



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญ  
ในสารสกัดไฉ่น้ำ

THE STUDY OF BIOACTIVITY AND CHEMICAL STABILITY OF  
ACTIVE COMPOUND IN *WOLFFIA GLOBOSA* EXTRACT

สุพรรณิ ทิพนี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

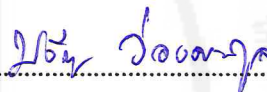
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดใข้่น้ำ  
THE STUDY OF BIOACTIVITY AND CHEMICAL STABILITY OF ACTIVE COMPOUND  
IN WOLFFIA GLOBOSA EXTRACT

สุพรรณิ ทิพนี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้  
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)  
เมื่อวันที่ 18 กรกฎาคม พ.ศ. 2560



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย  
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ



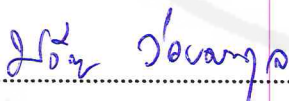
อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล  
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรัญญา จุติวิบูลย์สุข  
กรรมการ



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรัญญา จุติวิบูลย์สุข  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล  
กรรมการ



อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล  
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)



รองศาสตราจารย์อิสยา จันทรวิธานุชิต  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต  
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

## การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดใข้่น้ำ

สุพรรณณี ทิพนี 566098

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ปวีณา ว่องตระกูล, วท.ด.

อรัญญา จุติวิบูลย์สุข, ประ.ด.

### บทคัดย่อ

ใข้่น้ำ (*Wolffia globosa*) เป็นพืชดอกในวงศ์ Lemnaceae ที่สามารถนำมาประกอบอาหารสำหรับมนุษย์ มีสารอาหารสูงโดยเฉพาะโปรตีน ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์และใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของใข้่น้ำยังมีอย่างจำกัด งานวิจัยนี้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่มีอยู่ในสารสกัดใข้่น้ำ โดยทำการสกัดและแยกสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโทกราฟี วิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี และศึกษาความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ศึกษาความสามารถในการต้านการอักเสบโดยวิธียับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดใข้่น้ำ ประเมินความคงตัวของกายภาพและเคมีของสารสกัดหยาบและสารสกัดใข้่น้ำในตำรับครีม การสกัดทำโดยการหมักใข้่น้ำในเอทานอลพบว่าได้ปริมาณสารสกัดหยาบร้อยละ 12.25 ของใข้่น้ำแห้ง หลังจากแยกสารสกัดหยาบด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมด 4 แพรกชั้น และส่วนตะกอนที่ได้จากการละลายสารสกัดหยาบในเฮกเซน ผลการศึกษาโครงสร้างด้วย FT-IR และ  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดแพรกชั้นที่ 2 พบว่าประกอบด้วย  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol เป็นส่วนใหญ่ ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารผสมของแพรกชั้นที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW264.7 สูงสุดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรคิดเป็นค่าการยับยั้งร้อยละ  $16.84 \pm 1.81$  ซึ่งใกล้เคียงกับสาร Triamcinolone acetonide ที่ให้ค่าการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ร้อยละ  $15.93 \pm 5.13$  ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบในส่วนตะกอนที่ได้จากการละลายสารสกัดหยาบในเฮกเซน โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังพบว่าสารสกัดใข้่น้ำไม่มีพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดใข้่น้ำในตำรับครีมและสารสกัดหยาบใข้่น้ำมีความคงตัวของกายภาพและเคมีภายในระยะเวลาการศึกษา 90 วัน

**คำสำคัญ:** ใข้่น้ำ ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ความคงตัวของเคมี

THE STUDY OF BIOACTIVITY AND CHEMICAL STABILITY OF ACTIVE COMPOUND  
IN *WOLFFIA GLOBOSA* EXTRACT

SUPANNEE TIPNEE 566098

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PAVEENA WONGTRAKUL, Ph.D. (Biotechnology)

ARANYA JUTIVIBOONSUK, Ph.D. (Pharmaceutical  
Chemistry and Phytochemistry)

ABSTRACT

*Wolffia globosa* is an edible plant in Lemnaceae. It provides high nutrients, especially protein. It can be used to produce animal feed and to provide raw materials for various industrial products. However, information about chemical composition and bioactivity of this plant is still limited. Therefore, the objectives of this research were extract, isolate and identify the active substances in *W. globosa* and study their bioactivities such as antioxidant activity by DPPH assay, anti-inflammatory activity by determination of nitric oxide production, and cytotoxicity activity on fibroblast cells. Moreover, the physical and chemical stability of *W. globosa* crude extract and cream were also evaluated. Dried *W. globosa* was macerated in ethanol to obtain ethanolic crude extract of 12.25%. The crude ethanolic extract was then subjected to column chromatography to obtain 4 fractions and one precipitate (WP1) obtained from the filtration of crude extract dispersed in hexane. Structure elucidation by FT-IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy revealed that fraction 2 was mostly composed of β-sitosterol and stigmasterol. The results of bioactivity testing revealed that the mixture of fraction 1 and 2 (BSS) had the highest inhibitory effect on nitric oxide production in lipopolysaccharide activated murine macrophage (RAW 264.7) at 10 μg/mL with 16.84±1.81% inhibition. The results of antioxidant activity against DPPH showed that the precipitate (WP1) had antioxidant activity with the IC<sub>50</sub> of 2.70 mg/mL. The crude extract of *W. globosa* had no cytotoxicity to human fibroblasts. Moreover, the stability study revealed that cream containing *W. globosa* extract and the *W. globosa* crude extract were physically and chemically stable during 90 days of study period.

**Keywords:** Kai-nam, Bioactivity, Antioxidant activity, anti-inflammatory, Chemical stability

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ในการให้การช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำในการศึกษาครั้งนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต ในการให้คำปรึกษาทางด้านปฏิบัติการและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ขอขอบพระคุณสวนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ในการให้ความอนุเคราะห์อนุกรมวิธานและเก็บรักษาพันธุ์พืช และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางที่ให้คำแนะนำและประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณวิไลพรรณ ลิปะชานนท์ คุณชัยวิชิต รัตนมะณี ในการแนะนำการใช้อุปกรณ์ สำหรับการวิเคราะห์และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีสารสนเทศทุกท่านในการเอื้ออำนวย ประสานงานในการเบิกจ่ายอุปกรณ์และสารเคมี

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาครั้งนี้

สุพรรณณี ทิพนี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
สารบัญภาพ	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 คำย่อหรือสัญลักษณ์	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และประโยชน์ของไผ่	5
2.2 การสกัดและแยกสารสำคัญจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	10
2.3 การตรวจสอบโครงสร้างของสารด้วยสเปกโตรสโกปี <sup>(34)</sup>	14
2.4 อนุมูลิสรระ สารต้านอนุมูลิสรระและการตรวจสอบฤทธิ์การต้าน อนุมูลิสรระ	17
2.5 การอ้กเสบและสารสื่อกลางในการอ้กเสบ	20
2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	22
2.7 การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับอิมัลชัน	23
<b>บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย</b>	
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	27
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	29
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b>	
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดไผ่	37
4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค รังคเลขผิวบาง	37

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลการแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	40
4.4 ผลการตรวจโครงสร้างของสารสกัดไข่น้ำด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี	40
4.5 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay	45
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำโดยวิธียับยั้งการสร้างไนตริก ออกไซด์ (Nitric oxide assay)	47
4.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบร بلاสต์	47
4.8 ผลการเตรียมและคัดเลือกตำรับครีมสารสกัดไข่น้ำ	48
4.9 ผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพและเคมีของสารสกัดหยาบและสารสกัด ไข่น้ำในตำรับครีม	49
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล</b>	
สรุปผลการวิจัย	57
อภิปรายผล	58
บรรณานุกรม	65
ประวัติผู้เขียน	72

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณค่าทางโภชนาการของไชน้ำ (100 กรัม)	7
2	ความสามารถของตัวทำละลายในการชะสารเรียงลำดับจากต่ำไปสูง	13
3	ค่า stretching frequencies ของพันธะต่าง ๆ ที่พบทั่วไปในสารประกอบอินทรีย์	16
4	ส่วนประกอบในตำรับครีมสารสกัดไชน้ำ	36
5	ผลการวิเคราะห์เลขที่คลื่น (Wavenumber) และหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของสารสกัดแปรงชั้นที่ 2	43
6	ผลการวิเคราะห์ค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนในสารสกัดแปรงชั้นที่ 2	44
7	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบไชน้ำ (crude) แปรงชั้น 1-4 (F1-F4) และตะกอน (WP1)	45
8	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดไชน้ำในส่วนของตะกอน (WP1) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
9	ผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ของสารสกัดไชน้ำ (BSS) และ triamcinolone acetonide (TA)	47
10	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไชน้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์	48
11	ผลการทดสอบความคงตัวของร่างกายภายใต้สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ เพื่อคัดเลือกตำรับครีมที่มีความคงตัว	49
12	การศึกษาความคงตัวของร่างกายของครีมที่มีส่วนผสมสารสกัดไชน้ำความเข้มข้น 1% ที่ระยะเวลา 90 วัน	50
13	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบไชน้ำและสารสกัดไชน้ำในตำรับครีม ที่ความยาวคลื่น 666 และ 405 นาโนเมตร ระยะเวลา 90 วัน	53
14	ผลการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นกับช่วงเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปของสารสกัดหยาบไชน้ำและสารสกัดไชน้ำในตำรับครีม	55
15	การเปรียบเทียบเลขที่คลื่น (Wavenumber) และหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของสารสกัดแปรงชั้นที่ 2 เทียบกับ <i>Ageratum conyzoides</i> (Asteraceae)	60
16	การเปรียบเทียบค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนของสารสกัด แปรงชั้นที่ 2 เทียบกับ $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ของสารสกัด <i>Saurauia roxburghii</i> (Actinidiaceae)	61



### สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดไช้ น้ำ ส่วนตะกอน และค่า IC <sub>50</sub>	46
2	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร ascorbic acid และค่า IC <sub>50</sub>	46



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ลักษณะของไข่น้ำภายนอกลอยตัวอยู่ในน้ำ	6
2	โครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	20
3	การแยกตัวทำละลายเอทานอลออกจากสารสกัดไข่น้ำด้วยเครื่องกลั่น ระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)	29
4	การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี	31
5	ไข่น้ำสดก่อนตากแห้งและไข่น้ำหลังตากแห้ง 48 ชั่วโมง	37
6	ผลการตรวจสอบสารกลุ่มสเตอรอลของสารสกัดไข่น้ำก่อนสเปรย์และหลังสเปรย์ ด้วยรีเอเจนต์	38
7	ผลการตรวจสอบสารฟีนอลิก ได้แก่ ferulic acid, coumaric acid และ caffeic acid ในสารสกัดไข่น้ำ ภายใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ซ้าย) และ 366 นาโนเมตร (ขวา)	38
8	TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบไข่น้ำ (crude) สารมาตรฐาน ( $\beta$ -sitosterol) แพรกชั้นที่ 1-4 (F1-F4) และตะกอน (WF1) วัฏภาคเคลื่อนที่ acetone : hexane (10:30) ตรวจสอบสารโดยการพ่น 5% sulfuric acid และ 1% vanillin	41
9	สเปกตรัมของสารในแฟรกชันที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer	41
10	สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H}$ NMR : $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2	42
11	ภาพขยายของสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H}$ NMR : $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2	42
12	ภาพขยายของสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H}$ NMR : $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2	43
13	โครงสร้างของสาร $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ที่ระบุตำแหน่งคาร์บอน	44
14	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบไข่น้ำและ สารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมที่เวลา 90 วัน	51

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้คนหันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้น ประกอบกับกระแสนิยมในเรื่องสารสกัดจากธรรมชาติกำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก มีประโยชน์มากมายต่อร่างกาย สารจากธรรมชาติมีความหลากหลายและโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งในบางครั้งการสังเคราะห์เลียนแบบก็ยากที่จะทำให้เหมือนได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชผักและผลไม้ เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ทองแดง สังกะสี แมงกานีส และสารประกอบโพลีฟีนอล มีผลในการป้องกันโรคที่มีความเสี่ยงมาจากอนุมูลอิสระ<sup>(1)</sup>

อนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียรกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่อง ทำให้มีอนุมูลอิสระตัวใหม่เกิดขึ้นอย่างมากมายในระบบ อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายโดยการออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลสำคัญของสิ่งมีชีวิตได้แก่ ไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอ็มไซม์ รีเซพเตอร์และสารสื่อประสาท รวมไปถึงดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และองค์ประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญในร่างกาย ส่งผลให้การทำงานของสารชีวโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ ความชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง<sup>(2, 3)</sup> นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดจากรังสียูวีหรือสารเคมีที่รุนแรงเป็นผลให้ชั้นผิวหนังถูกทำลายทำให้เกิดการหลั่งสารไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบซึ่งเป็นผลให้เกิดอาการต่าง ๆ เช่น การบวม การแดง การหลุดลอกของชั้นผิวจากการเปลี่ยนแปลงและถูกทำลายและเกิดการอักเสบ<sup>(4)</sup>

สมุนไพรและพืชผักพื้นบ้านหลายชนิดอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ตัวอย่างการศึกษาในพืช เช่น

- ขมิ้นชันประกอบด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง และต้านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์<sup>(5)</sup>

- ใบขลุ่ย มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือกลุ่มฟิโนลิกและฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ลดการปวด และมีฤทธิ์ต้านโรควัณโรค<sup>(6)</sup>

จะเห็นได้ว่ามีการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสมุนไพรหรือผักพื้นบ้านที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อให้เกิดการนำสมุนไพรหรือผักพื้นบ้านนั้น ๆ มาใช้ประโยชน์ทั้งทางยา อาหารเสริมและ

เครื่องสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตรวดเร็ว มีปริมาณมาก มีความปลอดภัยสูง จึงทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นศักยภาพในการศึกษาพืชพื้นบ้านชนิดหนึ่งคือ ใข่น้ำ ซึ่งเป็นพืชที่ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

ใข่น้ำ (*Wolffia globosa*) เป็นพืชดอก พบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศไทย ถูกนำมาใช้ประกอบอาหาร นิยมรับประทานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ใข่น้ำมีคุณค่าทางอาหารสูงเนื่องจากมีโปรตีนสูงถึง 40 % และมีกรดอะมิโนเทียบเท่ากับถั่วเหลือง<sup>(7)</sup> จึงได้มีการศึกษาและใช้ใข่น้ำทดแทนถั่วเหลืองในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้ในการบำบัดน้ำเสียและวิจัยทางการแพทย์<sup>(8)</sup> ถึงแม้ว่าใข่น้ำจะมีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษารองประกอบทางเคมีหรือฤทธิ์ทางชีวภาพของใข่น้ำยังมีข้อมูลที่จำกัด จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการนำใข่น้ำมาทำการสกัดและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อที่จะใช้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของสารสกัดจากธรรมชาติและเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืช

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการสกัดและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใข่น้ำ โดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใข่น้ำ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใข่น้ำด้วยวิธี DPPH assay ฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยวัดความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้ยังศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดใข่น้ำโดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังและประเมินความคงตัวของร่างกายภาพและเคมีของสารสกัดใข่น้ำในตำรับครีมและสารสกัดหยาบ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในสารสกัดใข่น้ำ
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใข่น้ำ
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านการอักเสบของสารสกัดใข่น้ำ
4. เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใข่น้ำ
5. เพื่อประเมินความคงตัวของร่างกายภาพ และเคมีของสารสกัดใข่น้ำในตำรับครีม และสารสกัดหยาบ

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดใข่น้ำ
  - 1.1 ทำความสะอาดใข่น้ำ แล้วตากแดดให้แห้ง
  - 1.2 สกัดด้วยวิธีการหมักด้วยเอทานอล

- 1.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง
- 1.4 แยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
2. ตรวจสอบโครงสร้างของสารด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี
3. ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธี DPPH assay
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำโดยวิธียับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide assay)
5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดไข่น้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์
6. เตรียมตำรับครีมผสมสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธี beaker method
7. ประเมินความคงตัวของกายภาพและเคมีของสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมและสารสกัดหยาบ

ดังนี้

- 7.1 ชั่งน้ำหนักของครีมก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว
- 7.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH-meter
- 7.3 วัดค่าความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer
- 7.4 สังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น การแยกชั้น
- 7.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร

#### 1.4 คำย่อหรือสัญลักษณ์

%	ร้อยละ
°C	องศาเซลเซียส
TLC	ทีแอลซี หรือ รงคเลขผิวบาง (Thin layer chromatography)
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
g	กรัม
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
ng	นาโนกรัม
nm	นาโนเมตร
cm	เซนติเมตร
ppm	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
DPPH	อนุมูล 2,2 -ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

- Conc. ความเข้มข้น (Concentration)  
Am อุณหภูมิแวดล้อม (ambient temperature)  
IC<sub>50</sub> ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพยับยั้งที่ 50% (inhibitory concentration)

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลงานวิจัยนี้จะได้ข้อมูลของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในไข่น้ำที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงความสามารถในการต้านการอักเสบ
2. สามารถต่อยอดสู่ภาคอุตสาหกรรมทางอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืช
3. สามารถตีพิมพ์และเผยแพร่ในวารสารวิชาการในระดับประเทศหรือนานาชาติได้

## บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดใข้ น้ำ ผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้ารายละเอียด ทฤษฎี งานวิจัย และแนวคิดที่เกี่ยวข้อง สรุปได้ดังนี้

- 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และประโยชน์ของใข้ น้ำ
- 2.2 การสกัดและแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
- 2.3 การตรวจสอบโครงสร้างของสารด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี และอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี
- 2.4 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน
- 2.5 การอักเสบและสารสื่อกลางในการอักเสบ
- 2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
- 2.7 การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับอิมัลชัน

### 2.8 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และประโยชน์ของใข้ น้ำ

#### 2.8.1 ใข้ น้ำ (Water meal, Swamp Algae)

ใข้ น้ำ (*Wolffia globosa*) จัดอยู่ในวงศ์แห่น (Lemnaceae) สกุล *Wolffia* มีหลายสปีชีส์ เช่น *W. angusta*, *W. arrhiza*, *W. australiana*, *W. columbiana* *W. globosa* ประเทศไทยพบใข้ น้ำอยู่หลายชนิด แต่ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *W. globosa* (Roxburgh) Den Hartog and Van der Plas และ *W. arrhiza* (Linnaeus) Horker ex Wimmer<sup>(9)</sup> โดยทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันคือ *W. arrhiza* จะมีความกว้างมากกว่าความยาวมีขนาดใหญ่กว่า *W. globosa* ผิวสีเขียวเข้ม มันวาว<sup>(10)</sup> ขณะที่ *W. globosa* จะมีความยาวมากกว่าความกว้าง ขนาดเล็กกว่าและมีรูปทรงเป็นทรงกระบอกมากกว่า *W. arrhiza* มีลักษณะโปร่งแสง<sup>(11)</sup> ใข้ น้ำเป็นชื่อที่ใช้เรียกของภาคกลางและนครราชสีมา ขณะที่ภาคอีสานจะมีชื่อเรียกว่า ผำ และภาคเหนือจะเรียกว่า ใข้ ผำ<sup>(12)</sup> นอกจากนี้ยังพบใข้ น้ำ แอบยุโรป แอฟริกากลาง แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย บราซิล และอินโดนีเซีย<sup>(13)</sup>

#### 2.8.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใข้ น้ำ<sup>(14)</sup>

ใข้ น้ำเป็นพืชลอยน้ำที่มีขนาดดอกเล็กที่สุดในตระกูลพืชดอก<sup>(7)</sup> มีลักษณะเป็นเม็ดรีค่อนข้างกลม หรือรูปทรงไข่ มีสีเขียว มันวาว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 มิลลิเมตร ใข้ น้ำจัดเป็นพืชไม่มีรากไม่มีใบเรียกว่า ทัลลัส (thallus) ทัลลัสทำหน้าที่เป็นทั้งต้นและใบ มักอยู่กันเดี่ยว ๆ หรือติดกันเป็นคู่ ๆ ส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อพาราเรโนไคมา (parenchyma) ประกอบด้วยเซลล์มีชีวิตในลำต้นที่มีสีเขียวจะมีคลอโรพลาสต์ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์แสงและมีช่องอากาศแทรกอยู่ระหว่างเซลล์

จึงทำให้เห็นคล้ายฟองน้ำช่วยให้ไข่น้ำสามารถลอยตัวอยู่ที่ผิวน้ำ (ภาพที่ 1) ไข่น้ำจะพบมากระหว่างฤดูหนาวต่อกับฤดูร้อนพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของไทยชอบอากาศร้อนและแสงแดดมากพบได้ทั่วไปในน้ำนิ่งเช่น หนองน้ำ บ่อเก่า ๆ หรือที่มีน้ำขัง น้ำลึกตั้งแต่ 20 เซนติเมตร ไข่น้ำออกดอกเป็นช่อภายในฤดูตรงขอบที่สลัดเป็นดอกเดี่ยวแยกเพศ ดอกตัวผู้ 1 ดอกจะมีเพียงเกสรตัวผู้ที่มีอับเกสร 1 ช่อ ส่วนดอกตัวเมียมี 1 ดอกจะมีเพียงรังไข่ที่มีไข่อ่อนเพียง 1 ใบ ไข่น้ำสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบคือการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการผสมเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียภายในดอกอาศัยแมลงหรือน้ำในการแพร่กระจายละอองเกสรและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) แบ่งที่ลัดสใหม่ออกทางด้านข้างซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าที่ลัดสเดิมจนเจริญเติบโตและหลุดออกเป็นเดี่ยว ๆ ใช้เวลา 5-6 วัน การขยายพันธุ์ของไข่น้ำโดยปล่อยให้ขยายพันธุ์เองตามธรรมชาติซึ่งสามารถแตกหน่อและขยายพันธุ์รวดเร็วจนเต็มผิวน้ำคล้ายกับพรมสีเขียว โดยบ่อที่เพาะเลี้ยงจะต้องอยู่ในที่แสงแดดส่องทั้งวันและมีน้ำที่สะอาด หมั่นดูแลให้น้ำสะอาดสม่ำเสมอหากน้ำเริ่มเน่าเสีย ไข่น้ำจะตาย

ภาพที่ 1 ลักษณะของไข่น้ำภายนอกลอยตัวอยู่เหนือน้ำ



ที่มา: nanasarakaset.blogspot. 2558 : ออนไลน์.<sup>(15)</sup>

### 2.1.3 คุณค่าทางโภชนาการของไข่น้ำ

ไข่น้ำเป็นพืชชนิดเดียวในวงศ์แห่นที่นำมารับประทานเป็นอาหารของมนุษย์ได้ มีคุณค่าทางอาหารเชิงพืชสมุนไพร เนื่องจากมีสารเบต้าแคโรทีนสูงนิยมนำมาใช้ประกอบอาหารโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย นิยมนำมาประกอบอาหารประเภท ผัด คั่ว แกงหรืออ่อมและในปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาเพื่อนำไข่น้ำมาผลิตเป็นอาหารแปรรูปมากขึ้น



นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะสัตว์น้ำและสัตว์ปีก ไข่ น้ำมีรสชาติ มัน กรอบกรอบ มีรสชาติที่ดี มีกลิ่นเฉพาะตัวนอกจากนี้ยังมีปริมาณของโปรตีนสูงและมีสารอาหารต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** คุณค่าทางโภชนาการของไข่ไก่ (100 กรัม)

