีที่สุดประกอบด้วย oleic acid (5%, w/w), cremorphor EL (20%, w/w), ethanol (30%, w/w) และน้ำ (45% w/w) โดยมีอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 36.5 nm และมีการละลายของตัวยา penciclovir ในตำรับอิมัลชันเป็น 7.41 mgg-1 มีค่าการซึมผ่านผิวหนังหนูในไมโครอิมัลชันเป็นประมาณ 3.5 เท่าของครีมในท้องตลาด สรุปคือ ความสามารถในการซึมผ่านของตัวยา penciclovir เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากสูตรไมโครอิมัลชันเมื่อเทียบกับครีมในท้องตลาด

Badawi et al. (2009) ศึกษาการเตรียมและประเมินไมโครอิมัลชันที่มีส่วนประกอบ salicylic acid โดยเตรียมเจลเบสไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย 35%w/w Isopropyl palmitate (IPM), 20% water, and 45% Tween 80 (surfactant): Propylene glycol (PG) (co-surfactant) ในอัตราส่วน 15:1 ผสมกับ salicylic acid 2%, 5% และ 10% โดยจากการประเมินความคงตัว พบว่า การเตรียมด้วย Salicylic acid 10% จะมีความคงตัวที่สุด

Noridayu et al. (2011) ทำการศึกษาตำรับไมโครอิมัลชันโดยใช้ laser confocal scanning microscopy ในการส่องภาพการซึมผ่านและการกระจายตัวของไมโครอิมัลชัน fluorescently-labelled microemulsion โดยใช้ 0.1 %w/v Nile red ซึ่งประกอบด้วย 15.4 % oleic acid, 30.8 % tween 20, 30.8 % transcutol และ 23 %w/w water พบว่า ไมโครอิมัลชันสะสมตัวภายในเซลล์ของชั้น stratum corneum นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ภาพที่ถ่ายบนชั้น stratum corneum พบว่ามีการซึมผ่านที่ดี จากการใช้วิธี tape stripping และวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography mass spectroscopy ผลการศึกษา พบว่า การซึมผ่านของไมโครอิมัลชันในชั้น stratum corneum และแสดงให้เห็นถึงการทำงานของไมโครอิมัลชันร่วมกับโครงสร้างผิวหนัง

Acharya et al. (2013) ศึกษาการเตรียมและการประเมินผลของการนำส่งยา carbamazepine ในระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย oleic acid, tween 80, propylene glycol (PG) และ water จากการศึกษา พบว่า ระบบไมโครอิมัลชันที่มีอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งของ tween 80 และ propylene glycol ที่ 37.5% สามารถใช้ในการเป็นตัวพาสำหรับนำส่งยาผ่านผิวหนังได้ดี

กรอบแนวคิดในการวิจัย

ศึกษาการสกัดสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบขลู่ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบความปลอดภัย (cytotoxicity) แล้วตั้งตำรับกักเก็บสารสำคัญให้อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

แล้วศึกษาการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง โดยควบคุมปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นต้น ตามวิธีการในข้อกำหนดการผ่านผิวหนังของ COLIPA

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

ใบขลู่ (ใบสด) จากหมู่บ้านท่าจอด หมู่ที่ 7 ตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เก็บพืชในช่วงเดือนกันยายน ปีพ.ศ. 2560

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-205/V ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศเยอรมนี
3. เตาให้ความร้อน ยี่ห้อ IKA ประเทศเยอรมนี
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ รุ่น Rotofix 32A ยี่ห้อ Hrllich ประเทศเยอรมนี
5. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท รุ่น EZ Read 2000 ยี่ห้อ Biochrom ประเทศอังกฤษ
6. ตู้อบลมร้อน (Oven) ยี่ห้อ Amerex รุ่น Incumax CV250 ประเทศจีน
7. เครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร (Zetasizer Nanoseries) ยี่ห้อ Malvern รุ่น ZEN 3600 ประเทศอังกฤษ
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) รุ่น JEM-2100 ยี่ห้อ Jeol ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Starter 2100 ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น DV-I Prime ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Aluminum chloride ($AlCl_3$, AR grade) (Lot no.F2A261) บริษัท Chemicals จำกัด ประเทศออสเตรเลีย

2. L-Ascorbic acid (AR Grade) (Lot no: 1007089) บริษัท Carlo Erba จำกัด ประเทศอิตาลี

3. 2,2-diphenyl-1-picrylhtdrazyl (DPPH) (AR Grade) (Lot no: STDB 2362v) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. Ethanol 99.9% (AR Grade) บริษัท RCL Labscan จำกัด ประเทศไทย

5. Folin-Ciocalteu reagent (Lot no: BCBK 6010v) บริษัท Sigma- Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. Gallic acid (Lot no: 098k0245) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. Oleic acid (AR Grade) (Lot no: 0000511527) บริษัท Applichem Panreac ITW จำกัด ประเทศเยอรมนี

8. Sodium carbonate (Na_2CO_3, Lot no. 1201007) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย

9. Tween80 (Polysorbate80) (Cosmetic grade) บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

10. Propylene glycol (cosmetic grade) บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

11. Quercetin (Lot no: SLBV2993) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

12. 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid บริษัท Sigma-Aldrich จำกัดประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมพืช และกระบวนการสกัด

นำใบขลู่ที่เก็บได้จากจังหวัดจันทบุรีมาล้างทำความสะอาด แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) นำใบขลู่ที่บดแล้ว ทำการสกัดโดยวิธีการหมัก (Maceration technique) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล (99% ethanol, EtOH) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดออกมากรอง ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง และระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Ethanolic extract) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ เพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนัก (%Yield) ของสารสกัดหยาบ และเก็บไว้ในขวดสีชา และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay (ดัดแปลงจาก Maizura et al., 2011) เตรียมสารสกัดใบขลู่ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 mg/mL ปิเปตต์สารตัวอย่างมา 25 µL แล้วเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 125 µL บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 5% Na_2CO_3 ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และนำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปแบบ mgGAE/ g สารสกัด

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี aluminium chloride method (ดัดแปลงตามวิธีของ Meda et al., 2005) โดยเติมสารละลาย $AlCl_3$ เข้มข้น 2% ปริมาตร 100 µL ผสมกับสารสกัดจากใบขลู่ในตัวทำละลายเอทานอล (ความเข้มข้น 1.0 mg/mL) ปริมาตร 100 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยเทียบจากกราฟสารมาตรฐาน quercetin คำนวณในรูป QE/g สารสกัด

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบใบขลู่

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบใบขลู่ ตรวจสอบโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ระบบของเครื่อง HPLC ประกอบด้วยใช้คอลัมน์แบบ reverse phase column (C18), ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 2 µL, DAD-UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm, ระบบ mobile phase ((A) 0.1% Phosphoric acid ในน้ำ และ (B) 0.1% Phosphoric acid ใน methanol ใช้ระบบ gradient elution อัตราการไหล 0.8 mL/min ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงจาก Itsarasook et al., 2014) โดยเตรียมสารสกัดจากใบขลู่ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นผสมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 75 µL กับสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 150 µL เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นนำข้อมูลที่

ได้ไปคำนวณหาค่า Free radical scavenging activity (%) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง และ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

จากนั้นคำนวณหาค่าการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal effective concentration, EC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา)

6. การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของสารสกัดใบขลู่ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบขลู่ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์ (พลาสเสจที่ 41) ด้วยวิธี Sulforhodamine B colorimetric assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Vichai et al., 2006) โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ1.0 mg/mL ในตัวทำละลาย DMSO (10% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM) และทำการบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สภาวะ 37 ^{0}C และ 5%CO_2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบไปย้อมด้วยสี Sulforhodamine B (SRB) แล้วคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) เทียบกับตัวอย่างควบคุม ในการทดสอบใช้สาร Sodium lauryl sulfate เป็นสารมาตรฐาน และทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง

7. การเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำกักเก็บสารสกัดใบขลู่

เตรียมไมโครอิมัลชันในรูปแบบน้ำมันกระจายในน้ำ (Oil in water microemulsion) โดยวิธี Pseudo-ternary phase diagram เตรียมวัฏภาคน้ำ (DI water + tween 80 + propylene glycol) คนผสมจนเข้ากันดี เตรียมวัฏภาคน้ำมัน (oleic acid + สารสกัดใบขลู่) ค่อย ๆ เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ คนผสมจนเข้ากัน

8. การประเมินตำรับไมโครอิมัลชันทางเคมีกายภาพ

8.1 วัดขนาดและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค

นำไมโครอิมัลชันไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดขนาดและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Particle analyzer)

8.2 วัดความหนืด

วัดความหนืดของไมโครอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Viscometer)

8.3 วัดค่าความเป็นกรดด่าง

วัดค่าความเป็นกรดด่างของไมโครอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่อง pH meter

8.4 ลักษณะรูปร่างของไมโครอิมัลชัน

ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของหยดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชัน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron photomicrograph, TEM)

9. การทดสอบความคงตัวไมโครอิมัลชัน

ทดสอบความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดในสภาวะเร่งโดยทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 เดือน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1 เดือน อุณหภูมิร้อนสลับเย็นเป็นอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (48 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (48 ชั่วโมง) นับเป็น 1 รอบ ศึกษาทั้งหมด 6 รอบ บันทึกผลการทดลองเป็นลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชัน ได้แก่ สี กลิ่น ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ความหนืด ขนาดอนุภาค ดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคและการแยกชั้น

10. การทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง (in vitro permeation)

การทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง ดัดแปลงตามวิธีของอรุณศรี ปรีเปรม และคณะ (2555) โดยอุปกรณ์เซลล์ทดสอบการแพร่ชนิดแนวนอนสีชา (Amber glass horizontal diffusion cells) ที่ประกอบด้วยการประกบให้แผ่นกั้นผิวหนังหมูอยู่ระหว่างส่วนให้กับส่วนรับในส่วนให้ของเซลล์ทดสอบ ทำการทาตำรับไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่ปริมาณ 1 กรัม ลงในส่วนให้ (Donor) แล้วทดสอบการแพร่ของสารผ่านผิวหนังหมูลงไปในส่วนรับ (Receptor) ที่บรรจุ Phosphate buffer pH 7.4 ทั้งในส่วนให้และส่วนรับปั่นด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 32 ± 1°C เก็บตัวอย่างสารละลายในส่วนรับที่เวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี HPLC หลังจากเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 mL จากส่วนรับที่เวลาเก็บ 0, 30 นาที, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แล้วให้เติม Phosphate buffer pH 7.4 (อุณหภูมิ37 °C) ปริมาณเท่ากับที่เก็บไปวิเคราะห์ไปแทนที่เพื่อให้เกิดการซึมผ่านต่อเนื่องในส่วนรับ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลที่แสดงผลค่าเฉลี่ย (n=3) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติแบบ Student's *t-test* โดยใช้โปรแกรม Quick Cal (Graphpad software, ปร สหรัฐอเมริกา) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การสกัดใบขลู่ (Extraction)

จากการสกัดผงใบขลู่ด้วยวิธีการหมักในตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 99 พบว่า ได้สารสกัดหยาบใบขลู่ที่มีลักษณะสีเขียวเข้ม มีความหนืด (ดังภาพที่ 4.1) และมีค่าร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง (% yield) เท่ากับ 11.865 จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ภาพที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดหยาบใบขลู่

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 54.61±0.53 mg GAE/g extract คำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของกรดแกลลิก ($y= 5.2234x+0.1618$, $R^2 = 0.9976$)

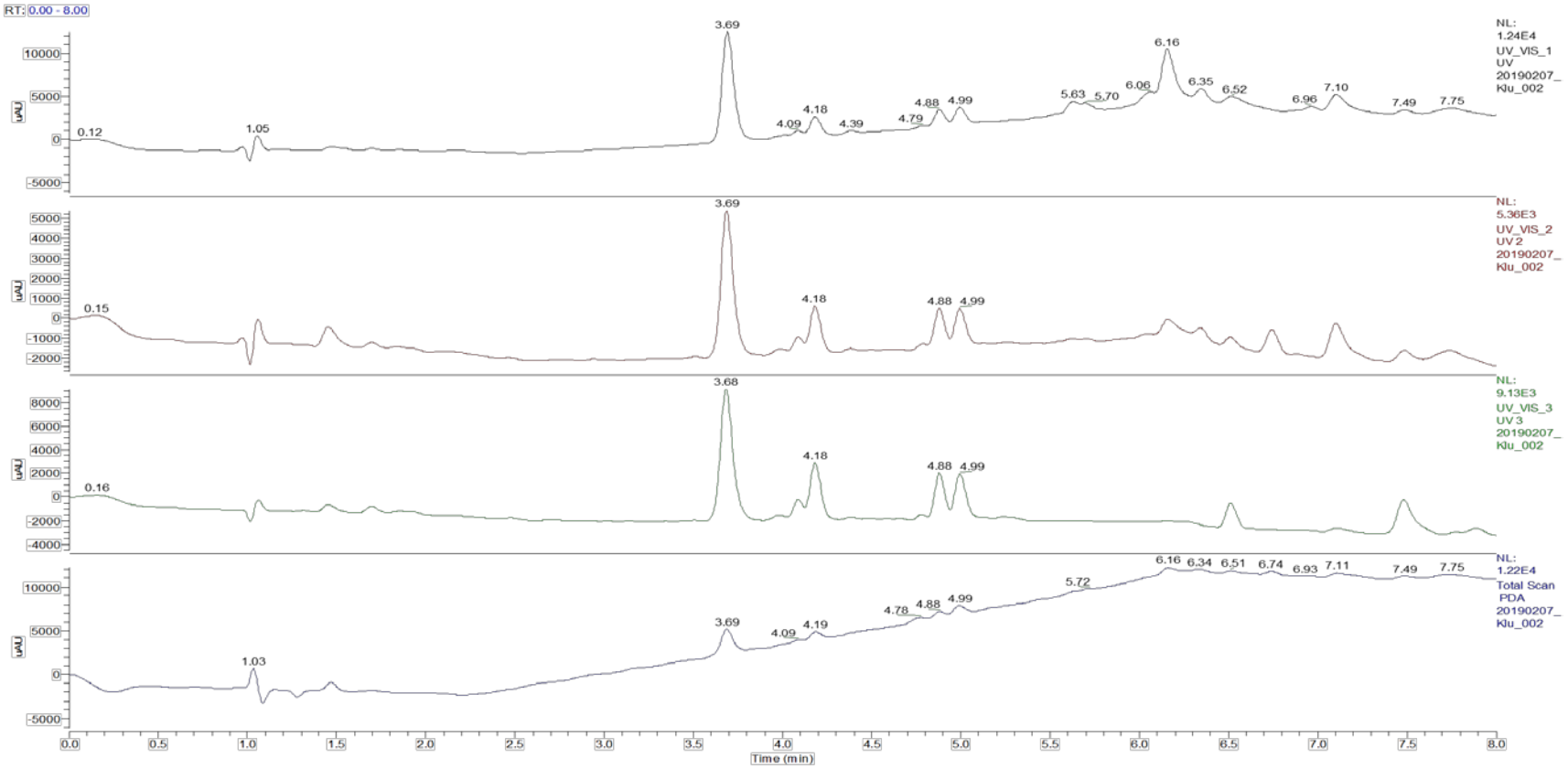
การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี Aluminium chloride method ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่มีปริมาณสารประกอบ

