



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2563

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

Development and Characterization *Anethum graveolens* L. extract loaded
solid lipid nanoparticles

โดย

- | | | |
|--------------------|--------------|---------------|
| 1. นสภ. ณัฐธิดา | สิงหกองกุล | รหัส 59210163 |
| 2. นสภ. ธัญพิสิษฐ์ | ภัทรวารินทร์ | รหัส 59210166 |
| 3. นสภ. ธัญวลัย | บุญแก้ว | รหัส 59210167 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2563

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

Development and Characterization *Anethum graveolens* L. extract loaded
solid lipid nanoparticles

โดย

- | | | |
|--------------------|--------------|---------------|
| 1. นสภ. ณัฐธิดา | สิงหกองกุล | รหัส 59210163 |
| 2. นสภ. ธัญพิสิษฐ์ | ภัทรวารินทร์ | รหัส 59210166 |
| 3. นสภ. ธัญวลัย | บุญแก้ว | รหัส 59210167 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จัดทำขึ้นเนื่องจากผู้วิจัยเล็งเห็นถึงว่าในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น และผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางในท้องตลาดส่วนใหญ่ผลิตมาจากสารเคมีซึ่งอาจทำให้เกิดการระคายเคืองสำหรับผู้ที่มีผิวบอบบางหรือแพ้ง่าย ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งถือเป็นสารที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางมาทำการพัฒนาสูตรต้นตำรับ

แต่สารออกฤทธิ์เหล่านี้มักมีข้อจำกัดในด้านการซึมผ่านเข้าผิวหนังได้ยากด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่จำเพาะรวมถึงความไม่คงตัวมีการสลายตัวได้ง่ายด้วยแสง เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้ง่าย ซึ่งตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ผู้วิจัยได้นำมาทำการศึกษานั้นคือสารสกัดจากผักชีลาว เนื่องจากมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของผักชีลาวที่มีผลต่อเรื่องฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการ พัฒนาระบบนำส่งสารสกัดผักชีลาวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว นั่นคือการศึกษาในรูปแบบอนุภาคไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticles) ซึ่งเป็นกระบวนการเพิ่มความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่าน เพิ่มการละลาย สามารถป้องกันการเสื่อมสลาย และควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญหรือทำให้เกิดความรู้สึกสัมผัสที่ดีบนผิวหนังหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ อนุภาคไขมันแข็งเกิดจากการไขมันประกอบด้วยไขมันแข็ง (solid lipid) หรือส่วนผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว (liquid lipid) เป็นส่วนประกอบหลักซึ่งมีชื่อเรียกว่า solid lipid nanoparticles (SLNs) ดังนั้นอนุภาคชนิดนี้จะไม่ได้มีลักษณะเป็นถุงที่มีความยืดหยุ่น อนุภาคนาโนไขมันเตรียมจากไขมันที่มีความปลอดภัยต่อร่างกาย โดยไม่หลอมละลายที่อุณหภูมิห้องหรือร่างกายทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาหรือสารสำคัญและมีการควบคุมการปลดปล่อยตัวยาหรือสารสำคัญออกมาจากตำรับ นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาผลของระบบนำส่งอนุภาคนาโน พบว่ามีผลช่วยในการนำส่งสารหรือยาเข้าสู่ผิวหนังได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของอนุภาคไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticle) ที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนารูปแบบนำส่งต่าง ๆ มากมาย แต่หากระบบที่เราศึกษานั้นสำเร็จและสามารถนำมาใช้ได้จริง ก็จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคที่จะสามารถมีทางเลือกในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตามงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตเพื่อนำไปประยุกต์ใช้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผู้วิจัย

มีนาคม 2563

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2564

เรื่อง การเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|--------------------|--------------|---------------|
| 1. นสภ. ณัฐธิดา | สิงหกองกุล | รหัส 59210163 |
| 2. นสภ. ัญญพิสิษฐ์ | ภัทรวารินทร์ | รหัส 59210166 |
| 3. นสภ. ัญญวลัย | บุญแก้ว | รหัส 59210167 |

อาจารย์ที่ปรึกษา

1. ภก.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง
2. ผศ.ดร.ณิกานต์ ภีระคำ
3. ภญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

บทคัดย่อ

ระบบนำส่งอนุภาคไขมันแข็งระดับอนุภาคนาโนเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารสกัดเข้าสู่ผิวร่วมกับเทคนิคเพิ่มความสามารถในการเพิ่มการดูดซึม เพิ่มการละลาย สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของสารสกัดและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญหรือทำให้เกิดความรู้สึกสัมผัสที่ดีบนผิวหนังหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ โดยงานวิจัยมีจุดประสงค์เพื่อเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว ซึ่งจากการทดสอบสารสำคัญในผักชีลาวพบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น phenolic compound 36.02 GAE/g extract และ flavonoid compound 1.00 QE/g extract ซึ่งนำสารสกัดไปทำการทดสอบ antioxidation โดยวิธี DPPH , ABTS และ FRAP ได้ค่า IC50 เท่ากับ 174.61 ug/ml , 219.36 ug/ml และ 53.10 mmol/g extract ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบอีกด้วย โดยการเตรียมอนุภาคไขมันแข็งใช้ stearyl alcohol หรือ cetyl alcohol ร่วมกับ lecithin และ cremophor ที่มีสารสกัดผักชีลาว เพื่อให้นำไปใช้พัฒนาต่อยอดต่อไป โดยตำรับที่เตรียมได้แต่ละสูตรจะนำมาเปรียบเทียบซึ่งพิจารณาลักษณะทางกายภาพ ขนาด การกระจายตัวของอนุภาค ความคงตัวของตำรับ และความสามารถในการกักเก็บยา พบว่าตำรับที่เหมาะสมที่สุดคือ LC2 ซึ่งมีอัตราส่วน cetyl alcohol : lecithin เท่ากับ 2 : 5 มีขนาดอนุภาค 292.09 ± 127.16 นาโนเมตร zeta potential เท่ากับ -35.94 และสามารถกักเก็บตัวยาได้ถึง 80.62 % ผลการศึกษาพบว่าสูตร cetyl alcohol : lecithin (2 : 5) ที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว สามารถเพิ่ม

การควบคุมตัวของสารสกัดและกักเก็บสารสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสรุปแล้ว solid lipid nanoparticles สามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งสารสำคัญต่อไปได้ในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....

ผก.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

Senior Project Academic Year 2021

: Development and Characterization *Anethum graveolens* L. extract loaded solid lipid nanoparticles

By

1.Miss. Nattida	Singhakongkun	ID 59210163
2.Mr.Thanpisit	Pataravarin	ID 59210166
3.Miss.Thanwalai	Boonkaew	ID 59210167

Advisor

1.Mr.Watcharapong	Chaemsawang
2.Dr.Nichakan	Peerakam
3.Dr.Putthiporn	Khongkaew

Abstract

A solid lipid nanoparticles system is an important strategy to increase the efficacy for the delivery of an extract into the skin and also increases the solubility to prevent the breakdown of the extract and control the discharge of the active ingredient. The study aimed to develop and characterize *Anethum graveolens* L. extract loaded onto solid lipid nanoparticles. Dill extract was found to have antioxidants; such as, total phenolic 36.02 GAE/g extract and total flavonoid 1.00 QE/g extract. After that, it was used to test the antioxidation by DPPH, ABTS and FRAP with the results being 174.61 ug/ml, 219.36 ug/ml, and 53.10 mmol/g extract that also had anti-inflammatory effects. The solid lipid nanoparticles system was prepared with stearyl alcohol or cetyl alcohol with lecithin and cremophor, which the loaded dill extract could be developed in the future. Each formulation was prepared to be compared by considering the parameters: physical properties, particle size, particle size distribution stability test, and entrapment efficacy. The results showed that the LC2 formulation had cetyl alcohol: lecithin 2:5 (particle size 292.09 ± 127.16 nanometers; zeta potential -35.94, and entrapment efficacy of 80.62%). The results showed that the cetyl alcohol: lecithin 2:5, which

had loaded dill extract could increase the stability of and maintain the dill extract effectively. In conclusion, a solid lipid nanoparticles system could be developed and used as an active ingredient delivery system in the future.

Major Advisor

.....

Mr.Watcharapong Chaemsawang

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจาก ภก.ดร. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง ที่ปรึกษาหลักโครงการวิจัย รวมถึง ผศ.ดร.ณิชกานต์ ภิระคำ และผญ.ดร. พุทธิพร คงแก้ว ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัยที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตรวจสอบและแก้ไขร่างงานวิจัยพร้อมสนับสนุนสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

นอกจากนี้คณะผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยวิจัย ภก.ดร. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์ จัดเตรียมสารเคมี รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นผลทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

มีนาคม 2563

สารบัญ

คำนำ.....	ข
บทคัดย่อ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ณ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
กรอบแนวคิด	5
บทที่ 2	6
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ข้อมูลทั่วไปของผักชีลาว.....	6
1.1 สารที่พบ.....	7
1.2ฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง	7
2. ระบบนำส่งไขมันแข็ง SOLID LIPID NANOPARTICLES (SLNs)	9
3. อนุมูลอิสระ	11
3.1 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ	12
3.2 ปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS).....	13
3.3 ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ	15
3.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants).....	16
3.5 ประเภทของสารต้านอนุมูล	17
3.6 สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย.....	17
3.7 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ	17
3.8 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ	19
3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity).....	20

4. พฤษเคมีเบื้องต้น.....	23
4.1 กลุ่มสารสำคัญในพืช	23
5. การอักเสบ (ANTI-INFLAMATION)	25
5.1 สิ่งที่มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบ.....	26
5.2 ประเภทยาชักนำให้อักเสบ	26
6. ข้อมูลสารเคมี.....	29
6.1 Stearyl alcohol.....	29
6.2 Cetyl Alcohol.....	30
6.3 Lecithin	30
6.4 Cremophore.....	31
7. หลักการเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	32
7.1 Homogenizer	32
7.2 Zetasizer	33
7.3 UV-VIS Spectrophotometer.....	35
7.4 Microplate Reader	37
7.5 Centrifuge	38
บทที่ 3	41
การดำเนินการวิจัย.....	41
1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา	41
2. วิธีดำเนินการศึกษา	42
2.1 การตรวจสอบทางพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening).....	42
2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงปริมาณ	43
2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	44
2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ.....	45
2.5 การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี UV-visible และทดสอบความคงตัวของสารสกัดเบื้องต้น	46
2.6 การพัฒนาอนุภาคไขมันแข็งบรรจุสารสกัดผักชีลาว	47
บทที่ 4	52
ผลการวิจัย	52
1. การตรวจสอบทางพฤษเคมีเบื้องต้น (PHYTOCHEMICAL SCREENING).....	52
1.1 Ferric chloride test (FeCl_3).....	52

1.2 Shinoda หรือ Cyaniding test	54
1.3 10% Sodium hydroxide (NaOH) test	56
1.4 Molisch test	58
1.5 Dragendorff's test.....	60
1.6 Foam test	62
1.7 Gelatin test.....	64
2. การวิเคราะห์หาปริมาณ TOTAL PHENOLIC และ TOTAL FLAVONOID.....	66
2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Phenolic.....	66
2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Flavonoid.....	68
3. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ANTIOXIDANT).....	70
3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay	70
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS assay	77
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay	84
4. การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของสารสกัด (WAVELENGTH SCAN)	89
5. การทดสอบความคงตัวของสารสกัด (STABILITY)	92
6. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด (ANTI-INFLAMATION).....	93
6.1 การทดสอบแบบ Heat induced haemolysis	93
7. การพัฒนาอนุภาคไขมันแข็ง SOLID LIPID NANOPARTICLES (SLNs).....	95
7.1 การศึกษาผลของ Wax และ Lecithin ต่ออนุภาค.....	95
7.2 การศึกษาผลของ cremophor RH40 ต่ออนุภาค	100
7.3 การทดสอบความคงตัวของอนุภาคไขมันแข็งที่.....	105
7.4 การบรรจุสารสกัดผักชีลาวลงในอนุภาคไขมันแข็งและประเมินความคงตัว	109
7.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดผักชีลาวในตำรับ.....	112
7.6 การทดสอบ Differential Scanning Calorimetry (DSC)	115
7.7 การประเมินความคงตัวของตำรับที่บรรจุสารสกัดผักชีลาวระยะยาว	118
บทที่ 5	120
สรุปและวิจารณ์ผลวิจัย	120
เอกสารอ้างอิง	122
ภาคผนวก.....	126

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงขอบเขตและกรอบแนวคิดของการศึกษา.....	5
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของผักชีลาว	6
รูปที่ 3 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน.....	19
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ ABTS.....	22
รูปที่ 5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FERRIC TRIPYRIDYL TRIAZINE	22
รูปที่ 6 HOMOGENIZER	32
รูปที่ 7 ZETASIZER.....	33
รูปที่ 8 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER	35
รูปที่ 9 MICROPLATE READER	37
รูปที่ 10 CENTRIFUGE	38
รูปที่ 11 การทดสอบ FERRIC CHLORIDE TEST (FeCl_3) ก่อน.....	53
รูปที่ 12 การทดสอบ FERRIC CHLORIDE TEST (FeCl_3) หลัง	53
รูปที่ 13 การทดสอบ SHINODA หรือ CYANIDING TEST ก่อน.....	55
รูปที่ 14 การทดสอบ SHINODA หรือ CYANIDING TEST หลัง	55
รูปที่ 15 การทดสอบ 10% SODIUM HYDROXIDE (NaOH) TEST ก่อน.....	57
รูปที่ 16 การทดสอบ 10% SODIUM HYDROXIDE (NaOH) TEST หลัง	57
รูปที่ 17 การทดสอบ MOLISCH TEST ก่อนเติม 5% A- NAPHTHOL (MOLISCH REAGENT)	59
รูปที่ 18 การทดสอบ MOLISCH TEST หลังเติม 5% A- NAPHTHOL (MOLISCH REAGENT).....	59
รูปที่ 19 การทดสอบ MOLISCH TEST หลังเติม CONC. SULFURIC ACID (H_2SO_4).....	59
รูปที่ 20 การทดสอบ DRAGENDORFF'S TEST ก่อน	61
รูปที่ 21 การทดสอบ DRAGENDORFF'S TEST หลัง	61
รูปที่ 22 การทดสอบ FOAM TEST ก่อน	63
รูปที่ 23 การทดสอบ FOAM TEST หลัง.....	63
รูปที่ 24 การทดสอบ FOAM TEST หลัง 10 นาที.....	63
รูปที่ 25 การทดสอบ GELATIN TEST ก่อน	65
รูปที่ 26 การทดสอบ GELATIN TEST หลัง.....	65
รูปที่ 27 แสดงค่าการดูดกลืนแสง GALLIC ACID ที่ความยาวคลื่น 750 NM.....	67

รูปที่ 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสง QUERCETIN ที่ความยาวคลื่น 405 NM	69
รูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ASSAY	70
รูปที่ 30 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว	73
รูปที่ 31 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว	73
รูปที่ 32 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	74
รูปที่ 33 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	75
รูปที่ 34 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	76
รูปที่ 35 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	76
รูปที่ 36 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ASSAY	77
รูปที่ 37 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ASSAY	77
รูปที่ 38 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ASSAY	77
รูปที่ 39 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว.....	80
รูปที่ 40 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว.....	81
รูปที่ 41 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	82
รูปที่ 42 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	82
รูปที่ 43 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	83
รูปที่ 44 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	84
รูปที่ 45 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ASSAY	85
รูปที่ 46 แสดงค่าการดูดกลืนแสง FERIOUS SULFATE ที่ความยาวคลื่น 600 NM	87
รูปที่ 47 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ASCORBIC ACID ที่ความยาวคลื่น 600 NM	87
รูปที่ 48 กราฟการดูดกลืนแสง TROLOX	88
รูปที่ 49 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว	89
รูปที่ 50 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของ CETYL ALCOHOL	90
รูปที่ 51 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของ STEARYL ALCOHOL.....	90
รูปที่ 52 การทดสอบแบบ HEAT INDUCED HAEMOLYSIS หลังปั่นเหวี่ยง.....	94
รูปที่ 53 การทดสอบแบบ HEAT INDUCED HAEMOLYSIS หลังปั่นเหวี่ยง.....	94
รูปที่ 54 แสดงลักษณะตำรับที่เตรียมได้	95
รูปที่ 55 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0	97

รูปที่ 56 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0.....	97
รูปที่ 57 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 1	98
รูปที่ 58 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 1	99
รูปที่ 59 แสดงลักษณะตำรับที่เตรียมได้	100
รูปที่ 60 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0	101
รูปที่ 61 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0.....	102
รูปที่ 62 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 1	104
รูปที่ 63 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 1.....	104
รูปที่ 64 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0	105
รูปที่ 65 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0.....	106
รูปที่ 66 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 7	107
รูปที่ 67 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 7.....	108
รูปที่ 68 แสดงลักษณะตำรับบรรจุสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 0.....	109
รูปที่ 69 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0	110
รูปที่ 70 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0.....	110
รูปที่ 71 แสดงลักษณะตำรับบรรจุสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 3.....	111
รูปที่ 72 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 3	111
รูปที่ 73 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 3.....	112
รูปที่ 74 แสดงวิธีทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดผักชีลาวโดยวิธี ไดอะไลซิส (DIALYSIS).....	113
รูปที่ 75 กราฟแสดงการค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ 340 NM.....	114
รูปที่ 76 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของ CETYL ALCOHOL	115
รูปที่ 77 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของ STEARYL ALCOHOL	116
รูปที่ 78 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของตำรับ LC2	117
รูปที่ 79 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของตำรับ LCC4.....	117
รูปที่ 80 แสดงลักษณะตำรับก่อนทำการเก็บดูความคงตัวระยะยาว.....	118

สารบัญตาราง

ตาราง 1 การแบ่งกลุ่มสารทุติยภูมิ (SECONDARY METABOLITES).....	24
ตาราง 2 แสดงสูตรตำรับที่มี WAX และ LECITHIN ในปริมาณที่ต่างกัน.....	48
ตาราง 3 แสดงสูตรตำรับที่มีการเติม CREMOPHOR ในปริมาณที่ต่างกัน.....	49
ตาราง 4 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ FERRIC CHLORIDE TEST.....	52
ตาราง 5 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ SHINODA หรือ CYANIDING TEST.....	54
ตาราง 6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ SODIUM HYDROXIDE TEST	56
ตาราง 7 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ MOLISCH TEST	58
ตาราง 8 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ DRAGENDORFF'S TEST	60
ตาราง 9 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ FOAM TEST	62
ตาราง 10 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ GELATIN TEST	64
ตาราง 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	66
ตาราง 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ GALLIC ACID ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	67
ตาราง 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	68
ตาราง 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ QUERCETIN ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	69
ตาราง 15 สรุปปริมาณ TOTAL PHENOLIC และ TOTAL FLAVONOID	70
ตาราง 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ DPPH.....	71
ตาราง 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว.....	71
ตาราง 18 แสดงค่าการดูดกลืนของ BLANK.....	72
ตาราง 19 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว	72
ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	74
ตาราง 21 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	75
ตาราง 22 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ ABTS.....	78
ตาราง 23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว.....	79
ตาราง 24 แสดงค่าการดูดกลืนของ BLANK.....	79
ตาราง 25 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของสารสกัดผักชีลาว	80
ตาราง 26 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ ASCORBIC ACID	81
ตาราง 27 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%INHIBITION) ของ TROLOX.....	83

ตาราง 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ FRAP	85
ตาราง 29 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวสารละลายมาตรฐาน FEROUS SULFATE ที่ความยาวคลื่น 600 NM	86
ตาราง 30 สรุปค่า IC50 ของสารสกัดผักชีลาว	88
ตาราง 31 การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารสกัด (ABSORBANCE ANALYSIS).....	91
ตาราง 32 แสดงความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ เมื่อทำการเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน.....	92
ตาราง 33 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวเพื่อดูผลด้านการต้านการอักเสบ% INHIBITION OF HAEMOLYSIS	93
ตาราง 34 แสดงข้อมูลสูตรตำรับในวันที่ 0	96
ตาราง 35 แสดงข้อมูลสูตรตำรับวันที่ 1	98
ตาราง 36 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม CREMOPHOR ในวันที่ 0	101
ตาราง 37 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม CREMOPHOR ในวันที่ 1	103
ตาราง 38 การทดสอบความคงตัวของตำรับ (STABILITY TEST) วันที่ 0.....	105
ตาราง 39 การทดสอบความคงตัวของตำรับ (STABILITY TEST) วันที่ 7.....	107
ตาราง 40 แสดงข้อมูลตำรับที่โหลดสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 0.....	109
ตาราง 41 แสดงข้อมูลตำรับที่โหลดสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 3.....	111
ตาราง 42 แสดงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว (STANDARD).....	113
ตาราง 43 แสดงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่บรรจุในตำรับเมื่อทำการทดสอบการกักเก็บอนุภาค	114
ตาราง 44 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวและตำรับในวันที่ 0 และ 30 ที่ความยาวคลื่น 340 NM	119

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้นถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้คนเข้าถึงได้ง่ายตอบโจทย์และแก้ไขปัญหาผู้บริโภคได้หลากหลายเครื่องสำอางถือเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้บนผิวหนังหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายโดยการทา ถู นวด พ่น หรือโรย มีจุดประสงค์เพื่อทำความสะอาดส่งเสริมให้เกิดความสวยงามหรือเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์ซึ่งถือว่าเป็นนอกจากจะเป็นผลิตภัณฑ์การตกแต่งเพื่อความสวยงามแล้วเครื่องสำอางยังเป็นเครื่องมือเพื่อเสริมสร้างบุคลิกภาพและเพิ่มความมั่นใจความน่าเชื่อถือให้กับผู้บริโภคอีกด้วยนอกจากนี้ธุรกิจเครื่องสำอางและความงามมีแนวโน้มเติบโตสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยข้อมูลจากศูนย์พยากรณ์เศรษฐกิจและธุรกิจมหาวิทยาลัยหอการค้าไทยระบุว่าธุรกิจเครื่องสำอางและสกินแคร์เป็นธุรกิจมาแรงโดยคาดว่าปี 2562-2566 จะเติบโตประมาณ 7.14% จากปี 2560 ที่ 7.8% มีมูลค่ารวมสูงถึง 1.68 แสนล้านบาทแบ่งเป็นกลุ่มสกินแคร์สูงสุดสัดส่วน 47% เมื่อวิเคราะห์ตัวเลขมูลค่าธุรกิจเครื่องสำอางดังกล่าวพบว่ามูลค่าธุรกิจเครื่องสำอางในภาพรวมเติบโตอย่างต่อเนื่องและอัตราการเติบโตสูงกว่าอัตราการขยายตัว ทางเศรษฐกิจภาพรวมของประเทศ

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีการจำหน่ายในท้องตลาดมีทั้งรูปแบบสารสกัดจากธรรมชาติและสารที่ได้จากการสังเคราะห์โดยผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากธรรมชาติส่วนใหญ่มีส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีสารเคมีเจือปนทำให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองน้อยกว่าเครื่องสำอางปกติหรือไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองเลยสามารถใช้ได้บ่อยและต่อเนื่องเท่าที่ต้องการไม่ก่อให้เกิดการอุดตันของผิวและไม่มีสารที่เป็นอันตรายตกค้างในร่างกายในขณะที่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั่วไปใช้สารเคมีเป็นส่วนผสมสามารถสะสมและตกค้างในร่างกายก่อให้เกิดการอุดตันของผิวก่อให้เกิดการแพ้ได้ง่ายและอาจเกิดอันตรายจากผลิตภัณฑ์ได้หากใช้ผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยจากการวิเคราะห์ตลาดจากผู้เชี่ยวชาญในธุรกิจเครื่องสำอางและความงามกล่าวว่ากลยุทธ์ในการชนะตลาดความงามในไทยโดยแบรนด์ต้องคำนึงถึง 2 มุมหลัก คือ ผลิตภัณฑ์และการสื่อสาร โดยผลิตภัณฑ์จะต้องเชื่อมโยงกับคำว่าสุขภาพโดยผสมผสานความเป็นธรรมชาติเข้าไปความเป็นธรรมชาติของคนไทยไม่ใช่แต่เพียงเรื่องของส่วนประกอบจากธรรมชาติแต่ยังคำนึงถึงควมมีประสิทธิภาพที่ล้ำลึกและมีสารปรุงแต่งน้อยที่สุดผลิตภัณฑ์ยังต้องปรับเปลี่ยนให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคอย่างเฉพาะเจาะจงยิ่งขึ้น เช่น ป้องกันปัญหามลพิษฝุ่น PM 2.5 ที่มีต่อผิวตอบโจทย์ความต้องการถึงระดับตัวบุคคล การสื่อสาร

ต้องมุ่งเน้นไปที่ “Holistic Health Benefits” คือ การสื่อสารให้เห็นคุณประโยชน์ต่อสุขภาพแบบองค์รวม ตอบโจทย์ความต้องการทางด้านการใช้งาน และความรู้สึกเพื่อสุขภาพดีจากภายในสู่ภายนอก ดังนั้นแบรนด์ต้องเข้าใจความต้องการของผู้บริโภคและกำหนดกลยุทธ์โดยมีลูกค้าเป็นศูนย์กลางเพื่อเติมเต็มความต้องการของผู้บริโภค

อย่างไรก็ตามในท้องตลาดส่วนใหญ่ได้มีการใช้เครื่องสำอางที่มีสารสกัดจากธรรมชาติมากขึ้น ซึ่งพบว่าได้มีการนำพืชหลากหลายชนิดมาสกัดเพื่อนำสารสำคัญที่ได้ไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ดังตัวอย่างเช่น สารสกัดจากรากชะเอมเทศ สารสกัดจากดอก calendula และสารสกัดจากดอก chamomile เป็นต้น ซึ่งสารสกัดเหล่านี้ก็มีคุณสมบัติที่หลากหลาย เป็นประโยชน์ในการช่วยบำรุงและฟื้นฟูเซลล์ผิวหนังได้ ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านหลายชนิดก็น่าจะมีฤทธิ์ในการใช้เป็นสารบำรุงผิวได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น สารสกัดที่อุดมไปด้วยสารกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความแก่ของผิว ซึ่งในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมากและมีหลายงานวิจัยทำการศึกษาศักยภาพของการกลุ่มดังกล่าวเพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางมากขึ้น โดยพืชที่สนใจในการศึกษานี้คือ ต้นผักชีลาว (*Anethum graveolens* Linn.) เป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในท้องถิ่น ง่ายและสามารถที่เพาะปลูกได้ง่าย มีสรรพคุณที่หลากหลาย เช่น ใช้เป็นยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลม ซึ่งเมื่อทำการสกัดและทดสอบฤทธิ์ พบว่ามีฤทธิ์ antioxidant ได้ ซึ่งพืชชนิดนี้เป็นพืชที่น่าสนใจศึกษาจึงเป็นที่มาของการนำสารสกัดผักชีลาวมาทำงานวิจัยผักชีลาว (*Anethum graveolens* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่มีสารกลุ่ม flavonoids ที่เป็นประโยชน์ในด้านเครื่องสำอางและความงามเป็นจำนวนมาก ได้แก่ quercetin, quercetin 3-glucuronide, isoquercitrin, quercetin-3-O-beta-glucuronide, rutin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดริ้วรอยก่อนวัย (anti-wrinkles) สารกลุ่ม lactones เช่น coumarins กลุ่ม phenolic compounds เช่น tannic acid และ gallic acid สามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ที่เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยจะลดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ช่วยป้องกันการสะสมของเมลานิน มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อให้ผิวขาว สารกลุ่ม tannins เช่น สาร theogallin สารกลุ่ม carotenoids เช่น สาร beta-carotene และน้ำมันหอมระเหย ซึ่งได้แก่สารกลุ่ม monoterpenes และ sesquiterpenes

การเสื่อมของผิวหนังเหล่านี้ไม่สามารถที่จะหยุดยั้งแต่สามารถชะลอให้เสื่อมช้าลงได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านและลดการเกิดอนุมูลอิสระอย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าสารสกัดจากผักชีลาวจะมีแนวโน้มที่ดีในการใช้ต้านอนุมูลอิสระและนำไปใช้ทางเครื่องสำอางแต่สารออกฤทธิ์เหล่านี้มักมีข้อจำกัดในด้านการซึมผ่านเข้าผิวหนังได้ยากด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่จำเพาะรวมถึงความไม่คงตัวมีการสลายตัวได้ง่ายไวต่อแสง เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้

ง่าย โดยจากการศึกษาในการวิจัยต่าง ๆ จะพบว่าอนุภาคไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticle) จะช่วยลดการสลายตัวของปฏิกิริยาดังกล่าว

นอกจากนี้การทำให้อยู่ในรูปแบบของอนุภาคนาโนไขมันแข็งนั้นทำให้ประสิทธิภาพการยึดติดผิวมีค่าสูงจึงนำไปสู่การสร้างฟิล์มบนผิวหนังนำไปสู่การเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังทั้งนี้ผิวหนังเป็นเครื่องกีดขวางที่สำคัญในการซึมผ่านของสารสำคัญคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีรวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์และชั้นผิวหนังที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกวิธีนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ชั้นของผิวหนังการเลือกใช้วิธีนำส่งสารสำคัญที่เหมาะสมจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านของสารสำคัญประหยัดและปลอดภัยแก่ผู้ใช้ข้อได้เปรียบในการนำส่งสารสำคัญเหล่านี้โดยการกักเก็บไว้ในระบบนำส่งอนุภาคนาโนคือความสามารถในการเพิ่มการดูดซึม เพิ่มการละลาย สามารถป้องกันการเสื่อมสลายและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญหรือทำให้เกิดความรู้สึกสัมผัสที่ดีบนผิวหนังหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ฯอนุภาคนาโนที่สามารถนำมาใช้มีอยู่ในหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอนุภาควิธีที่ใช้ผลิตสารสำคัญที่ต้องการกักเก็บกลไกการนำส่งอนุภาคที่ต้องการซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคนาโนเช่นขนาดอนุภาคพื้นผิวอนุภาคและความคงตัวของอนุภาค เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักชีลาวรวมถึงปริมาณสารสำคัญออกฤทธิ์ ได้แก่ phenolics และ flavonoids เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำมาพัฒนาสารสกัดผักชีลาวที่บรรจุลงในอนุภาคไขมันแข็งแล้วทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรมในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ของสารสกัดผักชีลาว
2. เพื่อศึกษาการเตรียมอนุภาคไขมันแข็ง Solid-lipid nanoparticle (SLN) ที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของระบบนำส่ง Solid-lipid nanoparticle (SLN)

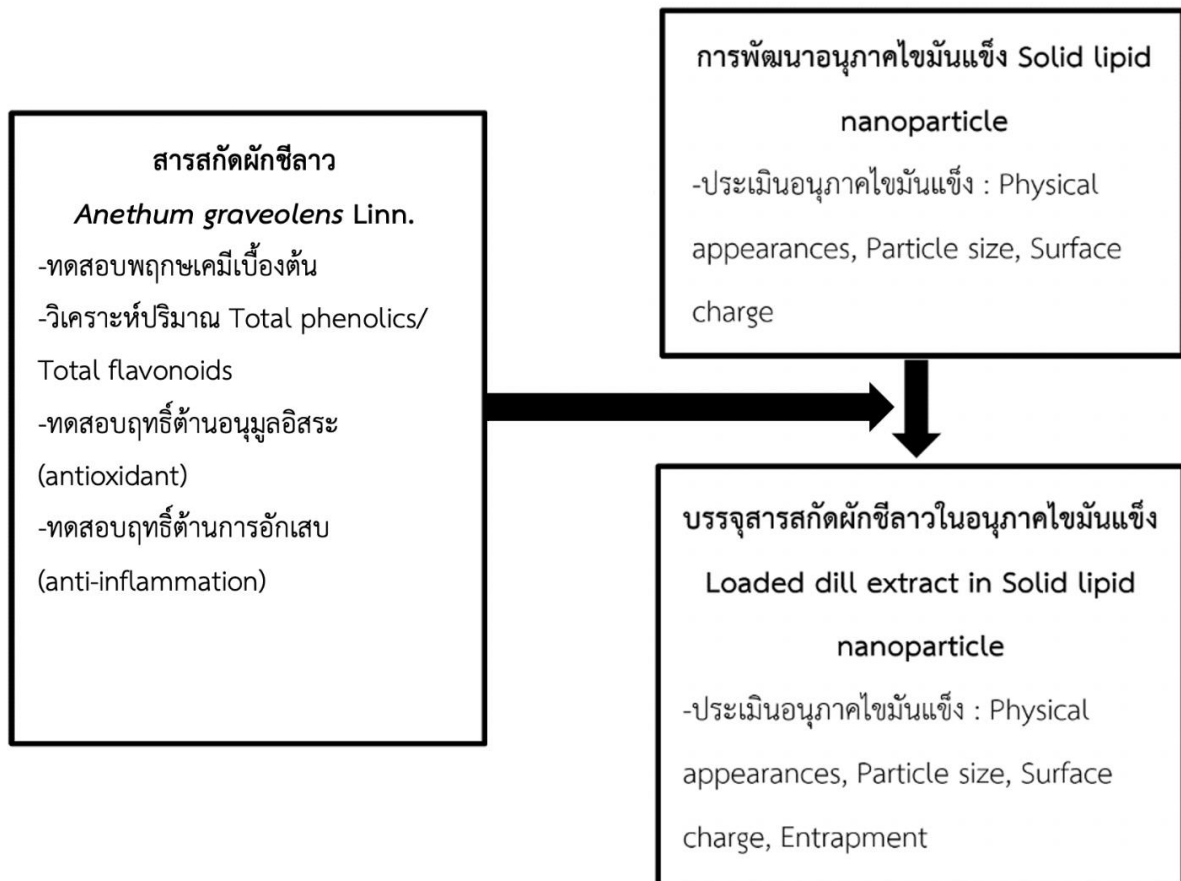
สมมติฐานงานวิจัย

1. สารสกัดผักชีลาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจริง
2. ระบบนำส่ง Solid-lipid nanoparticle (SLN) สามารถเพิ่มความคงตัวของสารได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนแบบ solid-lipid nanoparticle (SLN) ที่บรรจุสารสกัดจากผักชีลาวซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตไปใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ ในอนาคตได้

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 แสดงขอบเขตและกรอบแนวคิดของการศึกษา

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปของผักชีลาว^{(1),(2)}



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของผักชีลาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Anethum graveolens* Linn.

ชื่อวงศ์ : Apiaceae (Umbelliferae)

ชื่อสามัญ : Dill

ชื่อพื้นเมือง : เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตุ๊กแตน (ภาคกลาง) ผักชี (ขอนแก่น เลย) ผักชีตุ๊กแตน ผักชีเทียน (พิจิตร) ผักชีเมือง (น่าน) ผักจี (แพร่)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

- ลำต้น เป็นพืชล้มลุก มีลักษณะกลมเล็กถูกห่อหุ้ม ด้วยก้านใบโดยรอบ ต้นของผักชีลาวมีสีเขียว และมีกลิ่นหอม
- ราก ระบบรากแก้ว มีลักษณะยาวกลมสีน้ำตาล มีกลิ่นหอมกลั่นเฉพาะตัว
- ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับกัน สีเขียวสด ใบสดและใบแห้ง ใช้โรยบนอาหาร ประเภทยำเพื่อดับกลิ่นคาว

- ดอก ออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว มีดอกย่อย ลักษณะคล้ายซี่ร่ม มีขนาดเล็กสีเหลือง
- เมล็ด เป็นส่วนของผล ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นรูปไข่แบน ๆ มีกลิ่นหอมใช้เป็นเครื่องเทศอย่างแพร่หลาย

1.1 สารที่พบ^{(1),(3)}

1.1.1 สารกลุ่ม flavonoids เช่น quercetin, quercetin 3-glucuronide, isoquercitrin, quercetin-3-O-beta-glucuronide, rutin พบประมาณ 9.77 mg GAE g⁻¹ DW

1.1.2 สารกลุ่ม lactones เช่น coumarins, coriandrin (furoisocoumarin), coriandrones (isocoumarins), alantolactone, isoalantolactone

1.1.3 สารกลุ่ม phenolic compounds เช่น tannic, gallic, caffeic, cinnamic, chlorogenic, ferulic, และ vanillic acids พบประมาณ 11.90 mg GAE g⁻¹ DW

1.1.4 สารกลุ่ม tannins พบประมาณ 1.95 mg GAE g⁻¹ DW

1.1.5 สารกลุ่ม carotenoids เช่น beta-carotene

1.1.6 น้ำมันหอมระเหย ประกอบด้วยสารกลุ่ม monoterpenes และ sesquiterpenes ได้แก่ 2E-decenal, decanal, 2E-decen1-ol, และ n-decanol พบประมาณ 0.3%-0.4%

1.1.7 วิตามินและเกลือแร่

1.2 ฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง

จากการศึกษาของ Yung-Shin Shyu⁽⁴⁾ พบว่าผักชีลาวในส่วนต่าง ๆ พบสารสำคัญอยู่มากมายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งแต่ละส่วนก็สามารถพบสารสำคัญได้ไม่เท่ากัน ในผักชีลาวพบปริมาณสาร phenols และ flavonoids อยู่มาก สารประกอบในกลุ่ม flavonoids ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ phenolic compounds^{(5),(6)} มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้⁽⁷⁾ ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันและยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดริ้วรอยก่อนวัยด้วย⁽⁸⁾ นอกจากนี้ phenolic compounds ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ด้วยเช่นกัน โดยไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทำงานเกี่ยวข้องกับกระบวนการ

เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเห็ด ผัก ผลไม้ การลอกคราบในแมลง การเกิดสีผิว ผสม ตาของสัตว์ เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน⁽⁹⁾ สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะ ลดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินช่วยป้องกันการสะสมของเมลานินสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เครื่องสำอางเพื่อให้ผิวขาวขึ้นได้ ปัจจุบันเครื่องสำอางที่มาจากสมุนไพรได้รับความนิยม จึงมีการศึกษาและคัดเลือกสมุนไพรที่มีความสามารถในการนำมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวขาวและมีสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันริ้วรอยก่อนวัยด้วย เช่น เจลล้างหน้าและแผ่นแปะจากสารสกัดมะขามป้อม⁽¹⁰⁾

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดมีสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย เช่น สารสกัดเอทิลอะซีเตตจากผลมะขามป้อม⁽¹¹⁾ สารสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง⁽¹²⁾ สารสกัดเมทานอลจากดอกกล้วยและดอกส้มป่อย⁽¹³⁾ เป็นต้น

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่นิยมศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้ทางเครื่องสำอางคือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งจากงานวิจัยของ Chetna Dhiman⁽¹⁴⁾ พบว่าผักชีลาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกับ butylated hydroxytoluene (BHT) และ ascorbic acid และยังพบว่าปริมาณสารประกอบ phenolics มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย นอกจากนี้จากงานวิจัยของ B. Sohm และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผักชีลาวที่มีผลต่อผิวหนังพบว่าสารสกัดจากเมล็ดผักชีลาวช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ elastin และ collagen โดยกระตุ้น fibroblasts ที่ผิวหนังสามารถเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวหนังทั้งการทดสอบในหลอดทดลองและในคนมีการรายงานว่สารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้น 1% สามารถเพิ่มความกระชับและความยืดหยุ่นของผิวหนังให้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ที่ได้รับการรักษาเป็นเวลา 56 วัน เมื่อเทียบกับผู้ที่ได้รับยาหลอกและอาสาสมัครส่วนใหญ่ระบุว่ามีการเพิ่มความยืดหยุ่นความกระชับมากขึ้น หลังจากผ่านไป 84 วัน หลังผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยสารสกัดผักชีลาว ยังมีพื้นที่และความยาวของผิวหนังเฉลี่ยลดลง อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับผู้ที่ได้รับยาหลอก ความยืดหยุ่นที่มากขึ้นอาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของ Lysyl oxidase (LOX) ที่เพิ่มขึ้นซึ่งกระตุ้นโดยการใช้สารสกัดจากผักชีลาวแม้ว่าการศึกษานี้ไม่ได้วัด Lysyl oxidase (LOX) หรือ lysyl oxidase-like proteins (LOXL)

1.2.1 สารกลุ่ม Flavonoids

สาร flavonoids มีความสำคัญในเรื่องช่วยป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ต ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการถูกคุกคามจากไวรัส⁽¹⁶⁾ Flavonoids เป็นสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระพบในเม็ดสีชนิดละลายในน้ำของผัก ผลไม้เมล็ดธัญพืช ใบไม้และเปลือกไม้ flavonoids มีอยู่มากมายหลายชนิด และพืชแต่ละชนิดจะมี flavonoids แต่ละประเภทในความเข้มข้นที่ต่างกันไป มีการศึกษาหลายงานวิจัยพบว่า flavonoids บางชนิด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เหนือกว่าวิตามินซีหรือวิตามินอีถึง 50 เท่า และ flavonoids ในองุ่นแดง มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล (LDL-fat) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการอุดตันของเส้นเลือดแดงและการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมากกว่าวิตามินอีถึงกว่า 1,000 เท่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดริ้วรอยก่อนวัย (anti-wrinkles) เช่น จากงานวิจัยของ ศรีณยู อุ๋นทวี และคณะ⁽¹⁷⁾ โดยทำการศึกษากัดสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอางในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามพบว่าปริมาณสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม คือ phenolic compounds, flavonoids และ proanthocyanidins

นอกจากนี้สารสกัดผักชีลาวมีการรายงานว่าอนุพันธ์ของสารประกอบ flavonoids เช่น quercetin, rutin และ isorhamnetin derivatives⁽¹⁸⁾ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง cholinesterase ในหลอดทดลอง in silico ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการยับยั้ง cholinesterase ของสารสกัด⁽¹⁹⁾

1.2.2 สารกลุ่ม phenolics

การอธิบายฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักชีลาวต่าง ๆ ในการศึกษาหลายชิ้นและมีความสัมพันธ์กับปริมาณ phenolic ในการศึกษาของ Jinesh และคณะ⁽²⁰⁾ พบว่า polyphenols มีผลในการต้านอนุมูลอิสระด้านการอักเสบและต้านเชื้อจุลินทรีย์ เรื่องต่อต้านริ้วรอย ได้ทำการศึกษาในหลอดทดลองซึ่งตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระการยับยั้งโปรตีนเอสทางผิวหนังและฤทธิ์ในการป้องกันแสงซึ่งส่วนใหญ่ศึกษาโดยใช้ fibroblasts ผิวหนังหรือเซลล์ keratinocytes ของผิวหนัง มีการทบทวนการศึกษาทางคลินิกบางส่วนซึ่งครอบคลุมถึงการต่อต้านริ้วรอยของสาร Polyphenols ผิวหนังหลังการทาเฉพาะที่

2. ระบบนำส่งไขมันแข็ง solid lipid nanoparticles (SLNs)

อนุภาคนาโนไขมันประกอบด้วยไขมันแข็ง (solid lipid) หรือส่วนผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว (liquid lipid) เป็นส่วนประกอบหลัก มีชื่อเรียกว่า solid lipid nanoparticles (SLNs) และ nanostructured lipid carriers (NLCs) ตามลำดับ อนุภาค SLNs ไม่ได้มีลักษณะเป็นถุงที่มีความยืดหยุ่นซึ่งเตรียมได้จากไขมันที่มีความปลอดภัยต่อร่างกายโดยไม่หลอมละลายที่อุณหภูมิห้องหรือร่างกายและตัวยา หรือสารสำคัญที่ใส่เข้าไปในตำรับ SLNs จะแทรกตัวอยู่ในโครงร่างผลึก (crystal lattice) ที่เป็นระเบียบ

อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง คือระบบนำส่งสารที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 50-1000 นาโนเมตร เทคนิคการเตรียมโดยใช้สารหล่อหุ้มประเภทไขมัน เช่น ไตรกลีเซอไรด์ และไขมันแข็ง เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายเมื่อเตรียมเสร็จและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะเกิดการแข็งตัวของ ไขมันโดยเกิด การหล่อหุ้มสารสำคัญไว้ซึ่งสารสำคัญที่ต้องการอาจกระจายตัวอยู่ในอนุภาคหรือถูกดูดซับไว้บนพื้นผิวของอนุภาคได้ สำหรับข้อดีของการเตรียมรูปแบบนี้คือ สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ เพิ่มระยะเวลาใน

การออกฤทธิ์ เพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว เพิ่มความคงตัวของสารสำคัญและผลิตภัณฑ์ ลดการระคายเคืองจากผิวหนังของสารบางชนิด อีกทั้งยังเพิ่มการดูดซึมสารในชั้นที่ลึกยิ่งขึ้น สำหรับการนำรูปแบบนี้มาประยุกต์ใช้ในด้านเครื่องสำอางพบว่าสามารถทำได้หลายรูปแบบ เช่น การบรรจุลงในเนื้อครีมหรือโลชั่น เจล และการผสมในซีรัม เป็นต้น⁽²¹⁾

ปัจจุบันได้มีการนำรูปแบบการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมาพัฒนาใช้สำหรับบรรจุสารสำคัญจากสารสกัดสมุนไพร เช่น ว่านนางคำ ผลการวิจัยพบว่าสามารถเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในว่านนางคำได้ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระยะเวลายาวนานขึ้น ในการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้ง่ายทางเวชสำอาง เช่น ครีม โลชั่นหรือเจล อาจทำได้โดยการเติมอนุภาคนาโนไขมันลงในครีมหรือเจลที่เตรียมไว้ การใส่สารที่เหนียวทำให้เกิดความหนืด (viscosity enhancers) ลงในส่วนน้ำของอนุภาคนาโนไขมันเพื่อให้เกิดเป็นเจลหรือเตรียมอนุภาคนาโนไขมันโดยใช้ไขมันในความเข้มข้นสูงจนทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมออกมามีลักษณะใกล้เคียงกับครีม⁽²²⁾ จากงานวิจัยของ Souto และคณะ⁽²³⁾ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนไขมัน (SLNs และ NLCs) และเจล 4 ชนิด (xanthan gum, hydroxyethylcellulose 4000, Carbopol 934 และ chitosan) ที่ใช้เป็นตัวกลางในการกระจาย พบว่าคุณสมบัติของอนุภาคนาโนไขมันมีผลต่อคุณสมบัติในการไหลของเจลแต่ละชนิด นอกจากนี้งานวิจัยของ Shahgaldian และคณะ⁽²⁴⁾ ได้ศึกษาคุณสมบัติของ SLNs ในเจลชนิดต่าง ๆ (carbopol 980, carbopol 2020, hyaluronic acid และ Xanthan gum) โดยใช้ atomic force microscopy และ photon correlation spectroscopy พบว่า SLNs สามารถกระจายตัวอยู่ภายในเนื้อเจลโดยไม่เกิดการจับตัวกันหรือมีการจับตัวกันเพียงเล็กน้อย

การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนไขมันเพื่อเพิ่มความคงตัวทางเคมีแก่สารสำคัญที่กักเก็บ อนุภาคนาโนไขมันจะช่วยลดการสลายตัวของสารสำคัญที่ไวต่อแสง ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) นอกจากนี้ชนิดของไขมัน ชนิดของสารลดแรงตึงผิว การเติมสารต้านการเกิดออกซิเดชันในขั้นตอนการผลิตและสภาวะในการเก็บล้วนมีผลต่อความคงตัวของ SLNs ที่เตรียมได้ โดยจากงานวิจัยของ Jee และคณะ⁽²³⁾ ศึกษาพบว่าความคงตัวของ all-trans retinol จะสูงขึ้นเมื่อบรรจุใน SLNs ร่วมกับ butylate hydroxyanisole (BHA) และ butylate hydroxytoluene (BHT)

ในการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนไขมันเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนังขนาดอนุภาคที่เล็กของอนุภาคนาโนไขมันทำให้ประสิทธิภาพการยึดติดผิวมีค่าสูงจึงนำไปสู่การสร้างฟิล์มบนผิวหนังทำให้การระเหยของน้ำเกิดลดลง ทำให้เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง⁽²²⁾ จากงานวิจัยของ Pardeike และ Muller⁽²²⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบถึงความสามารถในการรักษาความชื้นบนผิวหนังของ NLCs อิมัลชัน และ liquid paraffin พบว่า NLCs มีความสามารถในการรักษาความชื้นบนผิวหนังสูงกว่าอิมัลชันเมื่อมีปริมาณไขมันและขนาดอนุภาคเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่า NLCs มีความสามารถในการรักษาความชื้นบนผิวหนังเทียบเท่า liquid paraffin อย่างไรก็ตาม

ตาม จากงานวิจัยของ Souto และคณะ⁽²³⁾ ศึกษาพบว่า SLNs มีค่าการปกคลุมผิว (occlusive factor) ที่สูงกว่า NLCs เมื่อเตรียมด้วยความเข้มข้นของไขมันที่เท่ากัน

ในการประยุกต์ใช้ออนุภาคนาโนไขมันเพื่อเพิ่มการดูดซึมของสารสำคัญผ่านผิวหนัง ขนาดที่เล็กของอนุภาคนาโนไขมันทำให้สามารถสัมผัสกับ stratum corneum ได้อย่างใกล้ชิดจึงช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารสำคัญผ่านผิวหนังได้⁽²²⁾ จากงานวิจัยของ Pardeike และ Muller⁽²⁵⁾ ศึกษาการเพิ่มการดูดซึมผ่านผิวหนังของ Coenzyme Q10 ที่บรรจุใน NLCs เปรียบเทียบกับ Coenzyme Q10 ในรูปแบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและในรูปแบบสารละลายใน liquid paraffin โดยใช้ tape-stripping test จากการศึกษาพบว่า NLCs สามารถเพิ่มการดูดซึมของ Coenzyme Q10 เมื่อเปรียบเทียบกับ Coenzyme Q10 ในรูปแบบอิมัลชันและในรูปแบบสารละลายใน liquid paraffin

ในการประยุกต์ใช้ออนุภาคนาโนไขมันเพื่อลดการระคายเคืองจากสารสำคัญทางเวชสำอาง สารกันแดดบางชนิด เช่น benzophenone และ titanium dioxide อาจซึมสู่ผิวหนังทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเกิดการแพ้⁽²⁶⁾ จากงานวิจัยของ Wissing และ Muller⁽²⁷⁾ ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ SLNs และ o/w emulsion ในการนำส่ง oxybenzone ซึ่งเป็นสารกันแดดผ่านผิวหนัง ผลการศึกษาพบว่า SLNs ให้การปลดปล่อย oxybenzone ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชัน นอกจากนี้ SLNs ยังให้ปริมาณและอัตราการซึมผ่านผิวที่ต่ำกว่า

ในการประยุกต์ใช้ออนุภาคนาโนไขมันในการป้องกันรังสียูวี จากการที่ SLNs มีคุณสมบัติในการป้องกันรังสียูวี^{(27),(28)} จากงานวิจัยของ Wising และ Muller⁽²⁷⁾ ได้ศึกษาสารกันแดดรูปแบบใหม่โดยการบรรจุ tocopherol acetate ลงใน SLNs เพื่อเพิ่มความคงตัวของเคมีและเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันรังสียูวี พบว่า SLNs เปล่า (placebo SLN) และ tocopherol acetate ในรูปแบบ SLNs มีประสิทธิภาพในการป้องกันรังสียูวีที่สูงกว่า tocopherol acetate ในรูปแบบอิมัลชัน นอกจากนี้ยังพบว่า SLNs ที่มี tocopherol acetate มีประสิทธิภาพในการป้องกันรังสียูวีที่สูงกว่า SLNs เปล่า ซึ่งเกิดจากการเสริมฤทธิ์ในการป้องกันรังสียูวีของ tocopherol acetate กับ SLNs

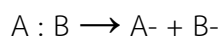
3. อนุมูลอิสระ⁽⁴⁾

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระนั้นจะไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่

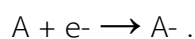
สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) แต่ก็ไม่ใช่ว่าอนุมูลอิสระทุกชนิดจะเป็นสารพิษต่อร่างกาย ดังนั้น จึงใช้ความสามารถในการ oxidized ของสารชีวโมเลกุลในร่างกายในการบอกระดับความเป็นพิษ โดยสารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species (RCS) และ reactive nitrogen species (RNS) ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ ROS นั้นเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่างๆ กระบวนการสร้างพลังงานการหายใจระดับเซลล์รวมถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิด 4 ภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลาด้านๆเพียงชั่วขณะนั้นจะ ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไป ทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบและนำไปสู่ความเสื่อมของ อวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่าง ๆ มะเร็ง รวมถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าภาวะ oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุของโรค และร่างกายจะมีภาวะนี้เมื่อเป็นโรคบางอย่าง ซึ่งภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหล่านี้ได้อย่างเห็นได้ชัด

3.1 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

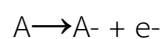
3.1.1 การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส⁽⁴⁾



3.1.2 การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



3.1.3 การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอม



3.2 ปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS)

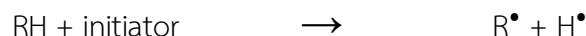
3.2.1 ปัจจัยภายในร่างกาย

อนุมูลอิสระ ROS จะเกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ ของร่างกายผ่านกระบวนการสร้าง ATP โดย O_2 จะเปลี่ยนไปเป็น H_2O

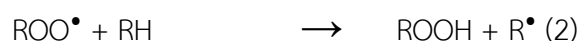
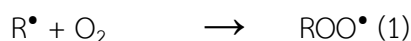
ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์และบางขั้นตอนก็ผ่านปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ นอกจากกระบวนการสร้างพลังงานแล้ว ในกลไกการป้องกันตนเองเมื่อถูก pathogen เข้ารุกรานก็มีการสร้าง ROS ขึ้นได้ด้วยเช่นกัน โดยปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Oxidative burst เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น macrophage และ leukocyte ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่าง ๆ จะมีการสร้าง $O_2^{\bullet-}$ ขึ้นผ่านทาง NADPH oxidase โมเลกุล $O_2^{\bullet-}$ ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น H_2O_2 และเกิดเป็น hypochlorite (HOCl) ในที่สุด

1) ปฏิกิริยา Auto-oxidation เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมันซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

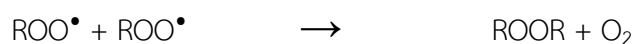
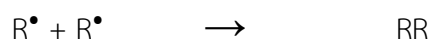
1.1 ระยะ Initiation เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสง อุณหภูมิเป็นตัวเร่ง ดังสมการ



1.2. ระยะ Propagation เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น Peroxy radical ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide และอนุมูลอิสระซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่ง ก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยาต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ



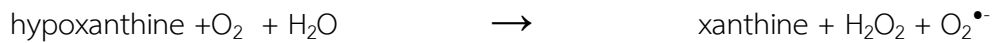
1.3. ระยะ Termination เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันในรูปแบบต่าง ๆ ดังสมการ



2) ปฏิกริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

2.1 เอนไซม์ Xanthine oxidase (XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลาย Purine โดยเร่งปฏิกริยาการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine และ xanthine เป็น uric acid พร้อม ๆ กับขนถ่ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็น $O_2^{\bullet-}$ ดังสมการ



2.2 เอนไซม์ Lipoyxygenase(LOX) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โมเลกุลของเอนไซม์นี้มี Iron(II) oxide เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้

3) กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

ในขั้นตอนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนเข้ามาภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจนมาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็น $O_2^{\bullet-}$ จากปฏิกริยาของเอนไซม์ NADPH oxidase ที่อยู่บน outer membrane ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ

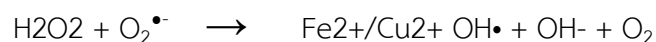


นอกจากนี้ในเม็ดสีของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ myeloperoxidase ทำให้เกิดอนุมูล hypochlorus ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ดังปฏิกริยาต่อไปนี้



4) Transition metal

โลหะ Transition 2 ชนิดคือ เหล็ก และ ทองแดง ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้าง hydroxyl จาก $O_2^{\bullet-}$ และ hydrogen peroxide ในปฏิกริยา Fenton



3.2.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกาย

ปัจจัยแวดล้อมนั้นมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีต่างๆ เช่น UV, X-ray, Gamma ray รังสีอย่างนี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนเป็น hydroxy radical อย่างง่ายดาย หรือแม้แต่มลภาวะทางเคมี เช่น paraquat ที่กระตุ้นให้เกิด peroxide หรือ ozone สารจำพวก quinones และ nitroaromatics ก็เป็นสารที่ทำให้เกิด superoxide ได้ นอกจากนี้ยังมีโลหะหนัก ซึ่งเมื่อรับไปมาก ๆ ก็เสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ได้ สารต่าง ๆ เหล่านี้มักก่อให้เกิดมะเร็งและโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ

1) ยารักษาโรค

ยาบางชนิดก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง อย่างเช่น Bleomycin , Anthracyclines และ Methotrexate เนื่องจากมีฤทธิ์เสริม Oxidation

2) รังสี

การใช้รังสีรักษาโรค เช่น X-ray , Gamma ray เป็นต้น อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิด Secondary reaction กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

3) ควันบุหรี่

ควันบุหรี่มีส่วนประกอบของ nitric oxide (NO) , Nitrogen dioxide และ Peroxynitrite และสารมลพิษ ได้แก่ sulfur dioxide และ carbontetrachloride ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของ CYP450 hydroxylase ที่มีอยู่ในเซลล์ตับ และพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็กทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ดังกล่าว

4) โอโซน

โอโซนไม่ได้เป็นสารอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นรูป hydroxyl ได้จากการกระตุ้นของ UV

3.3 ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ⁽⁵⁾

ภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล (Oxidative stress) และสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายมากเกินไปจนสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีปริมาณไม่เพียงพอ เรียกว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidation stress) และส่งผล

ให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลอื่นๆ จัดเป็นการทำลายแบบออกซิเดชัน (Oxidative Damage) โมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ผลเสียหายต่อโมเลกุลเป้าหมายและเซลล์จะขึ้นกับลักษณะของโครงสร้างโมเลกุล ชนิดเซลล์ ชนิดอวัยวะ และความรุนแรงของภาวะเครียดออกซิเดชัน ที่เกิดขึ้น หากเกิดประจำต่อเนื่อง ก็จะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดภาวะเสื่อมสภาพ และ แก่ก่อนวัย และรุนแรงไป ถึงการเกิดเป็นโรคต่าง ๆ

3.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation ด้วยเหตุที่ ROS เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่างๆ ในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น co-enzyme Q10 alpha-lipoic acid เป็นต้น โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และอนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น เป็นต้นเหตุของภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson รวมถึงอาการอักเสบต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ร่วมด้วย

- 1) ป้องกันการเกิดขึ้นของ ROS ได้
- 2) สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- 3) ต้องไม่เพิ่มความแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่าง ๆ ไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูง เช่น ไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น
- 4) ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ
- 5) เพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

3.5 ประเภทของสารต้านอนุมูล

แบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ คือ

3.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ

เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยการให้อนุมูลอิสระไฮโดรเจน ($H\cdot$) หรืออิเล็กตรอนที่อนุมูลอิสระโดยตรง เป็นผลทำให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้

3.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ

สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่าง ๆ เช่น จับกับ Fe^{2+} ดักจับออกซิเจน ดูดซับรังสี UV ไว้ เป็นต้น

3.6 สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายสารที่เรียกว่า กระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท

3.6.1 Intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase

3.6.2 Extracellular antioxidants ได้แก่ Vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups

3.6.3 Membrane antioxidants ได้แก่ Carotenoids Ubiquinone Vitamin E

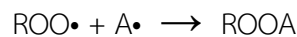
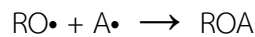
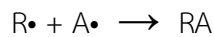
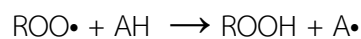
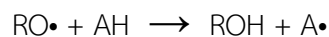
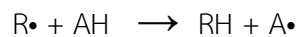
3.6.4 สารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Copper Manganese Selenium Zinc

3.7 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกแบ่งได้ 6 แบบ ใหญ่ ๆ คือ

3.7.1 ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิมโดยอาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรหรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆมาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA), Vitamin E (alpha-tocopherol)



สมการแสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ Free radical scavenging

3.7.2 ยับยั้งการทำงานของ (Singlet oxygen quenching)

ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen (1O_2) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น carotenoids

3.7.3 จับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelating)

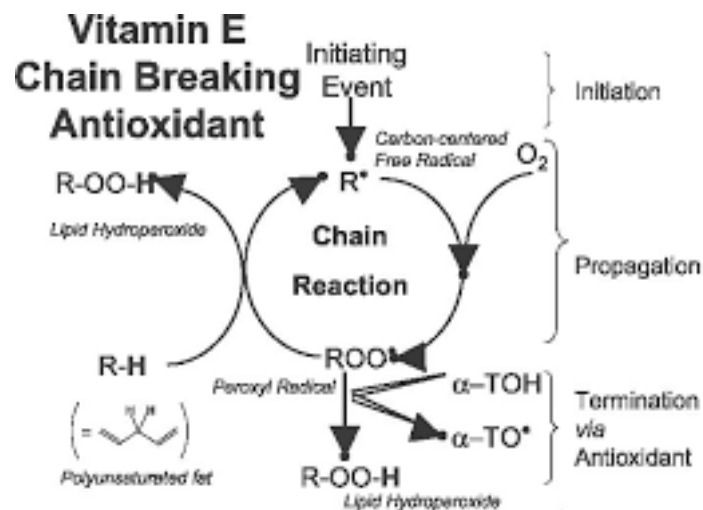
โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท เช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอ การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid

3.7.4 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor)

สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

3.7.5 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (a-tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเชื้อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy (ROO) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

3.7.6 เสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำงานร่วมกันระหว่าง a-tocopherol กับ ascorbic acid โดยที่ ascorbic acid ไม่สามารถทำงานในระบบ hydrophobic ได้เหมือนกับ a-tocopherol แต่จะได้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล a-tocopherol peroxy ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง a-tocopherol กับอนุมูล peroxy (ROO) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น a-tocopherol ที่สามารถทำงานได้

3.8 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

3.8.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารประกอบ phenolic สังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylated hydroxyanisole, BUT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน อันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติที่เปลี่ยนแปลงสารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทำไปแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยใน การบริโภค

3.8.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินอย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีนและสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ phenolic โดยเฉพาะ polyphenols เช่น แชนโวน และฟลาโวนอยด์ซึ่งประกอบด้วยหมู่ Aromatic hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไปหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล H แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชันคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารพิษที่ร่างกายได้รับและช่วยลดการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระจึงช่วยชะลอความทรุดโทรมของร่างกายและป้องกันการเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบันมีทั้งสารที่ได้จากธรรมชาติ และสารสังเคราะห์

การวัดความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชัน (total antioxidant capacity, TAC) เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่

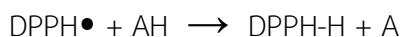
1) DPPH assay

2) ABTS assay

3) FRAP assay

3.9.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay

DPPH assay หรือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 - 517 นาโนเมตร โดย DPPH• จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R•)

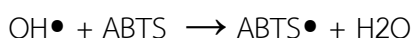


กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH• กับ สารต้านอนุมูลอิสระ

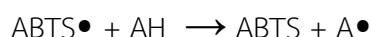
เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ BHT ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงจะลดลงซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ หรือ EC₅₀

3.9.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS assay

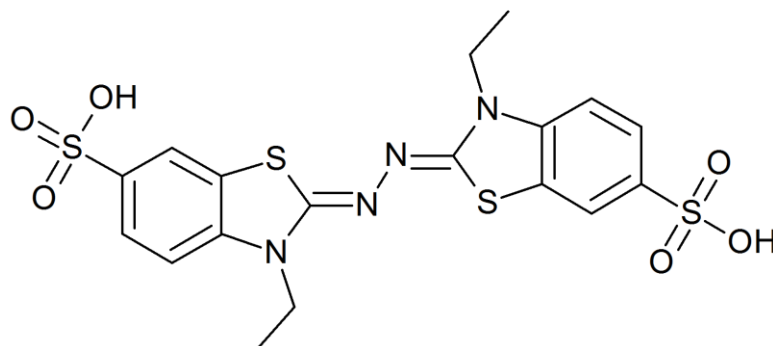
เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ซึ่งจะเป็น stable radical ในตัวทำละลาย aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียวดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร



antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ ABTS+ ดังนี้



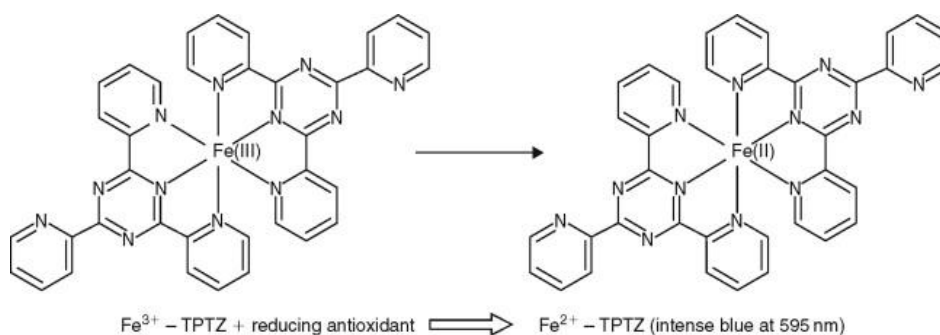
ซึ่งถ้าความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวลดลงจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้น ABTS+ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50 % inhibition concentration (IC50) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS+ ลดลง 50 %



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ ABTS

3.9.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย FRAP assay

FRAP assay หรือ Ferric reducing antioxidant power เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความคลื่น 595 นาโนเมตร โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังรูปแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ ferric tripyridyltriazine



รูปที่ 5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ ferric tripyridyltriazine

4. พฤษเคมีเบื้องต้น

พฤษเคมี (Phytochemicals) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช โดยมีขอบเขตเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากพืช การแยกสารให้บริสุทธิ์ การหาสูตรโครงสร้าง และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเคมีที่แยกได้จากพืช การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในพืช ตลอดจนการศึกษาระบบการชีวสังเคราะห์ และกระบวนการสลายสารเคมีในพืช เป็นต้น

4.1 กลุ่มสารสำคัญในพืช

สารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้นของสารเหล่านี้ได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

4.1.1 สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไปพบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมที่จำเป็นของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน เอนไซม์ เป็นต้น

4.1.2 สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้มักแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน สารทุติยภูมิสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

ตาราง 1 การแบ่งกลุ่มสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

สารทุติยภูมิ	กลุ่มย่อยของสารทุติยภูมิ
อัลคาลอยด์ (Alkaloids)	
ฟีนอลิก (Phenolic compounds)	- ฟีนอล และ ฟีนอลิกไกลโคไซด์ (Phenol and Phenolic glycosides) - คูมาริน (Coumarins) - ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) - แทนนิน (Tanins) - ควิโนน (Quinone)
เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)	- ซาโปนิน (Saponins) - โมโนเทอร์พีน (Monoterpenes) - เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpenes) - ไดเทอร์พีน (Diterpenes) - ไตรเทอร์พีน (Triterpenes) - เตตราเทอร์พีน (Tetraterpenes) - น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) - เรซิน และโอเลโอเรซิน (Resins and Oleoresins)
สเตอรอยด์ (Steroids)	- ซาโปนิน (Saponins) - คาร์ดิออลไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) - ไกลโคไซด์ชนิดอื่น ๆ (Other glycosides)
กลูโคซิโนเลต (Glucosinolate compounds)	

1) สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ โดยทั่วไปโครงสร้างประกอบด้วย aromatic ring ที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อยหนึ่งกลุ่ม ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปกลุ่ม -OH อิสระ หรือจับอยู่กับสารอื่นในรูปของ ether หรือ glycoside แต่เพื่อแยกสารกลุ่ม phenolic ออกจาก alkaloids และ terpenes ดังนั้นสารกลุ่ม phenolic ในพืชจึงหมายถึงกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย aromatic ring ที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อย 1 กลุ่ม โดยที่ไม่มีไนโตรเจนในโมเลกุล

การตรวจหา phenolic hydroxyl group อาจทำได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_2) สีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนของ Phenolic hydroxyl group ที่มีอยู่ในสารนั้น เช่น

สารที่มี Phenolic hydroxyl group 1 กลุ่ม จะให้สีม่วง

สารที่มี Phenolic hydroxyl group 2 กลุ่ม จะให้สีเขียว

สารที่มี Phenolic hydroxyl group 3 กลุ่ม จะให้สีน้ำเงิน

2) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

สารประกอบ flavonoid เป็นสารประกอบ phenolic compounds ประเภท polyphenol มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น aromatic ring ที่มีจำนวน hydroxyl group รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาล ในรูปของสารประกอบ glycoside สารประกอบ flavonoids ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins

5. การอักเสบ (Anti-inflammation)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตเพื่อที่จะป้องกันการทำลาย หรือควบคุมอันตรายต่าง ๆ ไม่ให้ลุกลามออกไปยังบริเวณอื่นของร่างกายโดยร่างกายมีการเพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตผลของเซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบขึ้นมาต่อต้านตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดอาการอักเสบ ทั้งยังช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลายโดยผลของการอักเสบจะทำให้บริเวณนั้นเกิดอาการ (Symptoms) 4 ประการ คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness) และร้อน (heat)

5.1 สิ่งที่มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบ

5.1.1 Mechanical stimulus เช่น การกระทบ (Trauma)

5.1.2 Chemical stimulus ได้แก่ สารเคมี ยา หรือ Toxin

5.1.3 Infectious stimulus ได้แก่ เชื้อโรค หรือจุลชีพต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา

สามารถแบ่งการอักเสบออกเป็น 2 ชนิด คือ

1) การอักเสบชนิดเฉียบพลัน (acute inflammation)

2) การอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation)

การอักเสบชนิดเฉียบพลัน (acute inflammation)

เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นทันทีและรวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาสั้น และกินเวลาไม่นาน ทั้งนี้ขึ้นกับสาเหตุชักนำ โดยพยาธิสภาพทั่วไปประกอบด้วย การขยายขนาดของหลอดเลือดเล็ก พร้อมกับการคั่งของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการบวมทั่วไปของเนื้อเยื่อบริเวณอักเสบ โดยเซลล์อักเสบที่พบร่วมเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear (PMN) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจพบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณอักเสบร่วมด้วยซึ่งขึ้นกับชนิดและระยะเวลาของสาเหตุชักนำ

การอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation)

เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นช้า กินระยะเวลานาน ขึ้นกับชนิดของสาเหตุชักนำและระยะเวลาของการอักเสบ อาจพบพยาธิสภาพร่วมในการซ่อมแซม เช่น เกิดการพอกของเยื่อพังผืด (fibrosis) และสารหินปูน (calcification) หรือบางรายพบการสร้างเซลล์เนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนที่ตายไป เป็นต้น หรือเกิดจากการอักเสบชนิดเฉียบพลันและต่อมากลายเป็นชนิดเรื้อรังเนื่องจากสาเหตุชักนำยังไม่ถูกกำจัดออกไป โดยมักพบเซลล์อักเสบเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells เช่น lymphocytes, plasma cells หรือ macrophages เป็นต้น

5.2 ประเภทสารชักนำให้อักเสบ

5.2.1 สารชักนำการอักเสบที่ได้มาจากเซลล์

1) Histamine พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อ พบมากใน mast cells ซึ่งอยู่ตามเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบใน basophils และ platelets สาร histamine ทำให้เกิดการขยายหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก (arterioles) และเพิ่ม vascular permeability ของหลอดเลือดดำขนาดเล็ก (venule) ทำให้เกิดการหดตัวของผนังหลอดเลือดดำ (venule) และขยายช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังหลอดเลือด (interendothelial cell junction)

2) Serotonin (5-Hydroxytryptamine) เช่นเดียวกับ สาร histamine พบได้ใน platelets และ enterochromaffin cells

3) Lysosomal compounds เป็นสารเคมีที่พบในเม็ด lysosomes ของเม็ดเลือดขาวและเซลล์ monocytes โดยเมื่อปล่อยออกมาออกเซลล์มีผลชักนำให้เกิดการอักเสบได้ สารเคมีใน lysosome มีหลายชนิด ที่สำคัญรวมเรียกว่า proteases (เช่น elastase, collagenase, proteinase เป็นต้น) สารต่าง ๆ เหล่านี้ทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย ในขณะที่ร่างกายก็ได้สร้างสารต่อต้านสารเคมีเหล่านี้เรียกว่า antiproteases ที่สำคัญ ได้แก่ สาร alpha1-antitrypsin ซึ่งปกติจะคอยต้านตัวทำลาย คือ elastase

5.2.2 สารชักนำการอักเสบที่สร้างขึ้นใหม่

1) Prostaglandins อยู่ในกลุ่ม eicosanoids ได้จากการย่อย arachidonic acid (AA) ด้วยเอนไซม์ cyclooxygenase โดย prostaglandins จะถูกย่อยต่อไปได้สารต่าง ๆ กันตามแต่ชนิดของเอนไซม์ เช่น ถูกย่อยด้วยเอนไซม์บนเกร็ดเลือด (platelets) ได้ thromboxane (TXA₂) ช่วยให้เกร็ดเลือดจับติดกัน (platelet aggregation promoter) และทำให้เส้นเลือดหดตัวหรือถูกย่อยด้วยเอนไซม์บนเซลล์บุผนังหลอดเลือด ได้เป็น prostacyclin (PGI₂) ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและห้ามการจับกันของเกร็ดเลือด (platelet aggregation inhibitor) นอกจากนี้มีสาร prostaglandins ชนิดอื่น ๆ อีกเช่น PGD₂ PGE₂ และ PGF₂ สารเหล่านี้มีส่วนร่วมทำให้เกิดการอักเสบ เช่น ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและส่งเสริมการบวม เป็นต้น

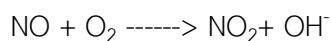
2) Leukotrienes อยู่ในกลุ่ม eicosanoids ได้จากการย่อย arachidonic acid (AA) ด้วยเอนไซม์ lipoxygenase สาร leukotrienes มีหลายชนิด เช่น LTA₄ LTB₄ ทำให้เม็ดเลือดขาวจับติดกัน ส่วน LTC₄ LTD₄ และ LTE₄ ทำให้หลอดเลือดหดตัวและเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด รวมทั้งทำให้หลอดลมบีบรัด (bronchospasm)

3) Platelet activating factor (PAF) เป็นสารชักนำการอักเสบ มีแหล่งกำเนิดมาจากสาร phospholipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ มีคุณสมบัติทำให้เกิด platelet aggregation และเร่งการปลดปล่อยเกร็ดเลือดเข้าสู่กระแสเลือด (platelet release) นอกจากนี้ยังทำให้หลอดเลือดและหลอดลมหดตัว

(vasoconstriction and bronchoconstriction) ในกรณีที่พบปริมาณเล็กน้อยในเลือดกลับช่วยให้หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มคุณสมบัติการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดดำขนาดเล็ก (increased venular permeability) ในขณะเดียวกันสาร PAF ยังช่วยการเกาะติดผนังหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาว และช่วยเร่งการสร้างสาร eicosanoids ในเซลล์อีกด้วย

4) Cytokines เป็นสารพวก polypeptides สร้างในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ lymphocyte และ macrophage สาร cytokines ที่สำคัญได้แก่ interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) และ interleukin-8 (IL-8) และมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบ โดยเฉพาะในเซลล์บุผนังหลอดเลือด จะช่วยสร้าง adhesion molecules เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะติดกับผนังหลอดเลือด และช่วยสร้าง cytokines และ growth factors ตัวอื่น ๆ อีกทั้งยังช่วยการสร้างสาร eicosanoids และ NO (nitric oxide) นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาของเซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ fibroblasts และทำให้เกิดอาการทางคลินิกอื่น ๆ เมื่อเกิดการอักเสบ เช่น ไข้ เป็นต้น

5) Nitric oxide (NO) เป็นก๊าซอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำ (soluble free radical gas) ผลิตจากเซลล์บุผนังหลอดเลือดจากเซลล์กินสิ่งแปลกปลอม และเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้เกิดการขยายหลอดเลือด (vasodilation) เนื่องจากก๊าซไนตริกออกไซด์ (NO) ไปเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของ cGMP (cyclic guanosine monophosphate) เป็นผลให้เซลล์กล้ามเนื้อในหลอดเลือดผ่อนคลาย และเกิดการขยายหลอดเลือด นอกจากนั้นยังทำให้เกร็ดเลือดจับกันเป็นก้อน และติดแน่นกับผนังหลอดเลือด และยังทำปฏิกิริยากับ superoxide ได้สาร oxidant ที่สำคัญคือ nitrogen dioxide กับสาร hydroxyl radical ดังนี้



โดยในภาวะช็อก (shock) หลอดเลือดในร่างกายจะขยายตัว เนื่องจาก NO ที่ผลิตจากเซลล์กินสิ่งแปลกปลอม (macrophage)

6) Oxygen-derived free radicals (อนุมูลอิสระจากออกซิเจน) กลุ่มอนุมูลอิสระเหล่านี้ ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว สารเหล่านี้เกิดจากปฏิกิริยาต่อเนื่อง oxidation ของสาร NADPH ได้สาร superoxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปเป็น H₂O₂, OH⁻ และสารพิษอื่นๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ nitric oxide (NO) ในร่างกายมีสารช่วยต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้เรียกว่า antioxidant ซึ่งเป็นกลไกคอยปกป้องร่างกาย

5.2.3 สารชักนำการอักเสบที่มีอยู่ในพลาสมา

1) พวกที่ได้จากกระบวนการปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันในส่วน complement activation ได้แก่ C3a, C5a และ C5b-9

2) Kinin system ได้แก่ bradykinin ช่วยเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อที่ผนังหลอดเลือดหดตัว เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และมีส่วนร่วมทำให้เกิดการปวด (pain)

3) Coagulation system สารที่ได้จากระบบการแข็งตัวของเลือด มีคุณสมบัติและบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการอักเสบ ในขั้นตอนสุดท้ายของระบบสาร thrombin เปลี่ยนสาร fibrinogen ไปเป็น fibrin ทำให้ได้ สาร fibrinopeptides หลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด และชักนำเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้สาร thrombin เองยังมีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้างอนุภาคเกาะติด (adhesion molecules) และเร่งการสร้างเยื่อเกี่ยวพัน (fibroblast proliferation)

4) Fibrinolysis system สำหรับระบบทำลายการแข็งตัวของเลือด จะละลายก้อน fibrin ที่เกิดจากระบบการแข็งตัวของเลือด ได้สารที่แตกกระจายออกมาหลายชนิดที่เรียกว่า fibrin degradation products ซึ่งมีคุณสมบัติ เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด สารสำคัญของระบบนี้ ได้แก่ plasmin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก plasminogen โดยอาศัยเอนไซม์ที่เรียกรวมว่า plasminogen activator พบได้ในผนังหลอดเลือดเม็ดเลือดขาว และเนื้อเยื่ออื่น ๆ สาร plasmin เป็นตัวการสำคัญที่ละลายก้อน fibrin เพื่อทำลายการแข็งตัวของเลือด

6. ข้อมูลสารเคมี

6.1 Stearyl alcohol

Stearyl alcohol เป็นแอลกอฮอล์ในกลุ่มตัวทำละลายหรือ Fatty alcohol ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็دنํ้ามันสีขาวขนาดเล็ก จุดหลอมเหลว 55-60 องศาเซลเซียส ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ใน alcohol และ ether สามารถใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดในตำรับ ointment และ cream เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น และเป็น emulsifier และสามารถทำให้เกิดการแพ้ได้ ใช้เพื่อทำละลายสารที่ไม่ละลายน้ำ เป็นแอลกอฮอล์ที่ไม่ทำให้เกิด

การระคายเคือง มีคุณสมบัติช่วยให้เครื่องสำอางติดผิวดี ทำความสะอาดผิว ชะล้างสิ่งสกปรกและไขมัน เหมาะกับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของน้ำมัน เช่น cream หรือ lotion

6.2 Cetyl Alcohol

Cetyl Alcohol คือ thickener หรือสารให้ความข้น ในเนื้อครีม มีลักษณะเป็นเกล็ด เมื่อผสมกับ Cream Maker ชนิดใด ๆ จะช่วยเพิ่มเนื้อให้กับครีม มีความหนืดของครีมมากขึ้น ให้น้ำเนื้อครีมที่ข้นยิ่งขึ้น มีลักษณะเป็น occlusive emollient หรือช่วยเคลือบผิว เพื่อลดโอกาสการสูญเสียน้ำของผิวจึงเป็น moisturizer ไปในตัวนิยมใช้ร่วมกับ Cream Maker ชนิดใด ๆ เนื่องจาก Cetyl Alcohol ไม่สามารถประสานน้ำกับน้ำมันได้ นอกจากนี้ Cetyl Alcohol จะทำให้เกิดความขาวของเนื้อครีม เมื่อทาลงบนผิว จึงเหมาะกับการใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

6.3 Lecithin

Lecithin คือ สารประกอบที่มีความซับซ้อนซึ่งจัดเป็นไขมัน เรียกว่า lecithin phospholipid phosphatidylcholine phospholipid ซึ่งมีน้ำหนักใกล้เคียงกับ triglyceride และมีโครงสร้างแยกออกเป็น 5 ส่วน คือ กรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (กรดไขมันจำเป็น) alcohol phosphate salt และ glycerol นอกจากนี้ มักพบโมเลกุล ของ vitamin B รวมอยู่ด้วย เช่น Choline, Inositol, Lecithin มีลักษณะเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ที่ทำให้น้ำและน้ำมันละลาย เข้ากันได้ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงทำให้ไขมันแขวนลอยในน้ำได้ดีขึ้น

Lecithin พบได้ตามธรรมชาติจาก 2 แหล่ง ที่สำคัญ คือ ร่างกายมนุษย์ สามารถผลิต lecithin ขึ้นได้เองที่ตับ โดยสารตั้งต้นที่ร่างกายใช้ผลิตเลซิติน เช่น กรดไขมันจำเป็น วิตามินบี และสารอาหารสำคัญอื่นๆ หากร่างกาย ได้รับสารอาหารต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพอจะส่งผลให้ร่างกายสร้าง lecithin ได้ไม่เพียงพอแหล่งธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ โดยจะพบมากในไข่แดง ถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน ถั่วลิสง จมูกข้าวสาลี เป็นต้น แต่อาหารเหล่านี้ก็จะให้โคเลสเตอรอลสูงตามไปด้วย

ประโยชน์ของ lecithin

- 1) การควบคุมระดับโคเลสเตอรอล โดยลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอลในทางเดินอาหารออกทางลำไส้ใหญ่ และขับถ่ายออกไปเลซิตินจะมีส่วนในการสร้างไลโปโปรตีนและเร่งปฏิกิริยาการขนย้ายโคเลสเตอรอลออกจากกระแสเลือด
- 2) ช่วยในกระบวนการเผาผลาญไขมันและนำไขมันไปใช้เป็นพลังงานได้ดีขึ้น
- 3) การสร้างสารสำคัญต่าง ๆ ในร่างกาย เลซิตินเป็นองค์ประกอบหนึ่งในการสร้างโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญต่อร่างกาย เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน สารเคมีระบบภูมิคุ้มกันบางชนิด การแข็งตัวของเลือด เป็นต้น
- 4) องค์ประกอบของเยื่อผิวของเซลล์ เลซิตินจะถูกใช้ในการสร้างเยื่อผิวเซลล์ต่าง ๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ผิวหนัง รวมถึง เซลล์ของอวัยวะต่าง ๆ อีกด้วย
- 5) ช่วยในการดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันได้ดีขึ้น

6.4 Cremophore

Cremophor ใช้ช่วยในการละลายสารออกฤทธิ์ที่ไม่ละลายในน้ำ น้ำมันหอมระเหย น้ำมัน หรือวิตามิน หรือส่วนผสมของแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบที่ได้จากการผสมกันระหว่าง hydrogenated castor oil และ ethylene oxide จึงทำให้น้ำและน้ำมัน สามารถรวมตัวเข้ากันได้ นิยมใช้ละลายน้ำหอมหรือน้ำมันที่ต้องการให้น้ำหอมหรือน้ำมันนั้นไปอยู่ในสูตรที่มีส่วนผสมของสินค้าในที่มีส่วนประกอบของน้ำมากกว่า หรือสินค้าที่ต้องการความใส เช่น น้ำหอมฉีดตัว เจลแต่งผม หรืออื่น ๆ โดยต้องนำมาละลายให้เข้ากันก่อนนำไปผสมลงในสูตรและสามารถใช้เป็น emulsifier ในสูตรที่มีน้ำมันผสมอยู่ไม่มากได้ด้วย มีเนื้อเป็นไขสีขาวขุ่นในอุณหภูมิห้อง และเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการทำกิลนด้วยน้ำและแอลกอฮอล์เพื่อหลีกเลี่ยงความขุ่น หรือสำหรับใช้ในเครื่องหอมปราศจากแอลกอฮอล์ (สูตรน้ำ) ก่อนใช้อาจต้องให้ความร้อนก่อน

ประโยชน์และการนำไปใช้

- 1) การดูแลผิว ดูแลผิวหนัง ทำความสะอาดผิวหนังดูแลร่างกาย
- 2) เครื่องสำอางตกแต่ง แต่งหน้า
- 3) ผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม (แชมพู, คอนดิชันเนอร์ & จัดแต่งทรงผม)

4) น้ำหอมและเครื่องหอม

5) ผลิตภัณฑ์กันแดด (ปกป้องผิวจากแสงแดด, ออฟเตอร์ซัน & ฟอกหนัง)

7. หลักการเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

7.1 Homogenizer



รูปที่ 6 Homogenizer

Homogenizer คือ เครื่องผสมของเหลว หรือครีม โดยใช้ใบพัดหมุนด้วยความเร็วรอบสูง ซึ่งจะทำให้เกิดการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และเกิดการฉีกของผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีขนาดเล็กลง โดยการใช้หัว Homogenizer ที่แตกต่างกันจะส่งผลให้ได้ผลลัพธ์ของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน เครื่องโฮโมจีไนส์ (homogenizer) อาจเรียกว่า pressure homogenizer ใช้เพื่อการโฮโมจีไนส์ (homogenization) ใช้เพื่อการผสม (mixing) และลดขนาดเม็ดไขมันในของเหลว เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกันเกิดอิมัลชัน (emulsion) คงตัว

หลักการทำงาน

Homogenization valve ด้วยความเร็วสูงมาก พลังงานจากแรงดัน ทำให้เกิดแรงเฉือน (shear) แรงกระแทกและการแตกตัวของฟองอากาศขนาดเล็ก (cavitation) อย่างรุนแรงมีผลให้อนุภาคของเหลวมีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายเป็นเนื้อเดียวกัน

ประเภทของเครื่องโฮโมจีไนซ์

1) เครื่องโฮโมจีไนซ์แบบขั้นตอนเดียว (single stage homogenizer) หมายถึง เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่มี วาล์วโฮโมจีไนซ์ชุดเดียว ใช้ความดันในช่วง 2,000 -2,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) น้ำนมที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ มีขนาดเล็กแต่ยังมีแนวโน้มที่กลับมารวมกันได้อีก

2) เครื่องโฮโมจีไนซ์แบบสองขั้นตอน (two stage homogenizer) หมายถึง เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่มี วาล์วโฮโมจีไนซ์ 2 ชุด โดยชุดแรกใช้ความดันในช่วง 2,000 -2,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ของเหลวที่ผ่าน จากวาล์วชุดแรกจะผ่านเข้าสู่วาล์วชุดที่สอง ซึ่งใช้ความดัน 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ช่วยทำให้เม็ดไขมันที่ ผ่านจากวาล์วชุดแรกซึ่งอาจกลับมารวมตัวกันได้อีก เกิดการกระจายตัวเป็นอิมัลชัน (emulsion) ที่คงตัวเครื่อง โฮโมจีไนซ์ทำงานโดยใช้ปั๊มความดันสูง บังคับให้ของเหลวผ่านช่องแคบ ที่เรียกว่า วาล์วโฮโมจีไนซ์

7.2 Zetasizer



รูปที่ 7 Zetasizer

ใช้วัดขนาดของอนุภาคระดับนาโนเมตรได้ในช่วง 0.3 นาโนเมตร ถึง 10 ไมครอน ใช้ทดสอบหาค่า ศักย์ซีต้าของสารคอลลอยด์ ที่มีค่าศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง -200 ถึง +200 มิลลิโวลต์ และ ใช้ทดสอบหาน้ำหนัก โมเลกุลของสารกลุ่มพอลิเมอร์และโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000 ถึง 2×10^7 ดาลตัน (Da)

สามารถทดสอบตัวอย่างทั้งในตัวกลางที่เป็น aqueous (น้ำ เมทานอล และเอทานอล) และ non- aqueous ตัวอย่างของเหลวหรือคอลลอยด์ ปริมาณตัวอย่างของเหลวต้องไม่น้อยกว่า 5 มิลลิลิตร และภาชนะบรรจุตามความเหมาะสมกับชนิดตัวอย่างระบบประกอบด้วยการทำงาน 2 ระบบคือการวิเคราะห์หุ้มของอนุภาคและการวิเคราะห์ขนาดของโมเลกุลสำหรับการตรวจวัดการเกาะกลุ่มของอนุภาคการวัดอนุภาคขนาดเล็กหรืออนุภาคที่มีความเข้มข้นที่สูงมากๆหรือต่ำมากๆโดยใช้หลักการการกระเจิงแสงโดยไดนามิก นอกจากนี้เครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์ Zeta potential ใช้หลักการของ electrophoretic light scattering สำหรับ particle, molecule และพื้นที่ผิว เครื่องที่ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลใช้หลักการของ static light scattering

การวัดค่าศักย์ซีตาของอนุภาคเพื่อศึกษาสมบัติการกระจายตัวในระดับคอลลอยด์ของอนุภาค อนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวจะแตกตัวให้ประจุพื้นผิวของอนุภาค อาจเป็นประจุบวกหรือประจุลบ อนุภาคเหล่านี้ถูกล้อมรอบด้วยประจุของของเหลวที่มีประจุชนิดตรงกันข้าม ทำให้เกิดปฏิกิริยาการดูดซับประจุตรงกันข้ามอนุภาคจึงเคลื่อนที่ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคขึ้นอยู่กับจำนวนประจุ เมื่อแสง laser กระทบของเหลว ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ laser ที่ scatter จะเกิด Doppler Shift ซึ่งปริมาณของ Doppler Shift ที่เกิดจะมีความสัมพันธ์กับความเร็วของอนุภาค ศักย์ซีตาที่เกิดขึ้น คำนวณได้จากจุดที่ slipping plane จุดนี้จะมีประจุอยู่อย่างหนาแน่น ซึ่งพฤติกรรมเหมือนอนุภาค ตำแหน่งนี้อธิบายพฤติกรรมของอนุภาคได้ดีกว่าผิวอนุภาค ค่าที่วัดได้คือ ค่าศักย์ไฟฟ้า zeta

Parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) Zeta potential (ศักย์ซีตา) คือ ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ อนุภาคเกิดขึ้นในกระบวนการโคแอกกูเลชันฟล็อกคูเลชัน (มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์) เป็นค่าที่ใช้เพื่อบอกแนวโน้มว่าอนุภาคจะมีการเกาะตัวกันเป็นก้อนหรือไม่ เช่น เมื่อมีการปรับค่า pH อนุภาคแขวนลอยจะเสถียรเมื่อศักย์ซีตามีค่ามากกว่า + 30 mV หรือน้อยกว่า -30 mV การวิเคราะห์หาค่าศักย์ซีตาของอนุภาคเพื่อศึกษาคูณสมบัติการกระจายตัวในระดับคอลลอยด์ของอนุภาค

2. Z-Ave คือ ขนาดอนุภาคของสารสามารถวัดตั้งแต่ 0.3 nm ถึง 10 um

3) Polydispersity Index (Pdl) คือ เป็นค่าที่บอกถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาค หากค่า Pdl=1 แสดงว่า Monodisperse หากค่า Pdl>1 แสดงว่า Polydisperse

7.3 UV-VIS Spectrophotometer



รูปที่ 8 UV-VIS Spectrophotometer

หลักการทำงาน

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่น ค่าต่าง ๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุล ที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1) แหล่งกำเนิดแสง แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลารวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมาซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสงช่วง UV ใช้หลอด H2 and D2 lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 nm ชนิดของสเปกโตรสโกปี UV molecular absorption และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm ชนิดของสเปกโตรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2) Monochromator ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบ ๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว โดยใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

3) เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวท (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4) Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)

ลักษณะของผลที่ได้

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งเรียกว่า Spectrum

การประยุกต์ใช้งาน

ส่วนใหญ่จะใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน หรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารนั้น การดูดกลืนแสงของสารต่างๆ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร จึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดี และใช้กันอย่างแพร่หลาย

ลักษณะตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

ตัวอย่างเป็นของเหลวใส ทั้งที่มีสีและไม่มีสี

7.4 Microplate Reader



รูปที่ 9 Microplate Reader

หลักการทำงาน

เป็นเครื่องมือใช้วัดค่า Abs ของตัวอย่างที่เป็นของเหลวซึ่งบรรจุอยู่ใน Well plate เครื่องจะวัดค่า Abs ด้วยความยาวคลื่นที่กำหนดตั้งแต่ 340-800 nm โดยอาศัยหลักการตาม Beer-Lambert's Law ที่กล่าวว่า แสงความยาวคลื่นหนึ่ง ๆ จะถูกดูดซับเอาไว้โดยโมเลกุลของตัวอย่าง

คุณลักษณะของเครื่อง

- 1) ระบบให้แสงเป็นแบบ Monochromator โดยสามารถเลือกค่าความยาวคลื่นในช่วง 340-800 nm
- 2) แหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดทั้งสแตนฮาโลเจนขนาด 30 วัตต์
- 3) สามารถใช้กับไมโครเพลทชนิด 12, 24, 48 หรือ 96-well plates
- 4) สามารถทำ Wavelength scan ได้โดยใช้ เวล่าน้อยกว่า 5 วินาที
- 5) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.000 ถึง 3.500
- 6) ใช้เวลาในการตรวจวัด 25 วินาทีต่อการวัด 96 well plate
- 7) ควบคุมการทำงานโดยต่อกับคอมพิวเตอร์และโปรแกรมควบคุมการทำงาน DigiRead Software

7.5 Centrifuge



รูปที่ 10 Centrifuge

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) เป็นเครื่องมือสำหรับสร้างแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อนำไปใช้แยกสารหรืออนุภาคโดยอาศัยหลักความแตกต่างของความหนาแน่น ขนาดของสาร หรืออนุภาคนั้น ๆ โดยทั่วไปเครื่องหมุนเหวี่ยงมักใช้ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างและใช้ปั่นแยกสารสำหรับวิเคราะห์ ใช้แยกตัวอย่างของเหลวออกจากของแข็งอนุภาคขนาดเล็กหรือใช้เพื่อแยกของเหลวหลายชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกันให้เกิดการแยกชั้น โดยอาศัยหลักการเร่งให้อนุภาคตกตะกอนเร็วขึ้น ภายใต้สนามของแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง แรงนอนกันของอนุภาคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงหนีศูนย์กลาง ทำให้อนุภาคนอนกันด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันภายใต้สนามแรงหนีศูนย์กลางอนุภาคจะตกตะกอนด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน การปั่นแยกตะกอนจึงต้องใช้เวลานานพอเพียงที่อนุภาคขนาดเล็กจะนอนกันหมด จะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน ตะกอน (pellet) และส่วนของเหลว

หลักการทำงาน

ใช้สำหรับเร่งการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกันออกจากกัน โดยอาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge force) ที่เกิดจากการ

หมุนรอบจุดหมุน (center of rotation) เครื่องหมุนเหวี่ยงมีแกนหมุนเป็นมอเตอร์ไฟฟ้า เมื่อมีกระแสไฟฟ้าเข้ามอเตอร์จะเหนี่ยวนำให้เกิดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า และทำให้แกนมอเตอร์หมุน ความเร็วรอบในการหมุน (rpm = round per minute) ควบคุมด้วยวงจรไฟฟ้า ส่วนเวลาที่ใช้ในการหมุนควบคุมด้วย สวิตช์ปิด-เปิด หรือนาฬิกา ความเร็วรอบและแรงหนีศูนย์กลาง การแยกสารด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงต้องมีการกำหนดเวลา และแรงหนีศูนย์กลางสำหรับงานนั้นๆ เสมอ ซึ่งในบางครั้งจะพบว่า มีการกำหนดเป็นค่าความเร็วรอบของการหมุนโรเตอร์ ซึ่งอาจเกิดปัญหาการใช้งานในกรณีที่ต้องการความถูกต้องของแรงหนีศูนย์กลาง แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ (relative centrifugal force) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับรัศมีการหมุนไม่เท่ากัน ดังนั้นการกำหนดวิธีการแยกสารด้วยค่าความเร็วรอบจึงไม่ใช่วิธีการที่เป็นมาตรฐาน ปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตจึงมักจะเตรียมตารางเทียบค่าทั้งสองที่ใช้กับโรเตอร์แต่ละชนิดของผู้ผลิตไว้แล้ว หรือผู้ใช้สามารถทำการคำนวณได้เอง โดยการใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$RCF = 1.12r (RPM/1000)^2 \text{ หรือ}$$

$$RPM = 103(RCF/1.12r)^{0.5}$$

$$RCF = \text{แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ หน่วยเป็น } \times g$$

$$r = \text{รัศมีแกนหมุน หน่วยเป็น มิลลิเมตร}$$

$$RPM = \text{อัตราความเร็วรอบ หน่วยเป็น รอบ/นาที (round per minute)}$$

ส่วนประกอบเครื่อง centrifuge

1) มอเตอร์และอุปกรณ์ทดรอบ (Motor and Gear box) มอเตอร์เป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่หลักให้เกิดการหมุนรอบแกน มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่ใช้แปรงถ่าน (brush drive) และชนิดที่ไม่ใช้แปรงถ่าน (brushless inductive drive) สำหรับเครื่อง Ultra speed centrifuge (100,000 รอบ/นาที) จะมีชุดเฟืองทดรอบการหมุน (gear box) เพื่อเพิ่มความเร็วรอบของแกนหมุน

2) หัวหมุน (Rotor, Head) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ยึด หรือใส่กระบอกใส่หลอดปั่น (bucket, shield, carrier) บรรจุภาชนะใส่ตัวอย่าง เมื่อเกิดการหมุนโดยการผลัดของมอเตอร์จะเกิดแรงหนีศูนย์กลางขึ้น ในบริเวณโรเตอร์ วัสดุที่ใช้ทำโรเตอร์มีหลายชนิด นิยมทำด้วยโลหะที่แข็งแรงแต่น้ำหนักเบา เช่น aluminium titanium polypropylene ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของแรงหนีศูนย์กลาง ความเร็วรอบที่ใช้งาน ชนิดและปริมาณ

ตัวอย่างที่ใช้ ส่วนรูปแบบของโรเตอร์มีให้เลือกตามลักษณะการใช้งาน คือ หัวหมุนแบบหมุนแกว่ง (swinging out rotor) หัวหมุนแบบมุมคงที่ (fixed angle rotor) หัวหมุนแบบแนวดิ่ง (horizontal rotor)

3) ช่องใส่หัวหมุน (Chamber) เป็นส่วนที่มีโรเตอร์ติดตั้งอยู่ภายใน ปกติจะมีฝาปิดมิดชิด และฝานี้จะไม่สามารถเปิดออกได้ขณะที่โรเตอร์กำลังหมุนอยู่ เพื่อสร้างความปลอดภัยในการใช้งานเครื่องหมุนเหวี่ยง

4) ระบบควบคุม (Control Panel) ส่วนของแผงควบคุมการทำงานของเครื่องหมุนเหวี่ยง มีปุ่มควบคุมการทำงานมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดและขนาดของเครื่อง

5) ระบบทำความเย็น (Refrigerated system) เป็นระบบทำความเย็นเพื่อลดอุณหภูมิให้กับตัวอย่างเนื่องจากตัวอย่างบางชนิดอาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเมื่อได้รับความร้อน สามารถทำความเย็นได้ต่ำสุดถึง -20 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1.1. Beaker
- 1.1.2. Ice bath
- 1.1.3. Zetasizer
- 1.1.4. UV-VIS Spectrophotometer
- 1.1.5. Homogenizer
- 1.1.6. Microplate reader
- 1.1.7. ชุดกรอง
- 1.1.8. กระจกกรอง
- 1.1.9. Hot air oven
- 1.1.10. Centrifuge
- 1.1.11. Sonicate
- 1.1.12. เครื่องชั่ง

1.2. สารเคมี

- 1.2.1. Soybean lecithin
- 1.2.2. Cremophor RH40
- 1.2.3. Cetyl alcohol
- 1.2.4. Steryl alcohol
- 1.2.5. Ethanol
- 1.2.6. Methanol
- 1.2.7. DI water

2. วิธีดำเนินการศึกษา

2.1 การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นเป็นการตรวจสอบเพื่อหาฤทธิ์ของสารสกัดในกลุ่มต่าง ๆ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนซึ่งมีดังนี้⁽²⁹⁾

2.1.1 Ferric chloride test (FeCl_3) เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม phenolic compounds ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น สีม่วงน้ำเงินเข้ม เขียว น้ำตาลดำ ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สารสกัดผักชีลาวโดยสกัดจาก Methanol, หลอดที่ 2 Gallic acid (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และทำการเติม Ferric chloride (FeCl_3) reagent หลังจากนั้นทำการสังเกตสี

2.1.2 Shinoda หรือ Cyaniding test เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids ที่มีโครงสร้าง γ - benzopyrone ring (benzo- γ -pyrone, benzopyran-4-one) ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น สีแดง ชมพู ส้ม ม่วงแดงเข้ม ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สารสกัดผักชีลาว, หลอดที่ 2 Quercetin (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และทำการใส่ Mg ribbon แล้วเติม conc. HCl 3 หยด หลังจากนั้นทำการสังเกตสี

2.1.3 10% Sodium hydroxide (NaOH) test เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม Coumarins ที่มีโครงสร้าง benzo - α - pyrone หรือ phenyl propanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น การเรืองแสง UV 365 nm สีเหลืองอมเขียว เขียว น้ำเงิน ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างหยดบนกระดาษ whatman No.1 filter จุดที่ 1 สารสกัดผักชีลาว, จุดที่ 2 Quercetin (positive control), จุดที่ 3 DI water (negative control) และทำการหยด 10% Sodium hydroxide (NaOH) บนจุดที่หยดสารข้างต้น หลังจากนั้นทำการสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV 365 nm

2.1.4 Molisch test เป็นการตรวจสอบว่าสารสกัดมีสารประกอบในรูป glycoside โดยตรวจสอบน้ำตาลที่เชื่อมอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น วงแหวนสีม่วงบริเวณรอยต่อของสารสกัดกับ กรดซัลฟูริกเข้มข้น ถ้าสารที่ให้ผลบวกมีความเข้มข้นมาก อาจเห็นชั้นของกรดทั้งหมดเป็นสีม่วงได้ ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สารสกัดผักชีลาว, หลอดที่ 2 สารละลาย Rutin (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และทำการเติม 5% - naphthol (Molisch reagent) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม conc. sulfuric acid (H_2SO_4) ค่อยๆ เติมข้างหลอด หลังจากนั้นทำการสังเกตสี

2.1.5 Dragendorff's test เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม Alkaloids ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น ตะกอนสีส้มแดง แดงอิฐ ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สารสกัดผักชีลาว หลอดที่ 2 Caffeine (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และทำการเติม Dragendorff's reagent หลังจากนั้นทำการสังเกตสี

2.1.6 Foam test เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม Saponins ซึ่ง saponins glycoside เป็น สารประกอบที่ละลายน้ำได้ และเกิดฟองคงทนอยู่นานเมื่อเขย่า มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดีและทำให้ เม็ดเลือดแดงแตกได้ ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น เกิดฟองคงทน ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สาร สกัดผักชีลาว, หลอดที่ 2 มะคำดีควาย (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และ ทำการเติม DI water เขย่าแล้วสังเกตฟอง หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วสังเกตฟอง

2.1.7 Gelatin test เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม Tannins ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างแบบ polyphenols ซึ่งจะให้ผลบวกเป็น สารละลายขุ่น ทำโดยเตรียมสารออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 สารสกัด ผักชีลาว, หลอดที่ 2 สารสกัดชาดำ (positive control), หลอดที่ 3 DI water (negative control) และทำ การเติม 2% gelatin solution หลังจากนั้นทำการสังเกตสี

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงปริมาณ

2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ Total Phenolic^{(30),(31)}

การหาปริมาณสารประกอบ Total Phenolic จะใช้วิธี Folin-Ciocalteu (FC) colorimetric method ซึ่งมีหลักการคือ สารประกอบ Phenolic จะมีหมู่ hydroxyl อยู่บนวงแหวนเบนซีน โดยจะทำการสกัด Phenolic ออกจากสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยปิเปตสารสกัดตัวอย่างมา ใส่ลงใน 96-well plates จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent จะเกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินตามปฏิกิริยา Oxidation-Reduction กับ Phosphomolybdic-phosphotungstic acid เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue จากนั้นนำไป incubate ในความมืดเป็นระยะเวลา 6 นาที และเติม 7.5% Na_2CO_3 นำไป incubate ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดปริมาณ total phenolic โดยใช้ microplate วัด UV absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 nm คำนวณหาปริมาณสารประกอบ Phenolic ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid ต่อกรัมสารสกัด (mg of gallic acid equivalent (GAE)/ g extract)

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Total flavonoid⁽³¹⁾

โดยจะสกัดสาร flavonoid จากสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำการทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ จะได้สารประกอบที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 405 nm ทำการทดลองโดยปิเปตสารสกัดตัวอย่างผสมกับ ethanol ลงใน microplate จากนั้นเติมสารละลาย $AlCl_3$ และ potassium acetate นำไป incubate ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดปริมาณ flavonoid โดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin คำนวณหาปริมาณสารประกอบ flavonoids ในสารสกัดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อกรัมสารสกัด (mg of quercetin equivalent (QE)/ g extract)

2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay⁽³²⁾

การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัวในตัวทำละลาย methanol ซึ่งมีสีม่วงดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox และ ascorbic acid มีวิธีการเตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่งผง DPPH ละลายใน methanol เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ลงใน 96-well พร้อมกับเติม DPPH agent ลงไป จากนั้นนำไป incubate ในความมืดเป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm หากสารสกัดมีฤทธิ์ antioxidant สารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay⁽³³⁾

การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay (ABTS assay) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัวในน้ำ ซึ่งจะมีสีเขียวและดูดกลืนแสงได้ดีที่ ความยาวคลื่น 734 nm ทำการเตรียมสารละลาย ABTS และสารละลาย Potassium persulfate ต่อจากนั้นผสม

สารละลาย ABTS กับ Potassium persulfate เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไป incubate ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จนปฏิกิริยาสมบูรณ์ซึ่งจะได้สารละลายกลายเป็นสีเขียวน้ำเงินแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV absorbance ให้ได้ Abs ในช่วง 0.8-0.2 ที่ความยาวคลื่น 734 nm จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง ลงใน 96-well plates เติมสารละลาย ABTS ซึ่งจะได้สารละลายที่มีสีเขียวน้ำเงินเข้ม ต่อจากนั้นนำไป incubate ในความมืดเป็นระยะเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้องและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm หากสารสกัดมีฤทธิ์ antioxidant สารละลายสีเขียวน้ำเงินจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงินจางลง คำนวณและรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS- $\cdot$ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibitory concentration (IC50) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS- $\cdot$ ลดลง 50% โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox และ ascorbic acid

2.3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay⁽³⁴⁾

การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดย Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยา Redox และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งทำได้โดยเตรียม FRAP reagent โดยผสม 10 mM TPTZ ใน 40 mM of HCl, 20 mM FeCl_3 ใน DI water และ 300 mM acetate buffer (pH 3.6) ในสัดส่วน 1:1:10 หลังจากนั้น ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง ลงใน microplate 96-well แล้วเติม FRAP reagent ลงไป จากนั้นนำไป incubated ในที่มืดเป็นระยะเวลา 10-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm หากสารสกัดมีฤทธิ์ antioxidant จะเปลี่ยนสีจากไม่มีสีกลายเป็นสีม่วงน้ำเงิน โดยผ่านปฏิกิริยา Redox ค่า FRAP แสดงอยู่ในรูปของ ค่าสมมูล Ferrous ของความเข้มข้นสารสกัดหรือสารเคมี โดยให้ค่า Absorbance เทียบเท่ากับ ferrous ion 1 mmol

2.4 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ⁽³⁵⁾

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตเพื่อที่จะป้องกันการทำลาย หรือควบคุมอันตรายต่าง ๆ ไม่ให้ลุกลามออกไปยังบริเวณอื่นของร่างกาย โดยร่างกายมีการเพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตผลของเซลล์ที่

เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบขึ้นมาต่อต้านตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดอาการอักเสบ ทั้งยังช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลายโดยผลของการอักเสบจะทำให้บริเวณนั้นเกิดอาการ (Symptoms) 4 ประการ คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness) และร้อน (heat) โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยวิธี Heat induced haemolysis เป็นการทดลองเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ความร้อนซึ่งมี Diclofenac เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ทำได้โดยเตรียม 10 mM sodium phosphate buffer saline (PBS) pH7.4, เตรียม Diclofenac, เตรียมสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำสารใส่หลอดทดลองโดยใส่เลือด, สารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ 10 mM PBS pH 7.4 ทำการ Incubate ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำการปั่นหมุนเวียงสาร เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลาย supernatant มาวัดหาปริมาณ hemoglobin ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm คำนวณ % Red blood cell membrane stabilization หรือ % Protection โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{Optical density of drug treated sample}}{\text{Optical density of control}} \times 100 \right)$$

2.5 การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี UV-visible และทดสอบความคงตัวของสารสกัดเบื้องต้น

2.5.1 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของสารสกัด (wavelength scan)

โดยนำสารสกัดผักชีลาวความเข้มข้น 1000 ug/ml ที่เตรียมได้มาทำการแสกนความยาวคลื่นสูงสุดที่สารสกัดดูดกลืนแสงได้ตั้งแต่ช่วง 200 - 800 nm

2.5.2 การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารสกัด (Absorbance analysis)

Limit of Detection (LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

Limit of Quantification (LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณหรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้

โดยนำสารสกัดผักชีลาวมาทำการ dilute ในอัตราส่วนต่าง ๆ นั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่สารสกัดดูดกลืนได้มากที่สุด

2.5.3 การทดสอบความคงตัวของสารสกัด (Stability)⁽³⁶⁾

1) ความคงตัวในสภาวะร้อน

ทำการเปรียบเทียบระหว่างเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิเย็น 2-8 องศาเซลเซียส กับตู้อบอุณหภูมิร้อน 40 องศาเซลเซียส ที่ทำการเตรียมโดยนำสารสกัดมาผสมกับน้ำ บรรจุลงขวดสีชาปิดสนิท หลังจากนั้นทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm และเก็บไว้ในสภาวะข้างต้นดังที่กล่าว เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm อีกครั้ง

2) ความคงตัวในสภาวะกรด

ทำการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ผสมน้ำกับสารสกัดที่ผสมกรด HCl เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิเย็น 2-8 องศาเซลเซียส ที่ทำการเตรียมโดยนำสารสกัดมาผสมกับน้ำ และสารสกัดมาผสมกับกรด บรรจุลงขวดสีชาปิดสนิท หลังจากนั้นทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm และเก็บไว้ในสภาวะข้างต้นดังที่กล่าว เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm อีกครั้ง

3) ความคงตัวในสภาวะไฮโดรไลซิส

ทำการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ผสมน้ำกับสารสกัดที่ผสม ethanol เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิเย็น 2-8 องศาเซลเซียส ที่ทำการเตรียมโดยนำสารสกัดมาผสมกับน้ำ และสารสกัดมาผสมกับ ethanol บรรจุลงขวดสีชาปิดสนิท หลังจากนั้นทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm และเก็บไว้ในสภาวะข้างต้นดังที่กล่าว เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm อีกครั้ง

2.6 การพัฒนาอนุภาคไขมันแข็งบรรจุสารสกัดผักชีลาว⁽³⁰⁾

2.6.1 การพัฒนาอนุภาคไขมันแข็ง solid lipid nanoparticles (SLNs)

2.6.1.1 เตรียมส่วน lipid phase โดยผสม solid wax กับ soybean lecithin ให้เข้าด้วยกันที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และเตรียมส่วน aqueous phase โดยใช้ DI water ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทส่วน aqueous phase ลงใน lipid phase แล้วผสมให้เข้ากัน และหลอมต่อจนได้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จะได้อนุภาค o/w microemulsion แล้วนำไป Homoginizer และทำการกระจายอนุภาค SLN โดยแช่ใน ice bath แล้วทำการวัด Size และ

Zeta potential ที่วัดที่อุณหภูมิห้อง 1 คืนแล้ววัดซ้ำอีกครั้ง ทำการเปรียบเทียบระหว่าง solid wax ที่เตรียมจาก cetyl alcohol และ stearyl alcohol

