

**บทที่ 3****วิธีวิจัย****อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย****วัสดุ อุปกรณ์**

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 400 ml, 600 ml, 1,000 ml และ 2,000 ml
2. บีกเกอร์ขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 400 ml, 600 ml, 1,000 ml และ 2,000 ml
3. กระบอกตวง ขนาด 10 ml, 50 ml, 100 ml และ 1,000 ml
4. กระดาษวัด pH (pH paper)
5. ขวดใส่สาร ขนาด 10 กรัม
6. ขาดังพร้อมที่ขีดกรวย
7. กระดาษสีน้ำตาล
8. เครื่องเคาะผงยา
9. แท่งแก้วคนสาร
10. นาฬิกาจับเวลา
11. กรวยปลายตัด
12. ผ้าขาวบาง
13. หลอดหยด
14. ถาดโลหะ
15. กระจก
16. Buchner funnel
17. Finn chamber
18. กรรไกร
19. คีม
20. กรงกระดาษ

**เครื่องมือ**

1. ตู้เย็น
2. เต้าไฟฟ้า
3. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
4. เครื่องชั่งวิเคราะห์
5. เต้าเผาอุณหภูมิสูง

6. เครื่องบดเอนกประสงค์
7. ตู้อบ (Hot air oven)
8. เครื่อง Corneometer
9. เครื่องปั่น (Homogenizer)
10. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
12. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
13. Moisture determination balance Kett model F-1A

### พืชสมุนไพร

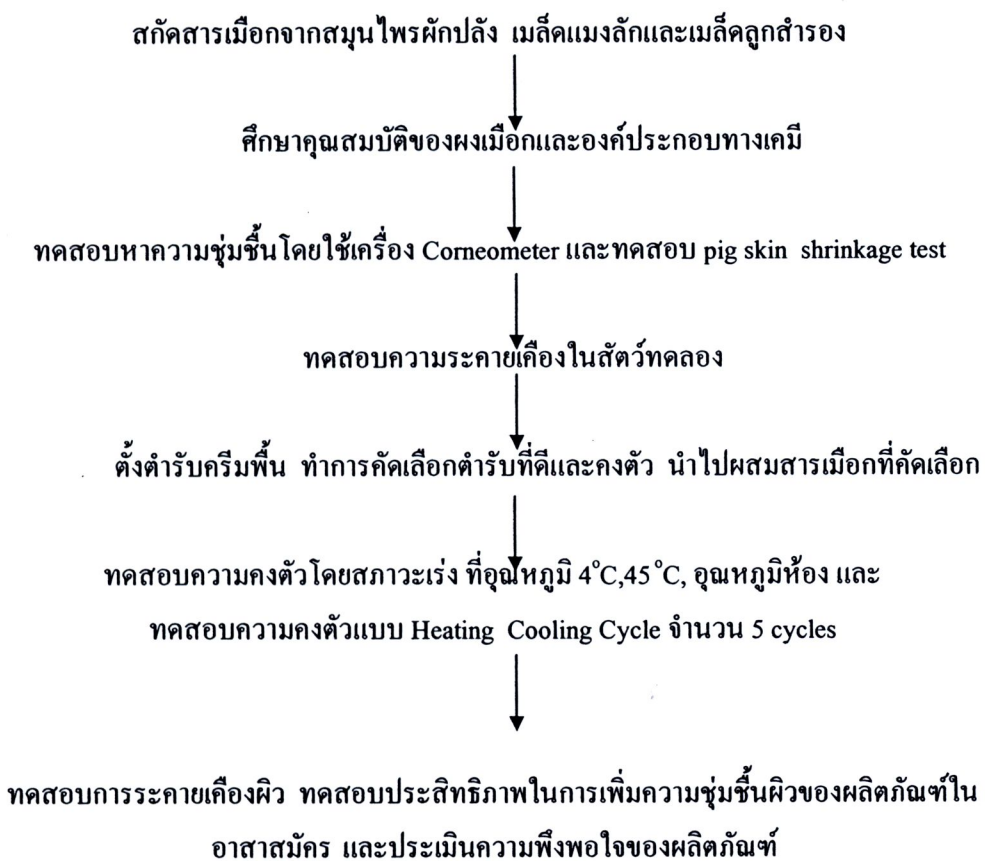
1. *Ocimum basilicum* L.f. var. *citratum* Back (แมงลัก) : เมล็ด
2. *Basella alba* Linn. (ผักปลัง) : ยอดอ่อน
3. *Sterculia lychnophora* Hance. (ตำรอน) : ผล