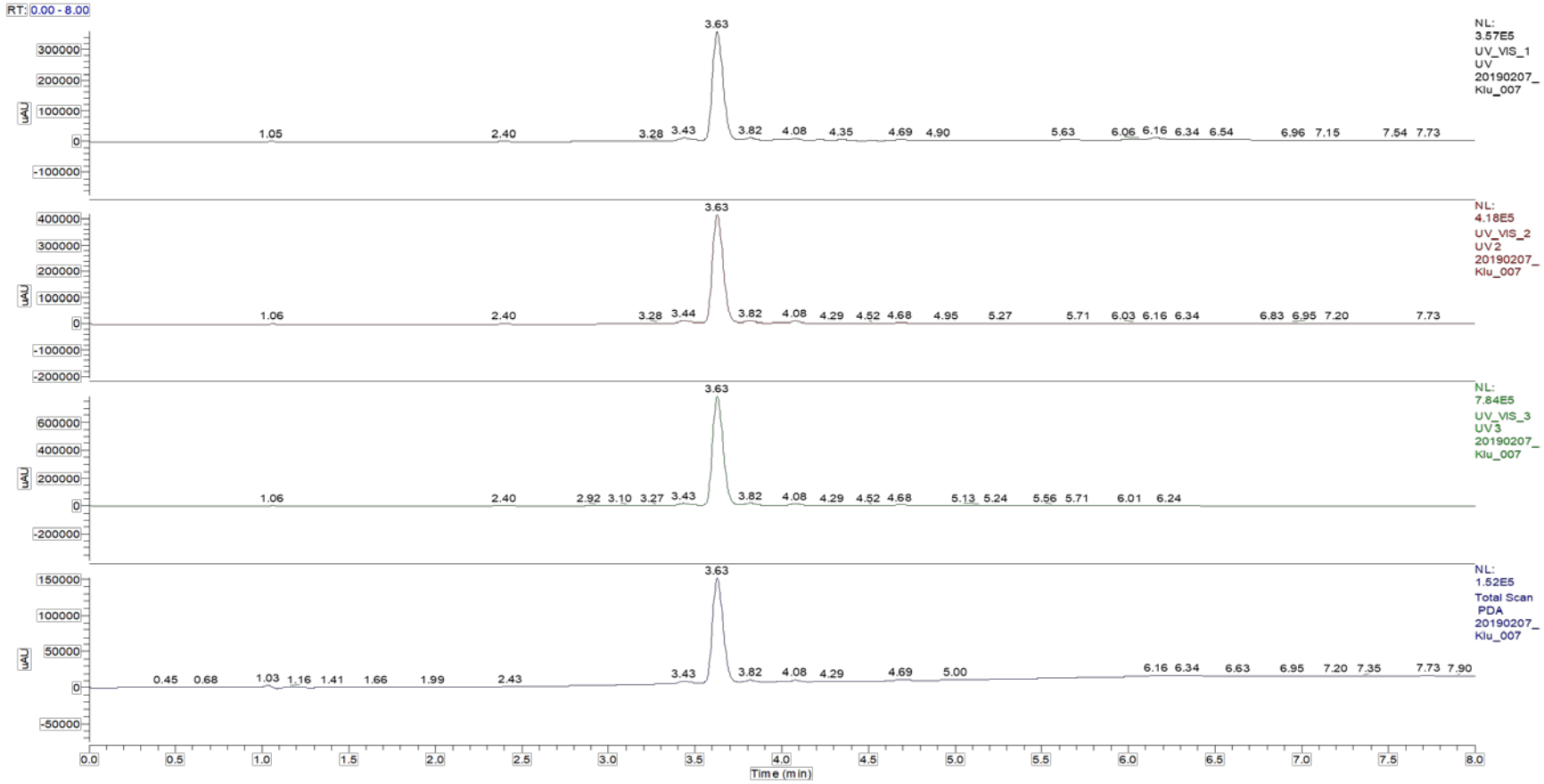
ฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 536.18±2.31 mgQE/ g extract คำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของเควอซิทิน (y= 1.8012x+0.1369, R^2 = 0.9995)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบใบขลู่

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ในสารสกัดใบขลู่ ด้วยวิธี HPLC พบว่า จากโครมาโทแกรม (ภาพที่ 4.2) ในสารสกัด 1 mL มีปริมาณ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid 9.359 ug เทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid (y=637169x, R^2=0.9950) (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารสกัดใบขลู่



ภาพที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid

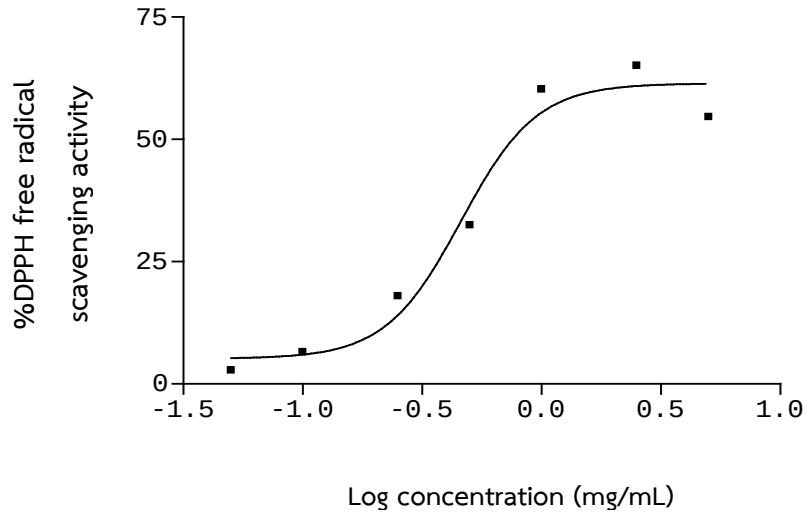
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบขลู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดใบขลู่ (mg/mL)	**ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH**	**EC_{50}± SD (mg/mL)**
0.05	2.78±1.75	0.4638±0.058
0.1	6.52±1.97	
0.25	17.97±2.53	
0.5	32.49±3.82	
1.0	60.23±2.23	
2.5	65.11±1.84	
5.0	54.59±0.72	

จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบใบขลู่ มีแนวโน้มให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสูงขึ้น (Dose-dependent curve) เมื่อนำข้อมูลจากตารางพล๊อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Log concentration) และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อหาค่าการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal effective concentration, EC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism จากการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.4638±0.058 mg/mL ดังแสดงในภาพที่ 4.4



