

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส  
ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม  
และการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏบรจบุรี เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ทีโรซิเนส  
ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม  
และการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส  
ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม  
และการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

นันทพล วงศ์สุขเกษม. (2560). การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม และการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง, รองศาสตราจารย์ ดร. ฐาปนี หงส์รัตนาวรกิจ.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม น้ำมันกุหลาบ (rose oil), น้ำมันเบอร์กามีอต (bergamot oil) และ น้ำมันแพตชูลี (patchouli oil) ในอัตราส่วน 6:3:1 โดยทำการทดสอบฤทธิ์ชะลอวัยของผิวหนังด้วยการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส พบว่าน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมสูตรนี้ไม่มีฤทธิ์ในการชะลอวัยของผิวหนัง เนื่องจากไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 1.5 และ 4 mg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ลดความหมองคล้ำของผิวหนังโดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้  $45 \pm 4.6\%$  เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 4 mg/ml อีกหนึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมดังกล่าวเพื่อเพิ่มความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหย โดยเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนี้ไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมโดยวิธี complex coacervation ใช้ผนังเป็น โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate): ไคโตซาน (chitosan) ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 2% ใช้ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) ปริมาณ 1.25% เป็นสารทำอิมัลชัน และใช้สารละลาย 10% แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เป็นสารทำให้ผนังแข็งตัว พบว่าไมโครพาร์ทิเคิลที่เกิดขึ้นเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $1.04 \pm 0.25$  mm มีค่าการพองตัว ( $\%S_w$ ) เท่ากับ 50.24% ค่าความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย ( $\%EE$ ) เท่ากับ 39.57% และมีการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยแบบค่อย ๆ ปลดปล่อยเมื่อเวลาผ่านไป และเมื่อทดสอบความคงสภาพของไมโครพาร์ทิเคิลเป็นเวลาสามเดือนพบว่าไมโครพาร์ทิเคิลมีขนาดที่ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีแนวโน้มที่จะเกิดการพองตัวได้มากขึ้นโดยเฉพาะในเดือนที่สาม และอัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยนั้นไม่แตกต่างกันเมื่อเวลาผ่านไป การระเหยของน้ำมันหอมระเหยพบว่าการระเหยออกมาอย่างต่อเนื่องทำให้ค่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป แต่มีอัตราการระเหยของน้ำมันหอมระเหยที่ช้าลงเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ได้เก็บในไมโครพาร์ทิเคิล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่เก็บอยู่ในไมโครพาร์ทิเคิลมีความคงสภาพดีกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ได้เก็บในไมโครพาร์ทิเคิลและสามารถนำไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เนื่องจากช่วยลดอัตราการระเหยออกจากผลิตภัณฑ์

ANTI-COLLAGENASE, ANTI-ELASTASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES TESTING OF  
BLENDED ESSENTIAL OILS COMPRISED OF ROSE, BERGAMOT AND PATCHOULI OILS  
AND THE DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES FROM BLENDED OILS



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Master of Science in Pharmaceutical Product Development  
at Srinakharinwirot University

December 2017

Nuntapol Wongsukkasem. (2017). Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Tyrosinase Activities Testing of Blended Essential Oils comprised of Rose, Bergamot and Patchouli Oils and the Development of Microparticles from Blended Oils. Master thesis, M.S. (Pharmaceutical Product Development). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Prof. Sarin Tadtong, Ph.D. and Assoc. Prof. Tapanee Hongratanaworakit, Ph.D.

The first objective of this study is to evaluate the biological activities of blended essential oils comprised of rose, bergamot and patchouli oils in a volume ratio of 6:3:1. The blended oil was tested for anti-aging properties. Anti-collagenase and anti-elastase were used as testing models. However, the blended oil had no anti-aging properties against collagenase and elastase when tested upto 1.5 mg/ml and 4.0 mg/ml concentrations, respectively. In addition, the blended oil was tested for skin lightening qualities using anti-tyrosinase as the testing model. The results showed that blended oil possessed skin lightening qualities. It had a  $45 \pm 4.6\%$  tyrosinase inhibition when tested at four milligram per milliliter concentration. Another objective was to developed microparticles of blended essential oils. The microparticles of blended essential oils were developed using the complex coacervation method. Sodium alginate and chitosan with 1:2 weight ratio at two percent concentration were used as wall material. 1.25% of PVA and 10%  $\text{CaCl}_2$  were used as emulsifying and hardening agents, respectively. The results exhibited that the average size of microparticles was  $1.04 \pm 0.25$   $\mu\text{m}$ . Swelling degree and encapsulation efficiency were 50.24% and 39.57%, respectively. The release rate of blended oils showed a slow release rate. Furthermore, the three month stability levels of the microparticles were tested. The results showed no changes in average particle size. The degree of increasing in swelling was observed especially in the third month. The release rate of the blended oils from the microparticles showed no change. For encapsulation efficiency, the results showed the decrease in encapsulation efficiency after three month storage. However, compared to uncapsulated oil, microparticles had a lower volatile rate. These results showed that microparticles of blended essential oils tended to possess better stability for use as ingredients in various products.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ทีโรซิเนส  
ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม  
และการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

ของ

นันทพล วงศ์สุขเกษม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 25.....

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กัลยาวัฒนกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. วิภาพร เสรีเด่นชัย)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วง เกิดจากความช่วยเหลือ การชี้แนะ รวมถึงการถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์จากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรินทร์ ทัดทอง และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สุวปณีย์ หงส์รัตนาวรกิจ ที่สละเวลาทุ่มเทให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้เพื่อนำไปใช้ในการประกอบวิชาชีพและนำไปใช้ในการประมวลความรู้ความเข้าใจเพื่อต่อยอดเป็นปริญญาานิพนธ์เล่มนี้ คณะกรรมการการสอบปากเปล่า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กัลยาวัฒนกุล และ อาจารย์ ดร. วิภาพร เสรีเด่นชัย รวมถึงกรรมการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทราวดี บุรณตระกุล ที่ให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญาานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือ แนะนำ และอำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์และสารเคมีมาโดยตลอด นอกจากนี้ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนสนับสนุนการไปเข้าร่วมเสนองานวิชาการ และสถานที่ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวสำหรับกำลังใจ แรงบันดาลใจ และคอยช่วยเหลือสนับสนุนตลอดมา

นันทพล วงศ์สุขเกษม

## สารบัญ

บทที่		หน้า
1	<b>บทนำ</b> .....	1
	ภูมิหลัง .....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย .....	3
	ความสำคัญของการวิจัย .....	4
	ขอบเขตการวิจัย .....	4
	กรอบแนวคิดในการวิจัย .....	5
	สมมุติฐานในการวิจัย .....	5
2	<b>เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	7
	กายวิภาคและสรีรวิทยาของผิวหนัง .....	7
	การชะลอวัยของผิวหนัง .....	8
	ความหมองคล้ำของผิวหนัง และแนวทางการลดความหมองคล้ำของผิวหนัง .....	11
	หลักการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส .....	11
	น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil .....	17
	ไมโครพาร์ทิเคิล (Microparticle) .....	19
	ไคโตซาน (chitosan) และอัลจิเนต (alginate) .....	21
3	<b>วิธีดำเนินการวิจัย</b> .....	26
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี (Materials, Instrument and Reagents) .....	26
	วิธีการศึกษา .....	28
	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	28
	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสด้วย Porcine pancreatic elastase .....	32
	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส .....	36

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิล .....	40
การศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในไมโครพาร์ทิเคิล .....	44
4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย .....	46
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	46
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสด้วย Porcine pancreatic elastase .....	48
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส .....	51
การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิล .....	54
การศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในไมโครพาร์ทิเคิล .....	58
5 สรุปผลการวิจัย .....	62
บรรณานุกรม .....	64
ภาคผนวก .....	69
ประวัติย่อผู้วิจัย .....	73

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แนวทางการชะลอวัยของผิวหน้า .....	9
2 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์คอลลาจีเนส .....	31
3 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ PPE .....	35
4 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ Tyrosinase .....	39
5 สูตรตำรับไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันตะไคร้ .....	40
6 %collagenase inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม .....	47
7 %collagenase inhibition ของสารละลาย 10%v/v DMSO .....	48
8 %PPE inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม .....	50
9 %tyrosinase inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม .....	53
10 %EE ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันตะไคร้ .....	55
11 %R ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมจากสูตรที่ 3 .....	56
12 สรุปผลการทดลองการศึกษาความคงสภาพของขนาดอนุภาค, %S <sub>w</sub> และ %EE .....	59
13 %R ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมเมื่อเก็บไว้ 0, 1 และ 3 เดือน ..	30
14 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์ด้วย Gas chromatography–mass spectrometry .....	70

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างของผิวหนัง .....	7
2 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก <i>C. histolyticum</i> ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น FALPGA เป็นผลิตภัณฑ์ N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu และ Gly-Pro-Ala .....	12
3 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก <i>C. histolyticum</i> ในการเปลี่ยน collagen ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เป็น โปรตีนเรืองแสง fluorescence .....	13
4 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสสองชนิดในการเปลี่ยน สารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ .....	14
5 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส ในการเปลี่ยน elastin ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เป็นโปรตีนเรืองแสง fluorescence .....	15
6 ปฏิริยาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการเปลี่ยนสารตั้งต้น L-DOPA เป็นผลิตภัณฑ์ dopaquinone .....	16
7 ส่วนประกอบ และชนิดของไมโครพาร์ทิเคิล .....	20
8 โครงสร้างของโคตินและโคโตซาน ก) โครงสร้างของโคติน, ข) โครงสร้างของโคโตซาน และ ค) โครงสร้างของโคตินที่เกิดปฏิริยา deacetylation บางส่วน .....	21
9 โครงสร้างของอัลจินต .....	22
10 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %collagenase Inhibition .....	46
11 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %PPE inhibition .....	49
12 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร kojic acid กับ %Tyrosinase inhibition .....	51
13 ไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม .....	55
14 กราฟแสดง %R ที่เวลาต่าง ๆ ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม.....	57
15 กราฟแสดงกราฟแสดง %R ที่เวลาต่าง ๆ ของไมโครพาร์ทิเคิลของ น้ำมันหอมระเหยสูตรผสมที่เก็บไว้ 0, 1 และ 3 เดือน .....	61

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

### ภาพประกอบ

หน้า

16	น้ำมันหอมระเหย ก) rose oil, ข) bergamot oil, ค) patchouli oil และ ง) น้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1) .....	72
----	--	----



## สัญลักษณ์และคำย่อ

$\Delta$	=	ค่าความเปลี่ยนแปลง, เดลตา
%	=	ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์)
%RH	=	ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
$\mu\text{g}$	=	ไมโครกรัม
$\mu\text{l}$	=	ไมโครลิตร
$\mu\text{M}$	=	ไมโครโมลาริตี
Ala	=	กรดอะมิโนอะลานีน
g	=	กรัม
Gly	=	กรดอะมิโนไกลซีน
Leu	=	กรดอะมิโนลิวซีน
M	=	โมลาริตี
ml	=	มิลลิลิตร
mg	=	มิลลิกรัม
mM	=	มิลลิโมลาริตี
nm	=	นาโนเมตร
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, พีเอช
Pro	=	กรดอะมิโนโพรลีน
v/v	=	สัดส่วนโดยปริมาตรต่อปริมาตร
Val	=	กรดอะมิโนวาลีน
w/v	=	สัดส่วนโดยน้ำหนักต่อปริมาตร

# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

ผิวหนังเป็นส่วนปกคลุมร่างกายที่สามารถถูกมองเห็นได้จากบุคคลอื่น ๆ การเสื่อมของผิวหนังไปตามวัยนั้นเกิดขึ้นโดยกลไกของธรรมชาติและสิ่งกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมอันเป็นสาเหตุให้เกิดการเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ ดังนั้นมนุษย์จึงพยายามค้นหากระบวนการชะลอวัยของผิวหนังเพื่อพยายามรักษาสภาพของผิวหนังให้ยังคงอยู่ในสภาวะเดิมเมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไปหรือเมื่อได้รับปัจจัยกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการที่สามารถช่วยชะลอการเหี่ยวย่นของผิวหนังมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่น การป้องกันรังสียูวี การบำรุงผิวเป็นประจำทุกวัน<sup>(1)</sup>

ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเกิดรอยเหี่ยวย่นคือ การทำงานของเอนไซม์ในผิวหนังที่ทำหน้าที่ในการสลายโปรตีนที่ให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังในบริเวณ Extracellular matrix (ECM) เอนไซม์ที่สำคัญคือ Matrix metalloproteinases (MMPs) โดยเอนไซม์ MMPs ที่สำคัญคือ เอนไซม์คอลลาจีเนสที่ทำหน้าที่ในการทำลายโปรตีนหลายชนิดรวมถึงคอลลาเจนที่เป็นโปรตีนสำคัญใน ECM ทำหน้าที่ในการเกิดความยืดหยุ่นของผิวหนัง ในขณะที่เอนไซม์อีลาสเตส ทำหน้าที่ในการทำลายโปรตีนอีลาสตินและคอลลาเจนใน ECM ที่เป็นโปรตีนสำคัญในการเกิดความยืดหยุ่นของผิวหนัง<sup>(2)</sup> คอลลาเจนที่พบในชั้น dermis ส่วนมากเป็นคอลลาเจน type I ร้อยละ 75 และคอลลาเจน type III ร้อยละ 15 โดยเมื่ออายุสูงขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ<sup>(3)</sup> นอกจากนั้นผิวหนังที่ถูกกระตุ้นจากรังสียูวี จะเกิดการผลิตเอนไซม์ MMPs มากเกินกว่าที่ร่างกายผลิตเป็นปกติ ซึ่งส่งผลให้เกิดการย่อยทำลายของเส้นใยอีลาสตินบริเวณผิวหนัง ให้ความยืดหยุ่นลดลง และเกิดเป็นริ้วรอยเกิดขึ้นได้<sup>(4)</sup>

นอกจากการเสื่อมของผิวหนังที่ทำให้เกิดการเหี่ยวย่นแล้ว รังสียูวียังกระตุ้นให้ผิวหนังสร้างเม็ดสีในชั้นผิวหนังที่มากขึ้น และเกิดความหมองคล้ำของผิวหนัง ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีที่เรียกว่าเมลานิน (melanin) ในชั้นใต้ผิวหนังนั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในร่างกายให้กลายเป็นเมลานินเพื่อปกป้องผิวหนังจากอันตรายของรังสียูวี และเป็นต้นเหตุของความหมองคล้ำของผิวหนัง<sup>(5)</sup>

อย่างไรก็ตามมีสารจากธรรมชาติหลายชนิดที่สามารถชะลอการเสื่อมของผิวหนัง และ/หรือ ช่วยลดความหมองคล้ำของผิวหนังลงได้ หนึ่งในสารเหล่านั้นคือน้ำมันหอมระเหย เนื่องด้วยมีหลายงานวิจัยแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี เช่นการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี<sup>(6)</sup> และในการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของน้ำมันหอมระเหยเพื่อหวังจะนำมาใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดเลือนรอยเหี่ยวย่น และชะลอวัยโดยมีการศึกษาว่าน้ำมันหอมระเหยจาก lemons, juniper และ grapefruit แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส<sup>(7)</sup> นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหย 20 ชนิดที่ได้จากพืชที่รับประทานได้ในประเทศไทยพบว่าน้ำมันตะไคร้ และน้ำมันแมงลักยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีอีกด้วย<sup>(8)</sup>

น้ำมันหอมระเหยนอกจากจะมีกลิ่นเฉพาะตัวที่สามารถนำมาแต่งกลิ่นให้เกิดความหอมของผลิตภัณฑ์ได้ ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาตัวรับเครื่องสำอางได้ เช่นฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถนำมาใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม และการนำน้ำมันหอมมาเหมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากขึ้น แต่ยังคงมีปัญหาเรื่องความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ทันสมัยเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยวิธีการหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยได้คือการทำไมโครเอ็นแคปซูลเลชัน (microencapsulation) ของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในตัวพาแบบเมทริกซ์ (carrier matrix) และสามารถทำให้อยู่ในรูปของผงแห้งได้<sup>(9)</sup>

จากงานวิจัยของของอรวรรณ, มณฑิรา และเอมปราง<sup>(6)</sup> ได้ศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมพบว่า rose oil, bergamot oil และ patchouli oil มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน (v/v) 6:3:1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี คือมีค่า IC<sub>50</sub> ของการทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) อยู่ที่ 0.67%v/v และ 0.14 %v/v ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการเสริมฤทธิ์กันในองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยนั่นเอง เนื่องจากน้ำมันหอม

