



การพัฒนาตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากใบโคล่าและ
พอลีไวนิลแลอกอหอร์ที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก

ชมพูนุท เวชชาภุล

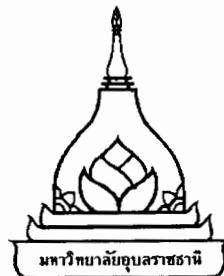
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์รромชาติ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



DEVELOPMENT OF FACIAL PEEL OFF MASK FROM CHITOSAN AND
POLYVINYL ALCOHOL CONTAINING
CENTELLA ASIATICA (L.) URBAN CRUDE EXTRACT

CHOMPUNUT WETCHAKUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2015
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ในรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาตัวรับมาร์คหน้าแบบลอกออกจากโค้ดชานและพอลีไวนิลแอลลอยด์
ที่สมสารสกัดหมายบบวนก

ผู้วิจัย นางสาวชนพนุท เวชชาภุล

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา บุญจูง

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิษญา ศิลาอ่อน

กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผุดุงขวัญ จิตโรกาส

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.วิษญา ศิลาอ่อน

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิษญา ศิลาอ่อน)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2558

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริษฎา ศิลาร่อ่อน ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ผู้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ การตรวจทานแก้ไข ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆ และเป็นกำลังใจในการจัดทำวิทยานิพนธ์ จนได้รูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์เล่มนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ในด้านการปฏิบัติการ และด้านอื่นๆ มาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ดร.ไพจิตร ศรีธนานุวัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะในด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ตลอดระยะเวลาทำการทดลองจนแล้วเสร็จ ขอขอบพระคุณ ดร.สุรีวัลย์ ดวงจิตต์ ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเรื่องการใช้งานโปรแกรมออกแบบการทดลอง Design expert® ตลอดการแปลผลที่ได้จากโปรแกรม ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา บุญจุ่ง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พดุงขวัญ จิตโรภาส ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ คณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี ทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือและข้อเสนอแนะในด้านการปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณ คณะ เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เป็นสถานที่สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จ และขอขอบพระคุณครอบครัวที่น่ารัก พ่อ แม่ และพี่สาว ที่เป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ชมพูนุท เวชชาภุตร

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง	: การพัฒนาตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากไคโตไซนและพอลีไวนิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก
ผู้วิจัย	: ชุมพูนุท เวชชาภุล
ชื่อปริญญา	: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	: เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิษณุ ศิลาอ่อน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ
คำสำคัญ	: มาส์กหน้าแบบลอกออก, บัวบก, ไคโตไซน, พอลีไวนิลแอลกอฮอลล์

การมาส์กหน้าเป็นวิธีการฟื้นฟูสุขภาพผิวที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากใช้ง่าย มีความสามารถจัดเซลล์ที่ตายแล้วออกและไม่เกิดสิวอุดตัน การนำสารสกัดจากสมุนไพรผสมลงในตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากไคโตไซนและพอลีเมอร์จากธรรมชาติและพอลีเมอร์สังเคราะห์ นับเป็นการส่งเสริมการใช้และเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรในด้านเครื่องสำอางมากขึ้น ซึ่งบัวบกเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่กระทรวงสาธารณสุขสนับสนุนให้ใช้ในโรงพยาบาลและการแพทย์แผนไทย เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย จึงมีการใช้ทั้งในด้านการแพทย์และความงาม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากไคโตไซนและพอลีเมอร์สังเคราะห์ ที่สามารถดูดซับสิ่วอุดตันออกซึ่งมีความคงทนและคงอยู่ได้ยาวนาน โดยศึกษาปริมาณสารสำคัญ ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์กระตุนการสร้างคอลลาเจนของสารสกัดหยาบบัวบก จากแหล่งเพาะปลูกอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ผลการทดลองพบว่า มีปริมาณเอเซียตโคไซด์ มาเดแคสโซไซด์ และกรดอะเซติกเท่ากับ 34.37, 4.17 และ 2.98 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบบัวบก ตามลำดับ ไม่พบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ชนิด *S. aureus* และ *E. coli* แต่สามารถด้านเชื้อแบคทีเรีย ชนิด *P. acnes* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* เท่ากับ 21.88 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. acnes* เท่ากับ 700 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบบัวบกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 20.52 ± 0.57 มิลลิกรัมส่วนมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP มีค่า 42.14 ± 1.53 มิลลิกรัมส่วนมูลของ Trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม, 12.81 ± 0.91 มิลลิกรัมส่วนมูลของวิตามินซีต่อสารสกัด 1 กรัมและ -0.65 ± 0.04 โมลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกประกอบด้วยไคโตไซน ร้อยละ 2 EDTA ร้อยละ 1 PVA ร้อยละ 1.42 PVMMMA ร้อยละ 0.05 กลีเซอริน ร้อยละ 2.74 แอลกอฮอลล์ ร้อยละ 10 และสารสกัดบัวบก ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมาะสม คือมีค่าความเป็นกรดด่าง 4.97 ± 0.06 ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม 19.33 ± 1.15 นาที และค่าความหนืด 894.57 ± 149.88 เช็นติพอยส์ มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี คือมีความหนาแรงดึง 0.57 ± 0.06 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด 166.77 ± 0.00 และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม 0.002 ± 0.0005

นิวัตันต่อตารางมิลลิเมตร ที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมงสามารถปลดปล่อยเอเชียติโคไซด์ได้ร้อยละ 24.61 ± 0.56 และ 107.13 ± 10.70 ตามลำดับ เมื่อทดสอบในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ สารสกัดหยาบบัวบกไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน เมื่อทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่งพบร่วมกับ สารสกัดหยาบบัวบก ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของ捺รับ แต่ปริมาณเอเชียติโคไซด์และมาเดแคสโซไซด์ใน捺รับลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น และควรเก็บ捺รับที่อุณหภูมิ 25°C ดังนั้น捺รับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากใบโคล่าและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF FACIAL PEEL OFF MASK FROM CHITOSAN AND POLYVINYL ALCOHOL CONTAINING CENTELLA ASIATICA (L.) URBAN CRUDE EXTRACT

AUTHOR : CHOMPUNUT WETCHAKUN

DEGREE : MASTER OF SCIENCES

MAJOR : PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS

ADVISOR : ASST. PROF. WARISADA SILA-ON, Ph.D.

CO-ADVISOR : ASST. PROF. UTSANA PUAPERMOONSIRI, Ph.D.

KEYWORDS : PEEL OFF MASK, CENTELLA ASIATICA (L.) URBAN, CHITOSAN, POLYVINYL ALCOHOL

The facial masking is the effectively method for skin rejuvenation. Nowadays, the facial peels off mask products are extensively used regarding the simple application, capability of elimination of dead cells and non comedone depiction. The incorporation of herbal extract into the facial peel off mask preparation composing of natural polymer and synthetic polymer is to encourage the use and to add the value of herbal medicine as cosmetic purpose. *Centella asiatica* (L.) Urban or centella is one of herbal plants which the Public Health Ministry reinforces the application in hospital and Thai traditional medicine due to its abundant of biological activities. As such, it is adopted in medicination and aesthetic purpose. Thus, the objective of this study was to develop the facial peel off mask containing centella crude extract having the applicable physical, chemical and mechanical properties. The investigation of quantity of active compounds, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity and collagen stimulating activity of centella crude extract, harvested from Warinchamrapi district, Ubon Ratchathani province, were performed. The results showed that the amount of asiaticoside, madecassoside and asiatic acid were 34.37, 4.17, 2.98 mg/g of centella crude extract, respectively. No antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* was found but showed antibacterial activity against *P. acnes* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 21.88 mg/mL and the minimum bactericidal concentration (MBC) of 700 mg/mL. Centella crude extract obtained the total phenolic compound content of 20.52 ± 0.57 mg GAE/g extract. Antioxidant activities using DPPH, ABTS and FRAP assays expressed as 42.14 ± 1.53 mg TEAC/g extract, 12.81 ± 0.91 mg Vitamin C/g extract and 0.65 ± 0.04 mole ferrous sulfate/g extract, respectively. The desirable formulation of facial peel off mask composed of

chitosan 2 % w/w, EDTA 1 % w/w, PVA 1.42 % w/w, PVMMA 0.05 % w/w, glycerin 2.74 % w/w, alcohol 10 % w/w and centella crude extract 5 % w/w. These exhibited optimal physical properties include pH value of 4.97 ± 0.06 , drying time of 19.33 ± 1.15 min and viscosity value of 894.57 ± 149.88 cP. It showed the appropriate mechanical properties being the tensile strength of 0.57 ± 0.06 N/mm², % elongation at break 166.77 ± 0.00 and peeling force of 0.002 ± 0.0005 N/mm². At time of 30 min and 24 hour, *in vitro* release of asiaticoside at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ were 24.61 ± 0.56 and 107.13 ± 10.70 %, respectively, with no cytotoxicity and collagen stimulating activity of centella extract were observed. For accelerated stability testing of formulation, the storage condition with high temperature and long period of time affected its physical and mechanical properties. But, asiaticoside and madecassoside contents were slightly decrease as compared to those of the initial. The formulation was kept at 25°C . Therefore, the formulation of facial peel off mask from chitosan and polyvinyl alcohol containing centella crude extract demonstrated antibacterial, antioxidant, collagen stimulating activities and non cytotoxicity.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ภ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 สมมุตฐานการวิจัย	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 ประวัติและความเป็นมาเกี่ยวกับมาสก์และเครื่องสำอาง	4
2.2 สารก่อฟิล์ม	5
2.3 พลัสติไซเซอร์หรือสารเพิ่มความยืดหยุ่น	8
2.4 สารเพิ่มการยึดติด	10
2.5 บัวบก	11
2.6 ขันผ้าหนัง	14
2.7 อนุมูลอิสระ	16
2.8 คอลลาเจน	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	20
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย	22
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	
4.1 การเตรียมสารสกัดหมายบัวบก	33
4.2 พัฒนาการวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในบัวบก	33
4.3 ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหมายบัวบกที่ได้จากแหล่งเพาะปลูกบ้านวังยาง ตำบลบุ่งหวาน อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี	39
4.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหมายบัวบก	40
4.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก	43
4.6 การพัฒนาตัวรับมาสก์เบสและตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออก ที่ผสมสารสกัดหมายบัวบก	44

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.7 การคัดเลือกมาส์กเบสที่เหมาะสมที่สุด	56
4.8 ตำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบก	57
4.9 การปลดปล่อยสาระสำคัญจากตำรับมาส์กหน้าแบบลอกออก ที่ผสมสารสกัดบัวบก	58
4.10 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT)	60
4.11 ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน	62
4.12 ประเมินความคงสภาพในสภาวะเร่งของตำรับมาส์กหน้า แบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก	63
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	72
5.2 ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้วิจัย	114

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดของคอลลาเจนและแหล่งที่พบ	19
2 สัดส่วนของ mobile phase และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	25
3 สูตร捺รับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่เข้าโปรแกรมออกแบบการทดสอบต่อบสนองพื้นผิว	28
4 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นในผงบัวบก	33
5 สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบกโดยวิธี HPLC	34
6 สัดส่วน mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์	34
7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น	36
8 %recovery จากการทดสอบความถูกต้อง โดยวิธี standard addition ในสารสกัดหยาบบัวบก	38
9 ความแม่นยำ ในวันเดียวกัน (Intraday precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	38
10 ความแม่นยำระหว่างวัน (Interday precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside madecassoside และ asiatic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	39
11 clear zone ที่พบในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion method	41
12 สารประกอบฟีโนลิกรวม extractable phenolic content (EPC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบบัวบกทดสอบโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP	43
13 สูตร捺รับมาส์กเบสเบื้องต้น ที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม	46
14 ปัจจัยและระดับของตัวแปรต้นในการศึกษาผลต่อการตอบสนองพื้นผิว (RSM)	46
15 ผลการตอบสนองด้าน pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืดของสูตร捺รับ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ของสูตร捺รับมาส์กหน้าแบบลอกออก	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16 การวิเคราะห์ (ANOVA) ของ pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืดของสูตรต่ำรับ ความทนแรงตึงรือดละการยึดของขั้นทดสอบที่จุชาด แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม	49
17 ปริมาณ PVA และ PVMMMA ที่เหมาะสมในการทำสูตรต่ำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกจากการคาดการณ์ของโปรแกรม	56
18 การเปรียบเทียบค่าการตอบสนองต้านคุณสมบัติทางเคมีภysis ของต่ำรับมาส์กเบสและคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการคาดการณ์จากโปรแกรม RSM และค่าที่ได้จากการทดลอง	56
19 สูตรต่ำรับของมาส์กเบสที่เหมาะสม	57
20 องค์ประกอบและหน้าที่ในต่ำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก	57
21 การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีภysis และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มของต่ำรับมาส์กเบสและต่ำรับที่เติมสารสกัดบัวบก 5%	58
22 การปลดปล่อย asiaticoside ของสารสกัดบัวบก ในต่ำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก	59
23 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบบัวบก	60
24 สรุปปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของต่ำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกและคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม	70

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของ Cicatrin และ Cicotizan	6
2 โครงสร้างของ Polyvinyl alcohol (PVA)	7
3 โครงสร้างของ Propylene glycol	8
4 โครงสร้างของ Glycerin	9
5 โครงสร้างของ Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride)	10
6 โครงสร้างทางเคมีของ asiaticoside (a), madecassoside (b) และ asiatic acid (c)	11
7 บัวก จากเหล็กปูน บ้านวังยาง ตำบลบุ่งขาวay อําเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี	14
8 โครงสร้างของผิวหนัง	15
9 โครงสร้างของคอลลาเจน	17
10 องค์ประกอบของเส้นใยคอลลาเจน	18
11 โครงmorite แกรนของสารละลายมาตรฐานของ Asiaticoside (A) Madecassoside (MAD) และ Asiatic acid (AA) ตามลำดับ	34
12 โครงmorite แกรนของสารสำคัญในสารสกัดหมายบัวก 'ได้แก่ Asiaticoside (A) Madecassoside (MAD) และ Asiatic acid (AA) ตามลำดับ	35
13 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ asiaticoside กับพื้นที่ตีกราฟ	36
14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ madecassoside กับพื้นที่ตีกราฟ	36
15 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ asiatic acid กับพื้นที่ตีกราฟ	37
16 ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดบัวก 1 กรัม	39
ค่าความเข้มข้นที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) จากการทดสอบสารสกัดบัวกความเข้มข้น 700, 350, 175, 87.5, 43.75 และ 21.88 mg/ml ตามลำดับ	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโค-டีกานและ EDTA	45
19 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อ pH แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	50
20 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	51
21 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อความหนืดของสูตรสำรับแสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	52
22 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อความทนแรงดึง (tensile strength) แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	53
23 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อ %elongation at break แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	54
24 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour	55
25 การปลดปล่อย asiaticoside สะสมจากตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออก	60
26 เปอร์เซ็นต์การเมชีวิตลดของเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดหอยนางรม	61
27 เปอร์เซ็นต์การลดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารเคมีที่ป้องกันตัวรับมาส์กหน้า	62
28 ร้อยละการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนของ asiaticoside และตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหอยนางรม	63
29 pH ของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	64
30 ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	65
31 ความความหนืดของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

序號	內容	頁數
32	ความทนแรงดึง (tensile strength) ของมาส์กหน้าแบบลอกออก ที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	67
33	ร้อยละการยืดของเชือกดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) ของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	68
34	แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ของมาส์กหน้า ^{แบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C} ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	68
35	ปริมาณ Asiaticoside ของผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสม สารสกัดบัวบก ในความคงสภาพในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	69
36	ปริมาณ Madecassoside ของผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่บัวบก ผสมสารสกัด ในความคงสภาพในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน	70
37	บัวบกสด	84
38	บัวบกแห้ง	84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การมาสก์หน้ามีมาตั้งแต่สมัยโบราณกาล โดยเริ่มจากการนำส่วนผสมจากธรรมชาติ เช่น ผักผลไม้ น้ำผึ้ง และ แร่ธาตุต่าง ๆ มาคลุกเคลือบให้เข้ากัน ซึ่งต้องใช้เวลานานและยุ่งยากในการเตรียมส่วนประกอบเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพผิว ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์มาสก์หน้าสำเร็จรูปหลากหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบมีส่วนผสมที่แตกต่างกันไปทำให้ผู้บริโภคเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมต่อสภาพผิวของแต่ละบุคคล รวมถึงสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในการแก้ไขปัญหาทางด้านผิวพรรณได้อย่างตรงจุดมากขึ้น ทั้งนี้ส่วนประกอบในมาสก์หน้ามีความแตกต่างกัน ขึ้นกับวัตถุประสงค์ ในตัวรับ เช่น หากต้องการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวและทำให้ผิวแน่นกระชับขึ้น ส่วนประกอบต้องประกอบด้วยด้วยสารที่ให้ความชุ่มชื้นกับผิว (moisturizer) เช่น ว่านหางจระเข้ บัวบก สาหร่าย ถั่วต้องการลดเลือนริ้วรอย ควรเลือกใช้มาสก์ที่มีส่วนผสมของวิตามินและสารต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบัน มีการนำสารจากธรรมชาติที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อผิวพรรณมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มาสก์หน้ามากขึ้น และอยู่ในรูปแบบของผงแห้ง ซึ่งต้องนำไปละลายน้ำก่อนที่จะนำมาพอกหน้า เช่น มาสก์โคลน ปัญหาที่พบคือเมื่อพอกหน้าไว้จนแห้ง ผลิตภัณฑ์รูปแบบนี้มักจับตัวกันเป็นก้อนแข็งบนผิวหน้า ทำให้ล้างออกได้ยากและอาจทิ้งตกรากไว้บนผิวหน้า หากทำความสะอาดสะอาดผิวหน้าไม่ดีพอ อาจทำให้เกิดการอุดตันที่ผิวและเป็นสาเหตุของการเกิดสิวบนใบหน้า ส่วนผลิตภัณฑ์มาสก์หน้าแบบลอกออก มีลักษณะเป็น เ洁ลขันหนึด เมื่อทาทิ้งไว้บนผิวหน้าจะเปลี่ยนจากเจลขันหนึดเป็นฟิล์มบาง ๆ เมื่อแห้งสนิท สามารถลอกออกเป็นแผ่นให้หลุดออกจากผิวหน้า มาสก์ชนิดนี้มีประโยชน์คือ ทำความสะอาดผิวหน้าโดยจัดเซลล์ผิวหนังเก่าออกและดูดซับน้ำมันส่วนเกินสำหรับผู้ที่มีผิวมัน ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผู้ที่มีผิวแห้ง ช่วยทำให้ใบหน้ากระชับ และในขณะลอกฟิล์มออกเซลล์ผิวหน้าที่หมองคล้ำรวมทั้ง สิวเสี้ยนบางส่วนก็จะถูกกำจัดออกไป ทำให้ช่วยลดรอยหมองคล้ำของผิวหน้าได้

ปัจจุบันกระแสความนิยมใช้สมุนไพรเพื่อการดูแลสุขภาพและความงามมีมากขึ้น ซึ่งบัวบกเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่กระทรวงสาธารณสุขสนับสนุนให้ใช้ในโรงพยาบาลและการแพทย์แผนไทย นอกจากนี้บัวบกเป็นสมุนไพรที่บรรจุอยู่ใน WHO monograph (1999) และเภสัชตำรับของหลายประเทศ บัวบกเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ในการสมานแผล ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์แก้อาการคันและแพ้ ฤทธิ์ต้านไวรัส Herpes Simplex ช่วยในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและช่องปาก และช่วยเพิ่มความจำ ใบบัวบกมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งลดการเสื่อมของเซลล์ร่างกายได้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสำคัญที่ได้จากบัวบกเร่งการสร้างคอลลาเจนที่เป็นโครงสร้างของผิว ทำให้ผิวแข็งแรงและเพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง อีกทั้งยังลดริ้วรอยบนใบหน้าได้ (World Health Organization, 1999)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์มาสก์หน้าแบบลอกออก โดยนำสารสกัดบัวบกผสมกับสารก่อฟิล์ม ได้แก่ โคโตชานและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากโคโตชานเป็นวัสดุ

ชีวภาพที่ได้จากรرمชาติสามารถถ่ายอย่างถูกต้องได้ตามธรรมชาติ จึงเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้ กับมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ส่วนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เป็นสารก่อฟิล์มที่ได้จากการสังเคราะห์ที่ใช้มากในทางเภสัชกรรม เมื่อใช้โคโตซานและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ ร่วมกันทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถก่อตัวเป็นฟิล์มปvcclumใบหน้าเมื่อทา ทำให้ใช้งานได้ง่ายและสะดวกมากยิ่งขึ้น เมื่อแห้ง สามารถถอกออกได้โดยไม่ทิ้งสารตกค้างไว้บนผิวหน้า ทำให้รู้สึกถึงผิวหน้าที่สะอาด สดชื่น นอกจากนี้ การใช้มาส์กหน้าแบบถอกออก ผู้ใช้สามารถทราบมาส์กชนิดนี้ลงบนผิวหน้าได้ทุกส่วน รวมถึงส่วนโค้งเว้า บนใบหน้า จากคุณสมบัติดังกล่าวมีผลทำให้สารสำคัญจากบัวกที่เป็นส่วนประกอบของคุณสมบัติเข้าสู่ผิวหน้า ผิวหน้าได้มากขึ้น ช่วยทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นและฟื้นฟูสภาพผิว จึงเป็นการนำบัวกที่เป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพ มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปใช้ นับเป็น การเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 พัฒนาตัวรับมาส์กหน้าแบบแผ่นถอกออก และศึกษาผลขององค์ประกอบในตัวรับมาส์ก หน้าแบบแผ่นถอกออก เช่น ชนิดและปริมาณสารก่อฟิล์ม (film former) สารเพิ่มความยืดหยุ่น (plasticizer) สารช่วยเพิ่มการยึดติด ที่ผสมในตัวรับต่อคุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ความเหนียว (viscosity) เวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม และคุณสมบัติเชิงกล ได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength), ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (% elongation at break) และแรงที่ใช้ในการถอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force)

1.2.2 ศึกษาปริมาณสารสำคัญ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดบัวก

1.2.3 ศึกษาผลของสูตรตัวรับมาส์กหน้าแบบแผ่นถอกออกที่ผสมสารสกัดบัวก เช่น ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ความเหนียว (viscosity) เวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม คุณสมบัติเชิงกล ได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength), ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (% elongation at break) และ แรงที่ใช้ในการถอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณการปลดปล่อยสารสำคัญ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การระคายเคือง และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากมาส์กหน้าแบบแผ่นถอกออกที่ผสมสารสกัดบัวก

1.2.4 ศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่งของสูตรตัวรับมาส์กหน้าแบบถอกออกที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เตรียมสารสกัดหยาบของบัวกโดยใช้ 95% ethanol เป็นสารละลายตัวกลางในการสกัด และทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยใช้ เครื่องระเหยโดยความดัน (rotary evaporator)

1.3.2 การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในบัวก ได้แก่ asiatic acid asiaticoside และ madecassoside โดยใช้วิธีクロมาโทกราฟฟิของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC)

1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของสารสกัดบัวบก

1.3.4 พัฒนาตัวรับมาส์กเบสด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว (Response surface methodology; RSM) โดยใช้โปรแกรมออกแบบการทดลอง Design-Expert®

1.3.5 ศึกษาปริมาณการปลดปล่อยสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกโดยใช้เครื่องมือจำลองการซีมผ่านผิวน้ำ

1.3.6 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์การระคายเคืองผิวน้ำของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกโดยใช้วิธี MTT

1.3.7 ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก

1.3.8 ศึกษาความคงสภาพในสภาพเร่งของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบก

1.4 สมมุติฐานการวิจัย

ผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกเมื่อทาบนผิวน้ำสามารถเกาะติดผิวน้ำ และลอกออกเป็นฟิล์มได้เมื่อแห้ง และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

หัวข้อการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ได้แก่

- (1) ประวัติและความเป็นมาเกี่ยวกับมาส์กและเครื่องสำอาง
- (2) สารก่อฟิล์ม
- (3) สารเพิ่มความยืดหยุ่น
- (4) สารช่วยเพิ่มการยึดเกาะ
- (5) ปั๊บก
- (6) ชั้นผิวหนัง
- (7) อนุมูลอิสระ
- (8) คอลลาเจน

2.1 ประวัติและความเป็นมาเกี่ยวกับมาส์กและเครื่องสำอาง

การใช้เครื่องสำอางเป็นศิลปะอย่างหนึ่งที่มีมาแต่สมัยโบราณ มีการค้นพบว่ามีการใช้เครื่องสำอางมาตั้งแต่สมัยอียิปต์โบราณ จีน อินเดียและต่อมาก็ถึงปัจจุบัน มาส์กเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มสารอาหารให้แก่ผิวหน้า พบร่วมกับการใช้มาส์กมามาตั้งแต่สมัยโบราณโดยใช้ส่วนประกอบที่มีตามธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ และโคลน แต่ผู้เชี่ยวชาญมักจะหลีกเลี่ยงการใช้มาส์กเนื่องจากให้ผลที่ไม่เป็นที่พึงพอใจ ต่อผู้ใช้ เช่น ทำให้เกิดสิวเนื่องจากล้างออกได้ยาก ในรูปแบบของมาส์กที่มีส่วนผสมของโคลน และทำให้หน้าแห้งตึง เนื่องจากพาลิตภัณฑ์มาส์กไว้นานเกินไป (Beringhs et al., 2013) มาส์กในรูปแบบผง จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน เช่น เวลาทามาส์กบนหน้าสักพักจะทำให้เศษของส่วนประกอบ เช่น สารสกัดจากพืช หรือโคลนที่แห้ง นั่นลุดอกจากหน้าเป็นเศษผง เนื่องจากมาส์กรูปแบบผงนั้น ยึดเกาะผิวหน้าได้เมดี และล้างออกยาก ดังนั้นจึงมีนวัตกรรมเกี่ยวกับแฟ่แปะ (patch) ที่สามารถใช้กับทางเครื่องสำอาง หรือที่เรียกว่า “มาส์ก” และทางเภสัชกรรม ส่วนใหญ่จะเน้นไปทางการรักษา เช่น แผ่นแปะบรรเทาอาการปวด บวม เป็นต้น ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่ใช้ในตัวรับของแผ่นแปะ แผ่นแปะสามารถควบคุมสารสำคัญให้เข้มข้นเข้าสู่ผิวหนัง รูขุมาน และต่อมไขมัน โดยออกฤทธิ์เฉพาะที่หรือดูดซึมเข้าสู่กระเสlesleoid ขึ้นอยู่กับการออกแบบเมทริกซ์ (matrix) ทั้งของเมทริกซ์ ประกอบด้วยตัวยาสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ พอลิเมอร์ที่ใช้เป็นสารก่อฟิล์ม มักใช้พอลิเมอร์ที่ละลายน้ำ พลาสติไซเซอร์ สารเพิ่มการยึดเกาะ และสารลดแรงตึงผิว สารออกฤทธิ์สำคัญ จะละลายหรือกระจายอยู่ในเมทริกซ์ มาส์กจะเหนียวและยึดติดผิวเมื่อแห้ง การยึดติดของมาส์กเป็นการบำรุงตลอดระยะเวลาที่แปะไว้บนผิว จนถึงเวลาลอกออก ซึ่งไม่ทำให้ผิวระคายเคือง และทิ้งลิ้งตกค้างไว้บนผิว (Shefer and Shefer, 2003) มาส์กมีหลายประเภท เช่น แผ่นแปะใต้ตา (eye contour patch) จะมีสารออกฤทธิ์ที่ทำให้บริเวณใต้ตาเรียบเนียน ผ่อนคลาย ระยะเวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มาส์กเพื่อชะลอวัย (anti-aging patch)

มีส่วนผสมของ ascorbic acid และจัดเป็นมาส์กประเภทแรก ๆ ของการคิดค้นและพัฒนามาส์กเพื่อชุ่มประสงค์อื่น ๆ และความต้องการของผู้บริโภค มาส์กเพื่อลดริ้วรอย (antiwrinkle patch) จะมีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์คล้ายกับ วิตามินซี มีชุ่มประสงค์เพื่อ ชะลอการเกิดริ้วรอย มาส์กทั่วไป (Lifting patch) มีส่วนผสมของ glycolic acid โปรตีน วิตามิน และสารสกัดที่ได้จากพืช เช่นการเพิ่มความชุ่มชื้นและเติมเต็มจุดบกพร่องบนใบหน้า และมาส์กเพื่อความกระชับ (slimming patch) มีส่วนผสมของสารสกัดตามธรรมชาติ เช่น สารสกัดจาก *Fucus Vesiculosus* และ *Ginkgo biloba* เน้นความกระชับผิวหน้า

โครงสร้างของแผ่นแปะหรือมาส์ก ประกอบด้วย 3 ขั้น ได้แก่

(1) Backing film เป็นชั้นที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ชั้น adhesive layer สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก มีคุณสมบัติ ปกคลุมผิว ยึดหยุ่นดี ระยะทางอากาศได้ดี เป็นชั้นที่แสดงเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ได้

(2) Adhesive layer เป็นชั้นที่สำคัญที่สุดของแผ่นแปะหรือมาส์ก มีคุณสมบัติทำให้แน่นเกาะผิวได้ดี สารที่ทำให้ยึดติดกับผิว เช่น acrylic, silicone และ rubber นอกจากนี้การยึดติดแบบลอกออกได้ ที่เกิดเป็นแผ่นเมื่อแห้งแล้วสามารถลอกออกได้ (dry adhesives) ใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ประเภท polyvinyl derivatives และสารที่ได้จากการธรรมชาติ เช่น แป้ง เชลลูโลส และน้ำตาล

(3) Release liner แป้งออกเป็นอีก 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแผ่นแปะหรือมาส์กแบบกระดาษ กลุ่มพลาสติก และกลุ่มที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุ (Patel et al., 2012)

มาส์กหน้าแบบตามลักษณะการใช้งานออกเป็น 3 แบบ ได้แก่

(1) มาส์กแบบพอกไว้บนหน้า แล้วล้างออก ช่วยจัดเซลล์ผิวที่เสื่อมสภาพ และแก้ปัญหาตามสภาพผิว

(2) มาส์กแบบพอกบนหน้าแล้วลอกออก เน้นเพิ่มความชุ่มชื้น แก้ไขปัญหาผิวหยาบกร้าน และลดริ้วรอย

(3) มาส์กชนิดแผ่น เพื่อความสดชื่น คืนความชุ่มชื้นให้แก่ผิว และเพิ่มความกระจางใส

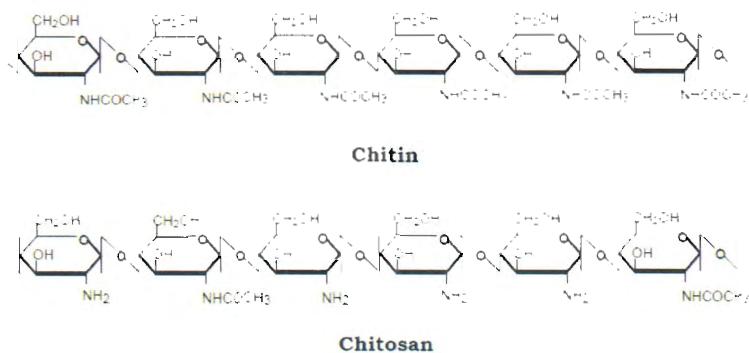
Pichayakorn (2013) ศึกษาเกี่ยวกับ การพัฒนามาส์กหน้าแบบลอกออกจากยางธรรมชาติ เพื่อถนนมผิว สารก่อฟิล์มที่ใช้ ได้แก่ ยางจากรธรรมชาติที่ขัดปอร์ตีนออก, PVA และ methylcellulose พลาสติไซเซอร์ ได้แก่ propylene glycol และ glycerin สารเพิ่มความคงตัว คือ tween 80 และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ พบว่า มาส์กหน้าแบบลอกออกจากยางธรรมชาติ ให้คุณสมบัติทางกายภาพและเขิงกลที่ดี (Pichayakorn et al., 2013)

ดังนั้น งานวิจัยนี้เลือกใช้เป็นมาส์กในรูปแบบผง ซึ่งล้างออกได้ยาก และยึดเกาะผิวได้ไม่ดี จึงได้มีการแก้ไขปัญหา และพัฒนาผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าชนิดลอกออก (peel off) โดยใช้พอลิเมอร์ เป็นสารก่อฟิล์มเพื่อย่างต่อการชำระล้าง และขัดปัญหารือการยึดติดผิว

2.2 สารก่อฟิล์ม

2.2.1 ไคโตชาน (Chitosan) มีโครงสร้างทางเคมีดัง ภาพที่ 1 ลักษณะเป็นผงสีขาว เหลือง มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000-1,000,000 ละลายน้ำได้ในน้ำและสารละลายกรด ที่มีความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 6.5 เนื่องจากไคโตชานมีความเป็นกรดสูงและมีประจุบวก จึงไม่เข้ากันกับสารหรือโมเลกุลที่มีประจุลบ