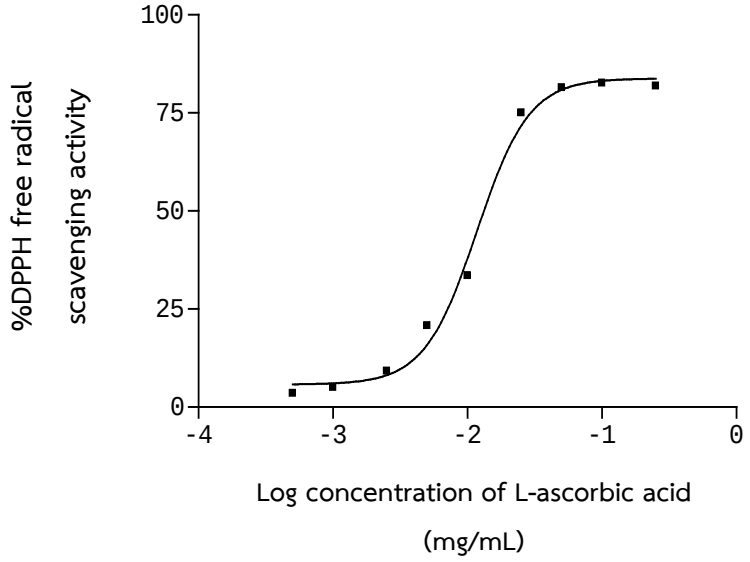
ภาพที่ 4.4 ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบขลู่

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) วิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินซี (mg/mL)	**ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%DPPH free radical scavenging activity)**	**EC_{50}± SD (mg/mL)**
0.0005	3.50±1.25	0.0114±0.0004
0.001	5.01±2.52	
0.0025	9.20±1.94	
0.005	20.81±3.63	
0.01	33.55±1.06	
0.025	75.00±1.01	
0.05	81.48±1.50	
0.10	82.64±1.30	

จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า สารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี มีแนวโน้มให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสูงขึ้น เมื่อนำข้อมูลจากตารางพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Log concentration) และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อหาค่าการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal effective concentration, EC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism จากการทดสอบ พบว่า สารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.0114±0.0004 mg/mL ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของวิตามินซี

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ (*P. indica* extract) ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารที่มาจากธรรมชาติ ในการทดสอบนี้ทดสอบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลเชิงบวก คือ วิตามินซี (L-ascorbic acid) พบว่า สารสกัดใบขลู่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซีประมาณ 40 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินซี เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ส่วนสารสกัดใบขลู่ที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และ Caffeoylquinic derivatives เป็นต้น จึงทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สารสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าวิตามินซี

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดใบขลู่

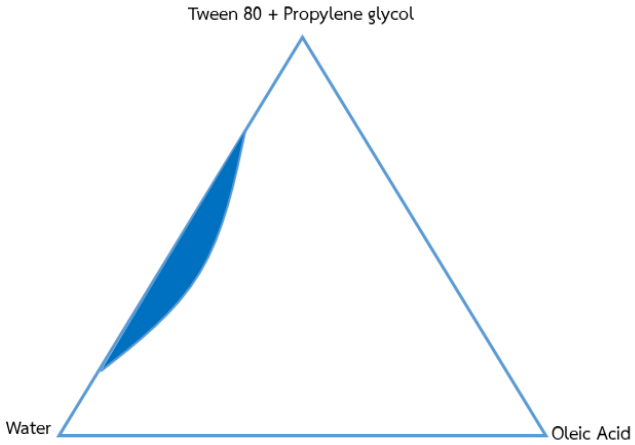
ตารางที่ 4.3 พบว่า สารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์ที่ความเข้มข้น 0.0001-1.0 mg/mL โดยมีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ระหว่าง 96.84-97.13 ส่วน Sodium lauryl sulfate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/mL โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 32.28±4.35 และ 8.10±1.81 ตามลำดับ จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าสารสกัดใบขลู่ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 99 มีความปลอดภัยต่อเซลล์และไม่ทำให้เซลล์ตาย

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์

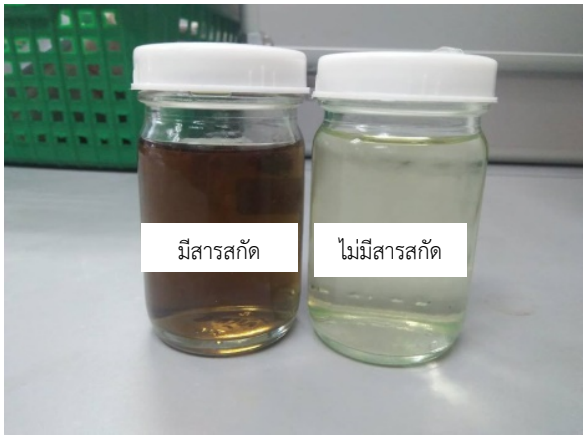
ตัวอย่าง	**ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability)**				
	0.0001	**0.001**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
สารสกัด (mg/mL)	96.84±4.15	97.11±3.14	96.93±3.33	97.13±3.05	97.10±2.87
Sodium lauryl sulfate (mg/mL)	95.83±4.26	96.02±3.07	96.04±2.30	32.28±4.35	8.10±1.81

การเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำกักเก็บสารสกัดใบขลู่

เตรียมไมโครอิมัลชันในรูปแบบน้ำมันในน้ำ (Oil in water microemulsion) ด้วยวิธี Pseudo-ternary phase diagram (ภาพที่ 4.6) ตำรับที่เหมาะสมประกอบด้วย oleic acid 1.0 %w/w, DI water 74 %w/w, tween 80 20 %w/w, propylene glycol 5.0 %w/w และสารสกัดใบขลู่ 0.23%w/w ผลการทดลอง พบว่า ไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดใบขลู่มีลักษณะสีเขียวเข้มใส และมีความหนืดน้อย (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.6 แผนภาพเฟสไดอะแกรมของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ



ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่

จากการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน พบว่า สารสกัดละลายได้ดีใน Oleic acid เนื่องจาก Oleic acid เป็นวัฏภาคน้ำมันที่สามารถละลายสารสกัดใบขลู่ได้ดี และเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งทางผิวหนัง (Penetration enhancer) เนื่องจากสามารถเพิ่มอัตราการไหลในไขมัน Stratum corneum ซึ่งเป็นการเสริมสร้างการซึมผ่าน และในการเตรียมไมโครอิมัลชันใช้ปริมาณของ Oleic acid 1.0 %w/w เนื่องจากถ้าปริมาณของ Oleic acid สูงกว่า 5.0 %w/w อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ (Zhu et al., 2008) ในการเตรียมใช้ Tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากมีค่า HLB เท่ากับ 15 ซึ่งจะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และมีส่วนประกอบของ Propylene glycol ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม เนื่องจากสามารถละลายเข้ากันกับ Tween 80 และสารสกัดได้ดี คณะผู้วิจัยใช้ Propylene glycol 5.0 %w/w เนื่องจากปริมาณที่สูงกว่านี้อาจทำให้รู้สึกร้อนเวลาสัมผัสผิว (Acharya et al., 2013)

การประเมินลักษณะของไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดใบขลู่

ประเมินการกระเจิงแสงของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดและไม่มีสารสกัด โดยปรากฏการณ์ทินดอลล์ (Tyndall effect) ซึ่งจะแสดงสมบัติการกระเจิงแสงของสารคอลลอยด์ วิธีการ คือ การฉายแสงผ่านสารคอลลอยด์ จากนั้นอนุภาคคอลลอยด์จะช่วยกระเจิงแสงทำให้สามารถมองเห็นลำแสงในคอลลอยด์ได้ จากภาพที่ 4.8 เป็นการนำไมโครอิมัลชันมาส่องผ่านด้วยลำแลงเลเซอร์ พบว่า ทั้งไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดและไม่มีสารสกัดสามารถกระเจิงลำแสงได้ แสดงให้เห็นว่าตำรับที่เตรียมได้เป็นไมโครอิมัลชัน

ภาพที่ 4.8 ลักษณะลำแสงที่ส่องผ่านระบบคอลลอยด์ไมโครอิมัลชัน

ประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่ โดยประเมินขนาดหยดวัฏภาคภายใน (Droplet size) และดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index, PDI) ด้วยเครื่อง Nanoparticles analyzer วัดค่าสี (Color) ของตำรับด้วยเครื่อง Chroma meter วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter และวัดความหนืด (Viscosity) ด้วยเครื่องวัดความหนืด (Viscometer) แสดงผลในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่

ไมโครอิมัลชัน	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	ดัชนีการกระจายตัว	ค่าสี			ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	ความหนืด (cP)
			L*	a*	b*		
ไม่มีสารสกัดใบขลู่	11.25±1.20	0.257±0.00	+10.37±0.06	+2.21±0.09	-0.17±0.04	6.08	16.3 ±0.3
มีสารสกัดใบขลู่	24.40±1.20	0.397±0.05	+8.29±0.76	+2.27±0.07	+0.26±0.09	6.08	18.3±4.16

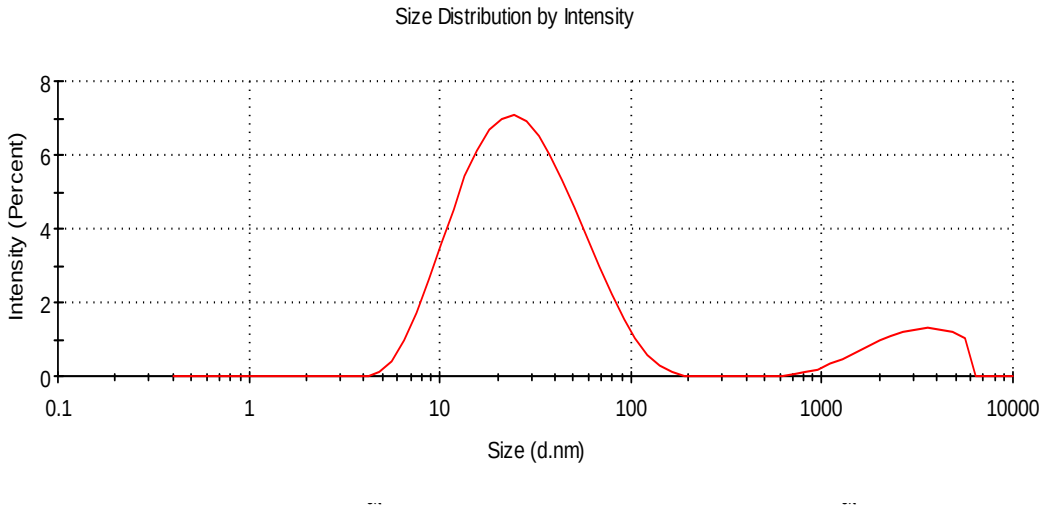
*** หมายเหตุ**

ค่า L* = ค่าความสว่าง (- คือ สีดำหรือสีทึบ, + คือ สีขาวหรือสว่าง)

ค่า a* = แสดงความเป็นสีแดงและเขียว (+ คือ มีสีเป็นไปทางแดงมาก, - คือ มีสีเป็นไปทางสีเขียวมาก)

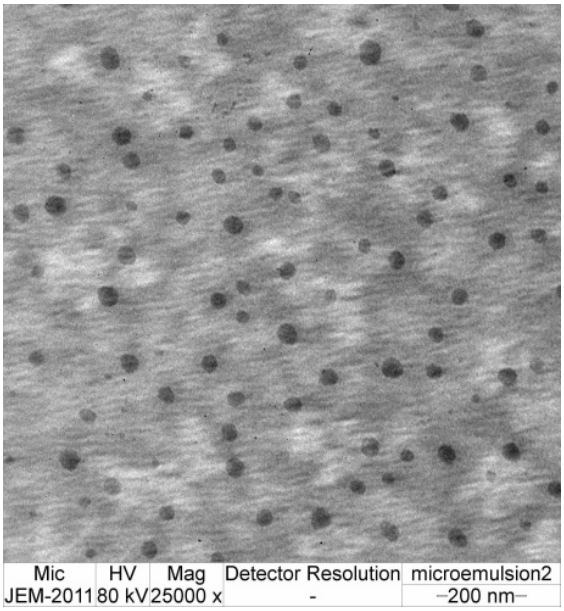
ค่า b* = แสดงความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน (+ คือ มีสีเป็นไปทางสีเหลืองมาก, - คือ มีสีเป็นไปทางสีน้ำเงินมาก

ผลการประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันกักเก็บสารสกัดใบขลู่ พบว่า ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีขนาดหยดวัฏภาคภายในเท่ากับ 24.40±1.20 นาโนเมตร และมีค่าดัชนีการกระจายตัวเท่ากับ 0.397±0.05 (ภาพที่ 4.9) มีค่าสีอยู่ในโทนสีเขียวเข้ม ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 6.08 ซึ่งเป็นค่าที่มีความปลอดภัยเมื่อใช้กับผิวหนัง โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางควรอยู่ในช่วง 5-7 และมีความหนืดเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัด พบว่า แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.9 ขนาดและการกระจายตัวของหยดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่

เมื่อนำไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดหยาบใบขลู่ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) จากภาพพบว่า ไมโครอิมัลชันมีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม และขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับค่าขนาดอนุภาคที่วัดขนาดด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค แสดงดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ลักษณะรูปร่างของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกำลังขยาย 25000 เท่า

การประเมินความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันทางเคมีกายภาพ

ประเมินความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน และสภาวะอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สลับ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง) จำนวน 6 รอบ โดยประเมินจากขนาดหยดวัฏภาคภายใน (Droplet size) ดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index, PDI) ค่าสี (Color) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และความหนืด (viscosity) ผลการประเมินแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการประเมินความคงตัวทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดใบขลู่

สภาวะ	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	ดัชนีการกระจายตัว	ค่าสี			ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	ความหนืด (cP)
			L*	a*	b*		
เริ่มต้น	24.40±1.20	0.397±0.05	+8.29±0.76	+2.27±0.07	+0.26±0.09	6.08	18.3±1.16
อุณหภูมิห้อง	14.043±0.09	0.280±0.02	+10.22±0.67	+2.03±0.13	-0.07±0.13	5.92	18.0±0.45
4 องศาเซลเซียส	10.64±0.60	0.137±0.06	+7.12±0.05	+1.91±0.11	+0.53±0.06	6.00	17.5±0.92
50 องศาเซลเซียส	10.67±0.19	0.190±0.04	+8.41±0.13	+2.01±0.09	+0.28±0.05	5.57	17.0±0.73
ร้อนสลับเย็น	16.84±0.19	0.215±0.01	+16.93±0.34	+0.05±0.04	+0.29±0.22	5.78	17.2±0.95

จากผลการประเมินความคงตัวทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดภายใต้สภาวะต่าง ๆ พบว่า ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ มีความคงตัวดีในทุกการประเมิน เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเริ่มต้นพบว่า แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

การทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลอง (*In vitro* permeation)

จากการทดสอบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในหลอดทดลองของสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน และทำการตรวจวัดปริมาณของสาร 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ด้วยวิธี HPLC พบว่าไม่พบสาร 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ในชั้นผิวหนัง Stratum corneum แต่พบปริมาณสาร 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ในชั้นผิวหนัง (Epidermis และ Dermis) ปริมาณเท่ากับ 0.823 μg/mL ที่ระยะเวลาการซึมผ่าน 30 นาที จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า สารสกัดที่เตรียมให้อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถแพร่ผ่านชั้นผิวหนังแผ่นกั้น นั่นคือ สามารถผ่านชั้นผิว Stratum corneum ได้ และแพร่ผ่านอยู่ในชั้นผิวหนังชั้นล่างลงมาได้ จากผลการทดสอบสามารถประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดใบขลู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวหนังได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สกัดใบขลู่ที่บดละเอียดเป็นผงแล้วด้วยวิธีการหมัก (Maceration technique) ในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 99 พบว่า ได้สารสกัดหยาบใบขลู่ที่มีลักษณะสีเขียวเข้ม มีความหนืด และมีค่าร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง (% yield) เท่ากับ 11.865

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 54.61±0.53 mg GAE/g extract และ วิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี Aluminium chloride method ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 536.18±2.31 mgQE/g extract และจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดใบขลู่มีปริมาณ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid เท่ากับ 9.359 μg/mL

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบขลู่ ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay จากการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบใบขลู่ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.4638±0.058 mg/mL จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ (*P. indica* extract) ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารที่มาจากธรรมชาติ ในการทดสอบนี้ทดสอบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลเชิงบวก (Positive control) คือ วิตามินซี (L-ascorbic acid) (EC_{50} เท่ากับ 0.0114±0.0004 mg/mL) พบว่า สารสกัดใบขลู่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซีประมาณ 40 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินซีเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ส่วนสารสกัดใบขลู่ที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และ Caffeoylquinic derivatives เป็นต้น จึงทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สารสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าวิตามินซี

การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์ด้วยวิธี SRB assay พบว่า สารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.0001-1.0 mg/mL โดยมีร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ระหว่าง 96.84-97.13

เตรียมไมโครอิมัลชันในรูปแบบน้ำมันกระจายในน้ำ (Oil in water microemulsion) ด้วยวิธี Pseudo-ternary phase diagram ได้ตำรับไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมประกอบด้วย Oleic acid

1.0 %w/w, DI water 74 %w/w, tween 80 20 %w/w, propylene glycol 5.0 %w/w และสารสกัดใบขลู่ 0.23 %w/w พบว่า ไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดใบขลู่มีลักษณะสีเขียวเข้มใส และมีความหนืดน้อย ในการเตรียมไมโครอิมัลชันใช้ปริมาณของ oleic acid 1.0 %w/w เนื่องจากถ้าปริมาณของ Oleic acid สูงกว่า 5.0%w/w อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ (Zhu et al., 2008) ในการเตรียมใช้ tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากมีค่า HLB เท่ากับ 15 ซึ่งจะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และมีส่วนประกอบของ Propylene glycol ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม เนื่องจากสามารถละลายเข้ากันกับ Tween 80 และสารสกัดได้ดี คณะผู้วิจัยใช้ Propylene glycol 5.0 %w/w เนื่องจากปริมาณที่สูงกว่านี้ อาจทำให้รู้สึกร้อนเวลาสัมผัสกับผิวหนัง (Acharya et al., 2013)

ประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่ พบว่าไมโครอิมัลชันมีขนาดหยดวัฏภาคภายใน (Droplet size) เท่ากับ 24.40±1.20 นาโนเมตร และมีค่าดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index, PDI) เท่ากับ 0.397±0.05 มีค่าสีอยู่ในโทนสีเขียวเข้ม ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 6.08 ซึ่งเป็นค่าที่มีความปลอดภัยเมื่อใช้กับผิวหนัง โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางควรอยู่ในช่วง 5-7 และมีความหนืดเล็กน้อย

เมื่อนำไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดหยาบใบขลู่ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) พบว่าไมโครอิมัลชันมีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม และขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับค่าขนาดอนุภาคที่วัดขนาดด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค

ประเมินความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดใบขลู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 เดือน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน และสภาวะอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สลับ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง) จำนวน 6 รอบ โดยประเมินจากขนาดหยดวัฏภาคภายใน (Droplet size) ดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index, PDI) ค่าสี (Color) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และความหนืด (Viscosity) จากผลการประเมิน พบว่า ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ มีความคงตัวดีในทุกตัวแปรที่ประเมินในทุกสภาวะที่มีการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเริ่มต้น พบว่า แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

ประเมินการแพร่ผ่านผิวหนังของสารสกัดใบขลู่จากตำรับไมโครอิมัลชัน ด้วยวิธี Franz diffusion cell พบว่า สารสกัดที่เตรียมให้อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถแพร่ผ่านชั้นผิวหนังแผ่นกั้น นั่นคือ สามารถผ่านชั้นผิว Stratum corneum ได้ และแพร่ผ่านอยู่ในชั้นผิวหนังชั้นล่างลงมาได้ เนื่องจากสารสกัดที่เตรียมในรูปแบบไมโครอิมัลชันละลายได้ดีใน Oleic acid ซึ่ง Oleic acid

มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งทางผิวหนัง (Penetration enhancer) สามารถเพิ่มอัตราการไหลในไขมัน Stratum corneum จึงส่งผลให้สารประกอบฟลาโวนอยด์ 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในสารสกัดใบขลู่สามารถซึมผ่านผิวหนังชั้น Stratum corneum ได้

จากผลการทดสอบทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าสารสกัดใบขลู่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง และเมื่อเตรียมให้อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชัน มีความคงตัวที่ดีในทุกสภาวะที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ จึงสรุปได้ว่า สามารถประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดใบขลู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวหนังได้

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ตำรับไมโครอิมัลชันสามารถกักเก็บสารสกัดใบขลู่ที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ แล้วแพร่ผ่านแผ่นกั้นผิวหนังหมูในระดับหลอดทดลองได้ และข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถใช้เป็นแนวทางในพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวหนังในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

การนำไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และศึกษาการแพ้การระคายเคืองต่อผิวหนัง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2539). *สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (1)*. กรุงเทพฯ: ประชาชน.

มลศิริ วีโรทัย. (2540). ส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*, 13, 69-75.

วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. (2552). *นาโนเทคโนโลยี*:การนำส่งยาและเครื่องสำอางทางผิวหนัง (1). กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด

สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล. (2553). ฐานข้อมูลสมุนไพรไทย. สืบค้นเมื่อ 25 มกราคม 2562 สืบค้นจาก http://www.phargarden.com/main.php.

อรุณศรี ปรีเปรม, วีรยาศักดิ์ คำดวง, วีรวัฒน์ ธีระณชัยดีกุล, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง, มาลิน จุลศิริ. (2554). การเปรียบเทียบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังคนกับหมูในหลอดทดลองของสารพอลิฟีนอลจากพืช. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน,* 7, 39-46.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Abbasi, S. & Radi, M. (2016). Food grade microemulsion systems: Canola oil/lecithin: n-propanol/water. *Food Chemistry,* 194, 972-979.

Acharya, S.P., Pundarikakshudua, K., Panchala, A. & Lalwanib, A. (2013). Preparation and evaluation of transnasal microemulsion of carbamazepine. *Asian journal of pharmaceutical sciences,* 8, 64-70.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B. & Wijaya H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121, 1231-1235.

Ashara, K.C, Paun, J.S, Soniwala, M.M, Chavada, J.R. & Mori N.M. (2014). Micro-emulsion based emulgel: a novel topical drug delivery system. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, Supplement 1:S27-S32.