ตาราง 2 แสดงสูตรตำรับที่มี wax และ lecithin ในปริมาณที่ต่างกัน

สูตร	LW1	LW2	LW3	LW4
Solid wax	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Lecithin	200 mg	500 mg	1,000 mg	2,000 mg
Ethanol	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
DI water	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml

หมายเหตุ : L = lecithin , W = wax , C = cetyl alcohol , S = stearyl alcohol

2.6.1.2 การศึกษาผลของ cremophor RH40 ต่ออนุภาค

หลังจากเลือกสัดส่วน solid wax ต่อ lecithin ที่ดีที่สุดจากข้อ 2.6.1.1 จะทำการเตรียมอนุภาคอีกครั้ง ใช้วิธีเดียวกันกับ 2.6.1.1 แต่เพิ่ม cremophor RH40 ลงใน aqueous phase หลังจากได้อนุภาคแล้วทำการวัด Size และ Zeta potential ที่วัดที่อุณหภูมิห้อง 1 คืนแล้ววัดซ้ำอีกครั้ง เปรียบเทียบระหว่าง solid wax ที่เตรียมจาก cetyl alcohol และ stearyl alcohol รวมถึงทดลองเพิ่มปริมาณ solid wax เพื่อดูผลของ solid wax ต่อการเกิดอนุภาคเมื่อมี cremophor RH40

ตาราง 3 แสดงสูตรตำรับที่มีการเติม cremophor ในปริมาณที่ต่างกัน

สูตร	LCW1	LCW2	LCW3	LCW4	LCW5	LCW6
Solid wax	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	400 mg	800 mg
Lecithin	x mg	x mg	x mg	x mg	x mg	x mg
Lecithin : Cremophore	1 : 0.25	1 : 0.5	1 : 1	1 : 2	1 : 2	1 : 2
Ethanol	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
DI water	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml

หมายเหตุ : L = lecithin , W = wax , C = cetyl alcohol , S = stearyl alcohol , C = cremophor

2.6.2 การประเมินอนุภาคไขมันแข็ง solid lipid nanoparticles (SLNs)⁽³⁷⁾

1) ลักษณะทางกายภาพ (Physical appearances)

โดยทำการดูสี ขนาด รูปร่าง พื้นผิว การกระจาย การแยกชั้น ของอนุภาค

2) ขนาดของอนุภาค (Particle size)

เป็นการวัดขนาดอนุภาค (particle size) และการกระจายของขนาดอนุภาค (particle size distribution) โดยใช้เครื่อง Zetasizer (photon correlation spectroscopy) ในการวัดขนาดของอนุภาค โดยทำการเจือจางอนุภาคด้วย DI water หลังจากนั้นดูดสารใส่ภาชนะใส่สารตัวอย่าง (cuvette) แล้วนำไปวัดขนาดอนุภาค (particle size)

3) ประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (Surface charge)

เป็นการวัดประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (Surface charge) โดยใช้เครื่อง Zetasizer (photon correlation spectroscopy) ในการวัดประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค โดยทำการเจือจางอนุภาคด้วย DI water

หลังจากนั้นดูดสารใส่ภาชนะใส่สารตัวอย่าง (cuvette) แล้วนำไปวัดประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (Surface charge)

2.6.3 การบรรจุสารสกัดผักชีลาวลงในอนุภาคไขมันแข็ง และประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

คัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดจากการพัฒนาอนุภาคไขมันแข็ง solid lipid nanoparticles (SLNs) มาทำการเตรียมอนุภาคที่บรรจุสารสกัด โดยทำการเตรียมตัวรับดังกล่าว และเพิ่มสารสกัดลงใน lipid phase แล้วทำการทดสอบลักษณะทางกายภาพ (Physical appearances) วัดขนาดของอนุภาค (Particle size) และทำการวัดประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (Surface charge) ด้วยเครื่อง Zetasizer (photon correlation spectroscopy) จากนั้นทำการหา Entrapment efficiency of AGE loaded SLN เป็นการวัดค่า amount of entrapped โดยจะใช้วิธี UV spectrophotometry ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว โดยนำสารสกัดสูตรที่ดีที่สุด ไปทำการปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มี membrane กรอง เรียกว่า centrifugal ultrafiltration หลังจากนั้นเก็บสารส่วนล่าง rinse ด้วย methanol เก็บแยกไว้ แล้วเก็บสารส่วนบน rinse ด้วย methanol และทำการปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น rinse ด้วย methanol อีกครั้งและทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำ หลังจากนั้นนำสารทั้งหมดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm^{(37),(38)}

2.6.4 การประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

1) ทดสอบความคงตัวของอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

เตรียมอนุภาคไขมันแข็งและอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว ทำการทดสอบลักษณะทางกายภาพ (Physical appearances) วัดขนาดของอนุภาค (Particle size) และทำการวัดประจุไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (Surface charge) ด้วยเครื่อง Zetasizer (photon correlation spectroscopy) โดยทำการเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2) Entrapment efficiency of AGE loaded SLN เป็นการวัดค่า amount of entrapped โดยจะใช้วิธี ไดอะไลซิส (Dialysis) ซึ่งเป็นกระบวนการเคลื่อนที่แลกเปลี่ยนสาร (Solute) ระหว่าง สารละลาย 2 ชนิด ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Semi-permeable membrane) โดยอาศัยความแตกต่าง ใน

ความเข้มข้น (Concentration Gradient) ระหว่างสารละลายทั้งสอง โดยทำการเตรียมตัวรับของสารสกัดสูตรที่ดีที่สุด ที่ต้องการทดสอบ นำมาใส่ Dialysis Bag จากนั้นปรับปริมาตรทั้งสองให้เท่ากัน โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย แล้วนำไปวัดค่า UV spectrophotometry ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ทำให้ทราบค่า amount of entrapped โดยอาศัยหลักการแพร่ของตัวถูกละลาย (Solute) จากบริเวณที่มีสารละลายเข้มข้นสูงกว่าผ่านเยื่อเลือกผ่านไป ยังบริเวณที่มีสารละลายเข้มข้นต่ำหรือเจือจางกว่า

3) การทดสอบ Differential scanning calorimetry (DSC)

ใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อน (thermal transition) ของสารตัวอย่าง ที่ใช้วัดการเปลี่ยนแปลงพลังงาน (การดูดหรือคายพลังงาน) ของสารตัวอย่าง เมื่อถูกเพิ่ม (หรือลด) อุณหภูมิ ในบรรยากาศที่ถูกควบคุม

ทำโดยตัวอย่างจะถูกวางบนจานอะลูมิเนียมที่อยู่ภายในเตาควบคุมอุณหภูมิได้ โดยภายในเตาจะมีสารอ้างอิงซึ่งเป็นจานอะลูมิเนียมเปล่า เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับตัวอย่างภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยมีการวิเคราะห์ดังนี้คือ ชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างที่แน่นอนประมาณ 5-10 mg ในถ้วยอะลูมิเนียม (aluminium pan) ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

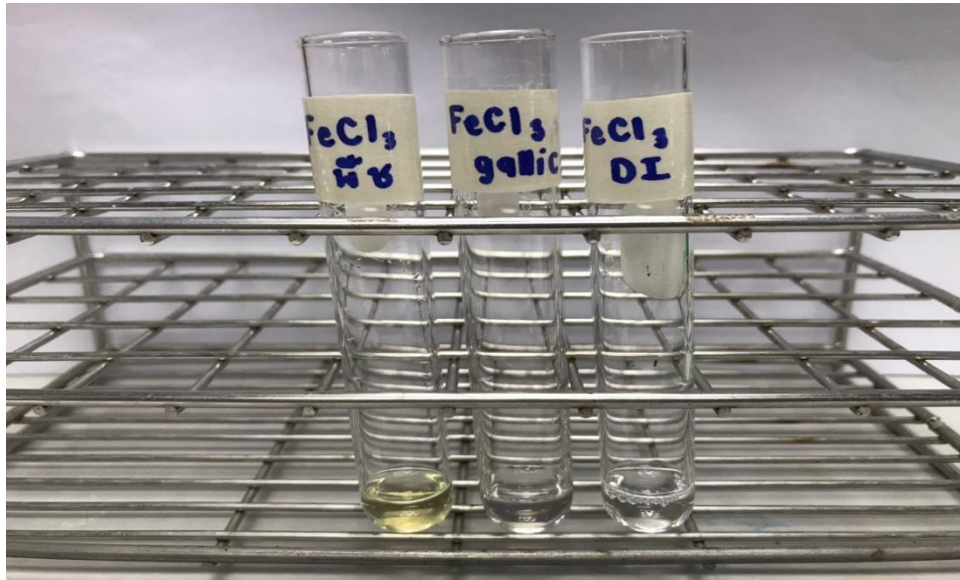
1. การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

1.1 Ferric chloride test (FeCl_3)

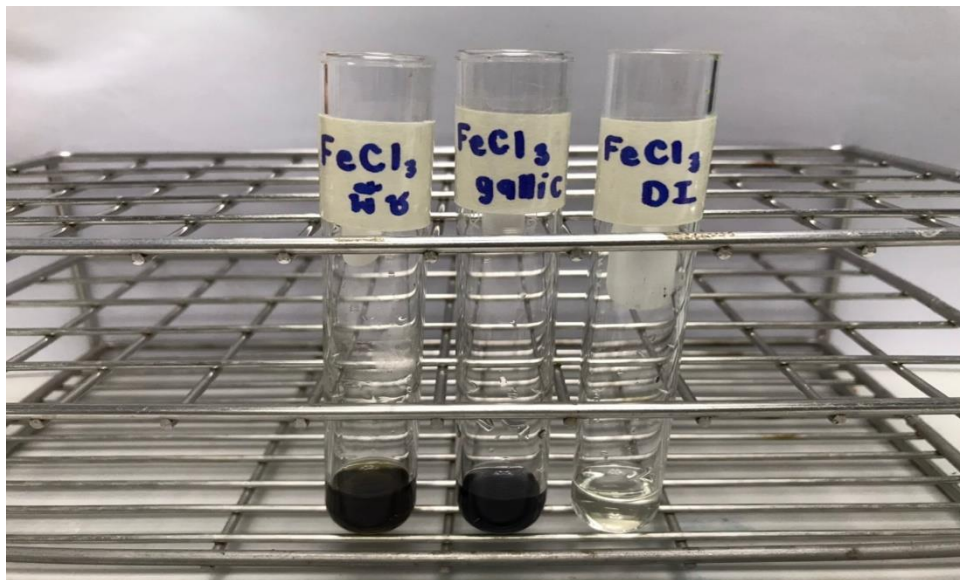
ตาราง 4 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Ferric chloride test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	+
Gallic acid	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = สีม่วงน้ำเงินเข้ม เขียว น้ำตาลดำ



รูปที่ 11 การทดสอบ Ferric chloride test (FeCl_3) ก่อน



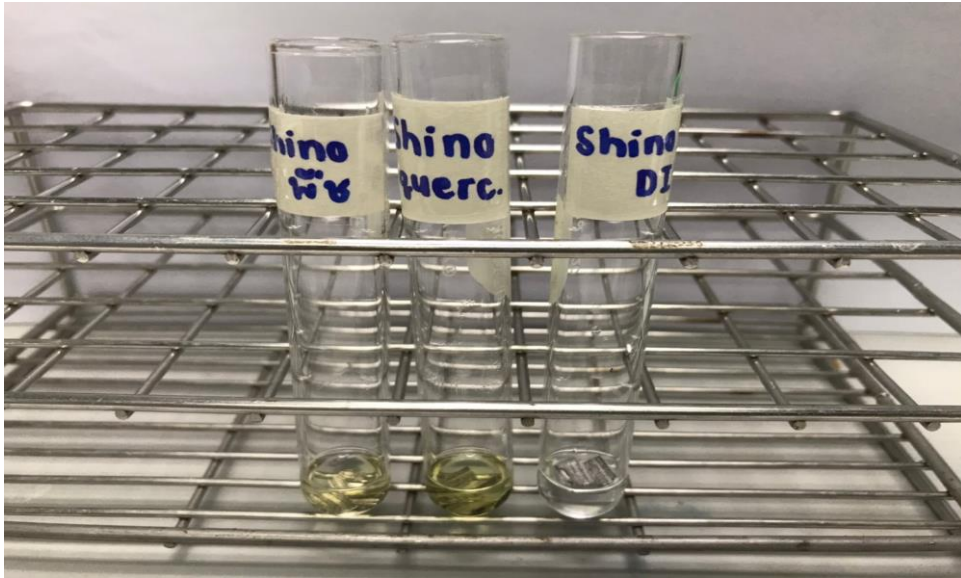
รูปที่ 12 การทดสอบ Ferric chloride test (FeCl_3) หลัง

1.2 Shinoda หรือ Cyaniding test

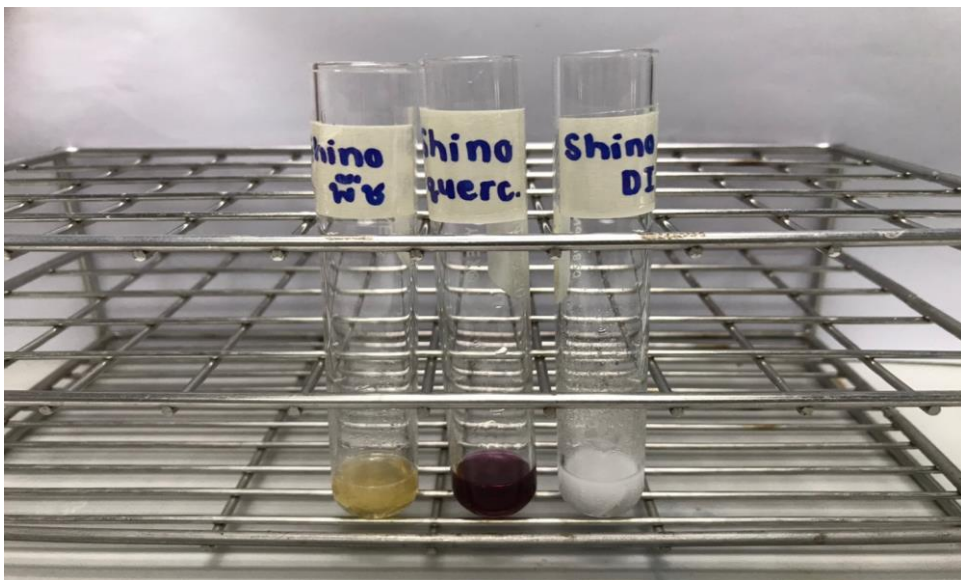
ตาราง 5 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Shinoda หรือ Cyaniding test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	-
Quercetin	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = สีแดง ชมพู ส้ม ม่วงแดงเข้ม



รูปที่ 13 การทดสอบ Shinoda หรือ Cyaniding test ก่อน



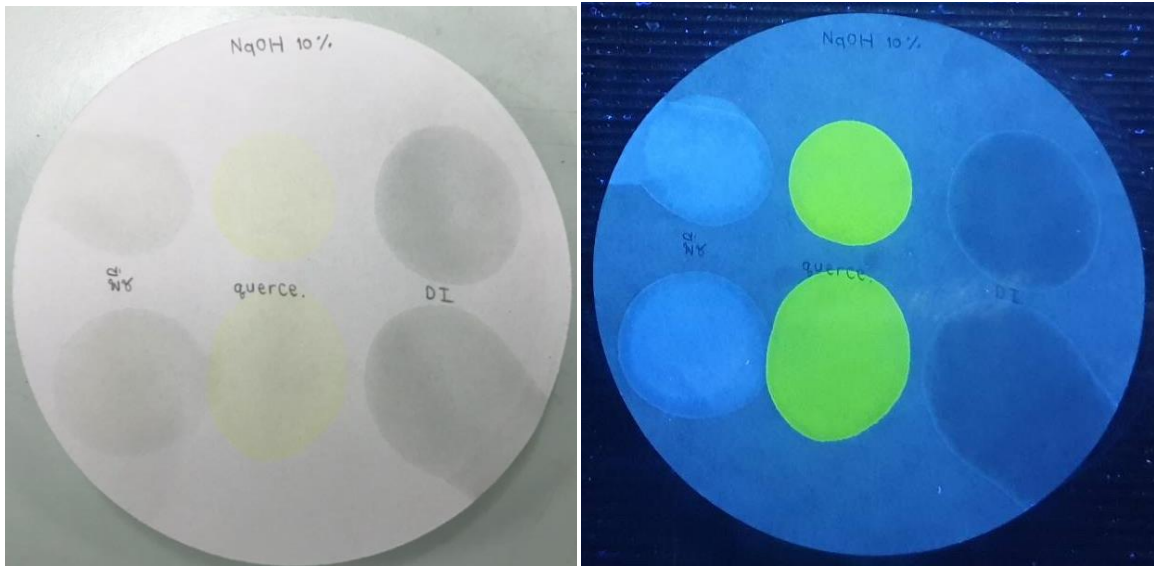
รูปที่ 14 การทดสอบ Shinoda หรือ Cyaniding test หลัง

1.3 10% Sodium hydroxide (NaOH) test

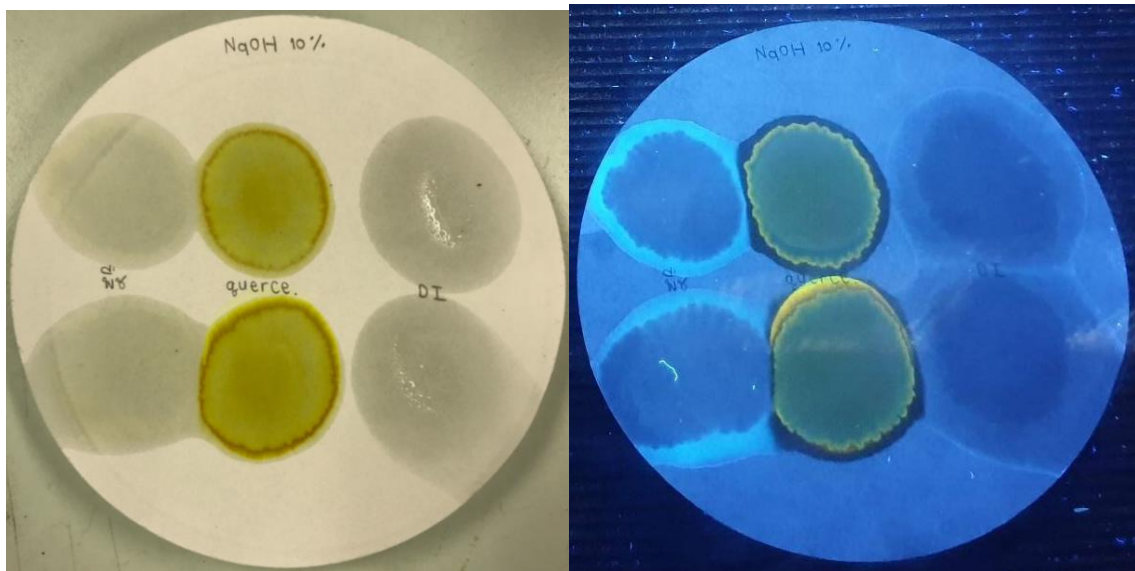
ตาราง 6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Sodium hydroxide test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	+
Quercetin	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = เรืองแสง UV 365 nm เหลืองอมเขียว เขียว น้ำเงิน



รูปที่ 15 การทดสอบ 10% Sodium hydroxide (NaOH) test ก่อน



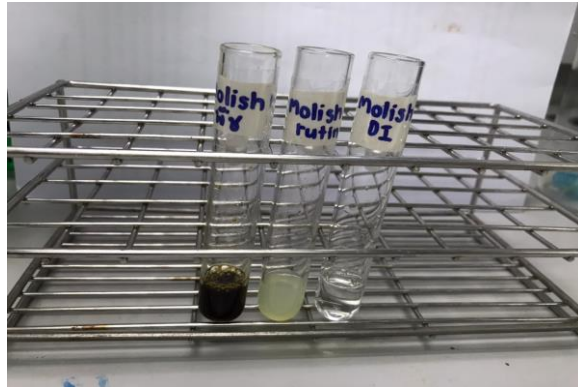
รูปที่ 16 การทดสอบ 10% Sodium hydroxide (NaOH) test หลัง

1.4 Molisch test

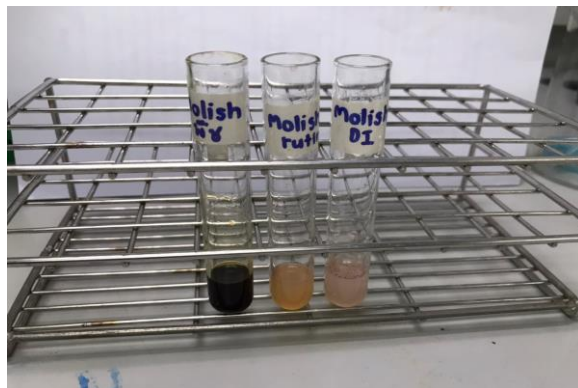
ตาราง 7 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Molisch test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	+
Rutin	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = วงแหวนสีม่วงบริเวณรอยต่อชั้นกรด ถ้าความเข้มข้นมากเห็นชั้นกรดสีม่วง



รูปที่ 17 การทดสอบ Molisch test ก่อนเติม 5% α -naphthol (Molisch reagent)



รูปที่ 18 การทดสอบ Molisch test หลังเติม 5% α -naphthol (Molisch reagent)



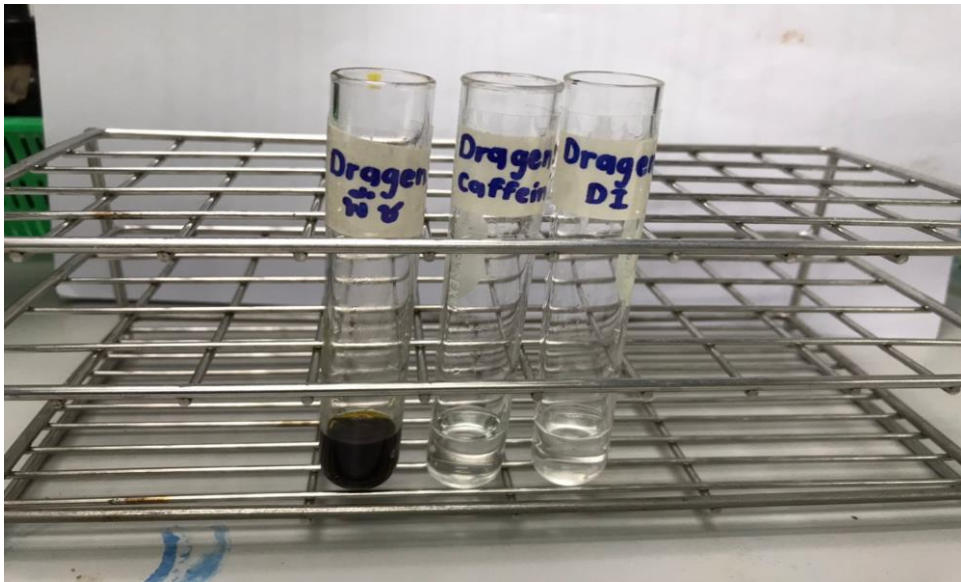
รูปที่ 19 การทดสอบ Molisch test หลังเติม conc. sulfuric acid (H_2SO_4)

1.5 Dragendorff's test

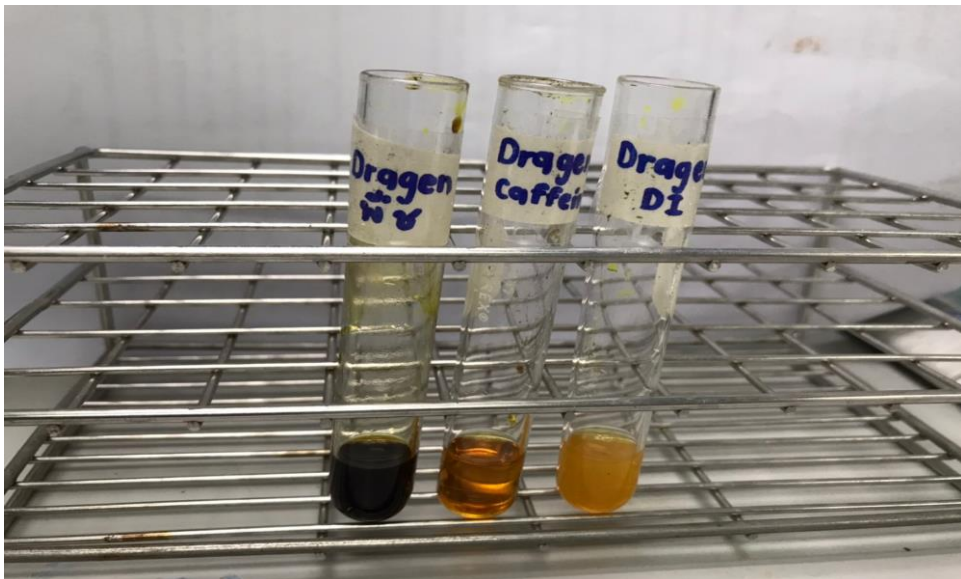
ตาราง 8 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Dragendorff's test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	-
Caffeine	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = ตะกอนสีส้มแดง แดงอิฐ



รูปที่ 20 การทดสอบ Dragendorff's test ก่อน



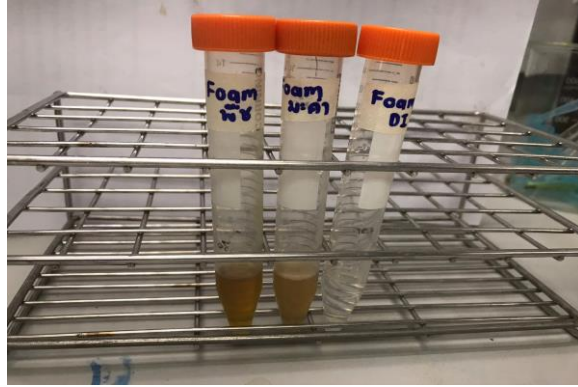
รูปที่ 21 การทดสอบ Dragendorff's test หลัง

1.6 Foam test

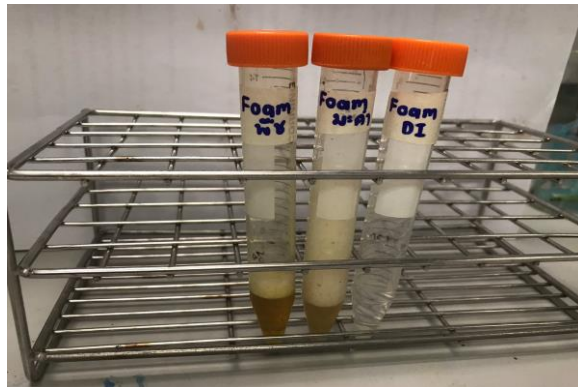
ตาราง 9 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Foam test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	-
มะคำดีควาย	+
DI water	-

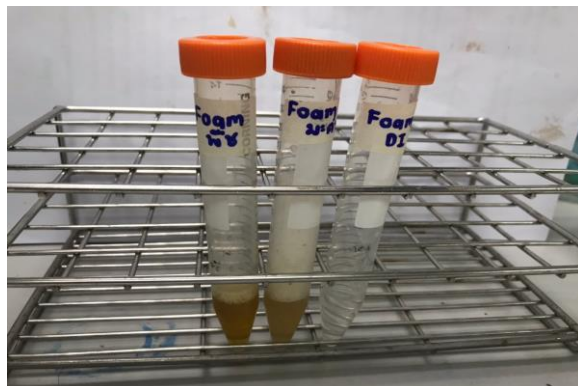
หมายเหตุ : ผลบวก = เกิดฟอง



รูปที่ 22 การทดสอบ Foam test ก่อน



รูปที่ 23 การทดสอบ Foam test หลัง



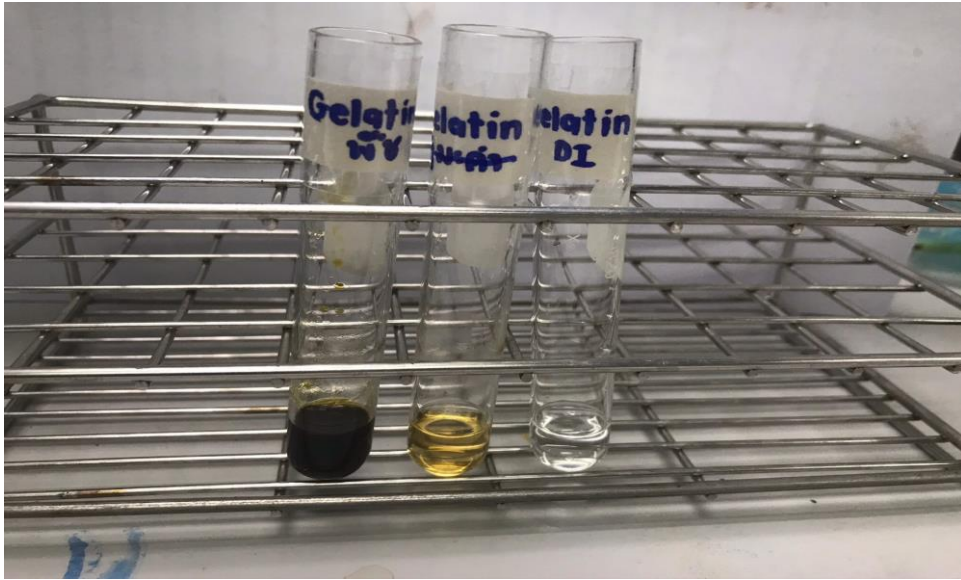
รูปที่ 24 การทดสอบ Foam test หลัง 10 นาที

1.7 Gelatin test

ตาราง 10 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบ Gelatin test

สาร	ลักษณะ
สารสกัด	-
ชาดำ	+
DI water	-

หมายเหตุ : ผลบวก = สารละลายขึ้น



รูปที่ 25 การทดสอบ Gelatin test ก่อน



รูปที่ 26 การทดสอบ Gelatin test หลัง

จากการทดสอบหวัข้อพฤษเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดผักชีลาวให้ผลทดสอบทางบวกกับการทดสอบ ferric chloride test, 10% sodium hydroxide test และ molisch test จึงทำให้มีสารสำคัญดังต่อไปนี้คือ phenolic compound, flavonoid, glycoside ซึ่งสารประกอบ flavonoid มีอยู่ในรูปแบบของ glycoside เนื่องจากการตรวจพบหมู่น้ำตาลในองค์ประกอบ ซึ่งจากการตรวจเบื้องต้นทำให้ทราบถึงชนิดของสารสำคัญเพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาสูตรต่อไป

2. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Phenolic และ Total Flavonoid

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Phenolic

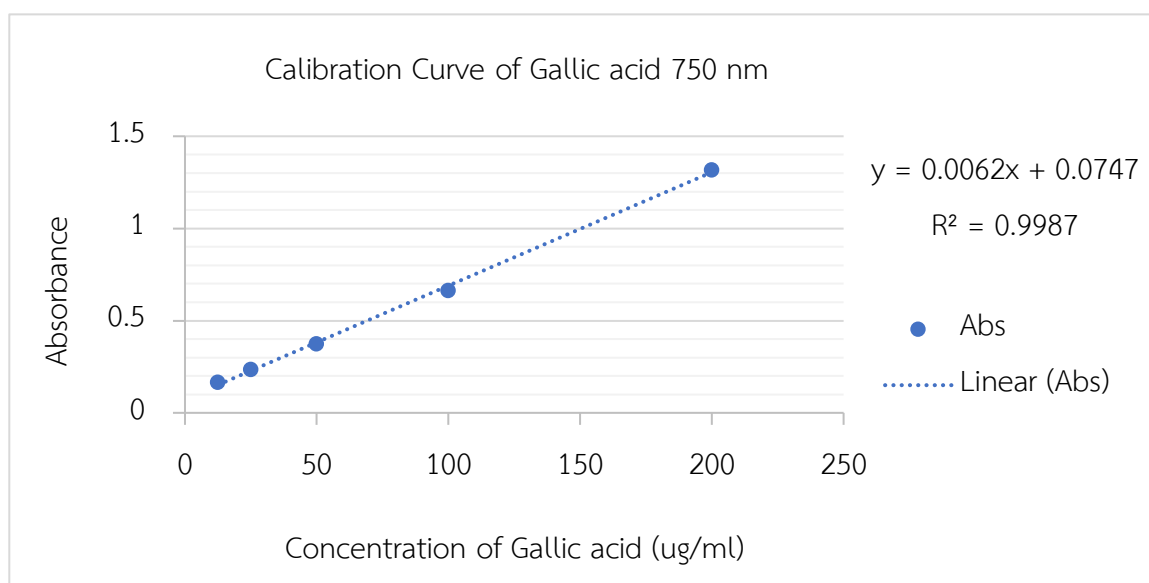
ตรวจวัดสารสกัดผักชีลาวที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้ Gallic acid เป็น Standard ที่ความเข้มข้น 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml และ 12.5 ug/ml ได้ผลดังนี้

ตาราง 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 750 nm	Mean
สารสกัดผักชีลาวเข้มข้น 2.50 mg/ml	1	0.64	0.63 ± 0.01
	2	0.62	
	3	0.64	

ตาราง 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 750 nm	Mean
Gallic acid ที่ความเข้มข้น 200 ug/ml	1	1.23	1.32 ± 0.08
	2	1.38	
	3	1.34	
Gallic acid ที่ความเข้มข้น 100.00 ug/ml	1	0.66	0.66 ± 0.00
	2	0.67	
	3	0.67	
Gallic acid ที่ความเข้มข้น 50.00 ug/ml	1	0.36	0.37 ± 0.01
	2	0.39	
	3	0.37	
Gallic acid ที่ความเข้มข้น 25.00 ug/ml	1	0.24	0.24 ± 0.01
	2	0.22	
	3	0.25	
Gallic acid ที่ความเข้มข้น 12.50 ug/ml	1	0.18	0.17 ± 0.01
	2	0.16	
	3	0.16	



รูปที่ 27 แสดงค่าการดูดกลืนแสง Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ปริมาณ Total Phenolic ของสารสกัดผักชีลาว ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 750 nm (y) มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid คือ $y = 0.0062x + 0.0747$ ที่ $R^2 = 0.9987$ จากนั้นนำความเข้มข้นที่ได้ (x) มาคำนวณปริมาณ Total Phenolic จากการคำนวณค่า Total Phenolic ได้ว่าสารสกัดผักชีลาว 1 กรัม มีปริมาณ Total Phenolic เทียบเท่ากับ Gallic acid 36.02 mg หรือ 36.02 GAE/g extract

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Flavonoid

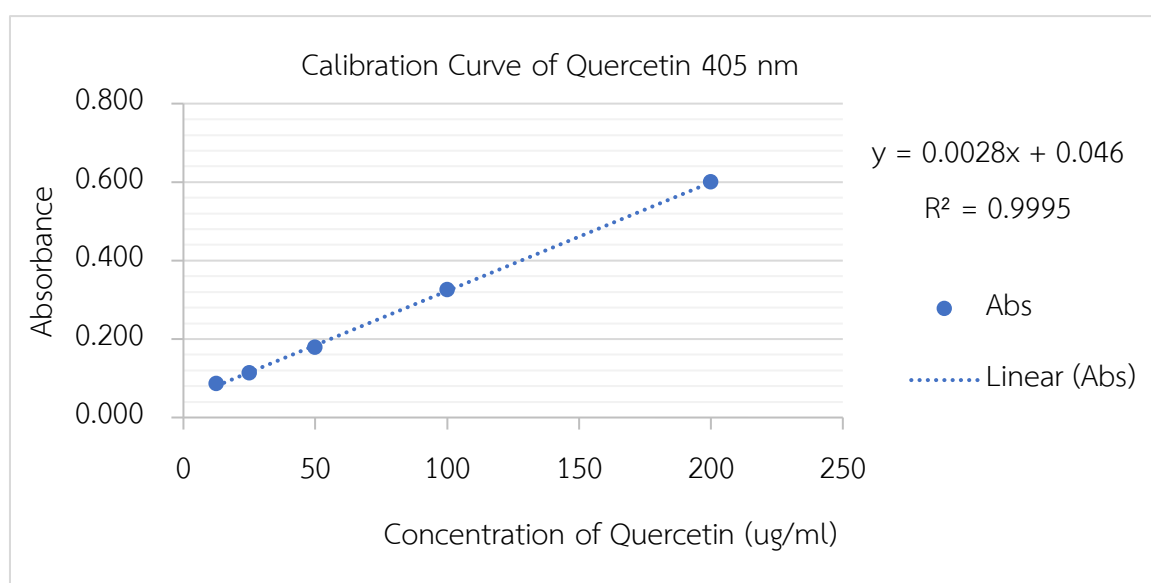
ตรวจวัดสารสกัดผักชีลาวที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้ Quercetin เป็น Standard ที่ความเข้มข้น 200.00 ug/ml, 100.00 ug/ml, 50.00 ug/ml, 25.00 ug/ml และ 12.50 ug/ml ได้ผลดังนี้

ตาราง 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 750 nm	Mean
สารสกัดผักชีลาวเข้มข้น 2.50 mg/ml	1	0.03	0.03 ± 0.00
	2	0.03	
	3	0.04	

ตาราง 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 750 nm	Mean
Quercetin ที่ความเข้มข้น 200.00 ug/ml	1	0.61	0.60 ± 0.01
	2	0.59	
	3	0.60	
Quercetin ที่ความเข้มข้น 100.00 ug/ml	1	0.32	0.33 ± 0.00
	2	0.33	
	3	0.32	
Quercetin ที่ความเข้มข้น 50.00 ug/ml	1	0.18	0.13 ± 0.00
	2	0.18	
	3	0.12	
Quercetin ที่ความเข้มข้น 25.00 ug/ml	1	0.12	0.113 ± 0.00
	2	0.11	
	3	0.11	
Quercetin ที่ความเข้มข้น 12.50 ug/ml	1	0.09	0.09 ± 0.00
	2	0.09	
	3	0.08	



