# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัยที่ 3 เรื่อง

"การพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทย
ในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้รักษาผมหงอก"

(Research and Development of Extracts from Thai Traditional Medicinal Plants in Nanoparticles for White Hair Treatment)

(ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง "การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย")


| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
|---|---|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร. ภญ. อรัญญา มโนสร้อย | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. ศาสตราจารย์ ดร. ภก. จีรเดช มโนสร้อย | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. อาจารย์ผ่องพรรณ เหลี่ยมวานิช | มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง จังหวัดลำปาง |
| 4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |



โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน

**ประจำปีงบประมาณ 2552-2554**

# คำนำ

ในปัจจุบัน ปัญหาผมหงอกก่อนวัยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญหนึ่งที่มีผลต่อบุคลิกภาพของทั้งผู้หญิงและผู้ชาย สาเหตุของผมหงอกก่อนวัย นอกจากปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น ความเครียดและสารเคมีรวมทั้งมลภาวะแล้ว ยังเกิดจากผลทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องของเมลาโนไซต์ในการสร้างเม็ดสีของเซลล์รากผม ในขณะนี้ ยังไม่มีวิธีการรักษาแต่เป็นการแก้ไขที่ปลายเหตุ โดยวิธีการย้อมผมซึ่งการย้อมผมด้วยผลิตภัณฑ์ยาย้อมส่วนใหญ่ที่เป็นสารเคมี โดยเฉพาะยาย้อมผมประเภทถาวร ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากยาย้อมจะไม่ใช่วิธีการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุแล้วยังอาจก่อการแพ้และระคายเคืองรวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็งต่อผู้บริโภคอีกด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศในภูมิภาคอาเซียนซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมุนไพรที่มีงานวิจัยและภูมิปัญญาพื้นบ้านที่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินหรือ melanogenesis และช่วยให้ผมดกดำได้ อย่างไรก็ตาม สารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ ไม่คงตัวและถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากผมได้ยากเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จุดประสงค์ของโครงการวิจัยที่ 3 นี้ (ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง "การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย") จึงเป็นการพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกก่อนวัย ผลจากโครงการวิจัยนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยรวมทั้งช่วยลดการนำเข้าที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติออกสู่เชิงพาณิชย์ได้ ในที่สุดนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ในปีงบประมาณ 2552-2554 เป็นระยะเวลา 3 ปี จนได้ผลงานวิจัยตามวัตถุประสงค์

**คณะผู้วิจัย**

กันยายน 2554

# สารบัญ


| ลำดับที่ | รายการ | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | **คำนำ** | ก |
| 2. | **สารบัญ** | ข |
| 3. | **บทสรุปผู้บริหาร** | ง |
| 4. | **บทคัดย่อภาษาไทยและอังกฤษ** | จ |
| 5. | **เนื้อหางานวิจัย** | 1 |
| 6. | **ภาคผนวก** | 5 |
| | **ภาคผนวก 1 :** การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก | 6 |
| | **ภาคผนวก 2 :** การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก | 17 |
| | **ภาคผนวก 3 :** การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก | 25 |
| | **ภาคผนวก 4 :** การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells ($B_{16}F_{10}$) | 32 |
| | **ภาคผนวก 5 :** การเก็บกักสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบกในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) | 39 |
| | **ภาคผนวก 6 :** การจัดทำ Specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน(นีโอโซม) | 51 |
| | **ภาคผนวก 7 :** การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) | 56 |
| | **ภาคผนวก 8 :** การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) | 61 |
| | **ภาคผนวก 9 :** การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) | 65 |
| | **ภาคผนวก 10 :** การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก | 72 |
| | **ภาคผนวก 11 :** การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก | 75 |
| | **ภาคผนวก 12 :** การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก | 85 |

# สารบัญ (ต่อ)


| ลำดับที่ | รายการ | หน้า |
|---|---|---|
| | **ภาคผนวก 13 :** การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม | 98 |
| | **ภาคผนวก 14 :** การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 | 100 |
| | **ภาคผนวก 15 :** การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | 119 |
| | **ภาคผนวก 16 :** หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์ของโครงการวิจัยโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ | 126 |
| | **ภาคผนวก 17 :** การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 | 131 |
| 6. | **กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์** | 134 |
| 7. | **ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ** | 139 |
| 8. | **รายงานการเงิน** | 143 |

# บทสรุปผู้บริหาร

ในปัจจุบัน ปัญหาผมหงอกก่อนวัยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญหนึ่งที่มีผลต่อบุคลิกภาพของทั้งผู้หญิงและผู้ชาย สาเหตุของผมหงอกก่อนวัย นอกจากปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น ความเครียดและสารเคมีรวมทั้งมลภาวะแล้ว ยังเกิดจากผลทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องของเมลาโนไซต์ในการสร้างเม็ดสีของเซลล์รากผม ในขณะนี้ ยังไม่มีวิธีการรักษาแต่เป็นการแก้ไขที่ปลายเหตุ โดยวิธีการย้อมผมซึ่งการย้อมผมด้วยผลิตภัณฑ์ยาย้อมส่วนใหญ่ที่เป็นสารเคมี โดยเฉพาะยาย้อมผมประเภทถาวรที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากยาย้อมจะไม่ใช่วิธีการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุแล้วยังอาจก่อการแพ้และระคายเคืองรวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็งต่อผู้บริโภคอีกด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศในภูมิภาคอาเซียนซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมุนไพรที่มีงานวิจัยและภูมิปัญญาพื้นบ้านที่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินหรือ melanogenesis และช่วยให้ผมดกดำได้ อย่างไรก็ตาม สารสำคัญจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้ ไม่คงตัวและยังถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากผมได้ยากเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จุดประสงค์ของโครงการวิจัยที่ 3 นี้ (ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง "การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวซสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย") จึงเป็นการพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกก่อนวัย โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษา Specification ของสารสกัดต่างๆ ด้วยน้ำ เมธานอล เอทธิลอซิเตตและ เฮกเซนของสมุนไพรพื้นบ้านที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ กวาวเครือขาว หม่อน ย่านาง บัวบกและอัญชัน จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวมีความเป็นกรดและสารสกัดที่มีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizer และ reducer คือ สารสกัดกวาวเครือด้วยน้ำ เมธานอลและเฮกเซน สารสกัดหม่อนด้วยเมธานอลและเฮกเซนและสารสกัดย่านางด้วยเมธานอล สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับ glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารสกัดน้ำและเอทธิลอซิเตตของย่านางและสารสกัดเฮกเซนของอัญชันมีฤทธิ์สูง ส่วนสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเอนไซมโทโรซิเนสได้แก่ สารสกัดน้ำของอัญชัน ย่านางและบัวบก สารสกัดเมธานอลของบัวบก สารสกัดเอทธิลอซิเตตของบัวบกและกวาวเครือและสารสกัดเฮกเซนของย่านาง ในการทดสอบกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนใน $B_{16}F_{10}$ สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัดเอทธิลอซิเตตของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง เมื่อนำสารสกัดหยาบเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิห้องและ 4 °C เป็นเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวที่ 45 °C จากการจัดทำ specification ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดเหล่านี้พบว่าสารแขวนตะกอนนีโอโซมมี pH เป็นกรดและ

ทุกสูตรมีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizing และ reducing agent สารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงกว่าสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแต่ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีและวิตามินอี ทั้งสารสกัดที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมมีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสต่ำ เมื่อเก็บกักสารสกัดในนีโอโซมไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน อาจเนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดไม่ถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซม ได้นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวข้างต้นมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกส่วนการละลายด้วยน้ำ เฮกเซนและเมธานอล ได้สารสกัดหยาบละ 3 fractions รวมเป็นทั้งสิ้น 15 fractions โดย fraction 1, 3 และ 3 ของสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วยเอทธิลอซิเตตและสารสกัดหยาบหม่อนด้วยเอทธิลอซิเตตได้ % yield สูงสุดเท่ากับ 77.55, 26.8 และ 26.76% ของสารสกัดหยาบตามลำดับ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระรองลงมาคือ ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation แต่มีจำนวน fraction ที่มีฤทธิ์จับโลหะน้อยที่สุด Fractions จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวและย่านางด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินประมาณ 113 และ104% ตามลำดับโดย fraction จากกวาวเครือมีฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด (171%) ทั้งนี้ fractions ทั้งหมดมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบได้คัดเลือก fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือมาเก็บกักในนีโอโซม พบว่าสามารถเก็บกักได้สูงสุด 2% ได้สารแขวนตะกอนขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน เมื่อเก็บกัก fraction จากกวาวเครือในนีโอโซมพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (27, 4, 45 °C) เป็นเวลา 3 เดือน มากกว่า fraction ที่ละลายใน propylene glycol นอกจากนี้ fraction ที่เก็บกักในนีโอโซมยังมีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่ประมาณ 2 เท่ามากกว่า fraction ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน ในการทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม พบว่า นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่ง linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ โดยมีค่าฟลักซ์และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขนมากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่าตามลำดับ ในการประเมินราคาต้นทุน ราคาคาดคะเนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือมีค่าประมาณ 60,000 บาทต่อกิโลกรัม และสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ 2% มีราคาประมาณ 2,400 บาทต่อกิโลกรัม ผลจากโครงการวิจัยนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนเพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย รวมทั้งช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาย้อมผมจากต่างประเทศที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

# บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่ 3 ที่อยู่ในชุดโครงการวิจัยเรื่อง "การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยโดยเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย" ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อรักษาอาการผมหงอกก่อนวัย โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษา Specification ของสารสกัดต่างๆ ด้วยน้ำ เมธานอล เอทธิลอซิเตตและเฮกเซนของสมุนไพรพื้นบ้านที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ กวาวเครือขาว หม่อน ย่านาง บัวบกและอัญชัน จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวมีความเป็นกรดและสารสกัดที่มีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizer และ reducer คือ สารสกัดกวาวเครือด้วยน้ำ เมธานอลและเฮกเซน สารสกัดหม่อนด้วยเมธานอลและเฮกเซนและสารสกัดย่านางด้วยเมธานอล สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับ glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone ในการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารสกัดน้ำและเอทธิลอซิเตตของย่านางและสารสกัดเฮกเซนของอัญชันมีฤทธิ์สูง ส่วนสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเอนไซมโทโรซิเนสได้แก่ สารสกัดน้ำของอัญชัน ย่านางและบัวบก สารสกัดเมธานอลของบัวบก สารสกัดเอทธิลอซิเตตของบัวบกและกวาวเครือและสารสกัดเฮกเซนของย่านาง ในการทดสอบกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนใน $B_{16}F_{10}$ สารสกัดที่มีแนวโน้นกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัดเอทธิลอซิเตตของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง เมื่อนำสารสกัดหยาบเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิห้องและ 4 °C เป็นเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวที่ 45 °C จากการจัดทำ specification ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดเหล่านี้พบว่าสารแขวนตะกอนนีโอโซมมี pH เป็นกรดและทุกสูตรมีความคงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizing และ reducing agent สารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงกว่าสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแต่ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีและวิตามินอี ทั้งสารสกัดที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมมีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสต่ำ เมื่อเก็บกักสารสกัดในนีโอโซมไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน อาจเนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดไม่ถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซม ได้นำสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวข้างต้นมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกส่วนการละลายด้วยน้ำ เฮกเซนและเมธานอล ได้สารสกัดหยาบละ 3 fractions รวมเป็นทั้งสิ้น 15 fractions โดย fraction 1, 3 และ 3 ของสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วยเอทธิลอซิเตตและสารสกัดหยาบหม่อนด้วยเอทธิลอซิเตตได้ % yield สูงสุดเท่ากับ 77.55, 26.8 และ 26.76% ของสารสกัดหยาบตามลำดับ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ รองลงมาคือฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation แต่มีจำนวน fraction ที่มีฤทธิ์จับโลหะน้อยที่สุด Fractions จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวและย่านาง

ด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินประมาณ113 และ104% ตามลำดับโดย fraction จากกวาวเครือมีฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด (171%) ทั้งนี้ fractions ทั้งหมดมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบได้คัดเลือก fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือมาเก็บกักในนีโอโซม พบว่าสามารถเก็บกักได้สูงสุด 2% ได้สารแขวนตะกอนขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน เมื่อเก็บกัก fraction จากกวาวเครือใน นีโอโซม พบว่ามีความคงตัวทางกายภาพเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (27, 4, 45 °C) เป็นเวลา 3 เดือน มากกว่า fraction ที่ละลายใน propylene glycol นอกจากนี้ fraction ที่เก็บกักในนีโอโซมยังมีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่ประมาณ 2 เท่ามากกว่า fraction ที่ไม่ได้เก็บกักในนีโอโซมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน ในการทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม พบว่า นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่ง linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ โดยมีค่าฟลักซ์และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขนมากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่าตามลำดับ ในการประเมินราคาต้นทุน ราคาคาดคะเนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือมีค่าประมาณ 60,000 บาทต่อกิโลกรัม และสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ 2% มีราคาประมาณ 2,400 บาทต่อกิโลกรัม ผลจากโครงการวิจัยนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรพื้นบ้านไทย โดยใช้เทคโนโลยีนาโนเพื่อใช้รักษาอาการผมหงอกแล้ว ยังจะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผมดำจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยรวมทั้งช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาย้อมผมจากต่างประเทศที่จะช่วยเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

# บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project is the third research project of the project set of "Research and Development of Cosmeticeuticals Containing the Extracts from Thai Traditional Medicinal Plants Entrapped in Nanoparticles for White Hair Treatment". This project has performed the specifications of the selected 20 extracts of the selected Thai traditional medicinal plants (Kwao Krua, Pennywort, Butterfly Pea, Mulberry and Yanang) that was extracted by methanol, ethyl acetate and hexane. All extracts had acidity property. The extracts which were stable in weak acid, weak base, strong acid, strong base, oxidizing and reducing agents were the Kwao Krua extracts with water, methanol and hexane, the Mulberry extracts with methanol and hexane and the Yanang extracts with methanol. Most extracts gave positive results with glycoside, flavonoid, carotenoid, tannin and xanthone. For antioxidative activities, aqueous and ethyl acetate extracts of Yanang and the hexane extract of Butterfly Pea indicated high activity. The extracts which exhibited no tyrosinase inhibition activity were the aqueous extract of Butterfly Pea, Yanang and Pennywort, the ethyl acetate extract of Pennywort and Kwao Krua, and the hexane extract of Yanang. The extracts which had the tendency to stimulate the melanin and protein production in $B_{16}F_{10}$ were the ethyl acetate extracts of Kwao Krua, Mulberry, Yanang and Pennywort and the aqueous extract of Yanang. When these extracts were entrapped in niosomes, the niosomes were physically stable at room temperature and 4°C for 3 months, but not stable at 45°C. For the specification of the niosomes entrapped with these extracts, they were suspension with the acidic pH. All formulations were stable in weak acid, weak base, strong acid, strong base, oxidizing and reducing agent. All crude extracts not entrapped in niosomes indicated higher antioxidant activity than the extracts entrapped in niosomes, but lesser activity than vitamin C and vitamin E. Both extracts entrapped and not entrapped in niosomes gave low tyrosinase inhibition activity. When entrapped in niosomes, the extracts did not stimulate the melanin production. This may be due to the unability to be released from the niosomes of the bioactive compounds in the extracts. Fiffteen semi-purified fractions were prepared from the 5 crude extracts by solvent partition method with water, hexane and methanol. Fractions nos. 1, 3 and 3 of the crude extracts of Pennywort by water, Kwao Krua by ethyl acetate and Mulberry by ethyl acetate showed the highest percentage yields of 77.55, 26.8 and 26.76% of the crude extract, respectively. Most semi-purified

extracts gave free radical scavenging activity, followed by lipid inhibition activity and the least number of the fractions exhibited chelating activity. Fractions from the crude extracts of Kwao Krua and Yanang by hexane indicated melanin production activity of about 113 and 104%, respectively. The fraction from Kwao Krua gave the highest tyrosinase activity (171%). All fractions showed higher activity than their corresponding crude extracts. The fraction 2 from the Kwao Krua crude extract was selected to entrap in niosomes. The maximum loading of this fraction in niosomes was 2%. The opaque white dispersion with no layer separation was obtained. Niosomes entrapped with this fraction showed chemical stability at 4, 27 and 45°C for 3 months higher than the fraction dissolved in propylene glycol. Also, the fraction entrapped in niosomes gave higher linoleic acid contents of 2 times more than the fraction not entrapped in niosomes when kept for 3 months at various temperatures. For transfollicular absorption study, when the fraction entrapped in niosomes, the transfollicular absorption was enhanced. The fluxes and cumulative amount per one follicle of the fraction entrapped in niosomes were more than the fraction in solution of 1.86 and 2.18 times, respectively. For cost estimation, the estimated cost of the semi-purified fraction of Kwao Krua (fraction2) was about 60,000 Baht per kilogram, while the niosomal dispersion entrapped with 2% of fraction 2 was about 2,400 Baht per kilogram. The results from this project can not only increase the value of the Thai traditional medicinal plants by nanotechnology for white hair treatment, but also the effective and safe cosmeceutical from natural products for hair darkening and the decrease of the imported hair darkening products from abroad to assist the Thai economics will be obtained, as well.

# เนื้อหางานวิจัย

**ผลงานวิจัยโดยสรุปมีดังต่อไปนี้** :

1. <u>การจัดทำ specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบก</u> ได้รับสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ methanol, ethyl acetate และ hexane จำนวน 20 ตัวอย่างจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และได้ทำการศึกษาสมบัติทางเคมี กายภาพและ phytochemistry ของสารสกัดเหล่านี้ ดังรายละเอียดใน<u>**ภาคผนวก 1 และ 2**</u>
2. <u>การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบก</u> ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกด้วยวิธี DPPH และ tyrosinase inhibition activity ซึ่งแต่ละสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีการที่ต่างกันให้ผลแตกต่างกัน ทั้งนี้ สารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme tyrosinase น่าจะเป็นสารสกัดที่จะนำมาพัฒนาสำหรับการรักษาอาการผมหงอกได้ ซึ่งได้แก่ สารสกัดน้ำจากอัญชัน ย่านางและบัวบก สารสกัดเมธานอลจากบัวบกและสารสกัดเอธิลอะซีเตทจากบัวบกและกวาวเครือและสารสกัดเฮกเซนจากย่านาง ดังรายละเอียดใน<u>**ภาคผนวก 3**</u>
3. <u>การทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการสร้างเม็ดสี melanin ใน melanoma cell ($B_{16}F_{10}$) ของสารสกัดกาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ methanol, ethyl acetate และ hexane จำนวน 20 ตัวอย่าง</u> พบว่าสารสกัดที่มีแนวโน้มในการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้แก่ สารสกัด ethyl acetate ของกวาวเครือ หม่อน ย่านางและบัวบกและสารสกัดน้ำของย่านาง ดังรายละเอียดใน<u>**ภาคผนวก 4**</u>
4. <u>การเก็บกักสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)</u> ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate , สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate , สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate และสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดี จึงคัดเลือกสารสกัดทั้ง 5 ชนิดมาเก็บกักในนีโอโซมที่ประกอบด้วย Tween 61 และ cholesterol ในอัตราส่วนโมลาร์ 1 ต่อ 1 และทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดดังกล่าวเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า maximum loading ของสารสกัดในนีโอโซมมีค่าเท่ากับ 0.5, 0.25, 0.125, 0.25 และ 0.25% ตามลำดับ และอนุภาคนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดดังกล่าวมีความคงตัวดี ไม่ตกตะกอน มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 150-300 nm มีค่า zeta potential เป็นลบในช่วง -20 ถึง -50 mV และมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5-5.5 ซึ่งทุกตำรับมีความคงตัวดีในอุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลา 3 เดือนแรกที่ดำเนินการศึกษา ส่วนในช่วงเดือนที่ 4-6 พบว่าตำรับนีโอโซมไม่มีความคงตัว (**ภาคผนวก 5 และภาคผนวก 6**)

5. <u>การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม</u> ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินด้วย DPPH assay พบว่า สารสกัดด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกและสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า $SC_{50}$ เท่ากับ 4.24, 5.34, 5.95, 5.97และ 4.73 mg/ml ตามลำดับ ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบก และสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัด โดยมีค่า $SC_{50}$ ของนีโอโซมมีค่า เท่ากับ 99.73, 138.23, 128.74, 112.64 และ 108.21 mg/ml ตามลำดับ (**ภาคผนวก** 7)
6. <u>การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม</u> ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 485.483 mg/ml ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 700.20 mg/ml (**ภาคผนวก** 8)
7. <u>การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่เก็บกักและ ไม่เก็บกักในนีโอโซมในเซลล์มะเร็งหนู B16F10</u> ในการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ไม่เก็บกักในนีโอโซมสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนได้ แต่นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากเซลล์มะเร็งหนู B16F10 อาจไม่สามารถย่อยนีโอโซมแตกออก จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถนำสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมเข้าเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมยังอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ ซึ่งถ้าหากนำนีโอโซมไปทำการศึกษาใน *in vivo* ซึ่งมีเอนไซม์ในร่างกาย ที่สามารถย่อยให้ นีโอโซมแตกออกได้ นีโอโซมอาจสามารถปลดปล่อยสารสกัดออกมา เพื่อออกฤทธิ์ตามต้องการได้ (**ภาคผนวก** 9)
8. <u>ได้นำสารสกัด 5 ตัว ซึ่งได้แก่สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของกวาวเครือขาว บัวบก ย่านาง และหม่อน</u> และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของบัวบกมาเตรียมเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการแยกส่วนการละลายซึ่งได้สารสกัดละ 3 fractions รวมเป็น 15 fractions พบว่า fractions ที่ให้ yield สูงที่สุด คือ fraction ที่ 1 จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำโดยน้ำ (77.55%) และ fraction ที่ให้ yield น้อยที่สุด คือ fraction ที่ 3 จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำโดย methanol (0.09%) (**ภาคผนวกที่**10) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50}$ =

0.16 ± 0.04 mg/ml) แต่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50}$= 0.05 ± 0.00 mg/ml) 3.2 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50}$= 0.09 ± 0.02 mg/ml) 1.77 เท่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับโลหะสูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50}$ = 1.06 ± 1.03 mg/ml) โดยให้ฤทธิ์จับโลหะต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50}$ = 0.30 ± 0.22 mg/ml) 3.53 เท่า ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50}$ = 0.03 ± 0.01 mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50}$ = 0.02 ± 0.01 mg/ml) 1.5 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50}$ = 0.48 ± 0.22 mg/ml) 16 เท่า (**ภาคผนวกที่ 11**) จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่า สารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ (ร้อยละ100.86±3.8) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 112.99±8.93) และ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 103.82±19.60) จากการศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase พบว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งเป็น fraction ที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (ร้อยละ 171.27±11.25) ในขณะที่สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ต่ำกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม (ร้อยละ99.46±6.78) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบอีก 2 ตัวโดย hexane ที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate และสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate (ร้อยละ 122.14±30.59 และ 115.12±12.87 ตามลำดับ) จากการศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่า ทุกสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบมีจำนวนโปรตีนภายในเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ดังนั้น fraction ที่เลือกมาพัฒนาต่อ คือ fraction ที่ 2 จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งมี % yield เท่ากับ 20.99% แม้ไม่พบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแต่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้สูงสุด (112.99%) และมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (171.27%) (**ภาคผนวกที่ 12**)

9. <u>การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือขาว fraction 2 ในนีโอโซม</u> พบว่าได้สารแขวนตะกอนของนีโอโซมที่มีสีขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน (**ภาคผนวกที่ 13**)
10. <u>การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่าไว้ที่อุณหภูมิห้อง</u>

(27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบว่านีโอโซมยังมีความคงตัวทางกายภาพ หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (**ภาคผนวกที่** 14)

11. การศึกษาความคงตัวทางเคมีของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ(4 + 2 , 30 + 2 และ 45 + 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 เดือน พบว่านีโอโซมที่เก็บกักสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือfraction 2 มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากกว่า 60% ทุกอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนในสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol มีปริมาณ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50%โดยที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 42.50% (**ภาคผนวกที่** 14)
12. การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม พบว่านีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญ (linoleic acid) ที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ได้ทั้งในผิวหนังและรีซีฟเวอร์ โดยมีปริมาณสะสม ค่าฟลักซ์ และ ปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขน มากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่า ตามลำดับ (**ภาคผนวกที่** 15) ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้รับการอนุมัติให้ใช้สัตว์ทดลองตามความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (**ภาคผนวกที่** 16)
13. การคำนวณต้นทุนการผลิตของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ พบว่า ราคาคาดคะเนของการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 58,800 บาท และราคาคาดคะเนของการผลิตสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 2,374.62 บาท (**ภาคผนวกที่** 17)

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก 1

## การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

**การจัดทำ specification ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก**

**วัตถุประสงค์**

เพื่อการจัดทำ specification ของสารสกัดต่างๆ

**ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)**

1. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
2. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
3. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
4. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
5. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
6. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
7. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
8. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
9. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
10. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
11. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
12. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
13. สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ
14. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
15. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate
16. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
17. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
18. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
19. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
20. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

**สารเคมี**

1. 10%hydrochloric acid (กรดแก่)
2. 10%sodium hydroxide (ด่างแก่)
3. 10%acetic acid (กรดอ่อน)
4. 10%ammonium hydroxide (ด่างอ่อน)

5. 10%hydrogen peroxide (oxidizer)
6. 10%feric chloride (reducer)
7. 10%sodium acetate (ด่างอ่อน)

**วิธีการทดลอง**

สารสกัดสมุนไพรปริมาณ 0.1%ในน้ำ

↓

วัดค่า pH

↓

หยดสารทดสอบทีละหยด(เขย่าด้วยมือ)หยุดหยดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง และ นับจำนวนหยดหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้หยดจนครบ 50 หยดแล้วหยุด

↓

สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละหยด(สี ความขุ่น ตะกอน)

หมายเหตุ สารสกัดที่ละลายยาก(สกัดด้วย methanol, ethyl acetate, hexane)เติม 95% แอลกอฮอล์ลงไป 15%

**ตารางที่** 1.1 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดกวาวเครือสกัดด้วยน้ำ**

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำใส pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.2 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดกวาวเครือสกัดด้วย** methanol ลักษณะสารสกัดละลายน้ำใส pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.3 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดกวาวเครือสกัดด้วย** ethyl acetate ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ ขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 5 หยดขุ่นเล็กน้อย |
| 10%NaOH | 5 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 4 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.4 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดกวาวเครือสกัดด้วย** hexane ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ ขุ่น pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.5 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดหม่อนสกัดด้วยน้ำ**

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีน้ำตาลอ่อน pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดขุ่นเล็กน้อย |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 10 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.6 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดหม่อนสกัดด้วย** methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวอ่อน pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.7 การทดสอบความคงตัว**ของสารสกัดหม่อนสกัดด้วย** ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนขุ่น pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.8 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดหม่อนสกัดด้วย** hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนขุ่น pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.9 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดย่านางสกัดด้วยน้ำ**

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีน้ำตาลอ่อน pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 5 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.10 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดย่านางสกัดด้วย** methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวอ่อนใส pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.11 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดย่านางสกัดด้วย** ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 5 หยดขุ่นเล็กน้อย |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.12 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดย่านางสกัดด้วย** hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 10 หยดขุ่นเล็กน้อย |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.13 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดอัญชันสกัดด้วยน้ำ**

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำเงินใส pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีแดง |
| 10%NaOH | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีแดง |
| 10%$CH_3COOH$ | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีม่วง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีคราม |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีม่วง |
| 10%$CH_3COONa$ | 1 หยดเปลี่ยนเป็นสีฟ้า |

**ตารางที่** 1.14 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดอัญชันสกัดด้วย** methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลอ่อนใส pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COONa$ | 5 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.15 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดอัญชันสกัดด้วย** ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 3 หยดขุ่นขึ้น |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COONa$ | 5 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.16 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดอัญชันสกัดด้วย** hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สีเขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 5 หยดขุ่นขึ้น |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**ตารางที่** 1.17 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดบัวบกสกัดด้วยน้ำ**

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลอ่อนขุ่น pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 5 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.18 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดบัวบกสกัดด้วย** methanol

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5.5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 5 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.19 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดบัวบกสกัดด้วย** ethyl acetate

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี เขียวแกมเหลืองขุ่น pH5

| **สารทดสอบ** | **ลักษณะของ สารสกัด** |
|---|---|
| 10%HCl | 1 หยดขุ่นขึ้น |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 3 หยดสีเข้มขึ้น |

**ตารางที่** 1.20 การทดสอบความคงตัวของ**สารสกัดบัวบกสกัดด้วย** hexane

ลักษณะสารสกัดละลายน้ำ สี น้ำตาลขุ่น pH5

| สารทดสอบ | ลักษณะของ สารสกัด |
|---|---|
| 10%HCl | 5 หยดขุ่นขึ้น |
| 10%NaOH | 1 หยดสีเข้มขึ้น |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | 1 หยดขุ่นขึ้น |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | 3 หยดสีเข้มขึ้น |

**สรุปผลการทดลอง**

**ตารางที่** 1.21 สรุปผลการทดลอง

| ตัวอย่าง | ลักษณะทางกายภาพ | pH | ความคงตัว |
|---|---|---|---|
| กวาวเครือสกัดด้วยน้ำ | ใส | 5.5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| กวาวเครือสกัด methanol | น้ำตาลอ่อนใส | 5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| กวาวเครือสกัด ethyl acetate | น้ำตาลอ่อนขุ่น | 5 | คงตัวในกรดอ่อน ด่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ |
| กวาวเครือสกัด hexane | น้ำตาลอ่อนขุ่น | 5.5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| หม่อนสกัดน้ำ | น้ำตาลอ่อนใส | 5.5 | คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducerไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน |
| หม่อนสกัด methanol | เขียวอ่อนใส | 5.5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| หม่อนสกัด ethyl acetate | เขียวอ่อนขุ่น | 5.5 | คงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน ด่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน ด่างแก่ |
| หม่อนสกัด hexane | น้ำตาลอ่อนขุ่น | 5.5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| ย่านางสกัด น้ำ | น้ำตาลอ่อนขุ่น | 5.5 | คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducerไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน |
| ย่านางสกัด methanol | เขียวอ่อนใส | 5.5 | คงตัวในทุกสภาวะ |
| ย่านางสกัด ethyl acetate | เขียวแกมเหลืองขุ่น | 5 | คงตัวใน กรดอ่อน ด่างอ่อน oxidizer reducerไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ |
| ย่านางสกัด hexane | น้ำตาลขุ่น | 5 | คงตัวใน กรดอ่อน ด่างอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ |
| อัญชันสกัด น้ำ | น้ำเงินใส | 5.5 | คงตัวใน oxidizer ไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ กรดอ่อน ด่างอ่อน reducer |

**ตารางที่** 1.21 สรุปผลการทดลอง (ต่อ)

| ตัวอย่าง | ลักษณะทางกายภาพ | pH | ความคงตัว |
|---|---|---|---|
| อัญชันสกัด methanol | น้ำตาลอ่อนใส | 5.5 | คงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน oxidizerไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน กรดอ่อน reducer |
| อัญชันสกัด ethyl acetate | เขียวขุ่น | 5 | คงตัวใน ด่างอ่อนoxidizerไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ กรดอ่อน reducer |
| อัญชันสกัด hexane | เขียวแกมเหลืองขุ่น | 5 | คงตัวใน ด่างอ่อน กรดอ่อน oxidizer reducer ไม่คงตัวในกรดแก่ ด่างแก่ |
| บัวบกสกัดน้ำ | น้ำตาลอ่อนขุ่น | 5.5 | คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อน oxidizer reducerไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน |
| บัวบกสกัด methanol | น้ำตาลอ่อนใส | 5.5 | คงตัวในกรดแก่ กรดอ่อนoxidizer reducerไม่คงตัวใน ด่างแก่ ด่างอ่อน |
| บัวบกสกัด ethyl acetate | เขียวแกมเหลืองขุ่น | 5 | คงตัวใน กรดอ่อนoxidizer reducerไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ ด่างอ่อน |
| บัวบกสกัด hexane | น้ำตาลขุ่น | 5 | คงตัวใน กรดอ่อนreducerไม่คงตัวใน กรดแก่ ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizer |

โดยสรุป สารสกัดทุกตัวมี pH เป็นกรด สารสกัดที่มีความคงตัวในทุกสภาวะคือ สารสกัดกวาวเครือด้วยน้ำ สารสกัดกวาวเครือด้วย methanol สารสกัดกวาวเครือด้วย hexane สารสกัดหม่อนด้วย methanol สารสกัดหม่อนด้วย hexane และสารสกัดย่านางด้วย methanol

# ภาคผนวก 2

## การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือหม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

**การทดสอบ phytochemistry ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก**

**วัตถุประสงค์**

เพื่อทดสอบพฤษเคมี (phytochemistry) ของสารสกัดต่าง ๆ

**ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)**

21. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
22. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
23. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
24. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
25. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
26. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
27. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
28. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
29. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
30. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
31. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
32. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
33. สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ
34. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
35. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate
36. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
37. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
38. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
39. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
40. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

**สารเคมี**

1. butanol
2. acetic acid
3. diehty ether
4. sulfuric acid
5. standard sucrose
6. standard fructose
7. standard glucose
8. hydrogen peroxide
9. potassium hydroxide
10. methanol
11. benzene
12. ammonium hydroxide

13. potassium hydroxide
14. dragendroff's reagent
15. hydrochloric acid
16. nitric acid
17. potassium iodide
18. sulfuric acid, Merck
19. chloroform
20. ลวด magnesium
21. calcium hydrochloride
22. ethanol

**วิธีการทดลอง**

**1 การทดสอบหา** Anthraquinone

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

นำไปต้มกับ 2 ml ของ 0.5N KOH

↓

เติม 0.5 ml ของ $H_2O_2$ (dilute)

↓

ต้มประมาณ 30 นาที

↓

เติม 100 µl ของ acetic acid

↓

นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย 1 ml ของ benzene

↓

นำชั้นของ benzene มาเติม 1 ml ของ 25%$NH_4OH$

ผลบวกของปฏิกิริยาจะทำให้ชั้น 25% $NH_4OH$ เปลี่ยนสีเป็นสีชมพูถึงแดง

**2 การทดสอบหา** Glycoside

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วยน้ำกลั่น และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

นำมา Spot ตัวอย่างทั้งหมดลงในแผ่น TLC ปริมาณ 10 µl

Condition ของ TLC:

Stationary phase: silica gel 60

Mobile phase : Butanol : Acetic acid : diethyl ether : water (9:6:1:3)

Detection : spraying with 10% $H_2SO_4$ และ heat

**3 การทดสอบหา Xanthrone**

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

เติม 2 ml ของ methanol และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายใสออกมา

↓

เติม 100 µl ของ 5% KOH

ผลบวกจะปรากฏตะกอนสีเหลืองขึ้น

**4 การทดสอบหา Tannin**

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml Ethanol และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทำการทดสอบด้วย 100 µl $Ca(OH)_2$ (sat.)

ผลบวก คือ เกิดตะกอนสีเหลืองเทาน้ำเงิน

**5 การทดสอบหา** Carotenoid

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml Chloroform

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย100 µl sulfuric acid เข้มข้นโดยทำการเปรียบเทียบกับ Control

ผลบวกจะได้สารละลายสีน้ำเงินหรือสีเขียวอมน้ำเงิน

**6 การทดสอบหา** Flavone

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml methanol และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ใส่ลวด Magnesium ลงไปสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรต้

เติม 100 µl HCl (conc.)

↓

ปฏิกิริยาที่เป็น Positive จะเป็นดังนี้คือ

Flavone จะปรากฏเป็นเหลือง

Flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงไปจนถึงสีแดงเข้ม

Flavanone จะปรากฏเป็นสีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง

Flavanonol จะปรากฏเป็นสีแดง

**7 การทดสอบหา** Alkaloid

ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ 0.05 g

↓

สกัดด้วย 2 ml HCl( 2N) และอุ่นใน water bath เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

↓

แยกสารละลายส่วนใสออกมา

↓

ทดสอบด้วย 100 µl Dragendroff's reagent

ผลบวกจะเกิดตะกอนสีส้มเกิดขึ้น

**วิธีการเตรียม** Dragendorff ' s reagent

1. ละลาย Bismuth nitrate 8 g ใน nitric acid, 30% W/V 12 ml
2. ละลาย Potassium iodide 27.2 g ในน้ำกลั่น 50 ml เทสารละลาย Potassium iodide ลงในสารละลาย Bismuth nitrate แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml

**ผลการทดลอง**

ผลการทดลองแสดงไว้ใน**ตารางที่** 2.1

**อภิปรายและสรุปผลการทดลอง**

จากผลการทดสอบทาง phytochemistry พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับสารสำคัญประเภท glycoside (glucose and sucrose), flavonoid, carotenoid, tannin และ xanthone มากกว่า ประเภท alkaloid แต่ไม่พบผลบวกกับสารประเภท anthraquinoneและ glycoside (fructose)

**ตารางที่** 2.1 ผลการทดสอบพฤษเคมี (Phytochemistry) ของสารสกัดต่างๆ

| **ตัวอย่างสารสกัด** | | **ผลการทดสอบพฤษเคมี** (Phytochemistry) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **พืช** | **ตัวทำละลาย** | Alkaloid | Anthraquinone | Glycoside | | | Flavonoid | Carotenoid | Tannin | Xanthone |
| | | | | F | G | S | | | | |
| - | Methanol | - | - | - | - | - | - | + | - | +++ |
| ย่านาง | ethyl acetate | - | - | - | - | - | - | ++++ | - | - |
| ย่านาง | Hexane | - | - | - | - | - | - | + | + | ++++ |
| ย่านาง | น้ำ | - | - | - | + | + | ++ | - | - | - |
| ย่านาง | methanol | - | - | - | +++ | ++ | - | ++++ | - | +++ |
| หม่อน | ethyl acetate | - | - | - | - | - | - | ++++ | - | ++ |
| หม่อน | hexane | - | - | - | - | - | - | - | +++ | + |
| หม่อน | น้ำ | - | - | - | ++++ | ++++ | ++ | - | + | + |
| อัญชัน | ethyl acetate | - | - | - | - | - | +++ | - | + | + |
| อัญชัน | hexane | - | - | - | - | - | ++ | - | +++ | + |
| อัญชัน | น้ำ | - | - | - | + | + | ++++ | - | - | - |
| อัญชัน | methanol | - | - | - | ++ | ++ | - | - | ++ | + |
| กวาวเครือ | methanol | + | - | - | +++++ | +++++ | +++ | - | - | ++ |

หมายเหตุ: ให้คะแนนจากน้อยไปมาก เป็น +1 ถึง +5

**ตารางที่** 2.1 ผลการทดสอบพฤษเคมี (Phytochemistry) ของสารสกัดต่างๆ (ต่อ)

| **ตัวอย่างสารสกัด** | | **ผลการทดสอบพฤษเคมี** (phytochemistry) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **พืช** | **ตัวทำละลาย** | Alkaloid | Anthraquinone | Glycoside | | | Flavonoid | Carotenoid | Tannin | Xanthone |
| | | | | F | G | S | | | | |
| กวาวเครือ | hexane | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| กวาวเครือ | ethyl acetate | + | - | - | +++ | +++++ | - | - | - | - |
| กวาวเครือ | น้ำ | | | | | | | | | |
| บัวบก | methanol | - | - | - | - | - | - | ++++ | - | + |
| บัวบก | ethyl acetate | | | | | | | | | |
| บัวบก | น้ำ | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| บัวบก | hexane | - | - | - | - | - | - | ++++ | - | - |

หมายเหตุ: ให้คะแนนจากน้อยไปมาก เป็น +1 ถึง +5

# ภาคผนวก 3

## การทดสอบ anti-oxidative activity ของสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบก

## การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว

### วัตถุประสงค์

เพื่อฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดนำ เมธานอล เอธิลอะซีเตต และเฮกเซน จากอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว

### ตัวอย่างสารสกัด (20 ตัวอย่าง)

41. สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ
42. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
43. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
44. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
45. สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ
46. สารสกัดหม่อน ด้วย methanol
47. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
48. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
49. สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ
50. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
51. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
52. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
53. สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ
54. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
55. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate
56. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
57. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ
58. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
59. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
60. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

### สารเคมี

1. Ferrous chloride
2. Linoleic acid
3. Ammonium thiocyanate
4. DPPH

5. Vitamin C
6. Vitamin E
7. Kojic acid
8. DMSO
9. Distilled water
10. 99.8% Ethanol
11. 0.1M Phosphate buffer (pH 6.8)
12. Tyrosinase
13. Tyrosine

**วิธีการทดลอง**

**การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน**

1.1 เตรียมสารสกัดจากอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาวที่เตรียมด้วยวิธี aqueous, methanol, ethyl acetate and hexane extraction ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้ 20%DMSO เป็นตัวทำละลาย

1.2 เตรียมสารมาตรฐานได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และกรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ0.0001 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้ 20%DMSO เป็นตัวทำละลาย

**2. การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกริยาออกซิเดชัน**

***2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay***

เติมสารต่างๆตามตาราง

| A (Blank) | | | | B (Sample) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| 20% DMSO | 50µl | 20% DMSO | 50µl | Sample | 50µl | Sample | 50µl |
| 99.8% Ethanol | 50µl | 0.5 mg ml DPPH | 50µl | 99.8% Ethanol | 50µl | 0.5 mg ml DPPH | 50µl |

↓

บ่มที่ 37°Cเป็นเวลา 30 นาที

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader

↓

คำนวณค่า % scavenging activity จากสมการ

$\%SC = [(A-B)/A)] \times 100$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

↓

คำนวณค่า $SC_{50}$ (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

## *2.2 ฤทธิ์ต้านการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยวิธี ferrous-thiocyanate methods*

เติมสารต่างๆตามตาราง

| A (Blank) | | | | B (Sample) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| 0.1% Linoleic acid | 50µl | 0.1% Linoleic acid | 50µl | 0.1% Linoleic acid | 50µl | 0.1% Linoleic acid | 50µl |
| 20% DMSO | 50µl | 20% DMSO | 50µl | Sample | 50µl | Sample | 50µl |
| 2mM $NH_4SCN$ | 50µl | 2mM $NH_4SCN$ | 50µl | 2mM $NH_4SCN$ | 50µl | 2mM $NH_4SCN$ | 50µl |
| 10% HCl | 50µl | 2mM $FeCl_2$ | 50µl | 10% HCl | 50µl | 2mM $FeCl_2$ | 50µl |

↓

บ่มที่ 37°Cเป็นเวลา 60 นาที

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader

↓

คำนวณค่า % lipid peroxidation activity จากสมการ

$$\%LC = [(A-B)/A)] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

↓

คำนวณค่า $LC_{50}$ (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

*2.3* ***ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี*** *the modified dopachrome method*

เติมสารต่างๆตามตาราง

| A (Blank) | | | | B (Sample) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| 2mM tyrosine | 50µl | 2mM tyrosine | 50µl | 2mM tyrosine | 50µl | 2mM tyrosine | 50µl |
| 20% DMSO | 50µl | 20% DMSO | 50µl | Sample | 50µl | Sample | 50µl |
| 0.1M Phosphate buffer | 50µl | 50 u ml tyrosinase | 50µl | 0.1M Phosphate buffer | 50µl | 50 u ml tyrosinase | 50µl |

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader ($T_0$)

↓

บ่มที่ 37°Cเป็นเวลา 60 นาที

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง 96-well reader ($T_{60}$)

↓

คำนวณค่า % tyrosinase inhibition activity จากสมการ

$$\%IC = [\{(B\text{-}A)_{60} - (B\text{-}A)_0\}/ (B\text{-}A)_0] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

↓

คำนวณค่า $IC_{50}$ (mg/ml) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SC กับความเข้มข้น

**ผลการทดลอง**

**ตารางที่** 3.1 แสดงฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดน้ำ เมธานอล เอธิลอะซีเตต และเฮกเซน จากอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการสลายตัวของไขมันไม่อิ่มตัว โดยสารสกัดน้ำจากย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ($SC_{50}$ = 0.871 ± 0.168 mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 0.07 เท่าของสารมาตรฐานวิตามินซี ส่วนสารสกัดเอธิลอะซีเตตจากย่านางมีฤทธิ์ต้านการสลายตัวของไขมันสูงสุด ($LC_{50}$ = 0.001 ± 0.000 mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 3 เท่าของสารมาตรฐานวิตามินอี

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากอัญชันมีฤทธิ์สูงสุด ($IC_{50}$ = 0.005 ± 0.001 mg/ml) ซึ่งคิดเป็น 17.5 เท่าของสารมาตรฐานกรดโคจิก ส่วนสารสกัดน้ำจากอัญชัน ย่านาง และบัวบก สารสกัดเมธานอลจากบัวบก สารสกัดเอธิลอะซีเตตจากบัวบกและกวาวเครือ และสารสกัดเฮกเซนจากย่านางไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

## สรุปผลการทดลอง

สารสกัดน้ำและเอธิลอะซีเตตจากย่านางและสารสกัดเฮกเซนจากอัญชันมีฤทธิ์ antioxidant สูง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเสริมอาหารได้ต่อไป ในขณะที่สารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme tyrosinase น่าจะสามารถนำไปพัฒนาสำหรับการรักษาอาการผมหงอกได้

## เอกสารอ้างอิง

Jung BK, Jong BK, Kang JC, Gabriele MK, Anthony DW (2006): Antioxidant Activity of 3,4,5-Trihydroxy benzaldehyde Isolated from *Geum japonicum.* J. Food & Drug Anal. 14(2), 190-193.

Gulcin I (2006): Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sciences* 78, 803 – 811.

Long ZP, Hyang RP, Yun KP, Seung KL, Jeong HP, and Man KP (2000): Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. J. Chem. Pharm. Bull., 50(3), 309-311.

# ภาคผนวก 4

## การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells ($B_{16}F_{10}$)

## การทดสอบผลของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชันและบัวบกต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของ melanoma cells ($B_{16}F_{10}$)

**วัตถุประสงค์**

เพื่อทดสอบผลของสารสกัดต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$

**สารสกัดที่ทดสอบ (20 ตัวอย่าง)**

61. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
62. สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate
63. สารสกัดย่านาง ด้วย hexane
64. สารสกัดย่านาง ด้วย น้ำ
65. สารสกัดย่านาง ด้วย methanol
66. สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate
67. สารสกัดหม่อน ด้วย hexane
68. สารสกัดหม่อน ด้วย น้ำ
69. สารสกัดอัญชัน ด้วย ethanol
70. สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane
71. สารสกัดอัญชัน ด้วย น้ำ
72. สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol
73. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol
74. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane
75. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate
76. สารสกัดกวาวเครือ ด้วย น้ำ
77. สารสกัดบัวบก ด้วย methanol
78. สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate
79. สารสกัดบัวบก ด้วย น้ำ
80. สารสกัดบัวบก ด้วย hexane

**สารเคมี**

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. DMSO

3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. 2 N Sodium hydroxide
6. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
7. Bovine serum albumin (BSA)

Cell culture

1. Mouse melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

**วิธีการทดลอง**

1. การเตรียม cell culture plate[1]

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้

↓

เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน culture medium และเปลี่ยน culture medium ทุกๆ 3 วัน

↓

ประเมิน culture cell จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การทดสอบผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ [(1-3)]

Seed เซลล์ $4x10^{4}$ เซลล์/หลุม ลงใน 24-well plate

↓

Incubate plate 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)

↓

Treat เซลล์แต่ละหลุมด้วยสารทดสอบ 72 ชั่วโมง

(แต่ละสารทดสอบในแต่ละขนาด ทำ 3 ซ้ำ)

↓

ละลายเซลล์ใน 2 N NaOH 1000 ul/well ที่ $60^{\circ}C$ 1 ชั่วโมง

↓

นำไปหาปริมาณเมลานินในเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละเซลล์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และใช้สารละลายเมลานินสังเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน (0.0001-1 mg/ml)

↓

หาความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละเซลล์ โดยใช้ Bradford protein assay และใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน (0-50 mg/ml)

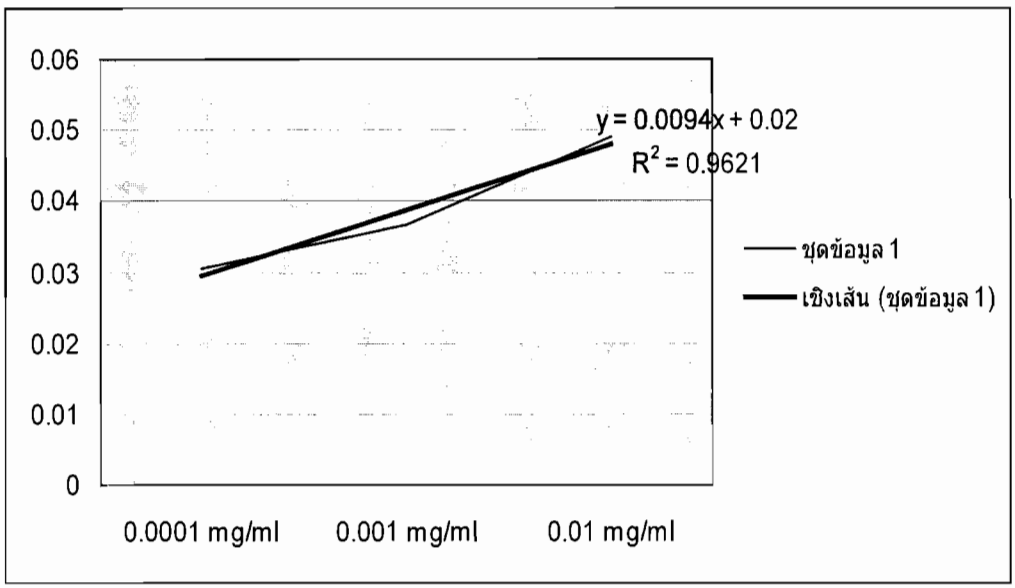
↓

แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ในรูปปริมาณ intracellular melanin ต่อปริมาณโปรตีน โดยเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลง ให้เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

**ผลการทดลอง**

**ตารางที่** 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเมลานิน (มก./มล.)

| ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเมลานิน (มก./มล.) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm |
|---|---|
| 0.0001 | 0.0304 |
| 0.001 | 0.03655 |
| 0.01 | 0.04915 |




**กราฟมาตรฐานของเมลานินมาตรฐาน**

**ตารางที่** 4.2 ผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและการเจริญของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$

| ลำดับ | สาร | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm สำหรับหาปริมาณเมลานิน | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm สำหรับหาปริมาณโปรตีน | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Control (2%DMSO+Medium) | 0.02939 | 0.09258 | - |
| 2 | Blank (Medium) | 0.0343 | 0.10675 | 16.71/15.30 |
| 3 | สารสกัดกวาวเครือ ด้วยน้ำ | 0.02865 | 0.1023 | -2.52/10.5 |
| 4 | สารสกัดกวาวเครือ ด้วย methanol | 0.02505 | 0.11035 | -14.77/19.19 |
| 5 | สารสกัดกวาวเครือ ด้วย ethyl acetate | 0.08735 | 0.0995 | 197.21/7.47 |
| 6 | สารสกัดกวาวเครือ ด้วย hexane | 0.02955 | 0.11035 | 0.54/19.19 |
| 7 | สารสกัดหม่อน ด้วยน้ำ | 0.0361 | 0.1048 | 22.83/13.20 |
| 8 | สารสกัดหม่อน ด้วย methanol | 0.0387 | 0.10705 | 31.68/15.63 |
| 9 | สารสกัดหม่อน ด้วย ethyl acetate | 0.1751 | 0.1013 | 495.78/9.42 |
| 10 | สารสกัดหม่อน ด้วย hexane | 0.0312 | 0.10705 | 6.16/15.63 |
| 11 | สารสกัดย่านาง ด้วยน้ำ | 0.04125 | 0.12095 | 40.35/30.64 |
| 12 | สารสกัดย่านาง ด้วย methanol | 0.0323 | 0.1021 | 9.90/10.28 |
| 13 | สารสกัดย่านาง ด้วย ethyl acetate | 0.2006 | 0.11385 | 582.55/22.97 |

**ตารางที่** 4.2 ผลของสารสกัดต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและการเจริญของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ **(ต่อ)**

| ลำดับ | สาร | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm สำหรับหาปริมาณเมลานิน | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm สำหรับหาปริมาณโปรตีน | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน) |
|---|---|---|---|---|
| 14 | สารสกัดย่านาง ด้วย hexane | 0.0315 | 0.1021 | 7.18/10.28 |
| 15 | สารสกัดอัญชัน ด้วยน้ำ | 0.0185 | 0.1026 | -37.05/10.82 |
| 16 | สารสกัดอัญชัน ด้วย methanol | 0.01975 | 0.0977 | -32.8/5.53 |
| 17 | สารสกัดอัญชัน ด้วย ethyl acetate | 0.02345 | 0.09375 | -20.21/1.26 |
| 18 | สารสกัดอัญชัน ด้วย hexane | 0.0216 | 0.0977 | -26.51/5.53 |
| 19 | สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำ | 0.03375 | 0.12155 | 14.83/31.29 |
| 20 | สารสกัดบัวบก ด้วย methanol | 0.0291 | 0.10095 | -0.99/9.04 |
| 21 | สารสกัดบัวบก ด้วย ethyl acetate | 0.10525 | 0.11025 | 258.12/19.09 |
| 22 | สารสกัดบัวบก ด้วย hexane | 0.031 | 0.10095 | 5.48/9.04 |

**อภิปรายและสรุปผลการทดลอง**

จากการศึกษาผลของสารสกัดต่างๆ ต่อกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$ พบว่า สารสกัดที่มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate สารสกัดย่านางด้วยน้ำ สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate และสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate

## เอกสารอ้างอิง

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. Biorg Med Chem. 2007; 15:4897-902.
2. ชวนพิศ ดีเอกนามกูล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน.ใน:สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.
3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/ departments/Biochem/Biochem 353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

# ภาคผนวก 5

## การเก็บกักสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบกในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

## การเก็บกักสารสกัด กวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

**วัตถุประสงค์** : เพื่อเตรียมอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ)

### วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี

1. กระดาษชั่งสาร
2. ช้อนตักสาร
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
4. ขวดก้นกลม
5. หลอดทดลอง
6. เครื่องระเหยแห้ง rotavapor
7. เครื่อง ultrasonic probe
8. Water bath
9. เครื่อง centrifuge
10. Ice bath
11. Beaker
12. Tween 61
13. Cholesterol
14. Chloroform
15. Methanol
16. สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
17. สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
18. สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
19. สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
20. สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ

### วิธีการเตรียม

เตรียมนีโอโซมจาก Tween 61 และ cholesterol อัตราส่วน 1:1 (20mM) จำนวน100 กรัม

1. ชั่ง Tween61 และ cholesterol ใส่ในขวดก้นกลม
2. ละลายด้วย chloroform 50 ml แล้วเขย่าจนละลายหมด
3. ชั่งสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย chloroform 5 ml (ยกเว้นสารสกัดกวาวเครือละลายด้วย methanol) และเติมลงในขวดก้นกลมที่มี Tween 61 และ cholesterol อยู่
4. ระเหย chloroform ออกด้วยเครื่อง rotavapor จนแห้งเกิดฟิล์มเคลือบผิวขวดก้นกลม และตั้งทิ้งไว้ 1 คืน
5. กระจายตัวฟิล์มด้วยน้ำกลั่น 100 ml โดยใช้ความร้อนจาก water bath อุณหภูมิ 50 – 55°C ช่วยในการกระจายตัวฟิล์มจนหมด
6. นำสารไปลดขนาดอนุภาคด้วย ultrasonic probe 10 นาที
7. นำไป centrifuge ที่ 5000 rpm นาน 1นาที แล้วเก็บนีโอโซมที่เตรียมได้ใส่ในขวด

8. ประเมินลักษณะนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า
9. ประเมินขนาดอนุภาคและค่า zeta potential ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยเครื่อง zetasizer
10. ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดโดยประเมินลักษณะภายนอก การตกตะกอน ค่า pH ขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ (4, อุณหภูมิห้อง (27±2) และ 45°C) เป็นเวลา 6 เดือน

**สูตรที่เตรียมได้**

ตำรับ 1 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.5% สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate

ตำรับ 2 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate

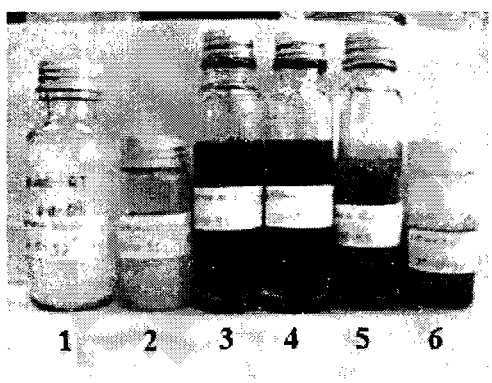
ตำรับ 3 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.125% สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate

ตำรับ 4 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดบัวบกด้วยethyl acetate

ตำรับ 5 นีโอโซมที่เก็บกัก 0.25% สารสกัดบัวบกด้วยน้ำและethyl acetate

ตำรับ 6 นีโอโซมเปล่า

**ผลการทดลอง** (รูปที่ 5.1-5.4 และตารางที่ 5.1-5.13)




**รูปที่ 5.1** ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเตรียมทันที (t = 0 เดือน)

ตำรับที่ 1. นีโอโซมเปล่า

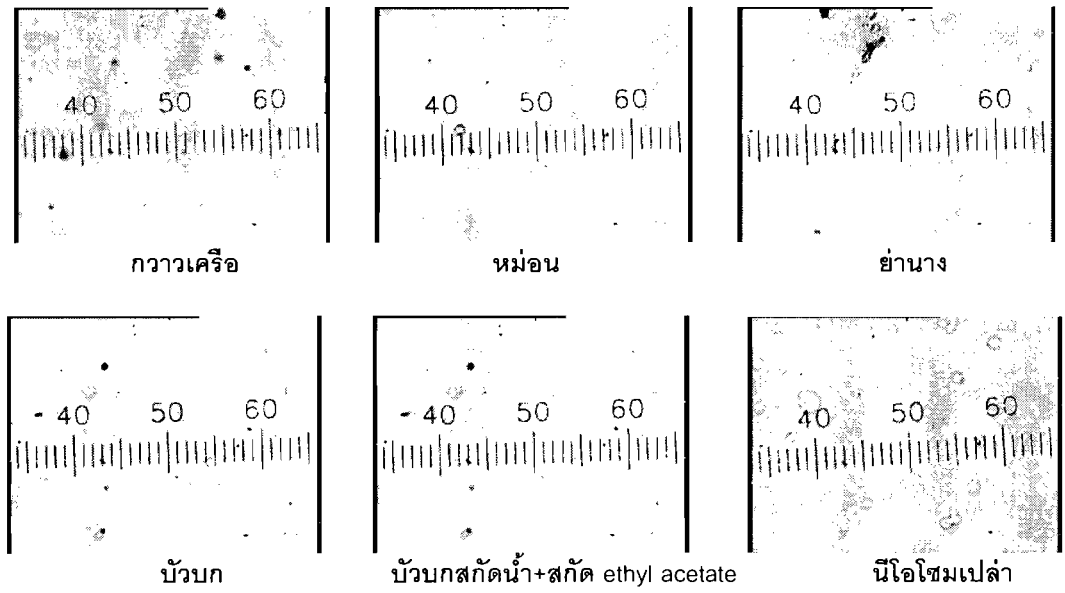
ตำรับที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ

ตำรับที่ 3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน

ตำรับที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง

ตำรับที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ

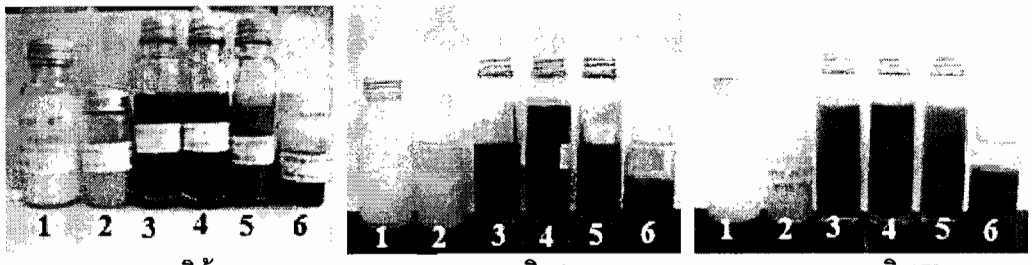
ตำรับที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate




**รูปที่** 5.2 ลักษณะอนุภาคนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

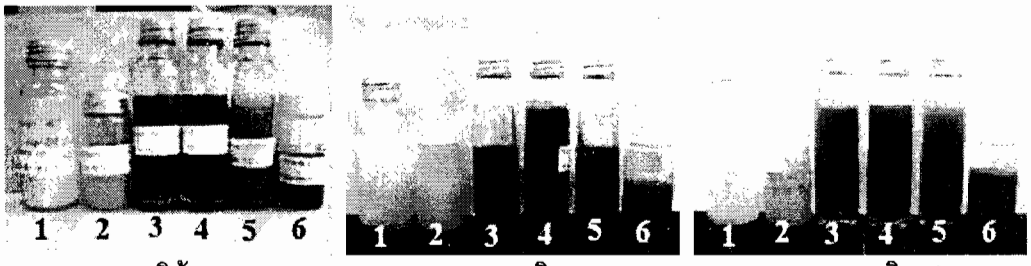
**ตารางที่** 5.1 ลักษณะภายนอก ขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้าของนีโอโซมสูตรต่างๆหลังเตรียมทันที ( t =0 เดือน)

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร) | ศักย์ซีต้า (mv) | ตะกอน | ลักษณะภายนอก | pH |
|---|---|---|---|---|---|
| ตำรับ 1 | 308.3±88.49 | -20.9±0.24 | ไม่มี | สีน้ำตาลอ่อน | 4.5 |
| ตำรับ 2 | 172.8±8.22 | -28.4±2.57 | ไม่มี | สีเขียวเข้ม | 5.0 |
| ตำรับ 3 | 176.6±28.59 | -31.1±0.78 | ไม่มี | สีเขียวเข้ม | 5.5 |
| ตำรับ 4 | 213.9±33.48 | -26.8±0.81 | ไม่มี | สีเขียว | 5.5 |
| ตำรับ 5 | 231.7±4.53 | -21.9±0.79 | ไม่มี | สีเขียว | 5.5 |
| ตำรับ 6 | 154.10±0.95 | -50.2±1.29 | ไม่มี | สีค่อนข้างใส | 5.5 |




**รูปที่** 5.3 ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

ตำรับที่ 1. นีโอโซมเปล่า
ตำรับที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
ตำรับที่ 3. นีโอโซที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
ตำรับที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
ตำรับที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
ตำรับที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate




**รูปที่** 5.4 ลักษณะภายนอกของนีโอโซมเปล่า และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

ตำรับที่ 1. นีโอโซมเปล่า
ตำรับที่ 2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
ตำรับที่ 3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
ตำรับที่ 4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
ตำรับที่ 5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
ตำรับที่ 6. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ และ ethyl acetate

**ตารางที่** 5.2 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อนมีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้มมีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้มมีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.5 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียวมีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียวมีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 4.5 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

**ตารางที่** 5.3 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | 454.9±66.4 | 286.6±14.14 | 615.6±147.3 | -25.6±0.15 | -17.5±4.2 | -18.2±0.68 |
| ตำรับ 2 | 352±131.5 | 168.6±7.98 | 263.1±58.57 | -23.4±0.86 | -24.3±0.56 | -18.9±1.1 |
| ตำรับ 3 | 147.6±14.68 | 146.5±9.78 | 121.1±35.9 | -29.1±0.85 | -29.9±1.09 | -33.6±0.36 |
| ตำรับ 4 | 386.3±51.74 | 310.2±157.5 | 882.8±364.9 | -12.5±0.81 | -12.8±0.94 | -11.0±0.24 |
| ตำรับ 5 | 245.4±39.85 | 219.0±21.42 | 243.3±40.47 | -25.7±0.89 | -18.3±0.98 | -26.4±0.51 |
| ตำรับ 6 | 144.8±22.78 | 185.5±57.09 | 127.7±7.26 | -13.6±0.37 | -19.1±0.85 | -18.7±0.49 |

**ตารางที่** 5.4 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 ° C | 45 ° C | อุณหภูมิห้อง | 4 ° C | 45 ° C | อุณหภูมิห้อง | 4 ° C | 45 ° C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อน มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีน้ำตาลอมเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.5 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

**ตารางที่** 5.5 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 2 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 ° C | 45 ° C | อุณหภูมิห้อง | 4 ° C | 45 ° C |
| ตำรับ 1 | 353.1±71.19 | 226.4±3.806 | 226.4±30.66 | -23.8±0.983 | -17.2±0.597 | -16.5±0.559 |
| ตำรับ 2 | 273.4±27.24 | 191.0±19.73 | 311.0±74.53 | -26.7±1.49 | -23.6±1.0 | -22.3±1.33 |
| ตำรับ 3 | 151.3±5.271 | 123.0±9.162 | 140.7±16.7 | -29±0.865 | -31.6±1.17 | -47.2±1.14 |
| ตำรับ 4 | 338.6±87.85 | 245.1±65.41 | 436.5±53.82 | -12.1±0.324 | -13.2±0.147 | -29.9±0.12 |
| ตำรับ 5 | 277.2±14.44 | 224.4±13.56 | 243.3±40.47 | -25.4±0.787 | -28.0±0.731 | -30.5±1.14 |
| ตำรับ 6 | 159.9±10.73 | 160.8±18.37 | 207.5±5.893 | -20.5±0.933 | -14.6±0.912 | -19.5±0.536 |

**ตารางที่** 5.6 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาลอ่อน มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีน้ำตาลอมเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.5 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | สีค่อนข้างใส | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

**ตารางที่** 5.7 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | 352.5±127.1 | 243.3±27.30 | 673.8±126.4 | -26.1±1.09 | -16.4±0.49 | -14.8±0.90 |
| ตำรับ 2 | 319.7±37.07 | 185.3±21.68 | 300.5±9.80 | -24.7±1.03 | -29.8±1.40 | -23.2±1.42 |
| ตำรับ 3 | 138.1±11.42 | 147.9±19.12 | 132.4±15.11 | -23.5±0.75 | -32.4±1.14 | -48.4±1.48 |
| ตำรับ 4 | 367.4±45.26 | 264.7±15.82 | 809.2±319.6 | -11.8±0.51 | -11.2±0.52 | -9.77±0.33 |
| ตำรับ 5 | 433.7±54.98 | 189.0±4.91 | 230.5±11.76 | -18.0±0.79 | -33.9±0.56 | -27.8±0.68 |
| ตำรับ 6 | 160.6±23.35 | 151.0±17.22 | 331.9±20.17 | -21.4±1.51 | -16.9±0.36 | -19.4±0.70 |

**ตารางที่** 5.8 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาล | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาล มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +3 | +1 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีน้ำตาลอมเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +3 | +2 | +1 | 5.0 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +2 | +1 | +3 | 5.0 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +4 | +2 | +1 | 5.5 | 5.0 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 4.5 | 5.0 | 4.5 |



**ตารางที่** 5.9 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 4 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | 302.2±8.14 | 231.9±28.22 | 516.6±87.2 | -25.2±1.4 | -18.8±0.67 | -14.7±0.45 |
| ตำรับ 2 | 288.6±25.92 | 195.7±32.75 | 331.9±61.7 | -28.9±0.89 | -27.5±1.34 | -24.2±0.89 |
| ตำรับ 3 | 296.7±96.1 | 129.8±7.75 | 242.0±16.74 | -22.0±1.02 | -34.1±1.47 | -47.0±0.95 |
| ตำรับ 4 | 571.5±8.55 | 294.8±55.48 | 515.0±35.63 | -11.5±0.58 | -15.2±0.89 | -8.98±0.50 |
| ตำรับ 5 | 875.2±83.1 | 198.8±21.6 | 310.7±15.1 | -16.17±0.63 | -27.1±0.94 | -37.8±2.0 |
| ตำรับ 6 | 166.8±23.9 | 145.7±15.66 | 418.4±27.27 | -33.2±0.29 | -17.5±0.49 | -18.0±0.23 |

**ตารางที่** 5.10 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 5 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาล | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาล มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +4 | +2 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +4 | +2 | +3 | 4.5 | 5.5 | 5.0 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +2 | +1 | +3 | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +5 | +2 | +2 | 4.5 | 5.5 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 4.5 | 5.0 | 4.5 |

**ตารางที่** 5.11 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 5 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | 481.9±54.62 | 306.0±48.97 | 680.8±90.08 | -17.9±1.06 | --6.77±0.16 | -16.0±1.64 |
| ตำรับ 2 | 305.6±23.09 | 196.1±19.53 | 360.0±31.03 | -35.3±3.34 | -29.5±1.06 | -22.2±0.74 |
| ตำรับ 3 | 382.1±83.99 | 247.4±35.30 | 166.8±17.60 | -20.4±0.03 | -40.2±0.59 | -55.5±3.97 |
| ตำรับ 4 | 627.5±91.93 | 370.3±15.10 | 671.4±44.68 | -9.62±0.96 | -12.7±0.21 | -5.68±0.56 |
| ตำรับ 5 | 351.6±39.30 | 214.3±55.30 | 338.9±70.05 | -20.5±1.59 | -30.77±0.58 | -42.3±1.81 |
| ตำรับ 6 | 184.4±21.35 | 174.2±25.40 | 465.2±12.19 | -23.2±2.49 | -5.09±2.58 | -16.2±0.44 |

**ตารางที่** 5.12 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 6 เดือน

| ตัวอย่าง | ลักษณะภายนอก | | | การตกตะกอน | | | ค่า pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | สีน้ำตาล | สีน้ำตาลอ่อน | สีน้ำตาล มีเม็ด oil | +1 | +1 | ไม่มี | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 2 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +4 | +2 | ไม่มี | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| ตำรับ 3 | สีเขียว | สีเขียวเข้ม | สีเขียวเข้ม มีเม็ด oil | +4 | +2 | +3 | 4.5 | 5.5 | 5.0 |
| ตำรับ 4 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +2 | +1 | +3 | 4.5 | 4.5 | 4.5 |
| ตำรับ 5 | สีเขียว | สีเขียว | สีเขียว มีเม็ด oil | +5 | +2 | +2 | 4.5 | 5.5 | 5.5 |
| ตำรับ 6 | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | สีขาวขุ่น | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี | 4.5 | 5.0 | 4.5 |



**ตารางที่** 5.13 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 6 เดือน

| ตัวอย่าง | ขนาดอนุภาค (nm) | | | ค่าศักย์ซีต้า (mV) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C | อุณหภูมิห้อง | 4 °C | 45 °C |
| ตำรับ 1 | 553.6±72.80 | 256.4±56.73 | 699.8±63.19 | -22.7±3.45 | -14.3±2.47 | -17.9±0.55 |
| ตำรับ 2 | 230.6±8.34 | 203.6±20.53 | 315.2±89.83 | -28.6±0.86 | -30.4±0.66 | -20.3±2.99 |
| ตำรับ 3 | 377.0±16.30 | 289.20±25.51 | 353.3±22.30 | -16.5±1.88 | -35.5±0.92 | -42.8±0.72 |
| ตำรับ 4 | 696.0±39.40 | 303.10±45.10 | 840.3±27.10 | -26.3±4.07 | -14.8±0.96 | -33.7±1.83 |
| ตำรับ 5 | 773.6±66.7 | 271.8±7.83 | 855.0±66.70 | -18.3±0.60 | -28.7±0.88 | -21.0±1.29 |
| ตำรับ 6 | 184.8±9.39 | 202.1±56.30 | 507.6±80.50 | -34.9±0.72 | -28.2±1.73 | -27.3±1.35 |

**สรุปผลการทดลอง**

นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง ที่สกัดด้วย ethyl acetate นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก สกัดด้วย ethyl acetate และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วย ethyl acetate มีตะกอนเล็กน้อยในเดือนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 4°C และ อุณหภูมิห้อง ไม่ตกตะกอนที่ 45°Cแต่มีเม็ดออยล์ลอยอยู่ด้านบน และตกตะกอนเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 4-6 ในทั้ง 3 อุณหภูมิโดยเริ่มเปลี่ยนสีในเดือนที่ 3 ที่ 45°C pH ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงโดยอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 ขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 4°C ทั้ง 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและ45°C มีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นในเดือนที่ 1-6 ค่าศักย์ซีต้าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในทุกอุณหภูมิ โดยสรุปนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดในทุกตัวอย่างค่อนข้างคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องในเวลา 3 เดือน แต่ไม่คงตัวในเดือนที่ 4-6 และไม่คงตัวที่อุณหภูมิ 45°C

# ภาคผนวก 6

## การจัดทำ Specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

## การจัดทำ Specification ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง บัวบกที่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาความคงตัวในสารเคมีต่างๆ ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดต่างๆ

### ความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

**วัสดุ /อุปกรณ์/ เครื่องมือ**

1. หลอดทดลอง
2. หลอดหยดสาร
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. vortex

**สารเคมี**

1. 10% hydrochloric acid
2. 10% sodium hydroxide
3. 10% acetic acid
4. 10% ammonium hydroxide
5. 10% hydrogen peroxide
6. 10% ferric chloride
7. 10% sodium acetate

**ตำรับที่ทดสอบ**

1. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ
2. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน
3. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง
4. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
5. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate
6. นีโอโซมเปล่า

**วิธีการทดลอง**

นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดปริมาณ 0.1%ในน้ำ

↓

วัดค่า pH

↓

หยดสารที่จะทดสอบทีละหยดจนครบ 50 หยด

↓

สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละหยด (สี,ความขุ่น,ตะกอน)

**ผลการทดลอง**

ความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

**ตารางที่ 6.1** ลักษณะของตัวอย่างเมื่อกระจายในน้ำกลั่น ( 0.1% ในน้ำ)

| ตัวอย่าง | ค่า pH | ลักษณะของตัวอย่างเมื่อกระจายตัวในน้ำกลั่น |
|---|---|---|
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ | 5.5 | ค่อนข้างใส |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน | 5.5 | ค่อนข้างใส |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง | 6.0 | ค่อนข้างใส |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ | 5.0 | ค่อนข้างใส |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยบัวบกน้ำและethyl acetate | 5.0 | ค่อนข้างใส |
| นีโอโซมเปล่า | 5.5 | ค่อนข้างใส |

**ตารางที่** 6.2 ความคงตัวของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรในสารทดสอบต่าง ๆ

| สารทดสอบ | ลักษณะการเปลี่ยนแปลงเมื่อหยดสารทดสอบ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านาง | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยบัวบกน้ำและ ethyl acetate | นีโอโซมเปล่า |
| 10%HCl | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%NaOH | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COOH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$NH_4OH$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$H_2O_2$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$FeCl_3$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |
| 10%$CH_3COONa$ | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง | ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง |

**สรุปผลการทดลอง**

นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากหม่อนเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 6.0 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ เมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.0 นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดด้วยบัวบกน้ำและ ethyl acetate เมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.0 และนีโอโซมเปล่าเมื่อกระจายตัวในน้ำ มีค่า pH = 5.5 นีโอโซมทุกตัวอย่างมีความคงตัวใน กรดแก่ กรดอ่อน ด่างแก่ ด่างอ่อน oxidizing agent และ reducing agent

# ภาคผนวก 7

## การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือหม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

## การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (วิตามิน C และ E)

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) ของสารสกัดกวาวเครือ,ย่านาง, หม่อน, และบัวบก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน C และวิตามิน E

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือ, ย่านาง, หม่อน, และบัวบก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน C และวิตามิน E

### สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Fluka
2. 96 well plate
3. microplate reader
4. absolute ethanol
5. auto pipette 10-100 µl
6. beaker 50, 1000 ml (Pyrex)
7. distilled water
8. filter apparatus
9. freeze dryer (Christ, Alpha 1-2 LD)
10. hot plate
11. test tube 15 ml
12. tip 10-100 µl
13. top load balance (Sartorius CP3202S)
14. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)
15. ตัวอย่างสารสกัดกวาวเครือ,ย่านาง, หม่อน, บัวบกและบัวบกน้ำ
16. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากสมุนไพร

**วิธีการทดลอง**

**การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) (รูปที่ 7.1 และ 7.2)**

1. เตรียมสารละลาย DPPH 0.25 mg/ml ใน absolute methanol
2. เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น100 mg/ml แล้วนำไป centrifuge และนำสารสกัดส่วนใสมาทดสอบ ดังนี้ :

**วิธีการทดสอบ**

100 µl sample + 100 µl DPPH

↓

ทิ้งไว้ 30 นาที 28 °C

↓

วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 515 nm

↓

หา % inhibition activity

เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระหาได้โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition activity} = (A-B/A) \times 100$$

**โดยที่** A = blank ก่อนเติม DPPH – blank หลังเติม DPPH

B = sample ก่อนเติม DPPH – sample หลังเติม DPPH

คำนวณค่า $SC_{50}$ จากกราฟที่ plot ระหว่าง %Inhibition และความเข้มข้น (mg/ml)