สารอาหาร	ปริมาณ
พลังงาน (กิโลแคลอรี/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	8.00
โปรตีน (ร้อยละ)	6.8 - 45
ไขมัน (ร้อยละ)	1.8 - 9.2
เส้นใย (ร้อยละ)	5.7 - 16.2
แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	59.00
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	25.00
เหล็ก (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	6.60
วิตามินเอ (IU/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	5,346.00
วิตามินบี (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	0.03
วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	11.00
กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง)	
Alanine	1,386
Arginine	1,045
Aspartic acid	1,576
Cysteine	339
Glutamic acid	1,723
Glycine	756
Histidine	335
Isoleucine	524
Leucine	1,222
Lysine	1,094
Methionine	176
Phenylalanine	728
Proline	820

### ตารางที่ 1 (ต่อ)

สารอาหาร	ปริมาณ
Serine	710
Threonine	636
Tryptophan	1,272
Tyrosine	1,095
Valine	774
Total amino acid	16,211
Total essential amino acids	7,860

ที่มา: วิลาสินี ดีปัญญา. 2555 : 14.<sup>(14)</sup>

#### 2.1.4 การใช้ประโยชน์ของไข่น้ำ

##### 1) การนำไข่น้ำมาประกอบอาหาร

ไข่น้ำมีปริมาณโปรตีนสูงและเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพอีกทั้งยังมีวิตามินและแร่ธาตุ ไข่น้ำเป็นอาหารนิยมรับประทานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของไทย โดยนำมาประกอบเป็นอาหารพื้นบ้านเช่น แกงคั่วหมู แกงอ่อม แกงไก่ ไข่เจียว ท่อหมกไข่น้ำ นอกจากนี้ได้มีการนำไข่น้ำมาใช้พัฒนาตำรับอาหารเพื่อส่งเสริมการบริโภคไข่น้ำโดยนำมาพัฒนาเป็นสูตรอาหาร 5 ตำรับ ได้แก่ แกงเขียวหวานไข่น้ำ ผัดฉ่าลูกชิ้นไข่น้ำ ท่อหมกไข่น้ำ ขนมหอยมรกต และก๋วยเตี๋ยวหลอดไข่น้ำ ซึ่งขนมหอยมรกตได้รับความนิยมและแนะนำให้มีการผลิตเพื่อจำหน่ายเนื่องจากมีรสชาติอร่อย และได้ประโยชน์ทางคุณค่าอาหารสูง<sup>(16)</sup> นอกจากนี้ยังมีการนำไข่น้ำมาใช้ผลิตไข่น้ำแผ่นเพื่อเพิ่มความหลากหลายและเป็นทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค<sup>(14)</sup>

##### 2) การนำไข่น้ำมาใช้เป็นอาหารสัตว์

ไข่น้ำเป็นอาหารจากธรรมชาติที่มีประโยชน์มาก เป็นแหล่งของโปรตีนและรงควัตถุ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะปลาที่กินพืชเป็นอาหารและอาหารสัตว์บก เช่น เป็ด ไก่ สุกร ได้มีการรายงานผลการนำไข่น้ำไปใช้แทนที่โปรตีนของถั่วเหลืองในการเลี้ยงไก่ ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของไข่น้ำเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองพบว่ามีความใกล้เคียงกัน โดยผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงการลดปริมาณต้นทุนในการเลี้ยงไก่และยังพบว่าไข่น้ำมีปริมาณการเพิ่มของสีไข่แดงที่เข้มข้นเมื่อใช้โปรตีนของไข่น้ำเพิ่มเข้าไปในอาหารปกติหรือใช้แทนที่โปรตีนจากถั่วเหลือง<sup>(17)</sup> นอกจากนี้การใช้ไข่น้ำทดแทนโปรตีนจากถั่วเหลืองในอาหารสัตว์ปีกพบว่าแหล่งสารสีธรรมชาติที่ดีสำหรับสัตว์ปีกอีกด้วย<sup>(18)</sup>

### 3) การนำไข่น้ำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ไข่น้ำเป็นพืชลอยน้ำที่สามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ช่วยดูดซับสารจากน้ำเสีย จากการศึกษาการใช้ไข่น้ำในการบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มสุกรและนำไข่น้ำมาใช้เป็นอาหารเสริม ในสัตว์เลี้ยงพบว่าความเข้มข้นของน้ำเสีย 40% ใช้ระยะเวลาในการบำบัด 15 วัน โดยที่ไข่น้ำมี ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียได้เกือบ 100% และพบว่าชีวมวลของไข่น้ำเฉลี่ยมีมากที่สุดเท่ากับ  $104.83 \pm 0.02$  กรัมน้ำหนักสดต่อตารางเมตร ซึ่งเหมาะสมในการใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมสัตว์<sup>(19)</sup>

### 4) การนำไข่น้ำมาใช้ในการทางการแพทย์

นอกจากไข่น้ำจะมีโปรตีนที่สูงมีประโยชน์ต่อร่างกายซึ่งช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อและ เป็นส่วนประกอบของฮอร์โมน เอ็มไซม์ เป็นสารสร้างภูมิคุ้มกันโรคติดเชื้อบางชนิด ช่วยรักษาสมดุ ลกรตต่างและสมดุลงน้ำในร่างกาย ไข่น้ำมีคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นสารสีเขียวที่พบในพืชทำหน้าที่สังเคราะห์ แสงมีโครงสร้างเป็น cyclic tetrapyrrole ที่คล้ายคลึงกับฮีม (heme) ที่อยู่ในฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือด ได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจาก *W. arrhiza* ในรูปแบบ ยาเม็ดเคี้ยว สำหรับผู้ที่ต้องการแหล่งโปรตีนจากพืช ผู้ที่ต้องการดูแลสุขภาพ ซึ่งมีสารอาหารและ กรดอะมิโนจำเป็นปริมาณสูง<sup>(20)</sup>

นอกจากนี้ยังมีการรายงานผลการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันและ ปริมาณฟีนอลิกของไข่น้ำที่ปรุงสำเร็จเป็นแกงไข่น้ำ ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น กระเทียม พริก ใบแมงลัก มะนาว เนื้อปลา และน้ำปลา พบว่าแกงไข่น้ำมีความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระเท่ากับ  $31.76 \pm 5.08$  mg/100g และมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ  $40.54$  mg/100g<sup>(21)</sup> ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของจินดาวลัย<sup>(22)</sup> ได้รายงานผลของการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำ ในรูปแบบตำรับอาหารคือ ข้าวไข่น้ำกับหมู พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าเท่ากับ 59.79% และมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ  $66.37 \pm 0.21$  มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามการศึกษาของทั้งสอง งานวิจัยยังคงอยู่ในรูปแบบของอาหารที่ปรุงสำเร็จซึ่งมีส่วนประกอบอื่น ๆ ผสมอยู่ด้วย นอกจากนี้ การศึกษาเปรียบเทียบไข่น้ำกับผักพื้นบ้านชนิดอื่น ๆ จำนวน 10 ชนิด พบว่าไข่น้ำที่ทำการสกัด ด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าผักพื้นบ้านชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ผักอีหนู ผักกะทกรก ผักพาย ยอดอ่อนใบขนุน เป็นต้น<sup>(23)</sup>

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำน่าจะมีเหตุผลจากองค์ประกอบทางเคมี ได้มีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีของไข่น้ำพบว่าไข่น้ำมีสาร apigenin และ luteolin ซึ่งเป็นสาร กลุ่ม flavones<sup>(24)</sup> นอกจากนี้มีการรายงานการพบสารกลุ่มสเตอรอลได้แก่ stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol ซึ่งเป็นสเตอรอลจากพืช (plant sterol) และพบสารอะโรมาติก (aromatic compounds) ได้แก่ (E)-p-coumaric acid, ferulic acid และ caffeic acid ใน *W. arrhiza*<sup>(25)</sup>

## 2.9 การสกัดและแยกสารสำคัญจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

พืชจัดเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์จำนวนมากขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาใช้ มีทั้งสารที่เป็นโมเลกุลพื้นฐานในการดำรงชีวิตจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งพืชจะสร้างสารเหล่านี้ในสภาวะเค้นมีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities) เช่น เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) น้ำมันหอมระเหย (essential oils) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบเหล่านี้มีประโยชน์ในการรักษาโรค ป้องกันและส่งเสริมสุขภาพ ดังนั้นการนำพืชมาใช้งานมักจะนำมาทำให้มีสารออกฤทธิ์ (active compounds) ในปริมาณสูงโดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นจะทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้ของผสมหรือสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยน้ำยาหรือตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ หรือสารละลายของผสม 2 ชนิด ซึ่งใช้หลักการ สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (like dissolve like) การเลือกน้ำยาหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมส่งผลให้มีปริมาณของสารสำคัญที่สนใจในปริมาณสูงและลดสารรบกวนต่าง ๆ หลังจากการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมการเลือกวิธีการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลาย วิธีการหมัก (maceration) เป็นวิธีการที่ค่อนข้างง่าย ไม่ยุ่งยาก ไม่ใช้เครื่องมือ ทำโดยการหมักพืชกับตัวทำละลายและปล่อยให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในออกมา ซึ่งเหมาะกับพืชที่เป็นเนื้อเยื่อไม่แข็งมากนักรวมถึงพืชที่ไม่สามารถทนความร้อนได้ทั้งไว้ประมาณ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ รินเอาสารสกัดออกมาให้ได้สารละลายมากที่สุด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองและนำไปทำให้สารสกัดเข้มข้นโดยวิธีการระเหย (free evaporation) การกลั่นในสุญญากาศ (distillation in vacuum) หรือการแช่แข็ง (freezing) ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบก่อนนำไปทำการวิเคราะห์หรือแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน<sup>(26)</sup>

### การแยกสารสำคัญจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี<sup>(27)</sup>

การแยกสารผสมหรือการทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัด การตกผลึก การกลั่น และเทคนิคโครมาโทกราฟีซึ่งเป็นอีกวิธีที่มีความนิยมในการนำมาใช้แยกสารที่ผสมกันอยู่ โดยอาศัยหลักการแยกของสารต่างชนิดกันที่ผสมกันและกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคคงที่ (stationary phase) หรือตัวดูดซับและวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากันโดยสารต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการเดินทางผ่านวัฏภาคคงที่ออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้น ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) และแรงคเลฟิวบาง (thin-layer chromatography) ซึ่งใช้ในการแยกสารในงานวิจัยครั้งนี้

## 1) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

คอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารต่าง ๆ อาทิเช่น การแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารสกัดจากธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา โดยเทคนิคนี้จะมีวัฏภาคคงที่เป็นของแข็งเช่น ซิลิกาเจล ( $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) บรรจุในคอลัมน์ยาวสามารถปรับขนาดคอลัมน์ได้ตามความเหมาะสมของงานหรือสารที่ต้องการแยก จากนั้นจึงนำสารที่ต้องการแยกนั้นเติมลงไปด้านบนของคอลัมน์ที่บรรจุวัฏภาคคงที่ก่อนจะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อให้เกิดการแยกตามกำลังความสามารถของสารแต่ละชนิดที่ดึงดูดกับวัฏภาคคงที่ ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมากได้ดีกว่าสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายจะชะสารแต่ละชนิดออกมาไม่พร้อมกันขึ้นอยู่กับแรงดูดของสารแต่ละชนิดสารที่ดูดซับได้ดีก็จะออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสารที่ดูดซับได้ไม่ดี

ซิลิกาเจลได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นวัฏภาคคงที่เนื่องจากสามารถใช้แยกสารได้เกือบทุกชนิดยกเว้นสารที่มีขั้วมาก ๆ และเป็นเบสมาก ๆ ยังมีสารที่นิยมนำมาใช้เป็นวัฏภาคคงที่อีกหลายชนิดได้แก่ อะลูมินา เซลลูโลส ซูโครส แป้ง แคลเซียมคาร์บอเนต โดยปัจจัยที่จะกำหนดว่าสารจะออกมาเร็วหรือช้าหรือการแยกจะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ ขึ้นกับแรงดึงดูดระหว่างสารที่ต้องการแยกกับวัฏภาคคงที่และการละลายของสารในวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นความมีขั้วของสารที่จะแยกและความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้จึงมีผลในการแยก โดยทั่วไปการชะสารหรือใช้ตัวทำละลายมักจะเริ่มต้นด้วยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้วน้อย ๆ เพื่อชะสารที่ดูดซับไว้ในวัฏภาคคงที่ได้ไม่ตีออกมาก่อนแล้วจึงเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นตามลำดับ ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีเรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปมาก แสดงในตารางที่ 2

เทคนิคการแยกสารผสมโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีเทคนิคสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแยกสารผสมโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีคือ

### 1) การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกจะต้องมีความสัมพันธ์กับสารที่จะใช้แยก โดยควรมีปริมาณตัวดูดซับ 25-30 เท่าของปริมาณสารตัวอย่างหรือหากเป็นสารผสมที่ซับซ้อนอาจใช้ 25-200 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง ในการเตรียมคอลัมน์เพื่อใช้งานจะทำการอุดปลายล่างของคอลัมน์ด้วยใยไหมหรือสำลี จากนั้นเติมทรายละเอียดเพื่อปรับระดับให้เรียบและป้องกันไม่ให้ตัวดูดซับไหลลงไปอุดตรงปลายคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการใส่ตัวดูดซับโดยมีวิธีทำได้ 2 วิธีคือ วิธีบรรจุแบบเปียกหรือ slurry (wet pack or slurry method) โดยตัวดูดซับจะถูกคนในตัวทำละลายแล้วเทผ่านกรวยลงในคอลัมน์พร้อมเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกไปอย่างช้า ๆ ใช้ลูกยางเคาะช่วยให้ตัวดูดซับอัดแน่น ป้องกันการเกิดช่องว่างของอากาศเข้าไปซึ่งจะทำให้เกิดรอยแตกแยกชั้นทำให้มีประสิทธิภาพ

การแยกทดลองและวิธีบรรจุอีกวิธีหนึ่งคือ วิธีบรรจุแบบแห้ง (dry pack method) วิธีนี้จะใส่ตัวทำละลายในคอลัมน์แล้วจึงจะค่อย ๆ เทตัวดูดซับลงไปคอลัมน์ครั้งละน้อยอย่างต่อเนื่องพร้อมทั้งปล่อยตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ ใช้สายยางเคาะเบาๆหลังจากใส่ตัวดูดซับหมดแล้วเกลี่ยผิวบนให้เรียบปิดทับด้วยทรายละเอียดอีกชั้นหนึ่ง

## 2) การใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์

ทำการไขตัวทำละลายที่เหลือบนชั้นทรายออกให้เหลือปริมาณชั้นทราย ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างในรูปแบบสารละลายเข้มข้นและปริมาตรที่น้อยลงด้านบนคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลลงไปจนปริมาณชั้นทราย ใช้ตัวทำละลาย (eluting solvent) เดิมลงไปทีละเล็กละน้อยเพื่อให้สารไหลผ่านตัวดูดซับ จนมั่นใจว่าสารที่จะทำการแยกนั้นลงไปในตัวดูดซับทั้งหมดแล้วเติมตัวทำละลายปริมาณมากลงไป

## 3) ขบวนการชะสาร (Elution process)

เลือกตัวทำละลายที่มีความบริสุทธิ์ในการนำมาใช้เป็นตัวชะและก่อนนำมาใช้ในการชะคอลัมน์ ควรมีการศึกษาบนแผ่น TLC ก่อนว่ามีการแยกที่ดี โดยตัวชะอาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม ในการชะควรควบคุมอัตราการไหลของตัวทำละลายไม่ควรเร็วหรือช้าเกินไป

## 4) การรองรับสารที่ถูกชะออกและการแยกสาร

การตรวจหาตำแหน่งของแถบสาร (visualization) เพื่อรองรับสารเมื่อออกจากคอลัมน์ มีวิธีการดังนี้


4.1) กรณีที่สารประกอบมีสีสามารถรองรับสารได้เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนลงมา

4.2) กรณีที่สารไม่มีสี หากสารเหล่านั้นเกิดฟลูออเรสเซนซ์กับรังสีอัลตราไวโอเล็ต เราสามารถมองเห็นแถบได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตในที่มืด

4.3) ในกรณีที่สารประกอบไม่มีสีและไม่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ การชะสารเหล่านี้ควรใช้กลุ่มตัวทำละลายหรืออนุกรมของตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นทีละน้อย โดยเริ่มต้นจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำสุด (โดยปกติเป็น hexane หรือ petroleum ether) อาจมีแถบหนึ่งเคลื่อนลงมาและถูกชะออกจากคอลัมน์ จากนั้นให้เปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มจากเดิมเล็กน้อยและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สารจะทยอยถูกชะออกทีละตัว วิธีเพิ่มสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ได้ผลดีที่สุดคือ การใช้ตัวทำละลายผสมเช่นเริ่มต้นจาก hexane แล้วเปลี่ยนเป็น hexane:ether ในอัตราส่วนดังนี้ 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 และ 1:9 จนในที่สุดเป็น ether ที่บริสุทธิ์ ถ้าการเปลี่ยนสภาพขั้วของตัวทำละลายเป็นแบบก้าวกระโดดจากต่ำไปสูงทันทีจะทำให้สารทั้งหมดถูกชะออกพร้อมกัน การรองรับสารละลายที่ออกมาให้รองรับเป็นส่วน ๆ แต่ละส่วนมีปริมาตรเท่ากันนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วย thin-layer chromatography (TLC) ส่วนใดที่พิสูจน์ด้วย TLC แล้วว่าเป็นสารเดียวกัน ให้เทรวมกันและแยกสารออกโดยระเหยตัวทำละลายออกไป

## ตารางที่ 2 ความสามารถของตัวทำละลายในการชะสารเรียงลำดับจากต่ำไปสูง

Hexane
Petroleum ether
Cyclohexane
Toluene
Benzene
Dichloromethane
Chloroform
Diethyl ether
Ethyl acetate
Acetone
Propanol
Ethanol
Methanol
น้ำ



ความสามารถในการชะสารเพิ่มขึ้น  
สถานะขั้วเพิ่มขึ้น

ที่มา: รัชณี ตัณฑะพานิชกุล. 2550 : 30-40.<sup>(27)</sup>

## 2) รงคเลขผิวนาง (Thin Layer Chromatography, TLC) <sup>(28,29)</sup>

รงคเลขผิวนาง (thin layer chromatography) หรือที่นิยมเรียกสั้น ๆ ว่า TLC เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่างออกจากกันบนแผ่นรงคเลขผิวนาง เป็นเทคนิควิเคราะห์สารประกอบที่รวดเร็ว สะดวก ราคาไม่แพง สามารถแยกและตรวจสอบสารปริมาณน้อย ๆ โดยจะมีวัฏภาคคงที่ (stationary phase) เคลือบอยู่บนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบอาจเป็นแผ่นกระดาษ แผ่นอลูมิเนียมหรือแผ่นพลาสติกบาง ๆ สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบจะถูกแต้มไว้บนวัฏภาคคงที่จากนั้นจะนำแผ่น TLC ใส่ลงไปในภาชนะที่มีระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) จะพาสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่นรงคเลขผิวนาง วัฏภาคเคลื่อนที่ที่จะเคลื่อนที่ไปตามตัวดูดซับและพาสารตัวอย่างขึ้นไปเกิดการแยกของสารตามหลักการของโครมาโทกราฟี การเคลื่อนที่ของสารชนิดหนึ่ง ๆ จากจุดเริ่มต้นมาจนถึงจุดที่สารเคลื่อนที่มาถึงเป็นสัดส่วนกับระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดที่ตัวทำละลายหยุดเคลื่อนที่ (solvent front) เรียกว่าค่า  $R_f$  เป็นค่าคงที่สำหรับสารชนิดหนึ่ง ๆ ที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ และตัวทำละลายชนิดหนึ่ง ๆ ดังนั้นการคำนวณหาค่า  $R_f$  จะทำให้สามารถบอกได้ว่าสารตัวอย่างนั้นคืออะไรซึ่งเป็นการวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้นได้ (qualitative) นอกจากนี้เทคนิครงคเลขผิวนางยังสามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ทางยา เครื่องสำอาง วิเคราะห์การปนเปื้อน ศึกษาความคงตัวของสารสำคัญ ควบคุมคุณภาพของยาและสมุนไพร เป็นต้น

ซึ่งต่อมาก็ได้มีการพัฒนาเป็นรงค์เลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง มีประสิทธิภาพในการแยกและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ทำได้รวดเร็ว แม่นยำและสามารถให้ผลการวิเคราะห์ซ้ำ (reproducibility) และมีความเที่ยง<sup>(26,30)</sup>

ได้มีการรายงานการศึกษาหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค TLC ในการแยกสาร ferulic acid, p-coumaric acid, caffeic acid โดยใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (20x20 cm) เป็นวัฏภาคคงที่และมีระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น chloroform:methanol:formic acid ในอัตราส่วน 85:15:1<sup>(31)</sup> และการวิเคราะห์หาสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates เป็นวัฏภาคคงที่เช่นเดียวกันแต่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น toluene:diethyl ether ในอัตราส่วน 40:40<sup>(32)</sup> และ acetone:hexane อัตราส่วน (20:60)<sup>(33)</sup>

## 2.10 การตรวจสอบโครงสร้างของสารด้วยสเปกโตรสโกปี<sup>(34)</sup>

สเปกโตรสโกปี (spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาโครงสร้างของสารหรือพันธะต่าง ๆ ในสารอินทรีย์โดยศึกษาอัตราการเกิดของรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าต่อสสารหรือโมเลกุลหนึ่ง ๆ โดยที่สารหรือโมเลกุลหนึ่ง ๆ จะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงไว้เมื่อความถี่ของแสงเท่ากับพลังงาน transition ของโมเลกุล ทำให้ค่าที่ไปตกกระทบที่ detector มีปริมาณที่ลดลงซึ่งจะบันทึกผลออกมาเรียกว่า สเปกโตรแกรม (spectrogram) หรือสเปกตรัม (spectrum) สเปกตรัมของสารแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารอินทรีย์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคในการหาโครงสร้างของสาร 2 ชนิด คือ

### 2.3.1 อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (infrared หรือ IR spectroscopy)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการหาหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะของสาร โดยสารที่ได้รับพลังงานอินฟราเรดที่มีความถี่ในช่วง  $700-5000\text{ cm}^{-1}$  จะส่งผลให้พันธะต่าง ๆ ในโมเลกุลเกิดการสั่น เช่น เกิดการยืด-หดของพันธะ (bond stretching) หรือการโค้งงอของพันธะ (bond bending) พันธะต่างชนิดกันจะเกิดการ stretching ในช่วงความถี่ที่ต่างกัน ดังนั้น IR spectrum จะใช้ในการบ่งบอกชนิดของพันธะที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารแต่ละชนิดซึ่งจะมีคุณสมบัติเฉพาะ โมเลกุลของสารแต่ละชนิดจะมีความสามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้ที่ความถี่ต่างกันขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะและน้ำหนักของอะตอมของ functional groups ในโมเลกุลนั้น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

### 2.3.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy)

nuclear magnetic resonance หรือ NMR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาโครงสร้างของสารอินทรีย์เป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน การศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับการดูดกลืน



คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นวิทยุ nuclei ของโมเลกุลหนึ่ง ๆ จะมีการหมุนอยู่ตลอดเวลาเมื่อผ่านยังสนามแม่เหล็กไฟฟ้าแรงสูงจะทำให้มีการจัดเรียงตัวใหม่ไปในทิศทางเดียวกันกับสนามแม่เหล็กไฟฟ้าหรือทิศทางตรงข้าม ซึ่งเมื่อเราให้พลังงานช่วงความถี่วิทยุ (radiofrequency, rf) เข้าไป จะไปกระตุ้น nuclei ที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำ (lower energy state) ให้ขึ้นไประดับพลังงานที่สูงกว่า (flip) ปรากฏการณ์นี้เราเรียกว่า การเกิด resonance หรือเรียกเต็มว่า nuclear magnetic resonance การ plot ระหว่างพลังงานที่ถูกดูดโดย nuclei ของสารตัวอย่างกับความถี่จะได้เป็น NMR spectrum ในงานวิจัยนี้ใช้การวิเคราะห์โปรตรอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปีซึ่งเป็นนิวเคลียสที่มีความสำคัญมากที่สุดเนื่องจากโปรตรอนเป็นธาตุที่พบมากในสารประกอบอินทรีย์ทั่วไป

