ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมล็ดสละเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

นางสาวเสาวลักษณ์ ศรีวรเพชร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Antioxidant Activity of *Salacca* Seed Extracts for Cosmetic Application

Miss Saowalak Sriworaphet

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมล็ดสละเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง
โดย	นางสาวเสาวลักษณ์ ศรีวรเพชร
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จงวิศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เสาวลักษณ์ ศรีวรเพชร : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมล็ดสละเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง (Antioxidant Activity of *Salacca* Seed Extracts for Cosmetic Application) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, 117 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดสละด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลาย สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมีค่าดังนี้ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 ขนาดวัตถุเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร อัตราส่วนตัวทำละลายต่อของแข็ง 1:10 และเวลาในการสกัด 240 นาที ค่าการต้านอนุมูลอิสระมีค่า 505 มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด และปริมาณสารฟีนอลิกรวมมีค่า 12.332 ± 0.51 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด ได้ทำการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion และ Broth dilution ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้สูงสุดต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัดทั้งหมดแสดงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปอด (WI-38) เมื่อวัดด้วยวิธี MTT assay สูตรของเจลบำรุงผิวถูกคัดเลือกมาผสมสารสกัด (ร้อยละ0.5-4 โดยน้ำหนัก) แล้วทำการประเมินลักษณะทางกายภาพและความคงตัว เจลบำรุงผิวมีค่าความเป็นกรด-ด่างและความหนืดอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7 และช่วง 20,000 – 26,000 เซนติพอยด์ ตามลำดับ ความชุ่มชื้นผิวของอาสาสมัครเพิ่มขึ้นจาก 22.8 เปอร์เซ็นต์ เป็น 24.7 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าเจลที่ไม่มีสารสกัด เจลไม่แสดงให้เห็นทั้งการแพ้หรือการระคายเคืองในอาสาสมัคร ระดับเม็ดสีเมลานินและรอยแดงในผิวของอาสาสมัครไม่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่ศึกษา คุณสมบัติทางกายภาพ ประสาทสัมผัส และเคมีอยู่ภายใต้มาตรฐานอุตสาหกรรมเครื่องสำอางไทยและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

5571026921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: SALACCA SEED, EXTRACTION, ANTIOXIDANT, COSMETIC

SAOWALAK SRIWORAPHET: Antioxidant Activity of *Salacca* Seed Extracts for Cosmetic Application. ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL, D.Eng., 117 pp.

In this research work, extraction of the phenolic antioxidants from *Salacca edulis* seed by solvent extraction method was investigated. The optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 60%; particle size of <150 μm; solvent to solid ratio of 1:10 and extraction time of 240 min. Total antioxidant activity was 505 mg Trolox/g crude extract, and total phenolic content was 12.332 ± 0.51 mg gallic acid equivalents/g crude extract. The antibacterial activities of the extracts were determined by disc diffusion and the broth dilution method. The results showed that the ethanolic extracts displayed the highest antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria. All extracts were shown non-cytotoxicity to human lung fibroblast cell line (WI-38) as determined by MTT assay. The formula of skincare gel was selected to incorporate the crude extract (0.5-4% w/w) and then evaluated for physical characteristics and stability. The pH values and viscosity of skincare gel ranged from 6.5 to 7, and 20,000 to 26,000 cPs respectively. The volunteers' skin moisture was significantly increased up to 22.8% and 24.7% more than the gel containing no extract. The gel demonstrated neither allergy nor irritation in volunteers. The melanin and erythem levels in volunteers' skin were not increased during the study period. The physical, sensory and chemical properties of the skincare gel complied with the Thai Industrial Standard and Thai Community Product Standard.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department: Chemical Engineering Student's Signature .....

Field of Study: Chemical Engineering Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือที่ดีจากบุคคลต่างๆ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย และให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเป็นรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา จงวิศาล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กษิดิศ หนูทอง และอาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอขอบคุณเพื่อนๆ และอาสาสมัครทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญรูป ..... ฐ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
1.5 แผนการดำเนินงาน 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 ข้อมูลทั่วไปของสละ 5
2.2 อนุมูลอิสระ 10
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ 11
2.4 สารประกอบฟีนอลิก 12
2.5 การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย 13
2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 18
2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 24
2.8 อิมัลชัน 26
2.9 ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 32
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 35
3.1 อุปกรณ์ 35
3.2 เคมีภัณฑ์ 36
3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 37
3.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ 37
3.5 แหล่งของเมล็ดสละที่ใช้ในการสกัด 38
3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย 38
3.6.1 การเตรียมผงเมล็ดสละ 38
3.6.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย 38
3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteau assay 39
3.6.4 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดสละด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay 39
3.6.5 การศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ 40
3.6.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด 41
3.6.7 วิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดสละ ตามมาตรฐาน AACC (2000) 42
3.6.8 วิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) 43
3.6.9 การศึกษาพัฒนาตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 44
3.6.10 การศึกษาความคงตัวของตำรับครีมแบบเร่งด้วยวิธีHeating and cooling cycle .. 50
3.6.11 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดในตำรับครีม 50
3.6.12 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของตำรับครีม 50
3.6.13 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของตำรับครีม 51
3.6.14 การประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับครีม 51

หน้า

3.6.15 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส 51
3.6.16 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง 52
3.6.17 การประเมินความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนัง 53
บทที่ 4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง 54
4.1 ผลการศึกษาผลการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดสละ ตามมาตรฐาน AACC (2000) 54
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย 54
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดสละ 61
4.4 ผลการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ 65
4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด 67
4.6 ผลการศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละ ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) 73
4.7 ผลการศึกษาพัฒนาตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 73
4.8 ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับเจลแบบเร่งด้วยวิธี Heating and cooling cycle 78
4.9 ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดในตำรับเจล 80
4.10 ผลการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับเจล 83
4.11 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส 84
4.12 ผลการประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง 86
4.13 ผลการประเมินความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนัง 86
4.14 ผลการประเมินการเปลี่ยนแปลงระดับเม็ดสีเมลานิน และรอยแดงของผิวหนัง 87
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 88
5.1 สรุปผลงานวิจัย 88
5.1.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดสละ 88
5.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย 88

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

5.1.3 ผลการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนตั้งตำรับ 88
5.1.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 88
5.1.5 ผลการศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละ 89
5.1.6 ผลการศึกษาพัฒนาตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 89
5.2 ข้อเสนอแนะ 90
รายการอ้างอิง 91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 117

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบลักษณะสายพันธุ์ของสละ 8

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่นิยมใช้ในการสกัด 16

ตารางที่ 2.3 สภาพขั้วของตัวทำละลายบางชนิดที่นิยมใช้ในการสกัด 17

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body loltion 45

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล 47

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 49

ตารางที่ 3.4 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง 52

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของเมล็ดสละ 54

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 62

ตารางที่ 4.3 ผลของชนิดตัวทำละลายเอทานอลต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 63

ตารางที่ 4.4 ผลของขนาดผงเมล็ดสละต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 64

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดในการศึกษาความคงตัว 65

ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดสละ 67

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 69

ตารางที่ 4.8 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion หลังเตรียมเสร็จใหม่ 74

ตารางที่ 4.9 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล หลังเตรียมเสร็จใหม่ 75

ตารางที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวแบบเร่งของครีมสูตรพื้น ด้วยวิธี Heating and cooling cycle 77

ตารางที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 79

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ เทียบกับค่าของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มอก. 152-2555 83

ตารางที่ 4.13 ช่วงอายุของผู้ทำการทดสอบ 84

ตารางที่ 4.14 ผลการประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสของตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ เมื่อใช้ครบ 1 เดือน 85

ตารางที่ 4.15 ผลการประเมินการเกิดอาการระคายเคืองของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 86

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2-1 ลักษณะของผลสละ 5

รูปที่ 2-2 พันธุ์เนินวง 6

รูปที่ 2-3 พันธุ์หม้อ 7

รูปที่ 2-4 พันธุ์สุมาลี 7

รูปที่ 2-5 ลักษณะของเนื้อสละและเมล็ด 9

รูปที่ 2-6 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก 13

รูปที่ 2-7 กระบวนการสกัดสารจากพืช 14

รูปที่ 2-8 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical 22

รูปที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมครีมบำรุงผิวที่ดัดแปลงจาก Hand and body Lotion 46

รูปที่ 3-2 ขั้นตอนการเตรียมเจลบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล 48

รูปที่ 3-3 การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของตำรับครีม 53

รูปที่ 3-4 ตำแหน่งบริเวณใต้ท้องแขนก่อนการทดสอบ 53

รูปที่ 4-1 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบ 56

รูปที่ 4-2 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 56

รูปที่ 4-3 ผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบที่ระยะเวลาต่างๆ 58

รูปที่ 4-4 ผลของความเข้มข้นตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 59

รูปที่ 4-5 ลักษณะของสารสกัดจากเมล็ดสละเข้มข้น 60

รูปที่ 4-6 ผลของขนาดผงเมล็ดสละบดต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบ 60

รูปที่ 4-7 ผลของขนาดผงเมล็ดสละบดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 61

รูปที่ 4-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเมล็ดสละที่การเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4-9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 68

รูปที่ 4-10 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ไลน์ WI-38..... 71

รูปที่ 4-11 การเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ WI-38 ที่อยู่ในสภาวะต่างๆ..... 72

รูปที่ 4-12 ลักษณะของเนื้อครีมพื้นทั้ง 2 สูตร หลังเตรียมเสร็จ 74

รูปที่ 4-13 ลักษณะของเนื้อครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion..... 76

รูปที่ 4-14 ลักษณะของเนื้อครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล 76

รูปที่ 4-15 ลักษณะของเนื้อเจลสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่ความเข้มข้นต่างๆ 78

รูปที่ 4-16 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว 80

รูปที่ 4-17 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว 81

รูปที่ 4-18 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว 81

รูปที่ 4-19 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว 82

รูปที่ 4-20 ผลการเปรียบเทียบการประเมินทางประสาทสัมผัสของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ เมื่อใช้ครั้งแรกกับเมื่อใช้ครบ 1 เดือน..... 85

รูปที่ 4-21 ลักษณะของผิวของอาสาสมัครก่อน (ก) และหลังจากใช้ตำรับเจลบำรุงผิว (ข)..... 87

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติมีแนวโน้มในการเลือกซื้อจากผู้บริโภคเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงและมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับสารสังเคราะห์ที่ได้จากห้องทดลอง มีความสามารถในการบำรุงและปกป้องผิวพรรณ สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และช่วยชะลอการเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ดี นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็งโดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ของพืชผักและผลไม้ จึงมีการส่งเสริมให้เกษตรกรและภาคอุตสาหกรรมนำผลผลิตทางการเกษตร เช่น ผลไม้สดมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ เพื่อเป็นการยืดอายุของผลผลิตและช่วยเก็บรักษาคุณภาพอาหารให้ยาวนานขึ้น ซึ่งเป็นการช่วยลดภาวะผลไม้ล้นตลาดและราคาสินค้าตกต่ำแล้ว ยังเป็นการสร้างรายได้ให้แก่ผู้ประกอบการและเกษตรกรอีกทางหนึ่ง สละเป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่ปลูกมากทางภาคตะวันออกของประเทศไทย เพราะเป็นที่นิยมของผู้บริโภค เนื่องจากมีรสชาติหวานกลมกล่อม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวที่แตกต่างจากผลไม้ชนิดอื่นๆ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน บำรุงสายตา สมอง และมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (นิดดา และ ทวีทอง, 2550) จึงนิยมนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูป ทำให้มีเมล็ดและเปลือกที่ได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปในปริมาณที่สูงขึ้นทุกปี ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะถูกทิ้งเป็นขยะที่เปล่าประโยชน์ มีงานวิจัยจำนวนมากพบว่า ในเมล็ดผลไม้ชนิดต่างๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเมล็ดของผลไม้สูงกว่าในเนื้อผลไม้ (Soong and Barlow, 2004) และในสารสกัดจากสละ มีกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ กรดแกลลิค กรดเฟรูลิก กรดคาเฟอิค กรดคลอโรจีนิก เควอซิทิน และกรดโรสมารินิค (Kanlayavattanakul *et al*., 2013)

ดังนั้นเพื่อให้เกิดการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากเมล็ดสละที่ได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น และเกิดประโยชน์สูงสุดแก่ประชาชน และเกษตรกรผู้ปลูกผลไม้ชนิดนี้ในประเทศ จึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิจัยการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดสละเพื่อให้ใช้ได้อย่างสะดวก และมีประสิทธิภาพ เนื่องด้วยในสารสกัดชนิดนี้มีมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสสระ สามารถนำไปใช้สำหรับชะลอความแก่ หรือลดรอยเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ ในการศึกษานี้จึงจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญ

โดยการแปรผันปัจจัยต่างๆ และศึกษาความคงตัวของสารในการพัฒนาตำรับครีมบำรุงผิว ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นสำหรับการนำไปพัฒนาเชิงอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลาย เพื่อให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง

1.2.2 เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดที่ได้ก่อนการตั้งตำรับเครื่องสำอาง

1.2.3 เพื่อศึกษาการเตรียมตำรับครีมจากสารสกัดเมล็ดสละในการต้านอนุมูลอิสระให้มีคุณสมบัติเหมาะสมและเป็นที่พึงพอใจของผู้ใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดสละ โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ความชื้น และเส้นใย ตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน

1.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลาย โดยการแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

1.3.2.1 ชนิดของตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) และเอทานอล (Ethanol) เมื่อทำการสกัดเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ที่อัตราส่วนเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

1.3.2.2 ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 1.3.2.1 และระยะเวลาในการสกัด โดยแปรผันเป็น 60, 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ระยะเวลา 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง เมื่อทำการสกัดเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ที่อัตราส่วนเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้อง

1.3.2.3 ขนาดเมล็ดสละ โดยแปรผันขนาดเป็นใหญ่กว่า 850, 425-300 และ เล็กกว่า 150 ไมโครเมตร เมื่อทำการสกัดที่อัตราส่วนเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเข้มข้นตัวทำละลายและระยะเวลาที่ได้จากข้อ 1.3.2.2

1.3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติสารสกัดเมล็ดสละ ดังนี้

1.3.3.1 ศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมที่มีในสารสกัด

1.3.3.2 ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดสละ ด้วยวิธี DPPH

1.3.3.3 ศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

1.3.4 ศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยการนำสารสกัดที่เตรียมได้เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่างๆ คือ

1.3.4.1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)

1.3.4.2 ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.4.3 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตู้อบ)

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมตามช่วงเวลา เป็นระยะเวลา 4 เดือน

1.3.5 ศึกษาฤทธิ์ยังยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

1.3.5.1 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละด้วยวิธี Disc diffusion method โดยใช้เชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *B. subtilis*

1.3.5.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

1.3.5.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสละต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

1.3.6 ศึกษาการเตรียมตำรับครีมบำรุงผิวจากสารสกัดเมล็ดสละในการต้านอนุมูลอิสระ

1.3.6.1 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ โดยวิเคราะห์ ลักษณะสีและกลิ่น ความเนียน ความหนืด และการแยกชั้น

1.3.6.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี โดยวิเคราะห์ ความเป็นกรด-ด่าง

1.3.6.3 การประเมินความคงตัวของตำรับครีมแบบเร่ง ด้วยวิธี Heating and cooling cycle

1.3.6.4 การประเมินความคงตัวของสารสกัดในตำรับครีม โดยการนำตำรับครีมที่เตรียมได้เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่างๆ เช่นด้วยกับข้อ 1.3.4 ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลา เป็นเวลา 4 เดือน

1.3.6.5 การประเมินคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัส

1.3.6.6 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

1.3.6.7 การประเมินความชุ่มชื้นและการลดริ้วรอยของผิวหนัง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลพื้นฐานในวิธีการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดสละด้วยตัวทำละลาย เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง

1.4.2 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความคงตัวของสารสกัดเพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับ

1.4.3 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับกับการเตรียมตำรับครีมจากสารสกัดเมล็ดสละที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสสระ มีความคงตัว และเป็นที่พึงพอใจของผู้ใช้

1.4.4 ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์จากเมล็ดสละสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและอาหารเสริม

1.5 แผนการดำเนินงาน

ขั้นตอน	2557-2558									
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1. ศึกษาหัวข้อโครงงานและค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง										
2. เขียนร่างโครงงาน										
3. เตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และ เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง										
4. ทำการทดลอง										
5. วิเคราะห์และสรุปผล										
6. จัดทำโครงงานฉบับสมบูรณ์										

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของสละ

รูปที่ 2-1 ลักษณะของผลสละ

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Salacca edulis*,
ชื่อสามัญ	*Salacca, Zalacca*
ชื่อวงศ์	Palmae or Arecaceae
อันดับ	Arecales
สกุล	*Salacca*
ชื่ออื่น	*Salacca edulis* Reinw., Salak, Snake fruit, สละ (Lim, 2012)
ลักษณะ	ต้นเป็นทรงพุ่ม มีหนามแหลมแข็งออกตามก้านใบ ดอกแยกเพศสีน้ำตาล ออกผลเป็นทะลาย โดยแต่ละทะลายจะมีทะลายย่อยซึ่งเรียกว่า “กระปุก” ลักษณะของผลสละ เป็นรูปทรงรียาว ผลอ่อนเป็นสีน้ำตาล ส่วนผลแก่เป็นสีแดงอมน้ำตาล เปลือกเป็นเกล็ดซ้อนกัน และบนผลมีขนแข็งสั้นคล้ายหนาม แสดงดังรูปที่ 2.1 เป็นผลไม้ที่มีรสชาติหอมหวานและกลิ่นเฉพาะตัว (ฟรินน์.คอม, 2556)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเพาะปลูก	ปลูกได้ดีเกือบทุกสภาพพื้นที่ เป็นพืชที่มีปลูกกันอยู่แล้วในประเทศไทย แต่พื้นที่ที่ปลูกสละมากจะอยู่ในภาคตะวันออก โดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรี เป็นจังหวัดที่ปลูกสละมากที่สุดในประเทศ เจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้รวดเร็ว โดยใช้เวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งออกดอกทะลายแรก จะใช้เวลาประมาณ 2 ปี และถ้ามีการดูแลรักษาอย่างถูกต้องเหมาะสม จะสามารถให้ผลผลิตได้ถึงต้นละ 15 กิโลกรัม (กรมวิชาการเกษตร, 2550)
สรรพคุณของสละ	แก้อาการกระหายน้ำ เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน บรรเทาอาการไอ ใช้เป็นยาขับเสมหะ ช่วยบำรุงสมอง บำรุงสายตา ป้องกันอาการตาบอดตอนกลางคืน บำรุงกระดูกและฟัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยบำรุงและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ บำรุงเลือด ช่วยลดไขมันในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยบรรเทาอาการของโรคท้องร่วง ช่วยในการย่อยอาหาร ลดกรดในกระเพาะ และป้องกันอาการท้องผูก (นิดดา และ ทวีทอง , 2550)

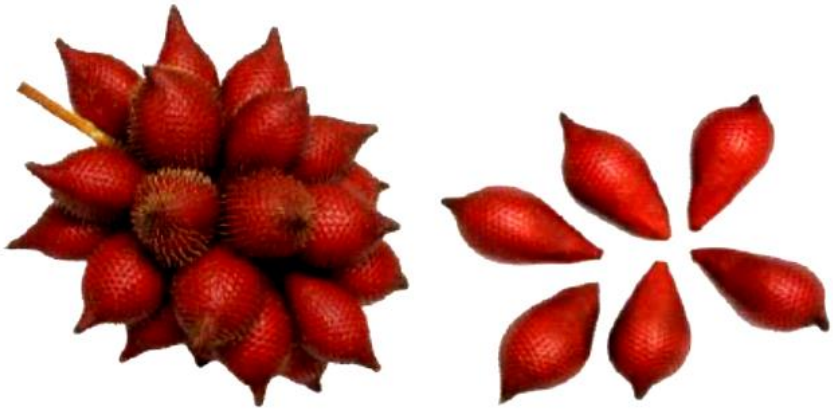
2.1.1 สายพันธุ์สละที่นิยมปลูกในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร (2550) ได้รายงานถึงพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย มีดังนี้

2.1.1.1 พันธุ์เนินวง เป็นพันธุ์สละที่นิยมปลูกมากที่สุด ขนาดตะโพกหรือลำต้นเล็กกว่าระกำ บริเวณกาบใบมีสีน้ำตาลทอง ปลายใบยาว หนามของยอดที่ยังไม่คลี่มีสีขาว ผลมีรูปร่างยาว หัวท้ายเรียวคล้ายกระสวย หนามผลยาว อ่อนนิ่ม ปลายหนามงอนไปทางท้ายผล เนื้อมีสีเหลืองนวลคล้ายน้ำผึ้ง หนานุ่ม รสชาติหวานหรือหวานอมเปรี้ยว รับประทานแล้วรู้สึกชุ่มคอ กลิ่นหอม

รูปที่ 2-2 พันธุ์เนินวง
(มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 22-2556, 2557)

2.1.1.2 พันธุ์หม้อ ขนาดตะโพกหรือลำต้นเล็กและใบมีสีเข้มกว่าพันธุ์เนินวง ข้อทางใบถี่สั้น หนามยาวเล็กและอ่อนกว่าพันธุ์เนินวง ช่อดอกยาว ติดผลง่ายกว่าพันธุ์เนินวง ผลคล้ายระกำ เปลือกผลสีแดงเข้ม เนื้อสีน้ำตาลมีลาย เนื้อหนาแต่ไม่แน่น รสชาติหวาน มีกลิ่นเฉพาะ เมล็ดเล็ก ทนต่อสภาพแสงแดดจัดได้ดีกว่าพันธุ์เนินวง



รูปที่ 2-3 พันธุ์หม้อ
(มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 22-2556, 2557)

2.1.1.3 พันธุ์สุมาลี เป็นพันธุ์ใหม่ ลักษณะลำต้นคล้ายระกำ ทางใบยาวมีสีเขียวอมเหลือง ใบใหญ่กว้างและปลายใบสั้นกว่าพันธุ์เนินวง หนามของยอดอ่อนที่ยังไม่คลี่มีสีส้มอ่อน คานดอกยาวช่อดอกใหญ่ ติดผลง่าย ผลมีรูปร่างป้อมสั้น สีเนื้อคล้ายสละเนินวง เนื้อหนากว่าระกำแต่บางกว่าพันธุ์เนินวง รสชาติหวาน มีกลิ่นเฉพาะ เจริญเติบโตเร็วและทนต่อสภาพแสงแดดจัดได้ดีกว่าพันธุ์เนินวง

รูปที่ 2-4 พันธุ์สุมาลี
(มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 22-2556, 2557)

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบลักษณะสายพันธุ์ของสละ (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

	พันธุ์		
	เนินวง	**หม้อ**	**สุมาลี**
ลำต้นและหนาม	เล็กกว่าระกำ	เล็กกว่า พันธุ์เนินวง	ใหญ่กว่าระกำ
หนามของยอดอ่อน	หนามยังไม่คลี่ มีสีขาว	หนามยาว เล็กและอ่อนกว่าพันธุ์เนินวง	หนามยังไม่คลี่ มีสีส้มอ่อน
ใบ	ทางใบยาว กาบใบมีสีน้ำตาลทองปลายใบยาว	ข้อทางใบสั้น ใบเข้มกว่าพันธุ์เนินวง	ทางใบยาว กาบใบมีสีเหลือง ใบใหญ่กว่าปลายใบสั้นกว่าพันธุ์เนินวง
ดอก	ช่อดอกยาว	ช่อดอกยาว	ช่อดอกยาวใหญ่
รูปร่างผล	ยาว หัวท้ายเรียว คล้ายกระสวย	คล้ายระกำ	ป้อมสั้น
เนื้อ	สีเหลืองนวลคล้ายน้ำผึ้ง เนื้อหนาและแน่น	มีสีน้ำตาล มีลาย เนื้อหนาแต่ไม่แน่น	สีเนื้อคล้ายพันธุ์เนินวง เนื้อหนากว่าระกำแต่บางกว่าพันธุ์เนินวง
เมล็ด	เล็ก	เล็ก	เล็ก
รสชาติ	หวานหรือหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอม	หวาน มีกลิ่นเฉพาะ	หวาน มีกลิ่นเฉพาะ
การเจริญเติบโต	ไม่ทนแดด	ทนแดด	โตเร็ว ทนแดด

รูปที่ 2-5 ลักษณะของเนื้อสละและเมล็ด

สละ นิยมรับประทานในรูปของผลไม้สด หรือในรูปของน้ำผลไม้ แต่ก็มีการนำมาสกัดกลิ่นเพื่อใช้แต่งกลิ่นอาหารหรือเครื่องดื่ม และมีการนำมาแปรรูปเป็นสละลอยแก้ว สละในเยลลี่ เป็นต้น

Aralas และคณะ (2009) ศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อสละที่สายพันธุ์ต่างๆ ใช้เมทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนของของแข็งต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 50 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า สละสายพันธุ์ SS1, SS2, SS3 และ SS4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใกล้เคียงกัน คือ 15.0 ± 0.81, 14.5 ± 0.72, 13.9 ± 0.33 และ 12.6 ± 0.63 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมเนื้อสละแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณกรดแอสคอบิค เท่ากับ 1.28 ± 0.08, 1.05 ± 0.05, 0.73 ± 0.09 และ 0.84 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมเนื้อสละสด ตามลำดับ

Mokhtar และคณะ (2014) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระและกรดอินทรีย์ในผลไม้ 3 ชนิด คือ สละ มะม่วง และมะไฟ (ผลอ่อน ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ และผลสุก) เปรียบเทียบกัน พบว่า สละผลอ่อน, ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ และผลสุก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 381.23 ± 2.52, 274.56 ± 3.21 และ 324.90 ±3.46 มิลลิกรัมแกลลิคต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay (IC_{50}) เท่ากับ 0.57, 2.38 และ 1.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสละยังมีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ คือ กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดออกซาลิก โดยพบว่า สละมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับมะม่วงและมะไฟ

Kanlayavattanakul และคณะ (2013) ศึกษาสารสกัดจากเนื้อสละและประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยสกัดด้วยวิธีการเขย่า ที่ 150 รอบ

ต่อนาที ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เอทิลอะซิเตรต และน้ำ ที่อัตราส่วนของของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 250 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในสารสกัดเนื้อสละมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ กรดแกลลิค กรดเฟรูลิก กรดคาเฟอิค กรดคลอโรจีนิก เควอซิทิน และกรดโรสมารินิค โดยสารสกัดเอทานอลจะให้มีสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด

Shui and Leong (2005) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ในสารสกัดเนื้อสละเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ คือ กรดคลอโรจีนิก แคทีชิน และโพรแอนโทไซยานิดิน

Haruenki และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 217.1 ± 13.2 มิลลิกรัมแกลลิคต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ และประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay เท่ากับ 110.4 ± 7.9 และ 1507.5 ± 70.1 มิลลิโมลโทรล็อกซ์ต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ ตามลำดับ

Gorinstein และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละสายพันธุ์สุมาลีและสายพันธุ์เนินวงเปรียบเทียบกับ พบว่า สละสายพันธุ์สุมาลีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าสายพันธุ์เนินวง โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 8.15 ± 0.4 และ 7.08 ± 0.3 มิลลิกรัมแกลลิคต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay เท่ากับ 11.28 ± 0.5 และ 9.40 ± 0.4 ไมโครโมลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และโดยวิธี ABTS Assay เท่ากับ 20.99 ± 0.9 และ 17.41 ± 0.8 ไมโครโมลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electron) อยู่ในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (Outer orbital) ซึ่งทำให้โมเลกุลหรืออะตอมนั้นไม่เสถียร อนุมูลอิสระจึงเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ (ฐิติกานต์, 2551)

การเกิดอนุมูลอิสระมี ได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

ก. การแตกของพันธะโควาแลนท์แบบโฮโมไลซิส

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\bullet}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$$

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระมีผลทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย ทำให้เกิดเซลล์มะเร็งและเกิดโรคต่างๆ ได้ ผิวหนังของมนุษย์เมื่อถูกอนุมูลอิสระเข้ามาจับกับคอลลาเจน ทำให้คอลลาเจนถูกทำลายส่งผลให้ผิวหนังของมนุษย์ขาดความแข็งแรง แก่ก่อนวัย อนุมูลอิสระสามารถพบได้รอบตัวเรา ได้แก่ แสงแดด ฝุ่นละออง ควันบุหรี่ ควันพิษ สารเคมี เป็นต้น โดยร่างกายของมนุษย์จะมีกลไกในการขจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สาร 2 ชนิด ได้แก เอนไซมและสารที่ไมใช่เอนไซม ซึ่งเอนไซมในร่างกายที่ใช้ ในการกำจัดอนุมูลอิสระมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นจึงต้องรับประทานสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระพวกที่ไมใชเอนไซม ไดแก สารตานอนุมูลอิสระ เข้าไปเพื่อช่วยในการขจัดอนุมูลอิสระ

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย (ฐิติกานต์, 2551) สารต้านอนุมูลอิสระมีมากในพืชผักและผลไม้ เช่น วิตามินซี พบในผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ฝรั่ง มะขามป้อม ส้ม มะนาว สับปะรด วิตามินอีพบในน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น รำละเอียดในพวกธัญพืชที่ไม่ขัดขาว ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ แคโรทีนอยด์พบในผักผลไม้ที่มีสีเหลือง สีส้มแดง เช่น แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง และสารประกอบฟีนอลิกพบได้ในพืชทั่วๆ ไป เช่น ชาเขียว ชาดำ และไวน์แดง (บุหรัน, 2556)

2.3.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งได้เป็น 2 แหล่ง ได้แก่

2.3.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิค (3, 4, 5-hydroxybenzoic acid), BHT (Butylated

hydroxytoluene) และ Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid) นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค

2.3.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ เป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) วิตามินอี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน)

2.3.2 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (ฐิติกานต์, 2551)

2.3.2.1 Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ

2.3.2.2 Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

2.3.2.3 Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

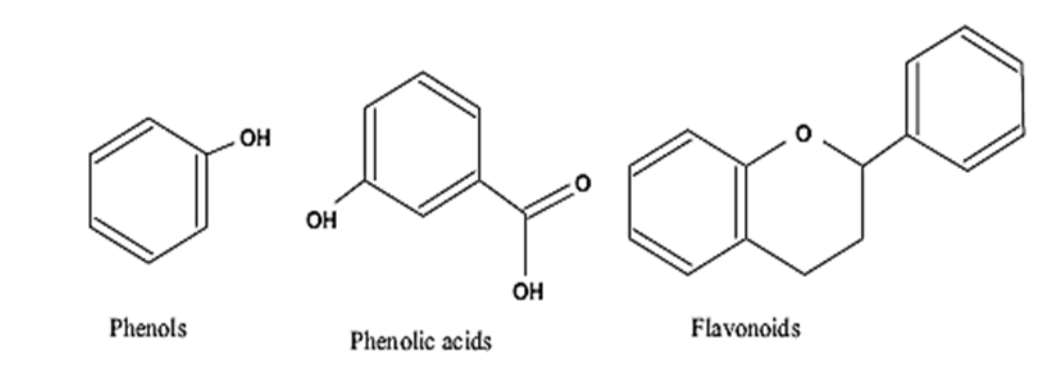
สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งวิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย พบได้มากในพืช ผัก และผลไม้ ได้แก่ ไวน์แดง ชาเขียว และช็อกโกแลต เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น โดยกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ (ปริยานุช, 2551)

โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยโครงสร้างที่ เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่



รูปที่ 2-6 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก
(พิมพ์เพ็ญ, 2556)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่บทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือด

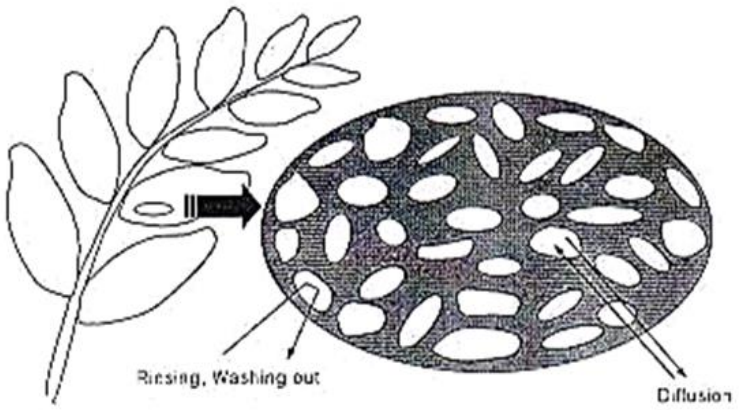
2.5 การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย

การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) คือ กระบวนการถ่ายโอนสารหรือส่วนประกอบจากของแข็งสู่ของเหลวด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลว สามารถแบ่งการสกัดด้วยของเหลวออกเป็น 2 ประเภท คือ การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid - liquid extraction) หรือที่เรียกว่า การชะละลาย (Leaching) และการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid - liquid extraction) การสกัดของแข็งด้วยของเหลวเป็นการใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลวละลายสารที่อยู่ในของแข็งที่ละลายได้ในตัวทำละลาย (Solute) ออกมาจากของผสมที่เป็นของแข็ง ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ เฮกเซน อีเธอร์ เมธิลีนคลอไรด์ คลอโรฟอร์ม อะซีโตน แอลกอฮอล์ และน้ำ

2.5.1 หลักการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช

การแยกสารออกจากพืช โดยทั่วไปจะใช้วิธีการสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลาย โดยสารที่ต้องการสกัดที่อยู่ในของแข็งจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลวออกมา โดยจะเกิดการถ่ายเทมวลขึ้นเนื่องจากการพา (Convection) และการแพร่ (Diffusion) ซึ่งการไหลแบบ Turbulence flow จะทำให้เกิดการแพร่ 2 แบบ คือ การแพร่เชิงโมเลกุล (Molecule diffusion) และการแพร่แบบเอ็ดดี้ (Eddy diffusion) ซึ่งการพา และการแพร่แบบเอ็ดดี้ จะส่งผลต่อการสกัดมากกว่าการแพร่เชิงโมเลกุล แต่เนื่องจากภายในโมเลกุลของแข็งอยู่กระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบการแพร่ของสารที่

เกิดขึ้นภายในโมเลกุลจะเป็นการแพร่แบบสุ่ม (Random Molecular Diffusion) ที่เป็นอิสระจากกัน จะมีผลอย่างมากในขั้นตอนการแพร่ของสารที่สกัดจากของแข็งไปยังตัวทำละลายใหม่ จึงกำหนดให้การแพร่เชิงโมเลกุลในของแข็งเป็นขั้นกำหนดอัตรา (Rate limiting step)



รูปที่ 2-7 กระบวนการสกัดสารจากพืช
(List and Schmidt, 1989)

จากรูปที่ 2.7 ในการกระบวนการสกัดสารจากพืชจะมี 2 กระบวนการที่เกิดขึ้น คือ กระบวนการชะล้างสารที่ถูกสกัดออกจากเซลล์ของพืช และกระบวนการสกัดสารโดยการแพร่ ซึ่งต้องทำให้เซลล์เปียกชุ่มและเต็มไปด้วยตัวทำละลายก่อน ตัวทำละลายจึงจะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปได้ จากงานวิจัยของ List and Schmidt (1989) ได้อธิบายขั้นตอนของการสกัดออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การที่ตัวทำละลายซึมเข้าไปในเซลล์พืชซึ่งทำให้เซลล์เต็มไปด้วยตัวทำละลาย การละลายสารที่สกัดออกมา และการแพร่ของสารที่ละลายออกมาจากเซลล์พืช

2.5.2 กระบวนการสกัดสารจากพืช

การสกัดเอาสารออกจากของแข็งในพืช เพื่อให้ได้สารออกมามากที่สุด จำเป็นต้องมีวิธีการที่เหมาะสม โดยทั่วไปสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.5.2.1 การแช่ (Percolation) คือ การแช่พืชที่ผ่านการบดเป็นผงในตัวทำละลาย และมีการเติมตัวทำละลายใหม่ตลอดเวลา อาจจะทำในภาชนะที่เรียกว่า percolator มีข้อเสียคือ ใช้ตัวทำละลายเป็นจำนวนมากและใช้เวลานาน

2.5.2.2 การเขย่า (Shake) หรือการปั่นกวน (Stir) คือ การนำสารที่ต้องการสกัดมาสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้เครื่องปั่นกวน (Magnetic Stirrer) หรือใช้เครื่องเขย่า (Shaker) โดย

วิธีการนี้เหมาะกับตัวถูกละลายที่ละลายได้ดีกับตัวทำละลาย และเป็นวิธีการสกัดที่นิยม มีความสะดวก และรวดเร็วกว่าแบบแช่ (Percolation)

2.5.2.3 การสกัดแบบหมุนเวียน (Repercolation) คือ การสกัดโดยนำตัวทำละลายกับสารที่ต้องการสกัดมาหมุนเวียนการสกัด โดยที่วิธีนี้จะทำให้ได้สารที่ต้องการมีความเข้มข้นมากกว่าแบบแช่ (Percolation) ยกตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) โดยวิธีการนี้จะเหมาะกับตัวถูกละลายที่มีความสามารถในการละลายต่ำ หรือสารสกัดที่จะสกัดสมบูรณ์ได้ต้องใช้เวลานาน ซึ่งการสกัดแบบนี้จะใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย

2.5.2.4 การสกัดต่อเนื่องแบบสวนทาง (Continuous-Counter current extraction) คือ กระบวนการสกัดโดยใช้วิธีการไหลสวนทางต่อเนื่องเป็นขั้นๆ ในหลายๆ เครื่องสกัด หรืออาจใช้เครื่องสกัดเพียงเครื่องเดียว โดยในการสกัดตัวทำละลายจะทำหน้าที่ละลายตัวถูกละลายทุกชนิดที่อยู่ในของแข็งที่ป้อนเข้ามา และไม่มีการดูดซึมของตัวทำละลายกับของแข็ง ดังนั้น การที่ตัวทำละลายเข้าไปละลายตัวถูกละลายอย่างสมบูรณ์จนสารละลายทั้งสองวัฏภาคมีความเข้มข้นเท่ากัน นั้นคือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในทั้งสองวัฏภาค

2.5.3 หลักการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสม

ในการเลือกตัวทำละลายจะอาศัยหลักเกณฑ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.5.3.1 ตัวทำละลายสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้

2.5.3.2 ตัวทำละลายต้องไม่ละลายสารอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการสกัด

2.5.3.3 ตัวทำละลายต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด

2.5.3.4 ตัวทำละลายต้องแยกออกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่ายและมีจุดเดือดต่ำระเหยได้ง่าย

2.5.3.5 ตัวทำละลายไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก

คุณสมบัติของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่นิยมใช้ในการสกัด (Leela and Satirapipathkul, 2011)

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
แอลกอฮอล์	เมทานอล และเอทานอล เป็นที่นิยมใช้กันมาก เพราะมีความเป็นพิษต่ำ มีอำนาจในการละลายสารกว้างมาก ลดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำ ขจัดออกได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง และยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชได้
น้ำกลั่น	เป็นตัวทำละลายที่สำคัญ ไม่ไวไฟ ไม่เป็นพิษ หาง่าย ราคาถูก และสกัดสารได้หลายชนิด แต่ไม่มีความคงตัวอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ก่อนนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อให้เรียบร้อย
อะซิโตน	เป็นตัวทำละลายที่กำจัดไขมันได้ดีและสามารถละลายสารพื้นฐานในพืชได้บ้าง
อีเทอร์	เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารได้จำกัดชนิด ไม่ละลายสารพื้นฐานชนิดอื่นๆที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อสมุนไพร
คลอโรฟอร์ม	เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายได้ในสารเกือบทุกชนิด แต่มีข้อเสียคือ หากได้รับประทานเข้าไปจะเป็นสารก่อมะเร็ง
เฮกเซน	เหมาะสำหรับสารไม่มีขั้ว และราคาถูก
เอสเทอร์	เป็นตัวทำละลายในการสกัดยาสมุนไพร ทำให้ตัวยาสำคัญเข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์
เมทิลีนคลอไรด์	เกิดอิมัลชัน แต่ทำให้แห้งหรือระเหยได้ยาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.3 สภาพขั้วของตัวทำละลายบางชนิดที่นิยมใช้ในการสกัด (Azmir *et al*., 2013)

ชนิด	จุดเดือด (°C)	สภาพขั้ว	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)	สารที่สกัดได้จากพืช
นอน-โพลาร์				
เฮกเซน	69	2	0.655	อะลิฟาติค ไขมัน เทอร์ปีน เบนซีน
เบนซีน	80	2.3	0.879	ไขมัน
คลอโรฟอร์ม	61	4.8	1.498	เทอร์พีนอยด์ ฟลาโว-นอยด์
ไดคลอโรมีเทน	40	9.1	1.326	เทอร์พีนอยด์
โพลาร์ อะโพรติก				
อะซิโตน	56	21	0.786	ฟลาโวนอยด์
อะซิโตไนไตรล์	82	37	0.786	ไขมัน โปรตีน แคโรทินอยด์
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	189	47	1.092	คาร์โบไฮเดรต ไขมัน
โพลาร์ โพรติก				
เอทานอล	79	24	0.789	แทนนิน ซาปอนิน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล อัลคาลอยด์
เมทานอล	65	33	0.791	แอนโทไซยานิน แทนนิน ซาปอนิน เทอร์พี-นอยด์ ฟลาโวนอยด์
น้ำ	100	80	0.998	โพลีฟีนอล

วีรยุทธ และจิรศักดิ์ (2552) ศึกษาตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ได้รายงานว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้ปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

พิชญ์อร (2546) ศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการสกัด หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่

Ong and Law (2012) ศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดเนื้อสละ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการสกัดหลังจากนั้นจะเริ่มคงที่

ทรงศิริ และคณะ (2552) ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวมในเมล็ดองุ่น พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะสูงมากในช่วงความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง 30 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ผกามาศ และคณะ (2550) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเมล็ดขนุน พบว่า ขนาดของเมล็ดขนุนที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยขนาดของเมล็ดขนุนที่มีขนาดเล็กจะมีปริมาณของสารสกัดที่สูงกว่าขนาดใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่สัมผัสระหว่างเมล็ดขนุนกับตัวทำละลายมีมากขึ้น และในขั้นตอนของการลดขนาดจะช่วยทำลายผนังเซลล์ที่หุ้มสารที่ต้องการสกัดทำให้สารที่ต้องการสกัดเกิดการแพร่สู่ตัวทำละลายได้ง่ายขึ้น ทำให้อัตราการสกัดที่ได้เพิ่มขึ้น

ทศพร (2553) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสมุนไพร พบว่า ขนาดอนุภาคของสมุนไพรมีอิทธิพลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งขนาดอนุภาคเล็กจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าขนาดใหญ่

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity determination) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (บุหรัน, 2556) ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

2.6.1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ เป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ เช่น Shinoda test, Pew test โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

2.6.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทำให้เกิดสี (Colorimetric assay)

เป็นวิธีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และดูสีที่เกิดขึ้น หลังจากการเกิดปฏิกิริยา ตัวอย่างของวิธีนี้ ได้แก่

วิธี Shinoda test

เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (Cyanidins reaction) โดยการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับผงแมกนีเซียมหรือวงแหวนแมกนีเซียม (Magnesium ribbon) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และออกทิลแอลกอฮอล์ (Octyl alcohol) ซึ่งจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาวาโนน (Flavanone) ฟลาวาโนนอล (Flavanonol) หรือแซนโทน (Xanthone)

วิธี Pew test

เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับผงสังกะสี (Zinc dust) และกรดไฮโดรคลอริก ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามีสารฟลาวาโนนอล (Flavanonol) และฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ (Flavonol-3-glycoside) แต่ถ้าเป็นสีจางๆ แสดงว่ามีสารฟลาวาโนน (Flavanone) และฟลาโวนอล (Flavonol)

วิธีการทั้งสองมีข้อดี คือ ทำได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อนและใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่มีข้อเสียคือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ เพราะสารหลายๆ ชนิดอยู่ด้วยกันสีที่เกิดขึ้นสามารถรบกวนกันได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6.1.2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (Mobile phase) กับการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (Adsorbent หรือ Stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลายและความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็ว ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจล และตัวทำละลายหรือตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจมีการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเทต กรดฟอร์มิก คลอโรฟอร์ม สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้ว สามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชาลโคน (Chalcone) และออโรน (Ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อกับไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่างๆ เช่น สารละลายโฟลิน สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบบส์ (Gibbs reagent) และสารละลาย DPPH

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่างสามารถแยกองค์ประกอบต่างๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสีย คือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่างมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้ หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์

2.6.1.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

วิธีการนี้ใช้หลักการคล้ายกับเทคนิคของ TLC โดยเครื่อง HPLC มีส่วนของปั๊มมาช่วยให้ตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) บรรจุเป็นทรงกลมเล็กๆ หรือเรียกว่าคอลัมน์ (Column) โดยสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หรือ Stationary phase ได้แตกต่างกัน คอลัมน์ต่างชนิดกันแยกสารได้แตกต่างกัน ซึ่งสารที่ถูกดูดซับ

ได้น้อยจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาก่อน ส่วนสารที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทีหลังองค์ประกอบอีกส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนตรวจวัดสัญญาณ (Detector) มีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่แยกออกมาแต่ละชนิด ซึ่งสัญญาณที่ตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (Peak) เรียกว่าโครมาโตแกรม (Chromatogram) โดยส่วนตรวจวัดสัญญาณ สามารถตรวจวัดด้วย UV, Fluorescence, IR เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสารแตกต่างกัน การแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่อง HPLC สามารถตรวจหาสารได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณในเวลาเดียวกัน อีกทั้งสามารถหาสารหลายชนิดไปพร้อมๆ กัน ทั้งนี้ต้องมีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันจะมีพีคออกมาในระยะเวลา (Retention time) เดียวกันเสมอ

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ๆ แต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเครื่อง HPLC มีราคาค่อนข้างแพง และเฟสเคลื่อนที่ ต้องใช้ประเภท HPLC grade

2.6.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ หาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสาร ตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น Trolox, Vitamin C และ Ferrous sulfate หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ μM/mg, mM/mg, μM/ml, mM/ml เป็นต้น

2.6.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenylpicryhydrazyl radical scavenging assay, DPPH)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, Diphenylpicryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด โดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จาก การคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่สารตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

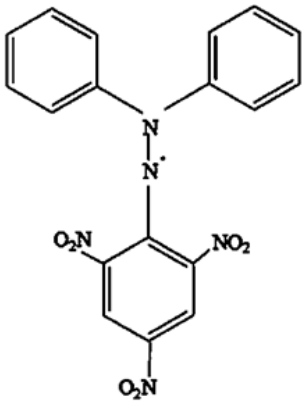
$$DPPH^{\bullet} + \text{AH(antioxidant)} \rightarrow \text{DPPH} - \text{H} + \text{A}^{\bullet}$$

สีม่วง สารต้านอนุมูลอิสระ สีเหลือง

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [\frac{(Ao - As)}{Ao}] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และ

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



รูปที่ 2-8 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical (บุหรัน, 2556)

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ μM/mg

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ $DPPH^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้าจึงทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์ แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2.6.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้

Chulalongkorn University

$$ABTS^{\bullet+} + AH(\text{antioxidant}) \rightarrow ABTS\ (\text{สีจางลง}) + A^{\bullet}$$

จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

2.6.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay, FRAP)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้น สามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต หรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

$$[\mathrm{Fe(III)(TPTZ)_2}]^{3+} \xrightarrow{antioxidant} [\mathrm{Fe(II)(TPTZ)_2}]^{2+}$$

Thumsongmuang (2010) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดลิ้นจี่โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay เปรียบเทียบกัน และ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการวิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธี มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน

2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีการตรวจสอบที่นิยมใช้กับเซลล์เพาะเลี้ยงแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบซึ่งต่างก็เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์หลังการบ่มเซลล์กับสารทดสอบ จากนั้นนำค่าความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารที่ทดสอบ ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ให้ผลยับยั้งความมีชีวิตลดลงเป็นครึ่งหนึ่งจากสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ คือ IC_{50}

2.7.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage)

มีผลให้เซลล์ตายทันที วิธีการวัดความมีชีวิตของเซลล์จะสามารถทำได้รวดเร็วและมักเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับ membrane integrity จึงอาจตรวจความเป็นพิษโดยการบ่มเซลล์กับสารทดสอบในระยะเวลาสั้นๆ แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเป็นการวัดความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนขณะนั้นเท่านั้น จึงไม่สามารถบอกความเป็นพิษที่ส่งผลกระทบต่อความบกพร่องส่วนอื่นของเซลล์ หรือพิษที่เกิดขึ้นภายหลังได้ (Delay cytotoxicity)

2.7.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ต่อเมตาโบลิซึม

มักออกฤทธิ์แสดงความเป็นพิษในช่วงเวลา 2-3 ชั่วโมง หลังการบ่มกับสารทดสอบ เป็นการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ให้ผลชัดเจนกว่าวิธีแรก แต่การตรวจวัดความเป็นพิษจะต้องคำนึงถึงการออกฤทธิ์แบบผันกลับ-ไม่ผันกลับ (reversible-irreversible cytotoxicity) รวมทั้งระยะเวลาในการบ่มกับสารทดสอบด้วยเพื่อให้ครอบคลุมการออกฤทธิ์ของสาร แล้ววัดกิจกรรมเมตาโบลิซึมของเซลล์ เช่น การวัดความสามารถเจริญของเซลล์โดย plating efficiency หรือการวัดปริมาณ ATP เป็นต้น

2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.7.3.1 ประเภทของเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้เป็นแบบตรวจสอบการเป็นพิษควรเลือกให้เหมาะสมต่อการศึกษา โดยทั่วไปมักใช้เซลล์ไลน์ต่างๆ ส่วนการตรวจสอบความเป็นพิษที่มีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ Differentiation ของเซลล์จะใช้เซลล์ปฐมภูมิโดยเซลล์ที่ใช้ควรมีความแข็งแรงและมีระยะการเจริญอยู่ในช่วง Log phase เพื่อให้ผลการตรวจสอบไม่มีความบกพร่องที่เกิดจากเซลล์เองมาเกี่ยวข้อง

2.7.3.2 ความเข้มข้นและความเสถียรของสารทดสอบ

สารทดสอบไม่ควรตกตะกอนหรือทำปฏิกิริยาเคมีกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่เสียสภาพ ที่สภาวะและระยะเวลาบ่มที่ใช้ทดสอบ มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงเหมาะสมและเซลล์สามารถสัมผัสกับสารได้ สารทดสอบที่ต้องละลายในตัวทำละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ควรใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ และควรใช้ปริมาณน้อย นอกจากนี้ควรมี negative control ที่มีตัวทำละลายอย่างเดียว เพื่อระบุความปลอดภัยจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวทำละลายนั้นๆ

2.7.3.3 ความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

ความหนาแน่นของเซลล์ในช่วงเวลาที่เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบอาจมีผลต่อการตอบสนองฤทธิ์ยา เช่น Hela cell มีความไวต่อ Alkylating agent ลดลงเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง ระยะเวลาการหยุดทดสอบควรเหมาะสมเพื่อที่จะให้ผลการทดสอบที่ชัดเจน แต่ควรครอบคลุมระยะเวลาที่สารสามารถออกฤทธิ์ นอกจากนี้เซลล์ที่ทดสอบควรอยู่ในระยะที่ตอบสนองต่อสารทดสอบได้

2.8 อิมัลชัน

อิมัลชัน (Emulsion) หมายถึง ระบบที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด แบ่งเป็น 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายใน และวัฏภาคภายนอก จะไม่กระจายตัวเข้าหากัน และไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน การที่จะทำให้ทั้งสองวัฏภาคกระจายตัวเข้าหากันจนเป็นเนื้อเดียวต้องอาศัยสารก่ออิมัลชัน (Emulsifier)

2.8.1 การแบ่งชนิดของอิมัลชัน

การแบ่งชนิดของอิมัลชัน อาจแบ่งได้หลายลักษณะ คือ

2.8.1.1 แบ่งตามลักษณะภายนอกที่มองเห็น แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.1.1.1 แมคโครอิมัลชัน (Macroemulsion) เป็นอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคค่อนข้างใหญ่ เป็นไมโครเมตร ทำให้มีลักษณะขาวขุ่น อิมัลชันชนิดนี้พบมากที่สุดทั้งในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.8.1.1.2 ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กมากๆ เป็นนาโนเมตร ทำให้มีลักษณะโปร่งแสง มองไม่เห็นหยดของวัฏภาคภายใน

2.8.1.2 แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.1.2.1. Conventional emulsions เป็นอิมัลชันทั่วไป แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.8.1.2.1.1 Oil in water emulsion (O/W) น้ำมันเป็นวัฏภาคภายใน น้ำเป็นเป็นวัฏภาคภายนอก จึงมีความเหนียวเหนอะหนะน้อย กระจายตัวดีเวลาทา ล้างออกได้ง่าย เป็นที่นิยมมากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีม โลชั่นทาผิว ครีมทาหน้า ครีมกันแดด

2.8.1.2.1.2 Water in oil emulsion (W/O) โดยน้ำเป็นวัฏภาคภายใน น้ำมันเป็นเป็นวัฏภาคภายนอก เวลาล้างน้ำออกยาก จึงไม่ค่อยนิยม พบอิมัลชันชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมล้างหน้า ครีมทากลางคืน ครีมนวดหน้า

