

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ดอกดาวเรืองชนิด *Tagetes erecta* Linn. ปลูกที่จังหวัดเชียงใหม่ ถูกนำมาสกัดแบบต่อเนื่องโดยชุดเครื่องมือชอกเลต ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ ได้สารสกัดหยาบ 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน (HE) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (EE) และสารสกัดหยาบเอทานอล (AE) โดยพบว่า สารสกัดเอทานอลให้ % yield สูงที่สุด ($23.83 \pm 1.76\%$) รองลงมาคือสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท ($10.26 \pm 1.03\%$) และสารสกัดหยาบ เฮกเซน มีปริมาณน้อยที่สุด ($4.45 \pm 0.16\%$)

เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัดหยาบ EE มีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 287.93 ± 0.19 mg RE/g of dry extract ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบ AE ที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 79.50 ± 0.14 mg RE/g of dry extract และสารสกัดหยาบทั้ง 2 นี้ให้ผลบวกกับการทดสอบ Shinoda test เช่นกัน ส่วนสารสกัดหยาบ HE ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ได้ และให้ผลลบกับการทดสอบ Shinoda test

สารสกัดหยาบ EE จึงถูกคัดเลือก เพื่อนำมาแยกสารด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC) เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสัดส่วนฟลาโวนอยด์มากขึ้น โดยชะ column ด้วยระบบตัวทำละลายแบบไล่ชั้น (100% Hexane - 30% MeOH/EtOAc) สามารถแยกได้ 14 fraction และเมื่อนำสารสกัดที่แยกได้แต่ละ fraction (F) ไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัด F6-F14 สามารถวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ได้เป็น 95.36 ± 0.33 , 278.31 ± 0.33 , 475.56 ± 0.38 , 441.91 ± 0.00 , 308.66 ± 0.23 , 214.26 ± 0.00 , 193.14 ± 0.00 , 93.75 ± 0.18 และ 78.05 ± 0.00 mg RE/g of dry extract ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด F8 มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (475.56 ± 0.38 mg RE/g of dry extract) ในสารสกัด fraction ทั้งหมด และยังพบว่า สารสกัด F8 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดหยาบ EE ถึง 1.65 เท่า นอกจากนี้ F6-F14 ยังให้ผลบวกกับ Shinoda test อีกด้วย ส่วนสารสกัด F1-F5 ไม่สามารถตรวจพบปริมาณฟลาโวนอยด์และให้ผลลบกับ Shinoda test

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดหยาบ **EE** และ **AE** มีค่า IC_{50} เป็น 261.20 ± 1.03 และ 3668.85 ± 3.32 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสารสกัด **F6-F14** มีค่า IC_{50} เป็น 174.31 ± 1.78 , 57.06 ± 1.23 , 50.73 ± 0.56 , 95.51 ± 0.42 , 126.40 ± 1.12 , 151.60 ± 1.44 , 166.51 ± 1.02 , 1177.17 ± 1.93 และ 3625.94 ± 4.83 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสารสกัดหยาบ **EE** (261.20 ± 1.03 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัด **F8** (50.73 ± 0.56 $\mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบและสารสกัดทั้ง 14 fraction ที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่า สารสกัด **F8** ยังให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสที่สูงกว่าสารสกัดหยาบ **EE** 5.15 เท่า, สารบริสุทธิ์มาตรฐาน beta-arbutin 10.57 เท่า และ vitamin C 1.66 เท่า, สารสกัดในท้องตลาด สารสกัดทับทิม (pomegranate) 3.25 เท่า และยังให้ฤทธิ์ที่สูงกว่า patulatin (1.87 เท่า) และ quercetagenin (1.40 เท่า) ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดดอกดาวเรือง แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัด **F8** ยังให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสที่ต่ำกว่าสารบริสุทธิ์มาตรฐาน ได้แก่ kojic acid และ quercetin และสารสกัดมะหาด (lakoocha) ที่เป็นสารสกัดเปรียบเทียบกับท้องตลาด

เนื่องด้วยคุณสมบัติการเป็นสารช่วยให้ผิวขาวของสารสกัดหยาบ **EE** และสารสกัด **F8** ดังกล่าว ทำให้สารสกัดทั้ง 2 ถูกนำมาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบตัวพาทอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้กับสารสกัดในด้านความคงตัว และการซึมผ่านของสารสู่ผิว โดยตำรับตัวพาทอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC ถูกพัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคการผสมที่ความดันสูงแบบใช้อุณหภูมิสูง มีสาร stearyl alcohol และ hydrogenated palm glycerides ทำหน้าที่เป็นไขมันแข็งในตำรับ มี olive oil และ isopropyl myristate ทำหน้าที่เป็นไขมันเหลวในตำรับ มี span 80 และ cetareth-25 ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยใช้สาร BHT ร่วมกับ methyl paraben และ propyl paraben เป็นสารกันเสียในตำรับตำรับ NLC เปล่า ที่พัฒนาขึ้นและมีความคงตัวดี ได้แก่ **A_Base** และ **B_Base** มีค่า HLB ของตำรับเป็น 9.75 และ 9.55 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ตำรับใช้สารลดแรงตึงผิว 10% และไขมันแข็ง 2% แตกต่างกันที่ **B_Base** มีไขมันเหลวมากกว่า **A_Base** 4% อย่างไรก็ตาม NLC เปล่า ทั้ง 2 ตำรับนี้ มีลักษณะทางกายภาพที่ดี เนื้อตำรับเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน มีสีขาวขุ่น ตำรับ **A_Base** มีค่า pH โดยเฉลี่ย 6.24 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 114.78 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ย -24.95 มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PDI) โดยเฉลี่ย 0.20 ส่วนตำรับ **B_Base** มีค่า pH โดยเฉลี่ย 6.28 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 124.32 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ย -24.81 มีค่า PDI โดยเฉลี่ย 0.22 ขนาดอนุภาคของ NLC เปล่า ทั้ง 2 ตำรับมีขนาดที่สอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานวิทยาที่สังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งพบว่ามีขนาดอนุภาคไม่เกิน 200 nm ทั้งตำรับ **A_Base** และ **B_Base** สามารถบรรจุสารสกัดหยาบ

EE และสารสกัด F8 ได้มากที่สุด 1.0% w/w และ 0.2% w/w ตามลำดับ โดยตำรับ A และ B ที่กักเก็บสารสกัด F8 0.2% (F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B) มีสีเหลืองขุ่น มีเนื้อตำรับเป็นสีเหลืองอ่อน และมีความหนืดต่ำ เช่นเดียวกับตำรับ A และ B ที่กักเก็บสารสกัดหยาบ EE 1.0% (EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B) ซึ่งมีสีเหลืองเข้มกว่าเล็กน้อย ตำรับ EE_1.0%_A มีค่า pH โดยเฉลี่ย 3.65 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 129.78 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ยเป็น -19.46 mV มีค่า PDI โดยเฉลี่ยเป็น 0.21 และให้ประสิทธิภาพการกักเก็บที่ 83.65% ตำรับ EE_1.0%_B มีค่า pH โดยเฉลี่ย 3.54 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 145.26 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ยเป็น -19.76 mV มีค่า PDI โดยเฉลี่ยเป็น 0.22 และให้ประสิทธิภาพการกักเก็บที่ 88.10% ตำรับ F8_0.2%_A มีค่า pH โดยเฉลี่ย 4.41 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 126.53 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ยเป็น -26.68 mV มีค่า PDI โดยเฉลี่ยเป็น 0.19 และให้ประสิทธิภาพการกักเก็บ 76.55% และตำรับ F8_0.2%_B มีค่า pH โดยเฉลี่ย 4.69 มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 142.47 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยเฉลี่ยเป็น -23.88 mV มีค่า PDI โดยเฉลี่ยเป็น 0.22 และให้ประสิทธิภาพการกักเก็บ 86.82% โดยที่ขนาดอนุภาคของ NLC ทั้ง 4 ตำรับ มีขนาดที่สอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานวิทยาที่สังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งพบว่ามีขนาดอนุภาคไม่เกิน 200 nm ทั้งนี้ตำรับ B มีแนวโน้มขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่าตำรับ A และ ตำรับ B สามารถกักเก็บสารสกัดได้มากกว่าตำรับ A เนื่องมาจากการมีไขมันเหลวในตำรับที่มากกว่า

ตำรับตัวพาอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC ทั้งตำรับ A และ B ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 ตำรับสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัด EE 1.0% และ F8 0.2% ที่ถูกกักเก็บไว้ได้ในทุกสภาวะทดสอบ ซึ่งได้แก่ที่สภาวะ Heating-Cooling cycle (HC) 6 รอบ และการเก็บที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ 4°C, อุณหภูมิสูง 45°C, อุณหภูมิห้องที่มีแสง (LRT) และ อุณหภูมิห้องไร้แสง (DRT) เป็นเวลา 3 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดดังกล่าวใน PEG จากการทดสอบความคงตัวของสารสกัดโดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ซึ่งเป็นสารเป้าหมาย และการวิเคราะห์ค่า % tyrosinase inhibition ของสารสกัดในตำรับ พบว่า ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัด (EE 1.0% และ F8 0.2%) ที่ถูกกักเก็บในแต่ละตำรับอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC (A และ B) ในสภาวะต่างๆมีการสลายตัวและ/หรือคงตัวที่สัมพันธ์กันกับค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลง และ/หรือคงเดิมของสภาวะนั้นๆ โดยมีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกัน ซึ่งสภาวะที่ทำให้สารสกัดมีความคงตัวน้อยไปมาก คือ 45°C>HC>LRT>DRT>4°C ทั้งนี้ที่สภาวะอุณหภูมิสูง 45°C ส่งผลต่อสารสกัดที่ถูกกักเก็บใน ตำรับตัวพาอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC ทั้งตำรับ A และ B โดยทำให้มีความคงตัวน้อยที่สุดจึงควรเก็บตำรับตัวพาอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC ทั้งตำรับ A และ B ที่กักเก็บสารสกัดที่พัฒนาได้ไว้ในภาชนะ หรือสถานที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ 4°C และ/หรือที่อุณหภูมิห้องไร้แสง (DRT)

จากการทดสอบการปลดปล่อยในหลอดทดลองด้วยวิธี Franz diffusion cell พบว่า สารสกัด
หยาบ **EE** 1.0% และสารสกัด **F8** 0.2% ที่กักเก็บไว้ใน NLC ทั้งตำรับ **A** และ **B** สามารถถูกปลดปล่อย
ออกจากอนุภาค NLC แพร่ผ่านเซลล์โลสมเมเบรอนลงมายัง receptor chamber ได้ โดย NLC ที่พัฒนา
ได้เป็นรูปแบบเมทริกซ์ ซึ่งมีการการปลดปล่อยอย่างฉับพลันในระยะแรกหรือในช่วงเวลาที่ 1-12 และ
ในระยะหลังหรือในช่วงเวลาที่ 12-24 มีการปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่น และเป็นคุณสมบัติที่ดีต่อการ
นำมาใช้ในทางเครื่องสำอางทางผิวหนัง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนไขมันแข็ง (NLC) ที่พัฒนา
ได้ทั้งตำรับ **A** และ **B** สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของ quercetagenin ซึ่งเป็น flavonol ที่เป็น
องค์ประกอบหลักที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดหยาบ **EE** และสารสกัด **F8** ของ
ดอกดาวเรืองได้ แต่อย่างไรก็ตาม NLC ที่กักเก็บสารสกัดหยาบ **EE** และสารสกัด **F8** ที่พัฒนาขึ้นนี้
ยังคงต้องนำไปใส่ตำรับพื้นก่อนที่จะนำไปใช้ เพื่อเพิ่มความหนืดให้เหมาะแก่การนำไปใช้ทาผิวได้
ต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved