



การพัฒนาเซรั่มจากสารสกัดบัวบก

DEVELOPMENT OF SERUM FROM CENTELLA ASIATICA EXTRACT



อิสเรศ ปัญญา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาเสริมจากสารสกัดบัวบก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF SERUM FROM CENTELLA ASIATICA EXTRACT



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy Srinakharinwirot University

2018

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาเซรั่มจากสารสกัดบัวบก
ของ
อิศเรศ ปัญญา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล)	(อาจารย์ ดร.วีรวัฒน์ ตีระชัยดีกุล)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภิมน ตันวิเชียร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ วิชะรังสรรค์)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเซรั่มจากสารสกัดบัวบก
ผู้วิจัย	อิศเรศ ปัญญา
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล

บัวบกเป็นพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาแผลเป็นชนิดนูนและคีลอยด์แต่ยังไม่พบการรายงานว่ามีเวชสำอางจากบัวบกที่ใช้ในการรักษาแผลเป็นชนิดที่ลึกนูน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับเซรั่มจากสารสกัดบัวบกเพื่อรักษาแผลเป็นจากการเกิดสิว ซึ่งเป็นแผลเป็นชนิดลึกนูน พัฒนาเซรั่มจากการปรับเปลี่ยนสารช่วยทางเภสัชกรรม ใช้สารสกัดบัวบกจากบริษัท (commercial extract), สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล (butanol extract) และสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ (in-house crude extract) พบว่าการเติม poloxamer 188 ทำให้ได้ตำรับมีลักษณะทางกายภาพที่ใส และการปรับเปลี่ยน buffering agent ทำให้ได้ตำรับที่มีเสถียรภาพต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง ตำรับเซรั่มผสมสารสกัดบัวบกในความเข้มข้น 5-10% มีเสถียรภาพทางกายภาพดี ยกเว้นเซรั่มที่มี 5% ของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ การปลดปล่อยและการซึมผ่านของ 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากบริษัทในเซรั่ม พบการซึมผ่านและปลดปล่อยได้เร็วกว่าตำรับเซรั่มอื่น เมื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านเฉพาะสารออกฤทธิ์ พบว่าเซรั่มที่มีสารสกัด 5% ของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลมีการซึมผ่านของปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่ม asiaticosides สูงที่สุด การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบเพียงสารสกัดและเซรั่มผสมสารสกัดจากห้องปฏิบัติการที่มีการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 90% พบเฉพาะสารสกัดและเซรั่มผสมสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม และเซรั่มดังกล่าวทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้มากกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง การพัฒนาเซรั่มจากสารสกัดบัวบกโดยการเปลี่ยนสารช่วยทางเภสัชกรรมทำให้ได้ตำรับเซรั่มที่มีเสถียรภาพและประเภทสารสกัดบัวบกส่งผลต่อเสถียรภาพของตำรับตลอดจนประสิทธิภาพของบัวบก ดังนั้นเซรั่มจากสารสกัดบัวบกจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลเหมาะสมที่จะนำไปทำการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ : บัวบก, เซรั่ม, เสถียรภาพ, การปลดปล่อย, การซึมผ่าน

Title	DEVELOPMENT OF SERUM FROM CENTELLA ASIATICA EXTRACT
Author	ISARATE PANYA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Duangratana Shuwisitkul , Ph.D.

Centella asiatica is a Thai medicinal plant used for the treatment of hypertrophic scar and keloid. A cosmeceutical product from *Centella asiatica* for the treatment of depressed scar has not been reported. The objective of this study was to develop serum containing *Centella asiatica* extract. The pharmaceutical excipients were adjusted to achieve an appropriate formulation. The different type of extracts have been added into the serum including the commercial extract, butanol extract and in-house crude extract. The results showed that the physical appearance of the serum containing poloxamer 188 was clear. The optimization of formulation by modifying the buffering agent resulted into the good stability. The serum containing 5-10% *Centella asiatica* extract have the good physical and rheological stability except the serum containing 5% in-house crude extract. The extract release and permeability of the serum containing 7.5% commercial extract were faster than the other serum formulations. The permeability of asiaticosides from the serum containing 5% butanol extract showed the highest permeation of asiaticosides. Only the in-house crude extract and the serum containing the in-house crude extract demonstrated the cell survival less than 90%. The cell migration of the butanol extract and the serum containing butanol extract produced more cell movement than the control. The serum containing 5% butanol extract has the best chance to be developed for the tretment of depressed scar from acne.

Keyword : *Centella asiatica*, serum, stability, release, permeability

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาและเมตตาอย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภิมันต์ ดันวิเชียร ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ทั้งสองท่านได้เสียสละเวลา เพื่อให้คำแนะนำ อบรมสั่งสอน รวมทั้งดูแลเอาใจใส่ในการดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอนอย่างดียิ่ง ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี ๒๕๖๑

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วีรวัฒน์ ตีระนัชชัยดีกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกและประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ อีกทั้งยังเป็นผู้อนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรวดี กฤษณพันธุ์ ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงเซลล์บางชนิด

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ วิชะรังสรรค์ (กรรมการบริหารหลักสูตร) ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณรงค์ มูลศรี คุณสมชาย หลวงสนาม คุณนิศา อุบลทิพย์ และเพื่อนร่วมหลักสูตรทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือเกี่ยวกับงานห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ งานเอกสารและเทคโนโลยีสารสนเทศที่ใช้ในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้คำแนะนำ รวมทั้งเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

อิศเรศ ปัญญา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ภูมิหลัง	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารงานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แผลเป็น	3
2.1.1 แผลเป็นที่โตขึ้น.....	3
2.1.2 แผลเป็นที่ลึกนูน (depressed scar).....	3
มีลักษณะเป็นร่องหรือรูนูนลึกลงไปภายในผิวหนัง	3
2.1.3 แผลเป็นที่มีการหดรั้งร่วมด้วย (scar contracture)	3
2.2 กระบวนการสมานแผลและการเกิดแผลเป็น (Wound healing and scar)	5
2.3 การรักษาแผลเป็น.....	7
2.4 บัวบก (<i>Centella asiatica</i>)	9
2.4.1 ข้อมูลทั่วไป.....	9

2.4.2 ข้อมูลทางพิษศาสตร์.....	10
2.4.3 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของบัวบก.....	10
2.4.4 การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics)	11
2.4.5 การศึกษาทางเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics)	12
2.5 รูปแบบผลิตภัณฑ์จากสารสกัดบัวบกและตำรับยาจากบัวบกในปัจจุบัน	12
2.6 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกในเซลล์เพาะเลี้ยง	13
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	15
3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	15
3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	15
3.1.2 สารเคมี	15
3.1.3 สมุนไพรและสารสกัดที่ใช้ในการศึกษา	16
3.1.4 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา	16
3.2. วิธีการทดลอง	16
3.2.1 การเตรียมสารสกัดบัวบก.....	16
3.2.2 การแยกสารสกัดบัวบก.....	17
3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางสมรรถนะสูง (High performance thin Layer chromatography, HP-TLC).....	18
3.2.4 การเตรียมตำรับเซรัมจากบัวบก	19
3.2.5 การศึกษาสมบัติทางเคมี.....	20
3.2.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ	20
3.2.7 การศึกษาเสถียรภาพ.....	20
3.2.8 การปลดปล่อยสารสกัด	20
3.2.9 การศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดบัวบกทางผิวหนัง.....	21

3.2.10 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)	21
3.2.11 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยวิธี MTS assay	22
3.2.12 การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ด้วยวิธี Scratch assay test	23
บทที่ 4 ผลการดำเนินวิจัย	25
4.1 ผลการสกัดและแยกสารสกัดบวบก	25
4.2 ผลการพัฒนาตำรับและเสถียรภาพของเซรั่มจากสารสกัดบวบก	26
4.3 ผลการปลดปล่อยและการซึมผ่านของเซรั่มจากสารสกัดบวบก.....	32
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)	34
4.5 ผลการศึกษ้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration)	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	38
ข้อเสนอแนะ	39
ภาคผนวก.....	40
บรรณานุกรม	47
ประวัติผู้เขียน.....	52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดงส่วนประกอบของเซรัมสารสกัดบัวบก	19
ตาราง 2 แสดงร้อยละปริมาณสารสกัดของสารสกัดบัวบกเมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง	26
ตาราง 3 แสดงผลของตำรับเซรัมพื้นฐานที่เตรียมจากพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	27
ตาราง 4 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับเซรัมที่ความเข้มข้นและประเภทต่างๆ	28
ตาราง 5 แสดงผลของสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเซรัมจากสารสกัดบัวบก	30
ตาราง 6 แสดงผลเสถียรภาพของตำรับเซรัมจากสารสกัดบัวบก	31
ตาราง 7 แสดงผลการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ของสารสกัดบัวบกและตำรับที่มีสารสกัด บัวบกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	37



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด hypertrophic scar	4
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด keloid	4
ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด depressed scar	5
ภาพประกอบ 4 แสดงแผลเป็นชนิด scar contracture	5
ภาพประกอบ 5 แสดงกระบวนการสมานแผลและการเกิดแผลเป็น	6
ภาพประกอบ 6 แสดงลักษณะของบัวบก	10
ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ asiaticoside (A), asiatic acid (B),	11
ภาพประกอบ 8 แสดงผลการปลดปล่อยสารสกัดของเซรัมที่ประกอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิด	32
ภาพประกอบ 9 แสดงการซึมผ่านของสารสกัดจากตำรับเซรัมที่ผสมสารสกัดบัวบก	33
ภาพประกอบ 10 แสดงการซึมผ่านของ asiaticoside จากตำรับเซรัมที่ผสมสารสกัดบัวบก	34
ภาพประกอบ 11 แสดงกราฟร้อยละการรอดชีวิตของสารสกัดต่อเซลล์ human keratinocyte (n)	35
ภาพประกอบ 12 แสดงผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)	43
ภาพประกอบ 13 แสดงผลของเซรัมที่มีสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)	45
ภาพประกอบ 14 แสดงกราฟมาตรฐานของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล	45
ภาพประกอบ 15 แสดงกราฟมาตรฐานของสารสกัดบัวบกจากบริษัทในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่วัดด้วย UV spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	46
ภาพประกอบ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของ asiaticoside ด้วยเทคนิค HPTLC	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

รอยแผลเป็นเกิดได้หลังจากการเป็นสิว เมื่อเกิดขึ้นแล้วไม่ได้เพียงเกิดลักษณะที่ไม่น่าดูบนผิวหนัง แต่ยังสามารถก่อปัญหาอื่นได้ เช่น ทำให้เกิดอาการคัน แสบ (Fearmonti, Bond, Erdmann, & Levinson, 2010) และอาจเกิดการติดเชื้อบริเวณแผลเป็นได้ บั๊วกเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานการวิจัยในการใช้รักษารอยแผลเป็น (Al-Attar & Duebel, 2006) มีฤทธิ์ในการระงับประสาท ช่วยในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น (Brinkhaus, Lindner, Schuppan, & Hahn, 2000) และยังมีฤทธิ์ในการสมานแผล อย่างไรก็ตามยังมียังงานวิจัยไม่มากนักที่ศึกษาฤทธิ์ของตำรับบั๊วกต่อการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือฤทธิ์ของตำรับบั๊วกในการรักษารอยแผลเป็นจากสิว

เซรัม (serum) เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญในการออกฤทธิ์สูง เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวประเภทอื่น เช่น ครีมหรือโลชั่น (Nilsuwankosit, Suwansichon, Winitchai, & Rimkeeree, 2014) เซรัมมีข้อดีอีกหลายอย่าง เช่น เป็นตำรับที่ซึมเข้าสู่ผิวหนังได้ง่าย มีความหนืดไม่สูง จึงทำให้ผิวไม่เหนียวเหนอะหนะ ปัจจุบันตำรับครีมหรือเจลจากสารสกัดบั๊วกมีความเข้มข้นของสารสำคัญต่ำ การเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญ โดยพัฒนาเป็นเซรัมก็น่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการรักษารอยแผลเป็นได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารสำคัญที่เพิ่มมากขึ้นอาจทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังได้ ดังนั้นนอกจากประสิทธิภาพในการรักษารอยแผลเป็นแล้วยังต้องคำนึงถึงการทดสอบการระคายเคืองหรือการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของเซรัมที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูงอีกด้วย

แม้จะมีการทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดบั๊วกจากหลายงานวิจัย ทั้งการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงและการศึกษาทางคลินิก แต่การทดลองประสิทธิภาพในเซลล์เพาะเลี้ยงกับตำรับจากสารสกัดบั๊วกในปัจจุบันยังทำได้ยาก เนื่องจากการรบกวนจากสารช่วยทางเภสัชกรรมในตำรับ เซรัมเป็นตำรับที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก จึงสามารถทำการศึกษาประสิทธิภาพในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาตำรับเซรัมสารสกัดบั๊วกเพื่อเป็นทางเลือกใหม่อีกทางเลือกหนึ่งให้กับการรักษารอยแผลเป็นบนผิวหนังหลังการเกิดสิว โดยคำนึงถึงประสิทธิภาพและเสถียรภาพของตำรับ นอกจากนี้จะเป็นการพัฒนาตำรับรูปแบบใหม่สำหรับบั๊วก แล้วยังเป็น

การเพิ่มมูลค่าให้กับบัวบกในการพัฒนาเป็นเวชสำอางที่มีผลการยืนยันจากการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง (Azis et al., 2017)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาตำรับเซรั่มสารสกัดบัวบกให้มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพ
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของคอลโรฟิลล์ต่อเสถียรภาพของตำรับเซรั่มสารสกัดบัวบก
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสมานแผลของสารสกัดบัวบกกับตำรับเซรั่มจากสารสกัดบัวบกในเซลล์เพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาตำรับเซรั่มจากบัวบกโดยการปรับเปลี่ยนสารช่วยทางเภสัชกรรมในตำรับ ศึกษาการปลดปล่อย การซึมผ่านและสมบัติทางกายภาพและเคมี การปลดปล่อย (release) การซึมผ่าน (permeable) และสมบัติทางกายภาพและเคมี เมื่อคัดเลือกตำรับที่มีประสิทธิภาพในด้านการปลดปล่อย การซึมผ่านและเสถียรภาพมาทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการรักษาแผลเป็นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยศึกษาผลของสารสกัดบัวบกเดี่ยวและผลของตำรับเซรั่มสารสกัดบัวบกต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตำรับเซรั่มสารสกัดบัวบกที่มีประสิทธิภาพและเสถียรภาพพร้อมที่จะนำไปศึกษาทางคลินิกต่อไป