### สารเคมี

1. Benedict's solution (Sigma)
2. Conc. Paraben (Sharon laboratories)
3. Corn starch (Sharon laboratories)
4. DI water
5. Glucose monohydrate (Sharon laboratories)
6. Iodine solution 1% (Sharon laboratories)
7. Castor oil (Thai castor oil industries Co., Ltd.)
8. Cetyl alcohol (Nof Cooperation, Japan)
9. Stearic acid (Nof Cooperation, Japan)
10. Beeswax (Kahl GmbH Co.KG)
11. Petrolatum (Kahl GmbH Co.KG)
12. Squalane (Kishimoto Special liver oil Co., Ltd, Japan)
13. Glyceryl monostearate SE (Nof Cooperation, Japan)
14. Polysorbate 80 (Nof Cooperation, Japan)
15. Triethanolamine (Nof Cooperation, Japan)
16. Propylene glycol (Kahl GmbH Co.KG)
17. Silicone oil (Dow corning coporation)
18. Glycerine (Kahl GmbH Co.KG)
19. Hyaluronic acid (Sigma)

20. Jojoba oil (Raj Petro Specialities (P) Ltd.)
21. Mineral oil (Raj Petro Specialities (P) Ltd.)
22. Isopropyl palmitate (Nof Cooperation, Japan)
23. Lanolin anhydrous (Namsiang international Co., Ltd.)
24. Cremophor A25 (Nof Cooperation, Japan)
25. Olive oil บริษัท (Raj Petro Specialities (P) Ltd.)
26. Cyclometicone (Dow coming coporation)

### แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



### วิธีดำเนินการวิจัย

#### I. การเตรียมสารสกัดเมือกจากสมุนไพร

##### 1. แมงลัก

ทำความสะอาดเมล็ดแมงลักโดยการเลือกสิ่งสกปรกออกและซัดฝุ่นละออง แช่เมล็ดแมงลักในน้ำกลั่นให้พองตัวเต็มที่ นำเมล็ดแมงลักที่พองตัวเต็มที่แล้ว ไปปั่นโดยเครื่องปั่น เพื่อแยก

สารเมือกออกจากเมล็ด จากนั้นแยกสารเมือกออกโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง โดยใช้ Buchner funnel นำสารเมือกที่แยกได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จนแห้ง พร้อมทั้งหา % yield ที่ได้ บดให้เป็นผงละเอียด เก็บไว้ใน dessicator

## 2. ผักปลัง

ล้างผักปลังให้สะอาด ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง สังเกตลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมือกที่ได้ จากนั้นนำไปทำให้แห้ง โดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) พร้อมทั้งหา % yield ที่ได้ แล้วบดเป็นผงละเอียดได้ผงเมือก เก็บไว้ใน dessicator

## 3. ผลตำรอน

ล้างผลตำรอนให้สะอาด ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ แช่ผลตำรอนในน้ำร้อนประมาณ 10-30 นาที แล้วแกะเปลือกและเมล็ดออก เอาแต่ส่วนเนื้อผลที่มีลักษณะคล้ายวุ้น นำวุ้นที่ได้ไปปั่นให้ละเอียด สังเกตลักษณะภายนอก เช่น สี กลิ่น ความหนืด pH อบวุ้นที่ได้ด้วยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จนแห้ง ปั่นให้ละเอียดอีกครั้งหนึ่ง พร้อมทั้งหา % yield ที่ได้ เก็บไว้ใน dessicator

การศึกษาวิธีการสกัดผักปลังด้วยวิธีต่างๆเพิ่มเติม

สำหรับผักปลังได้เพิ่มการศึกษาสภาวะต่างๆ ในการสกัดเพิ่มเติม เปรียบเทียบระหว่างการใช้ ผักปลังสด และผักปลังแห้ง ดังนี้

### 1. ผักปลังสด ใช้การสกัด 2 วิธี คือ

1.1 แช่หมักด้วย ethanol เพื่อแยก Chlorophyll ออกก่อน นำสารสกัดส่วน ethanol ระเหยแห้งได้เป็น สารสกัดผักปลัง PP 1.1 นำกากไปสกัดต่อด้วยน้ำ โดยนำไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง สังเกตลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมือกที่ได้ จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จนแห้ง บดให้เป็นผงละเอียดได้ผงเมือก PP 1.2 เก็บไว้ใน dessicator

1.2 ล้างผักปลังให้สะอาด ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง สังเกตลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมือกที่ได้ จากนั้นนำไปทำให้แห้ง 2 วิธี คือ อบในตู้อบที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จนแห้ง บดให้เป็นผงละเอียดได้ผงเมือก PP-2.1 และโดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วบดเป็นผงละเอียดได้ผงเมือก PP-2.2 (เหมือนวิธีในข้อ 2 ข้างต้น) เก็บไว้ใน dessicator

2. ผักปลังแห้ง โดยนำผักปลังสด มาอบแห้งที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  จนแห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใช้การสกัด 2 วิธี คือ

2.1 นำผงแห้งที่ได้ไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง สังเกตลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมือกที่ได้ จากนั้นทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้ง บดให้เป็นผงละเอียด ได้เป็นผงเมือก PP-3

2.2 นำผงแห้งไปแช่หมักด้วย ethanol เพื่อแยก Chlorophyll ออกก่อน นำสารสกัดส่วน ethanol ระเหยแห้ง ได้เป็น สารสกัดผักปลัง PP-4.1 นำกากไปสกัดต่อด้วยน้ำ โดยนำไปต้มในน้ำ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกสารเมือกด้วยผ้าขาวบาง สังเกตลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเมือกที่ได้ จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้ง บดให้เป็นผงละเอียดได้ผงเมือก PP-1.2 จากนั้นนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารให้ความชุ่มชื้นผิวเช่นเดียวกับสารเมือกอื่น

## II. ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของผงเมือกจากผักปลัง เมล็ดแมงลักและผลตำรายง

1 คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเมือกแห้งที่ได้, % yield, ค่าความเป็นกรด-เบส, มุมการไหล, % Compressibility, ความชื้น, การพองตัว และ ปริมาณเถ้า

### 1.1 การหามุมของการไหลและสมบัติการไหลของผงเมือก

นำกรวยแก้วมาวางลงในห้วงที่ยึดติดกับขาตั้ง โดยให้มีระยะห่างจากปลายกรวยถึงพื้น ประมาณ 10 เซนติเมตร คำนวณหาพื้นที่ของกระดาษพิมพ์ตัด (กว้าง x ยาว) นำกระดาษแผ่นนั้นไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อย่างละเอียด นำกระดาษไปวางใต้กรวย ชั่งผงเมือกตัวอย่าง 50 กรัม และเทลงในกรวยโดยใช้กระดาษแข็งปิดปลายท่อกรวยไว้ก่อน แล้วเลื่อนกระดาษแข็งออก และเริ่มจับเวลา จนกระทั่งผงเมือกเมล็ดแมงลักหมด ใช้ดินสอด่ขีดเป็นวงกลมตามแนวขอบของกองผงเมือก ลดระดับของปลายกรวยลงมาให้อยู่สูงกว่ายอดสูงสุดของกองผงเมือก  $\frac{1}{4}$  นิ้ว แล้วจึงวัดความสูงของกองผงเมือกโดยวัดจากพื้นถึงปลายกรวย เอาผงเมือกออกไป และใช้แปรงอ่อนปัดกระดาษให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดกระดาษตามรอยดินสอด่ที่ขีดไว้ นำกระดาษที่ตัดได้ไปชั่งโดยใช้เครื่องชั่งวิเคราะห์อย่างละเอียด ทำซ้ำอีก 2 ครั้งบันทึกผล และคำนวณหาค่ามุมการไหล และแปรผล

$$\text{พื้นที่ของวงกลม (A)} = \pi r^2$$

$$\text{รัศมีของวงกลม (r)} = \left( \frac{\sqrt{A}}{\pi} \right)$$

$$\text{ดังนั้น ค่า Tangent ของมุมของการไหลจะมีค่า} = \frac{h}{r}$$



ตารางที่ 3.1: การประเมินสมบัติการไหลของผงเมื่อกจากค่ามุมการไหล

Response angle	Flow
<25	Excellent
25-30	Good
30-40	Passable
>40	Very poor

## 1.2. การหา Compressibility Ratio

ทำการหา Bulk และ Tapped density ของผงเมือก โดยชั่งกระบอกตวงเปล่า 100 มิลลิลิตร เทผงเมือกลงในกระบอกตวงจนได้ปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักกระบอกตวงที่มีผงเมือกเพื่อรู้น้ำหนักแน่นอน เคาะกระบอกตวง 3 ครั้ง กับพื้นไม้โดยให้ก้นของกระบอกตวงสูงจากพื้น 1 นิ้ว และการเคาะแต่ละครั้งห่างกัน 2 วินาที แล้วจึงอ่านปริมาตรของผงเมือกในกระบอกตวง เคาะกระบอกตวงต่อไปอีก 500 ครั้ง (โดยใช้เครื่องเคาะกระบอกตวงอัตโนมัติ) อ่านปริมาตรของผงเมือกอีกครั้ง บันทึกผล คำนวณหา bulk density และ Tapped density ได้ดังนี้

$$\text{bulk density} = M / V_b \text{ กรัม/มล.}$$

$$\text{Tapped density} = M / V_t \text{ กรัม/มล.}$$

นำค่า Bulk และ Tapped density ที่ได้มาหาค่า Compressibility Ratio ดังนี้

$$\text{Compressibility Ratio (\%)} = \frac{\text{Tapped density} - \text{bulk density}}{\text{Tapped density}} \times 100$$

ประเมินผล โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับตารางที่ 3.2 ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

ตารางที่ 3.2: การประเมินสมบัติการไหลของผงเมื่อกจากค่า Compressibility Ratio

Compressibility ratio (%)	Flow
5-15	Excellent
12-16	Good
18-21	Fair to passable
23-35	poor
33-38	Very poor
> 40	Very Very poor

## 2 คุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบทางเคมีของสารเมือก

### 2.1. การหาปริมาณความชื้นและสารระเหยอื่นๆ ที่ระเหยได้ ณ อุณหภูมิ 100-105 °C

การหาความชื้นและสารระเหยอื่นๆ ที่ระเหยได้ (% Loss on drying) โดยวิธีการใน British Pharmacopoeia 1998 โดยมีรายละเอียดดังนี้