โดยค่า $SC_{50}$ คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50 %

**ผลการทดลอง**

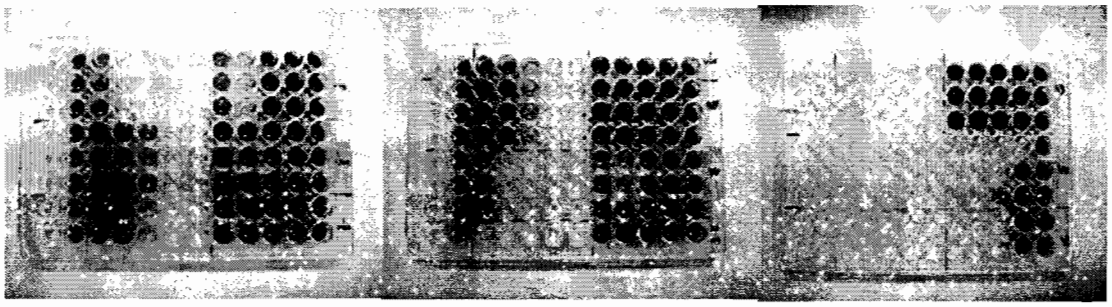
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์สูงกว่านีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ (**ตารางที่** 7.1) แต่สารสกัดสมุนไพรทุกตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid (vitamin C) และ alpha-tocopherol (vitamin E)

**ตารางที่** 7.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ที่เก็บกักในนีโอโซม

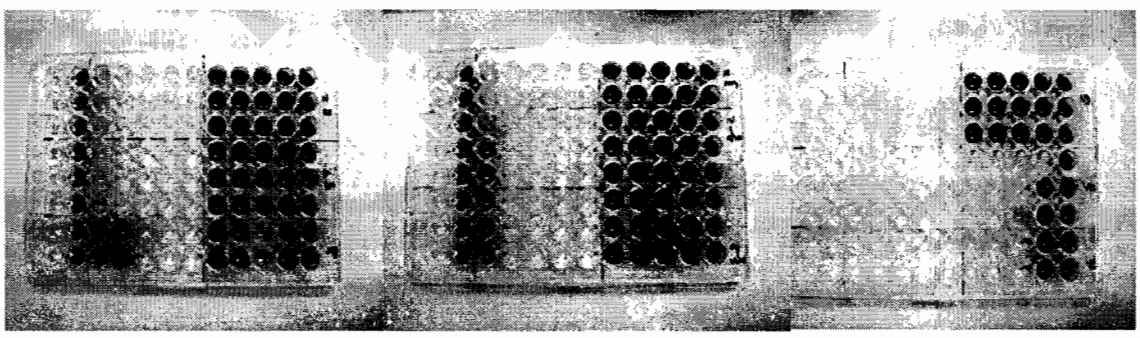
| ตัวอย่าง | $SC_{50}$ (mg/ml) [a] |
|---|---|
| สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate | 4.24 |
| สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate | 5.34 |
| สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate | 5.95 |
| สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate | 5.97 |
| สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ | 4.73 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate | 99.73 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate | 138.23 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อน | 128.74 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก Ethyl acetate | 112.64 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบก | 108.21 |
| นีโอโซมเปล่า | -32.02 |
| วิตามิน C | 0.036 |
| วิตามิน E | 0.049 |

**สรุปผลการทดลอง**

สกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า $SC_{50}$ เท่ากับ 4.24, 5.34, 5.95, 5.97และ 4.73 mg/ml ตามลำดับ ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate, ย่านางด้วย ethyl acetate, หม่อนด้วย ethyl acetate, บัวบกด้วย ethyl acetate และบัวบกน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า $SC_{50}$ เท่ากับ 99.73, 138.23, 128.74, 112.64 และ 108.21 mg/ml ตามลำดับ



**รูปที่** 7.1 การทดสอบ DPPH ของสารสกัดใน 96 well plate ในแต่ละความเข้มข้น ที่ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm



**รูปที่** 7.2 การทดสอบ DPPH ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดใน 96 well plate ในแต่ละความเข้มข้น ที่ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

# ภาคผนวก 8

## การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

## การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (วิตามิน C และ กรดโคจิก)

### วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน(วิตามิน C และกรดโคจิก)

### วัสดุ/อุปกรณ์/สารเคมี/ตัวอย่าง

1. tyrosine
2. mushroom tyrosinase
3. distilled water
4. 0.1 M phosphate buffer pH 6.8
5. test tubes
6. เครื่องชั่งละเอียด (Precisa 240)
7. autopipette
8. beaker
9. well reader
10. ตัวอย่างสารสกัดจากกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate และสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
11. ตัวอย่างนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดจากกวาวเครือ ย่านาง หม่อน บัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate และสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ

### วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซมที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓

เติมสารละลาย ดังแสดงในตาราง ใน 96-well microplate reader

| A | | B | | C | | D | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tyrosine | 50µl | Tyrosine | 50µl | Tyrosine | 50µl | Tyrosine | 50µl |
| Distilled water | 40µl | Distilled water | 40µl | Sample | 40µl | Sample | 40µl |
| Phosphate buffer | 100µl | Phosphate buffer | 100µl | Phosphate buffer | 100µl | Phosphate buffer | 100µl |
| Distilled water | 50µl | Tyrosinase | 50µl | Distilled water | 50µl | Tyrosinase | 50µl |

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ 0 นาที

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ 60 นาที

↓

คำนวณ % Inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D) \times 100}{(A-B)}$$

โดยที่ A ค่าการดูดกลืนแสงของ blank หลังจากบ่ม, B ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ก่อนบ่ม
C ค่าการดูดกลืนแสงของsampleหลังจากบ่ม, D ค่าการดูดกลืนแสงของsample ก่อนบ่ม

↓

คำนวณค่า $IC_{50}$ จากกราฟที่ plot ระหว่าง %Inhibition และความเข้มข้น (mg/ml)
โดยค่า $IC_{50}$ คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 %

**ผลการทดลอง** (ตารางที่ 8.1)

**ตารางที่ 8.1 ค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดสมุนไพรที่เก็บกักและไม่เก็บกักในนีโอโซม**

| ตัวอย่าง | $IC_{50}$ (mg/ml) [a] |
|---|---|
| สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate | ND |
| สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate | 485.483 |
| สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate | 1269.902 |
| สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate | ND |
| สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate | 5062.740 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate | ND |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate | 4271.101 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate | 2722.989 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate | 700.1978 |
| นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ | ND |
| วิตามิน C | 0.24 |
| กรดโคจิก | 0.049 |

**หมายเหตุ** ND คือ ไม่สามารถคำนวณหาค่า $IC_{50}$ ได้

**สรุปผลการทดลอง**

จากการทดลองพบว่าสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่ไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 485.483 mg/ml ส่วนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 700.1978mg/ml.

# ภาคผนวก 9

## การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

## การทดสอบฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

### วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ ของสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง และบัวบกที่เก็บกักและไม่เก็บกักในอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม)

### สารทดสอบ

81. สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
82. สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
83. สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
84. สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
85. สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ
86. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate
87. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate
88. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate
89. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate
90. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate และน้ำ
91. นีโอโซมเปล่า

### สารเคมี

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. DMSO
3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. 2 N Sodium hydroxide
6. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
7. Bovine serum albumin (BSA)

Cell culture

1. Mouse melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

**วิธีการทดลอง**

1. การเตรียม cell culture plate[1]

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้

↓

เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน cuiture medium และเปลี่ยน culture medium ทุก 3 วัน

↓

ประเมิน culture cell จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การทดสอบผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$[1-3] ของสารสกัดและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด

Seed เซลล์ $50x10^4$ เซลล์/หลุม ลงใน flask

↓

Incubate ใน $CO_2$ incubator 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)

↓

Treat เซลล์แต่ละ flask ด้วยสารทดสอบ และ incubate 72 ชั่วโมง

↓

เก็บเซลล์แต่ละ flask เพื่อวัดปริมาณเม็ดสีเมลานินและปริมาณโปรตีน โดยวิธีต่อไปนี้ :

ก. การหาปริมาณเม็ดสีเมลานิน: ละลายเซลล์ใน 2 N NaOH ที่ 60°C 1 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเมลานิน (0-0.1 มก./มล.)

ข. การหาปริมาณโปรตีน: ปิเปต Bradford reagent ลงในสารละลายเซลล์ที่ได้ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

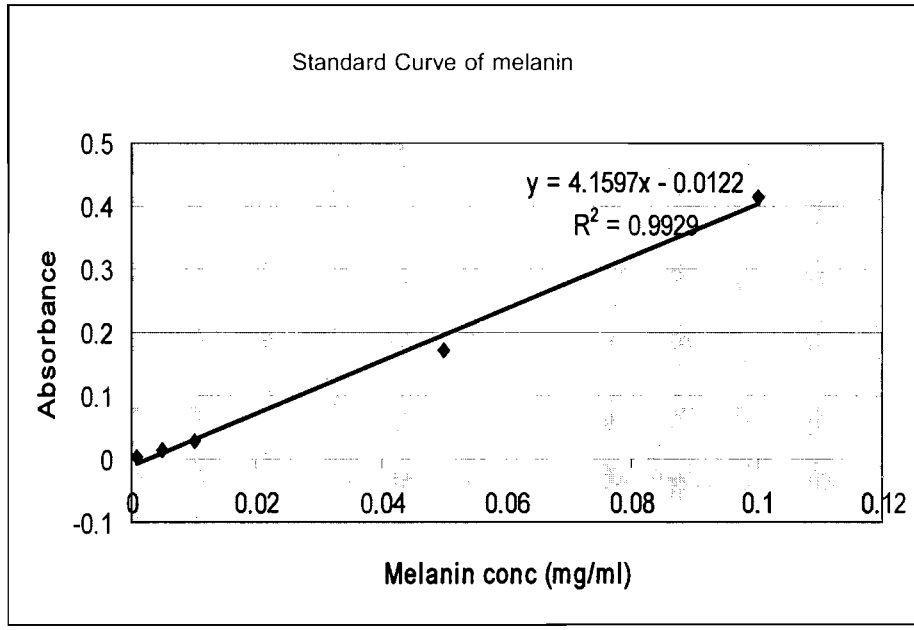
↓

แสดงผลการศึกษาในรูปเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบเซลล์ที่ทดสอบกับเซลล์กลุ่ม control

**ผลการทดลอง**

**ตารางที่** 9.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเมลานิน (มก./มล.)

| ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมลานิน | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.001 | 0.002 |
| 0.005 | 0.0125 |
| 0.01 | 0.028 |
| 0.05 | 0.171 |
| 0.1 | 0.416 |




**ตารางที่** 9.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรต่อกระบวนการสร้างเม็ด

สีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$

| ลำดับ | สารทดสอบ | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน) |
|---|---|---|
| 1 | สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | +11.13/+86.27 |
| 2 | สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | +14.17/+66.67 |

**ตารางที่ 9.2** ผลของสารสกัดสมุนไพรและนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพรต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ (ต่อ)

| ลำดับ | สารทดสอบ | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปริมาณเมลานินต่อปริมาณโปรตีน) |
|---|---|---|
| 3 | สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -* |
| 4 | สารสกัดย่านางด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -* |
| 5 | สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | +51.09/+11.76 |
| 6 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -34.02/-68.08 |
| 7 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. | -31.96/-65.26 |
| 8 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. | -15.46/-33.80 |
| 9 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -29.39/-64.79 |
| 10 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. | -3.19/+95.93 |
| 11 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. | -9.43/+7.20 |
| 12 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -* |
| 13 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. | -* |
| 14 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. | -* |
| 15 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate ความเข้มข้น 1 มก./มล. | -28.11/-55.46 |
| 16 | นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดบัวบกด้วยน้ำและ ethyl acetate ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. | -29.54/-53.69 |

เซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด เช่น สารลดแรงตึงผิว อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้

**เอกสารอ้างอิง**

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. Biorg Med Chem. 2007; 15:4897-902.

2. ชวนพิศ ดีเอกนามกูล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน. ใน: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.

3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

# ภาคผนวกที่ 10

## การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

## การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

1. **วัตถุประสงค์** เพื่อเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

2. **สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์**

**วัสดุ/อุปกรณ์**

1. กรวยแยก (separatory funnel)
2. บีกเกอร์
3. Hot plate stirrer
4. Megnetic stirrer
5. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ
6. ขวดก้นกลม

**สารเคมีที่ใช้ทดสอบ**

1. Hexane
2. Ethyl acetate
3. Methanol
4. น้ำกลั่น
5. สารสกัดหยาบของกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate
6. สารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วย ethyl acetate
7. สารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วยน้ำ
8. สารสกัดหยาบของใบย่านางด้วย ethyl acetate
9. สารสกัดหยาบของใบหม่อนด้วย ethyl acetate

3. **วิธีการทดลองและผลการทดลอง**

ได้ทำการเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวอย่างด้วยวิธีการแยกส่วนการละลาย ดังนี้ :

3.1 การแยกสารสกัดหยาบของกวาวเครือขาวที่สกัดด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.2 การแยกสารสกัดหยาบของใบบัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (ethyl acetate) และ fraction 3 (methanol)

3.3 การแยกสารสกัดหยาบของใบบัวบกด้วยน้ำ

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.4 การแยกสารสกัดหยาบของย่านางด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

3.5 การแยกสารสกัดหยาบของหม่อนด้วย ethyl acetate

- นำมาแยก fractions ได้ fraction 1 (น้ำ), fraction 2 (hexane) และ fraction 3 (methanol)

4. **สรุปผลการทดลอง**

การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถสรุปผลได้ดัง**ตารางที่** 10.1 ต่อไปนี้

**ตารางที่** 10.1 ผลการเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสมุนไพรต่างๆ

| ลำดับที่ | สารสกัดหยาบ | Fractions (%yield) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate | 11.09 | 20.99 | 26.8 |
| 2 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate | 1.8 | 2.07 | 11.6 |
| 3 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ | 77.55 | 1.58 | 0.09 |
| 4 | สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate | 13.8 | 2.8 | 20.66 |
| 5 | สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate | 21.99 | 0.3404 | 26.76 |

**เอกสารอ้างอิง**

1. Hideaki Otsuka., Purification by solvent extraction using partition coefficient, Methods in Biotechnology, Volume 20, 269-273, 2005

# ภาคผนวกที่ 11

## การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านางหม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

## การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (fraction) จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเครื่องสำอาง โดยการทดสอบฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ (DPPH free radical scavenging activity) ฤทธิ์จับโลหะ (ferrous metal ion chelating activity) และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation activity) รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก จำนวน 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ascorbic acid, EDTA, และ α-tocopherol และ kojic acid)

### 2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

#### 2.1 สารสกัดและ fraction ของสารสกัดที่ทดสอบ

1. สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate
2. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
3. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
4. fraction สารสกัดย่านางด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
5. สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate
6. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
7. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
8. fraction สารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
9. สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วย ethyl acetate
10. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
11. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
12. fraction สารสกัดกวาวเครือด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
13. สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate
14. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดยน้ำ) (fraction 1)
15. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดย hexane) (fraction 2)
16. fraction สารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate (โดย methanol) (fraction 3)
17. สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ

18. fraction สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ (โดยน้ำ) (fraction 1)
19. fraction สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ (โดย hexane) (fraction 2)
20. fraction สารสกัดบัวบกด้วยน้ำ (โดย methanol) (fraction 3)

### 2.2 สารเคมี

1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich Corp.,St. Louis, MO, U.S.A.)
2. Absolute ethanol (องค์การสุรา, Bangkok, Thailand)
3. Ascorbic acid (Carlo Erba Reagenti SPA, Milatino, Italy)
4. α-tocopherol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)
5. EDTA (Promega Corporation, Medison, WI, U.S.A.)
6. Ferrosine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)
7. Ferric chloride ($FeCl_2$) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)
8. Linoleic acid (Sigma-Aldrich Corp.,St. Louis, MO, U.S.A.)
9. Ammonium thiocyanate ($NH_4SCN$) (Sigma-Aldrich Corp.,St. Louis, MO, U.S.A.)
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Corp.,St. Louis, MO, U.S.A.)

### 2.3 วัสดุอุปกรณ์

1. Microcentrifuged tube (Hycon, BIOMED Co.,Ltd., Bangkok, Thailand)
2. Balance (Sartorius AG, Goettingen, Germany)
3. Microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, U.S.A )
4. 96-well plates (Sterilin, Newport, United Kingdom)
5. Beaker (Pyrex, Scilabware Limited, Staffordshire, UK)
6. Autopipette (Biohit Group, Helsinki, Finland)

## 3. วิธีการทดลอง

### 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสารสกัด

3.1.1 ละลายสารมาตรฐาน ascorbic acid และ EDTA ด้วยน้ำกลั่น ส่วนสารมาตรฐาน α-tocopherol ละลายด้วย absolute ethanol เจือจางด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 mg/ml

3.1.2 นำตัวอย่างจากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบกทั้ง 20 ตัว มาละลายด้วย absolute ethanol และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 mg/ml

**3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน**

3.2.1 **ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ** free radical scavenging activity **ด้วยวิธี** DPPH assay มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓

เติมสารละลายลงใน 96-well microplate ดังแสดงใน**ตารางที่** 11.1

**ตารางที่** 11.1 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ DPPH ลงใน 96-well plate

| A | B | C | D |
|---|---|---|---|
| EtOH | DPPH | EtOH | DPPH |
| 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |
| EtOH | EtOH | Sample | Sample |
| 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |

↓

บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28±2 °C เป็นเวลา 30 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm

↓

คำนวณ % free radical scavenging activity จากสมการ

$$\% \text{ free radical scavenging activity} = [(A-B)/(A)] \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

↓

คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถ scavenging อนุมูลอิสระได้ 50%) $IC_{50}$)

### 3.2.2 **การทดสอบฤทธิ์** chelating activity **ด้วยวิธี** ferrous iron–ferrozine complex

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓

เติมสารละลาย ลงใน 96-well microplate ดังแสดงใน**ตารางที่** 11.2

**ตารางที่** 11.2 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ chelating inhibition ลงใน 96-well plate

| A | B | C | D |
|---|---|---|---|
| Ferrozine | Ferrozine | Ferrozine | Ferrozine |
| 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| น้ำกลั่น | น้ำกลั่น | Sample | Sample |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| $H_2O$ | $H_2O$ | $H_2O$ | $H_2O$ |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| 2.4% HCl | $FeCl_2$ | 2.4%HCl | $FeCl_2$ |
| 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

↓

บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28±2°C เป็นเวลา 10 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

↓

คำนวณ % chelating effect จากสมการ

% chelating effect = [(A-B)/A] x 100

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

↓

คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถจับโลหะได้ 50% ($IC_{50}$)

### 3.3.3 **การทดสอบฤทธิ์** lipid peroxidation inhibition **ด้วยวิธี** ferric iron-thiocyanate complex

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓

เติมสารละลายลงใน 96-well microplate ดังแสดง**ในตารางที่** 11.3

**ตารางที่** 11.3 ปริมาณและลำดับการเติมสารละลายที่ใช้ทดสอบ lipid peroxidation activity ลงใน 96-well plate

| A | B | C | D |
|---|---|---|---|
| Linoleic acid | Linoleic acid | Linoleic acid | Linoleic acid |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| น้ำกลั่น | น้ำกลั่น | น้ำกลั่น | น้ำกลั่น |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| $NH_4SCN$ | $NH_4SCN$ | $NH_4SCN$ | $NH_4SCN$ |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| 2.4% HCl | $FeCl_2$ | 10%HCl | $FeCl_2$ |
| 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

↓

บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นเวลา 60 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm

↓

คำนวณ % Lipid peroxidation inhibition จากสมการ

% Lipid peroxidation inhibition = [(A-B)/A] x 100

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

↓

คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 50% ($IC_{50}$)

**4. ผลการทดลอง**

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระสูงที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50}$ = 0.16 ± 0.04 mg/ml), สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ($SC_{50}$ = 0.21 ± 0.14 mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50}$ = 0.23 ± 0.09 mg/ml) แต่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50}$= 0.05 ± 0.00 mg/ml) 3.2, 4.2 และ 4.6 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50}$= 0.09 ± 0.02 mg/ml) 1.77, 2.33 และ 2.55 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับโลหะสูงที่สุด ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50}$ = 1.06 ± 1.03 mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50}$ = 18.35 ± 7.10 mg/ml)โดยให้ฤทธิ์จับโลหะต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50}$ = 0.30 ± 0.22 mg/ml) 3.53 และ 61.17 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50}$ = 0.03 ± 0.01 mg/ml), สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ($IPC_{50}$ = 0.06 ± 0.02 mg/ml) และ fraction จากสารสกัดหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ($IPC_{50}$ = 0.08 ± 0.06 mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50}$ = 0.02 ± 0.01 mg/ml) 1.5, 3.0 และ 4.0 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50}$ = 0.48 ± 0.22 mg/ml) 16, 8 และ 6 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงใน **ตารางที่** 11.4

**ตารางที่** 11.4 ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ [$SC_{50}$ (mg/ml)] ฤทธิ์จับโลหะ [$CC_{50}$(mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [$IPC_{50}$ (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง

| **ตัวอย่าง** | DPPH | Metal chelating | Lipid peroxidation |
|---|---|---|---|
| | $SC_{50}$ (mg/ml) | $CC_{50}$ (mg/ml) | $IPC_{50}$ (mg/ml) |
| 1. สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate | 0.21 ± 0.14 | - | 0.09 ± 0.06 |
| 2. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1) | 0.66 ± 0.32 | - | - |
| 3. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2) | *ND | *ND | *ND |

**ตารางที่ 11.4** ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ [$SC_{50}$ (mg/ml)] ฤทธิ์จับโลหะ [$CC_{50}$(mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [$IPC_{50}$ (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต่อ)

| ตัวอย่าง | DPPH | Metal chelating | Lipid peroxidation |
|---|---|---|---|
| | $SC_{50}$ (mg/ml) | $CC_{50}$ (mg/ml) | $IPC_{50}$ (mg/ml) |
| 4. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3) | 0.16 ± 0.04 | - | - |
| 5. สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate | 2.27 ± 0.10 | - | 0.06 ± 0.02 |
| 6. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1) | - | - | - |
| 7. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2) | - | - | 0.03 ± 0.01 |
| 8. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3) | 0.32 ± 0.05 | - | 0.08 ± 0.06 |
| 9.สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate | 1.31 ± 0.58 | - | - |
| 10. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวขาวเครือด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1) | 2.10 ± 0.95 | - | - |
| 11. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวขาวเครือด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2) | - | - | - |
| 12. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3) | - | 1.06 ± 1.03 | - |
| 13. สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate | 2.65 ± 0.74 | - | - |
| 14. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1) | *ND | *ND | *ND |
| 15. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2) | *ND | *ND | *ND |
| 16. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3) | 0.23 ± 0.09 | 18.35 ± 7.10 | - |
| 17. สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ | 71.71 ± 6.83 | - | - |

**ตารางที่ 11.4** ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ [$SC_{50}$ (mg/ml)] ฤทธิ์จับโลหะ [$CC_{50}$(mg/ml)] และฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation [$IPC_{50}$ (mg/ml)]) จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต่อ)

| ตัวอย่าง | DPPH | Metal chelating | Lipid peroxidation |
|---|---|---|---|
| | $SC_{50}$ (mg/ml) | $CC_{50}$ (mg/ml) | $IPC_{50}$ (mg/ml) |
| 18. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ (fraction ที่ 1) | 0.27 ± 0.08 | - | - |
| 19. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane (fraction ที่ 2) | *ND | *ND | *ND |
| 20. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol (fraction ที่ 3) | 0.51 ± 0.07 | - | - |
| 21. วิตามินซี | 0.05 ± 0.00 | | 0.02 ± 0.01 |
| 22. วิตามินอี | 0.09 ± 0.02 | | 0.48 ± 0.22 |
| 23. EDTA | | 0.30 ± 0.22 | |

**หมายเหตุ** :

$SC_{50}$ : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถ scavenging radicals ได้ 50%

$CC_{50}$ : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถ chelating โลหะ ได้ 50%

$IPC_{50}$ : ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ 50%

- : ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

*ND : ไม่ได้ทำการทดสอบ เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณไม่เพียงพอ

**5. อภิปรายผลการทดลอง**

สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ส่วนใหญ่จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ รองลงมา คือ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation แต่ให้ฤทธิ์จับโลหะมีจำนวนน้อยที่สุด ซึ่งสารละลายที่ใช้ในการแยก fraction สารสกัดหยาบ เพื่อให้ได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าสารละลายที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระสูงลดลงตามลำดับ ดังนี้ methanol > น้ำ > hexane และจากผลการทดลอง สารสกัดหยาบให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ นอกจากนี้สารสกัดหยาบบัวบกที่สกัดด้วยน้ำยังให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารสกัด

หยาบบัวบกที่สกัดด้วย ethyl acetate เมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว และบัวบก มาเปรียบเทียบกัน สามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ ดังนี้ ย่านาง > หม่อน > บัวบก (สกัดด้วย ethyl acetate) > กวาวเครือขาว > บัวบก (สกัดด้วยน้ำ) ส่วนฤทธิ์จับโลหะสามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์ได้ดังต่อไปนี้ กวาวเครือขาว > บัวบก (สกัดด้วย ethyl acetate) ส่วนสารสกัดอื่นไม่มีฤทธิ์จับโลหะ นอกจากนี้สามารถเรียงลำดับการให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ดังนี้ หม่อน > ย่านาง ส่วนสารสกัดอื่นไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation

## 6. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ($SC_{50}$ = 0.16 ± 0.04 mg/ml) แต่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($SC_{50}$= 0.05 ± 0.00 mg/ml) 3.2 เท่า และต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($SC_{50}$= 0.09 ± 0.02 mg/ml) 1.77 เท่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์จับโลหะสูงที่สุด คือ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ($CC_{50}$ = 1.06 ± 1.03 mg/ml) โดยให้ฤทธิ์จับโลหะต่ำกว่าสารมาตรฐาน EDTA ($CC_{50}$ = 0.30 ± 0.22 mg/ml) 3.53 เท่า ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation สูงที่สุด ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ($IPC_{50}$ = 0.03 ± 0.01 mg/ml) โดยให้ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินอี ($IPC_{50}$ = 0.02 ± 0.01 mg/ml) 1.5 เท่า แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ($IPC_{50}$ = 0.48 ± 0.22 mg/ml) 16 เท่า

## 7. เอกสารอ้างอิง

1. Gulcin I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. Life Sci. 78, 803 – 811.

2. Bong K.J., Bum K.J., Jin C.K., Konig G.M., Wright A.D. 2006. Antioxidant activity of 3,4,5-trihydroxy benzaldehyde isolated from Geum japonicum. J Food Drug Anal. 14(2), 190-193.