2.8.1.2.2. Multiple emulsions เป็นอิมัลชันที่มีการกระจายตัวของของเหลวทั้ง 2 ชนิดซ้อนกัน แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.1.2.2.1 Water in oil in water emulsion (W/O/W) คือ ระบบที่มีการกระจายตัวของ Water in oil emulsion (W/O) ในวัฏภาคน้ำ

2.8.1.2.2.2 Oil in water in oil emulsion (O/W/O) คือ ระบบที่มีการกระจายตัวของ Oil in water emulsion (O/W) ในวัฏภาคน้ำมัน

2.8.1.3 แบ่งตามความหนืด แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.8.1.3.1 โลชั่น (Lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ (เหลว) เพราะมีวัฏภาคภายในปริมาณที่สูง มักมีไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นได้ทั้ง O/W หรือ W/O โลชั่นเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทาผิว เพราะทาแล้วมีความชุ่มชื้น ไม่เหนอะหนะ ดูดซึมดี ให้ความรู้สึกสบาย และล้างออกได้ง่าย

2.8.1.3.2 ครีม (Cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง (ลักษณะกึ่งแข็ง) เพราะมีส่วนประกอบของสารพวกไขแข็ง (Waxes) และไขมัน (Fatty acid or Fatty alcohol) ช่วยเพิ่มความหนืดและเนื้อครีมที่ผสมอยู่กับน้ำมัน (Oils) ในวัฏภาคน้ำมัน ครีมมีความหนืดมากกว่าโลชั่น เพราะมีวัฏภาคภายในสูงกว่า คือประมาณ 35-75 เปอร์เซ็นต์

2.8.2 ส่วนประกอบของอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบอิมัลชัน มีส่วนประกอบสำคัญหลักๆ 3 ส่วน คือ

2.8.2.1 วัฏภาคน้ำ (Water phase) ได้แก่น้ำ หรือสารต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ เช่น สารเพิ่มความหนืด (Acacia, Veegum, Methylcellulose, Carbopol) สารฮิวเมกแตนต์ (Glycerin, Propylene glycol หรือ Glycol ทั้งหลาย) สารกันเสีย (Methylparaben, Sodium benzoate) สารลดแรงตึงผิว (Tween, Sodium lauryl sulfate) สีที่ละลายน้ำ สารต้านออกซิเดชั่น (Sodium metabisulfite) อาจเป็นสารออกฤทธิ์อื่นที่ละลายน้ำได้ เช่น Cetyl pyridinium chloride, Benzalkonium chloride เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้ อาจเติมลงในวัฏภาคน้ำได้ทั้งหมด แล้วแต่ส่วนประกอบของสูตรในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

2.8.2.2 วัฏภาคน้ำมัน (Oil phase) ได้แก่ น้ำมันต่างๆ (Olive oil, Mineral oil, Castor oil) ไขมัน (Stearyl alcohol, Stearic acid, Cetyl alcohol, Lanolin) ไขแข็ง (Bee wax, Paraffin wax, Carnauba wax) สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารกันหืน เช่น BHT, BHA สารลดแรงตึงผิว (Span, Emulgin C 1000) หรือ สารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น ฮอร์โมน วิตามิน เป็นต้น แล้วแต่ส่วนประกอบในสูตรของผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทเช่นกัน

2.8.2.3 สารก่ออิมัลชัน (Emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว (Tween, Span, Sodium lauryl sulfate) คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ (Acacia, Gelatin) ของแข็งอนุภาคละเอียด (Bentonite, Colloidal magnesium aluminium silicate) ตัวก่ออิมัลชัน เป็นตัวสำคัญในการผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

2.9 ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

ผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิวที่อยู่ในรูปครีม โลชั่น น้ำมัน เจล และโฟม หมายถึง ผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ทาผิวกายหรือผิวหน้าเพื่อบำรุงผิวให้อ่อนนุ่มและชุ่มชื้นขึ้น (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2555b) อาจผสมสมุนไพรอยู่ในรูปครีม ของเหลวข้น หรือของเหลว (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547)

เครื่องสำอาง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่มุ่งหมายสำหรับใช้ทา ถู นวด โรย พ่น หยอด ใส่ อบ หรือกระทำด้วยวิธีอื่นใดต่อส่วนหนึ่งส่วนใดของร่างกายเพื่อความสะอาด ความสวยงาม หรือส่งเสริมให้เกิดความสวยงามและรวมตลอดทั้งเครื่องประทินผิวต่างๆ ด้วย เช่น แชมพู สบู่ แป้งฝุ่นโรยตัว (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2555a)

2.9.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความคงตัวของตำรับครีม

ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของตำรับครีม (นงเยาว์, 2547) มีดังนี้

2.9.1.1 ตัวก่ออิมัลชัน

การเลือกใช้สารชนิดใดเพื่อเป็นตัวก่ออิมัลชันต้องคำนึงถึงคุณสมบัติ และปริมาณที่ใช้ เพราะมีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน ถ้าเลือกอย่างไม่เหมาะสม หรือขาดการศึกษาถึงคุณสมบัติของตัวทำอิมัลชันที่ใช้ อาจทำให้อิมัลชันไม่คงสภาพได้ การเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน พบว่าการใช้ตัวทำอิมัลชันหลายชนิดร่วมกันจะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวกว่าการใช้ชนิดเดียว อิมัลชันอาจเป็นสารลดแรงตึงผิวทั้งคู่ เช่น Tween กับ Spans หรือโซเดียมสเตียเรต (Sodium stearate) กับโคเรสเตอรอล

(Cholesterol) เป็นต้น หรืออาจใช้ตัวช่วยก่ออิมัลชันร่วมกับตัวก่ออิมัลชัน เช่น โซเดียมลอริลซัลเฟต (Sodium laurylsulfate) กับ กลีเซอริลโมโนสเตียเรต (Glyceryl monosterarate) เป็นต้น

2.9.1.2 การตั้งสูตรตำรับครีม

ส่วนผสมในสูตรต้องเหมาะสม และไม่กระทบต่อคุณสมบัติของตัวก่ออิมัลชัน สภาวะความเป็นกรด-ด่างในตำรับ มีผลกระทบต่อความคงสภาพของตัวก่ออิมัลชัน นอกจากนี้ตัวก่ออิมัลชันชนิดไม่มีประจุบางชนิดอาจเกิดสารเชิงซ้อนกับสารกันเสียกลุ่มพาราเบนทำให้อิมัลชันไม่คงตัว ทำให้ฤทธิ์ของสารกันเสียลดลง

2.9.1.3 เทคนิคการผสม

เครื่องมือที่ใช้ผสมมีผลต่อรูปแบบการไหล (Flow pattern) ของของเหลว ถ้าเครื่องผสมทำให้เกิดการไหลวน (Turbulent flow) จะทำให้การผสมเข้ากันดีที่สุด ส่งผลให้อิมัลชันมีความคงตัว นอกจากนี้ความเร็วในการผสมก็มีความสำคัญ ถ้าใช้อัตราเร็วสูง หยดวัฏภาคภายในเกิดการกระจายตัวละเอียดเล็กมากทำให้อิมัลชันคงตัว

2.9.1.4 อุณหภูมิที่ใช้ผสม

อุณหภูมิที่ใช้ผสมควรมีอุณหภูมิเท่ากัน หรือใกล้เคียง โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตอิมัลชันอยู่ที่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิต่ำกว่านี้วัฏภาคน้ำมันอาจจะหลอมเหลวไม่หมด แต่ถ้าสูงเกินไป เช่น สูงกว่า 85 องศาเซลเซียส อาจทำให้ตัวก่ออิมัลชันบางชนิดเกิดไฮโดรไลซิส หรือเปลี่ยนสีได้

2.9.1.5 เวลาที่ใช้ในการผสม

เวลาที่ใช้ในการผสมจะต้องมากพอที่จะทำให้สารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในทั้งสองวัฏภาคอยู่ในสภาพสมดุล ซึ่งจะทำให้อิมัลชันคงตัวมากขึ้น ถ้าใช้เวลาในการผสมน้อยไปอาจทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการเคลื่อนย้ายของวัฏภาคหนึ่งไปอีกวัฏภาคหนึ่ง ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพ และความคงตัวของอิมัลชันเปลี่ยนไป

2.9.1.6 อัตราเร็วในการทำให้เย็นตัว

การทำให้อิมัลชันเย็นตัวลงเร็วเกินไปจะเกิดการตกผลึกของสารพวกขี้ผึ้ง (Waxes) และไขมัน (Fats) ทั้งหลาย ทำให้อิมัลชันที่ได้เนื้อหยาบ และความหนืดเปลี่ยนไปได้

2.9.2 การประเมินคุณภาพของตำรับครีม

การประเมินคุณภาพของตำรับครีม เป็นการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับและเชื่อถือได้จริง (เสาวนีย์ และ หทัยชนก, 2549) ซึ่งมีวิธีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (Laboratory test) เพื่อเป็นการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เบื้องต้น โดยแบ่งวิธีการทดสอบได้ดังนี้

2.9.2.1 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี เพื่อหาปริมาณตัวยาสำคัญ สารกันบูด เป็นต้น

2.9.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพเคมี เช่น ความหนืด ความเป็นกรด-ด่าง คุณสมบัติการไหล

2.9.2.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เช่นการแยกชั้น การตกตะกอน

2.9.2.4 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

2.9.2.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น ความเนียนของเนื้อครีม การกระจายตัว การซึมซาบสู่ผิวเวลาทา เป็นต้น

2.9.3 การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์

การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีการทดสอบที่มีความสำคัญมากเพราะผลิตภัณฑ์อาจเสื่อมคุณภาพไปจากเดิมก่อนถึงผู้บริโภค เนื่องจากสภาพแวดล้อมในการขนส่ง การรอจำหน่ายเป็นระยะเวลานานๆ ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการแยกชั้น ตกตะกอน เปลี่ยนสี และกลิ่น จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาความคงสภาพในด้านต่างๆ เช่น ความคงสภาพทางเคมีของตัวยาสำคัญ การเปลี่ยนแปลงความหนืด การตกตะกอน การแยกชั้น การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (พิมพร, 2532) โดยทดสอบด้วยการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่งหรือสองปี ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบค่อนข้างนาน จึงมีการทดสอบแบบเร่งเพื่อให้ระยะเวลาในการทดสอบเร็วขึ้น เช่นการทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง เช่น Heating cooling cycle และ freeze and thaw cycle

2.9.4 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง เป็นการทดสอบว่าผลิตภัณฑ์เป็นอันตรายหรือมีผลเสียต่อร่างกายหรือไม่ เช่น การทดสอบการแพ้ หรือการระคายเคือง โดยการทำ Patch Test โดยเป็นการทดสอบที่สำคัญเพราะ สารลดแรงตึงผิว หรือน้ำหอมบางชนิดอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อร่างกาย

2.9.5 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

เป็นการศึกษาคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยการใช้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีการนี้จะใช้วัดความพึงพอใจของผู้ที่ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีทดสอบเชิงพรรณนา เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความละเอียดของเนื้อครีม ความง่ายในการทาผิว การซึมเข้าสู่ผิว ความเหนียวเหนอะหนะ ความชุ่มชื้นผิว และความนุ่มเนียนผิว

Schwartz (1975) ได้ทำการทดสอบเชิงพรรณนา โดยใช้วิธีการ Texture profile analysis โดยแบ่งคุณลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงเริ่มเทครีม ช่วงที่ทาครีม และช่วงที่ทาทิ้งไว้ ดังนี้

1. ช่วงเริ่มเทครีม หมายถึง ช่วงที่ผลิตเคลื่อนที่จากภาชนะบรรจุมาสู่มือ โดยให้คำจำกัดความ ดังนี้

- Thickness คือ ผลิตภัณฑ์มีความหนาแน่นโดยสังเกตได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งได้ดังนี้ เหลว (Thin) ปานกลาง (Medium) หนืด (Thick)

- Consistency คือ ความยากในการป้ายครีมขึ้นมาจากภาชนะ โดยแบ่งได้ดังนี้ บางเบา (Light) ปานกลาง (Medium) หนัก (Heavy)

2. ช่วงที่ทาครีม หมายถึง การใช้นิ้วมือลูบไล้ผิวเป็นวงกลม โดยใช้อัตราเร็วในการทาครีม 2 ครั้งต่อนาที โดยให้คำจำกัดความ ดังนี้

- Spreadability หมายถึง ความง่ายในการเคลื่อนที่ของผลิตภัณฑ์จากจุดที่เริ่มทาจนทั่วบริเวณ โดยแบ่งได้ดังนี้ กระจายได้ง่ายมาก (Slips) กระจายได้ง่ายพอสมควร (Glides) กระจายได้ยาก (Drags)

- Absorbency หมายถึง อัตราการซึมซาบเข้าสู่ผิว สามารถทราบได้จากการสัมผัสหรือการสังเกต โดยแบ่งได้ดังนี้ ช้า (Slow) ปานกลาง (Medium) เร็ว (Fast)

3. ช่วงที่ทาทิ้งไว้ หมายถึง ช่วงที่ทำการประเมินค่าจากผิวหนังภายนอกโดยใช้นิ้วมือสายตา และการสัมผัสทันทีหลังจากผลิตภัณฑ์ออกฤทธิ์ หรือมีความรู้สึกว่าแทรกซึมเข้าสู่ผิวแล้ว โดยให้คำจำกัดความ ดังนี้

After feel หมายถึง ความรู้สึกของผลิตภัณฑ์ที่เหลือค้างอยู่บนผิวหรือความรู้สึกที่เปลี่ยนแปลงไปของผิว โดยแบ่งได้ดังนี้

- ความรู้สึกของผลิตภัณฑ์ที่เหลือค้างอยู่บนผิว เช่น เกิดฟิล์ม (เป็นมัน (Oily) หรือลื่น (Greasy)) เคลือบผิว (คล้ายขี้ผึ้ง (Waxy) หรือแห้ง (Dry)) ซึ่งจะบอกเป็นปริมาณเล็กน้อย (Slight) ปานกลาง (Moderate) มาก (Large)

- ความรู้สึกที่ผิวสามารถบอกได้เป็น 3 แบบ ดังนี้ แห้ง (Dry) เช่น ตึง (Taut) ดึงดูด (Pulled) รัดแน่น (Tight) เปียก (Moist) เช่น นุ่ม (Supple) ยืดหยุ่น (Pliant) และเป็นมัน (Oily) เช่น เหนอะหนะ (Dirty) เหนียวติด (Clogged)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Soong and Barlow (2004) ได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากเมล็ดผลไม้ชนิดต่างๆ คือ มะม่วง มะขาม ลำไย อโวคาโด และขนุน โดยสกัดด้วยวิธี Soxhlet เมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราส่วนของของแข็งต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 250 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ในเมล็ดของผลไม้ตัวอย่างจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าในเนื้อผลไม้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดในเมล็ดมะม่วง เมล็ดมะขาม เมล็ดอโวคาโด เมล็ดลำไยและเมล็ดขนุน มีค่าเท่ากับ 117± 13.5, 94.5 ± 4.9, 88.2± 2.2 , 62.6 ± 3.2 และ27.7 ± 3.4 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัดหยาบ

วรรณพิชญ์ และคณะ (2553) ศึกษาการสกัดพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดขนุน เมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราส่วนเมล็ดขนุนต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 8, 1 ต่อ 10 และ 1 ต่อ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ การสกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเมล็ดขนุนต่อตัวทำละลายที่ 1 ต่อ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ค่าผลได้สารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด คือ 35.0 เปอร์เซ็นต์ และ 16 มิลลิกรัมแกลลิคต่อกรัมเมล็ดขนุนแห้ง ตามลำดับ ส่วนการเพิ่มเวลาเป็น 2 ชั่วโมง มีผลทำให้เกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก

วันเซ็ง และ ดวงฤดี (2554) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว เมื่อให้ผงเปลือกบดแห้งที่ร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 355 ไมครอน ใช้เอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนเมล็ดมะขามต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 5 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวมีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 0.22-1.08 ไมโครกรัมแกลลิคต่อไมโครกรัมสารสกัด ฤทธิ์การ

ยับยั้งสาร DPPH อยู่ในช่วง 40-97 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ไพรวรรณ์ (2550) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้ เมื่อใช้เมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนเมล็ดมะขามต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 2 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้เป็นปฏิภาคโดยตรงกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Aralas และคณะ (2009) ศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อสละที่สายพันธุ์ต่างๆ ใช้เมทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนของของแข็งต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 50 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า สละสายพันธุ์ SS1, SS2, SS3 และ SS4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใกล้เคียงกัน คือ 15.0 ± 0.81, 14.5 ± 0.72, 13.9 ± 0.33 และ 12.6 ± 0.63 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมเนื้อสละแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณกรดแอสคอบิค เท่ากับ 1.28 ± 0.08, 1.05 ± 0.05, 0.73 ± 0.09 และ 0.84 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมเนื้อสละสด ตามลำดับ

Mokhtar และคณะ (2014) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระและกรดอินทรีย์ในผลไม้ 3 ชนิด คือ สละ มะม่วง และมะไฟ (ผลอ่อน ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ และผลสุก) เปรียบเทียบกัน พบว่า สละผลอ่อน ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ และผลสุกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 381.23 ± 2.52, 274.56 ± 3.21 และ 324.90 ±3.46 มิลลิกรัมแกลลิคต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay (IC_{50}) เท่ากับ 0.57, 2.38 และ 1.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสละยังมีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ คือ กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดออกซาลิก โดยพบว่า สละมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับมะม่วงและมะไฟ

Kanlayavattanakul และคณะ (2013) ศึกษาสารสกัดจากเนื้อสละและประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยสกัดด้วยวิธีการเขย่า ที่ 150 รอบต่อนาที ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เอทิลอะซิเตรต และน้ำที่อัตราส่วนของของแข็งต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 250 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในสารสกัดเนื้อสละมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ กรดแกลลิค กรดเฟรูลิก กรดคาเฟอิค กรดคลอโรจีนิก เควอซิทิน และกรดโรสมารินิค โดยสารสกัดเอทานอลจะให้มีสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด

Shui and Leong (2005) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ในสารสกัดเนื้อสละเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ คือ กรดคลอโรจีนิก แคทีชิน โพรแอนโทไซยานิดิน

Haruenki และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 217.1 ± 13.2 มิลลิกรัมแกลลิคต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ และประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay เท่ากับ 110.4 ±7.9 และ 1507.5 ± 70.1 มิลลิโมลโทรล็อกซ์ต่อร้อยกรัมเนื้อผลไม้ ตามลำดับ

Gorinstein และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสละสายพันธุ์สุมาลีและสายพันธุ์เนินวงเปรียบเทียบกับ พบว่า สละสายพันธุ์สุมาลีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าสายพันธุ์เนินวง โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 8.15 ± 0.4 และ 7.08 ± 0.3 มิลลิกรัมแกลลิคต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay เท่ากับ 11.28 ± 0.5 และ 9.40 ± 0.4 ไมโครโมลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และโดยวิธี ABTS Assay เท่ากับ 20.99 ± 0.9 และ 17.41 ± 0.8 ไมโครโมลโทรล็อกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร Whatman

3.1.2 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump) A-3S Tokyo Rikakikai co.,Ltd., Japan

3.1.3 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) C-MAG HS 7, IKA, Germany

3.1.4 เครื่องเขย่าตะแกรงร่อน (Sieve Shaker) Analysette 3 Spartan, Fritsch, Germany

3.1.5 เครื่องเขย่าสารละลาย (Incubator shaker) Innova 4000, New Brunswick,

3.1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง Mettler Toledo, Switzerland

3.1.7 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo, Switzerland

3.1.8 เครื่องบด (Disc Mill) T-100,Kawasaki, Japan

3.1.9 เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer), T-18Basic, IKA

3.1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan

3.1.11 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) MP220, Mettler Toledo, Switzerland

3.1.12 เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) Brookfield DV-II+ Pro, USA

3.1.13 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) Votex-Genie 2, Scientific Industries Inc., USA.

3.1.14 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) RV 10 digital, IKA, Germany

3.1.15 ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator) Sanyo, Japan

3.1.16 ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator) Sanyo, Japan

3.1.17 เตาอบ (Hot Air Oven) ULM 500, Memmert, Germany

3.1.18 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.1.19 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.20 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.1.21 ไมโครเพลท

3.1.22 ลูกแก้วกันเดือด

3.1.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) Memmert, Germany

3.1.24 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.1.25 ขวดแก้วสีชา

3.1.26 ตลับครีม

3.1.27 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 กรดแกลลิค (Gallic Acid) Sigma-Aldrich, China

3.2.2 กรดแทนนิค (Tannic acid) Sigma-Aldrich, Germany

3.2.3 กรดบอริก (Boric Acid, H_3BO_3) Merck, USA

3.2.4 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric Acid, H_2SO_4) Merck, USA

3.2.5 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl) Quality Reagent Chemical, New Zealand

3.2.6 กลีเซอรอลมอนอสเตียเรต (Glycerol monosterate) บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด

3.2.7 กลีเซอรีน (Glycerine) บริษัท สินไทย จำกัด

3.2.8 คอปเปอร์ซัลเฟต (Coppersulphate $CuSO_4$) Ajax Finechem, New Zealand

3.2.9 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) Ajax Finechem, Australia

3.2.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH) Ajax Finechem, Australia

3.2.11 โทรล็อกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) Sigma-Aldrich, Germany

3.2.12 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI)

3.2.13 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether) Quality Reagent Chemical, New Zealand

3.2.14 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.15 โพพิลีนไกลคอล (Propylene glycol) บริษัท สินไทย จำกัด

3.2.16 ฟอลิน ซิโอแคลตูรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu) Carlo Erba Reactifs SA, France

3.2.17 เมทานอล (Methanol) 99.9 % May & Baker, British

3.2.18 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) May & Baker, British

3.2.19 เอทานอล (Ethanol) 95% ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย

3.2.20 เอทานอล (Ethanol) 99.9% May & Baker, British

3.2.21 เฮกเซน (Hexane) May & Baker, British

3.2.22 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Sigma-Aldrich, Germany

3.2.23 Acetylated-lanolin alcohol บริษัท สินไทย จำกัด

3.2.24 Carbopol 940 บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด

3.2.25 Cetyl acohol บริษัท สินไทย จำกัด

3.2.26 Dimethicone บริษัท สินไทย จำกัด

3.2.27 Methyl paraben บริษัท วันรัต (หน่ำเซียน) จำกัด

3.2.28 Triethanolamine บริษัท สินไทย จำกัด

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

3.3.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช. วว) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช. วว) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3.3 *Escherichia coli* ATCC 25922 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช. วว) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.4.1 เซลล์ปอดของมนุษย์ (WI-38 human diploid lung fibroblasts)

3.5 แหล่งของเมล็ดสละที่ใช้ในการสกัด

3.5.1 เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี ที่ได้จากโรงงานสละลอยแก้วตรานายสะละ จังหวัดจันทบุรี (เดือนกรกฎาคม 2557)

3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การเตรียมผงเมล็ดสละ

นำเมล็ดสละที่ได้ มาล้างน้ำและตากแดดเป็นเวลา 1 วัน และจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบด (Disc Mill) และทำการแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน 3 ขนาด คือ

1. ขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร
2. ขนาดระหว่าง 300 - 425 ไมโครเมตร
3. ขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร

หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ก่อนนำมาทดลองในขั้นต่อไป

3.6.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย

3.6.2.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลาย

ชั่งผงเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ที่อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเฮกเซน นำไปเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ เช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) เก็บสารสกัดในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.6.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลาย

ชั่งผงเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 60, 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) ที่ระยะเวลาในการสกัด

คือ 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) เก็บสารสกัดในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

3.6.2.3 ศึกษาขนาดผงเมล็ดสละบด

ชั่งผงเมล็ดสละขนาดต่างๆ ที่ได้จากข้อ 3.6.1 อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร สกัดด้วยตัวทำละลายที่ความเข้มข้นและระยะในการสกัดที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2.2 จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) เก็บสารสกัดในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteau assay

เป็นการวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds) โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธี Folin Ciocalteau micro method (Waterhouse, 2002) โดยนำตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร และเติม Folin ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปผสมเข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไปผสมเข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ได้

3.6.4 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดสละด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยดัดแปลงวิธีการของ Yamasaki และคณะ (1994) โดยใช้สารละลายมาตรฐานคือ โทรล็อกซ์ (Trolox) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย DPPH 2.4 มิลลิกรัมกรัม ในเอทานอลเข้มข้น 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มา

100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร โดยใช้แบลงค์ (blank) เป็นตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 100 ไมโครลิตร และใช้สารละลายควบคุม (control) เป็นเอทานอล 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร และสารละลายควบคุมแบลงค์ (blank control) เป็นเอทานอล 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังจากนั้นทำการคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) โดยสูตร ดังนี้คือ

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - \frac{A_{sample} - A_{sampleblank}}{A_{control}}] \times 100$$

โดย A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่เติมสารละลาย DPPH

$A_{sample\ blank}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ไม่เติมDPPH

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารDPPHที่ไม่เติมสารตัวอย่าง

แล้วนำไปทำ linear regression เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) และคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยแสดงผลเป็น Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) หน่วยเป็น มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด

3.6.5 การศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ

นำสารสกัดที่เตรียมได้ เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 4 เดือน คือ

1. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)
2. ที่อุณหภูมิห้อง
3. ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตู้อบ)

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลา คือ วันที่ 0, 15, 30, 60, 90 และ 120 เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดโดยการสังเกตสีและกลิ่น และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัด

3.6.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

3.6.6.1 การทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method

ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มเชื้อพอเปียกแล้ว swab เชื้อลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาวางบนจานเพาะเชื้อโดยทำการทดลองซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองโดยดูลักษณะและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.6.6.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัด

นำเชื้อแบคทีเรียที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากเชื้อ จนมีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 Mc farland และเตรียม 2-fold serial dilution โดยนำหลอดทดลองขนาดเล็กมา 10 หลอด ใช้ปิเปตดูดอาหาร TSB ใส่ในหลอดที่ 2 จนถึงหลอดที่ 10 ปริมาณหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารสกัด ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดที่ 2 ให้สารสกัดกับอาหาร TSB รวมตัวกัน จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารในหลอดที่ 2 ไปใส่ในหลอดที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอด และทำเจือจางต่อไปจนถึงหลอดที่ 9 จากนั้น ใช้ปิเปตดูดสารจากหลอดที่ 9 ทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 10 จะเป็นหลอดที่มีเฉพาะอาหาร TSB เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง หลอดที่ 1 ถึง 10 หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลจากความขุ่นของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง ความเข้มข้นของหลอดทดลองสุดท้ายที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