Arantes, A.A., Falé, P.L, Costa, L.C.B., Pacheco, R., Ascensão, L. & Serralheiro, M.L. (2016). Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 38-43.

Arsiningtyas, I.S., Gunawan-Puteri, M.D., Kato, E. & Kawabata, J. (2014). Identification of α-glucosidase inhibitors from the leaves of *Pluchea indica* (L.) Less. a traditional Indonesian herb: promotion of natural product use. *Natural Product Communications*, 28, 1350–1353.

Badawi, A.A., Nour, S.A., Sakran, W.S. & El-Mancy, S.M. (2009). Preparation and evaluation of microemulsion systems containing salicylic acid. *American Association of Pharmaceutical Scientists,* 10, 1081-1084.

Barry, B.W. (2001). Review Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 14, 101 -114.

Burguera, J.L. & Burguera, M. (2012). Analytical applications of emulsions and microemulsions. *Talanta,* 96, 11-20.

Chen, J., Mangelinckx, S., Ma, L., Wang, Z., Li, W. & De Kimpe, N. (2014). Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast α-glucosidase and PTP1B inhibitory activity, *Fitoterapia*, 99, 1-6.

COLIPA. (1997). *Guidelines for percutaneous absorption/penetration*. In: Macmillan R. editor. 2 nd ed, The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. Brussel: Belgium.

Diembeck, W., Bekc, H., Benech-KieVer, F., Courtellemonth, P., Dupuis, J., Lovell, W., Paye, M., Spengler, J. & Steiling, W. (1999).Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food Chemistry and Toxicology*, 37, 191-205.

Itsarasook, K., Ingkaninan, K. & Viyoch, J. (2014). Artocarpin-enriched extract reverses collagen metabolism in UV-exposed fibroblasts. *Biologia,* 69, 943-951.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. & Vivanco, J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of *Iranian Ocimum accessions*. *Food Chemistry*, 83, 547-550.

Kanikkannan, N., Kandimalla, K., Lamba, S.S. & Singh, M. (2000). Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 593-608.

Kongkiatpaiboon, S., Chewchinda, S. & Vongsak, B. (2018). Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand. *Revista Brasileira de Farmacognosia,* 28, 145-150.

Gabbanini, S., Lucchi, E., Carli, M., Berlini, E., Minghetti, A. & Valgimigli, L. (2009). *In vitro* evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 370-376.

Gray, H. (1918). *Anatomy of the human body*. 20th ed. Revised and re-edited by Warren H. Lewis. Lea and Febiger: Philadelphia and New York.

Lawrence, M.J. & Rees, G.D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 89-121.

Maizura, M., Aminah, A. & Wan Aida, W.M. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18, 526-531.

Malhotra, S. & Subban, R. (2008). Singh A. Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5.

Mathur, V., Satrawala, Y. & Rajput, M.S. (2010). Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics,* 4, 173-183.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, 91, 571-577.

Meyer, W., Schwarz, R. & Neurand, K. (1987). The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with reference to the domestic pig. *Current Problem in Dermatology*, 7, 39-52.

Motaal, A.A., Ezzat, S.M., Tadros, M.G. & ElAskary H.I. (2016). In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54, 2864-3287.

Noridayu, A.R., Hii, Y.F., Faridah, A., Khozirah, S. & Lajis, N. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal*, 18, 925-929.

Pramanik, K.C., Biswas, R., Mitra, A., Bandyopadhyay, D., Mishra, M. & Chatterjee T.K. (2007). Tissue culture of the plant *Pluchea indica* (L.) Less. and evaluation of diuretic potential of its leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7, 197-204.

Priprem, A., Khamlert, C., Pongjanyakul, T., Radapong, S., Rittirod, T. & Chitropas, P. (2008). Comparative permeation studies between scale region of shed snake skin and human skin *in vitro*. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 3, 444-450.

Robert, M.S. & Cross, S.E. (2002). Skin transport. In: Dermatological and Transdermal Formulations: Drug and the Pharmaceutical Science. (Ed. K.A. Walters), Cardiff, New York, 119, 166.

Roslida, A.H., Erazuliana, A.K. & Zuraini, A. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica (L.)* Less. Leaf, *Pharmacologyonline*, 2, 349-360.

Rugh, W.J., Hadgraft, J. & Robert, M.S. (1998). Physicochemical determinants of stratum corneum permeation. In: Dermal and Absorption and Toxicology Assessment. (Eds. M.S. Robert and K.A. Walters). Marcel Dekker, New York, 245-268.

Scharffetter, K.K., Wlaschek, M., Briviba, K. & Sies, H. (2000). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett*, 331, 304-306.

Sinko, P.J. (2006). *Martin's physical pharmacy and pharmarceutical sciences*. 5th ed. Philadelphia, PA: Wippincott Williams and Wilkins.

Shukri, M.A.M., Alan, C. & Noorzuraini, A.R.S. (2011). Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science, 39, 69-83.*

Tabassum, N., Lee, J.H., Yim, S.H., Batkhuu, G.J., Jung, D.W. & Williams, D.R. (2016). Isolation of 4,5-O-Dicaffeoylquinic acid as a pigmentation inhibitor occurring in *Artemisia capillaris* thunberg and its validation *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: doi.org/10.1155/2016/7823541

Traithip, A. (2005). *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica.* Master's thesis (Pharmacognosy). Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocol*, 1, 1112-1116.

Vongsak, B., Gritsanapan, W., Wongkrajang, Y. & Jantan, I. (2013). *In vitro* inhibitory effects of *Moringa oleifera* leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. *Natural Product Communications*, 8, 1559-1561.

Walters, K.A. & Roberts, M.S. (2002). The structure and functional of skin. In: Walters, K.A. ed. Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker. p. 1-37.

Widyawati, P.S., Wijaya, C.H., Hardjosworo, P.S. & Sajuthi, D. (2013). Volatile compounds of *Pluchea indica* Less and *Ocimum basillicum* Linn essential oil and potency as antioxidant. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2, 117-126.

Williams, A.C. & Barry, B.W. (2004). Penetration enhancers. *Advance Drug Delivery Review*, 56, 603-618.

Xu, J.G., Hu, Q.P. & Liu, Y. (2012). Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11625-11630.

Zheng, W. & Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricutural and Food Chemistry*, 49, 5165-70.

Zhu, W., Yua, A., Wanga, W., Dongb, R., Wuc, J. & Zhaia, G. (2008). Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *International Journal of Pharmaceutics,* 360, 184–190.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%Yield)

%Yield = [น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)/ น้ำหนักพืชแห้ง (กรัม)] x100

= (23.73/200) x 100

= 11.865

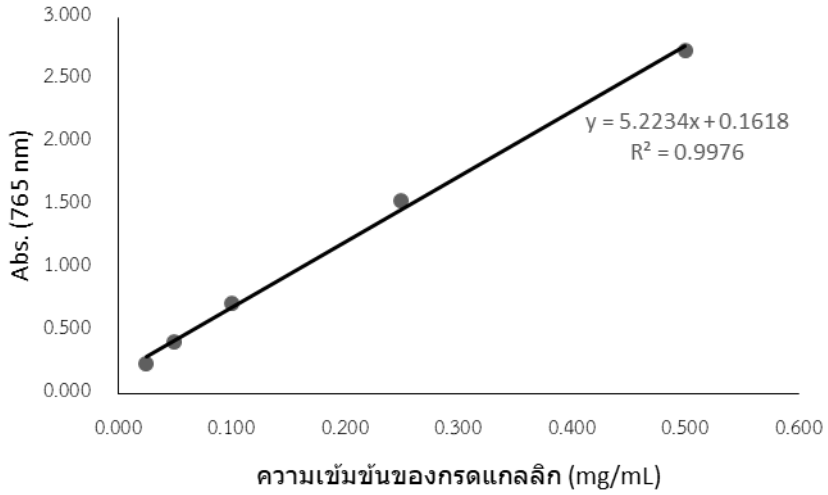
ดังนั้น สารสกัดหยาบใบขลู่ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 99 มีปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้งเท่ากับ 11.865