ละลายได้น้อยในแอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่า degree of deacetylation ของไคโตชาน (Rathke and Hudson, 1994) ประโยชน์ทางเภสัชกรรมของไคโตชาน ใช้เป็นสารก่อฟิล์ม สารยึดเกาะ สารเคลือบเม็ดยา สารเพิ่มความหนืด มีคุณสมบัติเป็น mucoadhesive มีค่า glass transition temperature (T_g) ที่ 203°C ไคโตชานเป็นวัตถุดิบทางชีวภาพ จัดอยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตผสมที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีรากตุ่นในโครงเจนอยู่ด้วย ทำให้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Rathke and Hudson, 1994)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไคติน และไคโตชาน

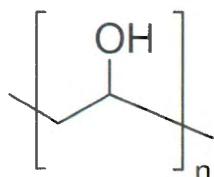
ไคโตชาน มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายเซลลูโลส ได้จากเปลือกของสัตว์ประเพณี crustacean เช่นเปลือกหุ้ง กระดองปู และแกนหมึก เป็นต้น (Tharanathan and Kittur, 2003) ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาว มีองค์ประกอบของหน่วยย่อยเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสมีชื่อว่า N-acetyl glucosamine ไคตินเป็นสารที่ละลายน้ำยากหรือไม่ค่อยละลาย ส่วนไคโตชานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาม้วง acetyl ออกจาก N-acetyl-D-glucosamine เรียกว่ากระบวนการ Deacetylation (DD) เป็นการเปลี่ยน N-acetyl-D-glucosamine ให้เป็น glucosamine มากกว่า 60% ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีทำให้ไคตินเปลี่ยนไปเป็นไคโตชานคือเป็นการลดลงของม้วง acetyl ซึ่งการลดลงของหน่วยย่อย N-acetyl glucosamine เป็นการเพิ่มขึ้นของ glucosamine ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน การจัดระดับของการขัดม้วง acetyl หรือ deacetylation ทำให้โมเลกุลเล็กลง และมีคุณสมบัติที่อ่อนตัว สามารถขึ้นรูปเป็นเจล รวมถึงการใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ ได้มากขึ้น (Nilsen-Nygaard et al., 2015)

เมื่อไคโตชานมีค่า % DD เกินกว่า 60% ไคโตชานจะสามารถละลายในกรดอินทรีย์ได้มากขึ้น เนื่องจากม้วงมิโนของ glucosamine มีการรับโปรตอนได้มากขึ้น ไคโตชานที่ละลายในกรดอินทรีย์ จึงมีประจุบวกเพิ่มขึ้น ไคโตชานจึงสามารถละลายในสภาวะที่เป็นกรดได้ สารละลายของไคโตชาน มีลักษณะคล้ายเจล ยึดหยุ่น ขันเหนียว จึงสามารถทำให้เป็นรูปแบบต่าง ๆ โดยเฉพาะการทำเป็นแผ่น หรือเยื่อบาง ๆ นอกจากนี้ไคโตชานสามารถถ่ายย่อยสลายตามธรรมชาติ มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตและไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม (Prashanth and Tharanathan, 2007) ไคโตชานถูกนำมา

ประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร วัสดุศาสตร์ จุลชีววิทยา และวิทยาศาสตร์การแพทย์ ส่วนการประยุกต์ใช้โคโตชาנתทางด้านเครื่องสำอาง เช่น การใช้โคโตชาณเป็นแผ่นแปะผิวนังผสานสารสกัดลำไย ระบบนำส่งแบบ transdermal delivery systems เพื่อลดอาการปวดข้อ (Borwanwattanarak et al., 2008) และแผ่นแปะผิวนังที่ทำจากโคโตชาณผสานสารสกัดไฟลลดอกรือวัสดุเพื่อใช้ในทางการแพทย์ (Suksaeree et al., 2015)

การนำโคโตชาณประยุกต์ใช้ทางด้านเครื่องสำอาง ด้วยคุณสมบัติของโคโตชาณมีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลทรรศน์ อีกทั้งโคโตชาณเป็นที่มีประจุบวกสามารถเพิ่มความหนืดได้โดยละลายในสภาพน้ำที่เป็นกรด ในทางเครื่องสำอางโคโตชาณจึงทำหน้าที่เป็น ยูบม ใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภท ครีม โลชั่น และยาทาเล็บเพื่อเพิ่มความหนืดและความเงา จึงนิยมนำมาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางหลายชนิด และโคโตชาณสามารถอุ้มน้ำได้ดี และสามารถเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ ป้องกันการสูญเสียความชุ่มชื้นของผิว (Borwanwattanarak et al., 2008) เนื่องจากโคโตชาณเป็น biomedical และ biocompatible polymer ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ย่อยสลายได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแผ่นเจลติดผิวนังและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ (Suksaeree et al., 2015) โคโตชาณยังสามารถทำเป็นเม็ดปีทบรรจุสารหอมใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมอาบน้ำ พบร่วมกับการปลดปล่อยสารหอมอย่างรวดเร็วจากเม็กบีทเมื่อใช้งาน (Anchisi et al., 2005)

2.2.2 Polyvinyl alcohol (PVA) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ โครงสร้างทางเคมีดัง ภาพที่ 2 รูปแบบผง สีขาว ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 - 200,000 โดยความหนืดของ PVA จะขึ้นอยู่กับขนาดน้ำหนักโมเลกุล ทำหน้าที่เป็นสารเคลือบ (Coating agent) สารหล่อลื่น (lubricant) สารเพิ่มความคงสภาพ (stabilizing agent) และสารเพิ่มความหนืด (viscosity-increasing agent) ในทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอาง ไม่เป็นพิษ ไม่มีกลิ่น และละลายได้ดีในน้ำร้อน เนื่องจาก PVA มีจุดหลอมเหลวที่ 180 °C ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Rowe et al., 2009) PVA สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยวิธีทางชีวภาพ มีคุณสมบัติการเกิดเป็นฟิล์ม และยึดติดผิวนังได้ (Chen et al., 2015) PVA มีความเค้นแรงดึงและความยืดหยุ่นสูง รวมถึงมีปริมาณออกซิเจนที่สูง และมีคุณสมบัติป้องกันการระเหยของน้ำ กลิ่น และน้ำมัน ได้ดี ทั้งนี้ คุณสมบัติดังกล่าวขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้น หากความชื้นสูง น้ำจะถูกดูดซับได้มากขึ้น โดยน้ำทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้พลาสติกนิ่มหรือพลาสติไซเซอร์ ดังนั้นจะทำให้ความเค้นแรงดึงลดลง แต่จะเพิ่มแรงยึดและแรงเฉือนให้มากขึ้น (Dou et al., 2015)



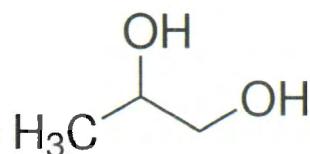
ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Polyvinyl alcohol (PVA)
ที่มา: Sigmaaldrich (2016)

การวิจัยของ Fan (2016) ได้ทำการเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของ chitosan gelatin และ PVA เพื่อเป็น hydrogel โดยการเตรียม chitosan ผสมกับ gelatin ในอัตราส่วนต่าง ๆ และผสมใน PVA สำหรับรักษาบาดแผล พบร่วมกัน การทดสอบคุณลักษณะเชิงกลของแผ่นปิดแผลมีความแข็งแรงถึง 2.2 Mpa. มีการดูดซับเลือดและน้ำเหลืองได้ดีและรวดเร็ว (Fan et al., 2016) อีกทั้ง Pal และคณะ (2007) ทำการออกแบบ hydrogel ที่ทำจาก PVA และ gelatin เพื่อใช้ทางการแพทย์ พบร่วมกับการซึมซับน้ำเลือดและน้ำเหลืองที่ดีขึ้น และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม มีความแข็งแรง (Pal et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ PVA ร่วมกับไคลโตชาน เป็นฟิล์มทนความอาหารเพื่อในอุตสาหกรรมอาหารอีกด้วย (Tripathi et al., 2009) ทั้งนี้ PVA เป็นสารก่อฟิล์มที่ทำให้คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ PVA เป็นสารก่อฟิล์มร่วมกับไคลโตชาน เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มมาส์กหน้าแบบลอกให้มีความแข็งแรงขึ้น

2.3 พลาสติไซเซอร์หรือสารเพิ่มความยืดหยุ่น

เป็นสารช่วยทางเภสัชกรรม เติมลงไปเพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่สารก่อฟิล์ม ให้แผ่นฟิล์มมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ดีขึ้น และลดความแข็งกระหะของแผ่นฟิล์ม โดยสารเพิ่มความยืดหยุ่นจะไปลดแรงยืดเห็นี่ระหว่างโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุลมากขึ้น เพิ่มความยืดหยุ่น และช่วยป้องกันการแยกตัวของฟิล์มในระหว่างที่ฟิล์มแห้ง ทำให้ฟิล์มมีลักษณะทางกายภาพดี สารช่วยทางเภสัชกรรมที่ใช้เป็นพลาสติไซเซอร์ ในผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออก ได้แก่

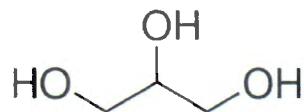
2.3.1 โพรพิลีน ไกลคอล (Propylene glycol) เป็นสารกลุ่ม glycol โครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 3 ได้จากการสังเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง propylene oxide กับน้ำ มีลักษณะเป็นของเหลวข้นใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เข้ากันได้กับน้ำ ทำหน้าที่เป็นสารถนอม (antimicrobial preservative) น้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) สารเพิ่มความชุ่มชื้น (humectant) พลาสติไซเซอร์ (plasticizer) ตัวทำละลาย (solvent) สารเพิ่มความคงสภาพ (stabilizing agent) และตัวทำละลายร่วม (cosolvent) ในทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอาง มีจุดเดือดที่ 188°C จุดหลอมเหลวที่ -59°C จุดวาบไฟที่ 99°C และใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ยา และเครื่องสำอางหลายชนิด ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนัง (humectants) (Rowe et al., 2009)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ Propylene glycol
ที่มา: Sigmaaldrich (2016)

Jagadeesh และคณะ (2013) พบว่าเมื่อใช้ propylene glycol เป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับฟิล์ม โดย propylene glycol ช่วยทำให้สายพอลิเมอร์เคลื่อนที่ได้ง่ายขึ้น ทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นและดูดความชื้นได้ (Jagadeesh et al., 2013) Cooper และคณะ (1984) ได้ทำการศึกษาเพิ่มการขนส่งสารที่ไม่มีข้าว เข้าสู่ผิวชั้น epidermis โดยใช้ propylene glycol เพิ่มความเป็นข้าวให้กับตัวพา (vehicle) ในการขนส่งเข้าสู่ผิว พบร่วมกับการขนส่งตัวชี้น์เมื่อเทียบกับการใส่สารเดี่ยว (Cooper, 1984)

2.3.2 กลีเซอริน (Glycerin) โครงสร้างทางเคมีดัง ภาพที่ 4 เป็นของเหลวหนืด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความหนืด และดูดความชื้นเมื่อสัมผัสกับอากาศ ทำหน้าที่เป็นสารถนอม (antimicrobial preservative) น้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) สารเพิ่มความชุ่มชื้น (humectant) สารป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผิว (emollient) พลาสติไซเซอร์ (plasticizer) ตัวทำละลายร่วม (cosolvent) สารให้ความหวาน (sweetening agent) และ สารปรับ Toniicity (tonicity agent) ในทางเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง มีจุดเดือดที่ 290 °C จุดหลอมเหลวที่ 17.8 °C จุดวาบไฟที่ 176 °C ละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ ละลายได้เล็กน้อยในน้ำมัน ไม่เข้ากันกับ strong oxidizing agent (Rowe et al., 2009)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ Glycerin
ที่มา: Sigmaaldrich (2016)

จากการศึกษาของ Jangchud และ Chinnan (1999) พบร่วม glycerin เป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่นใน peanut protein films ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ sorbitol, polyethylene, polyethylene glycol และ propylene (Jangchud and Chinnan, 1999) Gontard และคณะ(1993) ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์ม edible wheat gluten โดยมี glycerin เป็นพลาสติไซเซอร์ พบร่วม glycerin ทำให้ฟิล์มมีความสามารถในการยืดตัว (extensibility) ได้ดี แต่ความสามารถในการต้านแรงทะลุ (puncture strength) ความยืดหยุ่น (elasticity) และการระเหยของน้ำ (water vapor) ลดลงเนื่องจากเกิด glycerin รบกวนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างพอลิเมอร์ และน้ำ การเปลี่ยนสถานะของพอลิเมอร์จาก glassy state ไปเป็น rubber state ทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง (Gontard et al., 1993)

Propylene glycol และ glycerin นอกจากจะเป็นสารเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับฟิล์มแล้ว ยังเป็นสารเพิ่มให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว โดยจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

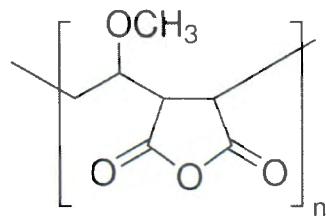
(1) สารเพิ่มความชุ่มชื้น (moisturizer) เป็นสารที่ทำให้เกิดความชุ่มชื้นแก่ผิวในชั้น epidermis ทำให้ผิวนางมีความอ่อนนุ่ม และยืดหยุ่นได้ดี

(2) emollient เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็น moisturizer โดยวิธีการปกคลุมผิว (occlusion) ทำหน้าที่ หล่อลื่น ลดแรงเสียดทาน และป้องกันการระเหยของน้ำ

กลไกทำให้เกิดความชุ่มชื้นของ moisturizer ประกอบไปด้วย occlusion effect คือ การเกิดเป็นฟิล์ม ป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผิว และดูดน้ำจากอากาศมา กักเก็บไว้ที่ตัวเอง (humectancy) และที่ผิว จากกลไกข้างต้น ผลิตภัณฑ์มาสก์หน้าแบบลอกออก สามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้ เนื่องจาก มีคุณสมบัติเป็น occlusion จากสารก่อฟิล์ม ป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผิว และมี glycerin ให้คุณสมบัติเป็น humectancy ช่วยดูดน้ำจากอากาศมา กักเก็บไว้ที่ตัวเองและที่ผิวทำให้ผิวนังชุ่มชื้น

2.4 สารเพิ่มการยึดติด

2.4.1 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) หรือ PVMMA อยู่ในรูปของแข็ง สีขาว น้ำหนักเบา กระจายตัวได้ง่าย ไม่มีกลิ่น ดูดความชื้นจากอากาศได้ดี และมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ชุ่น ไม่มีกลิ่น ทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มการยึดติด (Bioadhesive material) สารเพิ่มความหนืด (viscosity-increasing agent) สารจับโลหะ (complexing agent) และตัวประสานระหว่างน้ำกับน้ำมัน (emulsion stabilizer) ในทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอาง ละลายได้ในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ไม่เข้ากับ strong oxidizing agent (Rowe et al., 2009)

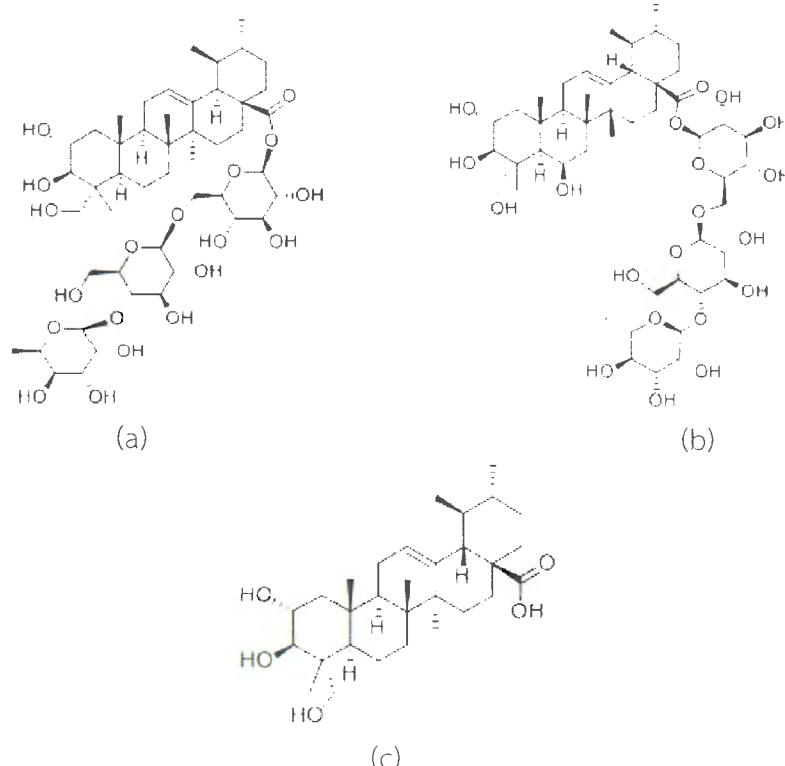


ภาพที่ 5 โครงสร้างของ Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride)
ที่มา: Sigmaaldrich (2016)

มีรายงานวิจัยของ Kim (2006) ใช้ PVMMA เป็นสารเพิ่มการยึดติดให้กับฟิล์มที่ทำจาก Polyethylene และ Rohatgi (2015) ทำการเชื่อมขวาง (crosslink) ระหว่าง PVA กับ PVMMA เพื่อใช้กับทางชีวการแพทย์ พบร่วม PVA และ PVMMA เข้ากันได้ดี และหลังการ crosslink ฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส มีความยืดหยุ่นที่ขึ้น และมีการยึดติดดี (Rohatgi et al., 2015) การวิจัยของ Orienti และคณะ (1998) ใช้ PVMMA เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยา ในรูปแบบยาเม็ด พบร่วมกับการปลดปล่อยยาที่รวดเร็ว (Orienti et al., 1998) อีกทั้ง Shahbazi และคณะ (2014) ใช้ PVMMA เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยา ขนาดอนุภาคระดับนาโน ในรูปrunของ silicon อีกด้วย (Shahbazi et al., 2014)

2.5 บัวบก

บัวบกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยและประเทศไทยในแถบร้อนที่ใช้มาตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์ ซึ่งปรากฏในตำราอายุเวทของอินเดียตั้งแต่ 500 ปีก่อนคริสต์ศักราช (Kartnig and Hoffmann-Bohm, 1992) มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง สามารถปลูกได้ดีในที่ที่มีความชุ่มชื้นโล่งแจ้ง มีแสงรำไรและในร่ม บัวบกจึงได้รับการบรรจุอยู่ใน WHO monograph และปรากฏอยู่ในเภสัชตำรับของหลายประเทศ อาทิ จีน อังกฤษ เยอรมัน อินเดีย และไทย บัวบกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (L.) Urban อยู่ในวงศ์ Umbelliferae หรือ Apiaceae สารที่อยู่ในบัวบกที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเป็นสารกลุ่ม triterpene, saponin และ sugar ester สารออกฤทธิ์ที่มีการศึกษาวิจัยกันมาก ได้แก่ asiaticoside, asiatic acid และ madecassoside มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 6 มีการนำบัวบกมาใช้ประโยชน์ทั้งในทางแพทย์แผนโบราณและแพทย์แผนปัจจุบันอย่างแพร่หลาย และมีบันทึกข้อมูลจากการบอกรเล่าของแพทย์พื้นบ้าน พบว่าสอดคล้องกับการใช้บัวบกในการแพทย์แผนปัจจุบัน ซึ่งมีการศึกษาทางคลินิก ได้แก่ ใช้ในการสมานแผล และใช้รักษาโรค สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่า บัวบกมีค่าดัชนีต้านอนุมูลอิสระสูง โดยพีชุดมีดัชนี 4.65 และในพืชแห้งมีค่าดัชนี 7.98 ทั้งนี้ตัวอย่างแห้ง 100 กรัม ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เปต้าแครอทีน 12.76 mg แซนโทฟิลล์ 10.59 mg วิตามินซี 3.29 mg วิตามินอี 0.0031 mg แทนนิน 24.28 mg และสารประกอบพินอลลิก 98.44 mg (นวัตศรี รักษอริยะธรรม, 2545)



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ asiaticoside (a), madecassoside (b) และ asiatic acid (c)
ที่มา: Chemicalbook (2016)

Asiaticoside ในบัวบกช่วยเร่งการสมานแผล ทั้งแบบปกติ และชนิดเกิดข้าม เมื่อทำการทดลองในหนูตะเภาโดยการทาสารละลาย asiaticoside ความเข้มข้น 0.2 % และ 0.4 % บริเวณที่เกิดบาดแผลพบว่ามีความทนแรงดี และมีปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ทั้งยังเกิดผิวนังใหม่คุณภาพริเวณบาดแผลเร็วขึ้น การให้ asiaticoside โดยการรับประทาน ความเข้มข้น 1 mg/kg ของหนูตะเภา พบร่ว่างการสมานแผลเช่นกัน (Shukla et al., 1999) การใช้สารสกัดน้ำจากบัวบกในรูปแบบครีม เจล และชี้ฟิ้งทาริเวนแผลเปิดของหนูขาว วันละ 3 ครั้ง ระยะเวลา 24 วัน ทำให้เพิ่มจำนวนของเซลล์ และมีการสร้างคอลลาเจนบริเวณบาดแผลเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนและแรงดึงของบาดแผลทำให้อัตราการหดตัวของแผลสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยการทาในรูปแบบของเจล ให้ผลการรักษาแผลดีกว่ารูปแบบครีมและชี้ฟิ้ง (Parameshwaraiah and Shivakumar, 1998) Suguna (1996) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของบัวบก ในการสมานแผลบริเวณผิวนังของหนูขาว พบร่ว่างการสกัดบัวบกในแหลกอยออล มีผลต่อระยะต่าง ๆ ในกระบวนการสมานแผล นอกจากนั้นสารสกัดช่วยทำให้การสร้างคอลลาเจน และจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น โดยพบการเพิ่มขึ้นของ DNA, โปรตีน และ คอลลาเจน ในเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล (Suguna et al., 1996) นอกจากนี้ สารสกัดบัวบกยังช่วยเพิ่มการสร้างคอลลาเจน และทำให้การเข้มข้นของสายคอลลาเจน เกิดได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากฤทธิ์ในการสมานแผลแล้ว ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของบัวบกในด้านอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาผลของ asiaticoside ต่อการต้านออกซิเดชัน ในบาดแผลบริเวณการผ่าตัดเนื้องอกของหนูขาว พบร่ว่างการทา asiaticoside ความเข้มข้น 0.2 % บริเวณบาดแผลวันละ 2 ครั้ง ติดต่อ กัน 1 สปดาห์ เกิดการเพิ่มขึ้นของสารต้านออกซิเดชันในเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่ การศึกษาของ Jaswir (2004) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของบัวบกพบว่าสารสกัดบัวบก ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีเทียบเท่ากับโรสมาร์และเซจ (sage) ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีจำหน่ายท้าไปในประเทศไทยเชีย (Jaswir et al., 2004) และในประเทศไทยมีรายงานว่า บัวบกมีดัชนีสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant index) สูง (นวลศรี รักอริยะธรรม, 2545) จากการรายงานของ Lu และคณะ (2004) ได้ทำการทดลองถึงผลของ asiaticoside ต่อการเปลี่ยนแปลง gene expression ใน human dermal fibroblast โดยใช้ cDNA microarray technology และประเมินระดับ mRNA จากการสร้างโปรตีนของยีน ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ extracellular matrix เช่น encoding type I และ type III collagen โดยวิธี Northen blot และ radioimmunoassay ตามลำดับ พบร่ว่าง asiaticoside 30 μg/mL มีผล up regulate ยีนส์ 54 ยีนส์ มีหน้าที่ควบคุม cell proliferation, cell cycle progression และการสร้าง extracellular matrix ที่เวลาต่าง ๆ และพบความสัมพันธ์ระหว่าง gene profile, mRNA และการสร้างโปรตีนของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย asiaticoside (Lu et al., 2004)

ไม่เพียงแต่บัวบกจะมีข้อบ่งใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณที่สอดคล้องกับแพทย์แผนปัจจุบัน สรรพคุณของบัวบกตามตำราแพทย์แผนไทยใช้บัวบกรักษาอาการข้อใน บำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง รักษาอาการอ่อนเพลีย ขับปัสสาวะ รักษาโรคทางผิวนัง รักษาบาดแผล รักษากระดูกขาว รักษาพิษจากงูกัด รักษาอาการบิดระยะแรก และการใช้บัวบกร่วมกับสมุนไพรชนิดเป็นยา rākṣa อาการร้อนใน กระหายน้ำ อีกทั้งบัวบกยังใช้ในแพทย์ทางเลือกในศาสตร์ที่เกี่ยวกับการรักษาแบบ homoeopathy (homeopathy) ทำให้แผลเป็นJason นอกจากนี้ยังมีการใช้ในรูปแบบชี้ฟิ้ง ยาน้ำสำหรับรับประทาน ปัจจุบันบัวบกได้มีการพัฒนาเป็นยาที่ใช้รักษาแผลและโรคผิวนัง เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรตัวอื่น ข้อมูล

การศึกษาฤทธิ์ของบัวบกมีค่อนข้างมากและหลากหลาย รวมถึงการวิจัยทางคลินิก เช่น การใช้บัวบก ในผู้ป่วยเส้นเลือกขอด (venous insufficiency) มีรายงานวิจัยของ Pointel และคณะ (1987) ทำการศึกษาแบบ randomized, multicenter, placebo-controlled double blind ในผู้ป่วยเส้นเลือดขอด จำนวน 94 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ให้รับประทาน สารสกัดจากใบบัวบก (Titrated extract of *Centella asiatica*; TECA) ขนาด 60 และ 120 mg/day เบริยบเทียบกับยาหลอก เป็นเวลา 2 เดือน พบร่างกายกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ TEAC มีอาการดีขึ้นตามขนาด TEAC ที่ได้รับ เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก (Pointel et al., 1987) การใช้บัวบกในผู้ป่วย diabetic microangiopathy ซึ่ง Incandela และคณะ (2001) ทำการศึกษาผลของ total triterpenic fraction ของบัวบก (TTFCA) ต่อ microcirculation ในผู้ป่วย diabetic microangiopathy และ neuropathy พบร่างกายที่ได้รับ TTFCA 60 mg วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 12 เดือน ช่วยทำให้ venoarterolar response ดีขึ้น ช่วยลด resting flux และอัตราการบวมที่ข้อเท้า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (Incandela et al., 2001) ผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในห้องตลาดมีรูปแบบหลากหลาย เช่น แคปซูลบรรจุผงแห้งบัวบก ใช้เป็นยารับประทานเพื่อช่วยลดการอักเสบ ยาน้ำรุ่งช่วยฟื้นฟูสภาพร่างกาย และช่วยปกป้องเซลล์ ประสาน ยาทาทางผิวหนังรูปแบบของครีม ขี้ผึ้ง หรือโลชัน เช่น ครีมทาผิวที่ผสมสารสกัดบัวบกเพื่อรักษาโรคผื่นแพ้สัมผัส (Izu et al., 1992) ใช้ในการสมานแผล (Morisset et al., 1987) โลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกเพื่อลดเซลล์ไลท์ (Hexsel et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีจำหน่ายอยู่ในรูปแบบสารสกัดบัวบก ที่ประกอบด้วย triterpene acids และ triterpene acid sugar ester มักเตรียมจากส่วนที่อยู่เหนือดินจากพืชสดหรือพืชแห้ง เช่น Titrated extract of *Centella asiatica* (TECA), Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* (TTFCA), Centellase, Emdecassol, Madecassol, Marticassol และ Blasteostimulina (Hausen, 1993; Brinkhaus et al., 2000) เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและงานวิจัยทางคลินิกของบัวบก เช่น ฤทธิ์กระตุ้นความจำ (Anand et al., 2010; Gray et al., 2016) ฤทธิ์ลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด (Supkamonseni et al., 2014) ฤทธิ์บรรเทาความวิตกกังวลและซึมเศร้า (Wijeweera et al., 2006) ดังนั้นบัวบกจึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพและมีประสิทธิภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง นับเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรที่เป็นพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยต่อไป



ภาพที่ 7 บัวบก จากแหล่งปลูก บ้านวังยาง ตำบลบุ่งหวย อำเภอวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี

2.6 ขั้นผิวนาง

ผิวนางเป็นอวัยวะมีมากที่สุดในร่างกายมนุษย์ คิดเป็น 10% ของมวลน้ำหนัก มีหน้าที่เป็นตัวป้องกัน สารเคมี ผลกระทบ และสิ่งแปรปรวนเข้าสู่ร่างกาย ทำหน้าที่ปรับสมดุลให้แก่ร่างกาย เช่น ควบคุมความร้อน และสารคัดหลั่งต่าง ๆ อีกทั้งเป็นอวัยวะที่รับรู้การสัมผัส และส่งสัญญาณเตือนความผิดปกติของร่างกาย เช่น ปวด แสง ร้อน และการแพ้

ชั้นผิวนาง ประกอบด้วย 3 ชั้นหลัก ได้แก่ epidermis, dermis และ hypodermis ดังภาพที่ 8

2.6.1 หนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นผิวนอกสุด ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสถกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ที่ไม่มีเส้นเลือด ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันสิ่งที่อยู่ภายนอกในร่างกาย แบ่งออกเป็น 4 ชั้น ได้แก่

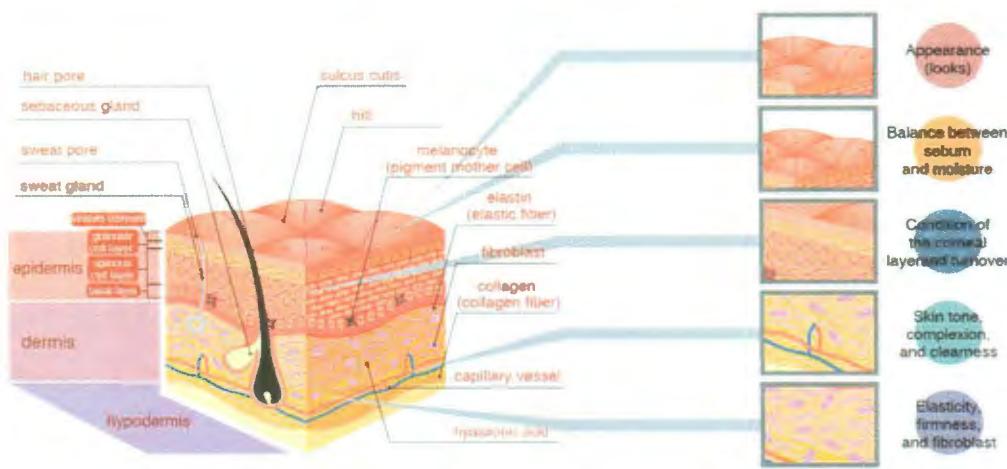
(1) stratum corneum เป็นชั้นผิวนอกสุด ประกอบด้วยเซลล์ผิวที่ตายแล้วหรือซีคล วิธีจัดเซลล์ผิวที่ตายแล้ว ให้หลุดออกจากผิว คือ การใช้ไฟมล้างหน้า การขัดหน้า นวดหน้า ลอกหน้า

(2) stratum lucidum

(3) stratum granulosum เป็นตัวผลักดันเซลล์ผิวขึ้นสู่ชั้นนอกสุด เซลล์จะเป็นรูปกลมรี ทำหน้าที่เป็นตัวรองแรงที่ส่องเข้าผิว และป้องกันน้ำไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย และกันความชื้นซึ่นในร่างกายไม่ให้ระเหยออก

(4) stratum spinosum เป็นชั้นของเซลล์ผิวใหม่ หรือ ลูกเซลล์ โดยที่เซลล์แต่ละเซลล์จะเชื่อมติดกัน โดยมีน้ำเหลือง ไอล่า่น และเลี้ยงเซลล์ทุกตัว ให้แข็งแรง ทำให้มีความยืดหยุ่น

(5) stratum basale เป็นชั้นผิวที่อยู่ลึกสุดของ epidermis มีหน้าที่ผลิตเซลล์ใหม่ และในชั้นนี้จะมีเซลล์ melanocytes มีหน้าที่ผลิตเซลล์สี เป็นตัวกำหนดเซลล์สีผิวเวลาที่ผิวโดนแสงแดด โดยจะตั้นให้ melanocytes ผลิตเม็ดสี melanin ขึ้นมา ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดฝ้า กระ และจุดด่างดำ