# ภาคผนวกที่ 12

## การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

## การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาวและบัวบก

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$

### 2. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

**สารสกัดหยาบและ fraction ของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบ**

1. สารสกัดหยาบของย่านางด้วย ethyl acetate
2. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
3. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
4. fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
5. สารสกัดหยาบของหม่อนด้วย ethyl acetate
6. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
7. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
8. fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
9. สารสกัดหยาบของกวาวเครือด้วย ethyl acetate
10. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
11. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
12. fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
13. สารสกัดหยาบของบัวบกด้วย ethyl acetate
14. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
15. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane (fraction ที่ 2)
16. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol (fraction ที่ 3)
17. สารสกัดหยาบของบัวบกด้วยน้ำ
18. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ (fraction ที่ 1)
19. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane (fraction ที่ 2)
20. fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol (fraction ที่ 3)

**สารเคมี**

1. Medium for mouse melanoma: DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/streptomycin solution
2. Absolute ethanol
3. Synthesis melanin (Sigma, St. Louis, MO)
4. Phosphate buffer saline, pH 7.4
5. Mushroom tyrosinase
6. 2 N Sodium hydroxide
7. Bradford dye reagent สำหรับหาปริมาณโปรตีน โดย Bradford protein assay
8. Bovine serum albumin (BSA)
9. Dopa
10. Cell lysis buffer
11. Cocktail protease inhibitor

Cell culture

1. Mous7e melanoma cell line ($B_{16}F_{10}$) ได้จากหนู mice พันธุ์ C57BL6

**3. วิธีการทดลอง**

1. การเตรียม cell culture plate[1]

กระจาย mouse melanoma cell line ที่แช่แข็งไว้

↓

เลี้ยงเซลล์ที่กระจายใน culture medium และเปลี่ยน culture medium ทุกๆ 3 วัน

↓

ประเมิน culture cells จนได้จำนวนเซลล์ตามต้องการ

2. การศึกษาผลของสารสกัดและ fraction ของสารสกัดต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน[1-3]

Seed เซลล์จำนวน $10x10^5$ เซลล์/well ลงใน 6-well plate

↓

Incubate plate 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ (cell adherence)

↓

Treat เซลล์แต่ละหลุมด้วยสารทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(แต่ละสารทดสอบในแต่ละขนาด ทำ 3 ซ้ำ)

↓

Wash เซลล์ด้วย PBS จำนวน 2-3 ครั้ง

↓

Lyse เซลล์ด้วย Cell lysis buffer ที่ผสม cocktail protease inhibitor และ incubate ที่ 4°C 30 นาที

↓

Harvest เซลล์และ supernatant ลงใน microcentrifuge tube

↓

Centrifuge เพื่อเก็บ supernatant และเซลล์

↓

ปิเปต supernatant เพื่อทดสอบ tyrosinase activity และปริมาณโปรตีน

↓

ละลายเซลล์และ supernatant ที่เหลือใน NaOH ที่ 60°C 1 ชั่วโมง

↓

นำไปหาปริมาณเมลานิน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และใช้สารละลายเมลานินสังเคราะห์เป็นสารมาตรฐาน

↓

แสดงผลการทดสอบปริมาณ melanin ในรูปเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

3. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase[1-3]

ปิเปต supernatant จากเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดและ fraction สารสกัด ลงใน 96-well plate

↓

ปิเปตสารละลาย 0.05% dopa ลงใน 96-well plate ที่มี sample อยู่

↓

Incubate ที่ 37°C 120 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และใช้สารละลาย mushroom tyrosinase เป็นสารมาตรฐาน

↓

แสดงผลการทดสอบในรูปเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

4. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$[1-3]

ปิเปต supernatant จากเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดและ fraction สารสกัด ลงใน 96-well plate

↓

ปิเปต Bradford dye reagent ลงใน 96-well plate ที่มี sample อยู่

↓

Incubate 5 นาที

↓

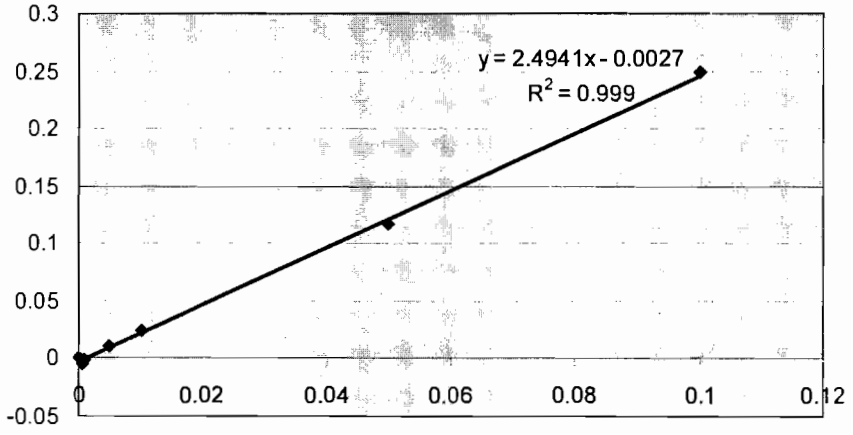
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และใช้สารละลาย bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน (0 – 1 mg/ml)

↓

แสดงผลการทดสอบในรูปเปอร์เซ็นต์ที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่ม control

**4. ผลการทดลอง**

1. การศึกษาผลของสารสกัดและ fraction ของสารสกัดต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน




**รูปที่** 12.1 กราฟมาตรฐานของเมลานินมาตรฐาน (ug/ml)

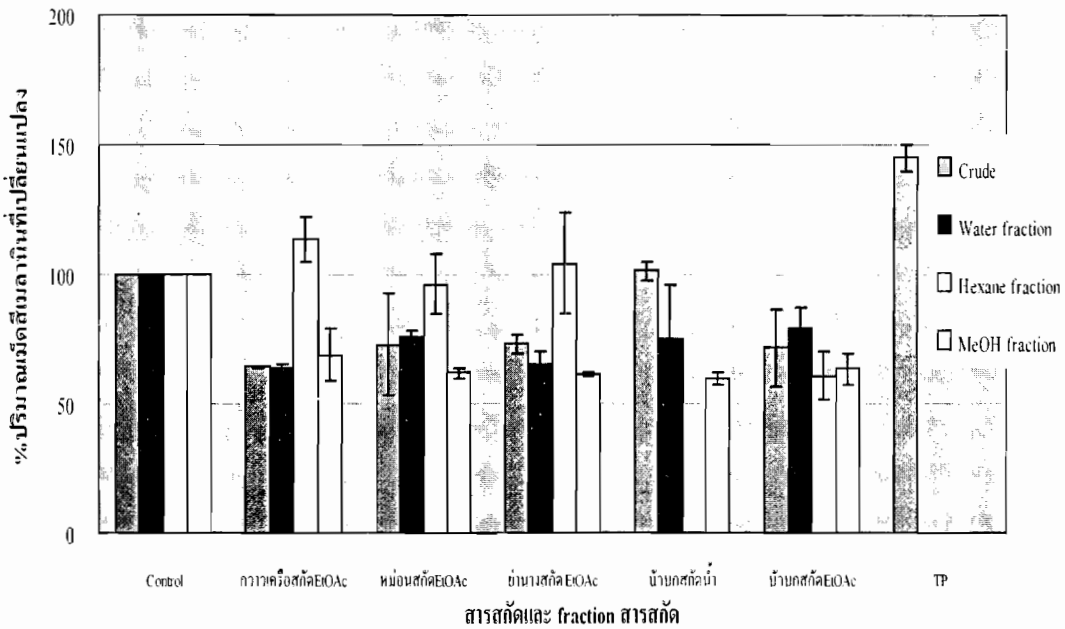
**ตารางที่** 12.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน

| ลำดับ | ตัวอย่าง | ปริมาณเม็ดสีเมลานิน (ug/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (absolute ethanol + DMEM) | 34 | 100 |
| 2 | สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 26 | 73.27±3.59 |
| 3 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 23 | 65.46±4.60 |

**ตารางที่** 12.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน (ต่อ)

| ลำดับ | ตัวอย่าง | ปริมาณเม็ดสีเมลานิน (ug/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 18 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml | 35 | 100.86±3.80 |
| 19 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 30 | 75.18±20.07 |
| 20 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | -* | - |
| 21 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 20 | 59.84±2.47 |
| 22 | Theophylline ความเข้มข้น 50 $\mu$g/ml | 48 | 144.81±5.07 |

**หมายเหตุ** *มีปริมาณสารน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ



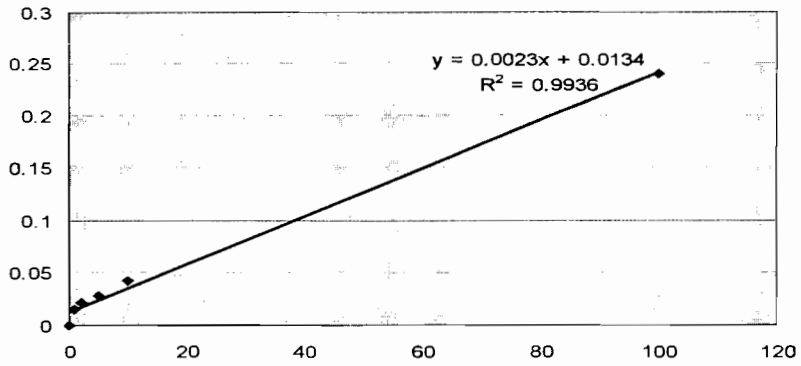

**รูปที่**12.2 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อปริมาณเม็ดสีเมลานิน

TP = Theophylline

**ตารางที่ 12.1** ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน (ต่อ)

| ลำดับ | ตัวอย่าง | ปริมาณเม็ดสีเมลานิน (ug/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 4 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 31 | 103.82±19.60 |
| 5 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 21 | 61.02±0.81 |
| 6 | สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 29 | 72.79±19.28 |
| 7 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 26 | 75.37±3.11 |
| 8 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 33 | 95.87±11.80 |
| 9 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 21 | 61.93±2.09 |
| 10 | สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 22 | 64.30±0.40 |
| 11 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 22 | 63.69±1.26 |
| 12 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 38 | 112.99±8.93 |
| 13 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 26 | 68.70±10.05 |
| 14 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate | 28 | 71.34±14.65 |
| 15 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 25 | 78.50±7.99 |
| 16 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 23 | 60.90±9.38 |
| 17 | fraction จากสารสกัดบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 20 | 63.48±5.95 |

2. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase




**รูปที่** 12.3 ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase มาตรฐาน (ug/ml)

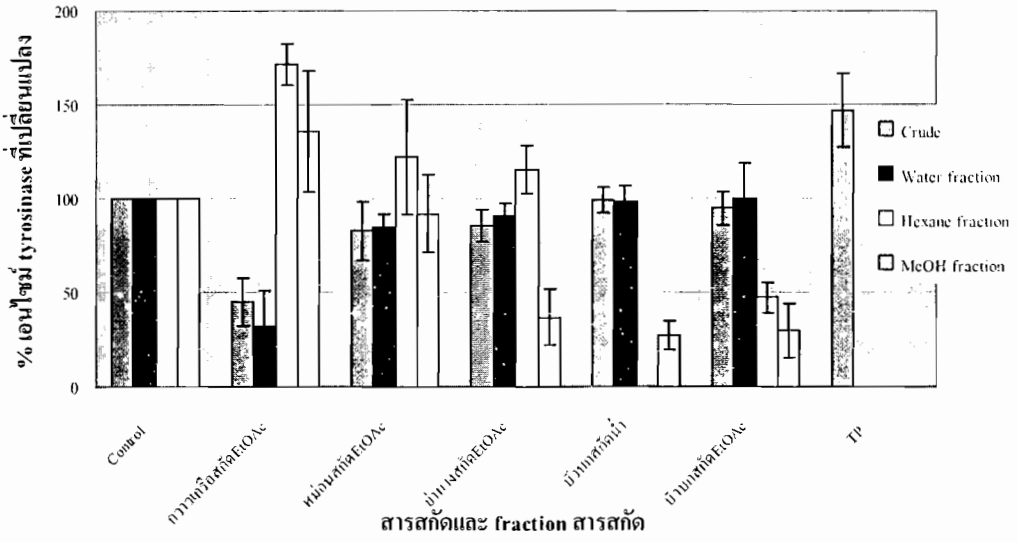
**ตารางที่** 12.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของตัวอย่างต่อเอนไซม์ tyrosinase

| ลำดับ | ตัวอย่าง | ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase (ug/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (absolute ethanol + DMEM) | 40.26 | 100 |
| 2 | สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 34.39 | 85.42±8.53 |
| 3 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 36.35 | 90.28±7.25 |
| 4 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 46.35 | 115.12±12.87 |
| 5 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 14.83 | 36.83±14.54 |
| 6 | สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 33.30 | 82.72±15.48 |
| 7 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 33.96 | 84.34±6.84 |
| 8 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 49.17 | 122.14±30.59 |
| 9 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 37.00 | 91.90±20.51 |
| 10 | สารสกัดหยาบกวาวเครือด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 18.09 | 44.92±12.53 |

**ตารางที่** 12.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของตัวอย่างต่อเอนไซม์ tyrosinase (ต่อ)

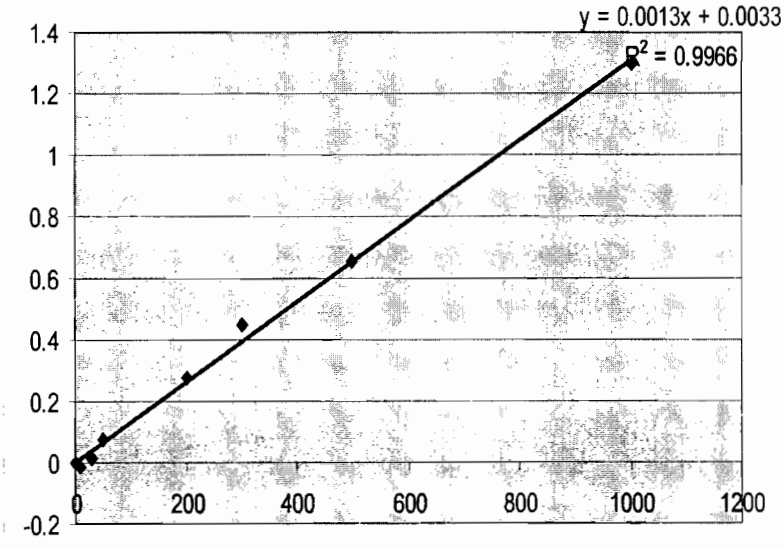
| ลำดับ | ตัวอย่าง | ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase (ug/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 11 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 13.09 | 32.51±18.52 |
| 12 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 68.96 | 171.27±11.25 |
| 13 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 45.48 | 135.64±32.07 |
| 14 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate | 38.09 | 94.60±9.16 |
| 15 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 40.26 | 100.00±18.64 |
| 16 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 18.96 | 47.08±8.25 |
| 17 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 12.00 | 29.81±14.67 |
| 18 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml | 40.04 | 99.46±6.78 |
| 19 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 39.61 | 98.38±8.26 |
| 20 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | -* | - |
| 21 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 10.91 | 27.11±7.85 |
| 22 | Theophylline ความเข้มข้น 50 $\mu$g/ml | 67.00 | 146.86±19.50 |

**หมายเหตุ** *ปริมาณสารที่ได้มีน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ




**รูปที่** 12.4 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase

3. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู $B_{16}F_{10}$




**รูปที่**12.5 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin มาตรฐาน (mg/ml)

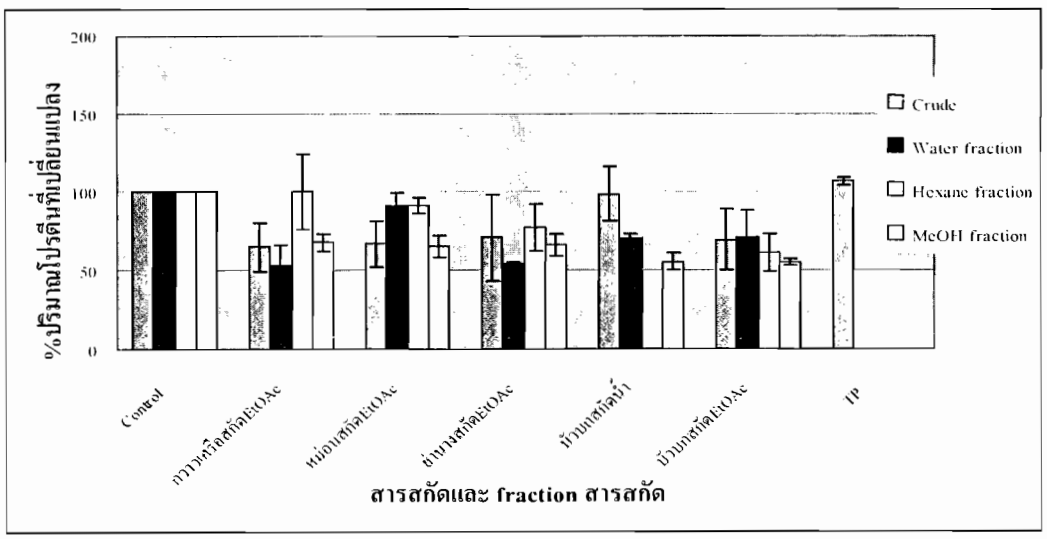
**ตารางที่** 12.3 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน

| ลำดับ | สาร | ปริมาณโปรตีน (mg/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (absolute ethanol + DMEM) | 2,221.69 | 100 |
| 2 | สารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 1,999.77 | 70.60±27.45 |
| 3 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 1,216.69 | 54.068±1.00 |
| 4 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 1,940.92 | 76.89±14.81 |
| 5 | fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 1,359.38 | 66.28±7.19 |
| 6 | สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 1,701.31 | 66.51±14.24 |
| 7 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 1,893.23 | 90.82±7.92 |
| 8 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 1,941.69 | 91.04±5.15 |
| 9 | fraction จากสารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 1,329.77 | 64.87±7.09 |
| 10 | สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ความเข้มข้น 1 mg/ml | 1,189.00 | 64.53±15.56 |
| 11 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 985.92 | 53.41±12.77 |
| 12 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 1,849.77 | 100.02±23.70 |
| 13 | fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 1,593.23 | 67.89±5.40 |
| 14 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate | 1,850.15 | 69.36±19.69 |
| 15 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 1,847.08 | 71.01±17.15 |
| 16 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | 1,535.92 | 60.82±11.75 |

**ตารางที่** 12.3 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน (ต่อ)

| ลำดับ | สาร | ปริมาณโปรตีน (mg/ml) | % การเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control |
|---|---|---|---|
| 17 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วย ethyl acetate โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 1,250.92 | 54.84±2.07 |
| 18 | สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml | 1,904.00 | 98.20±17.68 |
| 19 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดยน้ำ ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 1) | 1,605.92 | 69.55±3.87 |
| 20 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย hexane ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 2) | -* | - |
| 21 | fraction จากสารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ โดย methanol ความเข้มข้น 1 mg/ml (fraction ที่ 3) | 1,144.00 | 55.31±5.40 |
| 22 | Theophylline ความเข้มข้น 50 $\mu$g/ml | 1,981.88 | 146.86±19.50 |

**หมายเหตุ** *ปริมาณสารที่ได้มีน้อย ไม่พอสำหรับการทดสอบ




**รูปที่** 12.6 กราฟแสดงผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อปริมาณโปรตีน

## อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่า สารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ (ร้อยละ100.86±3.8) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน

ได้แก่ fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 112.99±8.93) และ fraction จากสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 103.82±19.60)

2. การศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase พบว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane ซึ่งเป็น fraction ที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase สูงสุด (ร้อยละ 171.27±11.25) ในขณะที่สารสกัดหยาบบัวบกด้วยน้ำ ซึ่งเป็นสารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ มีฤทธิ์ของเอนไซม์ต่ำกว่าเซลล์กลุ่มควบคุม (ร้อยละ 99.46±6.78) ส่วน fraction จากสารสกัดหยาบอีก 2 ตัวโดย hexane ที่มีฤทธิ์ของเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ สารสกัดหยาบหม่อนด้วย ethyl acetate และสารสกัดหยาบย่านางด้วย ethyl acetate (ร้อยละ 122.14±30.59 และ 115.12±12.87 ตามลำดับ)

3. การศึกษาปริมาณโปรตีน พบว่า ทุกสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบมีจำนวนโปรตีนภายในเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม

4. สารมาตรฐาน theophylline ในความเข้มข้น 50 /g/ml ซึ่งใช้เป็น positive control พบว่า theophylline สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้สูงกว่าสารสกัดหยาบและ fraction จากสารสกัดหยาบ ในร้อยละ 144.81±5.07 แต่สารมาตรฐานมีฤทธิ์ของเอนไซม์ tyrosinase ต่ำกว่า fraction จากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate โดย hexane (ร้อยละ 146.86±19.50)

5. Fraction จากสารสกัดมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินสูงกว่าสารสกัดหยาบ อาจเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการ fraction สามารถละลายสารสำคัญออกจากสารสกัดหยาบและทำให้สารสำคัญออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดรวมกันอยู่

**เอกสารอ้างอิง**

1. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nazawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. Biorg Med Chem. 2007; 15:4897-902.

2. ชวนพิศ ดีเอกนามกูล. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน. ใน: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. หน้า 3.5-3.6.

3. Bradford protein assay procedure. Available from: URL: http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Bradford.html (cited 2009, Sep 16)

# ภาคผนวกที่ 13

## การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม

## การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม

**วัตถุประสงค์** เพื่อเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ในนีโอโซม

**วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี**

1. ขวดก้นกลม
2. บีกเกอร์
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า
4. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ
5. เครื่อง Ultrasonic probe
6. หลอด centrifuge ขนาด 50 มล.
7. เครื่อง centrifuge
8. water bath
9. สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาว fraction2
10. Tween 61
11. Cholesterol
12. Chloroform
13. น้ำกรอง

**วิธีการเตรียม** (เตรียม 100 กรัม ด้วยอัตราส่วน Tween 61 / Cholesterol = 1.1)

1. ชั่ง Tween 61 และ Cholesterol ใส่ในขวดก้นกลมละลายด้วย 50 ml. ของ chloroform
2. ชั่งสารสกัดกวาวเครือขาว fraction2 ปริมาณ 2.0 กรัมละลายด้วย chloroform10มล.ผสมลงในสารละลายข้อ1
3. ระเหยเอา chloroform ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศอุณหภูมิ 50°C จนหมด กระจายตัวฟิล์มด้วยน้ำกรอง 100 มล. หมุนใน water bath อุณหภูมิ 50°C จนกระจายตัวหมด
4. นำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องUltrasonic probe นาน10นาที
5. นำไป centrifuge 5000 rpm นาน1นาที
6. แบ่งบรรจุขวดเพื่อนำไปศึกษาความคงตัวทางเคมีและกายภาพและทดสอบการซึมผ่านรูขุมขนทางผิวหนังเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาว fraction2 2% ในpropylene glycol

**ผลการทดลอง**

นีโอโซมที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอนสีขาวขุ่นและไม่ตกตะกอน

# ภาคผนวกที่ 14

## การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

# การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

## ตอนที่ 1: การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

### บทนำ

การนำสารจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์มักเกิดปัญหาความไม่คงตัว มีกลิ่นหรือมีรสชาติไม่ดี ก่อการระคายเคือง ไม่ติดผิว ไม่ละลายน้ำ ดูดซึมผ่านผิวหนังไม่ดี มีปัญหาความไม่เข้ากันกับส่วนประกอบต่างๆ ในตำรับและหมดฤทธิ์เร็ว ในปัจจุบัน มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ต่างๆมาใช้ในการแก้ปัญหา เช่น การใช้เทคโนโลยีเอนแคปซูเลชัน ได้แก่ การนำแคปซูลขนาดเล็ก ถุงขนาดนาโน (ไลโปโซมและนีโอโซม) และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเด็กซ์ตริน (cyclodextrin) เป็นต้น มาเก็บกักสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่างๆ ในอนุภาคเหล่านี้แล้วนำมาผสมเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความคงตัวของสารสกัดและผลิตภัณฑ์

นีโอโซม (niosomes) เป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นถุงกลมที่เก็บกักสารละลายน้ำไว้ภายในช่องตรงกลางเช่นเดียวกับไลโปโซม และเก็บกักสารละลายไขมันในผนังนีโอโซมโดยผนังนีโอโซมประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) ซึ่งมีราคาถูกกว่าฟอสโฟลิพิดที่ใช้เตรียมไลโปโซม นอกจากนี้นีโอโซมยังมีความคงตัวกว่าและมักมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าไลโปโซม

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความคงตัวทางกายภาพ (การแยกชั้น สี กลิ่น ค่าความเป็นกรดด่าง ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า) ของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ [4°C, อุณหภูมิห้อง (27±2°C) และ 45°C] เป็นเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกับเมื่อเวลาเริ่มต้น

### สารตัวอย่าง

1. นีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซน
2. สารละลาย 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol
3. นีโอโซมเปล่า