อบขวดพร้อมฝาปิดให้ได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก ชั่งผงเมือกที่ต้องการทดสอบ 1 กรัม อบที่อุณหภูมิ 100-105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละของความชื้น และสารระเหยอื่นๆ ที่ระเหยได้ ณ อุณหภูมิ 100 - 105 °C ดังสูตรคำนวณ ต่อไปนี้

$$\% \text{ Loss on drying} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)}}$$

### 2.2. การหาปริมาณสิ่งปลอมปน หรือสิ่งเจือปน

2.2.1 การหาปริมาณเถ้าทั้งหมด (% Total ash) ตามวิธีที่ระบุไว้ใน British Pharmacopoeia 1998 มีรายละเอียดดังนี้

เผา Crucible ที่ 625 °C เป็นเวลา 30 นาที ตั้งให้เย็นใน Desiccator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ชั่งผงเมือกที่ต้องการทดสอบ 1 กรัม แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 – 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เเผาที่ 575 – 625 °C จนน้ำหนักคงที่ และปราศจากคาร์บอน ตั้งให้เย็นใน Desiccator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละของปริมาณเถ้าทั้งหมด ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ Total ash} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

2.2.2 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดและไม่ระเหยที่เป็นสิ่งปนเปื้อน (% Acid – insoluble ash) ตามวิธีที่ระบุไว้ใน British Pharmacopoeia 1998 มีรายละเอียดดังนี้

นำเถ้าทั้งหมดมาต้มกับกรดเกลือ (2 M HCl) 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า (Ashless filter paper) แล้วล้างด้วยน้ำร้อน นำสารที่อยู่บนกระดาษกรองพร้อมด้วยกระดาษกรองมาเผาจนได้น้ำหนักคงที่ ตั้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ดังสูตรคำนวณ ต่อไปนี้

$$\% \text{ Acid – insoluble ash} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

2.3. การทดสอบความสามารถในการพองตัวได้ในน้ำ (swelling test) ตามวิธีที่ระบุไว้ใน British Pharmacopoeia 1998 มีรายละเอียดดังนี้

ชั่งสารเมือกตัวอย่าง 0.02 กรัม โปรมในน้ำที่บรรจุอยู่ในกระบอกตวงที่มีฝาปิด มีปริมาตรน้ำ 10 มล. เขย่ากระบอกตวงให้สารเมือกกระจายตัวทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารเมือกที่พองตัวที่เวลา 3 ชั่วโมง อ่านปริมาตรการพองตัวเป็นมิลลิลิตร คำนวณหาค่าดัชนีการพองตัว

ได้ดังนี้ ค่าดัชนีการพองตัว (swelling index) เท่ากับปริมาตรสารเมือกที่พองตัวเป็นมิลลิลิตรต่อ น้ำหนักสารเมือกแห้ง 1 กรัม

## 2.4. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมือก

### 2.4.1. การทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต

- ใช้สารละลายไอโอดีน ทดสอบคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ (Polysaccharide) ได้แก่ แป้งและไกลโคเจน ไอโอดีนจะแทรกเข้าไปในเกลียวของ amylose และกิ่งของ amylopectin

ผลบวก : ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินเข้มถึงม่วงกับแป้งและ dextrin

ได้สารประกอบสีน้ำตาลแดงกับ glycogen

- ใช้สารละลายเบนดิคต์ ทดสอบน้ำตาลที่มีสมบัติในการรีดิวซ์ (reducing property) ได้แก่ น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ทุกชนิดและน้ำตาลไดแซคคาไรด์ (disaccharide) เกือบทุกชนิด น้ำตาลที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบจะใช้หมู่อัลดีไฮด์รีดิวซ์  $\text{Cu}^{2+}$  ใน Benedict's solution เป็นตะกอนสีแดงอิฐของ  $\text{Cu}_2\text{O}$

ผลบวก : เกิดตะกอนสีเหลือง น้ำตาล หรือแดงของ  $\text{Cu}_2\text{O}$

## 2.5. การตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดเมือกโดย TLC

### 2.5.1 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมือกแมงลักโดย TLC

#### ก. การสกัดแยกและทำบริสุทธิ์โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกรดและเป็นกลาง

ชั่งสารเมือกแมงลัก 5 g เติมสารละลาย 4M NaOH ปริมาตร 150 ml ทำปฏิกิริยาที่  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 150 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนของเหลวใสที่อยู่เหนือตะกอน (supernatant) ทำการสกัดตะกอนที่เหลือโดยเติม 2M NaOH 50 ml นำไปปั่นและเก็บส่วนบน (ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง) นำของเหลวที่เก็บได้ (ซึ่งเป็นเบสแก่) มาปรับค่า pH ด้วย 25%v/v HCl จนกระทั่งได้ค่า pH ประมาณ 7 โดยวัดสภาพความเป็นกรด-ด่างด้วย pH-indicator strips จากนั้นบรรจุของเหลวที่ผ่านการสะเทินลงในหลอดไดอะไลซิส (dialysis tube) ปิดผนึกปลายทั้งสองด้านของหลอดให้แน่นและวางลงในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่น และมีแท่งแม่เหล็กกวนตลอดเวลา แช่หลอดไว้ 1-2 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนน้ำ ทำซ้ำอย่างน้อย 2 - 3 รอบ และแช่หลอดทิ้งไว้จนแทบไม่พบเกลือ NaCl ในน้ำ จากนั้นทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)