บทที่ 2

เอกสารงานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แผลเป็น

แผลเป็น คือ รอยแผลที่เกิดขึ้นหลังจากการหายของแผลจากกระบวนการหายของแผลที่ไม่สมบูรณ์ หรือผิดปกติ สามารถเกิดได้หลังจากอุบัติเหตุ สิว และหลังการผ่าตัด เป็นต้น เมื่อแผลหายแล้วจะทิ้ง ร่องรอยไว้ได้หลากหลายลักษณะ แต่ลักษณะที่เป็นแผลเป็นที่ถือว่าผิดปกติแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

2.1.1 แผลเป็นที่โตนูน

มีลักษณะใหญ่และนูนกว่าแผลเป็นปกติ สามารถแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่

ก. แผลเป็นนูนเกิน (hypertrophic scar) เป็นแผลเป็นที่ใหญ่ นูน แต่ไม่เกินขอบเขตของแผลเกิดจากการการหายเองของแผลขนาดใหญ่ที่ผิวหนัง ซึ่งทำการรักษาหายแล้วนั้นเกิด การสร้างคอลลาเจนที่มากเกินไป โดยในระยะแรกจนถึงระยะสุดท้ายจะมีลักษณะนูนใหญ่ มีสีแดงเข้ม และอาจมีอาการคันเป็นระยะเวลานาน (ภาพประกอบ 1)

ข. แผลเป็นคีลอยด์ เกิดจากการที่ผิวหนังบริเวณที่เป็นแผลหลังทำการรักษาหายแล้ว เกิดการสร้างคอลลาเจนที่มากเกินไป และอาจเกิดขึ้นจากความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) เนื่องจากมีรายงานว่าพบสารที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบางชนิด คือ โกรทแฟคเตอร์ เป็นปัจจัยกระตุ้นการ เจริญของเซลล์ที่เข้ามาซ่อมแซมบาดแผลมากกว่าแผลเป็นปกติทั่วไป แผลเป็นชนิดนี้นูนและขยายใหญ่เกินขอบเขตของแผลเดิมไปมาก มีความหนา หรือย่น และจะขยายใหญ่ขึ้นจนทำให้ใหญ่กว่ารอยแผล สามารถเกิดได้ทุกจุดบนร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณ กระดูกหน้าอกที่ใกล้เคียงกับกระดูกซี่โครงและไหล่ (ภาพประกอบ 2)

2.1.2 แผลเป็นที่ลึกบุ๋ม (depressed scar)

มีลักษณะเป็นร่องหรือรูบุ๋มลึกลงไปภายในผิวหนัง หลังจากการเป็นแผล เช่น แผลเป็นที่เกิดจากสิว อีสุกอีใส เป็นต้น อาจเกิดขึ้นจากความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) มีรายงานว่าพบสารที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบางชนิดคือ โกรทแฟคเตอร์ เป็นปัจจัย กระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่เข้ามาซ่อมแซมบาดแผลน้อยกว่าแผลปกติทั่วไป (ภาพประกอบ 3)

2.1.3 แผลเป็นที่มีการหดรั้งร่วมด้วย (scar contracture)

แผลเป็นชนิดนี้เกิดขึ้นบริเวณข้อต่อและส่วนที่ถูกดึงให้เคลื่อนที่ได้ และอาจดึงรั้ง อวัยวะบริเวณแผลให้ผิดรูปถึงขั้นพิการได้ (ภาพประกอบ 4) (Fearmonti et al., 2010)



ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด hypertrophic scar

ที่มา: <http://medicalpoint.org/hypertrophic-scar/>



ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด keloid

ที่มา: <http://serior.info/keloid>



ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะแผลเป็นชนิด depressed scar

ที่มา: <http://www.conceptcosmeticsurgeryservices.com>



ภาพประกอบ 4 แสดงแผลเป็นชนิด scar contracture

ที่มา: <http://www.ijps.org/viewimage>

2.2 กระบวนการสมานแผลและการเกิดแผลเป็น (Wound healing and scar)

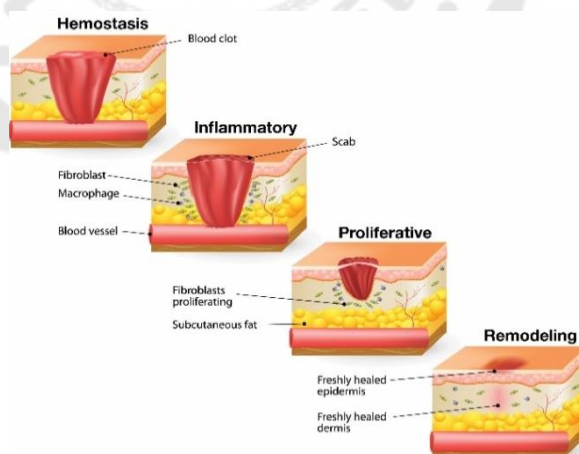
เมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บ โดยปกติจะเกิดกระบวนการสมานแผลและเกิดแผลเป็นโดยธรรมชาติ ประกอบไปด้วย 4 ระยะ ที่อาจมีช่วงเวลาทับซ้อนกันได้ดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะห้ามเลือด (Hemostasis) เป็นระยะแรกหลังเกิดบาดแผลทันที กระตุ้นให้เกิด กระบวนการสร้างลิ่มเลือด (blood clot หรือ fibrin clot) โดยเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งจะฟอร์มตัวเป็นร่างแหหรือตาข่าย ซึ่งทำให้เลือดหยุดไหลอย่างรวดเร็ว

ระยะที่ 2 ระยะอักเสบ (Inflammation) เป็นระยะที่เกิดหลังจาก coagulation มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมาที่บาดแผลเป็นจำนวนมากเพื่อกอยกำจัดเชื้อก่อโรค และมี macrophage มาปลดปล่อย cytokine หรือ growth factor เพื่อทำหน้าที่ควบคุมและซ่อมแซม connective tissue matrix

ระยะที่ 3 ระยะการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยหรือระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferative) เป็นระยะที่เพิ่มความหนาแน่นให้กับบาดแผลและขอบของบาดแผล เกิดการเชื่อมต่อกันและมีการสร้าง collagen ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อผ่านไปประมาณ 1 สัปดาห์ จะมีการสร้าง collagen ที่ลดลง นอกจากนี้ยังมีการสร้างเส้นเลือดต่างๆ และส่วนที่เรียกว่า ground substance

ระยะที่ 4 Remodeling เป็นระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล เกิดภาวะสมดุลของการสร้างและทำลาย collagen เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการสร้างและยังก่อตัวกันขึ้นใหม่ เรียกว่าแผลเป็น (scar) ซึ่งในสภาวะปกติโดยทั่วไปแล้ว ภายในช่วงแรกๆจะมีความนูนเล็กน้อย สีค่อนข้างแดง ซึ่งพบว่าจะสามารถหายไปได้เองในเวลาไม่นาน แผลจะมีความหนาแน่นที่สุดและสามารถหายได้ในระยะนี้ (Kirsner & Eaglstein, 1993; Velnar, Bailey, & Smrkolj, 2009)



ภาพประกอบ 5 แสดงกระบวนการสมานแผลและการเกิดแผลเป็น

ที่มา: <http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>

2.3 การรักษาแผลเป็น

ปัจจุบันในทางการแพทย์มีการรักษาแผลเป็นหลากหลายวิธี ดังต่อไปนี้

1. แผ่นซิลิโคน (silicone gel sheet)

แผ่นซิลิโคนเป็นวัสดุที่ทำจากซิลิโคน มีลักษณะสีใส เหนียวและนุ่ม สามารถแปะกับผิวหนังมนุษย์ได้ดี ทำให้ชุ่มชื้นลดความแห้งกร้านและความตึงของแผลเป็น ส่งผลให้การอักเสบลดลง และยังมีสารสื่อกลาง (mediators) ต่างๆ ทำหน้าที่ลดการสร้างคอลลาเจน ช่วยให้แผลเป็นนุ่มและแบนราบ นอกจากนี้ยังมีสมบัติช่วยลดการระคายเคืองแผลบนผิวหนัง วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายได้ผลดีในการรักษาแผลเป็น และมีความปลอดภัยในระดับสูง จึงได้รับความนิยมในการใช้เป็นที่เลือกแรกสำหรับการรักษาแผลเป็น ใช้เริ่มใช้ได้หลังจากแผลปิดสนิท ด้วยการปิดที่แผลเป็น วันละ 12-24 ชั่วโมง ยกเว้นตอนอาบน้ำ พบการรายงานว่ามีการศึกษาการใช้แผ่นปิดซิลิโคนรักษาแผลเป็นนาน 1 ปี พบว่า 33.33% ของผู้ที่มีความพึงพอใจในการรักษาแผลเป็นได้อย่างดี รวมถึง 33.33% ของผู้ที่มีความพอใจที่แผลเป็นดีขึ้นในระดับปานกลาง และอีก 33.33% ของผู้ที่มีความพอใจที่แผลเป็นดีขึ้นเล็กน้อยหรือไม่ดีขึ้นเลย (Goldenberg & Berman, 2014; Juanita et al., 2015; Juckett & Hartman-Adams, 2009)

2. ยาทาเฉพาะที่แบบเจลซิลิโคน (tropical silicone gel)

ยาทาเฉพาะที่แบบเจลซิลิโคนเป็นรูปเภสัชภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีใส มีน้ำและซิลิโคนเป็นส่วนประกอบ สามารถทาลงบนผิวหนังในบริเวณที่ต้องการ และเนื่องจากมีส่วนประกอบของน้ำทำให้ชุ่มชื้นลดความแห้งกร้านและความตึงของแผลเป็น ส่งผลให้การอักเสบลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการเปรียบเทียบการรักษาแผลเป็นด้วยการรักษาแบบแผ่นซิลิโคนกับการใช้ยาทาเฉพาะที่แบบเจลซิลิโคน วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น นาน 3 เดือน พบว่ายาทาเฉพาะที่แบบเจลซิลิโคนทำให้แผลเป็นแบนราบ ยุบตัวลง และลดสีแดงของแผลเป็นได้ดีกว่าแผ่นซิลิโคน และยังคงลดอาการคัน ระคายเคือง ได้ใกล้เคียงกับแผ่นซิลิโคน ทั้งนี้การรักษาแบบการใช้ยาทาเฉพาะที่แบบเจลซิลิโคนก็ยังคงความสะดวก ง่ายต่อการใช้กว่าการรักษาแบบแผ่นซิลิโคน และยังสามารถรักษาแบบวิธีเดี่ยวหรือรักษาพร้อมกับวิธีอื่นได้อีกด้วย (Al-Attar & Duebel, 2006; Chernoff, 2007)

3. ยาฉีดสเตียรอยด์ (intralesional corticosteroid injections)

ยาฉีดเป็นเภสัชภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่มีลักษณะเป็นของเหลว สีใส ที่นิยมใช้คือ triamcinolone acetonide ขนาด 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าไปทางในชั้นผิวหนังแท้ทุก 4-6 สัปดาห์จนแผลเป็นยุบตัวลงและเรียบ การฉีดจะช่วยลดการอักเสบลดอาการปวดและคันของ

แผลเป็นได้โดยกลไกยับยั้งการหลั่งสารตัวกลางจาก tissue macrophage และยังไปช่วยลดการสลาย collagen glycoaminoglycan เพิ่ม การสร้าง enzyme proteinase ลด การเกิด inflammation และเพิ่ม tissue hypoxia สารตัวกลางจะทำการลดการสร้างคอลลาเจน และเปลี่ยนแปลงการสร้าง glucosaminoglycan และ fibroblast proliferation ทำให้แผลเป็นแบนราบลง การรักษาแบบการใช้ยาฉีดคอร์ติโคสเตียรอยด์สามารถใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับการรักษาอื่นๆ เช่น การผ่าตัด เป็นต้น เมื่อใช้เป็นการรักษาเพียงวิธีเดียวจะมีอัตราการตอบสนองร้อยละ 50-100 และมีอัตราการกลับมาเป็นใหม่ เหลือร้อยละ 9-50 นอกจากนี้การใช้ยาฉีดสเตียรอยด์สามารถทำให้เกิดผลข้างเคียงอื่นๆ ตามมาได้ ได้แก่ สีผิวซีดลง (hypopigmentation) ผิวหนังและชั้นไขมันใต้ผิวหนังฝ่อตัว (skin และ subcutaneous fat atrophy) เป็นแผล (ulceration) มีเส้นเลือดฝอยเกิดขึ้น (telangiectasia) (Goldenberg & Berman, 2014; Juanita et al., 2015)

4. การผ่าตัด (Surgery)

การผ่าตัดนั้นควรเลือกเป็นวิธีหลังจากการใช้วิธีดังกล่าวมาแล้วขั้นต้นไม่ได้ผล เพราะเป็นวิธีที่ย่างยากต้องใช้แพทย์เฉพาะทางผิวหนังและชำนาญการในการผ่าตัด เป็นการกระตุ้นให้มีการสร้าง collagen bundles ขึ้นมาใหม่ การรักษาด้วยการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว พบว่ามีโอกาสที่แผลเป็นจะกลับมาใหม่สูงถึงร้อยละ 45-93 (Niessen, Spauwen, Schalkwijk, & Kon, 1999; Robson et al., 1992) ในขณะที่การผ่าตัดร่วมกับการฉีดยาฉีดสเตียรอยด์ triamcinolone acetonide หลังการผ่าตัดพบว่ามี cure rate สูงถึงร้อยละ 80 (Ketchum, Robinson, & Masters, 1971) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปัจจุบันพบว่าการรักษาด้วยวิธีผ่าตัดร่วมกับการรักษาแบบ adjuvant therapy เช่น การใช้แผ่นซิลิโคน การฉีดยาฉีดสเตียรอยด์ (intralesional steroid injection) หรือการรักษาโดยฉายรังสี (Radiation Therapy) จะช่วยลด recurrence rate ได้ (Goldenberg & Berman, 2014; Juanita et al., 2015)

5. Imiquimod 5% cream

Imiquimod 5% cream เป็นเภสัชภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีขาวขุ่น จัดเป็นยาในรูปแบบ immune response modifier มีกลไกไปกระตุ้น interferon α และ proinflammatory cytokine ทำให้ collagen เสื่อมแล้วสลายเพิ่มมากยิ่งขึ้น และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของยีนที่ควบคุมกระบวนการทำลายตัวเองของเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อพัฒนาการการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระบบ ภูมิคุ้มกันและการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต (apoptosis) (Zurada, Kriegel, & Davis, 2006) นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำของแผลเป็นภายหลังจากการผ่าตัด ใช้ทาวันเว้นวันในตอน กลางคืน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ผลข้างเคียงที่พบได้หลังจากการใช้ Imiquimod 5% cream ได้แก่ การระคายเคืองและสีผิวเข้มขึ้น (Juckett & Hartman-Adams, 2009)

6. การรักษาโดยฉายรังสี (Radiation Therapy)

การรักษาโดยฉายรังสีเป็นวิธีการฉายรังสีขนาดต่ำๆ ที่ 1,200 cGy เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งถ้าฉายรังสีขนาดที่สูงจะทำให้เกิดมะเร็ง นิยมทำร่วมกันหลังวิธีการผ่าตัด โดยพบว่ามีประสิทธิภาพการรักษาสูงถึง ร้อยละ 65-99 เมื่อเทียบกับการผ่าตัดเพียงอย่างเดียวและมีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับมาเป็นแผลเป็นซ้ำที่น้อย (Klumpar, Murray, & Anscher, 1994; Kovalic & Perez, 1989) มีกลไกการทำงานโดยไปกระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ fibroblast และส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของ collagen bundles นอกจากนี้ยังมีข้อเสีย คือ เมื่อใช้ไปนานๆแล้วอาจจะทำให้เกิดเป็นมะเร็งได้ (Borok et al., 1988)

7. การรักษาโดยใช้เลเซอร์ (Laser Therapy)

การรักษาโดยใช้เลเซอร์เป็นวิธีการใช้ argon และ CO₂ laser ซึ่งให้ผลประสิทธิภาพในการรักษาแผลเป็นได้อย่างไม่ค่อยชัดเจน ต่อมาได้มีการนำ pulsed dye laser (PDL) นิยมใช้ความยาวคลื่นประมาณ 585-595 นาโนเมตร มีกลไกโดยไปกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ fibroblast และกระตุ้นการเสื่อมและสลาย collagen (Kuo et al., 2005) เพื่อทำให้รอยแดงและอาการคันลดลง (Karsai, Adrian, Hammes, Thimm, & Raulin, 2007)

2.4 บัวบก (*Centella asiatica*)

2.4.1 ข้อมูลทั่วไป

บัวบกจัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae หรือ Umbelliferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นๆอีก ได้แก่ *Hydrocotyle asiatica* L, *Hydrocotyle lunata* Lam, *Centella coriacea* Nannfd เป็นต้น



ภาพประกอบ 6 แสดงลักษณะของบัวบก

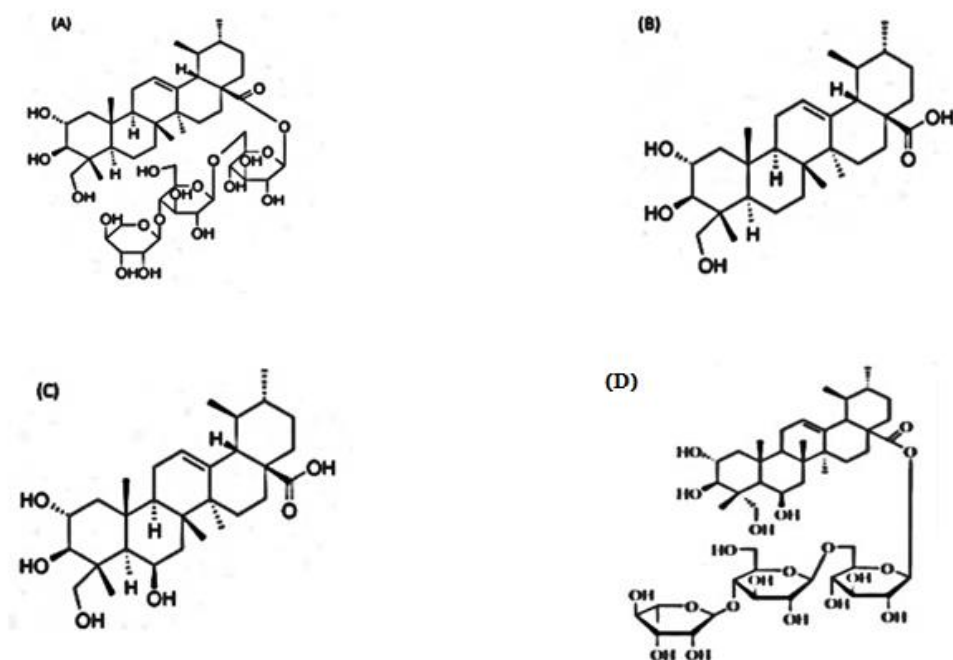
ที่มา : (Azis et al., 2017)

2.4.2 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดอกจะมีสีม่วงอ่อนๆ ใบบางและนุ่ม มีสีเขียว เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 2-5 เซนติเมตร กลิ่นคล้ายใบยาสูบ มีรสขม ก้านใบยาวที่มาจากส่วนที่เรียกว่า node คล้ายต้นกุหลาบและติดกับส่วนที่เรียกว่า ไหล (runners) (Arora, Kumar, & Dubey, 2002)

2.4.3 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของบัวบก

Asiaticoside, asiatic acid, madecassic acid และ madecassoside (Inamdar, Yeole, Ghogare, & de Souza, 1996)



ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ asiaticoside (A), asiatic acid (B), madecassic acid (C) และ madecassoside (D)

ที่มา : (Pan et al., 2010)

2.4.4 การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics)

ปัจจุบันมีการศึกษาทางด้าน pharmacokinetics จากสารสกัดบัวบก ทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ซึ่งการทดลองในมนุษย์แบบ randomized cross-over จำนวน 12 การทดสอบ พบว่าอาสาสมัครสามารถดูดซึม asiaticoside (mixture) จากการให้แบบ oral dose ได้ (Brinkhaus et al., 2000) การศึกษาในสัตว์ทดลองแบบ *in vivo* พบว่ามีการเกิดการเปลี่ยนรูปจาก asiaticoside ไปเป็น asiatic acid นั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นสูงสุดของ asiatic acid ในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งแบบ single oral administration และ repeated oral dose และมีการศึกษาเปรียบเทียบหลังจากที่มีการให้ madecassoside, asiaticoside, asiatic acid และ madecassic acid รวมสาร 4 ชนิด ในหนูทดลองพบว่า bio-availability อยู่ในช่วง 30-50% (van Der Watt & Pretorius, 2001)

2.4.5 การศึกษาทางเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics)

การศึกษา pharmacodynamic ของ *Centella asiatica* มีการศึกษาทั้งในการทดลองแบบ *in vitro*, *in vivo* และในสัตว์ทดลอง การศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้สารสกัดจาก บัวบกและ asiaticoside มีอย่างแพร่หลาย เช่น การสมานแผล (wound healing) การป้องกันแผล (ulcer-protective) เภสัชวิทยาของจิตประสาท (psychoneuro-pharmacological) ฤทธิ์การต้านจุลชีพ (antimicrobial) และฤทธิ์การต้านไวรัส (antiviral) การทดลองแบบ *in vivo* มีการศึกษาใน fibroblasts ระดับเซลล์ ชีวเคมี กลไกต่างๆ ตลอดจนทางคลินิกในมนุษย์ พบว่าสารสกัดบัวบกมีความเกี่ยวข้องในการเร่งสมานแผลในสภาวะที่มีความผิดปกติของผิวหนังทำให้ granuloma มีปริมาณที่ลดลงและทำให้เพิ่มความทนต่อแรงดึงของแผล นอกจากนี้ยังพบว่าการสังเคราะห์ collagen เพิ่มขึ้น มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น germ layer และมีการขยายตัวของ keratohyaline granules ในเนื้อเยื่อแผลเป็นอีกด้วย (Brinkhaus et al., 2000) และในการศึกษาโดยใช้สัตว์ทดลอง พบว่า asiaticoside ส่งเสริมและกระตุ้นการสมานแผลในหนูทดลองและยังช่วยเพิ่มความตึงผิวให้กับผิวที่เพิ่งเกิดใหม่ สามารถรักษารอยแผลเป็นประเภท hypertrophic scars และ keloids ได้โดยลดการเป็นพังผืดในแผล ป้องกันการเกิดรอยแผลเป็นใหม่ กลไกของการออกฤทธิ์แบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ เพิ่มการสังเคราะห์ collagen และ acidic mucopolysaccharide และยับยั้งระยะการอักเสบ (inflammatory phase) ของ hypertrophic scars และ keloids นอกจากนี้ยังสามารถไปรบกวนกระบวนการสร้างแผลเป็นโดยเพิ่มกิจกรรมของเซลล์ myofibroblasts และ immature collagen (Morisset et al., 1987)

2.5 รูปแบบผลิตภัณฑ์จากสารสกัดบัวบกและตำรับยาจากบัวบกในปัจจุบัน

1 ครีมบัวบก มีส่วนประกอบของสารสกัดบัวบก 7% ช่วยสมานแผล ลดรอยแผลเป็นและจุดด่างดำ ทำให้แผลนุ่มเร็วขึ้น

2 เจลล้างบัวบก กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อและเซลล์ผิวใหม่ ทำให้แผลเป็นจางลง

3 แชมพูบัวบก มีส่วนประกอบบัวบกสด 20% สมานแผลบนหนังศีรษะ

4 สบู่บัวบก 0.75% สมานแผล ทำให้แผลเป็นจางลง

5 โทนเนอร์บัวบก ทำความสะอาดผิวหนังและลดรอยแผลเป็น

6 แคปซูลบัวบก ช่วยขับปัสสาวะและบำรุงสมอง (Al-Attar & Duebel, 2006; Brinkhaus et al., 2000; Tenni et al., 1988)

เซรัม คือ ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวประเภทหนึ่งในรูปแบบสารละลายที่มีความหนืด ที่ได้รับความนิยมและมีมูลค่า อาจจัดเป็นเครื่องสำอาง ยาหรือเวชภัณฑ์ขึ้นอยู่กับสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่ผสมเข้าไปว่ามีฤทธิ์ในการรักษา เช่น รักษาแผลหรือบำรุงเพื่อความสวยงาม ยกตัวอย่างเช่น เซรัมวิตามินอี เซรัมวิตามินซี เซรัมจากสารสกัดพืช เซรัมจากพิษผึ้ง ซึ่งช่วยในเรื่องความกระจ่างใส ลดริ้วรอย หน้าเต่งตึง กระชับ เร่งผอมยาว เร่งคิวตัก ผลิตภัณฑ์ดูแลบำรุงผิวในรูปแบบเซรัมมีข้อได้เปรียบมากกว่าผลิตภัณฑ์ ดูแลผิวอื่นๆ เช่น ครีมหรือเจล หลายประการ ได้แก่ มีสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบเข้มข้นกว่า ปริมาณในการใช้ต่อครั้งที่น้อยเพียงแค่หยด ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของ เซรัม คือ น้ำ จึงไม่เหนียวเหนอะ มีโมเลกุลที่ขนาดเล็กกว่าจึงมีเนื้อสัมผัสที่เบาบาง ซึมเข้าผิวง่าย รวดเร็วและล้ำลึกกว่าจึงทำให้เห็นประสิทธิภาพได้เร็ว เป็นต้น (Nilsuwankosit et al., 2014) ตำรับเซรัมโดยทั่วไปจะ ประกอบด้วยน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก สารบัฟเฟอร์ (buffering agent) ได้แก่ sodium citrate, boric acid เป็นต้น รวมทั้งพอลิเมอร์ (polymer) เป็นสารเพิ่มความหนืด ได้แก่ poloxamer 188, sodium alginate gelatin, carbomer เป็นต้น และมีสารสำคัญต่างๆที่ออกฤทธิ์ในด้านการรักษา บำรุงและเพื่อเพิ่มความสวยงาม

การทดสอบเซรัม โดยทั่วไปจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ทางกายภาพและเคมี

ก. การทดสอบทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความหนืด มีหน่วยเป็นเซนติพอยต์ (cP) ใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์วัด ได้แก่ เครื่องวัดค่าความหนืดแบบด้านการหมุน (Rotational Brookfield Viscometer) หรือเครื่องวัดความหนืด Rheometer, ความเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้สายตาสังเกต, คุณภาพทางจุลินทรีย์ตามวิธี (มอก. 152-2539) ต้องไม่มีหรือต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ตามที่ได้กำหนด, ค่าสี L^* , a^* , b^*

ข. การทดสอบทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ใช้เครื่อง pH meter ในการวัด, การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งด้วยวิธี heating and cooling cycle (4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่องทำความเย็น สลับกับ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่อง incubator) (Kannasood, Rimkeeree, Winitchai, & Tadakittisarn; Nilsuwankosit et al., 2014)

2.6 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกในเซลล์เพาะเลี้ยง

ปัจจุบันมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) กันอย่างมากมาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเป้าหมายในการนำสารสกัดบัวบกไปใช้ประโยชน์ จากรายงานพบว่ามีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท PC12 (rat PC12

pheochromocytoma) และ IMR32 (human IMR32 neuroblastoma) โดยทดสอบกับสารสกัด บัวบกที่สกัดด้วย 20% ethanol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินผล การทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าความอยู่รอดของเซลล์ (cell availability) ทั้ง 2 ชนิด คือ PC12 และ IMR32 มีค่ามากกว่า 85.5% และ 133.3% ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารสกัดบัวบกที่สกัดด้วย ethanol 20% ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ระดับนัยสำคัญ $P > 0.05$ (Chen, Jang, Li, & Surh, 2005) และได้มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังและการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้สาร สกัดบัวบกมากมาย มีรายงานการศึกษาการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง HDF (human dermal fibroblast) และ HaCaT (human epidermal cell line) โดยใช้สารสกัดบัวบกที่สกัดด้วย เมทานอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.19-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความอยู่รอดของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด คือ HDF และ HaCaT มีค่ามากกว่า 90% โดยสารสกัดบัวบกที่สกัดจาก methanol ที่ความ เข้มข้นสูงสุด (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงผลร้อยละความอยู่รอดของ HDF และ HaCat แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control และที่ ความเข้มข้นต่ำสุด (0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า ผลร้อยละความอยู่รอดของ HDF และ HaCaT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control เช่นเดียวกัน ในการศึกษาการเคลื่อนที่ของ HDF และ HaCat ประเมินผลที่เวลา 40 ชั่วโมง พบว่า ให้ผลที่เหมือนกัน คือ สารสกัดบัวบกที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่า PDGF (Platelet-derived growth factor) ซึ่งเป็น positive control อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ (Azis et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ สารสกัด บัวบกในรูปแบบ nano-encapsulation และเจลลาตินในรูปแบบ nano-encapsulation ที่ความ เข้มข้นในช่วง 0.2-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองกับเซลล์ CCD-986sk (human skin fibroblast cells) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของทุกรูปแบบขึ้น สารสกัดบัวบกด้วยน้ำมีความเป็น พิษสูงสุด (15%) และเจลลาตินในรูปแบบ nano-encapsulation มีความเป็นพิษต่ำสุด (5%) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$ ในความเข้มข้นเดียวกัน คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสารสกัดบัวบกในรูปแบบ nano-encapsulation มีความเป็น พิษต่ำกว่าสารสกัดบัวบกด้วยน้ำที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Kwon et al., 2012)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany
2. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน	BUCHI, Switzerland
3. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง	Eutech instruments, Singapore
4. เครื่องวัดความหนืด	Thermo scientific, Germany
5. เครื่องบดลดขนาด	FRITSCH, Germany
6. Franz-diffusion cell	Perme gear, USA
7. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	Agilent technology, USA
8. เครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนแสง	Vankel, USA
9. ตู้ปลอดเชื้อ	Safe FAST Classic 212, Italy
10. หม้อน้ำแช่แข็งแรงดันไอน้ำ	Meditip, TOMY SX-500, USA
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท	Molecular Devices, USA
12. กล้องจุลทรรศน์	Nikon eclipse, Japan
13. ตู้บ่มภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	New Brunswick, England

3.1.2 สารเคมี

1. 95% ethanol	Merck, Germany
2. Dichloromethane	Merck, Germany
3. Butanol	Merck, Germany
4. Glycerin	SL Quality supply LTD PART, Thailand
5. Sodium alginate	BASF, Germany
6. Carbopol 940	BASF, Germany
7. Poloxamer 188	BASF, Germany
8. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Corning, USA
9. Fetal bovine serum (FBS)	Gibco, USA
10. 0.25% Trypsin-EDTA	Gibco, USA

11. 1% Penicillin-streptomycin Gibco, USA
12. สารสกัดบัวบกจากน้ำ Specialty Natural Products, Thailand

3.1.3 สมุนไพรและสารสกัดที่ใช้ในการศึกษา

1. บัวบก (*Centella asiatica*) จากตลาดของครักษ์ ต.ของครักษ์ อ.ของครักษ์ จ.นครนายก

2. สารสกัดบัวบก ด้วยน้ำเป็นตัวทำละลาย (บริษัทสเปเชียลตี้ เนเชอรัล โปรดักส์)

3.1.4 เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา

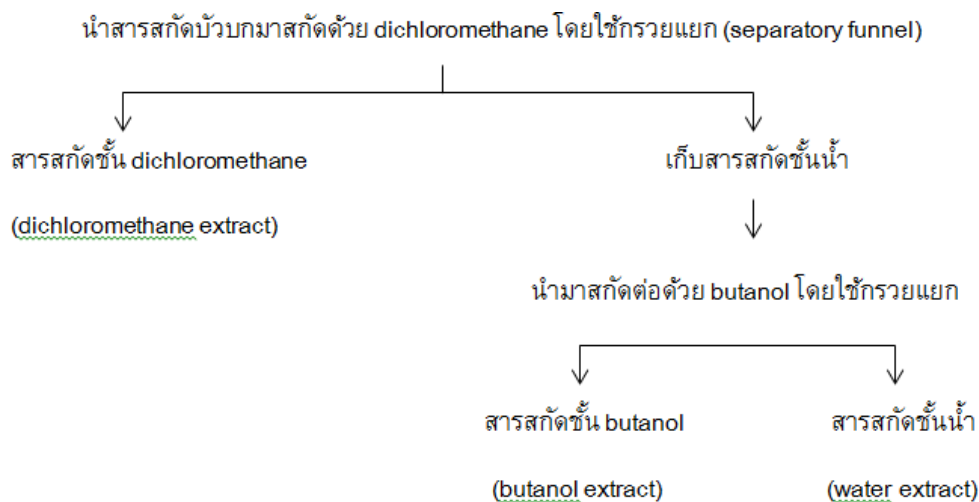
HaCaT (Human epidermal keratinocytes) CLS 300493

3.2. วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารสกัดบัวบก

1. การเตรียมบัวบกแห้ง
 - 1.1 นำบัวบกส่วนเหนือดินมาล้าง
 - 1.2 ชั่งบันทึกน้ำหนักบัวบกสด
 - 1.3 อบด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้หลังอบแห้ง
 - 1.4 นำบัวบกแห้งที่ได้มาบดด้วยเครื่อง cutting mill แรงขนาดรูเปิด 2 มิลลิเมตร
 - 1.5 ชั่งน้ำหนักบัวบกแห้งที่ทำการบดแล้วบันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้
2. การสกัดบัวบกด้วยวิธีการหมัก (Maceration)
 - 2.1 นำผงบัวบกแห้งน้ำหนัก 450 กรัม มาใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 3 ลิตร
 - 2.2 เติม 95% ethanol ปริมาตร 2 ลิตร หมักเป็นเวลา 3 วัน
 - 2.3 ทำการกรองสารละลาย (filtrate) ออกจากกากบัวบกด้วยกรวยกรอง (funnel)
 - 2.4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator อุณหภูมิ 60° C และระเหยแห้งบน water bath ตามลำดับ
 - 2.5 นำกากบัวบกไปทำการหมักซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเริ่มทำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2.2-2.4
 - 2.6 นำสารสกัดบัวบกที่ได้จากการหมักทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน และบันทึกน้ำหนัก
 - 2.7 คำนวณหาร้อยละโดยผลผลิต (yield)

3.2.2 การแยกสารสกัดบวบ



1. ละลายสารสกัดบวบจากข้อ 3.2.1 ปริมาณ 1 กรัม ด้วย dichloromethane 150 มิลลิลิตร
2. เทสารละลายลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า 1 นาทีแล้วหยุดพัก 3 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง รอจนแยกออกเป็น 2 ชั้น
3. ไขเอาสารสกัดบวบในชั้น dichloromethane และสกัดบวบในชั้นน้ำ ที่แยกกันเป็น 2 ชั้นออก โดยต้องเปิดฝาไว้ในขณะที่ไข
4. นำสารสกัดบวบในชั้น dichloromethane ระเหยในตู้ดูดควันจนแห้งสนิทและบันทึกน้ำหนักที่ได้
5. นำสารสกัดบวบชั้นน้ำเติมลงไปในการแยกอันใหม่ เติม butanol ลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า 1 นาทีแล้วหยุดพัก 3 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง รอจนแยกออกเป็น 2 ชั้น
6. ไขเอาสารสกัดบวบในชั้นน้ำและสกัดบวบในชั้น butanol ที่แยกกันเป็น 2 ชั้นออก โดยต้องเปิดฝาไว้ในขณะที่ไข
7. นำสารสกัดบวบในชั้นน้ำและสกัดบวบในชั้น butanol ระเหยบน water bath ในตู้ดูดควันจนแห้งสนิทและบันทึกน้ำหนักที่ได้

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางสมรรถนะสูง (High performance thin Layer chromatography, HP-TLC)

วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดบัวบกด้วยเทคนิค HP-TLC

1. ละลายตัวอย่าง สารสกัดบัวบกและสารมาตรฐาน asiaticoside ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ด้วย methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. Spot ตัวอย่างและสารสกัดบัวบกลงบน TLC silica gel 60 F254 Glass plates ขนาด 20x10 เซนติเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และทำการ spot สารมาตรฐานปริมาณ 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 และ 32 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง CAMAG Automatic TLC Sampler ขนาดแบน 0.6 เซนติเมตร เว้นระยะจากปลายด้านล่าง 1 เซนติเมตร และเว้นระยะด้านข้างแผ่นทั้งสองด้านๆ ละ 1.5 เซนติเมตร

3. วางแผ่น TLC plate ใน chromatographic tank โดยใช้ mobile phase เป็น chloroform: methanol: water (15:7:1 v/v) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ 8 เซนติเมตร

4. สังเกตลักษณะของสารที่แยกได้ในโครมาโทแกรม โดยการตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร สเปรย์ด้วยน้ำยาตรวจสอบ anisaldehyde/H₂SO₄

5. ให้ความร้อนที่ 100-105° C เป็นระยะเวลา 5-10 นาที และนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และแสงธรรมชาติ บันทึกภาพที่ได้

6. สแกนด้วยเครื่อง TLC Scanner บันทึกผลและคำนวณหาค่า R_f

วิธีคำนวณหาค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

วิธีการเตรียมน้ำยาพ่น

ผสม anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร ใน glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม methanol 85 มิลลิลิตร และเติม concentrated sulphuric acid 5 มิลลิลิตร (van Der Watt & Pretorius, 2001)

3.2.4 การเตรียมตำรับเซรัมจากบัวบก

เตรียมตำรับเซรัมดังสูตรในตารางที่ 1

1. แบ่งน้ำออกเป็น 3 ส่วน เริ่มจากส่วนที่ 1 ลดอุณหภูมิด้วยการแช่เย็นแล้วละลาย poloxamer 188 หรือเพิ่มอุณหภูมิด้วยการให้ความร้อนแล้วละลาย sodium alginate หรือละลาย carbopol 940

2. นำน้ำส่วนที่ 2 ผสมลงไปกับ propylene glycol, glycerine, Tween 80 และ vitamin E acetate น้ำส่วนที่ 1 และ ส่วนที่ 2 ผสมกัน

3. ละลายสารสกัดบัวบกด้วย alcohol แล้วผสมลงไป ในสารละลายผสมของส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2

4. ผสมน้ำส่วนที่ 3 โดยละลาย sodium citrate, citric acid, methyl paraben และ disodium EDTA ในตำรับที่ใช้ carbopol 940 ปรับความเป็นด่างให้แก่ตำรับด้วย 10% triethanolamine หลังจากเติมน้ำส่วนที่ 3 แล้ว

พัฒนาตำรับโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ poloxamer 188 ที่ความเข้มข้น 2.5-7.5% ประเภทต่างๆ ของสารสกัดบัวบก และความเข้มข้นของสารสกัดบัวบกที่ความเข้มข้น 5-10%

ตาราง 1 แสดงส่วนประกอบของเซรัมสารสกัดบัวบก

ส่วนประกอบ	%w/w	หน้าที่ในตำรับ
Water	q.s. to 100%	Vehicle
Poloxamer 188/ sodium alginate/ carbopol 940	0.25-0.75	Gelling agent
<i>Centella asiatica</i> extract (crude extraction or butanol extraction)	5-10	Active ingredient
Propylene glycol	3.00	Humectant
Glycerin	3.00	Humectant

ตาราง 1 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	%w/w	หน้าที่ในตำรับ
Tween 80	0.30	Emulsifier
Vitamin E acetate	0.30	Antioxidant
Disodium EDTA	0.05	Chelating agent
Citric acid	0.06	Buffering agent
Methylparaben	0.10	Preservative
Sodium citrate	0.24	Buffering agent
95% ethanol	5.00	Viscosity decreasing agent

ที่มา (Han et al., 2015)

3.2.5 การศึกษาสมบัติทางเคมี

วัดความเป็นกรด-ด่างของเซรั่มสารสกัดด้วย pH meter ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.2.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

สังเกตการแยกชั้นและวัดความหนืดด้วย Rheometer ด้วยหัวแบบ plate and plate geometry กำหนด shear rate ที่ 0.1-100/sec โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 3 มิลลิลิตร ต่อครั้ง วัดผล 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง ประเมินพฤติกรรมการไหลและความหนืดจากกราฟ shear stress กับ shear rate และกราฟ viscosity กับ shear rate

3.2.7 การศึกษาเสถียรภาพ

ศึกษาเสถียรภาพด้วยวิธี heating-cooling cycle จำนวน 6 วัฏจักร โดยเก็บที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 วัฏจักร ทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีในทุก 2 วัฏจักร

3.2.8 การปลดปล่อยสารสกัด

ศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดด้วยวิธี Franz diffusion cell โดยใช้ cellulose acetate membrane และส่วน receptor ที่บรรจุ phosphate buffer pH 5.5 ตั้ง water bath ที่ อุณหภูมิ 37 °C±0.5 °C และใส่ตัวอย่างลงไป donor ปริมาณ 0.3 กรัม เก็บตัวอย่างสารละลาย

ใน receptor ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แบบเติมทดแทน ที่ช่วงเวลา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.2.9 การศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดบัวบกทางผิวหนัง

ศึกษาการซึมผ่านของสารสกัดบัวบกทางผิวหนังด้วย Franz diffusion cell โดยใช้หนังลูกหมูตายแรกเกิด และส่วน receptor ที่บรรจุ phosphate buffer pH 7.4 ตั้ง water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C และใส่ตัวอย่างลงไป donor ปริมาณ 0.3 กรัม เก็บตัวอย่างสารละลายใน receptor ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ช่วงเวลา 10 นาที ถึง 2 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ HPTLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.2.10 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและทดสอบ คือ HaCaT (human epidermal keratinocyte)

1. ละลายเซลล์เพาะเลี้ยงที่แช่แข็งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำความสะอาด vial ด้วย 70% ethanol

2. เปลี่ยนถ่าย cell suspension ลงใน centrifuge tube ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เปลี่ยนถ่ายส่วน supernatant ออก ใช้รีแคะ vial

3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) กับ 1% penicillin และ streptomycin ลงใน centrifuge tube

4. เตรียม T-flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% FBS กับ 1% penicillin และ streptomycin

5. เปลี่ยนถ่าย cell suspension ใส่ลงใน T-flask ที่เตรียมไว้ บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใหม่หลังจากบ่มได้ 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ทุก 48 ชั่วโมงก่อนทำการ subculture/passaging เมื่อมีความหนาแน่นของเซลล์ 70-80% ของพื้นที่ผิวภาชนะ

การ sub culture/passaging

1. เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS (phosphate buffer saline) ปริมาตร 5 ml และทำการเปลี่ยนถ่ายออก เติม Trypsin-EDTA 0.25% ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-5 นาที

2. ส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะของเซลล์

3. เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ลงไป 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดกระบวนการ Trypsinization

4. เตรียม T-flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% FBS กับ 1% penicillin และ streptomycin

5. เปลี่ยนถ่าย cell suspension ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ใส่ลงใน T-flask ที่เตรียมไว้ บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C

การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

1. หลังจากกระบวนการ trypsinization แล้ว ทำการเปลี่ยนถ่าย cell suspension ลงใน eppendorf

2. เตรียม trypan blue 2 หยดๆ ละ 10 ไมโครลิตร แยกกันบนแผ่นพาราฟิล์ม

3. ทำการเจือจาง 4 เท่า โดยเปลี่ยนถ่าย cell suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นพาราฟิล์มผสมกับ trypan blue จำนวน 2 หยดๆ ละ 10 ไมโครลิตร ที่ได้ทำการเตรียมไว้

4. เปลี่ยนถ่าย trypan blue-cell suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน haemocytometer แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการนับเซลล์และคำนวณดังสูตรต่อไปนี (Lindee, 2007; Liu et al., 2011; Thibodeaux et al., 1992)

$$\text{ปริมาณเซลล์ (cell/ml)} = \text{ค่าเฉลี่ยของ cell/square} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

3.2.11 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยวิธี MTS assay

1. เปลี่ยนถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณของเซลล์เท่ากับ 5,000 เซลล์ต่อหลุม ลงใน 96 well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS กับ 1% penicillin และ streptomycin บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญและเกาะบนผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง (monolayer)

2. เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็น control บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เปลี่ยนถ่ายสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2-3 ครั้ง เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ลงไปหลุมละ

100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย MTS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท ทำการทดสอบละ 5 ซ้ำ (n = 5)

5. สร้างกราฟร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 หรือค่า IC₅₀

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{A \text{ sample } 490}{A \text{ control } 490} \times 100$$