ภาพที่ 8 โครงสร้างของผิวหนัง
ที่มา: Lifecellaaustralia

2.6.2 หนังแท้ (dermis) เป็นผิวที่อยู่ใต้ epidermis 95% ของผิวทั่วร่างกาย คือ ส่วนของชั้น dermis ทำหน้าที่รักษาความยืดหยุ่น และความชุ่มชื้นของผิวหนัง ชั้น dermis ประกอบด้วยเส้นเลือด ฝอย ห่อน้ำเหลือง เส้นประสาท ไขมัน รากขน และอื่น ๆ ซึ่งจะนำพาสารอาหารที่จำเป็น ไปเลี้ยง ผิวหนังทั่วร่างกาย นอกจากนี้ ผิวหนังยังขับไขมันออกมารูเป็นชั้นพิล์มไขมันบาง ๆ เพื่อปกป่องผิวหนัง อีกด้วย ผิวชั้น dermis มีหน้าที่หลัก 3 ประการ ได้แก่

2.6.2.1 บำรุงหล่อเลี้ยงผิวและร่างกาย เนื่องจากชั้น dermis มีเส้นเลือด และน้ำเหลือง อยู่เป็นจำนวนมาก เส้นโลหิตฝอยจะดูดซึมสารอาหารที่มีประโยชน์ไปเลี้ยงเซลล์ผิว และส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ส่วนน้ำเหลืองไหลผ่านโครงสร้างผิวเพื่อให้การบำรุง อีกทั้งยังมีเส้นใยคอลลาเจน และอิลาสติน ที่ช่วยโอบอุ้ม และดูดซับความชุ่มชื้น ทำให้ผิวหนังมีความกระชับและยืดหยุ่น

2.6.2.2 ขับถ่ายของเสีย เนื่องจากมีต่อมเหงื่อทำหน้าที่ขับของเสีย และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่ร่างกายไม่ต้องการแล้วออกจากร่างกาย และต่อมไขมัน มีหน้าที่ขับถ่ายน้ำมัน เพื่อหล่อเลี้ยง เส้นขน ผิวหนัง และเส้นผม ซึ่งการขับถ่ายของต่อมไขมัน มีส่วนช่วยป้องกันไม่ให้ความชุ่มชื้นได้ผิวระเหย ออกไประ

2.6.2.3 ความรู้สึก มีเส้นประสาทสัมผัส เช่น ร้อน หนาว เจ็บ เมื่ออาการร้อน ประสาท สัมผัสจะรู้สึกร้อน และไปกระตุ้นการทำงานของต่อมเหงื่อ ทำให้ต่อมไขมันขับถ่ายเหงื่อ และน้ำมันออกมากกว่าปกติ และเมื่ออาการหนาว รู้สึกหนาวและต่อมเหงื่อ จะหดตัว

2.6.3 Hypodermis เป็นชั้นที่มีไขมันจำนวนมาก เก็บอยู่ในชั้นนี้ทำหน้าที่รักษาอุณหภูมิในร่างกายให้อยู่อุ่นตลอดเวลา



2.7 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicle) คือ โมเลกุลหรืออะตอม ที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน โดยปกติร่างกายของเรา มีโมเลกุล หรืออะตอม ที่มีอิเล็กตรอนอยู่ครึ่งหรือในสภาพที่เสถียร แต่ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอน จากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ อนุมูลอิสระเป็นตัวทำลายภูมิคุ้มกันและเซลล์ต่าง ๆ ทำให้เกิดการเสื่อมของร่างกาย ซึ่งจะแสดงออกมาในรูปแบบของ ริ้วรอย แก่ก่อนวัย และโรคความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกาย จำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนช่วย ในกระบวนการนี้ทำให้ได้ออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คือ อนุมูลอิสระ สารตัวนี้นอกจากจะรวมตัวกับไขมันได้ดีหรือไม่ดีแล้ว ยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกาย แล้วก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ปกติแปรสภาพเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (Kehrer and Smith, 1994)

สาเหตุที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ แหล่งภายนอก เช่น คลพิษในอากาศ ozone, nitrous oxide, nitrogen dioxide, ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด และแหล่งภายใน เช่น อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น O_2^- (superoxide anion), OH^- (hydroxyl radicle), ROO (peroxy radicle), H_2O_2 (hydrogen peroxide) และ LO_2 (lipid peroxy) ดังนั้น ร่างกาย จึงมีกลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระ 2 วิธี คือ

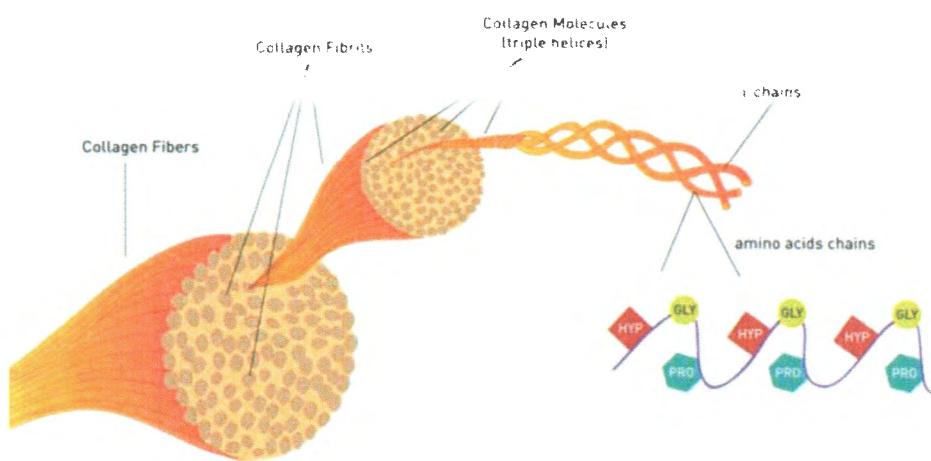
(1) ใช้ออนไซด์ ที่ร่างกายสร้างขึ้น เพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD) enzyme, catalase และ glutathione peroxidase enzyme โดยทั่วไปร่างกายจะสร้างไม่เพียงพอ เซลล์ จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อมีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม ผลที่ตามมาคือ ความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ เกิดริ้วรอย และรอยเที่ยวຢู่น

(2) รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร อาหารเสริม และเครื่องสำอาง เช่น วิตามินอี, beta-carotene, anthocyanin และสารประกอบ polyphenol ต่าง ๆ (Sies and Stahl, 1995)

มีการศึกษาถึงของสารสกัดบัวบก ด้วยวิธี free radical scavenging activity (DPPH) พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถึง 84% เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 83% เมื่อเทียบกับวิตามินซี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 88% (Hashim et al., 2011) งานวิจัยของ Pittella (2009) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบัวบกในตัวทำละลายน้ำ ด้วยวิธี maceration พบปริมาณ phenolic และ flavonoid เท่ากับ 2.86 g/100 g และ 0.361 g/100 g ตามลำดับ และทดสอบด้วยวิธี DPPH มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Pittella et al., 2009) อีกทั้ง Chippada และ Vangalapati (2011) ได้ศึกษาถึงต้านออกซิเดชันในสารสกัดบัวบก พบปริมาณ phenolic เท่ากับ $33.56 \pm 1.56 \text{ mg/g GAE}$ และทดสอบด้วยวิธี DPPH มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ $96.15 \pm 1.23 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Chippada and Vangalapati, 2011)

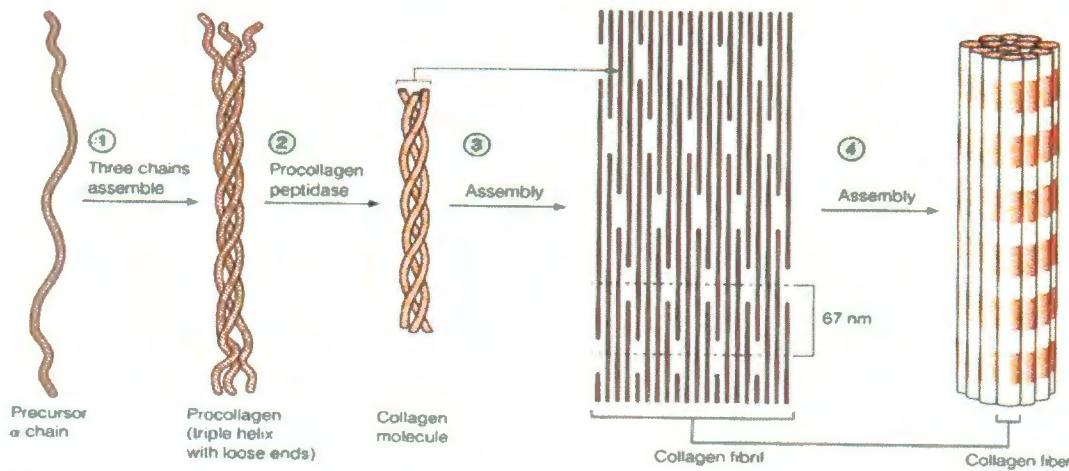
2.8 คอลลาเจน (Collagen)

มีโครงสร้างและองค์ประกอบดังภาพที่ 9 และ 10 คอลลาเจนเป็นโปรตีนสำคัญของผิวหนัง มีปริมาณมากถึง 30% ของโปรตีนในร่างกาย และคิดเป็น 75% ของผิวหนังทั้งหมด (Foegeding et al., 1996) สามารถจำแนกออกได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม ตามความแตกต่างขององค์ประกอบคอลลาเจน ซึ่ง collagen type I เป็นโปรตีนที่พบมากในผิวหนัง เส้นเอ็น เนื้อเยื่ออ่อนพัน และกระดูก ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Kimura et al., 1988) โครงสร้างของคอลลาเจน ประกอบไปด้วย สัดส่วนของ amino acid ชนิด glycine proline และ hydroxyproline ตามภาพที่ 9 collagen fiber จะถูกสังเคราะห์บน liposome ใน fibroblast เปรียบเสมือนเป็น precursor ที่ค่อนข้างยาว เรียกว่า procollagen และส่วนที่เรียกว่า globular extension ประกอบไปด้วย polypeptides ประมาณ 200 หน่วย สาย procollagen และ polypeptides จะถูกขนส่งไปยัง lumen ใน endoplasmic reticulum เกิดปฏิกิริยา hydroxylation และการดัดแปลงทางเคมี รวมตัวกันเป็น triple chain molecules เกิดพันธะ disulfide ระหว่างสายเรียงกันเป็น 3 สายมาพันกัน เกิดเป็น เกลียวสามเส้นวนขวา (right handed triple helix) เกิดเป็นเกลียวของเกลียว เรียกว่า superhelix และมี glycine เรียกตัวเข้าหากันอยู่ภายในแกนกลาง เรียกว่า procollagen เกิดปฏิกิริยา polymerize เป็นเส้นใยที่มีความยาวหลายไมครอน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-200 nm เส้น ใหญ่เหล่านี้จะถูกรวมกันในแนวนาน จนกลายเป็น collagen fibril และ collagen fibril หลาย ๆ เส้น รวมกันจะกลายเป็นเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) ที่มีความแข็งแรง ดังภาพที่ 10 (Peterkofsky, 1972; Knott and Bailey, 1998)



ภาพที่ 9 โครงสร้างของคอลลาเจน

ที่มา: Worldgold collagen (2016)



ภาพที่ 10 องค์ประกอบของเส้นใยคอลลาเจน

ที่มา: Bionanotech (2012)

ชนิดของคอลลาเจน แบ่งออกเป็น 13 ชนิด ตามลำดับของ amino acid และมวลโมเลกุล ดังตารางที่ 1 collagen type I จะพบในสัตว์ชั้นสูง นิยมใช้ในการศึกษา และนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ในผิวนังคนมี collagen type I และ III หากที่สุด

ตารางที่ 1 ชนิดของคอลลาเจน และแหล่งที่พบ

Collagen type	Principle tissue distribution	Cell of origin
I	Loose and dense ordinary connective tissue; collagen fibers Fibrocartilage Bone Dentin	Fibroblast and reticular cell; smooth muscle cell Osteoblast Odontoblast
II	Hyaline and elastic cartilage Vitreo body of the eye	Chondrocyte Ratinal cell
III	Loose and dense ordinary connective tissue; collagen fibers Papillary layer of dermis Blood vessel	Fibroblast and reticular cell Smooth muscle cell

ตารางที่ 1 ชนิดของคอลลาเจน และแหล่งที่พบ (ต่อ)

Collagen type	Principle tissue distribution	Cell of origin
IV	Basement membrane	Epithelial and endothelial cell
	Lens capsule of the eye	Lens fiber
V	Fetal membranes; placenta	Fibroblast
	Basement membrane	
	Bone	
	Smooth muscle	Smooth muscle cell
VI	Connective tissue	Fibroblast
VII	Epithelial basement membrane; anchoring fibrils	Fibroblast; keratinocyte
VIII	Cornea	Corneal fibroblast
IX	Cartilage	
X	Hypertrophic cartilage	
XI	Cartilage	
XII	Papillary dermis	Fibroblast
XIV	Reticular dermis	Fibroblast
XVII	P170 bullous pemphigoid antigen	Keratinocyte

ที่มา: Siani-Rose (2007)

ประโยชน์ของคอลลาเจน มีหน้าที่ค้ำจุน เพิ่มความยืดหยุ่น และความแข็งแรง ให้แก่ผิวนังในชั้นหนังแท้ ทำให้มีสุขภาพที่ดี ซึ่งบวบกมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน งานวิจัยนี้เล็งเห็นคุณประโยชน์ของบวบก จึงได้พัฒนาตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดจากบวบก เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่สมุนไพรไทย คาดหวังฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากสารสกัดจากบวบก และเพื่อเป็นการพัฒนาสูตรพิเศษให้ดีขึ้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 รายชื่อสารเคมี

- 3.1.1.1 Chitosan low molecular weight 75-85% deacetylated (Sigma-Aldrich, MO, Iceland)
- 3.1.1.2 Polyvinyl alcohol Sigma Mw 13,000-23,000 (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 3.1.1.3 Glycerin (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.4 Propylene glycol (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.5 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 3.1.1.6 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 3.1.1.7 95% Ethyl alcohol (EtOH) (analytical grade, RCI Labscan Co., Ltd, Thailand)
- 3.1.1.8 Methanol (MeOH) (HPLC grade, RCI Labscan Co., Ltd., Thailand)
- 3.1.1.9 Acetonitrile (ACN) (HPLC grade, RCI Labscan Co., Ltd., Thailand)
- 3.1.1.10 Brain-heart infusion broth (Lab M Co., Ltd., India)
- 3.1.1.11 Brain-heart infusion medium (Lab M Co., Ltd., India)
- 3.1.1.12 Müller-Hinton agar (Lab M Co., Ltd., India)
- 3.1.1.13 Tryptic Soy Broth (Lab M Co., Ltd., India)
- 3.1.1.14 Clindamycin 2.5 mg/ml (Milimed Co., Ltd., Thailand)
- 3.1.1.15 Gallic acid (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 3.1.1.16 Quercetin (Sigma-Aldrich, MO, India)
- 3.1.1.17 Folin reagent (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.18 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.19 Trolox (Sigma-Aldrich, MO, Denmark)
- 3.1.1.20 Ascorbic acid (Vitamin C) (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 3.1.1.21 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, MO, Germany)
- 3.1.1.22 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, MO, Germany)
- 3.1.1.23 Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.24 Acetic acid (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.1.25 Sodium acetate trihydrate (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)

- 3.1.1.26 Ferric Chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
 - 3.1.1.27 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, MO, Switzerland)
 - 3.1.1.28 Hydrochloric acid (HCl) (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
 - 3.1.1.29 Ferrous sulfate (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
 - 3.1.1.30 Asiaticoside (Chengdu biopurify, China)
 - 3.1.1.31 Asiatic acid (Chengdu biopurify, China)
 - 3.1.1.32 Madecassoside (Chengdu biopurify, China)
 - 3.1.1.33 DMEM high glucose media (Capricorn Scientific GmbH, Germany)
 - 3.1.1.34 Bradford (Applichem Panreac ITW Company, Spain)
 - 3.1.1.35 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide BioChemica (Applichem Panreac ITW Company, Spain)
 - 3.1.1.36 Dimethylsulphoxide (Carlo Erba Co., Ltd., Italy)
- 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์**
- 3.1.2.1 Evaporator R205 (Buchi, Switzerland)
 - 3.1.2.2 Auto pipette (Bio-Rad Laboratories, USA)
 - 3.1.2.3 HPLC injector (Waters 717 plus Autosampler, Waters, USA)
 - 3.1.2.4 HPLC pump (Waters 1525 Bibary HPLC pump, Waters, USA)
 - 3.1.2.5 HPLC column RP-C18, 250x4.60mm, 5m (Phemomenex, USA)
 - 3.1.2.6 UV-Spectrophotometer (Genesys10, Thermo electron, USA)
 - 3.1.2.7 Spectrophotometer (NovaspecII, Pharmacia biotech, Sweden)
 - 3.1.2.8 2-Digits digital balance (Mettler Toledo, Germany)
 - 3.1.2.9 4- Digits digital balance (Mettler Toledo, Germany)
 - 3.1.2.10 Fume hood (S.K. Powerable, Germany)
 - 3.1.2.11 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
 - 3.1.2.12 Water bath shaker (Julabo, USA)
 - 3.1.2.13 Hot plate stirrer (Torrey Pines Scientific, USA)
 - 3.1.2.14 Viscometer (HAAKE MARS III, LMS Instrument, Germany)
 - 3.1.2.15 Texture analyzer (LLOYD Instrument, UK)
 - 3.1.2.16 Laminar air flow (Envair, UK)
 - 3.1.2.17 Incubator (Heraeus, Germany)

3.2. วิธีดำเนินงานวิจัย

สถานที่ทำการทดลองส่วนใหญ่อยู่ที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ส่วนการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม ได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ทดสอบที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบบัวก เก็บตัวอย่างบัวบกสดที่บ้านวังยาง ตำบลบุ่งหวาน อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ในช่วงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2558 คัดเลือกเฉพาะส่วน嫩อกรากและลังท้าวความสะอาด นำไปปั่นผงเด็ดให้ละเอียดน้ำ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C โดยใช้ตู้อบลมร้อน เมื่อแห้งสนิทดเป็นเวลา 2 วัน และลดขนาดบัวบกแห้งโดยใช้เครื่องลดขนาด คัดขนาดเพื่อให้ผงบัวบกแห้งมีขนาดสม่ำเสมอโดยใช้แร่เบอร์ 60 จากนั้นสกัดสารสำคัญโดยใช้ 95% ethanol โดยวิธี การแซกัดตอเนื่อง (percolation) ทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยโดยความดัน และเก็บสารสกัดหยาบบัวบกในขวดแก้วฝาปิดสนิท

3.2.2 พัฒนาการวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของสารสำคัญในบัวบก ในการพัฒนาการวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของสารสำคัญในบัวบก 3 ชนิด ได้แก่ asiaticoside madecassoside และ asiatic acid โดยใช้วิธี HPLC เพื่อทดสอบหาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity range) ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (limited of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานค่าเป็นตัวเลขได้ (limited of quantitation, LOQ) และ system suitability

3.2.2.1 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยประเมินจากค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่า 0.999 คือ ค่าที่ยอมรับได้ และพิจารณาค่าจุดตัดแกนตั้ง (y-intercept) ค่าความชันของกราฟ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ 50, 100, 200, 300 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ
- 2) ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง HPLC ที่ลักษณะเข้มข้น โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 1 ครั้ง
- 3) สร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้กราฟ
- 4) คำนวณหาสมการเส้นตรงและค่า r^2 โดยค่า r^2 บ่งบอกถึงแนวโน้มความเป็นเส้นตรง

3.2.2.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การทดสอบความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีทดสอบแบบ standard addition โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน 50, 100 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ลงในตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของความเข้มข้นรวมของแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างที่มี

การเติมสารมาตรฐาน เรียกว่า spiked sample และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสาร standard เรียกว่า unspiked sample ค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คำนวนในรูปของ %recovery โดยมีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 80-110%

- 1) เตรียม unspiked sample (blank) โดยนำสารสกัดหยาบบัวบกใส่ใน volumetric flask และปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL
- 2) เตรียม spiked sample นำ stock solution ของสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบไปด้วย asiaticoside madecassoside และ asiatic acid ความเข้มข้น 4,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพื่อจะ spike ให้ได้ 3 ความเข้มข้น คือ 50, 200 และ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยใส่สารสกัดหยาบบัวบกลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้น pipette สารละลายมาตรฐาน 125, 500 และ 1000 μL ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 mL
- 3) นำสารที่เตรียมได้จากข้อ 2) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
- 4) คำนวนหาปริมาณสารละลายมาตรฐานที่ตรวจพบ
- 5) คำนวนหา % recovery ดังสมการ โดยมีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 80-110 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Measured concentration}}{\text{Standard concentration}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.2.3 การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)

การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ เป็นการทดสอบวิธีที่เลือกใช้ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ให้ผลที่ใกล้เคียงกันในทุก ๆ ครั้งที่ทำการทดลอง และผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงในรูปของ %RSD ควรมีค่าน้อยกว่า 2.0 มีการทดสอบ 2 รูปแบบ ได้แก่ การทดสอบในวันเดียวกัน (intra-day) เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือ และสภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน โดยวิเคราะห์ช้าในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันหรือในวันเดียวกัน และการทดสอบต่างวันกัน (inter-day) เป็นการทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ในเวลาที่ต่างกันออกไปทั้งหมด 3 วัน

- 1) เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50, 200 และ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 2) นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ช้ำ
- 3) ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) โดยหาค่าเฉลี่ย AUC ของแต่ละความเข้มข้นแล้วนำค่าเฉลี่ย AUC ของแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาคำนวน %RSD
- 4) ทำการวิเคราะห์ที่ต่างวันกันทั้งหมด 3 วัน (inter-day) โดยหาค่าเฉลี่ย AUC ของทั้ง 3 ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ในวันเดียวกัน (รวม 9 เข็ม) และนำค่าเฉลี่ยที่ได้ ของแต่ละวันมาหา %RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $\% \text{ RSD} \leq 2.0$ การคำนวน %RSD แสดงดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.2.4 ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานค่าเป็นตัวเลขได้ (Limited of quantitation, LOQ) ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ใน standard curve ที่ยังคงให้ค่า accuracy และ precision อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ การหาค่า LOQ ของสารสกัดหยาบบวบก โดยเตรียมสารละลายน้ำที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ตามวิธีเดียวกับ การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ และสร้างกราฟสารละลายน้ำที่ทราบ แสดงค่า r^2 ความเข้มข้นต่ำสุด ใน standard curve ที่ยังคงมี linearity concentration และให้ค่า accuracy และ precision อยู่ ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้

3.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบวบก สารสำคัญที่นำมายังวิเคราะห์หา ปริมาณ ได้แก่ asiaticoside madecassoside และ asiatic acid โดยใช้วิธี HPLC ใช้คอลัมน์แบบ reverse phase ขนาด 250 mm x 4 mm ขนาดอนุภาค 5 μm ใช้ acetonitrile และน้ำเป็น mobile phase สัดส่วนตาม ตารางที่ 2 มีอัตราเร็วของการไหล 1 mL/min ปริมาตรที่ฉีด 20 μL และใช้ UV Detector ความยาวคลื่น 206 nm

3.2.3.1 วิธีเตรียมสารละลายน้ำที่ทราบ

1) เตรียม stock solution ของ asiaticoside ความเข้มข้น 15.28 mg/mL โดย ซึ่ง asiaticoside 152.80 mg ใส่ลงใน volumetric flask จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จน ครบ 10 mL

2) เตรียม stock solution ของ asiatic acid ความเข้มข้น 17.09 mg/mL โดย ซึ่ง asiatic acid 170.90 mg ใส่ลงใน volumetric flask จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จน ครบ 10 mL

3) เตรียม stock solution ของ madecassoside ความเข้มข้น 16.68 mg/mL โดยซึ่ง madecassoside 166.80 mg ใส่ลงใน volumetric flask จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL

4) เตรียมสารละลายน้ำที่ทราบแบบผสม asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid ทั้งหมด 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่

4.1) ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยปีเปต asiaticoside 32.72 μL asiatic acid 29.26 μL และ madecassoside 29.92 μL จาก stock solution และปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL

4.2) ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยปีเปต asiaticoside 65.45 μL asiatic acid 58.51 μL และ madecassoside 59.95 μL จาก stock solution และปรับปริมาตร ด้วย methanol จนครบ 10 mL

4.3) ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยปีเปต asiaticoside 130.89 μL asiatic acid 117.03 μL และ madecassoside 119.9 μL จาก stock solution และปรับปริมาตร ด้วย methanol จนครบ 10 mL

4.4) ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยปีเปต asiaticoside 196.34 μL asiatic acid 175.5 μL และ madecassoside 179.86 μL จาก stock solution และปรับปริมาตร ด้วย methanol จนครบ 10 mL

4.5) ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/mL}$ โดยปีเปต asiaticoside 261.78 μL asiatic acid 234.05 μL และ madecassoside 239.80 μL จาก stock solution และปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL

5) กรองสารละลายน้ำที่ได้มาทุกชนิดแบบผ่าน nylon filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 μm

3.2.3.2 วิธีเตรียมสารละลายน้ำอย่าง

เตรียมสารสกัดที่ได้มาทุกความเข้มข้น 53.36 mg/mL โดยชั่งสารสกัดมา 533.60 mg ใส่ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL และกรองผ่าน nylon filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 μm

3.2.3.3 สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ

คอลัมน์ HPLC: Water symmetry RP C18 (250 mm x 4 mm I.D.

particle size: 5 μm)

อัตราการไหล: 1mL/min

ปริมาตรที่ฉีด: 20 μL

ความยาวคลื่นของ detector: 206 nm

Mobile phase: deionized water และ acetonitrile ซึ่งเป็นระบบ Gradient

ตารางที่ 2 สัดส่วนของ mobile phase ในระบบ gradient และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

เวลา (นาที)	Pump A: deionized water (%)	Pump B: acetonitrile (%)
0	85	15
5	80	20
10	55	45
15	55	45
20	20	80
30	20	80
35	85	15
50	85	15

3.2.4 ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดที่ได้มาทุกชนิดในการต้านเชื้อ *S. aureus*, *E.coli* และ *P. acnes* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และแกรมบวกที่เจริญเติบโตในสภาพไร้ออกซิเจน ตามลำดับ ด้วยวิธี agar diffusion method นำแผ่นกระดาษเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ทำปราศจากเชื้อโดยวิธี autoclave อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปีเปตสารละลายน้ำอย่าง และสารควบคุม ปริมาตร 40 μL ลงบนแผ่นกระดาษ แล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเจ้าของชนิด mueller hinton agar (MHA) สำหรับ *S. aureus*, *E.coli* และ brain heart infusion agar (BHI) สำหรับ *P. acnes* ที่มีการกระจายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ

ไว้วัดค่าความหนาแน่นของเชื้อเทียบเท่า 0.5 McFarland จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *E.coli* ส่วน *P. acnes* ปั่นภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดรอบแผ่นกระดาษ มียา clindamycin เป็นตัวควบคุมพลาททางบวก (positive control) จากนั้นทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดบัวบกที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี two-fold serial dilution และทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง

3.2.4.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MHA โดยซึ่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อมา 3.8 กรัม ละลายในน้ำ 100 mL ให้เข้ากันก่อนนำไป autoclave

2) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHI โดยซึ่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อมา 3.7 กรัม ละลายในน้ำ 100 mL ให้เข้ากันก่อนนำไป autoclave

3.2.5 ศึกษาทรัพยากรังสรรค์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบบัวบก โดยวิธีดังต่อไปนี้

3.2.5.1 การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกรวม (total phenolic compounds) โดยใช้ Gallic acid ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นสารมาตรฐาน และตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกคละลายในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้น 50 mg/mL ผสมกับสารละลาย folin-ciocalteu และสารละลาย sodium carbonate จากนั้นตั้งทึ้งไว้ในที่พ้นแสงนาน 40 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 nm แสดงผลกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 725 nm กับ ความเข้มข้นของ Gallic acid (Kolli et al., 2015) ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง ปริมาตรของตัวอย่างแต่ละหลอดที่ใช้ทดสอบ แสดงดังภาคผนวก ๑.

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1) ชั่ง Gallic acid 2.5 mg ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL

2) การเตรียมสารละลาย folin-ciocalteu โดยผสม folin-ciocalteu 50 mL กับน้ำ 50 mL ในอัตราส่วน 1:1 เก็บในขวดสีชา

3) การเตรียมสารละลาย sodium carbonate โดยซึ่ง sodium carbonate 7.5 g ละลายในน้ำ 100 mL

3.2.5.2 การทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging method) โดยใช้วิตามินอี (Trolox) ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นสารมาตรฐาน ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้แก่ สารสกัดหยาบบัวบกคละลายในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้น 50 mg/mL ผสมกับ methanol และสารละลาย DPPH แล้วตั้งทึ้งไว้ในที่พ้นแสงเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm (Thaipong et al., 2006) แสดงผลเป็นกราฟ %การยับยั้งการต้านออกซิเดชันกับความเข้มข้นของวิตามินอี ดังสมการ ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง ปริมาตรของตัวอย่างแต่ละหลอดที่ใช้ทดสอบ แสดงดังภาคผนวก ๑.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorption control} - \text{Absorbtion sample}}{\text{Absorption control}} \times 100 \quad (3.3)$$

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำตราชูนและสารละลายน้ำที่ใช้ในการทดสอบ

1) ชั่ง trolox 1.25 mg ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL

2) การเตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่ง DPPH 6.71 mg ละลายใน methanol

100 mL เก็บในขวดสีชา

3.2.5.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diaminium salt (ABTS method) โดยใช้วิตามินซี ความเข้มข้น 125 µg/mL เป็นสารมาตรฐาน ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้แก่ สารสกัดขยายบัวบุบกระลายในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้น 50 mg/mL ผสมกับสารละลาย ABTS และสารละลาย sodium phosphate ($K_2S_2O_8$) ทำให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่พื้นแสงเป็นเวลา 6 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm (Re et al., 1999) แสดงผลเป็นกราฟ %การยับยั้งการต้านออกซิเดชันกับความเข้มข้นของวิตามินซี ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง ปริมาตรของตัวอย่างแต่ละหลอดที่ใช้ทดสอบ แสดงดังภาคผนวก ง.

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำตราชูนและสารละลายน้ำที่ใช้ในการทดสอบ

1) ชั่งวิตามินซี 1.25 mg ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 mL

2) การเตรียมสารละลาย ABTS โดยชั่งสาร ABTS 7.2 mg กับ sodium phosphate ($K_2S_2O_8$) 1.32 mg ละลายด้วยน้ำ 2 mL บ่ม 12-16 ชั่วโมง ค่อยๆ ปรับปริมาตร ด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1:100 และวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.7 ± 0.02

3.2.5.4 การวัดความสามารถในการรีดิวช์เฟอริกให้เป็นเฟอรัส (FRAP) เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมสารละลาย acetate buffer สารละลาย ferric chloride และสารละลาย TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ โดยใช้ ferrous sulfate ความเข้มข้น 5 mM เป็นสารละลายน้ำตราชูน ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้แก่ สารสกัดขยายบัวบุบกระลายในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้น 50 mg/mL ผสมกับน้ำและสารละลาย FRAP จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่พื้นแสงเป็นเวลา 8 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 nm แสดงผลเป็นกราฟ ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm กับความเข้มข้นของ ferrous sulfate (Prior et al., 2005) ทำการทดสอบซ้ำสามครั้ง ปริมาตรของตัวอย่างแต่ละหลอดที่ใช้ทดสอบ แสดงดังภาคผนวก ง.