**สารเคมี**

1. Distilled water (NPRDC, Chiang Mai University, Thailand)

**เครื่องมือ/อุปกรณ์**

1. Particle size analyzer (Zetasizer ZS, Malvern, England)
2. Microcentrifuge tube (Eppendorf, Hamburg, Germany)
3. Micropipettes (BIO-RAD, Milan, Italy)
4. Automatic balance 4 digits (Satoruis, Canada)
5. Vortex mixers (Scientific industry, USA)
6. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)
7. Insulin syringe (Nipro corp., Osaka, Japan)
8. Tissue paper (Scott, Thailand)
9. pH-indicator strips (Merck, England)

**วิธีการทดลอง**

แบ่งนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัด นีโอโซมเปล่า และสารสกัดที่ละลายใน propylene glycol

ใส่ขวดแก้ว ปิดฝาให้แน่นสนิท

↓

ประเมินลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง

ประเมินลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างได้แก่ สี กลิ่น และการแยกชั้น ด้วยตาเปล่า และวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้กระดาษลิตมัส (litmus)

ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 50 µl ลงใน microcentrifuge tube แล้วเจือจางด้วย distilled water ปริมาตร 1,450 µl และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex แล้ววัดขนาดอนุภาค (nm±SD) และค่าศักย์ซีต้า

ประเมินเป็นเวลา 3 เดือนโดยให้:

T0 คือ เวลาเริ่มต้นหลังจากเตรียมเสร็จทันที

T1 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน

T2 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน

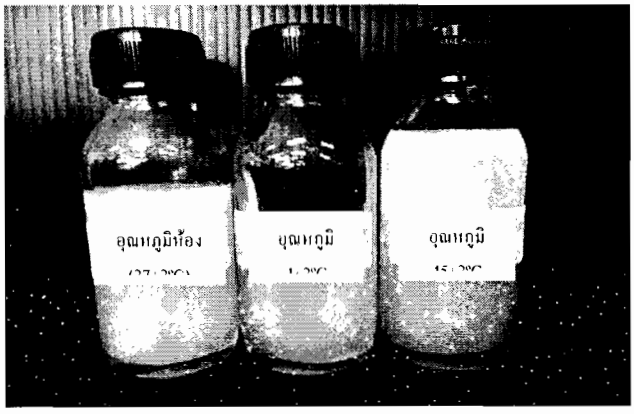
T3 คือ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

**ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง**

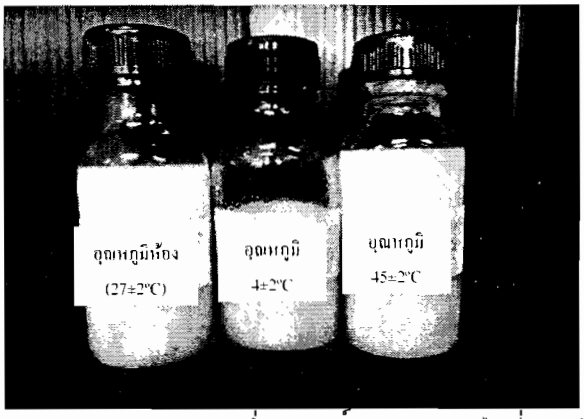
จากผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 %(w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol พบว่านีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่ามีความคงตัวทางกายภาพ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และไม่เกิดการแยกชั้น ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน แต่สารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนที่ละลายใน propylene glycol ไม่มีความคงตัวทางกายภาพ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองซีด และขุ่น กลิ่นเหม็นหืน และเกิดการตะกอนเล็กน้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (วัดด้วยกระดาษลิตมัส) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) และ 4±2°C ส่วนที่อุณหภูมิ45±2°C ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แต่มีกลิ่นเหม็นหืน และเกิดการตะกอนเล็กน้อย และค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (วัดด้วยกระดาษลิตมัส) เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน ดังแสดงใน**รูปที่** 14.1 – 14.3 และ**ตารางที่** 14.1 – 14.3 เมื่อวัดขนาดอนุภาค (nm) พบว่านีโอโซมมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) และ 4±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน ขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดอนุภาคลดลงน้อยกว่านีโอโซมเปล่า ในขณะที่อุณหภูมิ 45±2°C ขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดลดลง แต่ขนาดอนุภาคของนีโอโซมเปล่าเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของตัวอย่างนีโอโซมทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบ นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีค่าศักย์ซีต้าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า ซึ่งมีค่าศักย์ซีต้าลดลง แต่ที่อุณหภูมิ 4±2°C และ 45±2°C นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีค่าศักย์ซีต้าลดลง แต่นีโอโซมเปล่ามีค่าเป็นลบเพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากเมื่อเวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจากนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือเกิดการสลายตัว เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูง (45±2°C) เป็นเวลานาน ดังแสดงใน**ตารางที่** 14.1 – 14.3 และ**รูปที่** 14.4 – 14.9 ทั้งนี้การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิต่ำ (4±2°C) ช่วยชะลอการเพิ่มขนาดอนุภาคนีโอโซมได้ดีกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง (45±2°C) นีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่านีโอโซมเปล่าประมาณ 1 เท่า และมีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบใกล้เคียงกับนีโอโซมเปล่า อย่างไรก็ตาม การเก็บนีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนและนีโอโซมเปล่าไว้ที่

พลงหน รายงานฉบับสมบูรณ์ รวมไฟล์ รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยที่ 3.ง.๙(A,N)

อุณหภูมิห้อง (27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน นีโอโซมยังมีความคงตัวทางกายภาพหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย




**รูปที่** 14.1 นีโอโซมเปล่า ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน




**รูปที่** 14.2 นีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วย เฮกเซน ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

**รูปที่** 14.3 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซน ละลายใน propylene glycol ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน

**ตารางที่** 14.1 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27± 2°C) เป็นเวลา 3 เดือน

| ตัวอย่าง | T0 (0 เดือน) | | | | | | T1 (1 เดือน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 152.20 ± 10.22 | -29.03 ± 1.77 | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 97.25±2.00* | -40.07±1.89* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 196.53 ± 2.76 | -56.30 ± 1.61 | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 180.90±1.97* | -49.80±1.56* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |
| ตัวอย่าง | T2 (2 เดือน) | | | | | | T3 (3 เดือน) | | | | | |
| | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 106.63±1.80* | -40.63±1.27 | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 104.17±0.95* | -37.10±1.23* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 195.93±4.19 | -42.20±0.92* | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 199.45±5.23* | -39.61±4.14* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อน ขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |

**หมายเหตุ** : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่** 14.2 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 2°C เป็นเวลา 3 เดือน

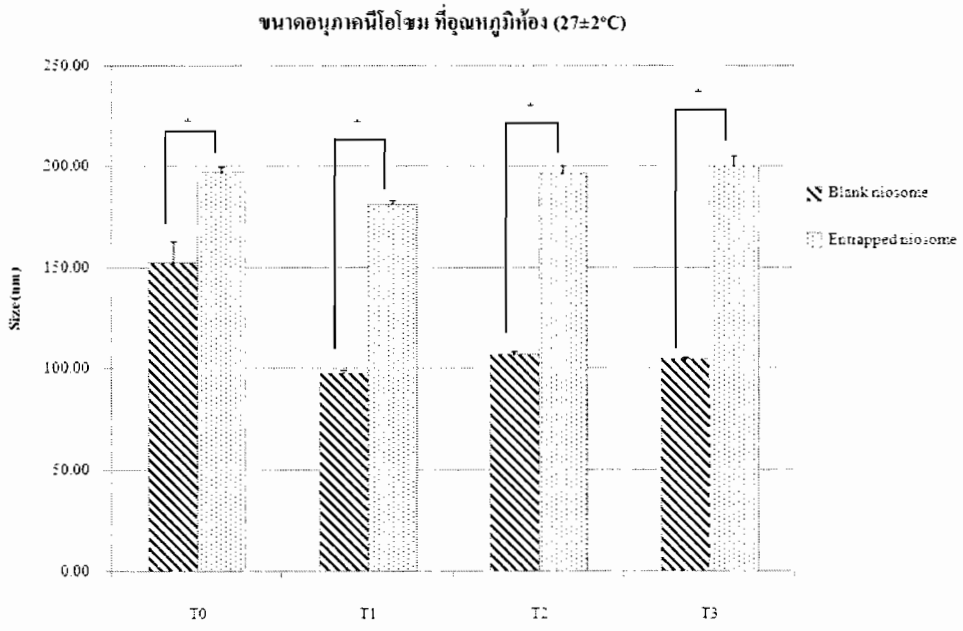
| ตัวอย่าง | T0 (0 เดือน) | | | | | | T1 (1 เดือน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 152.20 ± 10.22 | -29.03 ± 1.77 | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 103.10±1.11* | -44.67±4.15* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 196.53 ± 2.76 | -56.30 ± 1.61 | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 176.57±4.55* | -51.6±1.85 |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |
| ตัวอย่าง | T2 (2 เดือน) | | | | | | T3 (3 เดือน) | | | | | |
| | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 108.3±0.95* | -40.87±1.46* | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 185.33±1.36* | -45.50±0.46* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 182.80±1.18* | -46.93±1.00* | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 516.10±63.54* | -16.83±0.61* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |

**หมายเหตุ** : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

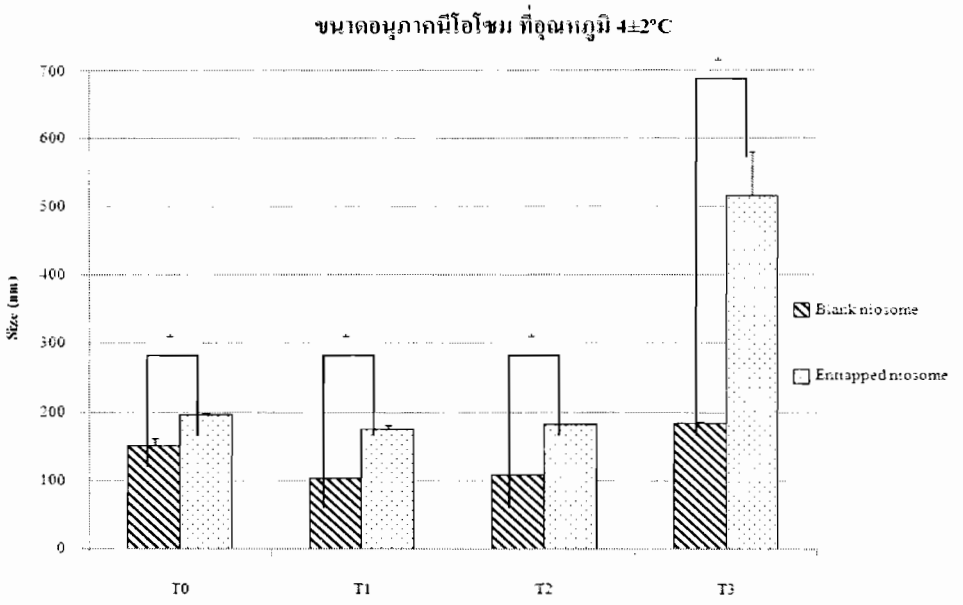
**ตารางที่** 14.3 ลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซน เปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2°C เป็นเวลา 3 เดือน

| ตัวอย่าง | T0 (0 เดือน) | | | | | | T1 (1 เดือน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) | สี | กลิ่น | pH | แยกชั้น | ขนาดอนุภาค (nm) | ศักย์ไฟฟ้า (mV) |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 152.20 ± 10.22 | -29.03 ± 1.77 | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 193.17±4.12* | -42.53±1.99* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 196.53 ± 2.76 | -56.30 ± 1.61 | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 174.57±0.85* | -47.43±1.50* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |
| **ตัวอย่าง** | **T2 (2 เดือน)** | | | | | | **T3 (3 เดือน)** | | | | | |
| | **สี** | **กลิ่น** | **pH** | แยกชั้น | **ขนาดอนุภาค (nm)** | **ศักย์ไฟฟ้า (mV)** | **สี** | **กลิ่น** | **pH** | แยกชั้น | **ขนาดอนุภาค (nm)** | **ศักย์ไฟฟ้า (mV)** |
| นีโอโซมเปล่า | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 260.47±2.96* | 3.37±2.70* | ขาวขุ่น | ไม่มีกลิ่น | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 253.83±10.14* | -33.98±1.63* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 169.47±5.07* | 37.30±2.23* | ขาวขุ่นอมน้ำตาลอ่อน | เขียวและฉุน | 5.0 | ไม่แยกชั้น | 178.43±88.16* | -36.80±0.98* |
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่ละลายใน propylene glycol | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - | เหลืองอ่อนขุ่นเล็กน้อย | propylene glycol | 5.0 | ไม่แยกชั้น | - | - |

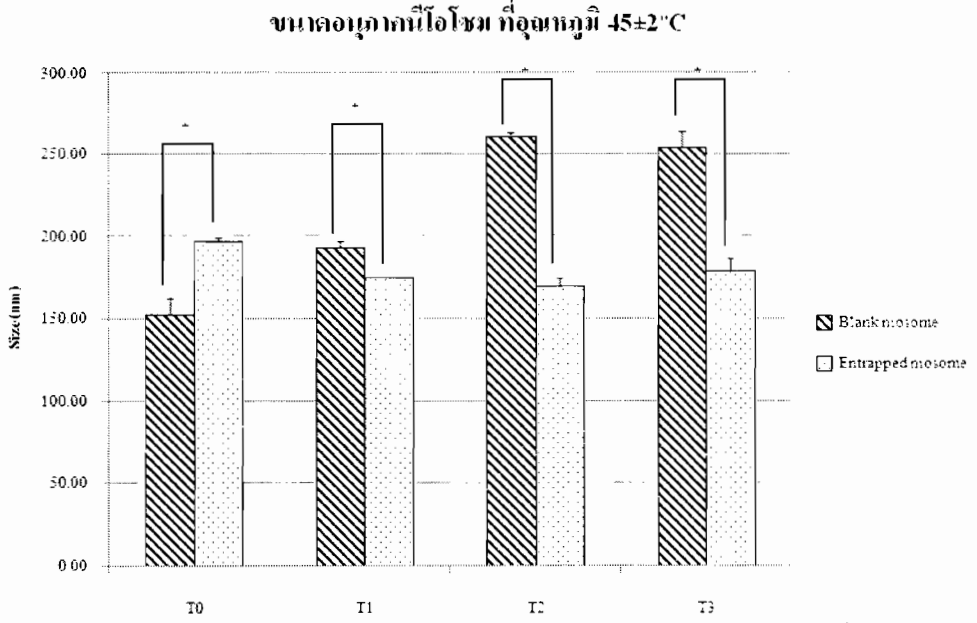
**หมายเหตุ** : * แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (T0) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



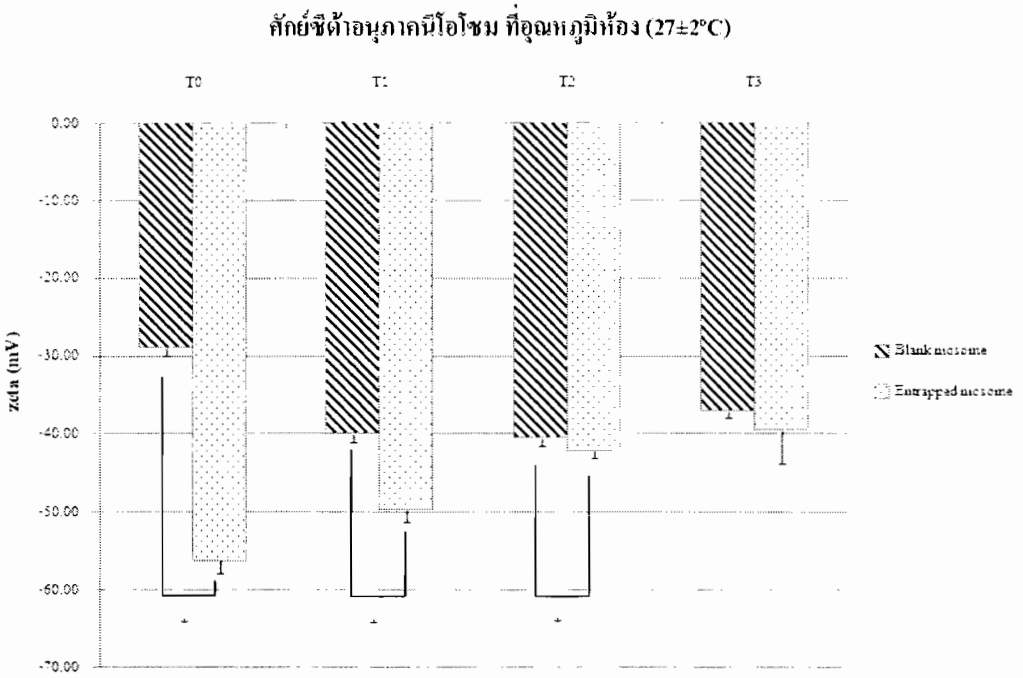

**รูปที่** 14.4 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) เป็นเวลา 3 เดือน



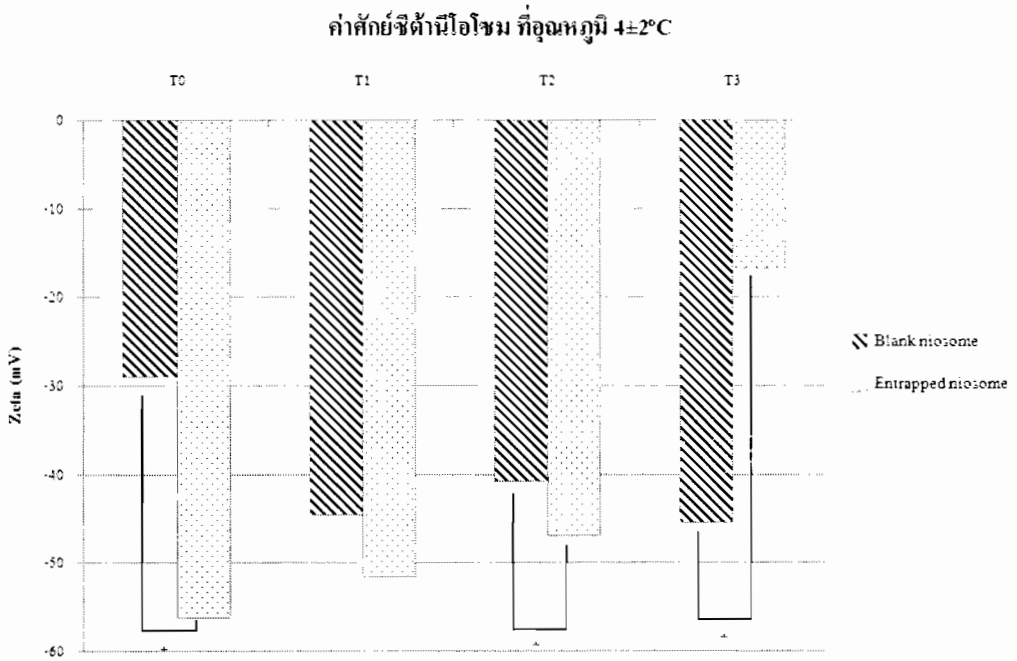

**รูปที่** 14.5 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2°C เป็นเวลา 3 เดือน



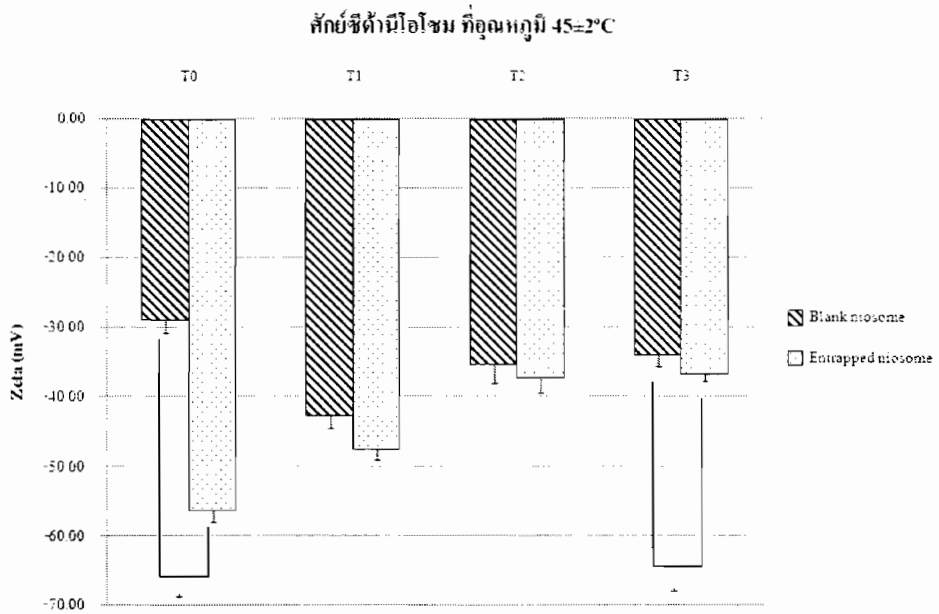

**รูปที่** 14.6 ขนาดอนุภาค (nm) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45±2°C เป็นเวลา 3 เดือน




**รูปที่** 14.7 ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง; 27±2°C เป็นเวลา 3 เดือน




**รูปที่** 14.8 ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2°C เป็นเวลา 3 เดือน




**รูปที่** 14.9 ค่าศักย์ซีต้า (mV) ของของนีโอโซมที่เก็บกัก 2% (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตต ที่ partition ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับนีโอโซมเปล่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45±2°C เป็นเวลา 3 เดือน

**สรุปผลการทดลอง**

จากผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพพบว่านีโอโซมที่เก็บกัก 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซน และนีโอโซมเปล่า มีความคงตัวทางกายภาพมากกว่าสารละลาย 2 % (w/v) สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนละลายใน propylene glycol ทั้งเก็บในอุณหภูมิห้อง(27±2°C), 4±2°C และ 45±2°C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน นอกจากนี้การเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตที่ partition ด้วยเฮกเซนในนีโอโซมทำให้สารสกัดมีความคงตัวทางกายภาพเพิ่มขึ้น โดยไม่เกิดการแยกชั้น มีค่าความเป็นกรดด่าง กลิ่น และสี ไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 3 เดือน แต่ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 45±2°C จึงควรเก็บตัวอย่างให้พ้นแสงหรือในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4±2°C)

**เอกสารอ้างอิง** :


1. Manosroi, A., Chutoprapat, R., Masahiko., A., Manosroi, W., and **Manosroi, J.** (2011) Anti-aging efficacy of topical formulations containing niosomes entrapped with rice bran bioactive compounds, **Pharmaceutical biology**, in press.
2. Manosroi, A.,Chutoprapat, R., Sato, Y., Miyamoto, K., Hsueh, K., Abe, Masahiko., Manosroi, W., and **Manosroi, J.** (2010), Antioxidant Activities and and Skin Hydration Effects of Rice Bran Bioactive Compounds Entrapped in Niosomes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 10**: 1-9.

**ตอนที่ 2: การศึกษาความคงตัวทางเคมีของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2**

**สารตัวอย่าง**

1. นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2
2. สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol

**สารเคมี**

1. Acetonitrile (Labscan, Bangkok, Thailand)
2. Acetic acid (Labscan, Bangkok, Thailand)
3. Methanol (Labscan, Bangkok, Thailand)
4. Linoleic acid (Tokyo Chemical Industrial, Tokyo, Japan)

**เครื่องมือ/อุปกรณ์**

2. Micro centrifuge tube (Eppendorf, Hamburg, Germany)
3. Micropipettes (BIO-RAD, Milan, Italy)
4. เครื่อง Centrifuge (Hettich Zentrifugen Universal 32R, Kirchkengern, Germany)
5. Volumetric flask (Pyrex, Asbash, Germany)
6. Beaker (Pyrex, Asbash, Germany)

**วิธีการทดลอง**

**HPLC condition สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของ linoleic acid**

| | | |
|---|---|---|
| HPLC | : | LC 1200 UV/VIS Detector, LC 1100 HPLC Pump |
| Column | : | Luna C18 10 micron 250×4.0 mm "Phenomenex U.S.A" |
| Mobile phase | : | 0.1% acetic acid in acetonitrile /water (95:5) |
| Flow rate | : | 1 ml/min |
| Detection | : | 205 nm. |

**การเตรียมสารมาตรฐาน**

**วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน**

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐาน 0.010 g ละลายใน mobile phase ปริมาตร 1 ml

↓

นำสารละลายไป centrifuge 7,000 rpm เป็นเวลา 10 min

↓

ดูดสารละลายใสออกมา 100 ไมโครลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ml (1 mg/ml)

↓

นำสารละลายไป centrifuge 7,000 rpm เป็นเวลา 10 min

↓

นำสารละลายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml

นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดปริมาณ 20 ไมโครลิตร

↓

นำ peak area ที่ได้มาสร้าง standard curve

**วิธีการเตรียมตัวอย่างสารสกัด**

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 100 mg

↓

นำไปละลายใน methanol ปริมาตร 1 ml

↓

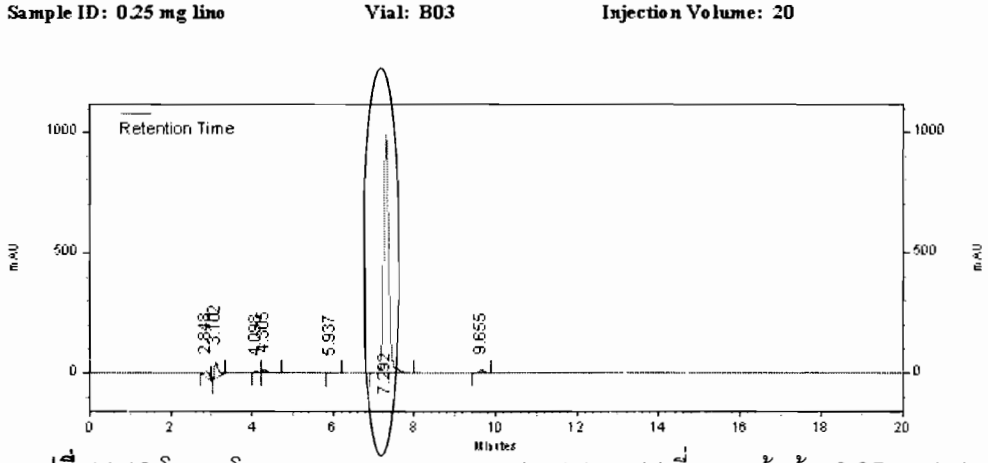
นำสารละลายไป centrifuge 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min

↓

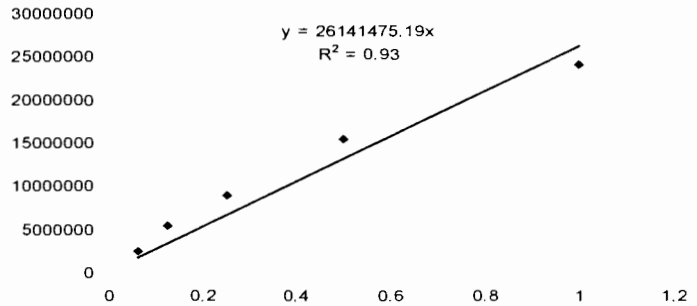
นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดปริมาณ 20 ไมโครลิตร

**ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของ** linoleic acid

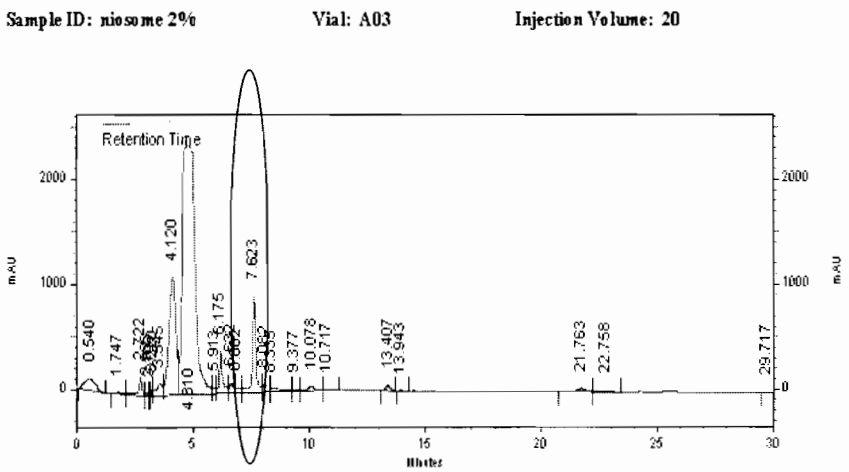
สารมาตรฐาน linoleic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้โครมาโทแกรมดัง**รูปที่** 14.10 นำพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน linoleic acid ที่นำไปวิเคราะห์มาสร้างกราฟมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานดัง**รูปที่** 14.11 แล้วนำสมการของกราฟมาตรฐานที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ **รูปที่** 14.12 แสดงโครมาโทแกรมของนิโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2




**รูปที่** 14.10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน linoleic acid ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml




**รูปที่** 14.11 calibration curve ของสารมาตรฐาน linoleic acid




**รูปที่** 14.12 โครมาโทแกรมของนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ที่เวลาเริ่มต้น

**ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในตัวอย่าง**

จากโครมาโทแกรมใน**รูปที่ 14.12** ที่ retention time = 7.623 มี peak area = 2968972

แทนค่าลงในสมการจาก calibration curve: y = 26141475.19x

เมื่อ y=2968972 จะได้ x= 0.11 mg/ml

ฉีดสารละลายนีโอโซม 20 µL

ในสารละลายนีโอโซม 1000 µl จะมี linoleic acid เท่ากับ 0.11 mg

นำสารละลายนีโอโซมไปฉีด 20 µl จะมี linoleic acid เท่ากับ 0.0022 mg

เตรียมสารละลายนีโอโซม 100 mg/ml

ในตัวทำละลาย 1000 µl มีนีโอโซม 100 mg

เมื่อนำไปฉีด 20 µl มีนีโอโซม 2 mg

ดังนั้น นีโอโซม 2 mg มี linoleic acid 0.0022 mg

นีโอโซม 100 mg จะมี linoleic acid 0.11 mg

จากการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ในนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ที่เวลาเริ่มต้นพบว่ามีปริมาณ linoleic acid เท่ากับ 0.11% สำหรับตัวอย่างอื่นๆสามารถคำนวณได้เช่นเดียวกัน ผลการคำนวณหาปริมาณ linoleic acid ได้แสดงไว้ใน**ตารางที่** 14.4

**ตารางที่** 14.4 ปริมาณ linoleic acid ในนีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือน

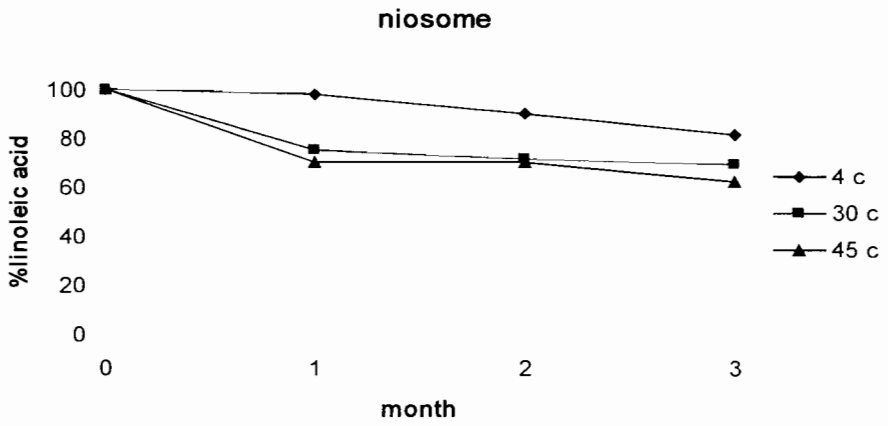
| **ตัวอย่าง** | **อุณหภูมิ** | linoleic acid (mg/100 g) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **เริ่มต้น** | 1 **เดือน** | 2 **เดือน** | 3 **เดือน** |
| นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก | 4 ± 2 °C | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.09 |
| กวาวเครือ | 30 ± 2 °C | 0.11 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| fraction 2 | 45 ± 2 °C | 0.11 | 0.08 | 0.08 | 0.07 |
| สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก | 4 ± 2 °C | 0.10 | 0.06 | 0.04 | 0.04 |
| กวาวเครือ | 30 ± 2 °C | 0.10 | 0.05 | 0.04 | 0.04 |
| fraction 2 ใน propylene glycol | 45 ± 2 °C | 0.10 | 0.05 | 0.04 | 0.03 |

นำปริมาณ linoleic acid มาคิดเป็นเปอร์เซ็นของ linoleic acid ที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับปริมาณ linoleic acid เริ่มต้นที่ช่วงเวลาต่างๆเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือนได้แสดงไว้ใน **ตารางที่** 14.5

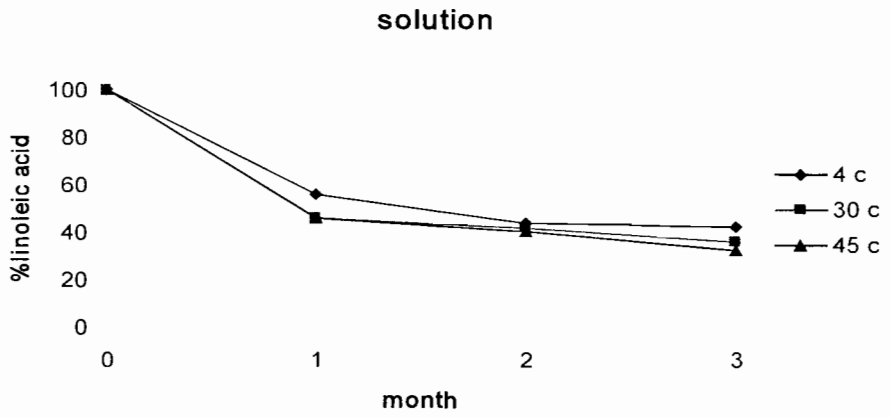
**ตารางที่** 14.5 เปอร์เซ็นของ linoleic acid ที่เหลืออยู่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ linoleic acid เริ่มต้นใน นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 3 เดือน

| ตัวอย่าง | อุณหภูมิ | % linoleic acid ที่เหลืออยู่ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | เริ่มต้น | 1 เดือน | 2 เดือน | 3 เดือน |
| นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 | $4 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 97.64 | 90.12 | 81.76 |
| | $30 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 74.89 | 71.47 | 69.38 |
| | $45 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 69.75 | 69.69 | 62.04 |
| สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ใน propylene glycol | $4 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 55.87 | 43.91 | 42.50 |
| | $30 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 45.37 | 41.69 | 35.85 |
| | $45 \pm 2\ ^{0}C$ | 100.00 | 45.63 | 39.93 | 32.12 |

จากกราฟ**รูปที่ 14.13-14.14** พบว่าที่เวลาผ่านไป 3 เดือนในนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือfraction 2 มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่มากกว่า 60 % ในทุกอุณหภูมิ และที่อุณหภูมิ $4 \pm 2$ องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนในสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2ใน propylene glycol มีเปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50% ตั้งแต่เดือนแรกทั้ง 3 อุณหภูมิ ดังนั้นการเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือfraction 2 ในนีโอโซมจึงเป็นการเพิ่มความคงตัวให้กับ linoleic acid ที่มีอยู่ในสารสกัดกวาวเครือfraction 2 ได้โดยเฉพาะการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4 \pm 2$ องศาเซลเซียส




**รูปที่** 14.13 เปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลืออยู่ในนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือfraction 2 เก็บที่อุณหภูมิ 4, 30และ45 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาเริ่มต้น 1, 2 และ 3 เดือน




**รูปที่** 14.14 เปอร์เซ็นต์ linoleic acid ที่เหลือในสารละลายสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2ในpropylene glycol เก็บที่อุณหภูมิ 4, 30และ45 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาเริ่มต้น 1, 2 และ 3 เดือน

## สรุปผลการทดลอง

เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ(4 $\pm$ 2 , 30 $\pm$ 2 และ 45 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) 3 เดือน พบว่านีโอโซมที่เก็บกักสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือfraction 2 มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากกว่า 60% ทุกอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 81.76% ส่วนสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2ใน propylene glycol มีปริมาณ linoleic acid ที่เหลืออยู่น้อยกว่า 50%โดยที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส มีปริมาณ linoleic acid เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 42.50%

## เอกสารอ้างอิง

1. Aranya Manosroi, Warintorn Ruksiriwanich, Masahiko Abe, Hideki Sakai, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi., Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid, Journal of Supercritical Fluids, 54, 137–144, 2010

# ภาคผนวกที่ 15

## การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม

## การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือที่เก็บกักในนีโอโซม โดยวิธี Franz diffusion cell และใช้เทคนิค follicular closing technique ปิดรูขุมขนบนผิวหนังของหมู และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน linoleic acid โดย HPLC

### 2. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

#### 2.1 วัสดุและอุปกรณ์

- Franz diffusion cell (diffusion cells and systems, Permegear, USA)
- Centrifuge (Univeral 32 R, Hettich Zentrifugen, Germany)
- Stainless scissors (Mira, Germany)
- Forcep (Mira, Germany)
- Transfer-pipette (Brand, Wertheim, Germany)
- Vortex (Scientific Industries, New York, U.S.A.)
- Sonicate bath (Tru-sweep, Crest ultrasonic, Malaysia)
- Analytical balance (Precisa gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland)

#### 2.2 สารเคมี

- น้ำยาทาเล็บ (Lab 2000, Samutprakarn, Thailand)
- Acetonitrile (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- Linoleic acid standard (Sigma Co, St. Louis, Mo, USA)
- Acetic acid (Lab Scan, Bangkok, Thailand)
- Distilled water

### 3. ผิวหนังที่นำมาทดสอบ

ผิวหนังของลูกหมูบริเวณด้านหลัง โดยใช้ลูกหมูที่มีอายุไม่เกิน 7 วัน น้ำหนักไม่เกิน 2 กิโลกรัม เมื่อตายแล้วต้องแช่เย็นเพื่อเตรียมนำมาใช้ทำแลบ (ฟาร์มเบทาโกร อ.บ้านโฮ่ง จ.ลำพูน)

4. **ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ**

1. นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 (fraction 2)
2. สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 (fraction 2)

5. **วิธีการทดลอง** [1]

**5.1 การเตรียมผิวหนังของลูกหมู**

นำผิวหนังด้านหลังของลูกหมูมาเลาะเอาชั้นไขมันออกจนหมด เก็บใน Incomplete DMEM ที่ 4 °C เมื่อต้องการใช้จึงนำออกมาล้างในน้ำกลั่น โกนขนออกจนหมด และเปิดรูขุมขนบนผิวหนังทั้งหมดโดยใช้กาวตราช้าง หยดลงบนผิวหนังแล้วใช้แผ่นสไลด์ปิดลงบนผิวหนัง ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วจึงดึงแผ่นสไลด์ออก

**5.2 การปิดรูขุมขนโดยใช้** follicular closing technique

นำสีทาเล็บมาปิดบนรูขุมขนแต่ละรู พร้อมกับนับจำนวนรูขุมขนที่ทำการบล็อกไว้ [2] โดยบล็อกจนหมดทั้งพื้นที่ที่กำหนดไว้ (ขนาดประมาณ 3x3 ซม.) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที และนับจำนวนรูขุมขนของผิวหนังอีกแผ่นหนึ่งที่มีพื้นที่เท่ากับแผ่นที่บล็อกไว้ ผิวหนังที่มีจำนวนรูขุมขนใกล้เคียงกับแผ่นแรก จะนำมาจับคู่กันเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**5.3 การศึกษาการนำส่งผ่านสารทางรูขุมขน**

การนำส่งผ่านสารทางรูขุมขนของสารตัวอย่างโดย vertical Franz diffusion cells ซึ่งทำการศึกษาเป็นคู่ เพื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านของสารผ่านทางผิวหนังที่มีการปิดกั้นรูขุมขนและไม่ได้ปิดกั้น ผลต่างของการซึมผ่านระหว่างผิวหนังคู่นี้จึงเป็นปริมาณสารที่สามารถผ่านทางรูขุมขน โดยสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ นีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 และสารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2

ผิวหนังแต่ละคู่ที่ทำการปิดกั้นรูขุมขนและนับจำนวนรูขุมขนของผิวหนังแต่ละคู่ไว้แล้ว จะถูกนำมาขึงบน Franz diffusion cells และทำการล็อกไว้โดยใช้ donor โดยหันด้าน dermis ให้สัมผัสกับ PBS (pH 7.4 ) ที่อยู่ใน receiver จากนั้นใส่สารตัวอย่างปริมาณ 500 ul ลงไปบนผิวหนังในช่อง donor ของ Franz diffusion cells เปิด magnetic bar เพื่อให้มีการไหลเวียนของ PBS ภายใน receiver (100 rpm) และควบคุมอุณหภูมิของ receiver ไว้ที่ 37 ± 2°C จากนั้นเมื่อครบเวลา 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง จึงหยุดการทดลองของผิวหนังแต่ละคู่ ดูดสารตัวอย่างที่เหลืออยู่ด้านบนออก คลายล็อกที่ยึด donor ไว้ นำผิวหนังที่ผ่านการทดลองแล้วมาล้างในน้ำกลั่น ซับให้แห้ง strip สาร

ตัวอย่างที่เหลือบนผิวหนังออก 1 ครั้ง โดยใช้เทป (3M Scotch MagicTM) และน้ำหนักกดทับประมาณ 300 กรัม นาน 10 วินาที

**5.4 การสกัดกรดไขมัน linoleic acid จากผิวหนังที่ผ่านการทดลอง**

นำผิวหนังไปสกัดเอากรดไขมัน linoleic acid ที่ใช้เป็น marker ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 โดยใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดย่อยหนังบริเวณที่มีการซึมผ่านของสารตัวอย่าง แล้วสกัดกรดไขมัน linoleic acid โดยใช้สารละลายที่ใช้สกัด 1 ml ซึ่งประกอบด้วย 10 % triton-X100 500 ul และ mobiie phase (95% acetonitriile +0.1 % acetic acid) 500 ul โดยนำไป sonicate นาน 10 นาที นำมากรองให้ได้สารละลายใส จากนั้นจึงไปวิเคราะห์โดย HPLC

**5.5 การสกัดกรดไขมัน linoleic acid จาก receiver**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองแต่ละคู่ของผิวหนัง ดูดเอาสารละลายที่อยู่ใน receiver ออกมา นำไปแช่แข็งที่ - 40°C และนำไป freezed dry จนแห้ง จากนั้นนำมาละลายกลับด้วยสารละลายที่ใช้สกัด 1 ml ซึ่งประกอบด้วย 10 % triton-X100 จำนวน 500 ul และ mobile phase (95% acetonitrile +0.1 % acetic acid) จำนวน 500 ul และ vortex ให้ละลายจนหมด จากนั้นนำมากรองให้ได้สารละลายใส แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดย HPLC

**5.6 การวิเคราะห์กรดไขมัน linoleic acid โดย HPLC**

| | | |
|---|---|---|
| HPLC | : | LC 1200 UV/VIS Detector, LC 1100 HPLC Pump |
| Column | : | Luna C18 10 micron 250×4.0 mm "Phenomenex U.S.A" |
| Mobile phase | : | acetonitrile/distilled water ผสม 0.1% acetic acid |
| | | 95:5+0.1% acetic acid |
| Flow rate | : | 1 ml/min |
| Detection | : | 205 nm |

การคำนวณหาปริมาณสะสม (cumulative amounts) ค่าฟลั๊กซ์ (flux) และปริมาณสารที่ซึมผ่าน 1 รูขุมขน (transfollicular penetration per one hair follicle) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Cumulative amounts (ng/cm}^2\text{)} = \frac{(FA_{open} - FA_{block})}{2.46}$$

$$\text{Fluxes (ng/cm}^2\text{/hour)} = \frac{(FA_{open} - FA_{block})}{2.46 \times 6}$$

$$\text{Transfollicular penetration per one HF (ng/one HF)} = \frac{(FA_{open} - FA_{block})}{\text{numbers of HF}}$$

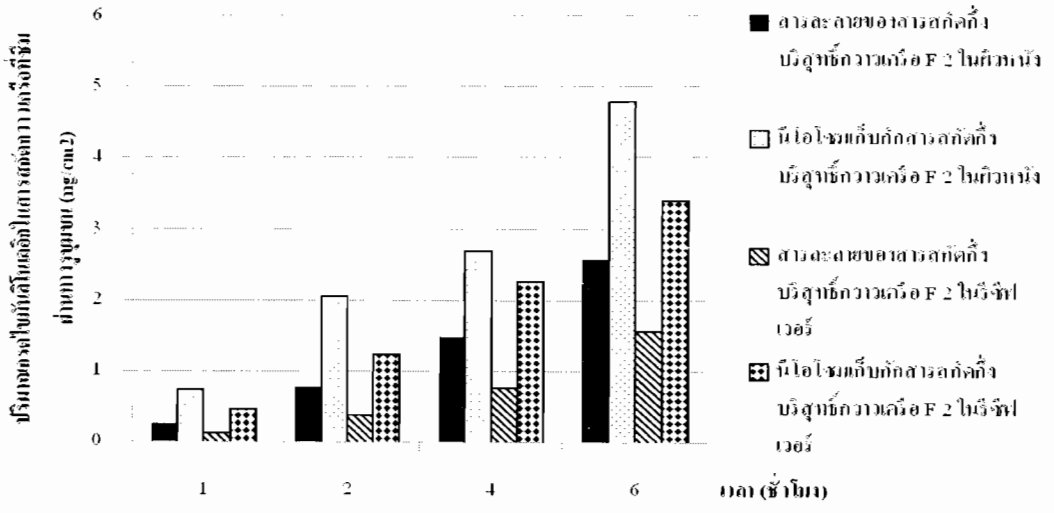
ซึ่ง $FA_{open}$ คือปริมาณของกรดไขมัน linoleic acid ในผิวหนังที่ไม่มีการปิดกั้นรูขุมขน $FA_{block}$ คือ ปริมาณของกรดไขมัน linoleic acid ในผิวหนังที่มีการปิดกั้นรูขุมขนและ HF คือ รูขุมขน (hair follicle)

**6. ผลการทดลอง**

จากการทดสอบการซึมผ่านของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 ที่อยู่ในนีโอโซม และสารละลาย พบว่า นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F 2 สามารถนำส่งสารสำคัญกรดไขมัน linoleic acid ได้ดีกว่า ในรูปแบบสารละลาย ดังแสดงใน**ตารางที่** 15.1 **และรูปที่** 15.1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารได้ เนื่องจากมีขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมในการผ่านทางรูขุมขน โดยพบว่า อนุภาคที่มีขนาดประมาณ 200 nm ซึ่งใกล้เคียงกับอนุภาคของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 สามารถซึมผ่านทางรูขุมขนได้ดีเท่ากับ อนุภาคขนาด 20 nm [3] และนีโอโซมยังมีองค์ประกอบที่มีสมบัติใกล้เคียงกับผิวหนัง โดยมีความเป็น non polar มากกว่ากรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการซึมผ่านมากขึ้นนอกจากนี้นีโอโซมยังช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 ด้วย เนื่องจากมีการเก็บกักสารสำคัญไว้ภายในอนุภาค ทำให้ลดการทำลายจากแสงและความร้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เมื่อเปรียบเทียบอัตราการซึมผ่านทางรูขุมขนของนีโอโซมที่อยู่ในผิวหนัง พบว่ามีปริมาณสะสม (4.785 ng/cm$^2$) ค่าฟลั๊กซ์ (0.797 ng/cm$^2$/h) และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขน 1 รูขุมขน (0.074 ng/ 1 hair follicle) มากกว่าในรูปแบบสารละลาย (2.577 ng/cm$^2$, 0.429 ng/cm$^2$/h และ 0.040 ng/ 1 hair follicle) โดยเฉลี่ยเป็น 1.86 เท่า ในทำนองเดียวกันกับในรีซีฟเวอร์ที่การซึมผ่านทางรูขุมขนของกรดไขมันที่เก็บกักในนีโอโซมดีกว่ารูปแบบสารละลาย แต่มีปริมาณสารน้อยกว่าที่อยู่ในผิวหนัง โดยมากกว่า 2.18 เท่า **ดังตารางที่** 15.1 เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับเวลาที่ใช้ในการซึมผ่าน พบว่า เมื่อเวลานานขึ้น สารตัวอย่างสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น ดัง**รูปที่** 15.1

**ตารางที่ 15.1 การซึมผ่านของสารผ่านทางรูขุมขนของ linoleic acid ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 ที่อยู่ในนีโอโซม และสารละลาย**

| สารตัวอย่าง | ผิวหนัง | | | รีซีฟเวอร์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ปริมาณสะสม (ng/cm2) | ค่าฟลักซ์ (ng/cm2/h) | ปริมาณการซึมผ่านใน 1 รูขุมขน (ng/number of HF) | ปริมาณสะสม (ng/cm2) | ค่าฟลักซ์ (ng/cm2/h) | ปริมาณการซึมผ่านใน 1 รูขุมขน (ng/number of HF) |
| สารละลายของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F 2 | 2.577 | 0.429 | 0.040 | 1.560 | 0.260 | 0.024 |
| นีโอโซมเก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F 2 | 4.785 | 0.797 | 0.074 | 3.408 | 0.568 | 0.052 |




**รูปที่ 15.1** ปริมาณสะสมของกรดไขมัน linoleic acid ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนของหนังหมู ที่เวลา 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ในผิวหนังและรีซีฟเวอร์

## 7. สรุปผลการทดลอง

นีโอโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญ (linoleic acid) ที่อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ F2 ได้ทั้งในผิวหนังและรีซีฟเวอร์ โดยมีปริมาณสะสม ค่าฟลักซ์ และปริมาณการซึมผ่านรูขุมขนใน 1 รูขุมขน มากกว่าในรูปแบบสารละลายโดยเฉลี่ย 1.86 และ 2.18 เท่า ตามลำดับ

## 8. เอกสารอ้างอิง

[1] A. Manosroi, W. Ruksiriwanich, M. Abe, W. Manosroi, J. Manosroi, Transfollicular enhancement of gel containing cationic niosomes loaded with unsaturated fatty acids in rice (*Oryza sativa*) bran semi-purified fraction Eur. J. Pharm. Biopharm., Submitted (2011).

[2] N. Otberg, A. Patzelt, U. Rasulev, T. Hagemeister, M. Linscheid, R. Sinkgraven, W. Sterry, L. J, The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine, Br. J. Clin. Pharmacol., 65 (2008) 488-492.

[3] R. Alvarez-Roman, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, Journal of Controlled Release, 99 (2004) 53-62.

# ภาคผนวกที่ 16

หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์ของโครงการวิจัย

โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณ

การใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์
## คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**หมายเลขโครงการ:** 38/2552

**ชื่อโครงการวิจัย:** การพัฒนาการเก็บกักสารสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคขนาดนาโน เพื่อใช้รักษาผมหงอกก่อนวัย

**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย** ศาสตราจารย์ อรัญญา มโนสร้อย

**สังกัด:** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ได้พิจารณาโครงการวิจัย แล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางการปฏิบัติเกี่ยวกับการใช้สัตว์ทดลองและจรรยาบรรณการใช้สัตว์สภาวิจัยแห่งชาติ

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมาได้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่ 29 กรกฎาคม 2553 และให้หมดอายุในวันที่ 30 ธันวาคม 2554

.....
( รองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร มรกต )
ประธานคณะกรรมการ
จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
วันที่ 29 ก.ค. 53

.....
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต)
คณบดี
วันที่ 4 ส.ค. 53

**ชื่อคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง ( 20 ตุลาคม 2552 – 19 ตุลาคม 2554 )**

| ชื่อ | คุณวุฒิ | สาขาวิชา | อยู่ในที่ประชุมพิจารณา |
|---|---|---|---|
| 1. รศ.ดร. นิมิตร มรกต, ประธานกรรมการ | Ph.D. | ปรสิตวิทยา | อยู่ |
| 2. รศ.ดร.พญ.นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข | M.D., Ph.D. | พยาธิวิทยา | อยู่ |
| 3. ผศ.ดร.ธวัช แต้โสดถิกุล | Ph.D. | เภสัชวิทยา | ไม่อยู่ |
| 4. ผศ.ดร.ชัชวาลย์ อภิชาติบีย์กุล | Ph.D. | จุลชีววิทยา | อยู่ |
| 5. ผศ.ดร.ชูชีพ ประพุทธ์พิทยา | Ph.D. | สรีรวิทยา | อยู่ |
| 6. ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย | Ph.D. | วิทยาศาสตร์การแพทย์ | อยู่ |
| 7. ดร.ฉายสุรีย์ สุภวิไล | Ph.D. | ภูมิคุ้มกันวิทยา | อยู่ |
| 8. นางจิตราภรณ์ อุตตโม | B.Ed | ภาษาอังกฤษ | อยู่ |
| 9. สพ.ญ.ทัศนีย์ ไหลมา, เลขานุการ | D.V.M | สัตวแพทย์ | อยู่ |
| 10. นางสัณหจุฑา วงศ์แก้ว | B.Ag.Tech | สัตวศาสตร์ | อยู่ |

Certificate of Approval
For Use of Animals
Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: **38/2552**
Title of project: **The Development of Thai Traditional Medicinal Plants Extracts in Nanoparticles for Grey Hair Treatment**
Principal investigator: **Professor Aranya Manosori**
Affiliation: **Faculty of Pharmacy**

The Faculty of Medicine, Chiang Mai University, supported by the results of Animal Ethics committee review, approved that the use of animals in the project conforms with international and national guidelines for ethical conduct on the care and use of animals,

Hereby approves the research proposal to be conducted under its proposed scheme. The approval is effective from **29 July 2010** and expired on **30 December 2010**

Nimit Morakote
.....
Nimit Morakote, Ph.D.
Associate Professor
Chair
Date 2 Aug 2010

N. Nantachit
.....
Niwes Nantachit , M.D.
Associate Professor
Dean
Date 4 Aug 2010

# Animal Ethics Committees (AECs) ( 20 Oct. 2009 – 19 Oct 2011 )

| Name/Surname | Qualification | Field of Study | Present/Absent |
|---|---|---|---|
| Assoc. Professor Dr. Nimit Morakote, Chair | Ph.D. | Parasitology | Present |
| Assoc. Professor Dr. Nirush Lertprasertsuke | M.D.,Ph.D. | Pathology | Present |
| Assist. Professor Dr. Chatchawann Apichartpiyakul | Ph.D. | Microbiology | Present |
| Assist. Professor Dr. Chucheep Praputhpitaya | Ph.D. | Physiology | Present |
| Assist. Professor Dr. Tawat Taesotikul | Ph.D. | Pharmacology | Absent |
| Assist. Professor Dr. Rawiwan Wongpoomchai | Ph.D. | Medical Science | Present |
| Ms. Chaisuree Suphavilai | Ph.D. | Tropical Health | Present |
| Ms. Chitraporn Uttamo | B.Ed | English | Present |
| Ms. Tassanee Laima, Secretary | D.V.M | Veterinary Medicine | Present |
| Ms. Sanhajuta Wongkaew | B.Ag.Tech | Animal Science | Present |

# ภาคผนวกที่ 17

## การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

## การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 และนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2

**การคำนวณต้นทุนมีรายละเอียด ดังตารางที่ 17.1 และ 17.2 ดังนี้**

**ตารางที่ 17.1** การคำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม

| วัตถุดิบ / ตัวทำละลาย | ปริมาณที่ใช้ | ราคา / กิโลกรัม | ต้นทุน (บาท) |
|---|---|---|---|
| กวาวเครือขาว | 250 กิโลกรัม | 150 | 37,500 |
| ตัวทำละลายที่ใช้ | Ethyl acetate 100 L | 80/L | 8,000 |
| | Hexane 100 L | 64/L | 6,400 |
| | MeOH 100 L | 19/L | 1,900 |
| ค่าไฟฟ้า + แรงงาน | | | 5,000 |
| ต้นทุนการผลิตสารสกัด 1 กิโลกรัม | | | 58,800 |

**ตารางที่ 17.2** การคำนวณต้นทุนการผลิตสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม

| ตัวอย่าง / สาร | ปริมาณที่ใช้ | ราคา / กิโลกรัม | ต้นทุน (บาท) |
|---|---|---|---|
| สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ | 20 g | 58,800 | 1,176 |
| Tween 61 | 13.12 g | 1,000 | 13.12 |
| Cholesterol | 3.867 g | 6,600 | 25.5 |
| Chloroform | 500 ml | 800 / 2.5 L | 160 |
| ค่าไฟฟ้า + แรงงาน | | | 1,000 |
| รวม | | | 2,374.62 |

* ต้นทุนการผลิตสารแขวนตะกอนนีโอโซม 1 กิโลกรัม

**สรุปผลการคำนวน** :

- ราคาคาดคะเนของการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 58,800 บาท
- ราคาคาดคะเนของการผลิตสารแขวนตะกอนนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือ fraction 2 ปริมาณ 1 กิโลกรัม เท่ากับ 2,374.62 บาท

**หมายเหตุ** : % yield ของสารสกัดหยาบจากผงกวาวเครือเท่ากับ 2% ในขณะที่สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ fraction 2 จากสารสกัดหยาบเท่ากับ 20 % ดังนั้นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ fraction 2 มาจากผงกวาวเครือเท่ากับ 0.4 % เพราะฉะนั้นสารสกัด fraction 2 ปริมาณ 20 กรัม มาจากสารสกัดกวาวเครือขาว 100 กรัม ถ้าต้องการสารสกัด fraction 2 ปริมาณ 1,000 กรัม ต้องใช้สารสกัดกวาวเครือขาวด้วย ethyl acetate ประมาณ 5 กิโลกรัม กวาวเครือขาวปริมาณ 1,000 กรัม สกัดด้วย ethyl acetate ได้สารสกัดประมาณ 20 กรัม ถ้าต้องการสารสกัดกวาวเครือปริมาณ 5 กิโลกรัมต้องใช้กวาวเครือขาว 250 กิโลกรัม สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ เช่น ethyl acetate, methanol และ hexane สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

# กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

## กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. ได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการประจำปีการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือกแห่งชาติ ครั้งที่ 7 งานมหกรรมสมุนไพรแห่งชาติครั้งที่ 7 ระหว่างวันที่ 1-3 กันยายน 2553 ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี จ. นนทบุรี ในหัวข้อเรื่อง "ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่เก็บกักในนีโอโซม"
2. ได้นำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ Natpro 4 ที่จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 28-30 พฤศจิกายน 2555 เรื่อง Effects of crude extracts, fractions and fractions loaded in niosomes on melanogenesis in B16F10 melanoma cells
3. ได้นำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ Natpro 4 ที่จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 28-30 พฤศจิกายน 2555 เรื่อง Inhibition of 5-α reductase and MMP-2 activity of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatab) extracts prepared by $scCO_2$ fluid

# ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีน ของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่เก็บกักในนีโอโซม

อรัญญา มโนสร้อย[1*], ภักดี ไชยกุล[2], ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา[1], ลักษณา เจริญใจ[1], วันดี รังสีวิจิตรประภา[1], วรพงษ์ มโนสร้อย[3], จีรเดช มโนสร้อย[4]

[1]ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[4]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**หลักการและเหตุผล** ผมหงอกเป็นลักษณะทางกายภาพที่มีเส้นผมสีขาวบนหนังศีรษะ เกิดจากเมลาโนไซท์ในเซลล์รูขุมขนที่หยุดการผลิตเมลานิน ในปัจจุบัน ยังไม่มียาที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษา มีเพียงการรักษาด้วยผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทน้ำยาย้อมผมเพื่อปิดผมขาว ซึ่งก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ การใช้สมุนไพรโดยเฉพาะตามตำรายาสมุนไพรเป็นทางเลือกที่มีความปลอดภัยมากกว่า อย่างไรก็ตาม การใช้สมุนไพรต่างๆ ในการรักษาอาการผมหงอกยังไม่มีข้อมูลที่สามารถยืนยันประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างเมลานิน

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่ไม่เก็บกักและเก็บกักในนีโอโซม

**วิธีดำเนินการ** นำสารสกัดกวาวเครือ หม่อน ย่านาง อัญชัน และบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ เอธิลอะซีเตท เมธานอล และเฮกเซน ในความเข้มข้น ๒๕๐ มคก./มล. มาทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนโดยใช้เซลล์มะเร็งหนู B16F10 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน theophylline ในขนาด ๒๕๐ มคก./มล. แล้วนำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินมาเก็บกักในนีโอโซมที่ประกอบด้วย Tween 61/cholesterol ในอัตราส่วนโมลาร์ ๑ ต่อ ๑ และประเมินลักษณะทางกายภาพ ตลอดจนการกระตุ้นการสร้างเมลานินและปริมาณโปรตีนของนีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดสมุนไพร โดยทำการทดสอบ ๓ ซ้ำ

**ผลการศึกษา** สารสกัดที่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนู B16F10 ได้สูง คือ สารสกัดบัวบกด้วยเอธิลอะซีเตท (ร้อยละ ๕๑.๐๙, ๑๑.๗๖) สารสกัดย่านางด้วยน้ำ (ร้อยละ ๔๐.๓๕, ๓๐.๖๔) สารสกัดย่านางด้วยเอธิลอะซีเตท (ร้อยละ ๓๖.๕๐, ๒๒.๙๗) สารสกัดกวาวเครือด้วยเอธิลอะซีเตท (ร้อยละ ๑๔.๑๗, ๗.๔๗) และสารสกัดหม่อนด้วยเอธิลอะซีเตท (ร้อยละ ๑๑.๑๓, ๙.๔๒) ซึ่งสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน theophylline (ร้อยละ ๕๕.๐๕, -๖.๖๒) เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาเก็บกักในนีโอโซมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา ๓ เดือน พบว่านีโอโซมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส มีความคงตัวทางกายภาพดีที่สุด การประเมินฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีน พบว่านีโอโซมที่เก็บกักสารสกัดไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเมลานิน เนื่องจากเซลล์มะเร็งหนู B16F10 อาจไม่สามารถย่อยนีโอโซม จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถนำสารสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมเข้าเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบของนีโอโซมยังอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์มีการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างเมลานินได้ อย่างไรก็ตาม หากนำนีโอโซมไปทดสอบใน *in vivo* ซึ่งมีเอนไซม์ในร่างกาย ที่สามารถย่อยนีโอโซม อาจสามารถปลดปล่อยสารสกัดออกมา เพื่อออกฤทธิ์ตามต้องการได้

**ข้อสรุป** สารสกัดสมุนไพรไทยสามารถกระตุ้นการสร้างเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็งหนูได้เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ สารสกัดบัวบกด้วยเอธิลอะซีเตท สารสกัดย่านางด้วยเอธิลอะซีเตท สารสกัดย่านางด้วยน้ำ สารสกัดกวาวเครือด้วยเอธิล อะซีเตท และสารสกัดหม่อนด้วยเอธิลอะซีเตท ในขณะที่เมื่อนำสารสกัดเหล่านี้มาเก็บกักในนีโอโซมไม่พบการกระตุ้นการสร้างเมลานิน ซึ่งสารสกัดอาจมีความคงตัวสูงในนีโอโซม แต่อาจถูกปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซมได้ในการศึกษา *in vivo* ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

NATPRO 4 Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Chiang Mai University, Chiang Mai, 28-30 Nov. 2012

# Effects of crude extracts, fractions and fractions loaded in niosomes on melanogenesis in B16F10 melanoma cells

Aranya Manosroi[1,2], Puxvadee Chaikul[1], Pisit Chainonthee[2], Laksana Charoenchai[3], Chutipun Prasitpuripreecha[3], Wandee Rungseevijitprapa[3], Worapaka Manosroi[4] and Jiradej Manosroi[1,2]
[1]Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[2]Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand
[3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand
[4]Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail addresses: a.manosroi@gmail.com

**Introduction and Objective**
Melanogenesis, the pigment formation process in melanocytes, involves the enzymatic oxidation of tyrosine to melanin. The decreased melanogenesis leads to the hypopigmentation state occurring both in the skin and hair. The objective of this study was to perform the *in vitro* melanogenesis effects of plant crude extracts, the semi-purified fractions of the plant crude extracts and the semi-purified fraction of the plant crude extract loaded in niosomes in B16F10 melanoma cells.

**Methods**
The 20 crude extracts prepared by different extraction processes of *Pueraria mirifica* (White Kwao Krua), *Clitoria ternatea* (Blue Pea), *Centella asiatica* (Asiatic Pennywort), *Morus alba* (Mon) and *Tiliacora triandra* (Ya Nang) were evaluated for *in vitro* melanogenesis stimulation. The five top crude extracts were selected for the semi-purified plant fraction preparation. The semi-purified plant fractions were then investigated for melanogenesis induction activity in comparing to their crude extracts. The fraction with the highest melanogenesis induction was selected to load in niosomes composing of Tween61 and cholesterol. The semi-purified fraction loaded in niosomes and the blank niosomes were evaluated for melanogenesis effects in comparing to theophylline (a positive reference).

**Results**
The top five crude extracts which gave high melanogenesis stimulation were the aqueous and ethyl acetate extracts of Asiatic Pennywort, the ethyl acetate extract of Ya Nang, the ethyl acetate extract of White Kwao Krua and the ethyl acetate extract of Mon. The crude extract and its semi-purified fractions, especially the hexane fraction, of White Kwao Krua showed the highest melanin induction and tyrosinase activity of 1.46 and 2.06 folds of the control, respectively. Also, the hexane fraction of White Kwao Krua extract loaded in niosomes demonstrated higher melanin induction than the free fraction and crude extract, but lower than the blank niosomes.

**Conclusion**
The crude extract and semi-purified fractions of White Kwao Krua demonstrated the high *in vitro* melanogenesis induction activity. This may be from the biological active compounds, such as saturated fatty acids and the phytoestrogenic compounds, in White Kwao Krua. The lower melanin induction of White Kwao Krua fraction loaded in niosomes may be from the tightly entrapped of the bioactive compounds in the niosomal vesicles that cannot be released to penetrate into the cells.

***Keywords:*** *Melanogenesis, White Kwao Krua, Niosomes, Plant extracts, Hypopigmentation*

NATPRO 4 Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Chiang Mai University, Chiang Mai, 28-30 Nov. 2012

# Inhibition of 5-α reductase and MMP-2 activity of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatab) extracts prepared by $scCO_2$ fluid

Aranya Manosroi[1,2], Korawinwich Boonpisuttinant[1], Worapaka Manosroi[3], and Jiradej Manosroi[1, 2]

[1]Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[2]Natural Products Research and Development Center (NPRDC), Science and Technology Research Institute (STRI), Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand
[3]Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail addresses: pmpti005@chiangmai.ac.th, wataru_dream@hotmail.com peng_tle@hotmail.com, pmpti006@chiangmai.ac.th

**Introduction and Objective**

The main cause of hair loss is from the high expression of testosterone 5-α redutase type 1 (SRD5A1) gene predominated in human scalp skin, especially in the dermal papilla as well as the imbalance of the MMP-2 level which causes inflammatory response around the lower portion of the hair follicles and scalps. The objective of this study was to compare the 5-α redutase type 1 mRNA expression and MMP-2 activities of the White Kwao Krua (WKK) extract prepared by ethyl acetate maceration (WKK1) and the supercritical carbondioxide fluid ($scCO_2$) extraction.

**Methods**

The bioactive contents (daidzein, genistein, puerarin, flavone and linoleic acid) of the extracts from the tuberous roots of WKK prepared by ethyl acetate maceration (WKK1) and the supercritical carbondioxide fluid ($scCO_2$) with the fluid carbon dioxide at the flow rate of 20 g/min and ethanol as a co-solvent at 1% w/v (WKK2), 5% w/v (WKK3) and 10% w/v (WKK4) were investigated by HPLC. The free radical scavenging activity of the WKK extracts were determined by the DPPH assay. The inhibition of SRD5A1 mRNA expression on DU-145 cell line and MMP-2 on human skin fibroblasts were also investigated.

**Results**

The WKK1 and WKK3 extracts gave the highest extraction yields (1.08 and 0.24%), the bioactive compound contents (daidzein, genistein, puerarin, flavone and linoleic acid of 0.36, 0.17, 0.00, 0.61 and 0.45%; 0.06, 0.02, 2.04, 0.02 and 13.20%) and free radical scavenging activity ($SC_{50}$ of 2.32 ± 0.35 and 3.30 ± 0.60 mg/ml). The WKK3 (0.5 mg/ml) which gave no cytotoxicity (90% cell viability) on human skin fibroblasts exhibited the highest testosterone 5α-reductase type 1 (SRD5A1) mRNA expression, and MMP-2 inhibitions at 24 hr ($p < 0.05$) of 23.31 and 48.69%, respectively. The linoleic acid together isoflavone and flavone contents in the WKK extracts appeared to be responsible for these inhibition effects.

**Conclusion**

This study has demonstrated that the WKK extract prepared by $scCO_2$ with 5% ethanol as a co-solvent (WKK3) has the potential to be developed as a cosmetic product for anti-hair loss treatment.

***Keywords:*** *Testosterone 5-α redutase type 1, Matrix metalloprotenase-2, Pueraria mirifica, White Kwao Krua, Supercritical carbon dioxide, Anti-hair loss*

# ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและ ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

| กิจกรรม | ปีที่ 1 | | ปีที่ 2 | | ปีที่ 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1-6 | 7-12 | 1-6 | 7-12 | 1-6 | 7-12 |
| 1. การคัดเลือกสมุนไพร | ←→ | | | | | |
| | ←- - -→ | | | | | |
| 2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร | ←→ | ←→ | ←→ | | | |
| | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | | | |
| 3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร | ←→ | ←→ | | | | |
| | ←- - -→ | ←- - -→ | | | | |
| 4. การพัฒนาอนุภาคขนาดนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคขนาดนาโน | | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ | |
| | | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | |
| 5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคขนาดนาโนที่พัฒนาได้ | | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ |
| | | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ |
| 6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ | | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ |
| | | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ |
| 7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน | | | ←→ | ←→ | ←→ | ←→ |
| | | | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ | ←- - -→ |
| 8. การคำนวณต้นทุนการผลิต | | | | | | ←→ |
| | | | | | | ←- - -→ |
| 9. การนำเสนอผลงาน | | ←→ | | ←→ | | ←→ |
| | | ←- - -→ | | ←- - -→ | | ←- - -→ |

**หมายเหตุ** ←→ **แผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้**

←- - -→ **งานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง**

## ตารางแผนงานเปรียบเทียบกับ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

| กิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ | กิจกรรมที่ได้ทำจริง |
|---|---|
| 1. การคัดเลือกสมุนไพร | ได้คัดเลือกสมุนไพร 5 ตัว คือ กวาวเครือขาว หม่อนย่านาง อัญชันและบัวบก แล้วนำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบแล้วจัดทำ specification และ phytochemistry ของสารสกัดหยาบ (**ภาคผนวกที่** 1,2) |
| 2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร | ได้นำสมุนไพรที่คัดเลือกมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์ (**ภาคผนวกที่** 10) |
| 3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร | ได้ทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดหยาบและสารกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกมาซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ antioxidant, ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีและฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส (**ภาคผนวกที่** 3, 4, 8, 11, 12) |
| 4. การพัฒนาอนุภาคขนาดนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคขนาดนาโน | ได้นำสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกมาเก็บกักในอนุภาคขนาดนาโนแล้วศึกษาฤทธิ์และคุณสมบัติต่างๆ รวมทั้งการจัดทำ specification ของตำรับที่พัฒนาได้ (**ภาคผนวกที่** 5, 6, 7, 8, 9, 13) |
| 5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคขนาดนาโนที่พัฒนาได้ | ได้ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของอนุภาคขนาดนาโน (นีโอโซม) ที่เก็บกักสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของกวาวเครือ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน (**ภาคผนวกที่** 13) |
| 6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ | ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำของสารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของสมุนไพรที่คัดเลือกทั้งที่ไม่ได้เก็บกักและเก็บกักในนีโอโซม โดยได้ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินและโปรตีนของเซลล์มะเร็ง $B_{16}F_{10}$ (**ภาคผนวกที่** 4,9,12) |
| 7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน | ได้ศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขนของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากกวาวเครือขาวที่เก็บกักในนีโอโซมบนผิวหนังของหูหมูโดยใช้ Franz diffusion cells (**ภาคผนวกที่** 15) และได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (**ภาคผนวกที่** 16) |
| 8. การคำนวณต้นทุนการผลิต | ได้คำนวณต้นทุนการผลิตสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์กวาวเครือขาวที่ไม่ได้เก็บกักและเก็บกัก 2% ในนีโอโซมโดยมีราคาต่อกิโลกรัมเท่ากับประมาณ 60,000 และ 2,400 บาท ตามลำดับ (**ภาคผนวกที่** 17) |
| 9. การนำเสนอผลงาน | ได้นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติดังในกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลงานโครงการไปใช้ประโยชน์ |

## ตารางแผนงานเปรียบเทียบกับ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

| output | | กรณีที่ล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%)ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ดำเนินการ |
|---|---|---|
| กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน | ผลสำเร็จ (%) | |
| 1. การคัดเลือกสมุนไพร | 100 % | - |
| 2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร | 100 % | - |
| 3. การศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารสกัดจากสมุนไพร | 100 % | - |
| 4. การพัฒนาอนุภาคขนาดนาโนและการเก็บกักสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคขนาดนาโน | 100 % | - |
| 5. การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและความคงตัวของอนุภาคขนาดนาโนที่พัฒนาได้ | 100 % | - |
| 6. การศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำ | 100 % | - |
| 7. การศึกษาการดูดซึมผ่านรูขุมขน | 100 % | - |
| 8. การคำนวณต้นทุนการผลิต | 100 % | - |
| 9. การนำเสนอผลงาน | 100 % | - |

# รายงานการเงิน

# สรุปค่าใช้จ่ายโครงการวิจัย

**ชื่อโครงการ** "การพัฒนาการเก็บกักสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านไทยในอนุภาคขนาดนาโนเพื่อใช้รักษาผมหงอก" (Research and Development of Extracts from Thai Traditional Medicinal Plants in Nanoparticles for White Hair Treatment)

1. **ปีงบประมาณ** 2552

**1.1. งบประมาณที่ได้รับ** 320,500 **บาท**

**1.2. การใช้เงิน**

| หมวด | รายการ | จำนวนเงิน (บาท) |
|---|---|---|
| - **ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย** | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 10,000 บาท เพื่อ :<br>- เตรียมสารสกัด<br>- ศึกษาสมบัติและฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัด<br>- จัดทำรายงาน<br>- วิเคราะห์/ประเมินผล<br>- เตรียมผลงานวิจัยเพื่อนำเสนอผลงาน | 240,000 |
| - **ค่าวัสดุ** | ค่าสมุนไพรต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย (ใบแทนใบเสร็จ) | 20,500 |
| - **ค่าใช้สอย** | ค่าจ้างเหมาเตรียม ล้างและอบสมุนไพรและล้างเครื่องแก้ว 1 คน เดือนละ 5,000 บาท | 60,000 |
| | **รวมปีที่ 1** | 320,500 |

2. ปีงบประมาณ 2553

2.1 งบประมาณที่ได้รับ 347,200 บาท

2.2 การใช้เงิน

| หมวด | รายการ | จำนวนเงิน (บาท) |
|---|---|---|
| - ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 12,000 บาท เพื่อ :<br>- พัฒนาอนุภาคขนาดนาโน<br>- ศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพของอนุภาคขนาด นาโน<br>- ศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง<br>- ศึกษาการดูดซึมผ่านหนังหมู<br>- เตรียมสารสกัดสมุนไพร<br>- เขียนรายงาน/ วิเคราะห์/ ประเมินผล<br>- เตรียมผลงานวิจัย/ นำเสนอผลงานวิจัย | 288,000 |
| - ค่าวัสดุ | สารเคมีต่างๆ เช่น Tween 61, Cholesterol, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI, อาหารหมู, ลูกหมู, เครื่องแก้วต่างๆ (ใบแทนใบเสร็จ) | 29,200 |
| - ค่าใช้สอย | ค่าจ้างเหมาเตรียมหนังหมู /ล้างเครื่องมือเครื่องแก้วต่างๆ 1 คน 6 เดือนๆ ละ 5,000 บาท | 30,000 |
| | **รวมปีที่ 2** | 347,200 |

3. ปีงบประมาณ 2554

3.1 งบประมาณที่ได้รับ 370,800 บาท

3.2 การใช้เงิน

| หมวด | รายการ | จำนวนเงิน (บาท) |
|---|---|---|
| - ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย | ผู้ช่วยวิจัย (นักศึกษาปริญญาเอก) 2 คน เดือนละ 12,000 บาท เพื่อ :<br>- พัฒนาอนุภาคขนาดนาโน<br>- ศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพของอนุภาคขนาดนาโน<br>- ศึกษาฤทธิ์ช่วยให้ผมดำในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง<br>- ศึกษาการดูดซึมผ่านหนังหมู<br>- เตรียมสารสกัดสมุนไพร<br>- การคำนวณต้นทุนการผลิต<br>- เขียนรายงาน/ วิเคราะห์/ ประเมินผล<br>- เตรียมผลงานวิจัย/ นำเสนอผลงานวิจัย | 288,000 |
| - ค่าวัสดุ | สารเคมีต่างๆ เช่น Tween 61, Cholesterol, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI, อาหารหมู, ลูกหมู, เครื่องแก้วต่างๆ (ใบแทนใบเสร็จ) | 22,800 |
| - ค่าใช้สอย | ค่าจ้างเหมา 1 คน เพื่อเตรียมสมุนไพร/ อบ/ ล้างเครื่องแก้ว/ เตรียมหนังหมู ฯลฯ เดือนละ 5,000 บาท | 60,000 |
| | **รวมปีที่ 3** | 370,800 |

ลงชื่อ_____

(ศาสตราจารย์ ดร.ภญ. อรัญญา มโนสร้อย )

หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3