#### ข. การแยกสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกรดและเป็นกลางออกจากกัน

การแยกนี้ทำโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ DEAE ซึ่งเป็น anion exchanger ละลายสารตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้ง 0.3 g ใน 0.1 M TRIS - buffered saline (pH 7.5) ค่อยๆ บรรจุสารตัวอย่างลงบนผิวหน้าของคอลัมน์ ชะด้วย TRIS buffer และเก็บ fraction ของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกลางทั้งหมด (ทดสอบโพลีแซคคาไรด์ในแต่ละ fraction ด้วยการนำมาหยดบนแผ่น TLC นำไปจุ่มใน Thymol -



sulfuric acid reagent หากมีโพลิแซคคาไรด์จะปรากฏสีน้ำตาลหรือสีดำบนพื้นสีแดง) เมื่อส่วนที่เป็นกลางถูกชะออกจนหมดแล้ว ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.5 M NaCl เพื่อเก็บส่วนที่เป็นกรด

หลังจากแยกสารโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรดและเป็นกลางออกจากกันแล้ว ทำการไดอะไลซิส เพื่อกำจัดสารที่ใช้ชะคอลัมน์และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

#### ค. การวิเคราะห์ด้วย TLC สารโพลิแซคคาไรด์จากสารสกัดเม็ดแมงลัก

การจะวิเคราะห์โมโนแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่ประกอบในโพลิแซคคาไรด์นั้น จำเป็นต้องทำการย่อย (hydrolysis) เพื่อทำลายพันธะระหว่างหน่วยย่อย ซึ่งในการทดลองนี้ทำการย่อยด้วยกรด trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 2 M โดยเริ่มจากการละลายสารตัวอย่าง 0.2 g ในกรด TFA 0.2 ml แล้วนำไป incubate เพื่อเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา กำจัดกรดออกโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และทำการชะด้วย methanol ประมาณ 1 ml จำนวน 2 – 3 ครั้ง เป่าให้แห้ง

สำหรับการทดสอบ TLC ใช้ระบบ ดังต่อไปนี้

**Stationary phase:** Silica gel plate G60 (Merck)

**Mobile phase:** Acetonitrile : H<sub>2</sub>O (17 : 3)

**Visualization reagent:** ฟันทด้วย Thymol – sulfuric acid reagent แล้วให้ความร้อน

**Standard:** น้ำตาลมาตรฐาน (อาจเลือกน้ำตาลหลายชนิดมาผสมเป็นชุดสารมาตรฐาน) ละลายน้ำตาลมาตรฐาน 5 mg ใน 8 ml MeOH

**Solvent:** Methanol

#### 2.5.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารเมื่อสกัดปลั่งโดย TLC

การทดสอบ TLC ใช้ระบบ ดังต่อไปนี้

**Stationary phase:** Silica gel plate G60 F<sub>254</sub> (Merck)

**Mobile phase:** ใช้ 5 ระบบ ดังนี้

- 1) CH<sub>3</sub>CN:EtOH = 8:2
- 2) CH<sub>3</sub>CN:MeOH = 8:2
- 3) CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O = 8:2
- 4) CH<sub>3</sub>CN:EtOH:H<sub>2</sub>O = 8:1:1
- 5) CH<sub>3</sub>CN:EtOH:H<sub>2</sub>O = 7:1:2

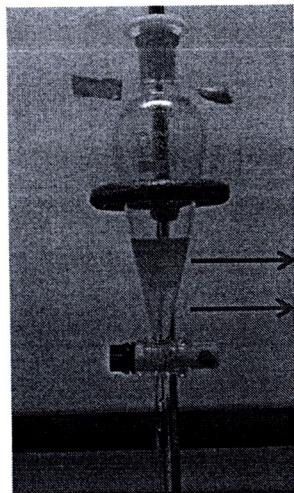
**Detection :** 0.5% thymol/sulfuric acid ( ผลบวกกับน้ำตาลเป็นสีชมพู ถึงสีส้ม)

**Standard :** glucose, fructose, galactose, arabinose, rhamnose, xylose และ sorbitol

**Sample:** สารสกัดปลั่งจากไบสด (เนื่องจากสามารถละลายได้ดีในน้ำที่ 45-70 °C)

### การเตรียมสารตัวอย่าง:

1. ชั่งสารสกัดเปลือกใบปลั่ง 0.225 g นำมาละลายในน้ำ 13.5 ml ที่อุณหภูมิ 70 °C เมื่อผสมเข้ากันแล้วทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 95% EtOH 1.5 ml เขย่าจนเข้ากันได้ สารละลายสีเหลืองใส
2. แยกสารสำคัญในตัวอย่างด้วยวิธี partition โดยการเติมคลอโรฟอร์ม 5 ml ลงในสารละลายที่เตรียมจากข้อ 1) สกัต์แยกด้วยคลอโรฟอร์มซ้ำอีก 3 รอบ สุดท้ายได้สารสกัดของเปลือกใบปลั่งสด ในชั้นเอทานอล/น้ำ
3. นำสารสกัดเอทานอล/น้ำของเปลือกใบปลั่ง ทำให้เข้มข้นโดยขจัดตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่อง rotary evaporator
4. การเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 % w/v ด้วยการชั่งสารสกัดเอทานอล/น้ำของเปลือกใบปลั่งจากข้อ 3) ปริมาณ 0.01 g นำมาละลายในน้ำ 10 ml ที่อุณหภูมิ 45-70 °C



สารสกัดเอทานอล/น้ำของเปลือกใบปลั่งสด  
สารสกัดคลอโรฟอร์มของเปลือกใบปลั่งสด

รูปที่ 3.1: การแยกสารเมือกออกจาก non-polar compounds ด้วยวิธี Partition extraction

### การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 % w/v

ชั่งน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ glucose, fructose, galactose, arabinose, rhamnose, xylose และ sorbitol ชนิดละ 0.1 g นำมาละลายในน้ำ 5 ml ที่อุณหภูมิห้อง

### III. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารให้ความชุ่มชื้นผิวของสารสกัดเมือก

ทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มความชุ่มชื้นผิว (in vitro moisturizing test) ของสารเมือก โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสารเพิ่มความชุ่มชื้นผิวที่มีขายในท้องตลาด

### 3.1 วิธีการทดสอบความชุ่มชื้นในหนังหมูโดยเครื่อง corneometer

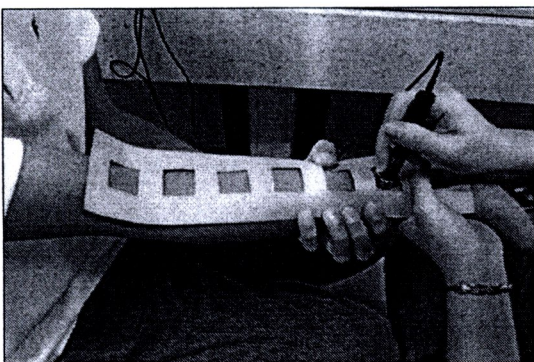
ล้างหนังหมูให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง พร้อมทั้งกำจัดไขมันและขนให้หมด ตัดหนังหมูให้มีขนาด 2x2 เซนติเมตร ทำการวัดปริมาณน้ำที่ผิวหนังด้วยเครื่อง Corneometer (M1) แล้วทาด้วยสารละลายที่ต้องการวัด คือ สารสกัดผักปลัง, สารสกัดแมงลัก และ สารสกัดสำรอง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายต่างๆ ได้แก่ propylene glycol, butylene glycol, Glycerine และ Hyaluronic acid ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 2 นาที แล้วจึงทำการวัดหาปริมาณน้ำที่ผิวหนังด้วยเครื่อง Corneometer (M2) อีกครั้ง เปรียบเทียบกับก่อนทาสารละลาย

### 3.2 การวัดการหดตัวของหนังหมู (Pig skin Shrinkage test)

ล้างหนังหมูให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง พร้อมทั้งกำจัดไขมันและขนให้หมด ตัดหนังหมูให้มีขนาด 2x2 เซนติเมตร (A1) พร้อมชั่งน้ำหนัก (W1) แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่ต้องการวัด ซึ่งได้แก่ สารสกัดเมือก (ผักปลัง, แมงลัก และ สำรอง) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายต่างๆ ได้แก่ propylene glycol, butylene glycol, Glycerin ที่ความเข้มข้น 5 % และ Hyaluronic acid ที่ความเข้มข้น 0.2 % เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้หนังหมูเปล่าเป็นตัวควบคุม (control) หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บันทึกผลโดยการวัดขนาด (A2) และชั่งน้ำหนัก (W2) เปรียบเทียบกับก่อนทำการทดลอง

### 3.3 การทดสอบความชุ่มชื้นผิวในอาสาสมัคร โดยเครื่อง Corneometer

วัดปริมาณความชุ่มชื้นผิว บริเวณท้องแขนและแขนด้านในส่วนบุคคลทั้งข้างขวาและข้างซ้ายของอาสาสมัคร (M - 0) ทาสารละลายที่ต้องการวัดได้แก่ 0.2% สารเมือกแมงลัก, 0.2% สารเมือกผักปลัง และ 0.2% สารเมือกสำรอง เปรียบเทียบกับ 0.2% Hyaluronic acid และน้ำ ทาทิ้งไว้ และวัดปริมาณความชุ่มชื้นผิว ในตำแหน่งเดิมที่ 10 นาทีและ 20 นาที (M-1 และ M-2 )