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำตราชูนและสารละลายน้ำที่ใช้ในการทดสอบ

1) ชั่ง ferrous sulfate 139 mg ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 mL

2) เตรียม acetate buffer โดยชั่ง sodium acetate trihydrate 1.5 g ละลายใน acetic acid 8 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 500

3) เตรียมสารละลาย ferric chloride โดยชั่ง ferric chloride 135 mg ละลายด้วยน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 25 mL

4) เตรียมสารละลาย TPTZ โดยซึ่ง TPTZ 78 mg ละลายด้วย HCl ความเข้มข้น 40 mM และปรับปริมาตรจนครบ 25 mL

5) เตรียมสารละลาย FRAP โดยนำ acetate buffer สารละลาย ferric chloride และสารละลาย TPTZ ผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

3.2.6 พัฒนาสำรับมาส์กเบสโดยใช้โปรแกรมออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว Design-Expert[®] ศึกษาผลของสารก่อฟิล์ม โดยเลือกใช้ chitosan ความเข้มข้น 0-5 %w/w และ polyvinyl alcohol ความเข้มข้น 0-2 %w/w พลาสติไซเซอร์หรือสารเพิ่มความยืดหยุ่นชนิดที่ขอบน้ำได้แก่ propylene glycol และ glycerin ความเข้มข้นตั้งแต่ 60-80% ของสารก่อฟิล์ม สารช่วยเพิ่มการยึดติดใช้ (poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride), PVMMA) ความเข้มข้น 0-0.05 %w/w กำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษาต่อคุณลักษณะสำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรมออกแบบการทดลอง ตัวแปรต้น ได้แก่ polyvinyl alcohol และ PVMMA กำหนดให้มีระดับ 3 ของ polyvinyl alcohol คือ 0, 1 และ 2 %w/w และ PVMMA คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 %w/w ผลที่ต้องการศึกษาได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ความหนืด ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) และนำเข้าโปรแกรมออกแบบการทดลองตอบสนองพื้นผิวโดยใช้ โปรแกรม Design-Expert[®] มีทั้งหมด 10 สูตร แต่ละสูตรทำ 3 ช้ำ ดังนี้

ตารางที่ 3 สูตรสำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่เข้าโปรแกรมออกแบบการทดลองตอบสนองพื้นผิว

สูตรที่		ช้ำ	Chitosan	EDTA	PVA*	Glycerin	EtOH	PVMMA*	Water
1	1	2	1	0	1.60	10	0.01	85.40	
	2	2	1	0	1.60	10	0.01	85.40	
	3	2	1	0	1.60	10	0.01	85.40	
2	1	2	1	0	1.60	10	0.03	85.40	
	2	2	1	0	1.60	10	0.03	85.40	
	3	2	1	0	1.60	10	0.03	85.40	
3	1	2	1	0	1.60	10	0.05	85.40	
	2	2	1	0	1.60	10	0.05	85.40	
	3	2	1	0	1.60	10	0.05	85.40	

ตารางที่ 3 สูตรสำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่เข้าโปรแกรมออกแบบการทดลองตอบสนองพื้นผิว
(ต่อ)

สูตรที่	ชั้น	Chitosan	EDTA	PVA*	Glycerin	EtOH	PVMMA*	Water
4	1	2	1	1	2.40	10	0.01	83.60
	2	2	1	1	2.40	10	0.01	83.60
	3	2	1	1	2.40	10	0.01	83.60
5	1	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60
	2	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60
	3	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60
6	1	2	1	1	2.40	10	0.05	83.60
	2	2	1	1	2.40	10	0.05	83.60
	3	2	1	1	2.40	10	0.05	83.60
7	1	2	1	2	3.20	10	0.01	81.80
	2	2	1	2	3.20	10	0.01	81.80
	3	2	1	2	3.20	10	0.01	81.80
8	1	2	1	2	3.20	10	0.03	81.80
	2	2	1	2	3.20	10	0.03	81.80
	3	2	1	2	3.20	10	0.03	81.80
9	1	2	1	2	3.20	10	0.05	81.80
	2	2	1	2	3.20	10	0.05	81.80
	3	2	1	2	3.20	10	0.05	81.80
10	1	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60
	2	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60
	3	2	1	1	2.40	10	0.03	83.60

หมายเหตุ: * คือ ตัวแปรต้นที่ต้องการศึกษาต่อคุณลักษณะสำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่เหมาะสมสมมี 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละสูตรทำซ้ำสามครั้ง

3.2.7 คัดเลือกมาส์กเบสที่ดีที่สุด

โดยการประเมินจาก

3.2.7.1 ลักษณะภายนอก เช่น สี ความใส

3.2.7.2 ความเป็นกรดด่าง (pH) โดยตัวรับค่ามีค่าอยู่ในช่วง 5.0-6.0

3.2.7.3 ความหนืดโดยใช้เครื่องวัดความหนืด (ก่อนนำมาส์กเบสลงในแม่แบบ)

3.2.7.4 ความหนาโดยเครื่องวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม

3.2.7.5 ทดสอบสมบัติเชิงกลโดยใช้เครื่อง texture analyzer วัดความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ขนาดชิ้นส่วนตัวอย่างในการวัดความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) มีขนาด $1\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ และขนาดชิ้นส่วนตัวอย่างในการวัดแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) มีขนาด $2\text{ cm} \times 8\text{ cm}$ แรงที่ใช้ในการวัดตัวอย่างมีอัตรา 50 mm/นาที (Srinivasa et al., 2003)

3.2.7.6 ระยะเวลาในการแห้ง นำตัวรับมาส์กปริมาตร 3 กรัม เทบน้ำสตูดิโอเรียบขนาด $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ วางบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water baths) โดยให้วัสดุสัมผัสกับน้ำที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลาจนกว่าตัวอย่างจะสามารถลอกออกเป็นแผ่นฟิล์มได้

ใช้สถิติ (t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances) เปรียบเทียบความแตกต่างคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารละลายมาส์กเบสและคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการคาดการณ์จากโปรแกรม RSM และได้จากการทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.8 การเตรียมตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบบวบก เติมสารสกัดหยาบบวบก $5\% \text{w/w}$ ลงในมาส์กเบสที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดบวบกที่ครอบคลุมถูกต้องเข็มแบบที่เรียกว่าต้านออกซิเดชัน และความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน จากนั้นประเมินตัวรับเช่นเดียวกับข้อ 3.2.7 และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสานสารสกัดบวบก เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารละลายมาส์กเบส และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มของตัวรับมาส์กเบสและตัวรับที่เติมสารสกัดหยาบบวบกความเข้มข้น 5% โดยใช้สถิติ Paired-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.9 ศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญ ในหลอดทดลองโดยใช้เครื่องมือจำลองการซึมผ่านของผิวนัง (modified Franz diffusion cell) ใช้เมมเบรนชนิด cellulose (Spectra/Por[®] Dialysis membrane MWCO: 6,000-8,000) มี phosphate buffer pH 7.4 ผสมกับ 10% ethanol เป็นสารละลายตัวรับ (receptor fluid) ทดสอบที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ สูญเสียตัวอย่างครั้งละ 1 mL แล้วเติมสารละลายตัวรับกลับเข้าไปในปริมาตรเท่ากับที่สูญเสียตัวอย่างออกมานะในแต่ละครั้ง วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ปลดปล่อยออกมานะที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180, 360, 720, 1080 และ 1440 นาที ด้วยวิธี chromatography ของเหลวสมรรถนะสูง (RP-HPLC)

3.2.10 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด primary human dermal skin fibroblast เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการใส่ 1% antibiotic 1% L-glutamine 1% non-essential amino acid และ 10% bovine fetal serum ทำการทดลองในถ้วยหลุมชนิด 24 หลุม (well plate) โดยควบคุมจำนวนเซลล์จำนวน 3,000 cells/หลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5% carbon dioxide จากนั้นนำสารสกัดขยายบัวบกความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 µg/mL ตามลำดับ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และมี ethanol เป็นตัวควบคุมผลทางลบ (negative control) เนื่องจากสารสกัดขยายบัวบกคล้ายในตัวทำละลาย ethanol ใส่ตัวอย่างโดยหยดสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ลงในถ้วยหลุมชนิด 24 หลุม (well plate) ปริมาตรหลุ่มละ 100 µL บ่มอุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5% carbon dioxide เป็นเวลา 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตรวจด้วยวิธี MTT เนื่องจากสารละลาย MTT โดยทั่วไปจะมีสีเหลือง ตรวจด้วยวิธี MTT จะไปจับกับไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดเป็นผลึกสีม่วง เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งสร้างพลังงานของเซลล์ จากนั้นใช้ DMSO ละลายผลึก และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.2.11 ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ใช้ human dermal skin fibroblast cell และวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ด้วยวิธีการติดสีย้อม (sirius red staining) ทำการเพาะเลี้ยง primary human dermal skin fibroblast cell ในสารละลาย DMEM ร่วมกับ 10% serum fetal bovine และ antibiotic ความเข้มข้น 100 IU/mL ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะ 5% carbon dioxide ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ 100,000 cells/well เพื่อมาทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ลงใน 6-well plate จากนั้นบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะ 5% carbon dioxide ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมตัวอย่างที่ทำการทดสอบได้แก่ control, สารละลาย asiaticoside เป็นตัวควบคุมผลทางบวก (positive control) และสารสกัดขยายบัวบกที่ได้จากการทดสอบการปลดปล่อยโดย Franz diffusion ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มภายใต้สภาวะ 5% carbon dioxide ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมานักด้วย acetic acid ความเข้มข้น 0.5 N ปั่นโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) นาน 15 นาที ที่ความถี่ 15,000 Hz เพื่อทำให้เซลล์แตกและวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธีติดสีย้อม (sirius red staining) โดยการนำ cell lysate ที่สกัดได้ของ control ตัวควบคุมผลทางบวก สารสกัดขยายบัวบกที่ได้จากการทดสอบการปลดปล่อยโดย Franz diffusion และสารละลายน้ำตราชูราคคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 0, 31.5, 125 และ 250 µg/mL ละลายในกรด acetic ผสมกับสารย้อมติดสีย้อม (sirius red staining) ปริมาตร 250 µL นำไปเขย่าให้เข้ากัน 30 นาที ด้วยความเร็ว 350 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จนเกิดตะกอน และนำไปปั่นให้วายังเพื่อยกตะกอน ล้างสารละลายน้ำตราชูราคคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 530 nm (Rodríguez-Rodríguez et al., 2013) เปรียบเทียบความแตกต่างร้อยละการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจน โดยใช้สถิติ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.12 ประเมินความคงสภาพในสภาวะเร่งของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหมายบัวบก บรรจุผลิตภัณฑ์ในภาชนะปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 3 เดือน ทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหมายบัวบก โดยประเมินจากลักษณะภายนอก ได้แก่ ความหนืด pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม สมบัติเชิงกล ได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) และ วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เปรียบเทียบความแตกต่างของสมบัติเชิงกลของผลิตภัณฑ์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการศึกษา และอภิปรายผล

ผลการทดลองและอภิปรายผลตามลำดับการทดลอง มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 การเตรียมสารสกัดหมายบัวบก

การเตรียมสารสกัดหมายบัวบก ได้คัดเฉพาะส่วนเนื้อรากของบัวบกที่แหล่งเพาะปลูกบ้านวังยาง ตำบลบุ่งหารา อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ที่เก็บในเดือนมีนาคม 2558 มาถึงทำความสะอาด นำไปผึ่งแดดให้แห้งแล้วนำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 48 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบลมร้อน พบว่าบัวบกมีน้ำหนักหลังอบ 230 กรัม ตั้งตารางที่ 4 ตามมาตรฐานของ Thai Herbal Pharmacopoeia supplement 2004 ได้กำหนดมาตรฐานปริมาณความชื้นของผงสมุนไพรไม่เกิน 14% ดังนั้นปริมาณความชื้นของผงบัวบกมีค่าเฉลี่ย 7.7% ซึ่งถือว่าผ่านมาตรฐานตามที่ Thai Herbal Pharmacopoeia supplement 2004 กำหนดไว้

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นในผงบัวบก

บัวบก	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (%)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean \pm SD
	5,000	230	8.2	7.7	7.2	7.7 \pm 0.5

นำบัวบกแห้งมาลดขนาดด้วยเครื่องบดและคัดขนาดด้วยแร่เบอร์ 60 ได้ผงบัวบก 229.39 กรัม จากนั้นสกัดสารสำคัญโดยใช้ 95% ethanol และทำให้สารสกัดเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยโดยความตัน ได้สารสกัดหมายบัวบก 61.05 กรัม คิดเป็นร้อยละของสารสกัดหมายที่สกัดจากผงแห้งบัวบก (%yield) เท่ากับ 26.61% ซึ่งสารสกัดหมายนี้ได้นำมาใช้ทดลองงานวิจัย

4.2 พัฒนาการวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในบัวบก

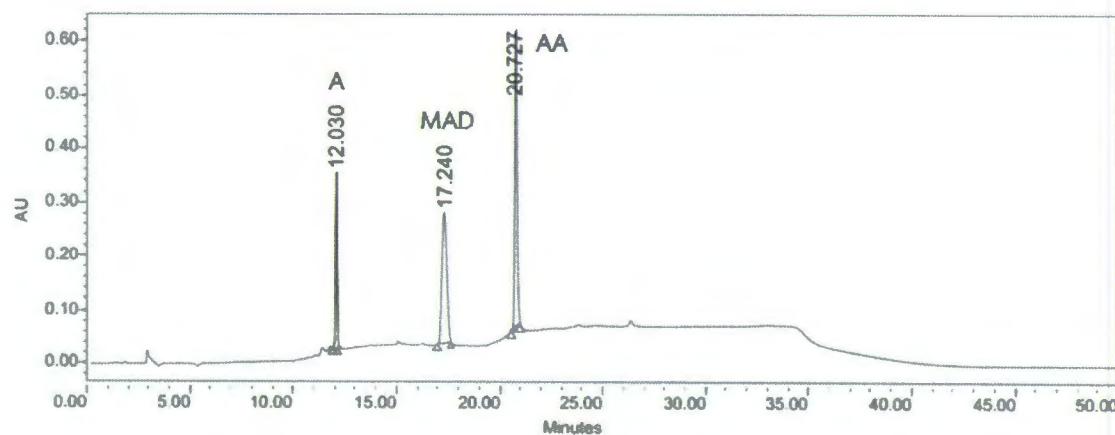
การพัฒนาวิเคราะห์เพื่อวิเคราะห์หา ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหมายบัวบก ได้พัฒนาวิเคราะห์จากการวิจัยของ Hashim และคณะ (Hashim et al., 2011) เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนของ mobile phase เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการแยกสารสำคัญในบัวบก ซึ่งงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดหมายบัวบกเฉพาะ asiaticoside madecassoside และ asiatic acid เท่านั้น พบว่าสามารถและสัดส่วน mobile phase ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารสำคัญดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบกโดยวิธี HPLC

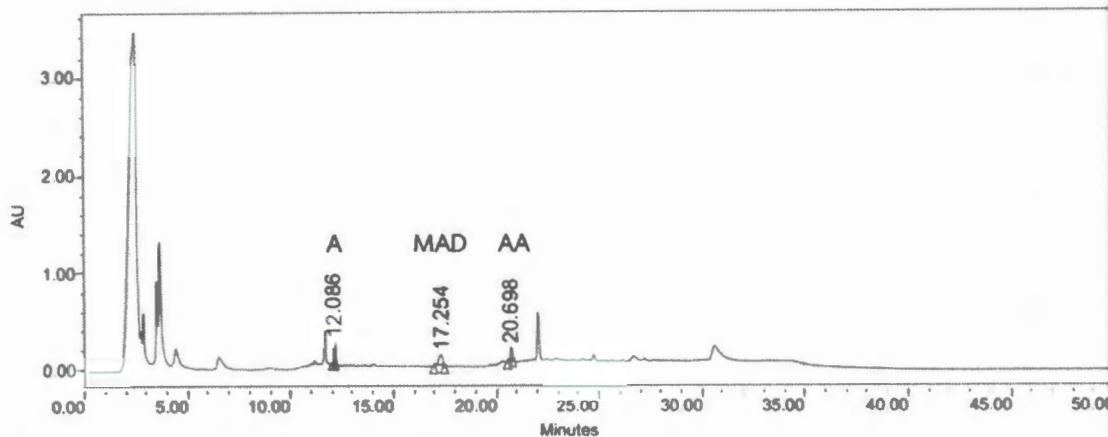
คอลัมน์	RP C18 (250 mm×4 mm I.D.; particle size: 5 μ m)
Mobile phase	A: deionized water; B: acetonitrile
อัตราเร็วของการไหล	1 mL/นาที
ปริมาตรที่ฉีด	20 μ L
Detector	UV ที่ความยาวคลื่น 206 nm
ระยะเวลาการวิเคราะห์	50 นาที

ตารางที่ 6 สัดส่วน mobile phase ระบบ gradient ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ระยะเวลา (นาที)	pump A Deionized Water (%)	pump B Acetonitrile (%)
0	85	15
5	80	20
10	55	45
15	55	45
20	20	80
30	20	80
35	85	15
50	85	15



ภาพที่ 11 โครมาตограмของสารละลายมาตรฐานของ asiaticoside (A)
madecassoside (MAD) และ asiatic acid (AA) ตามลำดับ



ภาพที่ 12 โครมาโทแกรมของสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบก ได้แก่ asiaticoside (A) madecassoside (MAD) และ asiatic acid (AA) ตามลำดับ

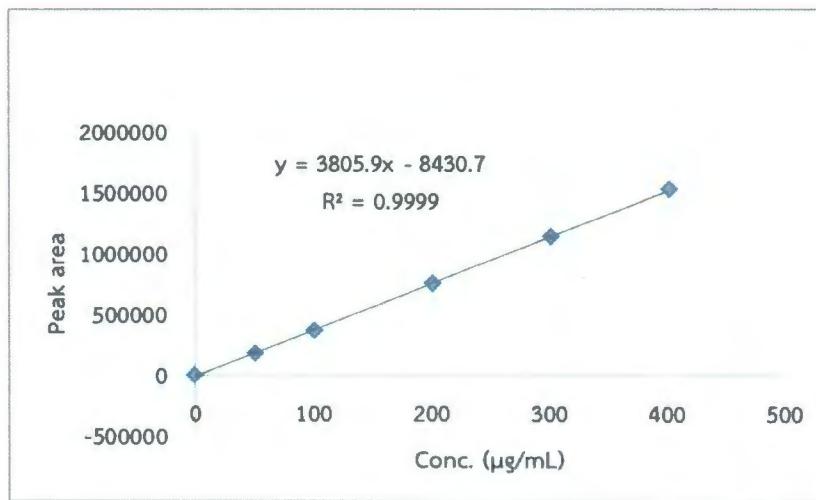
ตามการวิเคราะห์สารสกัดหยาบบัวบกด้วยเทคนิค HPLC ตามสภาวะที่ได้พัฒนา พบว่าสารสำคัญ กลุ่ม Triterpenoids ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid มี retention time ใกล้เคียงกับ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid ในสารประกอบมาตรฐาน ที่เวลา 12 นาที 17 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาพที่ 11 และ 12 แสดงว่า สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถแยก asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid จากสารสกัดหยาบบัวบกได้ อย่างไรก็ตามในสารสกัดหยาบบัวบกยังมีสารสำคัญอื่นอีก อาทิ madecassic acid, madasiatic ซึ่งในงานวิจัยนี้ ไม่ได้ทดสอบสาร 2 ตัว ดังกล่าว ดังนั้น ในการ ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และการวิเคราะห์หาสารสำคัญในตำรับมาสก์หน้าแบบลอกออก จะวิเคราะห์เฉพาะ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid เท่านั้น

เมื่อได้สภาวะวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญใน บัวบก ในหัวข้อของ ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limited of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถ รายงานค่าเป็นตัวเลขได้ (Limited of quantitation, LOQ) เพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ให้ได้ผลการ วิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้

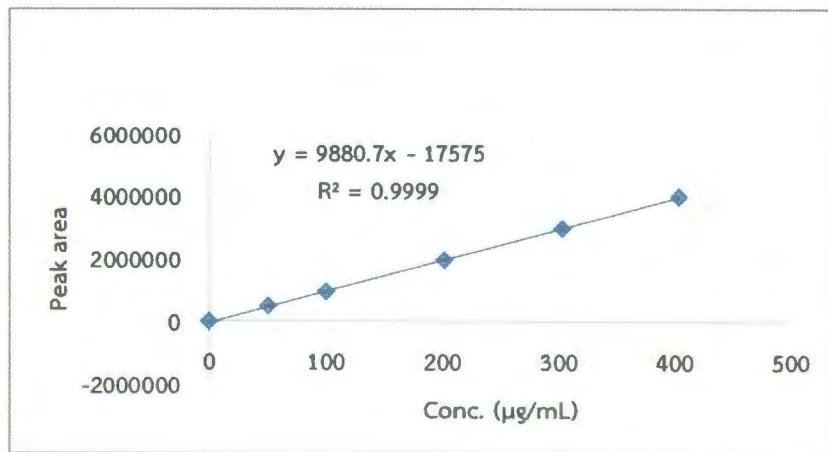
4.2.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) จากการทดลอง หากความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของสารสำคัญในบัวบก กลุ่ม Triterpenoids ทั้งสามชนิด ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid ในช่วงความเข้มข้น 50 – 400 µg/mL พบร้า $r^2 > 0.999$ ดังตารางที่ 7 แสดงว่า พื้นที่ได้กราฟ (AUC) ที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร จากการ ความสัมพันธ์ที่ได้ ดังภาพที่ 13, 14 และ 15 ซึ่งความเข้มข้นของสารช่วง 50 – 400 µg/mL ให้ผล การทดสอบที่เป็นเส้นตรง และสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารในช่วงดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและ แม่นยำ

ตารางที่ 7 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น

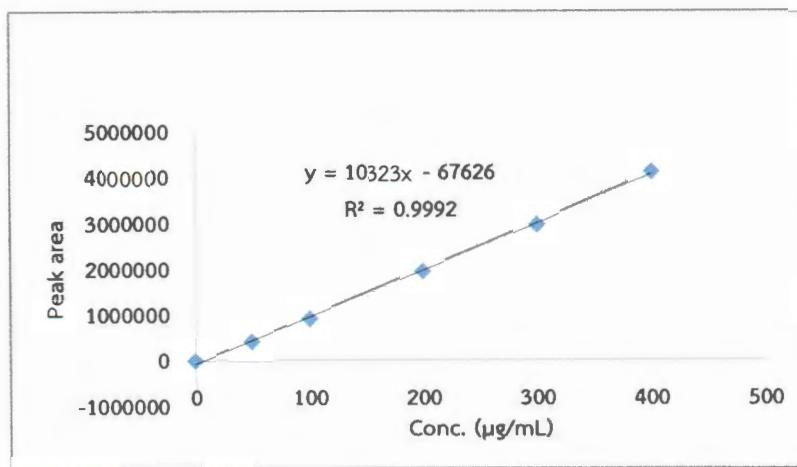
Triterpenoids	r^2
asiaticoside	0.9999
madecassoside	0.9999
asiatic acid	0.9992



ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ asiaticoside กับพื้นที่ใต้กราฟ



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ madecassoside กับพื้นที่ใต้กราฟ



ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของ asiatic acid กับพื้นที่ได้กราฟ

4.2.2 ความถูกต้อง (Accuracy) จากการทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยวิธี standard addition พบร้า %recovery ของ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid อยู่ในช่วง 80-110% ดังตารางที่ 8 แสดงว่าความถูกต้องของวิเคราะห์สารกลุ่ม Triterpenoids ในสารสกัด hairy bark ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid มีความถูกต้องสูง เนื่องจาก มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง และอยู่ในช่วง % recovery ที่ยอมรับได้

4.2.3 ความแม่นยำ (Precision) จากการทดสอบความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ ในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ทั้งความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (Intraday precision) และความแม่นยำระหว่างวัน (Interday precision) พบร้าสารทั้งสามชนิดมีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.1087 – 1.6460 แสดงในตารางที่ 9 และ 10 แสดงว่าวิเคราะห์มีความแม่นยำ เนื่องจากการวิเคราะห์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง มีความคลาดเคลื่อนไม่มาก และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ %RSD มีค่าน้อยกว่า 2%

4.2.4 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection) จากการผลการทดลอง พบร้า ขีดจำกัดของการตรวจวัดสารสำคัญในบัวบก กลุ่ม Triterpenoids พบร้าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ วิเคราะห์ได้ของ asiaticoside 1.04 $\mu\text{g/mL}$ madecassoside 1.33 $\mu\text{g/mL}$ และ asiatic acid 0.41 $\mu\text{g/mL}$

4.2.5 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification) จากการผลการทดลอง ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ พบร้าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ในการวิเคราะห์สารสำคัญในบัวบกกลุ่ม triterpenoids คือ asiaticoside 3.47 $\mu\text{g/mL}$ madecassoside 4.44 $\mu\text{g/mL}$ และ asiatic acid 1.36 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 8 %recovery จากการทดสอบความถูกต้อง โดยวิธี standard addition
ในสารสกัดหมายบัวบก

Conc.	Peak	% recovery		
		asiaticoside	madecassoside	asiatic acid
50 µg/mL		94.35	93.53	74.40
		95.32	99.84	75.04
		90.44	103.91	94.66
Mean ± SD		93.37 ± 2.59	81.36 ± 11.52	99.09 ± 5.23
200 µg/mL		96.55	98.52	97.90
		98.50	101.63	104.86
	Mean ± SD	97.53 ± 1.38	101.38 ± 4.92	100.07 ± 2.20
400 µg/mL		86.03	89.87	108.58
		85.14	87.82	108.87
		88.96	90.97	112.94
Mean ± SD		86.71 ± 2.00	110.13 ± 2.44	89.55 ± 1.60

ตารางที่ 9 ความแม่นยำ ในวันเดียวกัน (Intraday precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณ
asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

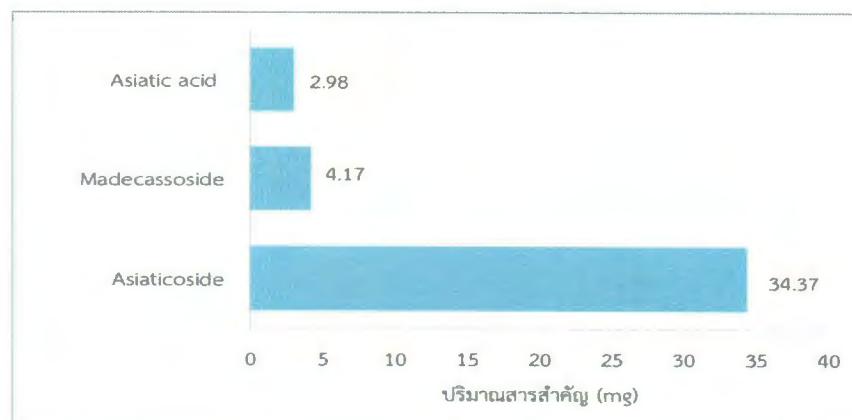
สาร	Conc. (µg/mL)	พื้นที่ไดกราฟ			Mean ± SD	% RSD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
asiaticoside	49.99	174217	176985	173006	174736 ± 2039	1.17
	199.98	842936	847576	865264	851925 ± 11782	1.38
	399.96	1728288	1732382	1755988	1738886 ± 14951	0.86
madecassoside	50.42	492872	502022	500236	498377 ± 4850	0.97
	201.67	2002865	2038864	2069869	2037199 ± 33533	1.65
	403.33	3839941	3832935	3891978	3854951 ± 32256	0.85
asiatic acid	50.18	515797	511977	501547	509774 ± 7376	1.45
	200.70	2252120	2275140	2314081	2280447 ± 31319	1.37
	401.40	4343407	4367555	4380591	4363851 ± 18866	0.43

ตารางที่ 10 ความแม่นยำระหว่างวัน (Interday precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside madecassoside และ asiatic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	พื้นที่ได้กราฟ			Mean \pm SD	%RSD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
วันที่ 1	49.99	218281	218328	217060	217890 \pm 718	0.33
	199.98	865906	866529	868563	866999 \pm 1389	0.16
	399.96	1717342	1730948	1746397	1731562 \pm 14537	0.84
วันที่ 2	49.99	190985	191276	190874	191045 \pm 207	0.11
	199.98	847505	844877	846522	846301 \pm 1327	0.16
	399.96	1703101	1715814	1711817	1710244 \pm 6500	0.38
วันที่ 3	49.99	177991	177840	179445	178425 \pm 886	0.50
	199.98	740990	747566	747279	745278 \pm 3716	0.50
	399.96	1465600	1476323	1474727	1472247 \pm 5785	0.39

4.3 ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบกที่ได้จากแหล่งเพาะปลูกบ้านวังยาง ตำบลบุ่งหวาย อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

จากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบบัวบก 1 กรัม มีสารสำคัญกลุ่ม triterpenoids 3 ชนิด ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid โดยในสารสกัดหยาบบัวบก 1 กรัม มีปริมาณ asiaticoside มากที่สุด รองลงมาคือ madecassoside และ asiatic acid ตามลำดับ ดังภาพที่ 16 จากงานวิจัยของ จิรพันธ์ ศรีทองกุล (2010) ได้ศึกษาปริมาณ asiaticoside ในบัวบก 3 สายต้น ได้แก่ สายตันนครศรีธรรมราช สายตันระนอง และสายตันอุบลราชธานี พบร่วมกับสายตันอุบลราชธานี มีปริมาณ asiaticoside สูงที่สุดถึง 3.94% ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสายตันนครศรีธรรมราช และสายตันระนอง (Srithongkul, 2010)



ภาพที่ 16 ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบก 1 กรัม

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Hashim (2011) ทำการศึกษาปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม triterpenoids ของบัวบกที่ตำแห่ง่ใบ โดยเก็บตัวอย่างในประเทศไทย เผชิญทำการอบให้แห้ง และนำผงบัวบกแห้งที่ได้มา 18 กรัม สกัดด้วย 36% ethanol โดยวิธี reflux ทดสอบหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดด้วยวิธี HPLC พบริมาณ madecassoside 3.10 ± 4.58 mg/mL asiaticoside 1.97 ± 2.65 mg/mL และ asiatic acid 0.55 ± 0.89 mg/mL (Hashim et al., 2011) ส่วนงานวิจัยของ Zainol และคณะ (2003) ได้รายงานปริมาณสารสำคัญในบัวบก จากการเก็บตัวอย่างในทางทิศใต้ของประเทศไทย เผชิญพบว่าสารสกัดบัวบกที่มีปริมาณ asiatic acid สูงถึง 3.4 mg/mL asiaticoside 2.6 mg/mL และ madecassoside 5.3 mg/mL (Zainol et al., 2003) แสดงว่าแห่ง่เพาะปลูกของบัวบก อีกทั้งวิธีการทดสอบและวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ทำให้ปริมาณของสารสำคัญที่ได้ต่างกันออกไป

จะเห็นได้ว่า ปริมาณ asiaticoside ในสารสกัดหยาบบัวบก จากแห่ง่เพาะปลูกบ้านวังยาง ตำบลบุ่งห่วย อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี มีปริมาณ asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีมากที่สุด คิดเป็น 0.9% ของน้ำหนักแห้ง สาเหตุอาจเนื่องมาจากการสกัดต่างกันโดยการศึกษาในครั้นนี้ผู้วิจัยใช้ทุกส่วนของบัวบกยกเว้นราก มีการศึกษาว่าปริมาณสาร triterpenoids ในส่วนต่างๆ ของบัวบกมีปริมาณไม่เท่ากัน พบร่วมกันในบัวบก 82.6% เมื่อเทียบกับส่วนอื่น ๆ รองลงคือ ลำต้นและราก ซึ่งพบร่วมกัน 15.9% และ 1.5% ตามลำดับ (Kim et al., 2004)

4.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบบัวบก

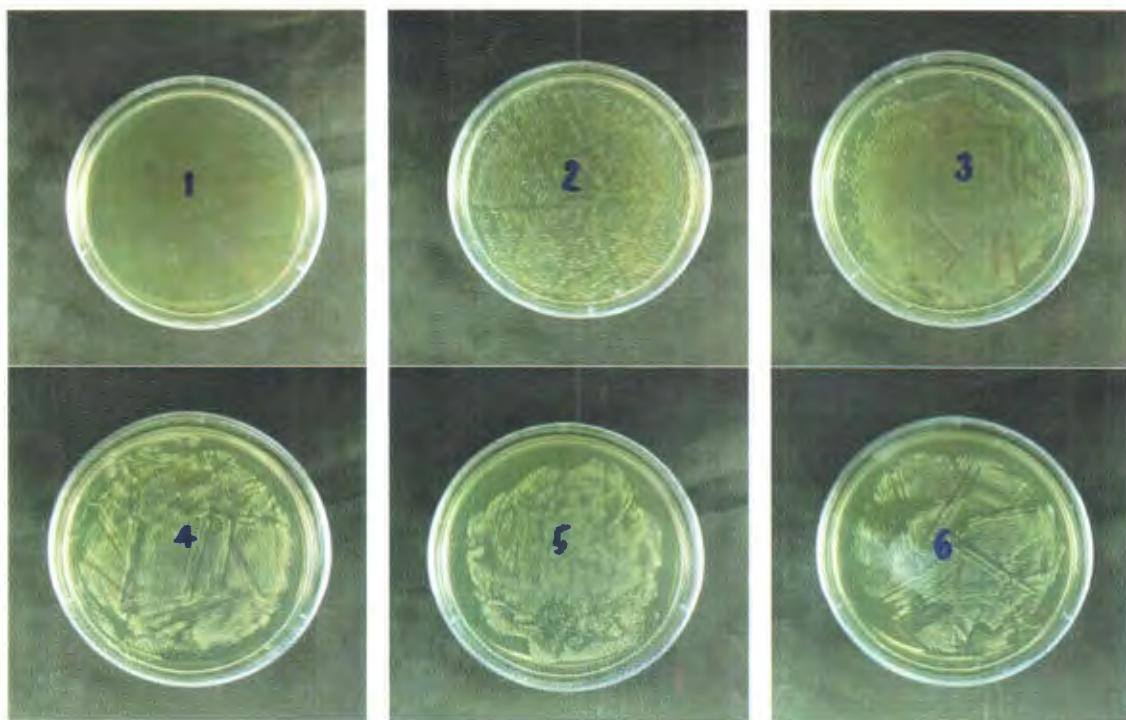
4.4.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* และ *E.coli* ด้วยวิธี agar diffusion method พบร่วมกัน พบว่า เกิด clear zone เฉพาะยา clindamycin ความเข้มข้น 10 mg/mL ซึ่งเป็นสารควบคุมผลทางบวกเท่านั้น สารสกัดหยาบบัวบกที่นำมาทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตัวทำละลาย 95% ethanol และ sterile water ไม่พบ clear zone ส่วนผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *P. acnes* พบร่วมกัน มีเฉพาะยา clindamycin ความเข้มข้น 10 mg/mL และสารสกัดหยาบบัวบกความเข้มข้น 300 , 500 และ 700 mg/mL ที่เกิด clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการกระจายเชื้อ *P.acnes* ตั้งตระหง่านที่ 11 จากผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion method พบร่วมกัน จึงได้ทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบบัวบกที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) เฉพาะแบคทีเรียชนิด *P. acnes* และเป็นที่น่าสังเกตว่า สารสกัดหยาบบัวบกความเข้มข้น 700 mg/mL มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ประมาณ 50% ของ clindamycin ความเข้มข้น 10 mg/mL ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลทางบวก

ตารางที่ 11 clear zone ที่พบในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion method

สารที่ใช้ทดสอบ	Clear zone (cm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. acnes</i>
Clindamycin ความเข้มข้น 10 mg/mL	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.17	4.6 ± 0.06
95% ethanol	-	-	-
Sterile water	-	-	-
สารสกัดบัวบก ความเข้มข้น 100 mg/mL	-	-	-
สารสกัดบัวบก ความเข้มข้น 300 mg/mL	-	-	0.9 ± 0.17
สารสกัดบัวบก ความเข้มข้น 500 mg/mL	-	-	1.33 ± 0.15
สารสกัดบัวบก ความเข้มข้น 700 mg/mL	-	-	2.17 ± 0.06

4.4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหมายบัวบกที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี two-fold serial dilution โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด brain heart infusion agar (BHI) ปริมาตร 1 mL ลงในหลอดทดลองทั้ง 12 หลอดทดลอง ใส่สารสกัดหมายบัวบกที่นำมาทำการทดสอบ MIC ความเข้มข้นเริ่มน้อยที่ 700 mg/mL และทำการเจือจาง จากความเข้มข้นเริ่มน้อยต่อเนื่อง ได้สารสกัดหมายบัวบกความเข้มข้น 350, 175, 87.5, 43.75, 21.88, 10.94, 5.47, 2.73, 1.37, 0.68 และ 0.34 mg/mL ตามลำดับ เติมเชื้อ *P. acnes* ที่ผ่านการปรับความชุ่นของเชื้อหรือค่าความหนาแน่นของเชื้อเทียบเท่า 0.5 McFarland ปริมาตร 1 mL ลงไปในหลอดทดลองทั้ง 12 หลอด ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นภายในไฟฟาระไรรอกอจิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตความชุ่นของหลอดทดลองทั้ง 12 หลอด พบร่วมหาดทดลองที่ 1-6 คือ สารสกัดหมายบัวบกที่ความเข้มข้น 700, 350, 175, 87.5, 43.75, 21.88 mg/mL ไม่ชุ่น แสดงถึงการไม่พบรการเจริญเติบโตของ *P. acnes* หรือสารสกัดหมายบัวบกทั้ง 6 ความเข้มข้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. acnes* ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดหมายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ได้คือ ความเข้มข้น 21.88 mg/mL และเลือกความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นนำไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ต่อไป อย่างไรก็ตาม MIC ของสารสกัดหมายบัวบกตามรายงานของ Chomnawang และคณะ (2005) มีค่า 5 mg/mL (Chomnawang et al., 2005) อาจเป็นเพราะว่าแหล่งที่มาของบัวบก ช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยว และวิธีในการสกัด เป็นสาเหตุให้ค่า MIC มีค่าแตกต่างกัน

4.4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) เลือกหลอดทดลองที่มีสารสกัดหัวใจบัวกความเข้มข้น 700, 350, 175, 87.5, 43.75, 21.88 mg/mL มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด brain heart infusion agar (BHI) พบว่า ajanอาหารเลี้ยงเชื้อที่ spread หลอดทดลองที่มีสารสกัดหัวใจบัวกความเข้มข้น 700 mg/mL เกิด single colony 2 จุด ดังภาพที่ 17 ซึ่งถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากค่า MBC สามารถเกิดเป็น colony ได้ไม่เกิน 5 colony (Chanluang et al., 2010; สุภารัตน์ จันทร์เหลือง, 2552) และajanอาหารเลี้ยงเชื้อที่ spread หลอดทดลองที่มีสารสกัดหัวใจบัวกความเข้มข้น 350, 175, 87.5, 43.75, 21.88 mg/mL พน colony มากกว่า 300 จุด แสดงว่า MBC จากการทดลองนี้มีค่า 700 mg/mL และจากการรายงานของ Chomnawang และคณะ (2005) พบว่าค่า MBC ของสารสกัดบัวก มีค่ามากกว่า 5 mg/mL (Chomnawang et al., 2005)



ภาพที่ 17 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) จากการ spread สารสกัดหัวใจบัวกความเข้มข้น 700, 350, 175, 87.5, 43.75 และ 21.88 mg/mL ตามลำดับหมายเลข 1-6

4.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหมายบัวบกจากแหล่งเพาะปลูก บ้านวังยาง ตำบลบุ่งหาราย อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก ทดสอบ 4 วิธี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 สรุปได้ดังนี้

4.5.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกรวม (total phenolic compounds) โดยใช้ Gallic acid ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นสารมาตรฐาน พบร่วมกับ 1 กรัมมีสารประกอบฟีโนลิกรวม 20.52 ± 0.57 มิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid

4.5.2 ทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging method) โดยใช้วิตามินอี (trolox) ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นสารมาตรฐาน พบร่วมกับ 1 กรัม เทียบเท่าได้กับ trolox 42.14 ± 1.53 mg

4.5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS method) โดยใช้วิตามินซี ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบร่วมกับ 1 กรัม เทียบเท่าได้กับวิตามินซี 12.81 ± 0.91 mg

4.5.4 ความสามารถในการรีดิวเซฟอริกให้เป็นเฟอรัส (FRAP) โดยใช้ ferrous sulfate ความเข้มข้น 5 mM เป็นสารละลายมาตรฐาน พบร่วมกับ 1 กรัม เทียบเท่าได้กับ ferrous sulfate 0.65 ± 0.04 mole

ตารางที่ 12 สารประกอบฟีโนลิกรวม extractable phenolic content (EPC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหมายบัวบก ทดสอบโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ($n=3$)

	EPC (mg GAE/g)	วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน		
		DPPH (mg TEAC/g)	ABTS (mg vit c/g)	FRAP (Mole ferrous sulfate/g)
สารสกัดหมายบัวบก	20.52 ± 0.57	42.14 ± 1.53	12.81 ± 0.91	0.65 ± 0.04

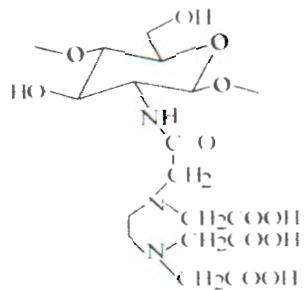
การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหมายบัวบกจากบ้านวังยาง ตำบลบุ่งหาราย อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี เป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (screening test) ซึ่ง EPC เป็นการทดสอบหาปริมาณสารฟีโนลิกที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดหมายบัวบก หน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้ออกซิเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดความเสียหาย ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS เป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดหมายบัวบกโดยกลไกการจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) และ FRAP เป็นการทดสอบฤทธิ์อนุมูลอิสระโดยกลไกการจับโลหะหนัก (metal chelating activity) อาศัยปฏิกิริยาคือในสารสกัดหมายบัวบก ประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม ได้แก่

pentacyclic triterpenes (asiatic acid, asiaticoside madecassic acid และ madecassoside) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก มีหมู่ phenolic hydroxyl groups ในโครงสร้างเป็นจำนวนมาก สามารถจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักได้ (Cao et al., 1997; Subhasree et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่ม saponins และ tannins ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ (Oyedeleji and Afolayan, 2005) อาจกล่าวได้ว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลายกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสารสกัด hairy root โดยมีกลไกการจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักเป็นกลไกหลักในการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ตามรายงานของ Hashim และคณะ (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบกโดยวิธี DPPH เปรียบเทียบกับวิตามินซี สารสกัดจากชาเขียว และสารสกัดเมล็ดองุ่น พบร่วมสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 1 mg/mL มีความสามารถจับอนุมูลอิสระได้ถึง 83% รองจากสารสกัดจากชาเขียว และวิตามินซี ส่วนสารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์น้อยที่สุด การที่สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเนื่องจากในมีสารกลุ่ม triterpenoids ได้แก่ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid (Nuttall et al., 1998; Zainol et al., 2003; Pittella et al., 2009) โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดคือ asiaticoside ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุดในสารสกัดบัวบก และการใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายสกัดจะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสกัด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา และพบร่วมสารสกัดจากส่วนใบและรากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าส่วนก้านใบ (petiole) (Hamid et al., 2002)

4.6 การพัฒนาตัวรับมาส์กเบสและตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัด hairy root

4.6.1 การพัฒนาตัวรับมาส์กเบส การทดลองนี้ใช้โคโตชาานเป็นสารก่อฟิล์ม ซึ่งโคโตชาานเป็นโคโพลีเมอร์ของ N-acetyl-d-glucosamine (Glc-NAc) และ D-glucosamine (GlcN) ซึ่งเกิดจากการ deacetylation ในสภาพที่เป็นด่าง ของโคติน ด้วยคุณสมบัติของโคโตชาาน ซึ่งเป็นด่างอ่อน และมีค่า pKa ของหมู่ D-glucosamine ประมาณ 6.2-7.0 ทำให้โคโตชาานไม่ละลายได้ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เป็นกลางหรือด่าง แต่ละลายได้ดีในสารละลายที่มี pH เป็นกรด ดังนั้นถ้าเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับใบหน้าไม่ควรใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดหรือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อมาละลายโคโตชาาน เพราะทำให้เกิดการระคายเคืองได้ จึงมีงานวิจัยที่ใช้สารอื่นช่วยละลายโคโตชาาน ตัวอย่างเช่น Hydroxybenzotriazole (HOBT) ช่วยเพิ่มการละลายโคโตชาานในน้ำ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ (Fangkangwanwong et al., 2006) หรือพัฒนาระบบนำส่งยาของ nucleic acid (Opanasopit et al., 2010) เนื่องจากเกิดเกลือระหว่างหมู่ carboxyl ของ HOBT และหมู่ amine ของโคโตชาาน ทำให้โคโตชาานสามารถละลายได้ในน้ำ ในงานวิจัยนี้ใช้ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสารคีเลต (chelating agent) สามารถจับกับโลหะหนักได้ โดยหมู่ carboxyl ของ EDTA เกิดสารประกอบเชิงช้อนกับหมู่ amine ของโคโตชาาน ซึ่งการใช้โคโตชาันร่วมกับ EDTA เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในงานวิจัยด้านการนำส่งยีนแบบ nano-particle (Loretz and Bernkop-Schnürch, 2006) และเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มเพื่อนำส่งยาผ่านทางกระเพุกแก้ม เนื่องจาก EDTA เป็นสารช่วยทางเภสัชกรรม ซึ่งมีความปลอดภัยสามารถใช้ในการเตรียมยาที่ให้โดยการรับประทานและฉีด โดยทำหน้าที่เป็นสารทำให้เป็นกรด (acidifying agent) (Cui et al., 2009) สารประกอบเชิงช้อนระหว่างโคโตชาานและ EDTA แสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตไซน์และ EDTA
ที่มา: Varma et al. (2004)

การพัฒนาตัวรับมาส์กเบสมีการใช้ไคโตไซน์เป็นสารก่อฟิล์มหลัก ความเข้มข้น 2%w/w เมื่อเพิ่มปริมาณไคโตไซน์ทำให้การละลายของไคโตไซน์ไม่สมบูรณ์และถ้าใช้ EDTA สูงเกินไปจะทำให้ pH ของสารละลายเป็นกรด ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ EDTA ความเข้มข้น 1%w/w ช่วยเพิ่มการละลายของไคโตไซน์และได้สารละลายของไคโตไซน์ที่มี pH ประมาณ 5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ pH ของผิวหน้า อย่างไรก็ตามการใช้ไคโตไซน์เป็นสารก่อฟิล์มเพียงชนิดเดียว ทำให้ได้สารละลายที่มีความหนืดต่ำและได้แผ่นฟิล์มที่บางและฉีกขาดง่าย จึงมีการใช้ไคโตไซน์ร่วมกับ PVA เพื่อบรรบปรุงคุณสมบัติต้านความหนืดของตัวรับและคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มให้ดีขึ้น (Srinivasa et al., 2003; Costa-Júnior et al., 2009; Fan et al., 2016; Jiang et al., 2016)

ในสูตรตัวรับมี glycerin เป็นพลาสติไซเซอร์เพื่อทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นไม่แตกหักง่าย ซึ่งการทดลองเบื้องต้นได้ปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณของพลาสติไซเซอร์ เช่น propylene glycol พบว่าทำให้ตัวรับขุนและใช้ระยะเวลาในการแห้งของฟิล์มนานขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติดูดความชื้นได้ดีของ propylene glycol (Rowe et al., 2009) และนิยมใช้ glycerin เป็นพลาสติไซเซอร์ ในงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น งานวิจัยที่พัฒนาผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ใช้น้ำยาพาราซินิดกำจัดโปรตีน (Pichayakorn et al., 2013)

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออก มีระยะเวลาการแห้งของแผ่นฟิล์ม เป็นปัจจัยหลัก อย่างหนึ่งที่ควรพิจารณาในการเลือกใช้ โดยไม่ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่แห้งช้าจนเกินไป เนื่องจากมีผลต่อความรู้สึกต่อผู้บริโภค จึงทำการทดลองเบื้องต้นโดยปรับระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารเร่งการทำให้แห้งในตัวรับมาส์กหน้า เนื่องจากแอลกอฮอล์เป็นสารที่ระเหยได้ง่าย และใช้อย่างแพร่หลายในตัวรับมาส์กหน้า (Beringhs et al., 2013) โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 0, 8, 10 และ 15% ตามตารางที่ 13 เพื่อหาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม ที่ทำให้ระยะเวลาการแห้งของแผ่นฟิล์มน้อยที่สุด ผลการทดลองพบว่า สูตรที่ 1 เป็นตัวรับที่ไม่มีการเติมแอลกอฮอล์จะมีลักษณะเป็นเจลใส มีระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มนานที่สุด (90 นาที) เมื่อเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ที่ 10 %w/w และ 15 %w/w ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มจะลดลง (50 นาที) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่า 10 %w/w จะทำให้ตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกเกิดความชุ่ม เนื่องจาก PVA เกิดความไม่เข้ากันกับแอลกอฮอล์ (Rowe et al., 2009) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณแอลกอฮอล์ 10 %w/w ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 13 สูตรสำหรับมาส์กเบสเบื้องต้น ที่ใช้ห้าปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม

องค์ประกอบ	สูตรที่ (%w/w)			
	1	2	3	4
Chitosan	2	2	2	2
EDTA	1	1	1	1
PVA	1	1	1	1
Ethanol	0	8	10	15
Glycerin	←———— 45% ของสารก่อฟิล์ม —————→			
Drying time (นาที)	90	60	50	50

4.6.2 การพัฒนาสำหรับมาส์กเบสใช้โปรแกรมออกแบบการทดลองตอบสนองพื้นผิว Design-Expert® version 10 ต่อมามีการศึกษาผลของปริมาณ PVA และ poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) หรือ PVMMA ซึ่งเป็นสารช่วยปรับปรุงการยึดติดผิวหนังของแผ่นฟิล์ม เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของสำหรับมาส์กเบสให้ดีขึ้น โดยนำปัจจัยอิสระ (ตัวแปรต้น) คือ ปริมาณของ PVA และ PVMMA มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสำหรับมาส์กเบส โดยผลที่ต้องการศึกษา (ตัวแปรตาม) ได้แก่ pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืดของสูตรสำหรับ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM) โดยใช้โปรแกรม Design-Expert® version 10 ข้อดีของวิธีตอบสนองพื้นผิว คือ สามารถศึกษาตัวแปรหลาย ๆ ปัจจัยไปพร้อมกันได้ ทราบผลกระทบที่เกิดจากตัวแปรที่ศึกษาร่วมกัน และลดระยะเวลาการศึกษาเกี่ยวกับการตั้งแต่งสำหรับ (Duangjit et al., 2012; Beringhs et al., 2013)

ปัจจัยตัวแปรต้น คือ ปริมาณของ PVA (A) อัตราห่วง 0-2 %w/w และปริมาณของ PVMMA (B) อัตราห่วง 0.01-0.05 %w/w ดังตารางที่ 14 ค่าตัวแปรต้นเหล่านี้ได้จากการทดสอบเบื้องต้น ส่วนผลการตอบสนองทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ปัจจัยและระดับของตัวแปรต้นในการศึกษาผลต่อการตอบสนองพื้นผิว (RSM)

Factor	Sample	Level		
		-1	0	1
PVA	A	0	1	2
PVMMA	B	0.01	0.03	0.05

ตารางที่ 15 ผลการตอบสนองด้าน pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นพิล์ม ความหนืดของสูตรต่ำรับ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นพิล์ม (peeling force) ของสูตรต่ำรับมาส์กหน้าแบบลอกออก

No	Repeat	PVA (%w/w)	PVMMMA (%w/w)	pH	DT (นาที)	Viscosity (cP)	Tensile (N/mm ²)	%EL	Peeling force (N/mm ²)
1	1	0	0.01	5.02	20	564.1	9.67	154.84	0.02
	2	0	0.01	5.1	20	531.2	9.65	159.23	0.02
	3	0	0.01	5.09	20	547.8	9.58	145.46	0.02
2	1	0	0.03	4.8	20	475.8	5.15	166.15	0.01
	2	0	0.03	4.92	20	405.1	5.63	166.73	0.01
	3	0	0.03	5.11	20	411.7	5.44	150.38	0.01
3	1	0	0.05	5.02	20	619.2	5.98	151.82	0.01
	2	0	0.05	5.1	20	627.4	5.82	166.76	0.01
	3	0	0.05	5.17	20	612.1	5.45	147.40	0.01
4	1	1	0.01	5.38	22	348.9	6.21	163.61	0.01
	2	1	0.01	5.34	22	304.6	6.81	150.67	0.01
	3	1	0.01	5.41	22	321.3	6.95	155.91	0.01
5	1	1	0.03	5.27	20	1036	4.52	166.74	0.01
	2	1	0.03	5.35	20	1075	4.74	158.69	0.01
	3	1	0.03	5.25	20	1057	4.46	166.75	0.01
6	1	1	0.05	5.13	21	837.6	2.49	166.51	0.01
	2	1	0.05	5.07	21	703	3.02	166.74	0.01
	3	1	0.05	5.16	21	993.9	2.77	166.71	0.01
7	1	2	0.01	5.22	22	588.1	2.88	166.74	0.00
	2	2	0.01	5.24	22	622.9	3.02	166.71	0.00
	3	2	0.01	5.21	22	636.5	2.89	166.72	0.00
8	1	2	0.03	5.18	22	708.3	2.66	166.73	0.00
	2	2	0.03	5.12	22	695.3	2.76	166.72	0.00
	3	2	0.03	5.16	22	713.7	3.13	166.71	0.00

ตารางที่ 15 ผลการตอบสนองด้าน pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืดของสูตรตารับ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) ของสูตรตารับมาสกหน้าแบบลอกออก (ต่อ)

No	Repeat	PVA (%w/w)	PVMMMA (%w/w)	pH	DT (นาที)	Viscosity (cP)	Tensile (N/mm ²)	%EL	Peeling force (N/mm ²)
9	1	2	0.05	5.17	20	720.3	2.88	166.70	0.00
	2	2	0.05	5.14	20	759.3	2.74	166.72	0.00
	3	2	0.05	5.16	20	749.4	2.76	166.74	0.00
10	1	1	0.03	5.25	20	861.2	3.44	158.65	0.00
	2	1	0.03	5.3	20	910.4	2.94	141.80	0.00
	3	1	0.03	5.27	20	940.4	2.72	107.58	0.00

หมายเหตุ: DT (Drying time) คือ ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น นาที
 Viscosity คือ ความหนืด มีหน่วยเป็น centipoise (cP)
 Tensile strength คือ ความทนแรงดึง มีหน่วยเป็น N/mm²
 %EL (percent elongation at break) คือ ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด
 Peeling force คือ แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น N/mm²

จากตารางที่ 15 โคโตชาณเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ EDTA ในสัดส่วน 2:1 และมี PVA เป็นสารก่อฟิล์มร่วมด้วยเนื่องจาก PVA อาจช่วยเพิ่มความแข็งแรงของฟิล์มได้ เมื่อพิจารณาจากค่า tensile strength และ %elongation at break พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ PVA ทำให้ tensile strength ลดลง และ %elongation at break ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจาก PVA ไปลดการเกิดเป็นผลึก (crystallinity) ของโคโตชาณ (Miya et al., 1983; Blair et al., 1987) ทำให้ tensile strength ของฟิล์มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srinivasa และคณะ (2003) ซึ่งทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลระหว่างฟิล์มที่ผสมโคโตชาณและ PVA ในอัตราส่วน 100:0, 60:40 และ 0-100 พบว่ามีค่า tensile strength เท่ากับ 55.56, 31.95 และ 25.64 Mpa ตามลำดับ แต่มีค่า %elongation at break เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ 8, 28.9 และ 105.47 ตามลำดับ (Srinivasa et al., 2003) เมื่อเพิ่มปริมาณ PVMMMA ทำให้แผ่นฟิล์มมีค่า tensile strength และแรงในการลอกออกเพิ่มขึ้น แสดงว่าแผ่นฟิล์มมีการยืดเทาที่ดีขึ้น เนื่องจาก PVMMMA มีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มแรงยืดเทา และเป็นสารก่อฟิล์ม (Rowe et al., 2009)

ผลการศึกษาสำหรับมาส์กเบสโดยใช้โปรแกรมออกแบบทดลอง Design-Expert[®] สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยตัวแปรต้น คือ ปริมาณของ PVA และ ปริมาณของ PVMMA ต่อ การตอบสนองทั้งหมด ได้แก่ pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืดของสูตรสำหรับ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) จากนั้นโปรแกรมทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ANOVA) ดังตารางที่ 16 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) แสดงถึงความเป็นสัดส่วนความ ประปร่วนในการตอบสนองที่เกิดจากแบบจำลอง เมื่อค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าสูง แสดงถึงสมการ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์มีความเหมาะสม ในกรณีสำหรับที่เหมาะสมในการเตรียมมาส์กเบส ได้

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ (ANOVA) ของ pH ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ความหนืด ของสูตรสำหรับ ความทนแรงดึง ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม

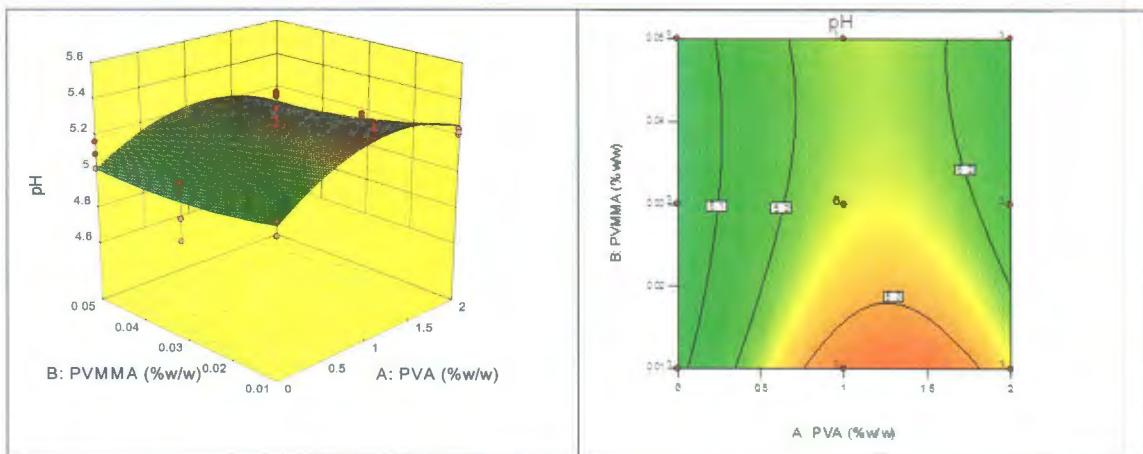
Source	pH	DT	Vis	TS	%EL	PF
	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
Model	< 0.0001 ^a	< 0.0001 ^a	0.0023 ^b	< 0.0001 ^a	0.178 ^{ns}	< 0.0001 ^a
A-PVA	0.0017 ^b	< 0.0001 ^a	0.0577 ^{ns}	< 0.0001 ^a	0.0855 ^{ns}	< 0.0001 ^a
B-PVMMA	0.0209 ^b	0.0012 ^b	0.0052 ^a	< 0.0001 ^a	0.4872 ^{ns}	< 0.0001 ^a
AB	0.3502 ^{ns}	0.0062 ^b	0.7747 ^{ns}	0.0002 ^b		< 0.0001 ^a
A^2	< 0.0001 ^a		0.0248 ^b	0.1159 ^{ns}		0.0751 ^{ns}
B^2	0.2702 ^{ns}		0.0436 ^b	0.0012 ^b		< 0.0001 ^a
R-Squared	0.6554	0.6379	0.5183	0.9032	0.12	0.917807
Adj R-Squared	0.5836	0.5961	0.4179	0.883	0.0548	0.900683
C.V. %	1.64	2.81	24.36	16.23808	7.602979	20.38837

หมายเหตุ: DT (Drying time) คือ ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น นาที Vis (Viscosity) คือ ความหนืด มีหน่วยเป็น centipoise (cP)
 TS (tensile strength) คือ ความทนแรงดึง มีหน่วยเป็น N/mm²
 %EL (percent elongation at break) คือ ร้อยละการยึดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด
 PF (peeling force) คือ แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น N/mm²
 Statistic significant at ^a P<0.01, ^b P<0.05 และ ^{ns} not significant
 R-Squared คือ Coefficient of multiple determinations
 Adj R-Squared คือ Adjusted r^2 ; C.V. % คือ Coefficient of variance

การวิเคราะห์พื้นผิวของ pH ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับตัวแปรต้นในสมการรูปแบบตัวแปรกำลังสอง (Quadratic) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ 0.6554 ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.1) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และตัวแปรต้น เมื่อ A แทน ปริมาณของ PVA และ B แทน ปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อ pH และ B มีความสัมพันธ์ในเชิงลบหรือไม่มีความสัมพันธ์ต่อ pH

$$\text{pH} = +5.25 + 0.07A - 0.049B - 0.023AB - 0.16A^2 + 0.036B^2 \quad (4.1)$$

จากภาพสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA ส่งผลให้ pH ของตารับมาส์กเบสเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVMMA ไม่มีผลต่อ pH ของตารับมาส์กเบส

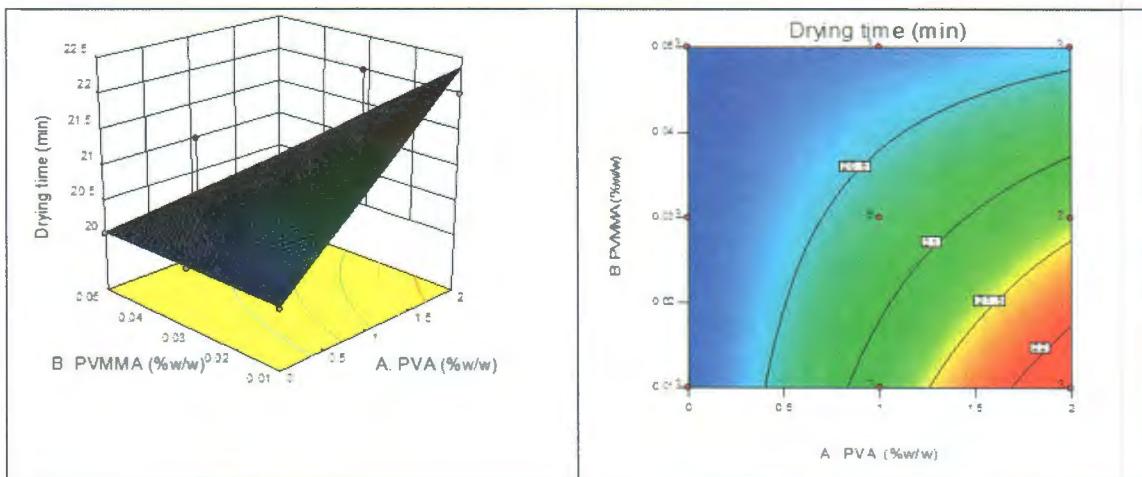


ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อ pH แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

การวิเคราะห์พื้นผิวของ drying time ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง drying time กับตัวแปรต้นในสมการรูปแบบ 2FI โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ 0.63786 ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.2) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง drying time และตัวแปรต้น เมื่อ A แทนปริมาณของ PVA และ B แทนปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อ drying time และ B มีความสัมพันธ์ในเชิงลบหรือไม่สัมพันธ์ต่อ drying time

$$\text{Drying time} = +20.70 + 0.67A - 0.50B - 0.50AB \quad (4.2)$$

จากภาพสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA ส่งผลให้ drying time ของตารับมาส์กเบสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.01 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVMMA ไม่มีผลต่อ drying time ของตารับมาส์กเบส

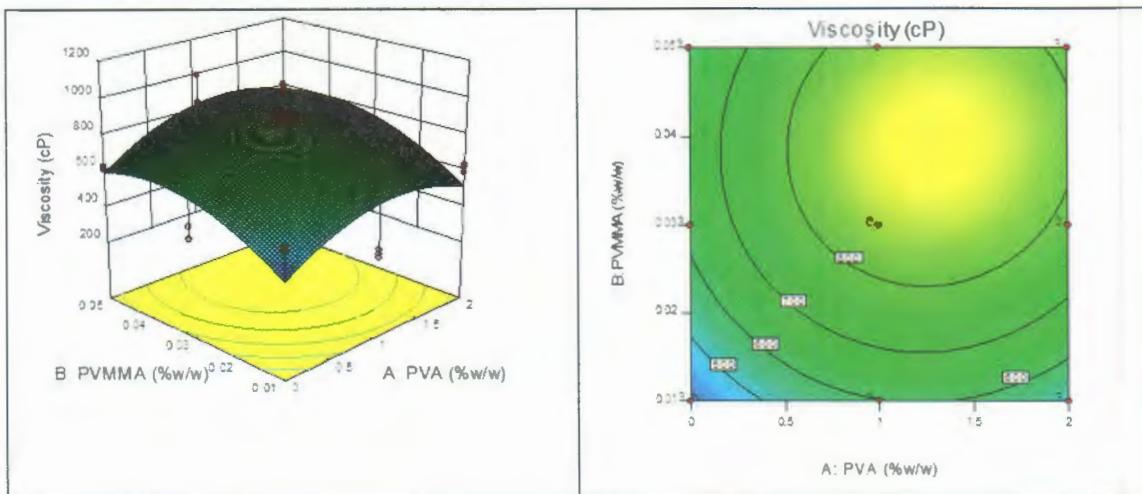


ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม
แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

การวิเคราะห์พื้นผิวของ viscosity ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง viscosity กับตัวแปรต้นในสมการรูปแบบตัวแปรกำลังสอง (Quadratic) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ 0.5183 ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.3) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง viscosity และตัวแปรต้น เมื่อ A แทนปริมาณของ PVA และ B แทนปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A และ B มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อ viscosity

$$\text{Viscosity} = +849.05 + 77.74A + 119.82B + 13.82AB - 149.78A^2 - 133.22B^2 \quad (4.3)$$

จากภาพสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA และ PVMMA ส่งผลให้ viscosity ของตัวรับมาส์กเบสเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05