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบขลู่

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (mg/mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0.010	0.138	0.141	0.131	0.137	0.005
0.025	0.245	0.241	0.230	0.239	0.008
0.050	0.415	0.407	0.415	0.412	0.005
0.100	0.718	0.709	0.724	0.717	0.008
0.250	1.538	1.541	1.530	1.536	0.006
0.500	2.724	2.761	2.724	2.736	0.021



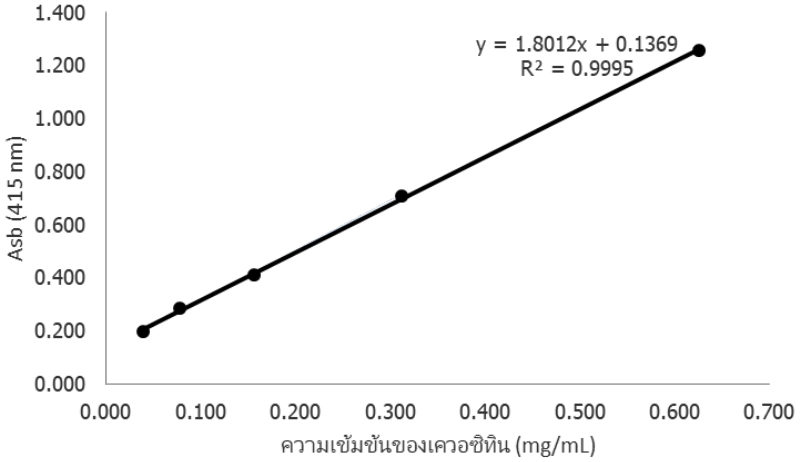
ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ตารางที่ ข-2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบขลู่

ความเข้มข้นสารสกัดใบขลู่ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (ค่าเฉลี่ย ± S.D.)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mgGAE/g extract ± S.D.)
2.0	0.732±0.01	54.61±0.53

ตารางที่ ข-3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอซิทินที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของเควอซิทิน (mg/mL)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0.039	0.220	0.181	0.190	0.197	0.020
0.078	0.298	0.261	0.303	0.287	0.023
0.156	0.412	0.416	0.408	0.412	0.004
0.312	0.709	0.713	0.705	0.709	0.004
0.625	1.261	1.234	1.280	1.258	0.023



ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานของเควอซิทิน

ตารางที่ ข-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบขลู่

ความเข้มข้นสารสกัดใบขลู่ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (ค่าเฉลี่ย ± S.D.)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g extract ± S.D.)
1.0	1.103±0.004	536.18±2.31

ภาคผนวก ค

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางที่ ค-1 ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบขลู่

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร**			**ค่าเฉลี่ย±S.D.**	**ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH**			**ค่าเฉลี่ย±S.D.**	**EC_{50} (mg/mL±S.D.)**
	1	2	3		1	2	3		
Blank	0.777	0.780	0.818	0.792±0.02	-	-	-	-	0.4638±0.058
0.05	0.779	0.777	0.754	0.770±0.01	1.64	1.89	4.80	2.78±1.75	
0.1	0.738	0.757	0.726	0.740±0.02	6.82	4.42	8.33	6.52±1.97	
0.25	0.670	0.630	0.649	0.650±0.02	15.40	20.45	18.06	17.97±2.53	
0.5	0.569	0.512	0.523	0.535±0.03	28.16	35.35	33.96	32.49±3.82	
1.0	0.334	0.299	0.312	0.315±0.02	57.83	62.25	60.61	60.23±2.23	
2.5	0.288	0.260	0.281	0.276±0.02	63.64	67.17	64.52	65.11±1.84	
5.0	0.358	0.355	0.366	0.360±0.01	54.80	55.18	53.79	54.59±0.72	

ตารางที่ ค-2 ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารควบคุมเชิงบวกวิตามินซี

ความเข้มข้นของวิตามินซี (mg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร**			**ค่าเฉลี่ย±S.D.**	**ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH**			**ค่าเฉลี่ย±S.D.**	**EC_{50} (mg/mL±S.D.)**
	1	2	3		1	2	3		
Blank	0.745	0.777	0.795	0.772±0.03	-	-	-	-	0.0114±0.0004
0.0005	0.752	0.749	0.734	0.745±0.01	2.59	2.98	4.92	3.50±1.25	
0.001	0.738	0.750	0.712	0.733±0.02	4.40	2.85	7.77	5.01±2.52	
0.0025	0.716	0.686	0.701	0.701±0.01	7.25	11.14	9.20	9.20±1.94	
0.005	0.610	0.584	0.640	0.611±0.03	20.98	24.35	17.10	20.81±3.63	
0.01	0.515	0.520	0.504	0.513±0.01	33.29	32.64	34.72	33.55±1.06	
0.025	0.198	0.197	0.184	0.193±0.01	74.35	74.48	76.17	75.00±1.01	
0.05	0.152	0.130	0.147	0.143±0.01	80.31	83.16	80.96	81.48±1.49	
0.1	0.134	0.124	0.144	0.134±0.01	82.64	83.94	81.35	82.64±1.29	
0.25	0.147	0.126	0.146	0.140±0.01	80.96	83.68	81.09	81.91±1.53	

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวขวัญจิต อิสระสุข

วัน เดือน ปีเกิด 01 เมษายน 2525

ตำแหน่งงานปัจจุบัน อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยรามคำแหง
พ.ศ. 2549

ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
(หลักสูตรนานาชาติ) มหาวิทยาลัยนเรศวร
พ.ศ. 2557

ผลงานวิจัย

Itsarasook, K., Ingkaninan, K., Chulasiri, M. & Viyoch, J. (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity to human skin fibroblasts of *Terminalia chebula* fruit extract. *Biological and Life Sciences, 40*, 43-46.

Itsarasook, K., Ingkaninan, K. & Viyoch, J. (2014). Artocarpin-enriched extract reverses collagen metabolism in UV-exposed fibroblasts. *Biologia, 69*, 943-951.

Itsarasook, K. (2015). Free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of Longkong Leaves Extract. *SDU Research Journal Sciences and Technology,* 8, 81-96.

Yakaew, S., Itsarasook, K. & Viyoch, J. (2015). Potencial of breadfruit's heartwood extract for preventing UV-induced fibroblast damage. *International society of antioxidants in nutrition and health*: *8th ISANH Congress on Polyphenol applications*, Lisbon, Portugal.

Yakaew, S., Itsarasook, K., Ngoenkam, J., Jessadayannamaetha, A., Viyoch, J. & Ungsurungsie, M. (2016). Ethanol extract of *Terminalia chebula* fruit protects against UVB-induced skin damage. *Pharmaceutical Biology*, 54, 2701-2707.

Itsarasook, K., Triyasuk, N., Promsomboon, C., Meepeoch, J., Rakthong, L., Imsatian, N., Sriburin, N., Chantree, K. & Narnok, P. (2017). Preparation of liposome entrapping *Pluchea indica* Less. leaf extract for application in cosmetic products. *SDU Research Journal Sciences and Technology,* 1, 43-60.