3.6.6.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ในการทดสอบความเป็นพิษจะใช้เซลล์ชนิด WI-38 ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Modified Eagles Medium (MEM) โดยทำการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้น 10^4 เซลล์ ต่อ 1 well plate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 ถึง 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปรับความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์) เติมลงใน well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาสารละลายใน well plate ออกและเติม 0.04 N HCl-isopropanol และเขย่าให้ผลึก Formazan ละลายได้ดี ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.6.7 วิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดสละ ตามมาตรฐาน AACC (2000)

3.6.7.1 ปริมาณความชื้น

อบภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่างพร้อมฝาในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ชั่งตัวอย่างผงเมล็ดสละให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2-3 กรัม ลงในภาชนะใส่ตัวอย่าง นำไปใส่ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยเปิดฝาภาชนะไว้ เมื่อครบเวลาแล้วนำออกจากตู้อบ ปิดฝาภาชนะและนำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทันที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปชั่ง คำนวณหาปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

3.6.7.2 ปริมาณโปรตีน

ชั่งผงเมล็ดสละ 1 กรัม ใส่ลงไปในหลอดย่อย ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัม รวมทั้งเม็ดลูกแก้วกันเดือด 2 เม็ด) และเติมกรดซัลฟิวริกประมาณ 20-25 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดเครื่องย่อยจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น เป็น 3 เท่าของกรด นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่น แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 35 จนสารละลายในหลอดย่อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล รองรับสิ่งกลั่นด้วยขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยกลั่นประมาณ 5 นาที นำไปไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งได้สารละลายสีเทา บันทึกปริมาณกรดที่ใช้ แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของไนโตรเจน

3.6.7.3 ปริมาณไขมัน

อบถ้วยสำหรับการทดลองในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนไว้ จากนั้นชั่งผงเมล็ดสละ 2 กรัม บนกระดาษและห่อให้มิดชิด บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนแล้วใส่ลงใน Extraction thimble แล้วเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในถ้วย และนำเข้าไปในเครื่องวิเคราะห์

ไขมัน ทำการสกัดเป็นเวลา 20 นาที และทำการชะล้างเป็นเวลา 45 นาที นำถ้วยไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป ทิ้งถ้วยให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) และนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณไขมัน

3.6.7.4 ปริมาณเส้นใย

ชั่งผงเมล็ดสละ 3 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.255 นอร์มอล ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ทำการสกัดเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วหยด anti-forming (n-Octanol) 2-3 หยดลงในคอลัมน์ ทำการดูดสารละลายออกจากคอลัมน์ และเปิดก๊อกน้ำเพื่อให้เกิดสุญญากาศ จากนั้นทำการดูดจนกรดซัลฟิวริกหมดจากคอลัมน์ เติมน้ำกลั่นเดือดเพื่อล้างกรดให้หมด เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.313 นอร์มอล ปริมาณ 200 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดแบบสุญญากาศจนโซเดียมไฮดรอกไซด์หมดจากคอลัมน์ เติมเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้หมด นำเบ้า (Crucible) ที่มีตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยกรดและเบสไปอบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จนน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

3.6.7.5 ปริมาณเถ้า

เผาเบ้า (Crucible) ในเตา Muffle furnace ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) และชั่งน้ำหนัก จากนั้นชั่งผงเมล็ดสละ 5 กรัม ใส่ลงในเบ้าแล้วนำไปเผาในเตา Muffle furnace ด้วยไฟอ่อน ๆ ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกว่าได้เถ้าเป็นสีเทา นำเบ้าออกมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณเถ้า

3.6.7.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยคำนวณจากผลต่าง คือ

ร้อยละคาร์โบไฮเดรต = 100 - (ร้อยละโปรตีน + ร้อยละไขมัน + ร้อยละเถ้า + ร้อยละเส้นใย)

3.6.8 วิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดสละ ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานต่างๆ คือ กรดแทนนิค (Tannic acid) และกรดแกลลิค (Gallic acid) โดยนำตัวอย่างสารสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้น

นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแทนนิค และกรดแกลลิค โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิค และกรดแกลลิค ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้สารละลายผสมระหว่าง Acetonitrile และ Orthophosphoric acid 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในน้ำ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร

3.6.9 การศึกษาพัฒนาตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

3.6.9.1 การคัดเลือกครีมบำรุงผิวสูตรพื้น

ทำการคัดเลือกครีมบำรุงผิวสูตรพื้น 2 สูตรเปรียบเทียบกัน คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999) และสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) โดยการทดสอบความคงตัวของครีมแบบเร่ง ด้วยวิธี Heating and cooling cycle แล้วประเมินลักษณะเนื้อครีมโดยการสังเกตดูลักษณะปรากฏ เช่น การแยกชั้น การเกิดฟองอากาศ ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด แล้วทำการคัดเลือกครีมบำรุงผิวสูตรพื้นที่มีความคงตัวดีที่สุดมาพัฒนาเป็นตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละต่อไป โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

3.6.9.1.1 สูตรครีมบำรุงผิวที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999)

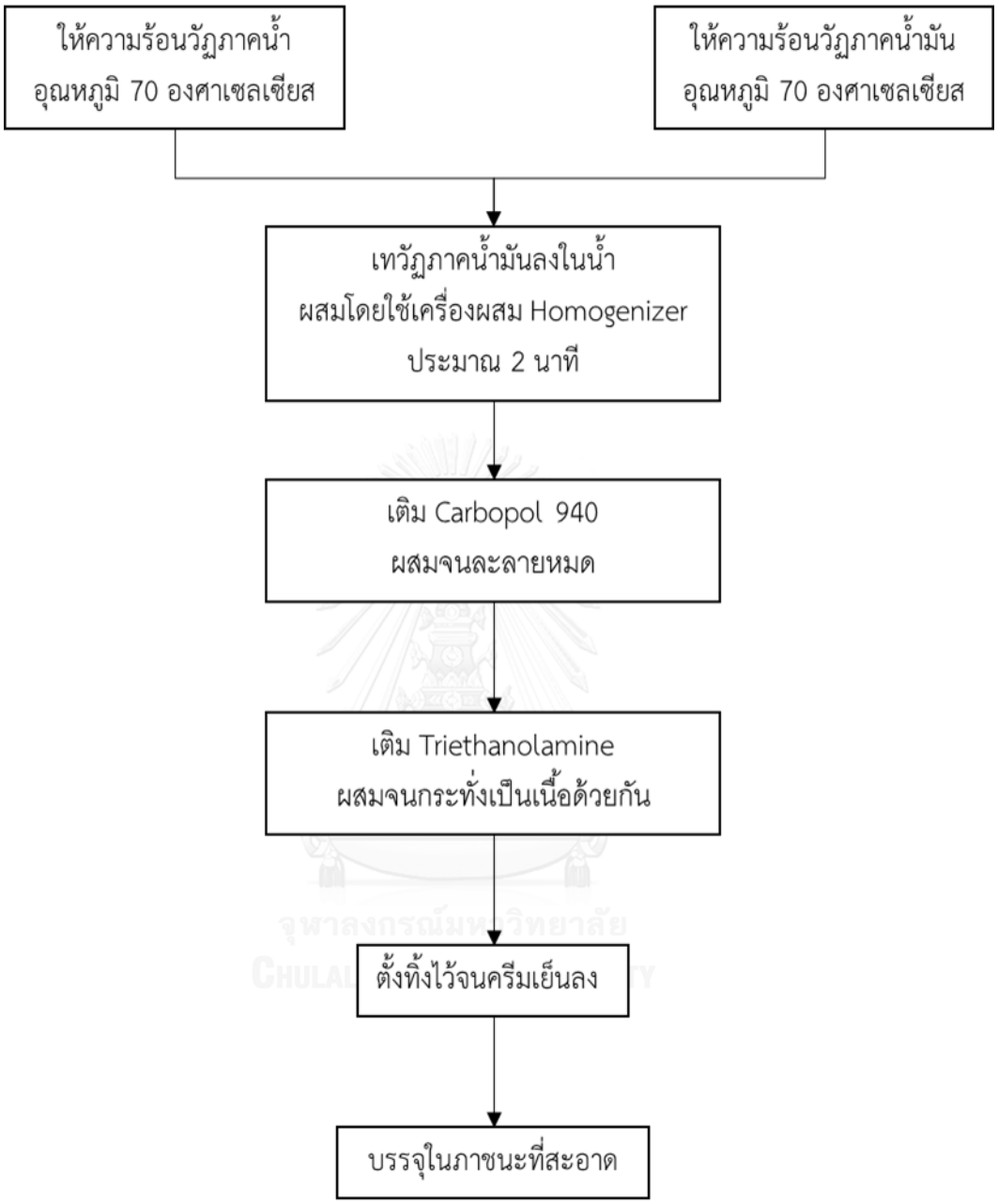
ทำการเตรียมครีมบำรุงผิวตามสูตรดังแสดงในตารางที่ 3.1

ขั้นตอนการเตรียม คือ ทำการชั่งสารในส่วนที่เป็นวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน แยกไว้ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีอุณหภูมิคงที่ หลังจากนั้นเติมสารส่วนของวัฏภาคน้ำมันลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารของวัฏภาคน้ำ โดยผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Homogenizer และเติม Carbopol 940 ลงไปผสม เมื่อ Carbopol 940 ละลายหมดแล้ว เติม Triethanolamine ลงไปผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้จนครีมเย็นลง จึงนำมาบรรจุในภาชนะที่สะอาด ดังรูปที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body loltion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999)

วัฏภาค	องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์	หน้าที่ในเครื่องสำอาง
Water phase	Deionized water	91.6	ตัวทำละลาย
	Carbopol 940	0.1	สร้างเนื้อสัมผัส
	Propylene glycol	0.8	เพิ่มความชุ่มชื้น
	Glycerine	5.0	เพิ่มความชุ่มชื้น
	Methyl paraben	0.2	สารกันเสีย
Oil phase	Glycerol monosterate	1.1	สารลดแรงตึงผิว
	Cetylacetate/Acetylated-lanolin alcohol (Acetulan)	0.5	เพิ่มความชุ่มชื้น
	Cetyl alcohol	0.2	ตัวก่ออิมัลชัน
	Dimethicone	0.5	ช่วยการกระจายตัว
	Triethanolamine	0.5	ปรับpH ทำให้เกิดเนื้อครีม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมครีมบำรุงผิวที่ดัดแปลงจาก Hand and body Lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999)

3.6.9.1.2 สูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557)

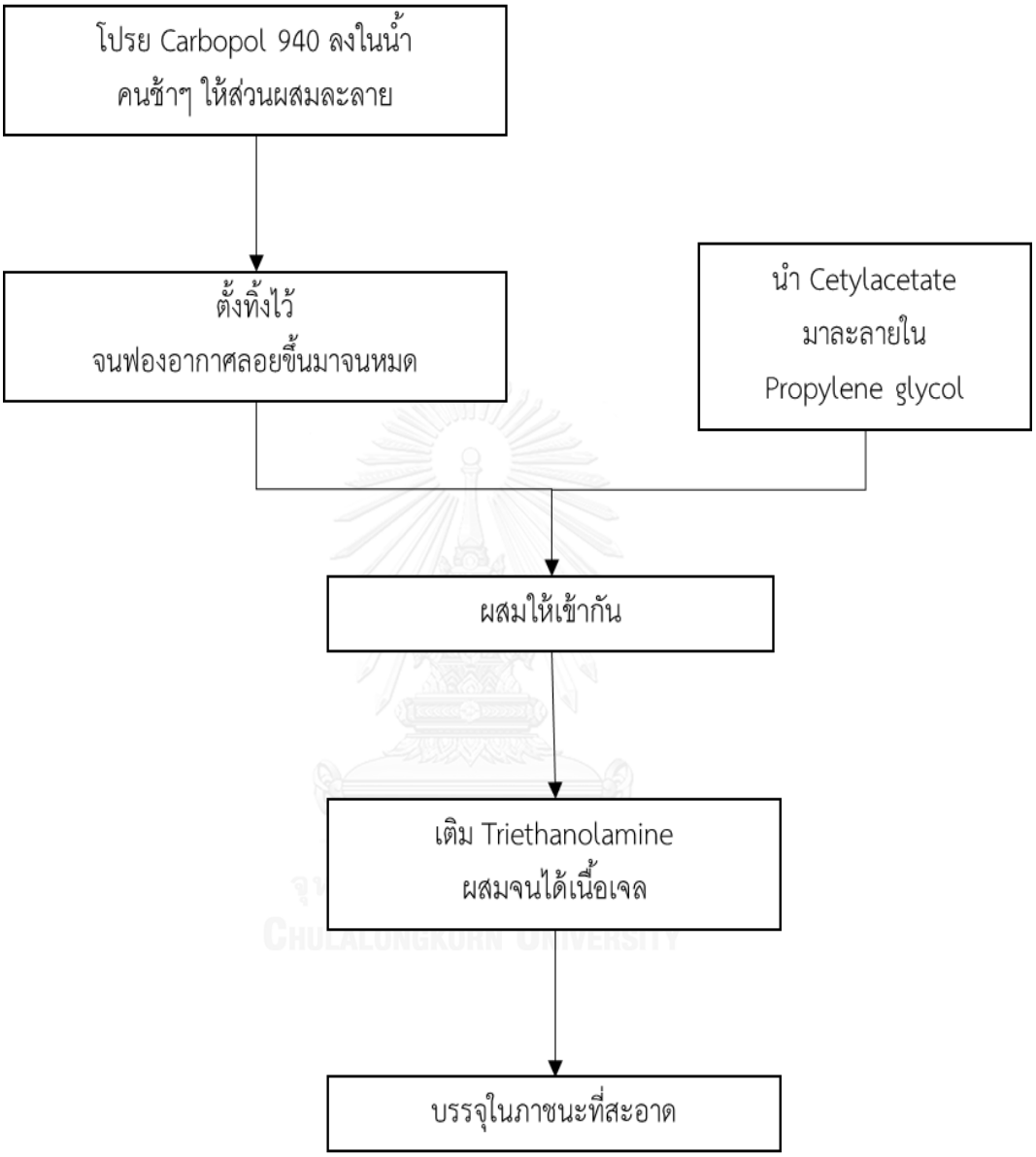
ทำการเตรียมเจลบำรุงผิวตามสูตร ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ขั้นตอนการเตรียม คือ ทำการชั่งคาร์โบเมอร์ ค่อยๆ โปรยลงไปในน้ำ คนช้าๆ ให้ส่วนผสมละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เพื่อให้ฟองอากาศลอยขึ้นมาจนหมด ชั่ง Cetylacetate นำมาละลายใน propylene glycol จากนั้นนำมาผสมกับส่วนแรกที่ตั้งทิ้งไว้ ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ หยด Triethanolamine ลงไปพร้อมกับคนช้าๆ จนได้เนื้อเจล นำมาบรรจุในภาชนะที่สะอาด ดังรูปที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557)

องค์ประกอบ	**เปอร์เซ็นต์**	**หน้าที่ในเครื่องสำอาง**
Deionized water	92.8	ตัวทำละลาย
Carbopol 940	0.7	ทำให้เกิดเนื้อสัมผัส
Cetylacetate	0.5	เพิ่มความชุ่มชื้น
Propylene glycol	5	เพิ่มความชุ่มชื้น
Triethanolamine	1	ปรับpH ทำให้เกิดเนื้อครีม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 3-2 ขั้นตอนการเตรียมเจลบำรุงผิวสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557)

3.6.9.2 การพัฒนาครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

นำครีมบำรุงสูตรพื้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.9.1 มาปรับสูตร เพื่อให้ได้ครีมบำรุงผิวสูตรที่เหมาะสมสำหรับนำมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ โดยทำการเตรียมครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละที่ 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ขั้นตอนการเตรียม คือ ทำการชั่งสารสกัดเมล็ดสละตามสูตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 นำมาละลายในน้ำก่อน แล้วค่อยๆ โปรยคาร์โบเมอร์ลงไป โดยทำตามขั้นตอนเดียวกับข้อ 3.6.9.1.2 นำไปศึกษาความคงตัวของตำรับครีม ความคงตัวของสารสกัดในตำรับครีม และวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตำรับครีม แล้วทำการเลือกตำรับครีมบำรุงผิวมีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละมา 1 สูตร เพื่อนำไปทำการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับครีม คุณภาพทางประสาทสัมผัส การระคายเคืองต่อผิวหนังและ ประเมินความชุ่มชื้นและการลดริ้วรอยของผิวหนังหลังจากใช้ครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละต่อไป

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของครีมบำรุงผิวสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

องค์ประกอบ	**เปอร์เซ็นต์**				**หน้าที่ในเครื่องสำอาง**
	ตำรับ1	**ตำรับ2**	**ตำรับ3**	**ตำรับ4**	
Deionized water	92.3	91.8	90.8	88.8	ตัวทำละลาย
สารสกัดจากเมล็ดสละ	0.5	1	2	4	สารต้านอนุมูลอิสระ และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
Carbopol 940	0.7	0.7	0.7	0.7	ทำให้เกิดเนื้อสัมผัส
Cetylacetate	0.5	0.5	0.5	0.5	เพิ่มความชุ่มชื้น
Propylene glycol	5	5	5	5	เพิ่มความชุ่มชื้น
Triethanolamine	1	1	1	1	ปรับpH ทำให้เกิดเนื้อครีม

3.6.10 การศึกษาความคงตัวของตำรับครีมแบบเร่งด้วยวิธีHeating and cooling cycle

นำตำรับครีมที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.9 มาทำการทดสอบในสภาวะร้อน-เย็นสลับกัน (Heating and cooling cycle) จำนวน 6 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะครีมก่อนและหลังการทดสอบ โดยการสังเกตดูลักษณะปรากฏ เช่น การแยกชั้น การเกิดฟองอากาศ กลิ่น สี ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด

3.6.11 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดในตำรับครีม

นำตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.9.2 เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน คือ

1. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)
2. ที่อุณหภูมิห้อง
3. ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตู้อบ)

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลาที่กำหนด เพื่อนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดในตำรับครีม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.6.12 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของตำรับครีม

นำตำรับครีมที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.9 มาทำการวิเคราะห์สมบัติตามมาตรฐาน มอก. 478-2555 คือ

- ลักษณะสีและกลิ่น
- ความเนียน
- การตกตะกอน
- การแยกชั้น

3.6.13 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของตำรับครีม

นำตำรับครีมที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.9 มาทำการวิเคราะห์สมบัติตามมาตรฐาน มอก. 478-2555 คือ

- ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยวัดจากเครื่อง pH meter

- ความหนืด ด้วยเครื่องBrookfield viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเลือกใช้หัวปั่น และความเร็วในการคนให้เหมาะสมกับความหนืดของครีม

3.6.14 การประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับครีม

นำตำรับครีมบำรุงผิวมีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.9.2 มาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน มอก. 152-2555 โดยตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนี้

1. ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*)
2. สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococus aureus*)
3. แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*)
4. คลอสตริเดียม (*Clostridium spp.*)
5. ฟีคัลโคลิฟอร์ม (*Faecal coliform*)
6. ซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*)
7. โคลิฟอร์ม (*Coliform Bac.*)

3.6.15 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ทำการประเมินค่าคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสด้วยวิธีทดสอบเชิงพรรณนา (Descriptive Analysis) โดยใช้ผู้ทดสอบเพศหญิง อายุ 20 – 50 ปี จำนวน 30 คน ให้ทดลองใช้เจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ และครีมที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด ซึ่งผู้ที่ทำการทดลองจะไม่ทราบว่าครีมทั้ง 2 กระปุกแตกต่างกัน โดยให้ทาครีมบริเวณแขนตามที่ระบุไว้ที่กระปุกว่า “แขนซ้าย” และ “แขนขวา” ซึ่งมีเงื่อนไขว่าก่อนจะทาครีมที่แขนอีกข้างหนึ่งต้องล้างมือให้สะอาดก่อน โดยให้ทดลองใช้เป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อวัดค่าคุณภาพตามคุณลักษณะที่คัดเลือก คือ ความเป็นเนื้อ

เดียวกัน ความละเอียดของเนื้อครีม ความง่ายในการทาผิว การซึมเข้าสู่ผิว ความเหนียวเหนอะหนะ ความชุ่มชื้นผิว และความนุ่มเนียนผิว (ภาคผนวก ค.) ใช้วิธีให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9 point hedonic scale) และกำหนดคะแนนความชอบในแต่ละปัจจัยเฉลี่ยจะต้องมากกว่า 6 คะแนน โดยช่วงระดับความชอบผลิตภัณฑ์คำนวณได้ช่วงกว้างของระดับชั้น เท่ากับ 1.0 ซึ่งความหมายของแต่ละระดับชั้นเป็นดังนี้ คือ

คะแนนเฉลี่ยในช่วง 0.1 – 1.0 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด
1.1 – 2.0 หมายถึง ไม่ชอบมาก
2.1 – 3.0 หมายถึง ไม่ชอบปานกลาง
3.1 – 4.0 หมายถึง ไม่ชอบเล็กน้อย
4.1 – 5.0 หมายถึง เฉย ๆ
5.1 – 6.0 หมายถึง ชอบเล็กน้อย
6.1 – 7.0 หมายถึง ชอบปานกลาง
7.1 – 8.0 หมายถึง ชอบมาก
8.1 – 9.0 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.6.16 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

ทำการทดสอบโดยใช้วิธี patch test ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยใช้แผ่นผ้าก๊อซที่มีขนาดกว้างและยาวขนาด 2.5 เซนติเมตร ชุบครีมบำรุงที่เตรียมไว้ แล้วปิดลงบนบริเวณใต้ท้องแขนด้านบนของผู้ทดสอบ ในตำแหน่งที่ห่างจากข้อพับ 1 นิ้ว หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพลาสติกบาง ๆ ปิดทับ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผ้าก๊อซออก เช็ดด้วยน้ำอุ่นทิ้งให้แห้ง สังเกตผลที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วประเมินผลการระคายเคืองจากการอ่านผลการเกิดอาการบวม หรือแดงตามค่าระดับคะแนนดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

ชั่วโมงที่	คะแนน
0	
24	
48	
72	

การให้คะแนนการสังเกตอาการระคายเคือง

คะแนน 0 หมายถึง ไม่เกิดอาการบวมแดง

1 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงน้อยมาก

2 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงชัดเจน

3 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงปานกลางถึงมาก

4 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงรุนแรง

รูปที่ 3-3 การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของตำรับครีม

รูปที่ 3-4 ตำแหน่งบริเวณใต้ท้องแขนก่อนการทดสอบ

3.6.17 การประเมินความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนัง

ทำการประเมินความชุ่มชื้นของผิวหนัง โดยใช้เครื่อง Corneometer และประเมินริ้วรอยและความหยาบละเอียดของผิวหนังอาสาสมัคร โดยใช้เครื่อง Skin visiometer ก่อนและหลังจากการใช้ครีมบำรุง แล้วทำการประเมินผลสภาพผิวหนังของอาสมัครเปรียบเทียบผลระหว่างสภาพผิวหนังบริเวณที่ทาครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละกับครีมบำรุงสูตรพื้นที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

บทที่ 4
ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาผลการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดสละ ตามมาตรฐาน AACC (2000)

เมื่อนำผงเมล็ดสละมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของเมล็ดสละ ตามมาตรฐาน AACC (2000) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า องค์ประกอบหลักจะเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 82.84 รองลงมาคือ ปริมาณเส้นใยและโปรตีน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 11.56 และ 5.6 ตามลำดับ ส่วนไขมันนั้นตรวจไม่พบ

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของเมล็ดสละ

องค์ประกอบ	**ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)**
โปรตีน	5.6
ไขมัน	-
เส้นใย	11.56
คาร์โบไฮเดรต	82.84
ความชื้น	8.41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย

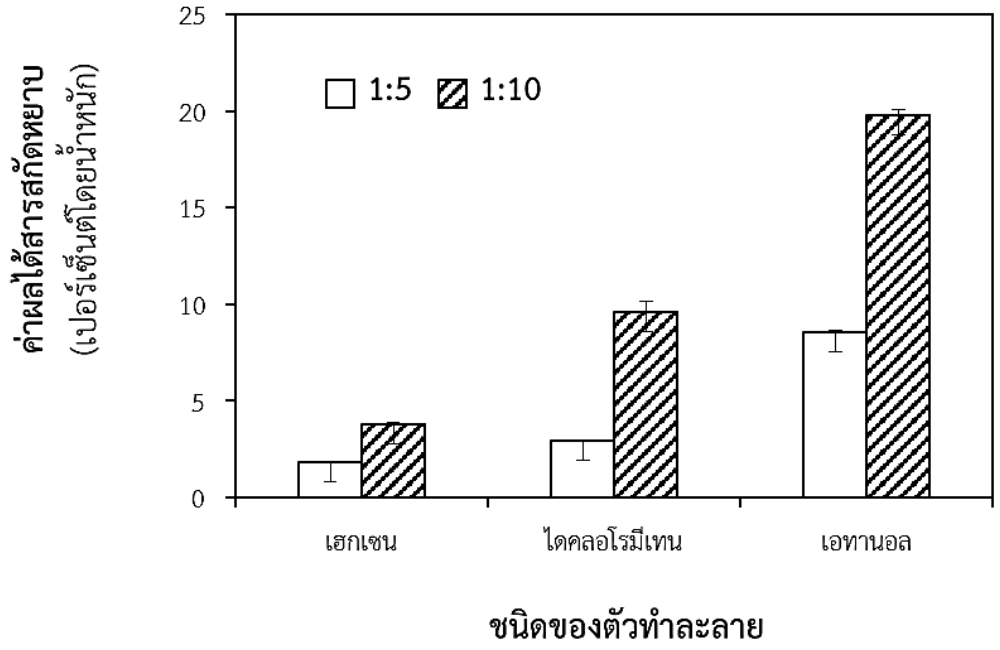
4.2.1 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

เมื่อทำการสกัดผงเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากตัวทำละลายไม่มีขั้ว (Non-polar solvent) จนถึงตัวทำละลายมีขั้ว (Polar solvent) ที่อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาล

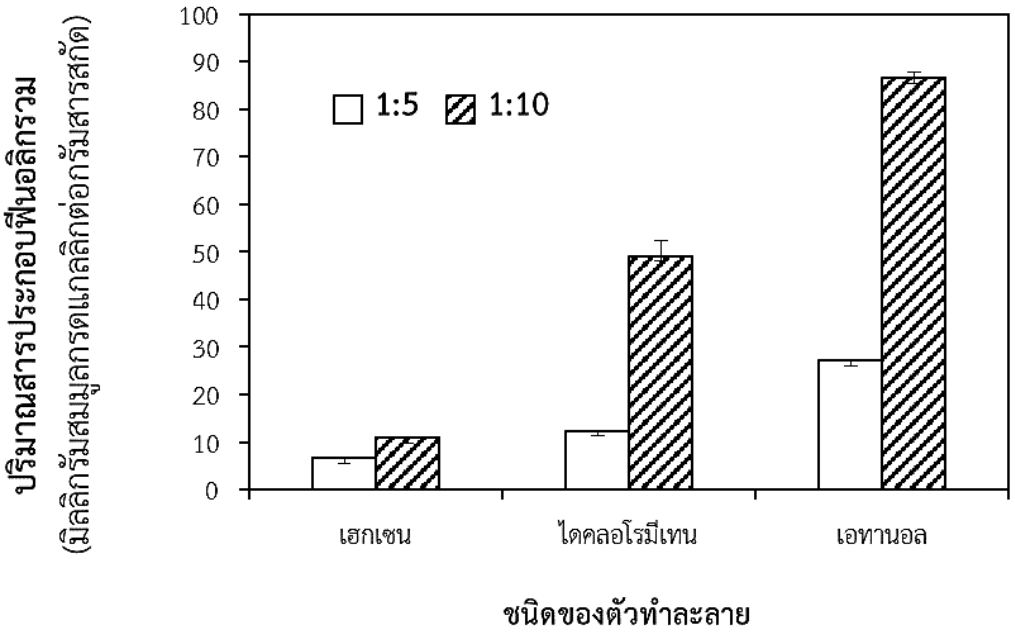
เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้สารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ทั้ง 2 อัตราส่วน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า การสกัดที่อัตราส่วน 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างตัวถูกสกัดต่อตัวทำละลายจะได้ปริมาณสารสกัดสูงขึ้น ในทางกลับกันการใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่น้อยเกินไปจะทำให้การดูดซึมได้ไม่เพียงพอทำให้ได้ปริมาณสารสกัดน้อยลง (วรรณพิชญ์ และคณะ, 2553) และเมื่อพิจารณาที่ชนิดของตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า การสกัดเมล็ดสละด้วยเอทานอล จะให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด รองลงมาคือ ไดคลอโรมีเทน ส่วนการใช้เฮกเซนจะให้ผลที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกรวมเป็นสารที่มีขั้วและมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี ทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (วันเช็ง และ ดวงฤดี, 2554)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม จากปฏิกิริยาการรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ที่มีส่วนประกอบของ Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents ด้วยหมู่ไฮดรอกซีของสารประกอบฟีนอลิก เกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ที่มีสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (ผุสดี, 2554) โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ได้สมการดังนี้ $y = 1.9336x + 0.0207$, ($R^2 = 0.9982$) ซึ่งกรดแกลลิคมีความคงตัวดีจึงเหมาะที่จะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวมมากกว่าสารประกอบฟีนอลิกตัวอื่นๆ ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น กรดแทนนิคที่ไม่คงตัว จึงไม่เหมาะใช้เป็นสารมาตรฐาน จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากเมล็ดสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ ไดคลอโรมีเทน ส่วนเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการสกัดได้น้อยที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวีรยุทธ (2552) ได้ศึกษาอิทธิพลตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากพืช พบว่า การใช้ตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดจะได้ปริมาณสารสกัดหยาบ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ดังนั้นสารประกอบหลักในสารสกัดเมล็ดสละจึงเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก เพราะสารประกอบฟีนอลิกรวมส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพความเป็นขั้วสูง (Walter *et al*., 1979) และยังพบว่าปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน

Ong and Law (2012) ได้ศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของตัวถูกสกัดต่อตัวทำละลายที่อัตราส่วน 1 ต่อ 10 ถึง 1 ต่อ 100 ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสละ พบว่า การสกัดสละด้วยตัวทำละลายที่อัตราส่วนที่มากขึ้นจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงขึ้น แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่ปัจจัยอื่นๆ ในการสกัดอีกด้วย



รูปที่ 4-1 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบ



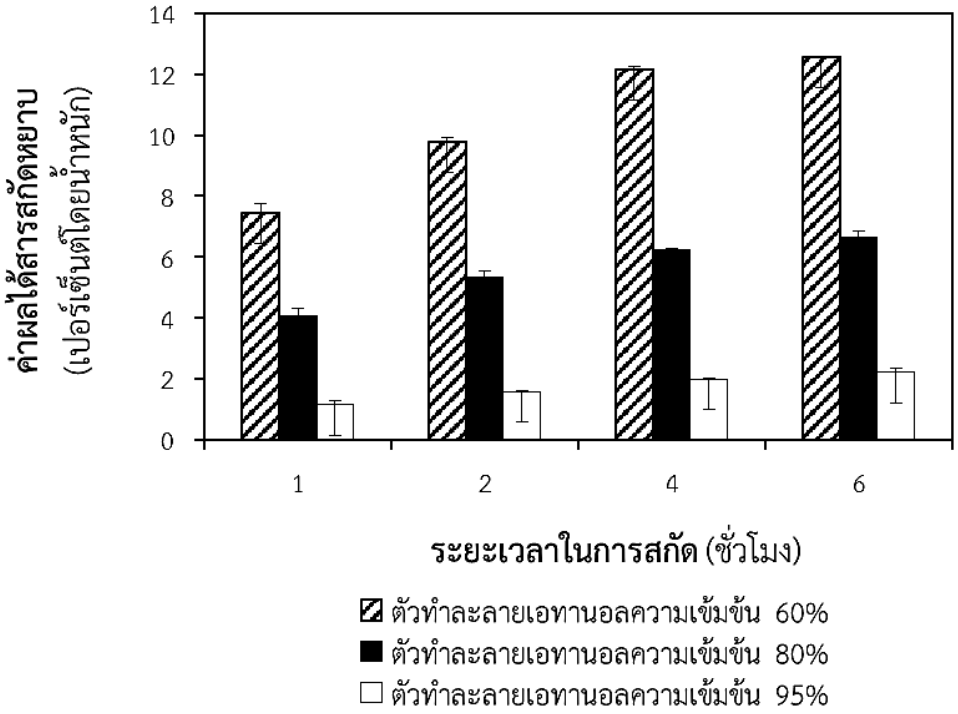
รูปที่ 4-2 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

4.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

เมื่อทำการสกัดผงเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยการแปรผันความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ 60, 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสารที่ระยะเวลาในการสกัด คือ 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาล

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามเวลา ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่า การสกัดเมล็ดสละด้วยสารละลายเอทานอลที่เจือจาง จะให้ผลการสกัดที่ดีกว่าการใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น โดยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด รองลงมาคือ การใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนการใช้สารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของทรงศิริ (2552) ที่ได้ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะถูกสกัดได้ดีเมื่อใช้สารละลายเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 30 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยสารละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำมีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าการใช้น้ำเพียงอย่างเดียว ซึ่งการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวไม่สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความมีขั้ว (Polarity) และความสามารถในการละลาย (Solubility) ที่แตกต่างกัน (Sun and Ho, 2005)

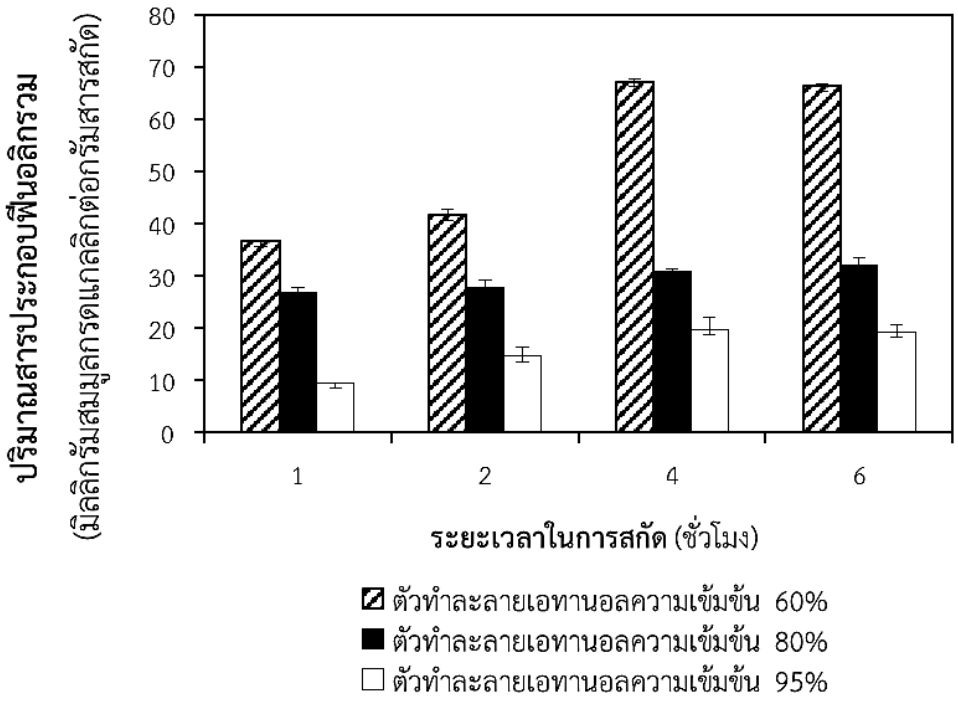
ทั้งนี้การเพิ่มระยะเวลาในการสกัดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด และที่ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุดในทุกความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และเมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มากกว่า 4 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสารสกัดหยาบมีอัตราการเพิ่มขึ้นเริ่มคงที่ โดยปริมาณสารสกัดหยาบจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการสกัด หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ (พิชญ์อร, 2546)



รูปที่ 4-3 ผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบที่ระยะเวลาต่างๆ

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสารสกัดจากเมล็ดสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และที่ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด ซึ่งจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่มากกว่า 4 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีอัตราการเพิ่มขึ้นเริ่มคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของทศพร (2553) และ Ong and Law (2012) ที่ได้รายงานว่า ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ได้ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะเพิ่มขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการสกัด หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่

Luthria and Mukhopadhyay (2005) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของตัวทำละลายจะมีผลต่อการละลายและค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารประกอบฟีนอลิกรวม ดังนั้นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยลง



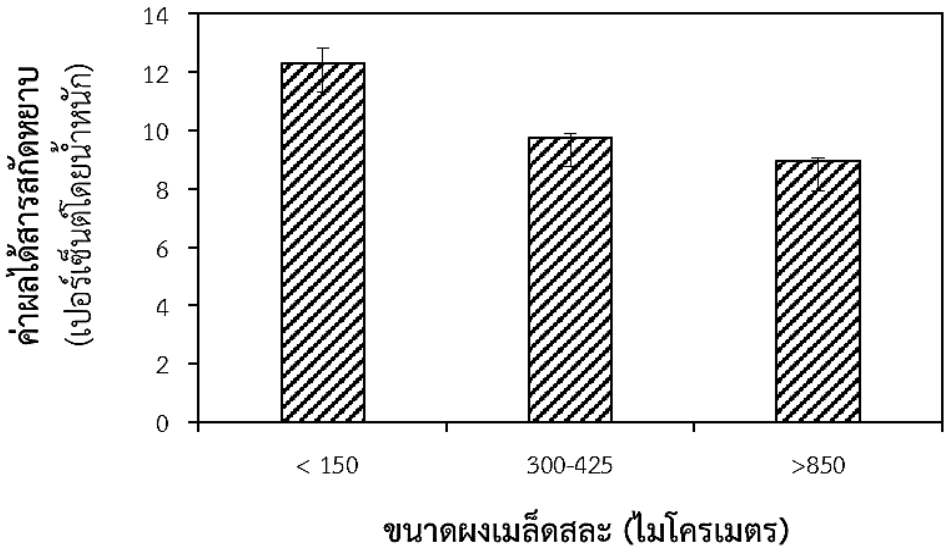
รูปที่ 4-4 ผลของความเข้มข้นตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

4.2.3 ผลการศึกษาขนาดผงเมล็ดสละบดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

เมื่อทำการสกัดผงเมล็ดสละที่อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำลายละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสาร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยแปรผันขนาดของผงเมล็ดสละเป็น 3 ขนาด ตามที่ได้จากข้อ 3.6.1 หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาล ดังรูปที่ 4.5

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดเล็กกว่า 150 ขนาดระหว่าง 300 - 425 และขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่า การสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด รองลงมาคือ ขนาดระหว่าง 300 – 425 ไมโครเมตร และที่ขนาดใหญ่กว่ากว่า 850 ไมโครเมตร จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบต่ำสุด โดยที่ผงเมล็ดสละที่ขนาดระหว่าง 300 - 425 และขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร มีค่าผลได้สารสกัดหยาบที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าผงเมล็ดสละที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับตัวทำละลายได้ดีกว่าผงเมล็ดสละขนาดใหญ่

รูปที่ 4-5 ลักษณะของสารสกัดจากเมล็ดสละเข้มข้น

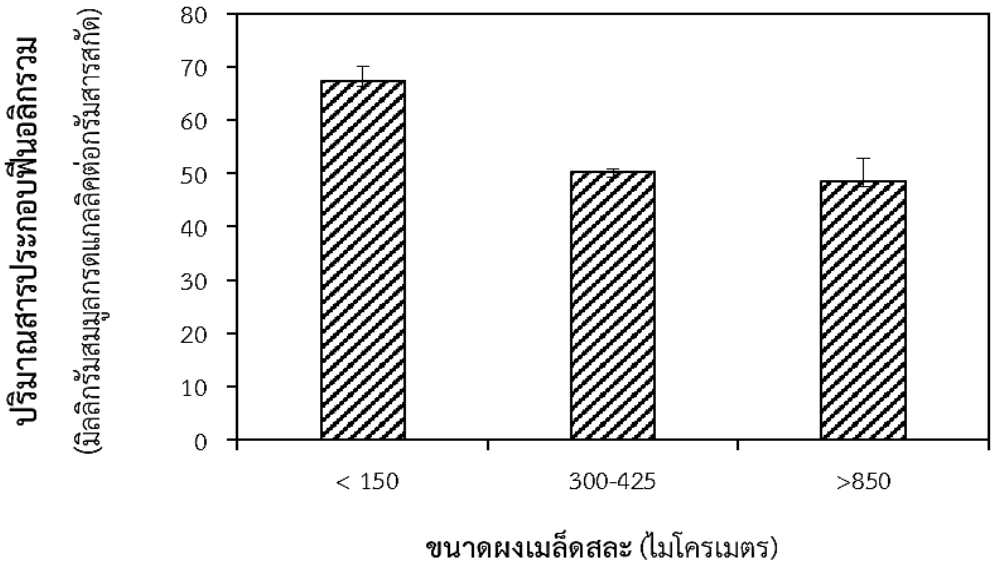


รูปที่ 4-6 ผลของขนาดผงเมล็ดสละบดต่อค่าผลได้สารสกัดหยาบ

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่า การสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดเล็กกว่า 150 ขนาดระหว่าง 300 - 425 และขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 67.393 ± 2.72, 50.185 ± 0.54, 44.611 ± 4.22 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ดังนั้นการสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด โดยที่ผงเมล็ดสละที่ขนาดระหว่าง 300 - 425 และขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่

ใกล้เคียงกัน โดยตัวถูกสกัดที่มีขนาดเล็กจะมีปริมาณของสารสกัดที่สูงขึ้น เนื่องจากพื้นที่สัมผัสระหว่างตัวถูกสกัดกับตัวทำละลายมีมากขึ้น และในขั้นตอนของการลดขนาดจะช่วยทำลายผนังเซลล์ที่หุ้มสารที่ต้องการสกัด ทำให้สารที่ต้องการสกัดเกิดการแพร่สู่ตัวทำละลายได้ง่ายขึ้น ทำให้อัตราการสกัดที่ได้เพิ่มขึ้น (ผกามาศ และคณะ, 2550)

ทศพร (2553) ศึกษาอิทธิพลของขนาดตัวถูกสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากพืช พบว่า ขนาดของตัวถูกสกัดมีอิทธิพลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ได้ ซึ่งขนาดของตัวถูกสกัดที่เล็กลงจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 4-7 ผลของขนาดผงเมล็ดสละบดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดสละ

4.3.1 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยแสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) และเมื่อคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ โดยแสดงผลเป็นค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า การสกัดผงเมล็ดสละที่อัตราส่วน 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 กรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาที่ชนิดของตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่า การสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลายเอทานอล จะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ไดคลอโรมีเทน ส่วนการใช้เฮกเซนจะให้ผลที่ค่อนข้างต่ำ

He และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมล็ดผลไม้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า ชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยตัวทำละลายประเภทแอลกอฮอล์จะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวทำละลายประเภทอื่น

วีรยุทธ และ จิรศักดิ์ (2552) ได้ศึกษาอิทธิพลตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากพืช พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

อัตราส่วน	**ชนิดตัวทำละลาย**	**IC_{50}**	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
1:5	เฮกเซน	552	84
	ไดคลอโรมีเทน	379	122
	เอทานอล	121	381
1:10	เฮกเซน	399	116
	ไดคลอโรมีเทน	210	220
	เอทานอล	89	518

4.3.2 ความเข้มข้นของตัวทำละลายและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อัตราส่วนของผงเมล็ดสละต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยแสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) และเมื่อคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปรียบเทียบกับสาร

มาตรฐานโทรล็อกซ์ โดยแสดงผลเป็นค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่ำจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย จะทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ของตัวทำละลายลดลง (ความมีขั้วลดลง) ส่งผลให้การจับตัวกันของโมเลกุลลดลงตามไปด้วย ดังนั้นประสิทธิภาพในการสกัดจึงลดลง (Cacace and Mazza, 2003) นอกจากนี้ความเข้มข้นของตัวทำละลายยังมีผลต่อการละลายและค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารประกอบฟีนอลิกรวม ดังนั้นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยลงอีกด้วย (Luthria and Mukhopadhyay, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจันทร์จารึก (2550) ที่พบว่า สารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมากว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลต่ำกว่าและสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง

ตารางที่ 4.3 ผลของชนิดตัวทำละลายเอทานอลต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	**ระยะเวลา** (ชั่วโมง)	IC_{50}	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
60	1	109	422
	2	99	467
	4	91	506
	6	84	548
80	1	116	397
	2	110	421
	4	102	451
	6	97	476
95	1	137	336
	2	133	347
	4	121	383
	6	113	410

4.3.3 ผลการศึกษาขนาดผงเมล็ดสละบดต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ขนาดผงเมล็ดสละต่าง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า การสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร จะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ ขนาดระหว่าง 300 - 425 และขนาดใหญ่กว่า 850 ไมโครเมตร จะมีค่าความสามรถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าค่า IC_{50} จะแปรผกผันกับค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่าน้อยๆ จะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี

ตารางที่ 4.4 ผลของขนาดผงเมล็ดสละต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

ขนาดผงเมล็ดสละ (ไมโครเมตร)	IC_{50}	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
< 150	91	505
300-425	96	477
>850	111	413
สารโทรล็อกซ์	46.13	-

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณสารสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roginsky (2005) ที่ได้รายงานว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแปรผันตรงกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมาก จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง เพราะว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีที่สามารถใช้จับกับอนุมูลอิสระ (วันเชิง และ ดวงฤดี, 2554)

Contreras-Calderon และคณะ (2011) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดผลไม้ ได้รายงานว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยเมล็ดผลไม้ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน

4.4 ผลการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ

นำสารสกัดที่เตรียมได้มาเก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่าง ๆ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตู้อบ) เป็นเวลา 4 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลา คือ วันที่ 0, 15, 30, 60, 90 และ 120 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำหรับการเก็บรักษาสารสกัดที่เหมาะสม

4.4.1 ผลความคงตัวทางกายภาพของสารสกัด

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดทางกายภาพ เป็นการศึกษาถึงสภาวะในการเก็บรักษาที่มีผลต่อลักษณะภายนอกของสารสกัด เช่น สี และกลิ่น โดยการสังเกต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดที่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีความคงตัวทางกายภาพยาวนานที่สุดโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งสีและกลิ่นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 120 วัน ส่วนการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า สีของสารสกัดจะมีลักษณะเข้มขึ้น และมีกลิ่นเมื่อเก็บไว้ประมาณ 120 วัน และที่การเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ลักษณะสีและกลิ่นของสารสกัดเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปหลังจากวันที่ 90 โดยสารสกัดจะมีสีที่เข้มขึ้น และมีกลิ่นมากขึ้นเมื่อครบ 120 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการเร่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารสกัด โดยจะแปรผันตามอุณหภูมิและระยะในการเก็บ

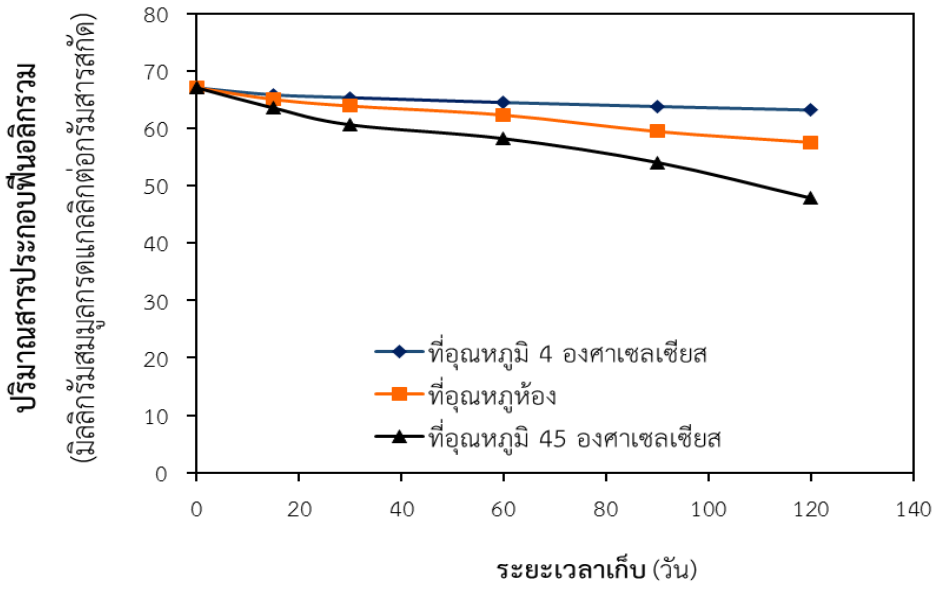
ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดในการศึกษาความคงตัว

ระยะเวลา (วันที่)	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่สภาวะการเก็บรักษา		
	ที่อุณหภูมิ 4 °C	ที่อุณหภูมิห้อง	ที่อุณหภูมิ 45 °C
0	-	-	-
15	-	-	-
30	-	-	-
60	-	-	-
90	-	-	สีเข้มขึ้น
120	-	สีเข้มขึ้น มีกลิ่น	สีเข้มขึ้น มีกลิ่น

หมายเหตุ (-) = ไม่เปลี่ยนแปลง

4.4.2 ผลความคงตัวทางเคมีของสารสกัด

การศึกษาความคงสภาพทางเคมี โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตามช่วงเวลา คือ วันที่ 0, 15, 30, 60, 90 และ 120 โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่า สารสกัดจะมีความคงตัวดีที่สุด เมื่อเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่ำที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะสลายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น ตามลำดับ จะเห็นว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะลดลงเพียง 3 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นการทดสอบ ส่วนการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะลดลงประมาณ 19 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 4 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจันทร์จารึก (2550) ที่รายงานว่า สารสกัดของพืชที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถคงคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีของสารสกัดได้นานกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง



รูปที่ 4-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเมล็ดสละที่การเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความคงตัวทั้งในทางเคมีและทางกายภาพของสารสกัด โดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า สารสกัดเมล็ดสละที่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความคงตัวดีมากที่สุด รองลงมาคือ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวต่ำที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสกัดเมล็ดสละจะมีความคงตัวดีที่การ

เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยสามารถเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ได้นานไม่ต่ำกว่า 4 เดือน

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

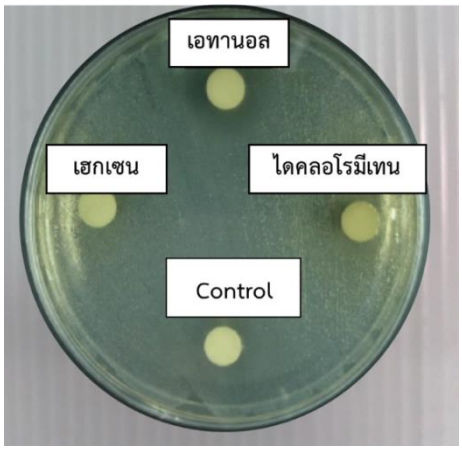
4.5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละด้วยวิธี Disc diffusion method

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ไดคลอโรมีเทน ส่วนเฮกเซน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยที่สุด และเมื่อเทียบกันระหว่างชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายทุกชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ส่วนการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเดียวกัน พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ *S. aureus* ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับ *B. subtilis* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shan และคณะ (2007) ที่ได้รายงานว่า แบคทีเรียที่มีความต้านทานต่อสารสกัดจากสมุนไพรมากที่สุดคือ คือ *E. coli* ส่วนแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารสกัดจากสมุนไพรมากที่สุด คือ *S. aureus* สาเหตุที่แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารสกัดจากสมุนไพรได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก สารไลโพพอลิแซกคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอก จะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารประกอบฟีนอลิกรวมจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยการทำให้โปรตีนตกตะกอน และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Chung *et al.*, 1998)

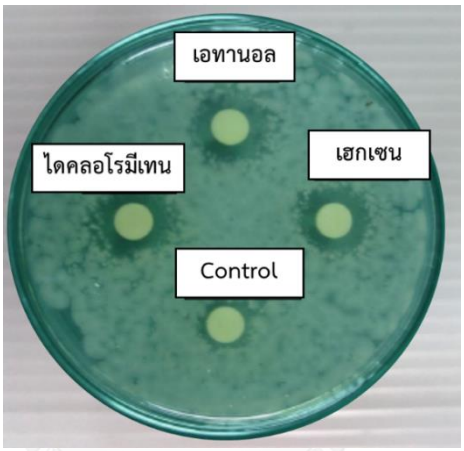
ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดสละ

ตัวทำละลาย	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย* (มิลลิเมตร) ± S.D.**		
	E. coli	***B. subtilis***	***S. aureus***
เอทานอล	17.4 ± 1.0	18.9 ± 1.3	19.8 ± 0.5
ไดคลอโรมีเทน	13.3 ± 1.9	15.5 ± 1.6	17.0 ± 1.3
เฮกเซน	7.7 ± 1.2	14.8 ± 2.2	12.1 ± 1.9

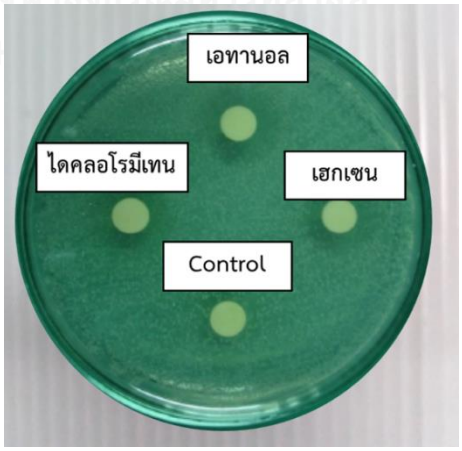
หมายเหตุ * เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และ S.D. หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



(ก) ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*



(ข) ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*



(ค) ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

รูปที่ 4-9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดเมล็ดสละ

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Broth dilution method ตั้งแต่ความเข้มข้น 2.5 ถึง 0.0049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเมล็ดสละมีความสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดสละที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยมีค่าเท่ากับ 1.25, 0.625 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*)

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	**เชื้อแบคทีเรีย**		
	E. coli	***B. subtilis***	***S. aureus***
2.5000	-	-	-
1.2500	-	-	-
0.6250	+	-	-
0.3125	+	+	+
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต, + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

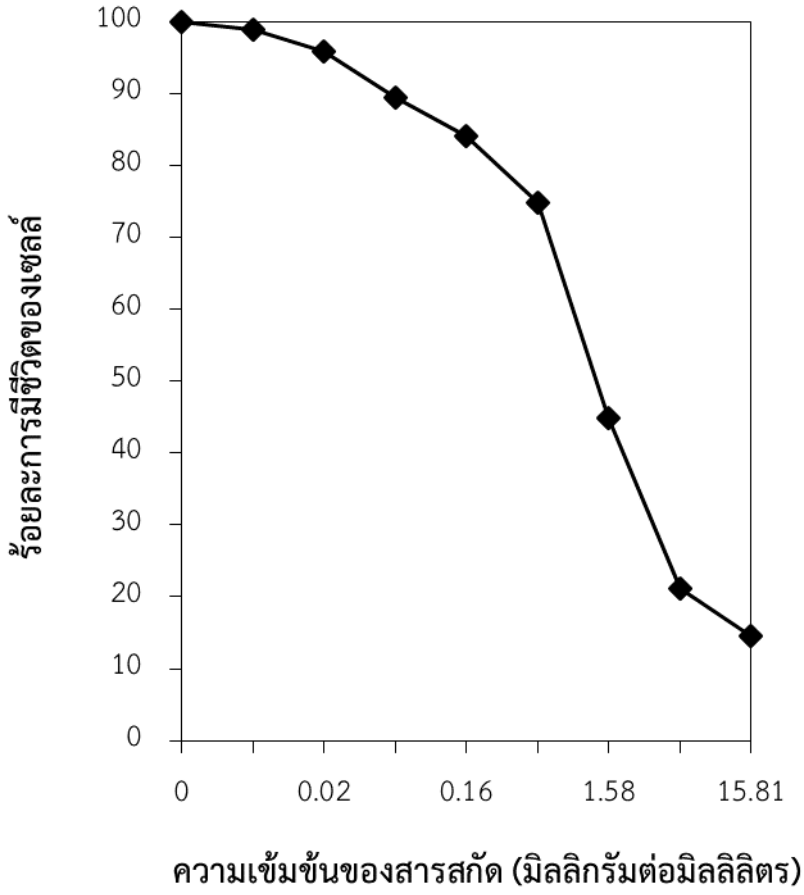
Majhenic (2007) ได้รายงานว่า สารสกัดจากเมล็ดผลไม้ในตัวทำละลายเอทานอลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีแปปทริโดไกลแคนที่บางกว่า อีกทั้งยังมีผนังเซลล์ชั้นนอกเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชั้น ทำให้สามารถกั้นโมเลกุลของสารไม่ให้ผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ง่าย ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

สุคนธ์ และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ตรวจพบในเปลือกผลไม้ และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

4.5.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสละต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

วิธี MTT assay เป็นการทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะทำการรีดิวซ์สาร MTT กลายเป็นผลึก Fromazan ที่มีสีม่วง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูง ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้ไม่เกิดสี ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ โดยค่าความเข้มข้นของสีที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

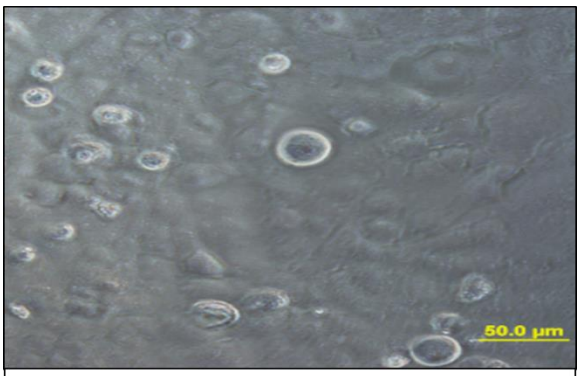
โดยเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดสละต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิด WI-38 ความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM Eagle ทำการทดสอบกับสารสกัดเมล็ดสละที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.002 ถึง 15.811 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ WI-38 จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} (Inhibition concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสารสกัดที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ WI-38 ลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง ค่า IC_{50} ของสารสกัดเมล็ดสละมีค่าเท่ากับ 1.48 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



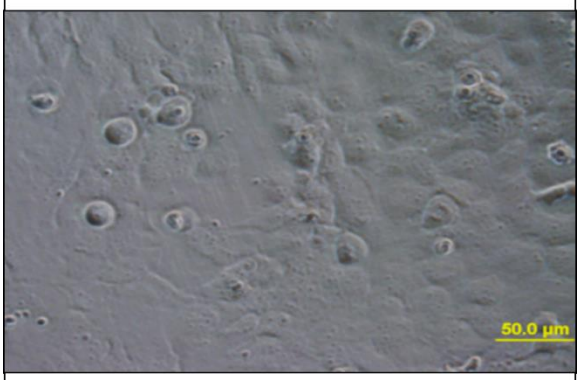
รูปที่ 4-10 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดต่อร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ไลน์ WI-38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

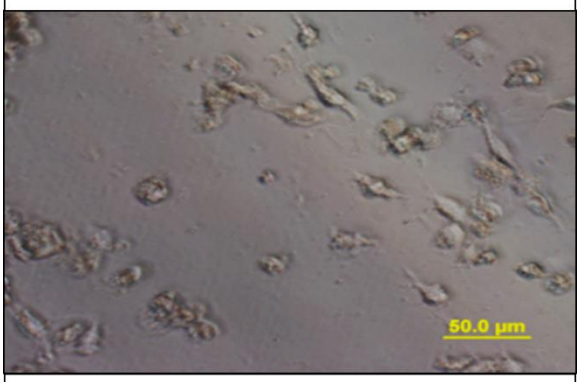
ในรูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเซลล์ WI-38 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีสารสกัด และเมื่อบ่มเลี้ยงกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเซลล์ปกติ มีความหนาแน่นของเซลล์มาก มีลักษณะวาวใสและแผ่การเจริญได้ดี และเมื่อนำเซลล์มาบ่มเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เซลล์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีการบวมพองเกิดขึ้น ทำให้มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าปกติ ในบางเซลล์มีการแตกสลายทำให้องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ออกมาภายนอก เกิดการยุบของผนังเซลล์ รวมทั้งสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียสเกิดการจับตัวหนาขึ้น โดยมีค่าร้อยละการอยู่รอดของสารสกัดเป็น 98.85



ในอาหารเลี้ยงเซลล์



ในสารสกัดเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ในสารสกัดเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 4-11 การเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ WI-38 ที่อยู่ในสภาวะต่างๆ

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีการแตกสลายของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทำการวัดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด พบว่าเซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพียง 21.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC_{50}

4.6 ผลการศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละ ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

เมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และที่ระยะเวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า ในสารสกัดเมล็ดสละประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ กรดแทนนิค (Tannic acid) เท่ากับ 27.24 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด และกรดแกลลิค (Gallic acid) เท่ากับ 11.26 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด โดยกรดแทนนิคจะพบมากในสารสกัดเมล็ดองุ่น (Escribano-Bailon *et al.*, 1992) เนื้อผลไม้ดิบ เมล็ดผลไม้ หรือแม้กระทั่งเปลือกของผลไม้ และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (Scalbert, 1991) โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของกรดแทนนิค (Pyla *et al.*, 2010) โดยมีองค์ประกอบเป็นกรดแกลลิค 9 โมเลกุล และน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล โดยกรดแทนนิคเป็นสารที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมไม้อัด ไม้แปรรูป นิยมนำมาใช้สำหรับการผลิตกาวเพื่อเกาะยึดไม้ รวมถึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหาร และยา มีงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดสละด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีปริมาณกรดแกลลิค เท่ากับ 2.859±0.083 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด (Kanlayavattanakul *et al*., 2013) โดยกรดแกลลิค พบมากในเมล็ดองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Reynolds and Wilson, 1991)

4.7 ผลการศึกษาพัฒนาตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

4.7.1 การคัดเลือกครีมบำรุงผิวสูตรพื้น

4.7.1.1 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของครีมสูตรพื้น

จากการเตรียมครีมสูตรพื้น 2 สูตร คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999) และสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) ดังแสดงในรูปที่ 4.12

ครีมบำรุงผิวสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999) พบว่า เนื้อครีมหลังจากเตรียมเสร็จใหม่มีสีขาว เนื้อสัมผัสเนียน ซึมซาบสู่ผิวได้ดี ไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกเหนอะหนะเวลาทา โดยมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

รูปที่ 4-12 ลักษณะของเนื้อครีมพื้นทั้ง 2 สูตร หลังเตรียมเสร็จ

ตารางที่ 4.8 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion หลังเตรียมเสร็จใหม่

คุณลักษณะ	**ครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion**
ลักษณะเนื้อโลชั่น	เนื้อครีม
การตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน
การแยกขั้น	ไม่แยกชั้น
ความหนืด (cP)	28,614
ความเป็นกรด-ด่าง	6.03
สี	ขาว
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความรู้สึกเวลาทา	ทาง่าย ซึมเข้าผิวดี ไม่เหนี่ยวเหนอะหนะ

ครีมบำรุงผิวสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) พบว่า เนื้อครีมหลังจากเตรียมเสร็จใหม่มีลักษณะเป็นเนื้อเจลใส เนื้อสัมผัสเนียน ซึมซาบสู่ผิวได้ดี ไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกเหนอะหนะเวลาทา โดยมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล หลังเตรียมเสร็จใหม่

คุณลักษณะ	**ครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล**
ลักษณะเนื้อโลชั่น	เนื้อเจลใส
การตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น
ความหนืด (cP)	25,864
ความเป็นกรด-ด่าง	5.94
สี	ใส
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความรู้สึกเวลาทา	ทาง่าย ซึมเข้าผิวดี ไม่เหนี่ยวเหนอะหนะ

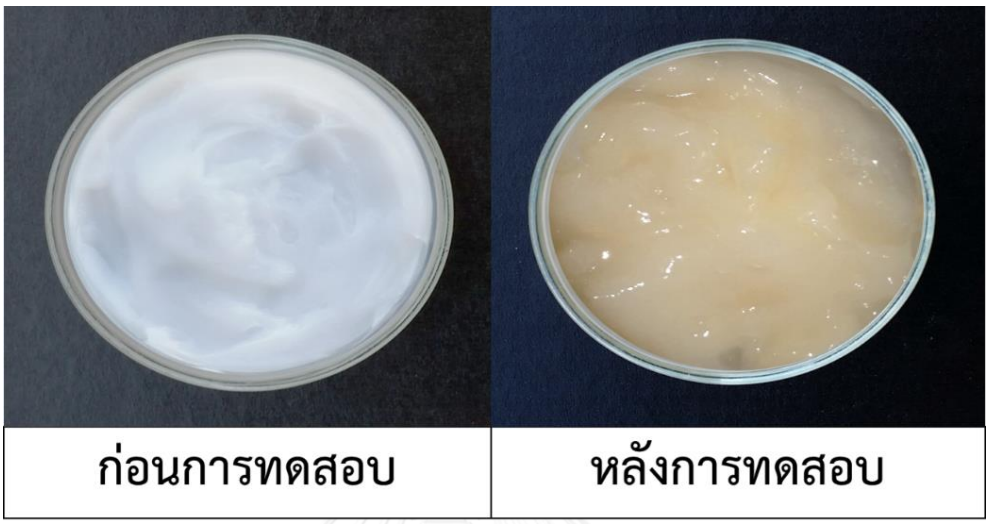
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.7.1.2 ผลการประเมินความคงตัวของครีมสูตรพื้นแบบเร่ง ด้วยวิธี Heating and cooling cycle

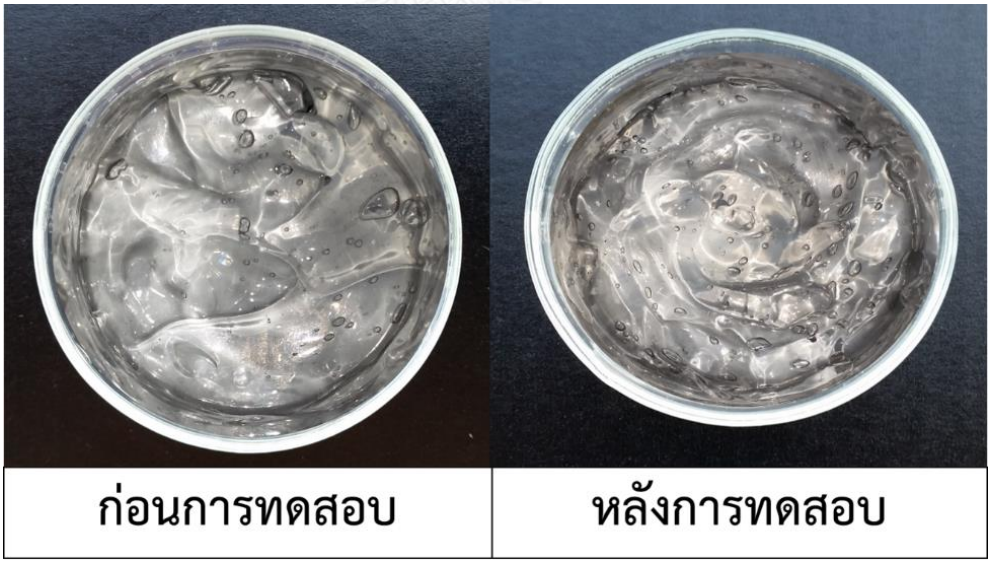
เมื่อนำครีมบำรุงผิวสูตรพื้นทั้ง 2 สูตร มาทำการทดสอบความคงตัวของตำรับครีมแบบเร่งด้วยวิธี Heating and cooling cycle จำนวน 6 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะครีมก่อนและหลังการทดสอบ โดยการสังเกตดูลักษณะปรากฏ เช่น การแยกชั้น การเกิดฟองอากาศ กลิ่น สี ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด

พบว่า ครีมบำรุงผิวสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999) สีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ส่วนครีม

บำรุงผิวสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) เนื้อเจลไม่เกิดการตกตะกอน การแยกชั้น ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความหนืด สี และกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างช่วงเวลาก่อนและหลังการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.10



รูปที่ 4-13 ลักษณะของเนื้อครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion ก่อนและหลังการทดสอบด้วยวิธี Heating and cooling cycle จำนวน 6 รอบ



รูปที่ 4-14 ลักษณะของเนื้อครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล ก่อนและหลังการทดสอบด้วยวิธี Heating and cooling cycle จำนวน 6 รอบ

ตารางที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวแบบเร่งของครีมสูตรพื้น ด้วยวิธี Heating and cooling cycle

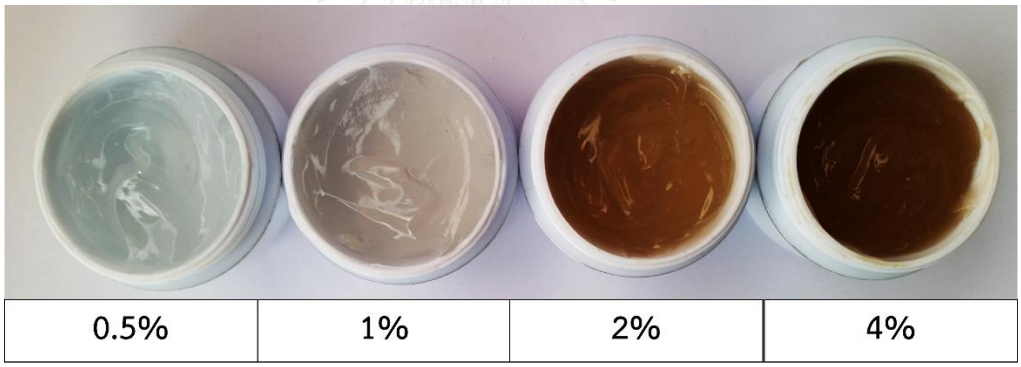
คุณลักษณะ	ครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion		ครีมพื้นสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล	
	ก่อน Heating & Cooling cycle	หลัง Heating & Cooling cycle	ก่อน Heating & Cooling cycle	หลัง Heating & Cooling cycle
ลักษณะเนื้อโลชั่น	เนื้อครีม	เนื้อครีม	เนื้อเจลใส	เนื้อเจลใส
การตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน	ไม่ตกตะกอน
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
การเกิดฟองอากาศ	ไม่มีฟองอากาศ	ไม่มีฟองอากาศ	ไม่มีฟองอากาศ	ไม่มีฟองอากาศ
ความหนืด (cP)	28,614	32,825	25,864	26,523
ความเป็นกรด-ด่าง	6.03	5.53	5.94	6.02
สี	ขาว	เหลืองอ่อน	ใส	ใส
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น

จากตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า ครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) มีความคงตัวดีกว่าครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999)

และเมื่อพิจารณาทั้งคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และความคงตัวของครีมสูตรพื้น จึงเลือกครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) มาทำการพัฒนาต่อเป็นตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

4.7.2 ผลการพัฒนาเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.7.1 จึงนำครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล มาทำการพัฒนาต่อเป็นตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่ 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า เนื้อเจลหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ มีลักษณะทางกายภาพดังแสดงในรูปที่ 4.15 โดยเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นจะมีสีเหลืองที่เข้มขึ้น เป็นผลมาจากสีของสารสกัด โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7 และความหนืดอยู่ในช่วง 20,000 ถึง 26,000 เซ็นติพอยด์ มีลักษณะเป็นเนื้อเจล มีเนื้อสัมผัสเนียน ซึมซาบสู่ผิวได้ดี ไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกเหนอะหนะเวลาทา ไม่เกิดการตกตะกอน และการแยกชั้น โดยทุกตำรับที่ได้เตรียมขึ้นมีลักษณะทางกายภาพที่ดีภายหลังเตรียมเสร็จ ดังแสดงในตารางที่ 4.12 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างของทุกตำรับอยู่ภายใต้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว มอก. 478-2555 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2555b) ที่กำหนดว่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ควรอยู่ในช่วง 3.5 ถึง 7.5 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว มผช.551/2547 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547) ที่กำหนดให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตองอยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 8.0



รูปที่ 4-15 ลักษณะของเนื้อเจลสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.8 ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับเจลแบบเร่งด้วยวิธี Heating and cooling cycle

นำตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละที่ 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่เตรียมได้ มาทำการทดสอบความคงตัวของตำรับเจลแบบเร่ง ด้วยวิธี Heating and cooling cycle จำนวน 6 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเจลก่อนและหลังการทดสอบ โดยการสังเกตดูลักษณะปรากฏ เช่น การแยกชั้น การเกิดฟองอากาศ กลิ่น สี ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่า เจลบำรุงผิวทุกตำรับมีความคงตัวดี ไม่ตกตะกอน ไม่

เกิดการแยกชั้น ไม่มีฟองอากาศ กลิ่น และสีไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงมากเมื่อเทียบกับค่าก่อนการทดสอบ โดยมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7 และความหนืดอยู่ในช่วง 20000 ถึง 26000 เซ็นติพอยด์

ตารางที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ

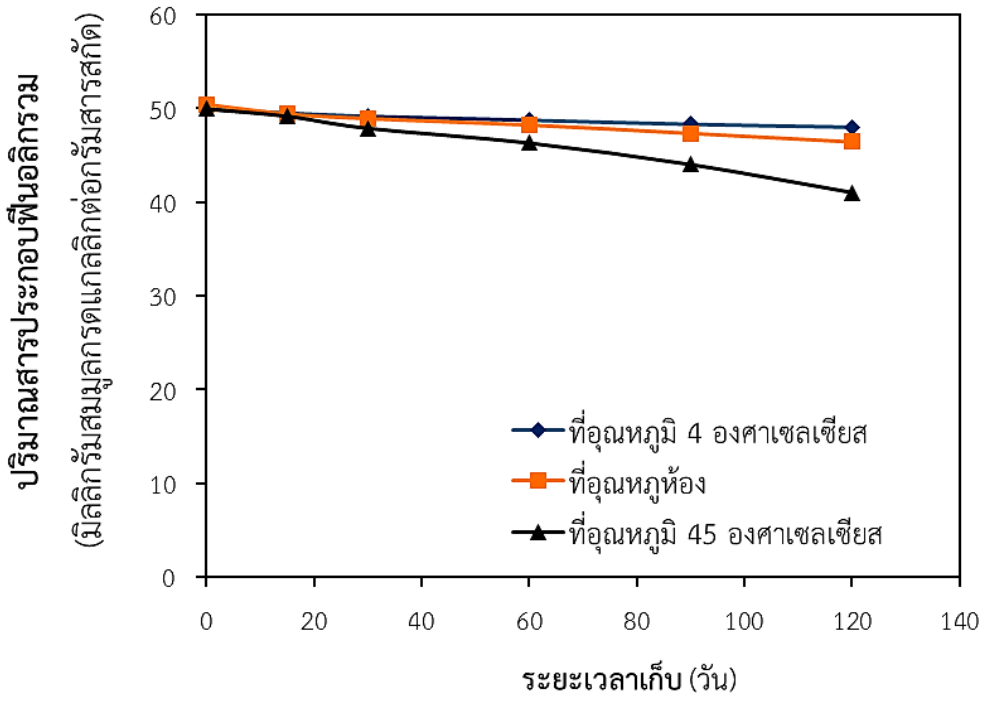
คุณลักษณะ	ก่อน Heating & Cooling cycle				หลัง Heating & Cooling cycle			
	ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3	ตำรับ 4	ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3	ตำรับ 4
ลักษณะเนื้อโลชั่น	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล	เนื้อเจล
การตกตะกอน	-	-	-	-	-	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	-	-	-	-	-	-
การเกิดฟองอากาศ	-	-	-	-	-	-	-	-
ความหนืด (cP)	25,718	25,114	22,950	20,484	25,925	25,236	23,164	20,539
pH	6.98	6.78	6.66	6.58	6.90	6.75	6.68	6.55
สี	-	-	+	++	-	-	+	++
กลิ่น	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ การวัดสีของตำรับ: (-) = เจลใส, (+) = เจลสีเหลืองอ่อน, (++) = เจลสีเหลืองเข้ม
การวัดกลิ่นของตำรับ: (-) = ไม่มีกลิ่น, (+) = มีกลิ่นเล็กน้อย, (++) = มีกลิ่นมาก
การตกตะกอน, การแยกชั้น, การเกิดฟองอากาศ ของตำรับ: (-) = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
(+) = เกิดการเปลี่ยนแปลง

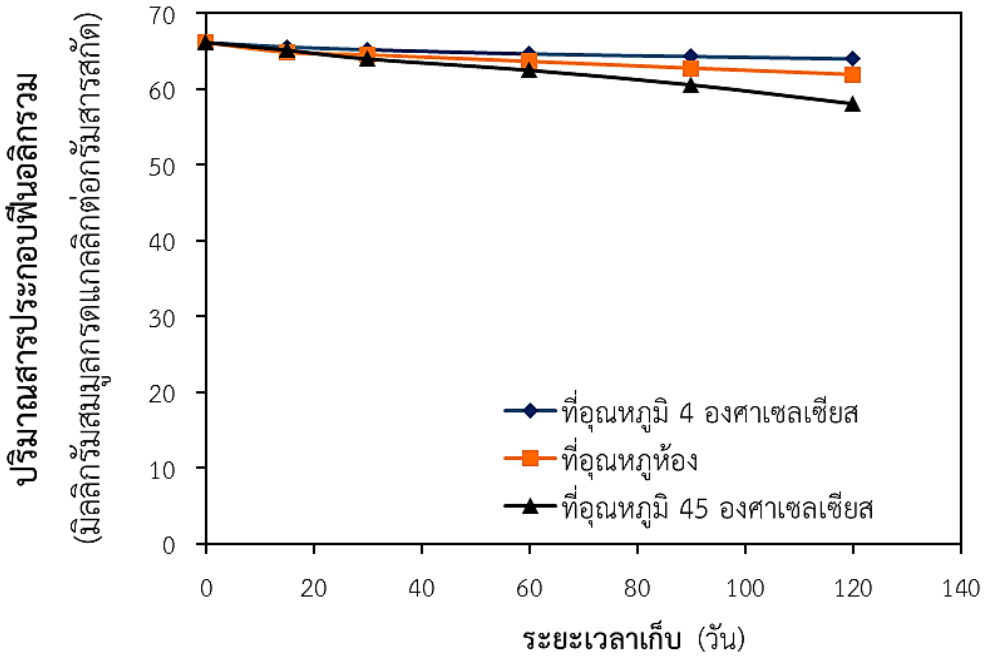
4.9 ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดในตำรับเจล

นำตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละที่ 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่เตรียมได้ เก็บไว้ในขวดกันแสงสีชาแยกตามสภาวะต่าง ๆ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ตู้อบ) เป็นเวลา 4 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์ตามช่วงเวลา คือ วันที่ 0, 15, 30, 60, 90 และ 120