ระเหยสูตรผสมของน้ำมันหอมระเหยสามชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลที่ดี นอกจากนี้งานวิจัยของชิตชนกและเปี่ยมจิตต์<sup>(10)</sup> ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมพบว่า rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ต่อเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหากน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ด้วย จะสามารถนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนี้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชะลอการเหี่ยวย่นของผิวหนัง และลดความหมองคล้ำของผิวหนังที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งเท่านั้น

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมและ 2) พัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม และศึกษาความคงสภาพของไมโครพาร์ทิเคิลที่พัฒนาขึ้น

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1)
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1)
4. เพื่อพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ด้วยวิธี complex coacervation

5. เพื่อศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ในไมโครพาร์ทิเคิล

### ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ทั้งในรูปแบบน้ำมันเดี่ยว และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำมันหอมระเหย นอกจากนั้นการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยช่วยเพิ่มความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยได้อีกด้วย

### ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี Spectrophotometric และเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
2. พัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 จากโคโคซานและโซเดียมอัลจีเนต ด้วยวิธี complex coacervation
3. ศึกษาความคงสภาพของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมขึ้น ที่เก็บในอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 เดือน

### นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สารควบคุมผลบวก (Positive control) หมายถึงสารมาตรฐานที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส หรือเอนไซม์ไทโรซิเนส แล้วนำไปผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่นเดียวกับสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เพื่อใช้ดูเปรียบเทียบ
2. ปฏิกริยาควบคุมผลลบ (Negative control) หมายถึงการทำปฏิกริยาระหว่างเอนไซม์ เอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส หรือเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารตั้งต้น โดยไม่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3. The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) หมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50%

4. ไมโครพาร์ทิเคิล หมายถึงระบบนำส่งยา หรือสารสำคัญต่าง ๆ ชนิดหนึ่งที่สามารถเตรียมได้จากเทคนิคไมโครเอ็นแคปซูลชัน ซึ่งไมโครพาร์ทิเคิลเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตร โดยส่วนมากจะมีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 1 - 1,000  $\mu\text{m}$  ประกอบด้วยส่วนสำคัญของสองส่วนคือ ส่วนแกนกลาง (core) ที่มักจะเป็นตัวยาหรือสารสำคัญ และที่สองคือผนังหุ้ม (wall) ที่ทำหน้าที่กักเก็บยาหรือสารสำคัญในแกนกลางเอาไว้

5. วิธี complex coacervation หมายถึงหนึ่งในวิธีการเตรียมไมโครพาร์ทิเคิลด้วยวิธีการทางเคมี โดยสารพอลิเมอร์ที่นำมาใช้เป็นผนังหุ้มประกอบด้วยพอลิเมอร์มากกว่า 1 ชนิด วิธีการเตรียมจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนหนึ่งการทำอิมัลชันของยาหรือสารสำคัญที่เป็นแกนกลาง ขั้นตอนที่สองเป็นการให้สารที่ใช้เป็นผนังไปเคลือบอยู่ระหว่างรอบต่อของหยดวิภาคภายในกับวิภาคภายนอก และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทำให้สารผนังนี้แข็งขึ้น และกักเก็บยาหรือสารสำคัญไว้ในอนุภาค

### กรอบแนวคิดในการวิจัย

น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 ไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย และศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยในไมโครพาร์ทิเคิลเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน

### สมมุติฐานในการวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้

2. น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้

3. น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (อัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

4. ไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 มีความคงสภาพเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 เดือน



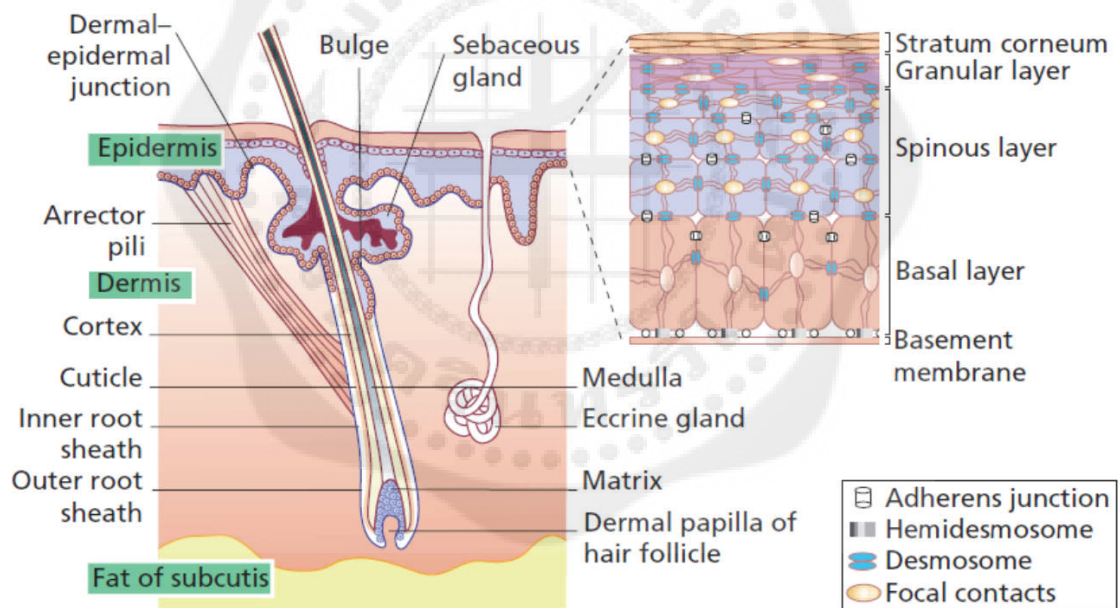
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

#### 1. กายวิภาคและสรีรวิทยาของผิวหนัง

ผิวหนัง (ภาพประกอบ 1) เป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย เป็นส่วนปกคลุมร่างกายที่สามารถถูกมองเห็นได้จากบุคคลอื่น ๆ โดยผิวหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชั้น คือ Epidermis และ Dermis<sup>(11)</sup>



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของผิวหนัง

ที่มา: McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin.

Rook's Textb Dermatology [Internet]. 2004;45-128. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1002/9780470750520.ch3>

ผิวหนังชั้น Epidermis เป็นผิวหนังชั้นนอกสุดที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อม ทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ป้องกันการสูญเสียความชื้น ปกป้องร่างกายจากแรงกดดัน แรงลม การขีดข่วน เชื้อโรค และ สารเคมี ประกอบด้วยชั้นย่อยหลายชั้น โดยแบ่งตามชนิดของเซลล์ที่อยู่ในชั้นนั้น ๆ คือ Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum และ Stratum corneum โดยเซลล์ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบในชั้นนี้คือ melanocyte อยู่ที่ชั้น Stratum basale ซึ่งทำหน้าที่สร้างเม็ดสีที่เรียกว่าเมลานิน ซึ่งเม็ดสีเมลานินจะทำหน้าที่ปกป้องผิวหนังจากรังสียูวี<sup>(3)</sup>

ผิวหนังชั้น Dermis เป็นชั้นที่อยู่ติดลงไปจากชั้น Epidermis องค์ประกอบหลักของผิวหนังในชั้นนี้คือ supporting matrix ซึ่งเป็นสารจำพวก polysaccharide และโปรตีนทำหน้าที่หลักในการกักเก็บน้ำเอาไว้ในผิวหนัง นอกจากนี้ใน matrix จะมีเส้นใยโปรตีนที่เรียกว่าคอลลาเจน และอีลาสตินที่สร้างจากเซลล์ที่ชื่อ fibroblasts โดยเส้นใยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีส่วนสำคัญในการสร้างความยืดหยุ่นให้กับผิวหนังและมีส่วนสำคัญในกระบวนการสมานแผล นอกจากนี้เซลล์ fibroblast แล้ว ในผิวหนังชั้น dermis ยังพบ mast cells ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพ้ และ histiocyte เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย<sup>(11)</sup>

คอลลาเจนที่พบในชั้น dermis ส่วนมากเป็น คอลลาเจน type I ร้อยละ 75 และคอลลาเจน type III ร้อยละ 15 โดยเมื่ออายุสูงขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ<sup>(3)</sup> ในขณะที่อีลาสตินเป็นเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่นของผิวหนัง ซึ่งหากผิวหนังถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี จะก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ ส่งผลให้ผิวหนังบริเวณนั้นมีการสะสมอีลาสตินลดลง<sup>(4)</sup>

## 2. การชะลอวัยของผิวหนัง

การเสื่อมของผิวหนังไปตามวัยนั้นเกิดขึ้นโดยกลไกของธรรมชาติและสิ่งกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมอันเป็นสาเหตุให้เกิดการเหี่ยวของผิวหนังได้ มนุษย์จึงพยายามค้นหาวิธีการชะลอวัยของผิวหนังเพื่อพยายามรักษาสภาพของผิวหนังให้ยังคงอยู่ในสภาวะเดิมเมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไปหรือเมื่อได้รับปัจจัยกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม วิธีการที่สามารถช่วยชะลอการเหี่ยวของผิวหนังมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่นการป้องกันรังสีจากแสงอาทิตย์ การบำรุงผิวเป็นประจำทุกวัน เป็นต้น

สภาวะแวดล้อมภายนอกเช่นแสงแดด ควันบุหรี่ หรือมลพิษอื่น ๆ ล้วนเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระที่ผิวหนังทั้งสิ้น โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นส่งผลต่อเซลล์ผิวหนังทำให้เซลล์เสียหาย หรือถูกทำลายไปและทำให้ผิวหนังเกิดการเหี่ยวย่น

ด้วยความก้าวหน้าของวิทยาศาสตร์จึงมีการศึกษากลไกของการเสื่อมไปตามวัยของผิวหนังและแนวทางชะลอความเสื่อมที่เป็นไปตามวัยของผิวหนังอย่างมากมาย ซึ่งสามารถสรุปเป็นแนวทางที่จะสามารถใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารต่าง ๆ หรือกระบวนการต่าง ๆ ที่จะสามารถช่วยชะลอความเสื่อมไปตามวัยของผิวหนังได้<sup>(1)</sup> ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แนวทางการชะลอวัยของผิวหนัง

แนวทางการชะลอวัยของผิวหนัง	รายละเอียด
1. การดูแลผิวหนังโดยทั่วไป	การดูแลความงามโดยการใช้ใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเป็นประจำและการใช้ผลิตภัณฑ์กันแดดอย่างถูกต้อง
2. การใช้ยาหรือผลิตภัณฑ์สำหรับทาบนผิวหนัง	ยาหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารที่ช่วยควบคุมการทำงานของเซลล์ให้เป็นปกติ
3. การใช้กระบวนการที่มีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างปกติของผิวหนัง	การใช้สารเคมีลอกผิวหนัง, การใช้อุปกรณ์ที่ใช้การฉายแสง, การใช้คลื่นความถี่วิทยุ, การฉีดสารที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทำงานเป็นปกติและดูแลอ่อนวัยลง, การป้องกันการเกิดริ้วรอย, การลบเลือนริ้วรอยด้วยวิธีการเติมเต็มร่องของผิวหนัง หรือทำให้จางลง
4. การให้สารหรือยาด้วยการรับประทาน	การใช้ยาฮอร์โมนทดแทน หรือการให้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดรับประทาน
5. การหลีกเลี่ยงปัจจัยที่ส่งเสริมการเสื่อมของผิวหนัง และการปรับเปลี่ยนวิถีชีวิต	เลิกสูบบุหรี่และหลีกเลี่ยงมลพิษ, หลีกเลี่ยงแสง UV จากแสงแดด, ไม่เครียด, ควบคุมการรับประทานอาหารเลือกทานสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย, ออกกำลังกาย และดูแลรักษาสุขภาพ

ที่มา: Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):308–19.

จะเห็นได้ว่ามีแนวทางในการชะลอวัยมากมายที่เราสามารถทำได้ โดยหนึ่งในวิธีการที่สามารถทำได้คือการใช้ยาหรือผลิตภัณฑ์สำหรับทาบนผิวหนัง ที่ช่วยควบคุมการทำงานของเซลล์ให้เป็นปกติ โดยสารในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำลายของเนื้อเยื่อคอลลาเจน และกระตุ้นการผลิตคอลลาเจนและอีลาสตินโดยกระบวนการที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำลายเนื้อเยื่อสองชนิดดังกล่าว คือเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส

ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเกิดรอยเหี่ยวย่นคือ การทำงานของเอนไซม์ในผิวหนังที่ทำหน้าที่ในการสลายโปรตีนที่ให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังในบริเวณ Extracellular matrix (ECM) เอนไซม์ที่สำคัญคือ Matrix metalloproteinases (MMPs)

เอนไซม์ MMPs ที่สำคัญคือ เอนไซม์คอลลาจีเนสที่ทำหน้าที่ในการทำลายโปรตีนหลายชนิด รวมถึงคอลลาเจนที่เป็นโปรตีนสำคัญใน ECM ทำหน้าที่ในการเกิดความยืดหยุ่นของผิวหนัง ในขณะที่เอนไซม์อีลาสเตส ทำหน้าที่ในการทำลายโปรตีนอีลาสตินและคอลลาเจนใน ECM ที่เป็นโปรตีนสำคัญอีกตัวในการเกิดความยืดหยุ่นของผิวหนัง<sup>(2)</sup>

อายุที่สูงขึ้นส่งผลให้เส้นใยคอลลาเจนในผิวหนังมีความผิดปกติไปในแง่ของโครงสร้าง และปริมาณของเส้นใยคอลลาเจนลดลง นอกจากนั้นผิวหนังที่ถูกกระตุ้นจากรังสียูวี จะเกิดการผลิตเอนไซม์ MMPs มากเกินกว่าที่ร่างกายผลิตเป็นปกติ ส่งผลให้เกิดการย่อยทำลายของเส้นใยอีลาสตินที่บริเวณผิวหนัง ให้ความยืดหยุ่นลดลง และเกิดเป็นริ้วรอยเกิดขึ้นได้

จะเห็นได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ MMPs มีความสำคัญต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนัง ซึ่งส่งผลให้เกิดริ้วรอยขึ้นดังนั้นหากเราสามารถหาสารต้านการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว มาใช้ร่วมกับวิธีการชะลอวัยอื่น ๆ แล้วนั้น ก็สามารถช่วยชะลอการเสื่อมของโครงสร้างผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหมายถึงชะลอการเกิดริ้วรอยบนผิวหนังนั่นเอง<sup>(4)</sup>

### 3. ความหมองคล้ำของผิวหนัง และแนวทางการลดความหมองคล้ำของผิวหนัง

สาเหตุหลักของความหมองคล้ำของผิวหนังคือรังสียูวี ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นในผิวหนังชั้น epidermis สร้างเม็ดสีที่เรียกว่าเมลานิน จากเซลล์ที่เรียกว่า melanocyte เพื่อที่จะปกป้องเซลล์ผิวหนังไม่ให้ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามเมื่อเมลานินถูกสร้างขึ้นจะถูกสะสมอยู่ในผิวหนังชั้นนอก และทำให้ผิวหนังแลดูหมองคล้ำขึ้น

เมื่อพิจารณาไปถึงกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินนั้น หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่ใช้สร้างเม็ดสีเมลานินคือเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเอนไซม์ชนิดนี้ถูกเก็บอยู่ในถุง melanosome ภายใน melanocyte ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน L-tyrosine เป็นสารตัวกลาง L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ซึ่ง L-DOPA สามารถถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปได้เป็นเม็ดสีเมลานิน 2 ชนิด ผ่านทาง 2 กลไกคือ eumelanogenesis ได้เป็นเม็ดสีที่เรียกว่า eumelanin ที่มีสีน้ำตาลถึงสีดำ กลไกที่สองคือ pheomelanogenesis ได้เม็ดสีเรียกว่า pheomelanin มีสีเหลืองถึงสีแดง โดยเมลานินที่เกิดขึ้นทั้งสองชนิดจะสะสมอยู่ที่ผิวหนังชั้นนอกเพื่อปกป้องผิวหนังจากรังสียูวี<sup>(5, 12)</sup>

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ และถือเป็นปัจจัยหลักในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้จะสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ และจะช่วยให้ผิวหนังไม่เกิดความหมองคล้ำ อย่างไรก็ตามยังไม่พบวิธีการทำลายเมลานินเดิมที่สะสมอยู่แล้วในชั้นผิวหนัง แต่ร่างกายของเรามีกระบวนการการผลัดเซลล์ผิวซึ่งจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติ สามารถกล่าวได้ว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นการป้องกันการเกิดความหมองคล้ำที่ผิวหนัง ควบคู่กับกลไกการผลัดเซลล์ผิวจะช่วยทำให้ผิวหนังที่หมองคล้ำดูกระจ่างใสขึ้นได้นั่นเอง

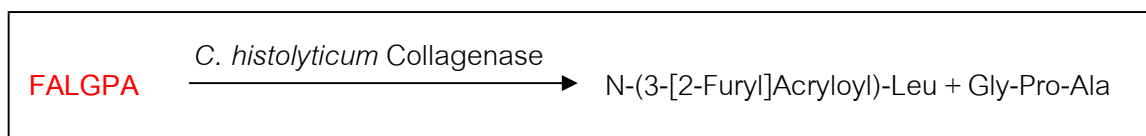
### 4. หลักการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส

#### 4.1 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

สามารถทดสอบได้ 2 วิธีคือ วิธี spectrophotometric และวิธี spectrofluorometric

##### 4.1.1 วิธี spectrophotometric<sup>(13)</sup>

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส จะเป็นการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ *Clostridium histolyticum* collagenase ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เป็นผลิตภัณฑ์ N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu และ Gly-Pro-Ala ตามปฏิกิริยาดังภาพประกอบ 2 ดังนี้



ภาพประกอบ 2 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น FALGPA เป็นผลิตภัณฑ์ N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu และ Gly-Pro-Ala

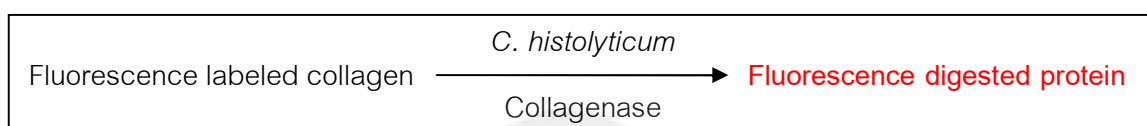
เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาทดสอบ วัดการลดลงของ FALGPA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA จะน้อยกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และสามารถคำนวณฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\Delta Optical \ density_{control} - \Delta Optical \ density_{sample}}{\Delta Optical \ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ  $\Delta Optical \ density$  คือการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยาของ FALGPA ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample)

#### 4.1.2 วิธี Spectrofluorometric<sup>(14, 15)</sup>

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ภาพประกอบ 3) เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ *C. histolyticum* collagenase ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นคือ collagen ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เมื่อเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง collagen ที่ถูกย่อยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรตีนสามารถเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 495 nm และ emission 515 nm ได้



ภาพประกอบ 3 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ในการเปลี่ยน collagen ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เป็นโปรตีนเรืองแสง fluorescence

ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาทดสอบ โดยวัดการเกิดขึ้นของ โปรตีนเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 495 nm และ emission 515 nm เป็นค่าการเรืองแสง fluorescence (fluorescence intensity) ของโปรตีนเรืองแสง ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ การเกิดขึ้นของโปรตีนเรืองแสงจะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสง ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Fluorescence\ intensity_{control} - Fluorescence\ intensity_{sample}}{Fluorescence\ intensity_{control}} \times 100$$

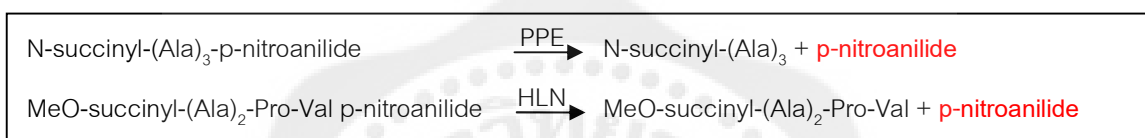
เมื่อ Fluorescence intensity คือค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสง ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

## 4.2 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส

สามารถทดสอบได้ 2 วิธีคือ วิธี spectrophotometric และวิธี spectrofluorometric

### 4.2.1 วิธี spectrophotometric<sup>(7)</sup>

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสจะใช้เอนไซม์สองชนิด คือ Porcine pancreatic elastase (PPE) และ Human leukocyte elastase (HLN) ในการเปลี่ยน N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide และ MeO-succinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val p-nitroanilide ตามลำดับเป็น p-nitroanilide เกิดปฏิกิริยาดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสสองชนิดในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์

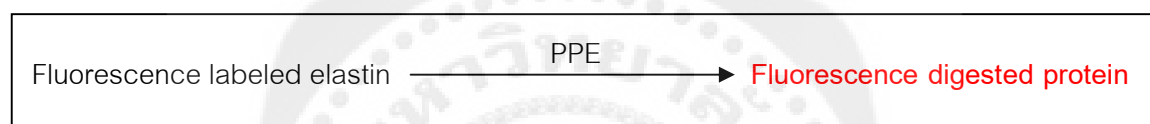
ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาทดสอบ โดยวัดการเกิดขึ้นของ p-nitroanilide ที่ความยาวคลื่น 410 nm เป็นค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ การเกิดขึ้นของสาร p-nitroanilide จะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\text{Optical density}_{control} - \text{Optical density}_{sample}}{\text{Optical density}_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 4.2.2 วิธี Spectrofluorometric<sup>(16, 17)</sup>

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ภาพประกอบ 5) เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ porcine pancreatic elastase (PPE) ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นคือ elastin ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เมื่อเกิดปฏิกิริยา elastin ที่ถูกย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตีนที่สามารถเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 505 nm และ emission 515 nm



ภาพประกอบ 5 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส ในการเปลี่ยน elastin ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เป็นโปรตีนเรืองแสง fluorescence

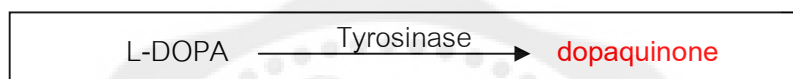
ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาทดสอบ โดยวัดการเกิดขึ้นของ โปรตีนเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 505 nm และ emission 515 nm เป็นค่าการเรืองแสง fluorescence (fluorescence intensity) ของโปรตีนเรืองแสง ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ การเกิดขึ้นของโปรตีนเรืองแสงจะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสง ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามา คำนวณฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Fluorescence\ intensity_{control} - Fluorescence\ intensity_{sample}}{Fluorescence\ intensity_{control}} \times 100$$

เมื่อ Fluorescence intensity คือค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสง ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 4.3 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส<sup>(18)</sup>

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จะเป็นการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เป็นผลิตภัณฑ์ dopaquinone เกิดปฏิกิริยาดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการเปลี่ยนสารตั้งต้น L-DOPA เป็นผลิตภัณฑ์ dopaquinone

ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่าปฏิกิริยาทดสอบ โดยวัดการเกิดขึ้นของ dopaquinone ที่ความยาวคลื่น 475 nm เป็นค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ การเกิดขึ้นของสาร dopaquinone จะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

## 5. น้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil

### 5.1 rose oil<sup>(6, 10, 19-22)</sup>

กุหลาบ (*Rosa damascena*) อยู่ในวงศ์ Rosaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้พุ่ม สูง 1-2 เมตร มีดอกที่มีสีส้มสวยงาม น้ำมันกุหลาบ (rose oil) ได้มาจากส่วนของดอกของต้นกุหลาบสามารถได้น้ำมันหอมระเหยจากการกลั่นด้วยน้ำ การสกัดด้วยตัวทำละลาย และการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว ได้เป็นน้ำมันใสไม่มีสี หรือมีสีเหลืองอ่อน

องค์ประกอบทางเคมีที่ตรวจพบได้ใน rose oil นั้น พบว่ามีองค์ประกอบหลักคือ citronellol, nerol, geraniol,  $\beta$ -phenylethanol, eugenol และ methyl eugenol

โดยฤทธิ์ทางชีวภาพของ rose oil ที่มีรายงานคือ ฤทธิ์ต้านชัก โดยการศึกษา pilot study แบบ double-blind clinical trial ในผู้ป่วยเด็ก 16 คน ที่มีภาวะลมชักที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (refractory epilepsy) โดยให้ใช้ rose oil เป็นยาเสริมในการรักษา พบว่าผู้ป่วยมีความถี่ในการเกิดลมชักลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.00$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติได้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบในหลอดทดลองด้วยวิธีวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.45 และ 0.09%v/v ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารแต่งกลิ่นทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

### 5.2 bergamot oil<sup>(6, 10, 22-24)</sup>

เบอร์กาม็อต (*Citrus bergamia*) อยู่ในวงศ์ Rutaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สามารถสูงได้ถึง 12 เมตร น้ำมันเบอร์กาม็อต (bergamot oil) ได้จากส่วนเปลือกผลสดสามารถสกัดให้ได้น้ำมันหอมระเหยโดยการบีบ หรือการกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มักมีสีเขียว หรือสีเหลืองน้ำตาล

องค์ประกอบทางเคมีหลักที่ตรวจพบใน bergamot oil คือ limonene, linalool, linalyl acetate,  $\gamma$ -terpinene และ  $\beta$ -pinene

ฤทธิ์ทางชีวภาพของ bergamot oil ที่มีรายงานคือ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีรายงานว่า bergamot oil สามารถยับยั้งเชื้อ *Campylobacter jejuni*, *E. Coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* และ *S. aureus* ได้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบในหลอดทดลองด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.30 และ 0.98%v/v ตามลำดับ

### 5.3 patchouli oil<sup>(6, 10, 22, 25, 26)</sup>

พิมเสนตัน (*Pogostemon cablin*) อยู่ในวงศ์ Lamiaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชล้มลุก มีความสูงประมาณ 1-1.5 เมตร น้ำมันพิมเสนตัน (patchouli oil) ได้มาจากส่วนใบแห้งสามารถสกัดได้น้ำมันหอมระเหยจากการกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด มีสีแดงน้ำตาล และมีกลิ่นคล้ายการบูร

องค์ประกอบทางเคมีหลักที่ตรวจพบใน patchouli oil คือ patchouli alcohol และ norpatchoulenol นอกจากนี้ยังสามารถพบสารอื่น ๆ ได้เช่น caryophyllene,  $\alpha$ ,  $\beta$ -patchoulenes, pogostol, seychellene และ cycloseychellenol

ฤทธิ์ทางชีวภาพของ patchouli ที่มีรายงานคือ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *P. acnes*, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium* และ *Eikenella* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบในหลอดทดลองด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 6.29 และ 1.45%v/v ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการนำ patchouli oil ไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอมอีกด้วย

#### 5.4 น้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน

6:3:1<sup>(6, 10)</sup>

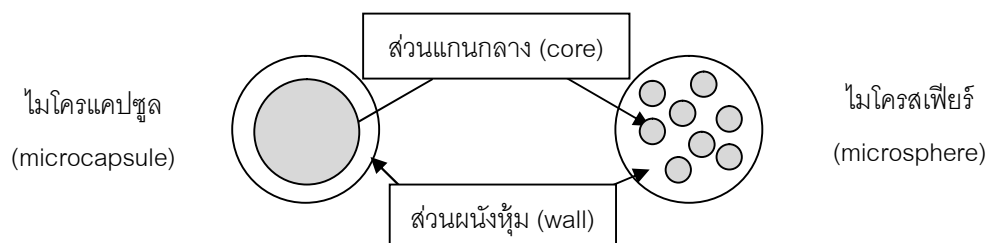
จากงานวิจัยของของอรวรรณ, มณฑิรา และเอมปราง (2555) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมพบว่า rose oil, bergamot oil และ patchouli oil มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี คือมีค่า IC<sub>50</sub> ของการทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) อยู่ที่ 0.67%v/v และ 0.14 %v/v ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดการเสริมฤทธิ์กันในองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมของน้ำมันหอมระเหยสามชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลที่ดี

นอกจากนี้งานวิจัยของชิตชนกและเปี่ยมจิตต์ (2557) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย น้ำมันหอมระเหยเดี่ยว และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมพบว่า rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth dilution น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดคือ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) เท่ากับ 0.25, 10 และ 0.0625 %v/v ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ค่า MIC เท่ากับ 0.125, 0.5 และ 0.0625 %v/v ตามลำดับ และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 0.125 และ 0.003125 %v/v ตามลำดับ

#### 6. ไมโครพาร์ติเคิล (Microparticle)<sup>(27-29)</sup>

ไมโครพาร์ติเคิลเป็นระบบนำส่งยา หรือสารสำคัญต่าง ๆ ชนิดหนึ่งที่สามารถเตรียมได้จากเทคนิคไมโครเอ็นแคปซูลชัน ซึ่งไมโครพาร์ติเคิลเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตร โดยส่วนมากจะมีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 1 – 1,000 μm ประกอบด้วยส่วนสำคัญสองส่วนคือ ส่วนแกนกลาง (core) ที่มักจะเป็นตัวยาหรือสารสำคัญ และที่สองคือผนังหุ้ม (wall) ที่ทำหน้าที่กักเก็บยา หรือสารสำคัญในแกนกลางเอาไว้ เราสามารถแบ่งไมโครพาร์ติเคิลได้เป็น 2 ชนิดหลัก ๆ คือ ไมโคร

แคปซูล (microcapsule) คือรูปแบบที่ส่วนแกนกลางทั้งหมดอยู่ตรงกลางของอนุภาคและถูกห่อหุ้มด้วยผนังล้อมรอบแกนกลางเอาไว้ อีกรูปแบบหนึ่งคือ ไมโครสเฟียร์ (microsphere) คือรูปแบบที่ส่วนแกนกลางกระจายตัวอยู่ในอนุภาคที่ถูกห่อหุ้มด้วยผนัง ดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ส่วนประกอบ และชนิดของไมโครพาร์ทิเคิล

เทคนิคไมโครเอ็นแคปซูลชั้นที่ใช้เตรียมไมโครพาร์ทิเคิลมีหลายวิธี แต่สามารถแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 2 กลุ่มใหม่ ๆ คือวิธีการทางกายภาพ (physico-mechanical techniques) เช่น spray drying เป็นต้น และวิธีการทางเคมี (physico-chemical techniques) เช่น coacervation

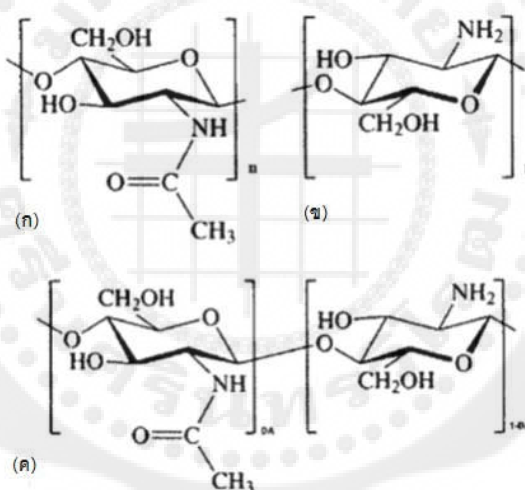
เทคนิค coacervation เป็นวิธีการเตรียมไมโครพาร์ทิเคิลด้วยวิธีการทางเคมี โดยสามารถแบ่งออกได้สองรูปแบบคือ simple coacervation และ complex coacervation โดยสองรูปแบบนี้มีวิธีการเตรียมเหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่สารพอลิเมอร์ที่นำมาใช้เป็นผนังหุ้ม จะมีจำนวน 1 ชนิดหรือมากกว่า 1 ชนิด สำหรับ simple coacervation และ complex coacervation ตามลำดับ วิธีการเตรียมจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนที่หนึ่งการทำอิมัลชันของยาหรือสารสำคัญที่เป็นแกนกลาง ขั้นตอนที่สองเป็นการให้สารที่ใช้เป็นผนังไปเคลือบอยู่ระหว่างรอบต่อของหยดวิภาคภายในกับวิภาคภายนอก และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทำให้สารผนังนี้แข็งขึ้น และกับเก็บยาหรือสารสำคัญไว้ในอนุภาค

ตัวอย่างของสารที่นำมาใช้เป็นผนังในเทคนิค coacervation เช่น protein, polysaccharides, ethyl cellulose, gelatin, alginate และ chitosan และวิธีการทำให้ผนังแข็งตัวในขั้นตอนการเตรียมที่สามนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และการใช้สารเคมีเพิ่มความแข็งแรง เป็นต้น

## 7. ไคโตซาน(chitosan) และอัลจีเนต (alginate)

### 7.1 ไคโตซาน<sup>(30, 31)</sup>

ไคโตซานคืออนุพันธ์ของไคติน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ เช่น เปลือกหอย ปู กุ้ง ปลาหมึก โดยไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการดึงหมู่อะซิทิล (acetyl group) ออกจากไคติน เรียกปฏิกิริยานี้ว่า deacetylation ซึ่งส่งผลให้ไคโตซานสามารถละลายได้ในของเหลวหรือสารละลายที่เป็นกรดได้เมื่อเกิดการดึงหมู่อะซิทิลออกไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพประกอบ 8) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation นั้นส่งผลต่อคุณสมบัติในแง่ของการละลาย ไคโตซานสามารถละลายในสารละลายกรดและเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่นการตกตะกอนโปรตีนเพื่อนำกลับมาใช้ หรือใช้เป็นสารดักจับมลพิษ เป็นต้น ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายกรดบางชนิด แต่ไม่ละลายน้ำ โดยสามารถอุ้มน้ำทำให้เกิดการพองตัวของพอลิเมอร์ขึ้นได้



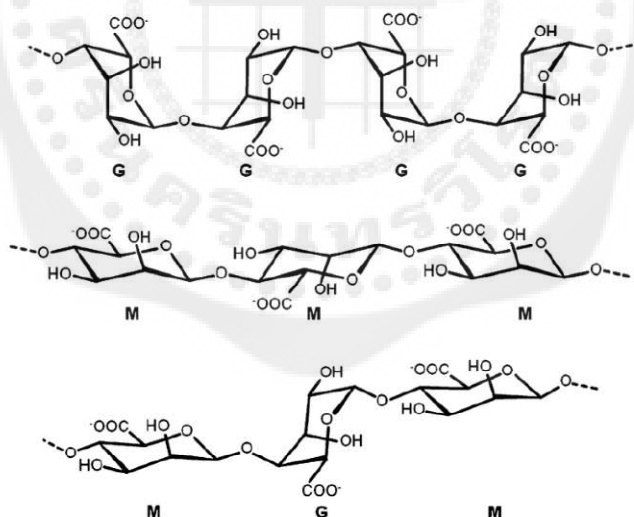
ภาพประกอบ 8 ก) โครงสร้างของไคติน ข) โครงสร้างของไคโตซาน ค) โครงสร้างของไคตินที่เกิดปฏิกิริยา deacetylation บางส่วน

ที่มา: Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science. 2006;31(7):603-32.

ไคโตซานเป็นสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย ไม่มีความเป็นพิษ มีความเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatible) และสามารถสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญได้ โดยอาศัยคุณสมบัติที่เกิดประจุบวก ทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์ประจุลบเกิดเป็น polyelectrolyte complexes ที่สามารถพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลใช้ในการกักเก็บยาหรือสารสำคัญได้

## 7.2 Alginate<sup>(32)</sup>

อัลจินตเป็นสารพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่สกัดแยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (เช่น *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*, *Ascophyllum nodosum* และ *Macrocystis pyrifera*) โอลิโกอัลจินตเป็นพอลิเมอร์ที่ให้ประจุลบ ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ให้ประจุสองบวก (divalent) เกิดเป็นเจลได้ โครงสร้างของอัลจินตประกอบด้วยโคพอลิเมอร์สองส่วนคือ (1,4)-linked  $\beta$ -d-mannuronate เรียกว่าส่วน M และ  $\alpha$ -l-guluronate เรียกว่าส่วน G (ภาพประกอบ 9) โดยในสายพอลิเมอร์สามารถประกอบด้วยส่วน G อย่างเดียว ส่วน M อย่างเดียว หรือส่วน G และ M จัดเรียงตัวอยู่ร่วมกันได้



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของอัลจินต

ที่มา: Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications.

Progress in polymer science. 2012;37(1):106-26.

อัลจิเนตมีความปลอดภัย สามารถเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatible) และสามารถสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) สามารถนำไปใช้ในระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญ โดยสามารถใช้เป็นผนังของไมโครพาร์ติเคิล ที่ใช้กักเก็บยาหรือสารสำคัญ ซึ่งให้อัลจิเนตเดี่ยว ๆ หรือใช้เป็นโคพอลิเมอร์ร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังของอนุภาคได้เช่นกัน

### 7.3 ตัวอย่างงานวิจัยไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหยจากไคโตซานและอัลจิเนตที่เตรียมด้วยวิธี coacervation

7.3.1 Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method<sup>(33)</sup>

จากผลงานวิจัยที่แสดงในงานประชุม Inside Food Symposium เมื่อปี 2013 ของ Dimaa และคณะ เรื่อง Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method ได้ทำการพัฒนาไมโครสเฟียร์ของน้ำมันหอมระเหยจากผักชี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้ไคโตซานและ/หรืออัลจิเนตเป็นส่วนประกอบร่วมกันของผนังไมโครสเฟียร์ เตรียมไมโครสเฟียร์ที่ใช้เป็นผนังสองกลุ่มคืออัลจิเนต และสารผสมของอัลจิเนตและไคโตซาน ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้คือ 1, 1.5 หรือ 2% และอัตราส่วนของอัลจิเนต : ไคโตซานที่ใช้คือ 1:2, 1:1 หรือ 3:2 การเตรียมไมโครสเฟียร์แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ

ส่วนที่หนึ่งคือการเตรียมอิมัลชันชนิด oil in water ประกอบด้วยน้ำ, สารละลายของพอลิเมอร์, สารลดแรงตึงผิว (Tween 40 ความเข้มข้น 0.5, 1 หรือ 1.5%) และน้ำมันหอมระเหย (ความเข้มข้น 20, 30 หรือ 40%) เตรียมโดย magnetic stirrer ความเร็ว 600 รอบต่อนาที ผสม 10 นาที และ sonicate นาน 5, 10 หรือ 15 นาที ที่ 20°C ความแรง 30% amplitude จนได้เป็นอิมัลชัน ส่วนที่สองคือการทำให้ผนังแข็งตัว หยดอิมัลชันผ่านเข็มฉีดยาขนาด 10 ml ที่ความสูง 15 เซนติเมตร ลงในสารละลาย 0.5M CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 50 ml จะได้เป็นไมโครสเฟียร์

ประเมินคุณภาพไมโครสเฟียร์ที่ในด้านต่าง ๆ คือ ขนาดและรูปร่าง, การพองตัวของอนุภาค, ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย อัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหย พบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไมโครสเฟียร์ พบว่าตำรับที่ดีที่สุดคือ ตำรับที่ประกอบด้วยสารผสมของอัลจิเนตต่อไคโตซานในอัตราส่วน 1:2, สารลดแรงตึงผิว 1.5% น้ำมันหอมระเหย 30% และใช้

เวลา sonicate 15 นาที ซึ่งสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้มากถึง 97.89% มีการพองตัวและการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยที่ดีเมื่อทดสอบในสภาวะ pH 4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของไมโครสเฟียร์คือ ความเข้มข้นของสารละลายตั้งผิว, ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย เวลาที่ใช้ sonicate และชนิดและสัดส่วนของพอลิเมอร์ที่ใช้ โดยพบว่าสัดส่วนของโคโคซานที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้

### 7.3.2 Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method<sup>(34)</sup>

งานวิจัยเรื่อง Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method ของ Liu, Xu และ Wang (2012) ได้พัฒนาไมโครแคปซูลของน้ำมันหอมระเหย sweet orange oil เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้อัลจิเนตและโคโคซานเป็นผนัง เตรียมโดยละลายโซเดียมอัลจิเนต (ความเข้มข้น 1.5, 2.0 หรือ 2.5 % w/v) ในน้ำที่ 50°C และเติม sweet orange oil (อัตราส่วนน้ำมันหอมระเหยต่อผนังเท่ากับ 7:1, 6:1 หรือ 5:1) และ glyceryl monostearate (0.2%w/v) ผสมโดย magnetic stirrer ที่ 50-60°C เกิดเป็นอิมัลชัน และนำอิมัลชันไปหยดใส่ gelation medium (ประกอบด้วยโคโคซาน 2%w/v ละลายใน 1% acetic acid ที่ผสมกับ CaCl<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 หรือ 2.5%w/v) ด้วยความเร็ว 60 หยดต่อนาที และปั่นผสมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จนได้ไมโครพาร์ติเคิล

เมื่อทดสอบคุณภาพของไมโครพาร์ติเคิลด้านประสิทธิภาพการกักเก็บ และอัตราการปลดปล่อยพบว่า ไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมโดยใช้โซเดียมอัลจิเนต 2.5%, CaCl<sub>2</sub> 2.0% และอัตราส่วนน้ำมันหอมระเหยต่อผนังเท่ากับ 5:1 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย 87.34%

### 7.3.3 Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil<sup>(35)</sup>

บทความของ ปราณี เลิศสุทธีวงศ์ (2011) เรื่อง Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil ได้นำเสนอแนวทางการพัฒนานาโนพาร์ติเคิลของน้ำมันขมิ้นโดยใช้โคโคซานและอัลจิเนตเป็นผนัง เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง ได้อธิบายวิธีการเตรียมแบ่งเป็นสามขั้นตอนคือ หนึ่งการเตรียมอิมัลชันชนิด oil in water โดยใช้ละลายน้ำมันขมิ้นในเอทานอล ผสมกับสารละลายอัลจิเนตที่ประกอบด้วย Tween 80<sup>®</sup> เป็นสารลดแรงตึงผิว แล้ว sonicate

จนได้อิมัลชัน ชั้นที่สองหยดอิมัลชันลงในสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  ที่มีโคโตซานเป็นส่วนประกอบ คนเป็นเวลา 30 นาที และขั้นสุดท้ายคือการระเหยตัวทำละลาย

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเตรียมนาโนพาร์ติเคิลคือสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ โดยพบว่า Tween 80<sup>®</sup> มีผลต่อขนาดอนุภาคที่เล็กระดับนาโน นอกจากนี้การ sonicate ในการเตรียมอิมัลชันยังมีผลต่อความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค คือมีขนาดที่สม่ำเสมอกว่าเมื่อเทียบกับการคนโดยไม่ sonicate และโมเลกุลของโคโตซานที่ใช้เป็นผนังยังส่งผลต่อขนาดอนุภาคเช่นกัน โดยหากใช้โคโตซานที่มีมวลโมเลกุลสูงจะได้อนุภาคขนาดใหญ่

การศึกษาข้างต้นเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหยจากโคโตซานและอัลจินต เพื่อนำไปใช้ในตำรับเครื่องสำอางได้

จากข้อมูลทีกล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม และเนื่องจากผู้วิจัยต้องการเพิ่มความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยจึงได้สนใจการพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม และศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในไมโครพาร์ติเคิลที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 เดือน

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี (Materials, Instrument and Reagents)

#### 1.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ

- 1.1.1 เครื่องแก้ว
- 1.1.2 Aluminium foil
- 1.1.3 Analytical balance (Mettler Toledo, USA)
- 1.1.4 Clevenger type equipment
- 1.1.5 Homogenizer (IKA-ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> T 8, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Germany)
- 1.1.6 Magnetic stirrer (DAIHAN Scientific Co., LTD, Korea)
- 1.1.7 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5, 5 ml (Eppendorf, Germany)
- 1.1.8 Micropipette ขนาด 20, 200, 1000  $\mu$ l (Glison, France)
- 1.1.9 Microplate reader (Molecular devices SpectraMax<sup>®</sup> M3, USA)
- 1.1.10 Needle No. 23 (Nipro, USA)
- 1.1.11 Parafilm
- 1.1.12 Pipette tip ขนาด 20, 200, 1000  $\mu$ l (Axygen, USA)
- 1.1.13 Syringe ขนาด 10 ml (Nipro, USA)
- 1.1.14 Vacuum filter set
  - 1.1.14.1 กระดาษกรอง Whatman<sup>®</sup> 93 (Whatman<sup>®</sup>, Germany)
  - 1.1.14.2 Buchner funnel (HCT, Germany)
  - 1.1.14.3 Buchner flask (Pyrex, England)
  - 1.1.14.4 Vacuum pump (GAST, USA)
- 1.1.15 Vernier (Hachi, China)

## 1.2 สารเคมี

1.2.1 น้ำมันหอมระเหย (บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด, ประเทศไทย)

1.2.1.1 rose oil

1.2.1.2 bergamot oil

1.2.1.3 patchouli oil

1.2.1.4 lemongrass oil

1.2.2 5% Chitosan solution (SL Quality supply, Thailand)

1.2.3  $\text{CaCl}_2$  (Merck KGaA, Germany)

1.2.4 Collagenase type I จาก *Clostridium histolyticum* (Sigma, USA)

1.2.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)

1.2.6 Epigallocatechin gallate (EGCG) (Sigma, USA)

1.2.7 Kojic acid (Sigma, USA)

1.2.8 L-DOPA (Sigma, USA)

1.2.9 N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, USA)

1.2.10 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (SANA) (Sigma, USA)

1.2.11  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)

1.2.12 NaCl (QRëC, New Zealand)

1.2.13  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (CARLO ERBA Reagents S.A.S, France)

1.2.14 NaOH (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)

1.2.15 Polyvinyl alcohol (PVA) (SL Quality supply, Thailand)

1.2.16 Porcine pancreatic elastase (PPE) (Sigma, USA)

1.2.17 Sterile water for irrigation (General drug house (GDH), ประเทศไทย)

1.2.18 Sodium alginate (SL Quality supply, Thailand)

1.2.19 Tricine (Sigma, USA)

1.2.20 Tris-HCl (Sigma, USA)

1.2.21 Tyrosinase (Sigma, USA)

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส<sup>(13)</sup>

#### 2.1.1 การเตรียมสาร

2.1.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine (pH 7.5) ที่ประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.01 M CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 100 ml

2.1.1.1.1 ชั่งสาร Tricine, NaCl และ CaCl<sub>2</sub> ปริมาณ 0.8959, 2.3376 และ 0.1110 g ตามลำดับ

2.1.1.1.2 ละลายด้วย Sterile water for irrigation และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

2.1.1.1.3 ปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1N NaOH จนได้ pH 7.5

2.1.1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 6.25 collagen digestion unit; CDU)

ชั่งเอนไซม์ 0.0025 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine (pH 7.5) ที่ประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.01 M CaCl<sub>2</sub> และปรับปริมาตรจนครบ 1000 µl

2.1.1.3 การเตรียมสารละลาย FALGPA (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM)

ชั่ง FALGPA 0.00381 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine (pH 7.5) ที่ประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.01 M CaCl<sub>2</sub> และปรับปริมาตรจนครบ 1000 µl

2.1.1.4 การเตรียมสารละลาย EGCG (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 µM)

ชั่ง EGCG 0.00115 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine (pH 7.5) ที่ประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.01 M CaCl<sub>2</sub> และปรับปริมาตรจนครบ 1000 µl

2.1.1.5 การเตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 1 mg/ml)

2.1.1.5.1 ชั่งน้ำมันหอมระเหย 0.01 g

2.1.1.5.2 ละลายด้วย DMSO 500  $\mu$ L

2.1.1.5.3 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine (pH 7.5) ที่ประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  จบครบ 1000  $\mu$ l

2.1.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.1.2.1 เตรียมสารละลาย EGCG 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา คือ 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ M (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบของน้ำมันหอมระเหยในข้อ 2.1.3 โดยเปลี่ยนจากสารละลายของน้ำมันหอมระเหยเป็นสารละลายของ EGCG)

2.1.2.1.1 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.1.2.1.2 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร EGCG กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า the half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

2.1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.1.3.1 Negative control

2.1.3.1.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.1.3.1.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l

2.1.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3.1.4 เติมสารละลาย FALGPA 20  $\mu$ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 750 วินาที

2.1.3.1.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม FALGPA เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.1.3.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

2.1.3.2 Positive control

2.1.3.2.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.1.3.2.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l ตามด้วยสารละลาย EGCG 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250  $\mu$ M)

2.1.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3.2.4 เติมสารละลาย FALGPA 20  $\mu$ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 750 วินาที

2.1.3.2.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม FALGPA เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.1.3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

2.1.3.3 Solvent control

2.1.3.3.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.1.3.3.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l ตามด้วยสารละลาย DMSO 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 5%v/v)

2.1.3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3.3.4 เติมสารละลาย FALGPA 20  $\mu$ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 750 วินาที

2.1.3.3.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม FALGPA เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.1.3.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

2.1.3.4 สารตัวอย่าง

2.1.3.4.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.1.3.4.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l ตามด้วยสารละลายละลายของน้ำมันหอมระเหย 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาแตกต่างกันไป โดยควบคุมให้ปริมาณ DMSO ไม่เกิน 5%v/v)

2.1.3.4.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3.4.2 เติมสารละลาย FALGPA 20  $\mu$ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยวัดเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 750 วินาที

2.1.3.4.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม FALGPA เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.1.3.4.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

ตาราง 2 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาณสารใน 96-well plate ( $\mu$ l)					
	Buffer	DMSO	EGCG	Essential oil	Enzyme	Substrate
Negative control	160	-	-	-	20	20
Blank Negative control	180	-	-	-	20	-
Positive control	140	-	20	-	20	20
Blank Positive control	160	-	20	-	20	-
Solvent control	140	20	-	-	20	20
Blank solvent control	160	20	-	-	20	-
Tested sample	140	-	-	20	20	20
Blank Tested sample	160	-	-	20	20	-

2.1.4 การหา %inhibition ของสารตัวอย่าง

2.1.4.1 หาได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\Delta Optical\ density_{control} - \Delta Optical\ density_{sample}}{\Delta Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ  $\Delta$ Optical density การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา ของ FALGPA ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample)

#### 2.1.4.1 หาค่า $IC_{50}$ ของสารตัวอย่าง

โดยใช้ค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

## 2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสด้วย Porcine pancreatic elastase (PPE)<sup>(7)</sup>

### 2.2.1 การเตรียมสาร

#### 2.2.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 M Tris – HCl buffer pH 8.0

##### 2.2.1.1.1 ชั่งสาร Tris-HCl 3.152 g

2.2.1.1.2 ละลายด้วย Sterile water for irrigation และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