ข้อมูลที่ได้จากโปรตรอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy)<sup>(27)</sup>

1) Chemical shift ( $\delta$ , ppm) เป็นค่าที่บอกตำแหน่งของโปรตรอนที่วัดห่างจากสัญญาณของ tetramethylsilane (TMS) ซึ่งเป็นสารอ้างอิงที่มีค่า chemical shift เท่ากับศูนย์ โดยทั่วไปสารประกอบอินทรีย์จะมีค่า chemical shift ระหว่าง 0-10 โดยที่ค่าของการเกิดเรโซแนนซ์นั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งและสภาวะแวดล้อมทางเคมีของโปรตรอนในสารนั้น ๆ

2) Integration สัญญาณซึ่งประกอบด้วยพีค อาจจะมีพีค 1 พีค 2 พีค หรือหลาย ๆ พีค NMR สเปกโตรมิเตอร์สามารถอินทิเกรต (integrate) พื้นที่ใต้พีคออกมาและให้ค่ากำกับแต่ละสัญญาณ สัญญาณที่มีโปรตรอนมากจะมีความเข้มสูงจะให้ค่าอินทิเกรตสูงมากกว่าสัญญาณที่มีโปรตรอนน้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้ความสูงของอินทิเกรตมาเปรียบเทียบกับอัตราส่วนใช้ในการหาจำนวนโปรตรอนของแต่ละสัญญาณ

3) Spin-spin splitting เป็นการแยกของสัญญาณออกเป็นหลายพีค เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาระหว่างสปินของโปรตรอนที่อยู่ข้างเคียงกัน อันตรกิริยานี้เรียกว่า coupling ซึ่งวัดเป็นค่าของ coupling

4) Coupling constant ช่วงห่างของพีคของแต่ละสัญญาณ (วัดเป็น Hz) สามารถอ่านค่าได้จากสเปกตรัมโดยตรง ค่าตัวเลขนี้เรียกว่า coupling constant โปรตรอนสองกลุ่มที่ couple กันจะมีช่วงห่างระหว่างพีคหรือ coupling constants เท่ากัน

การวัด  $^1\text{H}$  NMR spectrum สารตัวอย่างจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายโดยตัวทำละลายไม่มี  $^1\text{H}$  ประกอบอยู่หรือตัวทำละลายที่ถูกแทนที่ hydrogen ด้วย deuterium เรียกว่า deuterated solvent เช่น  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  ถึงแม้ว่า deuterium อะตอมจะมีแมกเนติกโมเมนต์เช่นเดียวกับโปรตรอนแต่จะไม่ดูดคลื่นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงเดียวกับโปรตรอน ดังนั้นจึงไม่มีสัญญาณของ deuterium ปรากฏในการวัด ในการวัดจะใช้ tetramethylsilane

(TMS;  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) เป็นสารอ้างอิงซึ่งสัญญาณของสาร TMS จะปรากฏสัญญาณเพียงตำแหน่งเดียวและเกิดที่ความถี่ต่ำเป็นพิเศษดังนั้นสัญญาณของ TMS จึงมีค่า chemical shift เป็นศูนย์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR พลังงานที่ nuclei ตูกลั่นจนเกิด resonance นำมา plot กับความถี่ของพลังงานที่ให้ไปจะได้เป็น NMR spectrum ซึ่งการ flip ของ  $^1\text{H}$  แต่ละตัวจะเกิดที่ความถี่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อมทางเคมี ตำแหน่งของพีค (peak) บน NMR spectrum จะวัดในหน่วยของ  $\delta$  (delta) ซึ่งจะเกิดพีคที่ downfield (lower field) กว่าสารอ้างอิง TMS ดังนั้นค่า chemical shift ของโปรตอนหนึ่ง ๆ คือค่า  $\delta$  เมื่อวัดเทียบกับ TMS ซึ่งเป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อมทางเคมีของโปรตอนที่อยู่ข้างเคียงในโมเลกุลของสารนั้น ๆ<sup>(35)</sup>

$$\text{Chemical shift} = \delta = \frac{\text{ระยะห่างของ peak จาก TMS (Hz)}}{\text{ความถี่ของ spectrometer ในหน่วย MHz}} \text{ ppm}$$

**ตารางที่ 3** ค่า stretching frequencies ของพันธะต่าง ๆ ที่พบทั่วไปในสารประกอบอินทรีย์

พันธะ	ชนิดของสารประกอบ	ช่วง wavenumber, $\text{cm}^{-1}$
C-H	Alkanes	2960-2850(s) stretch
		1470-1350(v) scissoring และ bending
	$\text{CH}_3$ Umbrella Deformation	1380(m-w)–Doublet–isopropyl
C - H	Alkenes	3080-3020(m) stretch
		1000-675(s) bend
C - H	Aromatic Rings	3100-3000(m) stretch
	Phenyl Ring Substitution Bands	870-675(s) bend
	Phenyl Ring Substitution Overtones	2000-1600(w) – fingerprint region
C - H	Alkynes	3333-3267(s) stretch
C = C	Alkenes	1680-1640(m,w) stretch
C $\equiv$ C	Alkynes	2260-2100(w,sh) stretch
C = C	Aromatic Rings	1600, 1500(w) stretch
C - O	Alcohols, Ethers, carboxylic acids,	1260-1000(s) stretch
C = O	Aldehydes, Ketones, Carboxylic	1760-1670(s) stretch
O-H	Monomeric – alcohols, phenols	3640-3160(s,br) stretch
	Hydrogen-bonded – alcohols,	3600-3200(br) stretch
	Carboxylic acids	3000-2500(br) stretch
N - H	Amines	3500-3300(m)stretch

### ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธะ	ชนิดของสารประกอบ	ช่วง wavenumber, $\text{cm}^{-1}$
C – N	Amines	1340-1020(m) stretch
C $\equiv$ N	Nitriles	2260-2220(v) stretch
NO <sub>2</sub>	Nitro compounds	1660-1500(s) asymmetrical stretch
		1390-1260(s) symmetrical stretch

ที่มา: บัญชา พูลโกคา. ม.ป.ป. : ออนไลน์.<sup>(34)</sup>

## 2.4 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

### 2.4.1 ความหมายอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระคือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ในตำแหน่งของอิเล็กตรอนวงนอกสุดเป็นผลให้ไม่เสถียรและทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นโดยการเข้าไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารอื่นเพื่อให้ตัวเองมีความเสถียร ดังนั้นโมเลกุลหรืออะตอมของสารที่สูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นสารอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไปเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อไปเรื่อย ๆ อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ในทางชีววิทยาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) นอกจากนี้สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite)<sup>(2)</sup>

### 2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสามารถจับอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย โดยปกติแล้วร่างกายของเราจะมีกลไกในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยกระบวนการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase:SOD) จะทำหน้าที่กำจัด  $\text{O}_2^{\cdot -}$  ได้เป็น  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ  $\text{O}_2$  และถูกกำจัดต่อด้วยเอนไซม์คะตาเลส (catalase:CAT) ได้เป็นน้ำกับออกซิเจน กลูตาไทโอน (glutathione:GSH) และคีเลทโลหะ (metal chelators) ช่วยให้ปริมาณอนุมูลอิสระสมดุล นอกจากนี้ยังมีกลไกการทำงานของ nuclear factor erythroid 2-related factor2 (Nrf2) เป็นกลไกในการกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ในสภาวะปกติ Nrf2 จะจับ Kelch-like-ECH-associated protein1 (Keap1) อยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อร่างกายได้รับการกระตุ้นจากสภาวะไม่ปลอดภัย

หรือได้รับอนุมูลอิสระ Nrf2 จะแยกตัวออกจาก Keap1 ทำให้ Nrf2 เคลื่อนตัวเข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นการทำงานของยีนอื่น ๆ เช่น intracellular redox-balancing proteins, phase II detoxifying enzymes, transporters<sup>(36)</sup>

นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่รับจากภายนอกซึ่งได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเช่น วิตามินซี, เบต้า-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) โดยในปัจจุบันพบว่า สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบมากในธรรมชาติอันได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ซ็อกโกแลต และ ไวน์แดง เป็นต้น สารโพลีฟีนอลเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงเป็นสารต้านการก่อมะเร็งและสามารถลดความดันโลหิตจากฤทธิ์การขยายหลอดเลือด เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลโดยกลไกของการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และโพลีฟีนอลอื่น ๆ มี 3 กลไกคือ

- 1) การเป็นสารคีเลต (chelating agent)
- 2) เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant)
- 3) ทำหน้าที่ regenerate วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ให้กลับไปทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกครั้ง<sup>(2)</sup>

มีงานวิจัยมากมายบ่งชี้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรค โดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ สารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทางคือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายและลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระตัวอย่าง เช่น ชาเขียว มีสารประกอบหลักกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, และ epigallocatechin-3-gallate โดยที่กลุ่มสารเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด ROS การทดสอบหาสาร epigallocatechin กับหนูที่ได้รับรังสี UVB พบว่าสามารถช่วยลดการเกิด  $H_2O_2$  ในชั้นอีพิเดอร์มิส (epidermis) และชั้นเดอร์มิส (dermis)<sup>(37)</sup> Anand et al. (2010)<sup>(38)</sup> ได้รายงานผลการศึกษาความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในใบชาที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ hydroxyl radical ซึ่งช่วยป้องกันดีเอ็นเอไม่ให้ออกซิเดชัน ลดความเสียหายที่จะทำอันตรายต่อดีเอ็นเอ นอกจากนี้พืชจะมีความสามารถในการป้องกันดีเอ็นเอถูกทำลายแล้วยังพบว่าพืชบางชนิดที่มีสารประกอบในกลุ่มของโพลีฟีนอล เช่น resveratrol ที่พบในองุ่นและไวน์แดงมีความสามารถในการกระตุ้น Nrf2 ให้เคลื่อนตัวเข้าไปในนิวเคลียสได้สูง

กว่าปกติในสภาวะที่เซลล์ได้รับอันตรายและส่งผลให้มีการลดปริมาณของ Keap1 ทำให้มีปริมาณ GST: glutathione-S-transferase ซึ่งเป็น phase II detoxifying enzymes และ SOD (superoxide dismutase) มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นผลให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดสูงขึ้น<sup>(39)</sup>

#### 2.4.3 ดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (total antioxidant capacity TAC)<sup>(2)</sup>

การตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารทดสอบมีวิธีการที่สำคัญอยู่สองวิธี

1) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เป็นวิธีการวัดความสามารถของการต้านออกซิเดชันโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม ตัวอย่างเช่น วิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC) และวิธีการ total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)

วิธี TRAP เป็นวิธีที่สร้างอนุมูลอิสระโดยใช้สารประกอบเอโซ เช่น 2,2'-azobis (2-amidinopropane) สลายตัวเกิดอนุมูลเปอร์ออกซี วิธีการนี้จะวัดปริมาณอะตอมไฮโดรเจนที่มีการแลกเปลี่ยนโดยจะวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ที่ลดลงเมื่อมีการเกิดออกซิเดชันจากสารทดสอบ สารต้านออกซิเดชันจะไปแย่งจับสารเรืองแสงจะทำให้ความเข้มสารฟลูออเรสเซนต์ลดลงหรือเกิดอนุมูลเปอร์ออกซีลดลง ในขณะที่วิธีการ ORAC เป็นการวัดแสงฟลูออเรสเซนต์จากสาร  $\beta$ -phycoerythrin ซึ่งเดิมจะให้แสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อผสมสารเอโซลงไปจะไม่มีผลทำให้แสงฟลูออเรสเซนต์เสียไป ดังนั้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบจะไปจับอนุมูลเปอร์ออกซีหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยกลไก HAT จะทำให้มีแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบทั้งสองวิธีเป็นวิธีการทดสอบโดยอ้อมคือจะต้องทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อนและวิธีการ ORAC เป็นวิธีการวิเคราะห์อนุมูลเปอร์ออกซีที่ละลายน้ำเท่านั้น

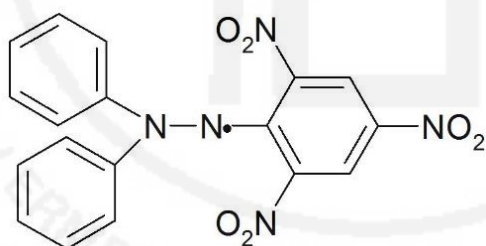
2) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (electron transfer, ET หรือ SET) วิธีการนี้จะหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของสารไปรีดิวซ์สารอื่น ได้แก่ โลหะ และ อนุมูล ตัวอย่างวิธีนี้เช่น วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีการนี้จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ใช้ในการทดสอบ สารสกัดจากพืชหรือสารที่ต้องการวัดความสามารถในการรีดิวซ์จะไปรีดิวซ์อะตอมของเหล็กได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส  $Fe^{2+}$ -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษแต่มีข้อเสียคือปฏิกิริยาที่ทดสอบไม่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย

วิธี TEAC เป็นการวิเคราะห์การขจัด 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) ที่คงตัว มีสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบไปจะทำให้มีสีลดลง เปรียบเทียบผลกับ trolox การขจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีการนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งรีดักชันและการขจัดโดยกลไก HAT ข้อดีของวิธีการนี้คือทำง่าย ใช้เวลารวดเร็ว วิเคราะห์ได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง วิเคราะห์ได้ทั้งสารที่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายในลิปิด แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นปฏิกิริยาที่ไม่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย

วิธี DPPH เป็นการวิเคราะห์โดยใช้อนุมูล DPPH<sup>•</sup> (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับ DPPH<sup>•</sup> สารจะรีดิวซ์อนุมูลอิสระให้เปลี่ยนฟอร์มไป ทำให้มีสีลดลง วัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร วิธีการนี้จัดเป็นวิธีการที่นิยมในการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ มีข้อดีคือ ง่าย ใช้เครื่องมือทั่วไป แต่มีข้อเสียคือเป็นปฏิกิริยาที่ไม่เกิดขึ้นในมนุษย์และจากโครงสร้างของ DPPH<sup>•</sup> จะถูกบดบังจากวงแหวนเบนซีนและหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้หรืออาจจะเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความสามารถจริง

ภาพที่ 2 โครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl



ที่มา: Magdalena Zdybel and Barbara Pilawa. 2014 : ออนไลน์.<sup>(40)</sup>

## 2.5 การอักเสบและสารสื่อกลางในการอักเสบ<sup>(41, 42)</sup>

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการของร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อในร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์ การขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน โดยกระบวนการอักเสบจะทำให้มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกไป รวมถึงเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาซึ่งกระบวนการอักเสบส่งผลให้เนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บได้มีการซ่อมแซมและกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไป แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบหากเกิดขึ้นนานเกินไปหรือเกิดเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อนั้นทำงานผิดปกติได้เช่นกัน

### การอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่

1. การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นภายในเวลาวินาที่หรือนาทีและสามารถคงอยู่ได้ 2-3 วัน จะมีอาการบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (exudate) ภายในเนื้อเยื่อและพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils ซึ่งสิ่งที่มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบชนิดเฉียบพลันเช่น เชื้อโรคชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสารพิษที่สร้างจากเชื้อโรค อุบัติเหตุที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ สารทางกายภาพและสารเคมี การตายของเนื้อเยื่อ สิ่งแปลกปลอมและปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (immune reaction)

2. การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) การอักเสบเรื้อรังจะเกิดนานกว่าเป็นระยะเวลาอันอาจเป็นสัปดาห์หรือหลายเดือน โดยจะมีการอักเสบดำเนินอยู่ (active inflammation) รวมทั้งการทำลายเนื้อเยื่อ (tissue destruction) และการสมาน (healing) ดำเนินไปพร้อม ๆ กัน โดยการอักเสบมักรุนแรงน้อยกว่าแบบเฉียบพลัน ผู้ป่วยไม่ค่อยมีอาการมากนักโดยมีสาเหตุสำคัญมาจากการติดเชื้อที่รักษาไม่หาย (persistent infection) ได้รับสิ่งที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อเป็นเวลานาน (prolonged exposure to injury) และโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune disease)

### สารสื่อกลาง (chemical mediator) ในการอักเสบ

สารสื่อกลางในการอักเสบมีแหล่งที่มาจาก plasma โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาจากเซลล์บางชนิดซึ่งสารดังกล่าวจะไปจับกับ receptor ที่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ที่มีบทบาทในการอักเสบโดยที่ mediator แต่ละชนิดจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบแตกต่างกันไปตามชนิดของ mediator และชนิดของเซลล์เป้าหมาย (target cell) หรือ บางชนิดอาจกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ทำให้ปฏิกิริยาการอักเสบขยายผลออกไป สารสื่อกลางในการอักเสบประกอบด้วยสารหลายกลุ่มเช่น กลุ่ม vasoactive amine, plasma protease, arachidonic acid (AA) metabolites, platelet-activating factor, cytokines, nitric oxide, neutrophil, monocyte, oxygen-derived free radicals และสารสื่อกลางชนิดอื่น ๆ

Nitric oxide (NO) เป็น free radical gas ที่ละลายได้ในน้ำ ในธรรมชาติ NO จะถูกสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์ของ arginine เป็นสาร citrulline และ nitric oxide<sup>(43)</sup> นอกจากนี้ยังสามารถสร้างได้จาก activated macrophage และ endothelial cell เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดยสารพิษ เอนโดทอกซินหรือสารก่อการอักเสบ (inducible form) NO เป็นสารสื่อกลางที่ส่งเสริมในกระบวนการอักเสบทำให้หลอดเลือดขยายตัวและออกฤทธิ์เป็น cytotoxic free radical โดยที่ NO จะพบเมื่อเซลล์ได้รับการบาดเจ็บหรือถูกเหนี่ยวนำ NO จะควบคุมการปลดปล่อยของสารสื่อกลางหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ กระตุ้นให้เกิดการอักเสบและเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพที่แปลกปลอมเข้ามา ในขณะเดียวกัน NO ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะสามารถทำปฏิกิริยา

กับโมเลกุลปรกติภายในเซลล์ ส่งผลทำลายเซลล์ข้างเคียงของ host และเกิดพิษ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาและคิดค้นยาเพื่อใช้ในการยับยั้ง NO เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการสร้าง NO ที่มีปริมาณมากผิดปกติซึ่งมีผลอย่างมากในการยับยั้งการอักเสบ<sup>(44)</sup>

## 2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ปัจจุบันการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์นิยมใช้วิธีเซลล์เพาะเลี้ยงมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แทนการทดลองในสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ผลรวดเร็ว ประหยัด ลดการใช้สัตว์ทดลองและสามารถทดสอบกับเซลล์ของมนุษย์ได้ ส่งผลให้การวิเคราะห์ที่ได้สามารถนำไปใช้กับคนได้ดีกว่าทดลองในสัตว์ ในปัจจุบันการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงได้นำไปใช้งานหลากหลาย เช่น การตรวจสอบความเป็นพิษทางอุตสาหกรรม ทางการแพทย์ ตรวจสอบฤทธิ์ของยาหรือสารสกัดใหม่ ๆ การตรวจวัดความเป็นพิษอาจวัดที่ผลการตายของเซลล์หรือผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ขึ้นกับค่าจำกัดความของความเป็นพิษที่ต้องการศึกษา ดังนั้นการตรวจสอบจะต้องคำนึงถึงความเป็นจริงหรือความสอดคล้องเช่น ความเข้มข้นของสารทดสอบหรือระยะเวลาที่ทดสอบ โดยค่าการยับยั้งการเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงของสารทดสอบคือ Inhibition concentration<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) ควรมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับการทดลองในสัตว์ทดลอง<sup>(45)</sup> ปัจจุบันมีวิธีหลากหลายในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณ ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นหรือการดู metabolic activity ของเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและนิยมใช้ในการวัด วิธี metabolic activity แสดงให้เห็นถึงพลังงานที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แสดงให้เห็นว่ามี metabolic activity นั้นหมายถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในการวัดจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีวัด metabolism มีอยู่หลายวิธีตัวอย่างเช่น วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt สามารถทำปฏิกิริยา reduction กับ enzyme succinate dehydrogenase ที่มีอยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น ส่งผลให้ MTT เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ formazan มีสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งสามารถละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 550-600 nm ค่าของ formazan ผันแปรกับปริมาณ succinate dehydrogenase enzyme ดังนั้นการวัดปริมาณ formazan product จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่<sup>(46)</sup> นอกจากนี้วิธี MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] และวิธี XTT [sodium 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] colorimetric assay ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ MTT มีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าแต่อย่างไรก็ตามก็มีข้อจำกัดเนื่องจากการทดสอบด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้เซลล์ที่ถูกวัดไม่สามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์



ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบด้วยการดู reduction environment ของเซลล์ด้วย Alarma Blue assay โดยสารที่ใช้ทดสอบคือ resazurin เมื่อถูก reduced ด้วย NADPH dehydrogenase จะเปลี่ยนเป็น rezorufin ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น fluorescent ได้โดยทำการวัดค่า excitation ที่ 540-570 nm และ emission ที่ 580-610 nm วิธีการนี้ได้รับความนิยมในการใช้ตรวจวัดการมีชีวิตของเซลล์เนื่องจาก มีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ ปลอดภัย ประหยัด และยังสามารถนำเซลล์ไปใช้ในการทดสอบอื่นได้ต่อไป<sup>(47)</sup>

## 2.7 การศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในตำรับอิมัลชัน<sup>(48)</sup>

อิมัลชัน (emulsion) หมายถึง ผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิดที่ไม่เข้ากันมาผสมกันได้โดยการใช้ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เมื่อเราส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เราจะพบว่าสารผสมมีหยดเล็ก ๆ ของสารหนึ่งแทรกตัวอยู่ในอีกสารหนึ่งซึ่งสารที่อยู่ภายในเรียกว่า วัฏภาคภายใน และสารที่ถูกวัฏภาคภายในกระจายตัวเรียกว่า วัฏภาคภายนอก ซึ่งวัฏภาคภายในสามารถมีได้หลายขนาด ขนาดของวัฏภาคจะเป็นตัวกำหนดให้มีการมองเห็นลักษณะของอิมัลชันแตกต่างกันตามขนาดและการกระจายแสงของอิมัลชัน อิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในขนาดเล็กจะมองเห็นเป็นลักษณะใส ในขณะที่วัฏภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.00 ไมครอนจะมองเห็นเป็นสีขาวขุ่นทึบ

### การแบ่งลักษณะอิมัลชัน สามารถแบ่งได้หลายลักษณะดังนี้

1. แบ่งตามลักษณะภายนอกที่มองเห็นแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ แมคโครอิมัลชัน มีลักษณะขุ่นขาวมีขนาดอนุภาคภายในตั้งแต่ 0.25 – 10 ไมครอน (โดยทั่วไปใหญ่กว่า 1 ไมครอน) ทำให้มีการกระจายแสงมองเห็นเป็นสีขาวขุ่น แมคโครอิมัลชันเป็นอิมัลชันที่พบมากที่สุด ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง เช่น ครีมกันแดด ครีมรักษาโรคผิวหนัง โลชั่นทาผิว และอีกชนิด ได้แก่ ไมโครอิมัลชัน ชนิดนี้มีวัฏภาคภายในขนาดเล็ก 10-75 นาโนเมตร ทำให้ไม่หักเหหรือกระจายแสงจึงมองเห็นลักษณะโปร่งใส

2. แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน ชนิดต่อมาได้แก่อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) อิมัลชันชนิดนี้จะมีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมันและวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ ชนิดนี้เป็นชนิดที่ได้รับความนิยมมากเนื่องจากเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายตัวดีและล้างออกง่าย สุดท้ายอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่อาจเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น W/O/W หรือ O/W/O

3. แบ่งตามความหนืดแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดที่มีความหนืดต่ำได้แก่ โลชั่น เนื่องจากมีวัฏภาคภายนอกในปริมาณสูงวัฏภาคภายในไม่เกิน 35% และอีกชนิดคือชนิดที่มีความหนืดสูง

ได้แก่ ครีม คือมีวิญภาคภายในสูงกว่า 35-75% โดยมีสารประกอบพวกสารไขแข็งและ ไขมันประกอบ อยู่หรืออาจใช้สารเพิ่มเนื้อครีมหรือสารเพิ่มความหนืด โดยที่ครีมจะมีความหนืดมากกว่าโลชั่น

### การประเมินคุณภาพอิมัลชันทางเครื่องสำอาง (Evaluation of Cosmetic Emulsions)

อิมัลชันทางเครื่องสำอางที่ผลิตขึ้นก่อนนำออกไปจำหน่าย มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการประเมินคุณภาพก่อนนำไปสู่ผู้บริโภค เพื่อให้มีความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้ใช้ การประเมินคุณภาพของอิมัลชันทางเครื่องสำอางจะต้องมีการทดสอบในทุกด้านได้แก่

1. การทดสอบในห้องปฏิบัติการ (Laboratory test) เป็นการประเมินเบื้องต้นถึงมาตรฐานของเครื่องสำอางเป็นไปตามหลักเกณฑ์หรือไม่ โดยการตรวจวิเคราะห์ ทางกายภาพ ทางเคมี ทางจุลชีววิทยาและทดสอบด้านประสาทสัมผัส

2. การทดสอบคุณภาพด้านการใช้ของผลิตภัณฑ์ (Performance test) เพื่อประเมินถึงเครื่องสำอางให้ผลการใช้ตามวัตถุประสงค์หรือไม่ โดยการให้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ และทำการประเมินผลการใช้

3. การทดสอบผลต่อร่างกาย (Physiological test) ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสารที่ใช้ในการผลิตอิมัลชัน เช่น สารลดแรงตึงผิว น้ำหอม หรือสารอื่น ๆ อาจทำให้เกิดอันตราย เกิดการแพ้หรือระคายเคืองได้ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่ปลอดภัยในการใช้งาน จึงจำเป็นที่จะต้องมีการประเมินผลการศึกษาความเป็นพิษ การก่อการแพ้หรือการระคายเคือง

4. การทดสอบด้านความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ (Stability test) การทดสอบความคงสภาพของอิมัลชันเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำเพื่อให้ผลิตภัณฑ์นั้นเป็นที่ยอมรับและสร้างความน่าเชื่อถือเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ดีจะต้องคงสภาพได้นาน ผลิตภัณฑ์อาจมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปโดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ แสงแดด การขนส่ง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไปเช่น เกิดการตกตะกอน การเปลี่ยนแปลงสี กลิ่นหรือการแห้งของเนื้อครีม ตลอดจนเชื้อจุลินทรีย์อาจปะปน เป็นต้น

### ความคงสภาพของอิมัลชันทางเครื่องสำอาง

อิมัลชันเป็นระบบที่ไม่คงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์สามารถเปลี่ยนแปลงสภาพได้ตลอดเวลา ดังนั้นการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางกายภาพเคมีเช่น การวัดขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค การวัดความหนืดและคุณสมบัติการไหลหรือการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลง เช่น การแยกชั้น การตกตะกอน การเปลี่ยนสี เปลี่ยนกลิ่น การแห้งของเนื้อครีมจะสามารถทำนายความไม่คงสภาพของอิมัลชันได้ การทดสอบความคงสภาพของอิมัลชันระหว่างการเก็บรักษาจนถึงมือผู้ใช้ในทางปฏิบัติอิมัลชันควรมี shelf life ไม่ต่ำกว่า 2 ปี แต่การเก็บรักษาเพื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 2 ปีนั้นเป็นวิธีที่ไม่สะดวกจึงมีการใช้วิธีทดสอบด้วยวิธีเร่ง (accelerated storage test) ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้ระยะเวลาสั้นสามารถใช้ในการคาดคะเนความคงตัวของอิมัลชันได้

### การทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (accelerated storage test)

การศึกษาความคงสภาพโดยการเร่งการสลายตัวของอิมัลชันให้เร็วขึ้นโดยการเพิ่มอุณหภูมิแสง ความชื้นสัมพัทธ์ สามารถย่นระยะเวลาในการศึกษาได้ สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกตำรับ คาคณะเนวันสั้นอายุ อิทธิพลขององค์ประกอบต่าง ๆ ต่อความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น โดยการทดสอบแบบเร่งสามารถเลือกใช้วิธีได้หลายวิธี ขึ้นกับความแตกต่างของชนิดอิมัลชันและความเหมาะสมในการทดสอบ วิธีการทดสอบโดยการเร่งมีดังนี้

1. การเร่งโดยอุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลในการเร่งการสลายตัวของสารเคมีในตำรับผลิตภัณฑ์การเร่งการสลายตัวของอิมัลชันด้วยอุณหภูมิสูงอาจทำให้ค่า HLB ของระบบเปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้เกิดการแยกชั้นหรือกลับวัตถุประสงค์ใช้คาคณะเนวันความคงสภาพที่อุณหภูมิห้องได้ยาก แต่อย่างไรก็ตามอิมัลชันที่ทนความร้อนได้ดีก็สามารถทนต่ออุณหภูมิห้องได้ดีด้วยเช่นกัน อุณหภูมิที่นิยมใช้คือระหว่าง 37-45°C ในช่วงระยะเวลา 1 ถึง 3 เดือน จากนั้นนำมาประเมินผล ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น การแยกชั้น การเปลี่ยนสี กลิ่น การตกตะกอน และคุณสมบัติทางกายภาพเคมี เช่น วัตถุประสงค์ การเหนียว คุณสมบัติการไหล วัตถุประสงค์และการกระจายขนาดอนุภาค การเร่งการสลายตัวนอกจากการใช้อุณหภูมิสูงในการเร่งแล้วยังสามารถใช้อุณหภูมิต่ำระหว่าง 2-8 °C เนื่องจากอิมัลชันที่เก็บไว้ที่เย็นอาจเกิดการแยกชั้นเนื่องจากตัวทำอิมัลชันหรือ wax จะตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ น้ำในตำรับจะกลายเป็นน้ำแข็งเกิดเป็นเกล็ดโตขึ้นสามารถแยกชั้นออกจากน้ำมันได้จึงเป็นการเร่งการสลายตัวของอิมัลชันเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีวิธีที่นิยมและย่นระยะเวลาในการทดสอบโดยการใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง ทำได้ 2 วิธีคือ

(a) Heating cooling cycle โดยการเก็บอิมัลชันในตู้เย็น (4 °C) นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่ 45 °C อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6-8 รอบ นำอิมัลชันมาประเมินผล

(b) Freeze-Thaw cycle โดยการเก็บอิมัลชันในช่องแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่ 25 °C นาน 48 ชั่วโมงเช่นกัน นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบ 6-8 รอบ นำอิมัลชันมาประเมินผล

2. การเร่งโดยแสง พลังงานแสงอาจเร่งให้ผลิตภัณฑ์เกิดการซีดจาง เปลี่ยนสี กลิ่น หรือเกิดปฏิกิริยาเคมีบางชนิดทำให้อิมัลชันมีลักษณะเปลี่ยนไปจึงควรทดสอบความคงสภาพต่อแสง โดยนำผลิตภัณฑ์ใส่ภาชนะที่กันฝนและน้ำค้างได้ นำอิมัลชันกลุ่มแรกไปตากแดดนาน 1 สัปดาห์ อีกกลุ่มตั้งไว้ริมหน้าต่าง 3 เดือน อีกกลุ่มเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิห้องและพันแสงใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ (control) จากนั้นนำมาประเมินผลว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แสงแดดเทียมโดยหลอดไฟในการเร่งการสลายตัว โดยต่อหลอดไฟให้เป็นแถวให้แสงผ่านกระจกเพื่อดูความร้อนก่อน

จะถูกผลิตภัณฑ์หรือใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 1860 วัตต์ วางห่างตัวอย่างที่จะทดสอบ 3 ฟุต จะได้ความเข้มของแสง 110 แกรทียน คิดเป็นประมาณ 20 เท่าของแสงที่พบในห้องเก็บยาหรือชั้นวางสินค้าจำหน่ายทั่วไป

3) การเร่งด้วยแรงโน้มถ่วงโลก อาจทำได้โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หรือเขย่า (shake) การปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงจะเร่งการตกตะกอนของอิมัลชันได้ตาม Stoke's equation โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วพอสมควรเช่นที่ 3750 รอบต่อนาที รัศมี 10 ซม. นาน 5 ชั่วโมง จะพอเทียบกับการตั้งทิ้งไว้ 1 ปี และการเขย่าหรือกวนจะส่งผลให้อุณหภูมิในอิมัลชันชนกันมากขึ้นและเป็นการลดความหนืดจึงเป็นการเร่งการรวมตัวของหยดน้ำมัน สามารถทำได้โดยการแกว่งอิมัลชันไป-มา โดยปรกติแล้วอิมัลชันควรจะคงสภาพเดิมเมื่อถูกแกว่งไปมา 60 ครั้งต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องและที่ 45°C

**แนวทางปฏิบัติที่เป็นที่ยอมรับสำหรับการทำนายอายุหรือความคงสภาพของอิมัลชัน (Practical Recommendation for Shelf Life Prediction) พร้อมเกณฑ์ตัดสินดังนี้**

1. อิมัลชันควรต้องคงสภาพหรือไม่เปลี่ยนแปลง อย่างน้อย 60-90 วัน ที่ 45°C หรือ 50 °C หรือ 37 °C นาน 5-6 เดือน และนาน 12-18 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง
2. ไม่พบข้อสังเกต (sing) ที่มองเห็นได้ว่าเปลี่ยนแปลงหรือแยกชั้นภายหลังการเก็บเพื่อทดสอบที่ 4 °C นาน 1 เดือน หรือ freeze – thaw cycle (-20°C สลับกับ +25°C) จำนวน 2-3 รอบ หรือ heating – cooling cycle (ในตู้เย็น สลับกับที่ 45°C) จำนวน 6-8 รอบ
3. ไม่พบการแยกชั้นภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2000-3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องหรือการเขย่าในเครื่องเขย่า ที่มีความเร็ว 60 รอบต่อนาที นาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 45 °C

### บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เพื่อทำการเตรียมสารสกัดไข่น้ำและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดไข่น้ำ และประเมินความคงตัวของสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม โดยการวิจัยครั้งนี้เริ่มจากการสกัดสารสำคัญ ไข่น้ำด้วยวิธีการหมัก นำสารสกัดมาตรวจสอบองค์ประกอบสารสำคัญด้วยเทคนิควงโคจรมวล ทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไข่น้ำและประเมินความคงตัวของสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม โดยทำการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิแวดล้อมและอุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลาทั้งหมด 90 วัน

#### 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer SHIMADZU, UV-1800)
- 2) เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer, Bruker, Avance III 400)
- 3) เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (fourier transform infrared spectroscopy; FT-IR, รุ่น spectrum 100, Perkin Elmer®, USA)
- 4) เครื่องเขย่าสารด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonic bath 40 Hertz (Hz), Branson®2510, USA)
- 5) เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator, BUCHI, V-700, Switzerland)
- 6) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (WTB binder, Tuttlingen, Germany)
- 7) ตู้แช่แข็ง (freezer)
- 8) ตู้เย็น (refrigerator)
- 9) ชุดตู้มืดภายใต้แสงยูวี (UV viewing cabinet) (Camag, Switzerland)
- 10) เครื่องวัดความหนืด (viscometer) (Bookfield, Model DV-II+)
- 11) เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter) (SCHOTT, model CG842)
- 12) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler®, USA)

- 13) TLC plate silica gel 60F<sub>254</sub> (MERCK, Germany)
- 14) ไมโครไปเปต (micropipette)
- 15) คอลัมน์ (glass chromatography columns)
- 16) บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 17) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- 18) กระบอกตวง (cylinder)
- 19) ขวดก้นกลม (round bottom flask)
- 20) กรวยกรอง (funnel)
- 21) หลอดทดลอง (test tube)
- 22) ที่วางหลอดทดลอง (rack)
- 23) แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- 24) กระดาษกรอง (filter paper, Whatman NO.1)
- 25) แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum Foil)
- 26) TLC chamber (Altech, Thailand)
- 27) หลอดหยด (dropper)
- 28) สำลี

### 3.1.2 วัตถุดิบและสารเคมี

- 1) ใสน้ำ (*Wolffia globosa*)
- 2) Ethanol (Merck, Germany)
- 3) Dichloromethane (Fisher scientific, UK)
- 4)  $\beta$ -sitosterol  $\geq 70\%$  (Sigma, France)
- 5) Stigmasterol 95% (Sigma, Switzerland)
- 6) Acetone (VWR international S.A.S, France)
- 7) Hexane (J.T.Baker, USA)
- 8) Ethyl acetate (J.T.Baker, USA)
- 9) Chloroform (VWR international S.A.S, France)
- 10) Methanol (Merck, Germany)
- 11) Sulfuric acid 98% (RCI Labscan Ltd.)
- 12) Vanillin 99% (Sigma, Germany)
- 13) DPPH 95% (Sigma-Aldrich, Germany)

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.2.1 การเตรียมสารสกัดไข่น้ำ

- 1) ใช้อุ่น้ำสดจำนวน 10 กิโลกรัมจากแหล่งเพาะเลี้ยง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
- 2) นำไข่น้ำสดมาล้างน้ำให้สะอาดและตากแดดให้แห้ง
- 3) บดไข่น้ำแห้งด้วยโกร่งให้ละเอียดก่อนนำไปทำการหมัก
- 4) หมักไข่น้ำด้วยตัวทำละลายเอทานอลในภาชนะที่ปิดสนิท หมักทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
- 5) กรองสารสกัดไข่น้ำและทำการหมักกากไข่น้ำซ้ำด้วยเอทานอล ทำซ้ำจนสารสกัดที่ได้มีลักษณะของสีเขียวจางลง
- 6) รวบรวมสารละลายของสารสกัดไข่น้ำที่ได้ทั้งหมดกรองด้วยกระดาษกรอง (whatman NO.1)
- 7) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-45 °C ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที (ภาพที่ 3)
- 8) นำสารสกัดหยาบที่ได้ชั่งน้ำหนักคำนวณหา % yield และเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในขั้นตอนวิเคราะห์ต่อไป

$$\% \text{ yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} / \text{น้ำหนักไข่น้ำแห้งหรือน้ำหนักสดที่ใช้ในการสกัด}) \times 100$$

**ภาพที่ 3** การแยกตัวทำละลายเอทานอลออกจากสารสกัดไข่น้ำด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)



### 3.2.2 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

1) การตรวจสอบสารกลุ่มสเตอรอลโดยใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates เป็นวัฏภาคคงที่ และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ toluene : diethyl ether ในอัตราส่วน 40:40 และ acetone : hexane ในอัตราส่วน 10:30 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol โดยเตรียมการทดสอบดังนี้

- 1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน
- 1.2) เตรียมสารละลายสารสกัดใช้น้ำเข้มข้น 10% ในตัวทำละลายเอทานอล
- 1.3) spot สารละลายมาตรฐานจำนวน 3 ไมโครลิตร และ สารละลายสารสกัดใช้น้ำจำนวน 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC โดยห่างจากปลายด้านล่าง 1 เซนติเมตร
- 1.4) นำแผ่น TLC ใส่ลงไปในแท่งค้ำที่อ้อมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย
- 1.5) รอจนสารเคลื่อนที่มาถึงปลายด้านบนของแผ่น TLC โดยห่างออกมา 1 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ออกมา เขียนตำแหน่ง solvent front จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที
- 1.6) ตรวจสอบสารโดยพ่นสารทดสอบ 5% sulfuric acid ในตัวทำละลายเอทานอลให้ทั่วทั้งแผ่น TLC ทิ้งไว้ 2-3 นาที จากนั้นทำการพ่น 1% vanillin ในตัวทำละลายเอทานอลให้ทั่วทั้งแผ่น TLC ทิ้ง 2-3 นาที นำแผ่น TLC ไปอบที่ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) การตรวจสอบสารกลุ่มฟีนอลิกโดยใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น chloroform : methanol : formic acid อัตราส่วน 85:15:1 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferulic acid, coumaric acid และ caffeic acid วิธีการทดสอบดังนี้

- 2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน ferulic acid, coumaric acid และ caffeic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายเอทานอล
- 2.2) เตรียมสารละลายสารสกัดใช้น้ำเข้มข้น 10% ในตัวทำละลายเอทานอล
- 2.3) spot สารละลายมาตรฐานจำนวน 3 ไมโครลิตร และ สารละลายสารสกัดใช้น้ำจำนวน 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC โดยห่างจากปลายด้านล่าง 1 เซนติเมตร
- 2.4) นำแผ่น TLC ใส่ลงไปในแท่งค้ำที่อ้อมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย
- 2.5) รอจนสารเคลื่อนที่มาถึงปลายด้านบนของแผ่น TLC โดยห่างออกมา 1 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ออกมา เขียนตำแหน่ง solvent front จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที
- 2.6) นำแผ่น TLC ไปตรวจภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร



### 3.2.3 การแยกสารสกัดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีดังนี้

- 1) เตรียมคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ใส่สำลีตรงปลายคอลัมน์
- 2) เตรียมซิลิกาเจลขนาด 0.04-0.06 mesh จำนวน 300 กรัม เดิมเฮกเซนจำนวน 700 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน
- 3) เทซิลิกาเจลที่อิมตัวลงผ่านแท่งแก้วลงไปยังคอลัมน์อย่างรวดเร็วพร้อมไขให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงไป
- 4) เดิมเฮกเซนลงในยังคอลัมน์อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งซิลิกาเจลมีระดับคงที่จากนั้นจึงปิดก๊อกโดยให้ระดับของเฮกเซนอยู่เหนือซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 4)
- 5) นำสารสกัดไขน้ำ 10 กรัม ละลายด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ทำการกรองแยกตะกอนสีขาว (WP1)
- 6) นำสารสกัดที่ละลายเฮกเซนที่ได้จากการกรองค่อย ๆ หยดลงขอบของคอลัมน์ เพื่อลดการรบกวนผิวหน้าของซิลิกาเจล เปิดก๊อกให้สารสกัดซึมผ่านลงบนผิวหน้าซิลิกาเจล ชะด้วยระบบตัวทำละลายแบบ gradient elution โดยใช้สารทั้งหมดดังนี้ เฮกเซน 9,000 มิลลิลิตร ไดคลอโรมีเทน 1,500 มิลลิลิตร เอทิลอะซิเตท 2,000 มิลลิลิตร และเมทานอล 2,000 มิลลิลิตร ตามลำดับ
- 7) เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ครึ่งละ 200 มิลลิลิตร/ขวด ตรวจสอบสารด้วยเทคนิค TLC เพื่อรวมสารให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยพิจารณาจากค่า Rf จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

ภาพที่ 4 การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี



### 3.2.4 การตรวจสอบโครงสร้างของสารด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี

1) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารในแฟรกชันที่ 2 ที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) โดยนำสารแฟรกชันที่ 2 บดให้ละเอียดวางตัวอย่างบน diamond crystal plate ของ universal ATR accessory (UATR) เปิดโปรแกรมสำหรับวัด IR ทำการ scan background และตั้งโปรแกรมเครื่องโดยตั้งค่าการสแกนที่เลขคลื่น (wave number)  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  เครื่องมือจะทำการวัดผลและบันทึกผล

2) วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารในแฟรกชันที่ 2 ที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ชนิด  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy โดยละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลายดีวเทอเรียม คลอโรฟอร์ม (deuterated chloroform :  $\text{CDCl}_3$ ) วิเคราะห์  $^1\text{H-NMR}$  ที่ความถี่ 400 เมกกะเฮิรตซ์ โดยใช้ tetramethylsilane เป็นสารอ้างอิง

### 3.2.5 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขี้เถ้าด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Alhakmani et al. (2013 : 623-627)<sup>(49)</sup> ดังนี้

1) เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.1 mM สารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบ แฟรกชัน 1-4 และตะกอน (WF1) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเอทานอล 80%

2) ทำการทดสอบโดยใช้สารทดสอบจำนวน 0.2-1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH จำนวน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 80% เอทานอล ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เตรียมได้ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง ใช้สารละลายเอทานอล 80% แทนสารทดสอบในหลอดควบคุม

4) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) และสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารที่ทำทดสอบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารทดสอบ เพื่อนำสมการเส้นตรงที่ได้มาคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $\text{IC}_{50}$ )

5) ทำการทดสอบซ้ำตามขั้นตอนโดยใช้ส่วนของตะกอน (WF1) เตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารทดสอบจำนวน 0.1-0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ DPPH จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร แล้วทำการตรวจวัดตามขั้นตอน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุโมลอิสระ (% inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (Ac - As)/Ac \times 100$$

โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง

### 3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธียับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide assay)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานโดย Torres-Rodriquez et al. (2016 : 266-274)<sup>(50)</sup> มีขั้นตอนดังนี้

1) เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มเซลล์ชนิดที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2) นำเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในช่วง logarithmic มาแบ่งเพาะเลี้ยงในภาชนะหลุมจำนวนหลุมละ  $2 \times 10^5$  เซลล์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3) กระตุ้นเซลล์ให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4) เติมสารสกัดไข่น้ำ (แฟรกชันที่ 1 และ 2 ผสมกัน (BSS) ) ที่ผ่านการทำให้ไร้เชื้อ ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ triamcinolone acetonide เป็น positive control จากนั้นบ่มเซลล์ไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Griess reagent (1% sulfanilamide และ 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine-dihydrochloride ใน 2.5% phosphoric acid) บ่มทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

### 3.2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานโดย O'Brien J et al. (2000 : 5421-5426)<sup>(51)</sup> มีขั้นตอนดังนี้

1) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human dermal fibroblast (HDFn) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มเซลล์ชนิดที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2-3 วัน ให้เซลล์มีการเจริญเติบโตในช่วง logarithmic

2) นำเซลล์ที่ความเข้มข้น  $3 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตรและใช้ DMEM เพียงอย่างเดียวเป็น blank นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ 48 ชั่วโมง

3) ดูดสารอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารสกัดไข่น้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ ellipticine เป็น positive control จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง

4) เติม resazurin ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 4 ชั่วโมง

5) นำไปวัดค่า fluorescence ด้วยเครื่อง fluorometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (excitation) และ 590 นาโนเมตร (emission) ค่าที่ได้จะถูกนำไปหักลบกับ blank ก่อนนำมาทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

โดยที่  $FU_T$  = ค่า fluorescent ของเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดไข่น้ำ

$FU_C$  = ค่า fluorescent ของเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วย 1% DMSO

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของค่า % Cytotoxicity สามารถประเมินได้ดังนี้

ถ้า % Cytotoxicity < 50% ผลการทดสอบ คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

% Cytotoxicity  $\geq$  50% ผลการทดสอบ คือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์

### 3.2.8 การเตรียมตำรับครีมสารสกัดไข่น้ำและการคัดเลือกตำรับ

เตรียมตำรับครีมที่มีสารสกัดไข่น้ำ 1% ด้วยวิธี Beaker method จำนวน 4 สูตร ดังนี้

1) ทำการซึ่งสารแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ วัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันของแต่ละสูตรตามตารางที่ 4

2) ให้ความร้อนจนทั้งสองส่วนมีอุณหภูมิที่ 65 °C

3) เทส่วนของน้ำมันลงไปในส่วนของน้ำเพื่อเตรียมครีมรูปแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water)

4) คนต่อเนื่องจนได้น้ำมันครีมและมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 40-45 °C ทำการเติมสารกันเสียและสารสกัดลงไปคนให้น้ำมันครีมเข้ากันและมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง การประเมินลักษณะทางกายภาพ ดังนี้

4.1) สังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น การแยกชั้น

4.2) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH-meter

4.3) วัดค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer

5) นำครีมบรรจุในกระปุกจำนวน 50 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนมาเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C จำนวน 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบทำการทดสอบทั้งหมด 6 รอบ จากนั้นนำครีมที่ผ่านการทดสอบมาทำการประเมินลักษณะทางกายภาพตามข้อที่ 4 บันทึกผลการทดลอง

### 3.2.9 การประเมินความคงตัวทางกายภาพและความคงตัวทางเคมีของสารสกัดหยาบและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม

- 1) เตรียมครีมตำรับที่ 3 จำนวน 600 กรัม ตามวิธีการข้อ 3.2.8
- 2) นำครีมใส่กระปุกปริมาณ 50 กรัม จำนวน 10 กระปุก และสารสกัดหยาบไข่น้ำใส่ในกระปุกปริมาณ 0.5 กรัม จำนวน 10 กระปุก
- 3) นำไปเก็บที่อุณหภูมิแวดล้อม (ambient temperature) จำนวน 5 กระปุก และผู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , 75% RH จำนวน 5 กระปุก
- 4) ประเมินความคงตัวทางกายภาพของครีมไข่น้ำในวันที่ 0, 7, 15, 30, 60, 90 ดังนี้
  - 4.1) ชั่งน้ำหนักของครีมไข่น้ำที่ก่อนและหลังการทดสอบ
  - 4.2) วัดค่าความเป็นกรด -ด่าง โดยใช้เครื่อง pH- meter
  - 4.3) วัดค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer
  - 4.4) สังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น การแยกชั้น
- 5) ประเมินความคงตัวทางเคมีของสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมและสารสกัดหยาบในวันที่ 0, 7, 15, 30, 60, 90 โดยใช้ UV-Vis spectrophotometer ดังนี้
  - 5.1) ชั่งครีมไข่น้ำ 2 กรัมหรือสารสกัดหยาบ 0.01 กรัม
  - 5.2) เติมตัวทำละลายเอทานอลจำนวน 10 มิลลิลิตร sonicate ให้ละลาย
  - 5.3) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง (whatman NO.1)
  - 5.4) ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเอทานอล 9 มิลลิลิตร
  - 5.5) นำไปสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร
  - 5.6) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 และ 405 นาโนเมตร
  - 5.7) วิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยสถิติ (paired t-test)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในตำรับครีมสารสกัดไช้หน้า

ภูมิภาค	สาร	ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก			
		ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3	ตำรับที่ 4
น้ำมัน	Cetyl alcohol	2.5	3.5	4.5	5
	Cetostearyl alcohol	2.5	3.5	4.5	5
	Tween <sup>®</sup> 20	2	3	3	3
	Isopropyl myristate	1	2	2	2
	Cetiol <sup>®</sup> HE	1	2	2	2
	Lexon <sup>®</sup> GT865	1	2	2	2
	Cyclomethicone	2	2	2	2
	Dimethicone	2	2	2	2
น้ำ	Water	82.85	76.3	74	72.8
	Cosmedia	0.25	0.5	0.8	1
	Glycerine	1	1	1	1
	Propylene glycol	1	1	1	1
สารกันเสีย	Paraben concentrated	0.2	0.2	0.2	0.2
สารสกัดไช้หน้า	<i>W. globosa</i> extract	1	1	1	1

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ผลการเตรียมสารสกัดไข่น้ำ

#### 4.1.1 ไข่น้ำ

ไข่น้ำที่ใช้ในงานวิจัยได้รับการยืนยันสายพันธุ์ชนิด *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas และเก็บตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง (voucher specimens) รหัส QBG95804 ที่หอพรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

#### 4.1.2 ผลการเตรียมสารสกัดไข่น้ำด้วยวิธีการหมัก

ไข่น้ำสดจำนวน 10 กิโลกรัมหลังจากตากแดดจนแห้งสนิทใช้เวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง จะได้ไข่น้ำแห้ง 672.15 กรัม คิดเป็นร้อยละ 6.72 ของปริมาณไข่น้ำสด เมื่อนำไข่น้ำตากแห้งหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะได้สารละลายสีเขียวเข้มหมักจนสารสกัดที่ได้มีสีจางลงใช้เวลาในการหมักทั้งหมด 30 วัน เอทานอลที่ใช้ในการหมักทั้งหมด 16 ลิตร รวบรวมสารสกัดและระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยابไข่น้ำมีลักษณะสารสกัดกึ่งของแข็ง ชั้นเหนียว สีเขียวเข้ม มีปริมาณเท่ากับ 82.4 กรัม คิดเป็นร้อยละ 12.25 ของไข่น้ำแห้งหรือร้อยละ 0.82 ของไข่น้ำสด

ภาพที่ 5 ไข่น้ำสดก่อนตากแห้งและไข่น้ำหลังตากแห้ง 48 ชั่วโมง



### 4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยابด้วยเทคนิคแรงคเลขวาง

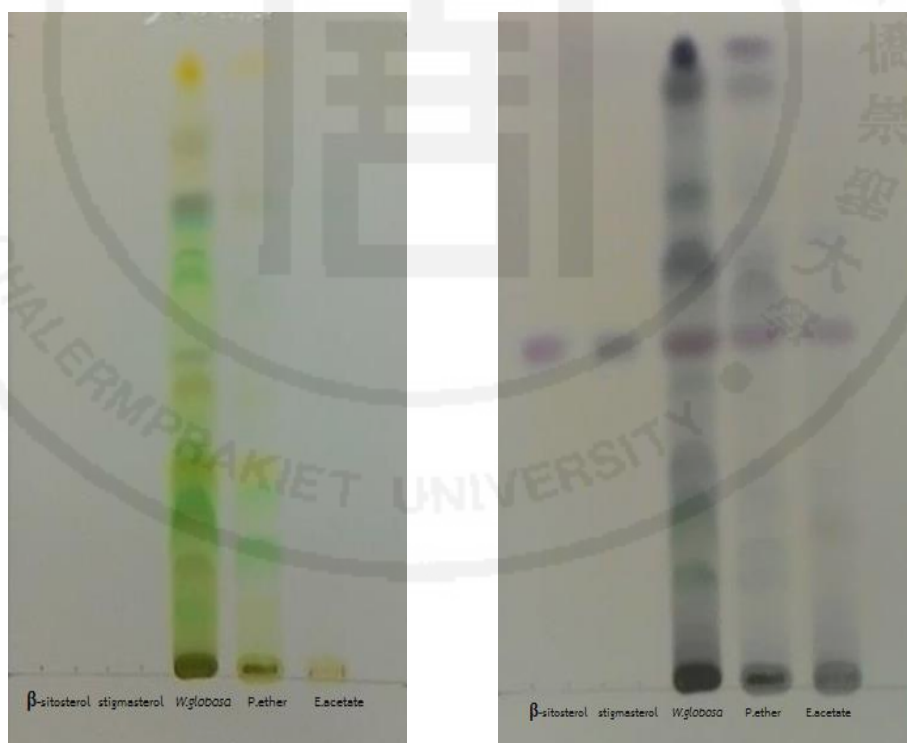
การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไข่น้ำด้วยเทคนิคแรงคเลขวาง โดยนำสารสกัดไข่น้ำมาทำการตรวจวัดเทียบกับสารมาตรฐาน ผลการทดสอบดังนี้

1. ผลการตรวจหาสารกลุ่มสเตอรอลเทียบกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol พบว่าผลการแยกของสารสกัดหยابที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ acetone : hexane อัตราส่วน 10:30

ให้ผลการแยกได้ดีกว่า toluene : diethyl ether อัตราส่วน 40:40 เนื่องจากสามารถแยกสารได้ดีกว่าโดยมีลักษณะการแยกของแถบสารที่ชัดเจน พบแถบสารของสารสกัดไขมันที่มีค่า  $R_f = 0.45$  ที่ตำแหน่งเดียวกันกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol โดยลักษณะของแถบสารของ  $\beta$ -sitosterol มีลักษณะสีม่วงชมพูและแถบสารของ stigmasterol มีลักษณะเป็นสีม่วงน้ำเงิน โดยที่แถบของสารสกัดไขมันที่ตำแหน่ง  $R_f = 0.45$  มีลักษณะเป็นสีม่วงชมพูและม่วงน้ำเงินอยู่ในตำแหน่ง  $R_f$  เดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 6

2. ผลการตรวจหาสารฟีนอลิก เทียบกับสารมาตรฐาน ferulic acid, coumaric acid และ caffeic acid โดยใช้ chloroform : methanol : formic acid อัตราส่วน 85:15:1 เป็น วัฏภาคเคลื่อนที่ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดไขมันไม่พบสาร ferulic acid ( $R_f=0.62$ ), coumaric acid ( $R_f=0.55$ ) และ caffeic acid ( $R_f=0.38$ ) ดังแสดงในภาพที่ 7

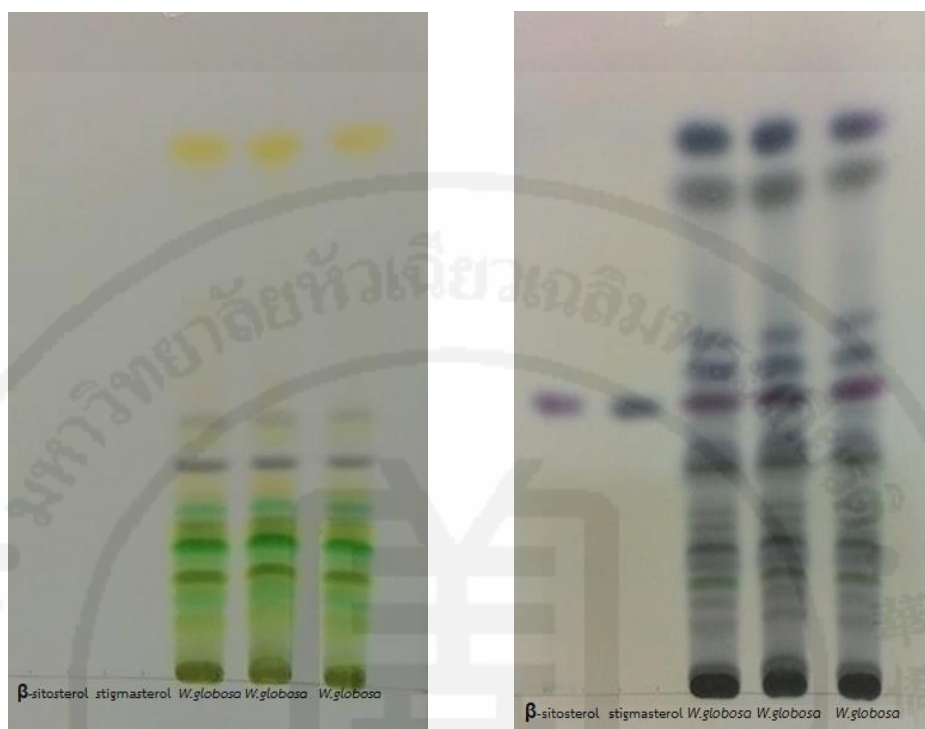
**ภาพที่ 6** ผลการตรวจหาสารกลุ่มสเตอรอลของสารสกัดไขมันก่อนสเปรย์และหลังสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์



(ก) toluene : diethyl ether ในอัตราส่วน 40:40 ภาพซ้ายแสดงผลก่อนสเปรย์รีเอเจนต์ภาพขวา แสดงผลหลังสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์

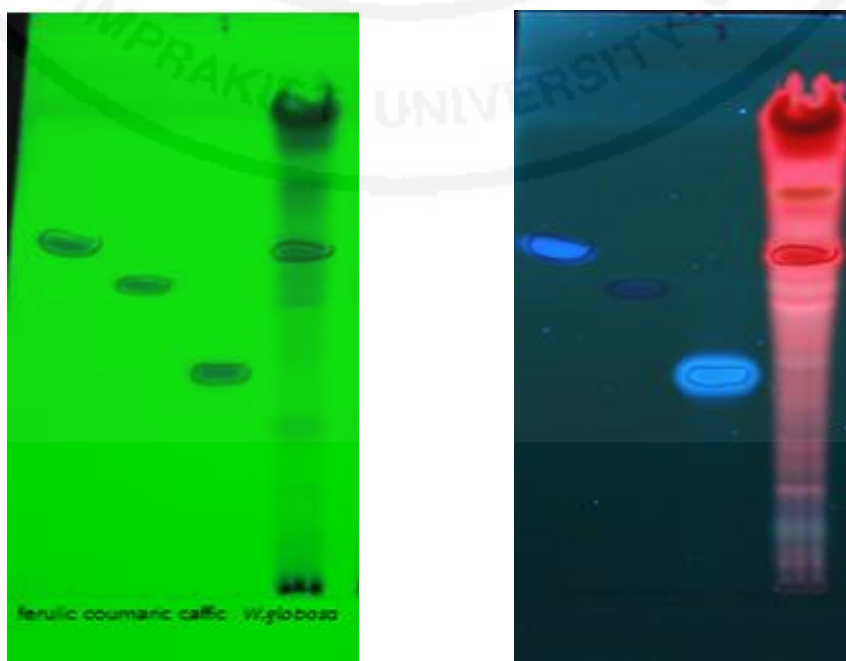


ภาพที่ 6 (ต่อ)



(ข) acetone : hexane ในอัตราส่วน 10:30 ภาพซ้ายแสดงผลก่อนสเปรย์รีเอเจนต์ภาพขวาแสดงผลหลังสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์

ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบสารฟีนอลิก ได้แก่ ferulic acid, coumaric acid และ caffeic acid ในสารสกัดไข่น้ำ ภายใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ซ้าย) และ 366 นาโนเมตร (ขวา)



### 4.3 ผลการแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ผลการแยกสารสกัดหยาบไข่น้ำด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าเมื่อนำสารสกัดหยาบไข่น้ำละลายในตัวทำละลายเฮกเซน พบส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายเกิดขึ้น ตะกอนที่ได้มีลักษณะสีขาว (WP1) 3.34 กรัม เป็นผงค่อนข้างละเอียด สามารถละลายได้ในสารละลาย 80% เอทานอล ในส่วนของสารละลายสารสกัดหยาบไข่น้ำหลังจากกรองแยกตะกอนนำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 4 แพรกชั้น ผลการทดสอบ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ acetone : hexane (10:30) ตรวจสอบสารโดยการพ่น 5% sulfuric acid และ 1% vanillin ดังแสดงในภาพที่ 8

แพรกชั้นที่ 1 (F1; 0.7 กรัม) สารละลายที่ได้มีลักษณะใส ไม่มีสี ทดสอบด้วย TLC พบว่าเป็นสารส่วนที่แยกตัวออกมาก่อนด้านบนสุดของแผ่น TLC ให้สีม่วงและสีน้ำเงินเมื่อพ่นด้วยสารทดสอบ หลังจากระเหยตัวทำละลายจะได้สารที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีขาวเหลือง

แพรกชั้นที่ 2 (F2; 0.54 กรัม) สารละลายที่ได้มีลักษณะใสไม่มีสี ทดสอบด้วย TLC พบว่าเป็นแถบสารที่มีค่า  $R_f = 0.45$  เท่ากับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปได้ของแข็งสีขาว

แพรกชั้นที่ 3 (F3; 1.4 กรัม) สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นสีเขียวน้ำตาลเข้ม ทดสอบด้วย TLC พบว่าเป็นแถบสารด้านล่างถัดจากแถบสารมาตรฐานลงไป เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปได้สารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีเขียวน้ำตาลเข้ม

แพรกชั้นที่ 4 (F4; 3.18 กรัม) สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นสีเขียวย้ำเข้ม ทดสอบด้วย TLC พบว่าเป็นแถบสารด้านล่างที่มีการเคลื่อนเพียงเล็กน้อย เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปได้สารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีเขียวย้ำเข้ม

### 4.4 ผลการตรวจโครงสร้างของสารสกัดไข่น้ำด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี

#### 1. ผลการตรวจหมู่ฟังก์ชันของสารสกัดไข่น้ำด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

ผลการตรวจวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดแพรกชั้นที่ 2 ด้วย Fourier transform infrared spectrometer ดังแสดงภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์เลขคลื่นและหมู่ฟังก์ชันแสดงในตารางที่ 5

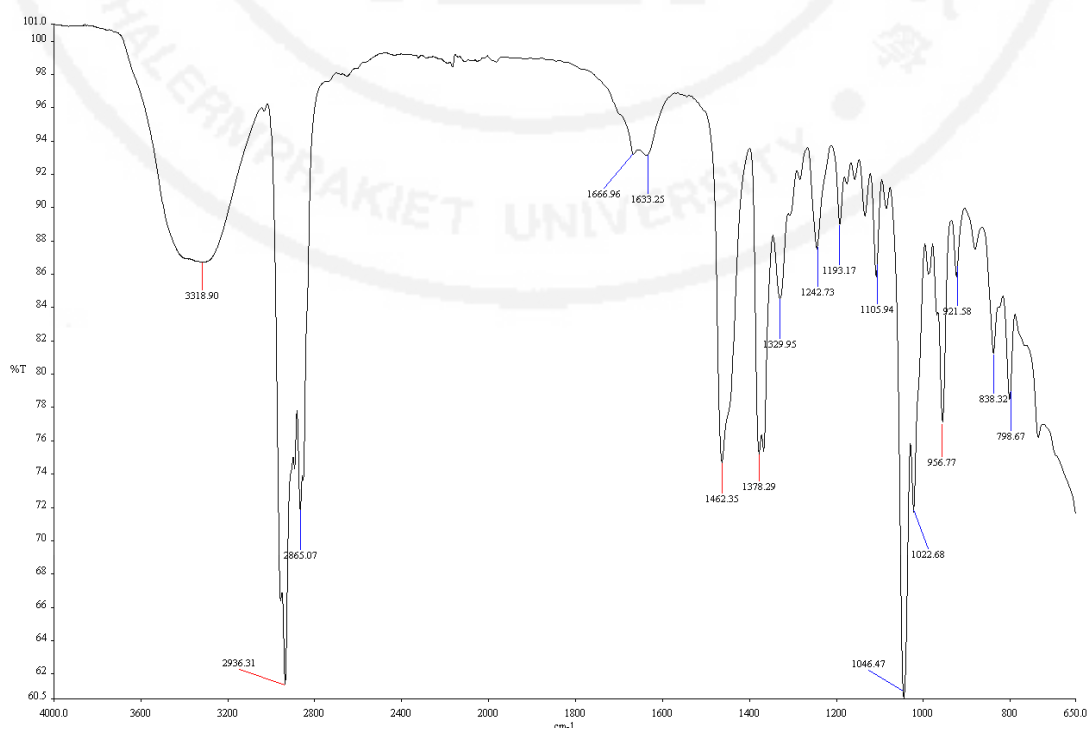
#### 2. ผลการตรวจโครงสร้างของสารสกัดไข่น้ำด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี

ผลการตรวจโครงสร้างสารแพรกชั้นที่ 2 ด้วย โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปีได้สเปกตรัม ( $^1\text{H-NMR}$ , ppm) ดังแสดงภาพที่ 10-12 ผลการวิเคราะห์ค่า chemical shift ของสัญญาณโปรตอนแสดงในตารางที่ 6 และค่า chemical shift ของโปรตอนที่เกิดขึ้นกับตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมของโครงสร้าง  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol (ภาพที่ 13)

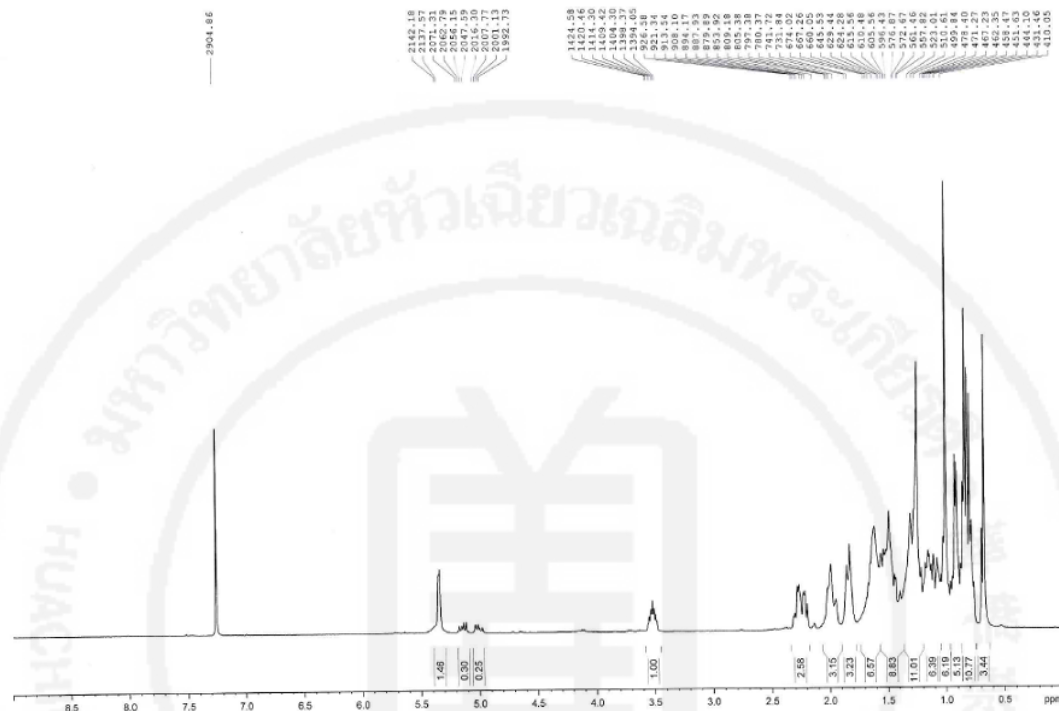
ภาพที่ 8 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบไข่น้ำ (crude) สารมาตรฐาน ( $\beta$ -sitosterol) แพรกชั้นที่ 1-4 (F1-F4) และตะกอน (WF1) วัฏภาคเคลื่อนที่ acetone : hexane (10:30) ตรวจสอบสารโดยการพ่น 5% sulfuric acid และ 1% vanillin



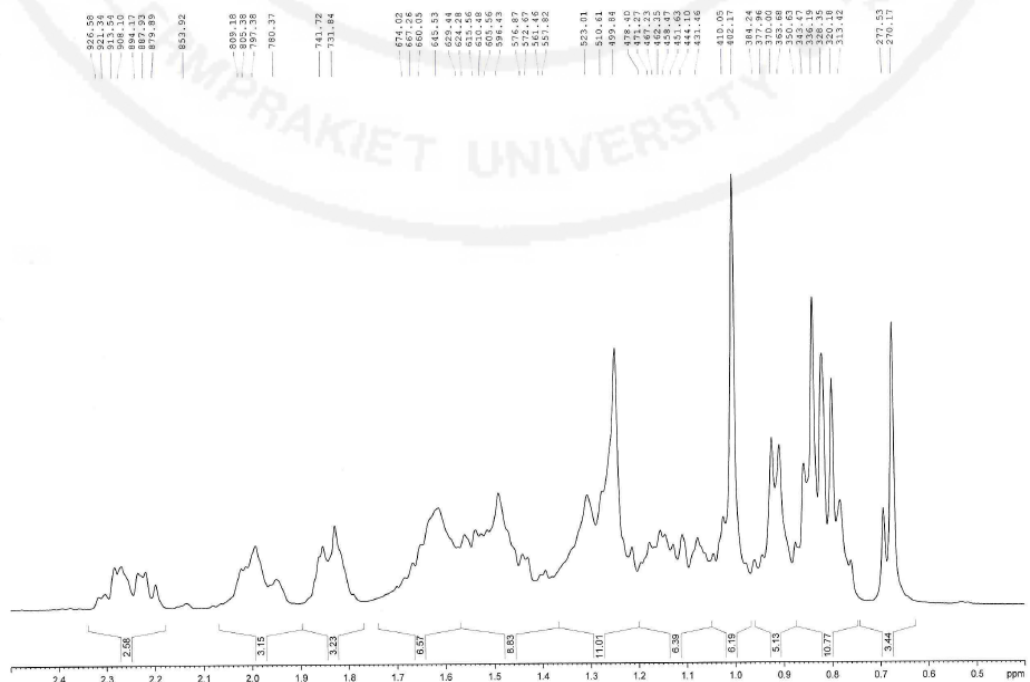
ภาพที่ 9 สเปกตรัมของสารในแฟรกชันที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer



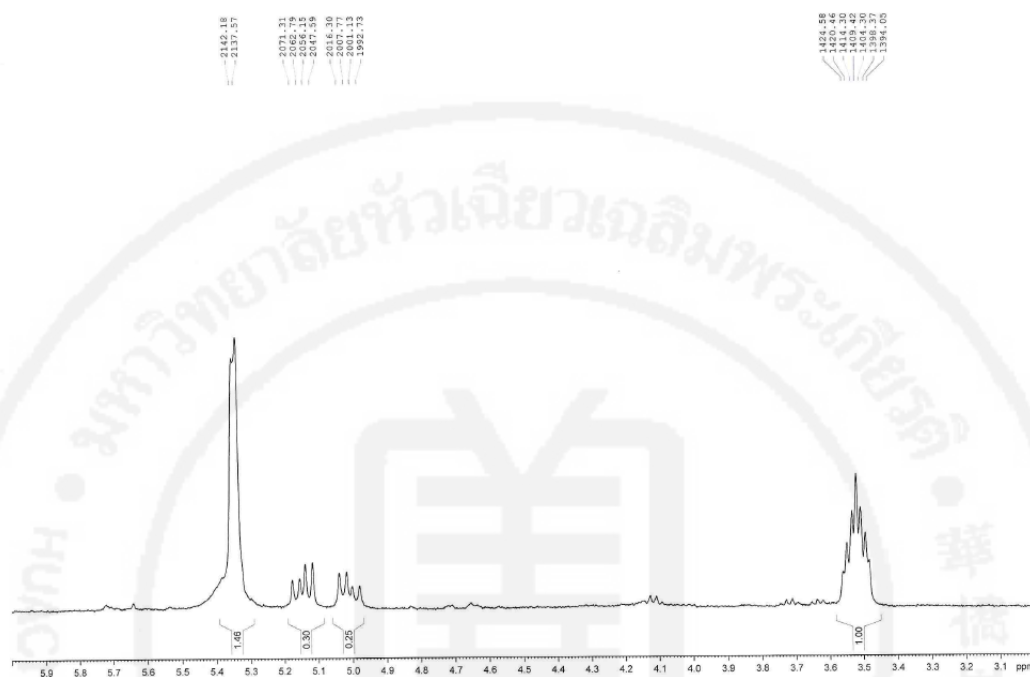
ภาพที่ 10 สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H}$  NMR :  $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2



ภาพที่ 11 ภาพขยายของสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ( $^1\text{H}$  NMR :  $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2



ภาพที่ 12 ภาพขยายของสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H}$  NMR :  $\text{CDCl}_3$ , ppm) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2



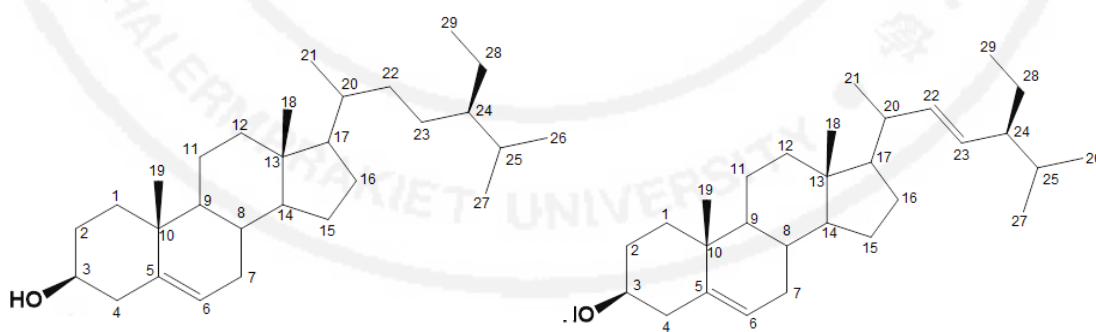
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์เลขที่คลื่น (Wavenumber) และหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2

เลขคลื่น ( $\text{cm}^{-1}$ )	หมู่ฟังก์ชัน
3318.90	O-H stretching
2936.31	aliphatic C-H stretching
2865.07	aliphatic C-H stretching
1635.24	C=C stretching
1462.35	cyclic $(\text{CH}_2)_n$
1378.29	$-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$
1044.60	Cycloalkane

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนในสารสกัด แพรกชั้นที่ 2

ตำแหน่ง	ค่าเคมีคัลชิฟต์ ( $\delta$ , ppm)	ชนิดของโปรตอน	โครงสร้าง
3	3.53	1H(m), alcohols	H-C-OH
6	5.53	1H(d), olefinic proton	C=C-H
18	0.68	3H(s), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>
19	1.01	3H(s), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>
21	0.93	3H(d), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>
22	5.12	1H(dd), olefinic proton	C=C-H
23	5.02	1H(dd), olefinic proton	C=C-H
26	0.83	3H(d), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>
27	0.79	3H(d), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>
29	0.85	3H(t), methyl proton	R-CH <sub>3</sub>

ภาพที่ 13 โครงสร้างของสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ที่ระบุตำแหน่งคาร์บอน



$\beta$ -sitosterol

stigmasterol

#### 4.5 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ในการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ, ตะกอน (WF1) และแฟรกชัน 1-4 (F1-F4) โดยวิธี DPPH assay ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบ ตะกอน และแฟรกชัน 3 และ 4 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในขณะที่แฟรกชันที่ 1 และ 2 พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมจากส่วน WF1 ให้มีค่าอยู่ในช่วงเท่ากับ 0.83-4.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8) พบว่าสามารถหาค่า  $IC_{50}$  จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้นของสารมีค่าเท่ากับ 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในแผนภูมิที่ 1 และผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในแผนภูมิที่ 2

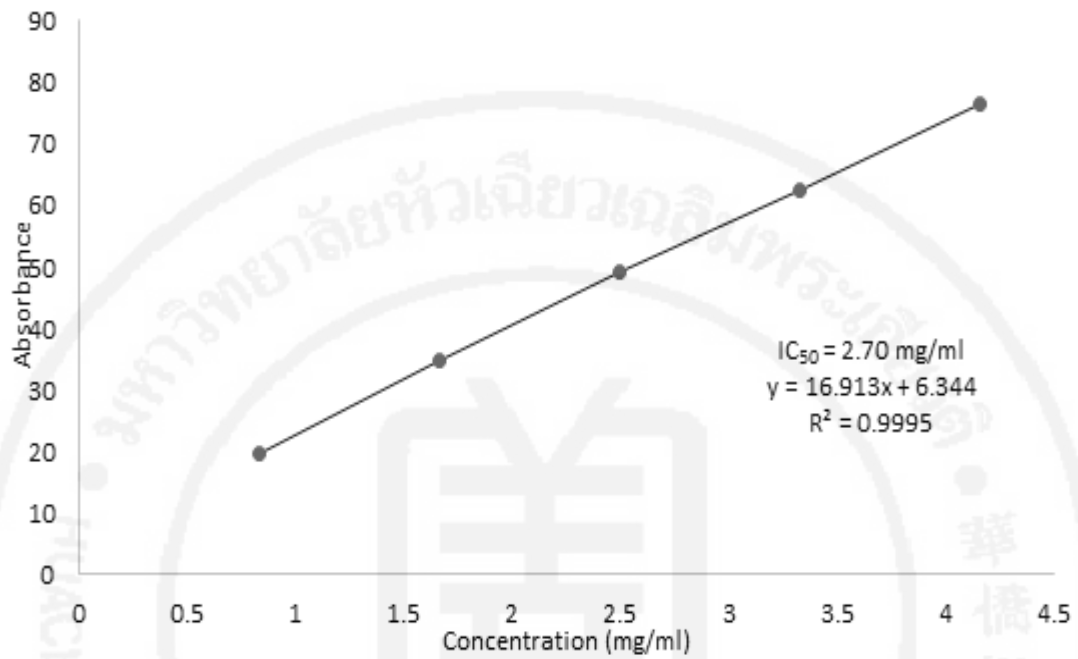
**ตารางที่ 7** ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบไข่น้ำ (crude) แฟรกชัน1-4 (F1-F4) และตะกอน (WP1)

สาร	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)				
	0.06	0.13	0.20	0.26	0.33
Crude	3.47	5.56	8.66	9.70	13.95
WP1	2.13	2.75	3.85	4.91	7.26
F1	0.13	1.05	1.15	1.17	0.89
F2	0.26	1.31	1.28	1.43	2.12
F3	2.57	3.52	5.46	6.71	7.38
F4	0.96	1.49	2.30	3.72	5.07

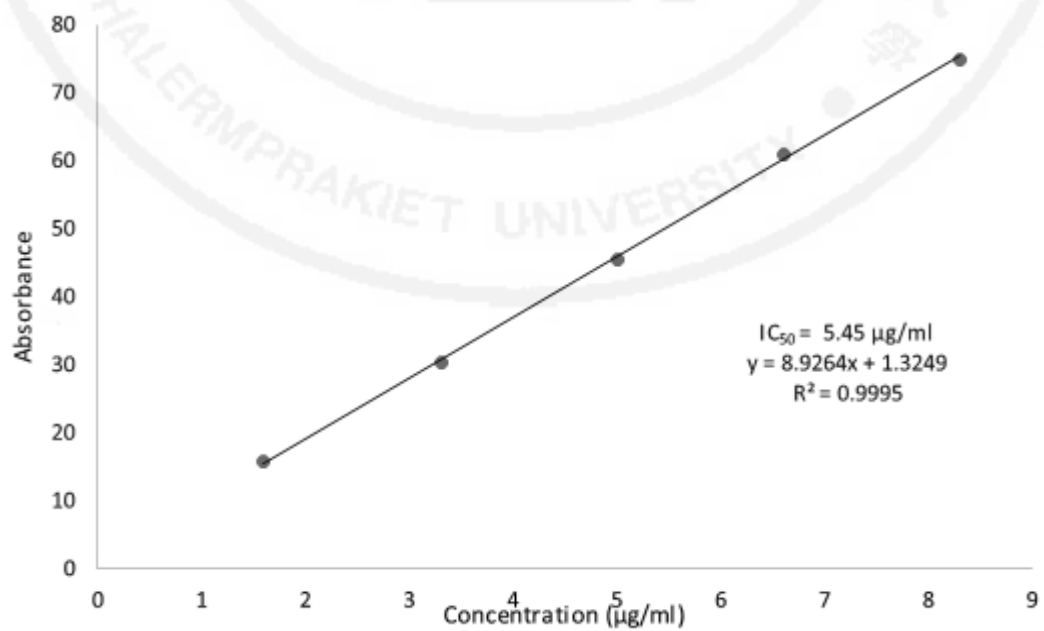
**ตารางที่ 8** ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดไข่น้ำในส่วนของตะกอน (WP1) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH
0.83	19.88
1.66	34.75
2.50	43.32
3.33	62.45
4.16	76.39

**แผนภูมิที่ 1** ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดใข้มีส่วนตะกอน และค่า  $IC_{50}$



**แผนภูมิที่ 2** ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร ascorbic acid และค่า  $IC_{50}$





#### 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำโดยวิธียับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide assay)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำ BSS (แฟรกชันที่ 1 และแฟรกชันที่ 2 ผสมกัน) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไข่น้ำไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ในขณะที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดไข่น้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ร้อยละ  $13.01 \pm 1.48$  และ  $16.84 \pm 1.81$  ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่ 100-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** ผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ของสารสกัดไข่น้ำ (BSS) และ triamcinolone acetonide (TA)

Sample Conc. µg/ml	Nitric oxide inhibition (%)				
	0.1	1	10	100	1000
<i>W.globosa</i> (BSS)	$-17.70 \pm 3.84$	$13.01 \pm 1.48$	$16.84 \pm 1.81$	$5.97 \pm 2.22$	$5.65 \pm 3.52$
TA	$9.73 \pm 2.81$	$14.75 \pm 2.02$	$15.93 \pm 5.13$	$16.52 \pm 4.45$	$18.88 \pm 3.90$

#### 4.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไข่น้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์เปรียบเทียบกับสาร ellipticine ซึ่งเป็น positive control ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดไข่น้ำที่ความเข้มข้น 3.13-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ที่  $106 \pm 37.0$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สาร ellipticine ที่ความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และมีค่า  $IC_{50}$  ที่  $4.00 \pm 3.7$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใข้ น้ำต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fluorescence unit		% Cytotoxicity	Activity
		Average	SD		
DMSO	1% DMSO	6091	295	0.00	-
Ellipticine	0.313	5564	515	8.65	Non-cytotoxic
	0.625	4875	392	19.97	Non-cytotoxic
	1.25	4330	568	28.91	Non-cytotoxic
	2.50	3875	142	36.38	Non-cytotoxic
	5.00	1961	270	67.81	Cytotoxic
	10.00	36	16	99.41	Cytotoxic
<i>W.globosa</i> extract	3.13	5621	362	7.72	Non-cytotoxic
	6.25	4351	449	28.57	Non-cytotoxic
	12.50	4499	171	26.14	Non-cytotoxic
	25.00	4023	324	33.94	Non-cytotoxic
	50.00	3759	385	38.28	Non-cytotoxic
	100.00	3368	172	44.71	Non-cytotoxic

#### 4.8 ผลการเตรียมและคัดเลือกตำรับครีมสารสกัดใข้ น้ำ

จากการเตรียมครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดใข้ น้ำ 1% จำนวน 4 ตำรับ ครีมที่เตรียมได้มีลักษณะเนื้อครีมสีเขียว มีกลิ่นเฉพาะตัวของสารสกัดโดยครีมที่เตรียมได้ตำรับที่ 1 และ 2 มีเนื้อครีมเหลวเหมือนโลชั่น ในขณะที่ตำรับที่ 3 และ 4 มีเนื้อครีมที่ข้นหนืด ทำการคัดเลือกตำรับที่มีความคงตัวทางกายภาพโดยทำการทดสอบภายใต้สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (heating – cooling) ทั้งหมดจำนวน 6 รอบ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 11 ตำรับครีมที่มีความคงตัวทางกายภาพและมีลักษณะของเนื้อครีมเนียนละเอียด ไม่เหนียวข้นเกินไป มีความหนืดที่เหมาะสม คือตำรับที่ 3 จึงคัดเลือกตำรับที่ 3 ในการนำไปใช้ในการทดสอบความคงตัวของสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 11** ผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพภายใต้สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเพื่อคัดเลือกตำรับครีมที่มีความคงตัว

ตำรับที่	ทดสอบ	สี	กลิ่น	การแยกชั้น	ลักษณะ	ค่า pH	ความหนืด (cP)*
1	เริ่มต้น	เขียวสด	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เหลวมาก	5.37	12,378
	สิ้นสุด	เขียวเข้ม	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เหลวมาก	5.35	12,397
2	เริ่มต้น	เขียวสด	ปกติ	ไม่แยกชั้น	ค่อนข้างเหลว	5.34	14,523
	สิ้นสุด	เขียวเข้ม	ปกติ	ไม่แยกชั้น	ค่อนข้างเหลว	5.32	14,517
3	เริ่มต้น	เขียวสด	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เนื้อเนียนชั้น	5.35	102,786
	สิ้นสุด	เขียวเข้ม	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เนื้อเนียนชั้น	5.34	102,800
4	เริ่มต้น	เขียวสด	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เนื้อเนียนชั้น	5.33	182,472
	สิ้นสุด	เขียวเข้ม	ปกติ	ไม่แยกชั้น	เนื้อเนียนชั้น	5.31	181,300

\* วัดความหนืดด้วยเข็ม T95 ความเร็วรอบ 1.5 rpm

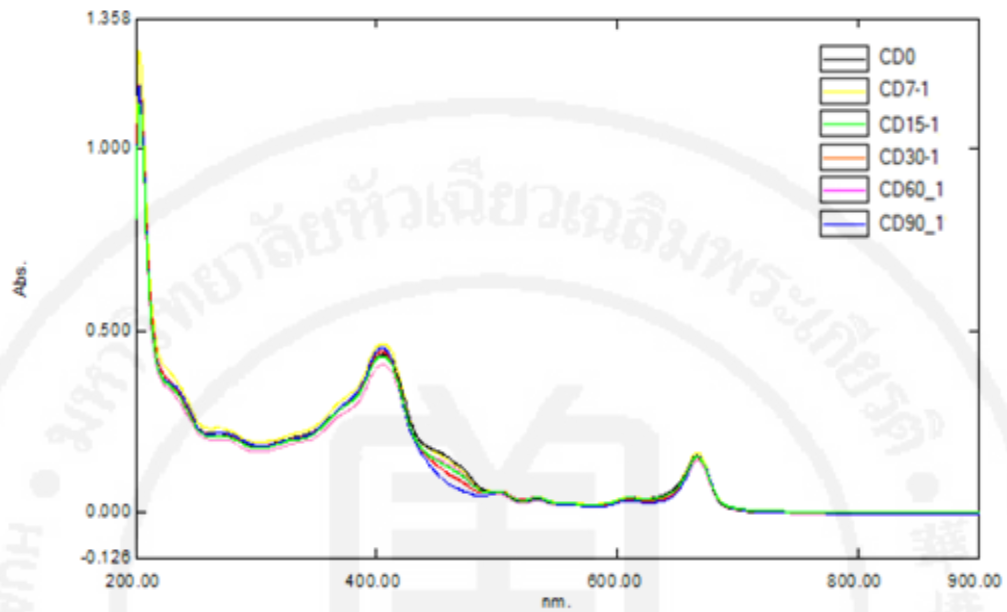
#### 4.9 ผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพและเคมีของสารสกัดหยาบและสารสกัดไชน้ำในตำรับครีม

ผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของครีมที่ผสมสารสกัดไชน้ำ 1% ที่เวลาผ่านไป 90 วันพบว่าไม่มีความเปลี่ยนแปลงทางด้านสี กลิ่น การแยกชั้น ความหนืดและค่าพีเอช แต่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของครีมบ้างเล็กน้อย เมื่อเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิ 45°C ดังแสดงในตารางที่ 12 ในขณะที่การทดสอบความคงตัวทางเคมีของสารสกัดไชน้ำในตำรับครีมและสารสกัดหยาบโดยใช้ UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดไชน้ำและสารสกัดไชน้ำในตำรับครีมมีค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เป็นองค์ประกอบที่ความคลื่นสูงสุด 2 ตำแหน่งคือ 666 และ 405 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 14 ดังนั้นจึงใช้เป็น marker ในการตรวจวัดความคงตัวทางเคมีของสารสกัดไชน้ำและสารสกัดไชน้ำในตำรับครีม ผลการทดลองความคงตัวที่ 90 วันแสดงในตารางที่ 13

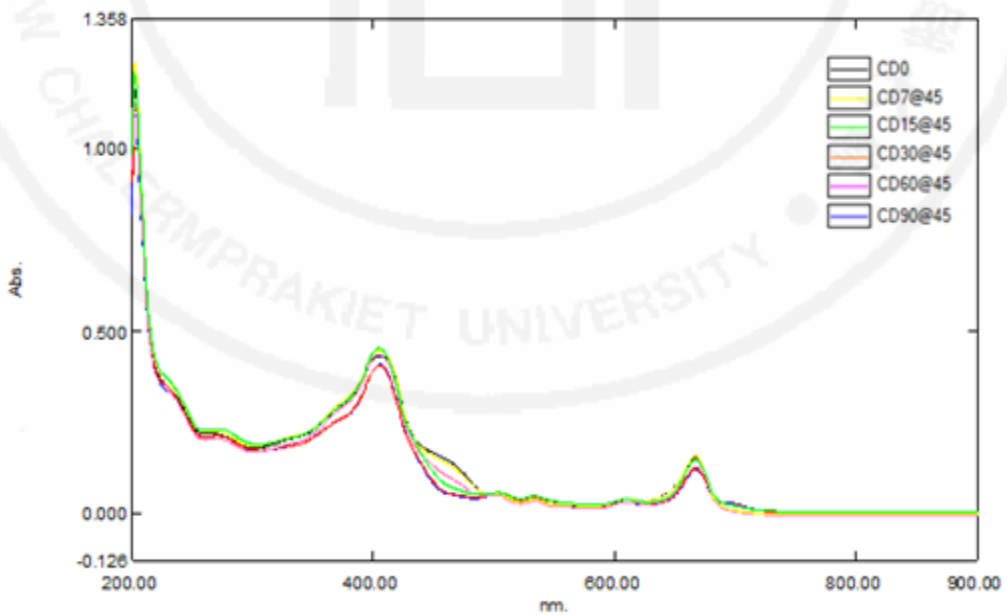
**ตารางที่ 12** การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของครีมที่มีส่วนผสมสารสกัดไข่น้ำความเข้มข้น 1% ที่ระยะเวลา 90 วัน

วันที่	สภาวะ	สี	กลิ่น	น้ำหนัก (กรัม)		การ แยก ชั้น	ความ หนืด (cP)	ค่าพี เอช
				ก่อน	หลัง			
Day 0	ambient	เขียว	ปรกติ	136.37	-	-	122,186	5.44
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	135.24	-	-	122,186	5.44
Day 7	ambient	เขียว	ปรกติ	136.37	136.37	-	126,960	5.44
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	135.24	135.22	-	124,000	5.42
Day 15	ambient	เขียว	ปรกติ	135.78	135.78	-	125,643	5.44
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	136.21	136.03	-	129,000	5.44
Day 30	ambient	เขียว	ปรกติ	136.58	136.54	-	125,498	5.44
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	136.85	136.76	-	122,086	5.44
Day 60	ambient	เขียว	ปรกติ	136.09	136.01	-	125,983	5.45
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	128.41	127.28	-	129,354	5.45
Day 90	ambient	เขียว	ปรกติ	134.91	134.08	-	121,342	5.34
	45±2 °C, 75% RH	เขียว	ปรกติ	128.38	127.45	-	120,298	5.38

ภาพที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบไข่น้ำและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมที่เวลา 90 วัน

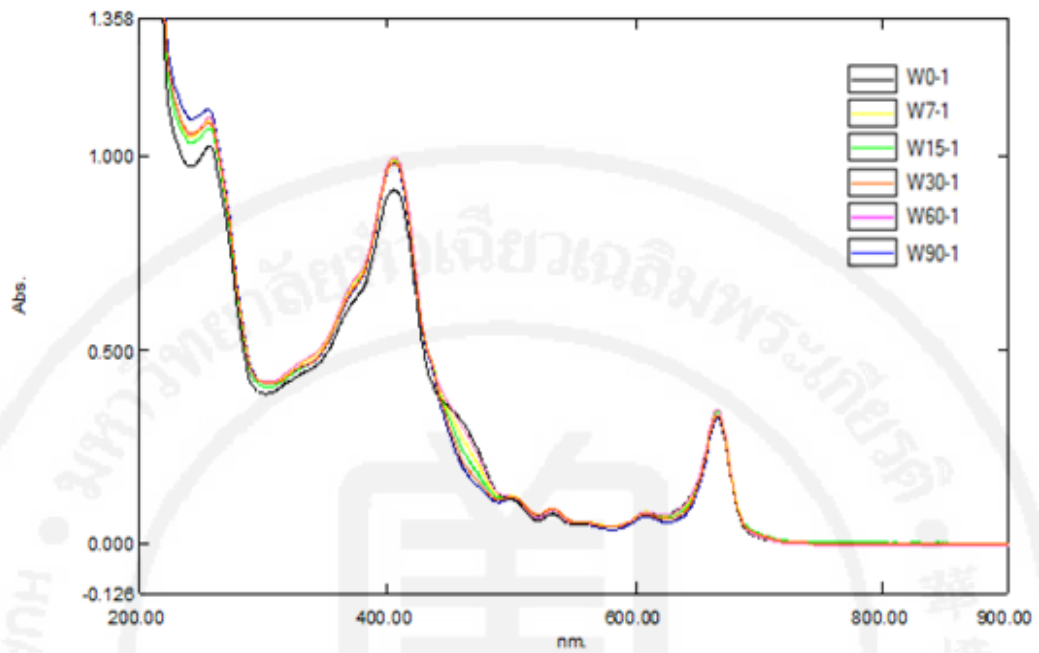


(ก) สารสกัดหยาบที่อุณหภูมิแวดล้อม

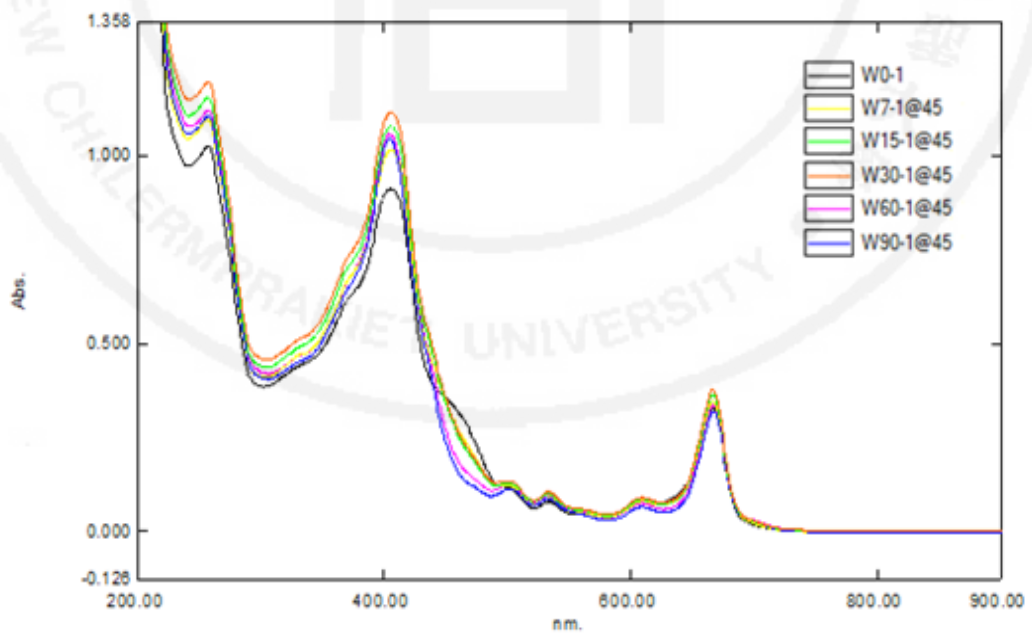


(ข) สารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 45°C

ภาพที่ 14 (ต่อ)



(ค) สารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมที่อุณหภูมิแวดล้อม



(ง) สารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมที่อุณหภูมิ 45°C

**ตารางที่ 13** ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาดไข่น้ำและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม ที่ความยาวคลื่น 666 และ 405 นาโนเมตร ระยะเวลา 90 วัน

วันที่	สาร	สภาวะ	ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Day0	Crude	Am	666	0.156	0.154	0.155	0.155 ± 0.001
			405	0.436	0.432	0.434	0.434 ± 0.002
	Cream	Am	666	0.330	0.339	0.362	0.343 ± 0.016
			405	0.914	0.936	1.002	0.950 ± 0.045
Day 7	Crude	Am	666	0.146	0.151	0.153	0.150 ± 0.003
			405	0.414	0.425	0.404	0.414 ± 0.010
		45° C	666	0.150	0.156	0.157	0.154 ± 0.003
			405	0.438	0.453	0.456	0.449 ± 0.009
	Cream	Am	666	0.371	0.350	0.344	0.355 ± 0.014
			405	1.050	0.997	0.981	1.009 ± 0.036
		45° C	666	0.332	0.329	0.346	0.335 ± 0.009
			405	0.975	0.966	1.016	0.985 ± 0.026
Day 15	Crude	Am	666	0.156	0.147	0.145	0.149 ± 0.005
			405	0.462	0.463	0.461	0.462 ± 0.001
		45° C	666	0.133	0.134	0.136	0.134 ± 0.001
			405	0.435	0.431	0.434	0.435 ± 0.001
	Cream	Am	666	0.347	0.342	0.356	0.348 ± 0.007
			405	0.991	1.064	1.001	1.018 ± 0.039
		45° C	666	0.362	0.367	0.367	0.365 ± 0.002
			405	0.978	1.092	0.917	0.995 ± 0.088
Day 30	Crude	Am	666	0.153	0.155	0.145	0.151 ± 0.005
			405	0.425	0.429	0.432	0.428 ± 0.003
		45° C	666	0.150	0.152	0.155	0.152 ± 0.002
			405	0.435	0.431	0.434	0.433 ± 0.002
	Cream	Am	666	0.342	0.315	0.304	0.320 ± 0.019
			405	0.986	0.909	0.873	0.922 ± 0.057
		45° C	666	0.248	0.356	0.341	0.315 ± 0.037
			405	0.755	1.081	1.037	0.953 ± 0.176

ตารางที่ 13 (ต่อ)

วันที่	สาร	สภาวะ	ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Day 60	Crude	Am	666	0.152	0.143	0.129	0.141 ± 0.011
			405	0.442	0.452	0.433	0.442 ± 0.015
		45° C	666	0.145	0.132	0.159	0.145 ± 0.013
			405	0.405	0.432	0.439	0.425 ± 0.017
	cream	Am	666	0.334	0.358	0.399	0.343 ± 0.012
			405	0.986	1.058	0.999	1.014 ± 0.038
		45° C	666	0.336	0.343	0.341	0.340 ± 0.003
			405	0.956	1.077	1.074	1.035 ± 0.069
Day 90	Crude	Am	666	0.143	0.153	0.151	0.149 ± 0.005
			405	0.452	0.450	0.448	0.450 ± 0.002
		45° C	666	0.151	0.158	0.142	0.150 ± 0.008
			405	0.442	0.436	0.448	0.442 ± 0.006
	Cream	Am	666	0.326	0.305	0.311	0.314 ± 0.010
			405	0.984	0.922	0.941	0.949 ± 0.031
		45° C	666	0.320	0.403	0.332	0.351 ± 0.044
			405	1.045	1.314	1.084	1.147 ± 0.145

หมายเหตุ Am = อุณหภูมิแวดล้อม 28.01°C ± 2 °C, 68.8% RH

45°C = อุณหภูมิตู้ควบคุม 45±2 °C, 75% RH

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม นำมาเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงวันเริ่มต้นด้วย Paired Samples t-test โดยมีค่าสมมติฐานและผลการทดสอบดังตารางที่ 14

#### Paired Samples t-test

##### 1. สมมติฐาน

H<sub>0</sub>: ค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นกับวันเวลาต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน

H<sub>1</sub>: ค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นกับวันเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกัน

##### 2. ทดสอบที่ค่าความเชื่อมั่น 95%



ตารางที่ 14 ผลการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นกับช่วงเวลาเปลี่ยนแปลงไปของสารสกัดหยาบไข่น้ำและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม

Test	ความยาวคลื่น (nm)	สถานะ	Pair	$r_{xy}$	T	Df	sig
Crude extract	666	Ambient temperature	Day 0 - 7	-0.69	1.99	2.00	0.19
			Day 0 - 15	0.77	1.91	2.00	0.20
			Day 0 - 30	-0.19	1.24	2.00	0.34
			Day 0 - 60	0.39	2.11	2.00	0.17
			Day 0 - 90	0.94	1.66	2.00	0.24
Crude Extract	405	Ambient temperature	Day 0 - 7	-0.52	2.92	2.00	0.10
			Day 0 - 15	-0.50	-18.33	2.00	0.00
			Day 0 - 30	-0.57	1.87	2.00	0.20
			Day 0 - 60	-0.53	-1.35	2.00	0.31
			Day 0 - 90	0.50	-2.62	2.00	0.12
Crude Extract	666	45°C	Day 0 - 7	-0.79	0.25	2.00	0.83
			Day 0 - 15	0.95	3.35	2.00	0.08
			Day 0 - 30	-0.40	1.51	2.00	0.27
			Day 0 - 60	0.48	1.28	2.00	0.33
			Day 0 - 90	-0.44	0.95	2.00	0.44
Crude Extract	405	45°C	Day 0 - 7	-0.78	-2.31	2.00	0.15
			Day 0 - 15	0.05	-1.00	2.00	0.42
			Day 0 - 30	0.96	2.00	2.00	0.18
			Day 0 - 60	-0.75	0.77	2.00	0.52
			Day 0 - 90	-0.92	2.88	2.00	0.10

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Test	ความยาวคลื่น (nm)	สภาวะ	Pair	$r_{xy}$	T	Df	sig
Cream <i>W.globosa</i>	666	Ambient temperature	Day 0 - 7	-0.85	-0.67	2.00	0.57
			Day 0 - 15	0.80	-0.69	2.00	0.55
			Day 0 - 30	-0.90	1.15	2.00	0.37
			Day 0 - 60	-0.05	0.00	2.00	1.00
			Day 0 - 90	-0.50	2.16	2.00	0.16
Cream <i>W.globosa</i>	405	Ambient temperature	Day 0 - 7	-0.84	-1.29	2.00	0.32
			Day 0 - 15	-0.15	-1.81	2.00	0.21
			Day 0 - 30	-0.88	0.48	2.00	0.68
			Day 0 - 60	-0.11	-1.75	2.00	0.22
			Day 0 - 90	-0.45	0.04	2.00	0.97
Cream <i>W.globosa</i>	666	45°C	Day 0 - 7	0.0	1.51	2.00	0.27
			Day 0 - 15	0.72	-2.58	2.00	0.12
			Day 0 - 30	-0.72	-1.00	2.00	0.42
			Day 0 - 60	0.50	0.42	2.00	0.71
			Day 0 - 90	0.72	-2.58	2.00	0.12
Cream <i>W.globosa</i>	405	45°C	Day 0 - 7	0.92	-2.54	2.00	0.13
			Day 0 - 15	-0.59	-0.64	2.00	0.58
			Day 0 - 30	0.60	-0.08	2.00	0.94
			Day 0 - 60	0.67	-2.90	2.00	0.10
			Day 0 - 90	-0.15	-2.15	2.00	0.16

จากตารางที่ 14 ผลการทดสอบพบว่า ค่า significant (p-value) ของทุกการทดสอบมีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐานหลัก ( $H_0$ ) สรุปได้ว่า สารสกัดหยาบไข่น้ำและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม มีค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นกับวันเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 นั่นคือสารสกัดหยาบและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมมีความคงตัวทั้งในสภาวะอุณหภูมิแวดล้อม และที่อุณหภูมิ 45 °C ที่ระยะเวลา 90 วัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารสำคัญจากไข่น้ำสามารถทำได้โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเอทานอล โดยผลการสกัดคิดเป็นร้อยละ 12.25 ของไข่น้ำแห้งหรือร้อยละ 0.82 ของไข่น้ำสด เมื่อนำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแรงขับเคลื่อนบางพบแถบสารที่มีค่า  $R_f = 0.45$  ตรงกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol จากนั้นทำการแยกสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อให้สารสกัดมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูง มีปริมาณสารรบกวนน้อย ช่วยให้การแปลผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพมีความชัดเจน จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสารสกัดแฟรกชันที่ 2 มีองค์ประกอบของสารส่วนใหญ่เป็นสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไข่น้ำในการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าแฟรกชัน 1 และแฟรกชัน 2 มีฤทธิ์น้อยมากในการต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่สารสกัดหยาบ ตะกอน (WF1) แฟรกชัน 3 และ แฟรกชัน 4 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของส่วน WF1 พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดไข่น้ำในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 โดยการวัดปริมาณของไนโตรต์ที่หลั่งออกมาหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย LPS สารที่ใช้ทดสอบคือแฟรกชัน 1 และแฟรกชัน 2 ผลรวมกันพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนโตรออกไซด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งร้อยละ  $16.84 \pm 1.81$  ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุม Triamcinolone acetonide ที่ความเข้มข้นเดียวกันมีค่าการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ  $15.93 \pm 5.13$  ผลการทดสอบชี้ให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดไข่น้ำส่วนของแฟรกชันที่ 1 และแฟรกชันที่ 2 ผลรวมกันมีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากก๊าซไนโตรออกไซด์ เมื่อนำสารสกัดหยาบไข่น้ำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์พบว่าสารสกัดหยาบไข่น้ำไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในขณะที่สาร Ellipticine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น สารสกัดไข่น้ำจึงมีความปลอดภัยที่จะนำไปใช้เป็นสารสกัดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต่อผิวหนังโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

การทดสอบความคงตัวของสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีม โดยการคัดเลือกตำรับครีมจากทั้งหมด 4 สูตร พบว่าสูตรที่ 3 มีความคงตัวทางกายภาพที่ดี จึงเลือกใช้เป็นตำรับครีมที่ผสมสารสกัดไข่น้ำ 1% จากนั้นนำไปศึกษาความคงตัวที่ 2 สภาวะคือ อุณหภูมิแวดล้อมมีค่าเฉลี่ย  $28.01^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 68.8% RH

และในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $45 \pm 2$  °C, 75% RH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 และ 405 นาโนเมตร เป็น marker ของสารสำคัญในสารสกัดไข่น้ำ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาดไข่น้ำและสารสกัดไข่น้ำในตำรับครีมที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 90 วัน มีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของสารสำคัญในสารสกัดไข่น้ำ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

## 5.2 อภิปรายผล

### 5.2.1 การเตรียมสารสกัดไข่น้ำ

แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการละลาย กว้างสามารถสกัดสารสำคัญได้ทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ทำให้ได้สารหลายกลุ่มได้ปริมาณสารออกมามาก และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย โดยที่เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ได้รับความนิยมมากกว่าเมทานอลเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยกว่า<sup>(26)</sup> การสกัดสารสำคัญในไข่น้ำใช้เอทานอลในการสกัด สารสกัดหยาดที่ได้คิดเป็นร้อยละ 0.82 ของน้ำหนักไข่น้ำสด ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชในตระกูลเดียวกันเช่น แหนเล็ก (*Lemna minor* L.) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารสกัดหยาดร้อยละ 18.4<sup>(52)</sup> หรือแหนใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza* L.) สกัดด้วย 85% เมทานอลได้ปริมาณสารสกัดหยาดร้อยละ 9.91<sup>(53)</sup> เนื่องจากไข่น้ำเป็นพืชที่ประกอบด้วยน้ำสูงถึง 91-95% จึงส่งผลให้ได้ปริมาณของสารสกัดหยาดในปริมาณที่น้อย โดยพืชจะมีปริมาณของสารสกัด (สารสำคัญ) ในปริมาณมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืช วิธีการและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญ นอกจากนี้ปัจจัยแวดล้อมที่เจริญเติบโต ธาตุอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีผลต่อปริมาณของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในพืชแตกต่างกัน<sup>(54)</sup>

### 5.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของสารสำคัญในสารสกัดไข่น้ำ

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไข่น้ำโดยใช้เทคนิค TLC ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดไข่น้ำพบแถบสารที่ตำแหน่ง Rf ตรงกันกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol จากผลของ TLC ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าสารที่พบในสารสกัดหยาดไข่น้ำคือ  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ดังนั้นจึงทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค column chromatography ต่อไปเพื่อแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น (semi-purified portion) ซึ่งจะทำการแปลผลของการทดสอบเอกลักษณ์ของสาร รวมถึงการแปลผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้สาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol เป็น plant sterol ที่ถูกพบมากในธรรมชาติมักจะอยู่ในรูปแบบสารผสมโดยสารทั้งสองมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันต่างกันเพียงพันธะของตำแหน่ง 22 และ 23 โดยที่  $\beta$ -sitosterol เป็นพันธะเดี่ยว และ stigmasterol เป็นพันธะคู่<sup>(55)</sup> ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะแยกสาร

ทั้งสองออกจากกันโดยใช้เทคนิค TLC หรือ column chromatography เนื่องจากสารทั้งสองมีค่า Rf ที่เท่ากันจึงเคลื่อนที่หรือแยกออกมาในเวลาเดียวกัน

สารสกัดหยาบไข่น้ำแยกสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกได้ทั้งหมด 4 แพรกชั้น เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าแพรกชั้นที่ 2 พบสารมีค่า Rf ตรงกันกับ  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว การวิเคราะห์โครงสร้างของสารสกัดที่ได้จากแพรกชั้นที่ 2 พบว่าสเปกตรัมของ FT-IR และ  $^1\text{H-NMR}$  แสดงลักษณะของพิกที่ชัดเจน มีพิกหรือสัญญาณอื่นรบกวนน้อย และสเปกตรัมทั้งสองยืนยันโครงสร้างของ  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างทดสอบประกอบด้วยสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ที่สนใจเป็นส่วนใหญ่ จากความชัดเจนของพิกที่ปรากฏในสเปกตรัมทั้งสองการวิเคราะห์ทำให้สามารถบอกอย่างคร่าว ๆ ถึงการมีสารอื่น ๆ ปนอยู่ในแพรกชั้นที่ 2 ในปริมาณน้อย ผลการทดสอบชี้ให้เห็นถึงระบบที่ใช้ในการแยกสารออกจากคอลัมน์มีประสิทธิภาพ สารละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนที่ใช้ชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยเทคนิค gradient elution ส่งผลให้สารไม่มีขั้วถูกแยกออกมาจากซิลิกาเจลก่อนสารที่มีขั้ว ในขณะที่สารที่มีขั้วดูดซับไว้ด้วยซิลิกาเจลและถูกชะออกมาเมื่อใช้สารละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอล

ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารในแพรกชั้นที่ 2 ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) ดังแสดงในตารางที่ 14 สเปกตรัมของสารที่วิเคราะห์ได้แสดงพิก O-H stretching ที่  $3318.9\text{ cm}^{-1}$ , C=C stretching ที่  $1635.24\text{ cm}^{-1}$ , aliphatic C-H stretching ที่  $2936.31$  และ  $2865.07\text{ cm}^{-1}$ , cyclic  $(\text{CH}_2)_n$  และ  $-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$  ที่  $1462.35$  และ  $1378.29\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังแสดงพิกของ cycloalkane ที่  $1044.60\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งผลการทดสอบค่าสเปกตรัมของสารในแพรกชั้นที่ 2 แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของทั้ง  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol มีความสอดคล้องกับการรายงานการวิจัยของ Kamboj และ Saluja (2011)<sup>(56)</sup> ที่ทำการสกัดและวิเคราะห์สารสกัด *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) แสดงในตารางที่ 15

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี แสดงค่า chemical shift ที่ 3.53 (m) แสดงค่าการมีหมู่ของ hydroxyl มาเกาะที่ตำแหน่งที่ 3 ค่า chemical shift ที่ 0.68 (s), 1.01 (s), 0.93 (d), 0.83 (d), 0.79 (d) และ 0.85 (t) แสดงชนิดของโปรตอน methyl proton ที่ตำแหน่ง 18, 19, 21, 26, 27 และ 29 ของโครงสร้างสารสเตอรอล และค่า chemical shift ที่ 5.53 (d) แสดงโปรตอนชนิด olefinic proton ตำแหน่งที่ 6 ของโครงสร้างของสารสเตอรอล นอกจากนี้ยังแสดงค่า chemical shift ที่ 5.12 (dd) และ 5.02 (dd) แสดงโปรตอนชนิด olefinic proton มีโครงสร้างเป็น alkene ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของสาร stigmasterol แสดงการมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 22 และ 23<sup>(57)</sup> ข้อมูลจาก  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดไข่น้ำแพรกชั้นที่ 2 ใกล้เคียงกับสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาของสารสกัดจากसानเห็บ *Saurauia roxburghii* (Actinidiaceae) แสดงในตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) แสดงค่า chemical shift ที่ 3.53 และ 5.36 แสดงถึงโปรตอนที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ในขณะที่ ตำแหน่งที่ 18, 19, 21, 26, 27 และ 29 แสดงค่า chemical shift ที่ 0.67, 1.00, 0.91, 0.82, 0.80 และ 0.85 โดยที่ตำแหน่งโปรตอนแสดงพันธะคู่ตำแหน่ง 22 และ 23 มีค่า chemical shift ที่ 5.16 และ 5.03 ppm<sup>(58)</sup> จึงเป็นการยืนยันว่า สารสกัดจากแฟรกชันที่ 2 ประกอบด้วย  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol

จากข้อมูลการวิจัยสารสกัดแฟรกชันที่ 2 แสดงให้เห็นว่าประกอบด้วยสาร  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ตรงกับการรายงานผลการศึกษาคู่ประกอบทางเคมีในสารสกัด *W. arrhiza* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกัน โดยใช้เทคนิค gas chromatography ร่วมกับ mass spectrometry (GC-MS) ในการศึกษาพบว่า สารสกัด *W. arrhiza* ประกอบไปด้วยสารกลุ่มไขมันและสเตอรอล โดยมี  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ *W. arrhiza* ยังพบสารกลุ่ม aromatic compounds ได้แก่ (E)-p-Coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid<sup>(24)</sup> ในขณะที่สารสกัด ใช้น้ำไม่พบแถบสารของ (E)-p-Coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid ในการทดสอบโดยใช้ TLC ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพืชในตระกูลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์อาจมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน นอกจากนี้พื้นที่เพาะปลูก สารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต ล้วนแต่เป็นองค์ประกอบที่ส่งผลต่อ องค์ประกอบทางเคมีในใช้น้ำ<sup>(54)</sup>

**ตารางที่ 15** การเปรียบเทียบเลขที่คลื่น (Wavenumber) และหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของสารสกัดแฟรกชันที่ 2 เทียบกับ *Ageratum conyzoides* (Asteraceae)

wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )		Functional groups
Fraction 2 of <i>W.globosa</i>	<i>Ageratum conyzoides</i> (Asteraceae)	
3318.90	3373.6	O-H stretching
2936.31	2940.7	aliphatic C-H stretching
2865.07	2867.9	aliphatic C-H stretching
1635.24	1641.6	C=C stretching
1462.35	1457.3	cyclic $(\text{CH}_2)_n$
1378.29	1381.6	$-\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$
1044.60	1038.7	Cycloalkane

**ตารางที่ 16** การเปรียบเทียบค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนของสารสกัด แพรกชั้นที่ 2 เทียบกับ  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ของสารสกัด *Saurauia roxburghii* (Actinidiaceae)

Position	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)		
	Fraction 2 Of <i>W.globosa</i>	$\beta$ -sitosterol of <i>Saurauia roxburghii</i>	stigmasterol of <i>Saurauia roxburghii</i>
3	3.53	3.51	3.52
6	5.53	5.34	5.34
18	0.68	0.67	0.67
19	1.01	1.00	1.00
21	0.93	0.92	0.92
22	5.12	-	5.16
23	5.02	-	5.03
26	0.83	0.83	0.81
27	0.79	0.79	0.79
29	0.85	0.85	0.85

### 5.2.3 การตรวจสอบความสามารถของสารสกัดไข่น้ำในการต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบความสามารถของสารทดสอบในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH<sup>(59)</sup> จากการศึกษาพบว่า สารสกัดไข่น้ำส่วนตะกอน (WF1) สารสกัดหยาบแพรกชั้นที่ 3 และแพรกชั้นที่ 4 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยที่ WF1 แพรกชั้นที่ 3 และ 4 เป็นส่วนของสารที่มีขี้ เนื่องจากส่วน WF1 ไม่ละลายในเฮกเซนแต่ละลายได้ดีในเอทานอล 80% ในขณะที่แพรกชั้น 3 และ 4 เป็นสารที่ละลายออกมาเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทและเอทานอลเป็นตัวชะ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในไข่น้ำจึงน่าจะเป็นสารกลุ่มที่มีขี้ ในขณะที่แพรกชั้นที่ 1 และ 2 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือมีน้อยมากเนื่องจากเป็นสารกลุ่มที่ไม่มีขี้ที่ละลายได้ดีในเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ซึ่งจากผลของการวิเคราะห์ FT-IR และ <sup>1</sup>H-NMR แสดงว่าสารกลุ่มนี้ประกอบด้วย  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol นอกจากนี้การทดลองพบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่เนื่องจากสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นสูงมาก ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นย่อมส่งผลกระทบต่อผลการตรวจวัดหรือให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ WF1 พบว่ามีฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสง

ของ DPPH ลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการรายงานของ Daduang J et al. (2011)<sup>(60)</sup> ได้รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกที่พบในสารสกัดใข้ น้ำที่สกัดด้วยเอทานอล 70% พบว่าใข้ น้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด  $27.19 \pm 0.07$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ในขณะที่ Nini et al. (2014)<sup>(24)</sup> รายงานผลการศึกษาองค์ประกอบในใข้ น้ำพบว่าประกอบด้วยอนุพันธ์ของสาร apigenin และ luteolin เป็นสารในกลุ่ม flavones ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ผลการรายงานการทดสอบในแหนเหล็ก (*Lemna minor* L. Lemnaceae) ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกันพบปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ในแหนเหล็กที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าเท่ากับ 16.7 และ 17.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ<sup>(52)</sup> ดังนั้นผลการทดสอบในครั้งนี้จึงสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมา โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใข้ น้ำน่าจะมาจากสารออกฤทธิ์ในกลุ่มของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ จึงเป็นเหตุผลให้สารสกัดใข้ น้ำที่สกัดด้วยเอทานอล 70% มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าพืชพื้นบ้านหลายชนิดได้แก่ กระจับปี่แดง ผักชีลาว ข้าพุด ถั่วพู ก้านจ้อย ดอกขจร แคบ้าน ผักชีฝรั่ง เป๊าะดำลิง ตำลึง ผักโขม ผักหนอก จิกน้ำ กระจับปี่ กระจับปี่แดง แคป่า ผักปลั่ง และชะมวง<sup>(23)</sup>

#### 5.2.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดใข้ น้ำด้วยวิธียับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide assay)

โดยปกติแล้วเซลล์มาโครฟาจสามารถสร้างสารก่อการอักเสบได้แก่ TNF- $\alpha$  และไนตริกออกไซด์ได้เป็นจำนวนมาก เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือถูกเหนี่ยวนำ ปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่สร้างขึ้นเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อ<sup>(61)</sup> การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในสารสกัดใข้ น้ำในการศึกษานี้ใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ให้ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียเพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ จากนั้นใช้สารสกัดทดสอบเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยทำการวัดปริมาณไนโตรท์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์จากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ดังนั้นการวัดปริมาณไนโตรท์จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS การวิเคราะห์ไนโตรท์โดยปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในขั้นแรกไนโตรท์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรด ได้สารตัวกลางเป็นเกลือ diazonium สารตัวกลางจะทำปฏิกิริยากับ N-1-naphyetylenediamine dihydrochloride ได้เป็นผลิตภัณฑ์ azo compound เป็นสารสีชมพูที่เสถียร<sup>(62)</sup> ทำให้สามารถประเมินปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นได้ ผลการทดสอบพบว่าที่ค่าความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดใข้ น้ำ BSS (แฟรกชันที่ 1 และ 2 ผสมรวมกัน) มีค่าการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ร้อยละ  $13.01 \pm 1.48$  และ  $16.84 \pm 1.81$  ตามลำดับ ผลของการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดใข้ น้ำน่าจะมาจากฤทธิ์ของ



$\beta$ -sitosterol และ stigmasterol ที่ยับยั้งการแสดงออกของ NFkB และ TNF-alpha ทำให้การสร้างไนตริกออกไซด์ลดลง<sup>(63)</sup> แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นเป็น 100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลับส่งผลน้อยต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ น่าจะมีสาเหตุมาจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารสำคัญในสารสกัดไข่น้ำ (concentration-dependent manner) ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการศึกษาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของพืชดอก *Ixeris dentate nakai* ในส่วนของแฟรงก์ชันเฮกเซน ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดส่วนเฮกเซนมีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์นั้นขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารสกัด<sup>(64)</sup> และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์กับสาร triamcinolone acetonide ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์จากสเตียรอยด์ในกลุ่ม corticosteroid ที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบพบว่า triamcinolone acetonide มีค่าการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใกล้เคียงกับสารสกัดไข่น้ำ (BSS) มีการรายงานการศึกษาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในแห่นใหญ่ (*Spirodela polyrrhiza*) ซึ่งพบว่าสารสกัดแห่นใหญ่ที่สกัดด้วย 85% เมทานอล สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้สูงถึง 94.4% ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการวิเคราะห์แสดงถึงการลดปริมาณการสร้าง iNOS protein ส่งผลให้มีปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ลดลง<sup>(53)</sup> ทั้งนี้ฤทธิ์การยับยั้งอาจมาจากองค์ประกอบหลายส่วนของสารสกัดหยาบในแห่นใหญ่ สำหรับสารสกัดไข่น้ำฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์น่าจะมาจากฤทธิ์ของสเตอรอลที่เป็นองค์ประกอบในไข่น้ำ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากไข่น้ำควรได้รับการทดสอบและพัฒนาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม รวมไปถึงการทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบด้วยวิธีอื่นร่วมด้วยเนื่องจากพืชหรือสารหนึ่ง ๆ สามารถออกฤทธิ์ในกระบวนการอักเสบได้ในหลายกระบวนการ

### 5.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์

การศึกษาคือความเป็นพิษนิยมใช้ในการประเมินความเป็นพิษของสารทดสอบหรือสารสกัดที่มาจากธรรมชาติก่อนนำไปใช้เป็นวัตถุดิบ<sup>(65)</sup> โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการประเมินความเป็นพิษของสารทดสอบ<sup>(66)</sup> ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดหยาบไข่น้ำพบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $106.38 \pm 37.0$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ positive control ได้แก่ สาร Ellipticine ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็ง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $4.00 \pm 3.7$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตามข้อกำหนดของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (American National Cancer Institute) สารทดสอบที่มีค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถือได้ว่าเป็นพิษต่อเซลล์<sup>(67)</sup> ดังนั้นสารสกัดไข่น้ำจึงมีสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย

### 5.2.6 การคัดเลือกตำรับและทดสอบความคงตัวของครีมที่มีสารสกัดไช้

การทดสอบแบบสภาวะเร่งสลับอุณหภูมิ (heating – cooling cycles) เป็นการศึกษาเพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีรวมถึงการสลายตัวของสาร โดยจะทำการเก็บตัวอย่างในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริงเพื่อใช้ทำนายผลของความคงตัวของเบื้องต้นหรือใช้ประเมินระยะเวลาของการหมักอายุของผลิตภัณฑ์อย่างคร่าว ๆ<sup>(68)</sup> การทดสอบเพื่อการคัดเลือกตำรับสารสกัดไช้ในสภาวะเร่งสลับอุณหภูมิพบว่า ครีมตำรับที่ 3 มีความคงตัวดีทางกายภาพ เนื้อครีมไม่มีการแยกชั้น กลิ่นปกติ มีสีเขียวเข้มขึ้นเล็กน้อยและค่าความเป็นกรดต่างรวมถึงความหนืดไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงนำมาใช้ในการศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของสารสกัดไช้ในสภาวะการเก็บรักษาจริง (Real time storage condition) ระยะเวลา 90 วัน จากการศึกษพบว่า ตำรับมีความคงตัวเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับโดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างน้อยที่ 60-90 วันที่อุณหภูมิ 45 °C ในขณะที่ความคงตัวทางเคมีของสารสกัดใช้วิธีการวัดค่าสเปกตรัมโดยเครื่อง UV-Vis spectroscopy<sup>(49)</sup> โดยเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบไช้และสารสกัดไช้ในตำรับครีม นำมาสแกนที่ความยาวคลื่น 200-900 นาโนเมตร ผลการสแกนพบว่าสารตัวอย่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 666 และ 405 นาโนเมตร ซึ่งใช้เป็นเอกลักษณ์ของสารสกัดไช้หรือ fingerprint<sup>(69)</sup> ของสารสำคัญที่ตรวจพบในสารสกัดไช้ ในการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความคงตัวทางเคมีจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบไช้และสารสกัดไช้ในตำรับครีมที่ความยาวคลื่น 666 และ 405 นาโนเมตร ระยะเวลาทดสอบ 90 วัน ผลการทดลองเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของวันที่เริ่มต้นเก็บความคงตัวกับวันที่ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้ paired samples t-test พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากวันเริ่มต้น แสดงถึงสารสกัดหยาบไช้และสารสกัดไช้ในตำรับครีมน่าจะมีความเข้มข้นของสารสำคัญไม่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงผันแปรกับความเข้มข้นของสารสำคัญในสารสกัดไช้

### บรรณานุกรม

1. อนันต์ สกฤติภูมิ. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. ปีที่ 8 (1); 2551.
2. โอลภา วัชรคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พี.ริษัท; 2549.
3. บุหรีน พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 21 (3) กรกฎาคม - กันยายน 2556.
4. Lee CW, Ko HH, Lin CC, Chai CY, Chen WT, Yen FL. Artocarpin attenuates ultraviolet B-induced skin damage in hairless mice by antioxidant and anti-inflammatory effect. Food Chem Toxicol. 2013;60:123-129.
5. ชัชวาลย์ ช่างทำ. คุณประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสมุนไพรขมิ้นชัน. ว. วิทย์. เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2558;1(2):94-109.
6. อรสา สุริยาพันธ์. ใบขลุ่: บทควาเผยแพร่วามรู้สู่ประชาชน คุณค่าทางโภชนาการ ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความเป็นพิษ. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 29 สิงหาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/277/ใบขลุ่-ประโยชน์-โทษ-ฤทธิ์-ความเป็นพิษ/>
7. Ivan K, Katya V. *Wolffia globosa* (roxburgh) hartog et plas (Lemnaceae): a new species in Bulgarian flora. Journal of Biological & Scientific Opinion. 2013;1(4):356-357.
8. บุญทิศา ชาติชานี. การบำบัดน้ำเสียฟาร์มสุกรโดยใช้ไข่น้ำเพื่อเป็นอาหารเสริมเลี้ยงสัตว์. [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2555.
9. อภิเดช แสงดี, เบญจรงค์ วัชระชาติ, อุดมลักษณ์ มณีโชติ, ปิยะเนตร จันทร์ถิระติกุล, อาณัติ จันทร์ถิระติกุล. การจำแนกชนิดของไข่น้ำโดยการหาลำดับเบสยีนในคลอโรพลาสต์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 2010;29(3):259-265.
10. *Wolffia arrhiza* (Linnaeus) Horkel ex Wimmer Common Watermeal [online]. W.P.Armstrong [updated 21 september 2013; cited 2016 July 19]. Available from: <http://www.Waynesword.palomar.edu/woar.htm>.
11. *Wolffia globosa* (Roxburgh) Den Hartog and van der plas tropical Watermeal [online]. W.P.Armstrong [updated 21 september 2013; cited 2016 July 19]. Available from: <http://www.Waynesword.palomar.edu/wogl.htm>.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

12. กลมทิพย์ กสิภรณ์. พืชผักพรรณไม้พื้นบ้านอีสาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทพิมเนศ พรินต์ติ้ง เซ็นเตอร์ จำกัด; 2543.
13. Elias L. Taxonomy and ecology of the section wolffia of the genus wolffia (Lemnaceae). Ber.Geobot.Inst.ETH,Stiftung Rübel,Zürich. 1994;60:137-151.
14. วิลาสินี ดีปัญญา. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไข่ไก่แช่แช่น้ำ. [งานวิจัย]. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์; 2555.
15. ชานี.การเลี้ยงไข่ไก่. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. นานาสาระเกษตร. [เข้าถึงเมื่อ 18 กรกฎาคม 2558]; สืบค้นจาก:[http://nanasarakaset.blogspot.com/2012/03/blog-post\\_06.html](http://nanasarakaset.blogspot.com/2012/03/blog-post_06.html)
16. ศันสนีย์ อุดมอ่าง. การพัฒนาตำรับอาหารจากไข่ไก่เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์ระดับชุมชนและเชิงพาณิชย์. [งานวิจัย]. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์; 2555.
17. Chantiratikul A, Poonpan P, Santhaweesuk S, Chantiratikul P, Sangdee A, Maneechote U, et al. Effect of wolffia meal [*Wolffia globosa* (L). Wimm.] as a dietary protein replacement on performance and carcass characteristics in broilers. International Journal of Poultry Science. 2010;9:664-668.
18. อาณัติ จันทรธิระติกุล. การผลิตและการใช้ไข่ไก่เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ปีก. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; 2553.
19. บุญทิศา ซาดิซานี. การบำบัดน้ำเสียฟาร์มสุกรโดยใช้ไข่ไก่เพื่อเป็นอาหารเสริมเลี้ยงสัตว์. [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2555.
20. สุภวรรณ์ สุธีพรวิโรจน์. เปิดโลกเขียวมะกอก คณะเภสัชศาสตร์ มช. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ [updated 13 Jul 2015; เข้าถึงเมื่อ 18 กรกฎาคม 2558]; สืบค้นจาก: <http://www.pharmacy.cmu.ac.th/web2553/n41.php>
21. Plerchai T, Gassinee T, Payom A, Boonma N, Karuna W. Antioxidant activity of northern and northeastern thai foods containing indigenous vegetables. Kasetsart J. 2006;40:47-58.
22. จินดาวลัย วิบูลย์อุทัย, ธีรรัตน์ สมดี, จิรภา เพชรสม. International and national Conference For The Sustainable Community Development เรื่องการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในอาหารพืชผักพื้นบ้านที่ปรุงสำเร็จ. วันที่ 16-19 กุมภาพันธ์ 2555.
23. ขวัญดาว แจ่มแจ่ม. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านในจังหวัดกำแพงเพชร. Rajabhat J. Sci. Humanit. Soc. Sci. 2552;13(2):32-41.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

24. Nini W, Yang F, Tao Y, Guoyou L, Hai Z. Chemical constituents of *Wolffia globosa*. Chin J Appl Environ Biol. 2014;20(6):1016-1019.
25. Kotowska U, Piotrowska A, Isidorova Anastasija G, Bajguz A, Isidorov Valery A. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of the aquatic plant *Wolffia arrhiza*. Oceanol Hydrobiol St. 2013;42:181-187.
26. รัตนา อินทรานุปกรณ์. สารสกัดจากสมุนไพรรวม การเตรียม และการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: บริษัทจามจุรีโปรดักส์ จำกัด; 2556.
27. รัชณี ตัณฑะพานิชกุล. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 3 (CM328). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2550. 33-40.
28. ปนัดดา พัฒนาศิน. รงคเลขผิบบาง (thin layer chromatography) การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ วิทยาเขตรังสิต. 2550.
29. อ้อมบุญ วัลลิสุต และ ปองทิพย์ สิทธิสาร. หลักการวิเคราะห์พิษเคมีในสมุนไพรร่วมด้วยเทคนิคที่แอลซีและทีแอลซีสมรรถนะสูง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: พีเอส.พรินท์; 2556.
30. ชिरดา สุขธรรม. การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยด้วย chromatographic Fingerprints. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ [วารสารออนไลน์]. มกราคม 2557;62(194): สืบค้นจาก: [http://lib3.dss.go.th/fulltext/dss\\_j/2557\\_62\\_194\\_P10-12.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/dss_j/2557_62_194_P10-12.pdf) [เข้าถึง 18 กรกฎาคม 2558]
31. Mabinya LV, Mafunga T, Brand JM. Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography. Afr J Biotechnol. 2006;5:1271-1273.
32. Boukes GJ, Venter MV, Oosthuizen V. Quantitative and qualitative analysis of sterols/sterolins and hypoxoside contents of three Hypoxis (African potato) spp. Afr J Biotechnol. 2008;7:1624-1629.
33. Mittal S. Thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography profiling of plant extracts of *Viola Odorata* Linn. Biotechnology. 2013;4(1):542-549.
34. บัญชา พูลโกคา. สเปกโตรสโกปีและการพิสูจน์ทราบโครงสร้างสาร [หนังสือออนไลน์]. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [เข้าถึงเมื่อ 22 พฤษภาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก: [http://chemistry.sc.chula.ac.th/course\\_info/2302265/spectro.pdf](http://chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302265/spectro.pdf).

### บรรณานุกรม (ต่อ)

35. ชิตีมา รุกขไชยศิริกุล. เคมีอินทรีย์ 2 Organic Chemistry II CH 323 [หนังสือออนไลน์]. กรุงเทพมหานคร: 2541 [เข้าถึงเมื่อ 22 พฤษภาคม 2560]. เข้าได้ถึงจาก มหาวิทยาลัยรามคำแหง e-book <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CH323/ch323-8.pdf>
36. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci.* 2010;58(2):85-90.
37. Pouillot A, Polla Luigi L, Tacchini P, Neequaye A, Polla A. Natural antioxidants and their effects on the skin. In: Dayan Nava, Kromidas Lambros, editors. *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products.* John Wiley & Sons; 2011. pp. 239-257.
38. Anand T, Mahadeva N, Kumar G, Farhath K. Antioxidant and DNA Damage Preventive Properties of *Centella asiatica* (L) Urb. *Phcog J.* 2010;2:53-58.
39. Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, et al. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur J Pharmacol.* 2011;650(1):130-137.
40. Magdalena Zdybel and Barbara Pilawa (2014). Application of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy in Ophthalmology, *Ophthalmology - Current Clinical and Research Updates*, Associate Prof. Pinakin Davey (Ed.), InTech, Available from: <https://www.intechopen.com/books/ophthalmology-current-clinical-and-research-updates/application-of-electron-paramagnetic-resonance-spectroscopy-in-ophthalmology>
41. พีรยุทธ สิทธีไชยากุล. Acute and chronic inflammation. ใน: เอกสารประกอบการสอน วิชาหลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ [หนังสืออิเล็กทรอนิกส์]. พิษณุโลก: ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [เข้าถึงเมื่อ 22 พฤษภาคม 2560] เข้าถึงได้จาก: <http://www.medded.nu.ac.th/backoffice/attachments/ACUTE%20AND%20CHRONIC%20INFLAMMATION.pdf>.
42. สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์. การอักเสบและการซ่อมแซม [เอกสารออนไลน์]. เชียงใหม่ [เข้าถึงเมื่อ 22 พฤษภาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.med.cmu.ac.th/dept/patho/Lecture/07-09-inflammation&repair-text.pdf>.
43. Bruch DG, Ruzicka T, Kolb KB. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol.* 1998 Jan; 110(1):1-7.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

44. Wallace JL. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Mar;100:5-9.
45. กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. [เอกสารประกอบการเรียน]. คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
46. เบญจมาศ จิตรสมบุรณ์. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. [งานวิจัย]. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี; 2553.
47. Borra RC, Lotufo MA, Gaglioti SM, Barros FM, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. Braz Oral Res. 2009;23(3):55-62.
48. พิมพ์ สีสภาพสิริฐ. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2540.
49. Alhakmani F, Kumar S, Khan SA. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(8):623-627.
50. Torres-Rodríguez ML, García-Chávez E, Berhow M, de Mejia EG. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2016;188:266-274.
51. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 2000;267:5421-5426.
52. GÜLÇİN İ , KİREÇCİ E, AKKEMİK E, TOPAL F, HİSAR O. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). Turk J Biol. 2010;34:175-188.
53. Jeon H. Anti-inflammatory and radical scavenging effects of *Spirodela polyrrhiza*. Natural Product Sciences. 2010;16(2):111-115.
54. Hasan MR, Chakrabarti R. Floating aquatic macrophytes–Duckweeds. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. 2009:29-51.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

55. Pierre LL, Moses MN. Isolation and characterisation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). JIPBS. 2015;2(1):88-95.
56. Kamboj A, Saluja AK. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). Int J Pharm Pharm Sci. 2011;3(1):94-96.
57. Parvin S, Kader A, Muhit A, Haque E, Mosaddik A, Wahed II. Triterpenoids and phytosteroids from stem bark of *Crataeva nurvala* buch ham. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011;01(09):47-50.
58. Ahmed Y, Rahman S, Akhtar P, Islam F, Rahman M, Yaakob Z. Isolation of steroids from n-hexane extract of leaves of *Saurauia roxburghii*. IFRJ. 2013;20(5):2939-2943.
59. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556;3:275-286.
60. Daduang J, Vichitphan S, Daduang S, Hongsprabhas P, Boonsiri P. High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activity. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2011;5(5):608-615.
61. Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor  $\alpha$  and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. J. Exp Med. 1993;177:511-516.
62. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. Sensors. 2003;3:276-284.
63. Saeidnia S, Manayi A, Gohari AR, Abdollahi M. The story of beta-sitosterol- A review. European Journal of Medicinal Plants. 2014;4(5):590-608.
64. Jung YY, Hong JT, Han SB, Park YH, Son DJ. Effect of *Ixeris dentate* Nakai extract on nitric oxide production and prostaglandin E2 generation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Immune Netw. 2015;15(6):325-330.



**บรรณานุกรม (ต่อ)**

65. Ifeoma O, Oluwakanyinsola S. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities. In: Sivakumar Gowder, editors. New Insights into Toxicity and Drug Testing [electronic book]. InTech; 2013. DOI:10.5772/54493. [cited 2016 June 10]. Available from:<https://www.intechopen.com/books/new-insights-into-toxicity-and-drug-testing/screening-of-herbal-medicines-for-potential-toxicities>.
66. สุวรรณมา เจริญอักษร. การทดสอบด้านพิษวิทยาด้วยวิธีทางเลือก. ว กรมวิทย์ พ 2558; ฉบับพิเศษ 3:337-350.
67. Intarat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. J Ethnopharmacol. 2004;90:33-38.
68. Bajaj S, Singla D, Sakhuja N. Stability test of pharmaceutical products. Journal of applied pharmaceutical science. 2012;02(03):129-138.
69. ชिरดา สุขธรรม. การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยด้วย chromatographic fingerprints. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2557;194:10-12.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นางสาวสุพรรณิ ทิพนี
วัน เดือน ปีเกิด	14 สิงหาคม 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	31/1 หมู่ที่ 10 ตำบลป่าไผ่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50210
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ไบโอเทค) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2550 General staff MCDONALD'S BY NOWAK ENTERPRISE INC.
พ.ศ. 2551	Cashier BUR/MAC, WILDWOOD.
พ.ศ. 2551	นักวิชาการ ศูนย์วิจัยพืชสวนลำปาง
พ.ศ. 2554 – 2555	นักวิชาการ และ ประชาสัมพันธ์โครงการ ศูนย์วิชาการ RAC สาขาสำโรง
พ.ศ. 2555 – 2556	พนักงานประสานงานลูกค้า ฝ่ายขาเข้า (CSQ) บริษัท ดีเอสแอล เอ็กเพรส (ประเทศไทย) จำกัด