โดยที่

A sample 490 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทำกรทดสอบกับตัวอย่างที่ 490 นาโนเมตร

A control 490 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่ 490 นาโนเมตร (Malich, Markovic, & Winder, 1997)

3.2.12 การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ด้วยวิธี Scratch assay test

1. เปลี่ยนถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณของเซลล์เท่ากับ 1.2×10^4 เซลล์ต่อหลุมลงใน 24 well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS กับ 1% penicillin และ streptomycin บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญและเกาะบนผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง (monolayer)

2. เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS กับ 1% penicillin และ streptomycin ออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ หลุมละ 500 ไมโครลิตร บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ออก

3. เติมสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ จากการทำการศึกษาก่อนหน้านี้ หลุมละ 500 ไมโครลิตร บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเปลี่ยนถ่ายสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก

4. ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี FBS ใช้ SPLScar™ Scratcher ขีดตรงกลางของแต่ละหลุมและล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี FBS

5. ถ่ายภาพรอยขีดตรงกลางของแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipse)

6. บ่มใน 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และถ่ายภาพที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

7. วัดพื้นที่ระยะห่างของเซลล์ด้วยโปรแกรม CellSens Standard

8. ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (relative migration) (Fronza, Heinzmann, Hamburger, Laufer, & Merfort, 2009)

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์} = \frac{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก} - \text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันถัดไป}}{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก}} \times 100$$



บทที่ 4

ผลการดำเนินวิจัย

การพัฒนาเซรัมจากสารสกัดบัวบกเพื่อใช้รักษาแผลเป็นชนิดลึกนูน (depressed scar) ได้ทำการตั้งตำรับและพัฒนาตำรับเซรัมพื้นฐานที่มีลักษณะทางกายภาพใส ไม่แยกชั้นและมีเสถียรภาพที่ดีเพื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับเซรัมผสมสารสกัดบัวบก โดยใช้สารสกัดบัวบกที่มีการแยกสารสกัดเพื่อแยกสารอื่นที่ไม่ใช่กลุ่มสารออกฤทธิ์ออกจากสารสกัดบัวบก ซึ่งสารกลุ่มนี้อาจจะมีผลต่อเสถียรภาพและประสิทธิภาพของตำรับและเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของตำรับเซรัมผสมสารสกัดบัวบกจึงทำการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดและการซึมผ่านของสารสกัด ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ของตำรับสารสกัดบัวบก

4.1 ผลการสกัดและแยกสารสกัดบัวบก

การแยกสารสกัดบัวบกจากบริษัท (commercial extract) ใช้ตัวทำละลาย (solvent) 3 ชนิด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน น้ำและบิวทานอล จากผลการทดลองพบว่าร้อยละปริมาณสารสกัด (yield) ของสารสกัดบัวบกที่แยกจากน้ำมีร้อยละปริมาณสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลและสารสกัดจากการแยกด้วยไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ (ตาราง 2) สารสกัดบัวบกมีสารที่ออกฤทธิ์ในการรักษาแผลเป็น ได้แก่ asiaticoside และสารในกลุ่ม glycoside อื่นๆ (Morisset et al., 1987) เมื่อผ่านการแยกสกัดควรอยู่ในชั้นของตัวทำละลายบิวทานอล เนื่องด้วยหลักการ like dissolve like ที่กล่าวว่าสารที่มีสภาพขั้วเหมือนกันจะถูกดูดมาอยู่ด้วยกัน (Conover, 2009) อะเซียติโคไซด์และสารในกลุ่ม glycoside เป็นสารกลุ่มกึ่งมีขั้ว (semipolar substance) จึงถูกแยกสกัดไปอยู่ในชั้นของบิวทานอลที่มีขั้วมากกว่าไดคลอโรมีเทน แต่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ ในขณะที่คลอโรฟิลล์จะไปอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทน เนื่องด้วยความเป็นสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar substance) (Wasielewski et al., 1990) ทำให้สังเกตพบชั้นไดคลอโรมีเทนเป็นสีเขียวเมื่อผ่านการแยกสกัด

ตาราง 2 แสดงร้อยละปริมาณสารสกัดของสารสกัดบัวบกเมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง

ชั้นของตัวละลาย	ร้อยละปริมาณสารสกัด (%)	
	สารสกัดบัวบกจาก	สารสกัดบัวบกจากบริษัท
	ห้องปฏิบัติการ	
Water	41.62±0.19	81.15±0.22
Butanol	8.80±0.06	12.21±0.12
Dichloromethane	23.12±0.12	1.41±0.08

4.2 ผลการพัฒนารับและเสถียรภาพของเซรั่มจากสารสกัดบัวบก

การพัฒนารับเซรั่มได้ทำการศึกษาผลของชนิดพอลิเมอร์ซึ่งเป็นสารให้ความหนืด (gelling agent) โดยศึกษาพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ sodium alginate, poloxamer 188 และ carbopol 940 ตำรับเซรั่มที่มี sodium alginate ในความเข้มข้น 0.25%, 0.5% และ 0.75% โดยน้ำหนัก มีลักษณะทางกายภาพที่ใสและข้นเมื่อความเข้มข้นมากขึ้น แต่มีสีเหลืองเข้มตามปริมาณ sodium alginate ที่มากขึ้น เนื่องจาก sodium alginate ที่นำมาใช้ตั้งตำรับนั้นมีผงสีน้ำตาล และตำรับที่ได้จาก sodium alginate มี pH อยู่ในช่วง 5.5-5.8 (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับเซรั่มที่มี poloxamer 188 เป็นสารเพิ่มความหนืด แม้จะได้ pH ของตำรับใกล้เคียงกับ sodium alginate แต่ตำรับที่ได้จะไม่มีสี ตำรับจะเริ่มข้นเมื่อใส่ poloxamer 188 มากกว่า 0.5% โดยน้ำหนัก (ตาราง 3) เพราะเนื่องจากเมื่อปริมาณ poloxamer 188 มากขึ้นแต่ปริมาณน้ำในตำรับเท่าเดิม จึงเกิดการแย่งจับกับน้ำระหว่าง poloxamer 188 และสารช่วยทางเภสัชกรรมอื่นในตำรับ ได้แก่ สารจำพวกเกลือ และสารให้ความชุ่มชื้น ทำให้เกิดการข้น (Bodratti & Alexandridis, 2018) สำหรับการเตรียมตำรับด้วย carbopol 940 จะได้ตำรับที่มี pH สูงที่สุด (> 7.5) (ตารางที่ 3) เนื่องจาก carbopol 940 เกิดการพองตัวขึ้นกลายเป็นเจลที่ pH เป็นกลางเมื่อเติม triethanolamine โดย carbopol 940 เริ่มจะก่อตัวเป็นเจลที่ pH มากกว่า 5.5 (Islam, Rodríguez-Hornedo, Ciotti, & Ackermann, 2004)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ pH ของตำรับเซรัมจากการเตรียมด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด พบว่า ตำรับเซรัมที่เตรียมจาก sodium alginate และ poloxamer 188 มีค่า pH เหมาะสม เนื่องด้วยมีค่า pH ใกล้เคียงกับผิวหนัง (Wilhelm, Cua, & Maibach, 1991) คือมี pH อยู่ในช่วง 5.5-5.8 แต่ sodium alginate มีสีเหลืองและขุ่น ทำให้ไม่น่าใช้และสีอาจจะไปผสมกับสีของสารสกัดส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพได้ต่อไป ในขณะที่ poloxamer 188 มีลักษณะทางกายภาพที่ดีกว่า คือ ใสและไม่มีสี จึงเหมาะสมนำมาเป็นสารเพิ่มความหนืดของเซรัมจากสารสกัดบัวบกในความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% w/w

มีการศึกษาปริมาณสารช่วยเพิ่มความหนืดที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์เซรัม โดยนำพอลิเมอร์ Carbopol® Ultrez 10 เป็นสารช่วยให้ความหนืดเช่นเดียวกับตำรับเซรัมจากสารสกัดบัวบกที่เตรียมขึ้นในความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% โดยน้ำหนัก พบว่าเซรัมตำรับที่ใช้พอลิเมอร์ Carbopol® Ultrez 10 ในความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนัก ไม่เกิดการแยกชั้นและตกตะกอน และในความเข้มข้น 0.2% โดยน้ำหนัก ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีความหนืด มากกว่าเนื่องจากมีปริมาณ Carbopol® Ultrez 10 ที่มากกว่า และมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.6-7.3 (Nilsuwankosit et al., 2014) ดังนั้นความเข้มข้นของสารเพิ่มความหนืดของตำรับเซรัม จึงส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของตำรับเซรัมได้

ตาราง 3 แสดงผลของตำรับเซรัมพื้นฐานที่เตรียมจากพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของพอลิเมอร์และ		ลักษณะทางกายภาพ		Shear rate (s ⁻¹)		pH
ความเข้มข้น (%)		ความใส	สี	5	100	
Sodium alginate	0.25	ใส	เหลืองอ่อน	1.62±0.22	1.03±0.01	5.75±0.020
	0.50	ขุ่น	เหลืองอ่อน	7.97±0.46	1.58±0.08	5.48±0.015
	0.75	ขุ่น	เหลืองส้ม	9.39±0.87	2.00±0.26	5.42±0.025
Poloxamer 188	0.25	ใสมาก	ไม่มีสี	3.02±0.56	1.12±0.37	5.77±0.011
	0.50	ใสมาก	ไม่มีสี	3.11±0.49	1.16±0.11	5.74±0.010
	0.75	ขุ่น	ขาว	3.24±0.25	1.24±0.25	5.70±0.030
Carbopol 940	0.25	ใส	ขาว	> 19000	> 1500	7.65±0.035
	0.50	ใส	ขาว	> 44000	> 3500	7.62±0.015
	0.75	ใส	ขาว	> 49000	> 3600	7.60±0.040

เมื่อผสมสารสกัดบัวบกจากบริษัท พบว่าตำรับเซรัมที่มีผสม 5%, 7.5% และ 10% โดยน้ำหนัก มีลักษณะทางกายภาพที่มีสีน้ำตาลที่เข้มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสารสกัดมีสีเขียวน้ำตาล (ตาราง 4) เมื่อเปรียบเทียบกับเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัทและ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล (butanol extract) พบว่าเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลมีสีที่อ่อนกว่า เนื่องจากการแยกสารสกัดทำให้สารมีสีถูกแยกสกัดออกมาในชั้นของไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นคนละตัวทำละลายกับชั้นตัวทำละลายสำหรับสารออกฤทธิ์ และเนื่องจากไม่ได้ทำการแยกสกัดสารออกจากสารสกัดในเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ (in-house crude extract) จึงทำให้ตำรับมีสีเขียวน้ำตาลและทึบแสง (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับเซรัมที่ความเข้มข้นและประเภทต่างๆ

ประเภทและความเข้มข้นของสารสกัด	ลักษณะทางกายภาพ	
	ความใส	สี
5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	ใส	น้ำตาล
7.5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	ใส	น้ำตาล
10% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	ใส	น้ำตาล
5% สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล	ใส	น้ำตาลอมเหลือง
5% สารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ	ทึบ	เขียวเข้ม

เมื่อใส่สารสกัดบัวบกลงไปในตัวรับ พบว่าตำรับเซรัมที่มีสารสกัดบัวบกทุกตัวรับมีค่า pH ที่ต่ำลง (ตาราง 5) อยู่ในช่วง 3.9-4.6 อาจส่งผลกระทบต่อผิวหนัง (Wilhelm et al., 1991) และตัวรับเกิดการแปรปรวนของ pH เมื่อทดสอบเสถียรภาพ จึงปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารบัฟเฟอร์ (buffering agent) ได้แก่ sodium citrate และ citric acid เพื่อให้บัฟเฟอร์ในตัวรับมีค่าความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) สูงขึ้น เพราะเมื่อตัวรับเซรัมมีค่าความจุบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ตัวรับเซรัมที่สามารถตรึงค่า pH ไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปมาก (Jørgensen & Mejer, 1977)

(ตาราง 5) ภายหลังจากการปรับเปลี่ยนสารบัพเฟอร์จึงทำให้เซรัมจากสารสกัดบัวบกทุกตัวรับมีค่า pH อยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pH ของผิวหนัง (ตาราง 5) เสถียรภาพของตัวรับเซรัมที่ไม่มีสารสกัดบัวบกและตัวรับเซรัมที่มี 5%, 7.5% และ 10% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท พบว่ามีเสถียรภาพที่ดี เนื่องจากค่า pH ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงและไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อผ่านไป 6 cycles และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดไม่ส่งผลต่อเสถียรภาพ และเมื่อเปรียบเทียบตัวรับเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล และสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ พบว่าตัวรับเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล มีเสถียรภาพที่ดีเทียบเท่ากับตัวรับเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท ยกเว้นเซรัมที่ประกอบด้วย 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ พบเสถียรภาพที่ไม่ดี เกิดการแยกชั้นตั้งแต่ 4 cycles อาจเนื่องมาจาก 5% โดยน้ำหนักสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ มีสารที่ส่งผลต่อเสถียรภาพของเซรัม และทำการแยกสกัดสารในชั้นไดคลอโรมีเทนเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดบัวบกจากบริษัทกับสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ พบว่าสารในชั้นไดคลอโรมีเทนของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการมีปริมาณมากกว่า ซึ่งในสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนมีสารสีเขียว คือ คลอโรฟิลล์ ออกมากับไดคลอโรมีเทนด้วย ดังนั้นสารในกลุ่มนี้จึงน่าจะส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพทางกายภาพของตัวรับสมมุติฐานยืนยันด้วยตัวรับผสม 5% สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลที่สกัดสารในกลุ่มนี้ออก ที่ไม่เกิดเสถียรภาพทางกายภาพ (ตาราง 5)

ความหนืดของตัวรับเซรัมที่ไม่มีสารสกัดและตัวรับเซรัมที่มีสารสกัดต่างกัน พบว่าการเติมสารสกัดบัวบกทำให้ตัวรับมีความหนืดขึ้นเล็กน้อย (ตาราง 6) และเมื่อเปรียบเทียบความหนืดของเซรัมที่มี 5%, 7.5% และ 10% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท พบว่าไม่ต่างกัน ความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีผลต่อความหนืด เมื่อเปรียบเทียบความหนืดของตัวรับเซรัมที่เติม 5% สารสกัดบัวบกเท่ากัน ระหว่างสารสกัดบัวบกจากบริษัท สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลและสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการก็ได้ความหนืดไม่แตกต่างกัน (ตาราง 6) มีการศึกษาผลของสารสกัดต่อความหนืดของตัวรับครีมที่ผสมสารสกัดจากพืช ได้แก่ ชะเอมเทศ เปะก๊วย บัวหลวง พบว่าความหนืดของตัวรับลดลงเมื่อใส่สารสกัดจากพืช เป็นเพราะสารสกัดทำการเจือจางด้วยน้ำทำให้เป็นการเพิ่มน้ำในวฏภาคน้ำของครีม จึงส่งผลให้ความหนืดของตัวรับลดลง (Di Mambro & Fonseca, 2005) ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานทดลองนี้ซึ่งเป็นตัวรับเซรัมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อนำตำรับเซรัมมาศึกษาเสถียรภาพทางกายภาพ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความหนืดกับตำรับที่ไม่เติมสารสกัดบัวบก (ตาราง 6) เมื่อเติมสารสกัดประเภทต่างๆ ลงไปในตำรับเซรัม พบเพียงตำรับผสมสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการที่มีความหนืดลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทดสอบด้วย shear rate 5/s เนื่องด้วยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดการแยกชั้นของตำรับ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ เมื่อผ่านการทดสอบเสถียรภาพไป 4 cycles (ตาราง 5) ทำให้เกิดการแยกตัวของสารเพิ่มความหนืด (gelling agent) ออกมาจากสารอื่นในตำรับทำให้ความหนืดลดลงอย่างชัดเจน

ตาราง 5 แสดงผลของสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเซรัมจากสารสกัดบัวบก

Formula	Appearance				pH (Before)				pH (After)*			
	initial	2	4	6	initial	2	4	6	initial	2	4	6
		cycle	cycle	cycle		Cycle	Cycle	Cycle		Cycle	Cycle	Cycle
Serum without <i>Centella asiatica</i> extract	-	-	-	-	5.53±0.03	5.60±0.02	5.78±0.04	5.85±0.03	5.94±0.04	5.98±0.02	6.03±0.02	6.12±0.01
5% commercial extract	-	-	-	-	4.45±0.03	4.37±0.03	4.82±0.04	4.79±0.03	5.70±0.01	5.63±0.02	5.54±0.01	5.58±0.04
7.5% commercial extract	-	-	-	-	3.95±0.01	3.84±0.04	4.28±0.02	4.34±0.01	5.52±0.02	5.57±0.03	5.49±0.02	5.59±0.02
10% commercial extract	-	-	-	-	4.14±0.01	4.07±0.01	4.49±0.02	4.54±0.01	5.45±0.04	5.57±0.02	5.59±0.04	5.70±0.03
5% butanol extract	-	-	-	-	4.08±0.01	4.05±0.03	4.49±0.01	4.51±0.02	5.04±0.04	5.08±0.01	5.14±0.03	5.18±0.03
5% in-house crude extract	-	-	+	+	4.53±0.02	4.51±0.01	4.53±0.01	4.20±0.02	5.53±0.03	5.64±0.04	5.58±0.03	5.40±0.02

หมายเหตุ: - คือ ไม่เกิดการแยกชั้น; + คือ เกิดการแยกชั้น

Before คือ ก่อนการปรับเปลี่ยนสารบัพเฟอร์; After คือ หลังจากการปรับเปลี่ยนสารบัพเฟอร์

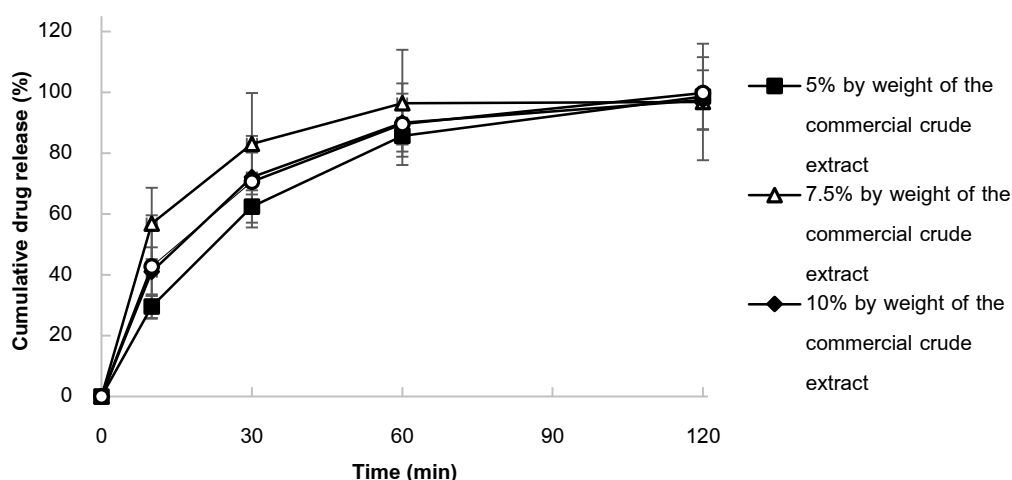
ตาราง 6 แสดงผลเสถียรภาพของตำรับเซรั่มจากสารสกัดบัวบก

Shear rate (s ⁻¹)	Cycle	Serum without <i>Centella asiatica</i> extract	Viscosity (CPs)				
			5% commerci al extract	7.5% commercial extract	10% commercial extract	5% butanol extract	5% in-house crude extract
5	initial	3.11±0.49	5.09±0.17	5.12±0.35	5.80±0.41	4.68±0.24	4.69±0.28
	2 cycles	3.14±0.67	5.66±0.45	5.67±0.78	6.80±0.31	3.72±0.54	2.59±0.29
	4 cycles	3.41±0.16	5.42±0.51	3.34±0.44	5.78±0.54	3.08±0.48	1.41±0.13
	6 cycles	3.49±0.52	5.57±0.69	3.35±0.16	5.55±0.26	3.38±0.13	1.25±0.38
100	initial	1.16±0.11	1.54±0.12	1.74±0.17	1.81±0.15	1.06±0.05	1.23±0.13
	2 cycles	1.07±0.08	2.07±0.10	1.44±0.07	1.41±0.06	1.36±0.05	1.42±0.09
	4 cycles	1.06±0.17	1.45±0.08	1.68±0.14	1.45±0.09	1.14±0.11	1.18±0.08
	6 cycles	1.10±0.05	1.36±0.03	1.68±0.05	1.94±0.12	1.17±0.09	1.13±0.09

4.3 ผลการปลดปล่อยและการซึมผ่านของเซรัมจากสารสกัดบัวบก

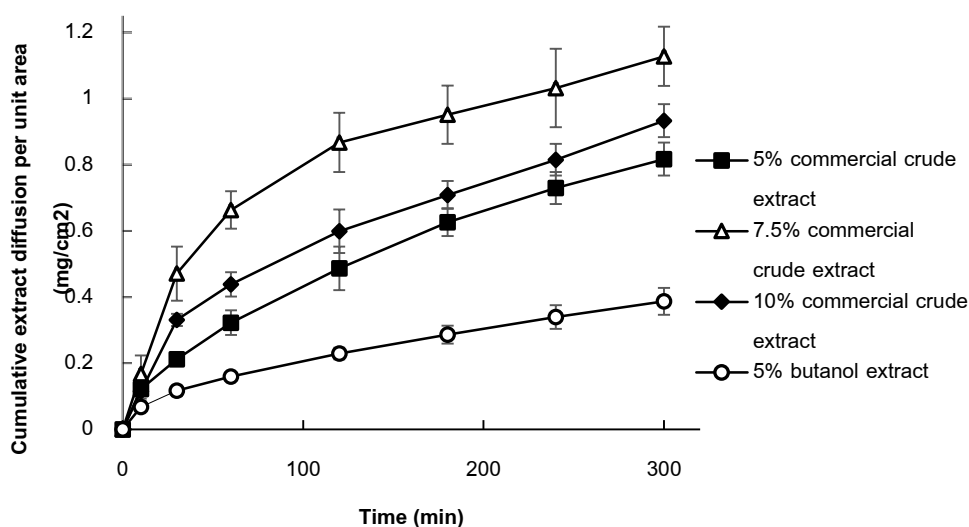
จากการศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดโดยเปรียบเทียบตำรับที่ผสมสารสกัดบัวบกประเภทต่างๆ พบว่าการปลดปล่อยของสารสกัดที่เวลา 10-60 นาที ของเซรัมที่ประกอบด้วย 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัทปลดปล่อยได้เร็วกว่าสารสกัดชนิดเดียวกันที่ประกอบด้วยสารสกัด 10% และ 5% โดยน้ำหนัก (ภาพประกอบ 8) ตามหลักการแพร่การปลดปล่อยสารสกัดจากตำรับที่มีความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่าจะเกิดการปลดปล่อยสารสกัดได้เร็วกว่า ผลการทดลองนี้ต่างจากงานวิจัยที่ทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากแผ่นแปะสมุนไพรบัวบกด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าแผ่นแปะสมุนไพรบัวบกมีการปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside หมดที่เวลา 135 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ และตำรับที่มีสารสกัด 1% ปลดปล่อยได้เร็วกว่าตำรับที่มีสารสกัด 2% ซึ่งหากมีการเติมสารสกัดสมุนไพรเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์แผ่นแปะสมุนไพรจะมีการปลดปล่อยที่นานขึ้น (Prasertwaree, Mingmuang, Thongdee, Onthong, & Chansuwanich) ทั้งนี้อาจเพราะตำรับเซรัมที่ประกอบด้วย 10% โดยน้ำหนักของ crude extract มีขีดจำกัดการละลายใน phosphate buffer medium จึงทำให้มีการปลดปล่อยสารสกัดที่ช้ากว่าในเซรัมที่มี 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท

เมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยสารสกัดบัวบกที่เวลา 10-60 นาที ระหว่างเซรัมบัวบกที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล กับ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท พบว่าตำรับที่ประกอบด้วย 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล ปลดปล่อยได้เร็วกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และทุกตำรับเกิดการปลดปล่อยสารสกัดอย่างสมบูรณ์หลังจากเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 8)

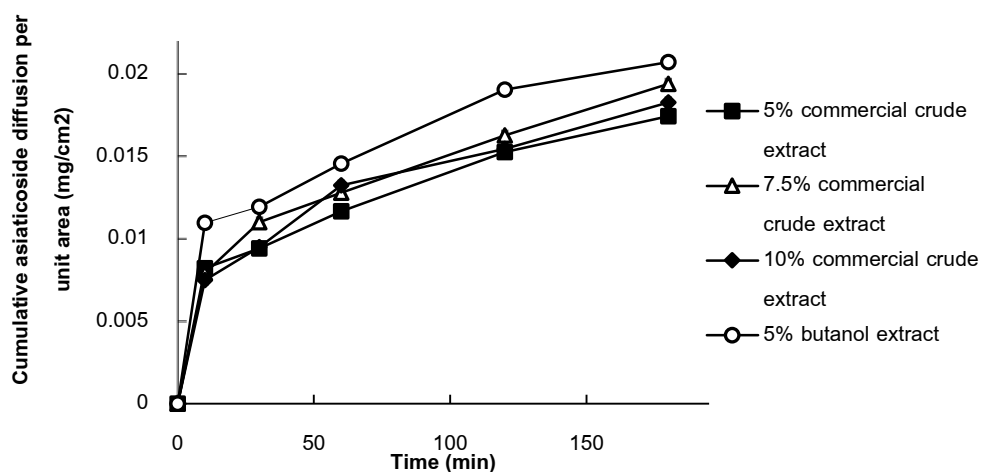


ภาพประกอบ 8 แสดงแสดงการปลดปล่อยสารสกัดของเซรัมที่ประกอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิด

การซึมผ่านของสารสกัดที่เวลา 10-300 นาที ของเซรัมที่วิเคราะห์ด้วยวิธี UV-spectrophotometry พบว่า เซรัมที่ประกอบด้วย 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัท สามารถซึมผ่านได้เร็วกว่าเซรัมที่ประกอบด้วยสารสกัด 10% และ 5% ตามลำดับ สาเหตุที่ตำรับเซรัมที่ประกอบไปด้วย 10% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัท มีการซึมผ่านน้อยกว่าตำรับเซรัมที่มี 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัท อาจเพราะขีดการละลายใน phosphate buffer medium เช่นเดียวกับการทดสอบการปลดปล่อยสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านของสารสกัดเซรัมที่มีส่วนประกอบของ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัทกับ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล พบว่าตำรับที่ประกอบด้วย 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัท ซึมผ่านได้เร็วกว่า (ภาพประกอบ 9) เนื่องด้วยผิวหนังลูกหมูตายแรกคลอดมีความชอบไขมันมากกว่าแผ่น cellulose membrane ทำให้สารสกัดที่ไม่ผ่านการแยกสกัดจะมีสารไม่มีขั้วอยู่มากกว่าสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลที่ซึมผ่านมาได้ อาจเป็นสารจำพวกไม่มีขั้ว จึงได้ทำการทดสอบปริมาณสารออกฤทธิ์จำพวก asiaticoside ที่ซึมผ่านออกมาด้วยเทคนิค HPTLC เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ซึมผ่านระหว่างตำรับที่ประกอบด้วย 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัทกับ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล พบว่าแม้ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลจะมีการซึมผ่านของสารสกัดได้ไม่ดีแต่เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ซึมผ่านพบมีแนวโน้มสูงที่สุด เนื่องด้วยสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลมีปริมาณสารออกฤทธิ์สูงที่สุด (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 9 แสดงการซึมผ่านของสารสกัดจากตำรับเซรัมที่ผสมสารสกัดบวบ



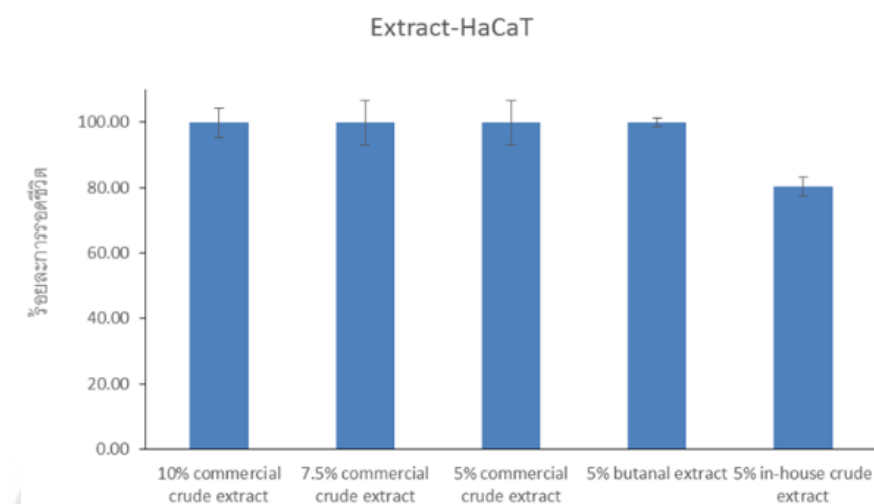
ภาพประกอบ 10 แสดงการซึมผ่านของ asiaticoside จากตำรับเซรัมที่ผสมสารสกัดบัวบก

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

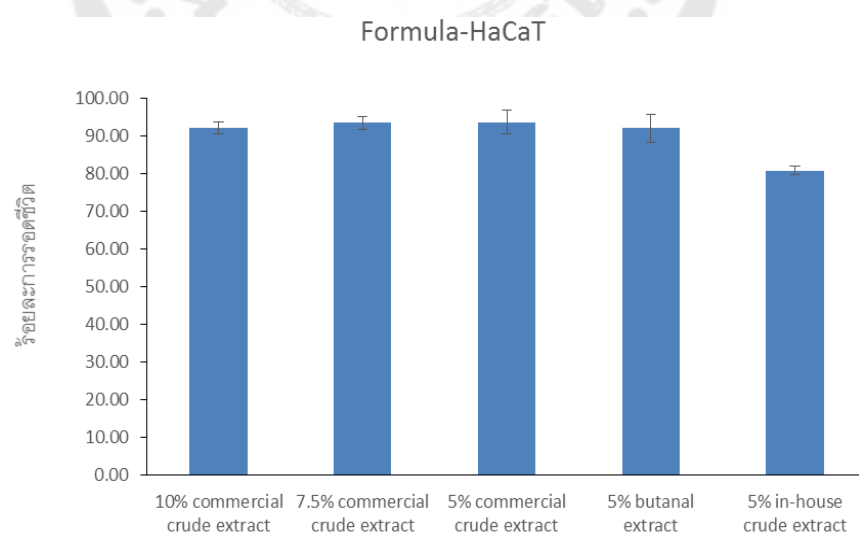
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้ human keratinocyte (HaCaT) จะพิจารณาจากค่าร้อยละการรอดชีวิต พบว่าผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ของสารสกัด 10%, 7.5% และ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท รวมถึงสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลมีค่าร้อยละการรอดชีวิต มากกว่า 90% แต่สารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการมีค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 90% สำหรับผลความเป็นพิษต่อเซลล์ human keratinocyte ของตำรับ (ที่ผ่านการเจือจาง 1000 เท่า) ที่ประกอบด้วย 10%, 7.5% และ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากบริษัท รวมถึง 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลมีค่าร้อยละการรอดชีวิตมากกว่า 90% แต่ตำรับที่ประกอบด้วย 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการ มีค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 90% เช่นเดียวกันผลการทดสอบสารสกัด (ภาพประกอบ 11) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้สารสกัดบัวบกจากเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.195-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบว่าสารสกัดบัวบกจากเมทานอลทุกความเข้มข้นมีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 90% (Azis et al., 2017) เหตุผลที่สารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการและตำรับที่มีสารสกัดดังกล่าว ที่มีค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 90% อาจเป็นเพราะสารสกัดบัวบกจากห้องปฏิบัติการอาจมีสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำไป scratch assay test ซึ่งเป็นการทดลองต่อไป และจากผลการทดสอบสารสกัดและตำรับอื่นที่ให้ผลการรอด

ชีวิตของเซลล์ HaCaT มากกว่า 90% จึงสรุปได้ว่าไม่มีพิษต่อเซลล์ HaCaT และสามารถนำไปทดสอบ scratch assay test ได้ต่อไป

(ก)



(ข)



ภาพประกอบ 11 แสดงกราฟร้อยละการรอดชีวิตของสารสกัดต่อเซลล์ human keratinocyte (ก) และร้อยละการรอดชีวิตของตำรับที่มีสารสกัดต่อเซลล์ human keratinocyte (ข)

4.5 ผลการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration)

การศึกษ้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์จะพิจารณาจากค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าสารสกัด 10%, 7.5% และ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบกจากบริษัท ทำให้เซลล์ HaCaT ไม่มีการเคลื่อนที่เข้าหากันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงแต่สารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล ทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้าหากันมากกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 7) และเมื่อศึกษาตำรับเซรัมที่เจือจางและมีสารสกัด 10%, 7.5% และ 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบกจากบริษัท เซลล์ก็ไม่มีการเคลื่อนที่เข้าหากันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน อาจเนื่องจากปริมาณร้อยละสารสกัดมีสารอื่นๆ ที่อาจส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญและไม่อาจสามารถเคลื่อนที่เข้ามาหากันได้ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า มีการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกับการทดลองนี้ ที่ทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT โดยใช้สารสกัดบวบกจาก เมทานอลที่ความเข้มข้น 0.2, 6 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่เวลา 40 ชั่วโมง สารสกัดบวบกจากเมทานอลทุกความเข้มข้นทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ มากกว่า PDGF (Platelet-derived growth factor) ซึ่งเป็น positive control และอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็น negative control (Azis et al., 2017) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ต่ำกว่าในการทดลองนี้มาก จึงให้ผลการทดลองต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่เข้าหากันของตำรับเซรัมที่ประกอบด้วยสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล เกิดการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ HaCaT มากกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกันกับสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล เนื่องจากได้มีการแยกสารอื่นๆ ที่อาจส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญและไม่อาจสามารถเคลื่อนที่เข้ามาหากันได้ออกแล้ว และพบว่าการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ที่มีตำรับเซรัมผสมสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล เคลื่อนที่เข้าหากันได้มากกว่าสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลเปล่าที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 7) อาจเพราะสารอื่นในตำรับเซรัมช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ร่วมกับสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลด้วย

ตาราง 7 แสดงผลการศึกษาคีษัาอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ของสารสกัดบัวบกและตำรับที่มีสารสกัดบัวบกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

Test solution		ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์	
		24 h.	48 h.
สารสกัด	5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	7.5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	10% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	5% สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล	61.55±9.14	100±0.00*
ตำรับเซรัมที่มีสารสกัด	5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	7.5% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	10% สารสกัดบัวบกจากบริษัท	< 0.01	< 0.01
	5% สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล	66.13±4.49	100±0.00*
กลุ่มควบคุม	Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	46.84±2.69	100±0.00*

หมายเหตุ: * คือ ไม่มีพื้นที่ระหว่างเซลล์เนื่องจากเซลล์ได้เคลื่อนที่เข้ามาปิดสนิทกันแล้ว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การตั้งตำรับและพัฒนาตำรับเซรัมพื้นฐานโดยการใช้ poloxamer 188 ทำให้ตำรับมีลักษณะ ทางกายภาพที่ใส ไม่มีสีและได้สมบัติทางกายภาพดีกว่าการใช้ sodium alginate และ carbopol 940 การตั้งตำรับโดยใช้สารสกัดบวบจากบริษัท (commercial extract), สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล (butanol extract) และสารสกัดบวบจากห้องปฏิบัติการ (in-house crude extract) พบว่าตำรับเซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากห้องปฏิบัติการมีเสถียรภาพไม่ดีเพราะเกิดการแยกชั้นตั้งแต่ 4 cycles และทำให้ความหนืดเปลี่ยนแปลงเมื่อศึกษาเสถียรภาพ อาจเนื่องมาจากมีสารกลุ่มไม่มีขั้วจำพวกคลอโรฟิลล์ที่อาจจะส่งผลต่อเสถียรภาพของเซรัม แต่ตำรับเซรัมผสมสารสกัดบวบอื่นในความเข้มข้น 5-10% มีเสถียรภาพทางกายภาพดีเนื่องจากค่า pH และความหนืดไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงและไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อผ่านไป 6 cycles และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดไม่ส่งผลต่อเสถียรภาพ การปรับเปลี่ยน buffering agent ในตำรับทำให้ได้ตำรับที่มี pH อยู่ในช่วง 5-6 และมีเสถียรภาพที่ดี การปลดปล่อยและการซึมผ่านของสารสกัดพบว่าเซรัมที่มี 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัทปลดปล่อยและซึมผ่านได้มากที่สุดเพราะว่ามีความเข้มข้นมาก แต่เซรัมที่มี 10% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัทมีการซึมผ่านน้อยกว่าเซรัมที่มี 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดบวบจากบริษัท อาจเพราะขีดการละลายใน phosphate buffer medium เมื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านสารออกฤทธิ์ พบว่าเซรัมที่มีสารสกัด 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล พบปริมาณสารออกฤทธิ์มากที่สุด การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบว่ามีเพียงเซรัมผสมสารสกัดและสารสกัดบวบจากห้องปฏิบัติการที่พบการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 90% อาจเป็นเพราะมีสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์พบว่าแค่เฉพาะเซรัมผสมสารสกัดและสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอลที่ทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมและเซรัมดังกล่าวทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้มากกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง อาจเพราะสารอื่นในตำรับเซรัมช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ร่วมกับสารสกัดสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล การพัฒนาเซรัมจากสารสกัดบวบโดยการเปลี่ยนสารช่วยทางเภสัชกรรมทำให้ได้ตำรับเซรัมที่มีเสถียรภาพ และประเภทของสารสกัดบวบมีผลต่อเสถียรภาพของตำรับ การสกัดสารอื่นที่ไม่ใช่สารออกฤทธิ์ออกจากสารสกัดบวบส่งผลดีต่อการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์และเซรัมช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ดีกว่าสารสกัดบวบเดี่ยว ดังนั้นตำรับเซรัมจากสารสกัด

จากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล จึงเป็นตำรับที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาทางคลินิกต่อไปเพื่อ
ฤทธิ์ในการรักษาแผลเป็นชนิดบ่มลึกจากการเกิดสิว

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ควรจะเพิ่มช่วงเวลาในการถ่ายภาพเก็บข้อมูลที่
เวลา 36 ชั่วโมง
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ควรจะเพิ่มการทดสอบกับ positive control
3. ควรตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์จากสารสกัดบ้วนกก่อนนำมาเตรียมตำรับ
เซรั่มจากสารสกัดบ้วนก



ภาคผนวก





ภาคผนวก ก

ผลการเคลื่อนที่ของเซลล์

ผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)

ก (1)



ก (2)



ก (3)



ข (1)



ข (2)



ข (3)



ค (1)



ค (2)



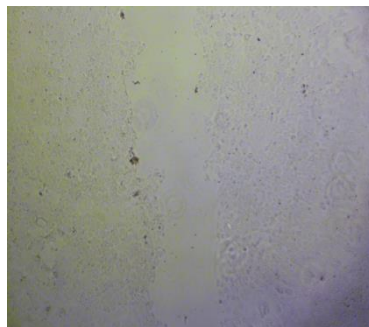
ค (3)



ง (1)



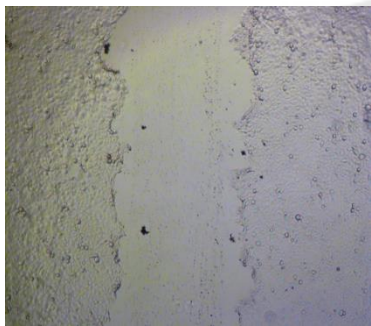
ง (2)



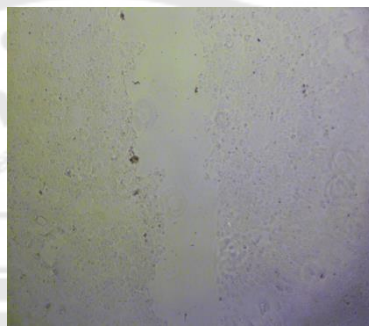
ง (3)



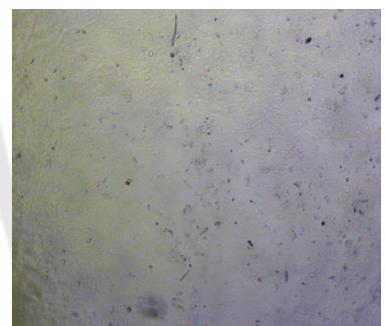
จ (1)



จ (2)



จ (3)



ภาพประกอบ 12 แสดงผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)

ก = 5% สารสกัดจากพืช

ข = 7.5% สารสกัดจากพืช

ค = 10% สารสกัดจากพืช

ง = 5% สารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล

จ = กลุ่มควบคุม

1 = เริ่มต้น; 2 = 24 ชั่วโมง; 3 = 48 ชั่วโมง

ผลของเซรัมที่มีสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)

ก (1)



ก (2)



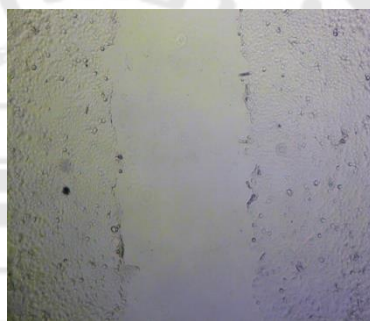
ก (3)



ข (1)



ข (2)



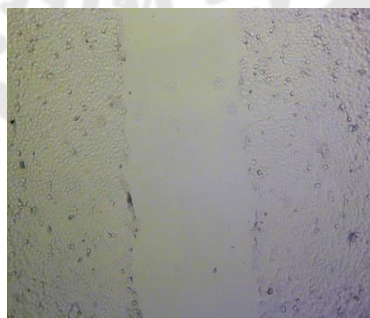
ข (3)



ค (1)



ค (2)



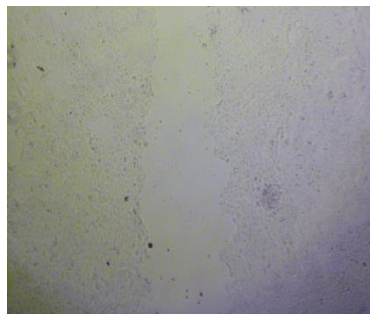
ค (3)



ง (1)



ง (2)



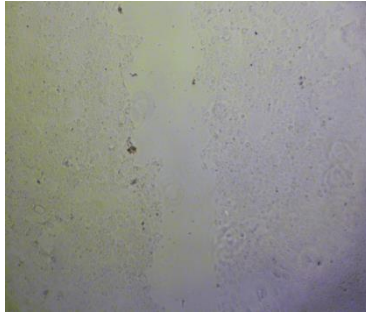
ง (3)



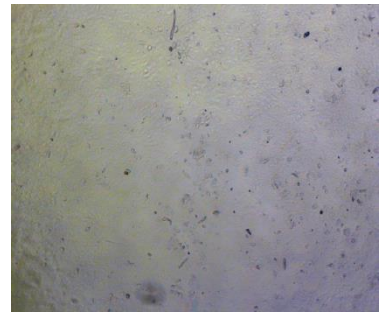
จ (1)



จ (2)



จ (3)



ภาพประกอบ 13 แสดงผลของเซรัมที่มีสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ Human keratinocyte (HaCaT)

ก = เซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากบริษัท

ข = เซรัมที่มี 7.5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากบริษัท

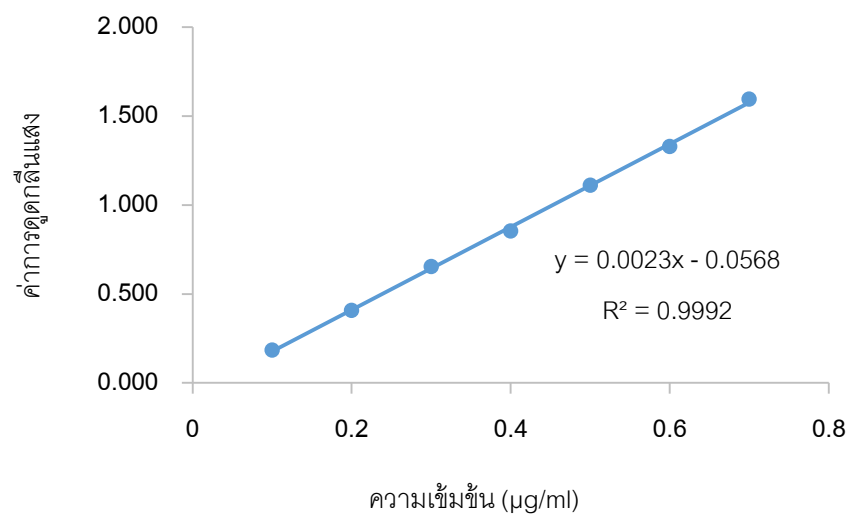
ค = เซรัมที่มี 10% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากบริษัท

ง = เซรัมที่มี 5% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล

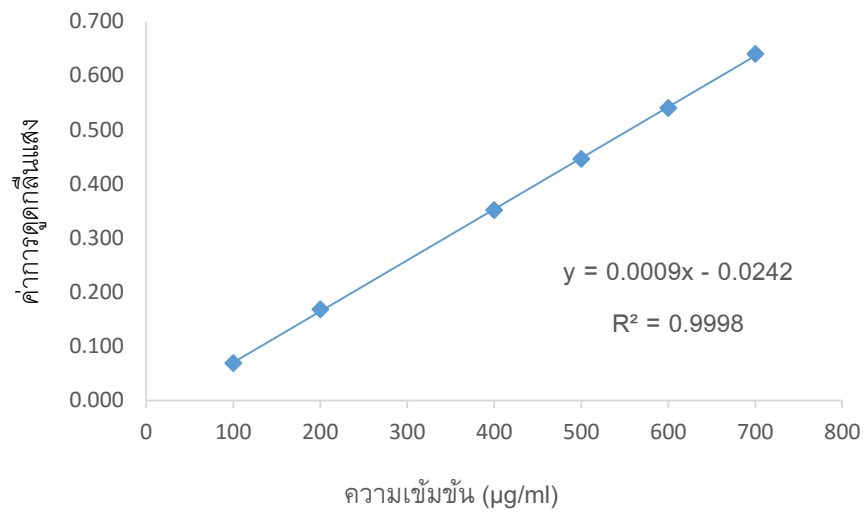
จ = กลุ่มควบคุม

1 = เริ่มต้น; 2 = 24 ชั่วโมง; 3 = 48 ชั่วโมง

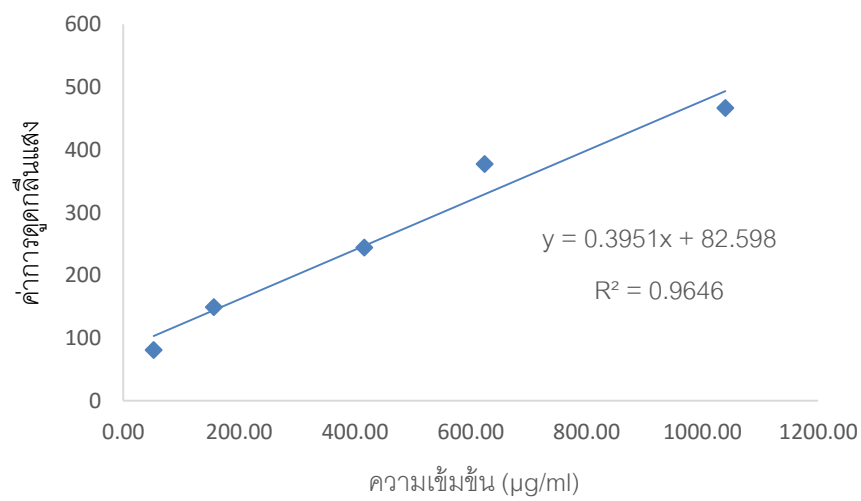
ผลของกราฟสมการเส้นตรงของสารสกัดและสารออกฤทธิ์



ภาพประกอบ 14 แสดงกราฟมาตรฐานของสารสกัดจากการแยกสกัดด้วยบิวทานอล
ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่วัดด้วย UV spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 15 แสดงกราฟมาตรฐานของสารสกัดบัวบกจากบริษัทในฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 7.4 ที่วัดด้วย UV spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของ asiaticoside ด้วยเทคนิค HPTLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

บรรณานุกรม

- Al-Attar, A., & Duebel, C. (2006). PROCESS-RELATED SYSTEMS AND METHODS.
- Arora, D., Kumar, M., & Dubey, S. D. (2002). Centella asiatica - A Review of it's Medicinal Uses and Pharmacological Effects. *Journal of Natural Remedies; Volume 2, Issue 2, June 2002.*
- Azis, H. A., Taher, M., Ahmed, A. S., Sulaiman, W. M. A. W., Susanti, D., Chowdhury, S. R., & Zakaria, Z. A. (2017). In vitro and In vivo wound healing studies of methanolic fraction of Centella asiatica extract. *South African Journal of Botany*, 108, 163-174. doi:10.1016/j.sajb.2016.10.022
- Bodratti, A. M., & Alexandridis, P. (2018). Formulation of poloxamers for drug delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1), <xocs:firstpage xmlns:xocs="" />. doi:10.3390/jfb9010011
- Borok, T. L., Bray, M., Sinclair, I., Plafker, J., Labirth, L., & Rollins, C. (1988). Role of ionizing irradiation for 393 keloids. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 15(4), 865-870. doi:10.1016/0360-3016(88)90119-8
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., & Hahn, E. G. (2000). Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant Centella asiatica. *Phytomedicine*, 7(5), 427-448. doi:[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80065-3)
- Chen, C.-Y., Jang, J.-H., Li, M.-H., & Surh, Y.-J. (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), 993-1000. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.237
- Chernoff, R. A. (2007). Treating an HIV/AIDS Patient's PTSD and Medication Nonadherence With Cognitive-Behavioral Therapy: A Principle-Based Approach (Chernoff). *Cognitive and Behavioral Practice*, 14(1), 125-126. doi:10.1016/j.cbpra.2006.11.003
- Conover, W. (2009). Chemistry, 8th Edition (by Stephen S. Zumdahl and Susan A. Zumdahl). *Journal of Chemical Education*, 86(11), 1273. doi:10.1021/ed086p1273
- Di Mambro, V. M., & Fonseca, M. J. V. (2005). Assays of physical stability and antioxidant

- activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 287-295.
doi:10.1016/j.jpba.2004.10.030
- Fearmonti, R., Bond, J., Erdmann, D., & Levinson, H. (2010). A review of scar scales and scar measuring devices. *Eplasty*, 10, e43.
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., & Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 463-467.
doi:10.1016/j.jep.2009.09.014
- Goldenberg, G., & Berman, B. (2014). Assessment of local skin reactions with a sequential regimen of cryosurgery followed by ingenol mebutate gel, 0.015%, in patients with actinic keratosis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 8, 1-8.
doi:10.2147/CCID.S70970
- Han, S. M., Hong, I., Woo, S., Chun, S., Park, K., Nicholls, Y., & Pak, S. C. (2015). The beneficial effects of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans. *Clinical Interventions in Aging*, 1587-1592.
- Inamdar, P. K., Yeole, R. D., Ghogare, A. B., & de Souza, N. J. (1996). Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A*, 742(1), 127-130. doi:10.1016/0021-9673(96)00237-3
- Islam, M., Rodríguez-Hornedo, N., Ciotti, S., & Ackermann, C. (2004). Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research*, 21(7), 1192-1199.
doi:10.1023/B:PHAM.0000033006.11619.07
- Jørgensen, S. E., & Mejer, H. (1977). Ecological buffer capacity. *Ecological Modelling*, 3(1), 39,47,49,51,53-45,47,49,51,61. doi:10.1016/0304-3800(77)90023-0
- Juanita, P., Guy, S., Tony, B., Jill, H., Paul, M., & Tom, G. (2015). The Royal Children's Hospital in Melbourne is taking a stand against kids in detention. *ABC News NSW (ABC1 Sydney)*.
- Juckett, G., & Hartman-Adams, H. (2009). Management of keloids and hypertrophic scars.

- American family physician*, 80(3), 253. doi:10.1556/AMicr.56.2009.2.7
- Kannasood, P., Rimkeeree, H., Winitchai, S., & Tadakittisarn, S. (2015). *Development of cleansing serum containing niosome of riceberry bran oil*.
- Karsai, S., Adrian, R., Hammes, S., Thimm, J., & Raulin, C. (2007). A randomized double-blind study of the effect of botox and dysport/reloxin on forehead wrinkles and electromyographic activity. *Archives of Dermatology*, 143(11), 1447-1462. doi:10.1001/archderm.143.11.1447-b
- Ketchum, L. D., Robinson, D. W., & Masters, F. W. (1971). FOLLOW-UP ON TREATMENT OF HYPERTROPHIC SCARS AND KELOIDS WITH TRIAMCINOLONE. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 48(3).
- Kirsner, R. S., & Eaglstein, W. H. (1993). The Wound Healing Process. *Dermatologic Clinics*, 11(4), 629-640. doi:10.1016/S0733-8635(18)30216-X
- Klumpar, D. I., Murray, J. C., & Anscher, M. (1994). Keloids treated with excision followed by radiation therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(2 I), 225-231. doi:10.1016/S0190-9622(94)70152-0
- Kovalic, J., & Perez, C. (1989). RADIATION-THERAPY FOLLOWING KELOIDECTOMY - A 20-YEAR EXPERIENCE. *International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics*, 17(1), 77-80. doi:10.1016/0360-3016(89)90373-8
- Kuo, Y.-R., Wu, W.-S., Jeng, S.-F., Huang, H.-C., Yang, K. D., Sacks, J. M., & Wang, F.-S. (2005). Activation of ERK and p38 kinase mediated keloid fibroblast apoptosis after flashlamp pulsed-dye laser treatment. *Lasers in Surgery and Medicine*, 36(1), 31-37. doi:10.1002/lsm.20129
- Kwon, M. C., Choi, W. Y., Seo, Y. C., Kim, J. S., Yoon, C. S., Lim, H. W., . . . Lee, H. Y. (2012). Enhancement of the Skin-Protective Activities of *Centella asiatica* L. Urban by a Nano-encapsulation Process. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 100-106. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.08.025
- Lindee, M. S. (2007). CELL BIOLOGY: The Culture of Cell Culture. *Science*, 316(5831), 1568-1569. doi:10.1126/science.1142574
- Liu, Y., Wang, T., Yan, J., Jiagbogu, N., Heideman, D. A. M., Canfield, A. E., & Alexander,

- M. Y. (2011). HGF/c-Met signalling promotes Notch3 activation and human vascular smooth muscle cell osteogenic differentiation in vitro. *Atherosclerosis*, 219(2), 440-447. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.033
- Malich, G., Markovic, B., & Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124(3), 179-192. doi:10.1016/S0300-483X(97)00151-0
- Morisset, R., Côté, N. G., Panisset, J. C., Jemni, L., Camirand, P., & Brodeur, A. (1987). Evaluation of the healing activity of hydrocotyle tincture in the treatment of wounds. *Phytotherapy Research*, 1(3), 117-121. doi:10.1002/ptr.2650010305
- Niessen, F. B., Spauwen, P. H. M., Schalkwijk, J., & Kon, M. (1999). On the Nature of Hypertrophic Scars and Keloids: A Review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 104(5).
- Nilsuwankosit, P., Suwansichon, T., Winitchai, S., & Rimkeeree, H. (2014). *Development of facial treatment serum product containing niosome of fibroin hydrolysate from Eri silk cocoon*. Bangkok.
- Pan, Y., Abd-Rashid, B. A., Ismail, Z., Ismail, R., Mak, J. W., Pook, P. C. K., . . . Ong, C. E. (2010). In vitro modulatory effects on three major human cytochrome P450 enzymes by multiple active constituents and extracts of *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 275-283. doi:10.1016/j.jep.2010.05.002
- Prasertwaree, P., Mingmuang, J., Thongdee, S., Onthong, S., & Chansuwanich, N. The Development of Transdermal Patch from *Centella asiatica* (L.) Urban-การพัฒนา แผ่นแปะ ผิวหนัง จาก สมุนไพร บัวบก. *Bulletin of the Department of Medical Sciences-วารสารกรมวิทยาศาสตร์ การ แพทย์*, 57(2), 174-185.
- Robson, M. C., Phillips, L. G., Lawrence, W. T., Bishop, J. B., Youngerman, J. S., Hayward, P. G., . . . Heggors, J. P. (1992). The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Annals of surgery*, 216(4), 401-408.
- Tenni, R., Zanaboni, G., De Agostini, M. P., Rossi, A., Bendotti, C., & Cetta, G. (1988). Effect of the triterpenoid fraction of *Centella asiatica* on macromolecules of the

- connective matrix in human skin fibroblast cultures. *The Italian journal of biochemistry*, 37(2), 69-77.
- Thibodeaux, J. K., Myers, M. W., Goodeaux, L. L., Menezo, Y., Roussel, J. D., Broussard, J. R., & Godke, R. A. (1992). Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. *Reproduction, Fertility and Development*, 4(5), 573-583.
- van Der Watt, E., & Pretorius, J. C. (2001). Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 87-91. doi:10.1016/S0378-8741(01)00197-0
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542. doi:10.1177/147323000903700531
- Wasielewski, M. R., Johnson, D. G., Niemczyk, M. P., Gaines, G. L., III, O'Neil, M. P., & Svec, W. A. (1990). Chlorophyll-porphyrin heterodimers with orthogonal. pi. systems: Solvent polarity dependent photophysics. *Journal of the American Chemical Society*, 112(18). doi:10.1021/ja00174a005
- Wilhelm, K. P., Cua, A. B., & Maibach, H. I. (1991). Skin Aging: Effect on Transepidermal Water Loss, Stratum Corneum Hydration, Skin Surface pH, and Casual Sebum Content. *Archives of Dermatology*, 127(12), 1806-1809. doi:10.1001/archderm.127.12.1806
- Zurada, J. M., Kriegel, D., & Davis, I. C. (2006). Topical treatments for hypertrophic scars. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(6), 1024-1031. doi:10.1016/j.jaad.2006.03.022

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล อิศเรศ ปัญญา
วัน เดือน ปี เกิด 19/4/2535
สถานที่เกิด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา พ.ศ. 2553 มัธยมศึกษา 4-6
จาก โรงเรียนปราชญ์ราษฎร์บำรุง จังหวัดปราจีนบุรี
พ.ศ. 2556 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
จาก มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา
พ.ศ. 2561 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน 19/74 หมู่ 11 ต.ไม้เค็ด อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
รางวัลที่ได้รับ พุทธคุณุณการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัย
แห่งชาติ ประจำปี ๒๕๖๑