

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

ง

บทคัดย่อภาษาไทย

จ

ABSTRACT

ช

สารบัญตาราง

ท

สารบัญภาพ

ณ

สารบัญแผนภาพ

ด

สารบัญกราฟ

ต

อักษรย่อ

ถ

สัญลักษณ์

น

บทที่ 1 บทนำ

1

1.1 ที่มาและความสำคัญ

1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาเชิงทฤษฎีและ/หรือเชิงประยุกต์

3

1.4 ขอบเขตการศึกษา

4

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

5

2.1 ผิวหนัง

5

2.1.1 โครงสร้างของผิวหนัง

5

2.1.2 เส้นทางของสารในการซึมผ่านผิวหนัง	8
2.1.3 สีผิวและเมลานิน	10
1) ทฤษฎีการเกิดเมลานิน	11
2) กลไกการขจัดเมลานิน	15
2.2 เอนไซม์ไทโรซิเนส	15
2.3 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร	17
2.4 กลุ่มสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	18
2.4.1 สารจากธรรมชาติ	18
2.4.2 สารสังเคราะห์	24
2.5 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และการออกฤทธิ์ยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	26
2.6 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ <i>o</i> -diphenol	27
2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	29
2.8 ดาวเรือง	29
2.8.1 อนุกรมวิธานของดาวเรือง (<i>Tagetes erecta</i> Linn.)	30
2.8.2 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และทางเคมี	30
2.8.3 สรรพคุณทางยา ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยา	31
2.9 ตัวพาอนุภาคไขมันระดับนาโน หรือ Nanostructured lipid carriers (NLC)	36
2.9.1 เทคนิคการเตรียม NLC	37
2.9.2 รูปแบบของ NLC	39
2.9.3 ข้อดีและประโยชน์ของ NLC ทางยาและเครื่องสำอาง	41
2.9.4 ข้อเสียของ NLC ทางยาและเครื่องสำอาง	42
2.9.5 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน	43
2.10 การพัฒนาตำรับและการทดสอบความคงตัว	47
2.10.1 วิธีการทดสอบความคงตัว	48
2.10.2 ตัวแปรที่ใช้ทดสอบความคงตัว	49
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	50
3.1 สารเคมี	50
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	51

3.3	วัตถุดิบสมุนไพร	52
3.4	การสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรือง	53
3.5	การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบ	53
3.5.1	การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยวิธี Shinoda test	54
3.5.2	การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) ในสารสกัด	54
3.6	การแยกสารสกัดหยาบ EE ด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC)	54
3.7	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสในสารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ด้วยวิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay	55
3.8	การพัฒนาตำรับตัวพาทานูภาคนาโนไขมันชนิด NLC เปล่า	56
3.8.1	การเตรียมตำรับ NLC เปล่า	56
3.8.2	การทดสอบลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่า	57
3.8.3	การทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC เปล่า ด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	57
3.9	การพัฒนาตำรับตัวพาทานูภาคนาโนไขมันชนิด NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	58
3.9.1	การเตรียมตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดจากดอกดาวเรือง	58
3.9.2	การทดสอบลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง	58
3.9.3	การทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง ด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	58
3.9.4	การทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากดอกดาวเรือง ที่กักเก็บในตำรับ NLC	58
1)	การวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรือง ที่กักเก็บในตำรับ NLC	59
2)	การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC	60
3.9.5	การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC	60
3.9.6	การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC	61
บทที่ 4	ผลการทดลอง	63
4.1	การสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรือง	63

4.2 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบ	64
4.3 การแยกสารสกัดหยาบ EE ด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC)	65
4.4 การหาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด F1-F14	68
4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดที่มี ฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay	69
4.6 การพัฒนาตำรับตัวพาท่อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC เปล่า	71
4.6.1 วิธีการเตรียมตำรับ NLC เปล่า	71
4.6.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพและการทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC เปล่า ด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	72
4.6.3 การวิเคราะห์รูปร่างพื้นฐานของอนุภาค NLC เปล่า ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	76
4.7 การพัฒนาตำรับตัวพาท่อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	77
4.7.1 วิธีการเตรียมตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง	77
4.7.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพและการทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิต่างๆ	82
4.7.3 การวิเคราะห์รูปร่างพื้นฐานของอนุภาค NLC ที่กักเก็บสารสกัด ดอกดาวเรืองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	83
4.7.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บ ในตำรับ NLC	83
4.7.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC	90
1) การวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรือง ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	90
2) % การกักเก็บของสารสกัดในตำรับตัวพาท่อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC	91
4.7.6 การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC	92
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	95
บรรณานุกรม	99
รายการสิ่งพิมพ์เผยแพร่	107

ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก ภาพประกอบการสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรือง	108
ภาคผนวก ข การตรวจสอบหาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยวิธี Shinoda test	109
ประวัติผู้เขียน	110



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มฟินอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	21
ตารางที่ 2.2 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มโพลีฟินอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	25
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากผงดอกดาวเรืองแห้ง 250 กรัมต่อครั้ง และ % yield ของสารสกัดหยาบ ซึ่งคิดเทียบจากผงดอกดาวเรืองแห้ง	63
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด	64
ตารางที่ 4.3 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบและ fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ EE ด้วยเทคนิค VCC โดยคิดเทียบเท่าผงดอกดาวเรืองแห้ง ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	67
ตารางที่ 4.4 แนวทางการพัฒนาสูตรตำรับ NLC เปล่า	72
ตารางที่ 4.5 แสดงสัดส่วนสารประกอบในตำรับ ลักษณะทางกายภาพ และความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่าที่พัฒนาได้	74
ตารางที่ 4.6 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่า ตำรับ A (A_base) และ B (B_base) ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	75
ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่า (A_Base และ B_Base) ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	76
ตารางที่ 4.8 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	79
ตารางที่ 4.9 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ	80
ตารางที่ 4.10 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ เปรียบเทียบสารละลายสารสกัด (EE_1.0%_PEG)	81

ตารางที่ 4.11 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบสารละลาย สารสกัด (F8_0.2%_PEG)	81
ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณการถูกกักเก็บของสารสกัดในตำรับตัวพาอนุภาคนาโนไขมันแข็ง ชนิด NLC	91
ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการปลดปล่อยสารสำคัญในสารสกัดหยาบ EE จากตัวพา NLC ตำรับ A และ B เปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดเปล่า	93



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างผิวหนัง	6
ภาพที่ 2.2 เส้นทางการซึมผ่านของสารที่ผิวหนัง	10
ภาพที่ 2.3 แสดงเซลล์สร้างสี และการกระจายของเม็ดสีในเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า	11
ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างเคมีของ Oxytyrosinase, Mettyrosinase และ Deoxytyrosinase	17
ภาพที่ 2.5 แสดง ก) โครงสร้างพื้นฐานของ flavonol ข) quercetagetin และ ค) benzo -γ- pyrone	26
ภาพที่ 2.6 ดอกดาวเรือง (<i>Tagetes erecta</i> L.)	29
ภาพที่ 2.7 ลักษณะ wall material ของ NLC และการแลกเปลี่ยนสารที่กักเก็บภายในกับสิ่งแวดล้อม	36
ภาพที่ 2.8 รูปแบบของ NLC	40
ภาพที่ 2.9 เปรียบเทียบการแลกเปลี่ยนระหว่างสิ่งแวดล้อมข้างนอกอนุภาคกับสารสำคัญที่ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคชนิด emulsion o/w (ก) และ NLC (ข)	41
ภาพที่ 2.10 การจัดเรียงตัวของโมเลกุลไขมันแบบ crystal lattice(ก)และแบบ crystalline structure(ข)	41
ภาพที่ 2.11 การกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC	47
ภาพที่ 3.1 แสดงลำดับการบรรจุคอลัมน์เพื่อแยกสารด้วยเทคนิค VCC	55
ภาพที่ 3.2 แสดง Franz diffusion cells	62
ภาพที่ 4.1 แสดง TLC โครมาโตแกรมของสารสกัด (fraction) ที่แยกได้จาก EE ด้วยเทคนิค VCC, สารสกัดหยาบ และสารเปรียบเทียบในเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท: อะซิโตน ในอัตราส่วน 2:2:1	66
ภาพที่ 4.2 รูปร่างสัณฐานของตัวพาอนุภาคไขมันแข็งชนิด NLC เปล่า	76
ภาพที่ 4.3 รูปร่างสัณฐานของตัวพาอนุภาคไขมันแข็งชนิด NLC_A และ B ที่กักเก็บสารสกัดหยาบ EE_1.0% และสารสกัด F8_0.2%	82
ภาพที่ 4.4 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ EE (ก) สารสกัด F8 (ข) และ quercetagetin (ค)	91

สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 2.1 เส้นทางการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการที่ผิวหนังถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี	13
แผนภาพที่ 2.2 ชีวิตสังเคราะห์ของเมลานิน	14
แผนภาพที่ 2.3 กลไกการยับยั้งของ inhibitor	18
แผนภาพที่ 2.4 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการเกิดออกซิเดชันของสารตั้งต้น o-diphenol ด้วยการทำงานของเอนไซม์ cresolase และ catecholase	28
แผนภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากดอกดาวเรืองด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	53

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญกราฟ

	หน้า
กราฟที่ 4.1 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบและ fraction	68
กราฟที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารเปรียบเทียบต่างๆ	
สารในดอกดาวเรือง และสารสกัดดอกดาวเรือง	69
กราฟที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ quercetagenin (ppm) ใน EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B	
ที่เก็บในแต่ละสภาวะ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย UV spectrophotometer	84
กราฟที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ quercetagenin (ppm) ใน F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B	
ที่เก็บในแต่ละสภาวะ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย UV spectrophotometer	85
กราฟที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ EE_1.0%_A	
และ EE_1.0%_B ที่เก็บในแต่ละสภาวะ	87
กราฟที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ F8_0.2%_A	
และ F8_0.2%_B ที่เก็บในแต่ละสภาวะ	88
กราฟที่ 4.7 แสดงการปลดปล่อยสารสกัดหยาบ EE และ F8 จากตัวพา NLC ดำรับ A และ B	
เปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัด	92

อักษรย่อ

AUC	area under curve
AFM	atomicforce microscope
C18	carbon 18
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
DRT	dark room temperature
°C	degree celsius
DI	deionized
DHI	5, 6-dihydroxyindole
DHICA	5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DPPH	2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E	enzyme
EC	enzyme commission
ES	enzyme-substrate complex
EI	enzyme-Inhibitor complex
ESI	enzyme-substrate-Inhibitor complex
EGC	epigallocatechin
ECG	epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate
EGCG	epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate
EA	ethanol extract
EE	ethyl acetate extract
EtOAc	ethyl acetate
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F	fraction
F8	fraction 8
GCG	galocatechin-3- <i>O</i> -gallate

GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
g	gram
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
HC	heating cooling
HE	hexane extract
HPLC	high performance liquid chromatography
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
HBTA	5-hydroxy-1, 4-benzothiazinylalanine
ICAQ	indole-2-carboxylic acid-5, 6-quinone
ICH	international conference on harmonization
kg	kilogram
LRT	light room temperature
L-DOPA	L-3, 4-dihydroxyphenylalanine
Hex.	hexane
I	inhibitor
LC ₅₀	lethal concentration fifty
MSH	melanocyte stimulation hormone
MeOH	methanol
μg	microgram
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
mg	milligram
ml	milliliter
mm	millimeter
mV	millivolt
M	molarity
nm	nanometer
NLC	nanostructured lipid carrier
o/w	oil in water
o/w/o	oil in water in oil
ppm	part per million
PCS	photocorrelation spectroscopy

PdI	polydispesity index
PEG	polyethylene glycol
pH	positive potential of the hydrogen ion
P	product
rpm	revolutions per minute
RE	rutin equivalent
SEM	scanning electron microscope
SDE	simultaneous distillation extraction
SLN	solid lipid nanoparticle
cm ²	square centimeter
SD	standard deviation
S	substrate
TEM	transmission electron microscope
TYR	tyrosinase
UV	ultraviolet
VCC	vacuum column chromatography
v/v	volume by volume
w/w	weight by weight
WHO	world health organization

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

สัญลักษณ์

α	alpha
β	beta
$^{\circ}$	degree sign
γ	gamma
$<$	less than
$>$	more than
o	ortho
$\pm$	plus-minus sign
®	registered trademark symbol
$\times$	multiplication sign

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved