

รายงานการวิจัย

ทุนวิจัย เงินงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2549-2550



ชุดโครงการวิจัย

การพัฒนาสารต้าน HIV และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากมะหาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้อำนวยการโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ

ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดโครงการวิจัย การพัฒนาสารต้าน HIV และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากมะหาด
ประกอบด้วยโครงการวิจัย 4 โครงการดังนี้

- โครงการวิจัยที่ 1 การพัฒนาวิธีสกัดแยกสารออกซิเรสเวอราทอลจากแก่นมะหาด
หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สัมพันธ์ วงศ์เสรีพัฒนา
รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรัมย์
อาจารย์ ดร. บุญชู ศรีตุลาภักย์
- โครงการวิจัยที่ 2 ข้อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวชของมะหาด
หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรัมย์
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ
- โครงการวิจัยที่ 3 การศึกษาการเตรียมและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์จากสาร
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติออกซิเรสเวอราทอรอล
หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ
- โครงการวิจัยที่ 4 การวิจัยประโยชน์ทางเครื่องสำอางของสารสกัดจากแก่นมะหาด
หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อติศักดิ์ วงศ์ขจรศิลป์
รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ

เลขหมู่

เลขทะเบียน 014027

วัน, เดือน, ปี 11 ก.พ. 52

กิตติกรรมประกาศ

ชุดโครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาทางด้าน HIV และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากมะหาด ซึ่งเป็นประกอบด้วยทั้งส่วนที่เป็นการวิจัยพื้นฐาน (basic research) และส่วนที่เป็นการวิจัยประยุกต์ (applied research) ในสาขาวิทยาศาสตร์เคมี และเภสัช ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เป็นเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2548 และปีงบประมาณ 2549 เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 2 ปี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้กรุณาจัดสรรงบประมาณสำหรับชุดโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้กรุณาให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ได้แก่สถานที่ทำงาน ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือสำหรับการวิจัย ตลอดจนอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องอย่างยิ่ง ทำให้ชุดโครงการวิจัยนี้สามารถดำเนินการจนสำเร็จไปได้ด้วยดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทสรุปรวม

ชุดโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการวิจัย 4 โครงการ โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือ (1) พัฒนาวิธีสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด (2) จัดทำข้อกำหนดทางเภสัชเวชของมะหาด (3) คัดแปลงโครงสร้างออกซิเรสเวอราทรอลเพื่อมีฤทธิ์ต้าน HIV สูงขึ้น และ (4) ศึกษาสารสกัดแก่นมะหาดในแง่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ผลต่อเซลล์ fibroblast ผลต่อเอนไซม์ collagenase และประสิทธิภาพในการลดริ้วรอยผิวหนัง แต่ละโครงการได้ดำเนินการแล้วเสร็จโดยมีรายละเอียดในรายงานวิจัยแต่ละโครงการ

ในภาพรวมกล่าวสรุปได้ว่าแก่นมะหาดซึ่งมีสารสำคัญคือ oxyresveratrol มีศักยภาพที่เด่นชัด เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป ส่วนการพัฒนาเป็นยาด้านไวรัสจากสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาดนั้น ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 ความสำคัญและที่มาของแผนงานวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (reviewed literature)

มะหาด เป็นไม้ยืนต้น จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae ในคำราชาไทยใช้ประโยชน์เป็นยาถ่ายพยาธิ โดยชาวบ้านจะนำแก่นมะหาดมาต้มในน้ำเดือด แล้วดักเอาสิ่งที่ลอยบนผิวน้ำมาเก็บรวมกัน ทำให้แห้งจะได้สิ่งสกปรกที่เรียกว่า “ปวกหาด” ซึ่งนำมาเข้าตำรับยา มีสรรพคุณถ่ายพยาธิ (1) ศาสตราจารย์ ดร. ศตางค์ มงคลสุข ได้วิจัยพบว่าสารหลักในแก่นมะหาดคือ 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene หรือ oxyresveratrol (2) มีผู้รายงานว่าในปวกหาดพบว่ามีปริมาณ oxyresveratrol สูงมากถึงประมาณร้อยละ 70 (3) ผลการทดลองปวกหาดในคนฮินฮันดูร์ด้วยพยาธิตัวตืด *Taenia saginata* โดยมี oxyresveratrol เป็นสารสำคัญ (4, 5) โดยมีเพียงผู้ป่วยบางคนที่มีอาการแพ้ (allergic) เล็กน้อย (4) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแหลมคมของภูมิปัญญาไทย นอกจากนี้ได้มีการศึกษาขนาดปวกหาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ (5) ต่อมาได้มีรายงานการศึกษา pharmacokinetics ของสาร oxyresveratrol ในอาสาสมัครอีกด้วย (7) ในปี พ.ศ. 2541 กลุ่มวิจัยซึ่งประกอบด้วยกิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วูฒิ และวันชัย คีเอกนามกุล ได้ร่วมกันพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ของสิ่งสกปรกพืช และสารบริสุทธิ์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเมลานินของคนและสัตว์ กลุ่มวิจัยนี้ได้พบว่า สาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (8, 9, 10) สารนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารสำคัญในเครื่องสำอาง ช่วยให้ผิวขาวได้ ในเวลาต่อมา กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วูฒิ และภาคภูมิ เต็งอำนวยการได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่าปวกหาดซึ่งมี oxyresveratrol เป็นสารหลัก มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในผิวหนังสัตว์ (11) และคน (12) ได้ดี ต่อมา กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วูฒิ และวิมลมาศ ลิปิพันธ์ พบว่า สาร oxyresveratrol ที่สกัดได้จากมะหาดนั้น ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus ซึ่งเป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเริมอีกด้วย (13) ในรายงานการวิจัยล่าสุด กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วูฒิ พบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ยับยั้ง human immune deficiency virus (HIV) ได้ในระดับปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อ host cells (14) สอดคล้องกับรายงานฤทธิ์ยับยั้ง HIV ของสารสังเคราะห์ CGA137053 ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น stilbene เช่นเดียวกัน (15) จากข้อมูลดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า สาร oxyresveratrol จากมะหาดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างน้อย 3 ประการ ได้แก่ (ก) เป็นสารสำคัญในยาถ่ายพยาธิ (ข) สารสำคัญใน skin whitening preparation และ (ค) มีฤทธิ์ anti-viral โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้าน HIV ซึ่งมีศักยภาพที่อาจนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น (starting material) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาด้าน HIV ค่อยไปได้อีกด้วย ดังนั้น

การวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากมะหาด หรือปวกหาดจึงอาจนำไปสู่การผลิตสินค้าที่มีมูลค่าสูงขึ้นกว่าเดิมมาก จนอาจส่งผลให้มะหาดกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของบ้านเรา

2. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย
 - 2.1 เพื่อพัฒนาวิธีสกัดสารบริสุทธิ์ oxyresveratrol จากแก่นมะหาด ที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด
 - 2.2 เพื่อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวชของมะหาด สำหรับใช้ประโยชน์ในประเทศ และเพื่อการส่งออก
 - 2.3 เพื่อเตรียมอนุพันธ์ของ oxyresveratrol ซึ่งสกัดจากแก่นมะหาดและศึกษาฤทธิ์ต้าน HIV ของอนุพันธ์ที่เตรียมได้
 - 2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาดในการต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระ การกระตุ้นการแบ่งตัวและ/หรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ผิวหนัง ตลอดจนความปลอดภัย และประสิทธิภาพของตัวรับเครื่องสำอางที่มีสารสกัดจากแก่นมะหาด
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 3.1 วิธีสกัดที่พัฒนาขึ้นมา สามารถนำไปเผยแพร่สู่ภาคเอกชนที่สนใจ เพื่อการผลิตสาร oxyresveratrol เจริญพาณิชย์
 - 3.2 มาตรฐานทางเภสัชเวชของมะหาดจะสามารถใช้เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรดังกล่าว ทั้งที่ผลิตใช้ในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ
 - 3.3 อนุพันธ์ของ oxyresveratrol ที่เตรียมได้ ถ้ามีฤทธิ์ต้าน HIV เพิ่มขึ้น อาจนำมาพัฒนาเป็นยาต้านไวรัสเอดส์ได้
 - 3.4 ผลการวิจัยของสิ่งสกัดมะหาดในการต้านอนุมูลอิสระ การกระตุ้นการแบ่งตัวหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ผิวหนัง และฤทธิ์ชะลอความแก่ของสิ่งสกัดมะหาด จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ช่วยเพิ่มมูลค่าของมะหาด เนื่องจากคุณค่าในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งภาคเอกชนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

เอกสารอ้างอิง (references)

- (1) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ อมรินทร์พรินดี กวีพ จำกัฒ กรุงเทพมหานคร 2535 หน้า 57
- (2) Mongkolsuk, S., Alexander, R. and Towers, R. (1957) 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. *J. Chem. Soc.* , 2231-2233.

- (3) Poopyruchpong, N., Rungruangsak, K., Nimmanpisut, S., Panjipan, B. and Ratanabanangkoon, K. (1978) Some physico-chemical properties of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene. J. Sci. Soc. Thailand 4: 163-167.
- (4) Manmontri, M. (1949) Report on the anthelmintic activity of Puag-Haad against tape-worm. J. Med. Assoc. Thailand 32 (6): 1-9.
- (5) Sambhandharaksa, C., Tantivatana, P., Ratanachai, T. (1965) Pharmacognistical and phytochemical studies of *Artocarpus lakoocha* Roxb. J. Natl. Res. Council Thailand 3: 68-78.
- (6) Charoenlarp, P., Radomyos, P. and Bunnag, D. (1989) The optimum dose of Puag-Haad in the treatment of Taeniasia. J. Med. Assoc. Thailand 72 (2): 71-73.
- (7) Tanunkat, A. (1990) Absorption, metabolism and excretion of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene in volunteers after oral administration of purified extract of Puag-Haad. Master's thesis. Faculty of Mahidol University.
- (8) Sritularak, B., De-Eknamkul, W. and Likhitwitayawuid, K. (1998) Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai J. Pharm. Sci. 22 (4): 149-155.
- (9) Likhitwitayawuid, K. and De-Eknamkul, W. (2000) Final report on tyrosinase inhibitors from plants. The Asahi Glass Foundation.
- (10) Likhitwitayawuid, K. (2002) Tyrosinase inhibitors from plants. Proceedings of the tenth special CU-af seminar on material science and medicinal plants: technologies for the future. May 31, 2002, Chulalongkorn University, Bangkok. Pp. 115-140.
- (11) Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K. and Likhitwitayawuid, K. A potent tyrosinase inhibitor from *Artocarpus lakoocha* heartwood extract: comparative evaluation of its melanin-reducing efficacy in guinea pigs and humans. Proceedings of 2003 IFCC Conference "Cosmetics: where science meets dream." September, 22-24, 2003, pp. 201-212.
- (12) Pheansri, I. (2001) Evaluation of skin whitening effect of *Artocarpus lakoocha* extract, nicinamide, lactic acid, tranexamic acid and their combinations in guinea pigs and human volunteers. Master's thesis, Chulalongkorn University, Bangkok.

- (13) Lihitwitayawuid, K., Sritularak, B., Mathew, J. and Schinazi, R.F. (2003) Anti-HIV activity and cytotoxicity of stilbenes from *Artocarpus lakoocha* and *Dracaena loureiri*. *Thai J. Pharm.* 27: 79.
- (14) Lihitwitayawuid, K., Sritularak, B., Mathew, J. and Schinazi, R.F. (2003) Anti-HIV activity and cytotoxicity of stilbenes from *Artocarpus lakoocha* and *Dracaena loureiri*. Proceedings of the sixth joint seminar of JSPS-NRCT core university system on natural medicine in pharmaceutical sciences: recent advances in natural medicine research, December, 2-4, 2003, Bangkok. P. 137.
- (15) Hamy, F., Gelus, N., Zeller, M., Lazdins, J., Baily, C. and Klimkait, T. (2000) Blocking HIV replication by targeting Tat protein. *Chem. Biol.* 7: 669-676.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 1

การพัฒนาวิธีสกัดแยกสารออกซิเรสเวอราทอลจากแก่นมะหาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูวฒิ
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สัมพันธ์ วงศ์เสรีพัฒนา
รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี อาจารย์ ดร. บุญชู ศรีคุณรักษ์

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

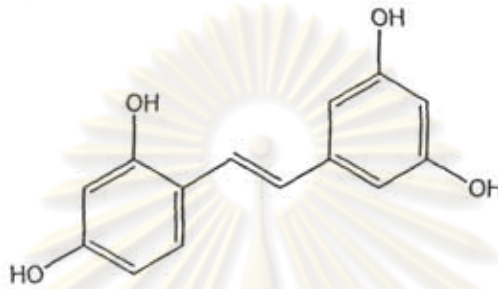
การศึกษาวิธีสกัดแยกสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด ในเบื้องต้นได้เปรียบเทียบวิธีสกัด 4 วิธี ได้แก่ reflux, soxhlet, sonication และ maceration และใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ EtOH, acetone และ EtOAc รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสิ่งสกัดของแต่ละวิธี ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าวิธีสกัดที่ให้ปริมาณ oxyresveratrol สูงสุดคือวิธี Soxhlet/EtOH ต่อมาได้ศึกษาวิธีแยกเอาสาร oxyresveratrol จากสิ่งสกัดโดยวิธี vacuum liquid chromatography (VLC) และ medium pressure liquid chromatography (MPLC) โดยใช้ stationary phase คือ SiO_2 , Al_2O_3 และ Kieselguhr และ mobile phase คือ MeOH, EtOH และ CH_2Cl_2 พบว่าวิธี VLC/ Al_2O_3 /EtOH- CH_2Cl_2 เป็นระบบที่ใช้แยกเอาสาร oxyresveratrol จากสิ่งสกัดได้ดี ส่วนวิธี MPLC/ SiO_2 /MeOH- CH_2Cl_2 เป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งแยกเอาสาร oxyresveratrol ได้ดี อย่างไรก็ตามยังพบว่าสามารถนำสิ่งสกัดมาแยกเอาสาร oxyresveratrol โดยวิธีคกผลึกในตัวทำละลายที่เหมาะสม นับเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัด มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการสกัดแยกสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำกรวิจัย

มะหาดเป็นไม้ยืนต้น จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae ในตำรายาไทยใช้ประโยชน์เป็นยาถ่ายพยาธิ โดยชาวบ้านจะนำแก่นมะหาดมาต้มในน้ำเดือด แล้วดักเอาสิ่งที่ลอยบนผิวน้ำมาเก็บรวมกัน ทำให้แห้งจะได้สิ่งสกปรกที่เรียกว่า “ปวกหาด” ซึ่งนำมาเข้าตำรับขามีสรรพคุณถ่ายพยาธิ (1) ศาสตราจารย์ ดร. ศตางค์ มงคลสุข ได้วิจัยพบว่าสารหลักในแก่นมะหาดคือ 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene หรือ oxyresveratrol (2) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างสาร oxyresveratrol

ในปวกหาดได้มีรายงานว่ามียุทธิมาณ oxyresveratrol ประมาณร้อยละ 70 (3) ผลการทดลองปวกหาดในคนขึ้นชั้นฤทธิ์ถ่ายพยาธิตัวตืด *Taenia saginata* โดยมี oxyresveratrol เป็นสารสำคัญ (4, 5) โดยมีเพียงผู้ป่วยบางคนที่มีอาการแพ้ (allergic) เล็กน้อย (4) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแหลมคมของภูมิปัญญาไทย นอกจากนี้ได้มีการศึกษาขนาดปวกหาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ (5) ต่อมาได้มีรายงานการศึกษา pharmacokinetics ของสาร oxyresveratrol ในอาสาสมัครอีกด้วย (7) ในปีพ.ศ. 2541 กลุ่มวิจัยซึ่งประกอบด้วยกิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูยาตุมิ บุญชูศรีตุลาภักษ์ และวันชัย ตีเอกนามกุล ได้ร่วมกันพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ของสิ่งสกปรกพืชและสารบริสุทธิ์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และได้พบว่า สาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาดมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (8-10) ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเมลานินของคนและสัตว์ สารนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารสำคัญในเครื่องสำอางช่วยให้ผิวขาวได้ ในเวลาต่อมา กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูยาตุมิ ร่วมกับภาคภูมิ เต็งอำนวย ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่าปวกหาดซึ่งมี oxyresveratrol เป็นสารหลัก มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในผิวหนังสัตว์ (11) และคน (12) ได้ดี การศึกษาโดยกิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูยาตุมิ และวิมลมาศ ลิปิพันธ์ ในเวลาต่อมาพบว่า สาร oxyresveratrol ที่สกัดได้จากมะหาดนั้น ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus ซึ่งเป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเริมอีกด้วย (13) ในรายงานการวิจัยล่าสุด กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูยาตุมิ และคณะพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ยับยั้ง human immune deficiency virus (HIV) ได้ในระดับปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อ host cells (13) สอดคล้องกับรายงานฤทธิ์ยับยั้ง HIV ของสารสังเคราะห์ CGA137053 ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น stilbene เช่นเดียวกัน (14) จาก

ข้อมูลดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า สาร oxyresveratrol จากมะหาดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างน้อย 3 ประการ ได้แก่

- (1) สารสำคัญในยาถ่ายพยาธิ
- (2) สารสำคัญใน skin whitening preparation
- (3) สารต้านไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้าน HIV ซึ่งมีศักยภาพที่อาจนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น (starting material) เพื่อนำพัฒนาเป็นยาด้าน HIV ต่อไปได้อีกด้วย

ดังนั้นการวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากมะหาด หรือปวกหาดจึงอาจนำไปสู่การผลิตสินค้าที่มีมูลค่าสูงขึ้นกว่าเดิมมาก จนอาจส่งผลให้มะหาดกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของบ้านเรา อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการศึกษาพัฒนาสาร oxyresveratrol ต่อไปไม่ว่าจะเป็นการศึกษาพื้นฐานหรือการวิจัยประยุกต์เพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์และเชิงอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้สาร oxyresveratrol บริสุทธิ์ในปริมาณมากพอควร จึงมีความชัดเจนว่ามีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีสกัด oxyresveratrol จากแก่นมะหาดให้ได้ในรูปของสารบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้สารในปริมาณสูง โดยมีค่าใช้จ่ายต่ำ

เอกสารอ้างอิง

- (1) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ อมรินทร์พรินต์ติ้งกรุ๊ป จำกัด กรุงเทพมหานคร 2535 หน้า 57
- (2) Mongkolsuk, S., Alexander, R. and Towers, R. (1957) 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. *J. Chem. Soc.* , 2231-2233.
- (3) Poopyruchpong, N., Rungruangsak, K., Nimmanpisut, S., Panjipan, B. and Ratanabanangkoon, K. (1978) Some physico-chemical properties of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene. *J. Sci. Soc. Thailand* 4: 163-167.
- (4) Manmontri, M. (1949) Report on the anthelmintic activity of Puag-Haad against tape-worm. *J. Med. Assoc. Thailand* 32 (6): 1-9.
- (5) Sambhandharaksa, C., Tantivatana, P., Ratanachai, T. (1965) Pharmacognostical and phytochemical studies of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *J. Natl. Res. Council Thailand* 3: 68-78.
- (6) Charoenlarp, P., Radomyos, P. and Bunnag, D. (1989) The optimum dose of Puag-Haad in the treatment of Taeniasia. *J. Med. Assoc. Thailand* 72 (2): 71-73.
- (7) Tanunkat, A. (1990) Absorption, metabolism and excretion of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene in volunteers after oral administration of purified extract of Puag-Haad. Master's thesis. Faculty of Mahidol University.

- (8) Sritularak, B., De-Eknamkul, W. and Likhitwitayawuid, K. (1998) Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. *Thai J. Pharm. Sci.* **22** (4): 149-155.
- (9) Likhitwitayawuid, K. and De-Eknamkul, W. (2000) Final report on tyrosinase inhibitors from plants. The Asahi Glass Foundation.
- (10) Likhitwitayawuid, K. (2002) Tyrosinase inhibitors from plants. Proceedings of the tenth special CU-af seminar on material science and medicinal plants: technologies for the future. May 31, 2002, Chulalongkorn University, Bangkok. Pp. 115-140.
- (11) Tengamnuay, P. Pengrungruangwong, K. and Likhitwitayawuid, K. A potent tyrosinase inhibitor from *Artocarpus lakoocha* heartwood extract: comparative evaluation of its melanin-reducing efficacy in guinea pigs and humans. Proceedings of 2003 IFCC Conference "Cosmetics: where science meets dream." September, 22-24, 2003, pp. 201-212.
- (12) Pheansri, I. (2001) Evaluation of skin whitening effect of *Artocarpus lakoocha* extract, nicinamide, lactic acid, tranexamic acid and their combinations in guinea pigs and human volunteers. Master's thesis, Chulalongkorn University, Bangkok.
- (13) Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Benchanak, K., Lipipun, V., Mathew, J., and Schinazi, R.F. (2005) Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat. Prod. Res.* **19**: 177-182.
- (14) Hamy, F., Gelus, N., Zeller, M., Lazdins, J., Baily, C. and Klimkait, T. (2000) Blocking HIV replication by targeting Tat protein. *Chem. Biol.* **7**: 669-676.

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด โดยเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด รวดเร็ว และให้ได้สารในปริมาณมาก และมีความบริสุทธิ์สูง

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างพืช

3.1.1 การเก็บตัวอย่างพืชสด

- 3.1.1.1 ได้เดินทางไปสำรวจหาแหล่งพืชมะหาดและเก็บตัวอย่าง ที่จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนตุลาคม 2547 ทำการศึกษา botanical morphology ของพืช และ thin layer chromatography ของสิ่งสกัด MeOH ที่เตรียมจากตัวอย่างเพื่อยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างพืช โดยใช้สาร oxyresveratrol เป็นสารอ้างอิง
- 3.1.1.2 ได้เดินทางไปสำรวจหาแหล่งพืชมะหาดและเก็บตัวอย่าง ที่จังหวัดระยองในเดือนพฤษภาคม 2548 ทำการศึกษา botanical morphology และ thin layer chromatography ของสิ่งสกัด MeOH ที่เตรียมจากตัวอย่างเพื่อยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างพืช โดยใช้สาร oxyresveratrol เป็นสารอ้างอิง
- 3.1.2 การเก็บตัวอย่างพืชแห้ง
- 3.1.2.1 ได้จัดซื้อแก่นมะหาดจากร้านยาสมุนไพร ในเดือน ตุลาคม 2548 ตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่างด้วยวิธี thin-layer chromatography ของสิ่งสกัด MeOH ที่เตรียมจากตัวอย่าง โดยใช้สาร oxyresveratrol เป็นสารอ้างอิง
- 3.1.2.2 ได้เดินทางไปสำรวจและเก็บตัวอย่างแห้งซึ่งหมอบนบ้านได้ตัดไว้สำหรับทำปวกหาด ที่จังหวัดเข็ขงราช ในเดือนมกราคม 2550 ทำการศึกษา thin layer chromatography ของสิ่งสกัด MeOH ที่เตรียมจากตัวอย่างเพื่อยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างพืช โดยใช้สาร oxyresveratrol เป็นสารอ้างอิง

3.2 การสกัดและแยกสาร oxyresveratrol

3.2.1 ตัวอย่างพืชสด

การสกัดและแยกสาร oxyresveratrol จากตัวอย่างพืชสดมีความไม่สะดวกในทางปฏิบัติหลายประการ ได้แก่การเดินทางไปยังแหล่งพืช การพักแรม การเก็บตัวอย่างพืชในปริมาณมาก และการขนส่งตัวอย่างพืชสดมายังห้องปฏิบัติการเพื่อดำเนินการสกัดทันที ขั้นตอนเหล่านี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งงบประมาณในการวิจัยไม่เพียงพอ ดังนั้นการวิจัยในส่วนนี้จึงเป็นการสำรวจแหล่งพืชเท่านั้น

3.2.2 ตัวอย่างพืชแห้ง

ใช้แก่นมะหาดซึ่งจัดซื้อจากร้านยาสมุนไพร โดยได้แบ่งงานวิจัยออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

- (1) การศึกษาวิธีการเตรียมสิ่งสกัด
- (2) การศึกษาวิธีแยกเอาสารบริสุทธิ์ oxyresveratrol จากสิ่งสกัด

การศึกษาวิธีการเตรียมสิ่งสกัด

การเตรียมสิ่งสกัดจากแก่นมะหาดทำเป็น 4 วิธีคือ (1) reflux (2) soxhlet (3) sonication และ (4) maceration หลังจากนั้นนำสิ่งสกัดที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี ไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

(1) วิธี reflux

เป็นวิธีสกัดโดยใช้ความร้อนโดยตรง ที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลาย ประกอบด้วย 3 การทดลอง ในตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิดคือ EtOAc, acetone และ EtOH ในปริมาณอย่างละ 300 ml ในแต่ละการทดลองใช้แก่นมะหาด (ร้านขายยา) 40 กรัม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำสิ่งสกัดที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณ oxyresveratrol โดยวิธี HPLC

(2) วิธี soxhlet

เป็นวิธีสกัดโดยใช้ความร้อนโดยอ้อม ที่อุณหภูมิใกล้จุดเดือดของตัวทำละลาย ประกอบด้วย 3 การทดลอง ในแต่ละการทดลองในตัวทำละลายต่างกันคือ EtOAc, acetone และ EtOH ในปริมาณอย่างละ 300 ml ใช้แก่นมะหาด 40 กรัม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำสิ่งสกัดที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณ oxyresveratrol โดยวิธี HPLC

(3) วิธี sonication

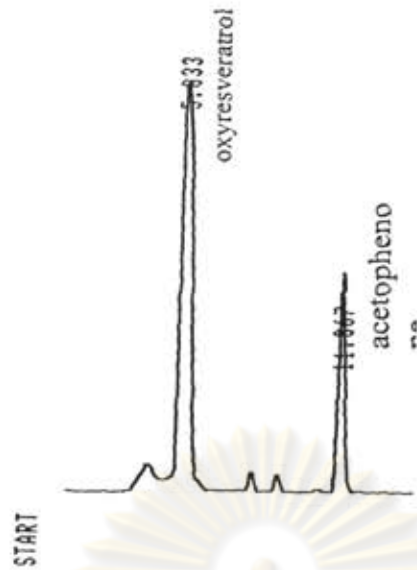
เป็นวิธีสกัดโดยไม่ใช้ความร้อน แต่อาศัยการสั่นสะเทือนใน sonicator ขนาดกำลัง 35 kHz ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27 – 30°C) ประกอบด้วย 3 การทดลอง ในตัวทำละลายต่างกันคือ EtOAc, acetone และ EtOH ในปริมาณอย่างละ 300 ml ในแต่ละการทดลองใช้แก่นมะหาด 40 กรัม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำสิ่งสกัดที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณ oxyresveratrol โดยวิธี HPLC

(4) วิธี maceration

เป็นวิธีสกัดโดยไม่ใช้ความร้อน ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27 – 30°C) ประกอบด้วย 3 การทดลอง ในตัวทำละลายต่างกันคือ EtOAc, acetone และ EtOH ในปริมาณอย่างละ 300 ml ในแต่ละการทดลองใช้แก่นมะหาด 40 กรัม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) นำสิ่งสกัดที่ได้จากแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณ oxyresveratrol โดยวิธี HPLC

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol โดยใช้ HPLC

ใช้เครื่อง Shimadzu high pressure liquid chromatograph ซึ่งประกอบด้วย Shimadzu LC-10AD pump เชื่อมต่อกับ Shimadzu SPD-10A detector (ที่ λ 254 nm) โดยบันทึก chromatogram ด้วย Shimadzu C-RG8 Chromatopac คอลัมน์ใช้ Phenomenex hyperclone reverse-phase C-18 column ขนาด 5 μ m 150 × 4.5 mm ส่วนตัวทำละลายใช้ 10% H₂O in MeOH อัตราไหล 0.3 ml/min ในลักษณะ isocratic elution ใช้ acetophenone เป็น internal standard โดย oxyresveratrol มี retention time ประมาณ 5 - 6 นาที



ตารางที่ 1 น้ำหนักสิ่งสกัดและปริมาณสาร oxyresveratrol

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสิ่งสกัด (กรัม)	ปริมาณ oxyresveratrol คิดเป็น ร้อยละของแก่นมะหาด
1. Reflux	EtOH	4.042	3.59
	Acetone	2.25	4.52
	EtOAc	1.44	3.23
2. Soxhlet	EtOH	4.06	5.42
	Acetone	2.15	3.79
	EtOAc	1.37	2.19
3. Sonication	EtOH	2.23	4.03
	Acetone	0.97	2.00
	EtOAc	1.82	4.24
4 Maceration	EtOH	1.87	3.07
	Acetone	1.58	2.98
	EtOAc	0.92	2.21

การศึกษาวิธีแยกเอาสารบริสุทธิ์ oxyresveratrol จากสิ่งสกัด

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแยกสาร oxyresveratrol แบบต่างๆ

1 Chromatography

นำแก่นมะหาด 2 กิโลกรัม (ร้านขายยา) มาบดเป็นผงหยาบ แล้วแช่สกัดด้วย ethanol จำนวน 20 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน กรองเอาชั้น ethanol เก็บไว้ ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง นำชั้น ethanol ทั้งหมดมารวมกัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก โดยวิธีลดความดันอากาศที่อุณหภูมิ 40°C ได้สิ่งสกัดหยาบ 120 กรัม แล้วนำมาแยกเอาสาร oxyresveratrol โดยวิธี chromatography ดังนี้

1.1 Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

ใช้ stationary phase จำนวน 3 ชนิด คือ silica gel, aluminium oxide และ kieselguhr ส่วน mobile phase ประกอบด้วย CH_2Cl_2 ผสมกับ MeOH หรือ EtOH ดังนี้

1.1.1 Silica gel และ MeOH- CH_2Cl_2

ใช้ silica gel (No. 7734, E. Merck, 698 g) บรรจุใน column แก้วเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 19.5 cm โดยให้ชั้น silica gel มีความสูง 4.5 cm นำสิ่งสกัดหยาบ (35 g) มา load ลงบน column จากนั้นทำ elution โดยใช้ของผสมระหว่าง MeOH- CH_2Cl_2 ในลักษณะ gradient elution เก็บ eluate ครั้งละ 400 ml นำ eluate ที่เก็บได้มาตรวจดูส่วนประกอบ โดยวิธี TLC (silica gel, 10 % MeOH in CH_2Cl_2) นำ fraction ที่ 16-26 มารวมกันแล้วระเหยให้แห้งในภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร oxyresveratrol (8.6 g คิดเป็น 1.72 % ของน้ำหนักแก่นมะหาด)

1.1.2 Silica gel และ EtOH- CH_2Cl_2

ใช้ silica gel (No. 7734, E. Merck, 600 g) บรรจุใน column นำสิ่งสกัดหยาบ (21 g) มา load ลงบน column จากนั้นทำ elution โดยใช้ของผสมระหว่าง EtOH- CH_2Cl_2 ในลักษณะ gradient elution ทั้งนี้เก็บ eluate ครั้งละ 400 ml นำ eluate ที่เก็บได้มาตรวจดูส่วนประกอบ โดยวิธี TLC (silica gel, 10 % MeOH in CH_2Cl_2) นำ fraction ที่ 9-24 มารวมกันแล้วระเหยให้แห้งในภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร oxyresveratrol (6.2 g คิดเป็น 2.00 % ของน้ำหนักแก่นมะหาด)

1.1.3 Aluminum oxide และ EtOH- CH_2Cl_2

ใช้ aluminum oxide (No. 1077, E. Merck, 600 g) บรรจุใน column นำสิ่งสกัดหยาบ (21 g) มา load ลงบน column จากนั้นทำ elution โดยใช้ของผสมระหว่าง EtOH- CH_2Cl_2 ในลักษณะ gradient elution ทั้งนี้เก็บ eluate ครั้งละ 400 ml นำ eluate ที่เก็บได้มาตรวจดูส่วนประกอบ โดยวิธี TLC (silica gel, 10 % MeOH in CH_2Cl_2) นำ fraction ที่ 16-46 มารวมกันแล้วระเหยให้แห้งในภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร oxyresveratrol (5.7 g คิดเป็น 1.85 % ของน้ำหนักแก่นมะหาด)

1.1.4 Kieselguhr และ EtOH-CH₂Cl₂

ใช้ kieselguhr (E. Merck, 196 g) บรรจุใน column นำสิ่งสกัดหยาบ (10.3 g) มา load ลงบนผิวหน้า column จากนั้นทำ elution โดยใช้ของผสมระหว่าง EtOH-CH₂Cl₂ ในลักษณะ gradient elution ทั้งนี้เก็บ eluate ครั้งละ 400 ml นำ eluate ที่เก็บได้มาตรวจ composition โดยวิธี TLC (silica gel, 10 % MeOH in CH₂Cl₂) นำ fraction ที่ 30-49 มารวมกันแล้วระเหยให้แห้งในภาวะสูญญากาศที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร oxyresveratrol (3.4 g คิดเป็น 2.19 % ของน้ำหนักแก่นมะหาด)

1.2 Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

นำสิ่งสกัด soxhlet/EtOH ที่เตรียมจากแก่นมะหาด (ร้านขายยา) ได้มาแยกเอาสาร oxyresveratrol ใช้ condition ดังนี้

MPLC:	BÜCHI Pump Module C-605 ต่อกับ BÜCHI Pump Manager C-615 และ BÜCHI UV Photometer C-635 at $\lambda = 254 \text{ nm}$ บันทึก chromatogram ด้วย Liscis L 120 S recorder
column:	Polypropylene cartridges C-675 (40×150 mm) with Porous HD-polyethylene frits
Column packing:	Silica gel (No. 1.07734), particle size 0.063-0.200 mm. (70-230 mesh ASTM) (E. Merck)
Sample preparation	สิ่งสกัด 2 กรัม ละลายใน MeOH (5 ml) แล้วเติม CH ₂ Cl ₂ จนได้ปริมาตร 20 ml นำสารละลายนี้กรองผ่านกระดาษกรองก่อนฉีด
Flow rate	5 ml/min
Mobile phase	5% MeOH in CH ₂ Cl ₂

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้ใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography โดยใช้ C-18 reverse-phase column และใช้ MeOH เป็น mobile phase ใน flow rate 0.3 ml/min สาร oxyresveratrol จะมี retention time ประมาณ 5 – 6 นาที จากการทดลองเบื้องต้น พบว่า จากสารสกัด 2 กรัม จะแยกได้สาร oxyresveratrol บริสุทธิ์ประมาณ 1.2 กรัม คิดเป็นร้อยละ 4.0 ของน้ำหนักแก่นมะหาดแห้ง

ตารางที่ 2 ปริมาณ oxyresveratrol ที่แยกได้โดยวิธี chromatography

วิธีแยกสาร	ปริมาณ oxyresveratrol กิด เป็นร้อยละของแก่นมะหาด
1. VLC/SiO ₂ /MeOH-CH ₂ Cl ₂	1.72
2. VLC/SiO ₂ /EtOH-CH ₂ Cl ₂	2.00
3. VLC/Al ₂ O ₃ /EtOH-CH ₂ Cl ₂	1.85
4. VLC/Kieselguhr/EtOH-CH ₂ Cl ₂	2.19
5. MPLC/SiO ₂ / MeOH-CH ₂ Cl ₂	4.0

2 วิธีตกผลึก (Recrystallization)

จากข้อมูลการเตรียมสิ่งสกัดข้างต้น ทราบว่าวิธีสกัดแบบ soxhlet extraction โดยใช้ EtOH เป็นตัวทำละลาย ให้ปริมาณสิ่งสกัด และปริมาณ oxyresveratrol สูงที่สุด ในเวลา 8 ชั่วโมง จึงได้นำแก่นมะหาดแห้งทำการสกัดโดยใช้แก่นมะหาด 5 กรัมโดยวิธี soxhlet extraction และใช้ EtOH (500 ml) เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แก่นมะหาดแห้งที่นำมาใช้มาจาก 2 แหล่งคือ (1) ตัวอย่างจากร้านขายยา และ (2) ตัวอย่างที่เดินทางไปเก็บที่จังหวัดเชียงราย ได้สิ่งสกัดน้ำหนักเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 3 นำสิ่งสกัดที่ได้มาทำการตกผลึกโดยละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ทำการเก็บผลึก แล้วตกผลึกซ้ำอีกครั้ง ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 การทดลอง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้โดยวิธี HPLC

ตารางที่-3 ปริมาณสาร oxyresveratrol โดยวิธีตกผลึก

แหล่งแก่น มะหาด	น้ำหนักแก่นแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสิ่งสกัด (กรัม)	น้ำหนักผลึก (กรัม)	น้ำหนักผลึกกิด เป็นร้อยละของ ตัวอย่างพืช
ร้านขายยา	5.01	0.81	ไม่ตกผลึก	-
เชียงราย	5.12	1.22	0.21	4.1

4. สรุปผลการทดลอง

จากการเดินทางไปสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชมะหาดที่จังหวัดเชียงใหม่ ระยอง และ เชียงราย พบว่าชื่อ “มะหาด” หรือ “หาด” เป็นชื่อท้องถิ่นที่ใช้เรียกพืชหลายชนิดในสกุล *Artocarpus*

วงศ์ Moraceae ซึ่งพืชที่มีชื่อเรียกว่า “หาด” บางชนิดไม่ใช่ *Artocarpus lakoocha* แต่มีลักษณะ botanical morphology ของพืชคล้ายกัน ดังนั้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์จึงควรจัดเตรียมสิ่งสกัด MeOH หรือ EtOH ของตัวอย่างพืชเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี thinlayer chromatography ควบคู่ไปด้วย

ในการศึกษาวิธีสกัดสารจากแก่นมะหาด (ร้านขายยา) นั้น ได้เลือกใช้วิธีสกัด 4 วิธีคือ 1. Reflux 2. soxhlet 3. maceration และ 4. sonication โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ EtOH, acetone และ EtOAc วิเคราะห์ปริมาณ oxyresveratrol ในสิ่งสกัดที่ได้ในแต่ละการทดลองโดยวิธี HPLC แล้วคำนวณคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแก่นมะหาดที่ใช้ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า วิธี soxhlet/EtOH เป็นวิธีที่ให้ปริมาณสาร oxyresveratrol สูงสุดคือร้อยละ 5.42 วิธีสกัดที่ให้ผลรองลงมาได้แก่วิธี reflux/acetone, sonication/EtOAc และ sonication/EtOH

ในการศึกษาวิธีแยกเอาสาร oxyresveratrol จากสิ่งสกัด EtOH ที่เตรียมจากแก่นมะหาด (ร้านขายยา) ได้ทดลองโดยใช้วิธี chromatography 2 วิธี กล่าวคือ วิธีแรก Vacuum liquid chromatography ใช้ stationary phase 3 ชนิด ได้แก่ silica gel, aluminum oxide และ kieselguhr ส่วน mobile phase ใช้ MeOH, EtOH และ CH_2Cl_2 ผสมในสัดส่วนต่างๆ กัน โดยทำ elution ในลักษณะ polarity gradient พบว่าสามารถแยกสาร oxyresveratrol ในปริมาณคิดเป็นร้อยละใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงร้อยละ 1.75 – 2.00 ของน้ำหนักแก่นมะหาดแห้ง ส่วนวิธีที่สองใช้ Medium pressure chromatograph สามารถแยกได้สาร oxyresveratrol ได้คือร้อยละ 4.00 ของน้ำหนักแก่นมะหาดแห้ง แต่วิธีนี้ใช้แยกสิ่งสกัดได้ครั้งละปริมาณน้อย ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้แยกสารจากสิ่งสกัดครั้งละมากๆ

การศึกษาวิธีการแยกเอาสาร oxyresveratrol จากสิ่งสกัดโดยวิธีตกผลึก พบว่าใช้ได้ดีกับสิ่งสกัดที่เตรียมจากแก่นมะหาดที่เก็บจากจังหวัดเชียงราย โดยเก็บได้ผลึกร้อยละ 4.1 แต่ต้องระมัดระวังการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ส่วนสิ่งสกัดที่เตรียมจากแก่นมะหาดที่จัดซื้อจากร้านขายยาไม่สามารถนำมาแยกเอา oxyresveratrol โดยวิธีตกผลึกได้ สาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามเห็นว่าวิธีการตกผลึกนี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและประหยัด

รายงานการวิจัย



โครงการวิจัยที่ 2

ข้อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวชของมหาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรัมย์
ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูวฒิ
ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATIONS OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA* WOOD

Introduction

Plant materials are used as home remedies, over-the-counter drug products and raw materials for the pharmaceutical industry, and represent a substantial proportion of the global drug market. An overall program for the development of comprehensive standards for the safety and efficacy of traditional medicines is urgently needed. The quality of medicinal plant products can be improved using modern quality control methods as guided by the World Health Organization. These analytical techniques form a basis for supporting the development of national standards based on local market conditions^{1,2}.

The dried heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. is one of the crude drugs that have potential to be developed as natural drug products. Prior to this study there have been no reports on the pharmacognostic characters of this crude drug. This research aims at establishing the pharmacognostic specifications of *Artocarpus lakoocha*, which could then be used as a tool for the standardization of this crude drug as well as its drug products.

Methods

Sample collection

The dried wood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae) was purchased from 13 different Thai traditional drugstores located in Bangkok (3 stores) and in the 10 provinces (one drugstore each) located in five geographical areas of Thailand as follows: Central: Nakorn Pathom, Kamphaeng Phet; North: Pichit, Nakorn Sawan; East: Chon Buri; North-east: Nakorn Ratchasima, Ubon Ratchathani; and South: Songkhla, Trang and Nakorn Si Thammarat.

Macroscopic and Microscopic examination

Each sample of the crude drug was initially identified by visual examination of the physical properties such as texture, size, colour and other visual inspection. Microscopic inspection was then performed as described below:

The powdered material was sifted through a 250 micron sieve and then inspected under microscope with a magnification of 4x, 10x and 40x in comparison with the scale of 0.01 mm on the micrometer.

Determination of foreign matter

The sample (weighed 50.0 g) was spread in a thin layer, and the foreign matter was sorted by visual inspection. Then, the sample was sifted through a 250 micron sieve, and the portion of this sorted foreign matter was weighed.

Determination of total ash

The ground sample (3.0 g accurately weighed) was placed in a previously ignited and tared crucible. The sample was spread in an even layer and then ignited by gradually increasing the heat to 500-600°C until it turns white. The sample was then cooled in a desiccator and weighed without delay.

Determination of acid-insoluble ash

To the crucible containing the total ash, 25.0 ml of hydrochloric acid (70 g/l) was added. The crucible was covered with a watch-glass and sample boiled gently for 5 minutes. The watch-glass was rinsed with 5 ml of hot water, and this liquid was added to the crucible. The insoluble matter was collected on an ashless filter-paper and washed with hot water until the filtrate is neutral. The filter-paper containing the insoluble matter was transferred to the original crucible, dried on a hot plate and ignite to constant weight. The residue was allowed to cool in a desiccator and weighed without delay.

Determination of ethanol-soluble extractive

The ground sample (5.0 g) was macerated with absolute ethanol (100.0 ml) in a closed conical flask for 6 hours in shaking bath and allowed to stand for 18 hours. The extract was filtered rapidly to avoid loss of ethanol. A portion of the filtrate (20.0 ml) was evaporated to dryness in a tared, small beaker and then dried with heat until constant weight was obtained.

Determination of water-soluble extractive

The ground sample (5.0 g) was macerated with distilled water (100.0 ml) in a closed conical flask for 6 hours in shaking bath and allowed to stand for 18 hours. The extract was filtered rapidly to avoid loss of ethanol. A portion of the filtrate (20.0 ml) was evaporated to dryness in a tared, small beaker and then dried with heat to constant weight was obtained.

Determination of loss on drying

The ground sample (5.0 g) was weighed in a tared, small beaker and then dried with heat until constant weight was obtained.

Determination of water content

The ground sample (50.0 g) was placed in a round-bottom flask containing water-saturated toluene (200.0 ml). An azeotropic distillation was conducted until water was completely distilled. The condenser tube was rinsed inside with toluene and the distillation was allowed to continue for 5 more minutes. The heat was then removed, and the receiving tube was allowed to cool to room temperature. The water and toluene layers were allowed to separate and the volume of water was read off.

Determination of volatile oil content

The ground sample (100.0 g) was placed in a round-bottom flask containing 600.0 ml of water which was connected to a clevenger apparatus, and distillation was started. After the volatile oil was completely distilled, the heat was removed, and the receiving tube was allowed to cool to room temperature. The volatile oil and water layers were allowed to separate, and the volume of volatile oil was read off.

Thin-layer chromatographic identification

The ground sample (1 g) was macerated with methanol (20 ml) for 12 hours. The extract was filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol (0.5 ml). Ten μ l of this solution was applied onto a thin-layer plastic plate coated with silica gel GF254 (Polygram[®] SIL G/UV254, 0.25 mm thickness, 20 cm x 20 cm). The TLC plate was placed in a chamber with chloroform and methanol (9:1) as mobile phase. After development, the plate was removed and allowed to dry in air, and was then examined under ultraviolet light (254 nm and 366 nm). Afterwards, the plate was sprayed with vanillin-sulfuric acid reagent (vanillin 1.5 g, ethanol 25 ml and conc. sulfuric acid 0.25 ml) and heated in an oven at 120 °C for 10 minutes to give colored spot(s).

Quantitation of oxyresveratrol content

The ground sample (2 g) was extracted with methanol (250 ml) using soxhlet apparatus for 5 hours. The extract was collected and its volume was adjusted to 250 ml in volumetric flask. Acetophenone was used as internal standard.

Results

Pharmacognostic specifications of the wood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. are described as follows.

มะหาด (MA-HAAD)

Common Name	MA-HAAD
Other Names	Kaa-yaе, Taa-pae, Taa - paeng (Malay - Narathiwat), Mahaad baiyai (General), Ka-nuun-pa
English Name	-
Scientific Name	<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. ; <i>Artocarpus lacucha</i> Roxb.
Family	Moraceae
Distribution	This plant is common in semi-open areas of Northern Thailand. Also found in Sri Lanka, India, Myanmar, Malay Peninsula, Sumatra, Borneo
Used Part	Heartwood
Ethnomedical Uses	Bark: applied to infected wounds. Seed: taken as a stomach purgative. Dried aqueous extrat of heartwood (puak haad): anthelmintic for threadworm, roundworm and tapeworm.