##### 2.2.1.1.3 ปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1N NaOH จนได้ pH 8.0

2.2.1.2 การเตรียมสารละลาย PPE type IV (4.5 unit/mg solid) เตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 10  $\mu$ g/ml

ซึ่งเอนไซม์ 0.0001 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1000  $\mu$ l

2.2.1.3 การเตรียมสารละลาย N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (SANA) (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM)

ซึ่ง SANA 0.00361 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และปรับปริมาตรจนครบ 1000  $\mu$ l

2.2.1.4 การเตรียมสารละลาย EGCG (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 500  $\mu$ M)

ซึ่ง EGCG 0.0023 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และปรับปริมาตรจนครบ 1000  $\mu$ l

2.2.1.5 การเตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 4 mg/ml)

2.2.1.5.1 ซึ่งน้ำมันหอมระเหย 0.04 g

2.2.1.5.2 ละลายด้วย DMSO 100  $\mu$ L

2.2.1.5.3 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1000  $\mu$ l

## 2.2.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.2.2.1 เตรียมสารละลาย EGCG 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา คือ 187.5, 375, 750, 1500, 3000  $\mu$ M (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบของน้ำมันหอมระเหยในข้อ 2.2.3 โดยเปลี่ยนจากสารละลายของน้ำมันหอมระเหยเป็นสารละลายของ EGCG)

2.2.2.2 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของ PPE ทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.2.2.3 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร EGCG กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

### 2.2.3.1 Negative control

2.2.3.1.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.2.3.1.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l

2.2.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.1.4 เติมสารละลาย SANA 20  $\mu$ l และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 nm

2.2.3.1.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม PPE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.2.3.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

#### 2.2.3.2 Positive control

2.2.3.2.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.2.3.2.2 ใส่สารละลาย EGCG 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 500  $\mu$ M) ตามด้วยสารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ M

2.2.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.2.4 เติมสารละลาย SANA 20  $\mu$ l และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 nm

2.2.3.2.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม PPE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.2.3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

#### 2.2.3.2 Solvent control

2.2.3.2.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.2.3.2.2 ใส่สารละลาย DMSO 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 1%v/v) ตามด้วยสารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l

2.2.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.2.4 เติมสารละลาย SANA 20  $\mu$ l และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 nm

2.2.3.2.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม PPE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.2.3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

#### 2.2.3.4 สารตัวอย่าง

2.2.3.4.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 160  $\mu$ l

2.2.3.4.2 ใส่สารละลายละลายของน้ำมันหอมระเหย 20  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาแตกต่างกันไป โดยควบคุมให้ปริมาณ DMSO ไม่เกิน 1%v/v) ตามด้วยสารละลายเอนไซม์ 20  $\mu$ l

2.2.3.4.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.4.4 เติมสารละลาย SANA 20  $\mu$ l และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 nm

2.2.3.4.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม PPE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.2.3.4.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

ตาราง 3 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPE

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate ( $\mu$ l)					
	Buffer	DMSO	EGCG	Essential oil	Enzyme	Substrate
Negative control	160	-	-	-	20	20
Blank Negative control	180	-	-	-	-	20
Positive control	140	-	20	-	20	20
Blank Positive control	160	-	20	-	-	20
Solvent control	140	20	-	-	20	20
Blank solvent control	160	20	-	-	-	20
Tested sample	140	-	-	20	20	20
Blank Tested sample	160	-	-	20	-	20

2.2.4 การหา %inhibition ของสารตัวอย่าง

2.2.4.1 หาได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 2.2.4.2 หาค่า $IC_{50}$ ของสารตัวอย่าง

โดยใช้ค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

## 2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส<sup>(18)</sup>

### 2.3.1 การเตรียมสาร

#### 2.3.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Phosphate buffer pH 6.8

2.3.1.1.1 ชั่งสาร  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  3.1202 g ละลายด้วย sterile water for irrigation ปริมาตร 100 ml

2.3.1.1.2 ชั่งสาร  $Na_2HPO_4$  3.5610 g ละลายด้วย sterile water for irrigation ปริมาตร 100 ml

2.3.1.1.3 นำสารละลาย  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  24.5 ml ผสมกับสารละลาย  $Na_2HPO_4$  25.5 ml

2.3.1.1.4 แล้วปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation จนได้ 100 ml

2.3.1.1.5 ปรับ pH ด้วยสารละลาย  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  หรือสารละลาย  $Na_2HPO_4$  จนได้ pH 6.8

2.3.1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 624.2 unit/ml)

ชั่งเอนไซม์ 0.00029 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จวบครบ 1000  $\mu$ l

2.3.1.3 การเตรียมสารละลาย L-DOPA (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 10 mM)

ซึ่ง L-DOPA 0.00394 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และปรับปริมาตรจวบครบ 2000  $\mu$ l

2.3.1.4 การเตรียมสารละลาย kojic acid (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 50  $\mu$ g/ml หรือคิดเป็น 0.35 mM)

2.3.1.4.1 ซึ่ง kojic acid 0.001 g ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และปรับปริมาตรจวบครบ 1000  $\mu$ l

2.3.1.4.2 นำสารละลายมา 250  $\mu$ l ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จวบครบ 1000  $\mu$ l

2.3.1.5 การเตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 4 mg/ml)

2.3.1.5.1 ซึ่งน้ำมันหอมระเหย 0.04 g

2.3.1.5.2 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จวบครบ 1000  $\mu$ l

2.3.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.3.2.1 เตรียมสารละลาย kojic acid 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา คือ 10, 20, 30, 40 และ 50  $\mu$ g/ml (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบของน้ำมันหอมระเหยในข้อ 2.3.3 โดยเปลี่ยนจากสารละลายของน้ำมันหอมระเหยเป็นสารละลายของ kojic acid)

2.3.2.2 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.3.2.3 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร kojic acid กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil, patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

#### 2.3.3.1 Negative control

2.3.3.1.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 130  $\mu$ l

2.3.3.1.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ 30  $\mu$ l

2.3.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.3.3.1.4 เติมสารละลาย L-DOPA 40  $\mu$ l และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 475 nm

2.3.3.1.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม Tyrosinase เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.3.3.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

#### 2.3.3.2 Positive control

2.3.3.2.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 90  $\mu$ l

2.3.3.2.2 ใส่สารละลาย kojic acid 40  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 50  $\mu$ g/ml หรือคิดเป็น 0.35 mM) ตามด้วยใส่สารละลายเอนไซม์ 30  $\mu$ l

2.3.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.3.3.2.4 เติมสารละลาย L-DOPA 40  $\mu$ l และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 475 nm

2.3.3.2.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม Tyrosinase เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.3.3.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

#### 2.3.3.3 สารตัวอย่าง

2.3.3.3.1 เตรียม 96-well plate โดยใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 50  $\mu$ l

2.3.3.3.2 ใส่สารละลายละลายของน้ำมันหอมระเหย 80  $\mu$ l (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาแตกต่างกันไป) ตามด้วยสารละลายเอนไซม์ 30  $\mu$ l

2.3.3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.3.3.3.4 เติมสารละลาย L-DOPA 40  $\mu$ l และ Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 475 nm

2.3.3.3.5 ทำ blank โดยเปลี่ยนจากการเติม Tyrosinase เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

2.3.3.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

ตาราง 4 ตารางการใส่สารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tyrosinase

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate ( $\mu$ l)				
	Buffer	Kojic acid	Essential oil	Enzyme	Substrate
Negative control	130	-	-	30	40
Blank Negative control	160	-	-	-	40
Positive control	90	40	-	30	40
Blank Positive control	120	40	-	-	40
Tested sample	50	-	80	30	40
Blank Tested sample	80	-	80	-	40

2.3.4 การหา %inhibition ของสารตัวอย่าง

2.3.4.1 หาได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 2.3.4.2 หาค่า $IC_{50}$ ของสารตัวอย่าง

โดยใช้ค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า  $IC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

## 2.4 การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิล <sup>(33, 36)</sup>

### 2.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครพาร์ทิเคิล

2.4.1.1 เตรียมไมโครพาร์ทิเคิลด้วยสูตรต่าง ๆ 5 สูตร (ตาราง 5) โดยใช้น้ำมันตะไคร้เป็นน้ำมันหอมระเหยแทนน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

ตาราง 5 สูตรตำรับไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันตะไคร้

สารเคมี	ปริมาณ				
	สูตรที่ 1 <sup>ก</sup>	สูตรที่ 2 <sup>ข</sup>	สูตรที่ 3 <sup>ค</sup>	สูตรที่ 4 <sup>ง</sup>	สูตรที่ 5 <sup>จ</sup>
Sodium alginate	1.67 g	1.00 g	0.67 g	0.67 g	1.00 g
5% Chitosan	66.67 ml (chitosan 3.33 g)	40.00 ml (chitosan 2.00 g)	26.60 ml (chitosan 1.33 g)	26.60 ml (chitosan 1.33 g)	50 ml (chitosan 2.50 g)
PVA	1.25 g	1.25 g	1.25 g	0.50 g	0.50 g
Lemongrass oil	5.00 g	5.00 g	5.00 g	5.00 g	5.00 g
Purified water q.s. to	100.00 g	100.00 g	100.00 g	100.00 g	100.00 g

ก. สูตรที่ 1 คือ 5% polymer ในสัดส่วน Sodium alginate : Chitosan เท่ากับ 1:2 และ 1.25% PVA

ข. สูตรที่ 2 คือ 3% polymer ในสัดส่วน Sodium alginate : Chitosan เท่ากับ 1:2 และ 1.25% PVA

- ค. สูตรที่ 3 คือ 2% polymer ในสัดส่วน Sodium alginate : Chitosan เท่ากับ 1:2 และ 1.25% PVA
- ง. สูตรที่ 4 คือ 2% polymer ในสัดส่วน Sodium alginate : Chitosan เท่ากับ 1:2 และ 0.5% PVA
- จ. สูตรที่ 5 คือ 2% Sodium alginate เคลือบด้วย 5%chitosan และ 0.5% PVA

#### 2.4.1.2 วิธีการเตรียม

##### 2.4.1.2.1 สูตรที่ 1, 2, 3 และ 4

###### 2.4.1.2.1.1 เตรียมอิมัลชันชนิด oil in water

2.4.1.2.1.1.1 ผสม Sodium alginate, 5%Chitosan, PVA และ purified water ให้เข้ากันด้วย homogenizer ความเร็วเบอร์ 6 (25,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที

2.4.1.2.1.1.2 เติมน้ำมันหอมระเหยลงผสม ผสมส่วนประกอบทุกส่วนให้เข้ากันด้วย homogenizer ความเร็วเบอร์ 6 (25,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที จนเกิดเป็นอิมัลชัน

###### 2.4.1.2.1.2 การเตรียมไมโครพาร์ทิเคิล

2.4.1.2.1.2.1 นำอิมัลชันที่ได้ใส่หลอดฉีดยา 10 ml แล้วฉีดผ่านเข็มขนาด 23 โดยตั้งปลายเข็มให้สูงจากสารละลาย 15 เซนติเมตร

2.4.1.2.1.2.2 หยดอิมัลชันลงในสารละลาย 10%  $\text{CaCl}_2$  ปริมาตร 100 ml ที่ตั้งอยู่บน magnetic stirrer 600 รอบต่อนาที เกิดเป็นไมโครพาร์ทิเคิล

2.4.1.2.1.2.3 แซ่ไมโครพาร์ทิเคิลที่เกิดขึ้นทิ้งไว้ในสารละลาย 10%  $\text{CaCl}_2$  ปริมาตร 100 ml ที่ตั้งอยู่บน magnetic stirrer 600 รอบต่อนาที 30 นาที

2.4.1.2.1.2.4 กรองไมโครพาร์ทิเคิลด้วย vacuum filter แล้วตั้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่มืด นานจนกว่าไมโครพาร์ทิเคิลแห้ง

##### 2.4.1.2.2 สูตรที่ 5

###### 2.4.1.2.2.1 เตรียมอิมัลชันชนิด oil in water

2.4.1.2.2.1.1 ผสม Sodium alginate, PVA และ purified water ให้เข้ากันด้วย homogenizer ความเร็วเบอร์ 6 (25,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที

2.4.1.2.2.1.2 เติมน้ำมันหอมระเหยลงผสม ผสมส่วนประกอบทุกส่วนให้เข้ากันด้วย homogenizer ความเร็วเบอร์ 6 (25,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที จนเกิดเป็นอิมัลชัน

#### 2.4.1.2.2.2 การเตรียมไมโครพาร์ทิเคิล

2.4.1.2.2.2.1 นำอิมัลชันที่ได้ใส่หลอดฉีดยา 10 ml แล้วฉีดผ่านเข็มขนาด 23 โดยตั้งปลายเข็มให้สูงจากสารละลาย 15 เซนติเมตร

2.4.1.2.2.2.2 หยดอิมัลชันลงในสารละลาย 10% CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 100 ml ที่ตั้งอยู่บน magnetic stirrer 600 รอบต่อนาที เกิดเป็นไมโครพาร์ทิเคิล

2.4.1.2.2.2.3 แยกไมโครพาร์ทิเคิลที่ได้ ไปแช่ใน 5% chitosan 50 ml ที่ตั้งอยู่บน magnetic stirrer 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

2.4.1.2.2.2.4 แยกไมโครพาร์ทิเคิลที่ได้ ไปแช่ใน 1% CaCl<sub>2</sub> 100 ml ที่ตั้งอยู่บน magnetic stirrer 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

2.4.1.2.2.2.5 กรองไมโครพาร์ทิเคิลด้วย vacuum filter แล้วตั้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่มืด นานจนกว่าไมโครพาร์ทิเคิลแห้ง

2.4.1.3 การประเมินคุณภาพของไมโครพาร์ทิเคิลน้ำมันตะไคร้เพื่อหาสูตรที่ดีที่สุดไปพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมต่อไป<sup>(37)</sup>

2.4.1.3.1 ใช้ไมโครพาร์ทิเคิลทั้งหมดที่เตรียมได้จากอิมัลชัน 50 g ใส่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 300 ml กลั่นด้วย Clevenger-type apparatus นาน 8 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้

2.4.1.3.2 คำนวณประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย (% Encapsulation efficiency; %EE) จากสมการ ด้านล่าง เพื่อเลือกสูตรตำรับที่ให้ค่า %EE ดีที่สุดและใช้ปริมาณสารพอลิเมอร์ในตำรับน้อยที่สุด

$$%EE = \frac{V}{V_0} \times 100$$

เมื่อ  $V$  คือ ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นเมื่อด้วย Clevenger-type apparatus นาน 8 ชั่วโมง และ  $V_0$  คือ ปริมาตรน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่ใช้เตรียมไมโครพาร์ทิเคิลทั้งหมดที่เตรียมได้จากอิมัลชัน 50 g

2.4.1.3.3 เลือกสูตรตำรับที่ให้ %EE ดีที่สุดไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

2.4.2 การพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

2.4.2.1 เลือกตำรับจากข้อ 2.4.1.1 ที่มีค่า %EE ดีที่สุดมาพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลโดยใช้วิธีการเตรียมเดียวกัน เพียงแต่เปลี่ยนน้ำมันตะไคร้เป็นน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1

2.4.2.2 นำไมโครพาร์ทิเคิลที่พัฒนาขึ้นไปประเมินคุณภาพ 4 ด้านคือ ขนาดอนุภาค, การพองตัวของอนุภาค (swelling measurement; % $S_w$ ), ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย (%EE) และอัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยจากไมโครแคปซูล (cumulative release; %R)<sup>(33, 37)</sup>

2.4.2.2.1 ขนาดของอนุภาค

2.4.2.2.1.1 วัดขนาดอนุภาคด้วย Vernier จำนวน 20 อนุภาค

2.4.2.2.1.2 หาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดอนุภาคที่วัดได้

2.4.2.2.2 การพองตัวของอนุภาค (swelling measurement; % $S_w$ )

2.4.2.2.2.1 ชั่งไมโครแคปซูล 1 g ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 25 ml ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง

2.4.2.2.2.2 นำไมโครแคปซูลที่พองตัว ชั่งน้ำหนักส่วนเกินด้วยกระดาษทิชชู แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

2.4.2.2.2.3 คำนวณค่าการพองตัวของไมโครแคปซูลจากสมการ

$$S_w\% = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

เมื่อ  $S_w$  คือ ค่าการพองตัวของไมโครแคปซูล,  $W_i$  คือ น้ำหนักของไมโครแคปซูลหลังจากแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ และ  $W_0$  คือ น้ำหนักของไมโครแคปซูลก่อนแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์

#### 2.4.2.2.3 ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย (%EE)

ทำเหมือนวิธีการทดสอบข้อ 2.4.1.3.2

2.4.2.2.4 อัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยจากไมโครแคปซูล (cumulative release; %R)

2.4.2.2.4.1 ใช้ไมโครพาร์ทิเคิลทั้งหมดที่เตรียมได้จากอิมัลชัน 50 g ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml กลั่นด้วย Cleverger-type apparatus นาน 8 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ทุก ๆ 30-60 นาที ต่อเนื่อง 8 ชั่วโมง

2.4.2.2.4.2 คำนวณ % Cumulative release (%R) จากสมการ

$$\%R = \frac{V_i}{V} \times 100$$

เมื่อ  $V$  คือ ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นนาน 8 ชั่วโมง และ  $V_i$  คือ ปริมาตรน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นที่เวลาต่าง ๆ

2.4.2.2.4.3 นำค่า %R ที่นาที่ต่าง ๆ มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมันที่วัดได้กับเวลาที่ผ่านไป

## 2.5 การศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในไมโครพาร์ทิเคิล

### 2.5.1 การเก็บไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

2.5.1.1 เก็บไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากอิมัลชัน 50 g ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 เดือน

2.5.1.2 นำตัวอย่างมาตรวจสอบความคงสภาพโดยหาค่าขนาดอนุภาค, %S<sub>w</sub>, %EE และ %R โดยนำตัวอย่างมาทดสอบเมื่อเก็บตัวอย่างไว้ 0, 1 และ 3 เดือน วิธีการทดสอบทำวิธีข้อ

2.4.2.2

2.5.1.3 เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ที่เวลาต่าง ๆ กับที่เวลาเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ด้วยวิธีการทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ใช้สถิติ One-way ANOVA เปรียบเทียบ ขนาดอนุภาคของไมโครพาร์ทิเคิล และเปรียบเทียบค่า %S<sub>w</sub>, %EE และ %R โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ที่เวลาเริ่มต้นเปรียบเทียบกับเมื่อเก็บไว้ 1 เดือน และที่เวลาเริ่มต้นเปรียบเทียบกับเมื่อเก็บไว้ 3 เดือน



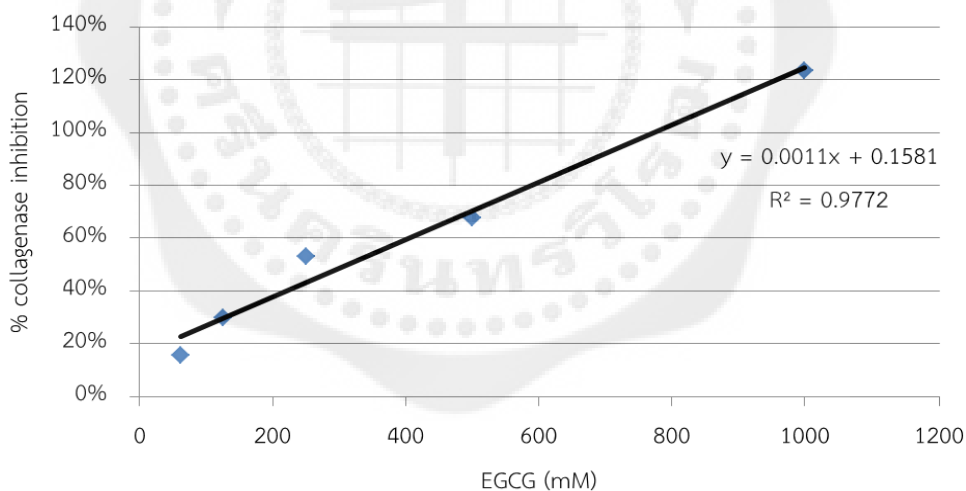
## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

#### 1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

##### 1.1 การทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

ผลการทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์โดยใช้ EGCG ที่เป็นสารควบคุมเชิงบวกแทนสารตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า วิธีการทดสอบนี้สามารถใช้ทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ โดยพิจารณาจากกราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %collagenase inhibition พบว่าได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9772 และเมื่อนำสมการเส้นตรงที่ได้จากหาความสัมพันธ์ คือ  $y = 0.0011x + 0.1581$  ไปคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ได้ค่าเท่ากับ 310.82  $\mu\text{M}$



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %collagenase inhibition

##### 1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทั้งสามชนิดและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนั้นพบว่า น้ำมันหอมระเหยไม่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ จึงใช้ 5%v/v DMSO เป็นตัวช่วยในการละลาย อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทุกชนิดสามารถละลายได้สูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1

mg/ml และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 mg/ml เมื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

ตาราง 6 %collagenase inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

น้ำมันหอมระเหย	%collagenase Inhibition ของน้ำมันหอมระเหย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg/mL)						
	0.125	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5
Rose oil	0%	0%	0%	0%	0%	N/A	N/A
Bergamot oil	0%	0%	0%	0%	0%	N/A	N/A
Patchouli oil	0%	0%	0%	0%	0%	N/A	N/A
น้ำมันหอมระเหยสูตรผสม*	N/A	N/A	N/A	0%	0%	0%	0%

\*rose oil: bergamot oil: patchouli oil (6:3:1), N/A หมายถึงไม่มีการทดสอบที่ความเข้มข้นนั้น ๆ

เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของ DMSO เป็น 10%v/v แล้วพบว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถละลายได้สูงสุดคือ 2.5 mg/ml แต่เมื่อทดสอบ solvent control คือใช้ 10%v/v DMSO ใส่แทนสารตัวอย่าง พบว่า 10%v/v DMSO สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ 28.67% จึงไม่สามารถใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบได้เนื่องจากจะรบกวนผลการทดลอง

ตาราง 7 %collagenase inhibition ของสารละลาย 10%v/v DMSO

สารตัวอย่าง	%collagenase Inhibition			
	ทดสอบครั้งที่	ทดสอบครั้งที่	ทดสอบครั้งที่	ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
5%v/v DMSO	0%	0%	0%	0%
10%v/v DMSO	28%	29%	29%	28.67%

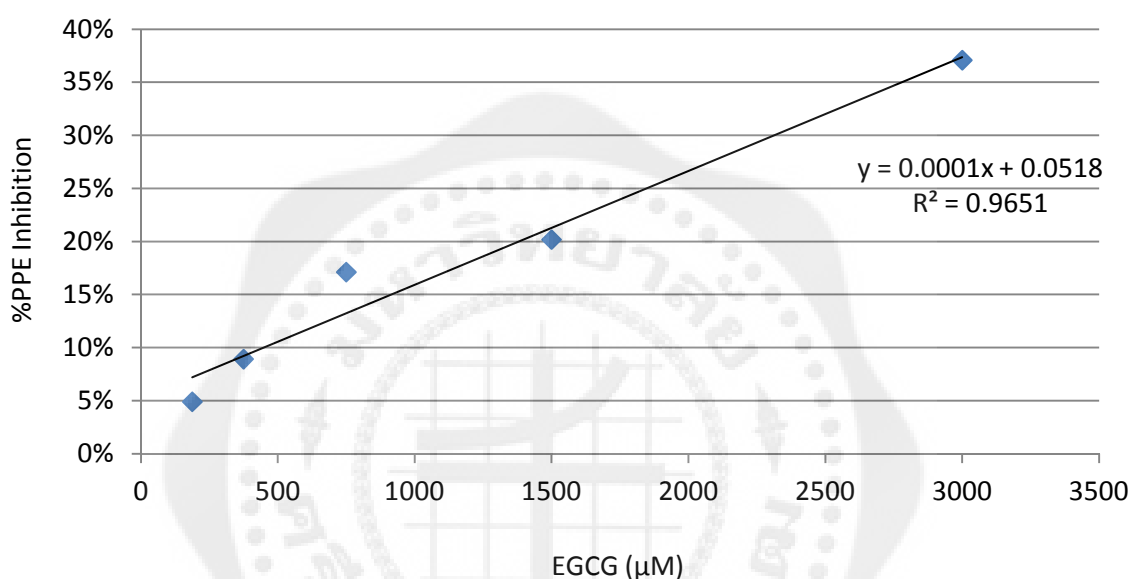
ผลการวิจัยที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของน้ำมันหอมระเหยทั้งน้ำมันเดี่ยวและน้ำมันผสม สอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรมที่ไม่พบการรายงานน้ำมันหอมระเหยหรือสารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ทดสอบมีคุณสมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้เลย อย่างไรก็ตามจากการวิจัยนี้ยังไม่อาจสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทั้งสามชนิด และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เนื่องจากความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบเป็นความเข้มข้นที่ยังต่ำ แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดในการละลายของน้ำมันหอมระเหยด้วย DMSO ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการเพิ่มการละลายของน้ำมันหอมระเหยวิธีอื่น ๆ ที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อไปเพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น

## 2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสด้วย Porcine pancreatic elastase (PPE)

### 2.1 การทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

ผลการทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์โดยใช้ EGCG ที่เป็นสารควบคุมเชิงบวกแทนสารตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า วิธีการทดสอบนี้สามารถใช้ทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPE ได้ โดยพิจารณาจากกราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %PPE inhibition พบว่าได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9651 และเมื่อนำสมการเส้นตรงที่ได้จากหาความสัมพันธ์ คือ  $y = 0.0001x + 0.0518$  อย่างไรก็ตามในการคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ยังไม่

สามารถทำได้เนื่องจากกราฟที่ได้นั้น ไม่ได้คลุมช่วงความเข้มข้นที่มีค่า %PPE inhibition มากกว่า 50% เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปคือ 12 mM พบว่าค่า %PPE inhibition มีค่า 41.23 % แสดงว่าที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นนั้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไม่แสดงความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับค่าความเข้มข้นของ EGCG อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ให้ผลของกราฟออกมาเป็นเส้นตรงในช่วง 187.5 - 3,000  $\mu\text{M}$  แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบนี้สามารถนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อไปได้



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร EGCG กับ %PPE inhibition

## 2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPE ของน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทั้งสามชนิดและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนั้นพบว่า น้ำมันหอมระเหยไม่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ จึงใช้ 1%v/v DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา) เป็นตัวช่วยในการละลาย เนื่องจากการทดสอบ solvent control พบว่าการใช้ 1% v/v DMSO เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPE

น้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมทุกชนิดสามารถละลายได้สูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2 mg/ml แต่ทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้ายสูงสุดที่ 4 mg/ml โดยที่ความเข้มข้นนี้ ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่นำไปทดสอบจะมีลักษณะเป็นอิมัลชัน

เมื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPE พบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

ตาราง 8 %PPE inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

น้ำมันหอมระเหย	%PPE Inhibition ของน้ำมันหอมระเหย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg/mL)				
	0.25	0.5	1	2	4
Rose oil	0%	0%	0%	0%	0%
Bergamot oil	0%	0%	0%	0%	0%
Patchouli oil	0%	0%	0%	0%	0%
น้ำมันหอมระเหยสูตรผสม*	0%	0%	0%	0%	0%

\*rose oil: bergamot oil: patchouli oil (6:3:1)

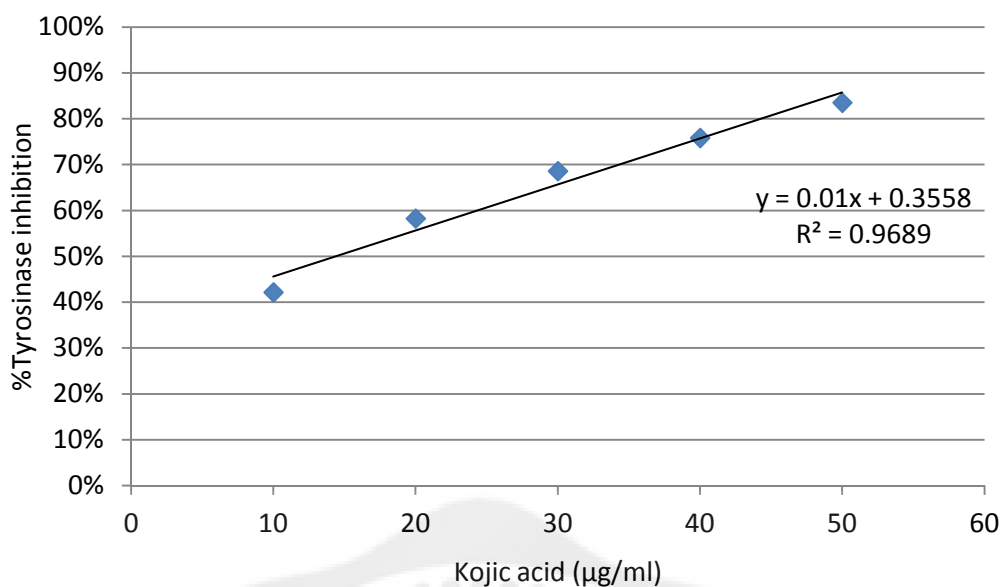
ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Masahiro Mori และคณะในปี 2002 ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE ของน้ำมันหอมระเหย ที่พบว่า bergamot oil ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE นอกจากนี้ Masahiro Mori และคณะยังได้ทดสอบฤทธิ์ของ lemon oil (พืชวงศ์เดียวกับ bergamot) ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml พบว่า lemon oil มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE ได้มากกว่า 80% โดยน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด (bergamot oil และ lemon oil) ต่างก็มีสาร limonene ที่เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของ แต่เมื่อนำ limonene ไปทำทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง PPE พบว่าที่ความเข้มข้น 250 µg/ml limonene สามารถยับยั้งการทำงานของ PPE ได้เพียงประมาณ 50% ดังนั้น limonene จึงไม่ได้เป็นสารหลักที่ยับยั้งการทำงานของ PPE ใน lemon oil แต่อาจจะเป็นสารชนิดอื่น ๆ ในที่ช่วยเสริมฤทธิ์กันมากกว่า ดังนั้นการที่ bergamot oil ไม่มีฤทธิ์อาจเกิดจากมีปริมาณ limonene น้อยเกินไปจนไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ PPE หรืออาจมีสารอื่น ๆ ที่หักล้างฤทธิ์ของ limonene ก็เป็นไปได้

จากข้อมูลของ Masahiro Mori และคณะ แสดงให้เห็นว่า bergamot oil ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE ทำให้ในงานวิจัยนี้ทดลองผสมน้ำมัน bergamot oil ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ คือ rose oil และ patchouli oil โดยหวังให้ส่วนประกอบของน้ำมันที่ผสมกันช่วยเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการทำงานของ PPE แต่ผลการวิจัยนั้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของทั้ง rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ PPE เลย อย่างไรก็ตามจากการวิจัยนี้ยังไม่อาจสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทั้งสามชนิด และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เนื่องด้วยข้อจำกัดในการละลายของน้ำมันหอมระเหยด้วย DMSO ในสารละลายบัฟเฟอร์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการเพิ่มการละลายของน้ำมันหอมระเหยวิธีอื่น ๆ ที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อไปเพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นสูงขึ้น

### 3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

#### 3.1 การทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

ผลการทดสอบการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์โดยใช้ Kojic acid ที่เป็นสารควบคุมเชิงบวกแทนสารตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า วิธีการทดสอบนี้สามารถใช้ทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยพิจารณาจากกราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร Kojic acid กับ %Tyrosinase inhibition พบว่าได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9689 และเมื่อนำสมการเส้นตรงที่ได้จากหาความสัมพันธ์ คือ  $y = 0.01x + 0.3558$  เมื่อกำหนดหาค่า  $IC_{50}$  ได้เท่ากับ 14.42  $\mu\text{g/ml}$



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงของความเข้มข้นของสาร kojic acid กับ %Tyrosinase inhibition

### 3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวทั้งสามชนิดและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนั้นพบว่า น้ำมันหอมระเหยไม่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ จึงทดลองใช้ DMSO และ ethanol เป็นตัวช่วยในการละลาย เนื่องจากการทดสอบ solvent control พบว่าการใช้ DMSO และ ethanol ทุกความเข้มข้น (เริ่มทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO และ ethanol เท่ากับ 1%v/v) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงเลือกที่จะไม่ใช้ตัวทำละลายในการทดสอบนี้

อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมทุกชนิดสามารถละลายได้สูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mg/ml แต่ทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้ายสูงสุดที่ 4 mg/ml โดยที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5 mg/ml ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่นำไปทดสอบจะมีลักษณะเป็นอิมัลชัน เมื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 %tyrosinase inhibition ของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวของ rose oil, bergamot oil และ patchouli oil และของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

น้ำมันหอมระเหย	%tyrosinase Inhibition ของน้ำมันหอมระเหย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg/mL)					
	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	4.00
Rose oil	6±3.3%	7±1.9%	9±1.9%	7±8.5%	17±10.4%	28±14.2%
Bergamot oil	8±8.8%	18±4.6%	21±1.7%	19±2.1%	16±5.7%	21±10.7%
Patchouli oil	4±4.7%	3±0.9%	1±1.1%	1±4.9%	1±3.7%	0%
น้ำมันหอมระเหย สูตรผสม*	9±2.7%	6±1.42%	5±2.8%	6±5.5%	9±4.6%	45±4.6%

\*rose oil: bergamot oil: patchouli oil (6:3:1)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว rose oil, bergamot oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่น้ำมัน patchouli oil มีแนวโน้มที่จะไม่ฤทธิ์

โดยค่า %tyrosinase inhibition ที่คำนวณได้ในแต่การทดสอบนั้นพบว่าไม่มีค่าที่ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น และยังมีค่าความเบี่ยงเบนที่สูงโดยเฉพาะตัวอย่างที่ความเข้มข้นสูง ๆ อาจเกิดเนื่องจากความขุ่นของสารทดสอบที่ใช้ในปฏิกิริยาทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อย่างไรก็ตามสามารถกล่าวได้ว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว rose oil, bergamot oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งน้ำมันเดี่ยวและน้ำมันผสมไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสและอีลาสเตสที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ แต่ rose oil, bergamot oil และน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

โทโรซิเนสได้ แต่ยังคงจำเป็นต้องทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นไป อย่างไรก็ตามเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมนี้ (rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1) มีรายงานฤทธิ์ต้านผิวและต้านอนุมูลอิสระที่ดี หากต้องการนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมสูตรนี้ไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ และอ้างฤทธิ์ชะลอวัยเพิ่มเติม ควรนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมสูตรนี้มาผสมกับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ ที่มีรายงานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส และ/หรือเอนไซม์อีลาสเตส และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง ก็จะเป็นแนวทางอีกทางหนึ่งที่จะสามารถใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์นั้นได้อีกทางหนึ่ง

นอกจากนี้หากต้องการนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมสูตรนี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์นั้นอาจมีความเป็นไปได้ต่ำ เนื่องจากต้นทุนของวัตถุดิบที่สูงของ rose oil ดังนั้นหากต้องการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ควรทำการศึกษาว่าสารที่เป็นองค์ประกอบใดของ rose oil มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ และหาน้ำมันหอมระเหยจากพืชแหล่งอื่น ๆ ที่มีสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ และราคาถูกกว่ามาใช้ทดแทน แต่ทั้งนี้ต้องนำน้ำมันหอมระเหยจากแหล่งนั้น ๆ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนเพื่อให้แน่ใจว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับน้ำมันหอมระเหยต้นแบบ ก่อนที่จะนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

#### 4. การพัฒนาไมโครพาร์ติเคิล

##### 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครพาร์ติเคิล

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหยนั้น ได้พัฒนาไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันตะไคร้เพื่อใช้เป็นตัวแทนของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม เนื่องจากมีค่าความหนาแน่นที่ใกล้เคียงกัน และมีราคาถูกกว่า โดยเมื่อพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันตะไคร้จากสูตรตำรับที่ 1-5 แล้วพบว่าสูตรที่ 1 ไม่สามารถพัฒนาเป็นไมโครพาร์ติเคิลได้ เนื่องจากอิมัลชันที่เตรียมมีความหนืดที่สูงเกินไป ไม่สามารถนำไปหยดผ่านเข็มเบอร์ 23 ให้เป็นไมโครพาร์ติเคิลทรงกลมได้ สำหรับสูตรตำรับที่ 2, 3, 4 และ 5 สามารถเตรียมได้เป็นไมโครพาร์ติเคิลทรงกลมที่มีค่า %EE ดังแสดงในตารางที่ 10

ตาราง 10 %EE ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันตะไคร้

สูตรที่	%EE
1	เตรียมไมโครพาร์ทิเคิลไม่ได้ เนื่องจากอิมัลชันมีความหนืดมากเกินไป
2	35.18 %
3	44.01 %
4	31.67 %
5	35.10 %

เมื่อพิจารณาจากค่า %EE พบว่าไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสูตรที่ 3 คือ 2% polymer ในสัดส่วน Sodium alginate : Chitosan เท่ากับ 1:2 และ 1.25% PVA ให้ค่า %EE สูงที่สุดคือ 44.01% จะได้นำไมโครพาร์ทิเคิลสูตรนี้ไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ต่อไป

#### 4.2 การพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

เมื่อเตรียมไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมจากสูตรที่ 3 ข้างต้นคือเตรียมโดยวิธี complex coacervation ด้วยการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยใช้ sodium alginate : chitosan อัตราส่วน 1:2 ผสมกันเป็นผนังที่ความเข้มข้น 2% และใช้ PVA 1.25% เป็นสารทำอิมัลชันได้ไมโครพาร์ทิเคิลทรงกลม สีเหลือง ลักษณะดังภาพประกอบ 13

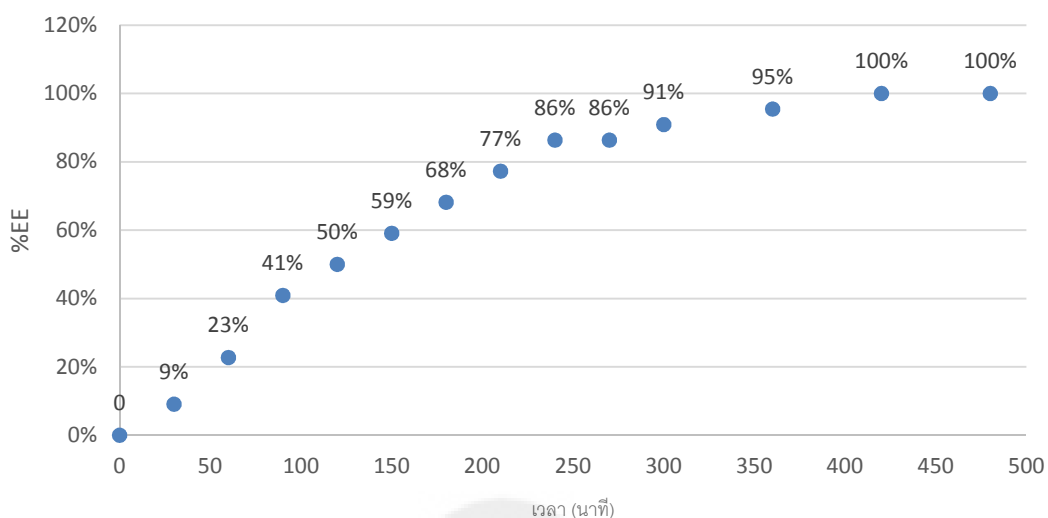


ภาพประกอบ 13 ไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

พบว่าสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ได้ ซึ่งเมื่อทดสอบคุณสมบัติของไมโครพาร์ทิเคิลได้ผลคือขนาดอนุภาคเฉลี่ย  $1.04 \pm 0.25$  mm, %S<sub>w</sub> 50.24%, %EE 39.57% และ %R เป็นดังแสดงในตาราง 11 และภาพประกอบ 14

ตาราง 11 %R ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมจากสูตรที่ 3

เวลา (นาทีก)	ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย (ml)	%R
0	0	0
30	0.1	9%
60	0.25	23%
90	0.45	41%
120	0.55	50%
150	0.65	59%
180	0.75	68%
210	0.85	77%
240	0.95	86%
270	0.95	86%
300	1	91%
360	1.05	95%
420	1.1	100%
480	1.1	100%



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดง %R ที่เวลาต่าง ๆ ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม

ไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ที่เตรียมโดยวิธี complex coacervation ด้วยการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยใช้ sodium alginate : chitosan อัตราส่วน 1:2 ผสมกันเป็นผนังที่ความเข้มข้น 2% และใช้ PVA 1.25% เป็นสารทำอิมัลชันให้ค่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ดีที่สุด คือมีค่า %EE เท่ากับ 39.57% มีค่าการพองตัวของไมโครพาร์ทิเคิลเมื่อทดสอบใน pH 5.5 เท่ากับ 50.24% แสดงอัตราการปลดปล่อยของน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกมาจากไมโครพาร์ทิเคิลเมื่อเวลาผ่านไป

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสูตรตำรับของไมโครพาร์ทิเคิลที่พัฒนาขึ้นสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ แต่มีความสามารถในการกักเก็บที่ต่ำ คือมีค่า %EE 39.57% หนึ่งในปัจจัยที่เป็นสาเหตุคือคุณภาพของ wall material ซึ่งในที่นี้คือ sodium alginate และ chitosan รวมไปถึงคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้คือ PVA ด้วยเช่นกัน เนื่องจากสารทั้งสามชนิดที่มีใช้นั้นมีอยู่หลายระดับ ในการทดลองครั้งนี้ใช้สารเคมีที่เป็น commercial grade ซึ่งไม่ได้ระบุคุณสมบัติเฉพาะของสาร เช่น %guluronic acid subunits และ % mannuronic acid subunits ของ sodium alginate หรือค่ามวลโมเลกุล และค่า deacetylation degree ของ chitosan<sup>(30, 32)</sup> และค่ามวลโมเลกุลของ PVA<sup>(38)</sup> ซึ่งค่าเหล่านี้มีผลต่อความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย ทำให้ผลการทดลองที่ได้คลาดเคลื่อนจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Dima และคณะในปี 2014 อย่างไรก็ตามหากจะเลือกใช้พอลิเมอร์ที่เป็น

commercial grade นี้ต่อไปในการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลจำเป็นที่จะต้องศึกษาปรับสัดส่วนขององค์ประกอบให้เหมาะสม เพื่อให้สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีขึ้นต่อไป

นอกจากนี้ PVA ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของผนังไมโครพาร์ทิเคิลนอกจากจะเป็นสารทำอิมัลชันแล้วยังทำหน้าที่เป็นสารก่อฟิล์ม แต่ต้องนำ PVA ไปให้ความร้อนให้อุณหภูมิสูงกว่าค่า glass transition temperature ที่อุณหภูมิประมาณ  $85^{\circ}\text{C}$ <sup>(39)</sup> ดังนั้นอาจปรับเปลี่ยนกระบวนการเตรียมอิมัลชันโดยเพิ่มการให้ความร้อนระหว่างการละลายผนังในขั้นตอนแรก เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการเป็นสารก่อฟิล์มของ PVA และน่าจะส่งผลให้ผนังของไมโครพาร์ทิเคิลมีความแข็งแรงมากขึ้น กักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้มากขึ้น และยาวนานขึ้น อย่างไรก็ตามหลังจากให้ความร้อน PVA แล้วจะเป็นต้องรอให้อุณหภูมิของสารนั้นกลับมาอยู่ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนจะเติมน้ำมันหอมระเหยลงผสม เพื่อลดการระเหยของน้ำมันหอมระเหย

ข้อสังเกตอีกอย่างหนึ่งของทดสอบ %EE และ %R โดยการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้ cleverger-type apparatus นั้น เนื่องจากวิธีการนี้ไมโครพาร์ทิเคิลจะสัมผัสกับน้ำโดยตรงที่อุณหภูมิสูงประมาณ  $100^{\circ}\text{C}$  อาจทำให้องค์ประกอบอื่น ๆ นอกเหนือจากน้ำมันหอมระเหยถูกกลั่นและควบแน่นออกมา รวมกันด้วย ดังนั้นปริมาตรของน้ำที่วัดได้อาจไม่เป็นปริมาตรที่แท้จริง อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไปสามารถตรวจสอบได้ว่าวิธีการกลั่นแบบมีการเจือปนของสารอื่น ๆ ออกมากับน้ำมันหอมระเหยหรือไม่ด้วยวิธีการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี เช่นการทำ Thin-layer chromatography เปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เตรียมไมโครพาร์ทิเคิล ก็จะบอกได้ว่ามีสารเจือปนหรือไม่ เพื่อจะปรับเปลี่ยนการหาค่า %EE และ %R ด้วยวิธีอื่น ๆ ต่อไป

## 5. การศึกษาความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในไมโครพาร์ทิเคิล

เมื่อพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยและเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  นาน 3 เดือน โดยติดตามคุณสมบัติของไมโครพาร์ทิเคิลในเดือนที่ 0, 1 และ 3 พบว่าไมโครพาร์ทิเคิลมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปดังนี้

5.1 ขนาดอนุภาคในเดือนที่ 0 ไมโครพาร์ทิเคิลมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย  $1.04 \pm 0.24$  mm ที่เดือนที่ 1 มีขนาด  $1.00 \pm 0.26$  mm และในเดือนที่ 3 มีขนาด  $1.06 \pm 0.18$  mm เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย

โปรแกรม SPSS เพื่อหาความแตกต่างพบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของไมโครพาร์ติเคิลเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนมีขนาดไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 12)

5.2 %S<sub>w</sub> พบว่าที่เดือนที่ 0 ไมโครพาร์ติเคิลมีค่าการพองตัว 50.24% ที่เดือนที่ 1 มีค่า 48.73% และเดือนที่ 3 มีค่า 86.26% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในเดือนที่ 3 ไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้มีค่าการพองตัวสูงขึ้น อาจส่งผลให้การปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อเก็บต่อไปนานกว่า 3 เดือน (ตาราง 12)

5.3 %EE เมื่อเวลาผ่านไปไมโครพาร์ติเคิลที่เก็บไว้มีค่า %EE ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยในเดือนที่ 0 มีค่า %EE 39.57% เดือนที่ 1 มีค่า 30.58% และเดือนที่ 3 มีค่า 23.38% แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีการระเหยออกไปจากไมโครพาร์ติเคิล โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเดือนที่ 0 และเดือนที่ 1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ระเหยออกไปคิดเป็น 22.73% และเมื่อเปรียบเทียบเดือนที่ 1 และเดือนที่ 3 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ระเหยออกไปคิดเป็น 23.53% อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบเป็นปริมาณน้ำมันหอมระเหยคงเหลือโดยคิดให้เดือนที่ 0 เป็น 100% เดือนที่ 1 จะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยคงเหลืออยู่ 77.27% และเดือนที่ 3 จะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยคงเหลืออยู่ 59.09% (ตาราง 12)

ตาราง 12 สรุปผลการทดลองการศึกษาคงสภาพของขนาดอนุภาค, %S<sub>w</sub> และ %EE

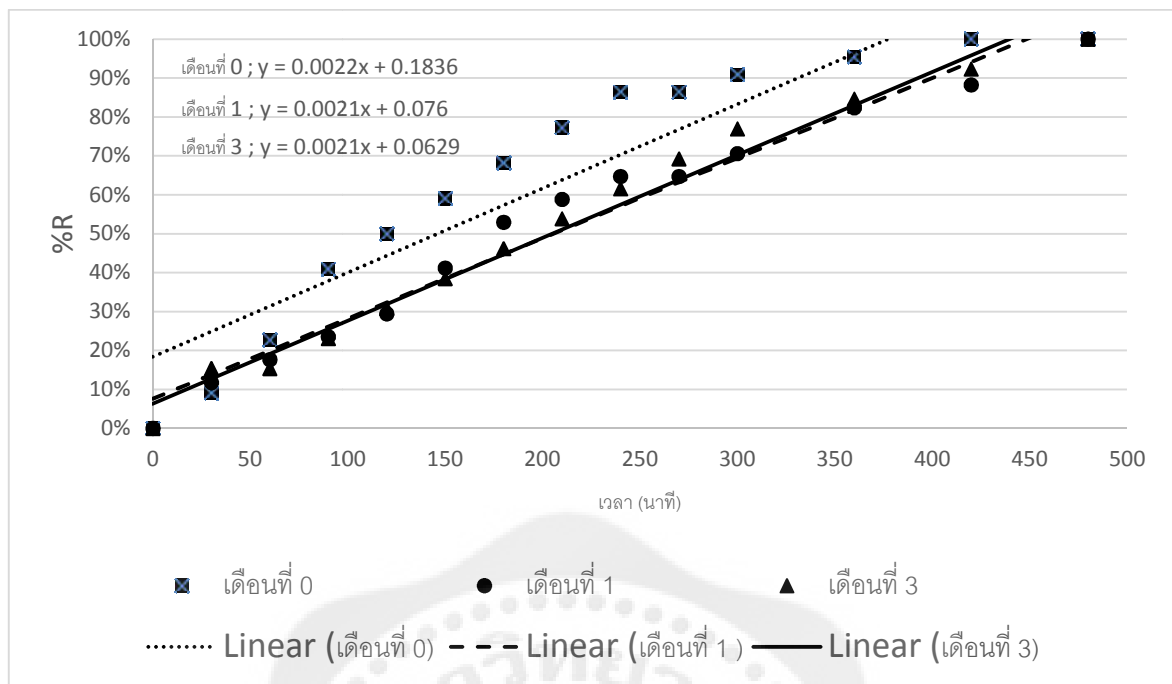
คุณสมบัติที่ทดสอบ	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 3
ขนาดอนุภาค (mm)	1.04±0.24	1.00±0.26	1.06±0.18
%S <sub>w</sub>	50.24%	48.73%	86.26%
%EE	39.57%	30.58%	23.38%
% ปริมาณการระเหยของน้ำมันหอมระเหย	-	22.73%	23.53%
% ปริมาณคงเหลือของน้ำมันหอมระเหย	100%	77.27%	59.09%

%R ของไมโครพาร์ติเคิลเมื่อเก็บไว้ 3 เดือนเป็นไปดังแสดงในตาราง 13 และในภาพประกอบ 15 เมื่อพิจารณาจากเส้นแนวโน้มจะพบว่าค่าความชันของเส้นแนวโน้มในแต่ละเดือนมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่าอัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยนั้นไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเวลาผ่านไป เพียงแต่ปริมาณที่ถูกปลดปล่อยจะลดลงเนื่องจาก %EE มีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป หาก

พิจารณาจากอัตราการปลดปล่อยของน้ำมันหอมระเหยจากไมโครพาร์ทิเคิลอาจคาดเดาได้ว่าการปลดปล่อยเป็นไปตาม Zero Order Kinetic Model ที่อัตราการปลดปล่อยจะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร<sup>(40)</sup> อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวนครั้งในการทดลองครั้งนี้ทำการทดลองเพียง 1 การทดลองและ 1 ชั่วโมงแต่ละเดือนที่เก็บไมโครพาร์ทิเคิลเอาไว้ จึงยังไม่สามารถสรุปได้เป็นเพียงการคาดเดาจากผลการทดลองที่มีอยู่เท่านั้น

ตาราง 13 %R ของไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมเมื่อเก็บไว้ 0, 1 และ 3 เดือน

เวลา (นาที)	เดือนที่ 0		เดือนที่ 1		เดือนที่ 3	
	ปริมาณน้ำมัน หอมระเหย (ml)	%R	ปริมาณน้ำมัน หอมระเหย (ml)	%R	ปริมาณน้ำมัน หอมระเหย (ml)	%R
0	0	0%	0	0%	0	0%
30	0.1	9%	0.1	12%	0.1	15%
60	0.25	23%	0.15	18%	0.1	15%
90	0.45	41%	0.2	24%	0.15	23%
120	0.55	50%	0.25	29%	0.2	31%
150	0.65	59%	0.35	41%	0.25	38%
180	0.75	68%	0.45	53%	0.3	46%
210	0.85	77%	0.5	59%	0.35	54%
240	0.95	86%	0.55	65%	0.4	62%
270	0.95	86%	0.55	65%	0.45	69%
300	1	91%	0.6	71%	0.5	77%
360	1.05	95%	0.7	82%	0.55	85%
420	1.1	100%	0.75	88%	0.6	92%
480	1.1	100%	0.85	100%	0.65	100%



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงกราฟแสดง %R ที่เวลาต่าง ๆ ของไมโครพาร์ติเคิลของน้ำมันหอมระเหย สูตรผสมที่เก็บไว้ 0, 1 และ 3 เดือน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ทั้งแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมในอัตราส่วน rose oil: bergamot oil: patchouli oil เท่ากับ 6:3:1 ต่อเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า น้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและสูตรผสมไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (*C. histolyticum* collagenase type I) เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 1 และ 1.5 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส (porcine pancreatic elastase) เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 4 mg/ml อีกด้วย แต่การทดสอบฤทธิ์ทั้งสองยังไม่สามารถสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยที่ทดสอบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ยังจำเป็นต้องหาวิธีการเพิ่มการละลายของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์เพื่อทดสอบในความเข้มข้นที่สูงขึ้นกว่านี้ต่อไป

อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว rose oil และ bergamot oil มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 4 mg/ml rose oil และ bergamot oil สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้  $28 \pm 14.2\%$  และ  $21 \pm 10.7\%$  ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันเดี่ยว patchouli oil ไม่มีฤทธิ์เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 4 mg/ml นอกจากนี้เมื่อทดสอบน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้  $45 \pm 4.6\%$  ซึ่งยังจำเป็นต้องทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นต่อไปเพื่อหาค่า  $IC_{50}$  ต่อไปแต่ก็ต้องหาวิธีเพิ่มการละลายของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์เช่นกัน

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ติเคิลซึ่งเตรียมโดยวิธี complex coacervation โดยใช้ผนังเป็น sodium alginate: chitosan ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 2% ใช้ PVA ปริมาณ 1.25% เป็นสารทำอิมัลชัน และใช้สารละลาย 10%  $CaCl_2$  เป็นสารทำให้ผนังแข็งตัว หุ้มน้ำมันเอาไว้ พบว่าไมโครพาร์ติเคิลที่เกิดขึ้นเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $1.04 \pm 0.25$  mm มีค่าการพองตัว ( $\%S_w$ ) เท่ากับ 50.24% ค่าความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย ( $\%EE$ )

เท่ากับ 39.57% และมีการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยแบบค่อย ๆ ปลดปล่อยเมื่อเวลาผ่านไป และเมื่อทดสอบความคงสภาพของไมโครพาร์ทิเคิลเป็นเวลาสามเดือนพบว่าไมโครพาร์ทิเคิลมีขนาดที่ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีแนวโน้มที่จะเกิดการพองตัวได้มากขึ้นโดยเฉพาะในเดือนที่สาม และมีการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยออกมาอย่างต่อเนื่องทำให้ค่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป อย่างไรก็ตามอัตราการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยนั้นไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเวลาผ่านไป จากข้อมูลของการศึกษาความคงสภาพจะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยที่เก็บอยู่ในไมโครพาร์ทิเคิลมีอัตราการหายที่ช้าลง และมีการปลดปล่อยของน้ำมันหอมระเหยที่ค่อย ๆ ปลดปล่อยออกมาเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งส่งผลต่อความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีแนวโน้มดีขึ้นเมื่อนำไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เนื่องจากช่วยลดอัตราการระเหยออกจากผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามในการพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของงานวิจัยนี้ทำขึ้นด้วยงบประมาณที่มีอยู่อย่างจำกัดทำให้ไม่สามารถกำหนดการทดสอบให้ทดสอบมากกว่า 1 การทดลองและมากกว่า 1 ซ้ำได้ ทำให้ผลการทดสอบที่ได้นั้นอาจมีความไม่เที่ยงตรงอยู่ จำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบซ้ำต่อไป

กล่าวโดยสรุปคือน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม rose oil, bergamot oil และ patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1 ไม่มีฤทธิ์ชะลอวัยของผิวหนังเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 4 mg/ml แต่มีฤทธิ์ลดความหมองคล้ำของผิวหนังเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 4 mg/ml และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมดังกล่าวไปพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลโดยใช้ sodium alginate และ chitosan เป็นผนังด้วยวิธี complex coacervation สามารถพัฒนาเป็นไมโครพาร์ทิเคิลที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ และเมื่อเก็บไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันหอมระเหยไว้นานสามเดือนค่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยลดลง แต่มีอัตราการระเหยของน้ำมันหอมระเหยที่ช้าลงเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ได้เก็บในไมโครพาร์ทิเคิล และความสามารถในการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยออกจากไมโครพาร์ทิเคิลได้เหมือนเดิม



บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

1. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*. 2012;4(3):308-19.
2. Philips N, Auler S, Hugo R, Gonzalez S. Beneficial Regulation of Matrix Metalloproteinases for Skin Health. *Enzyme Research*. 2011;2011:1-4.
3. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2011;29(10):471-4.
4. Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. *Archives of Dermatological Research*. 2008;300(1):7-20.
5. Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*. 2011;33(3):210-21.
6. อรรชรณ สร้อยนาค, มณฑิรา สุทธิกิจมนัส, เอมปราง จงดีเลิศ. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม: โครงการวิจัยปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2555.
7. Mori M, Ikeda N, Kato Y, Minamino M, Watabe K. Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2002;1(4):183-7.
8. Saeio K, Chaiyana W, Okonogi S. Antityrosinase and antioxidant activities of essential oils of edible Thai plants. *Drug discoveries & therapeutics*. 2011;5(3):144-9.
9. Karlsen J. Encapsulation and Other Programmed Release Techniques for Essential Oils and Volatile Terpenes. *Handbook of Essential Oils: CRC Press; 2009. p. 855-61.*
10. ชิดชนก ชัยรัตน์พิทักษ์, เปี่ยมจิตต์ วัฒนกิจศิริ. การพัฒนาตำรับน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมเพื่อต้านผิว: โครงการวิจัยปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2557.
11. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. *Rook's Textbook of Dermatology: Wiley-Blackwell; 2010. p. 1-53.*
12. Chang T-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(6):2440-75.

13. Mandrone M, Lorenzi B, Venditti A, Guarcini L, Bianco A, Sanna C, et al. Antioxidant and anti-collagenase activity of *Hypericum hircinum* L. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:402-8.
14. Chanvorachote P, Pongrakhananon V, Luanpitpong S, Chanvorachote B, Wannachaiyasit S, Nimmannit U. Type I pro-collagen promoting and anti-collagenase activities of *Phyllanthus emblica* extract in mouse fibroblasts. *Journal of cosmetic science*. 2009;60(4):395-403.
15. Information P. EnzChek® Gelatinase / Collagenase Assay Kit2001. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12052.pdf>.
16. Information P. EnzChek® Elastase Assay Kit ( E-12056 )2001. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12056.pdf>.
17. Vallisuta O, Nukoolkarn V, Mitrevej A, Sarisuta N, Leelapornpisid P, Phrutivorapongkul A, et al. In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014;7(1):246-50.
18. การตีพิมพ์ รุฎถาวร, จิตพิศุทธิ หาดุอนันทสุข, อภิญญา เอ็งวงษ์ตระกูล. ฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยสุตรผสม: โครงการวิจัยปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2556.
19. Ashrafzadeh Md F, Rakhshandeh Md H, Mahmodi Md E. *Rosa Damascena* Oil: an Adjunctive Therapy for Pediatric Refractory Seizures. *Iranian Journal of Child Neurology*; Vol 1, No 4 (2007): Iranian Journal of Child Neurology. 2009.
20. Baydar NG, Baydar H. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013;41(Supplement C):375-80.
21. Nasery M, Hassanzadeh MK, Najaran ZT, Emami SA. Chapter 75 - Rose (*Rosa damascena* Mill.) Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 659-65.
22. สุภาพนีย์ หงษ์รัตนาวรกิจ. น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด: นครนายก : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2550.

23. Avila-Sosa R, Navarro-Cruz AR, Sosa-Morales ME, López-Malo A, Palou E. Chapter 27 - Bergamot (*Citrus bergamia*) Oils Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. San Diego: Academic Press; 2016. p. 247-52.
24. Navarra M, Mannucci C, Delbò M, Calapai G. *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology*. 2015;6:36.
25. Das K. Chapter 72 - Patchouli (*Pogostemon Cablin* Benth) Oils Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. San Diego: Academic Press; 2016. p. 633-9.
26. Kumar P, Rani AR. Phytochemical, Pharmacological importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013;21(2):7-15.
27. Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(1):143-82.
28. Carvalho IT, Estevinho BN, Santos L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 2016;38(2):109-19.
29. Martins IM, Barreiro MF, Coelho M, Rodrigues AE. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*. 2014;245(Supplement C):191-200.
30. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31(7):603-32.
31. สุธิดา คงทอง. ไคติน-ไคโตซาน. 2552;ปีที่ 3, ฉบับที่ 1 (ม.ค.-มิ.ย.2552), หน้า 1-7.
32. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*. 2012;37(1):106-26.
33. Dima C, Gitin L, Alexe P, Dima S, editors. Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method. *InsideFood Symposium*; 2013 9-12 April 2013; Leuven, Belgium.

34. Liu K, Xu Y, Wang X. Microencapsulation of sweet orange oil terpenes using the orifice method. *Journal of Food Engineering*. 2012;110(3):390-4.
35. Lertsutthiwong P, Rojsitthisak P. Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil. *Die Pharmazie*. 2011;66(12):911-5.
36. กฤติกา สมฤดี, วิษณุวัฒน์ พิษวรัจจิรฐา. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมที่บรรจุในไมโครพาร์ติเคิลชนิดอัลจินตเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม: โครงการวิจัยปริญญาเอกสาขาสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2557.
37. Dima C, Cotârlet M, Alexe P, Dima S. Reprint of "Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2014;25(Supplement C):97-105.
38. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, American Pharmacists A. Handbook of pharmaceutical excipients. London; Chicago: APhA/Pharmaceutical Press; 2009.
39. Ghoshal S, Denner P, Stapf S, Mattea C. Study of the Formation of Poly(vinyl alcohol) Films. *Macromolecules*. 2012;45(4):1913-23.
40. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2010;67(3):217-23.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก

### 1. องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้งานวิจัย

ตาราง 14 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์ด้วย Gas chromatography-mass spectrometry

Name Compound	Kovat's Index	Area%			RBP* (6:3:1)
		Rose oil	Bergamot oil	Patchouli oil	
$\beta$ -Pinene	979	-	0.46	-	-
o-Cymene	1026	-	0.75	-	-
Limonene	1029	-	47.12	-	14.8
p-Mentha-2,4(8)-diene	1088	-	0.38	-	-
Linalool	1096	1.38	14.61	-	8.58
Phenyl ethyl alcohol	1107	38.52	-	-	16.35
$\alpha$ -Terpineol	1188	0.64	0.69	-	-
Citronellol	1225	35.14	-	-	14.03
Geraniol	1252	4.35	-	-	-
Linalool acetate	1257	-	22.63	-	17.31
2-Phenyl ethyl acetate	1258	5.83	-	-	-
Bornyl acetate	1288	-	0.75	-	-
Unidentified	-	-	0.63	-	-
Dihydro carveol acetate	1307	-	0.42	-	-
$\alpha$ -Terpinyl acetate	1349	-	11.57	-	7.36
Citronellyl acetate	1352	2.92	-	-	-

ตาราง 14 (ต่อ)

Name Compound	Kovat's Index	Area%			
		Rose oil	Bergamot oil	Patchouli oil	RBP* (6:3:1)
Eugenol	1359	1.45	-	-	-
Neryl acetate	1361	0.57	-	-	-
Geranyl acetate	1381	0.64	-	5.73	1.17
<b>β</b> -Elemene	1390	-	-	1.82	-
Methyl eugenol	1403	2.58	-	-	1.79
Cycloseychellene	1407	-	-	1.13	-
(E)-Caryophyllene	1419	-	-	2.27	-
<b>α</b> -Guaiene	1439	-	-	11.45	2.57
Seychellene	1446	-	-	10.76	1.68
<b>α</b> -Patchoulene	1456	-	-	6.58	0.98
<b>γ</b> -Patchoulene	1502	-	-	3.21	-
Aciphyllene	1501	-	-	2.19	3.14
<b>α</b> -Bulnesene	1509	-	-	14.65	-
Unidentified	-	-	-	1.11	-
Unidentified	-	-	-	2.66	-
Pogostol	1653	-	-	1.81	-
Patchouli alcohol	1658	-	-	33.38	7.54
Unidentified	-	-	-	1.26	-
Nonadecane (C19)	1900	0.78	-	-	-
Ethyl hexadecanoate	1993	0.72	-	-	-
Heneicosane	2100	2.31	-	-	1.05

ตาราง 14 (ต่อ)

Name Compound	Kovat's Index	Area%			
		Rose oil	Bergamot oil	Patchouli oil	RBP* (6:3:1)
Tricosane	2300	2.19	-	-	1.64

\* rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1

## 2. ภาพแสดงลักษณะของน้ำมันหอมระเหยและน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม



ก)

ข)

ค)

ง)

ภาพประกอบ 16 น้ำมันหอมระเหย ก) rose oil, ข) bergamot oil, ค) patchouli oil และ ง) น้ำมันหอมระเหยสูตรผสม (rose oil: bergamot oil: patchouli oil ในอัตราส่วน 6:3:1)



ประวัติย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นันทพล วงศ์สุขเกษม
วัน เดือน ปีเกิด	2 สิงหาคม 2530
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ปัจจุบันอยู่ที่	122/1 ถนนเฉลิมพระเกียรติ ร.9 ดอกไม้ ประเวศ กรุงเทพฯ 10250
ตำแหน่งหน้าที่	กรรมการผู้จัดการ
ที่ทำงาน	บริษัท เอ็ม.ดี.วรรณ จำกัด

### ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ
พ.ศ. 2552	ปริญญาตรี เกษศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2557	ปริญญาโท บริหารธุรกิจมหาบัณฑิต สาขาการจัดการ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
พ.ศ. 2560	ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

### ผลงานตีพิมพ์ เผยแพร่

1. นันทพล วงศ์สุขเกษม, สริน ทัดทอง, สุภาพนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ. การพัฒนาไมโครพาร์ทิเคิลของน้ำมันตะไคร้. ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 44; 19-20 ตุลาคม 2560; โรงแรม U-PLACE มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2560. หน้า 406-414.
2. Wongsukkasem N, Soynark O, Suthakitmanus M, Chongdiloet E, Chairattanapituk E, Vattanikitsiri P, et al. Antiacne-causing bacteria, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Elastase and Anti-Collagenase Activities of Blend Essential Oil comprising Rose, Bergamot and Patchouli oils. Nat Prod Commun. Submitted on 6/8/2017.