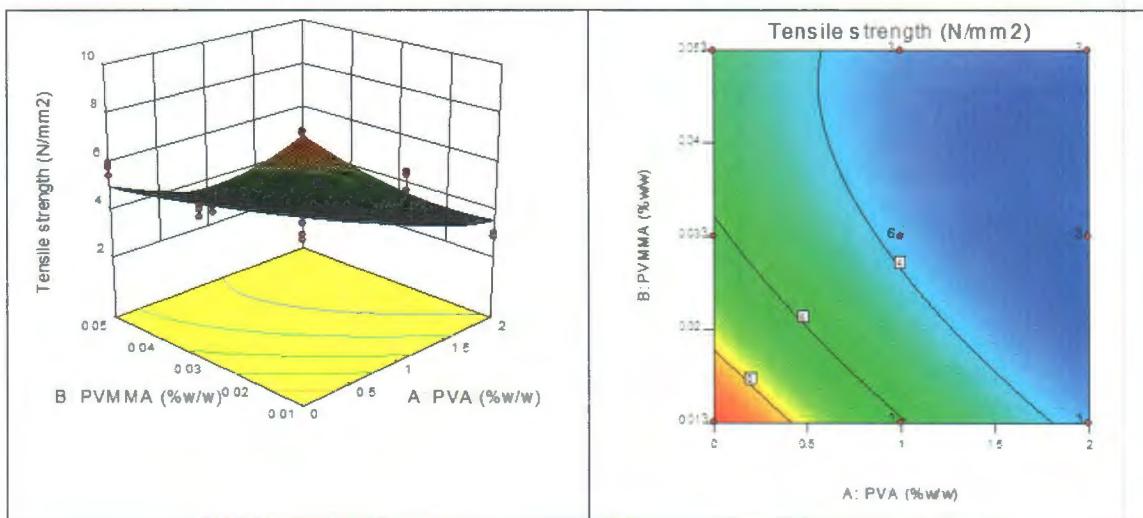


ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อกำลังของสูตรตัวรับ แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

การวิเคราะห์พื้นผิวของ tensile strength ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง tensile strength กับตัวแปรต้นในสมการรูปแบบตัวแปรกำลังสอง (Quadratic) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ 0.9032 ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.4) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง tensile strength และตัวแปรต้น เมื่อ A แทนปริมาณของ PVA และ B แทนปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A และ B มีความสัมพันธ์ในเชิงลบต่อ tensile strength

$$\text{Tensile strength} = +3.73 - 20.4A - 1.32B + 0.94AB + 0.446A^2 + 1.04B^2 \quad (4.4)$$

จากการทดสอบรูปได้รู้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA และ PVMMA ส่งผลให้ tensile strength ของแผ่นฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value}$ น้อยกว่า 0.01

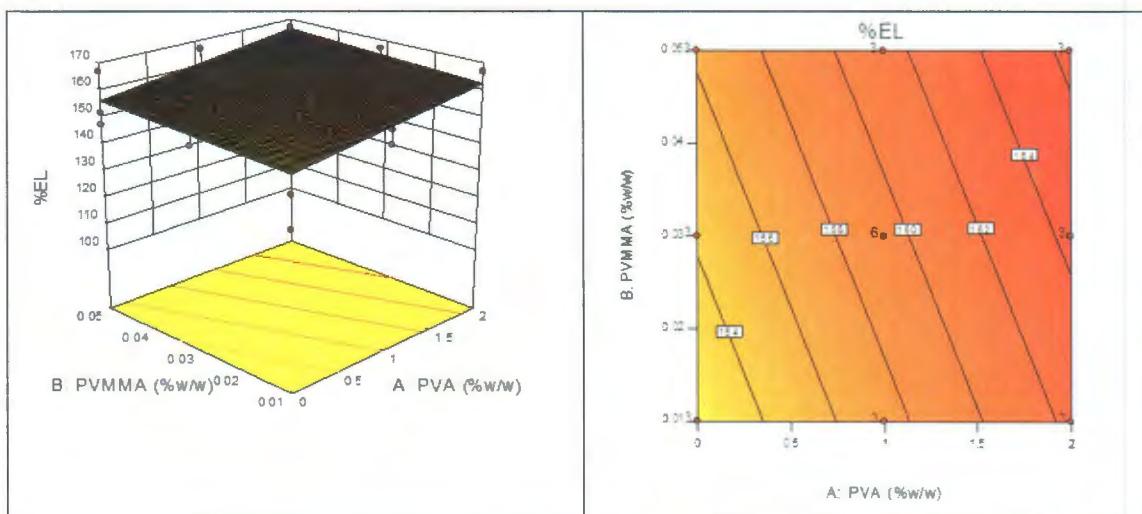


ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อความทนแรงดึง (tensile strength) แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

การวิเคราะห์พื้นผิวของ % elongation at break ผลการวิเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง % elongation at break กับตัวแปรต้นในสมการเส้นตรง (Linear) โดย มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ 0.1200 ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.5) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง tensile strength และตัวแปรตัน เมื่อ A แทนปริมาณของ PVA และ B แทนปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A และ B ไม่มีความสัมพันธ์ต่อ % elongation at break

$$\% \text{ Elongation at break} = +159.32 + 5.096A + 2.011B \quad (4.5)$$

จากการทดสอบรูปได้ว่า ปริมาณของ PVA และ PVMMA ไม่มีผลต่อ % elongation at break ของแผ่นฟิล์ม

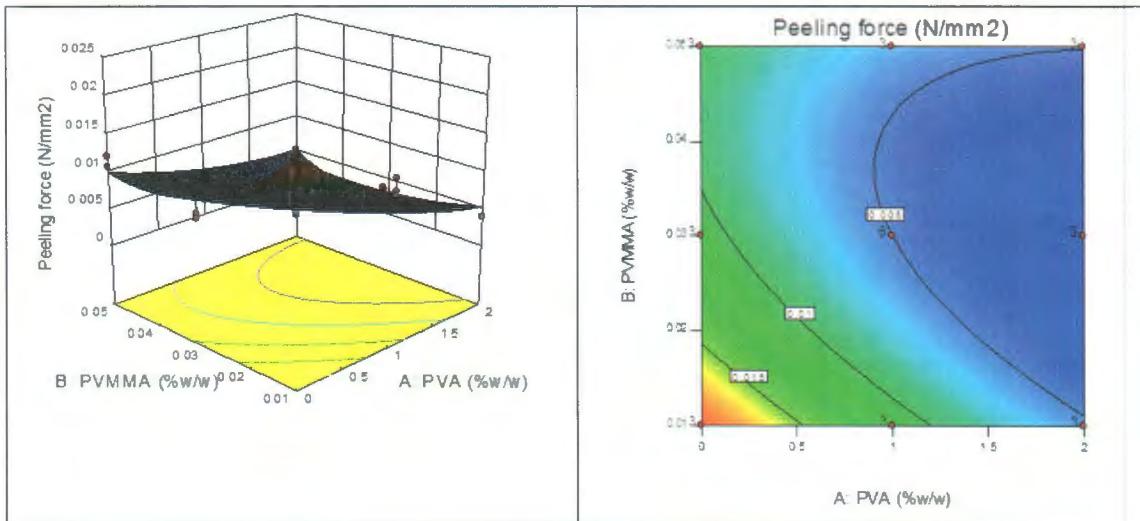


ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

การวิเคราะห์พื้นผิวของ peeling force ผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peeling force กับตัวแปรต้นในสมการรูปแบบตัวแปรกำลังสอง (Quadratic) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r^2 เท่ากับ ความแปรปรวนสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ (4.6) ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง peeling force และตัวแปรต้น เมื่อ A แทนปริมาณของ PVA และ B แทนปริมาณของ PVMMA จะเห็นได้ว่า A และ B มีความสัมพันธ์ในเชิงลบต่อ peeling force

$$\text{Peeling force} = +5.017E-003 - 4.791E-003A - 2.503E-003B + 2.345E-003AB + 1.15E-003A^2 + 3.899E-003B^2 \quad (4.6)$$

จากการทดสอบรูปได้รู้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ PVA และ PVMMA ส่งผลให้ peeling force ของแผ่นฟิล์มลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.01



ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่าง PVA และ PVMMA ต่อแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) แสดงเป็นแบบ 3D surface และ contour

4.7 การคัดเลือกมาส์กเบสที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 17 แสดงผลของปริมาณ PVA และ PVMMA ที่ได้จากการคาดการณ์จากการตอบสนองพื้นผิวผ่านโปรแกรม Design-Expert[®] version 10 พบว่ามีปริมาณ PVA ร้อยละ 1.42 และ PVMMA ร้อยละ 0.05 มีร้อยละความพึงพอใจ 87% และใช้เป็นสูตรที่เหมาะสมที่จะนำมาระจุใส่สารสกัด บัวบก การเปรียบเทียบค่าการตอบสนองด้านต่าง ๆ ที่ได้จากการคาดการณ์ (predicted value) และค่าที่ได้จากการทดลอง แสดงดังตารางที่ 18 สามารถสรุปได้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองมีความใกล้เคียง กับค่าที่ได้จากการคาดการณ์ และสูตรคำรับมาส์กเบสที่เหมาะสมที่สุดแสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 17 ปริมาณ PVA และ PVMMA ที่เหมาะสมในการทำสูตรตำรับมาส์กหน้าแบบลอกออก
จากการคาดการณ์ของโปรแกรม

Number	PVA	PVMMA	Desirability	
1	1.419	0.05	0.87	Selected

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบค่าการตอบสนองด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับมาส์กเบส และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการคาดการณ์จากโปรแกรม RSM และค่าที่ได้จากการทดลอง

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ของตำรับมาส์กเบส			คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม		
DT (นาที)	pH	Viscosity (cP)	Tensile strength (N/mm ²)	%EL	Peeling force (N/mm ²)
ค่าจาก โปรแกรม RSM	20.27	5.22	847.70	3.08	163.47
ค่าที่ได้ จากการ ทดลอง	21.33±0.5 8	5.25±0.0 2	1127.00±112.9 5	2.90±0.1 5	163.60±16.3 0 0.08±0.0 2

หมายเหตุ: DT (Drying time) คือ ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น นาที
 Viscosity คือ ความหนืด มีหน่วยเป็น centipoise (cP)
 Tensile strength คือ ความทนแรงดึง มีหน่วยเป็น N/mm²
 %EL (percent elongation at break) คือ ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด
 Peeling force คือ แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม มีหน่วยเป็น N/mm²

ตารางที่ 19 สูตรสำหรับของมาส์กเบสที่เหมาะสม

องค์ประกอบ	ปริมาณ %w/w
Chitosan	2
EDTA	1
PVA	1.42
PVMMA	0.05
Glycerin	2.74
Ethanol	10
Purify water q.s.	100

4.8 สำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบก

สำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก สูตรที่เหมาะสมที่สุด แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 องค์ประกอบและหน้าที่ในสำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%w/w)	หน้าที่ในสำหรับ
Chitosan	2	สารก่อฟิล์ม
EDTA	1	สารทำให้เกิดสารประกอบเชิงช้อน
PVA	1.42	สารก่อฟิล์ม
Glycerin	2.74	พลาสติไซเซอร์
Ethanol	10	สารเร่งการทำให้แห้ง
PVMMA	0.05	สารเพิ่มการยึดเกาะ
Centella Extract	5	สารสำคัญ
Purified Water q.s.	100	ตัวทำละลายและการสายยา

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีภysis และคุณสมบัติเชิงกลของมาส์กเบสและสำหรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 5%w/w แสดงดังตารางที่ 21 พบว่าความหนืดความทนแรงดึงและแรงที่ใช้ในการลอกออก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05 ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณ ethanol เพิ่มขึ้นจากสารสกัดที่เติมลงในสำหรับมาส์กเบสและองค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบบัวบกเป็นสารกลุ่ม triterpenoids ซึ่งมีหมู่ hydroxyl จำนวนมาก อาจรบกวนการเกิด hydrogen bonding ระหว่างน้ำและไคโตชานหรือ PVA ทำให้การพองตัวของสารก่อฟิล์มดังกล่าวลดลง ความหนืดของสำหรับจึงลดลง (Shukr, 2011)

ตารางที่ 21 การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีภysis และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นพิล์มของ ตำรับมาส์กเบสและตำรับที่เติมสารสกัดบัวบก 5%

คุณสมบัติทางเคมีภysis			คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นพิล์ม		
DT (นาที)	pH	Viscosity (cP)	Tensile strength (N/mm ²)	%EL	Peeling force (N/mm ²)
ตำรับ มาส์ก เบส	21.33±0.58	5.25±0.02	1127.00±112.95	2.90±0.15	163.60±16.30 0.08±0.02
ตำรับ ที่เติม สาร สกัด บัวบก 5%	19.33±1.15 ^{**}	4.97±0.06 ^{**}	894.57±149.88 [*]	0.57±0.06 [*]	166.77±0.00 ^{**} 0.002±0.0005 [*]

หมายเหตุ: DT (Drying time) คือ ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นพิล์ม มีหน่วยเป็น นาที

Viscosity คือ ความหนืด มีหน่วยเป็น centipoise (cP)

Tensile strength คือ ความทนแรงดึง มีหน่วยเป็น N/mm²

%EL (percent elongation at break) คือ ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่ขาด

Peeling force คือ แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นพิล์ม มีหน่วยเป็น N/mm²

*คือ significant at p<0.05; ns คือ not significant

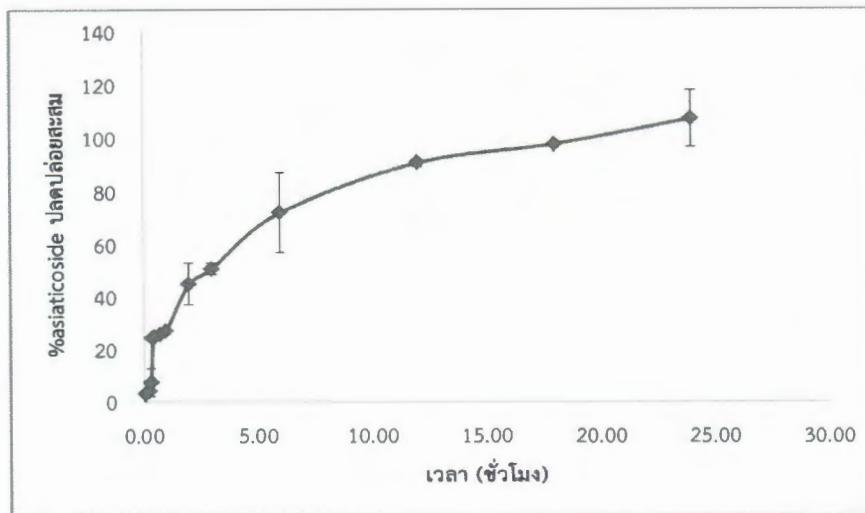
4.9 การปลดปล่อยสารสำคัญจากตำรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก

ทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญโดยใช้ตำรับที่เติมสารสกัดบัวบก 5% ด้วยเครื่องมือจำลองการซึมผ่านของผิวหนัง (modified Franz diffusion cell) ใช้ phosphate buffer pH 7.4 ผสมกับ 10% ethanol เป็นสารละลายน้ำตัวรับ (receptor fluid) ทดสอบที่อุณหภูมิ 35±2°C วิเคราะห์ปริมาณ asiaticoside ที่ปลดปล่อยออกมานาที ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180, 360, 720, 1080 และ 1440 นาที ด้วยวิธีクロมาโทกราฟฟิของเหลวสมรรถนะสูง (RP-HPLC) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การปลดปล่อย asiaticoside ของสารสกัดบัวบก ในตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่
ผสมสารสกัดบัวบก

เวลา (ชั่วโมง)	% cumulative asiaticoside release					Mean ± SD
	1	2	3	4	5	
0.08	3.02	2.94	2.72	2.79	2.98	2.89 ± 0.13
0.17	3.02	3.13	2.81	4.33	4.57	3.57 ± 0.81
0.25	3.18	7.25	2.91	3.13	2.97	3.89 ± 1.88
0.33	13.19	13.26	3.61	3.28	3.28	7.32 ± 5.39
0.42	24.01	23.72	24.91	24.99	24.25	24.37 ± 0.56
0.50	23.99	24.08	24.68	25.20	25.10	24.61 ± 0.56
0.75	26.28	25.73	25.25	26.73	25.52	25.90 ± 0.60
1.00	27.17	27.03	26.79	27.89	27.06	27.19 ± 0.42
2.00	53.40	46.10	46.26	47.04	31.89	44.94 ± 7.89
3.00	51.27	50.12	48.99	54.34	49.01	50.75 ± 2.22
6.00	83.55	83.68	81.78	56.02	55.54	72.11 ± 14.93
12.00	92.90	89.90	89.64	90.78	89.38	90.52 ± 1.43
18.00	96.42	98.22	97.51	98.35	96.82	97.46 ± 0.84
24.00	126.14	102.07	100.80	102.50	104.16	107.13 ± 10.69

จากข้อมูลข้างต้น นำมาสร้างกราฟการปลดปล่อย asiaticoside ในสารสกัดบัวบกในตารับมาส์กหน้าแบบลอกออก โดยแกน X คือ เวลา (นาที) และแกน Y คือ % asiaticoside ปลดปล่อยสะสมตั้งรูปภาพที่ 25 พบร้าเมื่อเวลาผ่านไปมีการปลดปล่อย asiaticoside จากตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกเพิ่มขึ้น และที่เวลา 30 นาที asiaticoside มีการปลดปล่อยจากตารับร้อยละ 24.61 ± 0.56 หรือคิดเป็น 1.35 ± 0.030 mg และที่ 24 ชั่วโมง มีการปลดปล่อย asiaticoside จากสารสกัดบัวบกในตารับมาส์กหน้าแบบลอกออก คิดเป็นร้อยละ 107.13 ± 10.69 การที่ร้อยละการปลดปล่อย asiaticoside มากกว่าร้อยละ 100 อาจมีสาเหตุเนื่องจากเมมเบรนที่ใช้เป็นชนิด cellulose ซึ่งอาจเกิดการพองตัวเมื่อสัมผัสกับสารละลายตัวรับที่มีน้ำและแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบในระยะเวลานาน ๆ จึงทำให้สารสำคัญปลดปล่อยออกมามากเกิน อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ไม่พบรการปลดปล่อยของ madecassoside และ asiatic acid เนื่องจากในสารสกัดหยาบบัวบกมีสารสำคัญของทั้ง 2 น้อยมากเมื่อเทียบกับ asiaticoside



ภาพที่ 25 การปลดปล่อย asiaticoside สะสมจากตับม้าสีหน้าแบบลอกออก

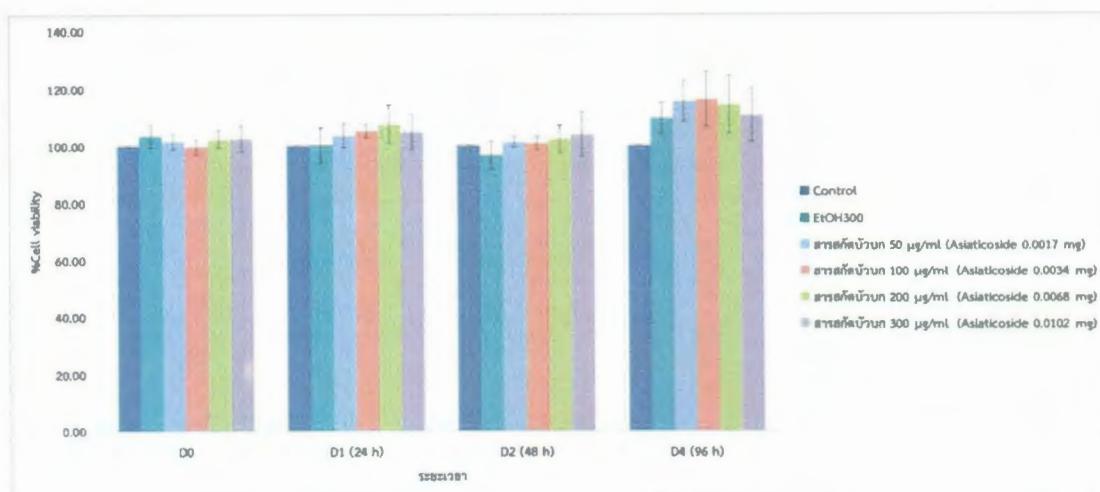
4.10 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT)

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดขยายบัวกความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ และมี ethanol เป็นตัวควบคุมผลทางลบ (negative control) เนื่องจากสารสกัดขยายบัวกจะถูกย่อยในตัวทำละลาย ethanol ตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดขยายบัวก

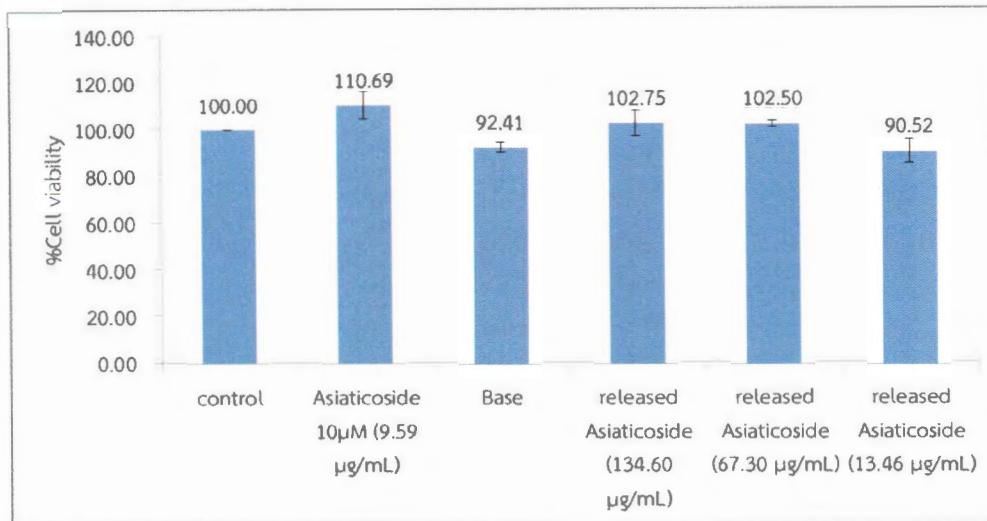
	% Cell viability			
	D0	D1	D2	D4
	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM
Control	100.00 \pm 0	100.00 \pm 0	100.00 \pm 0	100.00 \pm 0
Ethanol 300	103.42 \pm 3.99	100.35 \pm 6.18	96.76 \pm 4.86	109.55 \pm 5.59
สารสกัดบัวก 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Asiaticoside 1.7 μg)	101.63 \pm 2.75	103.54 \pm 4.28	101.32 \pm 1.85	115.53 \pm 7.04
สารสกัดบัวก 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Asiaticoside 3.4 μg)	99.69 \pm 2.67	105.13 \pm 2.22	100.85 \pm 2.31	116.14 \pm 9.50
สารสกัดบัวก 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Asiaticoside 6.8 μg)	102.33 \pm 3.07	107.54 \pm 6.63	102.33 \pm 4.92	114.33 \pm 9.97
สารสกัดบัวก 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Asiaticoside 1.02 μg)	102.58 \pm 4.72	104.91 \pm 5.98	103.88 \pm 7.74	110.55 \pm 9.31

พบว่าสารสกัดหยาบบัวบก และตัวทำละลาย ethanol ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งมีปริมาณ asiaticoside 0.0017, 0.0034, 0.0068 และ 0.0102 mg ตามลำดับ ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 แสดงร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบบัวบก

เมื่อต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบบัวบกในความเข้มข้นที่มากขึ้น เพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณสารสกัดที่ผสมในตารับมาส์กหน้าแบบลอกออก พบร่วมกับมีข้อจำกัดในการ ละลายสารสกัดหยาบบัวบก เนื่องจาก ethanol ถ้าใช้ในปริมาณที่สูงจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อ เซลล์ได้ และมีข้อจำกัดการใช้ ethanol ในการทดสอบในเซลล์ซึ่งไม่ควรเกิน 1 $\mu\text{l}/\text{mL}$ ของมีเดียม (Tapani et al., 1996) เพื่อลดข้อจำกัดในการใช้ตัวทำละลาย ethanol จึงทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์ของสารสกัดบัวบกที่ปลดปล่อยออกมานานาตารับมาส์กหน้าแบบลอกออก และมีมาส์กเบสเป็นตัว ควบคุมผลทางลบ โดยเครื่องมือจำลองการซึมผ่านผิวนัง (modified Franz diffusion cell) ที่ เวลา 24 ชั่วโมง และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เป็นสารละลายตัวรับ เมื่อวิเคราะห์หัวปริมาณ asiaticoside โดยวิธี HPLC พบร่วมกับมีปริมาณ asiaticoside 1.62 mg ที่ปลดปล่อยออกมานานนั้นเจือ จางลงเหลือ 50% และ 10% ตามลำดับ เหล่านี้นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้ผลการทดลองดัง ภาพที่ 27 แสดงให้เห็นว่าสารที่ปลดปล่อยออกมานานาตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัด หยาบบัวบก 5% ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์

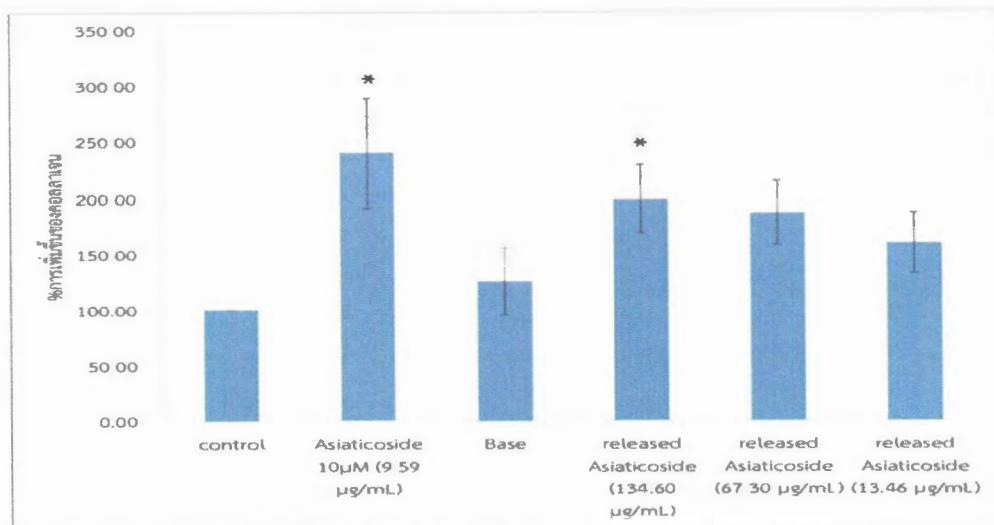


ภาพที่ 27 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารที่ปลดปล่อยจากตัวรับมาส์กหน้า

4.11 ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ได้จากการตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมการสกัดบัวบก 5% และมาส์กเบส โดยทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากตัวรับด้วยเครื่องมือจำลองการซึมผ่านผิวนัง (modified Franz diffusion cell) โดยใช้ DMEM media เป็นสารละลายตัวรับ (receptor fluid) ทดสอบที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บสารละลายตัวรับที่เวลา 24 ชั่วโมง จากตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมการสกัดหยาบบัวบก 5% และมาส์กเบส นำมากรองผ่าน nylon filter 0.22 μm และเติม 1% antibiotic, 10% bovine fetal serum ให้เหมือนกับนีเดียที่ใช้เลี้ยงเซลล์ปกติ

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ได้แก่ control คือ DMEM media ผสม 10% bovine fetal serum ซึ่งเป็นมีเดียในการเลี้ยงเซลล์ปกติ (control) สารละลาย asiaticoside ความเข้มข้น 10 μM เป็นตัวควบคุมผลทางบวก สารละลายตัวรับที่ได้จากการตัวรับมาส์กเบส (Base) สารละลายตัวรับที่ได้จากการตัวรับมาส์กหน้าที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก 5% (Buabok 100%) สารละลายในตัวรับที่ได้จากการตัวรับมาส์กหน้าที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก 5% ผ่านการเจือจางลงครึ่งหนึ่ง (Buabok 50%) และสารละลายตัวรับที่ได้จากการตัวรับมาส์กหน้าที่ผสมสารสกัดหยาบบัวบก 5% ที่เจือจางลง 10 เท่า (Buabok 10%) พนบว่า ร้อยละการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจน ของ control, asiaticoside ความเข้มข้น 10 μM , base, buabok 100%, buabok 50% และ buabok 10% เท่ากับ 99.99 ± 0.009 , 239.49 ± 0.84 , 125.23 ± 0.52 , 198.29 ± 0.54 , 186.03 ± 0.49 และ 159.19 ± 0.47 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 28 พบว่า asiaticoside ความเข้มข้น 10 μM และ buabok 100% มีร้อยละการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p -value น้อยกว่า 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



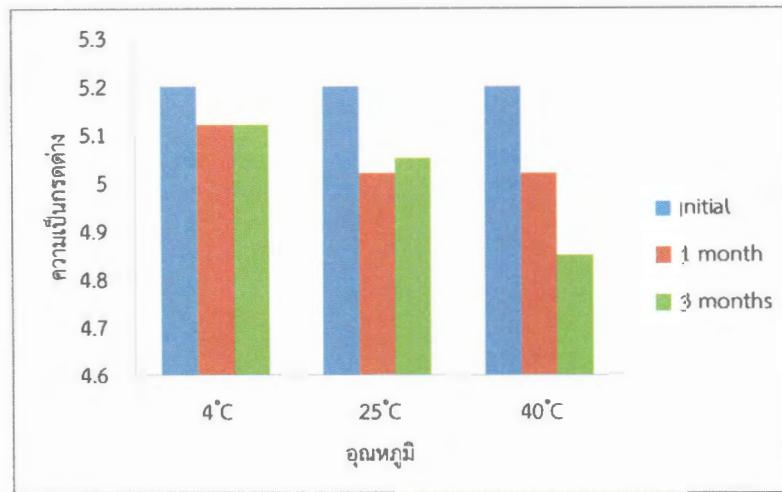
ภาพที่ 28 ร้อยละการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนของ asiaticoside และตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก

เมื่อพิจารณาผลการปลดปล่อย asiaticoside จากตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก 5% โดยใช้เครื่องมือจำลองการซึมผ่านผิวหนัง (modified Franz diffusion cell) ที่เวลา 30 นาที มีค่า $112.73 \pm 30.92 \mu\text{g}/\text{mL}$ (ผลการทดลองจากหัวข้อ 4.8) แสดงว่าตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่พัฒนาขึ้นสามารถถูกตัดส่วนการสร้างคอลลาเจนได้

4.12 ประเมินความคงสภาพในสภาวะเร่งของตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก

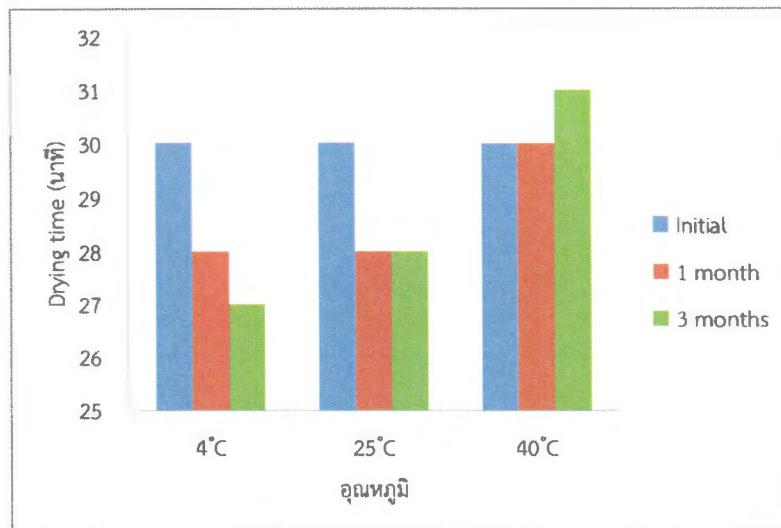
เก็บตารับที่อุณหภูมิ 4, 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นเวลา 3 เดือน ทดสอบคุณสมบัติของตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหมายบัวบก โดยประเมินจากลักษณะภายนอก ได้แก่ pH ความหนืด ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม สมบัติเชิงกล ได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของขั้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

4.12.1 ความเป็นกรดด่าง ของตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกอยู่ในช่วง 5.2-4.85 และพบว่า pH ของตารับมีแนวโน้มลดลง เมื่ออุณหภูมิการเก็บสูงขึ้นและเก็บนาน 3 เดือน แสดงดังภาพที่ 29 อย่างไรก็ตาม pH ของตารับเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C ดังนั้นควรเก็บตารับที่อุณหภูมิ 25 °C



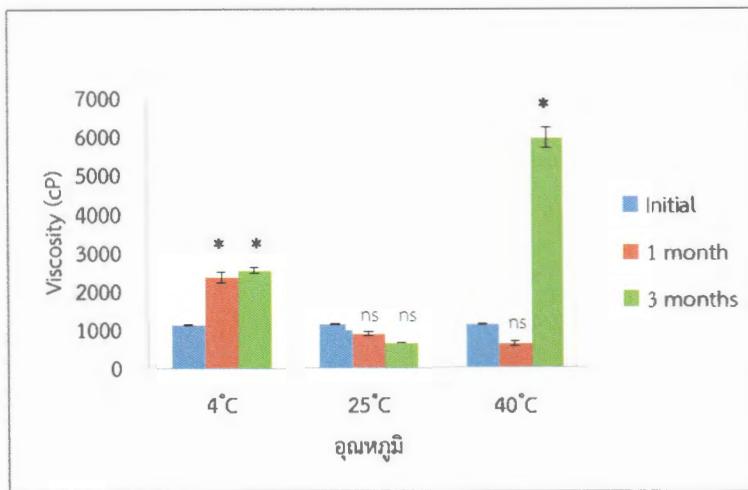
ภาพที่ 29 pH ของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C
ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน

4.12.2 ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม จากภาพที่ 30 พบว่าที่อุณหภูมิ 4°C ณ เวลาเริ่มต้น และเมื่อเก็บนาน 1 และ 3 เดือน ตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก มีระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มที่ 30, 28 และ 27 นาที ตามลำดับ สาเหตุอาจเกิดจากความหนืดของตัวรับที่ อุณหภูมิ 4 °C มีค่าสูงขึ้นทำให้มีปริมาณน้ำอิสระลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มลดลง ส่วนการเก็บตัวรับที่อุณหภูมิ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ณ เวลาเริ่มต้น และเมื่อเก็บนาน 1 และ 3 เดือน ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้น โดยความชื้นสัมพัทธ์ 75% ไม่มีผลต่อระยะเวลาการแห้งของแผ่นฟิล์ม ซึ่งสังเกตจากความหนืดของตัวรับที่เก็บนาน 1 และ 3 เดือน มีค่าไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้น การเก็บตัวรับที่อุณหภูมิ 40 °C ทำให้แอลกอฮอล์ที่อยู่ในตัวรับระเหยออกไปทำให้มีปริมาณน้ำอิสระมากขึ้น ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์มของเดือนที่ 3 จึงมีค่ามากขึ้น



ภาพที่ 30 ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นพิล์ม เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน

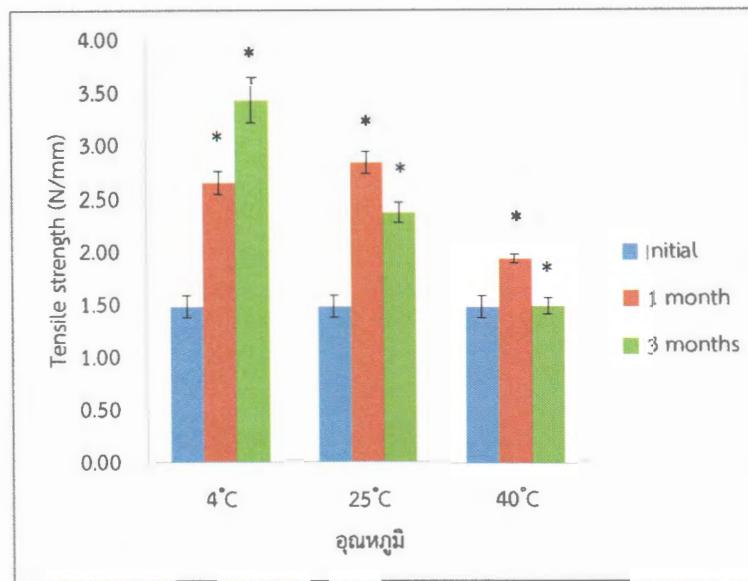
4.12.3 ความหนืด จากรูปภาพที่ 31 พบร่วมกันเริ่มต้นสำหรับการทดสอบความหนืดของวัสดุที่ผลิตขึ้นโดยใช้กระบวนการน้ำยา PVA และสารประกอบอื่นๆ ที่มีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 153.80 ± 6.06 cP เมื่อเก็บนาน 1 และ 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 4°C ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ เนื่องจากมีปริมาณน้ำอิสระลดลง ส่วนที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเก็บนาน 1 และ 3 เดือน ความหนืดลดลงเล็กน้อยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับความหนืดเริ่มต้น ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บนาน 3 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดการระเหยของน้ำหรือแอลกอฮอล์ในตัวรับ ทำให้ของเหลวที่อยู่รอบสายโซ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ตามเดิม แต่สังเกตเห็นว่าตัวรับมีลักษณะเป็นก้อนวุ้นแยกออกจากกัน ไม่เป็นเจลเนื้อดีเยิกกัน เนื่องจาก PVA ไม่คงตัวในสภาพที่เป็นกรดและอุณหภูมิที่สูงขึ้น โดย hydronium ion ร่างกายสามารถดูดซึมน้ำ OH ของ PVA ทำให้ไฮโดรเจลของ PVA เสียสภาพ (Alexy et al., 2002; Alexy et al., 2004) นอกจากนี้ไฮโดรเจลของไคโตซานเสียสภาพเมื่อเก็บที่ระยะเวลานานขึ้นและอุณหภูมิสูงขึ้น (No et al., 2006) ส่งผลทำให้ความหนืดของตัวรับมีค่าลดลงอย่างมากและตัวรับไม่คงสภาพ เมื่อเก็บตัวรับที่อุณหภูมิ 40°C นาน 3 เดือน



ภาพที่ 31 ความความหนืดของมาล์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน

หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

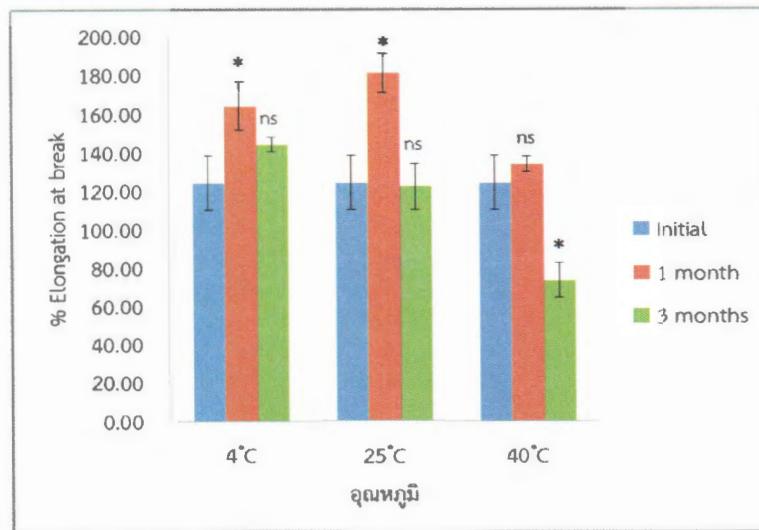
4.12.4 ความทนแรงดึง (tensile strength) จากภาพที่ 32 พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความทนแรงดึง โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้ความหนืดลดลง เมื่อนำเข้ารับมาล์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกมาเทเป็นแผ่นฟิล์ม ทำให้ความทนแรงดึงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Srinivasa (2007) ที่ศึกษาผลของสภาพการเก็บต่อคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานพบว่า ความทนแรงดึงของแผ่นฟิล์มมีค่ามากที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Srinivasa et al., 2007) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้เกิดการระเหยของน้ำในแผ่นฟิล์ม ทำให้เกิดช่องว่างภายในโครงร่างตาข่ายของฟิล์มส่งผลให้ความทนแรงดึงลดลง (Arvanitoyannis et al., 1998) ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าความทนแรงดึงมีแนวโน้มลดลง เนื่องมาจากแผ่นฟิล์มอาจถูกความชื้น ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Srinivasa (2007) ซึ่งพบว่าความทนแรงดึงของฟิล์มไคโตซาน มีค่าลดลง เมื่อความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60% (Srinivasa et al., 2007)



ภาพที่ 32 ความทนแรงดึง (tensile strength) ของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน

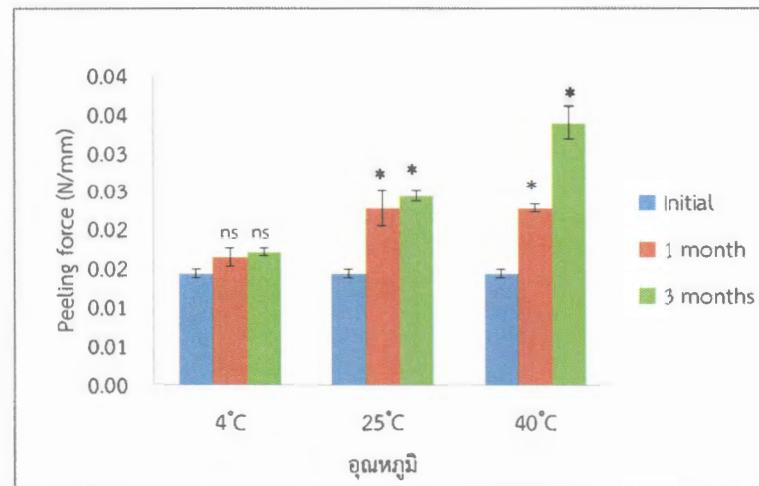
หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

4.12.5 ร้อยละการยืดของขีนทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) จากภาพที่ 33 พบว่าอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ค่าร้อยละการยืดของขีนทดสอบที่จุดขาดลดลง เนื่องจากการระเหยของน้ำในแผ่นฟิล์ม ทำให้เกิดช่องว่างภายในโครงร่างตามที่ข่ายของฟิล์มส่งผลให้ร้อยละการยืดของขีนทดสอบที่จุดขาดมีค่าลดลง (Srinivasa et al., 2007) อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บฟิล์มไม้โคโลราโดที่ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 30% ที่เวลา 30 วัน โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C ทำให้ร้อยละการยืดของขีนทดสอบที่จุดขาดมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากแผ่นฟิล์มมีการดูดความชื้นจากอากาศ ซึ่งน้ำหรือความชื้นมีสมบัติคล้ายกับพลาสติกเซอร์ที่ทำให้สายของพอลิเมอร์จับกันอย่างหลวม ๆ จึงทำให้ร้อยละการยืดของขีนทดสอบที่จุดขาดมีค่ามากขึ้น (Srinivasa et al., 2007)



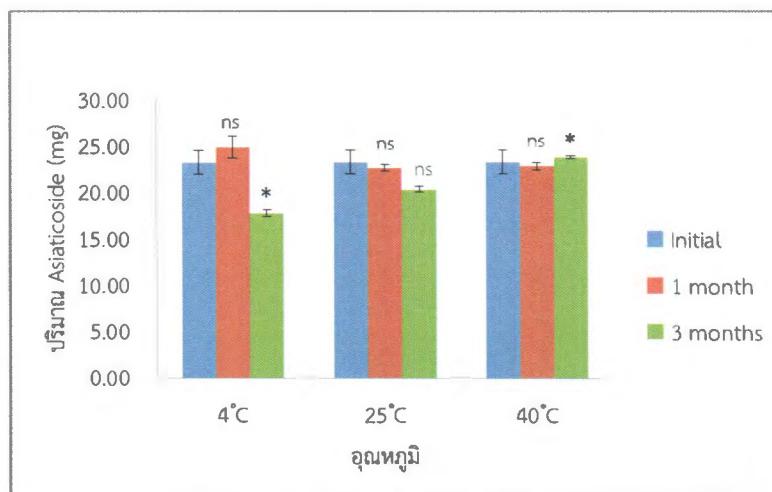
ภาพที่ 33 ร้อยละการยืดของขั้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) ของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน
หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

4.12.6 แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นพิล์ม (peeling force) จากภาพที่ 34 พบว่าเมื่ออุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บที่นานขึ้น ทำให้แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นพิล์มมีค่ามากขึ้น



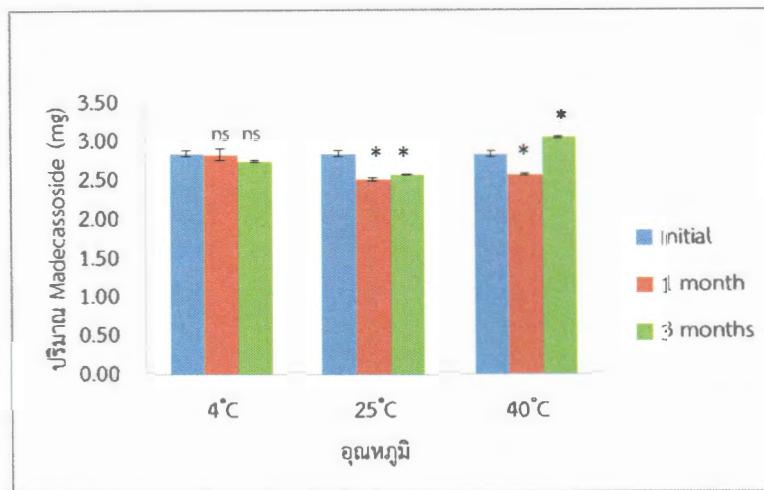
ภาพที่ 34 แรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นพิล์ม (peeling force) ของมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก เก็บอุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน
หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

4.12.7 วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ asiaticoside ในตารับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก 5 % ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ พบร่วม มีปริมาณ asiaticoside อยู่ในช่วง 24.79 ± 1.20 mg ถึง 17.73 ± 0.31 mg ดังภาพที่ 35 แสดงว่าการเก็บตารับที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3 เดือน ปริมาณ asiaticoside ไม่แตกต่างจากปริมาณ asiaticoside เริ่มต้นอย่างไรก็ตามการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ 40°C มีปริมาณ asiaticoside แตกต่างจากปริมาณ asiaticoside เริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05 ส่วนปริมาณ madecassoside อยู่ในช่วง 3.03 ± 0.01 mg ถึง 2.49 ± 0.02 mg ดังภาพที่ 36 พบร่วมอุณหภูมิ 4°C และระยะเวลาการเก็บนาน 3 เดือน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ madecassoside ในตารับ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และ 40°C นาน 1 และ 3 เดือน มีปริมาณ madecassoside แตกต่างจากปริมาณ madecassoside เริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05



ภาพที่ 35 ปริมาณ Asiaticoside ของผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก ในความคงสภาพในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 4°C , 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน

หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P > 0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น



ภาพที่ 36 ปริมาณ Madecassoside ของผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกในความคงสภาพในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 4°C, 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 3 เดือน
หมายเหตุ: ns คือ non-significant ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น

ตารางที่ 24 สรุปปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบกและคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม

ปัจจัย	คุณสมบัติทางกายภาพของตัวรับ			คุณสมบัติเชิงกล		
	pH	ความหนืด	ระยะเวลา	ความหนา	ร้อยละการ	แรงที่ใช้ใน
		ในการแห้ง	แห้งดึง	ของ	ยึดของชิ้น	การลอก
อุณหภูมิที่สูงขึ้น	ลดลง	ลดลง	เพิ่มขึ้น	ลดลง	ลดลง	เพิ่มขึ้น
ความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงขึ้น	ลดลง	ลดลง	เพิ่มขึ้น	ลดลง/ เพิ่มขึ้น	ลดลง/ เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น
ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น	ลดลง	ลดลง/ เพิ่มขึ้น	ลดลง/ เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น	ลดลง/ เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาความคงสภาพของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวบก 5% ในสภาวะเร่ง พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บ มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของตัวรับ ได้แก่ pH ความหนืด และระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพโดยเฉพาะความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไปของตัวรับ ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม อย่างไรก็ตามตัวรับมาส์กหน้าแบบ

ลอกออกที่ผสานสารสกัดบัวบก ที่มีความคงสภาพที่ดีในสภาพแวดล้อมมีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกล ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับตัวรับที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสภาพที่เหมาะสมในการเก็บตัวรับมาสักหน้าแบบลอกออกที่ผสานสารสกัดบัวบกควรเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เพราะคุณสมบัติต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพและเชิงกล ตลอดจนปริมาณสารสำคัญคือ asiaticoside มีการเปลี่ยนแปลงน้อยเมื่อเก็บนาน 3 เดือน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำบัวกจากแหล่งเพาะปลูก บ้านวังยาง อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี เตรียมเป็นสารสกัด หยาบบัวกโดยวิธีการแช่ด้วย 95% ethanol และทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยโดย ความดัน พบริมาณของ asiaticoside, madecassoside และ asiatic acid เท่ากับ 34.37, 4.17 และ 2.98 mg/กรัมของสารสกัดหยาบบัวก ตามลำดับ สารสกัดหยาบบัวกที่ได้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* แต่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ โดยมีค่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* (MIC) เท่ากับ 21.88 mg/mL และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. acnes* ได้ (MBC) เท่ากับ 700 mg/mL สารสกัด หยาบบัวกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP สารสกัดหยาบบัวก ไม่มีพิษต่อเซลล์ human skin fibroblast

ในการพัฒนาตัวรับมาส์กเบส พบริมาณของสารก่อฟิล์มคือ ไคโตซาน และ PVA มีผลต่อ คุณสมบัติทางกายภาพของตัวรับ เช่น ความเป็นกรดด่างและความหนืด และคุณสมบัติเชิงกลของ แผ่นฟิล์ม และปริมาณแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารเร่งการทำให้แห้ง มีผลต่อระยะเวลาการทำให้แห้งของ แผ่นฟิล์ม เมื่อใช้โปรแกรมออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว Design-Expert[®] พบริมาณ PVA 1.42 %w/w และ PVMMA 0.05 %w/w ทำให้คุณสมบัติต้านกายภาพ เช่น ความเป็นกรดด่าง ความหนืด ระยะเวลาในการแห้งของแผ่นฟิล์ม และสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม เช่น ความทน แรงดึง (tensile strength) ร้อยละการยืดของชิ้นทดสอบที่จุดขาด (percent elongation at break) และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม (peeling force) มีความหมายสมและมีค่าใกล้เคียงกับ ค่าที่ได้จากการทดลอง เมื่อทดสอบสารสกัดหยาบบัวก 5%w/w ลงในตัวรับมาส์กเบส ทำให้ความหนืด ความทนแรงดึง และแรงที่ใช้ในการลอกออกของแผ่นฟิล์ม มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value น้อยกว่า 0.05 เนื่องจากผลของแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นในตัวรับจากสารสกัดหยาบบัวกและ สารสำคัญในสารสกัดบัวกที่มีโครงสร้างเป็นหมู่ phenolic hydroxyl จำนวนมาก การปลดปล่อย สารสำคัญในหลอดทดลองโดยใช้เครื่องมือจำลองการซึมผ่านผิวนัง (modified Franz diffusion cell) ที่อุณหภูมิ $35\pm2^{\circ}\text{C}$ พบร่วมกันใน 30 นาที ตัวรับสามารถปลดปล่อยสารสำคัญคือ asiaticoside ได้ในปริมาณที่มากพอที่จะกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน madecassoside และ asiatic acid มีการปลดปล่อยจากตัวรับน้อยมาก และสารสำคัญที่ ปลดปล่อยออกมากจากตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบัวก 5% ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อ เซลล์เช่นกัน

อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และระยะเวลาการเก็บ มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและระยะเวลา ใน การแห้งของตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหยาบบัวก 5 %w/w และคุณสมบัติ เชิงกลของแผ่นฟิล์ม ส่วนปริมาณสารสำคัญ เช่น asiaticoside และ madecassoside ในตัวรับ มาส์กหน้าแบบลอกออกเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 3 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย เมื่อ เทียบกับเวลาเริ่มต้น ดังนั้น ควรเก็บรักษาตัวรับมาส์กหน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหยาบบัวก

ที่อุณหภูมิ 25°C และความชื้นสัมพัทธ์ที่ไม่สูงจนเกินไป เพราะคุณสมบัติด้านกายภาพ เคมีและเชิงกลเปลี่ยนแปลงน้อย เมื่อเทียบกับคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เวลาเริ่มต้น อย่างไรก็ตามระยะเวลาการเก็บรักษา ตัวรับยังต้องมีการทดสอบความคงสภาพในระยะยาว จึงจะสามารถระบุข้อมูลเบื้องต้นของระยะเวลาที่ทำให้ตัวรับยังคงสภาพทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และเชิงกล

ตั้งนั้นตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออกที่ได้พัฒนาขึ้นจากไคโตซานที่เป็นสารก่อฟิล์มจากธรรมชาติ และ PVA ซึ่งเป็นสารก่อฟิล์มที่ได้จากการสังเคราะห์ เมื่อนำมาผสานกับสารสกัดหยาบบวบกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน สามารถช่วยฟื้นฟูสภาพผิวหน้าได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทดสอบความคงตัวของตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดบวบกในระยะยาว เช่น ทดสอบนาน 6 12 หรือ 24 เดือน ทั้งนี้ควรทำการทดสอบความคงตัวของมาสก์เบศควบคู่กับตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหยาบบวบก ในสภาวะเตียงกัน

5.2.2 ควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* และฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ของตัวรับมาสก์หน้าแบบลอกออกที่ผสมสารสกัดหยาบบวบก ที่ผ่านสภาพแวดล้อมเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิที่สูงขึ้นหรือระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่

5.2.3 รูปแบบสารสกัดควรอยู่ในรูปผงแห้ง (Freeze dried powder) เนื่องจากสามารถเก็บไว้ได้นานและละลายได้ดีกว่าสารสกัดในรูปแบบสารสกัดหยาบ

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- สุภารัตน์ จันทร์เหลือง และคณะ “ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดข้าวลิ้ง ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบใบโอฟิล์ม”, **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal.** 5(4): 279-286, 2552.
- นวลศรี รักอริยะธรรม, อัญชนา เจนวิถีสุข. แอนติออกซิเดนท์: สารต้านมะเร็งในผัก-สมุนไพรไทย. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์, 2545.
- Alexy, P., et al. “Poly (vinyl alcohol) stabilisation in thermoplastic processing”, **Polymer Degradation and Stability.** 78(3): 413-21, 2002.
- Alexy, P., et al. “Effect of melt processing on thermo-mechanical degradation of poly (vinyl alcohol)s”, **Polymer Degradation and stability.** 85(2): 823-30, 2004.
- Anand, T., et al. “Antioxidant and DNA Damage Preventive Properties of *Centella asiatica* (L) Urb”, **Pharmacognosy Journal.** 2(17): 53-8, 2010.
- Anchisi, C., Meloni, M. and Maccioni, A. “Chitosan beads loaded with essential oils in cosmetic formulations”, **Journal of cosmetic science.** 57(3): 205-14, 2005.
- Arvanitoyannis, I.S., Nakayama, A., Aiba, S.-i. “Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties”, **Carbohydrate polymers.** 37(4): 371-82, 1998.
- Beringhs, et al. “Green Clay and Aloe Vera Peel-Off Facial Masks: Response Surface Methodology Applied to the Formulation Design”, **AAPS PharmSciTech.** 14(1): 445-55, 2013.
- Blair, H.S., Guthrie, J., Law, T.K., Turkington, P. “Chitosan and modified chitosan membranes I. Preparation and characterisation”, **Journal of Applied Polymer Science.** 33(2): 641-56, 1987.
- Boriwanwattanarak, P., et al. “Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled-release matrix”, **International journal of cosmetic science.** 30(3): 205-18, 2008.
- Brinkhaus, B., et al. “Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*”, **Phytomedicine.** 7(5): 427-48, 2000.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. “Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships”, **Free Radical Biology and Medicine.** 22(5): 749-60, 1997.
- Chanluang, S., et al. “Antimicrobial Activity of *Alpinia conchigera* Extraction on *Enterococcus faecalis* Biofilm”, **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal.** 5(4): 279-86, 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chen, J., Li, Y., Zhang, Y., Zhu, Y. "Preparation and characterization of graphene oxide reinforced PVA film with boric acid as crosslinker", **Journal of Applied Polymer Science.** 132(22), 2015.
- Chippada, S.C. and Vangalapati, M. "Antioxidant, an anti-inflammatory and anti-arthritis activity of Centella asiatica extracts", **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS).** 1(2): 260, 2011.
- Chomnawang, M.T., et al. "Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria", **Journal of Ethnopharmacology.** 101(1): 330-3, 2005.
- Cooper, E.R. "Increased skin permeability for lipophilic molecules", **Journal of Pharmaceutical Sciences.** 73(8): 1153-6, 1984.
- Costa-Júnior, E.S., et al. "Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications", **Carbohydrate Polymers.** 76(3): 472-81, 2009.
- Cui, F., et al. "Preparation and evaluation of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid hydrogel films for the mucoadhesive transbuccal delivery of insulin", **Journal of Biomedical Materials Research Part A.** 89(4): 1063-71, 2009.
- Dou, Y., et al. "Keratin/Polyvinyl Alcohol Blend Films Cross-Linked by Dialdehyde Starch and Their Potential Application for Drug Release", **Polymers.** 7(3):580-91, 2015.
- Duangjit, S., et al. "Menthosomes, novel ultradeformable vesicles for transdermal drug delivery: optimization and characterization", **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** 35(10): 1720-8, 2012.
- Fan, L., et al. "Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings", **Carbohydrate Polymers.** 146: 427-34, 2016.
- Fangkangwanwong, J., et al. "Chitosan-Hydroxybenzotriazole Aqueous Solution: A Novel Water-Based System for Chitosan Functionalization", **Macromolecular rapid communications.** 27(13): 1039-46, 2006.
- Foegeding, E., Lanier, T. and Hultin, H. "Characteristics of edible muscle tissues", **Food chemistry.** 3(15): 879-942, 1996.
- Gontard, N., Guilbert, S. and CUQ, J.L. "Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film", **Journal of Food Science.** 58(1): 206-11, 1993.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Gray, N.E., et al. "Centella asiatica modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice", **Journal of Ethnopharmacology.** 180: 78-86, 2016.
- Hamid, A.A., et al. "Characterisation of antioxidative activities of various extracts of Centella asiatica (L) Urban", **Food chemistry.** 77(4): 465-9, 2002.
- Hashim, P., et al. "Triterpene composition and bioactivities of Centella asiatica", **Molecules.** 16(2): 1310-22, 2011.
- Hausen, B. "Centella asiatica (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer", **Contact Dermatitis.** 29(4): 175-9, 1993.
- Hexsel, D., et al. "Botanical extracts used in the treatment of cellulite", **Dermatologic surgery.** 31(s1): 866-73, 2005.
- Incandela, L., et al. "Treatment of diabetic microangiopathy and edema with total triterpenic fraction of Centella asiatica: a prospective, placebo-controlled randomized study", **Angiology.** 52: S27, 2001.
- Izu, R., et al. "Allergic contact dermatitis from a cream containing Centella asiatica extract", **Contact dermatitis.** 26(3): 192-213, 1992.
- Jagadeesh, D., et al. "Preparation and properties of propylene glycol plasticized wheat protein isolate novel green films", **Journal of Polymers and the Environment.** 21(4): 930-6, 2013.
- Jangchud, A. and Chinnan, M. "Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect", **LWT-Food Science and Technology.** 32(2): 89-94, 1999.
- Jaswir, I., Hassan, T. and Said, M. "Antioxidative behaviour of Malaysian plant extracts in model and food oil systems", **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.** 13, 2004.
- Jiang, X., Zhao, Y. and Hou, L. "The effect of glycerol on properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) films with AlCl₃•6H₂O aqueous solution as the solvent for chitosan", **Carbohydrate polymers.** 135: 191-8, 2016.
- Kartnig, T. and Hoffmann-Bohm, K. "Centella. Hager's handbuch der pharmazeutischen praxis Springer", Berlin. 1992.
- Kehrer, J. and Smith, C. "Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases", **Natural antioxidants in human health and disease.** 25-62, 1994.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kim, O., et al. "Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors", **Plant cell reports.** 23(5): 339-44, 2004.
- Kimura, S., et al. "Characterization of fish muscle type I collagen", **Journal of Food Science.** 53(5): 1315-8, 1988.
- Knott, L. and Bailey, A.J. "Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance", **Bone.** 22(3): 181-7, 1998.
- Kolli, D., Amperayani, K. and Parimi, U. "Total phenolic content and antioxidant activity of morinda tinctoria leaves", **Indian journal of pharmaceutical sciences.** 77(2): 226, 2015.
- Loretz, B. and Bernkop-Schnürch, A. "In vitro evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system", **The AAPS journal.** 8(4): E756-E64, 2006.
- Lu, L., et al. "Dermal fibroblast-associated gene induction by asiaticoside shown in vitro by DNA microarray analysis", **British Journal of Dermatology.** 151(3): 571-8, 2004.
- Miya, M., et al. "MECHANICAL-PROPERTIES OF POLYVINYL-ALCOHOL CHITOSAN BLEND FILMS", **Kobunshi Ronbunshu.** 40(10): 645-51, 1983.
- Morisset, R., et al. "Evaluation of the healing activity of hydrocotyle tincture in the treatment of wounds", **Phytotherapy research.** 1(3): 117-21, 1987.
- Nilsen-Nygaard, J., et al. "Chitosan: Gels and interfacial properties", **Polymers.** 7(3): 552-79, 2015.
- No, H.K., et al. "Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time", **Carbohydrate Polymers.** 65(2): 174-8, 2006.
- Nuttall, S., et al. "An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect[®]", **Journal of clinical pharmacy and therapeutics.** 23(5): 385-9, 1998.
- Opanasopit, P., et al. "Nucleic acid delivery with chitosan hydroxybenzotriazole", **Oligonucleotides.** 20(3): 127-36, 2010.
- Organization, W.H. "WHO monographs on selected medicinal plants", **World Health Organization.** 1999.
- Orienti, I., et al. "Substituted Poly (Methyl Vinyl Ether-alt-Maleic Anhydride) for the Release Control and Targeting of Methotrexate", **Archiv der Pharmazie.** 331(11): 347-51, 1998.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Oyedele, O. and Afolayan, A. "Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Centella asiatica Growing in South Africa", **Pharmaceutical Biology.** 43(3): 249-52, 2005.
- Pal, K., Banthia, A.K. and Majumdar, D.K. "Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications", **Aaps Pharmscitech.** 8(1): E142-E6, 2007.
- Parameshwaraiah, S. and Shivakumar, H. "Evaluation of topical formulations of aqueous extract of Centella asiatica on open wounds in rats", **Indian journal of experimental biology.** 36(6): 569-72, 1998.
- Patel, D., et al. "Transdermal drug delivery system: a review", **The Pharma Innovation.** 1(4), 2012.
- Peterkofsky, B. "The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts", **Archives of biochemistry and biophysics.** 152(1): 318-28, 1972.
- Pichayakorn, W., Boonme, P. and Taweeprada, W., editors. "Preparation of Peel-off Mask from Deproteinized Natural Rubber Latex", **Advanced Materials Research Trans Tech Publ.** 2013.
- Pittella, F., et al. "Antioxidant and cytotoxic activities of Centella asiatica (L) Urb", **International journal of molecular sciences.** 10(9): 3713-21, 2009.
- Pointel, J., et al. "Titrated extract of Centella asiatica (TECA) in the treatment of venous insufficiency of the lower limbs", **Angiology.** 38(1): 46-50, 1987.
- Prashanth, K.H. and Tharanathan, R. "Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview", **Trends in food science & technology.** 18(3): 117-31, 2007.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", **Journal of agricultural and food chemistry.** 53(10): 4290-302, 2005.
- Rathke, T.D. and Hudson, S.M. "Review of chitin and chitosan as fiber and film formers", **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews.** 34(3): 375-437, 1994.
- Re, R., et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", **Free radical biology and medicine.** 26(9): 1231-7, 1999.

ເອກສາຮ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Rodríguez-Rodríguez, P., et al. "A simple dot-blot–Sirius red-based assay for collagen quantification", **Analytical and bioanalytical chemistry**. 405(21): 6863-71, 2013.
- Rohatgi, C.V., Dutta, N.K. and Choudhury, N.R. "Separator Membrane from Crosslinked Poly (Vinyl Alcohol) and Poly (Methyl Vinyl Ether-alt-Maleic Anhydride)", **Nanomaterials**. 5(2): 398-414, 2015.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E. "Handbook of pharmaceutical excipients", **Pharmaceutical press**. 2009.
- Shahbazi, M.A., et al. "Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid)-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Enhanced Stability and Cellular Internalization", **Macromolecular rapid communications**. 35(6): 624-9, 2014.
- Shefer, A. and Shefer, S. "Invisible patch for the controlled delivery of cosmetic, dermatological, and pharmaceutical active ingredients onto the skin", **Google Patents**. 2003.
- Shukla, A., Rasik, A.M. and Dhawan, B.N. "Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds", **Phytotherapy Research**. 13(1): 50-4, 1999.
- Shukr, S.S.a.M. "The Influence of the Type and Concentration of Alcohol on the Rheological and Mucoadhesive Properties of Carbopol 940 Hydroalcoholic Gels", **Pelagia Research Library**. 2(6): 161-71, 2011.
- Siani-Rose, M., et al. "Use of cultured three-dimensional tissue for treating congestive heart failure", **Google Patents**. 2007.
- Sies, H. and Stahl, W. "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants", **The American journal of clinical nutrition**. 62(6): 1315S-21S, 1995.
- Srinivasa, P., Ravi, R. and Tharanathan, R. "Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology", **Journal of food engineering**. 80(1): 184-9, 2007.
- Srinivasa, P.C., et al. "Properties and sorption studies of chitosan–polyvinyl alcohol blend films", **Carbohydrate Polymers**. 53(4): 431-8, 2003.
- Sripongkul, J. "Effects of leaf maturity, light intensity and temperature on changing of asiaticoside and quality of Asiatic Pennywort (*Centella asiatica* (L.) Urb.)", **King Mongkut's University of Technology Thonburi. KMUTT Library**. Bangkok: King Mongkut's University of Technology Thonburi. 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Subhasree, B., et al. "Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables", **Food Chemistry.** 115(4): 1213-20, 2009.
- Suguna, L., Sivakumar, P. and Chandrasekaran, G. "Effects of Centella asiatica extract on dermal wound healing in rats", **Indian journal of experimental biology.** 34(12): 1208-11, 1996.
- Suksaeree, J., et al. "Formulation, Physicochemical Characterization, and In Vitro Study of Chitosan/HPMC Blends-Based Herbal Blended Patches", **AAPS PharmSciTech.** 16(1): 171-81, 2015.
- Supkamonseni, N., et al. "Hypolipidemic and hypoglycemic effects of Centella asiatica (L.) extract in vitro and in vivo", **Indian J Exp Biol.** 52(10): 965-71, 2014.
- Tapani, E., et al. "Toxicity of ethanol in low concentrations: experimental evaluation in cell culture", **Acta Radiologica.** 37(6): 923-6, 1996.
- Thailand, D.o.M.S.i.M.o.P.H.o. **Thai Herbal Pharmacopoeia 2004.** Bangkok: Prachachon Co., Ltd; 2004.
- Thaipong, K., et al. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts", **Journal of food composition and analysis.** 19(6): 669-75, 2006.
- Tharanathan, R.N. and Kittur, F.S. "Chitin—the undisputed biomolecule of great potential", 2003.
- Tripathi, S., Mehrotra, G. and Dutta, P. "Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications", **International Journal of Biological Macromolecules.** 45(4): 372-6, 2009.
- Varma, A.J., Deshpande, S.V. and Kennedy, J.F. "Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review", **Carbohydrate Polymers.** 55(1): 77-93, 2004.
- Wijeweera, P., et al. "Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola – (Centella asiatica) extracts and asiaticoside in rat behavioral models", **Phytomedicine.** 13(9–10): 668-76, 2006.
- Zainol, M., et al. "Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centella asiatica (L.) Urban", **Food Chemistry.** 81(4): 575-81, 2003.

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารสกัดบัวบก



ภาพที่ 37 บัวบกสด



ภาพที่ 38 บัวบกแห้ง

2. พัฒนาการวิเคราะห์และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในบัวบก

2.1 Linearity

Asiaticoside	
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area
0	0
50.34	161291
100.69	394055
201.38	724016
302.06	1182540
402.75	1586407

Madecassoside	
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area
0	0
50.50	433869
100.50	1033579
202.00	1832933
303.00	2932268
404.00	3938322

Asiatic acid	
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area
0	0
50.18	380048
100.69	996982
200.70	1848878
301.05	3005999
401.40	4107802

2.2 ความถูกต้อง (Accuracy)

2.3.1 Asiaticoside

Blank				
ครั้งที่	Weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	Mean \pm SD
1	388.55	714091	175.51	176.58 \pm 0.93
2	388.55	720937	177.11	
3	388.55	721089	177.14	

51.25 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	368.49	876354	213.3200	224.93	94.35	93.37 \pm 2.59
2	368.49	878385	213.7933	225.43	95.32	
3	368.49	868198	211.4192	222.93	90.44	

205 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	388.66					97.53 \pm 1.38
2	388.66	1568478	374.6166	374.51	96.55	
3	388.66	1585657	378.6201	378.51	98.50	

410 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	391.35	2248539	533.1021	529.29	86.03	86.71 \pm 2.00
2	391.35	2232770	529.4272	525.64	85.14	
3	391.35	2300552	545.2235	541.32	88.96	

2.3.2 Madecassoside

Blank				
ครั้งที่	Weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	mean \pm SD
1	388.55	1001433	122.1935	124.79 \pm 3
2	388.55	1018296	124.1158	
3	388.55	1053011	128.0733	

50.15 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	368.49	1357944	162.8354	171.70	93.53	99.09 \pm 5.23
2	368.49	1373851	164.6488	174.86	99.84	
3	368.49	1390727	166.5726	176.91	103.91	

200.60 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	388.66					100.07 \pm 2.20
2	388.66	2758676	322.5176	322.43	98.52	
3	388.66	2813341	328.7493	328.66	101.63	

401.20 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	391.35	4217807	488.8572	485.36	89.87	89.55 \pm 1.60
2	391.35	4145002	480.5575	477.12	87.82	
3	391.35	4256892	493.3128	489.78	90.97	

2.3.3 Asiatic acid

Blank				
ครั้งที่	Weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	mean \pm SD
1	388.55	475547	51.9733	52.14 ± 0.59
2	388.55	483227	52.7888	
3	388.55	472517	51.6516	

50.23 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	368.49	785511	84.8852	89.51	74.40	81.36 ± 11.52
2	368.49	788394	85.1913	89.83	75.04	
3	368.49	876389	94.5346	99.68	94.66	

200.90 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	388.66					101.38 ± 4.92
2	388.66	2330188	248.8985	248.83	97.90	
3	388.66	2461847	262.8780	262.80	104.86	

401.80 ($\mu\text{g/mL}$)						
ครั้งที่	weight (mg)	peak area	amount ($\mu\text{g/mL}$)	amount eqi blank	% recovery	Mean \pm SD
1	391.35	4244745	491.9281	488.41	108.58	110.13 ± 2.44
2	391.35	4255024	493.0999	489.57	108.87	
3	391.35	4399698	509.5926	505.95	112.94	

2.3 ความแม่นยำ (Precision)

2.3.1 Asiaticoside

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
49.99	174217	176985	173006	174736	2039.6399	1.167269
199.98	842936	847576	865264	851925	11782.293	1.383019
399.96	1728288	1732382	1755988	1738886	14951.556	0.859835

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 1)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
49.99	218281	218328	217060	217890	718.89661	0.3299
199.98	865906	866529	868563	866999	1389.5403	0.1603
399.96	1717342	1730948	1746397	1731562	14537.239	0.8395

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 2)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
49.99	190985	191276	190874	191045	207.6078	0.1087
199.98	847505	844877	846522	846301	1327.8239	0.1569
399.96	1703101	1715814	1711817	1710244	6500.8337	0.3801

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 3)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
49.99	177991	177840	179445	178425	886.27893	0.4967
199.98	740990	747566	747279	745278	3716.577	0.4987
399.96	1465600	1476323	1474727	1472217	5785.5002	0.3930

2.3.2 Madecassoside

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.42	492872	502022	500236	498376.7	4850.1	0.973179
201.67	2002865	2038864	2069869	2037199	33533	1.646034
403.33	3839941	3832935	3891978	3854951	32256.81	0.836763

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 1)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.42	458118	452040	456876	455678	3211.218	0.7047
201.67	2155751	2177457	2169956	2167721	11024.2	0.5086
403.33	4137202	4070959	4182819	4130327	56246.04	1.3618

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 2)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.42	495037	493116	497285	495146	2086.636	0.4214
201.67	2036673	2051475	2025157	2037768	13193.15	0.6474
403.33	3984801	4034094	4031361	4016752	27704.1	0.6897

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 3)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.42	336684	343678	340401	340254.3	3499.306	1.0284
201.67	1789188	1799720	1798315	1795741	5718.379	0.3184
403.33	3579984	3591595	3589034	3586871	6100.226	0.1701

2.3.3 Asiatic acid

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.18	515797	511977	501547	509773.7	7376.085	1.4469
200.70	2252120	2275140	2314081	2280447	31319.56	1.3734
401.40	4343407	4367555	4380591	4363851	18866.69	0.4323

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 1)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.18	392152	398914	391269	394111.7	4182.311	1.0612
200.70	1974333	1985720	1994666	1984906	10190.89	0.5134
401.40	3779947	3848226	3862724	3830299	44204.54	1.1541

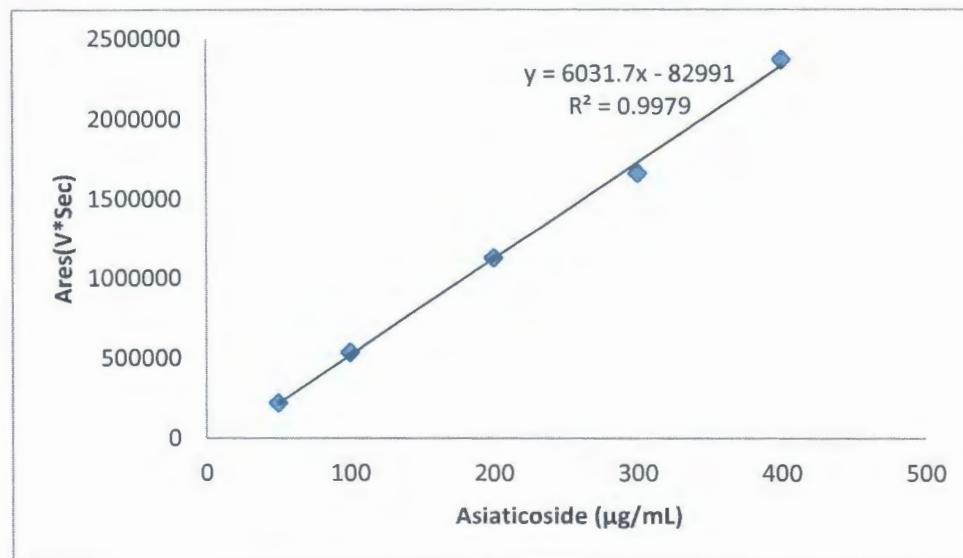
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 2)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.18	396553	397996	396923	397157.3	749.4974	0.1887
200.70	2054762	2041320	2051719	2049267	7048.48	0.3440
401.40	4040589	4140003	4189897	4123496	76010.34	1.8433

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (day 3)					
	ชั่ว 1	ชั่ว 2	ชั่ว 3	mean	SD	%RSD
50.18	312312	315963	319052	315775.7	3373.903	1.0684
200.70	1843393	1859755	1878137	1860428	17381.78	0.9343
401.40	3689000	3766215	3796792	3750669	55552.11	1.4811

3. ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบบัวบกที่ได้จากแหล่ง อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี

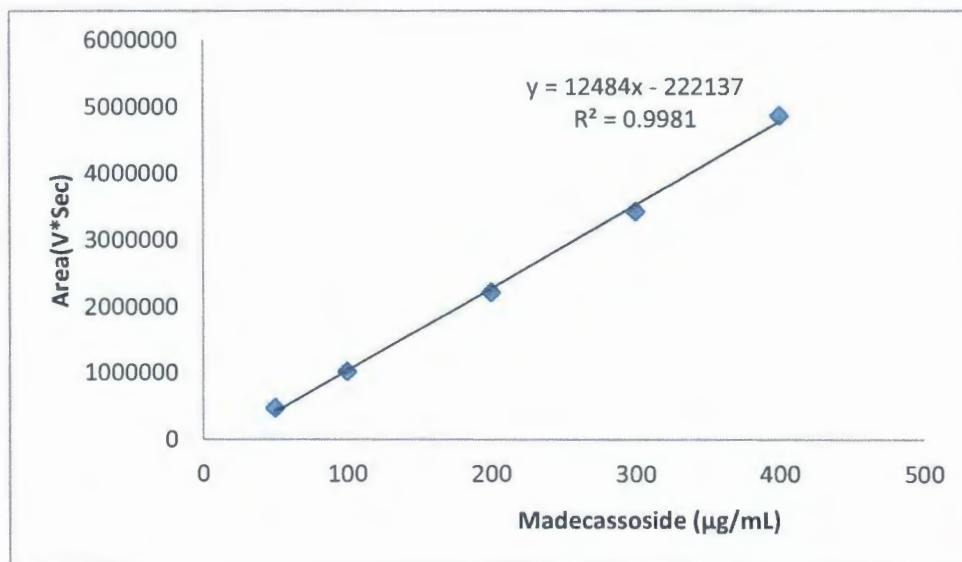
Asiaticoside

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RT	Area (V^*Sec)
49.996	12.064	220352
100.008	12.046	536415
200.000	12.017	1128055
300.008	12.036	1662365
400.000	12.063	2371229
สารสกัดบัวบก 53306	12.048	10967222



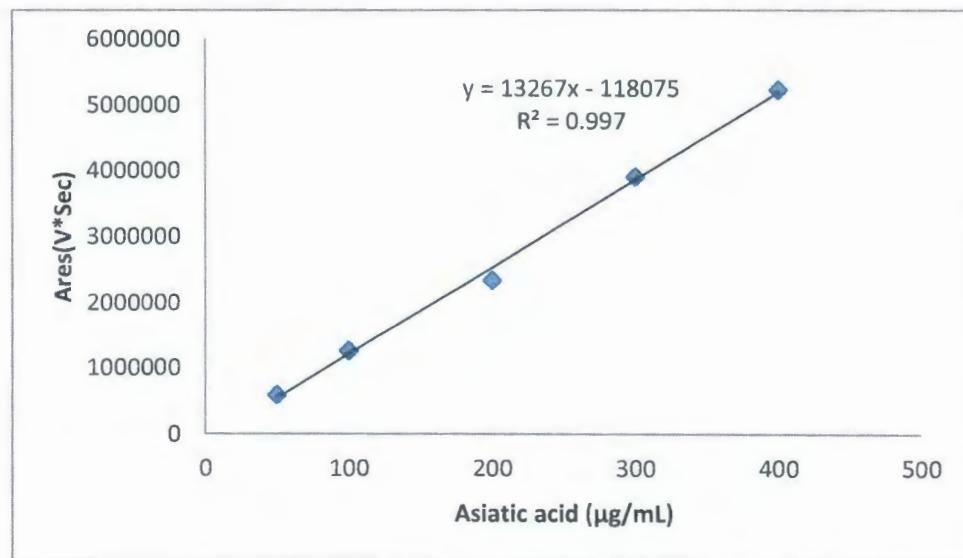
Madecassoside

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RT	Area (V^*Sec)
50.007	17.289	467514
99.997	17.271	1016600
199.993	17.263	2222291
300.006	17.333	3428129
399.986	17.42	4863160
สารสกัดบัวบก 53306	17.26	2551720



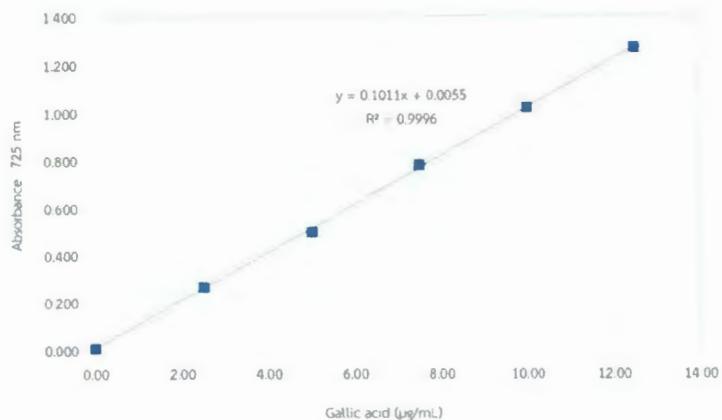
Asiatic acid

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RT	Area (V^*Sec)
50.005	20.954	594652
99.994	20.837	1259016
200.004	20.822	2350291
299.930	20.858	3907805
399.991	20.956	5227721
สารสกัดบัวบก 53306	20.831	1986046



4. ถูกอธิบายต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก

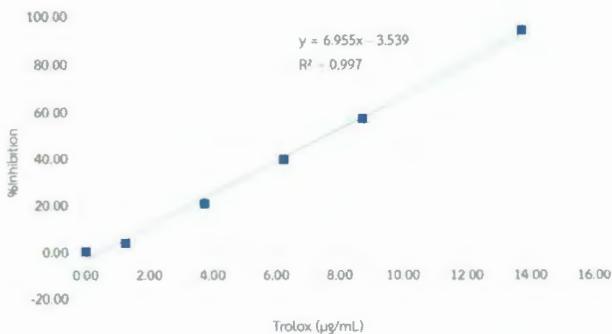
4.1 Phenolic compound



final conc. (µg/ml)	sample (µl)	di-water (µl)	folin solution (µl)	Na ₂ CO ₃ (µl)
0.00	0	1625	125	250
2.50	20	1605	125	250
5.00	40	1585	125	250
7.50	60	1565	125	250
10.00	80	1545	125	250
12.50	100	1525	125	250

Gallic acid (µg/mL)	Absorbance 725 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.00	0	0.008	0.008
2.50	0.255	0.263	0.269
5.00	0.507	0.482	0.502
7.50	0.782	0.768	0.781
10.00	1.006	1.038	1.009
12.50	1.271	1.279	1.248

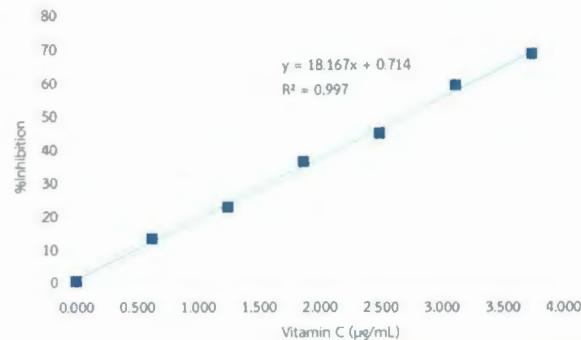
4.2 DPPH



final conc. (µg/ml)	sample (µl)	MeOH (µl)	DPPH (µl)
0.00	H ₂ O =250	250	500
1.25	10	490	500
3.75	30	470	500
6.25	50	450	500
8.75	70	430	500
13.75	110	390	500

Trolox (µg/mL)	Absorbance 725 nm			%Inhibition		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.00	1.503	1.519	1.53	0.92	-0.13	-0.86
1.25	1.475	1.451	1.456	2.77	4.35	4.02
3.75	1.242	1.197	1.183	18.13	21.09	22.02
6.25	0.94	0.919	0.912	38.04	39.42	39.88
8.75	0.684	0.641	0.644	54.91	57.75	57.55
13.75	0.096	0.047	0.081	91.70	95.94	93.00

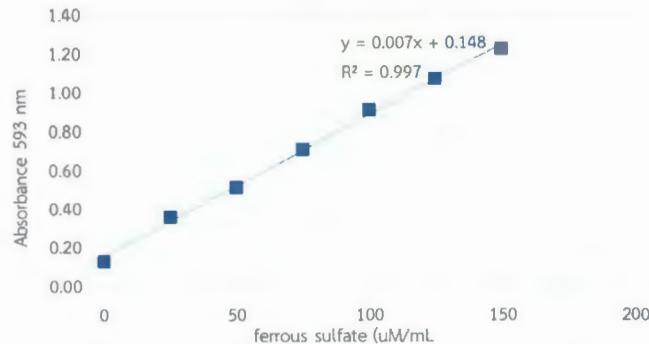
4.3 ABTS



final conc. (µg/ml)	sample (µl)	DI (µl)	ABTS (µl)
0.000	0	60	1000
0.625	5	55	1000
1.250	10	50	1000
1.875	15	45	1000
2.500	20	40	1000
3.125	25	35	1000
3.750	30	30	1000

Vitamin C (µg/mL)	Absorbance 734 nm			%Inhibition		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.000	0.605	0.614	0.61	0.820	-0.656	0.000
0.625	0.525	0.549	0.516	13.934	10.000	15.410
1.250	0.468	0.482	0.469	23.279	20.984	23.115
1.875	0.387	0.385	0.396	36.557	36.885	35.082
2.500	0.341	0.34	0.333	44.098	44.262	45.410
3.125	0.256	0.243	0.252	58.033	60.164	58.689
3.750	0.194	0.191	0.199	68.197	68.689	67.377

4.4 FRAP



final conc. (μM/ml)	sample (μl)	DI (μl)	FRAP (μl)
0	0	120	900
25	5	115	900
50	10	110	900
75	15	105	900
100	20	100	900
125	25	95	900
150	30	90	900

Ferrous sulfate (μM/mL)	Absorbance 593 nm		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.00	0.131	0.12	0.116
25	0.31	0.375	0.372
50	0.5	0.541	0.486
75	0.685	0.701	0.719
100	0.904	0.891	0.912
125	1.044	1.063	1.092

5. ปลดปล่อยสารสำคัญในหลอดทดลองโดยใช้เครื่องมือจำลองการซึมผ่านของผิวน้ำ

Cell ที่ 1

เวลา (min)	RT	Area	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (μg) in 12 mL	Commutation (μg)	% Commutative
5	11.554	110162	13.820	2.764	165.834	3.017
10	11.525	108974	13.604	2.721	163.245	3.021
15	11.524	111698	14.099	2.820	169.182	3.178
20	11.792	362796	59.704	11.941	716.445	13.187
25	11.477	630277	108.285	21.657	1299.415	24.011
30	11.467	619769	106.376	21.275	1276.513	23.989
45	11.484	667841	115.107	57.554	1381.285	26.282
60	11.484	663849	114.382	57.191	1372.584	27.171
120	11.484	1298915	229.725	114.862	2756.698	53.396
180	11.507	1192737	210.440	105.220	2525.285	51.275
360	11.512	1958349	349.493	174.747	4193.921	83.550
720	11.605	2113837	377.734	188.867	4532.804	92.896
1080	11.556	2116162	378.156	189.078	4537.872	96.424
1440	11.581	2778688	498.486	249.243	5981.834	126.138

Cell ที่ 2

เวลา (min)	RT	Area	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (μg) in 12 mL	Commutation (μg)	% Commutative
11.54	108285	13.479	2.696	161.744	161.744	2.94
11.54	111752	14.108	2.822	169.300	171.996	3.13
11.54	214296	32.733	6.547	392.792	398.310	7.25
11.323	362796	59.704	11.941	716.445	728.509	13.26
11.478	621103	106.618	21.324	1279.420	1303.425	23.72
11.466	620567	106.521	21.304	1278.252	1323.580	24.08
11.464	652454	112.312	56.156	1347.749	1414.382	25.73
11.473	659299	113.556	56.778	1362.668	1485.456	27.03
11.468	1114299	196.194	98.097	2354.331	2533.898	46.10
11.491	1170426	206.388	103.194	2476.659	2754.323	50.12
11.515	1969501	351.519	175.759	4218.227	4599.085	83.68
11.519	2045632	365.346	182.673	4384.153	4940.770	89.90
11.559	2171600	388.225	194.112	4658.698	5397.988	98.22
11.616	2179749	389.705	194.852	4676.458	5609.861	102.07

Cell ที่ 3

เวลา (min)	RT	Area	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (μg) in 12 mL	Commutation (μg)	% Commutative
11.535	102733	12.470	2.494	149.643	149.643	2.72
11.543	103767	12.658	2.532	151.897	154.391	2.81
11.533	105051	12.891	2.578	154.695	159.721	2.91
11.509	121617	15.900	3.180	190.800	198.404	3.61
11.461	657207	113.176	22.635	1358.108	1368.892	24.91
11.488	641213	110.271	22.054	1323.250	1356.669	24.68
11.471	645260	111.006	55.503	1332.070	1387.543	25.25
11.477	658684	113.444	56.722	1361.327	1472.303	26.79
11.486	1123691	197.900	98.950	2374.801	2542.499	46.26
11.486	1147203	202.170	101.085	2426.045	2692.693	48.99
11.509	1927639	343.916	171.958	4126.990	4494.723	81.78
11.518	2046825	365.563	182.781	4386.753	4926.444	89.64
11.536	2161534	386.397	193.198	4636.759	5359.232	97.51
11.555	2155826	385.360	192.680	4624.319	5539.990	100.80

Cell ที่ 4

เวลา (min)	RT	Area	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (μg) in 12 mL	Commutation (μg)	% Commutative
11.982	104480	12.788	2.558	153.451	153.451	2.79
11.532	142155	19.630	3.926	235.563	238.120	4.33
11.534	109977	13.786	2.757	165.431	171.915	3.13
11.535	112503	14.245	2.849	170.937	180.177	3.28
11.463	658602	113.429	22.686	1361.149	1373.238	24.99
11.466	653708	112.540	22.508	1350.482	1385.258	25.20
11.466	681816	117.645	58.823	1411.743	1469.027	26.73
11.462	684001	118.042	59.021	1416.505	1532.611	27.89
11.496	1139875	200.839	100.420	2410.074	2585.201	47.04
11.479	1277913	225.910	112.955	2710.925	2986.472	54.34
11.508	1268497	224.200	112.100	2690.403	3078.905	56.02
11.514	2093604	374.059	187.029	4488.707	4989.309	90.78
11.519	2198597	393.128	196.564	4717.537	5405.169	98.35
11.523	2213247	395.789	197.894	4749.467	5633.662	102.50

Cell ที่ 5

เวลา (min)	RT	Area	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (μg) in 12 mL	Commutation (μg)	% Commutative
11.543	109214	13.647	2.729	163.768	163.768	2.98
11.556	147954	20.683	4.137	248.201	250.931	4.57
11.528	105821	13.031	2.606	156.373	163.240	2.97
11.522	112539	14.251	2.850	171.015	180.487	3.28
11.469	639993	110.049	22.010	1320.591	1332.913	24.25
11.478	651330	112.108	22.422	1345.299	1379.632	25.10
11.463	651581	112.154	56.077	1345.846	1402.601	25.52
11.478	664640	114.526	57.263	1374.308	1487.139	27.06
11.47	760302	131.900	65.950	1582.802	1752.896	31.89
11.479	1161781	204.818	102.409	2457.817	2693.861	49.01
11.514	1279330	226.168	113.084	2714.013	3052.466	55.54
11.518	2080819	371.737	185.868	4460.842	4912.379	89.38
11.524	2183244	390.340	195.170	4684.076	5321.481	96.82
11.533	2278593	407.657	203.829	4891.887	5724.462	104.16

6. ความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT)

6.1 สารสกัดบัวบก

Time 1

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย absorbance 540 nm				
	D0	D1	D2	D3	D4
Control	0.363	0.488	0.551	0.572	0.618
DMSO50	0.434	0.563	0.700	0.576	0.646
DMSO100	0.430	0.535	0.578	0.553	0.662
DMSO200	0.413	0.533	0.564	0.541	0.619
DMSO300	0.390	0.514	0.539	0.577	0.728
DMSO400	0.239	0.523	0.559	0.554	0.637
50 ug/ml	0.403	0.550	0.583	0.569	0.678
100 ug/ml	0.398	0.549	0.545	0.539	0.665
200 ug/ml	0.386	0.552	0.553	0.529	0.672
300 ug/ml	0.397	0.554	0.547	0.536	0.667
400 ug/ml	0.383	0.482	0.467	0.502	0.495
Control	0.383	0.501	0.553	0.574	0.648
EtOH50	0.417	0.558	0.592	0.566	0.654
EtOH100	0.419	0.562	0.591	0.576	0.632
EtOH200	0.414	0.568	0.583	0.604	0.623
EtOH300	0.415	0.546	0.543	0.571	0.643
EtOH400	0.398	0.526	0.660	0.532	0.596
50 ug/ml	0.409	0.556	0.555	0.609	0.666
100 ug/ml	0.382	0.537	0.561	0.595	0.632
200 ug/ml	0.401	0.564	0.542	0.545	0.619
300 ug/ml	0.420	0.554	0.539	0.341	0.598
400 ug/ml	0.397	0.484	0.492	0.495	0.612

Time 2

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย absorbance 540 nm				
	D0	D1	D2	D3	D4
Control	0.343	0.374	0.402	0.384	0.356
DMSO50	0.360	0.367	0.399	0.381	0.428
DMSO100	0.351	0.344	0.387	0.381	0.416
DMSO200	0.351	0.336	0.381	0.379	0.410
DMSO300	0.350	0.336	0.379	0.379	0.403
DMSO400	0.343	0.335	0.372	0.377	0.398
50 ug/ml	0.350	0.374	0.416	0.425	0.420
100 ug/ml	0.339	0.365	0.415	0.409	0.405
200 ug/ml	0.350	0.354	0.407	0.383	0.389
300 ug/ml	0.342	0.352	0.402	0.382	0.359
400 ug/ml	0.323	0.349	0.392	0.380	0.358
Control	0.330	0.383	0.437	0.414	0.355
EtOH50	0.353	0.382	0.426	0.428	0.437
EtOH100	0.350	0.351	0.403	0.412	0.435
EtOH200	0.336	0.348	0.392	0.403	0.413
EtOH300	0.351	0.338	0.383	0.393	0.394
EtOH400	0.348	0.330	0.357	0.379	0.393
50 ug/ml	0.332	0.368	0.431	0.413	0.451
100 ug/ml	0.344	0.386	0.422	0.404	0.434
200 ug/ml	0.350	0.362	0.422	0.398	0.420
300 ug/ml	0.345	0.356	0.414	0.391	0.415
400 ug/ml	0.327	0.355	0.406	0.381	0.397

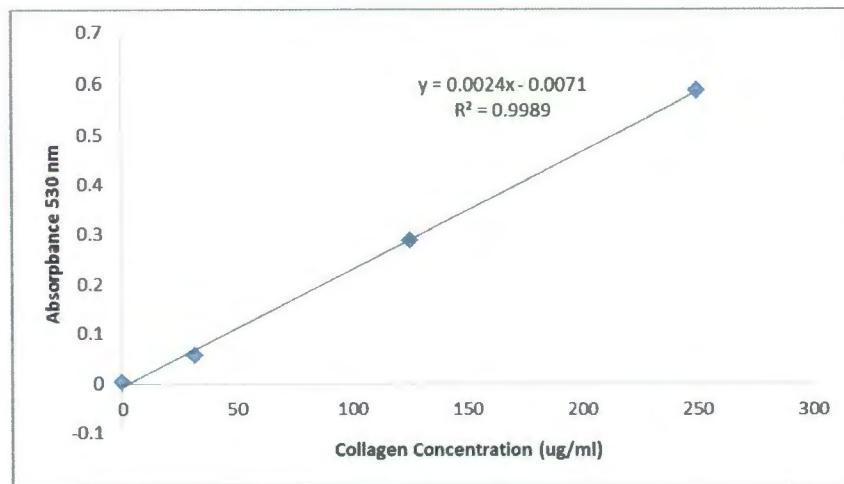
Time 3

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย absorbance 540 nm				
	D0	D1	D2	D3	D4
Control	0.230	0.258	0.285	0.287	0.245
DMSO50	0.214	0.244	0.298	0.295	0.301
DMSO100	0.218	0.239	0.288	0.302	0.310
DMSO200	0.218	0.243	0.291	0.310	0.321
DMSO300	0.229	0.233	0.288	0.314	0.309
DMSO400	0.213	0.229	0.271	0.286	0.278
50 ug/ml	0.215	0.234	0.277	0.286	0.310
100 ug/ml	0.207	0.242	0.279	0.296	0.294
200 ug/ml	0.236	0.253	0.310	0.298	0.300
300 ug/ml	0.292	0.238	0.301	0.325	0.305
400 ug/ml	0.235	0.236	0.307	0.287	0.230
Control	0.230	0.220	0.275	0.255	0.255
EtOH50	0.233	0.241	0.285	0.276	0.292
EtOH100	0.218	0.229	0.275	0.292	0.299
EtOH200	0.223	0.242	0.290	0.291	0.320
EtOH300	0.220	0.228	0.287	0.297	0.302
EtOH400	0.215	0.213	0.278	0.271	0.295
50 ug/ml	0.224	0.228	0.288	0.276	0.298
100 ug/ml	0.219	0.237	0.287	0.299	0.328
200 ug/ml	0.222	0.255	0.308	0.302	0.330
300 ug/ml	0.216	0.245	0.328	0.330	0.313
400 ug/ml	0.201	0.231	0.327	0.288	0.245

**6.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดบัวบกที่ปลดปล่อยออกมานานา
แบบลอกออก (MTT)**

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย absorbance 540 nm	
	D0	D24h
control	0.094	0.081
Asiaticoside 10µM (9.59 µg/mL)	0.087	0.084
Base	0.094	0.071
released Asiaticoside (134.60 µg/mL)	0.081	0.069
released Asiaticoside (67.30 µg/mL)	0.087	0.078
released Asiaticoside (13.46 µg/mL)	0.086	0.082

7. ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน



Collagen standard	
Conc. (μg/mL)	OD 530 nm
0	0.003
31.5	0.056
125	0.287
250	0.584

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคอลลาเจน

ตัวอย่าง	OD 530 nm			Mean	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
control	0.767	0.114	0.061	0.31	0.39
Asiaticoside 10μM (9.59 μg/mL)	1.11	0.36	0.18	0.55	0.50
Base	0.61	0.13	0.12	0.29	0.28
released Asiaticoside (134.60 μg/mL)	1.06	0.27	0.15	0.49	0.50
released Asiaticoside (67.30 μg/mL)	1.00	0.25	0.14	0.46	0.46
released Asiaticoside (13.46 μg/mL)	0.87	0.18	0.13	0.40	0.41

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล นางสาวชนมพูนท เวชชาภุล
วัน เดือน ปีเกิด 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2533
ประวัติการศึกษา ประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลอุบลราชธานี พ.ศ. 2538-2545
 มัธยมศึกษา โรงเรียนเบญจมบพิมพ์มหาราช พ.ศ. 2546-2551
 ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง พ.ศ. 2552-2555
ภูมิลำเนา จังหวัดอุบลราชธานี
 อีเมลล์: chompunut_33@ymail.com
 โทรศัพท์: 0866773244