Description of Plant

A large deciduous tree reaching 15-18 m. in height with a spreading head; bark rough, grey; young shoots thin, densely clothed with a soft grey, tawny or rusty tomentum. Leaves coriaceous, 10-30 by 5-15 cm., oblong, elliptic or subovate, entire (the young ones sometimes serrate), obtuse, cuspidate, glabrous and shining above, softly pubescent beneath, base broad or narrow, truncate or rounded; main nerves 6-12 pairs with reticulate venation between; petioles 1.3-2.5 cm. long, lanceolate tawny-pubescent. Flower in axillary globose shortly pedunculate heads; bracteoles peltate. Male flowers: Sepals 2-3, triangular, truncate, puberulous. Stamen 1; filament broad below, tapering upwards; anther exerted, short, broad, 2-celled. Female flowers: Anthocarps completely united. Fruit 5-7.5 cm. diam., lobulate, smooth, velvety, yellow, edible. Seeds oblong, few, broad, about 13 mm. across³.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

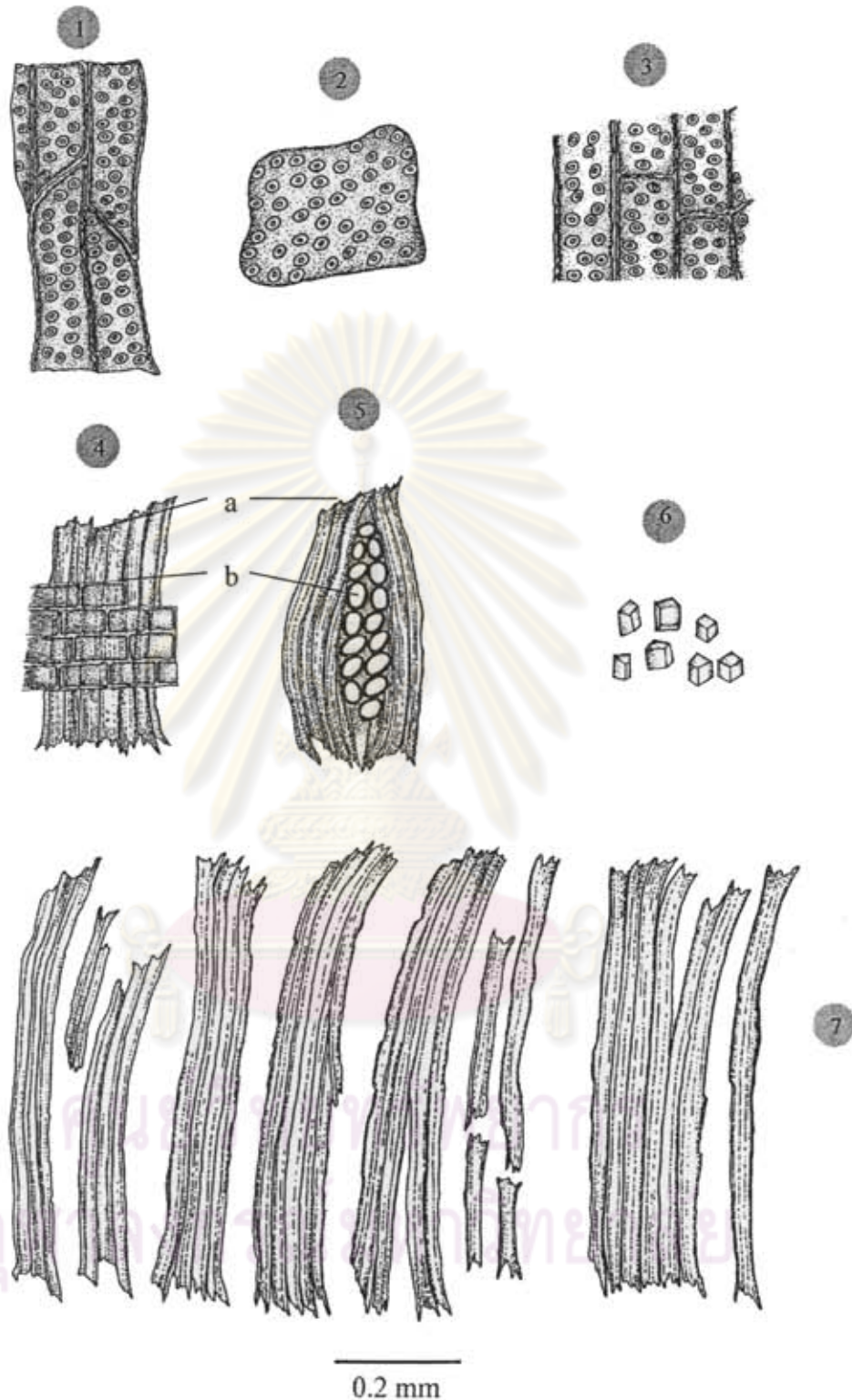


x 1/2

Macroscopic properties

The heartwood is hard and termite resistant with a weight of about 640 kg/m^3 . To prepare the traditional drug Puak haad, the chopped heartwood is boiled with water. After 5-6 hours, the heartwood is filtered off, and the remaining brown-yellow aqueous solution is left standing for 1-2 days for precipitates to occur. Then, the precipitates are collected on a cloth, and air-dried or grilled over a stove to give pale yellow powders called Puak haad.

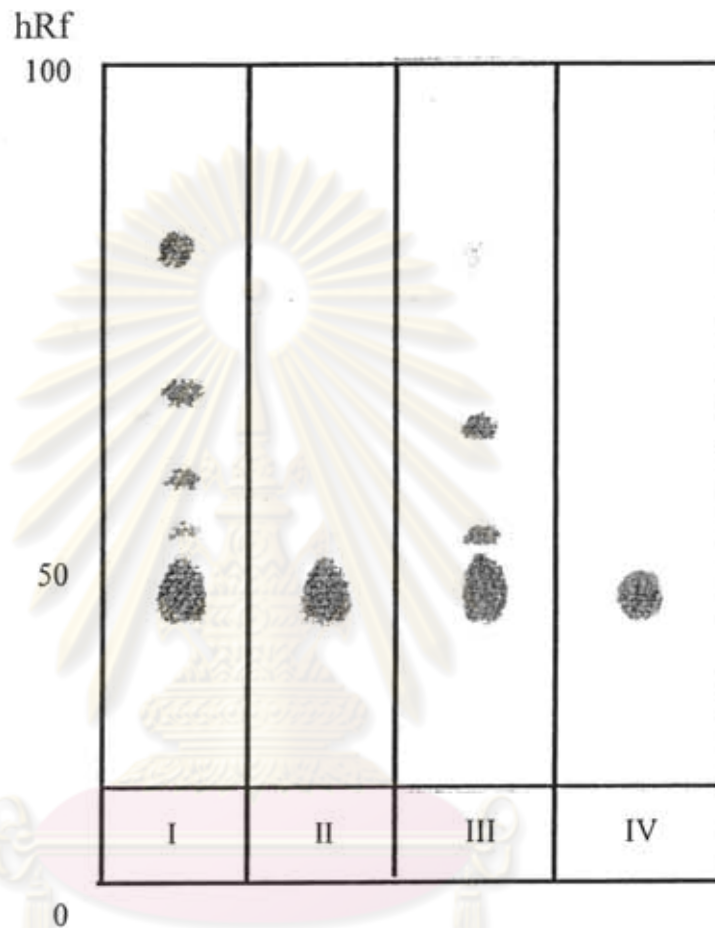
Microscopic properties



(1) Bordered-pored tracheids; (2,3) Bordered-pored vessels; (4) Part of the xylem in radial longitudinal section showing wood fiber (a) and medullary ray cells (b); (5) Part of the xylem in tangential longitudinal section showing wood fiber (a) and medullary ray cells (b); (6) Calcium oxalate prism (7) Nonlignified and very slightly lignified wood fibers with brownish wall

Identification

Macerate 1 g of powdered sample with 20 ml of methanol for 12 hours. Filter and evaporate the extract to dryness. Dissolve the residue in 0.5 ml of methanol. Apply 10 μ l of the solution onto thin-layer chromatographic plate with silica gel GF254 as the coating substance.



TLC chromatogram of methanolic extract of the wood of *Artocarpus lakoocha* Roxb.

Solvent system

Chloroform : Methanol 9 : 1

Detection

I = detection under UV light 254 nm

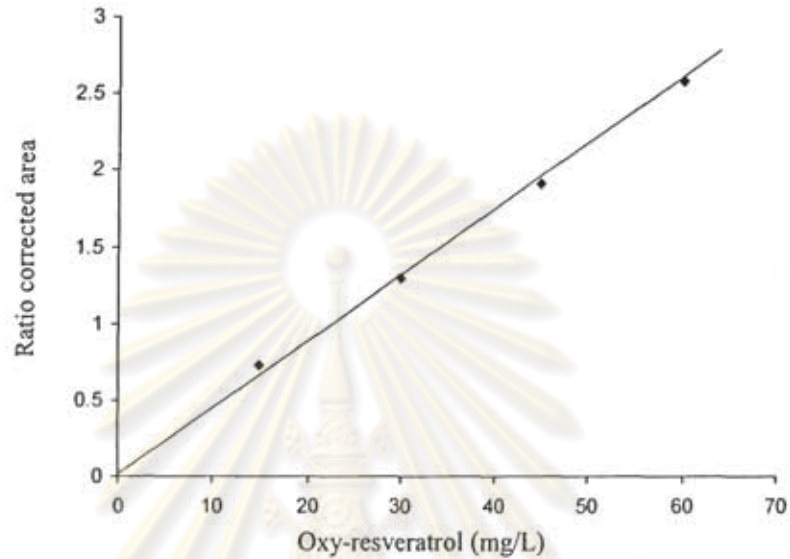
II = detection under UV light 366 nm

III = detection with vanillin-sulfuric acid

IV = standard oxy-resveratrol, detection with vanillin-sulfuric acid

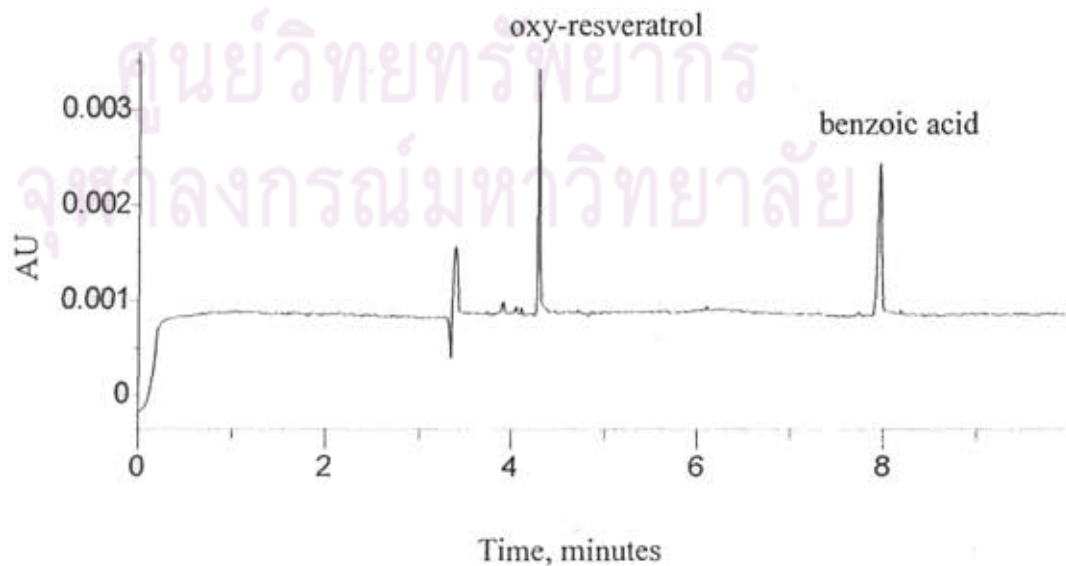
Quantitative analysis of oxyresveratrol content

Extract 2 g of the sample, in powder, with 250 ml of methanol for 5 hours by soxhlet extractor. Analyze for oxy-resveratrol by capillary zone electrophoresis* using benzoic acid as internal standard.



Calibration curve of oxy-resveratrol by capillary zone electrophoresis

*Instrument: P/ACE System 5010 Beckman; Buffer solution: Borate buffer 25 mM, pH 9.24; Capillary column: An uncoated fused silica capillary 57 cm length (50 cm to detector) x 50 μ m i.d., thermostated 25°C, voltage 30 kV; Detector: UV detector at 280 nm; Sample injection: 2 seconds



Chromatogram of methanolic extract of *A. lakoocha* wood by capillary zone electrophoresis

Specifications of Heartwood of *Artocarpus lakoocha*

Content (% by weight)	Mean \pm SD	Min - Max
Foreign matter	0.04 \pm 0.02	0.02 – 0.12
Acid-insoluble ash	2.06 \pm 1.31	0.82-5.95
Total ash	2.51 \pm 1.27	1.22-6.23
Ethanol-soluble extractive	7.93 \pm 3.53	0.10 – 16.28
Water-soluble extractive	5.27 \pm 2.38	0.91 – 9.90
Loss on drying	9.79 \pm 0.67	8.60 – 11.24
Volatile oil content	-	-
Water content	9.57 \pm 0.94	7.12 – 11.40
Oxy-resveratrol	1.44 \pm 0.66	0.44 – 2.35

References

1. World Health Organization (1998) Quality control methods for medicinal plant materials. ISBN 92 4 1545100 (NLM Classification: QV 766).
2. Cordell, G. A. (2004) Some thoughts on the standardization of traditional medicines. Thai J Health Res 18(2): 87-105.
3. Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. (1980) Indian Medicinal Plants. Vol. III. Second edition, pp. 2338-2339, Taj offset press, Delhi.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 3

การศึกษาการเตรียมและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์
จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติออกฤทธิ์เรสเวอราทอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์
ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ
ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ได้นำ oxyresveratrol ซึ่งสกัดจากแก่นมะหาด *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae) มาดัดแปลงโครงสร้าง ได้ออนุพันธ์จำนวน 15 ชนิด เมื่อนำอนุพันธ์เหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV ในหลอดทดลอง พบว่ามี 4 ชนิดที่มีฤทธิ์สูงขึ้นเป็นประมาณ 4 – 7 เท่าของ oxyresveratrol เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้กับฤทธิ์ต้าน HIV พบว่า การเติมหมู่แทนที่ซึ่งมีขนาดเล็กเช่น CH_3 จะได้ออนุพันธ์ที่มีฤทธิ์สูงขึ้น แต่ถ้าเติมหมู่แทนที่ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่านี้จะทำให้ฤทธิ์ลดลง อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์สูงขึ้นก็มีความเป็นพิษสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้แม้ว่าอนุพันธ์หลายชนิดมีฤทธิ์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น oxyresveratrol แต่ก็ยังมีฤทธิ์ต้าน HIV ต่ำกว่ายา AZT



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ออกซิเรสเวราทรอล (oxyresveratrol) เป็นสารธรรมชาติซึ่งได้จาก *Artocarpus lakoocha* Roxb. ซึ่งเป็นพืชซึ่งมีชื่อไทยว่า “มะหาด” ได้มีรายงานการศึกษาสารนี้ในเบื้องต้นพบว่ามีฤทธิ์ต้าน HIV ในหลอดทดลอง คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้าน HIV ของออกซิเรสเวราทรอล ทั้งนี้เนื่องจาก AIDS ได้เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในบ้านเราตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา นอกจากนี้ได้ยังมีรายงานการคือของไวรัส HIV ต่อยาที่ใช้ในปัจจุบัน ซึ่งทำให้นักวิจัยต้องพยายามคิดค้นหาขยาใหม่มาโดยตลอด เนื่องจากออกซิเรสเวราทรอลเป็นสารธรรมชาติที่สามารถสกัดได้ในปริมาณมาก คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าการศึกษาวิธีเตรียม และฤทธิ์ต้าน HIV ของอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์จากสารนี้อาจนำไปสู่งานวิจัยที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสำหรับบ้านเรา เนื่องจากหากพบสารที่สามารถนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ทางยาได้แล้ว ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสารธรรมชาติออกซิเรสเวราทรอลซึ่งมีแหล่งที่มาจากพืชในบ้านเรา

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

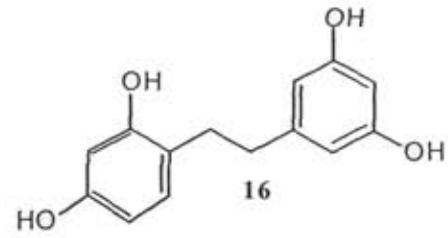
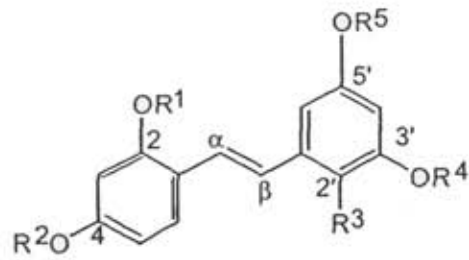
1. สังเคราะห์อนุพันธ์ของออกซิเรสเวราทรอล โดยใช้ออกซิเรสเวราทรอลเป็นสารตั้งต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV ของอนุพันธ์ที่เตรียมได้
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง โครงสร้างและฤทธิ์ต้าน HIV ของสาร

3. วิธีดำเนินการวิจัย

ได้เตรียมอนุพันธ์ของออกซิเรสเวราทรอล (1) จำนวน 15 ชนิด (รายละเอียดในภาคผนวก) ได้แก่สาร 2 – 16 และได้ทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV โดยวิธีที่ได้รายงานมาแล้ว^{1,2} ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 1

เอกสารอ้างอิง

1. Schinazi RF, Sommadossi, J.P., Saalman, V., Cannon, D.L., Xie, M.W., Hart, G.C., Smith, G.A. and Hahn E.F. Activity of 3'-deoxythymidine nucleotide dimers in primary lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1, Antimicrob. Agents Chemother. 1990, 34: 1061-1067.
2. Likhitwitayawuid, K., Supudompol, B., Sritularak, B., Lipipun, V., Rapp, K. and Schinazi, R.F. Phenolics with anti-HSV and anti-HIV activities from *Artocarpus gomezianus*, *Mallotus pallidus* and *Triphasia trifolia*. Pharm. Biol. 2005; 43: 651-657.



	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
1	H	H	H	H	H
2	Me	H	H	H	H
3	Me	H	H	Me	H
4	H	Me	H	Me	H
5	Me	Me	H	Me	Me
6	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	H	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph
7	COCH ₃	COCH ₃	H	COCH ₃	COCH ₃
8	COPh	COPh	H	COPh	COPh
9	COOEt	COOEt	H	COOEt	COOEt
10	CON(CH ₂ CH ₃) ₂	CON(CH ₂ CH ₃) ₂	H	CON(CH ₂ CH ₃) ₂	CON(CH ₂ CH ₃) ₂
11	Et	Et	H	Et	Et
12	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CHO	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph
13	CH ₂ COOH	CH ₂ COOH	H	CH ₂ COOH	CH ₂ COOH
14	CH ₂ COOEt	CH ₂ COOEt	H	CH ₂ COOEt	CH ₂ COOEt
15			H		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1ฤทธิ์ต้าน HIV ของออกซิเรสเวอราทรอลและอนุพันธ์ (1 – 16)

Compound	Anti-HIV activity in human PBM cells		Cytotoxicity, IC ₅₀ (μM) in		
	EC ₅₀ (μM)	EC ₉₀ (μM)	PBM	CEM	VERO
1	38.8	74.0	> 100	89.6	> 100
2	8.6	59.2	> 100	72.7	> 100
3	4.8	14.3	14.2	4.0	29.5
4	7.0	16.8	17.3	9.9	23.1
5	5.8	13.5	>100	38.8	>100
6	63.5	>100	>100	>100	>100
7	18.7	80.3	>100	47.4	>100
8	68.7	>100	>100	>100	>100
9	46.4	96.5	4.9	50.5	43
10	5.6	42.9	3.9	5.4	94
11	24.7	> 100	> 100	82.8	> 100
12	71.2	> 100	> 100	> 100	> 100
13	89.9	> 100	> 100	> 100	> 100
14	19.6	> 100	> 100	> 100	38.3
15	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
16	43.2	87.8	>100	13.4	>100
AZT	0.0047	0.098	>100	14.3	50.6

4. สรุปผลการทดลอง

จากตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาจากค่า EC₅₀ การเติมหมู่แทนที่ขนาดเล็กเช่น CH₃ ที่หมู่ OH ของออกซิเรสเวอราทรอล (1) ทำให้ได้อนุพันธ์ 2 – 5 ที่มีฤทธิ์ต้าน HIV สูงขึ้นประมาณ 4 – 7 เท่า ส่วนการเติมหมู่ที่ขนาดใหญ่กว่านี้ส่วนใหญ่ทำให้ฤทธิ์ต้าน HIV ลดลง ยกเว้นสาร 10 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน HIV เพิ่มขึ้น มีข้อสังเกตว่าอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์สูงขึ้นก็มีความเป็นพิษต่อ host cells เพิ่มขึ้นด้วยคงจะเห็นได้จากค่า IC₅₀ ของสาร 2 – 5 และ 10 ใน PBM, CEM และ Vero cells ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับสาร 1 อย่างไรก็ตามอนุพันธ์เหล่านี้ยังมีฤทธิ์ต้าน HIV ที่อ่อนกว่ายา AZT ดังนั้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าในขั้นต่อไป หากยังต้องการพัฒนาทางด้าน HIV จากออกซิเรสเวอราทรอล ควรเติมหมู่ที่มี polarity สูงเช่น SO₃H ลงบน aromatic ring ของออกซิเรสเวอราทรอล (1) ซึ่งน่าจะช่วยให้ได้

อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ต้าน HIV สูงขึ้น เนื่องจากช่วยให้มีการละลายน้ำได้ดีขึ้น และสามารถซึมผ่านเข้าสู่ host cells ได้ดีขึ้น

ภาคผนวก

Preparation of 2, 3 และ 4

To a solution of **1** (500 mg, 2.05 mmol, 1 eq) in acetone (10 ml) were added K_2CO_3 (854 mg, 6.17 mmol, 3 eq) and CH_3I (0.38 ml, 6.15 mmol, 3 eq). The reaction mixture was refluxed for 2 hr. A usual work-up followed by chromatographic purification on silica gel (CH_2Cl_2) gave **2** (19 mg, 0.07 mmol, 3.4%), **3** (22 mg, 0.08 mmol, 3.7%) and **4** (44 mg, 0.15 mmol, 7.3%).

Preparation of 5

Oxyresveratrol (**1**, 51 mg, 0.21 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (10 ml). To this solution, K_2CO_3 (170 mg, 1.23 mmol, 6 eq) and CH_3I (0.076 ml, 1.23 mmol, 6 eq) were added, respectively. The reaction mixture was refluxed for 24 hr. After a usual work-up, the obtained residue was purified by column chromatography (silica gel, CH_2Cl_2) to give **5** (49 mg, 0.16 mmol, 78.0 %).

Preparation of 6

Sodium hydride (36 mg, 0.92 mmol) was placed in a round-bottom flask with magnetic bar. Then dimethylformamide was added into flask rapidly, followed by oxyresveratrol (50 mg, 0.21 mmol). The mixture was stirred in an ice-bath for 30 minutes. After that benzylbromide (0.15 ml, 1.26 mmol) was added and stirred overnight. Extraction of the reaction mixture with CH_2Cl_2 and purification by column chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2) furnished **6** (46 mg, 0.076 mmol, 37.24%).

Preparation of 7

Oxyresveratrol (51 mg, 0.21 mmol) was dissolved in methylenechloride (2 ml) and placed in an ice-bath. Then, triethylamine (0.17 ml, 1.3 mmol), DMAP (103.7 mg, 0.85 mmol) and acetyl chloride (0.09 ml, 0.13 mmol) were added, respectively. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Extraction of the reaction mixture with CH_2Cl_2 and purification by preparative TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2) gave **7** (74 mg, 0.18 mmol, 86.07%).

Preparation of 8

Oxyresveratrol (36 mg, 0.15 mmol) was dissolved in methylenechloride (2 ml) and placed in an ice-bath. Then triethylamine (0.12 ml, 0.9 mmol), DMAP (73.4 mg, 0.6 mmol) and benzoylchloride (0.1 ml, 0.9 mmol) were added respectively. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Extraction of the reaction mixture with CH_2Cl_2 and subsequent purification by preparative TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2) yielded **8** (60.7 mg, 0.09 mmol, 61.83%).

Preparation of 9

Oxyresveratrol (51 mg, 0.21 mmol) was dissolved in methylenechloride (2 ml) in a round bottom flask. The flask was placed in an ice-bath. Then triethylamine (0.18 ml, 1.3 mmol), DMAP (103.7 mg, 0.85 mmol) and ethylformyl chloride (0.12 ml, 1.3 mmol) were added, respectively. The reaction was completed within an hour. Extraction of the reaction mixture with methylenechloride followed by purification through column chromatography (Silica gel, 7734, CH_2Cl_2) yielded **9** (64 mg, 0.120 mmol, 57.55%).

Preparation of 10

Oxyresveratrol (51mg, 0.21 mmol) was dissolved in methylenechloride (2 ml) in an ice-bath. Then triethylamine (0.17 ml, 1.3 mmol), DMAP (101.94 mg, 0.83 mmol) and *N,N*-diethylcarbonyl chloride (0.16 ml, 0.13 mmol) were added respectively. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Extraction with CH_2Cl_2 of the reaction mixture and purification by preparative TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2) gave **10** (74 mg, 55.51%).

Preparation of 16

Oxyresveratrol (100 mg, 0.41 mmol) was dissolved in EtOH (10 ml) with Palladium on charcoal (3.0 mg) in a Parr apparatus filled with hydrogen gas at pressure 47 bar. The mixture was shaken at room temperature for an hour. After the reaction was completed, the mixture was filtered through kieselguhr and dried under reduced pressure to give **16** (98 mg, 0.402 mmol, 98.05%).

รายงานวิจัย

โครงการวิจัยที่ 4 (ส่วนที่หนึ่ง)

การวิจัยประโยชน์ทางเครื่องสำอางของสารสกัดจากแก่นมะหาด

Research on cosmetic applications of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract

การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตและป้องกันการเสื่อมของเซลล์ fibroblast และ
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารสกัดจากแก่นมะหาด

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ
ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อธิศักดิ์ วงศ์จรศิลป์

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูฒิ

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อ	2
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ระเบียบวิธีการวิจัย	5
สารเคมีและเซลล์เพาะเลี้ยง	5
1. การศึกษาผลของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง	5
2. การศึกษาพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง	8
3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก oxidative stress (hydrogen peroxide)	8
4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A	9
5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A	10
6. การศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase (type IV) เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ	12
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	15
1. ผลของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง	15
2. ความเป็นพิษของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง	19
3. ฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide	23
4. ฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A	29
5. ฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A	35
6. การศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการยับยั้ง collagenase type IV	43
สรุปผลการวิจัย	53
กิตติกรรมประกาศ	55
เอกสารอ้างอิง	55

บทคัดย่อ

มะหาดหรือ *Artocarpus lakoocha* Roxb. เป็นพืชยืนต้นในสกุล Moraceae พบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย สารสกัดจากแก่นมะหาดหรือปวกหาด และสารสำคัญของมันคือ oxyresveratrol เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้ดี สามารถนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ เนื่องจาก oxyresveratrol จัดเป็นสาร polyphenol ซึ่งมีคุณสมบัติด้านออกซิเดชันด้วย จึงเป็นที่สนใจว่าจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอความแก่ (anti-aging agent) ได้หรือไม่ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงเป็นการประเมินฤทธิ์ชะลอความแก่และกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องของสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol ในหลอดทดลองโดยศึกษาในเซลล์ fibroblast เพาะเลี้ยง และเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆซึ่งนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ ได้แก่ epigallocatechin gallate (EGCG), สารสกัดจากเปลือกสนฝรั่งเศส (French pine bark extract), vitamin C (L-ascorbic acid) และ vitamin E (Trolox^o)

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol และสารต้านออกซิเดชันอ้างอิงทุกตัวสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของ fibroblast ได้ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 250 $\mu\text{g/ml}$ ทุกตัวจะให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ยักเว้น pine bark extract กับ Trolox^o เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันอันตรายจาก oxidative stress พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol สามารถป้องกัน fibroblast จากการถูกทำลายด้วย hydrogen peroxide ได้ที่ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารอ้างอิงตัวอื่นๆ ยกเว้น L-ascorbic acid ซึ่งสามารถป้องกันได้แต่ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น ส่วนการป้องกันการถูกทำลายจากรังสี UV-A พบว่า L-ascorbic acid มีฤทธิ์การป้องกันสูงสุด โดยสามารถป้องกันได้ในทุกความเข้มข้น (25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) ขณะที่สารสกัดจากแก่นมะหาดและสารอ้างอิงอื่นๆมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน โดยจะมีฤทธิ์ป้องกันเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและดีที่สุดที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol สามารถช่วยป้องกัน fibroblast จากอันตรายของรังสี UV-A โดยผ่านทางกลไกการช่วยลดการทำลายของ DNA นอกจากนี้ สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06 และ 0.15 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งความแรงในการยับยั้งเอนไซม์จะน้อยกว่า EGCG และ pine bark extract เล็กน้อย แต่จะมากกว่า L-ascorbic acid และ Trolox^o โดยสรุปแล้ว เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติต่างๆข้างต้น และราคาที่ถูกกว่า สารสกัดจากแก่นมะหาดจัดเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงมากในการนำมาพัฒนาเป็นสารต้านออกซิเดชันเพื่อช่วยต้านอนุมูลอิสระและชะลอความแก่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบัน สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้รับความนิยมเป็นอย่างสูง มีการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาใช้เป็นยา อาหาร และเครื่องสำอาง โดยเฉพาะเครื่องสำอางบำรุงผิว เช่น ผลิตภัณฑ์ช่วยทำให้ผิวขาว (whitening product) และผลิตภัณฑ์ช่วยชะลอความเหี่ยวย่นหรือความเสื่อมของผิวหนัง (anti-wrinkle/anti-aging) ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะผสมสารที่ได้จากธรรมชาติ ทำให้ได้รับความนิยมมาก โดยเฉพาะสารที่สกัดจากพืช เพราะเชื่อว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูง อย่างไรก็ตาม สารต่างๆเหล่านี้ ส่วนใหญ่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาสูง ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้มาซึ่งวัตถุดิบทางเครื่องสำอางจากทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศ จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต เป็นการเพิ่มศักยภาพและมูลค่าให้แก่วัตถุดิบ รวมถึงยังสามารถพัฒนาเพื่อการส่งออก นำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อีกด้วย

มะหาด หรือ *Artocarpus lakoocha* Roxb. เป็นไม้ยืนต้น อยู่ในวงศ์ Moraceae ชาวบ้านได้นำแก่นมาคั้นกับน้ำ นำสิ่งที่ได้มาทำให้แห้งเป็นผงเรียกว่าปวกหาด ซึ่งใช้เป็นยาถ่ายพยาธิมาแต่โบราณ สารสำคัญที่มีในผงปวกหาดและแก่นมะหาดคือ oxyresveratrol (2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene) (Mongkolsuk et al., 1957) ได้มีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพในการเป็นยาถ่ายพยาธิ (Preuksaraj et al., 1983; Charoenlarp et al., 1981, 1989) รวมถึงความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง (Nilvises et al., 1985; Ngamwat et al., 1987) และการศึกษาถึงเภสัชจลนศาสตร์ของสารสำคัญในอาสาสมัคร (Tanunkat, 1990) ภายหลังจากกินผง ปวกหาด เมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการวิจัยถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส HIV และ Herpes simplex virus ในหลอดทดลองของสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด (Likhitwitayawuid et al., 2003; Sritularak, 1998) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านไวรัสได้ดีพอสมควร

อย่างไรก็ดี การศึกษาในแง่เครื่องสำอางของสารสกัดจากแก่นมะหาดนับว่ายังมีน้อยมาก โดย Sritularak et al. (1998) เป็นกลุ่มแรกที่ได้รายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ในหลอดทดลองของสารสกัดนี้ เนื่องจากไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาดังคั้นของกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน สารสกัดจากแก่นมะหาดจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในเครื่องสำอาง จึงได้มีการศึกษาต่อเพื่อยืนยันผลในสิ่งมีชีวิต (In vivo study) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด สามารถลดความเข้มของสีผิวได้ทั้งในหนูตะเภาและในอาสาสมัคร โดยมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูงกว่าการทำผิวด้วยสารสกัดจากชะเอม (Licorice extract) และกรด โคจิก (Tengamnuay et al., 2003) ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยพบว่า oxyresveratrol ที่สกัดจากแก่นมะหาด สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้มากที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเอนไซม์ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 1.5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีความแรงกว่ากรด โคจิก ถึง 17.9 เท่า (Sritularak, 1998)

นอกจากนี้ การที่สาร oxyresveratrol เป็นสารในกลุ่ม polyphenols จึงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วย โดยได้เคยมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของ oxyresveratrol ไว้

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 (Tiptabiankarn, 1967) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการศึกษาฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันได้ก้าวหน้าไปมาก และกลไกการด้านออกซิเดชันก็มีหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์และนำไปสู่ภาวะการแก่ (aging) จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาโดยละเอียดและเปรียบเทียบผลกับสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน

เนื่องจากสารสกัดจากแก่นมะหาดมีปริมาณของ oxyresveratrol อยู่สูงมาก (ประมาณ 50 - 70%) (Sritularak et al., 1998) รวมถึงต้นมะหาดก็เป็นไม้ที่พบได้ทั่วไป สารสกัดจากแก่นมะหาดจึงมีศักยภาพสูงที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอางที่มีประโยชน์หลากหลาย ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต ส่งเสริมการใช้วัตถุดิบในประเทศ ลดการนำเข้า และสามารถพัฒนาเพื่อการส่งออกได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1). ศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดจากแก่นมะหาด (รายงานผลแล้วในรายงานประจำปี 2548)
- 2). ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากแก่นมะหาดที่มีต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (รายงานผลแล้วเมื่อ 30 มิถุนายน 2549)
- 3). การศึกษาพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (รายงานผลแล้วเมื่อ 30 มิถุนายน 2549)
- 4). ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (รายงานผลแล้วเมื่อ 30 มิถุนายน 2549)
- 5). ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (รายงานผลครั้งนี้)
- 6). การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet (รายงานผลครั้งนี้)
- 7). ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase (type IV) เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ (รายงานผลครั้งนี้)

ระเบียบวิธีการวิจัย

สารเคมี

สารสกัดจากแก่นมะหาดหรือปวกหาด (Puag-Haad) lot no. 01/03 ซื้อจากร้าน E.A.R. drugstore จังหวัด
เชียงใหม่ เปอร์เซ็นต์ oxyresveratrol เท่ากับ 80.0% w/w จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Oxyresveratrol (2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene) สกัดจากผงบวกหาดและทำให้บริสุทธิ์โดย Wachiranuntasin
(2005) ความบริสุทธิ์โดย HPLC เท่ากับ 98.64 %

สารเคมีอื่นๆเป็น reagent grade และใช้ตามที่ได้รับ

เซลล์ fibroblast เพาะเลี้ยง ใช้ 2 แหล่งคือ

1. Primary human normal dermal fibroblast (HNDF) cells ได้จาก biopsies ของผิวหนังคนปกติ (coded SiF 49)
โดยความอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศักดิ์ วงศ์จรศิลป์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2. Human normal dermal fibroblast (HNDF) cell line (coded CC2511) ซื้อจาก Cambrex Corp., USA

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง

1.1 การเตรียม primary cell culture ของ normal human skin fibroblast

เซลล์ primary skin fibroblast ได้มาจากตัวอย่างผิวหนังของมนุษย์สุขภาพปกติ รหัสของเซลล์ที่ใช้คือ
SIF 49 ซึ่งการเก็บตัวอย่างผิวหนัง (skin biopsy) การแยก fibroblast ออกจากชั้น dermis ด้วย trypsin ได้รับ
ความอนุเคราะห์จากแพทย์และนักวิจัยเฉพาะทางของคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และผ่านความเห็นชอบ
โดยกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลศิริราช

เมื่อแยกเซลล์ fibroblast ออกจาก dermis แล้ว นำเซลล์มาแขวนตะกอนใน Dulbecco's modified eagle's
medium (DMEM) ที่เตรียมใหม่ๆ จากนั้นหาความเข้มข้นของเซลล์ใน suspension โดย pipet cell suspension มา
เล็กน้อย (ประมาณ 10 – 20 μ l) เติมสารละลาย 0.4% trypan blue ใน phosphate buffered saline (PBS) ใน
ปริมาตรที่เท่ากันลงไป แล้วทำการวัดจำนวน total และ viable cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเครื่อง
hemacytometer (เฉพาะ viable cells จะติดสี trypan blue) เมื่อทราบความเข้มข้นเริ่มต้นแล้ว ให้ pipet
suspension ให้มีจำนวน viable cell อยู่ในช่วง $3 - 10 \times 10^4$ มาลงใน 25-cm² tissue culture flask (T-flask) ซึ่งได้
เติม 5 ml DMEM ที่เตรียมใหม่ไว้ล่วงหน้า นำไป incubate ที่ 37 °C จนกระทั่งเซลล์ติดที่พื้น flask จากนั้นทำการ

เปลี่ยน medium ทุกๆ 3-4 วันจนกระทั่งเซลล์ที่ซึ่คคิดแบ่งตัวเชื่อมกันเป็น monolayer (confluent) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จาก fibroblast ที่มาจากตัวอย่างผิวหนังในครั้งแรกนี้คือ primary cell culture

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

สูตรตำรับของอาหารเลี้ยง fibroblast ที่มีส่วนผสมของซีรัม (serum-containing media for fibroblast cultivation) มีดังนี้

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) powder containing:

D-glucose	4,500 mg
L-glutamine	4,500 mg
sodium pyruvate	110 mg
sodium bicarbonate	3.7 g
penicillin G	100,000 IU
streptomycin	50 mg
sodium hydroxide	q.s. to make pH 7.4
water q.s. to make	1,000 ml

วิธีการเตรียม ละลายผงของ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย D-glucose, L-glutamate และ sodium pyruvate ในน้ำ 800 ml และคนจนกระทั่งผงละลายหมด โดยที่ความเข้มข้นสุดท้าย สารแต่ละตัวจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 4,500 mg/L ของ D-glucose 4,500 mg/L ของ L-glutamate และ 110 mg/L ของ sodium pyruvate (Gibco invitrogen cell culture)

จากนั้นเติม sodium bicarbonate 3.7 g และเติม penicillin G ในปริมาณให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเท่ากับ 100 IU/ml และเติม streptomycin เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 µg/ml เมื่อสารทุกตัวละลายเข้ากันดีหมดแล้ว ให้ปรับ pH ของมีเดียจนเท่ากับ 7.4 ด้วย 0.1 N sodium hydroxide solution และเติมน้ำจนกระทั่งได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 ml ทำการ sterilize มีเดียโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 µm สุดท้ายทำการเติม fetal bovine serum (FBS) (Gibco invitrogen cell culture) ลงในมีเดียในสัดส่วน DMEM solution ต่อ FBS เท่ากับ 85 : 15 v/v เก็บสารละลายของมีเดียที่ผสม FBS แล้วที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืด

1.3 การเตรียม fibroblast subculture

การศึกษานี้จะใช้เซลล์ fibroblast ที่เพาะเลี้ยงจาก primary cell culture ใน DMEM ภายใต้ 5% carbon dioxide humidified atmosphere ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยการนำมาทำ subculture ติดต่อกัน 3 รุ่นแต่ไม่เกินรุ่นที่ 5 (อยู่ในช่วง 3 – 5 passage) การทำ subculture ของ primary cells จะใช้สารละลาย trypsin ใน phosphate buffered saline (PBS) เติมนลงใน T-flask เพื่อทำให้เซลล์หลุดจาก monolayer ออกมาแขวนลอยอยู่ใน DMEM แล้วจึงสุ่ม

ตัวอย่าง fibroblast suspension ให้นำจำนวน viable cell และแบ่งมาเพาะเลี้ยงต่อใน T-flask แบบเดียวกับการเตรียม primary cell culture ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนได้ passage ของเซลล์ตามที่ต้องการ

1.4 การศึกษาผลของสารสกัดที่มีต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast

วิธีการจะดัดแปลงจากของ Kawashima et al. (2003) นำเซลล์ fibroblast มา trypsinize ับจำนวน viable cell และนำมาทำ dilution ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 40,000 cell/ml ด้วย FBS-supplemented DMEM จากนั้น pipet fibroblast suspension ที่ได้มาลงใน 96-well multi-chamber plate หลุมละ 100 μ l (ดังนั้น แต่ละหลุมจะมีเซลล์เท่ากับ 4,000 เซลล์) นำไป incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 37 °C ภายใต้ 5% CO₂ atmosphere เพื่อให้เซลล์ติดกันหลุม จากนั้นดูด medium ออกจากแต่ละหลุม และแทนที่ด้วย 200 μ l DMEM-15%FBS ที่เตรียมใหม่ซึ่งมีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) หรือสารอ้างอิง (reference substance) ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ (10, 25 และ 50 μ g/ml) สารอ้างอิงที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ oxyresveratrol, epigallocatechin gallate (EGCG), French pine bark extract, L-ascorbic acid และ Trolox^o โดยหยอดความเข้มข้นละ 3 หลุม (n = 3) จากนั้นนำ plate ไป incubate ต่ออีก 72 ชั่วโมงเพื่อดูผลของสารสกัดและสารเปรียบเทียบที่มีต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนเซลล์ ทั้งนี้จะมีหลุมควบคุมซึ่งหยอดแค่ 200 μ l DMEM-15%FBS โดยไม่มีสารใดๆ ละลายอยู่ เมื่อครบกำหนดเวลา นำ plate ออกมาจากตู้บเพื่อวัดปริมาณ viable cell ที่มีอยู่ในแต่ละหลุมด้วย MTT assay

1.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงภายหลังการลงสารทดสอบ ให้นำ plate ออกจากตู้บเพาะเลี้ยง และหยอดหลุมเปล่าที่ยังว่างอยู่ด้วย 200 μ l ของ fibroblast cell suspension ใน DMEM-15%FBS ที่มี fibroblast cells ในความเข้มข้นต่างๆ โดยเมื่อหยอดแล้วในแต่ละหลุมจะมีปริมาณ fibroblast เท่ากับ 0, 500, 1000, 4000, 7000, 10000, 15000 และ 20000 เซลล์ตามลำดับ (n = 3 หลุมต่อหนึ่งค่าปริมาณ) จากนั้นนำ plate ไป incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง เพื่อให้ standard cells ของ fibroblast ติดกันหลุมก่อนไปวิเคราะห์ด้วย MTT assay พร้อมกับสารทดสอบ

1.6 การวัดปริมาณเซลล์ด้วย MTT assay

MTT assay เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธีการทาง colorimetry (Mosmann, 1983) โดยจะหยอด 100 μ l ของสารละลาย 0.2 mg/ml MTT หรือ [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ใน DMEM ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำ plate ไป incubate ต่ออีก 1 ชั่วโมงที่ 37 °C MTT จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เข้าไปทำปฏิกิริยากับ mitochondrial dehydrogenase enzyme ของ viable cell ทำให้ tetrazolium ring ของ MTT ถูก cleave ออกได้เป็นผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินของ formazan สะสมอยู่ใน viable cell จากนั้นทำการดูด supernatant ออกจากทุกหลุมให้หมด แล้วหยอด 150 μ l ของ dimethylsulfoxide (DMSO) ลงไปแทนที่ นำ plate ไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก (lysis) และ DMSO ละลาย formazan crystals ที่อยู่ในได้เป็นสารละลายสีม่วง นำ plate ไปเข้าเครื่อง multi-microplate reader (Victor^o multilable counter, Perkin Elmer, USA) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของ viable cell ที่ความยาว

คลื่น 595 nm ทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวน viable cell กับค่าการดูดกลืนแสงและหาความสัมพันธ์ด้วย linear regression analysis นำค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้สารทดสอบเข้าแทนที่ในสมการ linear regression คำนวณออกมาเป็นจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต เปรียบเทียบผลทางสถิติระหว่างหลุมที่ได้สารในความเข้มข้นต่างๆ (สารสกัดจากแก่นมะหาดและสารอ้างอิง) กับหลุมที่ไม่ได้ใส่สาร (control) โดยใช้ ANOVA และ Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 % หรือสถิติอื่นๆที่เหมาะสม

2. การศึกษาพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง

รายละเอียดการทดลอง (การเตรียม media การทำ subculture และการทดสอบด้วย MTT assay) จะเหมือนกับการศึกษาผลของสารสกัดต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast แต่เปลี่ยนแหล่งของเซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็น human normal dermal fibroblast cell line (รหัส CC 2511) ซึ่งสั่งซื้อจาก Cambrex ประเทศสหรัฐอเมริกา และเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาของสารสกัดและสารอ้างอิง (oxyresveratrol, EGCG, French pine bark extract, Trolox^o, L-ascorbic acid) เป็น 25, 100 และ 250 µg/ml เพื่อดู reproducibility ของผลการทดลองและผลของความเข้มข้นที่สูงขึ้นต่อการอยู่รอดของเซลล์

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก oxidative stress (hydrogen peroxide)

รายละเอียดการทดลองจะเหมือนกับการทดลองที่ 1 และที่ 2 โดยใช้ human normal dermal fibroblast cell line (CC2511) เป็นเซลล์ทดสอบ และใช้ hydrogen peroxide (H₂O₂) เป็นตัวแทนของ oxidative stress ที่มีผลทำลายเซลล์ และวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable cells) ด้วย MTT assay เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ถูก treat ด้วย H₂O₂ อย่างเดียว (control) และกลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ ในสถานะที่มีสารสกัดหรือสารอ้างอิงในความเข้มข้นต่างๆ ร่วมด้วย

3.1 การ pretreat fibroblast ด้วยสารสกัดและสารอ้างอิงก่อน treat ด้วย hydrogen peroxide

นำเซลล์ fibroblast มา trypsinize นับจำนวน viable cell และนำมาทำ dilution ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100,000 cell/ml ด้วย FBS-supplemented DMEM จากนั้นเปิด fibroblast suspension ที่ได้มาลงใน 96-well multi-chamber plate หลุมละ 100 µl (แต่ละหลุมจะมีเซลล์เท่ากับ 10,000 เซลล์) นำไป incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 37 °C ภายใต้ 5% CO₂ atmosphere เพื่อให้เซลล์ติดกันหลุม จากนั้นดูด medium ออกจากแต่ละหลุม และเปลี่ยนเป็น 200 µl DMEM-15% FBS ซึ่งมีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) หรือสารอ้างอิง (reference substance) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0 (control), 25, 50 และ 100 µg/ml สารอ้างอิงที่ใช้ศึกษา เปรียบเทียบได้แก่ oxyresveratrol, epigallocatechin gallate (EGCG), French pine bark extract, L-ascorbic acid และ Trolox^o โดยหยอดความเข้มข้นละ 3 หลุม (n = 3) นำ plate ไป incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง (= pre-treatment period) เพื่อให้เวลาเซลล์ในการดูดซึมสาร เมื่อครบกำหนดจึงเปลี่ยน medium เป็นสารละลาย 200 µl

ของ H_2O_2 ความเข้มข้น 2 mM ใน DMEM-15% FBS ซึ่งมีสารสกัดหรือสารอ้างอิงอยู่ด้วยที่ความเข้มข้นเดิม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (= H_2O_2 treatment period) เพื่อดูผลของสารเหล่านี้ในการต้านฤทธิ์การทำลายเซลล์ของ H_2O_2 จากนั้นจึงนำ plate ไปวิเคราะห์หาจำนวน viable cell ด้วย MTT assay (รายละเอียดการทดสอบเหมือนกับในหัวข้อ 1.6) นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม untreated คือหลุมซึ่งไม่ได้ pretreat ด้วยสารใดๆและไม่ได้ treat ด้วย H_2O_2 อีกด้วย (มีแต่ DMEM-15% FBS)

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ในช่วงเตรียมสารทดสอบ (pre-treatment) จะหยอดหลุมเปล่าที่ยังว่างอยู่ใน plate ด้วย 200 μ l ของ fibroblast cell suspension ใน DMEM-15%FBS ให้มีปริมาณ fibroblast เท่ากับ 0, 500, 1000, 4000, 7000, 10000, 15000 และ 20000 เซลล์ตามลำดับ (n = 3) จากนั้นนำ plate ไป incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง เพื่อให้ standard cells ของ fibroblast ติดกันหลุมก่อนไปวิเคราะห์ด้วย MTT assay โดยไม่ต้องเติม H_2O_2

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบจำนวน viable cells ระหว่างหลุมที่เติมสารในความเข้มข้นต่างๆ (สารสกัดจากแก่นมะหาด และสารอ้างอิง) กับหลุมที่ถูก treat ด้วย hydrogen peroxide อย่างเดียว (treated control) โดยใช้ ANOVA และ Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 % หรือสถิติอื่นๆที่เหมาะสม

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A

รายละเอียดการทดลองจะเหมือนกับการทดลองที่ 3 แต่จะใช้ รังสี ultraviolet A (UV-A) เป็นตัวแทนของ oxidative stress ที่มีผลทำลายเซลล์ และวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable cells) ด้วย MTT assay เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ถูกฉายด้วยรังสี UV-A อย่างเดียว (control) และกลุ่มที่ได้รับการฉายด้วย UV-A ในสถานะที่มีสารสกัดหรือสารอ้างอิงในความเข้มข้นต่างๆร่วมด้วย

4.1 การ pretreat fibroblast ด้วยสารสกัดและสารอ้างอิงก่อนฉายด้วยรังสี UV-A

นำเซลล์ fibroblast มา trypsinize นับจำนวน viable cell และนำมาทำ dilution ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100,000 cell/ml ด้วย FBS-supplemented DMEM จากนั้นเปิด fibroblast suspension ที่ได้มาลงใน 96-well multi-chamber plate หลุมละ 100 μ l (แต่ละหลุมจะมีเซลล์เท่ากับ 10,000 เซลล์) นำไป incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 37 °C ภายใต้ 5% CO_2 atmosphere เพื่อให้เซลล์ติดกันหลุม จากนั้นดูด medium ออกจากแต่ละหลุม และเปลี่ยนเป็น 200 μ l DMEM-15% FBS ซึ่งมีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) หรือสารอ้างอิง (reference substance) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0 (control), 25, 50 และ 100 μ g/ml สารอ้างอิงที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบกับได้แก่ oxyresveratrol, epigallocatechin gallate (EGCG), French pine bark extract, L-ascorbic acid และ Trolox โดยหยอดความเข้มข้นละ 3 หลุม (n = 3) นำ plate ไป incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง (= pre-treatment period) เพื่อให้เวลาเซลล์ในการดูดซึมสาร เมื่อครบกำหนดจึงนำ plate มาส่องด้วยรังสี UV-A ให้ได้

ปริมาณรังสีเท่ากับ 20 J/cm^2 เพื่อดูผลของสารเหล่านี้ในการต้านฤทธิ์การทำลายเซลล์ของรังสี UV-A จากนั้นจึงนำ plate ไปวิเคราะห์หาจำนวน viable cell ด้วย MTT assay (รายละเอียดการทดสอบเหมือนกับในหัวข้อ 1.6) นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม untreated คือหลุมซึ่งไม่ได้เติมสารใดๆและไม่ได้ treat ด้วยรังสี UV-A อีกด้วย (มีแต่ DMEM-15% FBS)

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เหมือนหัวข้อ 3.2 แต่จำนวนเซลล์ fibroblast ที่เติมลงใน plate คือ 0, 500, 1000, 7000, 15000 และ 20000 เซลล์

4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ เหมือนหัวข้อ 3.3

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A

วัตถุประสงค์ของการทดลองส่วนนี้เป็นการศึกษาเพิ่มเติมว่า ถ้าสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญสามารถช่วยป้องกันเซลล์ fibroblast จากการถูกทำลายโดยรังสี ultraviolet ได้จริง กลไกจะเกิดผ่านทาง การป้องกันการสลายตัวของ DNA ภายในเซลล์หรือไม่ โดยเทคนิคในการศึกษาจะใช้ flow cytometry ซึ่งเป็นเครื่องมือที่จะ scan อนุภาค เช่นเซลล์ หรือ discrete particles ที่ไหลผ่านลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) เช่น laser หรือลำแสงอื่นๆที่เหมาะสม เมื่อลำแสงตกกระทบอนุภาค จะเกิดการกระเจิงของแสงหรือมีการเรืองแสง (fluorescence emission) ขึ้น โดยจะมีรูปแบบเฉพาะขึ้นกับคุณสมบัติของอนุภาค ซึ่งสามารถนำมาประมวลผลเพื่อประเมินถึงลักษณะของอนุภาคได้ ในการทดลองนี้ จะทำการเพาะเลี้ยง fibroblast แล้วนำไปส่องด้วยรังสี UV-A ในภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol จากนั้นนำไปย้อมด้วย propidium iodide (PI) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ DNA ของเซลล์ที่ยังมีชีวิต (viable cells) เมื่อเซลล์ไหลผ่าน light source จะ emit fluorescence ในความเข้มที่สูง ขณะที่เซลล์ที่ตายแล้ว (apoptotic หรือ necrotic cells) สภาพของ DNA จะเสียไป เช่นเกิด fragmentation ทำให้ติดสี PI ได้น้อยหรือไม่ติดสี ทำให้มีความเข้ม fluorescence ที่ต่ำ จึงสามารถวิเคราะห์แยกความแตกต่างได้

5.1 การเตรียมสารละลายของสารทดสอบและ reagent

5.1.1 เตรียมสารละลายของสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol ใน DMEM ซึ่งมี 15% fetal bovine serum ให้มีความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$

5.1.2 เตรียมสารละลายของ propidium iodide (PI) 5 mg/ml ใน deionized water

5.1.3 เตรียมสารละลายของ ribonuclease A (RNase A) 1 mg/ml ใน deionized water แล้วนำไปเจือจางด้วย phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 จนได้ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$

5.2 การวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

จะทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate) โดยแต่ละครั้งมีรายละเอียดดังนี้

5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast

นำ fibroblast มาเพาะใน 6-well plate ในปริมาณเริ่มต้น 2×10^5 cells ต่อหลุม (โดยเติม cell suspension ความเข้มข้น 2×10^5 cells/ml ลงไปหลุมละ 1ml) นำไป incubate ที่ 37°C ภายใต้ $5\% \text{CO}_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์ติดกันหลุมแล้ว จะดูด medium เดิมออกจากทุกหลุมเพื่อเปลี่ยนใหม่ โดย 4 หลุมจะเติมด้วยสารละลายของสารสกัดจากแก่นมะหาดและของ oxyresveratrol (ที่ความเข้มข้นอย่างละ 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$) หลุมละ 1 ml ส่วนอีกหนึ่งหลุมจะเติมแค่ medium เปล่าที่ไม่มีสาร 1 ml (control group) จากนั้นนำไป incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วนำ plate ไปส่องรังสี UV-A ที่ความเข้ม 20 J/cm^2 เมื่อครบกำหนด ทำการ trypsinize เซลล์และถ่าย suspension ของเซลล์ลงใน $12 \times 75\text{-mm}$ centrifuge tube นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 5 นาทีที่ 1200 rpm เเท supernatant ทิ้ง และ resuspend เซลล์ใน 0.5 ml ของ phosphate buffered saline (PBS)

นอกจากนี้ยังจะเพาะเซลล์ใน plate ค้างหากอีกหนึ่งหลุม ซึ่งจะไม่ได้รับทั้งสารทดสอบและรังสี UV (untreated group) เพื่อใช้เปรียบเทียบ โดยรายละเอียดการทดลองอื่นๆจะเหมือนกัน

5.2.2 การ fix และย้อมเซลล์ด้วย PI

เติมสารละลาย 70% ethanol (fixative solution) ที่ทำให้เย็นจัด ปริมาณ 4.5 ml ลงใน centrifuge tube แต่ละหลอดพร้อมกับวางในอ่างน้ำแข็ง แช่ suspension ของเซลล์ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 1200 rpm 5 นาทีแล้วริน ethanol ทิ้ง ล้างเซลล์โดยการเติม PBS 2 ml แล้วนำไปปั่นแยก เเท supernatant ทิ้ง นำเซลล์มา resuspend ด้วย 1 ml ของสารละลายของ RNase A ($100 \mu\text{g/ml}$ ใน PBS) แล้ว incubate ที่ 37°C 30 นาที เพื่อทำลาย RNA ภายในเซลล์ไม่ให้นำบรบกวนการติดสี PI ของ DNA จากนั้นเติมสารละลาย PI ($10 \mu\text{l}$ ของ stock solution) ลงในแต่ละหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $50 \mu\text{g/ml}$ แล้วนำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีโดยเก็บในที่มืด

5.2.3 การวัด cell fluorescence ด้วย flow cytometer

นำ suspension ของเซลล์มาวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง FACSort flow cytometer (FACSCalibur, Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA) โดย set ความยาวคลื่น excitation ที่ 488 nm และ emission filter ที่ 600 nm คูดเซลล์จากแต่ละหลอดมาวิเคราะห์เป็นจำนวนอย่างน้อย 18000 เซลล์ คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่ DNA ถูกทำลาย (apoptotic, non-viable cell) และเซลล์ปกติที่ยังแบ่งตัวได้ (viable cell) โดยใช้ CellQuest^o Pro software (Becton Dickinson, USA) นำมา plot เป็น DNA histogram โดยเซลล์ที่ DNA ถูกทำลาย (non-viable cell) จะให้ peak ใน subG₀/G₁ phase ของ DNA histogram

5.3 การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ treat ด้วย สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol โดยใช้ ANOVA และ Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 5%

6. การศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase (type IV) เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ

วัตถุประสงค์ของการทดลองในส่วนนี้ เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเร่งการสลายตัวของ collagen ในชั้น dermis ถ้า collagenase ถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้น เช่น โดยรังสี UV จะทำให้ collagen ถูกทำลายเพิ่มขึ้น และมีส่วนเร่งให้เกิดริ้วรอยของผิวหนังได้มากขึ้น เนื่องจาก collagenase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases ซึ่งมีหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ collagenase type IV เป็นเอนไซม์ ทดสอบ เพราะเป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งในผิวหนังมนุษย์และมีผลเร่งการสลายตัวของทั้ง collagen และ gelatin ซึ่งต่างก็เป็น structural fibrous protein ใน matrix ของชั้น dermis

วิธีการทดลองจะศึกษาโดยใช้ชุดวิเคราะห์ EnzCheck^o gelatinase/collagenase assay kit (E-12055, Molecular Probes, USA) ตามวิธีที่รายงานโดย Chaudhuri et al. (2004) สารที่ใช้เป็น substrate คือ DQ^o gelatin (fluorescein conjugate gelatin) ซึ่งเป็น gelatin ที่ติดฉลากด้วย fluorescein ในปริมาณที่สูงจนกระทั่งเกิดการ quenching ของ fluorescence ทำให้การเรืองแสง fluorescence ถูกกดไว้เหลือไม่เกิน 3% DQ^o gelatin สามารถถูก hydrolyze ด้วยเอนไซม์ gelatinases และ collagenases หลายชนิด ทำให้ได้เปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งเรืองแสง fluorescence ได้มากขึ้น ทำให้สามารถประเมิน activity ของเอนไซม์ได้ ในชุดวิเคราะห์นี้จะใช้เอนไซม์ collagenase type IV จาก *Clostridium histolyticum* ซึ่งมี proteolytic activity ต่อ DQ^o gelatin สูง ในสภาวะการทดลองที่ไม่มีตัวยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) collagenase จะสลาย DQ^o gelatin อย่างรวดเร็วและให้เปปไทด์ที่เรืองแสง fluorescence ซึ่งวัดได้โดยใช้ 96-well fluorescence microplate reader (Victor^o multilable counter, Perkin Elmer, USA) โดยจะ set excitation wavelength ไว้ที่ 485 nm และ emission wavelength ที่ 535 nm

6.1 ชุดวิเคราะห์ collagenase activity: EnzCheck^o gelatinase/collagenase assay kit (E-12055, Molecular Probes, USA) ประกอบด้วย

6.1.1 10X reaction buffer 50 ml ประกอบด้วย 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl₂,

2 mM sodium azide, pH 7.6

6.1.2 lyophilized DQ^o gelatin จากหนึ่งหมู บรรจุใน vial

6.1.3 Collagenase, Type IV จาก *Clostridium histolyticum*

6.2 การเตรียม reaction mixture

6.2.1 เตรียม 1X reaction buffer 100 ml โดยการเจือจาง 10 ml ของ 10X reaction buffer ด้วย 90 ml deionized water

6.2.2 เติม 1.0 ml ของ deionized water ลงไปใน vial ของ lyophilized DQ^o gelatin เขย่าให้ละลาย จะได้ 1.0 mg/ml stock solution ของ DQ^o gelatin จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ 125 µg/ml working solution โดยเติม 1.0 ml ของ stock solution ลงใน 7.0 ml ของ 1X reaction buffer

6.2.3 ละลายผง collagenase, type IV ที่อยู่ใน vial ด้วย 0.5 ml deionized water จะได้ 1000 U/ml stock solution จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 1X reaction buffer จนได้ working solution ความเข้มข้น 0.25 U/ml

6.2.4 เตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง (sample) ที่จะทดสอบใน 1X reaction buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1.25 mg/ml นำมาเจือจางด้วย 1X reaction buffer จนกระทั่งได้ความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสมสำหรับสารทดสอบแต่ละตัว

6.3 การวัด collagenase activity

นำสารละลายต่างๆที่เตรียมข้างต้นมาผสมกันในแต่ละหลุมของ 96-well plate โดยปริมาตรรวมของ reaction mixture ในแต่ละหลุมคือ 200 µl ซึ่งมีปริมาตรและลำดับของการเติมสารต่างๆดังนี้

หลุม A (control)	120 µL ของ 1X reaction buffer (pH 7.6)
	40 µL ของ collagenase, type IV solution (0.25 U/mL)
	40 µL ของ DQ ^o gelatin 125 µg/mL
หลุม B (blank ของ A)	160 µL ของ 1X reaction buffer (pH 7.6)
	40 µL ของ DQ ^o gelatin 125 µg/mL
หลุม C (sample)	40 µL ของ 1X reaction buffer (pH 7.6)
	80 µL ของ sample solution in 1X reaction buffer (pH 7.6)
	40 µL ของ collagenase, type IV solution (0.25 U/mL)
	40 µL ของ DQ ^o gelatin 125 µg/mL
หลุม D (blank of C)	80 µL ของ 1X reaction buffer (pH 7.6)
	80 µL ของ sample solution in 1X reaction buffer (pH 7.6)
	40 µL ของ DQ ^o gelatin 125 µg/mL

ทั้งนี้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ทดสอบใน reaction mixture (C_2) จะเท่ากับ $[C_1V_1]/V_2$ เมื่อ C_1 และ V_1 คือความเข้มข้นเริ่มต้นและปริมาตรของสารทดสอบที่เติมลงใน reaction mixture และ V_2 คือ ปริมาตรสุดท้ายของ reaction mixture (200 μ l)

ปฏิกิริยาในแต่ละหลุมจะเริ่มหลังจากการเติม DQ^o gelatin เป็นตัวสุดท้าย ผสม reaction mixture ให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำ plate ไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่า % collagenase inhibition ของสารทดสอบที่แต่ละความเข้มข้นจากสูตร

$$\% \text{ collagenase inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100\%$$

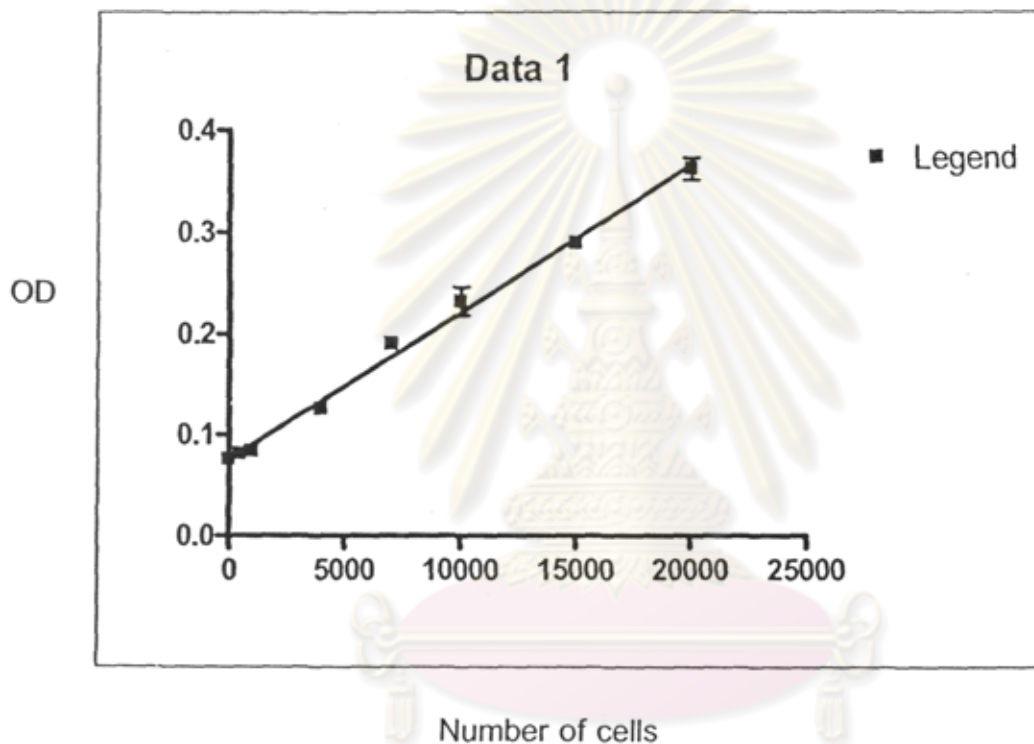
โดย A, B, C และ D คือค่า fluorescence emission intensity ของหลุม A, B, C และ D ตามลำดับ นำค่า % collagenase inhibition ไปพล็อตกราฟกับความเข้มข้นของสารทดสอบแต่ละตัว เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารทดสอบใน reaction mixture ที่ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) ทำการทดลองซ้ำข้างต้นอีกสองครั้งเพื่อให้ได้ $n = 3$ (triplicate) จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของ IC_{50} มาเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG, pine bark extract, Trolox และ L-ascorbic acid โดยใช้สถิติ ANOVA และ Tukey's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 5%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อการแพร่ขยาย (proliferation) ของเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง

รูปที่ 1 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 595 nm กับจำนวนเซลล์ fibroblast จะเห็นว่ากราฟที่จะได้จะเป็นเส้นตรง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย linear regression จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์แบบ linear equation ดังนี้ $Y = (1.456 \times 10^{-6}) X + 0.07501$ โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9852 โดย Y คือค่าการดูดกลืนแสง และ X คือจำนวนเซลล์ (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 Standard curve ที่ได้จากการ plot ระหว่างค่า OD กับ จำนวนเซลล์

ตารางที่ 1 ข้อมูล standard curve ระหว่างค่า Absorbance (OD) กับจำนวนของเซลล์

จำนวนเซลล์ (X)	OD1	OD2	OD3	average OD (Y)
0	0.075	0.076	0.076	0.076
500	0.081	0.081	0.080	0.081
1000	0.084	0.083	0.084	0.084
4000	0.123	0.132	0.122	0.126
7000	0.194	0.177	0.198	0.190
10000	0.260	0.220	0.215	0.232
15000	0.292	0.280	0.294	0.289
20000	0.377	0.367	0.341	0.362

สมการ $Y = 0.00001456 X + 0.07501$ ($r^2 = 0.9852$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ fibroblast ที่มีชีวิต (viable) ภายหลังจากการเติมสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับสารอ้างอิงคือ oxyresveratrol (สารสำคัญของสารสกัดจากแก่นมะหาด), epigallocatechin gallate (EGCG = สารสำคัญของสารสกัดจากใบชาเขียว), French pine bark extract (สารสกัดจากเปลือกสนฝรั่งเศส), L-ascorbic acid (vitamin C) และ Trolox^o (water-soluble vitamin E) ที่ความเข้มข้นช่วงเดียวกัน จากกราฟในรูปที่ 2 และค่าในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าสารทุกตัวสามารถเพิ่มการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast ได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งจะมีค่าสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารใดๆ (control) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA และ Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 % เพื่อหาความเข้มข้นของสารแต่ละตัวที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม พบว่าที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ของสารทุกตัวที่ทดสอบ ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากแก่นมะหาดหรือสารอ้างอิง สามารถเพิ่มจำนวน fibroblast ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$)

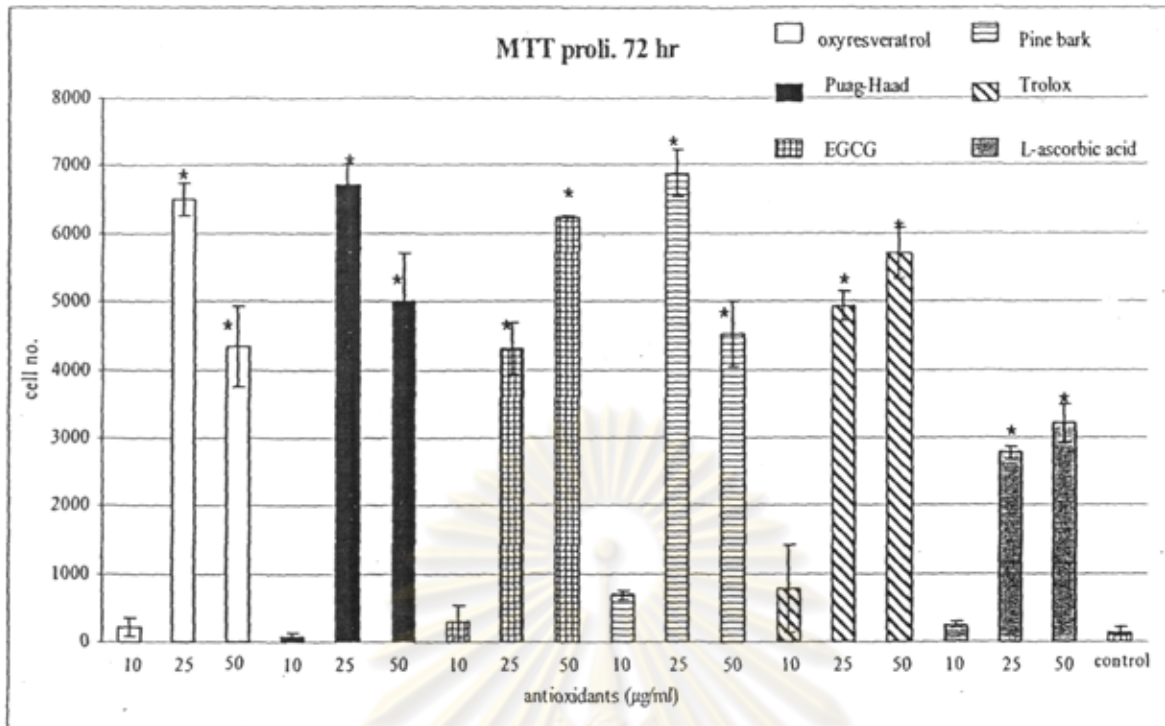


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ค่า OD ของสาร และจำนวน viable cell ที่ interpolate จาก standard curve

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	OD1	OD2	OD3	No. of cells			Average no. of cells	S.D.
					1	2	3		
Oxyresveratrol	10	0.076	0.08	0.078	68.0	342.7	205.4	205.4	137.4
	25	0.17	0.166	0.173	6524.0	6249.3	6730.1	6501.1	241.2
	50	0.137	0.13	0.147	4257.5	3776.8	4944.4	4326.2	586.8
Puag-Haad	10	0.076	0.077	0.076	68.0	136.7	68.0	90.9	39.7
	25	0.173	0.177	0.168	6730.1	7004.8	6386.7	6707.2	309.7
	50	0.138	0.148	0.158	4326.2	5013.0	5699.9	5013.0	686.8
EGCG	10	0.076	0.079	0.083	68.0	274.0	548.8	296.9	241.2
	25	0.138	0.143	0.132	4326.2	4669.6	3914.1	4303.3	378.3
	50	0.166	0.165	0.166	6249.3	6180.6	6249.3	6226.4	39.7
Pine bark	10	0.086	0.085	0.084	754.8	686.1	617.4	686.1	68.7
	25	0.17	0.18	0.175	6524.0	7210.9	6867.4	6867.4	343.4
	50	0.149	0.138	0.136	5081.7	4326.0	4188.9	4532.3	480.8
Trolox	10	0.081	0.097	0.081	411.4	1510.3	411.4	777.7	634.5
	25	0.144	0.15	0.146	4738.3	5150.4	4875.7	4921.5	209.8
	50	0.159	0.163	0.152	5768.5	6043.3	5287.8	5699.9	382.4
L-ascorbic acid	10	0.078	0.079	0.079	205.4	274.0	274.0	251.1	39.7
	25	0.115	0.114	0.117	2746.6	2677.9	2884.0	2769.5	104.9
	50	0.126	0.121	0.118	3502.1	3158.7	2952.6	3204.4	277.6
Control	0	0.076	0.077	0.078	68.0	136.7	205.4	136.7	68.7

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จำนวนเซลล์ที่หยอดเท่ากับ 4000 เซลล์ต่อหลุม

รูปที่ 2 กราฟแท่งเปรียบเทียบจำนวน viable cell ภายหลังการเติมสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และสารอ้างอิงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สาร (data = mean + SD, n = 3)

* แดกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05, Dunnett's test)

เมื่อพิจารณาผลเป็นรายตัว พบว่า oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดจากแก่นมะหาดจะให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ของ fibroblast เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสาร (136.68 ± 68.61 เซลล์) เป็น 205.36 ± 137.36 , 6501.15 ± 241.20 และ 4326.24 ± 586.81 เซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับ หรือคิดเป็น 1.5, 47.6 และ 31.7 เท่าของกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดจากแก่นมะหาดเองก็ให้ผลที่คล้ายกัน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ 25 และ 50 µg/ml จำนวนเซลล์จะเพิ่มจากกลุ่มควบคุมเป็น 6707.19 ± 309.70 และ 5013.05 ± 686.81 เซลล์ตามลำดับ หรือคิดเป็น 49.1 และ 36.7 เท่า ส่วนที่ความเข้มข้น 10 µg/ml จำนวนเซลล์จะลดลงเล็กน้อยเป็น 90.89 ± 39.65 (คิดเป็น 0.67 เท่า) แต่พบว่าไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05)

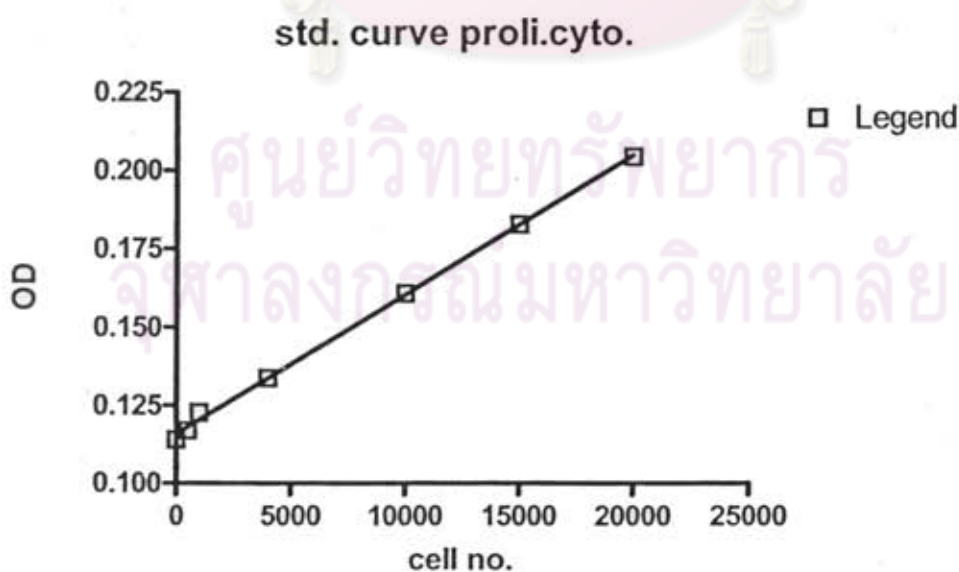
สำหรับสารอ้างอิงอื่นๆคือ EGCG จะเพิ่มการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast เป็น 2.2, 31.5 และ 45.6 เท่าของกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากเปลือกสนฝรั่งเศส (French pine bark extract) จะเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ 5.0, 50.2 และ 33.2 เท่า ส่วน Trolox เพิ่มขึ้น 5.7, 36.0 และ 41.7 เท่า และ L-ascorbic acid เพิ่มขึ้น 1.8, 20.3 และ 23.4 เท่าของกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับ

ดังนั้นผลการทดลองในครั้งนี้ จึงบ่งชี้ว่าสารทุกตัวมีคุณสมบัติช่วยให้เซลล์ fibroblast เจริญเติบโตและแพร่ขยายได้ดีขึ้น (proliferative effect) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้การที่ไม่พบการลดลงของจำนวน fibroblast น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยังบ่งชี้ว่าสารทุกตัวในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 10 ถึง 50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

2. การศึกษาพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากแก่นมะหาดต่อเซลล์ fibroblast ของผิวหนัง

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดสามารถช่วยเพิ่มการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอันหนึ่งของสารในกลุ่มต้านออกซิเดชันและต้านริ้วรอย อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic concentration) รวมถึงว่าถ้าเปลี่ยนแหล่งของเซลล์ fibroblast แล้ว ยังจะได้ผลแบบเดียวกันหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเปลี่ยนแหล่งที่มาของ fibroblast และทดลองซ้ำที่ความเข้มข้นเดิม (25 $\mu\text{g/ml}$) และศึกษาที่ความเข้มข้นสูงขึ้นอีกคือ 100 และ 250 $\mu\text{g/ml}$

รูปที่ 3 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 595 nm กับจำนวนเซลล์ fibroblast จะเห็นว่ากราฟที่จะได้จะเป็นเส้นตรง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย linear regression จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์แบบ linear equation ดังนี้ $Y = (4.452 \times 10^{-6}) X + 0.1157$ โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9951 โดย Y คือค่าการดูดกลืนแสง และ X คือจำนวนเซลล์ รายละเอียดของค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 3 Standard curve ที่ได้จากการ plot ระหว่างค่า OD กับ จำนวนเซลล์

ตารางที่ 3 ข้อมูล standard curve ระหว่างค่า Absorbance (OD) กับจำนวนของเซลล์ (cell number) และผลการทำ linear regression

จำนวนเซลล์ (x)	OD1	OD2	OD3	average OD (y)
0	0.114	0.113	0.115	0.114
500	0.117	0.118	0.116	0.117
1000	0.126	0.120	0.122	0.123
4000	0.134	0.133	0.134	0.134
10000	0.160	0.159	0.163	0.161
15000	0.180	0.186	0.182	0.183
20000	0.200	0.207	0.206	0.204

สมการ $y = 0.000004452x + 0.1157$
 $r^2 = 0.9951$

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ fibroblast ที่มีชีวิต (viable) ภายหลังจากเติมสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) ที่ความเข้มข้น 25, 100 และ 250 µg/ml เปรียบเทียบกับสารอ้างอิงคือ oxyresveratrol, EGCG, pine bark extract, Trolox^o และ L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้นช่วงเดียวกัน จากกราฟในรูปที่ 4 และค่าในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าสารทุกตัวสามารถเพิ่มการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสาร โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 µg/ml (P < 0.05, ANOVA และ Dunnett's test) จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6731.06 เซลล์ เป็น 15491.17, 16314.77, 18935.31, 13095.24, 8752.62 และ 8528.00 เซลล์สำหรับสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG, pine bark extract, Trolox^o และ L-ascorbic acid ตามลำดับ หรือคิดเป็น 2.30, 2.42, 2.81, 1.95, 1.30 และ 1.27 เท่า ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับการทดลองที่ 1 โดยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารอ้างอิงอื่นๆต่างก็มีผลกระตุ้นการแพร่ขยายของเซลล์ fibroblast ได้เช่นกัน แม้ว่าจะเปลี่ยนเซลล์ fibroblast เป็นแหล่งอื่นก็ตาม (อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนแหล่งของเซลล์ fibroblast และความแตกต่างของเวลาในการทดลอง อาจมีผลต่อความสามารถในการเติบโตและการตอบสนองต่อสารต้านออกซิเดชัน ดังจะเห็นได้จากความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในตารางที่ 2 และ 4 ซึ่งเซลล์รหัส CC 2511 (การทดลองที่ 2) จะมีจำนวนสูงกว่าเซลล์รหัส SIF 49 (การทดลองที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับสารชนิดและความเข้มข้นเดียวกัน

นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทุกตัวจาก 25 เป็น 100 และ 250 µg/ml พบว่าจำนวน viable fibroblast จะลดลง ซึ่งที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษาคือ 250 µg/ml จำนวนเซลล์จะลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) ในกรณีของสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG และ L-ascorbic acid โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เท่ากับ 2014.08, 292.00, 2987.42 และ 366.88 เซลล์ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่าสารทั้งสี่ตัวที่ความเข้มข้นนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ fibroblast อย่างไรก็ดี เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดจะมีพิษต่ำกว่าสาร

บริสุทธิของมัน (oxyresveratrol) เพราะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า รวมถึงยังมีความเป็นพิษต่ำกว่า L-ascorbic acid ด้วย

ส่วน pine bark extract และ Trolox^o ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml จะมีจำนวน viable fibroblast ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7180.29 และ 6132.08 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสองตัวนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG และ L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ส่วนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG และ pine bark extract แม้ว่าจะมีจำนวน viable fibroblast ลดลงจากที่ความเข้มข้น 25 µg/ml แต่ก็ยังสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงว่าที่ความเข้มข้นนี้ สารทั้งสี่ยังให้ผลเพิ่มการแพร่ขยายของเซลล์อยู่ (proliferative effect) ขณะที่ Trolox^o และ L-ascorbic acid ให้ผลไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) แม้จะให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงจากที่ความเข้มข้น 25 µg/ml เช่นกัน

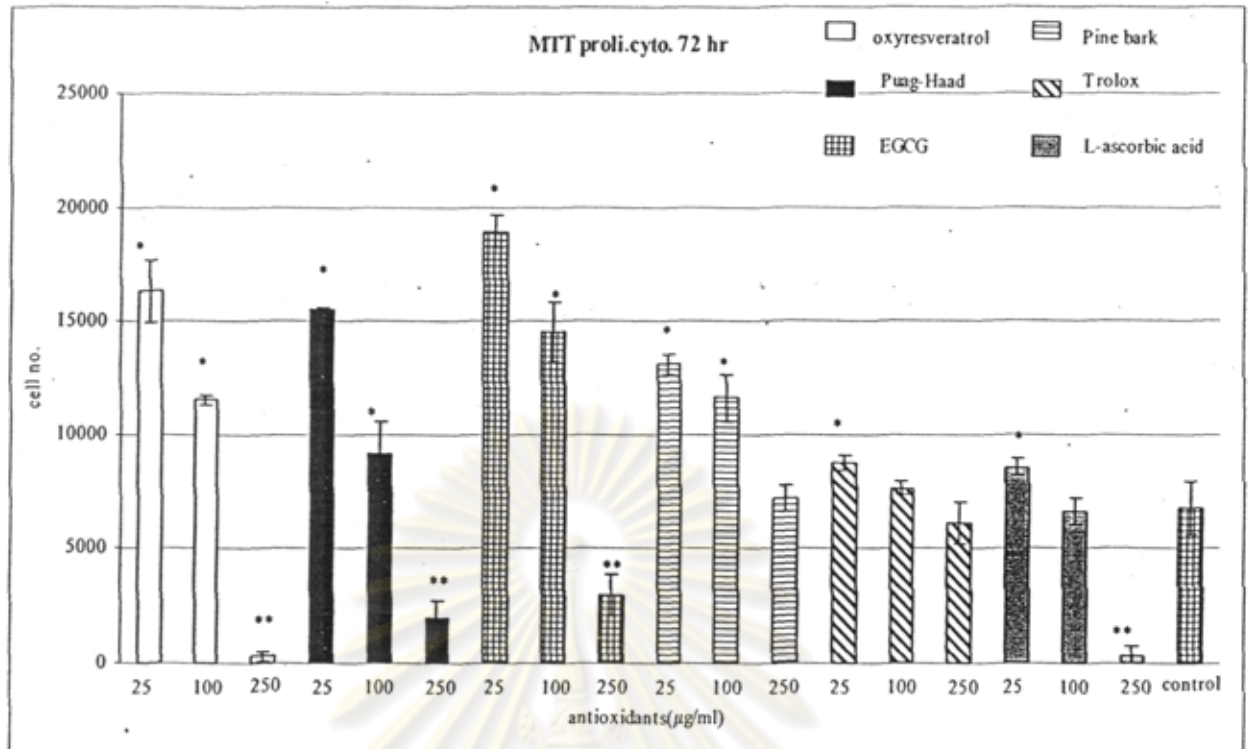


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ค่า OD ของสาร และจำนวน viable cell ที่ interpolate จาก standard curve

sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	OD1	OD2	OD3	No. of cells 1	No. of cells 2	No. of cells 3	Average	S.D.
Oxyresveratrol	25	0.195	0.187	0.183	17812.2	16015.3	15116.8	16314.8	1372.4
	100	0.168	0.167	0.166	11747.5	11522.9	11298.3	11522.9	224.6
	250	0.116	0.117	0.118	67.4	292.0	516.6	292.0	224.6
Puag-Haad	25	0.185	0.184	0.185	15566.0	15341.4	15566.0	15491.2	129.7
	100	0.161	0.149	0.159	10175.2	7479.8	9726.0	9127.0	1444.1
	250	0.127	0.121	0.126	2538.2	1190.5	2313.6	2014.1	722.0
EGCG	25	0.200	0.203	0.197	18935.3	19609.2	18261.5	18935.3	673.9
	100	0.187	0.176	0.178	16015.3	13544.5	13993.7	14517.8	1316.1
	250	0.129	0.133	0.125	2987.4	3885.9	2089.0	2987.4	898.5
Pine bark	25	0.172	0.176	0.174	12646.0	13544.5	13095.2	13095.2	449.2
	100	0.162	0.169	0.171	10399.8	11972.1	12421.4	11597.8	1061.5
	250	0.145	0.148	0.150	6581.3	7255.2	7704.4	7180.3	565.3
Trolox	25	0.153	0.156	0.155	8378.3	9052.1	8827.5	8752.6	343.1
	100	0.149	0.149	0.151	7479.8	7479.8	7929.0	7629.5	259.4
	250	0.143	0.139	0.147	6132.1	5233.6	7030.5	6132.1	898.5
L-ascorbic acid	25	0.154	0.155	0.152	8602.9	8827.5	8153.6	8528.0	343.1
	100	0.144	0.148	0.143	6356.7	7255.2	6132.1	6581.3	594.3
	250	0.117	0.119	0.116	292.0	741.2	67.4	366.9	343.1
Control	0	0.150	0.147	0.140	7704.4	7030.5	5458.2	6731.1	1152.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จำนวนเซลล์ที่หอดเท่ากับ 4000 เซลล์ต่อหลุม

รูปที่ 4 กราฟแท่งเปรียบเทียบจำนวน viable cell ภายหลังจากเติมสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และสารอ้างอิงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สาร (data = mean + SD, n = 3)

- * มากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05, Dunnett's test)
- ** คำน้อยกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05, Dunnett's test)

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide

รูปที่ 5 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 595 nm กับจำนวนเซลล์ fibroblast จะเห็นว่ากราฟที่จะได้จะเป็นเส้นตรง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย linear regression จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์แบบ linear equation ดังนี้ $Y = (1.954 \times 10^{-5}) X + 0.0691$ โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9945 โดย Y คือค่าการดูดกลืนแสง และ X คือจำนวนเซลล์ รายละเอียดของค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ fibroblast ที่มีชีวิต (viable) ภายหลังจาก expose กับ 2 mM H_2O_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (H_2O_2 treatment) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ซึ่งถูก pre-treated ด้วยสารสกัด

จากแก่นมะหาด (Puag-Haad) หรือสารอ้างอิงอื่นๆ (oxyresveratrol, French pine bark, EGCG, L-ascorbic acid, Trolox) ที่ความเข้มข้น 0 (control), 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟในรูปที่ 6 และข้อมูลในตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าสารทุกตัวสามารถเพิ่มจำนวน viable fibroblasts ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม (control) ซึ่งไม่ถูก pre-treat ด้วยสารใดๆ (ได้รับแต่ H_2O_2) ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 25 - 100 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA และ Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 5 % พบว่าทุกความเข้มข้นของสารทุกตัวที่ทดสอบ (25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) ไม่ว่าจะเป็สารสกัดจากแก่นมะหาด หรือสารอ้างอิง ยกเว้น L-ascorbic acid สามารถให้จำนวน viable fibroblast ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ขณะเดียวกันกลุ่มที่ไม่ได้สัมผัสกับ H_2O_2 (untreated) จะมีเซลล์เหลืออยู่มากที่สุด เพราะไม่ถูกทำลายด้วย H_2O_2 โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เท่ากับ 10774.14 ± 332.98 ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใส่ลงไปในแต่ละหลุม (10,000 เซลล์ต่อหลุม) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งสัมผัสกับ H_2O_2 แล้ว จะมีจำนวนเซลล์สูงกว่า ประมาณ 2.94 เท่า

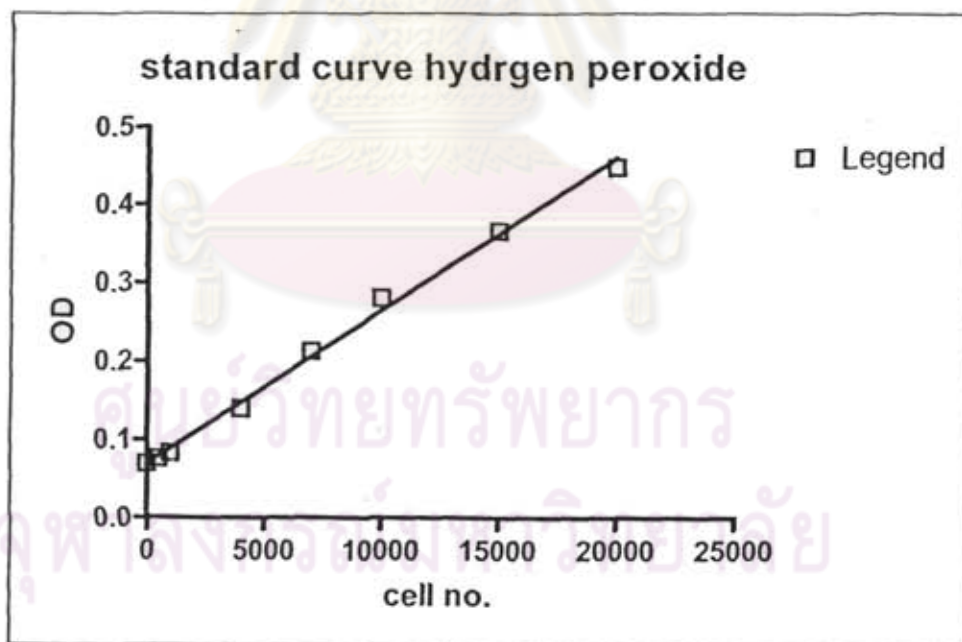
เมื่อพิจารณาผลเป็นรายตัว พบว่า oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดจากแก่นมะหาดจะให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ fibroblast เท่ากับ 7345.28 ± 179.73 , 6424.09 ± 128.79 และ 7908.22 ± 384.11 เซลล์ ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งทุกความเข้มข้นมีค่ามากกว่ากลุ่ม control (3660.53 ± 281.86 เซลล์) หรือคิดเป็น 2.0, 1.75 และ 2.16 เท่าของกลุ่ม control ในขณะที่สารสกัดจากแก่นมะหาดก็ให้ผลที่คล้ายกัน โดยที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ จะช่วยป้องกัน fibroblast จากการทำลายของ H_2O_2 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 6901.74 ± 204.71 , 6748.21 ± 204.71 และ 7396.45 ± 128.79 เซลล์ตามลำดับ หรือคิดเป็น 1.89, 1.84 และ 2.02 เท่า

สำหรับสารอ้างอิงอื่นๆคือ EGCG จะให้จำนวนเซลล์ fibroblast สูงเป็น 2.22, 2.22 และ 2.38 เท่าของกลุ่ม control ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากเปลือกสนฝรั่งเศส (French pine bark extract) จะเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ 2.02, 2.22 และ 2.54 เท่า ส่วน Trolox เพิ่มขึ้น 1.96, 1.86 และ 1.82 เท่า

สำหรับ L-ascorbic acid เป็นที่น่าสังเกตว่าจะช่วยให้เซลล์ fibroblast รอดจากพิษของ H_2O_2 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control เฉพาะที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น (เพิ่มขึ้น 1.80 เท่า; $P < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นสูงกวานี้ กลับส่งผลให้เซลล์ตายมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับแต่ H_2O_2 อย่างเดียว โดยคิดเป็น 0.78 และ 0.32 เท่า ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ($P < 0.05$)

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในส่วนนี้ จึงบ่งชี้ว่าสารต้านออกซิเดชันที่ศึกษาทุกตัว สามารถช่วยป้องกันหรือลดการตายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจาก oxidative stress โดยเฉพาะอย่างยิ่งจาก H_2O_2 ได้ และสารสกัดจากแก่นมะหาดก็ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายดังกล่าวได้ใกล้เคียงกับ oxyresveratrol, EGCG, French pine bark extract และ Trolox

อย่างไรก็ดี เนื่องจาก L-ascorbic acid ให้ผลป้องกันเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า L-ascorbic acid กลับทำให้เซลล์ตายมากขึ้นกว่ากลุ่ม control ซึ่งได้รับแต่ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว ซึ่งสาเหตุที่แท้จริง ยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่สันนิษฐานว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากความแปรปรวนของผลการทดลอง (biological variation) หรืออาจเป็นเพราะ L-ascorbic acid อาจมีฤทธิ์ของ pro-oxidant ได้ด้วย (Halliwell, 1997; Cadenas 1995) โดยอาจไปเสริมความเป็นพิษของ H_2O_2 ที่มีต่อ fibroblast ให้มากขึ้น โดยตัว L-ascorbic acid สามารถที่จะ reduce Fe^{3+} ให้กลับมาอยู่ในรูป Fe^{2+} ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 แล้วได้เป็น hydroxyl radical ตาม Fenton reaction ซึ่ง hydroxyl radical จัดเป็นอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดตัวหนึ่ง โดยสันนิษฐานว่าใน fetal bovine serum ที่เติมลงใน medium เลี้ยงเซลล์นั้น อาจมี Fe^{3+} ปนเปื้อนอยู่ จึงเป็นโอกาสให้ L-ascorbic acid ที่เติมลงไป สามารถ regenerate Fe^{2+} ได้ ทำให้เกิด hydroxyl radical อย่างต่อเนื่อง และทำอันตรายต่อเซลล์ ทำให้ยังเพิ่มความเข้มข้นของ L-ascorbic acid เซลล์จึงยิ่งตายมากขึ้น เสริมความเป็นพิษของ H_2O_2 อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงต่อไป



รูปที่ 5 Standard curve ที่ได้จากการ plot ระหว่างค่า OD กับ จำนวนเซลล์

ตารางที่ 5 ข้อมูล standard curve ระหว่างค่า Absorbance (OD) กับจำนวนของเซลล์ (cell number)และผลการ
ทำ linear regression

จำนวนเซลล์ (x)	OD1	OD2	OD3	average OD (y)
0	0.073	0.067	0.069	0.070
500	0.074	0.078	0.076	0.076
1000	0.083	0.087	0.079	0.083
4000	0.150	0.142	0.128	0.140
7000	0.206	0.219	0.213	0.213
10000	0.272	0.292	0.278	0.281
15000	0.361	0.373	0.366	0.367
20000	0.452	0.447	0.445	0.448

สมการ

$$Y = 0.00001954 X + 0.06914$$

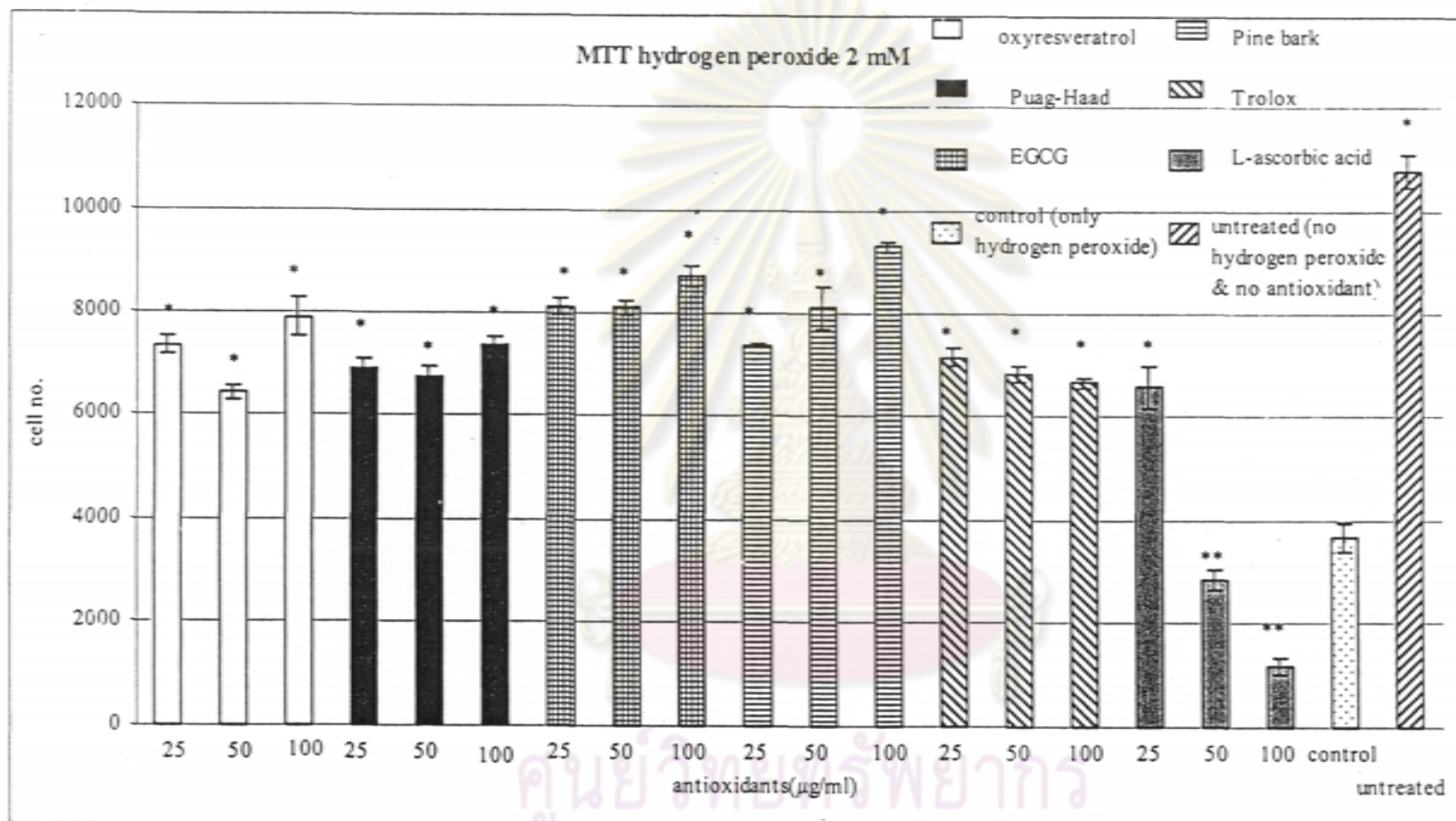
$$r^2 = 0.9945$$



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่า OD ของสาร และจำนวน viable cell ที่ interpolate จาก standard curve

Sample	H ₂ O ₂ 2 mM	Conc. (µg/ml)	OD			No. of cells 1	No. of cells 2	No. of cells 3	Average	S.D.
			OD1	OD2	OD3					
Oxyresveratrol	Yes	25	0.213	0.216	0.209	7362.3	7515.9	7157.6	7345.3	179.7
		50	0.195	0.192	0.197	6441.1	6287.6	6543.5	6424.1	128.8
		100	0.224	0.231	0.216	7925.3	8283.5	7515.9	7908.2	384.1
Puag-Haad	Yes	25	0.2	0.208	0.204	6697.0	7106.4	6901.7	6901.7	204.7
		50	0.201	0.197	0.205	6748.2	6543.5	6952.9	6748.2	204.7
		100	0.214	0.216	0.211	7413.5	7515.9	7260.0	7396.5	128.8
EGCG	Yes	25	0.228	0.231	0.225	8130.0	8283.5	7976.5	8130.0	153.5
		50	0.228	0.23	0.225	8130.0	8232.3	7976.5	8112.9	128.8
		100	0.235	0.242	0.242	8488.2	8846.5	8846.5	8727.1	206.8
Pine bark	Yes	25	0.213	0.213	0.214	7362.3	7362.3	7413.5	7379.4	29.5
		50	0.223	0.237	0.223	7874.1	8590.6	7874.1	8112.9	413.7
		100	0.253	0.251	0.249	9409.4	9307.1	9204.7	9307.1	102.4
Trolox	Yes	25	0.211	0.211	0.205	7260.0	7260.0	6952.9	7157.6	177.3
		50	0.2	0.201	0.206	6697.0	6748.2	7004.1	6816.4	164.5
		100	0.201	0.197	0.2	6748.2	6543.5	6697.0	6662.9	106.5
L-ascorbic acid	Yes	25	0.205	0.199	0.189	6952.9	6645.9	6134.1	6577.6	413.7
		50	0.128	0.125	0.121	3012.3	2858.8	2654.0	2841.7	179.7
		100	0.089	0.092	0.095	1016.4	1169.9	1323.4	1169.9	153.5
Control	Yes	0	0.146	0.141	0.135	3933.5	3677.6	3370.5	3660.5	281.9
Untreated	No	0	0.273	0.286	0.28	10433.0	11098.3	10791.2	10774.1	333.0



รูปที่ 6 กราฟแท่งแสดงจำนวน viable cell ที่เหลืออยู่ภายหลังจากการเติมสารทดสอบในความเข้มข้นต่างๆร่วมกับ hydrogen peroxide 2 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับแต่ hydrogen peroxide (control) และกลุ่ม untreated ซึ่งไม่ได้รับทั้งสารทดสอบและ hydrogen peroxide (data = mean \pm SD, n = 3)

- * มากกว่ากลุ่มควบคุม (control) ซึ่งถูก treat ด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, Dunnett's test)
- ** น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (control) ซึ่งถูก treat ด้วย H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, Dunnett's test)

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A

เป็นที่ทราบกันดีว่ารังสี ultraviolet โดยเฉพาะรังสี UV-A เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผิวหนังเกิดการแก่ก่อนวัย อันเนื่องมาจากสมบัติในการผ่านผิวหนังได้ดีกว่ารังสี UV-B โดยรังสี UV-A สามารถผ่านมาถึงชั้น dermis และออกฤทธิ์ทำลาย fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในชั้นนี้ที่ช่วยสร้าง structural proteins ที่จำเป็นต่อความแข็งแรงของผิวหนัง เช่น collagen และ elastin วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อดูถึงความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันหรือลดการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี UV-A ซึ่งจัดเป็นตัวการที่ก่อให้เกิด oxidative stress ที่สำคัญที่สุดคือเซลล์ผิวหนัง

รูปที่ 7 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 595 nm กับจำนวนเซลล์ fibroblast จะเห็นว่ากราฟที่จะได้จะเป็นเส้นตรง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย linear regression จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์แบบ linear equation ดังนี้ $Y = (1.478 \times 10^{-5})X + 0.1422$ โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9710 โดย Y คือค่าการดูดกลืนแสง และ X คือจำนวนเซลล์ รายละเอียดของค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ fibroblast ที่มีชีวิต (viable) ภายหลังจาก expose กับรังสี UV-A ในปริมาณ 20 J/cm² เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ซึ่งถูก pre-treated ด้วยสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) หรือสารอ้างอิงอื่นๆ (oxyresveratrol, French pine bark, EGCG, L-ascorbic acid, Trolox) ที่ความเข้มข้น 0 (control), 25, 50 และ 100 µg/ml

จากกราฟในรูปที่ 8 และข้อมูลในตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าสารทุกตัวสามารถเพิ่มจำนวน viable fibroblasts ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม (control) ซึ่งไม่ถูก pre-treat ด้วยสารใดๆ (ได้รับแต่รังสี UV-A) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย ANOVA และ Dunnett's test พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สารทดสอบทุกตัว สามารถให้จำนวน viable fibroblast เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะเดียวกันกลุ่ม untreated จะมีเซลล์เหลืออยู่มากที่สุด เพราะไม่ถูกทำลายด้วยรังสี UV-A โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เท่ากับ 27907.1 ± 1257.3 เซลล์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control แล้ว (7767.3 ± 473.6) จะมีจำนวนเซลล์สูงกว่าประมาณ 3.59 เท่า

เมื่อพิจารณาผลเป็นรายตัว พบว่า oxyresveratrol จะให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ fibroblast เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นโดยเท่ากับ 3888.1 ± 710.7 , 11353.2 ± 179.0 และ 13292.7 ± 1387.1 เซลล์ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/mL มีค่ามากกว่ากลุ่ม control (7767.3 ± 473.6 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หรือคิดเป็น 1.46 และ 1.71 เท่า อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ศึกษาคือ 25 µg/mL oxyresveratrol ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblast ให้มากกว่ากลุ่ม control ได้ และเมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Dunnett's test กลับพบว่าจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นนี้จะต่ำกว่า control ($P <$

0.01) หรือเท่ากับ 0.50 เท่าของ control ซึ่งสาเหตุที่ทำให้จำนวนเซลล์กลับลดลงที่ความเข้มข้นต่ำนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้

สำหรับสารสกัดจากแก่นมะหาดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ จะให้จำนวน fibroblast ที่รอดชีวิตเท่ากับ 2061.3 ± 1079.0 , 5872.8 ± 2394.0 และ 12977.0 ± 294.9 เซลล์ตามลำดับ หรือคิดเป็น 0.27, 0.76 และ 1.67 เท่า เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา (100 $\mu\text{g/ml}$) เท่านั้นที่ให้ผลป้องกันการทำลายของเซลล์ (protective effect) เพราะให้จำนวน fibroblast ที่รอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ยังไม่สูงพอที่จะให้ protective effect โดยที่จำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ นี้จะต่ำกว่ากลุ่ม control ($P < 0.05$) แต่ที่ 50 $\mu\text{g/ml}$ จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่สูงกว่า control ($P > 0.05$)

ส่วนสารอ้างอิงอื่นๆคือ EGCG, pine bark extract และ Trolox จะให้ฤทธิ์ป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast ที่คล้ายคลึงกับสารสกัดจากแก่นมะหาดมาก โดยที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ EGCG จะให้จำนวนเซลล์ fibroblast ที่รอดชีวิตคิดเป็น 0.49, 0.74 และ 1.57 เท่าของกลุ่ม control ส่วน pine bark extract จะให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 0.27, 1.19 และ 1.76 เท่า และ Trolox จะให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 0.20, 0.93 และ 2.18 เท่า ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติ จะพบว่าสารทั้งสามตัวจะให้ protective effect ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา (100 $\mu\text{g/ml}$; $P < 0.05$) ขณะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ยังไม่สูงพอที่จะให้ protective effect โดยที่จำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ นี้จะต่ำกว่ากลุ่ม control ($P < 0.05$) แต่ที่ 50 $\mu\text{g/ml}$ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่สูงกว่า control ($P > 0.05$) ในลักษณะเดียวกับสารสกัดจากแก่นมะหาด ซึ่งสาเหตุที่ สารสกัดจากแก่นมะหาด, EGCG, pine bark extract และ Trolox ที่ความเข้มข้นต่ำๆ กลับให้ค่าจำนวน fibroblast ที่ต่ำกว่า control ยังไม่สามารถอธิบายได้ โดยคาดว่าส่วนนี้อาจมาจากความแปรปรวนทางชีวภาพของผลการทดลอง (biological variation) หรืออาจเป็นเพราะเซลล์ในภาวะ oxidative stress ภายใต้รังสี UV-A อาจทำให้เซลล์อ่อนแอลง ทำให้ไวต่อสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้มากขึ้นจึงตายมากกว่าตอนที่ไม่มีสาร (เกิด cytotoxic effect) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น คุณสมบัติในการเป็น ROS scavenger และต้านออกซิเดชันของสารเหล่านี้จะเด่นมากขึ้น ทำให้ช่วยลดอันตรายจากรังสี UV-A ได้ (เกิด protective effect)

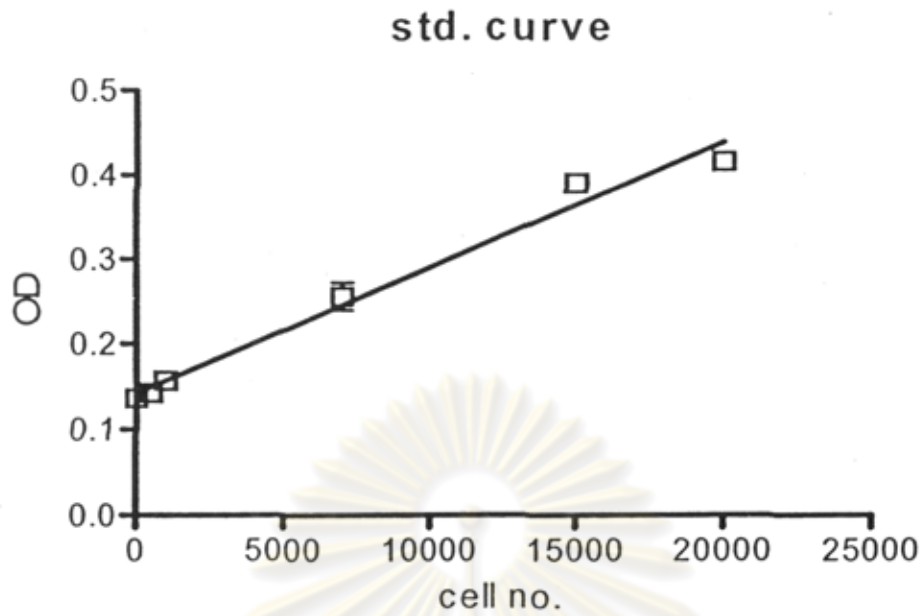
สำหรับ L-ascorbic acid จะช่วยป้องกันให้เซลล์ fibroblast รอดจากอันตรายของรังสี UV-A เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ได้ทุกความเข้มข้น โดยจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะเพิ่มขึ้นคิดเป็น 1.91, 3.05 และ 3.58 เท่าของกลุ่ม control ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าจะมีค่าสูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น ($P < 0.05$) ซึ่งผล protective effect ของ L-ascorbic acid ต่อการทำลายของเซลล์จากรังสี UV-A จะตรงข้ามกับผล protective effect ต่อพิษของ H_2O_2 ซึ่ง L-ascorbic acid จะให้ผลป้องกันเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำๆ (25 $\mu\text{g/ml}$) เท่านั้น แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) กลับจะยิ่งเสริมความเป็นพิษของ H_2O_2 ขณะที่ภายใต้อิทธิพลของรังสี UV-A L-ascorbic acid จะมีประสิทธิภาพในการ

ช่วยป้องกันเซลล์ได้ตลอด โดยยิ่งความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 25 ไปเป็น 100 $\mu\text{g/ml}$ ประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งสาเหตุของผลลัพธ์ที่ขัดแย้งกัน ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากชนิดของ oxidative stress ที่แตกต่างกัน ทำให้ L-ascorbic acid ออกฤทธิ์ในการป้องกันหรือเสริมความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ต่างกัน โดย L-ascorbic acid อาจทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 โดยตรง แล้วได้สารที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น หรืออาจช่วย regenerate Fe^{2+} ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 แล้วได้ hydroxyl radical ที่เป็นพิษต่อเซลล์ดังที่ได้วิจารณ์ผลในหัวข้อการทดลองก่อนหน้านี้ไปแล้ว

จากผลการทดลองในส่วนนี้ สามารถสรุปได้ว่าสารต้านออกซิเดชันที่ศึกษาทุกตัว มีคุณสมบัติช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี UV-A ได้ แต่ประสิทธิภาพอาจแตกต่างกัน โดย L-ascorbic acid จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันสูงสุดตลอดช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (25 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$) ส่วน oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารสำคัญของสารสกัดจากแก่นมะหาดจะให้ประสิทธิภาพรองลงมาคือสามารถให้ protective effect ได้ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่สารสกัดจากแก่นมะหาด, EGCG, pine bark extract และ Trolox จะมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน โดยให้ฤทธิ์ป้องกันการทำลายที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา คือ 100 $\mu\text{g/ml}$



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 Standard curve ที่ได้จากการ plot ระหว่างค่า OD กับ จำนวนเซลล์

ตารางที่ 7 ข้อมูล standard curve ระหว่างค่า Absorbance (OD) กับจำนวนของเซลล์ (cell number)และผลการทำ linear regression

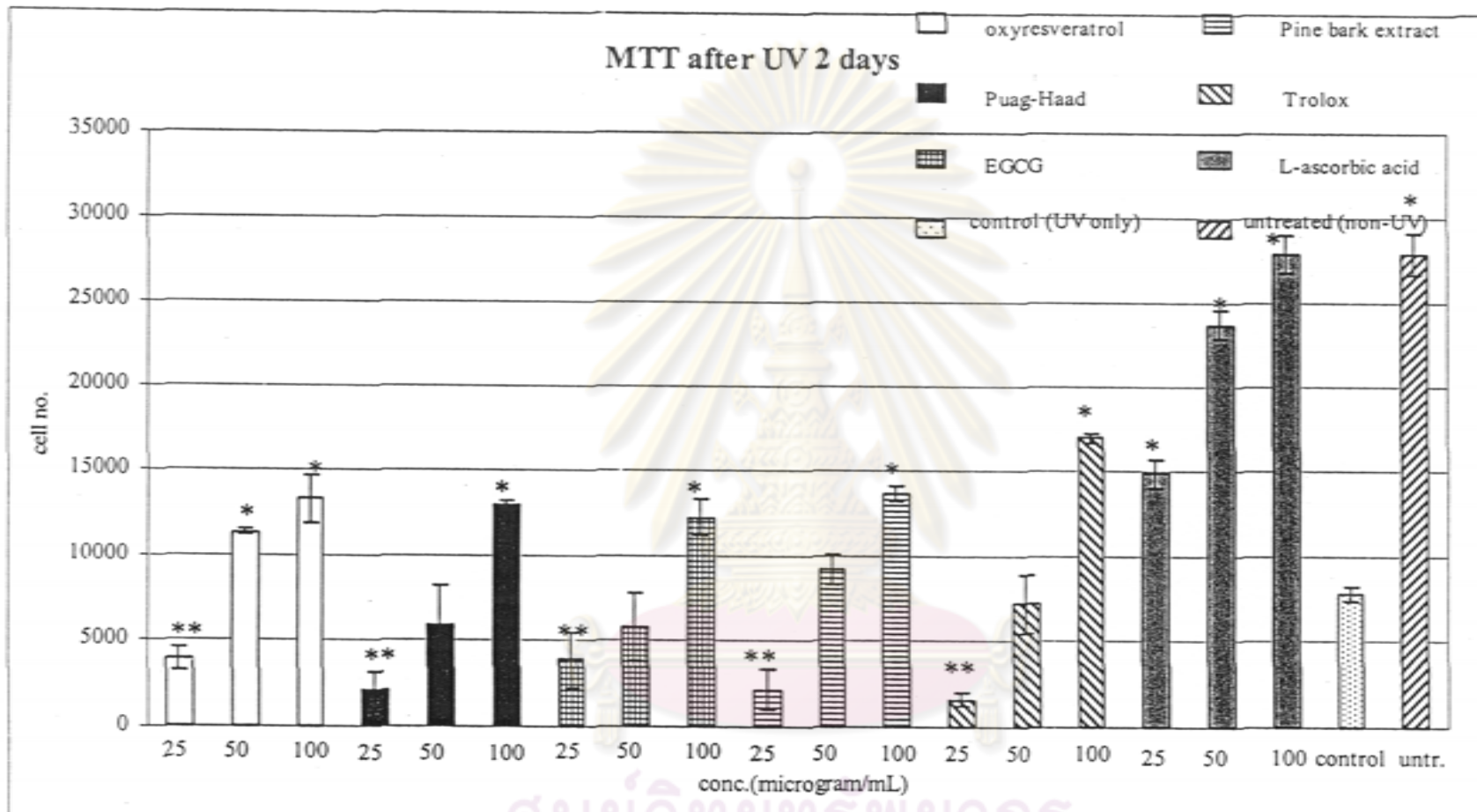
จำนวนเซลล์ (X)	OD1	OD2	OD3	average OD (Y)
0	0.140	0.138	0.131	0.136
500	0.137	0.143	0.148	0.143
1000	0.164	0.150	0.156	0.157
7000	0.226	0.258	0.283	0.256
15000	0.407	0.385	0.378	0.390
20000	0.426	0.424	0.395	0.415

สมการ $Y = 0.00001478 X + 0.1422$

$r^2 = 0.9710$

ตารางที่ 8 ค่า OD ของสาร และจำนวน viable cell ที่ interpolate จาก standard curve ภายหลังจากส่องด้วยรังสี UV-A (20 J/cm^2)

Sample	UV-A treated	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	OD1	OD2	OD3	cell no.1	cell no. 2	cell no.3	Average	S.D.
Oxyresveratrol	Yes	25	0.210	0.189	0.200	4587.3	3166.4	3910.7	3888.1	710.7
		50	0.308	0.309	0.313	11217.9	11285.5	11556.2	11353.2	179.0
		100	0.359	0.318	0.339	14668.5	11894.5	13315.3	13292.7	1387.1
Puag-Haad	Yes	25	0.165	0.191	0.162	1542.6	3301.8	1339.6	2061.3	1079.0
		50	0.223	0.267	0.197	5466.8	8443.8	3707.7	5872.8	2394.0
		100	0.331	0.339	0.332	12774.0	13315.3	12841.7	12977.0	294.9
EGCG	Yes	25	0.219	0.205	0.173	5196.2	4249.0	2083.9	3843.0	1595.4
		50	0.226	0.198	0.257	5669.8	3775.4	7767.3	5737.5	1996.8
		100	0.307	0.338	0.324	11150.2	13247.6	12300.4	12232.7	1050.4
Pine bark	Yes	25	0.174	0.156	0.191	2151.6	933.7	3301.8	2129.0	1184.2
		50	0.293	0.271	0.271	10203.0	8714.5	8714.5	9210.6	859.4
		100	0.341	0.339	0.352	13450.6	13315.3	14194.9	13653.6	473.6
Trolox	Yes	25	0.160	0.172	0.165	1204.3	2016.2	1542.6	1587.7	407.8
		50	0.274	0.249	0.223	8917.5	7226.0	5466.8	7203.4	1725.4
		100	0.397	0.393	0.389	17239.5	16968.9	16698.2	16968.9	270.6
L-Ascorbic acid	Yes	25	0.375	0.360	0.351	15751.0	14736.1	14127.2	14871.4	820.3
		50	0.480	0.505	0.493	22855.2	24546.7	23734.8	23712.2	846.0
		100	0.572	0.540	0.549	29079.8	26914.7	27523.7	27839.4	1116.5
Control	Yes	0	0.250	0.264	0.257	7293.6	8240.9	7767.3	7767.3	473.6
Untreated	No	0	0.542	0.546	0.576	27050.1	27320.7	29350.5	27907.1	1257.3



รูปที่ 8 กราฟแท่งแสดงจำนวน viable cell ที่เหลืออยู่ภายหลังการส่องด้วยรังสี UV-A (20 J/cm^2) ในสภาวะที่มีสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งได้รับแต่รังสี UV-A โดยไม่มีสารทดสอบ และกลุ่ม untreated ซึ่งไม่ได้รับทั้งสารทดสอบและรังสี (data = mean \pm SD, n = 3) หมายเหตุ จำนวนเริ่มต้นที่ 10000 เซลล์ต่อหลุม

- * มากกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, Dunnett's test)
- ** น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, Dunnett's test)

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast อันเนื่องมาจากรังสี ultraviolet A

จากการทดลองก่อนหน้านี ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด oxyresveratrol และสารต้านออกซิเดชันทุกตัวที่ศึกษา สามารถช่วยป้องกันหรือลดอันตรายจากรังสี UV-A ที่มีต่อเซลล์ fibroblast ได้ วัตถุประสงค์ของการทดลองในส่วนนี้จึงเป็นการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูว่ากลไกการป้องกันเซลล์จากรังสี UV-A นี้เกี่ยวข้องกับ การป้องกัน DNA หรือไม่ เพราะถ้า DNA ของเซลล์มีการถูกทำลาย เซลล์จะสูญเสีย viability และ ความมาด้วยการตาย ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบ necrosis และ apoptosis ในการทดลองนี้จะประเมิน viability และสถานะของเซลล์โดยการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ของเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry ซึ่งใช้ propidium iodide (PI) เป็นตัวย้อมสี DNA โดยตัวมันจะไป intercalate ระหว่างโมเลกุลของเบสใน DNA ในอัตราส่วนหนึ่ง โมเลกุลของสีคือ 4-5 base pairs ของ DNA จึงนิยมใช้ PI ในการตรวจสอบการเกิด apoptosis ของเซลล์ โดยเฉพาะในช่วงท้ายๆของขบวนการ (Lecoeur, 2002)

เมื่อตัวอย่างเซลล์ซึ่งย้อมด้วย PI ไหลผ่านเครื่อง flow cytometer จะเรืองแสง fluorescence ทำให้วิเคราะห์หาปริมาณ DNA ในเซลล์ได้ โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะคำนวณออกมาและสร้างเป็น DNA histogram ซึ่งเป็นกราฟที่พล็อตระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ (cell count) กับค่าความเข้ม (intensity) ของ PI fluorescence โดยเซลล์ที่เกิด apoptosis หรือมีการทำลายของ DNA จะให้ค่าความเข้มของการเรืองแสง fluorescence ที่ต่ำ และให้ peak ในช่วงต้นๆของ DNA histogram เรียกว่า subG₀/G₁ phase (Nicoletti et al., 1991) ยิ่งเซลล์ตายมากเท่าใด (DNA ถูกทำลายมาก) ความสูงของ subG₀/G₁ peak จะยิ่งมาก ขณะที่เซลล์ซึ่งยังมีชีวิตและอยู่ใน phase อื่นๆของ cell cycle จะสามารถแบ่งตัวได้ จึงมี DNA ที่ไม่ถูกทำลายและสามารถสังเคราะห์ DNA เพิ่มใหม่ได้อีก ทำให้ค่าความเข้ม fluorescence สูงขึ้นและเห็นเป็น peak ค่อยๆมาใน histogram ได้แก่ peak ของเซลล์ในช่วง G₀/G₁ phase (เซลล์เตรียมการสังเคราะห์ DNA ใหม่), S phase (เซลล์อยู่ระหว่างการ duplicate DNA), G₂ phase (เซลล์มีจำนวน DNA เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของ G₁ และพร้อมที่จะแบ่งตัว) และ M phase (DNA แยกออกจากกันเป็น 2 daughter cell) ซึ่งเปอร์เซ็นต์หรือสัดส่วนของเซลล์ที่อยู่ในแต่ละ phase สามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของ DNA histogram ในช่วงต่างๆของ cell cycle จึงสามารถใช้สัดส่วนของเซลล์ที่อยู่ใน subG₀/G₁ phase เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงปริมาณการถูกทำลายของ DNA หรือการตายของเซลล์ได้ (BD biosciences, 2003)

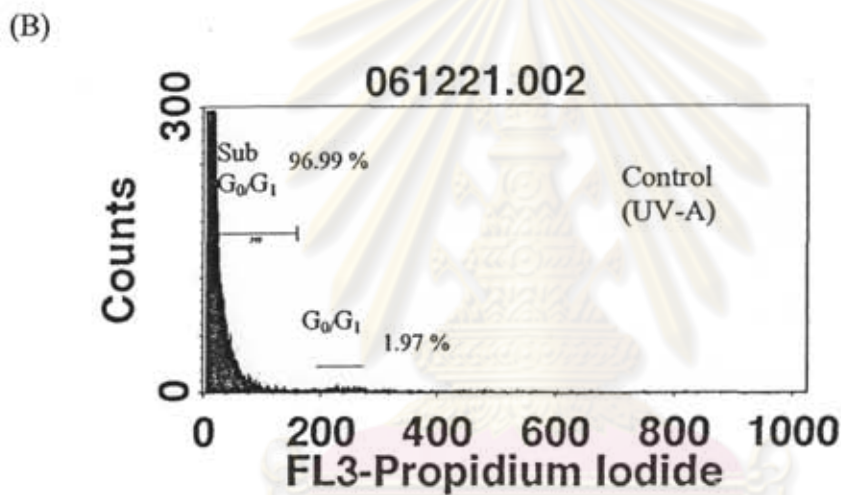
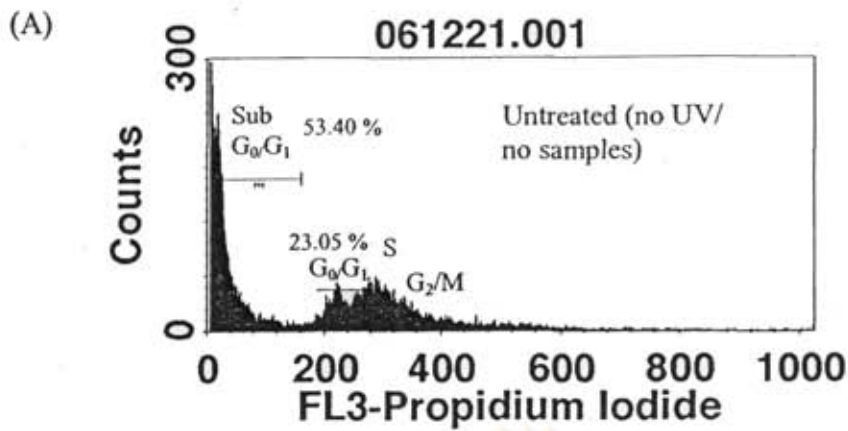
ตารางที่ 9 แสดงถึงสัดส่วนของเซลล์ fibroblast ที่อยู่ใน subG₀/G₁ phase ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย flow cytometer เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้ถูกส่องด้วยรังสี UV-A กับเซลล์ที่ถูกส่องด้วยรังสีในภาวะที่มีและไม่มีสารทดสอบ ส่วนรูปที่ 9A-F เป็นตัวอย่างของ DNA histogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะต่างๆคือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกส่องด้วยรังสี UV-A 20 J/cm² (untreated cells = A), เซลล์กลุ่มควบคุมที่ถูกส่องด้วยรังสีแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (control = B), เซลล์ที่ถูกส่องด้วยรังสีและได้รับการ pretreat ด้วยสารสกัดจากแก่นมะหาด (C, D) และ oxyresveratrol (E, F) ตามลำดับ

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ของ fibroblast ใน subG₀/G₁ phase ภายหลังจากย้อมสีด้วย propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้ถูกส่องด้วยรังสี UV-A (untreated) และเซลล์ที่ถูกส่องด้วยรังสีภายใต้สภาวะที่ไม่มีสาร (control) และมีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ oxyresveratrol

Sample	% sub G ₀ /G ₁ phase (n1)	% sub G ₀ /G ₁ phase (n2)	% sub G ₀ /G ₁ phase (n3)	Average	SD
Untreated	53.40	55.81	58.34	55.85	2.47
Control	96.99	93.43	74.57	88.33	12.05
Puag-Haad 25µg/mL	86.73	85.56	64.53	78.94	12.49
Puag-Haad 50µg/mL	79.29	79.50	62.75	73.85	9.61
oxyresveratrol 25µg/mL	79.68	82.33	64.95	75.65	9.36
oxyresveratrol 50µg/mL	78.26	81.22	62.28	73.92	10.19

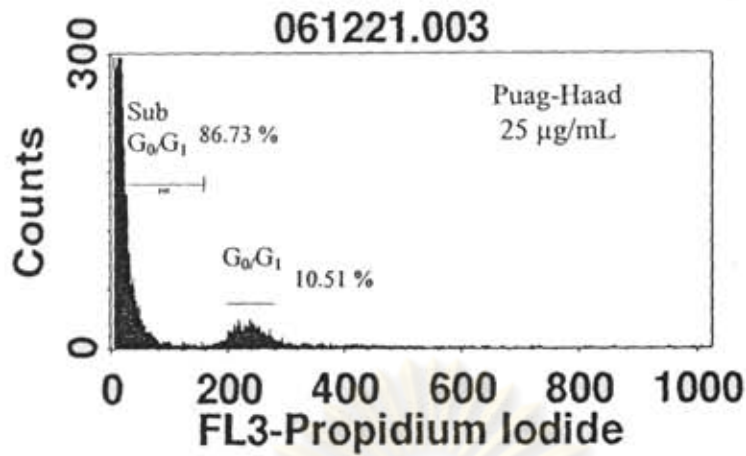
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของ fibroblast ใน G₀/G₁ phase ภายหลังจากย้อมสีด้วย propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่ได้ถูกส่องด้วยรังสี UV-A (untreated) และเซลล์ที่ถูกส่องด้วยรังสีภายใต้สภาวะที่ไม่มีสาร (control) และมีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ oxyresveratrol

Sample	% G ₀ /G ₁ phase (n1)	% G ₀ /G ₁ phase (n2)	% G ₀ /G ₁ phase (n3)	Average	SD
Untreated	23.05	25.57	29.56	26.06	3.28
Control	1.97	3.71	4.34	3.34	1.23
Puag-Haad 25µg/mL	10.51	9.11	26.00	15.21	9.37
Puag-Haad 50µg/mL	13.39	13.08	26.96	17.81	7.93
oxyresveratrol 25µg/mL	14.29	13.07	25.92	17.76	7.09
oxyresveratrol 50µg/mL	17.66	14.91	27.31	19.96	6.51

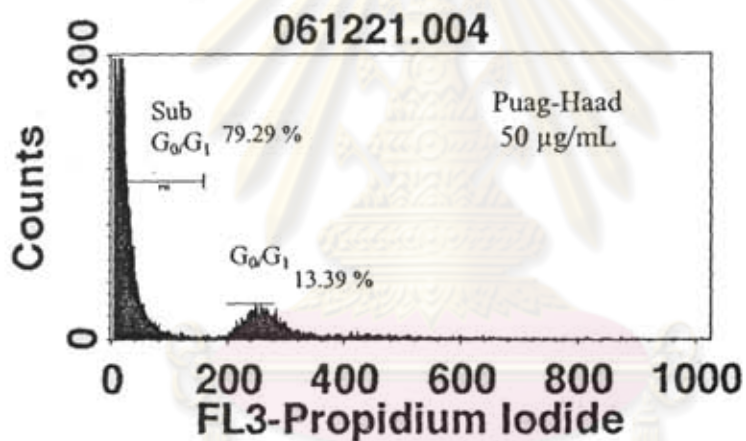


รูปที่ 9 ตัวอย่าง DNA histogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย flow cytometer แสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของ fibroblast population ในช่วงต่างๆของ cell cycle (sub G_0/G_1 , G_0/G_1 , S และ G_2/M phase) เปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้ถูกส่อง (untreated = A) และกลุ่มที่ถูกส่องด้วยรังสี UV-A (control = B) หมายถึง: ตัวเลขใน histogram ก็คือค่าเปอร์เซ็นต์ของ fibroblast ใน population ที่อยู่ใน sub G_0/G_1 (non-viable) และ G_0/G_1 (viable) phase (จำนวน fibroblast population ที่วิเคราะห์เท่ากับ 15,000 เซลล์ต่อกลุ่ม)

(C)



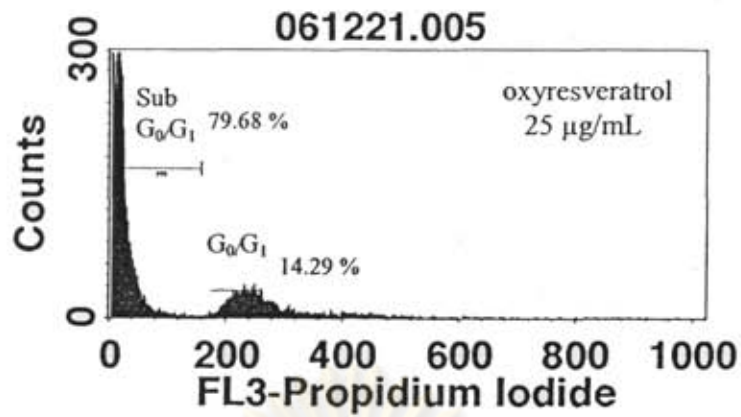
(D)



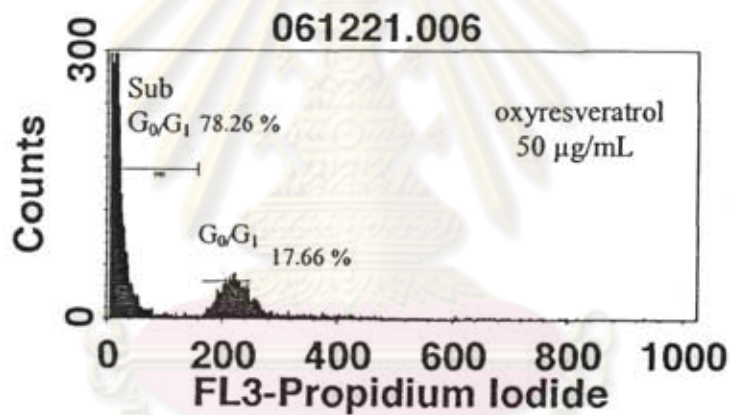
รูปที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่าง DNA histogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย flow cytometer แสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของ fibroblast population ในช่วงต่างๆของ cell cycle ของกลุ่มที่ถูกส่องด้วยรังสี UV-A ภายใต้สภาวะที่มีสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) อยู่ด้วยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ (C และ D)

หมายเหตุ: ตัวเลขใน histogram คือค่าเปอร์เซ็นต์ของ fibroblast ใน population ที่อยู่ใน sub G_0/G_1 (non-viable) และ G_0/G_1 (viable) phase (จำนวน fibroblast population ที่วิเคราะห์เท่ากับ 15,000 เซลล์ต่อกลุ่ม)

(E)



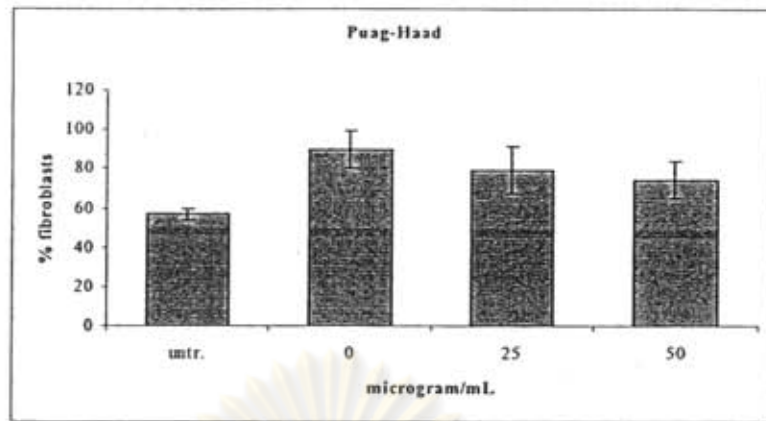
(F)



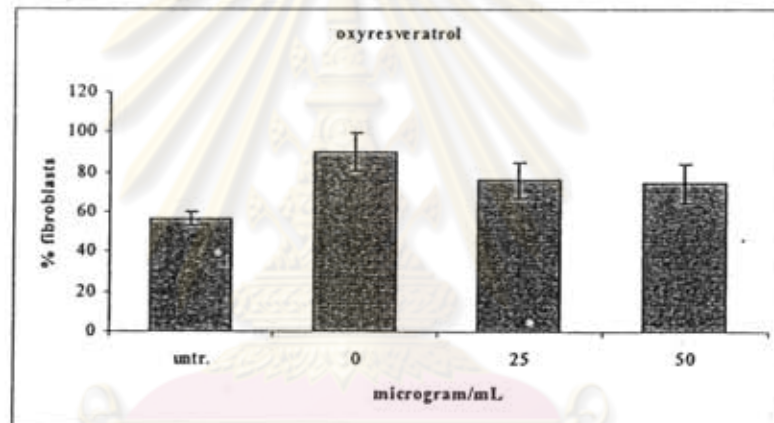
รูปที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่าง DNA histogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย flow cytometer แสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของ fibroblast population ในช่วงต่างๆของ cell cycle ของกลุ่มที่ถูกส่องด้วยรังสี UV-A ภายใต้สภาวะที่มี oxyresveratrol อยู่ด้วยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml (E และ F)

หมายเหตุ: ตัวเลขใน histogram คือค่าเปอร์เซ็นต์ของ fibroblast ใน population ที่อยู่ใน subG₀/G₁ (non-viable) และ G₀/G₁ (viable) phase (จำนวน fibroblast population ที่วิเคราะห์เท่ากับ 15,000 เซลล์ต่อกลุ่ม)

(A)

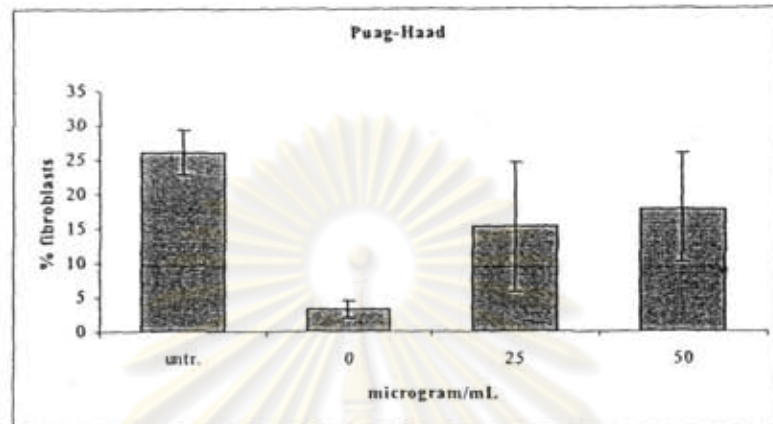


(B)

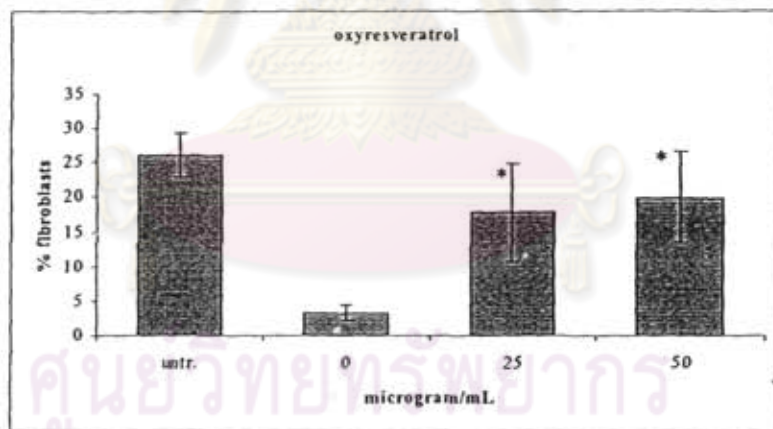


รูปที่ 10 Histogram แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของ non-viable fibroblast ใน subG₀/G₁ phase เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้ถูกส่อง (untreated) และกลุ่มที่ถูกส่องด้วยรังสี UV-A ในสภาวะที่ไม่มีและมีการทดสอบ (A) = สารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ (B) = oxyresveratrol
ข้อมูลเท่ากับ mean \pm s.d. (n = 3)

(A)



(B)



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 Histogram แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของ viable fibroblast ใน G₀/G₁ phase เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้ถูกส่อง (untreated) และกลุ่มที่ถูกส่องด้วยรังสี UV-A ในสถานะที่ไม่มีและมีส่วนผสม (A) = สารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ (B) = oxyresveratrol

ข้อมูลเท่ากับ mean \pm s.d. (n = 3)

* มากกว่า control (0 μ g/ml) อย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05, Dunnett's test)

จากข้อมูลในตารางที่ 9 สัดส่วนของเซลล์ที่ DNA ถูกทำลาย (non-viable cell) ใน subG₀/G₁ peak จะเพิ่มขึ้นจาก 55.85 ± 2.47 % ในกลุ่ม untreated เป็น 88.33 ± 12.05 % ในกลุ่ม control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการฉายรังสี UV-A ทำให้เกิดการทำลาย DNA ของเซลล์ fibroblast ทำให้เซลล์ตายมากขึ้น จึงให้จำนวนเซลล์ในช่วง low fluorescence intensity หรือใน subG₀/G₁ phase เพิ่มขึ้น เพราะเซลล์ใน phase นี้จะติดสี PI ได้น้อยมาก ขณะที่สัดส่วนของเซลล์ใน viable phase (เช่น G₀/G₁, S และ M phase) จะลดน้อยลง อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์ถูก pretreat เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยสารสกัดจากแก่นมะหาดที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ก่อนส่องด้วยรังสี UV-A พบว่าจำนวน non-viable cell ใน subG₀/G₁ phase จะน้อยกว่า control คือลดลงเหลือ 78.94 ± 12.49 % และ 73.85 ± 9.61 % ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน การ pretreat เซลล์ด้วย oxyresveratrol ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ก่อนนำไปส่องรังสี UV-A พบว่าจำนวนเซลล์ใน subG₀/G₁ phase จะน้อยกว่า control เช่นกันคือลดลงเหลือ 75.65 ± 9.36 % และ 73.92 ± 10.19 % ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญคือ oxyresveratrol สามารถช่วยป้องกันการทำลาย DNA ของ fibroblast จากรังสี UV-A ได้

เป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวน non-viable cell ใน subG₀/G₁ phase แม้แต่ในกลุ่ม untreated ซึ่งไม่ได้รับรังสีใดๆก็ยังมีค่าสูงคือ 55.85 % ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งอาจมาจากความเป็นพิษของ PI เองที่ออกฤทธิ์โดยการไปทำปฏิกิริยากับ DNA ได้โดยตรง (Vitale, 2000) อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนและระยะเวลาการย้อมสีด้วย PI จะเหมือนกันหมดสำหรับเซลล์ทุกกลุ่ม ทำให้สามารถเปรียบเทียบผลกันได้

เป็นที่ทราบกันดีว่ารังสี UV ทำอันตรายต่อ DNA ผ่านทางการสร้าง ROS ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ (Berneburg et al., 2000) จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ non-viable fibroblast ใน subG₀/G₁ phase (เปรียบเทียบรูป 9A และ 9B) รังสี UV-A เป็นรังสีที่สามารถผ่านเข้าชั้นผิวหนังได้ลึกกว่า UV-B โดยเฉพาะชั้น dermis จึงเป็นอันตรายต่อ fibroblast ซึ่งอยู่ในชั้นนี้ (Berneburg et al., 2000; Scharffetter-Kochanek et al., 2000) นอกจากนี้รังสี UV-A ยังทำให้จำนวน viable cell ลดลงอีกด้วย โดยเฉพาะ peak ในช่วง G₀/G₁ phase จากข้อมูลในตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ viable fibroblast ใน G₀/G₁ phase ของกลุ่ม untreated ที่ไม่ได้รับรังสีใดๆจะมีค่าเท่ากับ 26.06 ± 3.28 % แต่จะลดลงเหลือเพียง 3.34 ± 1.23 % ในกลุ่ม control ที่ถูกฉายด้วยรังสี UV-A แต่เมื่อนำเซลล์มา pretreat ด้วยสารสกัดจากแก่นมะหาดที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ก่อนนำไปส่องรังสี UV-A พบว่าจำนวน viable cell จะเพิ่มสูงกว่า control เป็น 15.21 ± 9.37 % และ 17.81 ± 7.93 % ตามลำดับ และเพิ่มเป็น 17.76 ± 7.09 % และ 19.96 ± 6.51 % ในกรณี pretreat ด้วย oxyresveratrol ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลในส่วนนี้จึงยังแสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญสามารถช่วยป้องกันหรือลดการทำลาย DNA จากรังสี UV-A ได้

เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ของ non-viable (subG₀/G₁ phase) และ viable fibroblast (G₀/G₁ phase) มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ pretreat ด้วยสารสกัด หรือ oxyresveratrol ที่ระดับนัยสำคัญ 5% พบว่ามีความแตกต่างเฉพาะค่าของเปอร์เซ็นต์ viable fibroblast ระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ pretreat ด้วย oxyresveratrol (P < 0.05) เท่านั้น เมื่อนำมาทดสอบด้วย Dunnett's test พบว่า

oxyresveratrol ทั้งสองความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ จะให้จำนวน viable fibroblast ใน G_0/G_1 phase มากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากแก่นมะหาด แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างจาก control ($P > 0.05$) แต่จากค่าเปอร์เซ็นต์ viable fibroblast ในตารางที่ 10 ก็ยังมีค่าสูงกว่ากลุ่ม control ในลักษณะเดียวกับ oxyresveratrol ซึ่งสาเหตุที่ยังไม่พบนัยสำคัญของความแตกต่างอาจเป็นเพราะจำนวนครั้งของการทดสอบ ($n = 3$) ยังไม่พอเพียง ทำให้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุเดียวกันที่ทำให้ไม่พบเห็นความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ non-viable cell ระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ pretreat ด้วยสารสกัดหรือ oxyresveratrol นอกจากนี้ ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้อาจยังไม่เพียงพอที่จะไปลดการทำลาย DNA ได้มากพอจนเห็นนัยสำคัญ รูปที่ 10 และ 11 เป็น histogram เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของ non-viable และ viable fibroblast ระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ pretreat ด้วยสารสกัดหรือ oxyresveratrol จากรูปจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของสารทั้งสองจะค่อยๆเพิ่มตามความเข้มข้นด้วย จึงมีโอกาสที่จะเห็นนัยสำคัญได้ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบให้สูงกว่านี้

ข้อมูลจากการทดลองในส่วนนี้และการทดลองก่อนหน้า บ่งชี้ได้ว่าทั้งสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol สามารถช่วยป้องกันหรือลดการตายของเซลล์ fibroblast จากรังสี UV-A ได้ โดยอาจมีกลไกผ่านทางคุณสมบัติการเป็น ROS scavenger ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ โดยเฉพาะ DNA ทำให้ช่วยป้องกัน DNA และ fibroblast จากอันตรายของ oxidative stress เหล่านี้ได้ (Wachiranuntasin, 2005)

6. การศึกษาความสามารถของสารสกัดจากแก่นมะหาดในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase (type IV)

เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ

เป็นที่ทราบกันดีว่ารังสี UV ทั้ง UV-A และ UV-B นอกจากจะทำให้ผิวหนังเกิด photoaging โดยผ่านทางกระตุ้นให้เกิด ROS ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์แล้ว ยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์ collagenase และ gelatinase ให้เร่งการสลายตัวของ collagen และ gelatin ในชั้น dermis อีกด้วย (Qureshi, 2001)

ตารางที่ 11 เป็นข้อมูลค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase type IV (*Clostridium histolyticum*) ของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ oxyresveratrol เปรียบเทียบกับของ EGCG, pine bark extract, L-ascorbic acid และ Trolox^o ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 – 5.0 mg/ml) จากข้อมูลในตารางที่ 11 และรูปที่ 12 ซึ่งเป็นกราฟที่พล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทุกตัว ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงจุดหนึ่ง ค่าการยับยั้งจะไม่เพิ่มขึ้นอีกหรือเพิ่มขึ้นด้วยความชันที่น้อยกว่าในช่วงแรกซึ่งอาจเกิดจากการอิ่มตัวของเอนไซม์ ในกรณีของสารสกัดจากแก่นมะหาด ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง collagenase จะเพิ่มอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.1 mg/ml โดยให้ค่าการยับยั้งเฉลี่ยในช่วงนี้เท่ากับ $6.57 \pm 2.41 \%$ ถึง $69.39 \pm 1.10 \%$ จากนั้นจะเพิ่มขึ้นด้วยความชันที่น้อยกว่าโดยที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml จะให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ $99.99 \pm 0.03 \%$ ซึ่งสูง

กว่า oxyresveratrol ($77.92 \pm 2.76 \%$), L-ascorbic acid ($18.76 \pm 3.15 \%$) และ Trolox^o ($10.89 \pm 1.56 \%$) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน L-ascorbic acid และ Trolox^o ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ที่อิมิตัวเท่ากับ $97.63 \pm 0.10 \%$ และ $95.39 \pm 0.14 \%$ ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 mg/ml ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของ EGCG และ pine bark extract พบว่าสารทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ตีมากและใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอิมิตัวเท่ากับ $99.78 \pm 0.13 \%$ และ $99.85 \pm 0.09 \%$ ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.10 mg/ml ตามลำดับ

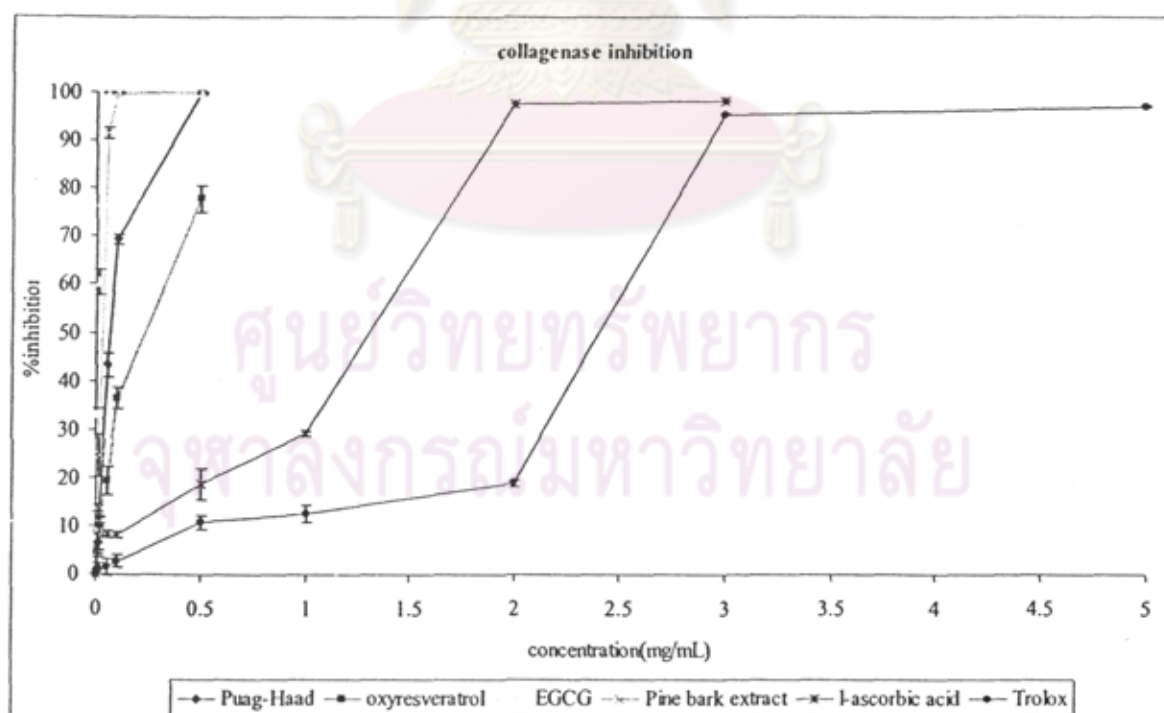
รูปที่ 13 เป็นกราฟที่พล็อตระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันแต่ละตัว จากกราฟจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดหรือ Puag-Haad จะมีประสิทธิภาพที่สูงกว่า oxyresveratrol โดยให้ค่าการยับยั้งที่สูงกว่า oxyresveratrol โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.50 mg/ml ขณะที่ EGCG และ pine bark extract จะมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดเพราะให้ค่าการยับยั้งเกือบ 100% ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าคือที่ 0.05 และ 0.10 mg/ml ตามลำดับ ส่วน L-ascorbic acid และ Trolox^o จะมีประสิทธิภาพต่ำที่สุดในกลุ่มสารทดสอบเพราะให้ค่าการยับยั้งอิมิตัวที่ความเข้มข้นที่สูงกว่ามากคือที่ 2.0 และ 3.0 mg/ml ตามลำดับ

จากนั้นจึงได้คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่เกิดการยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) สำหรับสารทดสอบแต่ละตัว โดยคำนวณจาก non-linear regression ของกราฟที่พล็อตระหว่างค่าความเข้มข้นในช่วงต้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ก่อนถึงจุดอิมิตัวของสารทดสอบแต่ละชนิด (regression analysis ของ initial portion ของพล็อตระหว่าง % inhibition (y) กับ concentration (x)) โดยมีสมการ polynomial regression พร้อมกับค่า regression coefficient (R^2) ดังแสดงในรูปที่ 14 และค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 12 จากค่า R^2 ซึ่งมีค่าสูงใกล้เคียงกับ 1 ช่วยบ่งชี้ให้เห็นว่า สมการ polynomial regression ที่ใช้ในการคำนวณหา IC_{50} มีความเหมาะสม เพราะเส้นกราฟจากสมการจะใกล้เคียงกับเส้นกราฟที่ได้จากการพล็อตจริง (รูปที่ 14) ซึ่งได้ทดลองหา IC_{50} โดยใช้สมการ linear regression ด้วย แต่ค่า R^2 ของสมการ linear regression ไม่สูงเท่ากับของ polynomial (non-linear) regression จึงเลือกใช้วิธีหลังในการหา IC_{50} ดังกล่าว

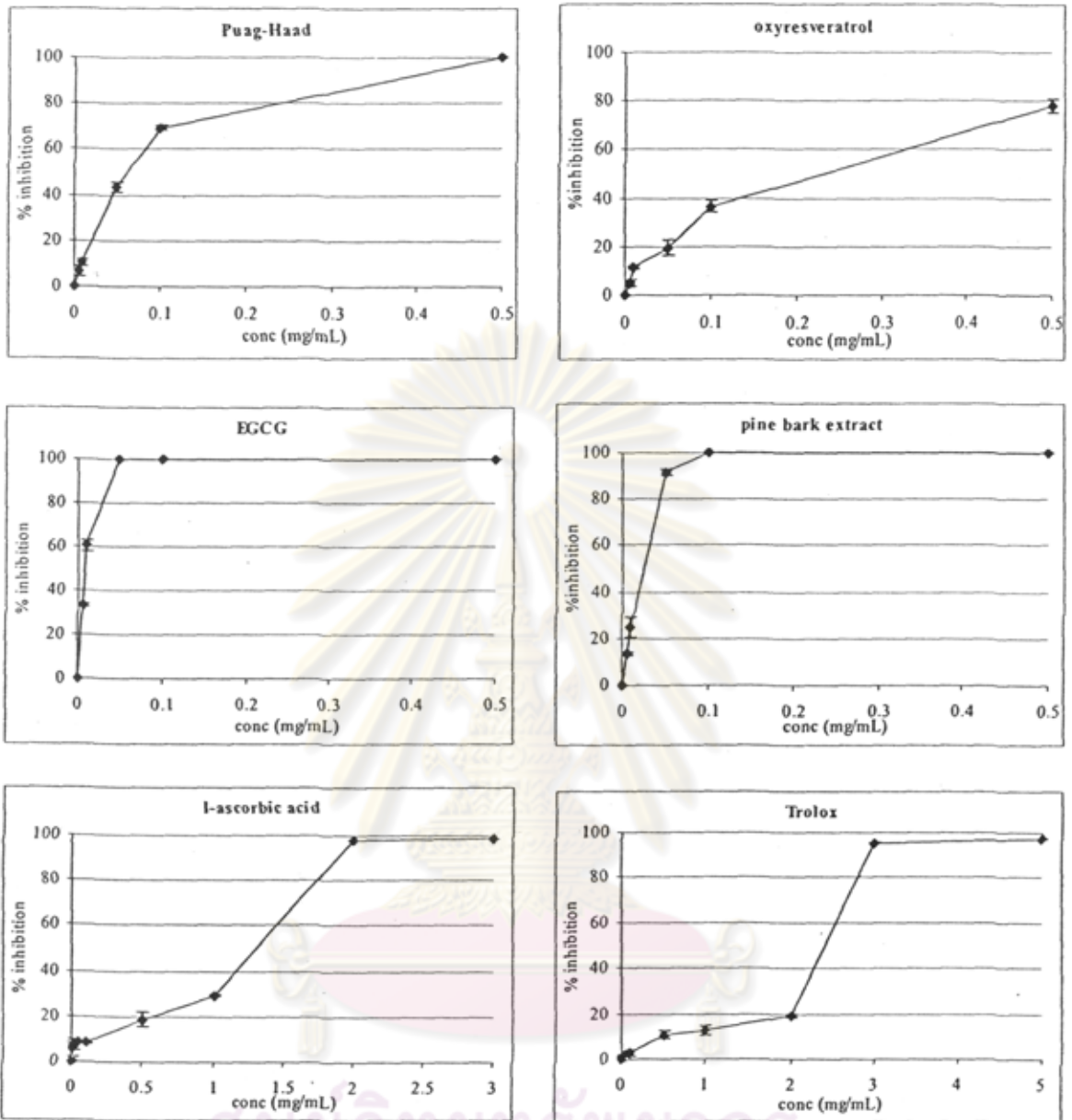
จากตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} จากค่าสุดไปสูงสุดเรียงได้ดังนี้คือ EGCG (0.008 ± 0.0004 mg/mL), pine bark (0.0219 ± 0.0032 mg/mL), สารสกัดจากแก่นมะหาด (0.0588 ± 0.046 mg/mL), oxyresveratrol (0.1531 ± 0.0096 mg/mL), L-ascorbic acid (1.3314 ± 0.0274 mg/mL) และ Trolox^o (2.348 ± 0.009 mg/mL) เนื่องจากค่า IC_{50} เป็นตัวบ่งชี้ถึงความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol จึงมีฤทธิ์ยับยั้ง collagenase ที่ต่ำกว่า EGCG และ pine bark เพราะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าเพื่อให้เกิดการยับยั้งในเปอร์เซ็นต์ที่เท่ากัน ขณะที่ L-ascorbic acid และ Trolox^o ซึ่งให้ค่า IC_{50} ที่สูงมาก จะมีความแรง (potency) ในการยับยั้ง collagenase ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารทดสอบอื่นๆ (รูปที่ 15)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase type IV ของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) และ oxyresveratrol เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

No.	Final concentration (mg/mL)	Puag-Haad		oxyresveratrol		EGCG		Pine bark extract		L-ascorbic acid		Trolox®	
		%inh	SD	%inh	SD	%inh	SD	%inh	SD	%inh	SD	%inh	SD
1	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.005	6.57	2.41	5.04	1.45	33.27	1.03	13.58	0.74	5.52	3.10	0.98	0.27
3	0.010	10.38	1.36	11.33	0.82	60.41	2.73	24.61	4.38	7.31	2.42	1.15	1.20
4	0.050	43.28	2.42	19.45	2.92	99.78	0.13	91.40	1.17	8.35	0.62	1.52	1.80
5	0.100	69.39	1.10	36.52	2.27	99.95	0.03	99.85	0.09	8.16	0.56	2.74	1.36
6	0.500	99.99	0.03	77.92	2.76	99.98	0.01	99.90	0.24	18.76	3.15	10.89	1.56
7	1.000									29.24	0.44	12.67	1.80
8	2.000									97.63	0.10	18.93	0.67
9	3.000									98.31	0.06	95.39	0.14
10	5.000											97.18	0.12



รูปที่ 12 พล็อตของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad) เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

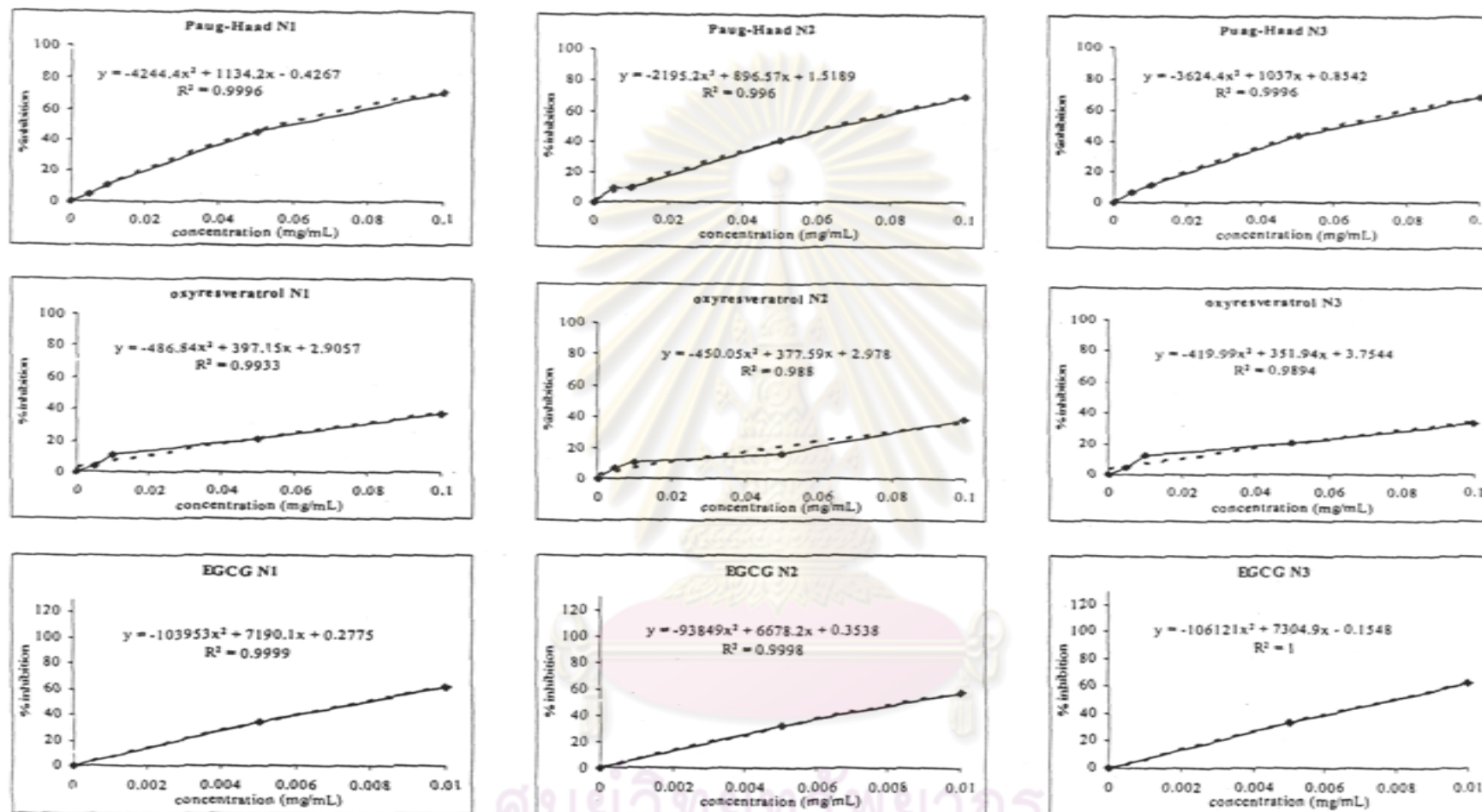


รูปที่ 13 กราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันแต่ละตัว (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

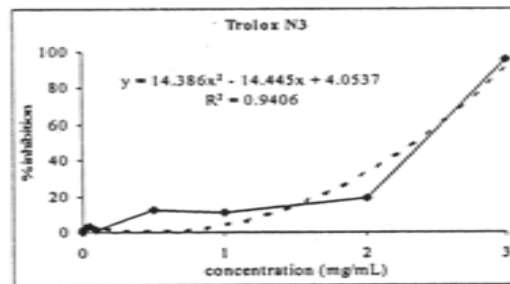
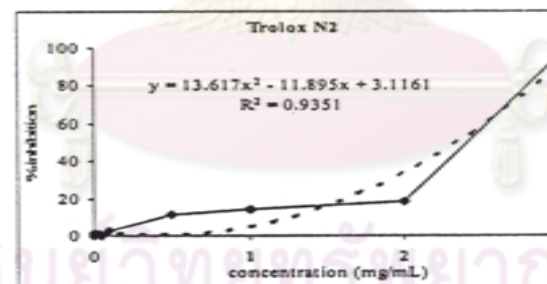
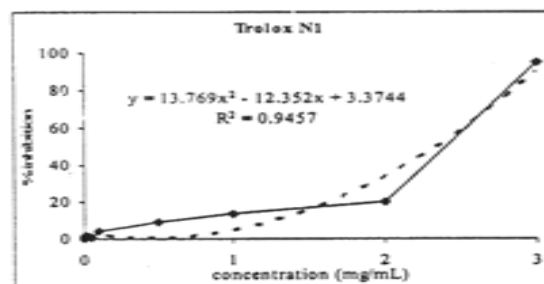
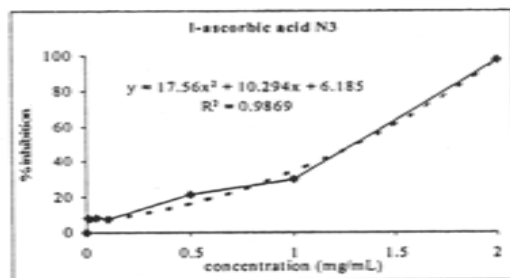
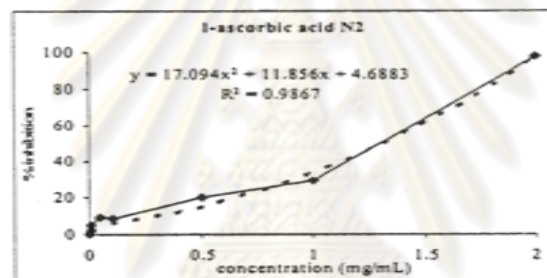
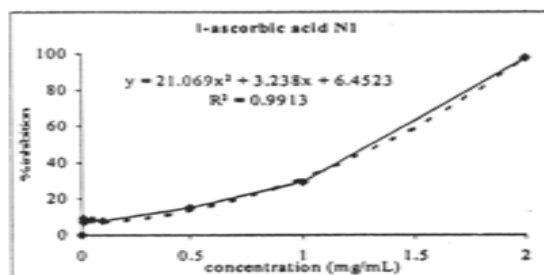
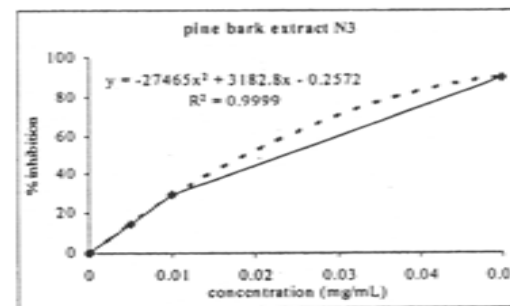
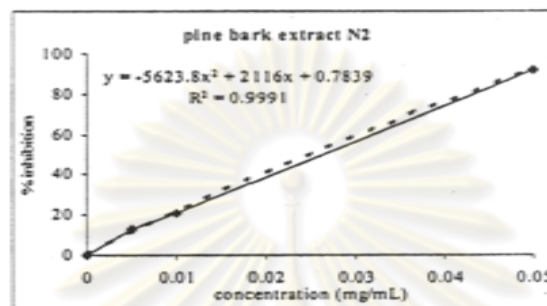
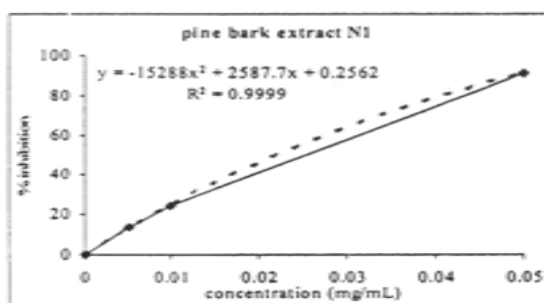
ตารางที่ 12 ค่า IC_{50} (mg/ml) ของการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารต้านออกซิเดชันแต่ละตัวพร้อมกับค่า regression coefficient (R^2) ของสมการ polynomial regression ที่ใช้ในการคำนวณค่า IC_{50}

No.	Sample	Polynomial equation (partial)					
		IC_{50} (mg/ml)	Mean	SD	R^2	Mean	SD
1	Puag-Haad	0.0563	0.0588	0.046	0.9996	0.9984	0.0021
		0.0641			0.9960		
		0.0560			0.9996		
2	Oxyresveratrol	0.1440	0.1531	0.0096	0.9933	0.9902	0.0027
		0.1521			0.9880		
		0.1632			0.9894		
3	EGCG	0.0078	0.0080	0.0004	0.9999	0.9999	0.0001
		0.0084			0.9998		
		0.0077			1.0000		
4	pine bark extract	0.0221	0.0219	0.0032	0.9999	0.9996	0.0005
		0.0249			0.9991		
		0.0186			0.9999		
5	L-ascorbic acid	1.3629	1.3314	0.0274	0.9913	0.9883	0.0026
		1.3178			0.9867		
		1.3135			0.9869		
6	Trolox [®]	2.3426	2.3480	0.0090	0.9457	0.9405	0.0053
		2.3420			0.9351		
		2.3584			0.9406		

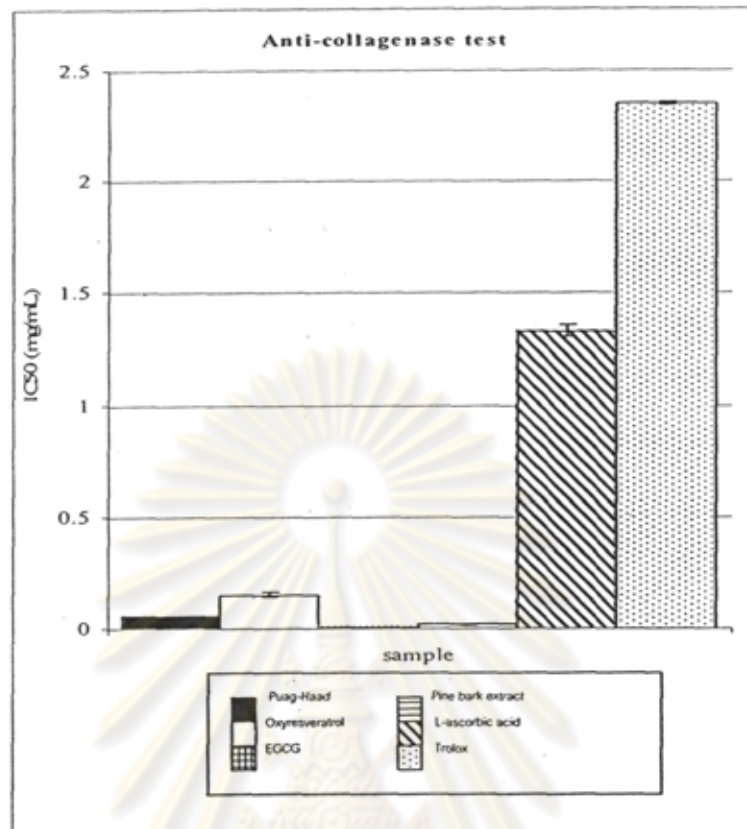
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 กราฟจากข้อมูลจริง (เส้นประ) เปรียบเทียบกับ regression curve (เส้นทึบ) ของพล็อตในช่วงต้นระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง collagenase กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันแต่ละตัว พร้อมกับสมการ polynomial regression ในการหาค่า IC_{50} และค่า regression coefficient (R^2)



รูปที่ 14 (ต่อ) กราฟจากข้อมูลจริง (เส้นประ) เปรียบเทียบกับ regression curve (เส้นทึบ) ของพล็อตในช่วงต้นระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง collagenase กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันแต่ละตัว พร้อมกับสมการ polynomial regression ในการหาค่า IC_{50} และค่า regression coefficient (R^2)



รูปที่ 15 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ (mg/ml) ในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase ของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมดตัว (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

เมื่อนำค่า IC₅₀ มาวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 5% พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างสารทั้งหมดตัว ($P << 0.05$) จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ต่อกด้วย Tukey's test เพื่อที่จะจัดกลุ่มความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ collagenase โดยผลการวิเคราะห์สามารถจัดกลุ่มสารต้านออกซิเดชันได้เป็น 5 กลุ่มที่มีความแรงในการยับยั้งเอนไซม์แตกต่างกัน ($P < 0.05$) โดยมีการเรียงลำดับจากสารที่ความแรงมากที่สุด (ค่า IC₅₀ ต่ำสุด) จนถึงความแรงอ่อนที่สุด (ค่า IC₅₀ มากที่สุด) ได้ดังนี้

EGCG ~ pine bark < Puag-Haad < oxyresveratrol < L-ascorbic acid < Trolox®

0.01 0.02 0.06 0.15 1.33 2.35 mg/ml

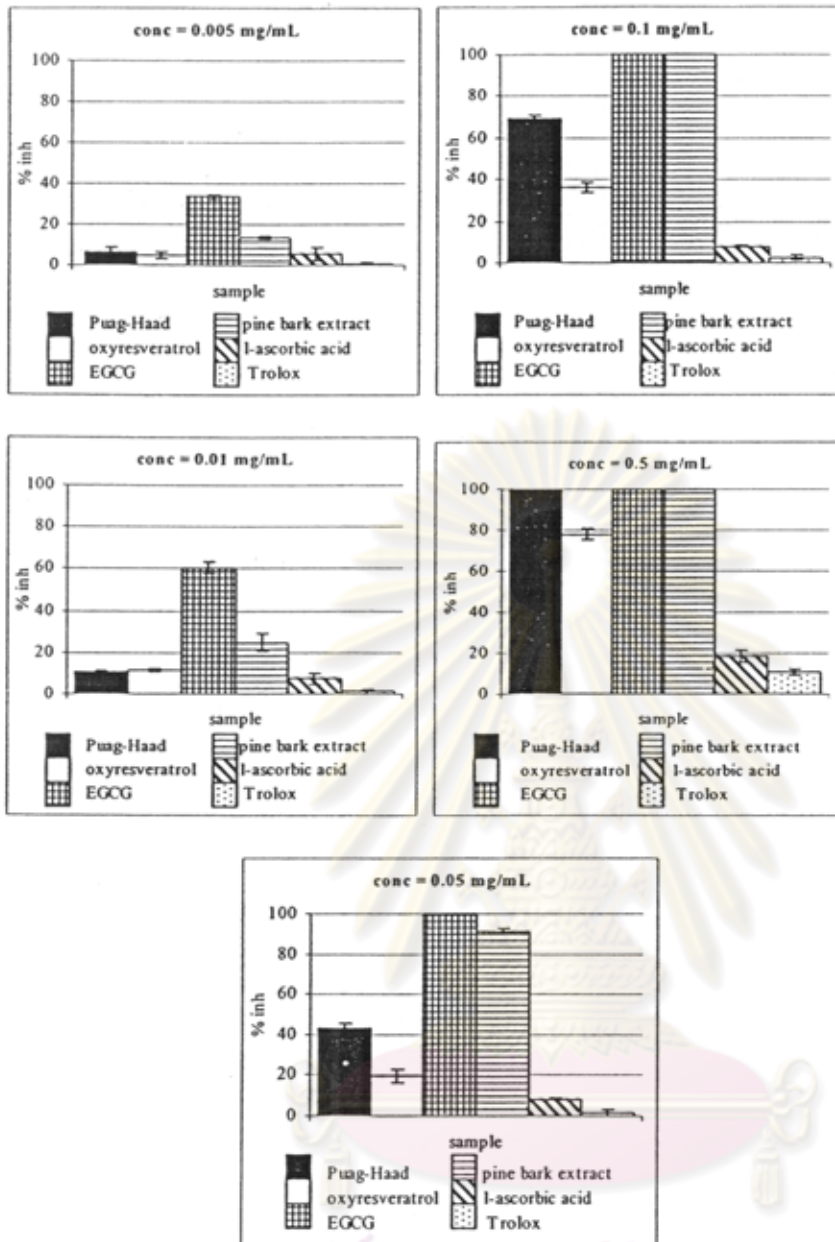
กลุ่มที่มีประสิทธิภาพหรือความแรงในการยับยั้งมากที่สุดคือกลุ่มที่ประกอบด้วย EGCG และ pine bark extract ซึ่งสารทั้งสองมีค่า IC₅₀ ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ถูกเชื่อมด้วยเส้นเดียวกัน; $P > 0.05$) แต่จะมี

ความแรงมากกว่าสารอีกสี่ตัวอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สารสกัดจากแก่นมะหาดจะเป็นตัวที่มีความแรงในการยับยั้ง collagenase รองลงมา ($IC_{50} = 0.06$ mg/ml) และมีความแรงมากกว่า oxyresveratrol (IC_{50} 0.15 mg/ml) ซึ่งจะมีความแรงมากกว่า L-ascorbic acid (IC_{50} 1.33 mg/ml) ตามลำดับ ส่วน Trolox^o ซึ่งมีค่า IC_{50} สูงที่สุดเท่ากับ 2.35 mg/ml จะอยู่ในกลุ่มสุดท้ายซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำสุด ($P < 0.05$)

รูปที่ 16 เป็นกราฟแท่งเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง collagenase ระหว่างสารต้านออกซิเดชันทั้งหมดที่แต่ละความเข้มข้น จากกราฟจะเห็นได้ว่ามีรูปแบบที่สอดคล้องกันกับค่า IC_{50} โดย EGCG จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงมากตลอดช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาโดยเฉพาะจะอ้อมตัวตั้งแต่ที่ความเข้มข้นน้อยมากๆ ขณะที่สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol จะให้ผลอยู่ในช่วงกลางๆ และ L-ascorbic acid กับ Trolox^o จะให้ค่าการยับยั้งที่ต่ำกว่าสารอื่นๆเสมอไม่ว่าจะที่ความเข้มข้นใด ส่วนสาเหตุที่สารสกัดจากแก่นมะหาดมีความแรงในการยับยั้ง collagenase ที่ดีกว่า oxyresveratrol ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Tengamnuay et al., 2006) ก็พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดมีค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase เท่ากับ 0.76 μ g/ml ซึ่งน้อยกว่า oxyresveratrol เล็กน้อย (0.83 μ g/ml) ซึ่งค่า IC_{50} ยิ่งน้อย แสดงว่ามีความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ที่แรงกว่า จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดจากแก่นมะหาด นอกจาก oxyresveratrol ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase และ collagenase ได้แล้ว ยังมีสารอื่นๆอีกที่ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างแต่ก็สามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองนี้ได้เช่นกัน จึงมีผลเสริมให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองตัวนี้ได้มากกว่าสารบริสุทธิ์อย่าง oxyresveratrol

ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol ต่างก็สามารถยับยั้ง collagenase type IV ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMP) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสลายตัวของ collagen และ structural proteins ในชั้น dermis ซึ่งเป็นสาเหตุอันหนึ่งของการเกิดริ้วรอย อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถของสารทั้งสองในการยับยั้ง collagenases ชนิดอื่นๆอีกเพื่อเป็นขั้นผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 กราฟแท่งเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง collagenase ระหว่างสารต้านออกซิเดชันทั้งหกตัวที่แต่ละความเข้มข้น (ค่าเฉลี่ย \pm SD, n = 3)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในข้อ 1 ถึง 6 สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ viable fibroblast ด้วย MTT test พบว่าสารต้านออกซิเดชันทั้งหกตัวที่ทดสอบคือสารสกัดจากแก่นมะหาด (Puag-Haad), สารสำคัญในสารสกัดหรือ oxyresveratrol, EGCG, pine bark extract, Trolox^o และ L-ascorbic acid มีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ fibroblasts อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งประสิทธิภาพของสารสกัดและ oxyresveratrol จะใกล้เคียงกับ EGCG, pine bark extract และ Trolox^o แต่จะสูงกว่า L-ascorbic acid เล็กน้อย นอกจากนี้ยังไม่พบความเป็นพิษของสารทดสอบตัวใดต่อเซลล์ fibroblast ในช่วงความเข้มข้น 10 – 50 $\mu\text{g/ml}$ และค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่กระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (optimum proliferative concentration) สำหรับสารแต่ละตัวในการทดลองนี้คือ 25 $\mu\text{g/ml}$

2. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันจาก 25 ไปเป็น 100 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ ความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ fibroblast จะลดลงในสารทุกตัว โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ จะพบความเป็นพิษต่อเซลล์ (จำนวน viable fibroblast ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่ม control) ในกรณีของสารสกัดจากแก่นมะหาด, oxyresveratrol, EGCG และ L-ascorbic acid แต่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ในกรณีของ Pine bark extract และ Trolox^o

3. สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol มีฤทธิ์ช่วยป้องกัน fibroblast จากการถูกทำลายโดย hydrogen peroxide ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ภายหลังจาก incubate fibroblast กับ 2 mM H_2O_2 ในภาวะที่มีสารทดสอบทั้งสองอยู่ด้วยที่ทุกความเข้มข้นที่ศึกษา (25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจาก H_2O_2 ของสารสกัดและ oxyresveratrol จะใกล้เคียงกับ EGCG, pine bark extract และ Trolox^o ขณะที่ L-ascorbic acid จะให้ผลป้องกันอันตรายเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ และกลับเสริมความเป็นพิษของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4. สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol มีฤทธิ์ช่วยป้องกัน fibroblast จากการถูกทำลายโดยรังสี ultraviolet A (UV-A) ภายหลังจาก irradiate fibroblast ด้วย UV-A ในปริมาณ 20 J/cm^2 ในภาวะที่มีสารทดสอบทั้งสองอยู่ด้วยที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากรังสี UV-A ของสารสกัดและ oxyresveratrol จะใกล้เคียงกับ EGCG, pine bark extract และ Trolox^o แต่จะน้อยกว่า L-ascorbic acid

5. เมื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการป้องกันอันตรายจากรังสี UV-A โดยการย้อม DNA ของ fibroblast ด้วย propidium iodide (PI) และวิเคราะห์หาสัดส่วนของ viable และ non-viable (apoptotic) fibroblast ด้วย flow cytometry พบว่าทั้งสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol สามารถลดการทำลายของ DNA อันเนื่องจากรังสี UV-A (20 J/cm^2) ได้โดยจะให้เปอร์เซ็นต์ non-viable fibroblast ที่น้อยกว่ากลุ่ม control ซึ่งได้รับแคร์รังสี UV-A อย่างเดียวโดยไม่มีสารสกัด นอกจากนี้ oxyresveratrol ยังให้จำนวน viable fibroblast ที่มากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ด้วย ผลการทดลองนี้จึงช่วยอธิบายว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol อาจช่วยป้องกันเซลล์ fibroblast จากรังสี UV-A ได้โดยการไป scavenge หรือช่วยกำจัด reactive oxygen species (ROS) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยรังสี UV-A ซึ่ง ROS เหล่านี้สามารถทำอันตรายต่อ DNA และองค์ประกอบอื่นๆของเซลล์ได้

6. สารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol สามารถยับยั้งเอนไซม์ collagenase type IV ในหลอดทดลองได้ โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 0.06 และ 0.15 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้ง collagenase ของสารสกัดจากแก่นมะหาดและ oxyresveratrol จะอยู่ระหว่าง EGCG และ pine bark extract (ฤทธิ์ยับยั้งแรงที่สุด) และ L-ascorbic acid กับ Trolox[®] (ฤทธิ์ยับยั้งอ่อนที่สุด) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญของมัน นอกจากช่วยป้องกัน fibroblast จาก oxidative stress ต่างๆแล้ว ยังอาจช่วยเพิ่มปริมาณ collagen ที่จำเป็นต่อการรักษา structural integrity ของชั้น dermis ได้โดยผ่านทาง การยับยั้งเอนไซม์ collagenase ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการย่อยสลาย collagen

7. โดยสรุปแล้ว ผลการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสำคัญของมันคือ oxyresveratrol สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในชั้น dermis รวมถึงสามารถป้องกันหรือลดการถูกทำลายจาก oxidative stress ต่างๆได้ โดยเฉพาะจาก hydrogen peroxide และรังสี UV-A นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติต่างๆข้างต้นและความเป็นพืชที่ต่ำใกล้เคียงกับสารชะลอความแก่ (anti-aging agent) อื่นๆที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง รวมถึงราคาที่ถูกลงกว่า จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดเป็นสารที่มีศักยภาพสูงมากในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันเพื่อใช้ชะลอความแก่หรือลดริ้วรอยในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ทั้งนี้จะต้องมีการพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยในอาสาสมัครต่อไป ก่อนที่จะนำไปใช้ได้จริง

แผนการทดลองขั้นต่อไป

จะทำการศึกษาดังความสามารถของสารสกัดในการชะลอหรือช่วยลดริ้วรอยในอาสาสมัคร ทั้งที่เตรียมในรูปแบบสารละลายและครีมในรูปแบบโลชัน เปรียบเทียบกับสาร anti-aging ที่นิยมใช้ในเครื่องสำอาง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคคลต่อไปนี้ ที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย
2. ภาควิชาเภสัชกรรม และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการวิจัย
3. นางสาวรอนงค์ พฤษากิจ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยวิจัย
4. คุณเนพล เอี่ยมสะอาด ภาควิชาอิมมูโนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง flow cytometry และช่วยแปลผลการวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

- ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ. 2543. ความสามารถของสารสำคัญในการต่อต้านโรคของสมุนไพรไทย. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Alexis, A.F., Jones, V.A., and Stiller, M.J., Potential therapeutic applications of tea in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 1999, 38: 735-743.
- Andrew, L., Ternay, J., and Viktor, S., Redox, radicals, and antioxidants. In Steven, I.B. (ed.), *Oxidants, antioxidants, and free radicals*. Taylor & Francis, London, UK, 2000, pp. 1-21.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., and Bouwens, L.C.M., The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997, 37: 693-704.
- Banerjee, A., et al., *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*. 2005, 90: 727-733.
- BD biosciences, Techniques for immune function analysis, Application handbook. 1st Edition: *BrdU staining and multiparameter flow cytometric analysis of the cell cycle*. Becton Dickinson and Company Press, San Diego, USA, 2003.
- Cadenas, E., Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In Ahmad, S. (ed.), *Oxidative stress and antioxidant defense in biology*. Chapman & Hall, New York, USA, 1995, pp. 1-46.

- Charoenlarp, P., Radomyos, P., and Harinasuta, T., Treatment of Teaniasis with Puag-haad: A crude extract of *Artocarpus lakoocha* wood. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 1981, 12(4): 568-570.
- Charoenlarp, P., Radomyos, P., and Bunnag, D., The optimum dose of Puag-haad in the treatment of Taeniasis. J. Med. Assoc. Thai 1989, 72(2): 71-73.
- Chaudhuri, R.K., Hwang, C., and Puccetti, G., Low molecular weight tannins of *Phyllanthus emblica*: anti-aging effects. Cosmetics & Toiletries 2004, 119(1): 59-70.
- Cho, S. A., Comparative study of polyphenol contents, antioxidant activities and cytotoxicity of green tea from three different asian sources. Master's Thesis, Department of Pharmaceutical Technology, Graduate School, Chulalongkorn University. 2002.
- Dasgupta, N., et al., Antioxidant activity of *Piper betel* L. leaf extract *in vitro*. Food Chemistry. 2004, 88: 219-224.
- Gordon, M. H., The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In Hudson, B. J. F. (ed.), Food antioxidants. Elsevier Science Publishers, UK, 1990, pp. 1-18.
- Halliwell, B., Antioxidant: the basics-what they are and how to evaluate them. In Helmut, S. (ed.), Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Vol. 38, Academic Press, New York, USA, 1997, pp. 3-17.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., and Aruoma, I.O., The characterization of antioxidants. Food. Chem. Toxicol. 1995, 33(7): 601-617.
- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, L., Tamura, Y., and Kinoshita, T., Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. Bioorg. Med. Chem. 1998, 6: 339-347.
- Kawashima, Y., Zhou, Y.-Y., Kishida, N., Ohto, N., Araho, D., Ito, Y., Kambara, T., and Zhou, W.-H., Biological activities of plant leaf extracts: Availability of star fruit leaf extract against skin aging. Proceedings of the 2003 IFSCC Conference, Sept. 22-24, 2003, Seoul, Korea, Part I, pp. 645-658.
- Katiyar, S.K., Challa, A., McCormick, T.S., Cooper, K.D., and Mukhtar, H., Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. Carcinogenesis. 1999, 20: 2117-2124.
- Lecoeur, H., Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. Exp. Cell. Res. 2002, 277(1): 1-14.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Matthew, J., and Schinazi, R.F., Anti-HIV activity and cytotoxicity of stilbenes from *Artocarpus lakoocha* and *Dracaena loureiri*. Proceedings of the 6th JSPS-NRCT Joint Seminar: Recent Advances in Natural Medicine Research. December 2-4, 2003, Chulalongkorn

- University, Bangkok, Thailand, p. 137.
- Masuda, M., Tejima, T., and Suzuki, T., Skin lighteners. Cosmetics and Toiletries. 1996, 111: 65-77.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Immunol. Methods. 1983, 65(1-2): 55-63.
- Ngamwat, W., Permpipat, U., Sithisomwong, N., Chavalittumrong, P., Chantarachaya, C., and Pecharaply, D., Toxicity of puag-haad extract: The extracts from *Artocarpus lakoocha* Roxb. The first Princess Chulabhorn Science Congress: International Congress on Natural Products. Bangkok, 1987: 80.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods. 1991, 139(2): 271-279.
- Nilvises, N. Permpipat, U., and Sithisomwong, N., Toxicity test of Puag-haad (*Artocarpus lakoocha* Roxb.). Bull. Dept. Med. Sci. 1985, 27(1): 49-55.
- Noguchi, N., Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In Andreas, M. P.(ed.), Antioxidant status, diet, nutrition, and health. CRC Press, New York, USA, 1999, pp. 3-20.
- Nordberg, J. et al., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med. 2001, 31: 1287-1312.
- Olive, P.L., Banath, J.P., and Durand, R.E., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. Radiat. Res. 1990, 122(1): 86-94.
- Preuksaraj, S., Jeradit, C., Nilapun, S., Sathitayathai, A., and Kiattansakul, S., Efficacy of Mahaad against *Taenia* infection. Commun. Dis. J. 1983, 9(1): 1-8
- Qureshi, A., The skin and aging. Medscape conference coverage. 59th Annual meeting of the American academy of dermatology. Medscape Portals Inc., Washington D.C., USA, 2001.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., and Tyler, V.E., Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1996, pp. 140-141.
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., and Wlaschek, M., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. Exp. Gerontol. 2000, 35: 307-316.
- Sritularak, B., Chemical Constituents of *Artocarpus lakoocha* and *A. gomezianus*. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 1998.

- Sritularak, B., De-Eknamkul, W., and Likhitwitayawuid, K., Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai J. Pharm. Sci. 1998, 22: 149-155.
- Tanunkat, A., Absorption, metabolism and excretion of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene in volunteers after oral administration of purified extract of puag-haad. Master's Thesis, Graduate School, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1990.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., and Likhitwitayawuid, K., A potent tyrosinase inhibitor from *Artocarpus lakoocha* heartwood extract: Comparative evaluation of its melanin-reducing efficacy in guinea pigs and humans. Proceedings of the 2003 IFSCC Conference, Sept. 22-24, 2003, Seoul, Korea, Part II, pp. 201-212.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., and Likhitwitayawuid, K., *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. Int. J. Cosmet. Sci. 2006, 28: 269-276.
- Tiptabiankam, L., The antioxidant action of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene and some of its derivatives. Master's Thesis. Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Bangkok, Thailand, 1967.
- Toda, S., Kumura, M., and Ohnishi, M., Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. Planta Med. 1991, 57: 8-10
- Wachiranuntasin, K., Evaluation of stability, antioxidative and free radical scavenging activities of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract. Master's Thesis. Department of Pharmacy, Graduate School, Chulalongkorn University, 2005.
- Yokota, T., Nishio, H., and Kubota, Y., The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. Pigment Cell Res. 1998, 11: 335-361.
- Zhai, H., Skin-whitening agents. Cosmetics and Toiletries. 2001, 116:20 -25.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย

โครงการวิจัยที่ 4 (ส่วนที่สอง)

เรื่อง การวิจัยประโยชน์ทางเครื่องสำอางของสารสกัดจากแก่นมะหาด

Research on cosmetic applications of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract

การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของสารสกัดจากแก่นมะหาดในผิวหนัง
อาสาสมัคร

Evaluation of anti-wrinkle efficacy of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract in
volunteers' skin

ผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ

ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูรย์

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	i
บทนำและวัตถุประสงค์การวิจัย.....	1
ทบทวนวรรณกรรม.....	3
ระเบียบวิธีการทดลอง.....	6
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	15
1. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของสารละลายปกหาดใน อาสาสมัคร.....	15
2. การพัฒนาโลชั่นลดริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปกหาด.....	30
3. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของโลชั่นปกหาดในอาสาสมัคร.....	35
สรุปผลการทดลอง.....	57
กิตติกรรมประกาศ.....	58
เอกสารอ้างอิง.....	59



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิผลในการชะลอหรือลดริ้วรอยในอาสาสมัครเพศหญิง โดยการศึกษาวิจัยทางคลินิกแบบคู่ขนาน โดยมีกลุ่มควบคุมในตนเอง (parallel clinical study with self-control) เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยใช้อาสาสมัครจำนวน 86 คนแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยที่แก้มข้างขวาของอาสาสมัครแต่ละกลุ่มแยกทาด้วยสารละลายปกปิดความเข้มข้น 0.10% และ 0.25% สารละลายอิพิแกลโลแคทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate) ความเข้มข้น 0.10% และสารละลายวิตามินซีความเข้มข้น 0.10% ส่วนแก้มข้างซ้ายของทุกกลุ่มทาด้วยสารละลายควบคุมชนิดเดียวกันคือ 20% โพรไพลีนไกลคอลในน้ำ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ทาด้วยสารละลายปกปิด 0.10% ให้ผลชะลอริ้วรอยดีที่สุด โดยให้ผลลดความหยาบของผิว (skin surface roughness) ต่ำกว่าแก้มข้างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เร็วที่สุดภายใน 2 สัปดาห์เมื่อวัดด้วยเครื่อง Visioscan® และผลยังคงอยู่บนสิ้นสุดการทดลอง รองลงมาคือกลุ่มที่ทาด้วยสารละลายปกปิด 0.25% ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับสารละลายอิพิแกลโลแคทชินแกลเลต ความเข้มข้น 0.10% ส่วนสารละลายวิตามินซีความเข้มข้น 0.10% ให้ผลในการชะลอริ้วรอยน้อยที่สุด จึงเลือกสารละลายปกปิดความเข้มข้น 0.10% และสารละลายอิพิแกลโลแคทชินแกลเลต ความเข้มข้น 0.10% มาเตรียมในรูปแบบผลิตภัณฑ์โลชั่นเพื่อศึกษาผลในอาสาสมัคร โดยใช้กระบวนการเดียวกัน โดยได้ทำการวัดความยืดหยุ่น รวมถึงความสามารถในการนำไฟฟ้า (ความชุ่มชื้น) และความขาวของผิวไปพร้อมกันด้วย พบว่าโลชั่นปกปิด 0.10% มีประสิทธิผลในการลดริ้วรอยเร็วกว่าโลชั่นอิพิแกลโลแคทชินแกลเลต 0.10% โดยเริ่มเห็นผลที่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป ในขณะที่โลชั่นอิพิแกลโลแคทชินแกลเลตเริ่มเห็นผลในสัปดาห์ที่ 8 โดยโลชั่นปกปิดมีประสิทธิภาพในการลดหรือชะลอริ้วรอยได้เท่ากับ 5.78 - 5.93% นอกจากนี้ พบว่าโลชั่นทั้งสองชนิดไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นของผิว แต่โลชั่นปกปิดมีประสิทธิภาพทำให้ผิวขาวขึ้นมากกว่า โลชั่นอิพิแกลโลแคทชินแกลเลต เมื่อพิจารณาในแง่การเพิ่มความชุ่มชื้น โลชั่นทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังได้ใกล้เคียงกันซึ่งเป็นผลมาจากโลชั่นเบสที่เหมือนกัน ดังนั้น จากคุณสมบัติที่หลากหลายของปกปิดซึ่งมีทั้งฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ชั่วลครีวรอยและทำให้ผิวขาว ประกอบกับราคาที่ไม่แพงและหาซื้อได้ง่าย จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำสารสกัดจากแก่นมะหาดหรือปกปิดมาประยุกต์ใช้เป็นสารชะลอความแก่ (anti-aging) ในเครื่องสำอางที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพต่อไป

บทนำและวัตถุประสงค์การวิจัย

การแก่ (aging) เป็นกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อนและเปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา การแก่ของผิวหนัง (skin aging) หมายรวมถึงสาเหตุจากภายในและภายนอก เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบผิวหนัง เช่นการสลายตัวของคอลลาเจนซึ่งก่อให้เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นขึ้น

กระบวนการแก่มีสาเหตุมาจาก reactive oxygen species (ROS) ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายโครงสร้างโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตซึ่งพบได้ในผิวหนังชั้น dermal และ epidermis ซึ่งส่งผลให้เกิดการแก่ของผิวหนัง ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการแก่หรือการทำลายของเซลล์ผิวหนังคือการใช้สารต้านออกซิเดชันแบบทาภายนอก (topical antioxidants) ซึ่งมีอยู่อย่างมากมายทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติจะนิยมใช้มากกว่าเนื่องจากมีความปลอดภัยสูงกว่าและราคาประหยัด

มะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae สารสกัดแห้งจากแก่นมะหาดได้ถูกนำมาใช้เป็นยาถ่ายพยาธิมาแต่โบราณ สารสำคัญที่พบในเปลือกหาคือ oxyresveratrol หรือ 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene (Mongkolsuk, Robertson and Towers, 1957) จากการศึกษาพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Sritularak, 1998; Sritularak, De-Eknamkul and Likhitwitayawuid, 1998) และในปี 2003 ที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองและฤทธิ์ในการทำให้ผิวขาวในหนูทดลองและอาสาสมัคร พบว่าเปลือกหาคสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้ทั้งในหนูทดลองและอาสาสมัคร (Tengamnuay, Pengrung-ruangwong and Likhitwitayawuid, 2003) และเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกหาค (Wachiranuntasin, 2005) พบว่าเปลือกหาคมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี ทั้ง superoxide anion, hydroxyl free radical, singlet oxygen และ DPPH นอกจากนี้ Lorenz และคณะ (2003) ยังได้รายงานว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ nitric oxide ได้สูงกว่า resveratrol ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่พบมากในถั่วและไวน์แดง

เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังที่กล่าวมา จึงน่าจะนำเปลือกหาคมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางชะลอริ้วรอยที่มีประสิทธิภาพได้ ในรายงานก่อนหน้านี้นี้ ได้ทำการศึกษาดังฤทธิ์ของเปลือกหาคในการช่วยป้องกันการเสื่อมของเซลล์ fibroblast พบว่าเปลือกหาคสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast รวมถึงช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วย oxidative stress ทั้งรังสี UV-A และจาก hydrogen peroxide ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมุ่งศึกษาไปที่

ประสิทธิภาพในการช่วยชะลอริ้วรอยโดยศึกษาในอาสาสมัครทั้งในรูปแบบของสารละลายและ
โลชั่น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้จึงมีดังนี้

1. เพื่อประเมินความสามารถในการลดริ้วรอยและการระคายเคืองของสารละลายปก
หาคในผิวหนังอาสาสมัคร
2. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับ โลชั่นจากปกหาคและทดสอบประสิทธิผลในการลดริ้วรอย
รวมถึงความปลอดภัยในอาสาสมัคร

วัตถุประสงค์โดยรวมทั้งหมดของการทดลองนี้ เพื่อประเมินศักยภาพของปกหาคในการ
นำมาประยุกต์ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันและช่วยชะลอริ้วรอยในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บททวนวรรณกรรม

Artocarpus lakoocha Roxb.