รูปที่ 3.2: การวัดความชุ่มชื้นผิวของอาสาสมัคร โดยเครื่อง Corneometer

จากนั้นคัดเลือกสารเมือกที่ให้ความชุ่มชื้นสูงสุดมาผสมในตำรับครีม

## V. การทดสอบความระคายเคืองในสัตว์ทดลอง (Primary irritation test in rabbit)

ทดสอบความระคายเคืองในสัตว์ทดลอง (Primary irritation test in rabbit) ก่อนนำไปใช้ในการผลิตสูตรตำรับเครื่องสำอาง

สัตว์ทดลองใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White น้ำหนักระหว่าง 2.0-2.5 กิโลกรัม เพศผู้ อายุ 7-8 เดือน จำนวน 3 ตัว

สารที่ใช้ทดสอบ คือ สารสกัดเมือกผักปลัง ดังนี้ PP 1.2 PP 2.1 PP 3 PP 4.2 และสารสกัดเมือกแมงลัก ML โดยใช้ตัวควบคุมคือ Propylene glycol ( Negative control ) และ 1.5% SLS ( Positive control )

### วิธีการทดสอบ

1. คัดเลือกกระต่ายที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ไม่เคยผ่านการทดสอบ
2. โกนขนที่หลังกระต่ายทั้ง 2 ข้าง ของแนวกระดูกสันหลังให้เกลี้ยง พักไว้ 24 ชั่วโมง
3. แบ่งพื้นที่หลังกระต่ายให้เท่ากับจำนวนสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดยเหลือพื้นที่ว่างเพื่อเป็นตัวควบคุม
4. แปะด้วยสำลีที่ป้ายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 200 มิลลิลิตร/แผ่น แปะไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาแกะสำลีออกแล้วเช็ดด้วยน้ำทิงให้แห้ง ทำการประเมินผลเมื่อครบเวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้คะแนนอาการบวม และแดงของแต่ละตำแหน่ง

### การประเมินผล

หลังแกะสำลีออกทำการประเมินให้คะแนนอาการแดง (Erythema) และอาการบวม (Ederma) ของแต่ละตำแหน่งตาม Draize scoring system ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3.3

ในการจัดประเภทของการระคายเคือง คะแนนเฉลี่ยของอาการบวมและแดงในกระต่ายทั้ง 3 ตัว ณ เวลาต่างๆ แทนด้วย PDI เมื่อนำผลบวกของค่า PDI ณ เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหารด้วยจำนวนช่วงเวลาประเมินค่าที่ได้เรียกว่า PDII ซึ่งค่านี้นำไปใช้ในการจัดประเภทของการระคายเคืองดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3: เกณฑ์การประเมินคะแนนอาการระคายเคือง

อาการ	คะแนน
<b>อาการแดงและการเกิดสะเก็ดแผล</b>	
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อย (เกือบจะไม่แดง)	1
แดงชัดเจน	2

แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงมากถึงเริ่มมีสะเก็ดแผล (มีการบาดเจ็บลึกลงไป)	4
<b>อาการบวม</b>	
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อย	1
บวมเล็กน้อย (ขอบเริ่มนูน)	2
บวมปานกลาง (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร ขยายวงกว้างกว่าบริเวณที่สัมผัสสาร)	4

ตารางที่ 3.4: การจัดประเภทของการก่ออาการระคายเคืองผิวหนัง

ค่า Primary Dermal Irritation Index	ประเภทของการก่อระคายเคือง
น้อยกว่า 0.5	ไม่ระคายเคือง (non - irritation)
0.5 – 2.0	ระคายเคืองเล็กน้อย (slightly irritation)
2.1 – 5.0	ระคายเคืองปานกลาง (moderately irritation)
มากกว่า 5.0	ระคายเคืองรุนแรง (severe irritation)

## VI. การตั้งตำรับครีมพื้นและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมผสมสารสกัดเมือก

ตั้งตำรับครีมพื้นประมาณ 4-5 สูตรตำรับ ประเมินผลด้านสี กลิ่น ความเนียน ความเหนอะหนะ และการกระจายตัวเมื่อใช้ทาผิว คัดเลือกตำรับที่ดีที่สุดและมีความคงตัวดี ได้แก่ตำรับ 2 ซึ่งประกอบด้วย Silicone oil, Stearic acid, Cetyl alcohol, Glyceryl monostearate SE, Jojoba oil , Triethanolamine Glycerine Water และ Conc. Paraben เพื่อนำมาผสมกับสารเมือกที่คัดเลือกแล้ว (โดยใช้สารเมือกแทนที่ glycerin ในตำรับ ) จากนั้นทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 3 เดือน และ ที่สภาวะเร่งแบบ Heating Cooling Cycling ( ที่ 4°C และ 45 °C สลับกันทุก 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 รอบ) ประเมินผลด้านสี กลิ่น การตกตะกอน การแยกชั้น

หมายเหตุ : สารสกัดเมือกจะใช้ที่ความเข้มข้นตามที่ได้ทำการศึกษาความชุ่มชื้น ซึ่งได้แก่ 0.2% ของสารสกัดเมือกในตำรับ

## VII. การทดสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้นผิวของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

ผลิตภัณฑ์ครีมและครีมที่ผสมสารสกัดเมือก ได้แก่

### 1. ครีมพื้น

2. ครีมพื้นผสมสารไฮยาลูรอนิก (HA)
3. ครีมผสมสารสกัดเมือกผักปลัง (PP 1.2)
4. ครีมผสมสารสกัดเมือกผักปลัง (PP 3)
5. ครีมผสมสารสกัดเมือกแมงลัก (ML)

### กลุ่มประชากร

อาสาสมัครทั้งชายและหญิงที่มีอายุระหว่าง 20 – 60 ปี มีสุขภาพดี และมีสัญชาติไทย จำนวนทั้งหมด 29 คน ที่สมัครใจและลงลายมือชื่อยินยอมการเข้าร่วมวิจัยในโครงการนี้ ซึ่งการทดสอบนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากกรรมการจริยธรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### การทดสอบในอาสาสมัคร

#### 1. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

เริ่มจากการทำความสะอาดบริเวณผิวทดสอบของอาสาสมัคร (บริเวณท้องแขนด้านในทั้งสองข้าง) ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นให้อาสาสมัครปรับสภาพผิวหนังอย่างเต็มที่ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดสภาพผิว (ความชุ่มชื้นด้วยเครื่องมือ comeometer) แล้วทาผลิตภัณฑ์ทดสอบบนบริเวณที่กำหนดให้กับอาสาสมัครแล้ววัดความชุ่มชื้นหลังจากทาครีม 15 นาที จากนั้นวัดความชุ่มชื้นอีกครั้งเมื่อครบ 30 นาที โดยอาสาสมัครทุกคนจะต้องอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ตลอดระยะเวลาการทดสอบนี้ วัดปริมาณความชุ่มชื้นผิว ก่อนใช้และหลังใช้ผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (paired t-test) และคำนวณหา % ประสิทธิภาพการเพิ่มความชุ่มชื้นผิวของผลิตภัณฑ์ จากสมการ

$$\% \text{ ประสิทธิภาพการเพิ่มความชุ่มชื้นผิว} = \frac{\text{ความชุ่มชื้นหลังจากทาครีม} - \text{ความชุ่มชื้นก่อนทาครีม}}{\text{ความชุ่มชื้นก่อนทาครีม}} \times 100$$

#### 2. การประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองจะให้อาสาสมัครใช้ผลิตภัณฑ์ไป 14 วัน นัดหมายอาสาสมัครมาอีกครั้งและให้กรอกแบบสอบถามเพื่อประเมินความพึงพอใจ โดยประเมินลักษณะของผลิตภัณฑ์ (สี กลิ่น ความหนืด เนื้อผลิตภัณฑ์) และความพึงพอใจในการใช้ (ได้แก่ ความชุ่มชื้น เนื้อสัมผัส การกระจายบนผิว การซึมสู่ผิว ความมัน ความเหนอะหนะ การเคลือบคลุมผิว และความพึงพอใจโดยรวม) ตลอดจนข้อเสนอแนะต่าง ๆ จากอาสาสมัครโดยการตอบแบบสอบถาม จะให้คะแนนความพึงพอใจเป็น 5,4,3,2,1 (Likert scale) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

## VIII. การทดสอบความระคายเคืองผิวในอาสาสมัคร

ใช้อาสาสมัครชาย-หญิงที่สุขภาพดี ไม่เป็นโรคเกี่ยวกับผิวหนัง อายุ 20-60 ปี จำนวน 29 คน

วิธีการทดสอบ (ใช้วิธี patch testing)

1. บรรจุสารทดสอบใน Finn chambers ได้แก่ ครีมพื้นผสมสารสกัดเมือกผักปลัง PP1.2, ครีมพื้นผสมสารสกัดเมือกผักปลัง PP3, ครีมพื้นผสมสารสกัดเมือกแมงลัก (ML), ครีมพื้นที่ไม่ผสมสารสกัด, ครีมพื้นผสมกรดไฮยาลูรอนิก และใช้ 1 % w/v sodium lauryl sulfate (SLS) เป็น positive control

2. ปิดแผ่น Finn chambers บริเวณแผ่นหลังด้านบน (upper back) โดยปิดทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ประเมินด้วย Draize scoring system ณ เวลาที่ 1, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังนำแผ่นแปะออก

**การประเมินผล**

หลังแกะแผ่น Finn chambers ออกทำการประเมินให้คะแนนอาการแดง (Erythema) และอาการบวม (Ederma) ของแต่ละตำแหน่ง ที่เวลา 1, 24 และ 48 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3.3 ในการจัดประเภทของการระคายเคือง คะแนนเฉลี่ยของอาการบวมและแดงในอาสาสมัครทั้ง 29 คน ณ เวลาต่างๆ แทนด้วย PDI เมื่อนำผลบวกของค่า PDI ณ เวลา 1, 24 และ 48 ชั่วโมงหารด้วยจำนวนช่วงเวลาที่ประเมินค่าที่ได้เรียกว่า PDII ซึ่งค่านี้นำไปใช้ในการจัดประเภทของการระคายเคืองดังตารางที่ 3.4