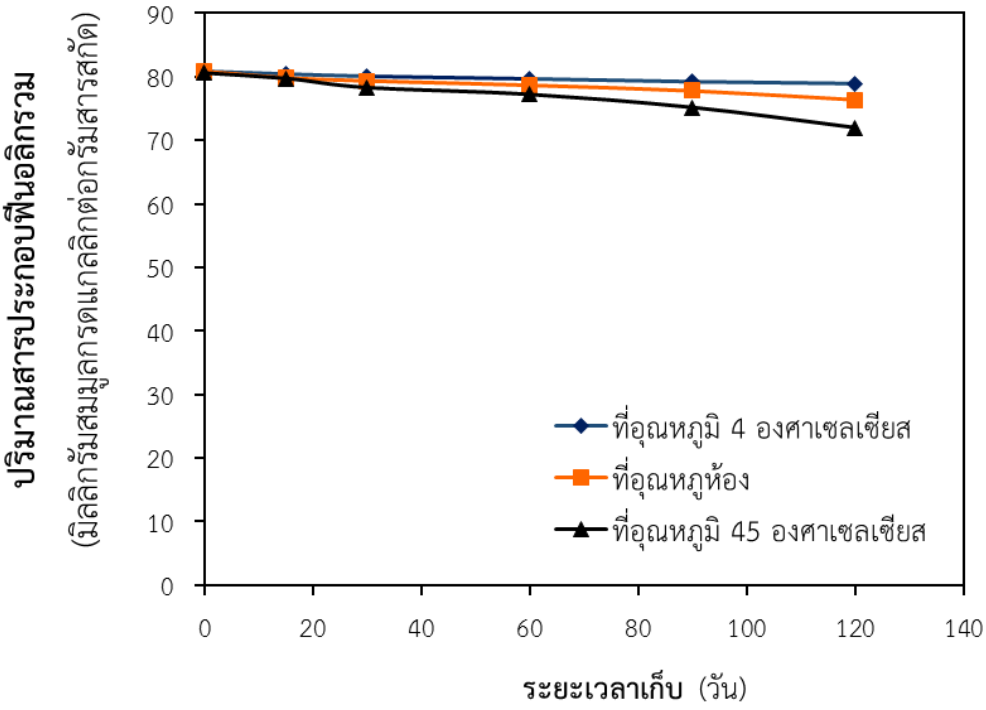
วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดในตำรับเจลตามช่วงเวลาต่างๆ โดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค ได้สมการดังนี้ $y = 1.9336x + 0.0207$, ($R^2 = 0.9982$) ที่การเก็บตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไว้ในสภาวะต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะมีค่าลดลง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16 ซึ่งที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งจากรูปที่ 4.16 จะเห็นว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัด



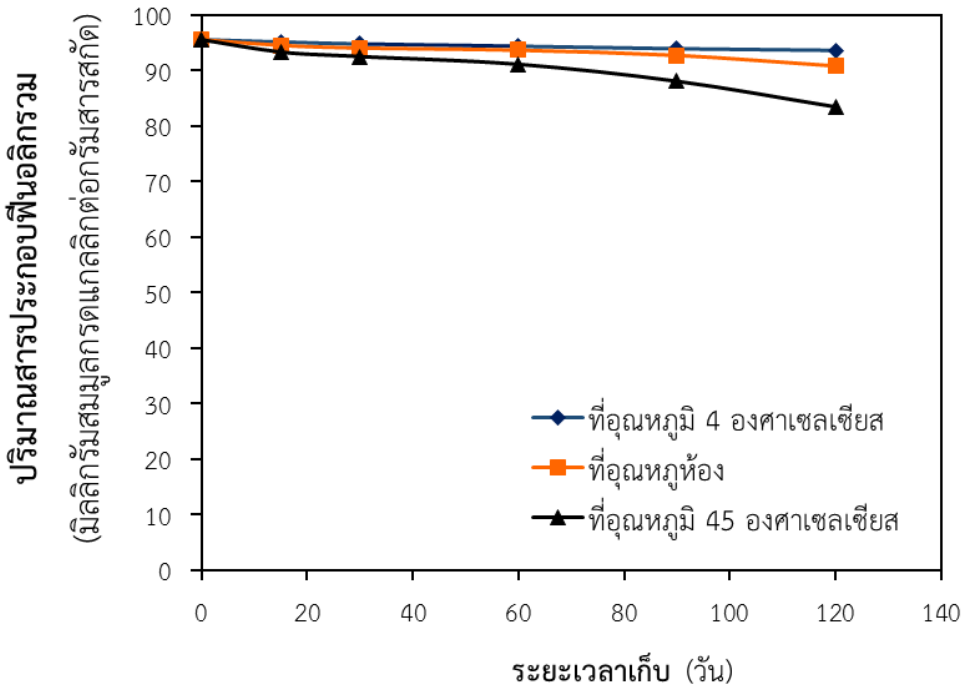
รูปที่ 4-16 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4-17 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4-18 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4-19 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในเจลบำรุงผิว ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ที่การเก็บเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสภาวะต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะมีค่าลดลง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17, 4.18 และ 4.19 ตามลำดับ ซึ่งที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เช่นเดียวกับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

จากผลการประเมินลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ความคงตัวของตำรับเจลแบบเร่ง และความคงตัวของสารสกัดในตำรับเจล พบว่า ตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก คุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และความคงตัวของเจลที่ดี มีลักษณะสีของเนื้อเจลที่ดูน่าใช้มากว่าตำรับเจลบำรุงผิวสูตรอื่น จึงนำตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไปทำการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับเจล คุณภาพทางประสาทสัมผัส การระคายเคืองต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพของเจลบำรุงผิวต่อความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนังต่อไป

4.10 ผลการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตำรับเจล

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่เตรียมได้ทันที ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า คุณลักษณะต่างๆ เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มอก. 152-2555 โดยมีค่าไม่เกินมาตรฐานกำหนด

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละเทียบกับค่าของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มอก. 152-2555

การตรวจสอบจุลินทรีย์	**มาตรฐานกำหนด**	**ค่าที่วัดได้**
จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์และราทั้งหมด	ต้องไม่เกินกว่า 1000 โคโลนีต่อกรัม	ตรวจไม่พบ
ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา	ต้องตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส	ต้องตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
แคนดิดา อัลบิแคนส์	ต้องตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
คลอสตริเดียม	ต้องตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
ฟีคัลโคลิฟอร์ม	ไม่กำหนด	ตรวจไม่พบ
ซาลโมเนลลา	ไม่กำหนด	ตรวจไม่พบ
โคลิฟอร์ม แบคทีเรีย	ไม่กำหนด	ตรวจไม่พบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

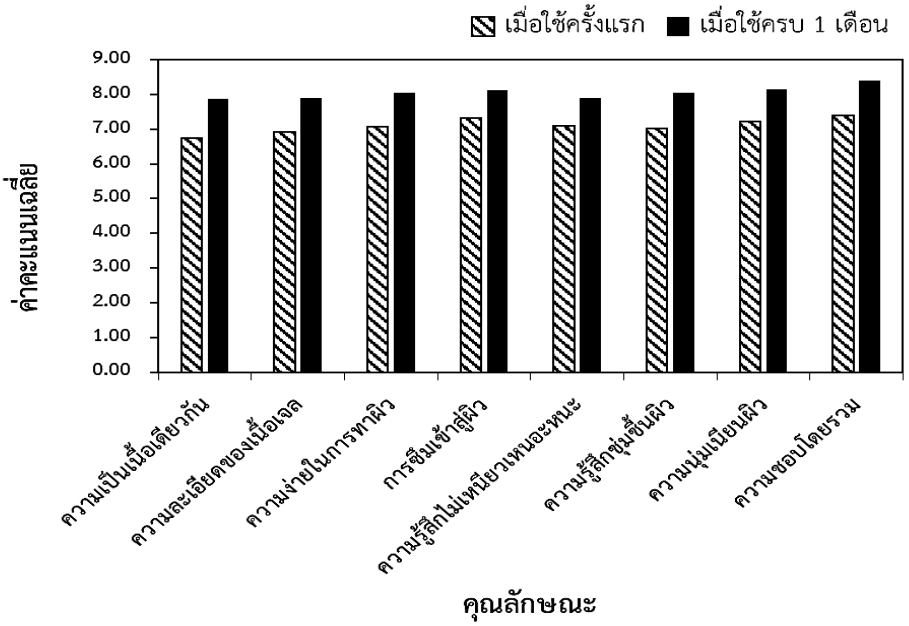
4.11 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

โดยใช้ผู้ทำทดสอบเป็นเพศหญิงจำนวน 30 คน ที่มีอายุระหว่าง 20 – 50 ปี เพื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับเจลบำรุงผิวที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด จากผลการสำรวจข้อมูลผู้ทำการทดสอบ สามารถแบ่งเป็นช่วงอายุได้ดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ช่วงอายุของผู้ทำการทดสอบ

อายุ	จำนวน	ร้อยละ
21 - 30 ปี	10	33.33
31 - 40 ปี	15	50.00
41 - 50 ปี	5	16.67
รวม	**30**	**100**

หลังจากที่ผู้ทดสอบได้ใช้เจลบำรุงที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละครบ 1 เดือน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.14 จะเห็นได้ว่า คุณลักษณะต่างๆ เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความละเอียดของเนื้อเจล ความรู้สึกไม่เหนียวเหนอะหนะ และความชอบโดยรวม อยู่ในระดับความพึงพอใจมาก และผู้ทำการทดสอบส่วนใหญ่มีความพึงพอใจต่อประสิทธิภาพของเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละในด้าน ความง่ายในการทา การซึมเข้าสู่ผิว ความชุ่มชื้นผิว และความนุ่มเนียนของผิวมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจระหว่างการใช้ครั้งแรกกับเมื่อใช้ครบ 1 เดือน พบว่าผู้ทดลองใช้มีความพึงพอใจต่อเจลบำรุงผิวเพิ่มขึ้นในทุกคุณลักษณะ ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และเมื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจระหว่างเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดกับเจลบำรุงผิวที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด พบว่า ผู้ทดสอบมีความพึงพอใจในเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดมากกว่าเจลบำรุงผิวที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด



รูปที่ 4-20 ผลการเปรียบเทียบการประเมินทางประสาทสัมผัสของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ เมื่อใช้ครั้งแรกกับเมื่อใช้ครบ 1 เดือน

ตารางที่ 4.14 ผลการประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสของตำรับครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ เมื่อใช้ครบ 1 เดือน

คุณลักษณะ	ค่าคะแนนเฉลี่ย±S.D.	การประเมินผล
ความเป็นเนื้อเดียวกัน	7.88 ± 0.96	ชอบมาก
ความละเอียดของเนื้อครีม	7.89 ± 0.92	ชอบมาก
ความง่ายในการทาผิว	8.05 ± 0.93	ชอบมากที่สุด
การซึมเข้าสู่ผิว	8.12 ± 1.07	ชอบมากที่สุด
ความรู้สึกไม่เหนียวเหนอะหนะ	7.90 ± 1.28	ชอบมาก
ความรู้สึกชุ่มชื้นผิว	8.05 ± 0.95	ชอบมากที่สุด
ความนุ่มเนียนผิว	8.15 ± 0.99	ชอบมากที่สุด
ความชอบโดยรวม	8.40 ± 0.85	ชอบมาก

หมายเหตุ S.D. หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากจำนวนผู้ทดสอบ 30 คน

4.12 ผลการประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

เมื่อใช้ผู้ทำการทดสอบจำนวน 30 คน เพื่อทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละที่ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.15 พบว่า ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือการระคายเคืองกับผิวของอาสาสมัคร

ตารางที่ 4.15 ผลการประเมินการเกิดอาการระคายเคืองของตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ

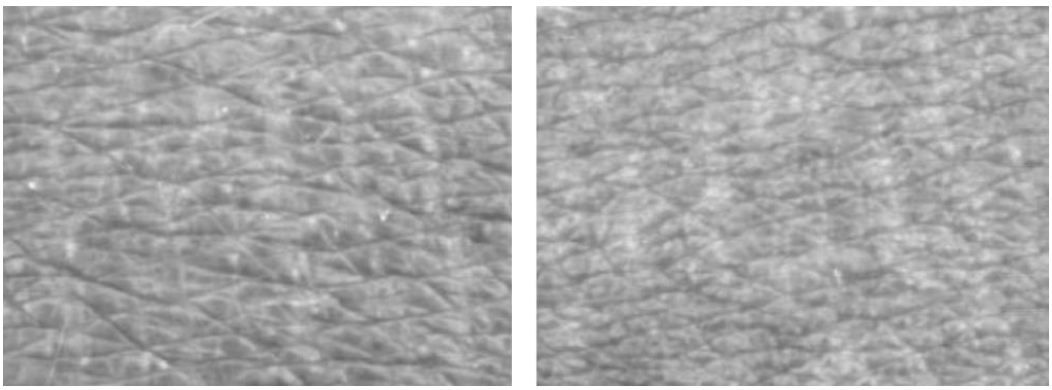
ชั่วโมง	คะแนน	อาการ
0	0	ไม่เกิดอาการบวมแดง
24	0	ไม่เกิดอาการบวมแดง
48	0	ไม่เกิดอาการบวมแดง
72	0	ไม่เกิดอาการบวมแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.13 ผลการประเมินความชุ่มชื้น และการลดริ้วรอยของผิวหนัง

เมื่อทดสอบการความชุ่มชื้นของผิวหนัง ด้วยเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยการเปรียบเทียบความชุ่มชื้นของผิวหนังของอาสาสมัครหลังจากใช้เจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดกับเจลที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด ด้วยเครื่อง Corneometer พบว่า ความชุ่มชื้นของผิวหนังเพิ่มขึ้นจาก 22.8 เปอร์เซ็นต์ เป็น 24.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเจลที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด

และเมื่อความสามารถของครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในการลดริ้วรอยของผิวหนัง โดยตรวจวัดลักษณะของพื้นผิวของผิวหนัง และปริมาณริ้วรอยบนผิวหนัง ด้วยเครื่อง Skin visiometer โดยเปรียบเทียบผิวหนังของอาสาสมัครก่อน และหลังจากใช้ตำรับครีม ดังแสดงในรูปที่ 4.21 พบว่า ลักษณะของพื้นผิวของผิวหนังเกิดการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้นภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์



(ก) (ข)

รูปที่ 4-21 ลักษณะของผิวของอาสาสมัครก่อน (ก) และหลังจากใช้ตำรับเจลบำรุงผิว (ข)

4.14 ผลการประเมินการเปลี่ยนแปลงระดับเม็ดสีเมลานิน และรอยแดงของผิวหนัง

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยการประเมินการเปลี่ยนแปลงระดับเม็ดสีเมลานิน และรอยแดงของผิวหนังหลังใช้เจลบำรุงผิว ด้วยเครื่อง Mexameter โดยการวัดค่า Melanin และค่า Erythem โดยเปรียบเทียบผลหลังใช้เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดกับเจลที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด พบว่า เจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไม่ทำให้ระดับเม็ดสีเมลานินและรอยแดงของผิวหนังเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำรับเจลบำรุงผิวมีความปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลงานวิจัย

5.1.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดสละ

จากการศึกษาองค์ประกอบของเมล็ดสละ พบว่าองค์ประกอบหลักของเมล็ดสละจะเป็นสารคาร์โบไฮเดรต รองลงมาคือ ปริมาณเส้นใยและโปรตีน ตามลำดับ

5.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากการศึกษาการสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลายโดยหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด พบว่า การสกัดเมล็ดสละขนาดเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ด้วยสารละลายเอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ค่าผลได้สารสกัดหยาบ เท่ากับ 12.322 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 67.393 ± 2.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 505 มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด โดยค่าผลได้สารสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน

5.1.3 ผลการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดก่อนตั้งตำรับ

จากการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดเมล็ดสละ พบว่า สารสกัดมีความคงตัวดี เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยสารสกัดจะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงสรุปได้ว่า สารสกัดมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิต่ำ และควรเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้สารสกัดไม่เกิดเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี อย่างน้อยเป็นเวลาประมาณ 4 เดือน

5.1.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละ พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายตัวทำละลายเอทานอล มีผลยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยที่สุด เมื่อเทียบกันระหว่างชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายทุกชนิด สามารถยับยั้ง

แบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ส่วนการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเดียวกัน พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อ *S. aureus*

โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเมล็ดสละในการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่า มีค่าเท่ากับ 1.25, 0.625 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นสารสกัดที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ WI-38 ลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง มีค่าเท่ากับ 1.48 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น จะทำให้การแตกสลายของเซลล์เพิ่มขึ้นอีกด้วย

5.1.5 ผลการศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละ

จากการศึกษาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากเมล็ดสละ ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า ในสารสกัดเมล็ดสละประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ คือ กรดแทนนิค (Tannic acid) และกรดแกลลิค (Gallic acid) ปริมาณ เท่ากับ 27.24 และ 11.26 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

5.1.6 ผลการศึกษาพัฒนาตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

จากผลการศึกษาการพัฒนาตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ โดยทำการคัดเลือกครีมสูตรพื้น จำนวน 2 สูตร คือ สูตรที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion (BF Goodrich Specialty Chemicals, 1999) และสูตรที่ดัดแปลงจากตำรับเจล (สมบูรณ์ และ วารี, 2557) โดยทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และการประเมินความคงตัวแบบเร่ง ด้วยวิธี Heating and cooling cycle พบว่า ครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจากตำรับเจล มีความคงตัวดีกว่าครีมสูตรพื้นที่ดัดแปลงจาก Hand and body lotion โดยเนื้อครีมไม่เกิดการตกตะกอน การแยกชั้น สี และกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างช่วงเวลาก่อนและหลังการทดสอบ และค่าความเป็นกรด-ด่าง กับ ค่าความหนืดมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยหลังการทดสอบ

และเมื่อทำการพัฒนาตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่ 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี ความคงตัวแบบเร่ง และความคงตัวของสารสกัดในตำรับเจล พบว่า ตำรับเจลบำรุงผิวทั้ง 4 ตำรับ มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7 และความหนืดอยู่ในช่วง 20,000 ถึง 26,000 เซ็นติพอยด์ มีลักษณะเป็นเนื้อเจล เนื้อสัมผัสเนียน ซึมซาบสู่ผิวได้ดี ไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกเหนอะหนะเวลาทา ไม่เกิดการตกตะกอน การแยกชั้น โดยทุกตำรับมีลักษณะทางกายภาพที่ดีภายหลังเตรียมเสร็จ และเมื่อนำตำรับเจลบำรุงผิวทั้ง 4 ตำรับไปทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating and Cooling cycle และความคงตัวของสารสกัดใน

ตำรับเจล พบว่า เจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละทั้ง 4 ตำรับ มีความคงตัวดี ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อเจลหลังการทดสอบ โดยตำรับเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละที่ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีลักษณะสีของเนื้อเจลที่ดูน่าใช้มากว่าตำรับเจลสูตรอื่น

และเมื่อนำเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไปทำการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ คุณภาพทางประสาทสัมผัส ประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนังและความชุ่มชื้นของผิวและประสิทธิภาพในการลดริ้วรอยของผิวหนัง พบ เจลบำรุงผิวมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพอยู่ภายใต้มาตรฐานอุตสาหกรรมเครื่องสำอางไทยและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน และเป็นที่พึงพอใจของผู้ที่ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์โดยอยู่ในเกณฑ์ที่ดี โดยไม่ก่อให้เกิดการแพ้ หรือการระคายเคืองต่อผิว และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง และสามารถลดเลือนริ้วรอยของผิวหนังได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษากรรมวิธีในการสกัดเมล็ดสละในระดับการขยายกำลังผลิตเพื่อสามารถนำไปต่อยอดในทางอุตสาหกรรม

5.2.2 ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดสละเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในด้านอื่นต่อไปในอนาคต

5.2.3 ควรมีการศึกษาความคงตัวของเจลบำรุงผิวที่ระยะเวลานานขึ้น และศึกษาประสิทธิภาพของเจลบำรุงผิวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 ปี เพื่อทราบถึงวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์

5.2.4 ควรทำการพัฒนาตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ เพื่อเพิ่มความคงสภาพของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

5.2.5 ควรทำการพัฒนาตำรับเจลบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละในด้านกลิ่นหอมเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นหอมน่าใช้มากยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

Aralas, S., Mohamed, M., & Abu Bakar, M. F. (2009). Antioxidant properties of selected salak (*Salacca Zalacca*) varieties in Sabah, Malaysia. *Nutrition & Food Science, 39*(3), 243-250.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Md. Mokhlesur, R., Khan, S., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering, 117*(4), 426–436.

BF Goodrich Specialty Chemicals. (1999). Hand and body lotion. Retrieved 18 August, 2014, from http://www.happi.com/special/1099form.html

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Food Process Engineering, 59*, 379-389.

Chung, K. T., Wei, C. I., & Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology, 9*(4), 168-175.

Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International, 44*(7), 2047-2053.

Escribano-Bailon, T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1992). Characterization of procynidins of Vitis vinifera variety tinta del pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*, 1794–1799.

Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y.-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., . . . Jang, H. G. (2009). The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chemical Toxicology, 47*(8), 1884-1891.

Haruenkit, R., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Sajewicz, M., Kowalska, T., . . . Gorinstein, S. (2007). Comparative study of health properties and nutritional value of durian, mangosteen, and snake fruit: Experiments in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 5842-5849.

He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., & Gao, Y. (2011). Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues

and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS^{+} assay. *Food Research International, 44*(5), 1161-1167.

Kanlayavattanakul, M., Lourith, N., Ospondpant, D., Ruktanonchai, U., Pongpunyayuen, S., & Chansriniyom, C. (2013). Salak plum peel extract as a safe and efficient antioxidant appraisal for cosmetic. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77*(5), 1068-1074.

Leela, T., & Satirapipathkul, C. (2011). *Studies on the antibacterial activity of Quercus infectoria galls*. Paper presented at the 2011 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE, Singapore.

Lim, T. K. (2012). *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1): Springer Netherlands.

List, P. H., & Schmidt, P. C. (1989). *Phytopharmaceutical technology*. London: Heyden and Son Limited.

Luthria, D. L., & Mukhopadhyay, S. (2005). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 41-47.

Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry, 104*(3), 1258-1268.

Mokhtar, S. I., Leong, P. C., Ven, L. E., & Aziz, N. A. A. (2014). Total phenolic contents, antioxidant activities and organic acids composition of three selected fruit extracts at different maturity stages *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science, 2*, 40-46

Ong, S. P., & Law, C. L. (2012). Extraction of antioxidant phenolic compounds from salak fruit. Retrieved 4 July, 2014, from http://www.researchgate.net/publication/268202700_Extraction_of_Antioxidant_Phenolic_Compounds_from_Salak_Fruit

Pyla, R., Kim, T.-J., Silva, J. L., & Jung, Y.-S. (2010). Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International Journal of Food Microbiology, 137*(2–3), 154-160.

Reynolds, L. D., & Wilson, N. G. (1991). *Scribes and Scholars* (3 ed.): Oxford.

Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry, 92*(2), 235-254.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry, 30*(12), 3875-3883.

Schwartz, N. O. (1975). Adaptation of the sensory texture method to skin care products. *Journal of Texture Studies, 6*(1), 33-42.

Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Food Microbiol, 117*, 112-119.

Shui, G., & Leong, L. P. (2005). Screening and identification of antioxidants in biological samples using High-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application on *Salacca edulis* Reinw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 880–886.

Soong, Y.-Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry, 88*(3), 411-417.

Sun, T., & Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry, 90*, 743-749.

Thumsongmuang, S. (2010). *Development and application of standardized lychee seed extract for anti-wrinkle cosmetic.* Master of Science in Phamaceutical Sciences, Chiang Mai University.

Walter, W. M., Purcell, A. E., & McCollum, G. K. (1979). Use of high-pressure liquid chromatography for analysis of sweet potato phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*(5), 938–941.

Waterhouse, A. L. (2002, Aug 08, 2012). Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. Retrieved 22 July, 2014, from http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteau-micro-method-for-total-phenol-in-wine

Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., & Sato, T. (1994). Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 42*, 1663-1165.

กรมวิชาการเกษตร. (2550). การปลูกสละ. Retrieved 20 กรกฎาคม, 2557, from http://www.doa.go.th/Pl_data/20_LOCAL/oard6/Sala/main.html

จันทร์จารึก รัตนเดชสกุล. (2550). การพัฒนาตำรับครีมและเจลสารสกัดเอ็คไคนาเซีย เพอร์พูเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่. (2551). กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเตา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ทรงศิริ วงศ์จิตตภิญโญ, ชนิตา โชติรสเวคิน และ ศศิธร ตรงจิตภักดี. (2552). ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด. Paper presented at the การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพร ลีลา. (2553). ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นงเยาว์ ชูสุข. (2547). การพัฒนาโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยแพทชูลิ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิดดา หงส์วิวัฒน์ และ ทวีทอง หงส์วิวัฒน์. (2550). ผลไม้ *111* ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แสงแดด.

บุหรัน พันธุ์สววรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ *21, 3*, 275-286.

ปริยานุช อินทร์รอด. (2551). ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์, ราม แย้มแสงสังข์ และ กุลชนาฐ ประเสริฐสิทธิ์. (2550). การสกัดพรีไบโอติกส์จากเมล็ดขนุนและเปลือกตาลโตนดด้วยเครื่องสกัดแบบแบทช์.

ผุสดี ตังวัชรินทร์. (2554). ความคงตัวและกิจกรรมการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำต่อการต้านเชื้อ Coagulase Positive Staphylococcus aureus ที่แยกจากเนื้อสุกร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่*29, 3*(2), 28-36.

พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล. (2546). ผลของเวลาที่มีต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในใบติ้ว (Cratoxylum formosum Dyer.) ใบกระโดนบก (Careya sphaerica Roxb.) และใบ

ผักหวานบ้าน (Sauropus andrugynus Merr.). วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ปีที่ *23*, 66-77.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2556). สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds). Retrieved 20 กรกฎาคม, 2014, from https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. (2532). เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง (1 ed.). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฟรินน์.คอม. (2556). สละ สรรพคุณประโยชน์ของสละ 15 ข้อ (Salak). Retrieved 4 กรกฎาคม, 2557, from http://frynn.com/%E0%B8%AA%E0%B8%A5%E0%B8%B0/

มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 22-2556. (2557). สละ. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 131 ตอน พิเศษ 31ง วันที่ 13 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2557.

วรรณพิชญ์ จุลกัลป์, ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์ และ ราม แย้มแสงสังข์. (2553). ศึกษาการสกัดพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีโนลิกส์จากเมล็ดขนุน. Paper presented at the การประชุมวิชาการทางวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ครั้งที่ 8, วันที่ 22-23 เมษายน 2553, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วันเชิง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. (2554). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, *16*(1), 47-55.

วีรยุทธ โตสิงหราช และ จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. (2552). การเปรียบเทียบตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการสกัดสารประกอบฟินอลิกจากรำข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 776-783.

สมบูรณ์ เจตลีลา และ วารี ลิมป์วิกรานต์. (2557, 18/05/2557). ผลิตภัณฑ์สมุนไพรตอนที่ 3: สนุกกับการผลิตเจลสมุนไพร. Retrieved 18/07/2557, from http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/195/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%97%E0%B8%B3-%E0%B9%80%E0%B8%88%E0%B8%A5%E0%B8%AA%E0%B8%A1%E0%B8%B8%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A3/

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2547). มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน:ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว มผช.๕๕๑/๒๕๔๗.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2555a). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง: ข้อกำหนดทั่วไป มอก.*152-2555*.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2555b). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว มอก. *478-2555*.

สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และ เพชรลดา เดชายืนยง. (2012). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น, *17*(6), 880-884.

เสาวนีย์ กระสานติสุข และ หทัยชนก รุณรงค์. (2549). การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: บริษัท นิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด.

ไพรวรรณ์ บุญวงษ์. (2550). ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ปริมาณค่าผลได้สารสกัดหยาบ

ค่าผลได้สารสกัดหยาบ สามารถคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\%\text{Yield (dry weight basis)} = (W_1 / W_2) \times 100$$

W_1= น้ำหนัก (กรัม) สารสกัดหลังจากระเหยตัวทำละลายออก

W_2= น้ำหนักแห้ง (กรัม) ของตัวอย่าง

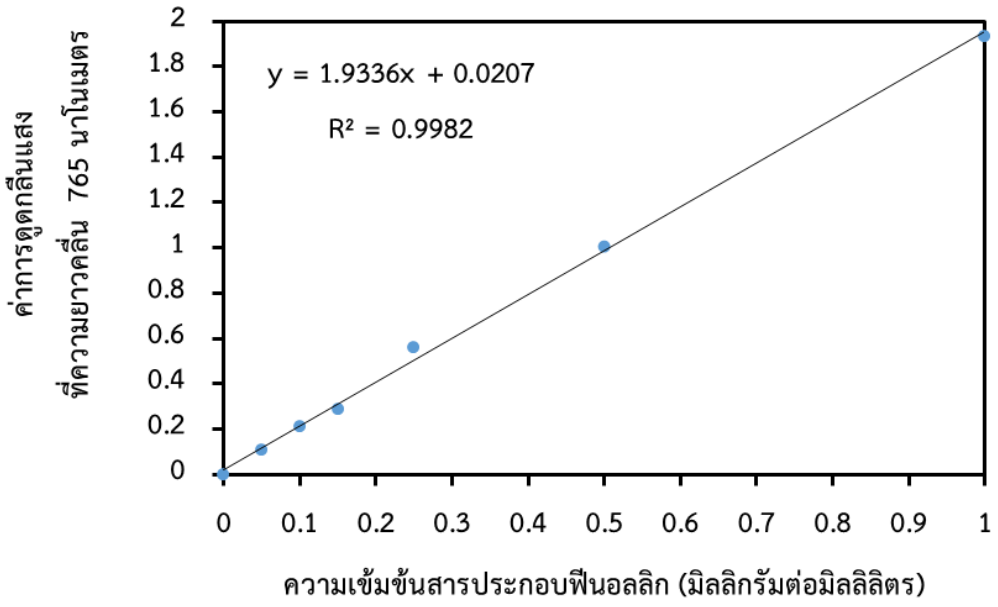
2. การวิเคราะห์หาความเข้นข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก จะเป็นการวัดค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds) โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธี Folin Ciocalteau micro method (Waterhouse, 2002) โดยนำตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร และ Folin ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไปผสมเข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ได้

3. การสร้างกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

การสร้างกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้สารละลายมาตรฐานคือ กรดแกลลิค โดยทำการเตรียมกรดแกลลิค 0.5 กรัมผสมกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในปริมาตร 1, 2, 3, 5, 10, 20 และ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแกลลิคที่เตรียมได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 มิลลิลิตร และ Folin ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 200

กรัมต่อลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไปผสมเข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และนำค่าความเข้มข้นของกรดแกลลิคและค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นมาพลอตกราฟ จะได้กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิกแสดงดังรูปที่ ก-1



รูปที่ ก- 1 กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. การหาค่าผลได้สารประกอบฟีนอลิกรวม

ค่าผลได้สารประกอบฟีนอลิกรวม สามารถหาได้จากค่าความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก โดยนำมาแทนในสูตรดังต่อไปนี้

$$C = \frac{c \cdot (V2 + V3)(V1/V2)}{M}$$

โดยที่ C คือ ค่าผลได้สารประกอบฟีนอลิก
(มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด)

c คือ ความเข้มข้นสารสกัดฟีนอลิก (มิลลิกรัมสมมูลแกลลิคต่อมิลลิลิตร)

V_1 คือ ปริมาตรที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)

V_2 คือ ปริมาตรที่ดึงมาเจือจาง (มิลลิลิตร)

V_3 คือ ปริมาตรที่เติมเพื่อเจือจาง (มิลลิลิตร)

M คือ น้ำหนักสารสกัด (กรัม)

5. การวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยดัดแปลงวิธีการของ Yamasaki และคณะ (Yamasaki et al.) โดยใช้สารละลายมาตรฐานคือ โทรล็อกซ์ (Trolox) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย DPPH 2.4 มิลลิกรัมกรัม ในเอทานอลเข้มข้น 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร โดยใช้แบลงค์ (blank) เป็นตัวอย่างสารสกัด 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 100 ไมโครลิตร และใช้สารละลายควบคุม (control) เป็นเอทานอล 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร และสารละลายควบคุมแบลงค์ (blank control) เป็นเอทานอล 100 ไมโครลิตร ผสมกับเอทานอล 100ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ก็ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการข้างต้นเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัด โดยเปลี่ยนจากตัวอย่างสารสกัดเป็นสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) แทน โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition)

การคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) โดยสูตร ดังนี้คือ

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - \frac{A_{sample} - A_{sampleblank}}{A_{control}}] \times 100$$

โดย A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่เติมสารละลาย DPPH

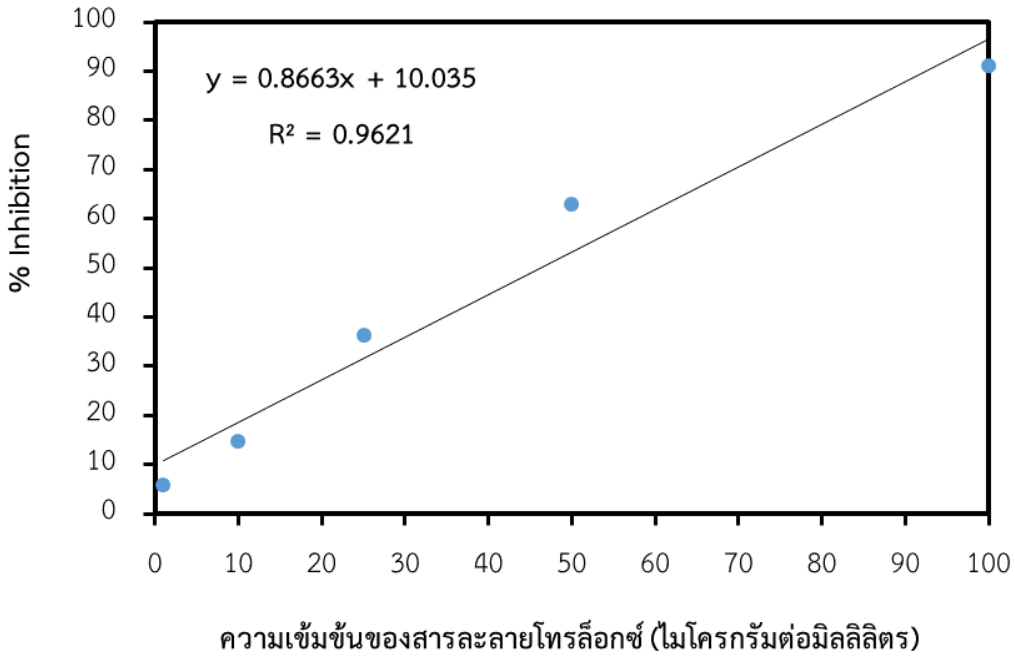
$A_{sample\ blank}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ไม่เติมDPPH

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารDPPHที่ไม่เติมสารตัวอย่าง

6. การหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ทำการพลอตกราฟระหว่างค่า % Inhibition กับค่าความเข้มข้นของสาร จะได้สมกาเส้นตรง คือ y=mx+c เมื่อ y คือ ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) และ X คือ ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วทำการคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ ก-2



รูปที่ ก- 2 กราฟค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

จากรูปที่ จะสามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 46.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

หาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยแสดงผลเป็น Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) หน่วยเป็น มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด โดยนำค่า IC_{50} ของตัวอย่างสารสกัดมาคำนวณเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์

8. คำนวณค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% viability)

$$\% \text{ Cell viability} = [\frac{A_{sample}}{A_{control}}] \times 100$$

โดย

% Cell viability = ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ใส่สารสกัดแต่ละความเข้มข้น

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ใส่สารสกัด

9. ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ปอดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ทำการพลอตกราฟระหว่างค่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% Viability) กับค่าความเข้มข้นของสาร จะได้สมกาเส้นตรง คือ y=mx+c เมื่อ y คือ ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% Viability) และ X คือ ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วทำการคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ภาคผนวก ข

ข้อมูลทางการทดลอง

ตารางที่ ข- 1 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ N=3

ชนิดของตัวทำละลาย	**สารสกัดหยาบที่ได้** (กรัม/100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม** (mg GAE/g crude extract)	
	1:5	**1:10**	**1:5**	**1:10**
เฮกเซน	1.820 ± 0.02	3.786 ± 0.06	6.590 ±0.03	10.865 ± 0.03
ไดคลอโรมีเทน	2.920 ± 0.01	9.580 ± 0.59	12.310 ± 0.20	48.965 ±3.40
เอทานอล	8.533 ± 0.12	19.753 ± 0.31	27.110 ±0.09	86.471 ± 1.35

ตารางที่ ข- 2 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ที่ N=3

อัตราส่วน	**ชนิดตัวทำละลาย**	IC_{50} (ug/ml)	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
1:5	เฮกเซน	552	84
	ไดคลอโรมีเทน	379	122
	เอทานอล	121	381
1:10	เฮกเซน	399	116
	ไดคลอโรมีเทน	210	220
	เอทานอล	89	518

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ข- 3 ผลของความเข้มข้นตัวทำละลายเอทานอลต่อปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ N=3

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	**ระยะเวลา** (ชั่วโมง)	**สารสกัดหยาบที่ได้** (กรัม/100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม** (mg GAE/g crude extract)
60	1	7.465 ± 0.28	36.663 ± 0.20
	2	9.776 + 0.13	41.759 ± 1.06
	4	12.150 ± 0.11	67.247 ± 0.63
	6	12.547 ± 0.02	66.373 ± 0.41
80	1	4.079 ± 0.02	26.818 ± 1.10
	2	5.350 ± 019	27.877 ± 3.14
	4	6.249 ± 0.04	30.912 ± 0.40
	6	6.635 ± 0.21	32..079± 1.36
95	1	1.153 ± 0.16	9.447 ± 0.15
	2	1.597 ± 0.02	14.644 ± 1.66
	4	1.998 ± 0.02	19.703 ± 2.45
	6	2.223 ± 0.12	19.240 ± 1.43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข- 4 ผลของความเข้มข้นตัวทำละลายเอทานอลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	**ระยะเวลา** (ชั่วโมง)	IC_{50} (ug/ml)	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
60	1	109	422
	2	99	467
	4	91	506
	6	84	548
80	1	116	397
	2	110	421
	4	102	451
	6	97	476
95	1	137	336
	2	133	347
	4	121	383
	6	113	410

ตารางที่ ข- 5 ผลของขนาดผงเมล็ดสละต่อปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ N=3

ขนาดผงเมล็ดสละ (ไมโครเมตร)	**สารสกัดหยาบที่ได้** (กรัม/100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม** (mg GAE/g crude extract)
< 150	12.322 ± 0.51	67.393 ± 2.72
300-425	9.760 ± 0.13	50.185 ± 0.54
>850	8.944 ± 0.11	44.611 ± 4.22

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ข- 6 ผลของขนาดผงเมล็ดสละต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ขนาดผงเมล็ดสละ (ไมโครเมตร)	**IC_{50}** (ug/ml)	**ค่า TEAC** (mg Trolox/g crude extract)
< 150	91	505
300-425	96	477
>850	111	413

ตารางที่ ข- 7 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิกรวม

ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg/ml)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร**			
	1	**2**	**3**	**เฉลี่ย**
0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.05	0.109	0.109	0.109	0.109
0.10	0.211	0.211	0.210	0.211
0.15	0.286	0.286	0.286	0.286
0.25	0.561	0.560	0.561	0.561
0.50	1.008	1.008	1.008	1.008
1.00	1.934	1.935	1.934	1.934

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข- 8 ผลของชนิดตัวทำละลายต่อค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ที่ N=3

อัตราส่วน	ชนิดตัวทำละลาย	% Inhibition ± S.D. ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ				
		50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml
1:5	เฮกเซน	0.805±0.82	4.405±4.04	22.618±1.30	37.089±0.68	51.253±0.46
	ไดคลอโรมีเทน	6.203±2.06	14.805±1.54	25.317±2.68	50.548±0.94	58.421±1.52
	เอทานอล	18.482±1.04	47.14±0.98	63.079±1.96	86.117±0.80	90.324±1.14
1:10	เฮกเซน	1.395±0.38	6.423±0.34	28.792±5.36	46.089±0.03	57.253±2.31
	ไดคลอโรมีเทน	9.254±5.19	19.33±1.26	37.818±1.34	72.255±6.84	78.421±5.24
	เอทานอล	27.933±1.58	54.749±1.58	79.609±1.19	93.575±1.19	98.324±0.79

ตารางที่ ข- 9 ผลของความเข้มข้นตัวทำละลายเอทานอลต่อค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ที่ N=3

ความเข้มข้นของตัวทำละลาย	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	% Inhibition ± S.D. ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ				
		50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml
60% Ethanol	1	24.914±0.35	45.183±5.44	72.839±4.47	85.194±4.52	90.183±1.63
	2	49.702±0.62	49.702±0.85	75.005±1.06	89.160±0.76	95.473±2.17
	4	30.021±3.89	51.841±0.19	79.598±2.49	93.206±2.38	98.013±2.01
	6	29.708±2.56	55.910±2.40	83.996±3.42	94.142±2.14	99.202±0.36
80% Ethanol	1	23.824±0.82	43.888±0.62	69.984±0.36	81.044±0.71	89.912±5.09
	2	21.211±5.77	46.609±5.19	76.045±1.06	85.946±4.25	94.956±3.81
	4	23.478±7.33	47.971±0.28	78.460±2.87	90.054±1.46	98.116±0.94
	6	24.629±0.58	51.500±0.68	80.173±2.06	90.660±4.11	98.485±0.74
95% Ethanol	1	17.542±3.94	39.173±2.56	62.736±1.69	77.798±5.12	88.221±1.12
	2	15.231±9.47	39.303±6.43	66.012±7.98	82.827±4.45	90.309±0.09
	4	19.038±2.22	42.596±1.10	69.790±0.73	85.495±1.77	92.749±0.03
	6	19.087±0.17	49.596±3.82	70.660±0.85	87.162±2.98	92.875±0.49

ตารางที่ ข- 10 ผลของขนาดผงเมล็ดสละที่ต่อค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ที่ N=3

ขนาดผงเมล็ดสละ (µm.)	% Inhibition ± S.D. ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ				
	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml
< 150	30.077±0.24	50.058±6.03	79.076±1.84	93.025±0.61	97.981±1.11
300-425	28.542±3.35	48.077±1.88	77.141±1.96	91.190±2.97	94.859±1.27
>850	23.512±0.42	42.560±4.63	71.429±8.42	90.476±10.94	93.512±4.21

ตารางที่ ข- 11 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ได้จากการสกัดผงเมล็ดสละที่ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

อัตราส่วน	ชนิดตัวทำละลาย	IC_{50} (ug/ml)	สมการเส้นตรง	R^2
1:5	เฮกเซน	552	y = 22.919x - 94.724	0.9422
	ไดคลอโรมีเทน	379	y = 23.91x – 92.00	0.9208
	เอทานอล	121	y = 32.091x - 104.14	0.9698
1:10	เฮกเซน	399	y = 26.119x - 106.44	0.9527
	ไดคลอโรมีเทน	210	y = 32.758x - 125.18	0.9209
	เอทานอล	89	y = 31.912x - 93.405	0.9718

ตารางที่ ข- 12 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ได้จากการสกัดผงเมล็ดสละที่ขนาดต่างๆ

ขนาดผงเมล็ดสละ (ไมโครเมตร)	**IC_{50}** (ug/ml)	**สมการเส้นตรง**	**R^2**
< 150	91	y = 31.65x - 92.854	0.9735
300-425	96	y = 31.14x - 92.307	0.9682
>850	111	y = 33.114x - 106.13	0.9687

ตารางที่ ข- 13 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ได้จากการสกัดผงเมล็ดสละด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	**ระยะเวลา** (ชั่วโมง)	**IC_{50}** (ug/ml)	**สมการเส้นตรง**	**R^2**
60	1	109	y = 30.247x - 92.013	0.9732
	2	99	y = 22.691x - 44.979	0.9168
	4	89	y = 31.443x - 91.295	0.9737
	6	84	y = 31.637x - 90.239	0.9633
80	1	116	y = 29.947x - 92.402	0.9871
	2	110	y = 33.225x - 106.05	0.9784
	4	102	y = 33.982x - 107.20	0.9782
	6	97	y = 33.271x - 102.15	0.9746
95	1	137	y = 31.649x - 105.79	0.9945
	2	133	y = 34.173x - 117.15	0.9855
	4	121	y = 33.620x - 111.10	0.9841
	6	113	y = 32.813x – 105.00	0.9738

ตารางที่ ข- 14 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

ความเข้มข้นของสารละลายโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**% Inhibition**
1	5.952
10	14.881
25	36.310
50	63.095
100	91.071

ตารางที่ ข- 15 ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

สารละลายโทรล็อกซ์	**IC_{50}** (ug/ml)	**สมการเส้นตรง**	**R^2**
	46.13	y = 0.8663x + 10.035	0.9621

ตารางที่ ข- 16 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดสละที่ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส** (มิลลิเมตร)								
	E. coli			***B. subtilis***			***S. aureus***		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
เฮกเซน	6.4	8.7	7.9	12.3	16.5	15.6	10.8	14.2	11.2
ไดคลอโรมีเทน	13.1	15.3	11.5	15.8	16.9	13.8	15.8	17.1	18.3
เอทานอล	17.6	16.3	18.3	17.5	19.0	20.1	19.6	19.4	20.4

ตารางที่ ข- 17 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ปอดของมนุษย์ (เซลล์ WI-38) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	**ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์**	**ค่าความคลาดเคลื่อน**
0	100.00	0.015
0.01	98.85	0.021
0.02	95.81	0.018
0.05	89.36	0.005
0.16	84.02	0.024
0.50	74.81	0.007
1.58	44.89	0.051
5.00	21.12	0.029
15.81	14.59	0.024

ตารางที่ ข- 18 องค์ประกอบของเมล็ดสละ

องค์ประกอบ	**ปริมาณ** (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)
โปรตีน	5.6
ไขมัน	-
เส้นใย	11.56
คาร์โบไฮเดรต	82.84
ความชื้น	8.41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข- 19 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากการทดสอบความคงสภาพของตำรับครีม โดยการเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน ที่ N=3

สูตรครีม	วันที่	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ย (mg GAE/g crude extract) ± S.D.					
		0	15	30	60	90	120
ตำรับ 1	ที่อุณหภูมิ 4°C	153.074 ± 0.30	149.281 ± 0.00	144.885 ± 0.00	136.007 ± 0.30	131.008 ± 0.54	126.095 ± 0.15
	ที่อุณหภูมิห้อง	153.074 ± 0.30	143.851 ± 0.00	137.214 ± 0.15	127.301 ± 0.00	115.062 ± 0.15	107.1312 ± 0.00
	ที่อุณหภูมิ 45 °C	153.074 ± 0.30	138.765 ± 0.30	129.629 ± 0.52	111.528 ± 0.00	95.926 ± 0.30	88.514 ± 0.00
ตำรับ 2	ที่อุณหภูมิ 4°C	230.735 ± 0.45	226.598 ± 0.52	217.375 ± 0.39	203.584 ± 0.52	190.482 ± 0.15	182.208 ± 1.22
	ที่อุณหภูมิห้อง	230.735 ± 0.45	214.272 ± 0.60	207.290 ± 0.15	185.224 ± 0.00	169.709 ± 0.00	161.176 ± 0.52
	ที่อุณหภูมิ 45 °C	230.735 ± 0.45	205.911 ± 0.00	186.517 ± 0.52	175.140 ± 0.00	150.746 ± 0.30	140.058 ± 0.30
ตำรับ 3	ที่อุณหภูมิ 4°C	282.452 ± 0.45	272.195 ± 0.30	267.713 ± 0.26	248.319 ± 0.26	234.356 ± 0.00	230.994 ± 0.00
	ที่อุณหภูมิห้อง	282.452 ± 0.45	265.731 ± 0.30	261.593 ± 0.54	241.165 ± 0.15	220.651 ± 0.00	215.134 ± 0.30
	ที่อุณหภูมิ 45 °C	282.452 ± 0.45	253.922 ± 0.15	249.095 ± 0.00	233.58 ± 0.00	218.323 ± 0.00	207.463 ± 0.52
ตำรับ 4	ที่อุณหภูมิ 4°C	323.101 ± 0.00	326.239 ± 0.54	319.085 ± 0.39	310.121 ± 0.00	300.209 ± 0.30	291.848 ± 0.30
	ที่อุณหภูมิห้อง	323.101 ± 0.00	318.827 ± 0.15	310.897 ± 0.00	298.571 ± 0.39	286.762 ± 0.30	271.764 ± 0.15
	ที่อุณหภูมิ 45 °C	323.101 ± 0.00	311.673 ± 0.26	300.898 ± 0.15	282.28 ± 0.39	261.679 ± 0.65	250.991 ± 0.30

ตารางที่ ข- 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากการทดสอบความคงสภาพของสารสกัด โดยการเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน ที่ N=3

วันที่	**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ย** (mg GAE/g crude extract) **± S.D.**					
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**
ที่อุณหภูมิ 4˚C	67.077 ± 0.00	65.851 ± 0.03	65.353 ± 0.10	64.510 ± 0.09	63.802 ± 0.06	63.189 ± 0.07
ที่อุณหภูมิห้อง	67.077 ± 0.00	65.047 ± 0.03	63.897 ± 0.03	62.307 ± 0.32	59.453 ± 0.18	57.557 ± 0.20
ที่อุณหภูมิ 45 ˚C	67.077 ± 0.00	63.553 ± 0.09	60.622 ± 0.14	58.208 ± 0.29	54.052 ± 0.20	47.846 ± 0.13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

แบบสอบถามการประเมินผลการใช้ครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดสละ

แบบสอบถามนี้จัดทำขึ้นเพื่อการสำรวจความพึงพอใจในการใช้ครีมที่บำรุงผิวมีส่วนผสมสารสกัดเมล็ดสละที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ เรื่อง “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเมล็ดสละเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบถึงความพึงพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์
2. เพื่อทราบถึงเหตุผลของผู้บริโภคที่ใช้ในการเลือกคุณสมบัติครีมที่มีความพึงพอใจมากที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลในการผลิตครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมสารสกัดเมล็ดสละสำหรับผู้บริโภค
2. ได้แนวทางในการพัฒนาสูตรครีมบำรุงที่มีสารสกัดเมล็ดสละเป็นส่วนผสม

ในการประเมินการใช้ครีมที่มีสารสกัดเมล็ดสละนี้ ผู้ตอบแบบสอบถามจะได้รับแบบสอบถาม 1 ชุด และตัวอย่างครีมบำรุงผิวที่มีส่วนผสมสารสกัดเมล็ดสละ เพื่อใช้เป็นเวลา 1 เดือน โดยระบุวิธีการใช้คือทาบาง ๆ วันละ 1 ครั้งก่อนนอนติดต่อกันทุกวันในบริเวณที่กำหนด

รายละเอียดการตอบแบบสอบถาม

1. ในการตอบแบบสอบถามจะแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง และการประเมินความพึงพอใจเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ครั้งแรกและเมื่อใช้ครบระยะเวลา 1 เดือน
2. กรอกข้อมูลเบื้องต้นของผู้ตอบแบบสอบถามให้ครบถ้วน

ข้อมูลทั่วไป

1. ระยะเวลาในการประเมินความพึงพอใจ

เริ่มทดสอบวันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2558 ถึงวันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2558

2. ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม

ชื่อและนามสกุล..... เพศ ( ) ชาย ( ) หญิง อายุ..... ปี

ที่อยู่ที่ติดต่อได้.....

เบอร์โทรติดต่อ.....

ข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์

ตอนที่ 1 การประเมินการระคายเคืองต่อผิวหนัง

คำชี้แจง กรุณาใส่คะแนน 0 - 4 ตามระดับอาการระคายเคืองหลังทดลองใช้ผลิตภัณฑ์

ชั่วโมงที่	คะแนน
0	
24	
48	
72	

การให้คะแนนการสังเกตอาการระคายเคือง

คะแนน 0 หมายถึง ไม่เกิดอาการบวมแดง

1 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงน้อยมาก

2 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงชัดเจน

3 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงปานกลางถึงมาก

4 หมายถึง เกิดอาการบวมแดงรุนแรง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตอนที่ 2 การประเมินความพึงพอใจเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ครั้งแรกและเมื่อใช้ครบ 1 เดือน

คำชี้แจง กรุณาใส่คะแนนตามความชอบผลิตภัณฑ์ 0 - 9 และทำเครื่องหมาย √ ลงที่หน้าหัวข้อคุณสมบัติที่พึงพอใจของท่านมากที่สุด

คุณลักษณะ	คะแนนเมื่อใช้ครั้งแรก	คะแนนเมื่อใช้ครบ 1 เดือน
ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความละเอียดของเนื้อครีม ความง่ายในการทาผิว การซึมเข้าสู่ผิว ความรู้สึกไม่เหนียวเหนอะหนะ ความรู้สึกชุ่มชื้นผิว ความนุ่มเนียนผิว ความชอบโดยรวม		

โดยช่วงระดับความชอบผลิตภัณฑ์ คือ

คะแนนเฉลี่ยในช่วง	0.1 – 1.0	หมายถึง	ไม่ชอบมากที่สุด
	1.1 – 2.0	หมายถึง	ไม่ชอบมาก
	2.1 – 3.0	หมายถึง	ไม่ชอบปานกลาง
	3.1 – 4.0	หมายถึง	ไม่ชอบเล็กน้อย
	4.1 – 5.0	หมายถึง	เฉย ๆ
	5.1 – 6.0	หมายถึง	ชอบเล็กน้อย
	6.1 – 7.0	หมายถึง	ชอบปานกลาง
	7.1 – 8.0	หมายถึง	ชอบมาก
	8.1 – 9.0	หมายถึง	ชอบมากที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเสาวลักษณ์ ศรีวรเพชร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	4 กรกฎาคม 2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	44 หมู่ที่ 5 ซ.วัดราษฎร์บูรณะ ถ.เทพารักษ์ ตำบล บางปลา อำเภอ บางพลี จังหวัด สมุทรปราการ 10540
ประวัติการศึกษา	โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ เมื่อปี พ.ศ. 2548, วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปี พ.ศ. 2552
ปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2555

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Saowalak Sriworaphet and Chutimon Satirapipathkul. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF SALACCA SEED EXTRACT. The 3rd Academic Science and Technology Conference 2015 (ASTC 2015). ; วันที่ 28-29 พฤษภาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย จังหวัดกรุงเทพ ประเทศไทย