รูปที่ 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสง Quercetin ที่ความยาวคลื่น 405 nm

ปริมาณ Total Flavonoid ของสารสกัดผักชีลาว ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 405 nm (y) มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid คือ $y = 0.0028x + 0.046$ ที่ $R^2 = 0.9995$ จากนั้นนำความเข้มข้นที่ได้ (x) มาคำนวณปริมาณ Total Flavonoid ได้ว่า สารสกัด 1g มีปริมาณ Total Phenolic เทียบเท่ากับ Quercetin 1.00 mg หรือ 1.00 QE/g extract

ตาราง 15 สรุปปริมาณ Total Phenolic และ Total Flavonoid

Sample	ปริมาณ Phenolic (GAE/g extract)	ปริมาณ Flavonoid (QE/g extract)
สารสกัดผักชีลาวเข้มข้น 2.5 mg/ml	36.06	1.00

3. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดจากผักชีลาว โดยใช้สาร Standard 2 ชนิด Ascorbic acid และ Trolox วัดที่ความยาวคลื่น 520 nm



รูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay

ตาราง 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ DPPH

Concentration สารสกัดผักชีลาว + DPPH (ug/ml)	Abs 520 nm				
1000.00	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07
500.00	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07
400.00	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
300.00	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11
250.00	0.19	0.18	0.19	0.19	0.19
125.00	0.28	0.27	0.32	0.27	0.27
100.00	0.25	0.25	0.25	0.27	0.25
75.00	0.27	0.27	0.27	0.29	0.28
62.50	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32
31.25	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34
15.125	0.34	0.36	0.35	0.35	0.35
7.8125	0.36	0.35	0.35	0.35	0.36

ตาราง 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว

Concentration สารสกัดผักชีลาว (ug/ml)	Abs 520 nm				
1000.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
500.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04
400.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
300.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
250.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
125.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
100.00	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04
75.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
62.50	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05
31.25	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
15.13	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05
7.81	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05

ตาราง 18 แสดงค่าการดูดกลืนของ Blank

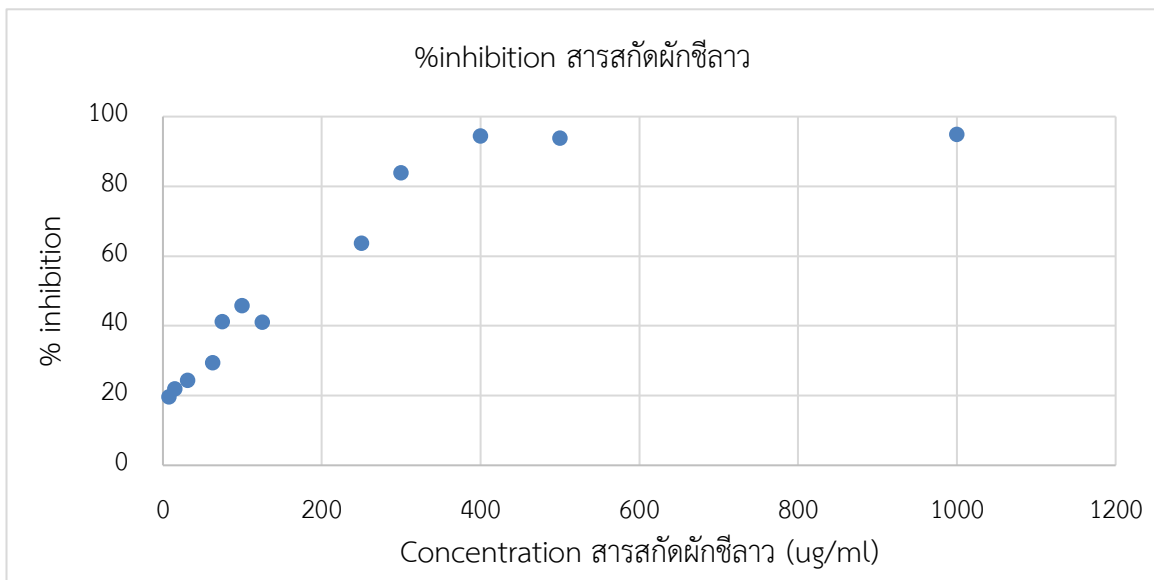
Sample	Abs 520 nm
Methanol + DPPH (Blank เต็ม DPPH)	0.38
Methanol (Blank ไม่เต็ม DPPH)	0.04

ทำการคำนวณเพื่อหาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) โดยสูตร

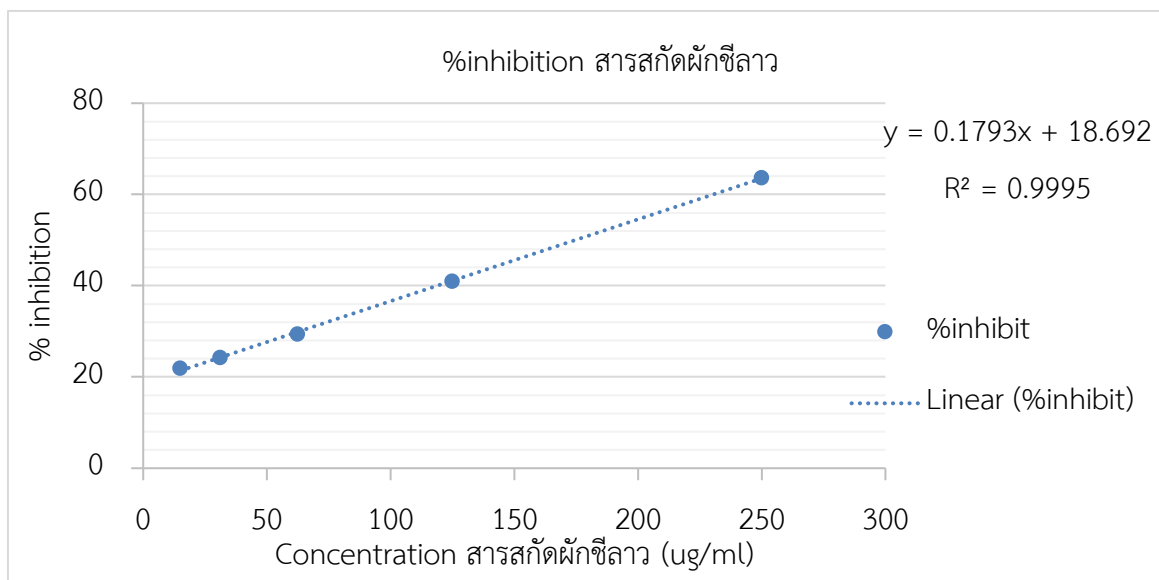
$$\%inhibition = ((\text{MeOH DPPH} - (\text{Sample DPPH} - \text{Blank sample})) / \text{MeOH DPPH}) \times 100$$

ตาราง 19 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

Concentration สารสกัดผักชีลาว (ug/ml)	%inhibition
1000.00	94.87
500.00	93.74
400.00	94.35
300.00	83.75
250.00	63.68
125.00	40.99
100.00	45.69
75.00	41.17
62.50	29.35
31.25	24.31
15.13	21.88
7.80	19.53



รูปที่ 30 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

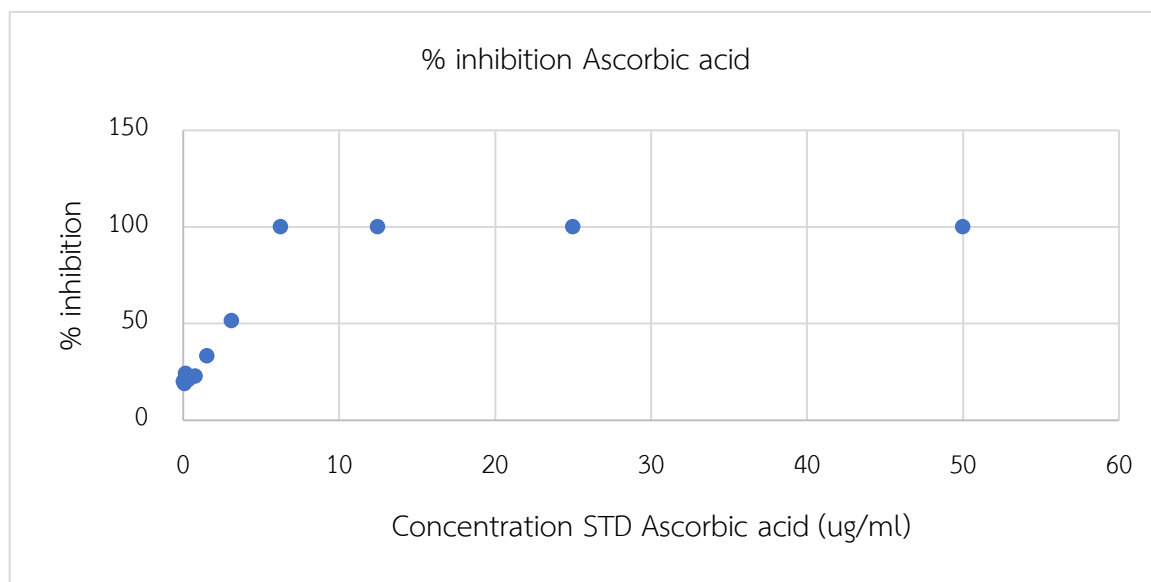


รูปที่ 31 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

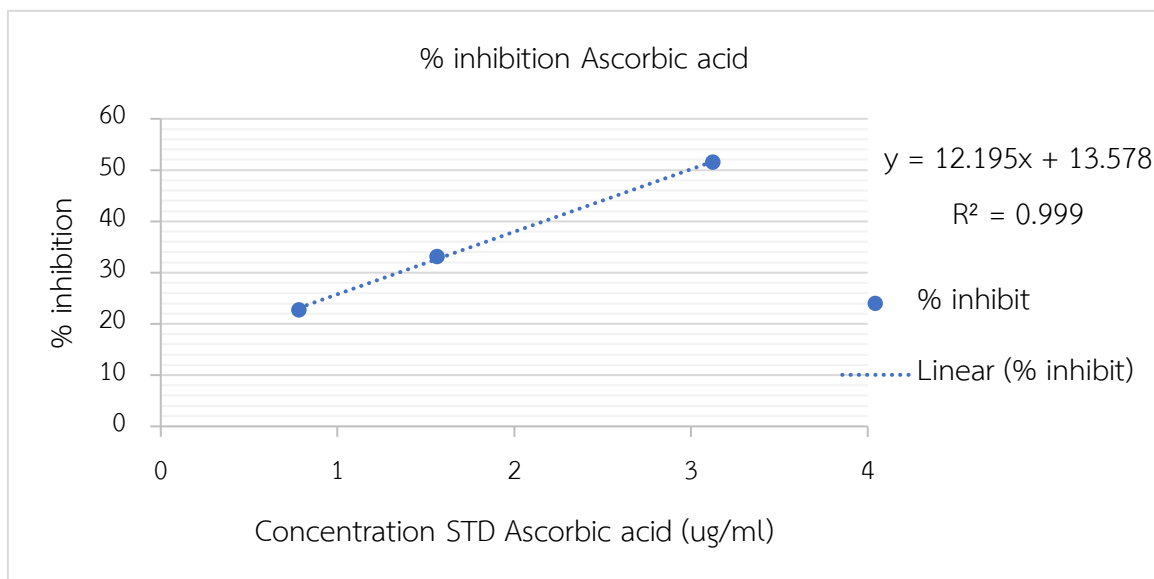
จากรูปที่ 31 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 0.1793x + 18.692$ ค่า $R^2 = 0.9995$ ทำการคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 174.61 ug/ml

ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

Concentration STD Ascorbic acid (ug/ml)	% inhibition
50.00	100.00
25.00	100.00
12.50	100.00
6.25	100.00
3.13	51.51
1.56	33.16
0.78	22.75
0.39	21.08
0.20	24.03



รูปที่ 32 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

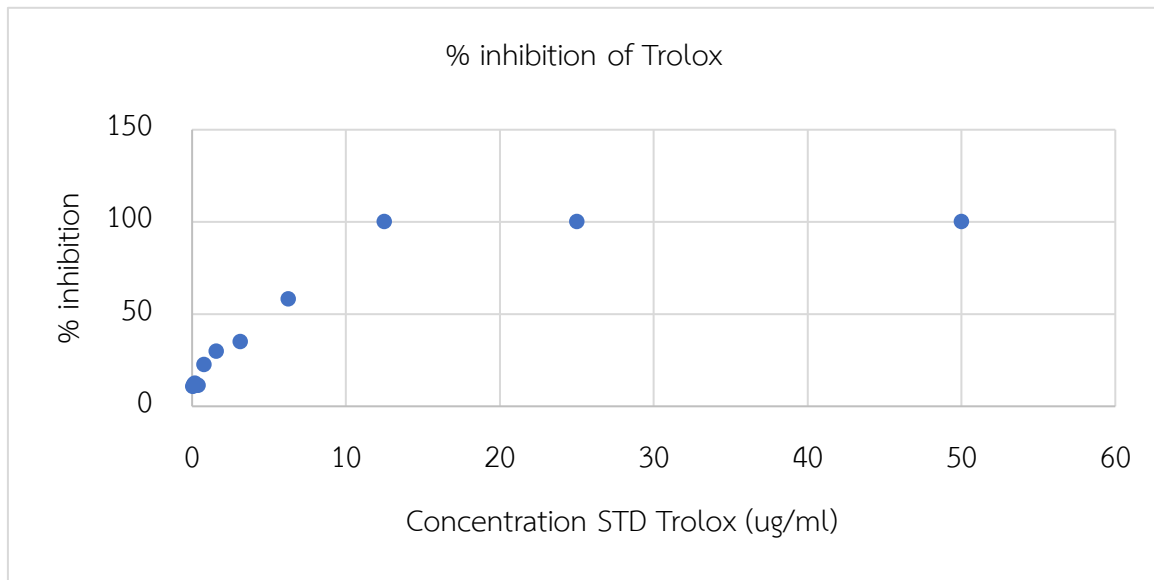


รูปที่ 33 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

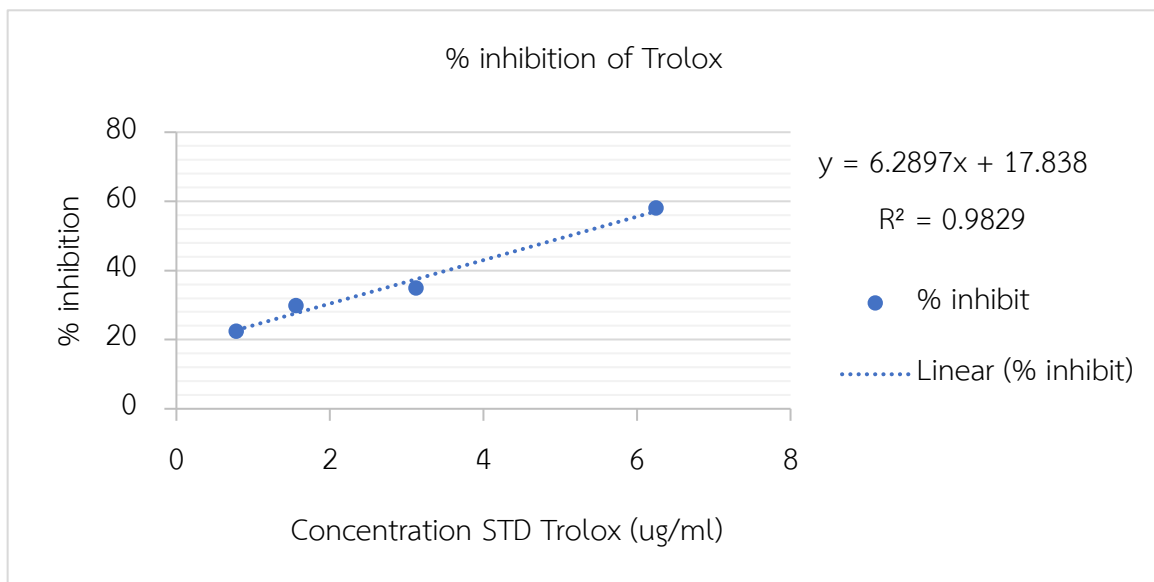
จากรูปที่ 33 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 12.195x + 13.578$ ค่า $R^2 = 0.999$ ทำการคำนวณหาค่า IC₅₀ ได้เท่ากับ 2.98 ug/ml

ตาราง 21 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

Concentration STD Trolox (ug/ml)	% inhibition
50.00	100.00
25.00	100.00
12.50	100.00
6.25	57.96
3.13	34.89
1.56	29.80
0.78	22.41
0.39	11.22
0.20	12.32
0.10	11.72
0.05	10.63



รูปที่ 34 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

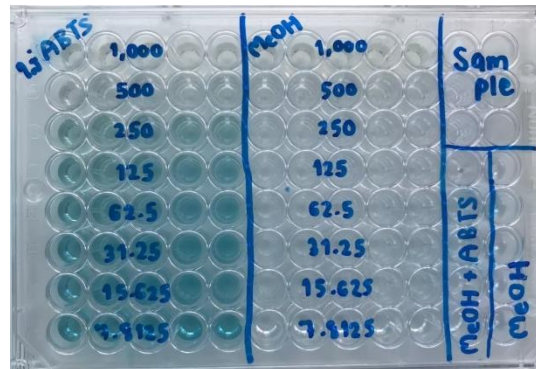


รูปที่ 35 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

จากรูปที่ 35 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 6.2897x + 17.838$ ค่า $R^2 = 0.9829$ ทำการคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 5.11 ug/ml

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS assay

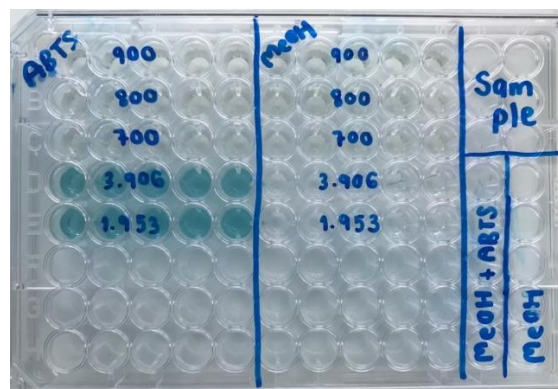
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ของสารสกัดจากผักชีลาว โดยใช้สาร Standard 2 ชนิด Ascorbic acid และ trolox วัดที่ความยาวคลื่น 734 nm



รูปที่ 36 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay



รูปที่ 37 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay



รูปที่ 38 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay

ตาราง 22 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ ABTS

Concentration สารสกัดผักชีลาว + ABTS (ug/ml)	Abs 734 nm		
1000.00	0.04	0.05	0.04
900.00	0.04	0.04	0.04
800.00	0.04	0.04	0.04
700.00	0.05	0.05	0.05
500.00	0.12	0.12	0.13
400.00	0.17	0.17	0.17
300.00	0.27	0.27	0.27
250.00	0.32	0.31	0.34
125.00	0.43	0.43	0.46
100.00	0.47	0.47	0.47
75.00	0.51	0.50	0.50
62.50	0.53	0.52	0.55
31.25	0.58	0.58	0.59
15.63	0.57	0.62	0.61
7.81	0.63	0.64	0.63
3.91	0.60	0.60	0.62
1.95	0.62	0.63	0.65

ตาราง 23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว

Concentration สารสกัดผักชีลาว (ug/ml)	Abs 734 nm		
1000.00	0.04	0.04	0.04
900.00	0.04	0.04	0.04
800.00	0.04	0.04	0.04
700.00	0.04	0.04	0.04
500.00	0.04	0.04	0.04
400.00	0.04	0.04	0.04
300.00	0.04	0.04	0.04
250.00	0.04	0.04	0.04
125.00	0.04	0.04	0.04
100.00	0.04	0.04	0.04
75.00	0.04	0.04	0.04
62.50	0.04	0.04	0.04
31.25	0.04	0.04	0.04
15.63	0.04	0.04	0.04
7.81	0.04	0.04	0.04
3.91	0.04	0.04	0.04
1.95	0.04	0.04	0.04

ตาราง 24 แสดงค่าการดูดกลืนของ Blank

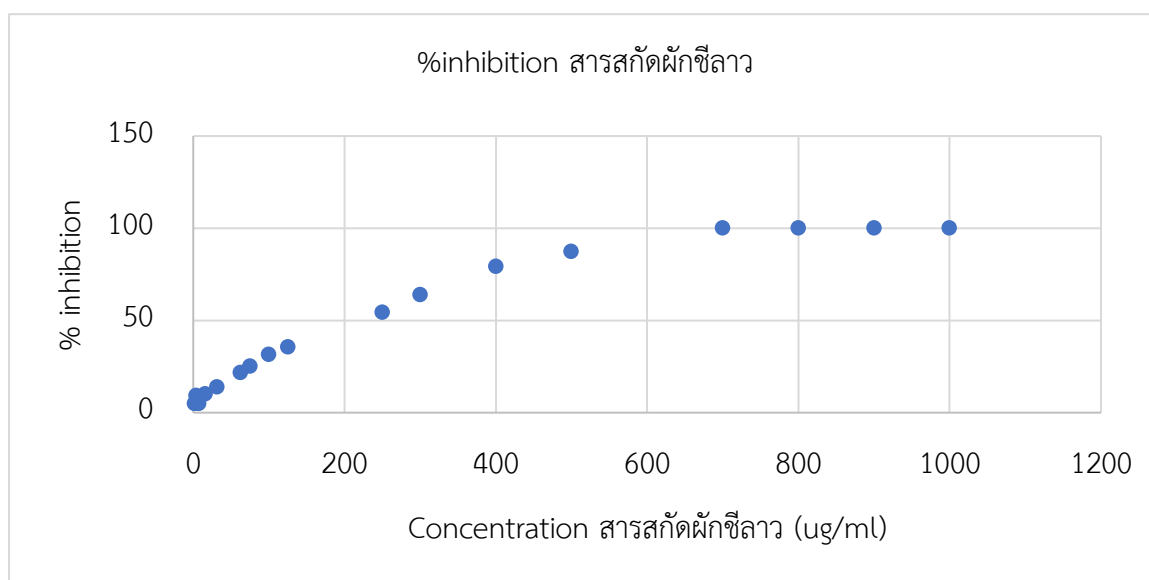
Sample	Abs 734 nm
Methanol + ABTS (Blank เติม ABTS)	0.63
Methanol (Blank ไม่เติม ABTS)	0.05

ทำการคำนวณเพื่อหาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) โดยสูตร

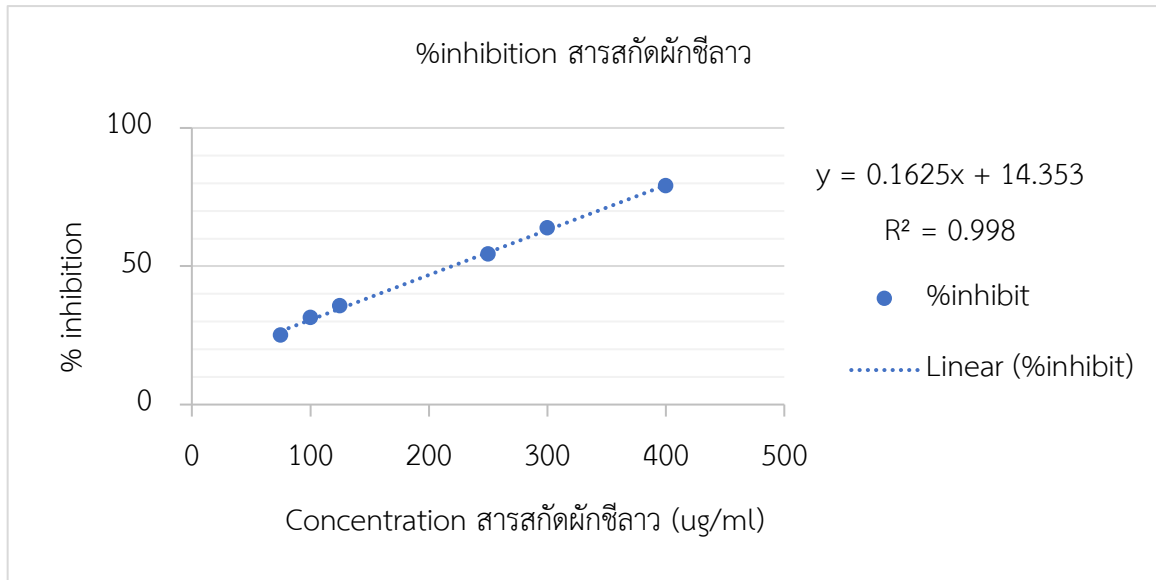
$$\%inhibition = ((\text{MeOH ABTS} - (\text{Sample ABTS} - \text{Blank sample})) / \text{MeOH ABTS}) \times 100$$

ตาราง 25 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

Concentration สารสกัดผักชีลาว (ug/ml)	%inhibition
1000.00	100.00
900.00	100.00
800.00	100.00
700.00	100.00
500.00	87.19
400.00	79.03
300.00	63.72
250.00	54.33
125.00	35.55
100.00	31.44
75.00	25.10
62.50	21.68
31.25	13.79
15.63	10.10
7.81	4.82
3.91	9.09
1.95	4.93



รูปที่ 39 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

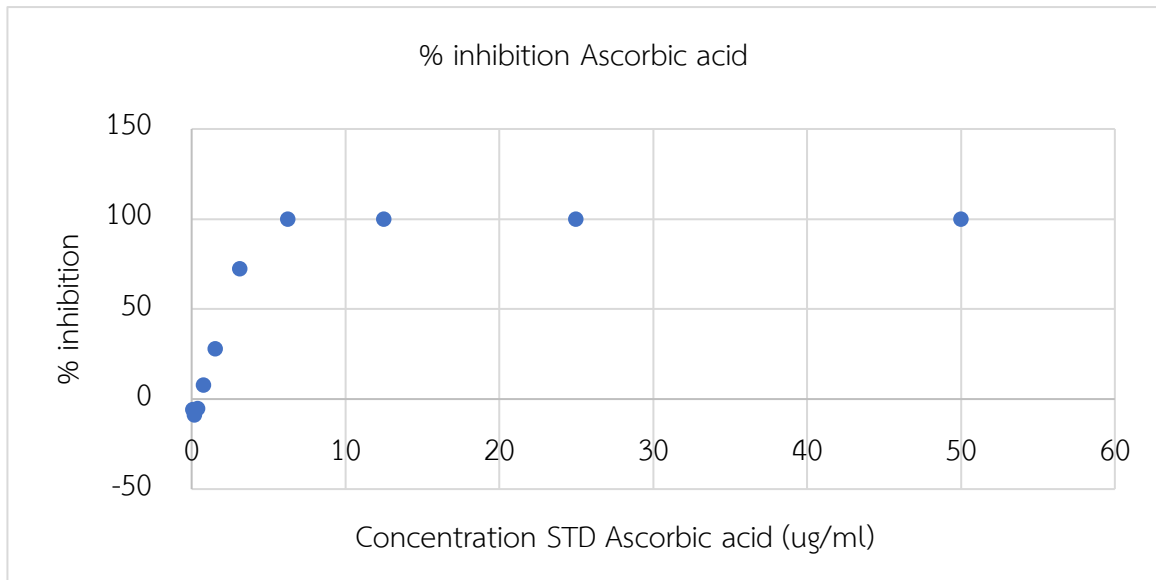


รูปที่ 40 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดผักชีลาว

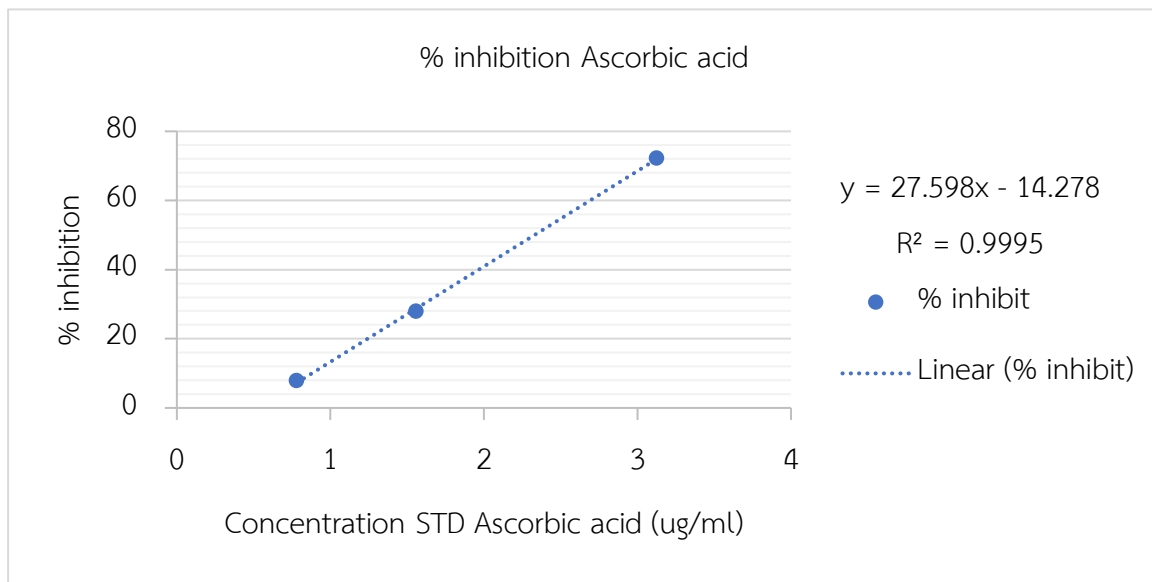
จากรูปที่ 40 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 0.1625x + 14.353$ ค่า $R^2 = 0.9980$ ทำการคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 219.36 ug/ml

ตาราง 26 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

Concentration Ascorbic acid (ug/ml)	% inhibition
50.00	100.00
25.00	100.00
12.50	100.00
6.25	100.00
3.13	72.23
1.56	27.97
0.78	7.81
0.39	-5.31
0.20	-9.03
0.10	-5.87
0.05	-9.74



รูปที่ 41 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

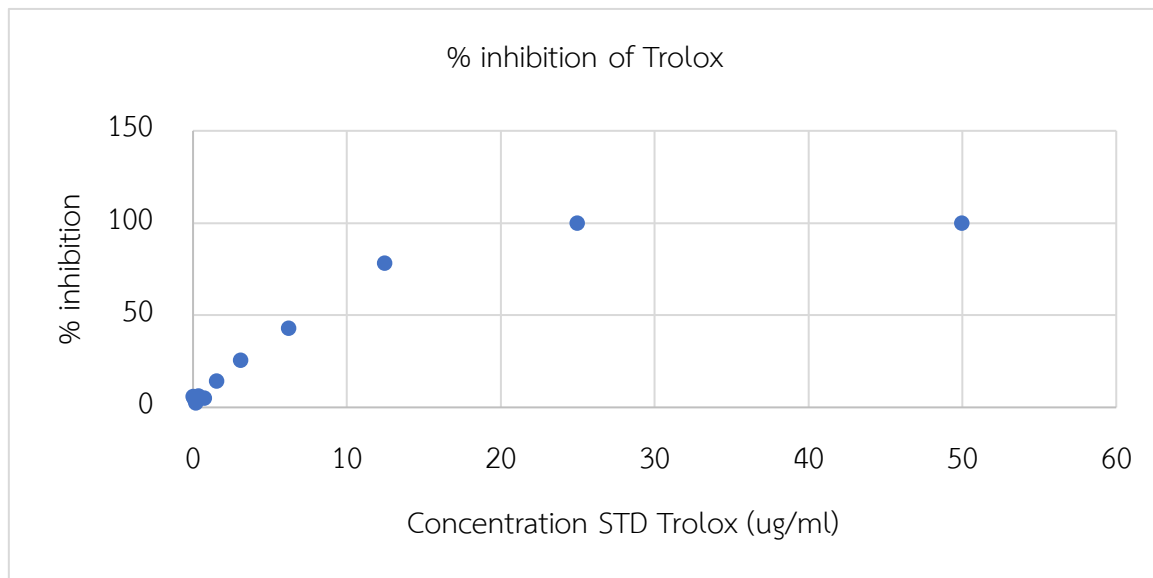


รูปที่ 42 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Ascorbic acid

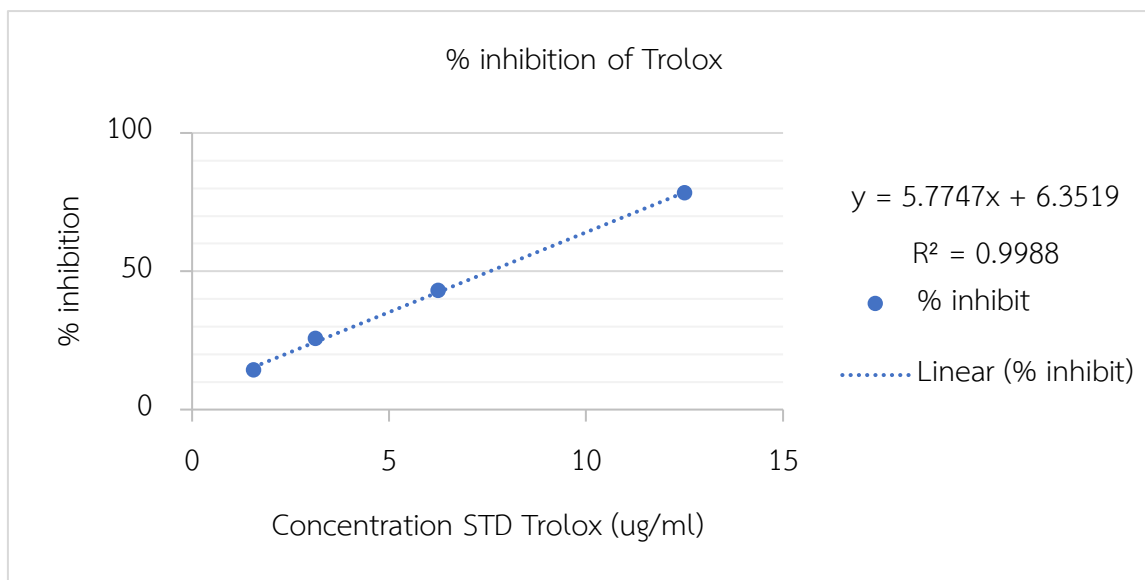
จากรูปที่ 42 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 27.598x - 14.278$ ค่า $R^2 = 0.9995$ ทำการคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 2.32 ug/ml

ตาราง 27 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

Concentration Trolox (ug/ml)	% inhibition
50.00	100.00
25.00	100.00
12.50	78.20
6.25	42.87
3.13	25.47
1.56	14.20
0.78	4.96
0.39	6.14
0.20	2.22
0.10	4.59
0.05	5.87



รูปที่ 43 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

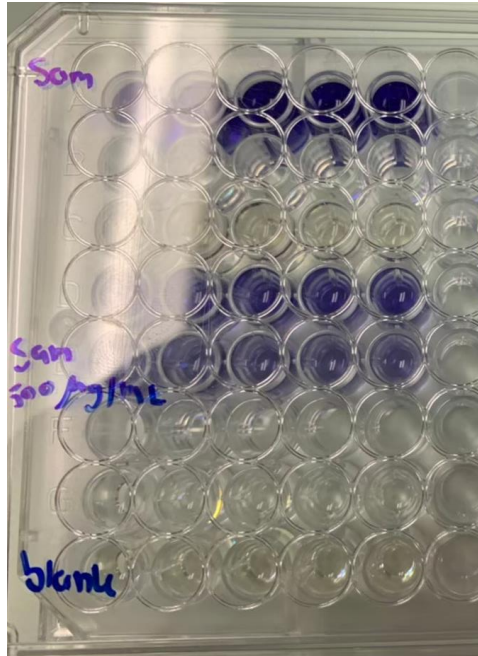


รูปที่ 44 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของ Trolox

จากรูปที่ 44 กราฟแสดง % inhibition โดยมีค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 5.7747x + 6.3519$ ค่า $R^2 = 0.9988$ ทำการคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 7.55 ug/ml

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยวิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay ของสารสกัดจากผักชีลาวที่ความเข้มข้น 500.00 ug/mL โดยใช้สาร Standard 3 ชนิด คือ Ferrous sulfate, Ascorbic acid และ trolox เปรียบความเข้มข้น 400.00 uM/ml - 6.25 uM/ml วัดที่ความยาวคลื่น 600 nm



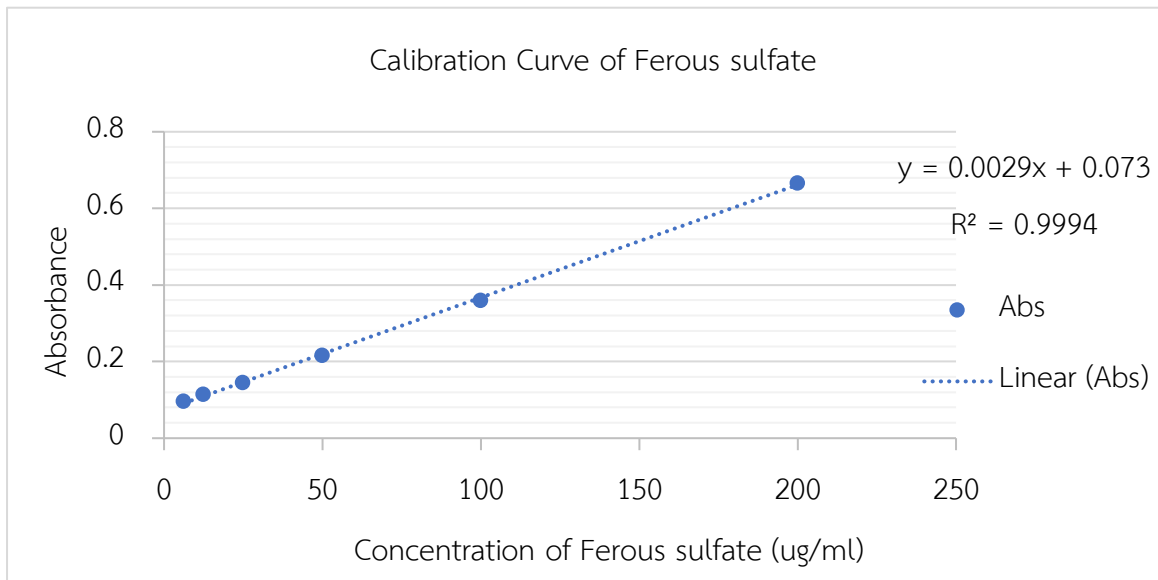
รูปที่ 45 แสดงการเปลี่ยนสีของสารสกัดผักชีลาวเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

ตาราง 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวร่วมกับ FRAP

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 600 nm	Mean
สารสกัดจากผักชีลาวที่ความเข้มข้น 500 ug/mL	1	0.45	0.46 ± 0.01
	2	0.46	
	3	0.47	
	4	0.46	
	5	0.46	

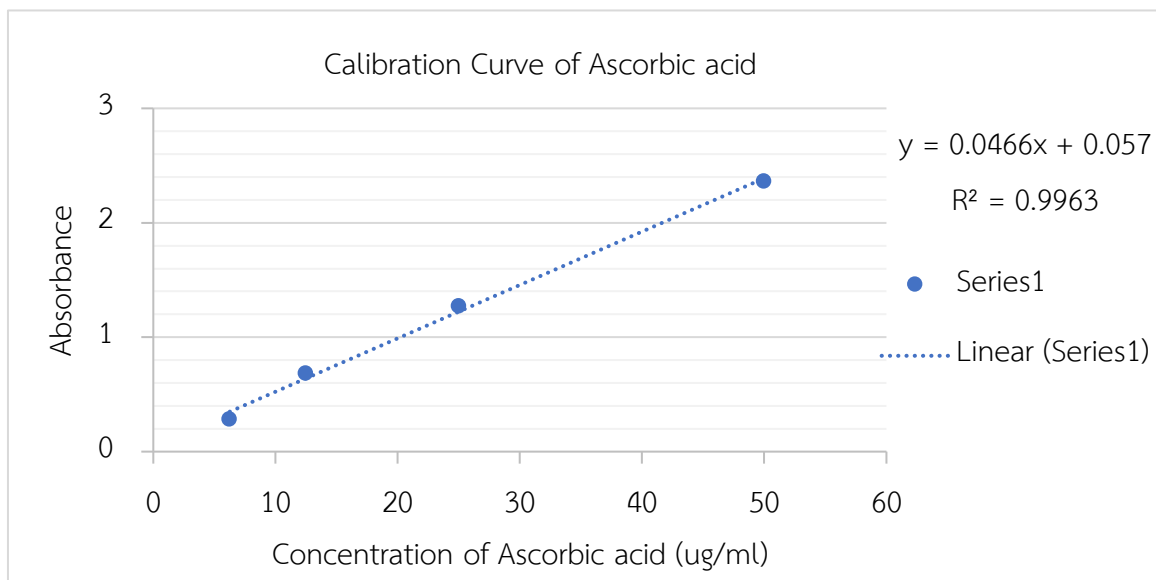
ตาราง 29 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate ที่ความยาวคลื่น 600 nm

Sample	ครั้งที่	Absorbance ความยาวคลื่น 600 nm	Mean
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 200.00 ug/ml	1	0.67	0.67 ± 0.01
	2	0.66	
	3	0.67	
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 100.00 ug/ml	1	0.35	0.36 ± 0.01
	2	0.37	
	3	0.36	
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 50.00 ug/ml	1	0.22	0.22 ± 0.01
	2	0.22	
	3	0.21	
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 25.00 ug/ml	1	0.14	0.15 ± 0.01
	2	0.15	
	3	0.15	
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 12.50 ug/ml	1	0.11	0.11 ± 0.01
	2	0.11	
	3	0.12	
Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้น 6.25 ug/ml	1	0.10	0.10 ± 0.01
	2	0.09	
	3	0.01	



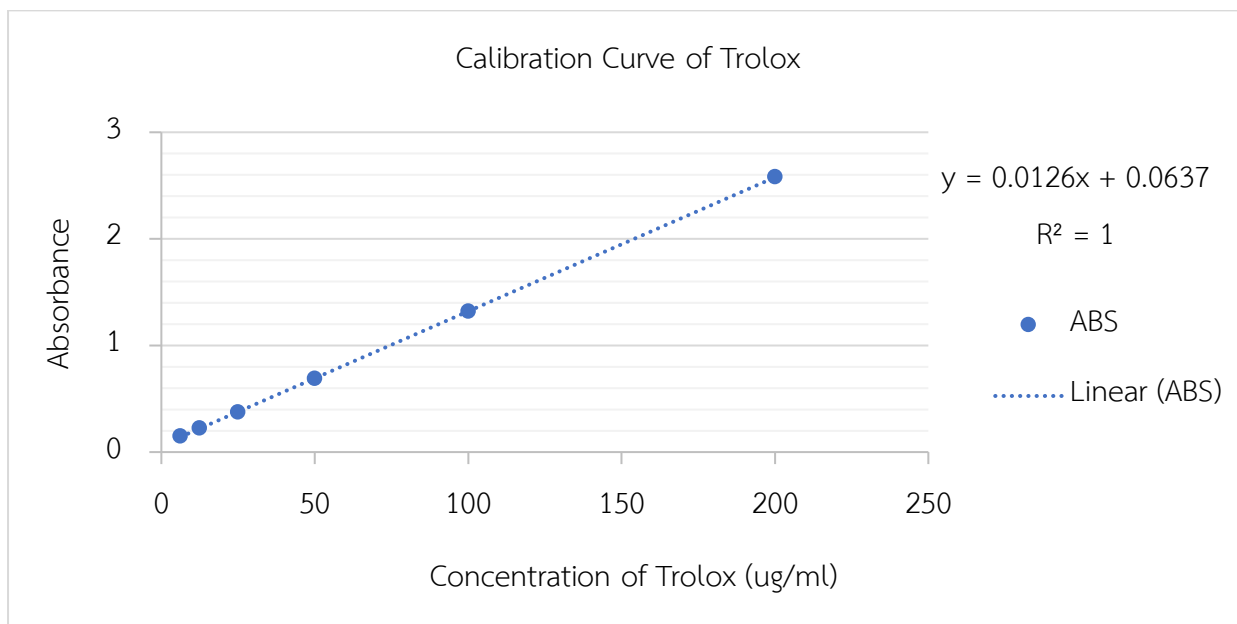
รูปที่ 46 แสดงค่าการดูดกลืนแสง Ferrous sulfate ที่ความยาวคลื่น 600 nm

จากรูปที่ 46 กราฟการดูดกลืนแสง Ferrous sulfate คำนวณค่า Antioxidant ของสารสกัดผักชีลาว ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 nm (y) มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate คือ $y = 0.0029x + 0.073$ ที่ $R^2 = 0.9994$ มาคำนวณได้เท่ากับ 53.10 mmole/ g extract



รูปที่ 47 แสดงค่าการดูดกลืนแสง Ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 600 nm

จากรูปที่ 47 กราฟการดูดกลืนแสง Ascorbic acid คำนวณค่า Antioxidant ของสารสกัดผักชีลาว ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 nm (y) มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid คือ $y = 0.0466x + 0.057$ ที่ $R^2 = 0.9963$ มาคำนวณได้เท่ากับ 8.60 Ascorbic/g extract



รูปที่ 48 กราฟการดูดกลืนแสง Trolox ที่ความยาวคลื่น 600 nm

จากรูปที่ 48 กราฟการดูดกลืนแสง Trolox คำนวณค่า Antioxidant ของสารสกัดผักชีลาว ได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 nm (y) มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ Trolox คือ $y = 0.0126x + 0.0637$ ที่ $R^2 = 1.000$ มาคำนวณได้เท่ากับ 12.52 Trolox/g extract

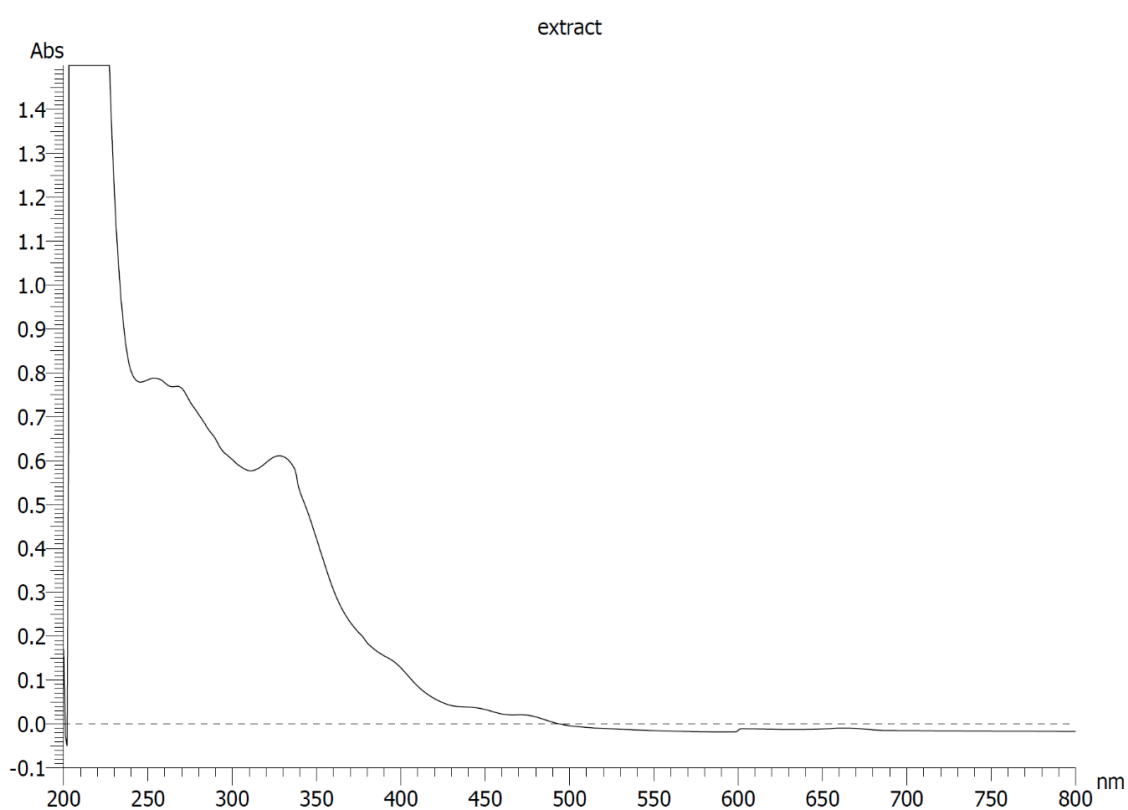
ตาราง 30 สรุปค่า IC50 ของสารสกัดผักชีลาว

การทดสอบ	DPPH	ABTS	FRAP
IC50	174.61 ug/ml	219.36 ug/ml	53.1 mmole/g extract

จากการทดสอบเรื่องฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) พบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH assay นำมาคำนวณค่าของ IC50 พบว่าได้ค่าเท่ากับ 174.61 ug/ml ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid กับ trolox ได้ค่า IC50 เท่ากับ 2.98 ug/ml และ 5.11 ug/ml ตามลำดับ ค่า IC50 ที่น้อยแสดงถึงฤทธิ์ antioxidant ที่ดี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ABTS นำมาคำนวณค่าของ IC50 พบว่าได้ค่าเท่ากับ 219.36 ug/ml ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบกับสาร

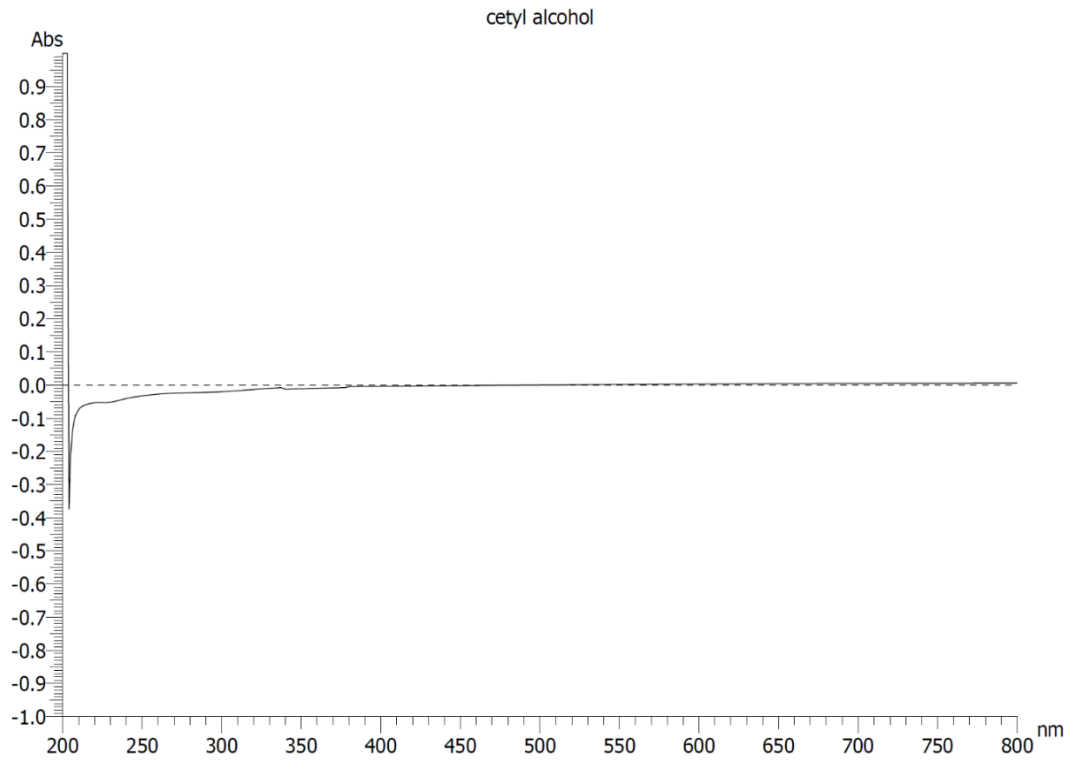
มาตรฐาน ascorbic acid กับ trolox ได้ค่า IC50 เท่ากับ 2.32 ug/ml และ 7.55 ug/ml ตามลำดับ ค่า IC50 ที่น้อยแสดงถึงฤทธิ์ antioxidant ที่ดี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ FRAP assay นำมาคำนวณค่าได้ค่าเท่ากับ 53.10 mmole/g extract ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid กับ trolox ได้ค่า 8.60 ascorbic/g extract และ 12.52 trolox/g extract ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของสารสกัด (wavelength scan)

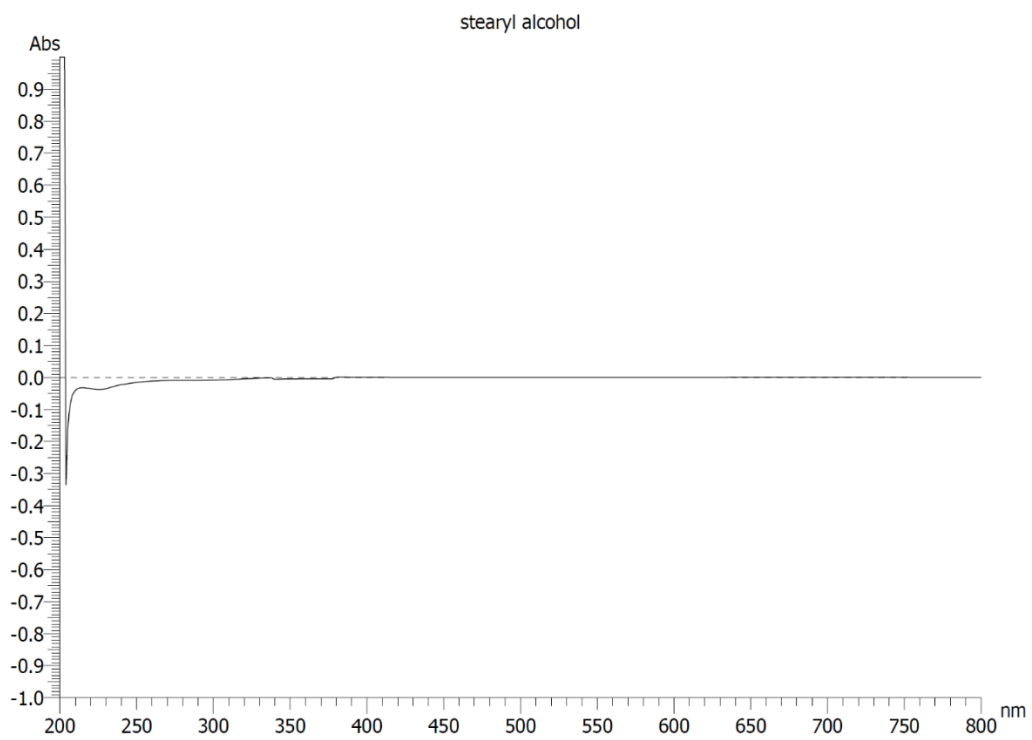


รูปที่ 49 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว

จากรูปที่ 49 พบว่าสารสกัดผักชีลาวมีการดูดกลืนคลื่นแสงช่วง 340 nm มากที่สุด จึงสามารถนำช่วงการดูดกลืนนี้ไปเป็นประโยชน์ในการทดสอบดูค่าการดูดกลืนของสารสกัดผักชีลาวได้ในการทดสอบต่อ ๆ ไป



รูปที่ 50 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของ *Cetyl alcohol*



รูปที่ 51 การวิเคราะห์ช่วงการดูดกลืนแสงของ *Stearyl alcohol*

จากรูปที่ 49-51 พบว่า cetyl alcohol และ stearyl alcohol มีช่วงการดูดกลืนแสงที่ไม่ทับช่วงของสารสกัดผักชีลาวจึงทำให้มั่นใจได้ว่าการดูดกลืนช่วง 340 nm ที่ทำการวิเคราะห์ไม่มีตัวไหนมารบกวน

ตาราง 31 การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารสกัด (Absorbance analysis)

สัดส่วน สารสกัด : Ethanol	ความเข้มข้น (ug/ml)	Limit of Detection (LOD)	Limit of Quantification
		Abs 340 nm	Abs 340 nm
1 : 1	500.00	0.73	0.80
1 : 2	333.33	0.52	0.54
1 : 3	250.00	0.40	0.41
1 : 4	200.00	0.32	0.32
1 : 5	166.67	-	0.27
1 : 6	142.86	0.23	0.22

จากตารางที่ 31 วิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารสกัด (Absorbance analysis) ที่อัตราส่วนความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อคิดค่า Limit of Detection (LOD) คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ และ Limit of Quantification (LOQ) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณหรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้ พบว่าที่ความเข้มข้น 500.00, 333.33, 250.00, 200.00, 166.67 และ 142.86 ug/ml มีค่า LOD เท่ากับ 0.73, 0.52, 0.40, -, 0.23 ตามลำดับ และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.80, 0.54, 0.41, 0.32, 0.27 และ 0.22 ตามลำดับ

5. การทดสอบความคงตัวของสารสกัด (Stability)

ตาราง 32 แสดงความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ เมื่อทำการเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่าง	ความยาวคลื่น Abs 340 nm						% การดูดกลืนแสง D7 เทียบกับ D0
	Day 0			Day 7			
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
สารสกัด + DI water (เก็บในที่เย็น)	0.77	0.77	0.77	0.78	0.77	0.77	100.00
สารสกัด + DI water (เก็บในที่ร้อน)	0.71	0.70	0.71	0.70	0.69	0.70	98.31
สารสกัด + Ethanol (เก็บในที่เย็น)	0.76	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	100.78
สารสกัด + HCl pH2 (เก็บในที่เย็น)	0.70	0.79	0.79	0.77	0.78	0.78	98.98

จากตารางที่ 32 เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของสารสกัดที่สภาวะต่าง ๆ เก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน พบว่า % การดูดกลืนแสงในวันที่ 7 เทียบกับวันที่ 0 ทุกสภาวะมีค่าใกล้เคียง 100% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บสารสกัดไว้ยังมีปริมาณสารสกัดที่ดูดกลืนแสงได้ใกล้เคียงค่าเดิมซึ่งเป็นตัวแสดงว่าสารสกัดมีความคงตัว จึงสรุปได้ว่าสารสกัดที่ความคงตัวสภาวะร้อน, คงตัวในสภาวะกรด และคงตัวในสภาวะไฮโดรไลซิส

6. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด (Anti-inflammation)

6.1 การทดสอบแบบ Heat induced haemolysis

ตาราง 33 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวเพื่อแสดงผลด้านการต้านการอักเสบ % Inhibition of haemolysis

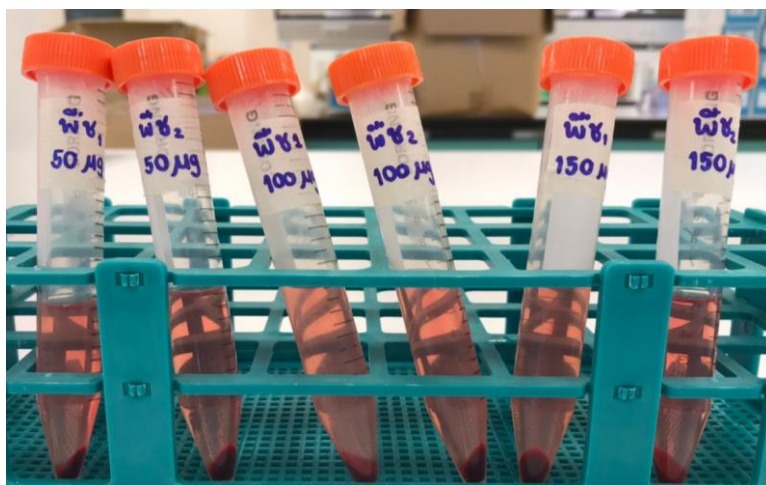
ตัวอย่าง	Abs (560 nm)		เฉลี่ย Abs (560 nm)	% Inhibition of haemolysis
- เลือด - สารสกัดผักชีลาว 50 ug/ml - PBS pH 7.4	0.38	0.41	0.39	4.85*
- เลือด - สารสกัดผักชีลาว 100 ug/ml - PBS pH 7.4	0.29	0.34	0.31	24.27*
- เลือด - สารสกัดผักชีลาว 150 ug/ml - PBS pH 7.4	0.36	0.36	0.36	12.62*
- เลือด - สารสกัดผักชีลาว 250 ug/ml - PBS pH 7.4	0.28	0.31	0.30	28.40*
- เลือด - สารสกัดผักชีลาว 500 ug/ml - PBS pH 7.4	0.29	0.32	0.21	49.51*
- เลือด - Diclofenac 100 ug/ml - PBS pH 7.4	0.51	0.46	0.49	-17.96*
- เลือด - Diclofenac 200 ug/ml	0.34	0.32	0.33	19.90*

- PBS pH 7.4				
- เลือด - PBS pH 7.4	0.44	0.39	0.41	0*

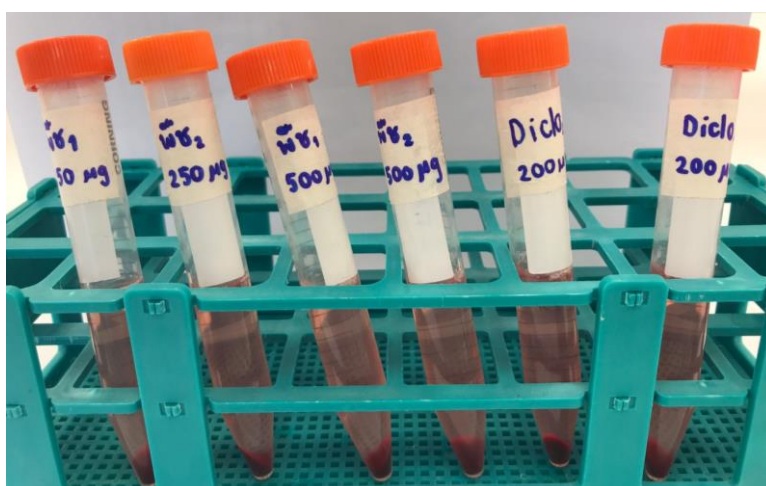
*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน

หมายเหตุ : คำนวณ % Protection or Inhibition of haemolysis จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{Optical density of drug treated sample}}{\text{Optical density of control}} \times 100 \right)$$



รูปที่ 52 การทดสอบแบบ Heat induced haemolysis หลังปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 53 การทดสอบแบบ Heat induced haemolysis หลังปั่นเหวี่ยง

จากตารางที่ 33 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ Diclofenac เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบ เมื่อนำผลไปเข้าทางสถิติพบว่า สารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ผลในการต้านการอักเสบ (% Inhibition of haemolysis) ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าให้ผลด้านการอักเสบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} \leq 0.05$)

7. การพัฒนาอนุภาคไขมันแข็ง solid lipid nanoparticles (SLNs)

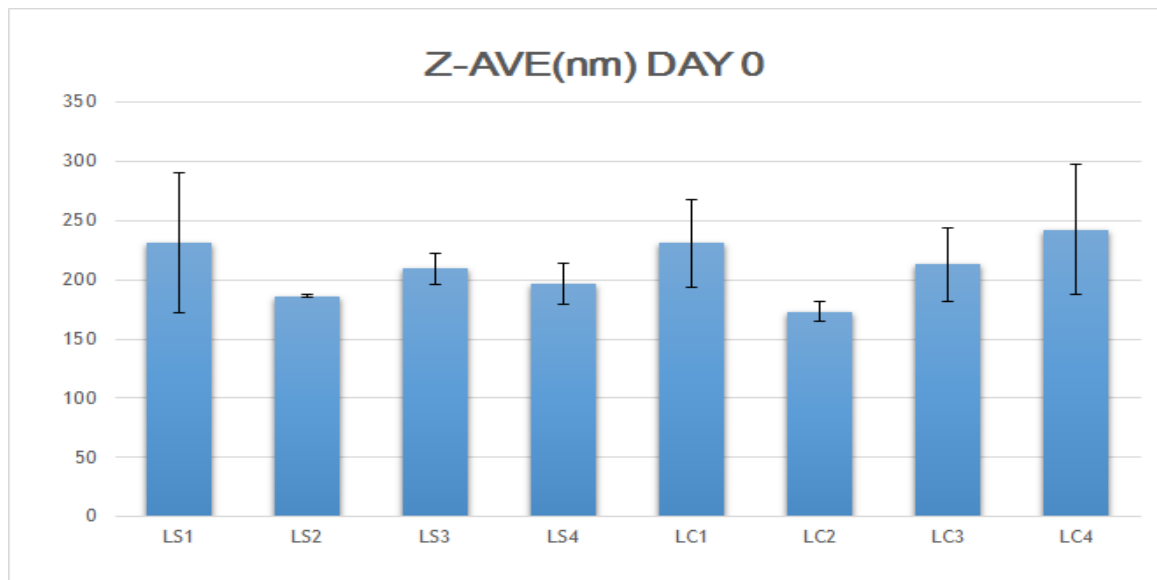
7.1 การศึกษาผลของ Wax และ Lecithin ต่ออนุภาค



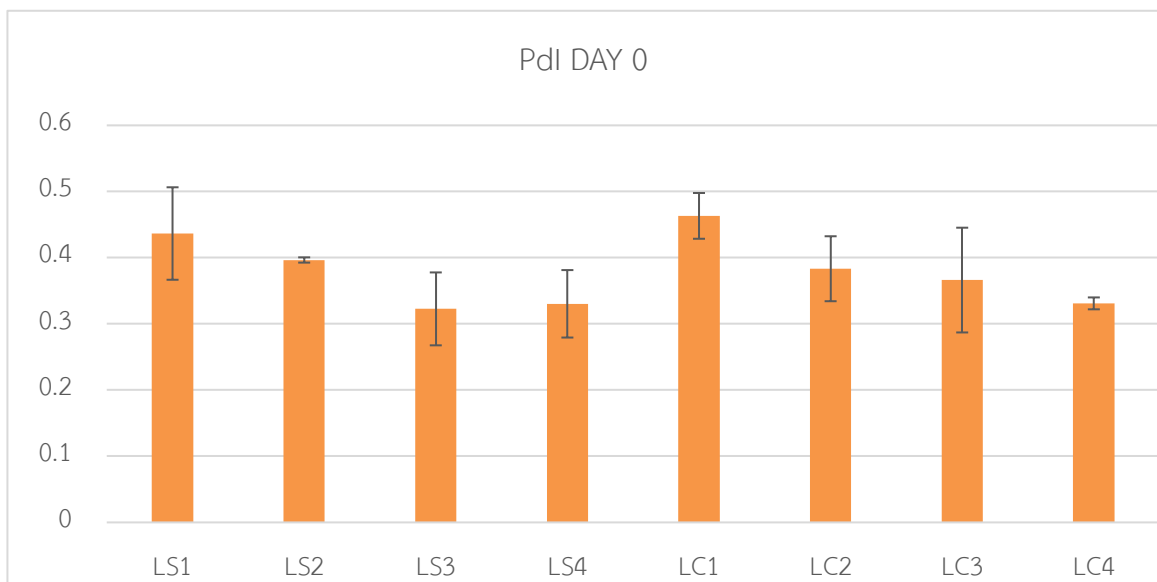
รูปที่ 54 แสดงลักษณะตำรับที่เตรียมได้

ตาราง 34 แสดงข้อมูลสูตรตำรับในวันที่ 0

DAY 0				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	Pdl	Zeta potential
LS1	ขาวขุ่น	231.08 ± 59.10	0.33	-41.14
LS2	ขาวขุ่นเหลืองเล็กน้อย	186.37 ± 1.60	0.40	-44.8
LS3	ขาวขุ่นเหลืองเล็กน้อย	209.13 ± 13.12	0.32	-44.28
LS4	เหลืองขุ่น	196.66 ± 16.99	0.33	-41.31
LC1	ขาวขุ่น	230.63 ± 37.08	0.46	-40.81
LC2	ขาวขุ่นเหลืองเล็กน้อย	173.66 ± 8.66	0.38	-43.75
LC3	เหลืองขุ่น	212.96 ± 30.91	0.37	-40.83
LC4	เหลืองขุ่น	241.99 ± 54.75	0.33	-41.8



รูปที่ 55 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0



รูปที่ 56 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0

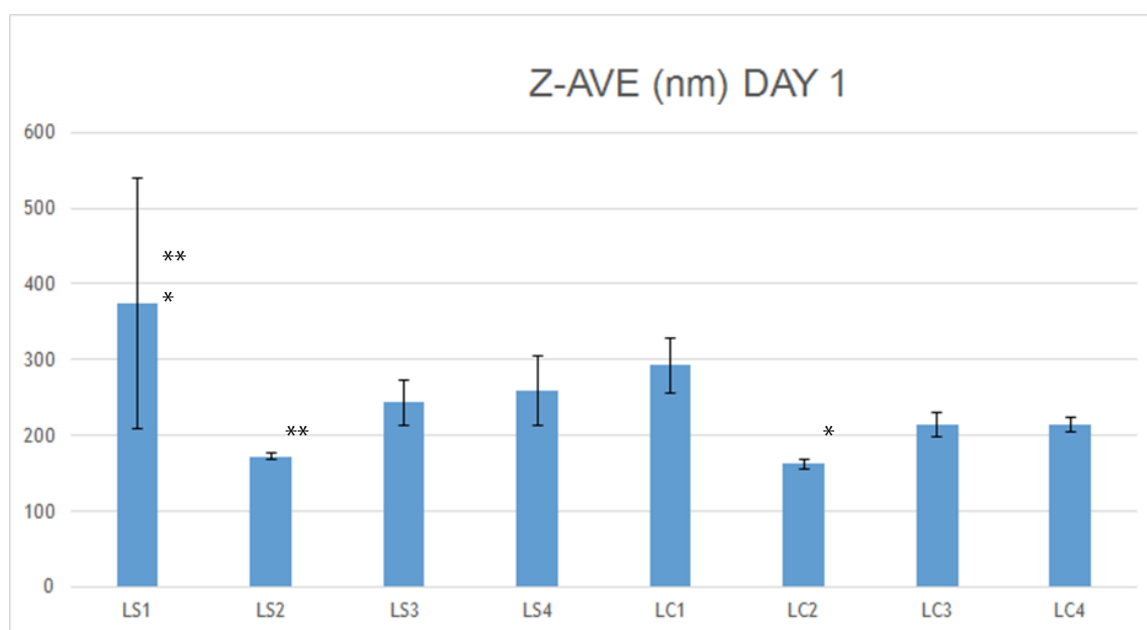
จากตารางที่ 34 แสดงข้อมูลสูตรตำรับในวันที่ 0 จากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol และ stearyl alcohol , Lecithin ในปริมาณที่ต่างกัน พบว่าขนาดของอนุภาค, ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

ตาราง 35 แสดงข้อมูลสูตรตำรับวันที่ 1

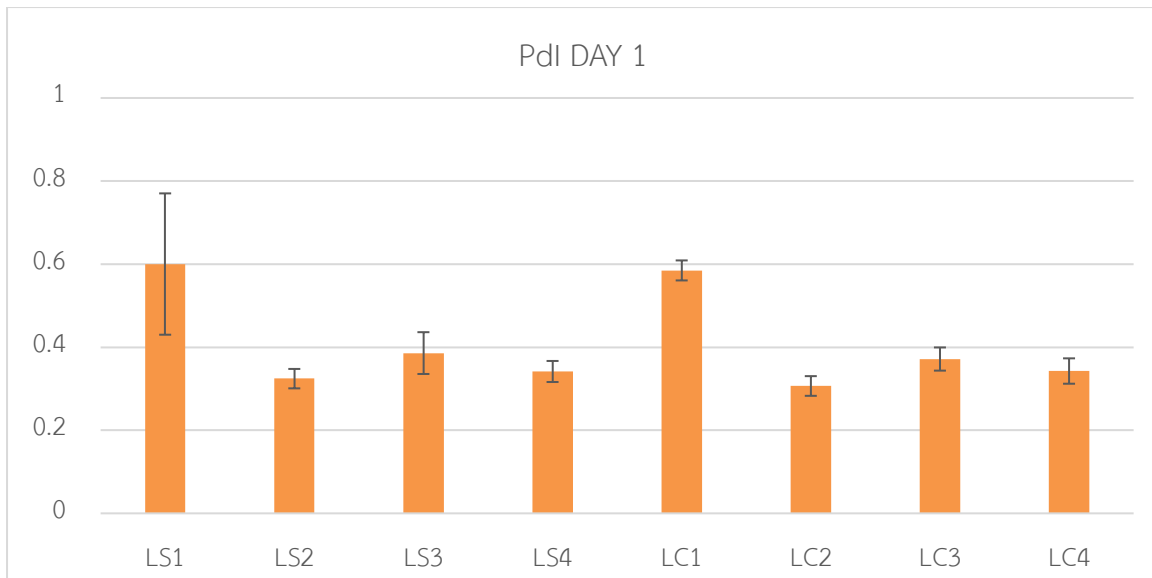
วันที่ 1				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LS1 ^(**)	ขาวขุ่น	364.56 ± 164.70	0.60	-41.05
LS2 ^{**}	ขาวขุ่นเหลืองเล็กน้อย	172.83 ± 4.71	0.32	-46.23
LS3	เหลืองขุ่น	243.40 ± 29.66	0.39	-40.40
LS4	เหลืองขุ่น	259.26 ± 45.27	0.34	-39.34
LC1	ขาวขุ่น	292.29 ± 36.68	0.58	-39.67
LC2 [*]	ขาวขุ่นเหลืองเล็กน้อย	162.84 ± 6.14	0.31	-43.42
LC3	เหลืองขุ่น	214.47 ± 16.85	0.37	-39.60
LC4	เหลืองขุ่น	214.41 ± 9.36	0.34	-39.75

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบสูตรตำรับ LS1 กับ LC2

**แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบสูตรตำรับ LS1 กับ LS2



รูปที่ 57 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 1



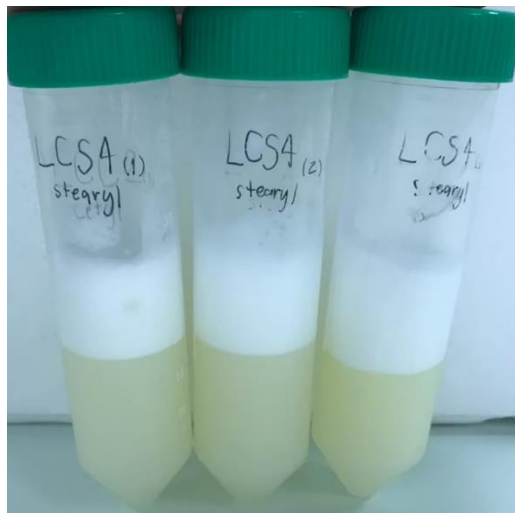
รูปที่ 58 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในที่ 1

จากตารางที่ 35 แสดงข้อมูลสูตรตำรับในวันที่ 1 จากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol และ stearyl alcohol พบว่าสูตร LS1 กับ LC2 มีขนาดอนุภาคที่ต่างกันโดยสูตร LC2 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าสูตร LS1 เนื่องจาก stearyl alcohol มีโครงสร้างโมเลกุลที่ยาวกว่า cetyl alcohol เล็กน้อย เพราะมีการเพิ่มจำนวนคาร์บอนมา 2 คาร์บอน โดยที่ stearyl alcohol มี 18 คาร์บอนอะตอม cetyl alcohol มี 16 คาร์บอนอะตอม และ cetyl alcohol มีการเปลี่ยน polymorphism จาก amorphous form เป็น crystalline form ซึ่งส่งผลทำให้อนุภาคมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบส่งผลให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กและมีความคงตัวมากกว่า⁽³⁹⁾ และสูตรตำรับ LS1 และ LS2 มีขนาดอนุภาคที่ต่างกันโดยสูตร LS2 มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า LS1 เนื่องจากปริมาณ lecithin ที่แตกต่างกันทำให้ลดขนาดของ particles size ลงได้ และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารได้เพราะจะเข้าไปช่วยปกคลุมโมเลกุลสารสกัด ดังนั้นการมี lecithin ในตำรับแล้วเตรียมในแบบของอนุภาคนาโนไขมันจะช่วยเพิ่มการกักเก็บสารสกัดได้ดียิ่งขึ้น ช่วยในการเก็บรักษาและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญออกมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ดี โดยจะส่งผลให้ตำรับในรูปแบบอนุภาคนาโนเพิ่มความสามารถในการละลายได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดธรรมดา อีกทั้งยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น⁽⁴⁰⁾ ส่วนความต่างศักย์ประจุไฟฟ้าหมายถึง ศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคน้ำที่เคลื่อนไปพร้อม ๆ กับอนุภาคคอลลอยด์ ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้านี้จะใช้เป็นพารามิเตอร์บอกถึงระดับเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ได้ โดยระบบคอลลอยด์ที่มีเสถียรภาพสูงจะมีค่าความต่างศักย์ประจุไฟฟ้าสูงด้วย (มีค่าบวกหรือลบ

สูง ๆ) ในขณะที่ระบบคอลลอยด์ที่มีเสถียรภาพต่ำจะมีค่าความต่างศักย์ประจุไฟฟ้าต่ำ (ค่าเข้าใกล้ 0) จึงทำให้อนุภาครวมตัวกันและตกตะกอนลงมาได้ง่าย จากตำรับค่าที่ได้เป็นลบเนื่องจากผลของ lecithin มีโครงสร้าง PO_4^{3-} เป็นส่วนประกอบจึงทำให้อนุภาคเป็นประจุลบ และในส่วนของค่าการกระจายอนุภาคมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงถึงขนาดอนุภาคในตำรับมีขนาดใกล้เคียงกันซึ่งค่าเข้าใกล้ 0 มากเท่าไรหมายความว่าขนาดอนุภาคในตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

ดังนั้นจึงได้เลือกสูตร LW2 มาทำการผสมกับ cremophor เพื่อเปรียบเทียบผลของ cremophor ในการส่งผลต่อตำรับ

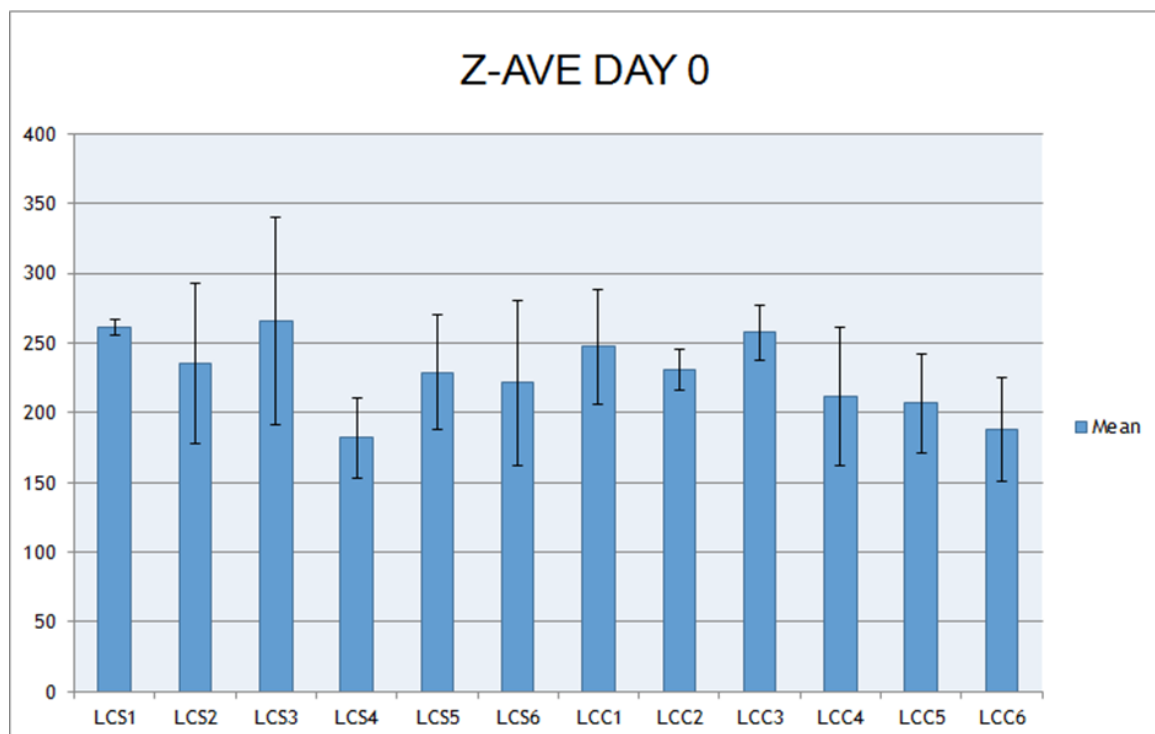
7.2 การศึกษาผลของ cremophor RH40 ต่ออนุภาค



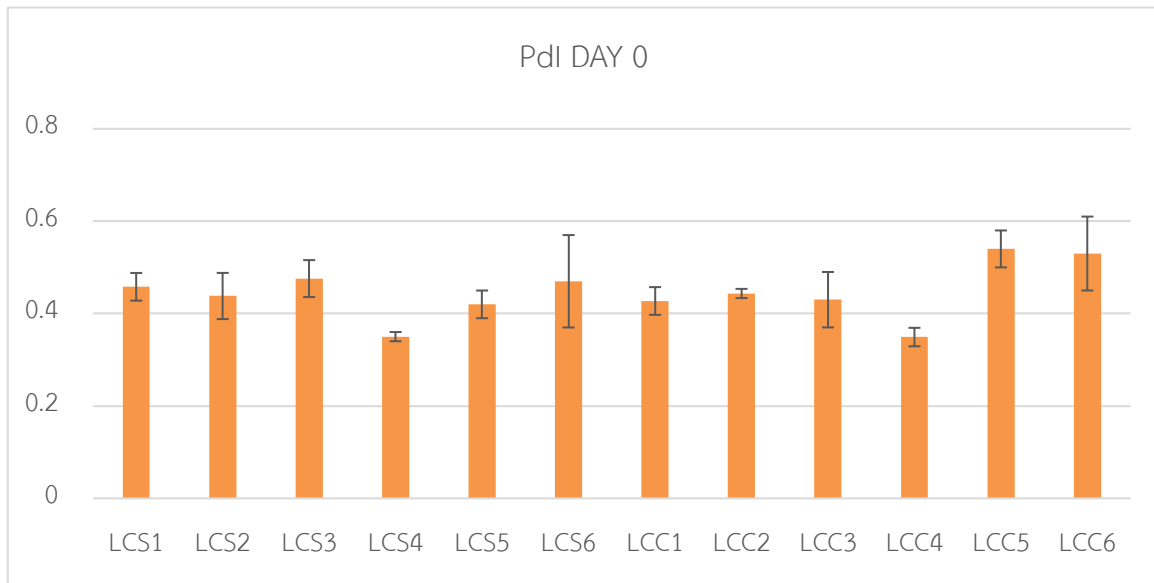
รูปที่ 59 แสดงลักษณะตำรับที่เตรียมได้

ตาราง 36 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม Cremophor ในวันที่ 0

วันที่ 0				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	Pdl	Zeta potential
LCS1	เหลืองขุ่น	260.9 ± 5.32	0.48	-38.40
LCS2	เหลืองขุ่น	235.34 ± 57.13	0.42	-38.34
LCS3	เหลืองขุ่น	256.67 ± 74.09	0.48	-37.32
LCS4	เหลืองขุ่น	181.71 ± 28.84	0.35	-32.88
LCS5	เหลืองขุ่น	228.82 ± 41.39	0.42	-33.00
LCS6	เหลืองขุ่น	221.27 ± 59.32	0.47	-34.07
LCC1	เหลืองขุ่น	247.08 ± 40.80	0.42	-34.41
LCC2	เหลืองขุ่น	228.30 ± 11.98	0.44	-36.41
LCC3	เหลืองขุ่น	257.32 ± 19.44	0.43	-35.17
LCC4	เหลืองขุ่น	211.50 ± 49.48	0.35	-35.16
LCC5	เหลืองขุ่น	206.57 ± 35.31	0.54	-31.90
LCS6	เหลืองขุ่น	188.28 ± 37.26	0.53	-33.92



รูปที่ 60 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0

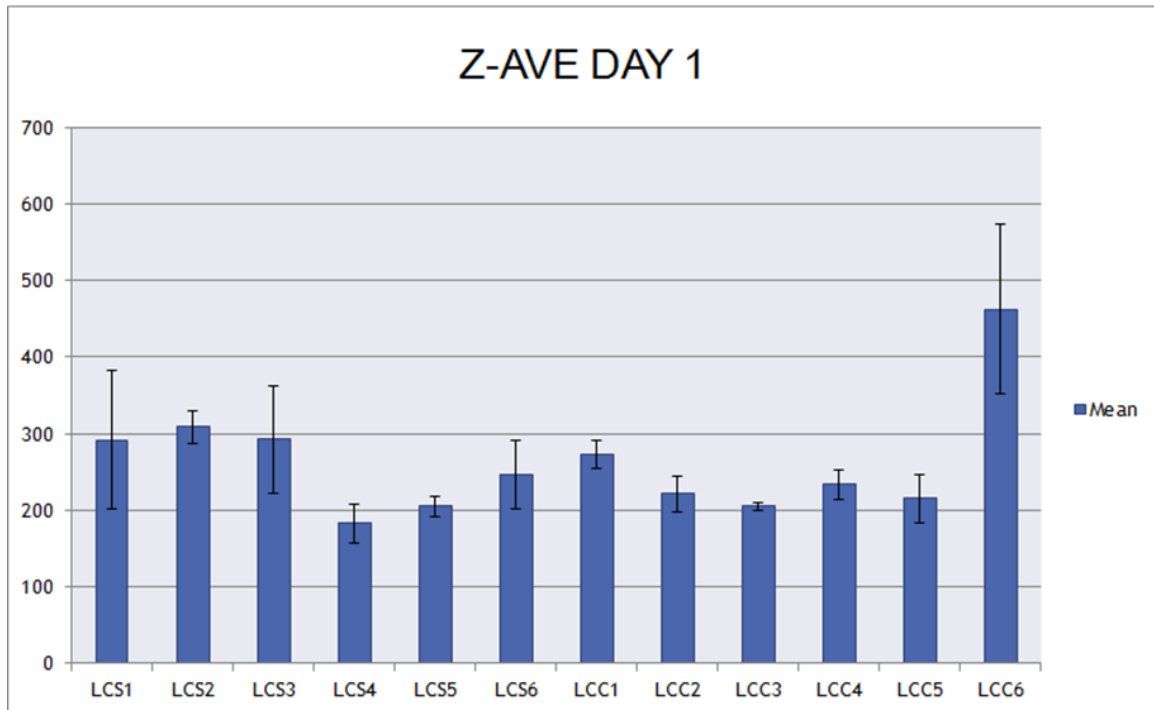


รูปที่ 61 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0

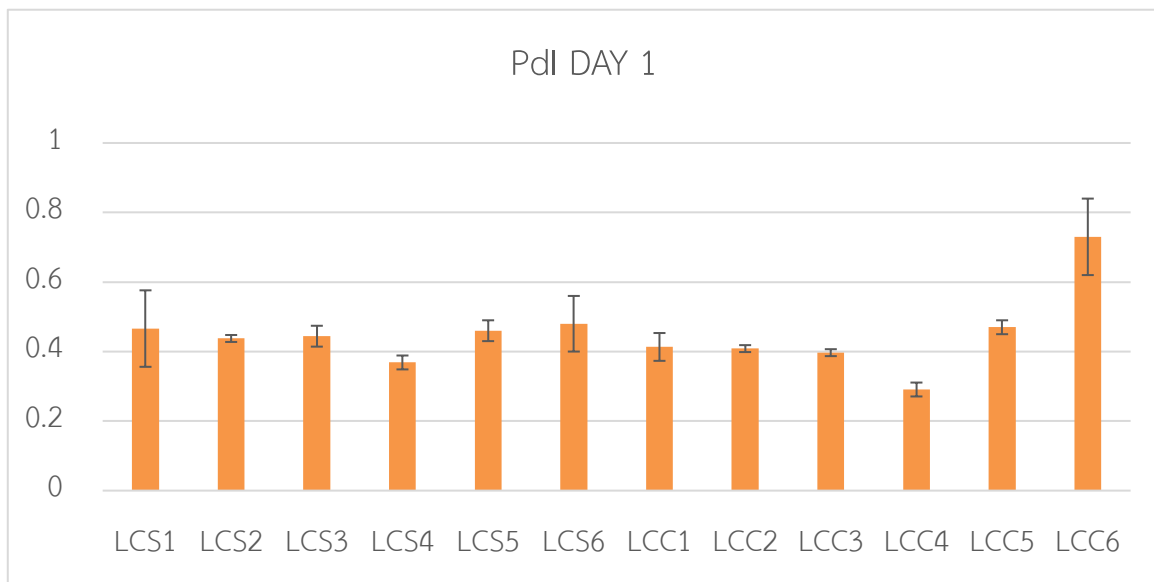
จากตารางที่ 36 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม Cremophor ในวันที่ 0 พบว่าจากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่แตกต่างกันคือ cetyl alcohol , stearyl alcohol และ cremophor ในปริมาณที่ต่างกันพบว่า ขนาดของอนุภาค, ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

ตาราง 37 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม Cremophor ในวันที่ 1

วันที่ 1				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LCS1	เหลืองขุ่น	292.07 ± 90.80	0.47	-38.00
LCS2	เหลืองขุ่น	320.11 ± 27.43	0.43	-37.81
LCS3	เหลืองขุ่น	292.79 ± 70.52	0.44	-38.77
LCS4	เหลืองขุ่น	183.02 ± 25.82	0.36	-29.05
LCS5	เหลืองขุ่น	205.33 ± 12.61	0.46	-32.40
LCS6	เหลืองขุ่น	247.11 ± 44.77	0.47	-34.15
LCC1	เหลืองขุ่น	272.87 ± 18.94	0.41	-36.50
LCC2	เหลืองขุ่น	222.00 ± 23.33	0.40	-38.10
LCC3	เหลืองขุ่น	205.46 ± 5.08	0.40	-37.39
LCC4	เหลืองขุ่น	233.56 ± 19.47	0.29	-27.51
LCC5	เหลืองขุ่น	215.54 ± 31.49	0.48	-33.63
LCC6	เหลืองขุ่น	462.79 ± 110.36	0.73	-34.10



รูปที่ 62 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 1



รูปที่ 63 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 1

จากตารางที่ 37 แสดงข้อมูลสูตรตำรับผสม Cremophor ในวันที่ 1 พบว่าจากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol , stearyl alcohol และ cremophor ในปริมาณที่ต่างกันพบว่า ขนาดของอนุภาค, ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

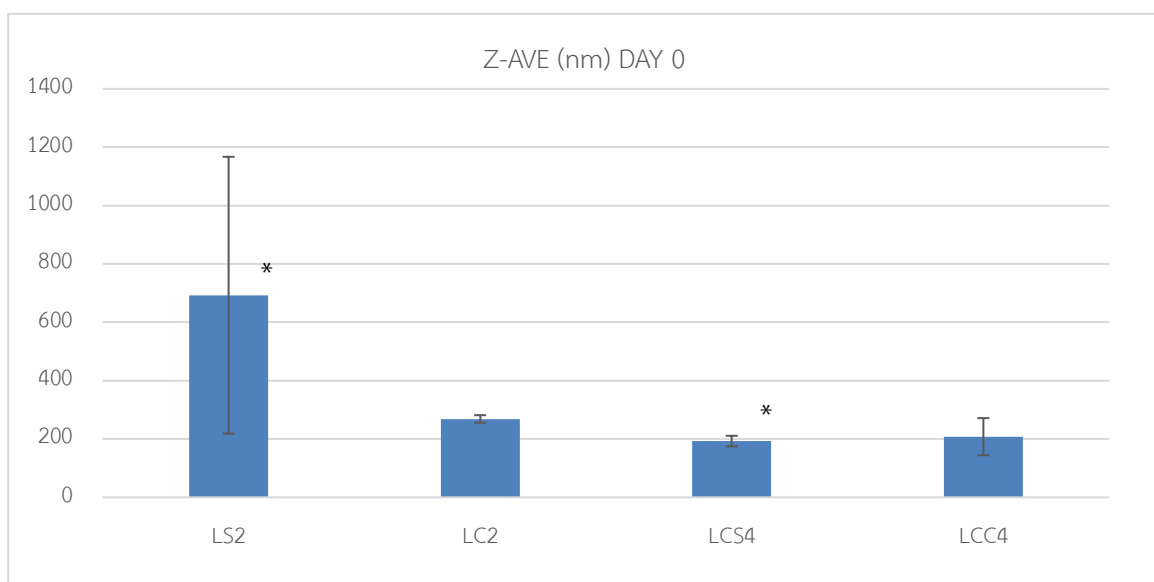
จากการทดลองข้างต้นคือ ตำรับที่มีการใส่กับไมใส่ cremophor ได้ทำการเลือกตำรับที่ดีที่สุดที่ให้ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงที่เราต้องการและมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและความต่างศักย์เพียงเล็กน้อยเมื่อทำการเก็บไว้เป็นเวลา 1 วัน จึงได้มีการเลือกสูตร คือ LW2 และ LCW4

7.3 การทดสอบความคงตัวของตำรับไขมันแข็งที่

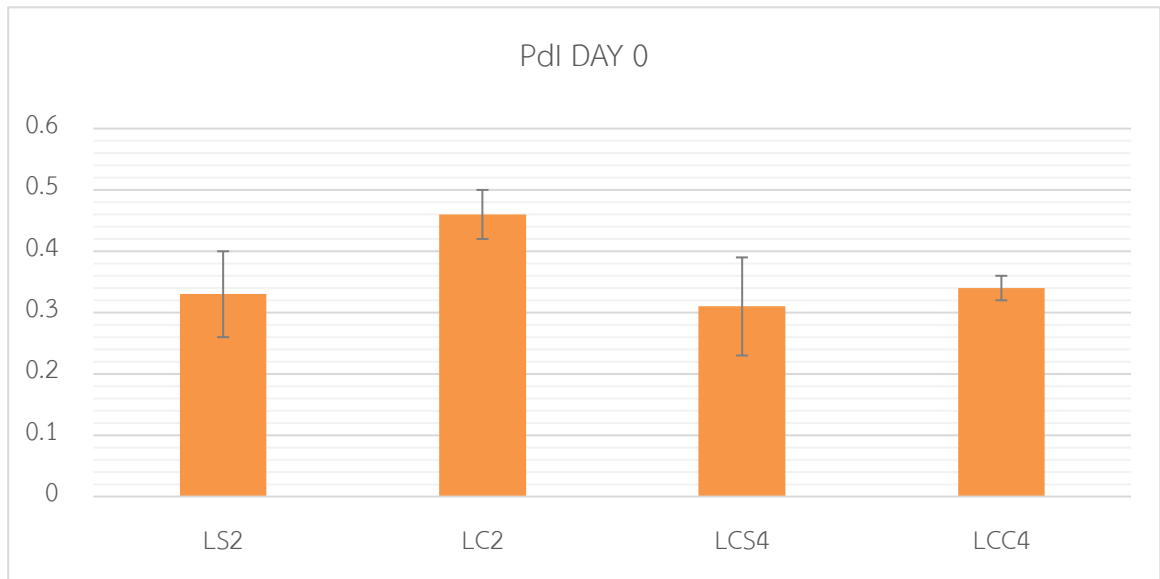
ตาราง 38 การทดสอบความคงตัวของตำรับ (Stability Test) วันที่ 0

วันที่ 0				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LS2*	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	300.74 ± 51.28	0.33	-37.39
LC2	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	241.83 ± 38.75	0.46	-37.71
LCS4*	เหลืองขุ่น	168.03 ± 54.32	0.31	-24.48
LCC4	เหลืองขุ่น	176.78 ± 13.57	0.34	-25.95

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบ LS2 กับ LCS4



รูปที่ 64 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0



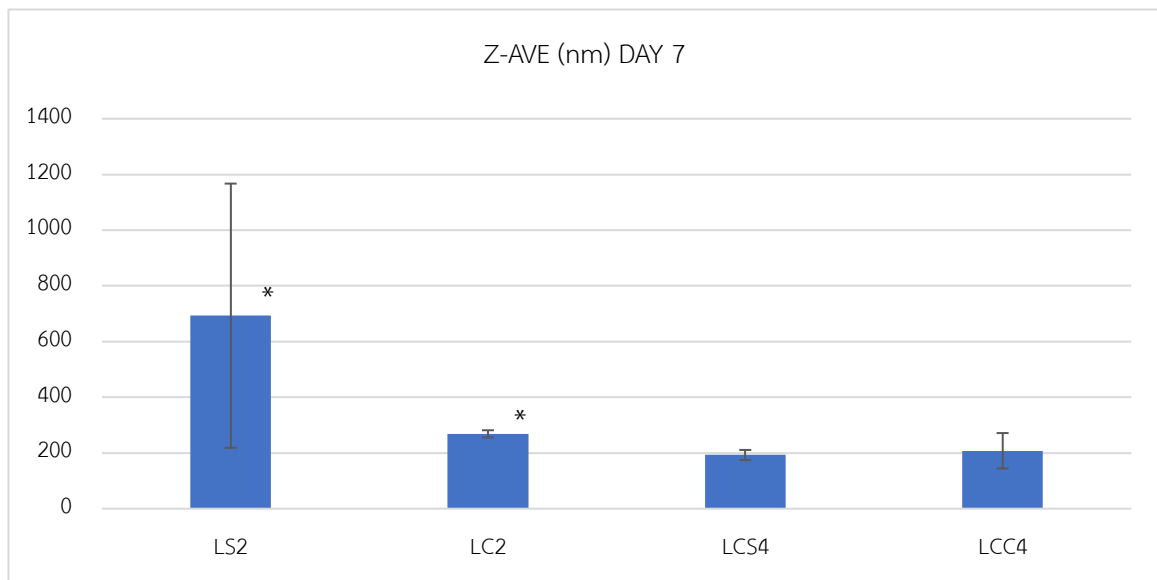
รูปที่ 65 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0

จากตารางที่ 38 การทดสอบ Stability Test วันที่ 0 จากสูตรตำรับ LS2 กับ LCS4 พบว่าขนาดอนุภาคมีความแตกต่างกันโดยสูตร LCS4 มีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า LS2 เนื่องจากตำรับ LCS4 มีการเติม cremophor ลงไป เพราะ cremophor มีค่า HLB ในช่วง 14-16 ซึ่งเข้าได้กับตำรับที่เป็น o/w ดังนั้น cremophor จะทำให้เกิดการสร้างฟิล์มที่มีความเสถียรรอบ ๆ หยดอนุภาคคอลลอยด์ในระหว่างการทำอัลมัลชัน ซึ่งจะช่วยลดการเกิด coalescence ในระหว่างการเตรียมอนุภาค จึงทำให้ขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ⁽⁴¹⁾ ส่วนความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

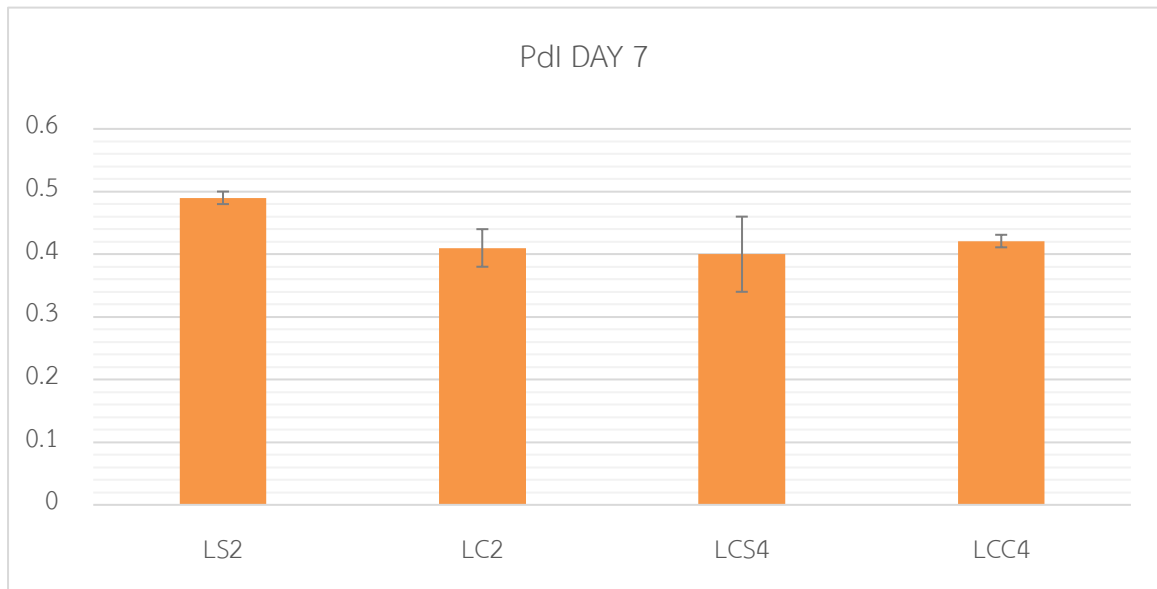
ตาราง 39 การทดสอบความคงตัวของตำรับ (Stability Test) วันที่ 7

วันที่ 7				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LS2*	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	317.78 ± 48.60	0.49	-37.19
LC2*	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	196.09 ± 18.41	0.41	-37.91
LCS4	เหลืองขุ่น	212.16 ± 30.83	0.31	-29.00
LCC4	เหลืองขุ่น	176.78 ± 13.57	0.34	-29.76

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value ≤ 0.05 เมื่อเทียบ LS2 กับ LC2



รูปที่ 66 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 7

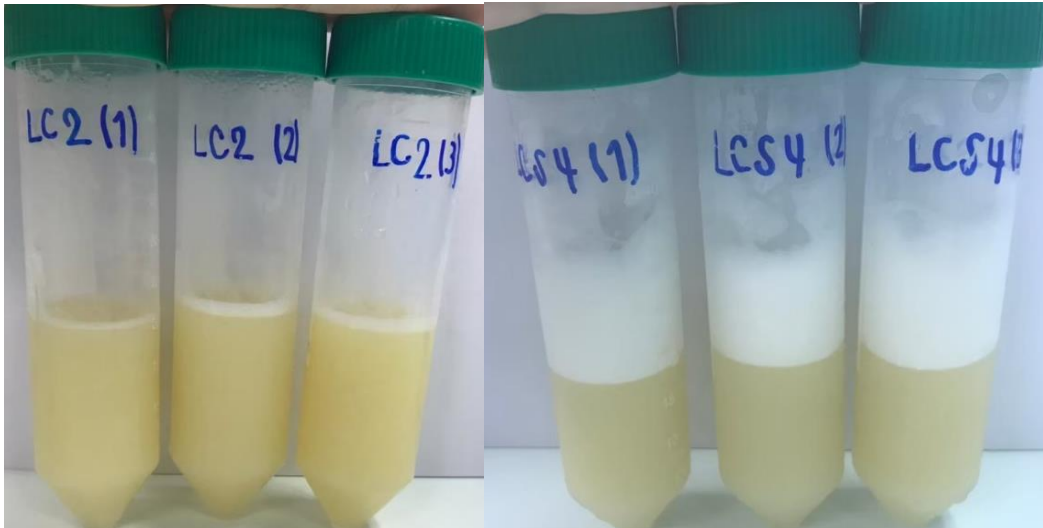


รูปที่ 67 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 7

จากตารางที่ 39 แสดงข้อมูลสูตรตำรับในวันที่ 7 จากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol และ stearyl alcohol พบว่าสูตร LS1 กับ LC2 มีขนาดอนุภาคที่ต่างกันโดยสูตร LC2 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าสูตร LS1 เนื่องจาก ใช้ชนิดของ wax แตกต่างกัน ส่วนความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

จากสูตรตำรับเมื่อดูความคงตัวของตำรับเรียบร้อยแล้วทำการโหลดสารสกัดผักชีลาวลงในสูตรตำรับเพื่อดูขนาดอนุภาค ความต่างศักย์ของตำรับเมื่อมีการบรรจุสารสกัดลงไป

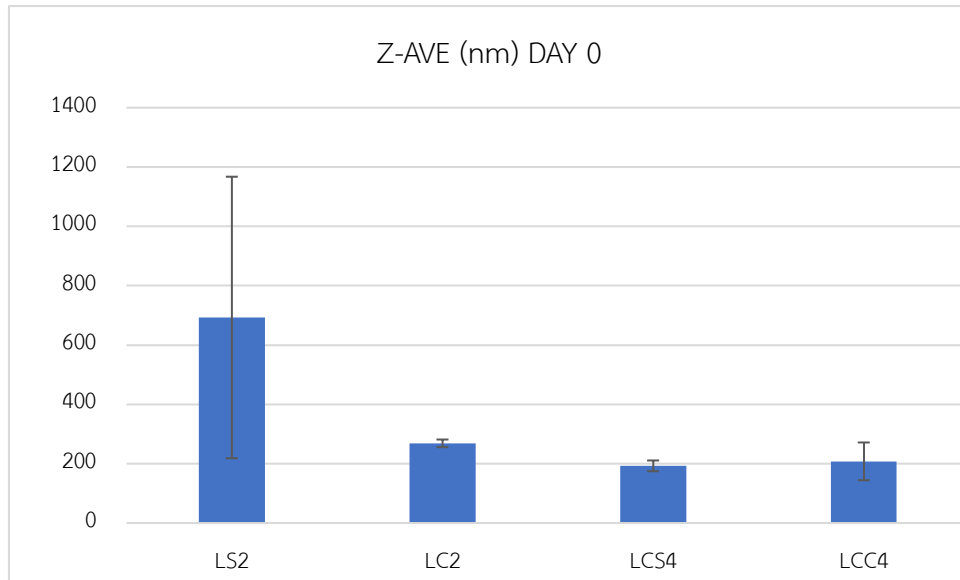
7.4 การบรรจุสารสกัดผักชีลาวลงในอนุภาคไขมันแข็งและประเมินความคงตัว



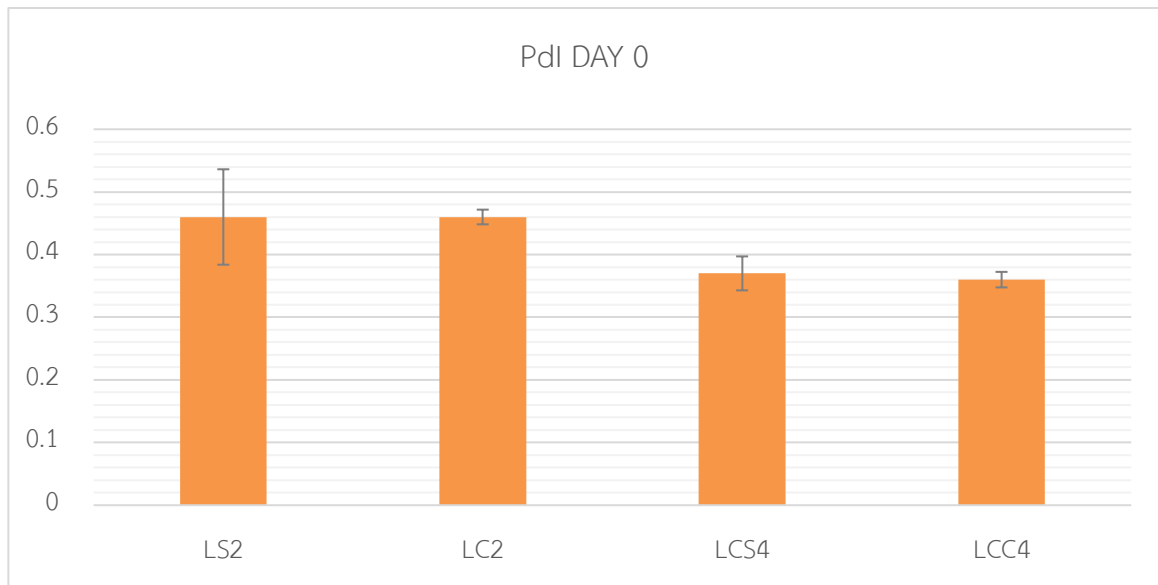
รูปที่ 68 แสดงลักษณะตำรับบรรจุสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 0

ตาราง 40 แสดงข้อมูลตำรับที่โพลีเมอร์สกัดผักชีลาวในวันที่ 0

DAY 0				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LS2	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	292.09 ± 127.16	0.46	-35.94
LC2	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	269.70 ± 67	0.46	-36.90
LCS4	เหลืองขุ่น	182.26 ± 2.76	0.37	-33.02
LCC4	เหลืองขุ่น	167.46 ± 16.71	0.36	-28.57

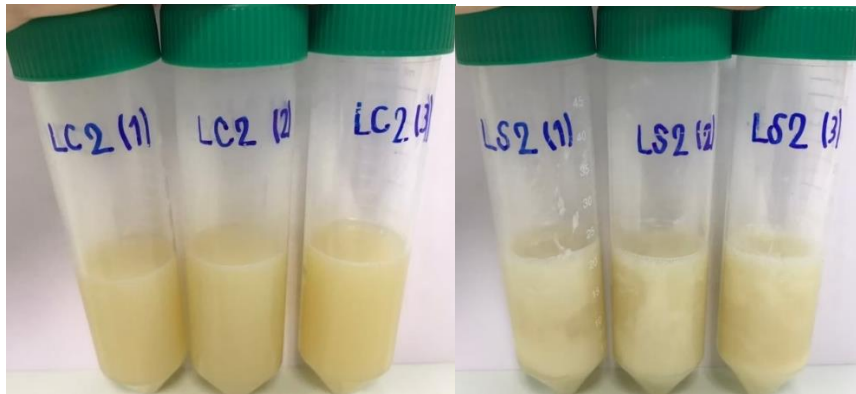


รูปที่ 69 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 0



รูปที่ 70 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 0

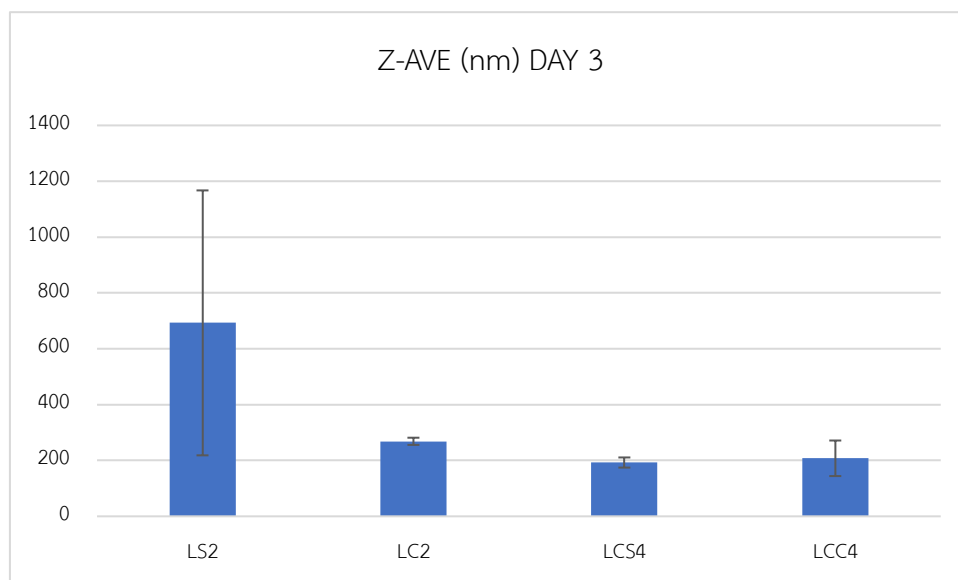
จากตารางที่ 40 แสดงข้อมูลสูตรที่ใส่สารสกัดผักชีลาววันที่ 0 พบว่าจากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol , stearyl alcohol และ cremophor ในปริมาณที่ต่างกันพบว่าขนาดของอนุภาค, ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน



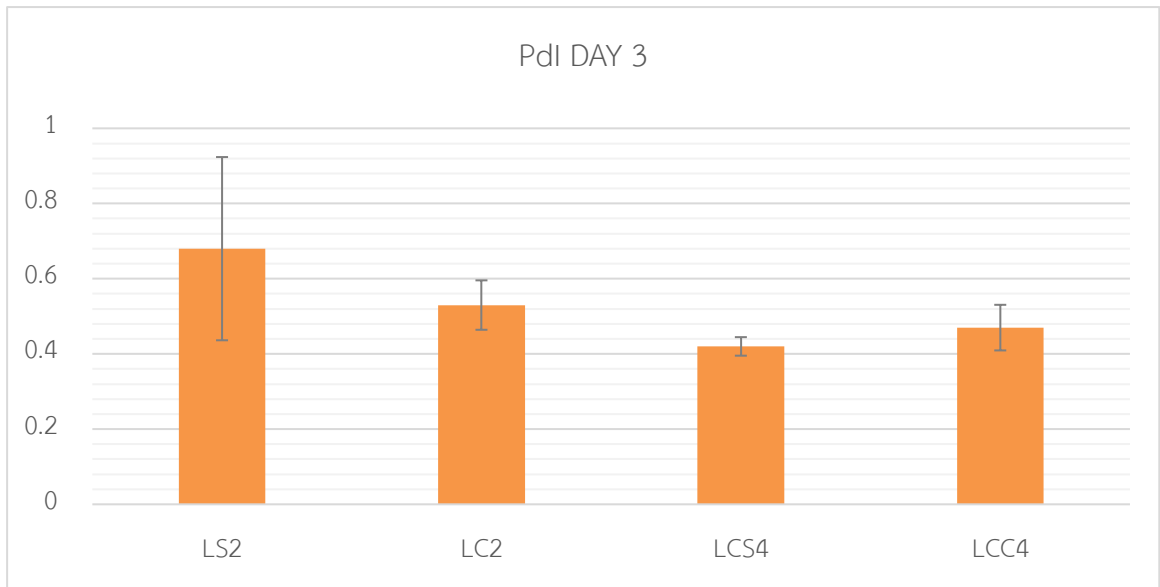
รูปที่ 71 แสดงลักษณะตำรับบรรจุสารสกัดผักชีลาวในวันที่ 3

ตาราง 41 แสดงข้อมูลตำรับที่โพลีเมอร์สารสกัดผักชีลาวในวันที่ 3

วันที่ 3				
สูตร	ลักษณะทางกายภาพ	การวัดอนุภาค		
		Z-AVE (nm)	PdI	Zeta potential
LS2	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	692.86 ± 474.41	0.68	-39.04
LC2	ขาวขุ่น เหลืองเล็กน้อย	268.66 ± 12.89	0.42	-39.40
LCS4	เหลืองขุ่น	192.73 ± 18.14	0.47	-31.20
LCC4	เหลืองขุ่น	207.90 ± 63.67	0.47	-32.50



รูปที่ 72 แผนภูมิแสดงขนาดอนุภาคในวันที่ 3



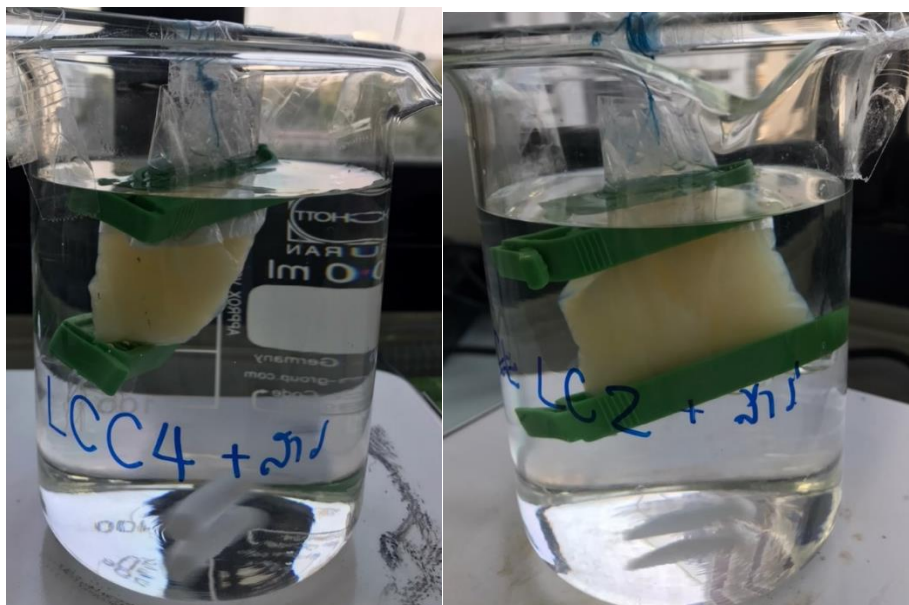
รูปที่ 73 แผนภูมิแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในวันที่ 3

จากตารางที่ 41 แสดงข้อมูลสูตรที่ใส่สารสกัดผักชีลาววันที่ 3 พบว่าจากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่ต่างกันคือ cetyl alcohol , stearyl alcohol และ cremophor ในปริมาณที่ต่างกันพบว่าขนาดของอนุภาค, ความต่างศักย์ประจุไฟฟ้า และค่าการกระจายอนุภาคที่ได้แต่ละสูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกัน

จากผลการทดลองตำรับที่ใส่และไม่ใส่สารสกัดผักชีลาวข้างต้นพบว่า ขนาดอนุภาคที่ได้ทั้งสองตำรับมีขนาดอนุภาค , ความต่างศักย์ไฟฟ้า และการกระจายอนุภาคมีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากสารสกัดผักชีลาวมีองค์ประกอบสารสำคัญ เช่น phenolic และ flavonoid ในองค์ประกอบปริมาณมากซึ่งสารทั้งสองชนิดมีความขี้วสูงจึงทำให้เมื่อทำการบรรจุสารลงตำรับที่เป็น o/w ทำให้เข้าได้กับตำรับจึงทำให้ขนาดอนุภาคมีค่าใกล้เคียงกัน

7.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดผักชีลาวในตำรับ

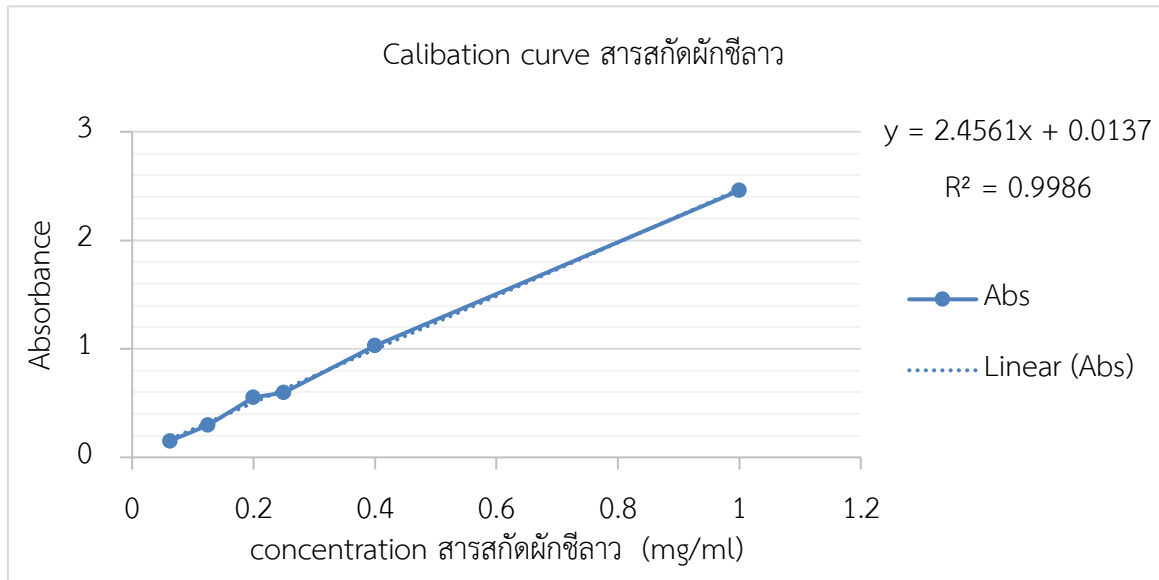
Entrapment efficiency of AGE loaded SLN เป็นการวัดค่า amount of entrapped โดยใช้วิธีไดอะไลซิส (Dialysis) ซึ่งเป็นกระบวนการเคลื่อนที่แลกเปลี่ยนสาร (Solute) ระหว่างสารละลาย 2 ชนิด ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Semi-permeable membrane) โดยอาศัยความแตกต่าง ในความเข้มข้น (Concentration Gradient) ระหว่างสารละลายทั้งสอง



รูปที่ 74 แสดงวิธีทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดผักชีลาวโดยวิธี ไดอะไลซิส (Dialysis)

ตาราง 42 แสดงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาว (standard)

Concentration สารสกัดผักชีลาว (mg/ml)	Abs 340 nm
0.06	0.15
0.13	0.30
0.20	0.55
0.25	0.60
0.40	1.03
1.00	2.50



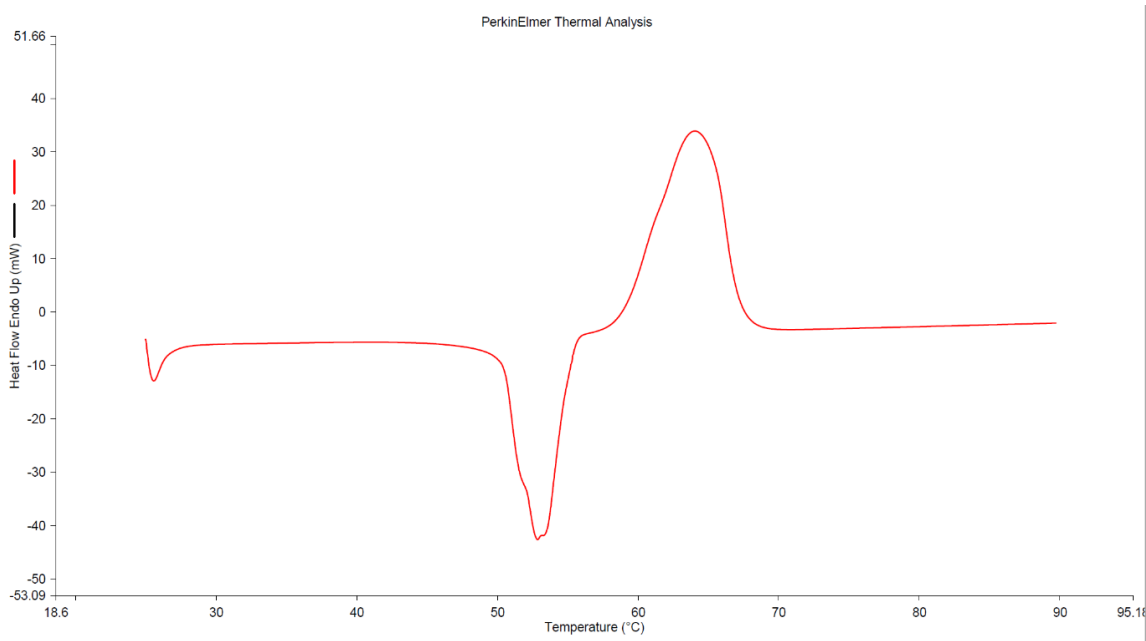
รูปที่ 75 กราฟแสดงการค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่ 340 nm

ตาราง 43 แสดงการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวที่บรรจุในตำรับเมื่อทำการทดสอบการกักเก็บอนุภาค

Sample	Abs 340 nm	%Entrapment
LC2+สารสกัดผักชีลาว	0.14	52.60 %
LCC4+สารสกัดผักชีลาว	0.41	97.20 %

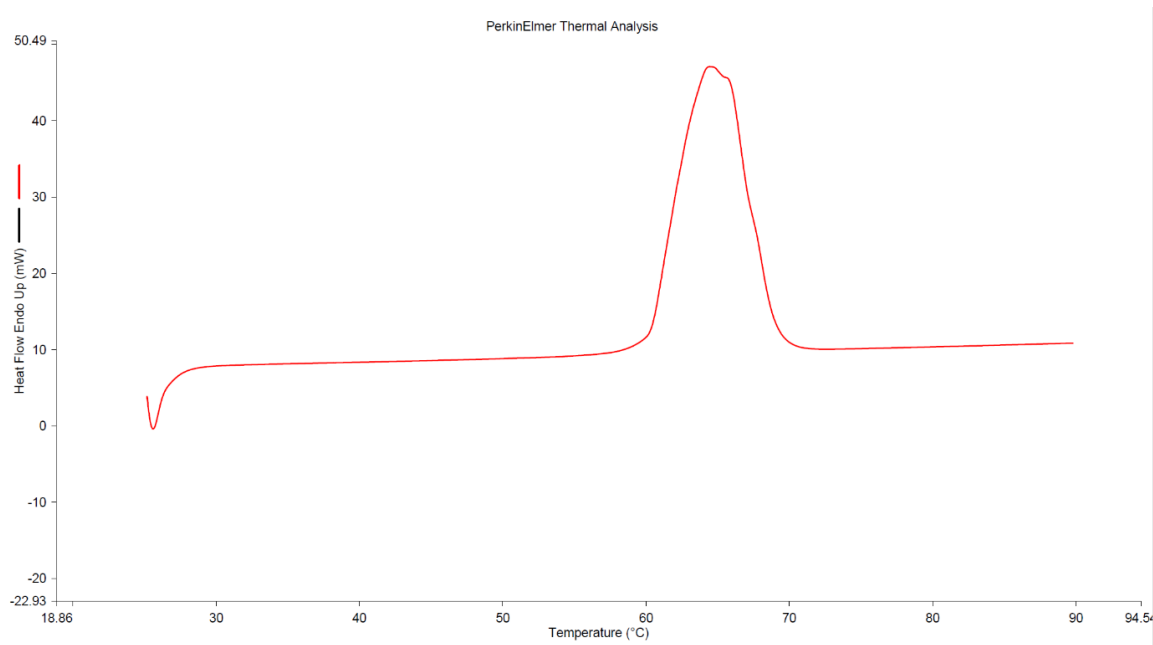
จากรูปที่ 75 นำสมการสารสกัดผักชีลาวมาตรฐานมาทำการคำนวณเพื่อหาค่า % Entrapment ความสามารถในการกักเก็บอนุภาคของตำรับ solid lipid nanoparticle (SLN) จากสมการ $y = 2.4561x + 0.0137$ ที่ $R^2 = 0.9986$ %Entrapment ตำรับ LC2+สารสกัดผักชีลาว ได้เท่ากับ 52.60 % และ ตำรับ LCC4+สารสกัดผักชีลาว เท่ากับ 97.2 % จึงสรุปได้ว่าสูตรตำรับ LCC4 สามารถกักเก็บอนุภาคได้ดีมากกว่า

7.6 การทดสอบ Differential Scanning Calorimetry (DSC)



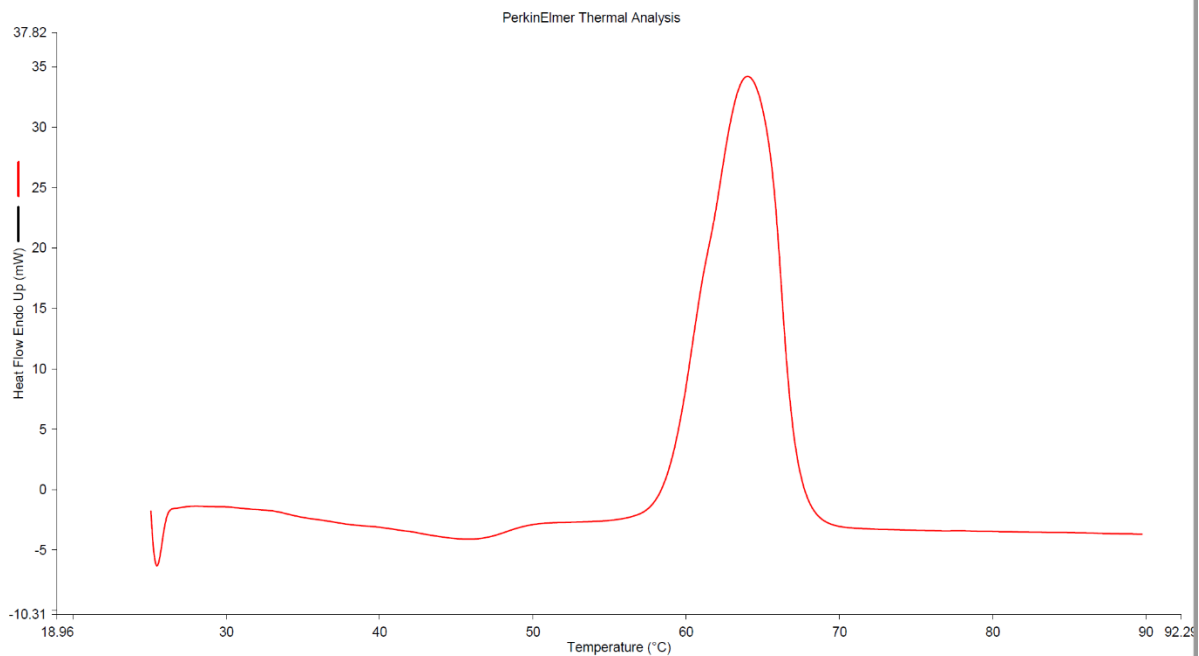
รูปที่ 76 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของ Cetyl alcohol

จากรูปที่ 76 พบว่า cetyl alcohol มีค่า melting point ที่อุณหภูมิ 64.05 °C และค่า recrystalline ที่อุณหภูมิ 52.84 °C หมายความว่า cetyl alcohol มีการเปลี่ยน polymorphism จาก amorphous form เป็น crystalline form ซึ่งส่งผลทำให้อนุภาคมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบส่งผลให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็ก และมีความคงตัวมากกว่า



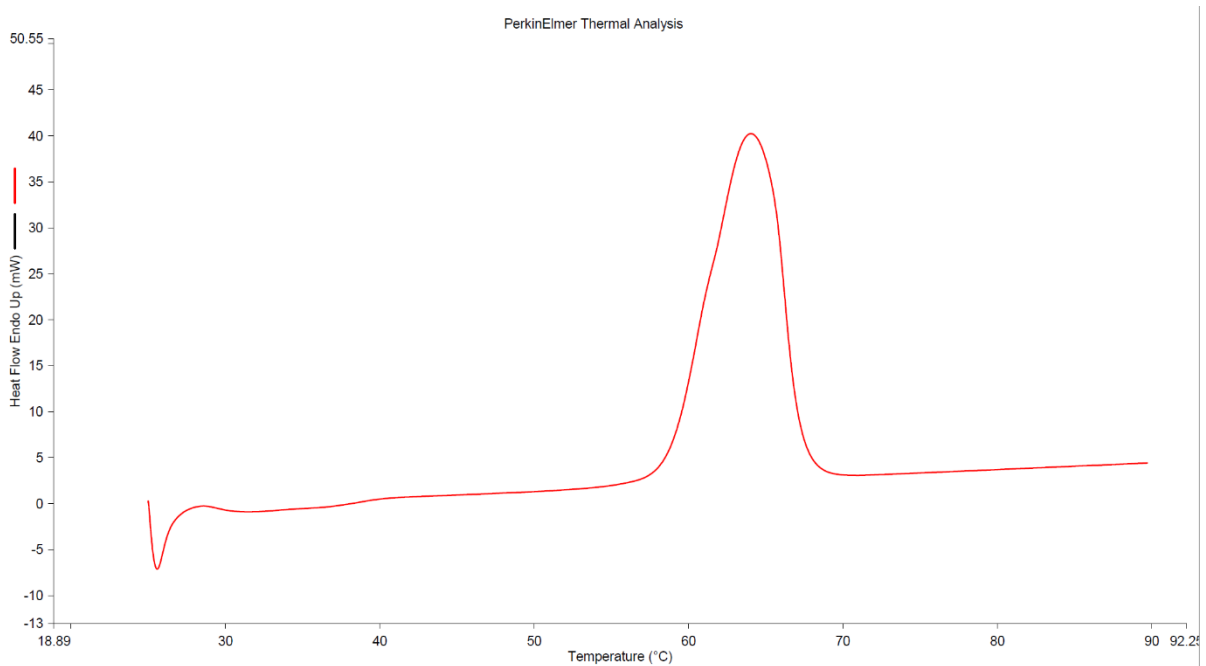
รูปที่ 77 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของ Stearyl alcohol

จากรูปที่ 77 พบว่า stearyl alcohol มีค่า melting point ที่อุณหภูมิ 64.44 °C ซึ่งอยู่ในรูป crystalline form ทำให้ไม่เกิดปรากฏการณ์ recrystalline จึงส่งผลให้มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ อนุภาคจึงมีขนาดใหญ่มากยิ่งขึ้นกว่า



รูปที่ 78 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของตำรับ LC2

จากรูปที่ 78 พบว่าตำรับ LC2 มีค่า melting point ที่อุณหภูมิ 64.02 °C

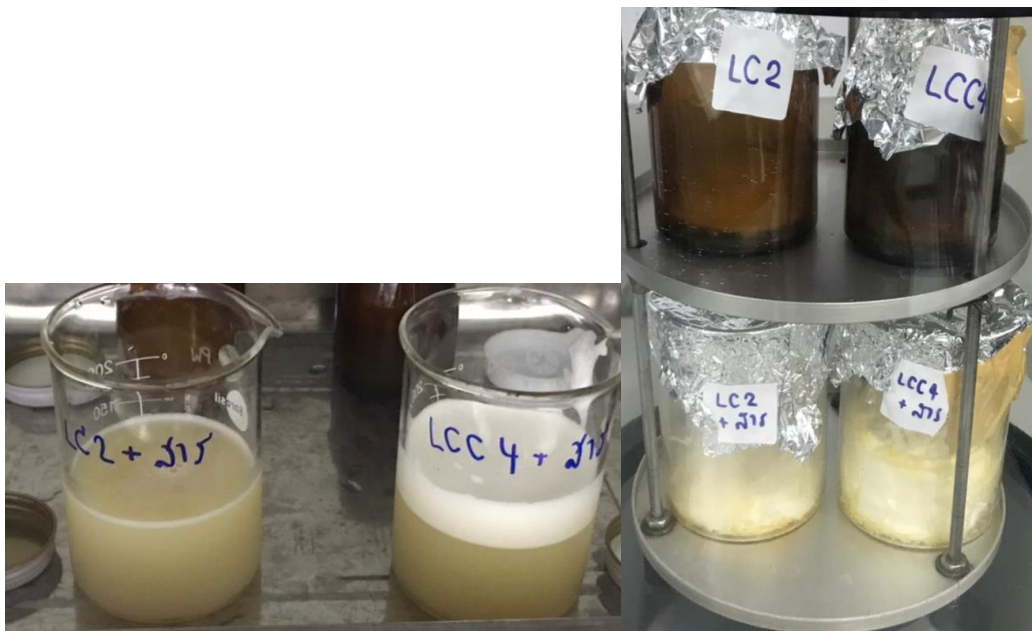


รูปที่ 79 แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของตำรับ LCC4

จากรูปที่ 79 พบว่าตำรับ LCC4 มีค่า melting point ที่อุณหภูมิ 64.04 °C

จากรูปที่ 76-79 แสดงให้เห็นว่าจาก thermogram ของ cetyl alcohol มีคุณสมบัติเป็น amorphous เมื่อให้ความร้อนจึงเห็นการเปลี่ยนแปลง recrystallization ต่างจาก steryl alcohol ที่อยู่ในรูป crystalline form จากผลการศึกษานี้จึงสอดคล้องกับค่า entrapment ที่พบว่า solid lipid nanoparticle (SLN) ที่ทำจาก cetyl alcohol จะมีการกักเก็บตัวยาได้มากกว่า เพราะเกิดการเรียงตัวเป็นรูปผลึกได้ช้ากว่า ทำให้มีพื้นที่พอที่จะให้ยากักเก็บภายในอนุภาค และเมื่อพิจารณา thermogram ของอนุภาค SLN ทั้ง cetyl และ steryl alcohol จะเห็นถึง melting point ที่ชัดเจน แสดงถึงอนุภาคเกิดการจัดเรียงตัวเป็น crystalline form แล้ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของ SLN ที่ต่างจาก NLC โดย NLC จะมี wax อยู่ในรูป amorphous หลงเหลืออยู่มากกว่าเพราะมีส่วนของน้ำมัน (oil) ผสมอยู่

7.7 การประเมินความคงตัวของตำรับที่บรรจุสารสกัดผักชีลาวระยะยาว



รูปที่ 80 แสดงลักษณะตำรับก่อนทำการเก็บดูความคงตัวระยะยาว

ตาราง 44 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักชีลาวและตำรับในวันที่ 0 และ 30 ที่ความยาวคลื่น 340 nm

Sample	Abs วันที่ 0	Abs วันที่ 30	% การดูดกลืนแสง D30 เทียบกับ D0
สารสกัดผักชีลาว	0.52	0.58	110.12%
LC2	0.67	0.54	80.63%
LCC4	0.49	0.59	120.12%

จากตารางที่ 44 แสดงความคงตัวของตำรับที่บรรจุสารสกัดผักชีลาวเมื่อทำการเก็บไว้ในระยะยาวเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสารสกัดผักชีลาวเมื่อเก็บไว้เป็นเวลาผ่านไป 1 เดือน มีค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับเริ่มต้นเท่ากับ 110.12% ซึ่งผลที่ออกมาตามจริงควรที่จะมีค่าเท่าเดิมหรือลดลง ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะสรุปผลการทดลองได้เนื่องจากสารสกัดผักชีลาวอาจมีสารละลายหรือตัวทำละลายระเหยไประหว่างทำการเก็บ ส่วนตำรับ LC2 มีปริมาณตัวยาสัญญเหลือ 80.63% เมื่อเทียบกับวันแรก แสดงว่าตำรับสามารถที่จะช่วยเรื่องความคงตัวของสารสกัดได้ ในส่วนของตำรับ LCC4 มีปริมาณตัวยาสัญญเหลืออยู่ที่ 120.12% ซึ่งมีค่าเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากอาจเกิดจากตำรับมีความไม่คงตัวเกิดขึ้นเป็นผลมาจากการที่ตำรับมีผลึกสารสกัดออกมาจากอนุภาคที่กักเก็บเนื่องจาก cremophor สามารถละลาย wax ทำให้เกิดการแยกชั้นของสารสกัดออกจาก wax เกิดความไม่คงตัวของตำรับ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลวิจัย

จากการศึกษาการเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาวโดยใช้ stearyl alcohol หรือ cetyl alcohol เป็น wax ร่วมกับการใช้ lecithin หรือ cremophor ในการสร้างอนุภาคนานโนเพื่อบรรจุสารสกัดผักชีลาว เมื่อทำการประเมินคุณสมบัติทางด้านพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดผักชีลาว พบว่ามีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น phenolic compound และ flavonoid compound เป็นต้น หลังจากนั้นนำสารสกัดไปหาปริมาณ total phenolic และ total flavonoid ได้ปริมาณเท่ากับ 36.02 GAE/g และ 1.00 QE/g extract ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้การทดสอบ 3 วิธี คือ DPPH test , ABTS test และ FRAP test โดยใช้สารละลาย ascorbic acid และ trolox เป็นสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดค่าเป็น %IC50 ได้ผลดังนี้ วิธี DPPH 174.61 ug/ml วิธี ABTS 219.36 ug/ml และวิธี FRAP รายงานค่าเป็น 53.10 มิลลิโมลต่อกรัม สารสกัด จากนั้นนำสารสกัดผักชีลาวไปทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบซึ่งพบว่าสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ผลในการต้านการอักเสบ (% Inhibition of haemolysis) ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสารสกัดผักชีลาวที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าให้ผลด้านการอักเสบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากมีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักชีลาวแล้วจึงได้ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับอนุภาคนานโน ได้แก่ ขนาด Pdl zeta potential stability test และ %entrapment efficacy ซึ่งจากการทดลองพบว่า ขนาดของอนุภาคมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหากสูตรตำรับมีประเภท wax ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อขนาดอนุภาคโดย cetyl alcohol ให้ขนาดอนุภาค 241.83 ± 38.75 นาโนเมตร ซึ่งเล็กกว่า stearyl alcohol ที่ให้ขนาด 300.74 ± 51.28 นาโนเมตร นอกจากนี้ปริมาณ cremophor ยังส่งผลต่อขนาดของอนุภาค โดยหากมีการเติม cremophor ลงไปในตำรับจะทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กกว่าตำรับที่ไม่เติม ซึ่งจากสูตร LS2 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 300.74 ± 51.28 นาโนเมตร และ LCS4 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 168.03 ± 54.32 นาโนเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P\text{-value} \leq 0.05$ ในส่วนของปริมาณ lecithine ที่เติมเข้าไปในแต่ละสูตรตำรับพบว่าแนวโน้มของขนาดอนุภาคในตำรับเล็กลงแต่เมื่อเติมไปถึงปริมาณหนึ่งพบว่าขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นมาอีกครั้ง หลังจากที่มีการทดลองสูตรตำรับแบบต่าง ๆ แล้วได้มีการเลือกสูตรตำรับมาทำการทดสอบหา stability test โดยได้เลือกสูตรตำรับมา 2 สูตร คือ LW2 และ LCW4 ซึ่งทั้ง 2 ตำรับได้ใช้ wax ทั้งสองชนิดในการเตรียมคือ stearyl alcohol และ cetyl

alcohol จากผลการทดสอบพบว่า ในวันที่ 0 สูตรตำรับ LS2 กับ LCS4 พบว่าขนาดอนุภาคมีความแตกต่างกันโดยสูตร LCS4 มีขนาดอนุภาค 168.03 ± 54.32 นาโนเมตรซึ่งเล็กกว่า LS2 ที่มีขนาด 300.74 ± 51.28 นาโนเมตร และหลังจากทำการเก็บไว้ 7 วัน พบว่า จากสูตรตำรับทั้งหมดซึ่งใช้ wax 2 ชนิดที่แตกต่างกันคือ cetyl alcohol และ stearyl alcohol พบว่าสูตร LS2 กับ LC2 มีขนาดอนุภาคที่แตกต่างกันโดย LC2 มีขนาด 196.09 ± 18.41 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า LS2 ที่มีขนาดอนุภาค 317.78 ± 48.60 นาโนเมตร ในส่วนของค่า Pdl และ zeta potential ไม่ได้มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.41 และ -37.91 ตามลำดับ ในการประเมิน stability test ของตำรับแล้วมีการนำสูตรตำรับ 2 สูตรไปใช้ทดสอบ %entrapment efficacy ซึ่งคือสูตร LC2 และ LCC4 ได้ผลเท่ากับ 52.6 % และ 97.2 % ตามลำดับ ต่อจากนั้นได้มีการเตรียมตำรับที่บรรจุสารสกัดจากผักชีลาวทั้งหมด 2 ตำรับคือ LC2 และ LCC4 เพื่อทำการประเมินความคงตัวของตำรับเป็นระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งวัดเป็นค่า Abs ของสาร ได้ผลดังต่อไปนี้ ในวันที่ 0 ตำรับ LC2 มีค่าเท่ากับ 0.67 และในวันที่ 30 ได้ค่าเท่ากับ 0.54 ซึ่งปริมาณของสารสกัดลดลง 19.52 % จากปริมาณเริ่มต้น ในส่วนของตำรับ LCC4 วันที่ 0 ได้ค่าเท่ากับ 0.49 และในวันที่ 30 ได้ค่าเท่ากับ 0.58 เพิ่มขึ้น 19.91 % ปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นจากตำรับ LCC4 อาจเกิดจากการที่ตำรับไม่สามารถกักเก็บยาได้จึงผลึกยาออกจากตำรับทำให้เกิดความไม่คงตัวของตำรับ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระบบนำส่งในระดับนาโนเมตร (nanoparticle) ที่มีการบรรจุสารสกัดจากผักชีลาว มีลักษณะด้านคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำส่งสารสำคัญรวมถึงมีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสกัดเข้าสู่ผิวหนัง แต่จากการศึกษานี้เพียงคุณสมบัติของ ระบบนำส่งในระดับนาโนเมตร ในด้านทางกายภาพเท่านั้น ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาในด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติทางเคมี หรือสมบัติทางชีววิทยาต่อไป อีกทั้งในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักชีลาว (antioxidant) ศึกษาเพียงแค่กลุ่มสารใหญ่ ๆ เท่านั้น ซึ่งในอนาคตอาจจะมีการศึกษาถึงสาระสำคัญต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมเพื่อให้มีการสกัดสารออกมาใช้ได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้นและนำมาใช้ในการทดสอบกับมนุษย์เพื่อศึกษาผลของสารสำคัญในผักชีลาวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Mohsin MM, Hanif MA, Ayub MA, Bhatti IA, Jilani MI. Chapter 18 - Dill. In: Hanif MA, Nawaz H, Khan MM, Byrne HJ, editors. Medicinal Plants of South Asia: Elsevier; 2020. p. 231-9.
2. ผักชีลาว [Internet]. 2010. Available from:
<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=171>.
3. Saleh-E-In M, Sultana A, Roy M. Chemical Constituents of Essential Oil from *Anethum sowa* L. Herb (Leaf and Stem) Growing in Bangladesh. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 2010;45:173-6.
4. Shyu Y-S, Lin J-T, Chang Y-T, Chiang C-J, Yang D-J. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. Food chemistry. 2009;115(2):515-21.
5. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แอนโทไซยานิน. สำนักหอสมุด และศูนย์สารสนเทศ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553.
6. Lee J, Durst R, Wrolstad R. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 2005;88:1269-78.
7. จิรัมย์ เ, สีหนาม ป. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 2554:59-70.
8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17):7915-22.
9. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cell Mol Life Sci. 2005;62(15):1707-23.
10. นิมนานิตย์ อ. การพัฒนาสารสกัดมะขามป้อมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง. การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรสู่ระดับอุตสาหกรรม ครั้งที่2. 2552.
11. จันทิมา หอมกลบ, สุพนิดา วินิจฉัย, หทัยรัตน์ ริมศิริ, นครเหลืองประเสริฐ, หฤทัยธนาสันต์ ว. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซีเตตจากผลมะขามป้อมจากแหล่งใน

ประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. 2554.

12. กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาพรรณ สาลี, เจริญสุข ๒, ศรีสุข. ๒.

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง.

วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2 (ฉบับพิเศษ). 2553:143-50.

13. มณีฉาย ส, รินทอง ป. Total phenolic and total flavonoid contents, free radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory potential from the methanolic extracts of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. And *Acacia concinna* (Willd.) DC. Flowers. *KKU Sci J.* 2016;44(1):142-52

14. Neeraj Kumar, Chetna Dhiman, Kothiya P. EVALUATION OF ANETHUM GRAVEOLENS EXTRACT ON MEMORY IMPAIRED MICE. *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES.* 2017.

15. Sohm B, Cenizo V, André V, Zahouani H, Paillet-Mattei C, Vogelgesang B. Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo. *Int J Cosmet Sci.* 2011;33(2):157-63.

16. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.

17. อุ่นทวิ, ศรีณยู.

วิทยาศาสตร์ชีวภาพการกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารสกัดจากผลสมอไทยด้วยไนโอโซมเพื่อการประยุกต์ใช้ในเวชสำอาง. *Thai Journal of Science and Technology.* 2018;7.

18. Al-Snafi A. The pharmacological importance of *Anethum graveolens*. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014;6:11-3.

19. Khan MT, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorská M, et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3):383-9.

20. Jinesh V, V J, Badami S, Shyam W. Comparative evaluation of antioxidant properties of edible and non-edible leaves of *Anethum graveolens* Linn. *Indian Journal of Natural Products and Resources.* 2010;1:168-73.

21. Hall JB, Dobrovolskaia MA, Patri AK, McNeil SE. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine (Lond).* 2007;2(6):789-803.

22. Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm.* 2009;366(1-2):170-84.

23. Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(1):83-90.
24. Shahgaldian P, Quattrocchi L, Gualbert J, Coleman AW, Goreloff P. AFM imaging of calixarene based solid lipid nanoparticles in gel matrices. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.* 2003;55(1):107-13.
25. Müller JPRH. Coenzyme Q10-loaded NLCs: preparation, occlusive properties and penetration enhancement. *Pharmaceutical Technology Europe.* 2007;19(7).
26. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54 Suppl 1:S131-55.
27. Wissing SA, Müller RH. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. *Int J Cosmet Sci.* 2001;23(4):233-43.
28. Wissing SA, Müller RH. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Control Release.* 2002;81(3):225-33.
29. Ayoola G, Coker H, Adesegun S, Adepoju-Bello A, Obaweya K, Ezennia E, et al. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research (ISSN: 1596-5996) Vol 7 Num 3.* 2008;7.
30. Garcês A, Amaral MH, Sousa Lobo JM, Silva AC. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *Eur J Pharm Sci.* 2018;112:159-67.
31. Matejić J, Dzamic A, Mihajilov-Krstev T, Randjelovic V, Krivošej Z, Marin P. Total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Tordylium maximum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2013;3:55-9.
32. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology.* 1995;28(1):25-30.

33. Arnao M, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2001;73:239-44.
34. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
35. Sarveswaran R, Jayasuriya WJAB, Suresh Née Malalavidhane T S Suresh T. In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;6:131-41.
36. Estrin, F. N, Akerson, M J. Stability Testing of Cosmetic Products. *Cosmetic Regulation in a Competitive Environment*. 2004.
37. Siriphan P. Antioxidant evaluation and formulation development of Zingiber officinale extract loaded in solid lipid nanoparticles for skin delivery. *จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย* 2008.
38. Wallace S, Li J, Nation R, Boyd B. Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug delivery and translational research*. 2012;2:284-92.
39. Souza I, Saez V, Campos V, Mansur C. Size and Vitamin E Release of Nanostructured Lipid Carriers with Different Liquid Lipids, Surfactants and Preparation Methods. *Macromolecular Symposia*. 2019;383.
40. Schubert MA, Harms M, Müller-Goymann CC. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;27(2):226-36.
41. Zhang JA, Anyarambhatla G, Ma L, Ugwu S, Xuan T, Sardone T, et al. Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;59(1):177-87.

ภาคผนวก

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภาคผนวก (1) แบบฟอร์มรายงานการเงิน

ภาคผนวก (2) เอกสารการตรวจสอบการคัดลอกของจุลินทรีย์โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์

ภาคผนวก (1)
แบบฟอร์มรายงานการเงิน

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรรจุสารสกัดผักชีลาว

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภก.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 25 พฤษภาคม 2563 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2564

ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน ตั้งแต่วันที่ 25 พฤษภาคม 2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม 2563

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าอุปกรณ์สำหรับ ปฏิบัติการ	1,000 บาท	1,500 บาท	-500 บาท
2. ค่าสารเคมีและ วัตถุดิบ	6,000 บาท	8,000 บาท	-2,000 บาท
3. ค่าโปสเตอร์	500 บาท	200 บาท	300 บาท
4. ค่าเอกสาร วิทยานิพนธ์	1,500 บาท	1,500 บาท	0 บาท
รวม	9,000 บาท	11,200 บาท	-2,200 บาท

(.....)

ภก.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

ภาคผนวก (2)

เอกสารการตรวจสอบการคัดลอกของจุลินทรีย์โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์

เอกสารการตรวจสอบการคัดลอกของจุลินิพนธ์โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2022115	Apr 7, 2021 at 15:34 PM	59210167@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	การเตรียมและการประเมินอนุภาคไขมันแข็งที่บรจาสารสกัดผักชีลาว.pdf	Completed	0.11 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	การประยุกต์แบบจำลอง Rutter เพื่อศึกษากระบวนการน้ำพืชยึดในพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินต่างกัน บริเวณลุ่มน้ำแม่สา จังหวัดเชียงใหม่ ,Application of Rutter model on interception process of different landuses at Mae Sa watershed\, Chiang Mai province	จักรกริช ไชยเนตร	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	0.11 %