มะหาด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus lakoocha* Roxb. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่ออื่น ได้แก่ หาด ขนุนป่า หาดใบใหญ่ พบได้ทั่วไปในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ตำราไทยได้นำแก่นมะหาดมาต้มกับน้ำ นำสิ่งที่ได้มาทำให้เป็นผงแห้งเรียกว่า ปวกหาด ซึ่งใช้เป็นยาถ่ายพยาธิมาแต่โบราณ มีสารออกฤทธิ์ ได้แก่ oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) (Mongkolsuk et al., 1957) อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากแก่นมะหาดยังมีน้อยอยู่ โดยได้มีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Sritularak et al., 1998) จากนั้นจึงได้มีการวิจัยโดยการทดสอบฤทธิ์ทำให้ผิวขาว (whitening activity) ของสารสกัดในหนูตะเภาและอาสาสมัคร พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดสามารถลดความเข้มของสีผิวได้อย่างมีนัยสำคัญ (Tengamnuay et al., 2003) และเร็วๆ นี้ได้มีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Wachiranuntasin, 2005) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ดี รวมถึงมีรายงานว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ nitric oxide ได้ดีและมากกว่า resveratrol ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจที่มีอยู่ในพืชตระกูลถั่ว (Lorenz et al., 2003) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารสกัดจากแก่นมะหาดมาพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชะลอความแก่หรือชะลอริ้วรอย (anti-aging/anti-wrinkle)

ผิวหนัง (Mitsui, 1997)

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ

1. ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นที่อยู่บนสุดของผิวหนัง ประกอบด้วยเซลล์สำคัญหลายชนิดเช่น keratinocyte ทำหน้าที่สร้าง stratum corneum ซึ่งทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันผิว เซลล์สร้างเม็ดสี (melanin) ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีหรือ pigment ต่างๆ
2. ชั้นหนังแท้ (dermis) เป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ประกอบด้วยเซลล์ fibroblast ซึ่งทำหน้าที่สร้าง fibrous protein ที่สำคัญได้แก่ คอลลาเจน(collagen)และอีลาสติน (elastin)
3. ชั้นเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous fat) ประกอบด้วยเซลล์ไขมันเป็นฉนวนป้องกันความร้อนและแรงกระแทกจากภายนอก

ความแก่ (Aging)

เมื่ออายุมากขึ้น เซลล์ต่างๆของร่างกายรวมถึงเซลล์ผิวหนังเริ่มมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง องค์ประกอบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน คือ คอลลาเจนและอีลาสติน มีปริมาณลดลงหรือเสื่อมสลายไปทำให้ความยืดหยุ่นหรือความตึงตัวของผิวหนังลดลง จึงปรากฏเป็นริ้วรอยบน ขาดความยืดหยุ่น ผิวบางและหยาบแห้ง ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงความแก่ของผิวหนัง

ความแก่ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด (Doris, 1996) คือ

1. Intrinsic aging หรือแก่ตามวัย

ผิวหนังจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง การทำงานหรือประสิทธิภาพของเซลล์ผิวหนัง เริ่มลดลง พบเมื่ออายุตั้งแต่ 20 – 30 ปีขึ้นไป การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังที่พบได้คือ

: ชั้นหนังกำพร้าบางลง

: เส้นใยคอลลาเจนและอีลาสตินมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยอีลาสตินจะถูกทำลายมากขึ้น

และคอลลาเจนจะจับกันแน่นขึ้น ทำให้ความยืดหยุ่นลดลง และเกิดการยุบตัวจนสังเกตเห็นเป็นริ้วรอยบนผิวหนัง (Martin, 1995)

: ค่อมไขมันและค่อมเหงื่อลดขนาดลง ทำให้ไขมันธรรมชาติของผิวหนังและเหงื่อถูกขับออกมาน้อยลง ผิวแห้งมากขึ้น

2. Photoaging หรือ แก่ก่อนวัย

เกิดจากปัจจัยภายนอกในร่างกาย เช่น แสงแดดและมลภาวะต่างๆ ส่งผลให้เกิดการทำลาย เซลล์และสารชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก ลักษณะของผิวหนังที่แก่ก่อนวัย ต่างจากผิวหนังที่แก่ตามวัย คือ เป็นรอยขุ่นลึก คิ่งแล้วไม่ค่อยคืนกลับ หยาบหนา ผิวหนัง มิได้บางลงแต่มีฝ้า กระ และสีผิวเข้มขึ้น ยิ่งถ้าถูกแสงแดดมากและนานจะสะสมให้เกิดรอยขุ่นที่มากขึ้น

การชะลอริ้วรอยของผิวหนังอาจทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่นิยมกันมาก คือ การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารที่ช่วยยับยั้งกระบวนการทำลายผิวหนัง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบได้มากมายในท้องตลาด ซึ่งการเลือกใช้จำเป็นต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอย ปัจจุบันเครื่องสำอางชะลอริ้วรอยหลายยี่ห้อ ได้ยืนยันผลจากการประเมินประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มความมั่นใจของผู้บริโภคและความน่าเชื่อถือของผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจเป็นการประเมินความสามารถในการลดรอยเหี่ยวย่น ความสามารถในการทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น เพิ่มความยืดหยุ่นของผิวหนังเป็นต้น ซึ่งศึกษาได้ทั้งแบบในกายและนอกรกาย

การประเมินประสิทธิภาพเครื่องสำอางชะลอความแก่

สามารถศึกษาได้หลายวิธี โดยเฉพาะการศึกษาทาบอาสาสมัคร

1. การวัดความชุ่มชื้นของผิว (Skin hydration)

เนื่องจากน้ำเป็นตัวนำไฟฟ้า การวัดส่วนใหญ่จึงเป็นการวัดค่าทางไฟฟ้าของผิว เช่น ความต้านทานไฟฟ้า, ความจุไฟฟ้าของผิวหนัง เมื่อผิวหนังมีความชุ่มชื้นสูง จะทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลงและความจุไฟฟ้าเพิ่มขึ้น (Tagami et al., 1983) ตัวอย่างเครื่องมือที่นิยมใช้คือ NOVA DPM[®], The Skicon[®] และ Corneometer[®] (Barlow and Wiechers, 1999)

2. การวัดความยืดหยุ่นของผิวหนัง (Skin elasticity)

เป็นการวัดคุณสมบัติเชิงกลของผิวหนัง Hristo(2005) ได้วัดความยืดหยุ่นของผิวหนังในอาสาสมัคร โดยใช้ Cutometer[®] พบว่า ความยืดหยุ่นของผิวหนังมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น เครื่องมือที่ใช้วัดความยืดหยุ่นของผิวหนังมีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้คือ Cutometer[®] ซึ่งอาศัยการเปลี่ยนรูปของผิวหนัง โดยใช้แรงกดและปล่อย มีหลักการคือ ประกอบด้วย probe ที่มีแหล่งกำเนิดแสงอยู่ปลายprobe เมื่อผิวหนังถูกกดเข้าไปใน probe จะไปกั้นแสงที่ส่องจากแหล่งกำเนิดแสงไปที่ตัวรับ อัตราส่วนของแสงระหว่างแหล่งกำเนิดกับตัวรับจะเป็นสัดส่วนเดียวกับความหนาของผิวหนังที่ถูกกดเข้าไป (Takema et al., 1994)

3. การวัดความหยาบของผิวหนัง (Skin roughness)

เนื่องจากไม่สามารถวัดความหยาบของผิวหนังโดยตรงได้ จึงต้องวัดทางอ้อม โดยการทำ replica (แบบหล่อผิวหนัง) ด้วย silicone ซึ่งจะเป็ negative image ของผิวหนัง เรียกวิธีนี้ว่า profilometry (Harnisch et al., 1999) ซึ่งวิธีที่นิยมกันมาก คือ Transmission profilometry โดยใช้เครื่องมือ Visiometer[®] หลักการคือ ใช้แสงส่องผ่าน silicone replica แล้วใช้ CCD camera เป็นตัววัดแสงที่ส่องผ่าน แล้วประมวลผลจากความเข้มของแสง วิธีนี้สามารถวัดความลึกที่แท้จริงของริ้วรอยได้

(Khazaka, 1996) และไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาการวัดริ้วรอยของผิวจากการถ่ายภาพ โดยใช้เครื่อง Visioscan[®] ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องใช้ silicone replica เรียกวิธีนี้ว่า SELS (Surface Evaluation of the Living Skin) (Tronnier, 1997) โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ใช้งานง่าย แต่ไม่สามารถทราบถึงความลึกที่แท้จริงของริ้วรอยได้ ปัจจุบันนี้จึงนิยมใช้ Visiometer[®] ร่วมกับ Visioscan[®] เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการวัดริ้วรอยของผิวหนัง

นอกจากวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีการประเมินประสิทธิภาพเครื่องสำอางที่ช่วยชะลอความแก่ได้อีกหลายวิธี เช่น การใช้อัลตราซาวด์เพื่อวัดความหนาของชั้นหนังแท้ (Daniel and Fred, 2002) การใช้ Tape sampling method เพื่อดูจำนวน ขนาด ความหนาของ comeocyte การใช้ Fluorescence method เพื่อดูความสามารถในการผลิตเปลี่ยนเซลล์ผิว (Harnisch et al., 1999) เป็นต้น

ระเบียบวิธีการทดลอง

สารสกัด

สารสกัดจากแก่นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) หรือเปลือกหาด (80% w/w oxyresveratrol)

วัสดุ

1. 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), Fluka, Switzerland
2. Dimethicone oil, Namsiang Co., Ltd., Thailand
3. Emulgade 1000 NI (Cetearyl alcohol/ceteareth-20), Cognis, Germany
4. Eumugin B2 (Ceteareth-20), Cognis, Germany
5. Finsolve TN (C12-15 alkyl benzoate), Finetex, Inc., USA
6. Glyceryl monostearate, Namsiang Co., Ltd., Thailand
7. Green tea extract powder (70% EGCG), Specialty Natural Product Co., Ltd., Thailand
8. Myristol 318 (Caprylic/capric triglyceride), Cognis, Germany
9. Oxyresveratrol (244 g/mol), purified from Puag-Haad (purity > 95%) (Wachiranuntasin, 2005)
10. Propylene glycol, Srichand United Dispensary Co., Ltd., Thailand
11. Puresyn No.2 (Hydrogenated polydecene), ExxonMobil Corp., USA
12. Sepicide HB (Phenoxyethanol + combined paraben), Seppic, France
13. STAY-C® 50 (50% L-ascorbic acid), E.Merck, Germany

เครื่องมือ

1. Analytical balance, AG 258, Mettler Toledo, Switzerland
2. Corneometer® (CM 825, Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany)
3. Cutometer® (MPA 580, Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany)
4. International Rheology Viscometer (RI:H:12, Rheology (International) Shannon Ltd., Ireland)
5. Mexameter® (MX 18, Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany)
6. pH meter, model 420A, Orion, USA
7. Visioscan® (VC 98, Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany)

วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ ดังนี้

1. การประเมินประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยของสารละลายปกวาดในอาสาสมัคร
2. การพัฒนาตำรับ โลชันชะลอริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปกวาด
3. การประเมินประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยของโลชันปกวาดในอาสาสมัคร

1. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของสารละลายปกวาดในอาสาสมัคร

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิผลในการลดหรือชะลอริ้วรอยของปกวาดซึ่งเตรียมในรูปสารละลายที่ส่งความเข้มข้นและนำไปทดสอบในอาสาสมัคร โดยมีตัวทำละลาย (สารละลาย 20% propylene glycol ในน้ำ) เป็นตัวควบคุม อีกทั้งยังได้เปรียบเทียบประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยเทียบกับสารช่วยชะลอริ้วรอยตัวอื่นๆ ซึ่งได้รับความนิยมในท้องตลาดคือสาร สำคัญในสารสกัดจากชาเขียว (epigallocatechin gallate, EGCG) และ วิตามินซี (vitamin C) จากนั้นจะนำสารละลายปกวาด ณ ความเข้มข้นที่ให้ประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยสูงที่สุด ไปพัฒนาเป็นตำรับ โลชันในหัวข้อถัดไป

1.1 การออกแบบการทดลองและการคัดเลือกอาสาสมัคร

การทดลองนี้ใช้อาสาสมัครหญิงสุขภาพดีจำนวน 90 คน (อายุระหว่าง 30 – 61 ปี) เข้าร่วมการศึกษาวิจัยทางคลินิกแบบคู่ขนาน โดยมีกลุ่มควบคุมในตนเอง (parallel study with self-control) เกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครมีดังต่อไปนี้

Inclusion criteria

- อาสาสมัครหญิงสุขภาพดี
- อายุระหว่าง 30-65 ปี
- เซ็นซิ่งในเอกสารแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมวิจัย
- ผ่านกระบวนการทดสอบการแพ้ (patch test)

Exclusion criteria

- มีประวัติการแพ้เครื่องสำอาง
- แพ้สารทดสอบที่ใช้ในการทดลอง
- มีประวัติเคยเป็น โรคผิวหนังเช่น สะเก็ดเงิน บนใบหน้า
- ได้รับยารับประทานหรือยาทาภายนอกที่อาจมีผลต่อการทดลอง

* อาสาสมัครจะต้องหยุดใช้เครื่องสำอางหรือครีมบำรุงผิวใดๆเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง

อาสาสมัครจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับสารละลายทดสอบที่แตกต่างกันออกไป โดยบริเวณที่ทดสอบคือบริเวณกึ่งกลางของแก้มซ้ายและแก้มขวา หลังจากนั้นจึงทำการวัดค่าความหยาบของผิว (skin roughness value) โดย จะทำการวัดค่า baseline เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนเริ่มการทดลองเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสภาพผิวภายใน 1 เดือนด้วยเครื่อง Visioscan® VC 98

อาสาสมัครต้องผ่านการทดสอบ Patch test ก่อนที่จะเริ่มการทดลองดังอธิบายในข้อถัดไป

1.2 Patch test (Anita, Stephen, and McEwen, 1991)

หยดสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุมลงบนผ้ากอซขนาด 1x1 เซนติเมตร วางลงบนต้นแขนด้านใน โดยต้นแขนด้านซ้ายจะเป็นตัวทำละลายควบคุม (สารละลาย 20% propylene glycol ในน้ำ) และต้นแขนด้านขวาจะเป็นสารละลายทดสอบซึ่งละลายในตัวทำละลายเดียวกัน แปะทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ถ้าเกิดอาการแพ้หรือคัน อาสาสมัครสามารถดึงแผ่นทดสอบออกได้ทันที) หลังจากนั้นดึงแผ่นออก ทำความสะอาดด้วยน้ำแล้วทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นจึงอ่านผลด้วยสายตา ดังเกณฑ์ดังต่อไปนี้

0	No erythema
+1	Mild erythema
+2	Severe erythema
+3	Erythema and papules
+4	Erythema, papules and vesiculation

1.3 การเตรียมสารละลายทดสอบ

เตรียมสารละลายทดสอบ 4 ชนิดคือ สารละลายปกวาดที่ความเข้มข้น 0.25% w/v และ 0.10% w/v, สารละลาย EGCG ความเข้มข้น 0.10% w/v และสารละลายวิตามินซี ความเข้มข้น 0.10% w/v ซึ่งจะใช้กับอาสาสมัครกลุ่ม A, B, C และ D ตามลำดับ โดยสารละลายทุกชนิดจะละลายในตัวทำละลายเดียวกันคือ 20% propylene glycol ในน้ำ

1.4 การทาสารละลายทดสอบบนผิวหนังของอาสาสมัคร

อาสาสมัครจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะมีกลุ่มควบคุมในตนเอง คืออาสาสมัครจะได้รับสารละลายทดสอบ (A, B, C หรือ D) ที่แก้มด้านขวา และได้รับสารละลายควบคุม (20% propylene glycol ในน้ำ) ที่แก้มด้านซ้าย ปริมาณที่ทาในแต่ละครั้งจะเท่ากันคือ 0.05 mL (1 หยด) โดยทาวนละ 2 ครั้ง เช้าและเย็นเป็นเวลาติดต่อกัน 8 สัปดาห์ โดยทุกๆ 2 สัปดาห์อาสาสมัครจะได้รับการตรวจวัดความหยาบของผิวด้วยเครื่อง Visioscan® VC 98

อาสาสมัครจะได้รับสารละลายทดสอบทั้งหมด 2 ขวด โดยแต่ละขวดมีปริมาตรประมาณ 10 mL ซึ่งเพียงพอต่อการใช้ประมาณ 2 สัปดาห์ ก่อนที่จะมารับการตรวจสภาพผิวครั้งต่อไป อาสาสมัครจะได้รับการปกปิดโดยจะไม่ทราบว่าขวดใดเป็นสารทดสอบหรือขวดใดเป็นสารควบคุม โดยหน้าขวดจะมีเพียงฉลากที่ติดบอกชื่อกลุ่มและข้างที่ทาเท่านั้น เช่น อาสาสมัครหมายเลข A1 จะได้รับสารละลาย 2 ขวด โดยขวดหนึ่งเขียนว่า "A1 Left" และอีกขวดหนึ่งเขียนว่า "A1 Right" จะมีเพียงผู้ทำการวิจัยที่ทราบเท่านั้น และเพื่อเป็นการกำหนดปริมาณการทาให้เท่ากัน ในทุกๆคน อาสาสมัครทุกคนจะต้องทาสารทดสอบตำแหน่งละ 1 หยด (0.05 mL)

1.5 การวัดความหยาบของผิว (skin surface roughness)

เครื่องวัดความหยาบของผิวที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ Visioscan VC 98 (ดังรูปที่ 1) วัดโดยวาง probe ของเครื่องที่บริเวณกึ่งกลางแก้มด้านซ้ายและด้านขวา โดยวัดซ้ำกัน 3 ครั้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของความหยาบของผิวนั้นเพื่อนำไปคำนวณทางสถิติต่อไป



รูปที่ 1 Visioscan® VC 98

1.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการวิจัยนี้ ได้ใช้ One-way ANOVA ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าความหยาบของผิวในช่วง baseline (week -4 to week 0) ระหว่างกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความหยาบของผิวระหว่างด้านซ้ายและด้านขวาในคนๆเดียวกัน นั้น ได้เลือกใช้ Paired student's t-test อีกทั้งยังได้มีการวิเคราะห์ผลของเวลาทั้งในช่วง baseline และระหว่างการทดลองด้วย Randomized block ANOVA โดยโปรแกรม SPSS version 11.5

2. การพัฒนาโลชันลดริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปลวกหาด

สูตรตำรับ โลชันเบสในการทดลองนี้ได้ดัดแปลงมาจากสูตรต้นแบบของ Pheansri (2001) ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนรายละเอียดการพัฒนาสูตรตำรับในการวิจัยนี้แสดงไว้ดังตารางที่ 2 สำหรับความเข้มข้นของปลวกหาดจะเลือกใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายจากการทดลองในส่วนแรกที่ให้ประสิทธิภาพและความปลอดภัยที่สุดมาเตรียมเป็น โลชัน

2.1 วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนผสมทุกตัว
2. ให้ความร้อนแก่ส่วนผสม Part A และ Part B ไปพร้อมๆกันพร้อมกับคนตลอดเวลา จนกระทั่งอุณหภูมิของทั้งสองส่วนอยู่ที่ประมาณ 70 องศาเซลเซียส
3. ค่อยๆเทส่วนผสม Part B ลงใน Part A พร้อมกับคนไปด้วยอย่างสม่ำเสมอจนอุณหภูมิ ลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส
4. เทส่วนผสม Part C ลงไปในโลชัน หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer เป็น เวลาประมาณ 20 นาที จนโลชันเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การวัดคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโลชันที่เตรียมได้

2.2.1 การวัดความคงตัวทางกายภาพ

ในการทดลองนี้จะวัดความคงตัวทางกายภาพของโลชันในแง่ของสีและการแยกชั้น โดยจะทำการวัดก่อนและหลัง heating-cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ (1 รอบ = เก็บที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสลับกับ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

2.2.2 การวัดความหนืดของโลชัน

วัดความหนืดของ โลชันที่เตรียมได้ก่อนและหลัง heating-cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ โดยใช้เครื่อง International Rheology Viscometer[®] โดยทำการวัดซ้ำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

2.2.3 การวัดความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของ โลชันที่เตรียมได้ก่อนและหลัง heating-cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ โดยใช้เครื่อง Orion[®] pH-meter โดยทำการวัดซ้ำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 1 สูตรโลชั่นเบส (Pheansri, 2001)

Part	Ingredients	% by weight
A	Petrolatum	3
	Finsolve TN (C12-15 Alkyl benzoate)	1
	Lanette O (Cetostearyl alcohol)	1.4
	Cutina KD 16 (Glyceryl monostearate SE)	2
	Ceteareth-20	1
	Emulgrade NI 1000 (Cetearyl alcohol/Ceteareth-20)	3
	Myristol 318 (Caprylic/capric triglyceride)	3
	Dimethicone	1
	Joboba oil	0.5
	Vitamin E acetate	0.5
B	Deionized water	77.84
	Glycerine	2
	Propylene glycol	3
	Sodium EDTA	0.1
	Glydant plus (DMDM Hydantoin)	0.2
C	Butylated hydroxyanisole (BHA)	0.01
	Sodium metabisulfite	0.15
	Perfume	0.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สูตร โภชนของปวกหาดที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้ (% w/w)

Ingredient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Phase A															
Finsolve TN*	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Puresyn No.2**	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	3	3
Cetearyl alcohol	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.3	0.6	-	0.8	0.8	0.8	0.8
Glyceryl monostearate	1	1	1	1	1	0.8	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	0.8	1
Ceteareth-20	0.5	0.5	0.8	1	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8	0.5	0.5
Emulgade NI1000 ***	2.3	2.3	2	1.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	2.3	2.3	1.6	2.3
Myristol 318 ****	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Dimethicone	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phase B															
Glycerine	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Propylene glycol	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Xanthan gum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	0.8
DI water	82.88	82.88	82.58	82.88	83.28	83.58	82.88	83.58	84.18	84.18	83.68	82.48	80.48	81.68	80.88
Phase C															
Acitve (Puag-Haad)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
BHA	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Sepicide HB *****	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

* = C12-15 Alkyl benzoate, ** = Hydrogenated polydecene, *** = Cetearyl alcohol/Ceteareth-20, **** = Caprylic/capric triglyceride,

***** = Phenoxyethanol + combined paraben

3. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของโลชั่นปกกแดดในอาสาสมัคร

การทดลองในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยของโลชั่นปกกแดด ณ ความเข้มข้นที่คัดเลือกมาจากการทดลองในหัวข้อที่ 1 โดยเปรียบเทียบกับสารชะลอริ้วรอยทางการค้าตัวใดตัวหนึ่งจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 1

3.1 การออกแบบการทดลองและการคัดเลือกอาสาสมัคร

การทดลองนี้ใช้อาสาสมัครหญิงสุขภาพดีจำนวน 44 คน (อายุระหว่าง 30 – 55 ปี) โดยเลือกจากอาสาสมัครกลุ่มเดิมจากหัวข้อที่ 1 เข้าร่วมการศึกษาโดยกระบวนการวิจัยและเกณฑ์ในการคัดเลือกอาสาสมัครจะเช่นกันกับหัวข้อที่ 1 โดยจะแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 22 คน อาสาสมัครจะต้องหยุดใช้เครื่องสำอางหรือครีมบำรุงผิวใดๆเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับ โลชั่นทดสอบที่แตกต่างกันออกไป และบริเวณที่ทดสอบคือบริเวณแก้มซ้ายและแก้มขวา

3.2 การเตรียมโลชั่นทดสอบ

โลชั่นทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 2 ชนิดสำหรับอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม กลุ่มแรกจะได้รับ โลชั่น A คือ โลชั่นปกกแดด ณ ความเข้มข้นที่คัดเลือกจากหัวข้อที่ 1 และกลุ่มที่สองได้รับ โลชั่น B คือ โลชั่นของสารชะลอริ้วรอยทางการค้าที่คัดเลือกจากหัวข้อที่ 1 เช่นเดียวกัน ทั้งนี้แต่ละกลุ่มยังได้รับ โลชั่นควบคุมซึ่งเป็น โลชั่นเบสที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (blank lotion) เป็น self-control อีกด้วย

3.3 การทาโลชั่นทดสอบบนผิวหนังของอาสาสมัคร

อาสาสมัครในแต่ละกลุ่มจะได้รับ โลชั่นทดสอบ (A หรือ B) ที่แก้มด้านหนึ่ง และได้รับ โลชั่นควบคุม (blank lotion) ที่แก้มอีกด้านหนึ่ง ปริมาณที่ทาในแต่ละครั้งจะเท่ากันคือ 0.1 g (1 หัวบีบ) โดยทาวนละ 2 ครั้ง เช้าและเย็นเป็นเวลาติดต่อกัน 8 สัปดาห์ ทั้งนี้บริเวณที่ทาโลชั่นจะถูกกระจายให้สม่ำเสมอในแต่ละกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม A อาสาสมัคร 11 คนแรก จะได้ทาโลชั่นควบคุมที่แก้มด้านซ้าย และ โลชั่นทดสอบที่แก้มด้านขวา ในขณะที่อาสาสมัครที่เหลืออีก 11 คน จะได้รับ โลชั่นทดสอบที่แก้มด้านซ้ายและ โลชั่นควบคุมที่แก้มด้านขวา และในกลุ่ม B ก็เช่นเดียวกัน

อาสาสมัครจะได้รับ โลชั่นทดสอบทั้งหมด 2 ขวด โดยแต่ละขวดมีน้ำหนักประมาณ 30 g ซึ่งเพียงพอต่อการใช้ตลอดการทดลอง (ประมาณ 2 เดือน) อาสาสมัครจะได้รับการปกปิดโดยจะไม่ทราบว่าขวดใดเป็น โลชั่นทดสอบหรือขวดใดเป็น โลชั่นควบคุม โดยหน้าขวดจะมีเพียงฉลากที่ติด

บอกชื่อกลุ่มและข้างที่ทาเท่านั้น เช่น อาสาสมัครหมายเลข A1 จะได้รับโลชั่น 2 ขวด โดยขวดหนึ่งเขียนว่า “A1 Left” และอีกขวดหนึ่งเขียนว่า “A1 Right” จะมีเพียงผู้ทำการวิจัยที่ทราบเท่านั้น และเพื่อเป็นการกำหนดปริมาณการทาให้เท่ากันในทุกๆคน อาสาสมัครทุกคนจะต้องทาสารทดสอบตำแหน่งละ 1 หัวบีบ (0.1 g) โดยกำหนดให้ทาวันละสองครั้งเช้า เย็น ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ อาสาสมัครจะต้องมารับการตรวจสอบสภาพผิวโดยวัดรีวรอย ด้วยเครื่อง Visioscan VC 98 และวัดความยืดหยุ่นของผิวด้วยเครื่อง Cutometer® MPA 580 ทุกๆ สองสัปดาห์ อีกทั้งยังได้ทำการวัดความขาวของผิวและความชุ่มชื้นผิวยุ่ร่วมด้วย โดยใช้เครื่อง Mexameter MX® 18 และ Corneometer® CM 825 ตามลำดับ โดยจะทำการวัดทุกๆ 4 สัปดาห์

3.4 การวัดความหยาบของผิว

วัดความหยาบของผิวโดยใช้ Visioscan® VC 98 วัดโดยวาง probe ของเครื่องที่บริเวณกึ่งกลางแก้มด้านซ้ายและด้านขวา โดยวัดซ้ำกัน 3 ครั้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของความหยาบของผิวนั้นเพื่อนำไปคำนวณทางสถิติต่อไป

3.5 การวัดความยืดหยุ่นของผิว

วัดความยืดหยุ่นของผิวโดยใช้เครื่อง Cutometer® MPA 580 วัดโดยวาง probe ของเครื่องที่บริเวณกึ่งกลางแก้มด้านซ้ายและด้านขวา โดยวัดซ้ำกัน 3 ครั้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน นำค่า elasticity parameter (R2) ที่วัด ได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปคำนวณทางสถิติต่อไป

3.6 การวัดความขาวของผิว

วัดความขาวของผิวโดยใช้เครื่อง Mexameter MX® 18 วัดโดยวาง probe ของเครื่องที่บริเวณกึ่งกลางแก้มด้านซ้ายและด้านขวา โดยวัดซ้ำกัน 3 ครั้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน นำค่า melanin value ที่วัด ได้ไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปคำนวณทางสถิติต่อไป

3.7 การวัดความชุ่มชื้นของผิว

วัดความชุ่มชื้นของผิวโดยใช้เครื่อง Corneometer® CM 825 วัดโดยวาง probe ของเครื่องที่บริเวณกึ่งกลางแก้มด้านซ้ายและด้านขวา โดยวัดซ้ำกัน 3 ครั้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน นำค่า hydration value ที่วัด ได้ไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปคำนวณทางสถิติต่อไป

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของสารละลายปกปิดในอาสาสมัคร

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อที่จะประเมินประสิทธิผลของปกปิดสองความเข้มข้นในการชะลอหรือช่วยลดริ้วรอยของผิวหนังในอาสาสมัคร ความเข้มข้นของสารละลายปกปิดที่เลือกมาใช้ในการทดลองนี้คือ 0.25% และ 0.10% w/v ละลายใน 20% propylene glycol ในน้ำ สาเหตุที่เลือกใช้ความเข้มข้น 0.25% นั้น อ้างอิงมาจากผลการศึกษาประสิทธิผลในการทำให้ผิวขาว โดย Pengrungruangwong (2001) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าความเข้มข้นของสารละลายปกปิดที่ให้ประสิทธิภาพในการทำให้ผิวขาวสูงที่สุด คือ 0.25% โดยมีประสิทธิภาพเหนือกว่าที่ 0.5% และ 1.0 % อีกทั้งยังเหนือกว่าสารที่ทำให้ผิวขาวที่นิยมใช้ทางการค้า เช่น kojic acid และ licorice extract อีกด้วย ส่วนสาเหตุที่เลือกใช้ความเข้มข้น 0.10% ด้วยนั้น มาจากการทดลองของ Tengamnuay และคณะในปี 2006 ซึ่งได้รายงานไว้ว่า โลชันปกปิดที่ความเข้มข้น 0.10% w/v มีประสิทธิภาพในการทำให้ผิวขาวดีกว่า licorice lotion ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้น ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ยังช่วยทำให้ลักษณะทางกายภาพของปกปิดดีขึ้น คือสีจะไม่เหลืองเข้มเท่าที่ความเข้มข้นสูงๆ อีกด้วย

สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดจากชาเขียวและวิตามินซีที่เลือกใช้ในการทดลองนี้คือ 0.10% สาเหตุที่เลือกใช้ที่ความเข้มข้นนี้คือ ต้องการเปรียบเทียบประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยที่ความเข้มข้นเดียวกันกับสารละลายปกปิด

จากการทดลอง อาสาสมัครจำนวน 90 คน จะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 23, 23, 22, และ 22 คน เรียกว่ากลุ่ม A, B, C และ D ตามลำดับ โดยกลุ่ม A ได้รับ สารทดสอบคือ สารละลายปกปิดความเข้มข้น 0.25% กลุ่ม B ได้รับสารละลายปกปิดความเข้มข้น 0.10% กลุ่ม C ได้รับสารละลาย EGCG ความเข้มข้น 0.10% และกลุ่ม D ได้รับสารละลายวิตามินซีที่ความเข้มข้น 0.10% เช่นกัน โดยอาสาสมัครทุกคนจะทาสารทดสอบที่แก้มด้านขวาและทาสารควบคุม (20% propylene glycol ในน้ำ) ที่แก้มด้านซ้าย

ก่อนเริ่มการทดลอง อาสาสมัครจะต้องได้รับการทดสอบการแพ้ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในวิธีการทดลอง โดยผลปรากฏว่า มีอาสาสมัครสองคนที่เกิดการแพ้ คนแรกได้รับสารทดสอบในกลุ่ม B มีระดับการแพ้อยู่ที่ระดับ +1 (erythema) ส่วนคนที่สองเป็นอาสาสมัครในกลุ่ม D มีระดับการแพ้อยู่ที่ระดับ +2 (erythema and papule) ดังนั้นอาสาสมัครทั้งสองคนจึงต้องถอนตัวออกจากการศึกษา อีกทั้งยังมีอาสาสมัครอีกสองคนในกลุ่ม C และ D ขอดถอนตัวออกจากการศึกษาหลังจากเริ่มการทดลองไปได้ 2 สัปดาห์เนื่องจากเหตุผลส่วนตัวที่ไม่เกี่ยวข้องกับการแพ้ ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษานจบการศึกษาจึงเหลือ 86 คน โดยแบ่งเป็น 23, 22, 21 และ 20 คน ในกลุ่ม A, B, C และ D ตามลำดับ

ก่อนที่จะเริ่มทดสอบ อาสาสมัครจะต้องมาวัดสภาพผิวเพื่อเป็นค่า baseline เป็นเวลา 1 เดือนก่อนเริ่มทดสอบ ตัวแปรที่ใช้วัดค่าความหยาบของผิวมี 2 อย่างคือ circular roughness และ mean roughness ค่า baseline ของทั้งสองตัวแปรได้แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า baseline ของ circular roughness ณ สัปดาห์ที่ 4 และ 2 ก่อนเริ่มการทดลอง (week -4 และ week -2) และ ณ สัปดาห์ที่เริ่มการทดลอง (week 0)

กลุ่ม		แก้มซ้าย				แก้มขวา			
		week -4	week -2	week 0	P-value ^a	week -4	week -2	week 0	P-value ^a
A (n = 23)	Mean	57.38	59.84	57.10	0.10	58.43	58.86	55.96	0.10
	SD	11.26	9.53	10.08	NS*	10.71	8.59	10.73	NS*
B (n = 22)	Mean	58.62	58.74	58.08	0.87	59.02	56.89	56.91	0.40
	SD	10.07	8.86	9.08	NS*	11.29	9.09	11.00	NS*
C (n = 21)	Mean	60.90	59.40	58.24	0.21	60.03	58.25	57.35	0.28
	SD	12.41	10.22	11.44	NS*	11.55	9.11	10.53	NS*
D (n = 20)	Mean	62.10	59.43	58.95	0.29	61.92	59.08	56.33	0.06
	SD	8.44	10.23	12.17	NS*	8.73	10.24	10.26	NS*
P-value ^b		0.465	0.986	0.954		0.731	0.865	0.974	
		NS**	NS**	NS**		NS**	NS**	NS**	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for one-way ANOVA

* ไม่มีผลของเวลาต่อค่า baseline circular roughness ($P > 0.05$), randomized block ANOVA.

** ไม่มีความแตกต่างของค่า baseline circular roughness ระหว่าง 4 กลุ่ม ($P > 0.05$), one-way ANOVA

ตารางที่ 4 ค่า baseline ของ mean roughness ณ สัปดาห์ที่ 4 และ 2 ก่อนเริ่มการทดลอง (week -4 และ week -2) และ ณ สัปดาห์ที่เริ่มการทดลอง (week 0)

กลุ่ม		แก้มซ้าย				แก้มขวา			
		week -4	week -2	Week 0	P-value ^a	week -4	week -2	week 0	P-value ^a
A (n = 23)	Mean	55.88	57.94	55.57	0.17	56.61	56.77	53.91	0.07
	SD	10.86	9.29	9.76	NS*	10.75	8.73	10.54	NS*
B (n = 22)	Mean	56.82	56.74	56.36	0.94	57.38	54.98	54.83	0.21
	SD	9.79	8.48	9.60	NS*	10.78	8.69	10.60	NS*
C (n = 21)	Mean	59.02	57.70	55.90	0.08	57.81	56.68	55.70	0.42
	SD	11.83	9.77	10.13	NS*	10.93	8.73	10.13	NS*
D (n = 20)	Mean	60.05	57.17	56.48	0.17	59.93	57.27	54.60	0.06
	SD	7.73	9.71	10.98	NS*	8.55	9.34	9.76	NS*
P-value ^b		0.519	0.974	0.990		0.756	0.846	0.950	
		NS**	NS**	NS**		NS**	NS**	NS**	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for one-way ANOVA

* ไม่มีผลของเวลาต่อค่า baseline mean roughness ($P > 0.05$), randomized block ANOVA.

** ไม่มีความแตกต่างของค่า baseline mean roughness ระหว่าง 4 กลุ่ม ($P > 0.05$), one-way ANOVA

จากตารางที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างของค่าความหยาบของผิวทั้ง circular roughness และ mean roughness ระหว่างกลุ่มทั้ง 4 กลุ่มในช่วง baseline โดยดูจากค่า P-value ของ one-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 4 กลุ่ม ($P > 0.05$) ทั้งที่ week -4, -2 และ 0 แสดงให้เห็นว่าค่าความหยาบของผิวของอาสาสมัครทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน นอกเหนือจากนั้น ยังได้ทำการวิเคราะห์ผลของเวลาที่มีต่อความหยาบของผิวแก้มแต่ละด้าน โดย randomized block ANOVA พบว่าความหยาบของผิวไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในช่วงเวลา 1 เดือน ($P > 0.05$) อีกทั้งยังได้วิเคราะห์ดูความแตกต่างของความหยาบของผิวระหว่างด้านซ้ายและด้านขวา โดยใช้ Paired t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและขวาในช่วง baseline เช่นกัน ($P > 0.05$)

ตารางที่ 5 แสดงค่า circular roughness ในช่วงเวลาของการทดสอบ (week 0 – week 8) จากตารางจะสังเกตเห็นได้ว่า ค่า circular roughness ของแก้มข้างซ้ายซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม(ได้รับ 20% propylene glycol ในน้ำ)ทั้ง A, B, C และ D มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้อาจมีผลเพิ่มความหยาบของผิว แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณการเพิ่มนั้นถือว่าค่อนข้างน้อยและไม่เห็นผลนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, randomized block ANOVA) โดยได้มีการรายงานถึงการให้ propylene glycol ว่าไม่ควรจะเกิน 20% มิฉะนั้นอาจทำให้ผิวแห้งได้ (Roberts and Walker, 1993) ซึ่งในทำนองเดียวกันก็อาจทำให้ความหยาบของผิวเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

สำหรับค่าความหยาบของผิวแก้มข้างที่ได้รับความทดสอบ (ด้านขวา) จะแตกต่างจากด้านซ้ายที่เป็นข้างควบคุม พบว่าค่าความหยาบไม่ได้เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของเวลาโดย randomized block ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อสังเกตข้อมูลอย่างใกล้ชิด พบว่าค่า circular roughness ในบางกลุ่ม (กลุ่ม B และ C) มีแนวโน้มจะลดลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารทดสอบอาจช่วยชะลอผลของตัวทำละลาย (ที่ทำให้ค่าความหยาบเพิ่มขึ้น) ได้

เมื่อวิเคราะห์ดูความแตกต่างของความหยาบของผิวระหว่างด้านซ้ายและด้านขวาโดยใช้ Paired t-test ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าค่าเฉลี่ยของ circular roughness ภายในแต่ละกลุ่มระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวามีความแตกต่างกัน โดยข้างที่ได้รับความทดสอบมีแนวโน้มที่จะต่ำกว่าด้านควบคุม ซึ่งจะเห็นได้ในทุกกลุ่มแต่ที่เวลาต่างกันออกไป เช่น ในกลุ่มที่ได้รับ 0.25% ปวกหาด (A) และ 0.10% EGCG (C) จะเห็นความแตกต่างที่ระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวา ณ สัปดาห์สุดท้าย (week 8) โดยค่า circular roughness ของแก้มด้านขวาค่าต่ำกว่าแก้มด้านซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ 0.10% vitamin C (กลุ่ม D) พบว่าให้ผลที่ขัดต่อการแปลคือค่า circular roughness ของแก้มด้านขวาค่าสูงกว่าแก้มด้านซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เฉพาะในสัปดาห์ที่ 4 เท่านั้น แต่ไม่แตกต่างกันในเวลาต่อมา ในทางกลับกัน กลุ่มที่ได้รับ 0.10 % w/v ปวกหาด (B) ดูเหมือนจะให้ผลที่ดีที่สุด โดยค่า circular roughness ของแก้มด้านขวาค่าต่ำกว่าแก้มด้านซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองและคงอยู่จนสิ้นสุดการทดลอง ($P < 0.05$)

ส่วนตัวแปรอีกหนึ่งตัวที่ใช้ในการศึกษานี้คือ mean roughness ซึ่งแสดงดังตารางที่ 6 พบว่า ได้ผลที่เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับ circular roughness คือ ค่า mean roughness ของแก้มข้างซ้ายซึ่งเป็นด้านควบคุม(ได้รับ20% propylene glycol ในน้ำ)ในอาสาสมัครทุกกลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณการเพิ่มนั้นถือว่าค่อนข้างน้อยและไม่เห็นผลนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, randomized block ANOVA) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาอย่างใกล้ชิดจะเห็นว่าในกลุ่ม A และ C จะเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า mean roughness ของแก้มซ้ายในขณะที่กลุ่ม B และ D จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นบางสัปดาห์เท่านั้น ซึ่งเหตุผลนั้นสามารถอธิบายได้ในทำนอง

เดียวกับค่า circular roughness ก็น่าจะเกิดจากผลของ propylene glycol ที่อาจทำให้ผิวแห้งและหยาบเพิ่มมากขึ้นได้

สำหรับค่าความหยาบของผิวข้างที่ได้รับความทดสอบ(แก้มด้านขวา) จะแตกต่างกับด้านซ้าย ที่เป็นข้างควบคุม พบว่าค่าความหยาบไม่ได้เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป เมื่อวิเคราะห์ผลของเวลา โดย randomized block ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาข้อมูลอย่างใกล้ชิด พบว่าค่า circular roughness ของแก้มขวาในบางกลุ่ม (กลุ่ม B) มีแนวโน้มจะลดลง ซึ่งจากผลของ mean roughness สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกันกับ circular roughness คือสารทดสอบ(antioxidant) อาจช่วยชะลอผลของตัวทำละลาย (ที่ทำให้ค่าความหยาบเพิ่มขึ้น) ได้

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของความหยาบของผิวระหว่างด้านซ้ายและด้านขวาโดยใช้ Paired t-test ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า circular roughness โดยแก้มข้างที่ได้รับความทดสอบมีแนวโน้มที่จะต่ำกว่าด้านควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ในทุกกลุ่ม (ยกเว้นกลุ่ม D) ในเวลาที่ต่างกันออกไป เช่น ในกลุ่มที่ได้รับ 0.25% ปวกหาด (A) และ 0.10% EGCG (C) จะเห็นความแตกต่างที่ระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวา ณ สัปดาห์สุดท้ายของการทา (week 8) โดยค่า mean roughness ของแก้มด้านขวาค่าต่ำกว่าแก้มด้านซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ 0.10% vitamin C (กลุ่ม D) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาเลยตลอดการทดลอง ($P > 0.05$) ในทางกลับกัน กลุ่มที่ได้รับ 0.10% ปวกหาด (กลุ่ม B) ดูเหมือนจะให้ผลที่ดีที่สุด โดยค่า mean roughness ของแก้มด้านขวาค่าต่ำกว่าแก้มด้านซ้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองและคงอยู่บนสิ้นสุดการทดลองซึ่งผลจะสอดคล้องกับค่า circular roughness ในตารางที่ 5

จากการศึกษานี้ อาจกล่าวได้ว่าสารทดสอบ (test antioxidants) สามารถช่วยลดผลที่ไม่ดีของตัวทำละลาย (solvent effect) และช่วยในการชะลอริ้วรอยได้ โดยสารที่ให้ประสิทธิผลดีที่สุดในการทดลองนี้คือ 0.10% ปวกหาด รองลงมาคือ 0.25% ปวกหาดซึ่งให้ประสิทธิผลพอกันกับ 0.10% EGCG ส่วน 0.10% vitamin C ดูเหมือนจะให้ประสิทธิผลที่ต่ำที่สุดในการชะลอริ้วรอย รูปที่ 2-9 แสดงถึงค่าเฉลี่ยของ circular roughness และ mean roughness ของสารทดสอบแต่ละตัว ณ เวลาต่างๆ ส่วนรูปที่ 10, 11 และ 12 แสดงภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังที่สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม B (0.10% ปวกหาด) โดยเปรียบเทียบระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวา

เป็นที่น่าสนใจว่าสารละลายปวกหาดที่ความเข้มข้น 0.10% ให้ผลในการชะลอริ้วรอยที่ดีที่สุด คือเห็นความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและด้านขวาดังแต่สัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่ปวกหาดที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าหรือ 0.25% นั้น กลับเห็นผลซ้ำกว่าคือเห็นที่สัปดาห์ที่ 8 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pengrungruangwong ในปี 2001 ซึ่งรายงานไว้ว่า ประสิทธิภาพในการทำให้ผิวขาวของสารละลายปวกหาด 0.25% ให้ผลที่ดีกว่า 0.50% ซึ่งจากการศึกษาของ Pengrungruangwong

และการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า สารปกวาดจะต้องมีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะให้ผลดีที่สุด ความเข้มข้นที่สูงขึ้นกลับไม่ได้ช่วยให้ประสิทธิภาพดีขึ้น ดังนั้น จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากแก่นมะหาด (หรือของปกวาด) ในผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอางแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา อาจสรุปได้ว่า 0.10% ปกวาด มีประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอยมากที่สุด รองลงมาคือ 0.25% ปกวาดซึ่งให้ผลพอกันกับ 0.10% EGCG ในขณะที่ 0.10% vitamin C กลับให้ผลที่น้อยที่สุดในการชะลอริ้วรอย ดังนั้นจึงเลือก 0.10% ปกวาดและ 0.10% EGCG ไปพัฒนาเป็น โលันเพื่อใช้ในอาสาสมัครในการทดลองขั้นต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่า circular roughness บริเวณแก้มของอาสาสมัครที่ได้รับสารทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD)

Treatment group		Circular roughness					P-value ^a
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	
A (n = 23)	PG-control	57.10 \pm 10.08	56.54 \pm 11.61	57.00 \pm 9.19	57.58 \pm 9.81	58.34 \pm 9.48	0.824
	A	55.96 \pm 10.73	54.65 \pm 10.87	54.58 \pm 8.56	55.52 \pm 9.63	55.75 \pm 7.08	0.834
	P-value ^b	0.355	0.131	0.056	0.076	0.028*	
B (n = 22)	PG-control	58.08 \pm 9.08	59.62 \pm 10.08	60.42 \pm 10.71	60.51 \pm 9.95	59.19 \pm 10.14	0.526
	B	56.90 \pm 11.00	54.10 \pm 9.83	56.45 \pm 8.65	57.26 \pm 10.19	55.33 \pm 9.66	0.270
	P-value ^b	0.36	0.000*	0.010*	0.013*	0.011*	
C (n = 21)	PG-control	58.24 \pm 11.44	58.05 \pm 9.44	59.06 \pm 10.33	58.51 \pm 9.04	59.73 \pm 9.05	0.155
	C	57.35 \pm 10.53	57.14 \pm 10.67	56.68 \pm 8.75	56.35 \pm 9.19	56.36 \pm 10.11	0.975
	P-value ^b	0.407	0.482	0.190	0.058	0.015*	
D (n = 20)	PG-control	56.95 \pm 12.17	58.55 \pm 10.18	58.92 \pm 8.10	57.45 \pm 8.56	59.68 \pm 8.63	0.765
	D	56.33 \pm 10.26	55.97 \pm 9.14	56.42 \pm 7.73	58.43 \pm 9.05	56.63 \pm 9.94	0.503
	P-value ^b	0.077	0.069	0.012*	0.481	0.057	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

PG-control = 20% propylene glycol self-control. A = 0.25% Puag-Haad, B = 0.10% Puag-Haad, C = 0.10% EGCG, D = 0.10% Vitamin C

* มีความแตกต่างระหว่าง แก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

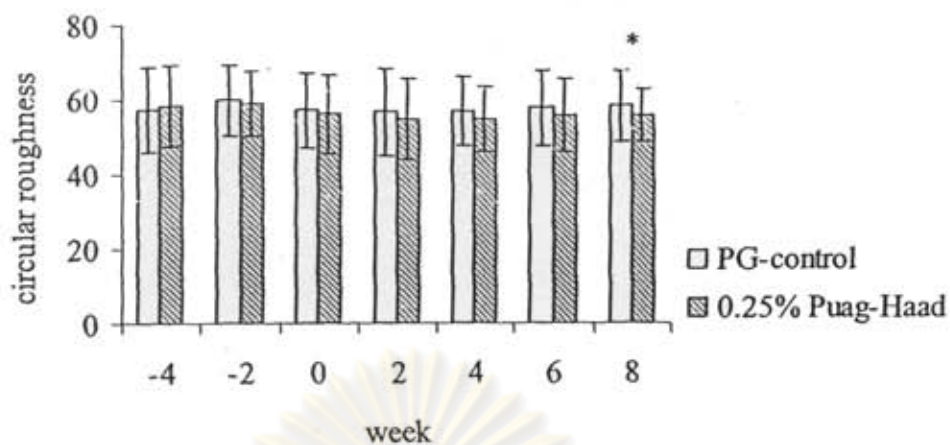
ตารางที่ 6 ตารางแสดงค่า mean roughness บริเวณแก้มของอาสาสมัครที่ได้รับสารทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD)

Treatment group		Mean roughness					P-value ^a
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	
A (n = 23)	PG-control	55.56 \pm 9.76	54.59 \pm 11.23	54.94 \pm 9.01	55.19 \pm 9.48	56.53 \pm 8.89	0.741
	A	53.91 \pm 10.54	53.09 \pm 10.67	53.12 \pm 8.57	53.79 \pm 9.30	53.92 \pm 6.69	0.950
	P-value ^b	0.162	0.177	0.131	0.192	0.019*	
B (n = 22)	PG-control	56.36 \pm 9.60	57.70 \pm 9.58	58.47 \pm 10.27	57.56 \pm 8.96	56.56 \pm 9.71	0.676
	B	54.83 \pm 10.60	52.54 \pm 9.39	54.80 \pm 8.31	54.98 \pm 8.74	53.83 \pm 9.24	0.333
	P-value ^b	0.212	0.000*	0.011*	0.046*	0.045*	
C (n = 21)	PG-control	55.90 \pm 10.80	56.05 \pm 9.38	56.75 \pm 9.70	56.48 \pm 9.19	57.51 \pm 8.50	0.113
	C	55.73 \pm 10.13	55.33 \pm 10.19	55.19 \pm 8.62	54.86 \pm 9.36	55.17 \pm 10.57	0.987
	P-value ^b	0.864	0.550	0.347	0.119	0.036*	
D (n = 20)	PG-control	56.48 \pm 10.98	56.42 \pm 9.56	56.60 \pm 7.69	55.32 \pm 8.32	58.02 \pm 10.55	0.657
	D	54.60 \pm 9.76	54.52 \pm 8.80	54.77 \pm 7.53	56.33 \pm 8.35	55.80 \pm 11.03	0.697
	P-value ^b	0.169	0.139	0.057	0.432	0.126	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

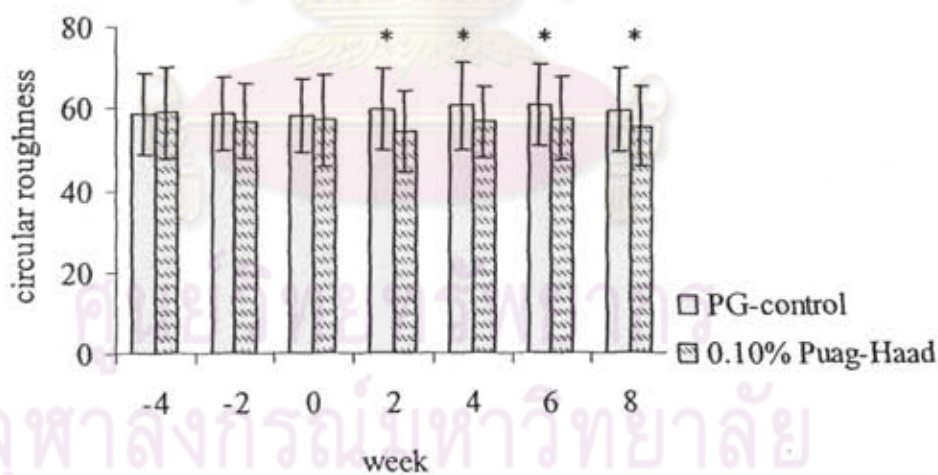
PG-control = 20% propylene glycol self-control. A = 0.25% Puag-Haad, B = 0.10% Puag-Haad, C = 0.10% EGCG, D = 0.10% Vitamin C

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)



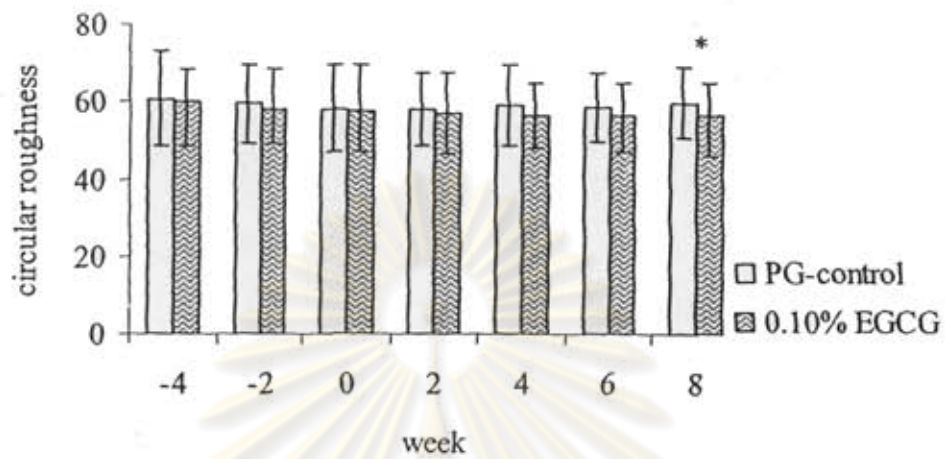
รูปที่ 2 กราฟแสดงค่า circular roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.25% ปวกหาด(A) และ สารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 23)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05).



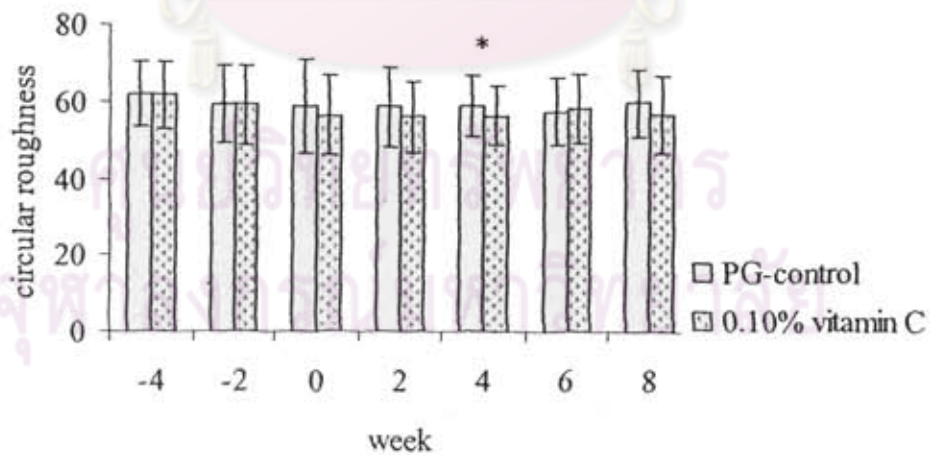
รูปที่ 3 กราฟแสดงค่า circular roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.10% ปวกหาด(B) และ สารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 22)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05).



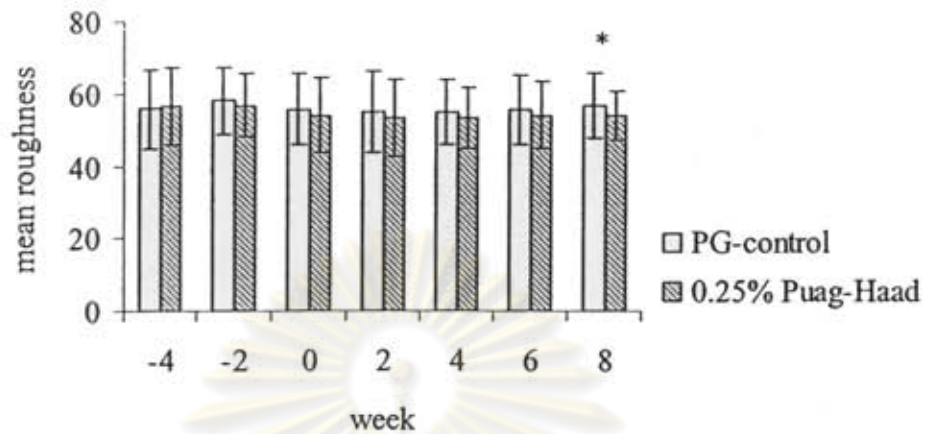
รูปที่ 4 กราฟแสดงค่า circular roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.10% EGCG (C) และสารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean ± s.d., n = 21)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$).

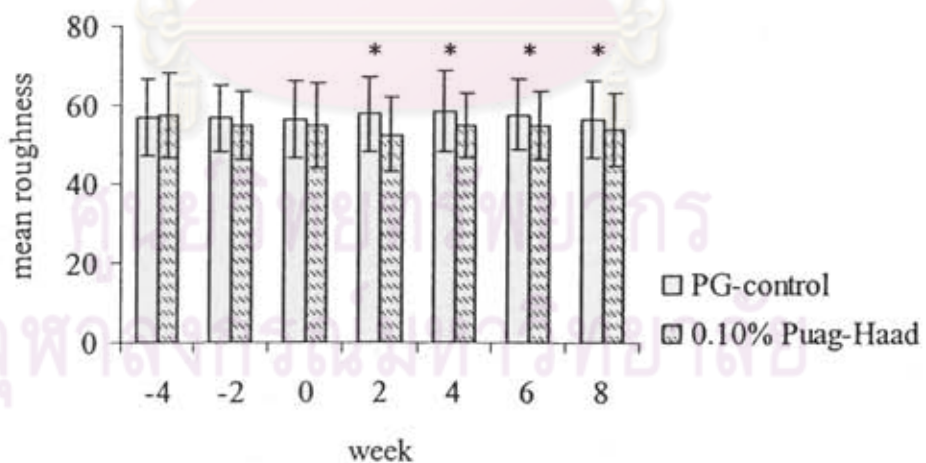


รูปที่ 5 กราฟแสดงค่า circular roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.10% vitamin C (D) และสารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean ± s.d., n = 20)

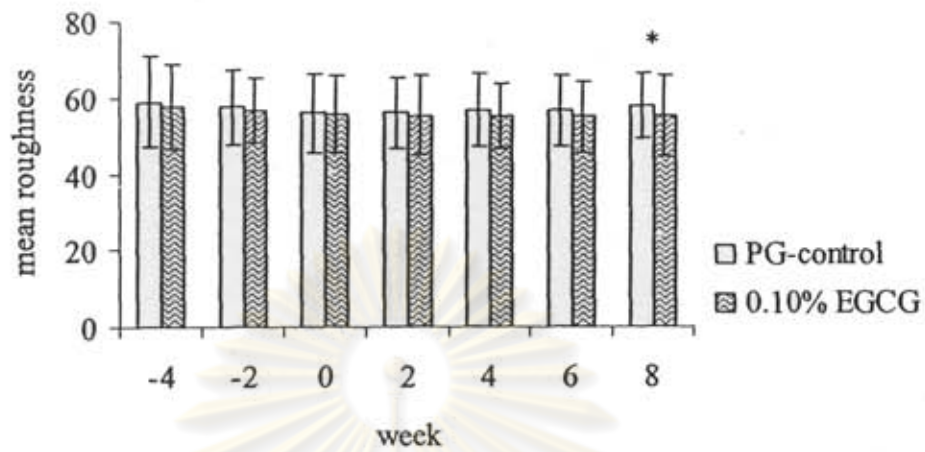
* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$).



รูปที่ 6 กราฟแสดงค่า mean roughness ก่อนและหลังการทำสารละลาย 0.25% ปวกหาด (A) และ สารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 23)
 * มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05).

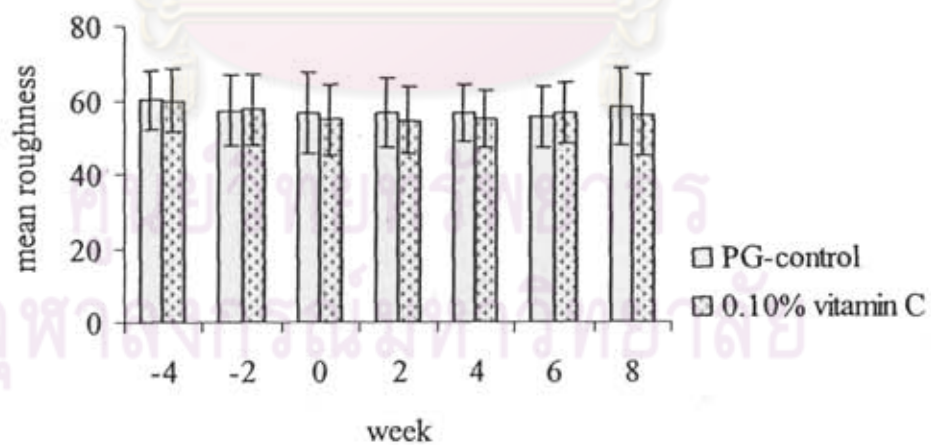


รูปที่ 7 กราฟแสดงค่า mean roughness ก่อนและหลังการทำสารละลาย 0.10% ปวกหาด (B) และ สารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 22)
 * มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05).

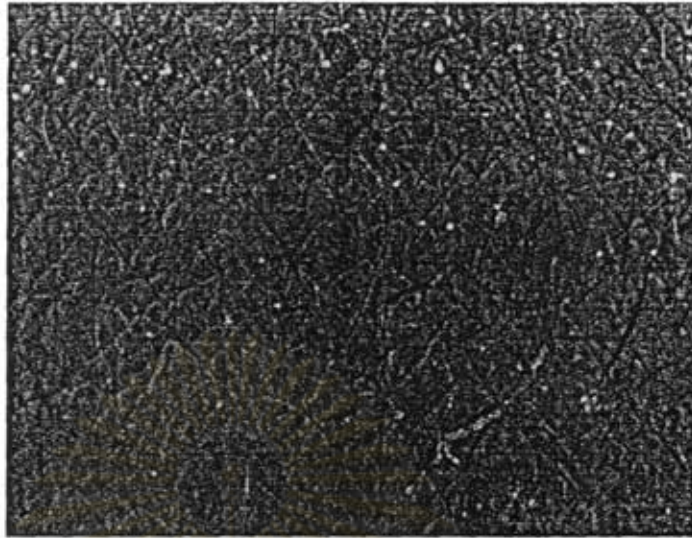


รูปที่ 8 กราฟแสดงค่า mean roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.10% EGCG (C) และสารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 21)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$).

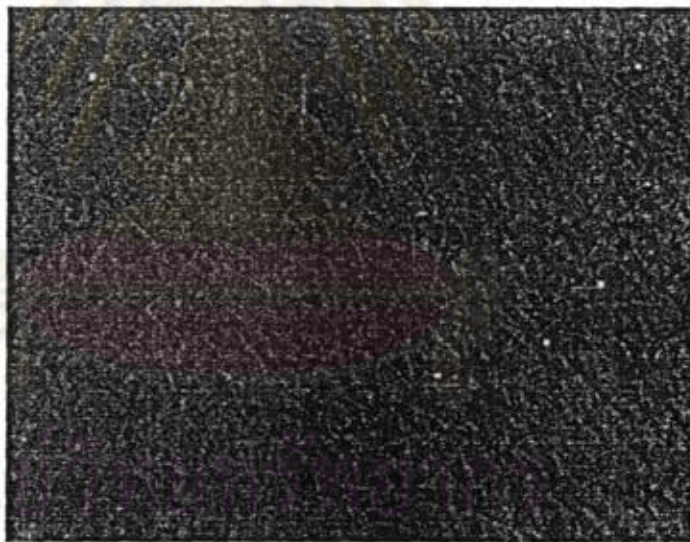


รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า mean roughness ก่อนและหลังการทาสารละลาย 0.10% vitamin C (D) และสารละลายควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 20)



Left cheek (control)

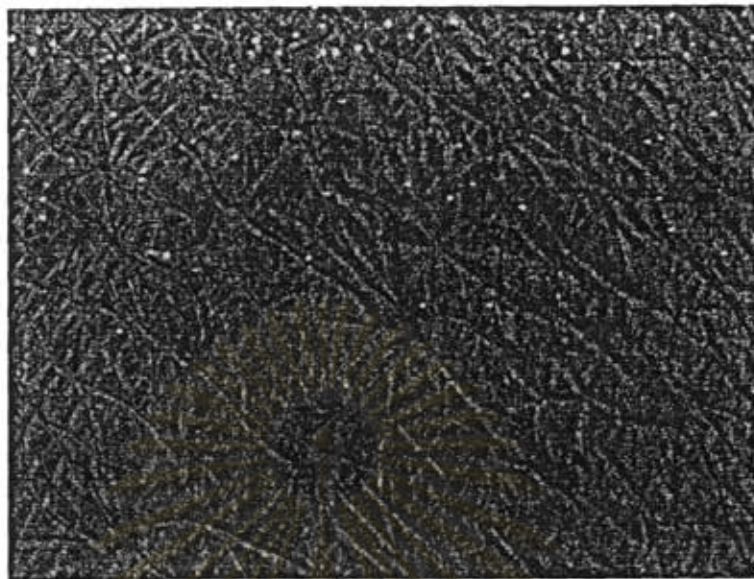
circular roughness = 66.00, mean roughness = 63.33



Right cheek (treatment)

circular roughness = 55.33, mean roughness = 53.6

รูปที่ 10 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 3 ที่ สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม B (สารละลายปูนขาว 0.10% w/v) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ด้านซ้ายและด้านขวา



Left cheek (control)

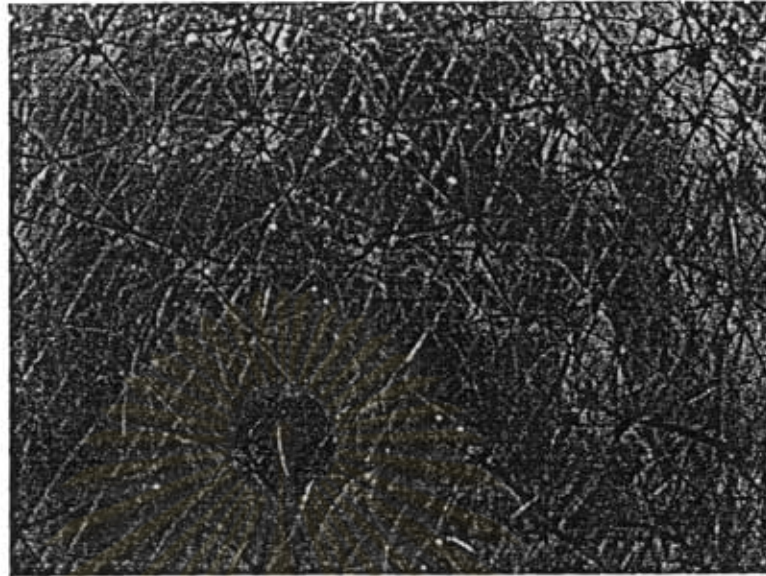
circular roughness = 68.33, mean roughness = 66.33



Right cheek (treatment)

circular roughness = 56.00, mean roughness = 54.00

รูปที่ 11 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 10 ที่ สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม B (สารละลายปกขาด 0.10% w/v) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ด้านซ้ายและด้านขวา



Left cheek (control)

circular roughness = 54.00, mean roughness = 52.00



Right cheek (treatment)

circular roughness = 47.33, mean roughness = 47.00

รูปที่ 12 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan[®] VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 11 ที่สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม B (สารละลายปกกัด 0.10% w/v) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ด้านซ้ายและด้านขวา

2. การพัฒนาโลชันลดริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปลวกหาด

การทดลองนี้เป็นการพัฒนาโลชันชะลอริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปลวกหาดที่ความเข้มข้น 0.10% โดยพัฒนามาจากสูตรพื้นฐาน (lotion base) ของ Pheansri ในปี 2001 สูตรโลชันที่ได้พัฒนาในการทดลองนี้ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนผลของความคงตัวของกายภาพ (การแยกชั้นและสี) ก่อนและหลัง heating-cooling cycle ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่า ลักษณะทางกายภาพของโลชันก่อนเข้า heating-cooling cycle นั้น มีความคงตัวของกายภาพที่ดีและมีสีเหลืองอ่อน (ระดับ 0) และพบว่าหลังจากนำโลชันผ่าน heating-cooling cycle ทั้งหมด 6 รอบ พบว่า สูตร 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 เกิดการแยกชั้นจึงไม่สามารถประเมินสีของโลชันได้ ส่วนสูตรที่เหลือ (3, 4, 12, 13, 14 และ 15) ก่อนข้างขวด ไม่แยกชั้นและมีการเปลี่ยนแปลงของสีค่อนข้างน้อย (ระดับ +1) ยกเว้นสูตร 14 และ 15 ซึ่งจะมีสีที่เข้มกว่า (+2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก xanthan gum ที่ใส่ไปเพื่อเพิ่มความข้นหนืด ส่วนตารางที่ 8 แสดงถึงค่าความหนืดและ pH ก่อนและหลังเข้า heating-cooling cycle สำหรับสูตร 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 พบว่าไม่สามารถวัดค่า pH ได้เนื่องจากเกิดการแยกชั้นของโลชัน ส่วนสูตร 3, 4 และ 12 นั้นมีความหนืดลดลงเล็กน้อยในขณะที่ สูตร 14 และ 15 ความหนืดแทบไม่เปลี่ยนแปลงเลย ในทางกลับกัน ความหนืดของสูตรที่ 13 พบว่าลดลงประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับก่อนเข้า heating-cooling cycle สำหรับค่า pH พบว่าทุกตัวรับแทบไม่เปลี่ยนแปลง

จากผลของความคงตัวของตัวดังกล่าวมา จะเห็นได้ว่า สูตร 4 และ 12 ดูเหมือนจะเป็นสูตรที่มีความคงตัวของกายภาพดีกว่าตัวอื่น ส่วนสูตรที่ 14 และ 15 ถึงแม้ว่าจะมีความคงตัวของกายภาพดี แต่สีค่อนข้างเข้ม ในขณะที่สูตร 3 นั้นมีความหนืดค่อนข้างต่ำเกินไป

ตารางที่ 9 แสดงถึงค่าความรู้สึกสัมผัสซึ่งประเมินโดยผู้วิจัยเอง จากผลในตาราง จะเห็นว่า สูตร 12 มีค่าความรู้สึกสัมผัสที่ดีกว่าสูตร 4 โดยเฉพาะภายหลังจากการผ่าน heating-cooling cycle แล้ว ทั้งในแง่ของความเร็วในการดูดซึมและความไม่เหนียวเหนอะหนะ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงคัดเลือกสูตรที่ 12 (ตารางที่ 10) มาใช้ในการเตรียมโลชันเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอยในหัวข้อถัดไป และทางผู้วิจัยยังได้เตรียมโลชัน EGCG โดยใช้โลชันเบสของสูตร 12 เพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบในการทดลองด้วย

ตารางที่ 7 ตารางแสดงลักษณะทางกายภาพ (การแยกชั้นและสี) ก่อนและหลัง heating-cooling cycle 6 รอบ

Formulation	ก่อน heat-cool cycle		หลัง 6 heat-cool cycles	
	การแยกชั้น	สี	การแยกชั้น	สี
1	-	0	PS	N/A
2	-	0	PS	N/A
3	-	0	-	+1
4	-	0	-	+1
5	-	0	PS	N/A
6	-	0	PS	N/A
7	-	0	PS	N/A
8	-	0	PS	N/A
9	-	0	PS	N/A
10	-	0	PS	N/A
11	-	0	PS	N/A
12	-	0	-	+1
13	-	0	-	+1
14	-	0	-	+2
15	-	0	-	+2

- = no phase separation; PS = phase separation; N/A = not available due to PS

0 = normal (pale yellow) = without change; +1 = slight change (light yellow); +2 = noticeable change (light brown); +3 = marked change (brown); +4 = seriously deteriorated (dark brown); +5 = completely deteriorated (intense deep brown)

ตารางที่ 8 ตารางแสดงค่าความหนืดและ pH ก่อนและหลัง heating-cooling cycle 6 รอบ

Formulation	ก่อน heat-cool cycle		หลัง heat-cool cycle	
	ความหนืด (cps)	pH	ความหนืด (cps)	pH
1	1471.06	5.55	-	-
2	1813.40	5.48	-	-
3	1178.50	5.48	941	5.50
4	1343.73	5.47	1132.2	5.48
5	1008.00	5.47	-	-
6	1716.73	5.50	-	-
7	1350.27	5.50	-	-
8	1756.40	5.51	-	-
9	994.16	5.49	-	-
10	1550.95	5.50	-	-
11	758.76	5.44	-	-
12	1833.25	5.48	1637.50	5.48
13	2318.33	5.51	1181.50	5.50
14	1685.25	5.50	1663	5.48
15	1846.00	5.52	1809	5.49

- = ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากการแยกชั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ตารางแสดงค่าความรู้สึกสัมผัส ก่อนและหลัง heating-cooling cycle 6 รอบ

Formulation	ก่อน heat-cool cycle			หลัง heat-cool cycle		
	spreadability	absorption	Stickiness	Spreadability	absorption	Stickiness
1	+3	+2	+3	-	-	-
2	+3	+3	+3	-	-	-
3	+3	+3	+3	+2	+3	+3
4	+3	+3	+3	+3	+2	+2
5	+3	+3	+3	-	-	-
6	+3	+3	+3	-	-	-
7	+3	+3	+3	-	-	-
8	+3	+3	+3	-	-	-
9	+3	+3	+3	-	-	-
10	+3	+3	+3	-	-	-
11	+3	+3	+3	-	-	-
12	+3	+3	+3	+3	+3	+3
13	+3	+2	+1	+2	+2	+1
14	+3	+3	+3	+3	+3	+3
15	+3	+3	+3	+3	+3	+3

+3 = พอใจมากที่สุด, +2 = พอใจปานกลาง, +1 = พอใจน้อยที่สุด

- = เกิดการแยกชั้น

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ตารางแสดงสูตร โลชันที่คัดเลือกแล้ว (% w/w)

Ingredient	A	B
Phase A		
Puresyn No.2 *	3	3
Cetearyl alcohol	0.8	0.8
Glyceryl monostearate	1	1
Ceteareth-20	0.8	0.8
Emulgrade NI 1000 **	2.3	2.3
Myristol 318 ***	3	3
Dimethicone	1	1
Phase B		
Glycerine	2	2
Propylene glycol	3	3
DI water	82.48	82.48
Phase C		
Puag-Haad	0.1	-
EGCG	-	0.1
BHA	0.02	0.02
Sepicide HB ****	0.5	0.5

* = Hydrogenated polydecene

** = Cetearyl alcohol/Ceteareth-20

*** = Caprylic/capric triglyceride

**** = Phenoxyethanol + combined paraben

3. การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของโลชันปกกาคในอาสาสมัคร

การทดลองในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขึ้นชั้นประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยของปกกาคเมื่อเตรียมในรูปโลชันที่ความเข้มข้น 0.10% (w/w) เปรียบเทียบกับโลชัน EGCG โดยใช้โลชันเบสเดียวกันและที่ความเข้มข้นเดียวกัน

การทดลองนี้ใช้อาสาสมัครจำนวน 44 คน (คัดเลือกมาจากการทดลองส่วนที่ 1) อาสาสมัครจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 22 คน โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับโลชันทดสอบที่แตกต่างกันออกไป โดยกลุ่มแรกจะได้รับสารทดสอบคือโลชันปกกาค (A) และกลุ่มที่สองได้รับโลชัน EGCG (B) บริเวณที่ทาโลชันทดสอบในหัวข้อนี้จะถูกกระจายให้สม่ำเสมอในแต่ละกลุ่มเพื่อให้เกิดความสมดุล ยกตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม A อาสาสมัคร 11 คนแรก จะทาโลชันเบส (โลชันควบคุม) ที่แก้มด้านซ้าย และโลชันทดสอบ A ที่แก้มด้านขวา ในขณะที่อาสาสมัครที่เหลืออีก 11 คนจะสลับข้างกันโดยได้รับโลชัน A ที่แก้มด้านซ้ายและโลชันควบคุมที่แก้มด้านขวา ส่วนอาสาสมัครกลุ่ม B ก็ใช้วิธีการทาเช่นเดียวกัน โดยบริเวณที่ทาคือทั่วใบหน้าทั้งซ้ายและขวา ทาวันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ทุกๆสองสัปดาห์อาสาสมัครต้องมารับการตรวจวัดสภาพผิว โดยวัดริ้วรอยด้วย Visioscan® VC 98 และวัดความยืดหยุ่นของผิวด้วย Cutometer® MPA 580 ส่วนความขาวของผิวและความชุ่มชื้นของผิวนั้นวัดด้วยเครื่อง Mexameter® MX 18 และ Corneometer® CM 825 ตามลำดับทุกๆ 4 สัปดาห์

3.1 การวัดริ้วรอยของผิว

ตารางที่ 11 แสดงค่า circular roughness ของแต่ละกลุ่ม จากตารางจะเห็นได้ว่า ค่า circular roughness ของข้างที่ทาโลชันทดสอบทั้ง A และ B นั้น มีค่าลดลงต่ำเรื่อยๆตามระยะเวลาของการทาที่นานขึ้น โดยกลุ่ม A ซึ่งได้รับโลชันปกกาค มีค่าเฉลี่ย circular roughness ของด้านที่ทาโลชันทดสอบลดลงจาก 63.50 ในสัปดาห์แรกเป็น 58.59 ในสัปดาห์ที่ 8 ส่วนในกลุ่ม B ซึ่งได้รับโลชัน EGCG นั้น มีค่า circular roughness ของด้านที่ทาโลชันทดสอบลดลงจาก 64.05 ในสัปดาห์แรกเป็น 59.52 ในสัปดาห์ที่ 8 ในขณะที่เดียวกัน แก้มด้านที่ทาด้วยโลชันควบคุมของทั้งสองกลุ่มนั้นแทบจะมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเลย โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อคูณผลของเวลาโดย Randomized block ANOVA ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าค่า circular roughness ของแก้ม control นั้นค่อนข้างจะคงที่ในทั้งสองกลุ่ม ซึ่งค่า mean roughness (ตารางที่ 12) ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันคือมีแนวโน้มลดลงในแก้มที่ทาด้วยโลชันทดสอบไม่ว่าจะเป็นโลชัน A หรือ B แต่จะไม่เปลี่ยนแปลงในแก้มข้างที่ทาด้วยโลชันควบคุม

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของความหยาบของผิวทั้ง circular roughness และ mean roughness ระหว่างด้านซ้ายและด้านขวาโดยใช้ Paired t-test ที่แต่ละสัปดาห์ (ตารางที่ 11 และ 12)

พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าความหยาบของผิวระหว่างแก้มด้านซ้ายและแก้มด้านขวาของแต่ละกลุ่มที่เวลาเดียวกันมีความแตกต่างกัน โดยข้างที่ได้รับโลชันทดสอบมีแนวโน้มที่จะต่ำกว่าด้านควบคุมทั้งสองกลุ่ม แต่กลุ่มที่ได้รับโลชันปกเกล้า (กลุ่ม A) ดูเหมือนจะให้ผลที่ดีที่สุด โดยทั้งค่า circular และ mean roughness ของแก้มด้านทดสอบต่ำกว่าแก้มด้านควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ของการทดลองและคงอยู่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ($P < 0.05$) ขณะที่ในกลุ่มที่ทำด้วยโลชัน EGCG จะให้ค่าความหยาบ (ทั้ง circular และ mean roughness) น้อยกว่าข้างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์สุดท้าย (สัปดาห์ที่ 8) เท่านั้น

เมื่อวิเคราะห์ผลของเวลาโดยใช้ randomized block ANOVA พบว่ามีความแตกต่างของค่า circular roughness และ mean roughness ภายหลังการทำโลชันปกเกล้าที่เวลาต่างๆอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จึงทดสอบทางสถิติคือโดยใช้ Dunnett's test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความหยาบระหว่างเวลาเริ่มต้นกับที่สัปดาห์ต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสัปดาห์เริ่มต้นกับสัปดาห์ที่ 8 ทั้งค่า circular roughness และ mean roughness ($P < 0.05$) ขณะที่ในกลุ่มที่ทำด้วยโลชัน EGCG แม้ว่าค่าความหยาบของผิวจะมีแนวโน้มลดลงจากเวลาเริ่มต้น แต่ไม่พบนัยสำคัญของความแตกต่างด้วย randomized block ANOVA ($P > 0.05$) ทั้งกับค่า circular roughness และค่า mean roughness ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (0.10% w/v) โลชันปกเกล้ามีประสิทธิภาพในการช่วยลดหรือชะลอริ้วรอยได้ โดยผิวของอาสาสมัครที่ทำด้วยโลชันปกเกล้าจะมีค่า roughness ต่ำกว่าด้านควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป ภายหลังจากการทำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ตารางแสดงค่า circular roughness บริเวณแก้มของอาสาสมัครที่ได้รับ โลชั่นทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD)

กลุ่ม		Circular roughness					P-value ^a
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	
A (n = 22)	Control	64.52 \pm 11.73	65.05 \pm 14.17	63.50 \pm 11.83	64.61 \pm 10.49	63.11 \pm 11.98	0.715
	Puag-Haad	63.50 \pm 10.30	62.98 \pm 10.12	63.91 \pm 8.65	61.23 \pm 9.63	58.59 \pm 10.91	0.017**
	P-value ^b	0.419	0.286	0.797	0.035*	0.03*	
B (n = 22)	Control	63.21 \pm 9.09	62.93 \pm 10.56	63.50 \pm 10.32	63.53 \pm 10.95	63.38 \pm 8.31	0.996
	EGCG	64.05 \pm 9.74	62.80 \pm 10.53	63.09 \pm 10.88	63.74 \pm 8.50	59.52 \pm 9.22	0.069
	P-value ^b	0.518	0.937	0.803	0.877	0.047*	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านควบคุมและแก้มด้านทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, paired student's t-test)

** มีความแตกต่างของค่า circular roughness ในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, randomized block ANOVA)

ตารางที่ 12 ตารางแสดงค่า mean roughness บริเวณแก้มของอาสาสมัครที่ได้รับ โลชั่นทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD)

กลุ่ม		Mean roughness					P-value ^a
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	
A	Control	62.27 \pm 11.07	62.98 \pm 12.92	60.77 \pm 10.15	62.94 \pm 10.35	60.70 \pm 11.31	0.25
	Puag-Haad	61.41 \pm 10.01	59.98 \pm 10.47	61.32 \pm 8.38	59.29 \pm 8.99	56.58 \pm 10.33	0.015**
	P-value ^b	0.436	0.098	0.695	0.007*	0.024*	
B	Control	61.24 \pm 8.32	60.84 \pm 9.99	61.25 \pm 10.10	61.38 \pm 10.24	61.39 \pm 9.35	0.575
	EGCG	61.91 \pm 8.95	60.68 \pm 9.63	60.89 \pm 10.56	60.92 \pm 8.25	57.45 \pm 8.57	0.059
	P-value ^b	0.528	0.917	0.803	0.700	0.045*	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านควบคุมและแก้มด้านทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, paired student's t-test)

** มีความแตกต่างของค่า mean roughness ในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, randomized block ANOVA)

ส่วนอาสาสมัครที่ได้รับ โลชัน EGCG พบว่าค่า circular และ mean roughness ของแก้มค้ำน ที่ทำด้วยโลชันทดสอบจะต่ำกว่าแก้มค้ำนควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่สัปดาห์สุดท้าย คือสัปดาห์ที่ 8 เท่านั้น ($P < 0.05$, paired student's t-test) อีกทั้งเมื่อดูผลของเวลาโดยใช้ randomized block ANOVA พบว่าไม่เห็นความแตกต่างของทั้งค่า circular roughness และ mean roughness ในแต่ละช่วงเวลาต่างๆเลย แสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอยของโลชัน EGCG จะต้องใช้เวลาค่อนข้างนานกว่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าโลชันปกกาคให้ผล ในการชะลอริ้วรอยที่เร็วกว่าโลชัน EGCG

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณในการลดริ้วรอยของโลชันทั้งสองชนิด ได้ทำการคำนวณหาร้อยละของการลดริ้วรอยเมื่อเทียบกับค้ำนควบคุมสำหรับ โลชันแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบเฉพาะที่ สัปดาห์ที่ 8 เนื่องจากเป็นสัปดาห์ที่โลชันทั้งสองชนิดให้ประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอยอย่างมี นัยสำคัญ โดยจะคำนวณจากสูตร

$$\text{ร้อยละของการลดริ้วรอย} = \frac{R_c - R_t}{R_c} \times 100\%$$

R_c = roughness value ณ สัปดาห์ที่ 8 ของค้ำนควบคุม

R_t = roughness vlue ณ สัปดาห์ที่ 8 ของค้ำนที่ทำโลชันทดสอบ

ค่าเฉลี่ยของร้อยละของการลดริ้วรอยได้แสดงไว้ในตารางที่ 13 เมื่อใช้ unpaired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละของการลดริ้วรอยทั้ง circular roughness และ mean roughness ระหว่างโลชันทั้งสองชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า โลชันปกกาคและ โลชัน EGCG มีปริมาณในการชะลอหรือลดริ้วรอยที่เท่ากัน

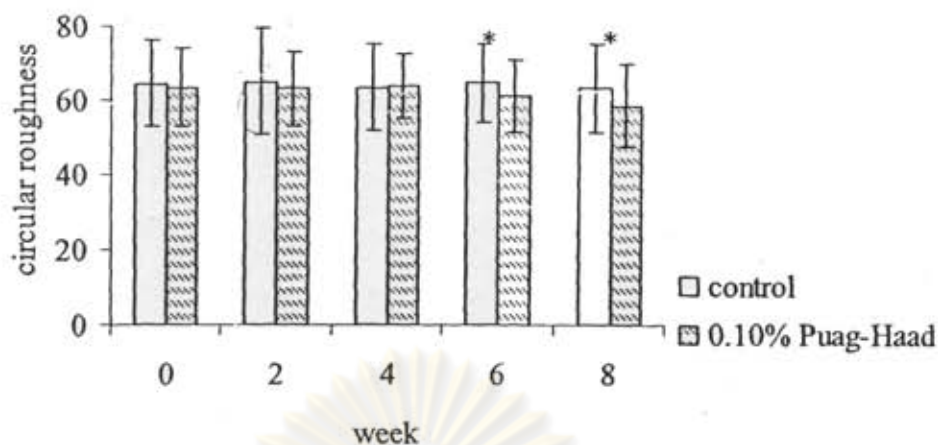
ตารางที่ 13 ตารางแสดงค่าร้อยละของการลดริ้วรอย เมื่อพิจารณาจากค่า circular และ mean roughness ณ สัปดาห์ที่ 8

ร้อยละของการลดริ้วรอย	โลชันปกกาค	โลชัน EGCG	P-value
Circular roughness	5.93 ± 14.77	5.64 ± 12.86	>> 0.05
Mean roughness	5.78 ± 13.65	2.11 ± 13.48	>> 0.05

เมื่อพิจารณาจากทั้งค่า circular roughness และ mean roughness จะเห็นได้ว่าโลชันปก
หาคให้ประสิทธิผลในการลดริ้วรอยเร็วกว่าโลชัน EGCG ในขณะที่ปริมาณในการลดริ้วรอยของ
โลชันทั้ง 2 ชนิดมีค่าไม่แตกต่างกัน ข้อมูลดังกล่าวสามารถแสดงผลในรูปของกราฟแท่งดังรูปที่ 13-
16 ส่วนรูปที่ 17-19 แสดงภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังที่สัปดาห์ที่
8 จากอาสาสมัคร 3 คนในกลุ่มที่ได้รับโลชันปกหาค 0.10% โดยเปรียบเทียบระหว่างแก้มด้าน
ควบคุม (control lotion) และแก้มด้านที่ทำด้วยปกหาค (treatment) จากรูป 17-19 จะเห็นได้ว่า
แก้มข้างที่ทำด้วยโลชันปกหาค ไม่ว่าจะป็นข้างซ้ายหรือข้างขวา จะมีความลึกของริ้วรอยน้อยกว่า
แก้มข้างควบคุมที่ทำด้วยโลชันเบส ซึ่งยืนยันผลเป็นตัวเลขด้วยค่า circular และ mean roughness
นอกจากนี้แก้มข้างที่ทำด้วยโลชันปกหาคยังมีสีผิวที่จางกว่าแก้มข้างที่ทำด้วยโลชันควบคุมด้วย
ซึ่งสาเหตุมาจากการที่ปกหาคมีคุณสมบัติเป็น skin whitening ด้วย

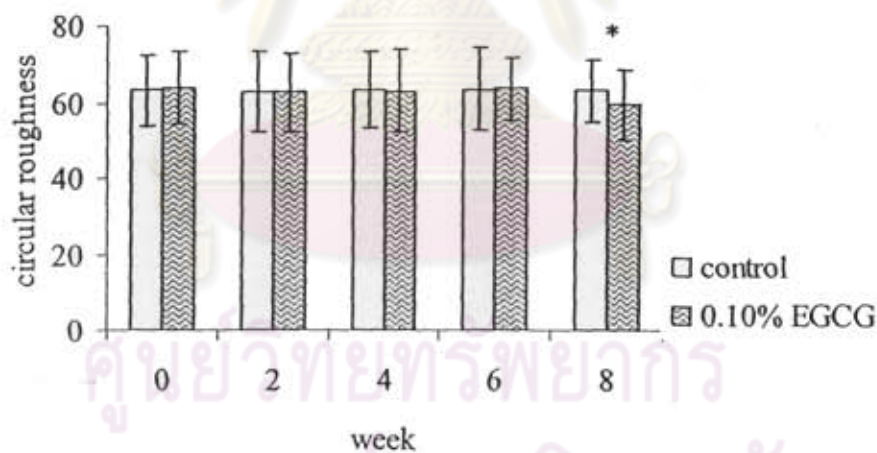
เป็นที่น่าสังเกตว่าข้อมูลของประสิทธิภาพในการชะลอริ้วรอยของปกหาคในรูปโลชัน
(ดังตารางที่ 11 และ 12) มีความแปรปรวนน้อยกว่าของสารละลาย (การทดลองส่วนที่ 1) ซึ่งพบว่า
ค่า roughness ของแก้มด้านควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลา ในขณะที่ค่า roughness ของแก้ม
ด้านที่ทาสารทดสอบนั้น ไม่เปลี่ยนแปลงหรือมีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งได้อธิบายไปแล้วว่า
อาจเกิดจากผลของโพร ไพลีน โกลคอลลในตัวทาละลายซึ่งทำให้ผิวแห้ง จึงทำให้ค่าความหยาบของ
ผิวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ในการทดลองส่วนที่ 3 นี้ ได้ใช้โลชันเบสซึ่งเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมัน
กระจายตัวในน้ำแทนการใช้ 20% โพร ไพลีน โกลคอลล ซึ่งคุณสมบัติในการให้ความชุ่มชื้นของ
โลชันเบสนั้น สามารถช่วยป้องกันผลเสียที่อาจเกิดจากโพร ไพลีน โกลคอลลได้ นอกจากนั้น การที่
การทดลองในส่วนของโลชัน ได้มีการกระจายค่านของแก้มที่ทำโลชันทดสอบให้สมดุลยิ่งขึ้น โดยมี
ครึ่งหนึ่งของอาสาสมัครในแต่ละกลุ่มได้รับ โลชันทดสอบที่แก้มด้านขวาและอีกครึ่งหนึ่งได้รับที่
แก้มด้านซ้าย อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ช่วยลดความแปรปรวนของผลการทดลอง ทำให้ค่า
roughness ของแก้มด้านควบคุมมีค่าคงที่มากขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการศึกษา

ศูนย์วิจัยทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



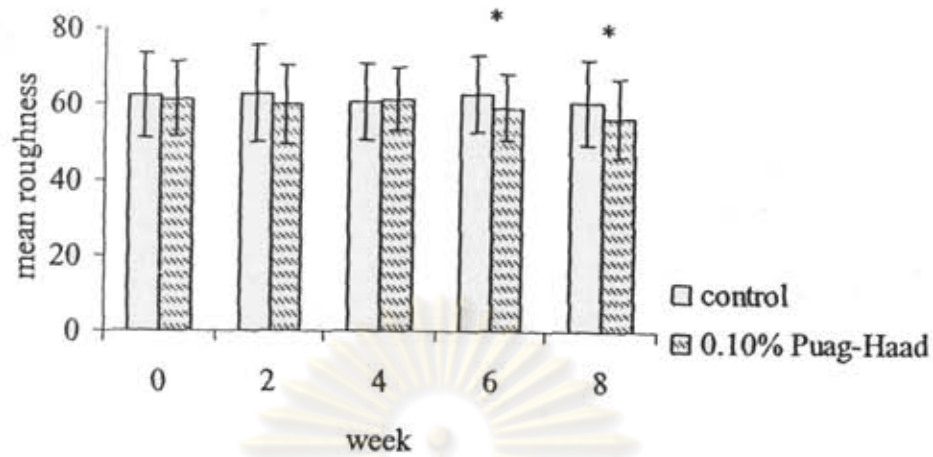
รูปที่ 13 กราฟแสดงค่า circular roughness หลังการทำโลชันปกหาด (A) และ โลชันควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean ± s.d., n = 22)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านที่ทำด้วยโลชันควบคุมและด้านที่ทำด้วยโลชันทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



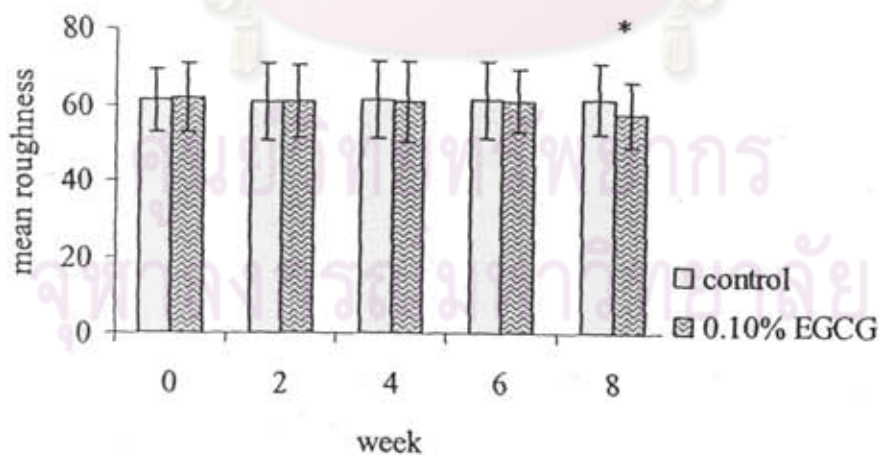
รูปที่ 14 กราฟแสดงค่า circular roughness หลังการทำโลชัน EGCG (B) และ โลชันควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean ± s.d., n = 22)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านที่ทำด้วยโลชันควบคุมและด้านที่ทำด้วยโลชันทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



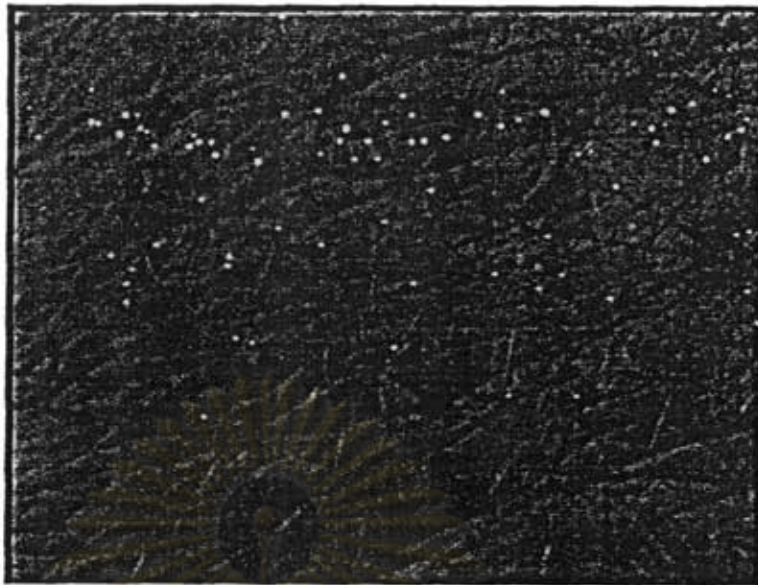
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่า mean roughness หลังการทาโลชันปรอทาด (A) และ โลชันควบคุมที่บริเวณ แก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 22)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านที่ทำด้วยโลชันควบคุมและด้านที่ทำด้วยโลชันทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



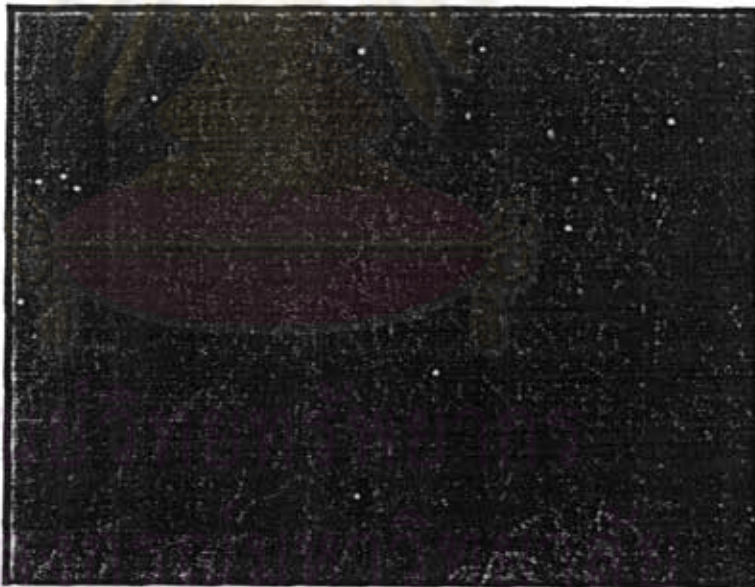
รูปที่ 16 กราฟแสดงค่า mean roughness หลังการทาโลชัน EGCG (B) และ โลชันควบคุมที่บริเวณ แก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean ± s.d., n = 22)

* มีความแตกต่างระหว่างแก้มด้านที่ทำด้วยโลชันควบคุมและด้านที่ทำด้วยโลชันทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



Left cheek (control)

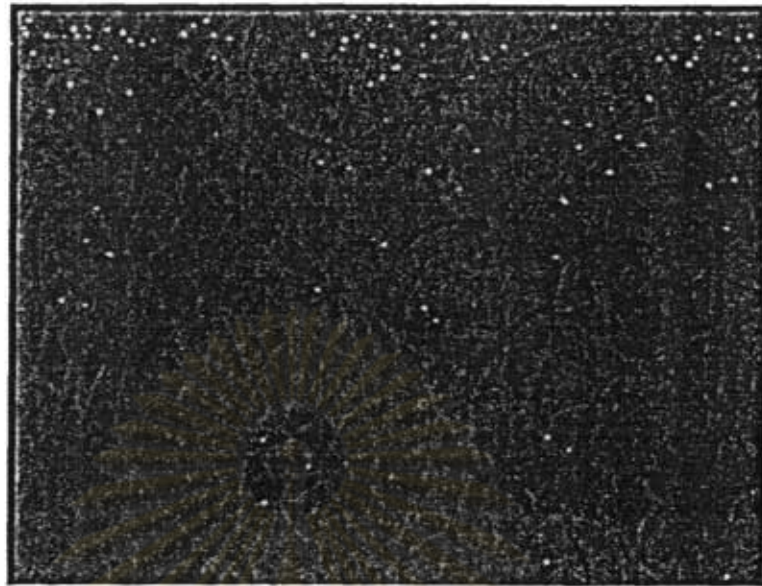
circular roughness = 76.33, mean roughness = 69.67



Right cheek (treatment)

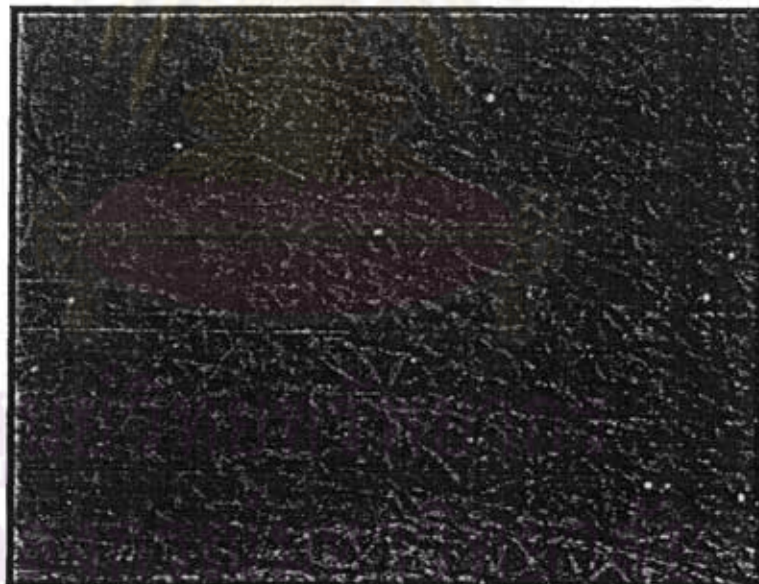
circular roughness = 55.33, mean roughness = 56.00

รูปที่ 17 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 5 ที่ สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม A (โลชันปกหวาด 0.10% w/w) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ค้านซ้าย (control) และค้านขวา (treatment)



Left cheek (treatment)

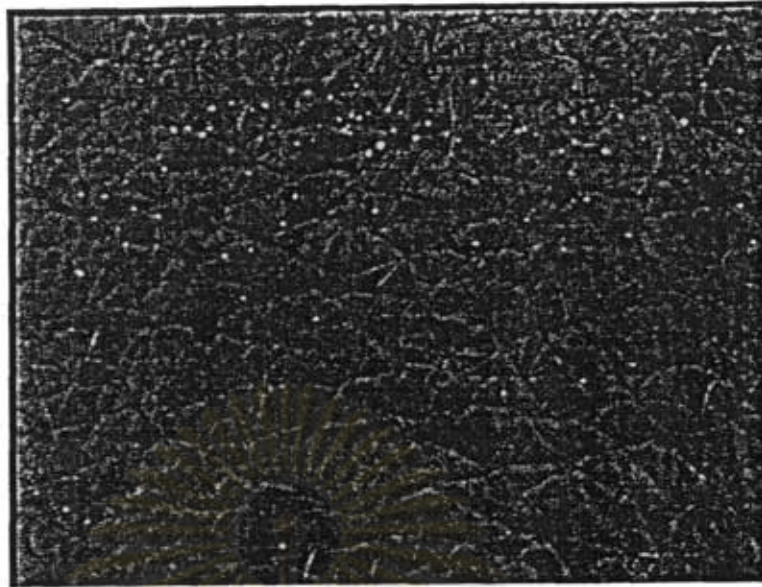
circular roughness = 58.00, mean roughness = 57.33



Right cheek (control)

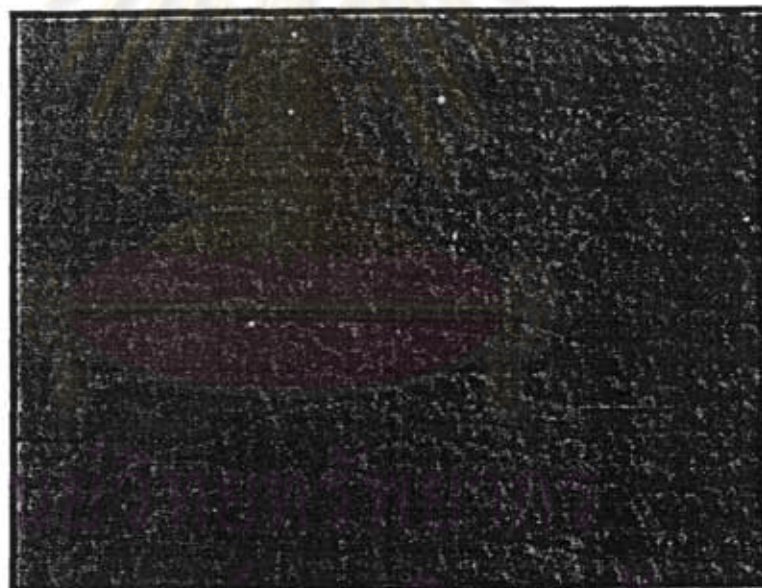
circular roughness = 69.67, mean roughness = 66.00

รูปที่ 18 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan[®] VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 18 ที่ สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม A (โลชั่นปกปิด 0.10% w/w) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ด้านซ้าย (treatment) และด้านขวา (control)



Left cheek (control)

circular roughness = 59.33, mean roughness = 56.67



Right cheek (treatment)

circular roughness = 50.33, mean roughness = 49.00

รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากเครื่อง Visioscan® VC 98 ซึ่งเป็นรูปของผิวหนังของอาสาสมัครหมายเลข 21 ที่สัปดาห์ที่ 8 จากอาสาสมัครในกลุ่ม A (โลชันปกวาด 0.10% w/w) โดยเปรียบเทียบระหว่าง คำนซ้าย (control) และค้ำนขวา (treatment)

3.2 การวัดความยืดหยุ่นของผิว

การทดลองนี้วัดความยืดหยุ่นของผิวโดย Cutometer® MPA 580 ทุก 2 สัปดาห์ คิวแปรที่ใช้ในการประเมินความยืดหยุ่นของผิวในการทดลองนี้คือ R2 ซึ่งค่านี้ยิ่งสูงจะบ่งบอกได้ว่าผิวมีความยืดหยุ่นสูง ค่า R2 ที่วัดได้จากการทดลองนี้แสดงในตารางที่ 14 จากตารางจะเห็นได้ว่า R2 แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอด 8 สัปดาห์ของการทดลองไม่ว่าจะเป็นโลชั่นควบคุมหรือโลชั่นทดสอบชนิดใด เมื่อวิเคราะห์หาค่าผลของเวลาด้วย randomized block ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า R2 ระหว่างแก้มด้านควบคุมและด้านทดสอบด้วย paired t-test ก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับ randomized block ANOVA คือไม่มีความแตกต่าง ($P > 0.05$) เช่นกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าทั้งโลชั่นปกหน้าและโลชั่น EGCG ไม่สามารถช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวได้หลังจากการทาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ข้อมูลดังกล่าวสามารถแสดงผลในรูปของกราฟดังรูปที่ 20-21

ผลจาก Cutometer® ให้ผลที่ค่อนข้างแตกต่างกับผลจากเครื่อง Visioscan® ซึ่งเห็นผลชัดเจนว่าสามารถช่วยลดริ้วรอยได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า เครื่อง Cutometer นั้นใช้ค่อนข้างยาก ต้องอาศัยเทคนิคที่ค่อนข้างชำนาญในการวัด การควบคุมแรงจากมือผู้วัดเพราะแรงกดมีผลทำให้ค่า R2 นั้นเปลี่ยนแปลงได้

อีกสาเหตุหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ก็น้อยมากซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่น้อยเกินกว่าที่เครื่องจะสามารถวัดได้ มีการทดลองในปี 2005 โดย Chui ได้รายงานถึงผลของชาเขียว (ปริมาณ EGCG 38%) ว่าสามารถเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวได้โดยใช้วิธี skin biopsy โดยให้อาสาสมัครทั้งรับประทานและทาสารสกัดจากชาเขียวควบคู่กัน ไป (10% green tea cream and 300 mg daily oral dose) แต่การศึกษาเดียวกันนี้ยังพบว่าความเข้มข้นที่สูงก่อให้เกิดการระคายเคืองได้

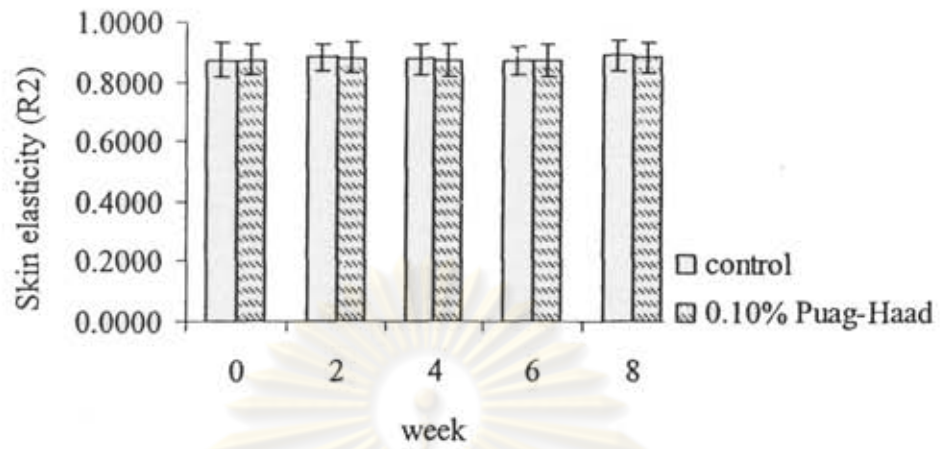
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ตารางแสดงค่าความยืดหยุ่นของผิว (R2) ของอาสาสมัครที่ได้รับโลชั่นทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD, n = 22 per group)

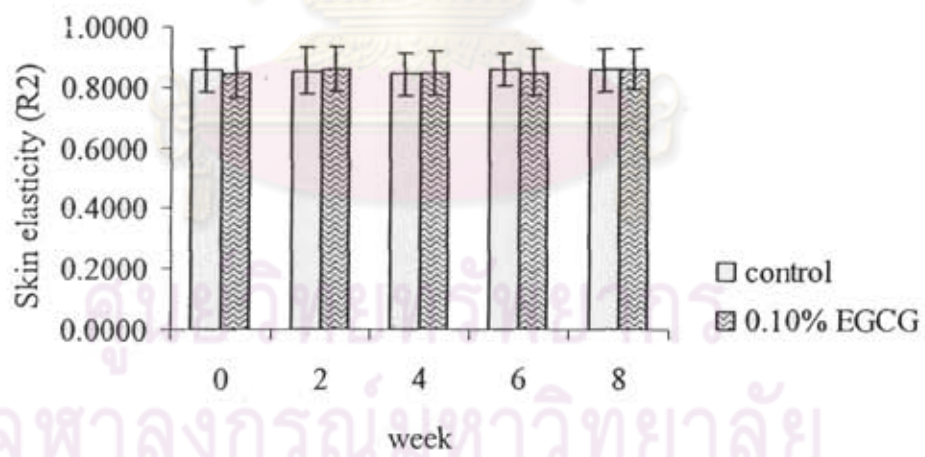
Treatment group		Skin elasticity (R2)					P-value ^a
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	
A	Control	0.8749 \pm 0.0563	0.8824 \pm 0.0448	0.8754 \pm 0.0525	0.8731 \pm 0.0467	0.8891 \pm 0.0527	0.375
	Puag-Haad	0.8745 \pm 0.0486	0.8810 \pm 0.0486	0.8722 \pm 0.0548	0.8742 \pm 0.0534	0.8821 \pm 0.0517	0.646
	P-value ^b	0.968	0.781	0.544	0.852	0.516	
B	Control	0.8562 \pm 0.0685	0.8552 \pm 0.0759	0.8427 \pm 0.0703	0.8597 \pm 0.0527	0.8559 \pm 0.0693	0.428
	EGCG	0.8490 \pm 0.0838	0.8575 \pm 0.0736	0.8443 \pm 0.0756	0.8482 \pm 0.0755	0.8581 \pm 0.0686	0.492
	P-value ^b	0.498	0.818	0.815	0.182	0.838	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 กราฟแสดงค่า R2 หลังการทำโลชันปกแดด (A) และ โลชันควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean \pm s.d., n = 22)



รูปที่ 21 กราฟแสดงค่า R2 หลังการทำโลชัน EGCG (B) และ โลชันควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (mean \pm s.d., n = 22)

3.3 การวัดความขาวและความชุ่มชื้นของผิว

นอกจากการวัดริ้วรอยและความยืดหยุ่นของผิวแล้ว การทดลองนี้ยังได้ทำการวัดความขาวและความชุ่มชื้นของผิวอีกด้วยโดยวัดทุกๆ 4 สัปดาห์ ตารางที่ 15 แสดงถึงค่าความขาวของผิวที่วัดโดยเครื่อง Mexameter® MX18 จากตารางจะเห็นได้ว่า ค่าเมลานินของผิวในด้านควบคุมที่ได้รับแต่โลชันเบสนั้นมีค่าไม่แตกต่างไปจากค่าเริ่มต้นในทั้งสองกลุ่ม ส่วนค่าเมลานินของผิวแก้มด้านที่ทาโลชันปกกาคานั้นมีค่าลดลงจาก 257.64 ไปเป็น 252.95 ณ สัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป ค่าเมลานินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, randomized block ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแก้มด้านควบคุมและด้านทดสอบโดยใช้ paired student's t-test พบว่าค่าเมลานินของด้านทดสอบมีค่าต่ำกว่าด้านควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากการทาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าปกกาคามีผลทำให้ผิวขาวขึ้นได้เมื่อทดสอบในอาสาสมัคร ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลของ Tengamnuay และคณะในปี 2006 ซึ่งรายงานไว้ว่าโลชันปกกาคาที่ความเข้มข้น 0.10% นั้น มีผลทำให้ผิวขาวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ของการทา ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าสารสำคัญในปกกาคาหรือ oxyresveratrol นั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ค่อนข้างแรง (Likhitwitayawuid, Sritularak and De-Eknamkul, 2000) อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการทำให้ผิวขาวดีกว่า kojic acid และ licorice extract ทั้งในหนูทดลองและในอาสาสมัคร (Pengrungruangwong, 2001) ในขณะที่โลชัน EGCG 0.1% นั้น พบว่าค่าเมลานินไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลยตลอด 8 สัปดาห์ของการทดลองทั้งในแก้มด้านควบคุมและด้านทดสอบ แสดงว่ามีเพียงโลชันปกกาคาเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ผิวขาว ข้อมูลดังกล่าวสามารถแสดงผลในรูปแบบของกราฟผังรูปที่ 22-23 นอกจากนี้ ผลการวัดความเข้มของเมลานินจะสอดคล้องกับภาพที่ได้จาก Visioscan ในรูปที่ 17-19 ดังกล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 16 แสดงค่าความชุ่มชื้นของผิว (skin hydration) ซึ่งวัดโดยเครื่อง Comeometer® CM 825 จากตารางจะเห็นว่าค่าความชุ่มชื้นของผิว (วัดในรูปค่า skin capacitance) เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มอันเนื่องมาจากผลของเนื้อโลชัน ตัวอย่างเช่น อาสาสมัครในกลุ่ม A มีค่าความชุ่มชื้นของผิวด้านควบคุมเพิ่มขึ้นจาก 48.08 เป็น 54.67 ที่สัปดาห์สุดท้ายและมีความชุ่มชื้นของผิวด้านทดสอบเพิ่มขึ้นจาก 43.60 เป็น 55.46 อาสาสมัครในกลุ่ม B มีค่าความชุ่มชื้นของผิวด้านควบคุมเพิ่มขึ้นจาก 48.19 เป็น 54.67 ที่สัปดาห์สุดท้ายและมีความชุ่มชื้นของผิวด้านทดสอบเพิ่มขึ้นจาก 50.96 เป็น 56.72 และเมื่อคูผลของเวลาโดย randomized block ANOVA พบว่ามีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในทุกกลุ่มทั้งด้านควบคุม, โลชันปกกาคา และโลชัน EGCG และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างด้านควบคุมและด้านทดสอบโดยใช้ paired student's t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าความชุ่มชื้นของผิวที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลมาจากโลชันเบส ข้อมูลดังกล่าวสามารถแสดงผลในรูปแบบของกราฟผังรูปที่ 24-25

ตารางที่ 15 ตารางแสดงค่า melanin ของอาสาสมัครที่ได้รับ โลชันทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์
(mean \pm SD, n = 22)

Treatment group		Melanin value			P-value ^a
		Week 0	Week 4	Week 8	
A	Control	258.16 \pm 62.81	260.02 \pm 66.36	259.47 \pm 65.36	0.669
	Puag-Haad	257.64 \pm 61.54	255.32 \pm 67.40	252.95 \pm 62.95	0.027**
	P-value ^b	0.633	0.005*	0.004*	
B	Control	255.51 \pm 60.32	258.74 \pm 60.25	255.87 \pm 58.74	0.156
	EGCG	256.48 \pm 71.54	257.06 \pm 63.79	255.74 \pm 69.01	0.449
	P-value ^b	0.867	0.612	0.984	

a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

* มีความแตกต่างระหว่างด้านควบคุมและทดสอบที่สัปดาห์เดียวกัน (P < 0.05), paired student's t-test

** มีความแตกต่างทางผลของเวลา (P < 0.05), randomized block ANOVA

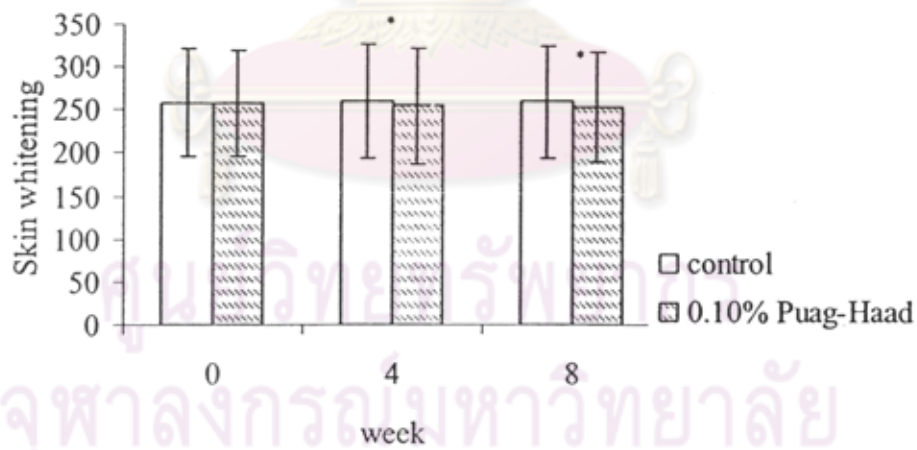
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ตารางแสดงค่า skin hydration ของอาสาสมัคร (วัดในรูปแบบ skin capacitance) ที่ได้รับ โลชันทดสอบต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (mean \pm SD, n = 22)

Treatment group		Skin capacitance			P-value ^a
		Week 0	Week 4	Week 8	
A	Control	48.08 \pm 13.63	52.73 \pm 10.47	54.67 \pm 10.25	0.007**
	Puag-Haad	43.60 \pm 12.89	50.92 \pm 11.74	54.97 \pm 7.96	0.000**
	P-value ^b	0.144	0.423	0.863	
B	Control	48.19 \pm 12.24	54.23 \pm 15.94	55.46 \pm 12.31	0.035**
	EGCG	50.96 \pm 9.52	55.56 \pm 10.45	56.72 \pm 11.05	0.034**
	P-value ^b	0.246	0.551	0.585	

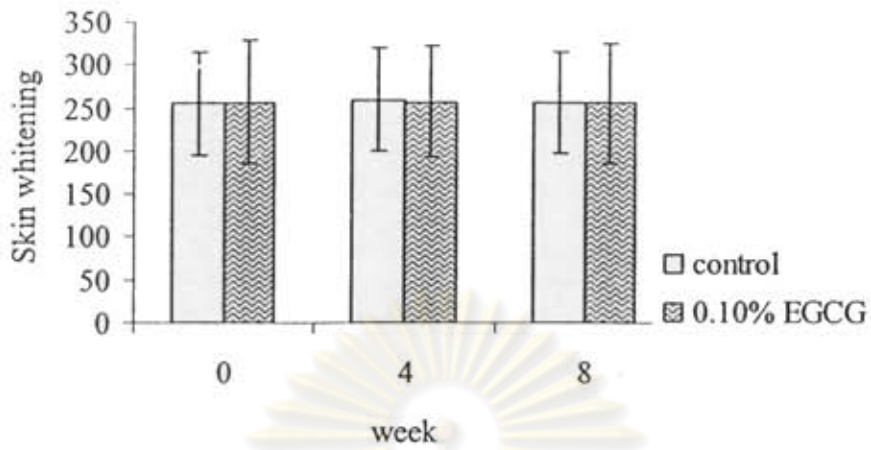
a = P-value for randomized block ANOVA, b = P-value for paired student's t-test

** มีความแตกต่างทางผลของเวลา (P < 0.05) , randomized block ANOVA

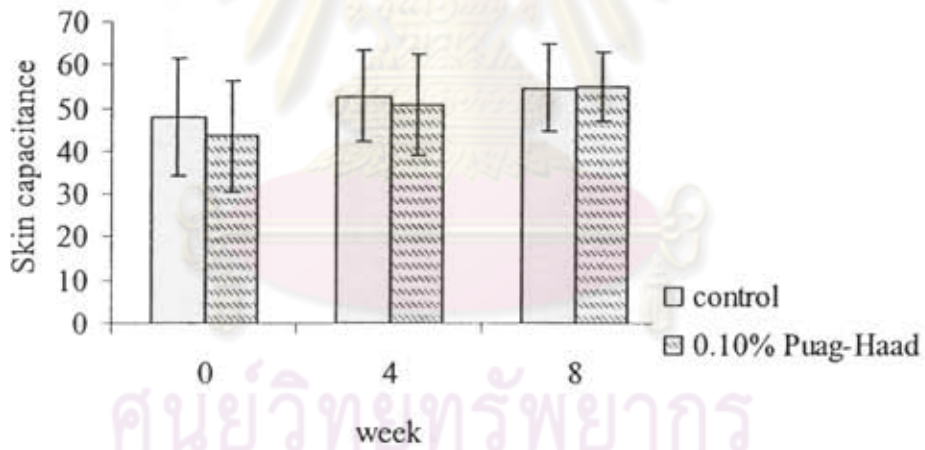


รูปที่ 22 กราฟแสดงค่า Melanin หลังการทาโลชันปกแดด (A) และ โลชันควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 22)

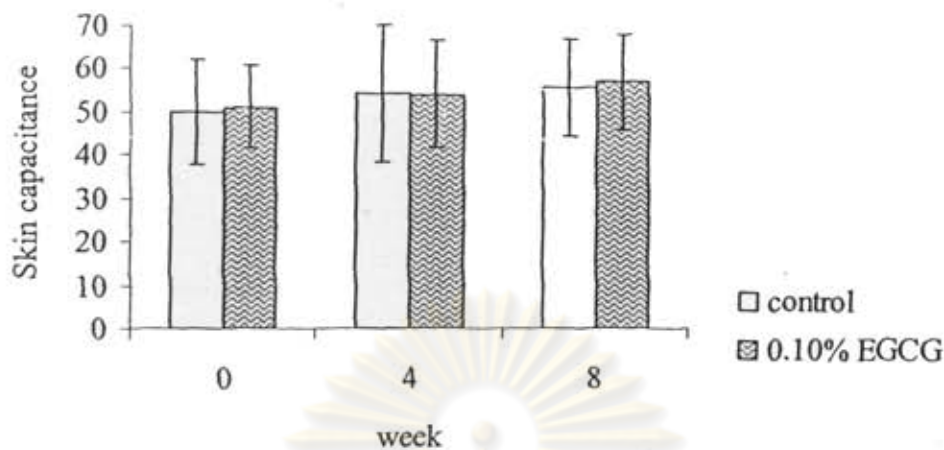
* น้อยกว่าข้างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05, paired student's t-test)



รูปที่ 23 กราฟแสดงค่า Melanin หลังการทาโลชั่น EGCG (B) และ โลชั่นควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 22)



รูปที่ 24 กราฟแสดงค่า skin hydration หลังการทาโลชั่นปวกหาด (A) และ โลชั่นควบคุมที่บริเวณแก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 22)



รูปที่ 25 กราฟแสดงค่า skin hydration หลังการทาโลชั่น EGCG (B) และ โลชั่นควบคุมที่บริเวณ แก้ม ณ เวลาต่างๆกัน (mean \pm s.d., n = 22)

3.4 การประเมินความรู้สึกสัมผัสหลังการใช้โลชั่น

จากการทดลองตลอด 8 สัปดาห์ ไม่พบว่ามีอาสาสมัครคนใดเกิดการแพ้และถอนตัวออกจากการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองอาสาสมัครจะต้องตอบแบบสอบถามประเมินความพึงพอใจ ทั้งในตัวอย่างแบบผลิตภัณฑ์และผลต่อผิวหนังของอาสาสมัคร

ตารางที่ 17 แสดงถึงผลความพึงพอใจในตัวอย่างแบบผลิตภัณฑ์โลชั่นซึ่งจะประเมินในแง่ของความยากง่ายในการทา ความเร็วในการซึม ความเหนียวเหนอะหนะและการยอมรับในผลิตภัณฑ์โดยรวม (ร้อยละต่อจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด) เนื่องจากทั้งโลชั่นปกแดดและโลชั่น EGCG ต่างก็ใช้โลชั่นเบสสูตรเดียวกัน ดังนั้นจึงประเมินร่วมกัน โดยถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกัน จากตารางจะเห็นว่า อาสาสมัครส่วนใหญ่ (68-72%) มีความพึงพอใจระดับมากในแง่ของความยากง่ายในการทา ความไม่เหนียวเหนอะหนะและการยอมรับผลิตภัณฑ์โดยรวม ในขณะที่ร้อยละ 43 พึงพอใจมากในแง่ของความเร็วในการซึมและอีก 57% นั้นมีความพึงพอใจปานกลาง และมีแค่เพียง 2% ที่บอกว่าครีมก่อนข้างเหนอะหนะ

ตารางที่ 17 ตารางแสดงระดับความพึงพอใจในตัวอย่างแบบผลิตภัณฑ์โลชั่น (ร้อยละต่อจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด n = 44)

Attributes	ระดับความพึงพอใจ		
	มาก	ปานกลาง	น้อย
ความยากง่ายในการทา	68.18	31.82	0
ความเร็วในการซึม	43.18	56.82	0
ความไม่เหนียวเหนอะหนะ	72.73	25	2.27
การยอมรับผลิตภัณฑ์โดยรวม	70.45	29.55	0

ตารางที่ 18 แสดงถึงการประเมินผลของโลชั่นต่อสภาพผิวของอาสาสมัครหลังการใช้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งจะประเมินในแง่ถึงความหยابของผิวหนัง ความยืดหยุ่นของผิวหนัง ความขาวของผิวและความนุ่มของผิว สำหรับความหยابของผิวหลังการใช้โลชั่นปกวาดานั้น พบว่าอาสาสมัคร 18.19% รู้สึกว่าด้านที่ทาโลชั่นปกวาดดีกว่าด้านควบคุม ในขณะที่ 27.27% รู้สึกตรงกันข้าม 27.27% รู้สึกว่าดีขึ้นทั้งสองด้านและ 27.27% รู้สึกว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆทั้งสองด้าน สำหรับความหยابของผิวของโลชั่น EGCG นั้นพบว่า ครึ่งหนึ่งของอาสาสมัคร (50%) รู้สึกว่าดีขึ้นเท่ากันทั้งสองด้านในขณะที่ 22.73 % รู้สึกว่าด้านที่ทาโลชั่น EGCGดีกว่าด้านควบคุม ในขณะที่ 4.54% รู้สึกตรงกันข้าม และ 22.73% บอกว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆทั้งสองด้าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ตารางแสดงการประเมินผลของโลชันต่อสภาพผิวของอาสาสมัครหลังการใช้เป็นเวลา 8 สัปดาห์

กลุ่ม	สภาพผิว	ร้อยละของความพึงพอใจ			
		ด้านควบคุม ดีกว่า	ด้านทดสอบ ดีกว่า	ดีขึ้นเท่ากันทั้ง สองด้าน	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง ทั้งสองด้าน
A (ปกขาด)	ความหยาบของ ผิว	27.27	18.19	27.27	27.27
	ความยืดหยุ่นของ ผิว	18.19	36.36	40.91	4.54
	ความขาวของผิว	4.54	18.19	40.91	36.36
	ความนุ่มของผิว	4.54	9.10	86.36	0
B (EGCG)	ความหยาบของ ผิว	4.54	22.73	50.00	22.73
	ความยืดหยุ่นของ ผิว	18.19	22.73	45.45	13.63
	ความขาวของผิว	13.63	13.63	54.55	18.19
	ความนุ่มของผิว	9.10	4.54	86.36	0

สำหรับค่าความยืดหยุ่นของผิว พบว่า อาสาสมัคร 36.36% รู้สึกว่าด้านที่ทาโลชันปกขาด ดีกว่าด้านควบคุมในขณะที่ 18.19% รู้สึกตรงกันข้าม 40.91% รู้สึกว่าดีขึ้นทั้งสองด้านและ 4.54% รู้สึกว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆทั้งสองด้าน สำหรับความยืดหยุ่นของผิวของโลชัน EGCG นั้น พบว่า อาสาสมัคร 45.45% รู้สึกว่าดีขึ้นเท่ากันทั้งสองด้านในขณะที่ 22.73 % รู้สึกว่าด้านที่ทาโลชัน EGCG ดีกว่าด้านควบคุมในขณะที่ 18.19% รู้สึกตรงกันข้าม และ 13.63% บอกว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆทั้งสองด้าน

เป็นที่น่าสังเกตว่าความหยาบและความยืดหยุ่นของผิวที่ได้จากการประเมินความรู้สึกของอาสาสมัครนั้น ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่าที่ได้จากเครื่องมือ ทั้งนี้เนื่องจากการประเมินโดยอาสาสมัคร (subjective method) นั้นเป็นวิธีที่ค่อนข้างยากที่จะแยกแยะความแตกต่างที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยซึ่งมีเพียงเครื่องมือที่สามารถทำได้ (objective method) อีกทั้งในการ

ทดลองนี้ไม่ได้มีการอธิบายความหมายที่ชัดเจนแก่อาสาสมัครในเรื่องนิยามของคำว่าความหยาบ และความขีดยุ่น จึงอาจทำให้อาสาสมัครรู้สึกได้แตกต่างกันออกไปในแต่ละคน จึงทำให้ผลที่ได้ นั้นไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

สำหรับผลของความขาวของผิวและความนุ่มของผิวแม้ว่าจะแยกแยะค่อนข้างยากเช่นกัน แต่จะมีความสอดคล้องกับค่าที่วัดโดยเครื่องมือมากกว่า เช่น อาสาสมัคร 18.19% รู้สึกว่าด้านที่ทา โลชันปกวาดดีกว่า (ขาวกว่า) ด้านควบคุมในขณะที่ 4.54% รู้สึกตรงกันข้าม ซึ่งสอดคล้องกับผล จากเครื่องมือ Mexameter สำหรับโลชัน EGCG นั้น มีอาสาสมัคร 13.63% รู้สึกว่าด้านที่ทาโลชัน EGCG ขาวกว่าด้านควบคุมขณะที่อีก 13.63% รู้สึกตรงกันข้าม

สำหรับผลของความนุ่มของผิว พบว่าอาสาสมัครส่วนใหญ่ของทั้งสองกลุ่ม (86.36%) รู้สึก ว่าดีขึ้นทั้งสองด้านทั้งนี้เนื่องมาจากผลของโลชันเบสที่ทำให้ความชุ่มชื้นของผิวเพิ่มขึ้นซึ่ง สอดคล้องกับค่าที่ได้จากเครื่องมือ Corneometer

โดยสรุปแล้ว จากผลการทดลองในส่วนนี้ สามารถอธิบายได้ว่า โลชันปกวาดที่ความ เข้มข้น 0.10% ให้ประสิทธิผลในการชะลอริ้วรอยที่ลึกกว่าโลชัน EGCG ที่ความเข้มข้นเดียวกันทั้งค่า circular roughness และ mean roughness โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่สัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่โลชัน EGCG เห็นผลที่สัปดาห์ที่ 8 อีกทั้งโลชันปกวาดยังมีผลทำให้ผิวขาวขึ้นอีกด้วย ในขณะที่ทั้ง โลชันปกวาดและโลชัน EGCG ไม่ได้ช่วยให้ความขีดยุ่นของผิวดีขึ้นแต่ทำให้ความชุ่มชื้นของ ผิวเพิ่มขึ้นได้อันเนื่องมาจากผลของโลชันเบส

จากประสิทธิผลในการลดริ้วรอยและทำให้ผิวขาว ทำให้ปกวาดเป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่า สนใจที่จะนำมาเป็นส่วนประกอบหนึ่งในเครื่องสำอางที่มาจากธรรมชาติที่หาง่ายและราคาไม่ แพง โดยมีราคาประมาณกิโลกรัมละ 400-500 บาท ในขณะที่ EGCG มีราคากิโลกรัมละ 8,500 – 12,000 บาท จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำปกวาดมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางที่ช่วยชะลอริ้วรอย และทำให้ผิวขาวที่มีทั้งประสิทธิภาพและความปลอดภัยในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของสารละลายปกวาดในอาสาสมัคร

สารละลาย 0.10% w/v ของปกวาดให้ประสิทธิผลในการลดริ้วรอยที่ดีที่สุด โดยผิวแก้มนั้นด้านที่ทาด้วยสารทดสอบมีค่าความหยาบของผิว (ทั้ง mean roughness และ circular roughness) ต่ำกว่าด้านควบคุมที่ทาด้วยตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่สองของการทาไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง รองลงมาคือ สารละลาย 0.25% w/v ปกวาดและ 0.10% w/v EGCG ซึ่งให้ผลเท่าเทียมกันคือเห็นผลในการลดริ้วรอยที่สัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง ในขณะที่สารละลาย 0.10% w/v vitamin C ดูเหมือนจะให้ผลในการลดริ้วรอยที่น้อยที่สุด

ส่วนที่ 2 การพัฒนาโลชันลดริ้วรอยที่มีส่วนผสมของปกวาด

โลชันปกวาดได้ถูกเตรียมขึ้น 15 สูตร จากผลการทดสอบความคงตัวของแบบเร่งพบว่า สูตร 12 เป็นสูตรที่มีความคงตัวของกายภาพที่ดีที่สุดทั้งในแง่ของลักษณะทางกายภาพ ความหนืด pH และความรู้สึกสัมผัส

ส่วนที่ 3 การประเมินประสิทธิผลในการลดริ้วรอยของโลชันปกวาดในอาสาสมัคร

1. โลชันปกวาดที่ความเข้มข้น 0.10% w/w ให้ผลในการลดริ้วรอยที่เร็วกว่า โลชัน 0.1% w/w EGCG โดยเห็นความแตกต่างตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่โลชัน EGCG เห็นผลที่สัปดาห์ที่ 8
2. ที่สัปดาห์ที่ 8 โลชันปกวาดสามารถช่วยลดริ้วรอยได้ 5.93% และ 5.78% เมื่อพิจารณาจากค่า circular roughness และ mean roughness ตามลำดับ ในขณะที่โลชัน EGCG ช่วยลด circular และ mean roughness ได้ 5.64 และ 2.11% อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของค่าร้อยละของความสามารถในการลดริ้วรอยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างโลชันทั้งสองชนิดเมื่อวิเคราะห์ด้วย independent t-test ($P > 0.05$)
3. โลชันปกวาดมีผลในการทำให้ผิวขาว โดยเห็นผลตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป ($P < 0.05$) ในขณะที่โลชัน EGCG ไม่มีผลทำให้ผิวขาว
4. จากการวัดความยืดหยุ่นของผิวพบว่า ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงในค่าความยืดหยุ่นของผิวทั้งโลชันปกวาดและโลชัน EGCG ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคการวัดและความ sensitive ของเครื่องมือ
5. จากการวัดความชุ่มชื้นของผิวพบว่า ค่าความชุ่มชื้นของผิวเพิ่มขึ้นในโลชันทั้งสองกลุ่มอันเนื่องมาจากผลการให้ความชุ่มชื้นของ โลชันเบส

6. โลกทัศน์ที่พัฒนาขึ้นในการทดลองนี้ได้รับการยอมรับจากอาสาสมัครทั้งในแง่ของความง่ายในการทำ ความเร็วในการชิม ความไม่เหนียวเหนอะหนะและความพึงพอใจโดยรวม อีกทั้งยังไม่พบว่ามีอาสาสมัครคนใดเกิดการแพ้ตลอดช่วงระยะเวลา 8 สัปดาห์ของการศึกษา

7. เป็นที่น่าสังเกตว่าการประเมินประสิทธิผลในการชะลอหรือลดริ้วรอยนั้นต้องอาศัยเครื่องมือที่ sensitive มีความไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของผิวหนัง การสังเกตด้วยตาเปล่านั้นค่อนข้างยากที่จะแยกแยะความแตกต่างได้ รวมถึงการประเมินผล โดยตัวอาสาสมัครเองก็ จะมีความแปรปรวนสูงเนื่องจากอาสาสมัครไม่ได้ผ่านการฝึกฝนและเป็นการใช้ความรู้สึกของตัวเองในการตัดสินใจ

โดยสรุปแล้ว ผลการวิจัยนี้พิสูจน์ว่าปวกหาคสามารถช่วยลดหรือชะลอริ้วรอยของผิวหนังได้ ซึ่งประสิทธิผลจะเร็วกว่า EGCG และ vitamin C ที่ความเข้มข้นเดียวกัน อีกทั้งยังมีฤทธิ์ช่วยให้ผิวขาว ดังนั้น ปวกหาคจึงเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติอีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารบำรุงผิวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางซึ่งให้ทั้งประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอริ้วรอยและทำให้ผิวขาว

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคคลต่อไปนี้ ที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย
2. ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการวิจัย
3. นางสาวนัชชา วนวัฒนากุล นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Anita, S.C., Stephen, D.G., and McEwen, G.N. 1991. CTFA safety testing guidelines. Washington D.C.: The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.
- Barlow, T., and Wiechers, J.W. 1999. Measuring skin hydration. Cosm. Toil. 114 : 47-53.
- Chui, A.E. 2005. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in clinical and histological appearance of photoaging skin. Dermatol. Surg. 7Pt2: 855-860.
- Daniel, S., and Fred, Z. 2002. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. Cosm. Toil. 117: 45-50.
- Doris, E.B. 1996. Cosmetics for elderly people. Cosm. Toil. 111: 31-37.
- Harnisch, L.M., Raheja , M.K., Lockhart, L.K., Pagnoni, A., Lopez, A. and Gabbianelli, A. 1999. Substantiating Antiaging Product Claims. Cosm. Toil. 114: 33-47.
- Hristo, D. 2005. Application of Cutometer area parameters for study of human skin fatigue. Skin Research and Technology. 11: 120-122
- Khazaka, D. 1996. Claim Support & Efficacy Testing. A New System to Analyze Skin Roughness and Wrinkles. Active ingredients, International Conference Paris.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., De-Eknamkul, W. 2000. Tyrosinase inhibitor from *Artocarpus gomezianus*. Planta. Med. 66: 275-277.
- Martin, R. 1995. Intrinsic Aging. Cosm.Toil. 110: 94-101
- Mitsui, T. 1997. New cosmetic science. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Mongkolsuk, S., Roberson, A. and Tower, R. 1957. 2,4,3',5'-tetrahydroxystillbene from *Artocarpus lakoocha*. J.Chem.Soc: 2231-2233.
- Pengrungruangwong, K. 2001. Evaluation of skin whitening efficacy and stability of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract. Master's thesis, Department of Pharmacy, Graduate school, Chulalongkorn university.
- Pheansri, I. 2001. Evaluation of skin whitening effect of *Artocarpus lakoocha* extract, niacinamide, lactic acid, tranxemic acid and their combination in guinea pigs and human volunteers. Master's thesis, Department of Pharmaceutical technology, Graduate school, Chulalongkorn university.
- Sritularak, B. 1998. Chemical Constituents of *Artocarpus lakoocha* and *A. gomezianus*. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Graduate School, Chulalongkorn University.

- Sritularak, B., De-Eknamkul, W., and Likhitwitayawuid, K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai. J. Pharm. Sci. 22(4): 149-155.
- Tagumi, H., Ohi, M., Iwatsuki, K. and Yamada, M. 1983. Electrical measurement of the hydration state of the skin surface in vivo. In: Marks, R. and Plewig, G., Stratum Corneum, 248-251. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag,
- Takema, Y., Yorimoto, Y., Kawai, M. and Imokawa, G. 1994. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. Br J Dermatol. 131: 641-648
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., and Likhitwitayawuid, K. 2006. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. Int. J. Cosmet. Sci. 28: 269-276.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., and Likhitwitayawuid, K. 2003. A potent tyrosinase inhibitor from *Artocarpus lakoocha* heartwood extract: Comparative evaluation of its melanin-reducing efficacy in guinea pigs and humans. Proceedings of the 2003 IFSCC Conference.: 201-212.
- Tronnier, H. 1997. Results of the Skin Surface Analysis by Means of SELS . Akt Dermatol. 23: 97-100.
- Wachiranuntasin, K. 2005. Evaluation of stability, antioxidative and free radical scavenging activities of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract. Master's Thesis, Department of Pharmacy, Graduate School, Chulalongkorn University.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย