



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปลดปล่อยและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส  
จากนาโนอาร์บูตินครีม

Controlled-release delivery and tyrosinase inhibitory activity  
from nano-arbutin cream

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิษณุ ธงไชย	หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ	ผู้ร่วมวิจัย
ดร.เฉลิมพร ทองพูน	ผู้ร่วมวิจัย
ดร.ยุทธศักดิ์ แซ่ม่มุ่ย	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวศิริรัตน์ พันธุ์เรือง	ผู้ร่วมวิจัย

สังกัดคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2559

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การปลดปล่อยและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากนาโนอาร์บูตินครีม” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จสมบูรณ์ได้เป็นอย่างดี และเป็นไปตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายฝ่าย ที่ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะต่างๆ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณบุคคลเหล่านั้น ที่ได้กรุณาทำให้ผลงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ หากมีสิ่งขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยมา ณ โอกาสนี้ และผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้คงจะมีประโยชน์บ้างไม่มากก็น้อยสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่สนใจ

วิษณุ ธงไชย  
กันยายน 2559

งานวิจัยเรื่อง	การปลดปล่อยและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากนาโนอาร์บูตินครีม
หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิษณุ จงไชย
คณะ/สังกัด	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ปี	2558
คำสำคัญ	การปลดปล่อย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส นาโนอาร์บูตินครีม

### บทคัดย่อ

อาร์บูตินเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่พบได้ในสาลี ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อพัฒนาสูตรเม็ดปิดที่สามารถกักเก็บสารอาร์บูตินที่สกัดแยกจากสารสกัดสาลีได้ในปริมาณสูงโดยใช้กัมที่สกัดจากเม็ดแมงลักโดยใช้เทคนิคไฮออลโทรอปิกเจลเลชันในการเตรียมเม็ดปิด และได้มีการพัฒนาสูตรครีม รวมไปถึงศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกับคุณลักษณะทางกายภาพ การกักเก็บและการปลดปล่อยของเม็ดปิดอาร์บูติน และใช้เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีและโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิธีไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินที่แยกด้วยคอลัมน์ Nova-Pak C<sub>18</sub>, 150x3.9 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น Brij 35 (พีเอช 7) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 2-350 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการหาประสิทธิภาพของการกักเก็บและการศึกษาการปลดปล่อยแบบอินวิโทร สูตรตำรับครีมที่ดีที่สุด คือ สูตรที่มีปริมาณอาร์บูติน 15% (w/w) ปริมาณอัลจินต 0.20% ขนาดของซีเมนต์เท่ากับ 0.10 เซนติเมตร สารเชื่อมโยงที่ใช้คือ 4% (w/v) CaCl<sub>2</sub> ตย 1% Brij 35 คือ อัตราส่วน 1:2, กัมเม็ดแมงลักต่ออัลจินต คือ 0.25:1.00 ได้ประสิทธิภาพในการกักเก็บที่ 62.87% ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และมีการปลดปล่อยได้มากกว่า 9 ชั่วโมง เม็ดปิดจากกัมเม็ดแมงลักจะให้ประสิทธิภาพการกักเก็บสารอาร์บูตินได้ดีที่สุดและช่วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและช่วยให้ผิวยืดหยุ่น

<b>Research Title</b>	Controlled–release delivery and tyrosinase inhibitory activity from nano–arbutin cream
<b>Author</b>	Assistant Professor Dr. Wisanu Thongchai
<b>Faculty</b>	Faculty of Science and Technology
<b>Institute</b>	Pibulsongkram Rajabhat University
<b>Year</b>	2015
<b>Keywords</b>	Controlled–release delivery, Tyrosinase inhibitory activity, Nano–arbutin cream

### Abstract

Arbutin is a natural extract isolated from *Pyrus communis* L. in addition to its outstanding antioxidant and anti–tyrosinase activities. The purpose of this study was to develop and obtain high encapsulating arbutin beads with *Ocimum canum* Sims gum. The preparation of arbutin bead was investigated by ionotropic gelation technique and to investigate the influence of formulation composition on physical properties, encapsulate and release of beads. The optimization, *in vitro* release and entrapment efficiency of beads were employed for spectrophotometric method and HPLC system. Micellar liquid chromatographic method for the determination of arbutin were developed. The sample was extracted and then determined by HPLC using Nova–Pak C<sub>18</sub>, 150x3.9 mm analytical column, Brij 35 (pH 7) as mobile phase, with the flow rate of 1.0 mL/min and detected at 280 nm. Linear calibration curve was obtained over the range 2–350 mg/L. The results showed that the optimized beads formulation could be achieved by using 15% (w/w) arbutin, 0.2% w/w alginate, 4% (w/v) CaCl<sub>2</sub>, 1% Brij 35 and 4% (w/v) CaCl<sub>2</sub> was 2:1 and *Ocimum canum* Sims gum:alginate was 0.25:1.0, respectively. The entrapment efficiency was 62.87% by spectrophotometer at 280 nm. Controlled release of arbutin beads was obtained over 9 h. The beads with *Ocimum canum* Sims gum are high entrapment efficiency represents a promising delivery system of arbutin for anti–tyrosinase and elastic skin.

## สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ข
บทคัดย่อ		ค
สารบัญ		จ
สารบัญตาราง		ช
สารบัญรูป		ฉ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ที่มา หลักการ และเหตุผล	1
	สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง	7
	เทคนิคต่างๆ ที่นำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน	8
	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	10
	วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา	12
	ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	12
บทที่ 2	ทฤษฎีและเครื่องมือ	14
	ทฤษฎีของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	14
	เทคนิคไมเซลล์ลาร์ลิควิตโครมาโทกราฟี	18
	ประเภทของครีม	19
	วัสดุที่ใช้เตรียมเม็ดปิด	22
บทที่ 3	การทดลอง	24
	เครื่องมือสำหรับการทดลอง	24
	สารเคมีที่ใช้	24
	วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4	ผลการวิจัย	35
	ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ MLC	35
	ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	49
	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่าง	54
	พืชและครีมบำรุงผิว	

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพืช และครีมบำรุงผิวโดยวิธีมาตรฐาน	55
ผลการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากสารสกัด	57
ผลศึกษาความคงสภาพจากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางไลซันอาร์บู ตินรูปแบบนาโนอิมัลชัน	60
การประเมินลักษณะทางกายภาพและความพึงพอใจของตำรับ ครีมและไลซัน	62
ผลการศึกษาการปลดปล่อยของเม็ดปิดไลซันอาร์บูติน	63
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด	65
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด	68
<b>สรุปผลการทดลอง วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ</b>	<b>69</b>
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>71</b>
<b>ผลงานวิจัยที่นำเสนอและเผยแพร่</b>	

## สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	Chemicals demonstrated in man and in animal models to cause depigmentation	3
1.2	Severity of ochronosis	5
3.1	สัดส่วนของปริมาณสารสกัดและปริมาณโซเดียมอัลจินेट	33
4.1	ค่าפקเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลล์มัน์	37
4.2	ค่าפקเตอร์ความจุ และค่าประสิทธิภาพของคอลล์มัน์เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน	40
4.3	ค่าפקเตอร์ความจุ และค่าประสิทธิภาพของคอลล์มัน์เมื่อใช้ Brij 35 ที่พีเอชต่างๆ กัน	42
4.4	ค่าפקเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลล์มัน์ของ Brij 35 ที่พีเอช 7 ที่เติมอะซิโตไนโตรนความเข้มข้นต่างๆ	44
4.5	ค่าפקเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลล์มัน์ของ Brij 35 ที่พีเอช 7 ที่เติมโพพานอลความเข้มข้นต่างๆ	46
4.6	ค่าפקเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลล์มัน์ของวัฏภาค เลื่อนที่ที่อัตราการใช้ต่างๆ กัน	48
4.7	ผลการศึกษาของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง	51
4.8	ค่า %R.S.D. ในการศึกษาความแม่นยำ	52
4.9	ค่าร้อยละของการกลับคืนของการศึกษาความถูกต้องของ ตัวอย่างพีช	53
4.10	ค่าร้อยละของการกลับคืนของการศึกษาความถูกต้องของ ตัวอย่างครีมบำรุงผิว	53
4.11	ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพีช	54
4.12	ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่าง ครีมบำรุงผิว	55
4.13	ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพีชโดยวิธีเทียบ	56
4.14	ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่าง ครีมบำรุงผิวโดยวิธีเทียบ	57
4.15	ลักษณะทางกายภาพของครีมและโลชั่นที่เตรียมขึ้น	62

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
4.16	ระดับการประเมินความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์ครีม	63
4.17	ค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	66
4.18	ค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของความเข้มข้นการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	68

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ		หน้า
1.1	โครงสร้างของ (a) อาร์บูติน และ (b) ไฮโดรควิโนน	1
2.1	ลักษณะการเกิดไมเซลลาร์ของสารลดแรงตึงผิว	18
2.2	แสดงหลักการพื้นฐานของเทคนิคไมเซลลาร์	19
2.3	การเกิดอิมัลชัน	20
4.1	ยูวีสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยตัวทำละลายน้ำ	35
4.2	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ SDS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	36
4.3	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และ เรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ CTAB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	36
4.4	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และ เรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	37
4.5	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่พีเอช 7 (ก) 0.2 mM (ข) 0.6 mM (ค) 1.0 mM (ง) 1.5 mM และ (จ) 2.0 mM เป็นเฟสเคลื่อนที่	39
4.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 กับค่า Log k โดยที่ค่าפקเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และค่าפקเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k <sub>2</sub> ) ตามลำดับ	40
4.7	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช (ก) 4 (ข) 5 (ค) 6 และ (ง) 7	41
4.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 0.6 มิลลิโมลาร์ Brij 35 ที่พีเอช ต่างๆ กับค่า Log k โดยที่ค่าפקเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และ ค่าפקเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k <sub>2</sub> ) ตามลำดับ	42

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพ		หน้า
4.9	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เติมอะซิโตนไทรน(ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% เป็นเฟสเคลื่อนที่	43
4.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะซิโตนไทรน กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k <sub>2</sub> ) ตามลำดับ	44
4.11	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เติมโพรพานอล (ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% เป็นเฟสเคลื่อนที่	45
4.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโพรพานอล กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k <sub>2</sub> ) ตามลำดับ	46
4.13	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และ เรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเป็น 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.5 มิลลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่	47
4.14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และ ค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k <sub>2</sub> ) ตามลำดับ	48
4.15	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน วันที่ 1	50
4.16	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน วันที่ 3	50
4.17	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน	51
4.18	ลักษณะไลชันอาร์บูตินรูปแบบนาโนอิมัลชัน	56

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพ		หน้า
4.19	ลักษณะหยดอนุภาคจากกล้อง SEM ของตำรับโลชันอาร์บูตินนาโนอิมัลชัน 1% ผสมกับสารลดแรงตึงผิว	59
4.20	ขนาดอนุภาคแบบสะสมของตำรับโลชันอาร์บูตินนาโนอิมัลชัน จากเครื่อง PCS	59
4.21	ค่าความคงตัวของอาร์บูตินในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	60
4.22	ค่าความคงตัวของอาร์บูตินในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	61
4.23	ค่าความคงตัวของอาร์บูตินในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	61
4.24	กราฟเส้นการปลดปล่อยของเมคปิดอาร์บูติน	64
4.25	กราฟเส้นแสดงการปลดปล่อยของเมคปิดอาร์บูติน	65
4.26	กราฟเส้นตรงแสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายกรดโคจิก	66
4.27	กราฟเส้นตรงแสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารสกัดในตัวทำละลายเอทานอล 20%เอทานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ	67

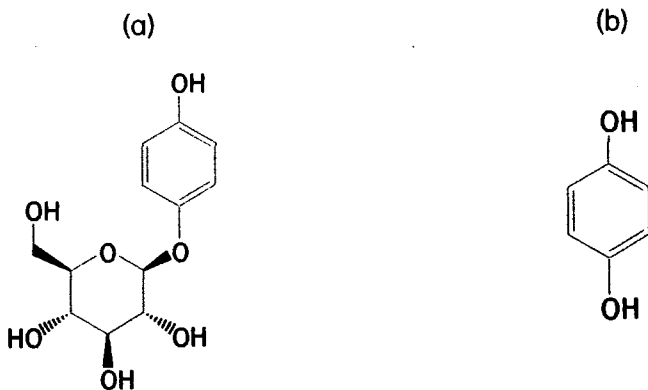
# บทที่ 1

## บทนำ

### ที่มา หลักการ และเหตุผล

การขจัดสีผิวหรือทำให้ผิวขาวเป็นเรื่องของการเสริมความงาม โดยสังคมมนุษย์นั้นนิยมการมีสีผิวขาวมากกว่าสีผิวเข้ม เพราะแลดูสะอาดตาและสดใส การมีลักษณะสีผิวที่แตกต่าง กัน มีปัจจัยมาจากเชื้อชาติหรือกรรมพันธุ์ ดังนั้นผู้ที่เกิดมามีสีผิวเข้มจึงพยายามเอาชนะธรรมชาติด้วยการใช้สารสังเคราะห์เข้าช่วยเพื่อหวังผลให้ผิวสีจางลงและขาวขึ้น

ในปัจจุบันนี้ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาว เป็นที่นิยมมากขึ้นในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น ไทย และหลายประเทศในเอเชีย เพราะสังคมนิยมการมีสีผิวที่ขาว โดยเฉพาะผิวบริเวณใบหน้า ซึ่งเป็นจุดเด่นในการเข้าสังคม ทำให้มีการใช้สารทำให้ผิวขาว ที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์มากขึ้น การใช้ผลิตภัณฑ์ซึ่งผสมสารขจัดสีผิว หรือทำให้ผิวขาว โดยการยับยั้งขบวนการสร้างเมลานินโดยไม่ทำให้เซลล์สร้างสีผิวดาย เป็นหลักการที่ถูกต้อง และนิยมใช้ในปัจจุบัน พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จะเป็นที่ยอมรับสูงสุด และมีการวิจัยค้นคว้าเพื่อหาสารใหม่ๆ ซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าวมาใช้มากมาย เพื่อใช้แทนไฮโดรควิโนน ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีผลข้างเคียงและข้อเสียมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้เป็น เวลานานๆ จะทำให้เกิดฝ้าถาวรบนใบหน้า เนื่องจากสารตัวนี้ถูกออกซิไดส์โดยแสงแดดและอากาศ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำในที่สุด และการใช้ไฮโดรควิโนนในกระบวนการผลิตทำให้คงตัวได้ยากนอกจากนี้ยังเป็นสารที่ไวต่อแสง ทำให้ผู้ใช้เกิดการแพ้แสงได้ง่าย ซึ่งในปัจจุบันกำหนดให้ห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และจัดเป็นยาที่อยู่ในความดูแลของ แพทย์อย่างใกล้ชิด ทำให้ผู้ผลิตหันมาให้ความสนใจในการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีสารสำคัญคือ อาร์บูติน หรือ 4-hydroquinone- $\beta$ -d-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารต่อต้าน กลไกการสร้างสีผิว และเป็นสารทำให้ผิวขาว จัดเป็นไฮโดรควิโนนกลูโคไซด์ มีสูตรโครงสร้างดังรูปภาพ 1.1



รูปภาพ 1.1 โครงสร้างของ (a) อาร์บูติน และ (b) ไฮโดรควิโนน

ซึ่งแต่เดิมอาร์บูตินสกัดจากใบของ *Bergenia crassifolia* และพืช Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) มีความระคายเคืองน้อยกว่าและคงตัวดีกว่าไฮโดรควิโนนมาก สารนี้คงตัวที่พีเอช 5-6 ในตำรับเครื่องสำอางนิยมใช้ในความเข้มข้น 3-7% ซึ่งคุณสมบัติเด่นของอาร์บูติน คือ ทำให้ผิวขาวขึ้น ชลลดความแก่ และป้องกันแสงแดดจากรังสียูวีบี/ยูวีซี

ไฮโดรควิโนน มีชื่อเรียกตามลักษณะโครงสร้างได้หลายชื่อ เป็นผงรูปเข็มสีขาว เมื่อสัมผัสแสงหรือออกซิเจนในอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม สารสามารถละลายได้ดีในน้ำ ละลายได้บางส่วนในแอลกอฮอล์ สารนี้มีใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เป็น reducing agent ในน้ำยาอัดภาพ จึงมีรายงานการแพ้ไฮโดรควิโนนในอาชีพล้างรูปหรือในคนซึ่งมีงานอดิเรกถ่ายภาพและล้างรูปเอง ในอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์จะใช้ไฮโดรควิโนนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์คงทน ในอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ กลุ่มสาร acrylic และ polyester จะใช้ไฮโดรควิโนนป้องกันการหลอมเหลวของสาร ก่อนนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่ต้องการ ดังนั้นในอาชีพซึ่งมีการสัมผัสสารไฮโดรควิโนน เช่น ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ผลิตสาร bacteriostatic โรงงานผลิตยา โรงงานผลิตผ้าขนสัตว์ โรงงานผลิตสี โรงงานผลิตพลาสติก โรงงานผลิตสาร stabilizer หรือ rubber antioxidant โรงงานเคลือบหิน โรงงานผลิตยางและยางสังเคราะห์ จะมีรายงานการแพ้สารไฮโดรควิโนนแบบสัมผัส ส่วนการเกิดรอยต่างขาวจากการสัมผัสสารไฮโดรควิโนนจะพบเฉพาะในอาชีพช่างภาพเท่านั้น ทันตแพทย์จะใช้ไฮโดรควิโนนผสมในสารอุดฟันทำให้เกิดการแพ้ในช่องปากและริมฝีปากหลังรักษาโรคทันตกรรม ในปี ค.ศ. 1940 Oliver และคณะ ได้รายงานการเกิดรอยต่างขาวจากสารเคมีผสมในถุงมือยาง คือ monobenzylether hydroquinone (MBEH) หลังจากนั้นจึงมีการนำสารกลุ่มนี้มาปรับสีผิว เนื่องจากสีผิวคล้ำเป็นปัญหาในด้านความงาม สารปรับสีผิวจึงเป็นสารซึ่งมีความต้องการของตลาดเครื่องสำอาง ได้มีความพยายามศึกษาหากกลุ่มสารที่ช่วยลดการทำงานของเซลล์สร้างเม็ดสีมานานโดยสารส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟีนอล และ แคทีคอล สารดังกล่าวมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกรดอะมิโนไทโรซีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเม็ดสีเมลานิน เมื่อเซลล์สร้างเม็ดสีหลั่งนำสารกลุ่มนี้ไปใช้สร้างเม็ดสีแทนสารไทโรซีนจะทำให้เกิดสารแบบมีประจุอนุมูลอิสระทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีได้เกิดเป็นรอยต่างขาวในบริเวณท่ายา แพทย์ผิวหนังยังมีความพยายามที่จะปรับปริมาณของสารกลุ่มนี้เพื่อใช้ปรับสีผิวให้ได้ระดับสีผิวปกติ แต่ผลข้างเคียงจากการแพ้สัมผัสและรอยต่างขาวของสารกลุ่มนี้ก็ยังคงพบสูงมากไม่ปลอดภัยและไม่สมควรใช้ผสมในเครื่องสำอาง สารในกลุ่มนี้มีหลายชนิดดังแสดงในตาราง 1.1

ตาราง 1.1 Chemicals demonstrated in man and in animal models to cause depigmentation

---

Hydroquinone
Monobenzylether of hydroquinone
Monomethylether of hydroquinone ( <i>p</i> -methoxyphenol or <i>p</i> -hydroxyanisole)
Monoethylether of hydroquinone ( <i>p</i> -ethoxyphenol)
<i>p</i> - <i>tert</i> -Butylphenol
<i>p</i> - <i>tert</i> -Butylcatechol
<i>p</i> -Isopropylcatechol
<i>p</i> -Methylcatechol
<i>p</i> -Octylphenol
<i>p</i> -Nonylphenol
<i>p</i> -Phenylphenol
<i>p</i> - <i>tert</i> -Amylphenol
<i>p</i> -Cresol
Mercaptoamines, such as <i>N</i> -(2-mercaptoethyl)-dimethylamine hydrochloride (MEDA)
$\beta$ -Mercaptoethylamine hydrochloride (MEA)
Physostigmine (eserine)
Diisopropyl fluorophosphate
<i>N,N,N'</i> -triethylenethiophosphoramidate (Thio-TEPA)

---

ในปี ค.ศ. 1968 มีงานวิจัยประสิทธิภาพการลดสีผิวในใบหูหนูตะเภาสีดำของสารหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสารแคทีคอลและอนุพันธ์ พบว่า 4-isopropylcatechol มีประสิทธิภาพสูงสุด ส่วนสารในกลุ่มอื่นนอกจากสารแคทีคอลที่สามารถลดสีผิวหนูตะเภาได้ คือ ไฮโดรควิโนน เป็นต้น ส่วนสารที่ทดลองในคน พบว่าช่วยลดสีผิวได้ เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก และพบว่า 4-hydroxyanisole จะมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ก็ก่อให้เกิดการระคายสูง จึงไม่นิยมใช้ ส่วนสารกลุ่มซัลฟาร์ตริวและอนุพันธ์ในกลุ่ม จะทำให้ปลาของสีดำมีสีจางลง และเมื่อใช้ทาผิวสีดำของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะลดสีผิวได้ แต่สารสามารถทำลายเซลล์สร้างเม็ดสี จึงไม่มีการพัฒนามารักษาสีผิวคน ในปี ค.ศ.1998 มีการใช้สารไฮโดรควิโนนร้อยละ 3 ทาผิวหน้าสุนัขไร้ขนเม็กซิกัน พบว่าสารสามารถลดสีผิวสุนัขได้ใน 1 สัปดาห์ และเมื่อทาต่อครบ 4 เดือนผิวสุนัขเปลี่ยนเป็นรอยต่างขาว ดังนั้นในอนาคตการทดสอบประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของสารปรับสีผิวคงจะพัฒนาได้สารปลอดภัยขึ้น เพราะการทดลองทาในสุนัขไร้ขนจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีผิวชัดเจนกว่าการทดลองในหนูตะเภาซึ่งมีขนยาว เมื่อครีมผสมสารปรอทซึ่งเคยใช้ปรับสีผิวทำให้เกิดปัญหาการแพ้ เกิดการสะสมเป็นรอยดำและมีพิษต่อไต

กลายเป็นสารต้องห้าม สารที่นิยมใช้ลดสีผิวในลำดับต่อมาคือ ยาทา monobenzyl ether hydroquinone (MBEH) ในความเข้มข้นร้อยละ 1-20 มีรายงานประสิทธิภาพของ MBEH ในปี ค.ศ.1951 และ 1953 และมีการศึกษาผลของ MBEH ต่อเซลล์สร้างเม็ดสีของหนูตะเภาพบว่า ปลอดภัยสามารถลดสีผิวได้ แต่หลังจากครีมนี้แพร่หลายเพียง 5 ปี ก็มีรายงานการแพ้เป็นผื่น อักเสบแบบแพ้สัมผัส ในบางรายพบเป็นรอยดำและรอยด่างขาวในบริเวณท่ายา ในประเทศที่มีการจำหน่ายครีมนี้โดยไม่ต้องปรึกษาแพทย์ จะพบการแพ้แบบรุนแรง หรือมีรอยดำและรอยด่างขาวแบบ แปรลกๆ มากมาย ส่วนในประเทศซึ่งสารนี้อยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ ก็ยังพบผลข้างเคียงดังกล่าว เช่นกัน จากการศึกษาอุบัติการณ์การแพ้สาร MBEH พบเป็นผื่นอักเสบแบบแพ้สัมผัสร้อยละ 13 ผื่น อาจเป็นเล็กน้อยหรือรุนแรง และในบางรายผื่นกระจายไปในบริเวณอื่นทั่วตัวโดยมีพาสารดังกล่าว ไป ส่วนการเกิดรอยผิวดำคล้ำหรือรอยด่างขาวพบประมาณร้อยละ 1 เมื่อหยุดทา MBEH พบว่าต้อง รอนานหลายเดือนสีผิวจึงกลับปกติ แต่บางรายสีผิวดำคล้ำคงอยู่ยาวนานหลายปี จากการศึกษาใน สัตว์ทดลองพบว่า MBEH ทำลายเซลล์สร้างเม็ดสี และเชื่อว่า MBEH เปลี่ยนเป็นสารไฮโดรควิโนน เมื่อดูดซึมเข้าในชั้นผิวหนัง เมื่อไม่สามารถปรับความเข้มข้นของ MBEH ให้ปรับสีผิวได้พอเหมาะ และ ด้วยความไวของเซลล์สร้างเม็ดสีต่อสาร MBEM ในแต่ละบุคคลมีความแตกต่าง ผลการลดสีผิวจึงไม่ แน่นนอนแต่ผลข้างเคียงสูงมาก สาร MBEH ได้ถูกห้ามใช้เป็นสารฟอกสีผิวซึ่งมีสีเข้มผิดปกติ ใน ปัจจุบันสาร MBEH จะใช้ฟอกสีผิวปกติของผู้ป่วยต่างขาให้กลายเป็นผิวด่างขาวทั่วร่างกายเท่านั้น โดยทายา MBEH ในความเข้มข้นร้อยละ 20 วันละ 1-2 ครั้ง บริเวณผิวหนังปกติ หลังทาอาจเกิดการ ระคายผิวบ้าง สีผิวจางลงภายใน 3-6 เดือน และขาวเท่ากับรอยด่างขาวภายใน 1 ปี เมื่อสาร MBEH ถูกห้ามใช้เป็นสารฟอกสีจึงมีความพยายามหาสารอื่นทดแทน ในปี ค.ศ 1965 Fitzpatrick และคณะ รายงานสารไฮโดรควิโนนสามารถช่วยลดสีผิวได้โดยลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เข้าใจว่า สารไม่มีอันตรายต่อเซลล์สร้างเม็ดสี สารไฮโดรควิโนนจึงได้ถูกนำมาเป็นสารฟอกสีผิวและใช้ แพร่หลายจนปัจจุบัน ในปี ค.ศ. 1975 มีการทดสอบความปลอดภัยของยาทาไฮโดรควิโนน ความ เข้มข้นร้อยละ 1-7 เพื่อปรับสีผิวของคนผิวดำชาวแอฟริกา พบว่าในความเข้มข้นร้อยละ 5 หรือ มากกว่าก่อให้เกิดการระคายเคือง ถ้าในความเข้มข้นร้อยละ 2 จะปลอดภัยกว่า ดังนั้นสารไฮโดรควิ โนนในความเข้มข้นต่ำจึงเป็นสารฟอกสีหลักเพื่อลดสีผิวมานานกว่า 30 ปี และจากการทดสอบ ประสิทธิภาพการฟอกสีผิวของสารไฮโดรควิโนนรักษาผิวดำในความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่าได้ผล เท่ากับร้อยละ 5 และการระคายผิวจะพบน้อยกว่า จึงไม่แนะนำให้ใช้สารไฮโดรควิโนนความเข้มข้น สูง ควรใช้สารไฮโดรควิโนนในปริมาณร้อยละ 2-4 จากการศึกษาในหนูทดลองในปี ค.ศ. 1974 พบว่าไฮโดรควิโนนในความเข้มข้นสูงจะทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีได้ แต่ในขณะนั้นผลการรักษาสีผิวใน คนยังไม่พบปัญหาจึงยังคงมีการใช้สารไฮโดรควิโนนอยู่ เมื่อมีการใช้สารไฮโดรควิโนนอย่าง

แพร่หลายในหลายรูปแบบ บางตำรับผสมในความเข้มข้นสูงบางตำรับผสมสารส่งเสริมการดูดซึมผลข้างเคียงจากการสะสมของสารจึงมีรายงานเพิ่มขึ้น เช่น การแพ้ การระคาย การเกิดรอยต่างขา การเกิดรอยดำเข้ม และเมื่อใช้ในระยะเวลายาวจะเกิดผื่นฝ้าตามมา สารไฮโดรควิโนนจึงเป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอางเหมือนเช่นสารปรอทและ MBEH ยกเว้นใช้ในยาอ้อมผม ในปี ค.ศ.1986 มีรายงานผลพยาธิวิทยาของผื่นฝ้าของผู้ป่วย 1 ราย หลังใช้ยาทาไฮโดรควิโนนนาน 10 ปี ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการศึกษาความชุกของปัญหาจากการใช้สารไฮโดรควิโนนเพื่อลดสีผิวในชาวแอฟริกาสำรวจในคลินิกผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาล 2 แห่งที่เมืองพริทอเรีย โดยคัดเลือกผู้ป่วยซึ่งมาพบแพทย์ด้วยปัญหาไม่เกี่ยวข้องข้อกับผิวหนังบริเวณใบหน้าแบบสุ่ม พบผื่นฝ้าในชาย 8 คน หญิง 60 คน ที่พบบ่อยคือช่วงอายุ 40-49 ปี ในผู้ป่วยที่มีประวัติใช้ครีมปรับสีผิว 87 คน มีผื่นฝ้า 60 คน และในผู้ป่วยซึ่งมีผื่นฝ้า 68 คน พบว่าใช้ครีมไฮโดรควิโนน 60 คน ในผู้ป่วย 12 คนใช้ไฮโดรควิโนนติดต่อกันนาน 5 ปี พบผื่นฝ้า 7 คน ผื่นฝ้าพบบ่อยบริเวณโหนกแก้มร้อยละ 93 บริเวณหางตาร้อยละ 54 แก้มร้อยละ 37 หน้าผากร้อยละ 37 ใบหูร้อยละ 26 จมูกร้อยละ 22 ข้างลำคอร้อยละ 12 เหนือริมฝีปากร้อยละ 9 ผื่นเกิดในบริเวณโดนแสงแดด และส่วนใหญ่พบเป็นด้านซ้ายของใบหน้าเท่ากับด้านขวา แต่ในบางรายพบเป็นด้านขวามากกว่าซ้าย ประวัติการใช้ครีมพบหลังใช้เพียง 6 เดือน ร้อยละ 70 และเมื่อใช้นาน 16 ปี พบผื่นฝ้าถึงร้อยละ 92 ผู้ป่วยหลายรายได้หยุดใช้ไฮโดรควิโนนนานหลายปี แต่ผื่นฝ้ายังคงเหมือนเดิม ความรุนแรงของรอยผื่นฝ้า สามารถแบ่งออกเป็น 5 แบบ คือ รอยดำ รอยดำร่วม ตุ่มดำขนาดเล็ก ตุ่มดำขนาดใหญ่ และยังพบผลข้างเคียงของไฮโดรควิโนนลักษณะอื่นร่วมด้วย เช่น รอยต่างขา ผิวหนังบาง และผื่นแดง

ตาราง 1.2 Severity of ochronosis

Grade	Descriptions	Subjects	
		No.	%
1	Faint macular sooty pigmentation	35	51.5
2	Distinct macular stippling/small papules	24	35.3
3	Dark deposits and papules	7	10.3
4	Colloid milia (1 mm and greater)	2	2.9
5	Keloid-like nodules/cysts	0	0.0
	Total	68	100.0

โดยสรุปการเกิดฝ้า อาศัย 3 ปัจจัย คือ ระยะเวลาและปริมาณสารไฮโดรควิโนนที่ได้รับ ถ้ามีการสะสมสารในปริมาณสูงก็เกิดเร็วขึ้น ปัจจัยจากแสงแดดจะส่งเสริมการเกิดฝ้า ดังนั้นรอยผื่นจึง

เด่นชัดบริเวณโหนกแก้ม ซึ่งได้รับแสงแดดในปริมาณสูง และปัจจัยที่สามคือต้องมีเซลล์สร้างเม็ดสี ถ้าหาสารไฮโดรควิโนนในบริเวณไม่มีเซลล์สร้างเม็ดสี เช่น รอยต่างขาว ในบริเวณรอยต่างขาวที่หายาก็จะไม่พบฝ้า เข้าใจว่าฝ้าจะเกิดหลังจากสารไฮโดรควิโนนเข้าไปรวมตัวกับส่วนประกอบภายในเซลล์สร้างเม็ดสีในปริมาณมากพอควรและเมื่อสารดังกล่าวมีการซึมผ่านออกจากเซลล์สร้างเม็ดสีเข้าไปชั้นหนังแท้จึงกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้างใยคอลลาเจนผิดปกติ ดังนั้นจึงเกิดฝ้าหลังจากยาไฮโดรควิโนนสามารถปรับสีผิวจางลงก่อน ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานรักษาฝ้า มีรายงานการรักษาด้วยเลเซอร์ว่าได้ผล สารปรับสีผิวยังเป็นที่ต้องการของตลาดเครื่องสำอาง เพราะความนิยมสีผิวของชาวเอเชียคือผิวขาวไม่มีตำหนิ จึงมีการค้นคว้าหาสารปรับสภาพสีผิวหลากหลายชนิดผสมในตำรับเครื่องสำอาง เช่น กรดโคจิก อนุพันธ์วิตามิน ซี สารสกัดจากชะเอม และสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิด แต่ประสิทธิภาพสารดังกล่าวต่ำมาก ในพืชหลายชนิดพบสารอาร์บูติน ก็คืออนุพันธ์ของสารไฮโดรควิโนน โดยอยู่ในรูป  $\beta$ -D-glucopyranoside hydroquinone สารนี้ในปัจจุบันนิยมผสมในเครื่องสำอางเพื่อให้ผิวขาว สารอาร์บูตินพบมากในใบและเปลือกของ bearberry, cranberry, mulberry, blueberry และแพร์ ในสูตรตำรับยารักษาผิวของชาวญี่ปุ่นหรือชาวพื้นเมืองอเมริกันจะผสมพืชเหล่านี้สารอาร์บูตินคงเปลี่ยนเป็นสารไฮโดรควิโนนในชั้นผิวหนังและก่อกำหนดการทำงานของเซลล์สร้างเม็ดสีเหมือนสารสังเคราะห์ไฮโดรควิโนน แต่เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดธรรมชาติต่ำผลการฟอกสีจึงต่ำ มีการศึกษาในคนหลายกลุ่ม สามารถตรวจพบสารไฮโดรควิโนนในโลหิตและปัสสาวะ สารอาร์บูตินอาจสลายเป็นสารไฮโดรควิโนนภายในร่างกาย ดังนั้นเมื่อตรวจระดับสารไฮโดรควิโนนในเลือด หรือปัสสาวะจึงพบปริมาณสารไฮโดรควิโนนแตกต่างกันตามแต่ชนิดอาหารที่รับประทาน ยังไม่มีผลเสียของสารนี้ต่อระบบภายในร่างกายแต่มีการกล่าวอ้างถึงประสิทธิภาพของสารสกัดเหล่านี้เมื่อผสมในตำรับเครื่องสำอางว่าอาจช่วยปรับสีผิวได้สารนี้คงยังอยู่ในความนิยมอีกนานเท่าที่กระแสดังกล่าวต้องการผิวขาวยังอยู่ แต่ประโยชน์ที่ได้รับคงน้อยไม่คุ้มค่า การรักษาผิวให้ขาวควรเป็นการป้องกันจึงจะเป็นวิธีที่ปลอดภัยและคุ้มค่ากว่า แต่เนื่องจากยังมีความต้องการให้ผิวขาวในแง่การตลาด ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาวจึงยังมีความพยายามนำสารสังเคราะห์ซึ่งเคยมีรายงานมาแต่โบราณมาปรับใช้ใหม่ หรือบางผลิตภัณฑ์ก็พยายามสกัดสารจากพืชหลากหลายชนิดมาผสมผลการใช้สารสังเคราะห์ก็ยังมีปัญหาด้านความปลอดภัยเช่นเดิม มีการลักลอบผสมสารไฮโดรควิโนนกับผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวอยู่มากมาย และคงจะทำให้เกิดปัญหาฝ้า เหมือนเช่นในประเทศแอฟริกา เพราะการใช้เพื่อผิวขาวจะทาครีมทั่วทั้งใบหน้าผลข้างเคียงคงจะเกิดขึ้นเร็ว โดยเฉพาะครีมสูตรผสมแพทย์ผิวหนังจึงต้องเป็นผู้ชี้แนะสังคมในทางที่ถูกต้องก่อนจะเกิดปัญหาฝ้าเช่นในแอฟริกา

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพืชเพื่อให้มีความถูกต้อง รวมถึงการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และช่วยลดผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นในการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

### สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง

สกุลสาลี (*Pyrus*) มีสมาชิกจำนวน 50-60 ชนิดในบริเวณเขตติดต่อของทวีปเอเชียและยุโรป รวมทั้งทางเหนือของทวีปแอฟริกา เป็นไม้ผลัดใบหรือกึ่งผลัดใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ ขอบใบเรียบหรือจักฟันเลื่อย มีก้านใบ หูใบขนาดเล็กและหลุดร่วงง่าย ดอกออกเป็นช่อ ออกดอกก่อนหรือพร้อมกับใบ ดอกสมบูรณ์เพศ สีขาวหรือพบบ้างที่เป็นสีชมพู กลีบเลี้ยง 5 กลีบ เชื่อมติดกันเป็นรูปคนโทหรือฐานดอกรูปถ้วย กลีบดอก 5 กลีบ รูปกลมหรือรูปไข่กลับ เกสรตัวผู้ 20-30 อัน มักมีสีแดง เกสรตัวเมียประกอบด้วยรังไข่ใต้วงกลีบ รังไข่มีอันเดียวและมี 2 ช่อง แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 อันและติดรอบแกนร่วม ก้านเกสรตัวเมีย 2-5 อัน ผลแบบผลแอปเปิล สกุลสาลีแบ่งออกเป็นสกุลย่อยได้ 2 สกุลย่อย คือ สกุลย่อยของสาลี (*Pyrophorum*) ลักษณะที่เด่นชัด คือ ดอกมีก้านเกสรตัวเมียแยกกันตั้งแต่วางตัว และเนื้อผลมีเซลล์หิน และมีลักษณะเฉพาะ คือ ใบอ่อนมีลักษณะม้วนขอบขึ้น และกลีบดอกมีสีขาว ยกเว้นพันธุ์ที่ผ่าเหล่ามีกลีบดอกสีชมพู ไม้ผลที่น่าสนใจในสกุลย่อยนี้แบ่งออกตามแหล่งปลูกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตะวันตก เป็นกลุ่มที่มีก้านดอกและก้านผลนิ่ม ผลรูปทรงผลสาลี และผลมีวงกลีบเลี้ยงที่ไม่หลุดร่วง ได้แก่ สาลีธรรมดา (common pear; *Pyrus communis* L.) และสาลีหิมะ (snow pear; *Pyrus nivalis* Jacq.) กลุ่มตะวันออกเป็นกลุ่มที่มีก้านดอกและก้านผลไม้เหนียว ผลรูปทรงผลแอปเปิล และผลมีวงกลีบเลี้ยงหลุดร่วง ยกเว้น *Pyrus ussuriensis* และ *Pyrus ovoides* ได้แก่ สาลีจีนสีขาว (chinese white pear; *Pyrus Bretschneideri* Rehd.) สาลีทราย (sand pear; *Pyrus pyrifolia* Nakai) และสาลีฮัสซูเรียน (ussurian pear; *Pyrus ussuriensis* Maxim.)

สรรพคุณทางยา: สาลีเป็นผลไม้ที่มีสรรพคุณในการช่วยบำรุงร่างกาย และอวัยวะภายในต่างๆ อาทิเช่น กระเพาะ ปอด และไต นอกจากนี้แล้วก็ยังมีสรรพคุณที่ช่วยในการย่อยอาหาร ช่วยลดความร้อนภายในร่างกาย แก้ไอละลายเสมหะ และยังช่วยในการบรรเทาอาการของโรคหลอดลมอักเสบอีกด้วย ตำรับยาแผนโบราณ: หากนำเอาลูกสาลีสดมาล้างให้สะอาดแล้วนำไปต้มรวมกับน้ำตาลทราย แล้วนำไปรับประทานเพื่อบรรเทาอาการของโรคหัด บรรเทาอาการไอ และรักษาอาการของโรคหลอดลมเรื้อรัง ส่วนการรับประทานสาลีประจําวันก็จะมีส่วนช่วยในการป้องกันการเป็นโรคดีซ่านได้ หรือหากนำเอาเนื้อของผลสาลีมาต้มกับน้ำผึ้งและน้ำตาลเพื่อรับประทานติดต่อกันแล้ว ก็จะช่วยรักษาอาการไอแห้ง หรือมีเสมหะภายในลำคอ หรือช่วยรักษาอาการท้องผูกได้เป็นอย่างดี

## เทคนิคต่างๆ ที่นำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน

การวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน ด้วยเทคนิคต่างๆ เป็นการตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณสารสำคัญจากวัตถุดิบที่จะนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จากสารสกัดสมุนไพรร และจากสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีรายงานการวิเคราะห์อาร์บูติน จากผู้นำการศึกษาที่ผ่านมามีดังนี้

Keller (1960) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน จากใบ bearberry โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลาย 10% กรดซัลฟูริก สกัดด้วยเอทานอล เดิมสารละลายเลดอะซิเตต แล้วกรอง นำสารละลายที่ได้มาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอลไอโอดี (1 มิลลิลิตร ของ 0.1 นอร์มอลไอโอดี จะเท่ากับ 0.013 กรัม ของอาร์บูติน)

Brailovskaya และคณะ (1976) วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน จากพืชสมุนไพรรด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยนำสารสกัดที่ได้มาทำปฏิกิริยากับสารละลายเลดอะซิเตตแล้วทำปฏิกิริยาต่อด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟต ที่ปรับพีเอช 9.3 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อด้วยสารละลายอะมิโนไพรีน เกิดเป็นสารละลายที่มีสี แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 540 นาโนเมตร

Buhl และคณะ (1991) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินจากพืชที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Ce(IV)-arbutin เป็น Ce(III)-arbutin และให้ทำปฏิกิริยาต่อด้วยสารละลาย amenzo III เกิดเป็นสารละลายที่มีสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 655 นาโนเมตร ที่พีเอช 3.5

Zhang และคณะ (1987) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน ในพืชสมุนไพรรจีน *P. calliantha* โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว ใช้ developing solvent คือ เอซิลอะซิเตต เมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วนผสม 20:3.4:2.7 โดยปริมาตร ในการแยกสาร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร

Sticher และคณะ (1979) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน เมซิลอาร์บูติน-ไฮโดรควิโนน และไฮโดรควิโนน โมโนเมทิลอีเธอร์ ในพืช *Arctostaphylos alpina*, *Aretostaphylos Uva-ursi*, *Bergenia crassifolia*, *Calluna vulgans* และ *Vaccinium vitis-idaea* โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Bondapak C18 ในการแยกสาร วัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอลและน้ำในอัตราส่วนผสม 10:90 โดยปริมาตร

KrauS และ Stahl (1979) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน และเมซิลอาร์บูติน โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Nucleosil C18 ในการแยกสาร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำ และเมทานอล ในอัตราส่วนผสม 80:120 โดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Formard และ Francois (1983) ได้ตรวจเอกลักษณ์อาร์บูติน จากพืช *Aretostaphylos uva-ursi* โดยวิธี TLC และวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Teglia และ Alessandro (1989) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรควิโนน และอาร์บูตินในเครื่องสำอาง โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Lichrosphere 100 RP-18 ในการแยกสาร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ไฮโดรควิโนน และความยาวคลื่น 288 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์อาร์บูติน

Sun และคณะ (1997) ได้วิเคราะห์ปริมาณของอาร์บูติน ในพืชสมุนไพรวัด *vaccinium vitis-idaea* โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ Inersil-ODS ในการแยกสาร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำในอัตราส่วนผสม 15:85 โดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

Coutea และคณะ (2000) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินจากพืชสมุนไพรวัด *bearberry (Arctostaphylos uva-ursi)* และ *vanilla slice (Achillea millefolium)* โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และได้ทำการศึกษาถึงผลของการสลายตัวต่อแสง และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ใช้คอลัมน์ Nucleosil 5 C18 วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอล น้ำ และกรดอะซิติกในอัตราส่วนผสม 60:35:5 โดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร พบว่าค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวที่ได้คือ  $5.5 \times 10^{-4}$   $7.0 \times 10^{-4}$  และ  $24.1 \times 10^{-4}$  นาที ที่พีเอช 5, 7 และ 9 ตามลำดับ

Qui และคณะ (2000) ได้วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน ในเครื่องสำอางโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Huang และคณะ (2001) ได้วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในเครื่องสำอางใช้คอลัมน์ ODS-C18 ในการแยกสาร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิเทรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.0 และเมทานอล ในอัตราส่วนผสม 95:5 โดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

Parejo และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงฤดูในการเก็บตัวอย่างพืช พบว่าในฤดูใบไม้ร่วงเป็นระยะเวลาที่ *Aretostaphylos uva-ursi* มีสารสำคัญอาร์บูตินมากที่สุด และส่วนใบมีปริมาณอาร์บูตินสูงถึง 9.1% ของน้ำหนักพืชแห้ง ต่อมาได้พัฒนาวิธีการสกัดแบบขั้นตอนเดียว สำหรับสกัดสารจากพืชสมุนไพรวัด แล้วศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินจากใบของพืช *bearberry* โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเป็นขบวนการที่มีความสำคัญ และจะต้องมีมาตรการตรวจสอบประเมินว่า เป็นวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ทั้งนี้เพราะผลจากการวิเคราะห์จะบ่งชี้ถึงคุณภาพของสารสำคัญ ทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ยังใช้ในการติดตามควบคุมคุณภาพของสารสำคัญให้มีมาตรฐานคงที่อยู่เสมอ หากวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีที่ให้ผลไม่ถูกต้องแล้ว ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ก็ไม่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพและความปลอดภัยของสารสำคัญได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจะต้องศึกษาสภาวะการทดลองและทดสอบในเรื่องความคงตัวของสาร ละเอียดต่างๆ ในระบบโครมาโทกราฟี ตลอดจนวิธีทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี และวิธีการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มีดังนี้

#### ความถูกต้อง (accuracy)

แสดงถึงผลของการวิเคราะห์ว่าใกล้เคียงค่าจริงเพียงใด ซึ่งพิจารณาจากค่า %recovery โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบปริมาณ เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หรือหาความผิดพลาดของวิธีการ ในการทดลองจะต้องหาค่า %recovery ของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นหลายระดับ วิธีที่นำมาใช้คือ วิธี standard addition ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปในการผลิตภัณฑ์ที่ต้องการวิเคราะห์ หรือตัวอย่าง ที่ผลิตตามขบวนการผลิตจริง มีสารสำคัญที่จะวิเคราะห์อยู่ในตัวอย่างอยู่แล้วก่อนจะเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนเข้าไปเพิ่มอีก

#### ความแม่นยำ (precision)

แสดงถึงความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์เมื่อทำการทดลองซ้ำ หรือการกระจายตัวของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์เมื่อทำซ้ำ ความแปรปรวนหรือการกระจายของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย เป็น random error อันเนื่องมาจากผู้วิเคราะห์ เครื่องมือ สารเคมีและสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในการวิเคราะห์ ซึ่งยากที่จะควบคุมให้เหมือนเดิมทุกประการ ค่าที่ใช้แสดงถึงความแม่นยำ คือ relative standard deviation (R.S.D.) หรือ coefficient of variation (CV) ซึ่งคำนวณเป็นค่าร้อยละ ในการหาความแม่นยำ แยกได้เป็นความแม่นยำในการทำซ้ำ (repeatability) และการทำใหม่ (reproducibility) ขึ้นกับวิธีการทดลองหรือห้องปฏิบัติการ คือ repeatability หมายถึงการหา %R.S.D. ในการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน ส่วน reproducibility คือการทำซ้ำต่างวันกัน ซึ่งจะเตรียมน้ำยาต่างๆ ใหม่ในการทำซ้ำ การกำหนดค่า %R.S.D. จะขึ้นกับระดับสารที่จะวิเคราะห์หาปริมาณ %R.S.D. จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ต่ำลง

**ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (limit of quantitative, LOQ)**

LOD จะต้องหาในการทำ limit test ส่วน LOQ ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณที่วัดได้ต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยความถูกต้อง และความแม่นยำที่ยอมรับได้ การกำหนดค่า LOD และ LOQ ในวิธีที่ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ทำโดยหาค่า background และ S.D. โดยใช้ blank การวิเคราะห์หาค่า LOD จะเท่ากับหรือมากกว่า 3 S.D. และค่า LOQ จะเท่ากับหรือมากกว่า 10 S.D. ค่า LOD อาจหาได้จากค่า S/N (signal to noise ratio) โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสำคัญที่รู้ปริมาณและ blank ค่าที่ยอมรับคือ 2:1 หรือ 3:1

**ความเฉพาะเจาะจง (selectivity หรือ specificity)**

เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่ตรวจพบอย่างถูกต้อง เจาะจงเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้น การวิเคราะห์ถูกรบกวนจากส่วนผสมของยา ด้วยาร่วม สิ่งที่ได้จากการสลายตัวของยา สารปนเปื้อน และสารตั้งต้นจากการผลิตตัวยาสำคัญ

**ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)**

การหาค่าช่วงของความเข้มข้นที่ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณตัวยามีอยู่จริง สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะต้องทำ system suitability ร่วมในการทำ validation ด้วย เพื่อตรวจสอบระบบการทำงานทางอิเล็กทรอนิกส์ และคอยล์ว่าอยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับใช้งานหรือไม่ การทดสอบมี 2 ส่วน ส่วนแรก คือ หาความแม่นยำโดยดูผลเมื่อฉีดซ้ำ โดยนำความสูงพื้นที่ หรือ respond ratio มาคำนวณ %R.S.D. คูณพื้นที่ที่ยอมรับ USP 26 กำหนดให้ %R.S.D. น้อยกว่า 2 เมื่อฉีดซ้ำ 5 ครั้ง และ %R.S.D. มากกว่า 2 ได้ เมื่อฉีดซ้ำกัน 6 ครั้งขึ้นไป ส่วนที่สอง คือ ความสามารถในการแยกโดยการหาค่า resolution (R) และ tailing factor (T) USP กำหนดค่า R ไม่น้อยกว่า 2-3

**การเทียบวิธีมาตรฐาน**

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้วิธีมาตรฐานในงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ไว้แล้ว โดยใช้สภาวะและขั้นตอนของวิธีมาตรฐานทั้งหมด แต่ใช้ตัวอย่างที่เราต้องการวิเคราะห์ในการหาปริมาณแล้วทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีที่คิดค้นขึ้นมาใหม่กว่าวิธีที่คิดค้นขึ้นมานั้นมีความเหมาะสมกว่าวิธีมาตรฐานที่มีอยู่แล้วเพื่อทำการพัฒนาต่อไป

## วัตถุประสงค์การศึกษาวิจัย

### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาและเตรียมสูตรตำรับนาโนอาร์บูตินครีม

เพื่อทดสอบการปลดปล่อยอาร์บูตินจากเม็ดยานาโนครีมและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไท

โรซิเนสในขบวนการสร้างเมลานินของผิวหนัง

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินจากไมโครปิดนาโนครีม ด้วยเทคนิคไมเซลลาร์ลิควิดโคร

มาโทกราฟีที่เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีสะอาดของเทคนิควิเคราะห์ที่เป็นมิตรกับ

สิ่งแวดล้อม

## ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา เชิงทฤษฎีและหรือเชิงประยุกต์

### เชิงเศรษฐศาสตร์

ประชาชนสามารถนำความรู้ที่ได้จากงานวิจัย และการนำเอาสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และเพิ่มรายได้ให้ครอบครัวแบบยั่งยืน ประชาชนสามารถผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างปลอดภัยและใช้ได้ปริมาณที่ถูกต้อง

### เชิงสังคม

ประชาชนและหน่วยงานต่างๆ ได้รับข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส องค์ประกอบของสารสำคัญทางชีวภาพของสารสกัดจากลูกสาส์ และวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีสะอาดที่ความปลอดภัยสูง เกิดการสร้างเครือข่ายระหว่างผู้ผลิต นักวิชาการท้องถิ่น นักวิชาการภาครัฐ ประชาชน และฝ่ายคุ้มครองผู้บริโภคในการประสานงานความร่วมมือในการพัฒนาคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางของสารสกัดจากสาส์ อันเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัย เพื่อพัฒนาปรับปรุง และได้ข้อมูลเบื้องต้น สร้างความเข้มแข็งให้กับชุมชน โดยทำให้เกิดความร่วมมือในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อชุมชนให้ได้มาตรฐานสากล เป็นที่ยอมรับ ได้เครือข่ายความร่วมมือในการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ผู้ผลิตและชุมชน ได้ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์หรือรายงานสืบเนื่องจากการประชุมในระดับชาติหรือนานาชาติ

## ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

งานวิจัยมีขอบเขตการใช้ประโยชน์จากสารสกัดที่ได้จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขบวนการสร้างเมลานินของผิวหนัง ได้แก่ อาร์บูติน

ศึกษาและพัฒนาการเตรียมนาโนครีมที่มีส่วนผสมของอาร์บูติน และ ศึกษาการปลดปล่อย สารและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขบวนการสร้างเม็ดสีของเมลานินของสีผิว จากนั้น วิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินจากเม็ดปิดนาโนครีม ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นพัฒนาเทคนิคที่สะดวกเพื่อเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสารสำคัญที่แยกและวิเคราะห์ได้นั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเตรียมเป็นพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางยาทางด้านเครื่องสำอางซ้ดสีผิว ต่อ การนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อทดแทนการนำเข้าสู่สารเคมี และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพอื่นๆ ต่อไป

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและเครื่องมือ

#### ทฤษฎีของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีแยกองค์ประกอบของสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายขององค์ประกอบระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ และวัฏภาคเคลื่อนที่ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งทางคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งสารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนของคอลัมน์ วัฏภาคเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์โดยอาศัยแรงอัดจากปั๊ม สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับบนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบจะมีการกระจายอยู่ระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งวัฏภาคเคลื่อนที่จะนำสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อเข้าสู่เครื่องตรวจวัด และจะส่งสัญญาณต่อไปที่เครื่องบันทึกสัญญาณจะเปลี่ยนสัญญาณออกมาในรูปโครมาโทแกรม วิธีการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถแบ่งย่อยออกเป็นรูปแบบต่างๆ ตามชนิดของวัฏภาคคงที่ที่ใช้ได้ดังนี้

Absorption HPLC เทคนิคนี้มีวัฏภาคคงที่เป็นอนุภาคของแข็งที่มีรูพรุน และมีพื้นผิวมาก เช่น ซิลิกาเจล หรือ อะลูมินา ซึ่งมีพื้นผิวที่ว่องไว เช่น หมู่ silanol ที่อยู่บนพื้นผิวของซิลิกาเจล และมี สารเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติตั้งแต่มีสภาพขั้วจน ถึงไม่มีสภาพขั้วหลักการแยกสารนั้นอาศัยการเกิดอันตรกิริยาที่ต่างกันระหว่างสาร กับพื้นผิวที่ว่องไวของวัฏภาคคงที่

Ion exchange chromatography เทคนิคนี้ใช้ของแข็งที่มีรูพรุนเป็นวัฏภาคคงที่ ปกติจะเป็นพวกเรซิน (resin) ที่มีหมู่ไอออนต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี โดยทั่วไปใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยแคตไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับหมู่ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่ไอออนในเฟสเคลื่อนที่ที่มีประจุเหมือนกันกับไอออนที่ต้องการแยก และจะรวมกับหมู่ที่อยู่บนผิวเรซินในลักษณะที่เป็นคู่ไอออน เพื่อให้ประจุทั้งหมดอยู่ในสภาวะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนที่อยู่ในสารละลายกับแคตไอออน เพื่อเข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยึดเกาะขึ้น ส่วนขบวนการแยกขึ้นกับชนิดของเรซิน ความเป็นกรด-เบส และค่าความแรงของไอออนของวัฏภาคเคลื่อนที่

Molecular exclusion HPLC (gel permeation หรือ filtration) เทคนิคนี้อาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล และ/หรือ ขนาดของโมเลกุลที่จะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ การที่สารจะถูกหน่วงให้อยู่ในคอลัมน์นานหรือไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลเมื่อเทียบกับขนาดรูพรุนของวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กสามารถที่จะผ่านเข้าไปในรูที่เล็กโมเลกุลขนาด

กลางผ่านได้เฉพาะบางส่วนของรูพรุนของสารที่บรรจุในคอลัมน์เท่านั้น สำหรับโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มากจะไม่สามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนได้ ดังนั้นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ก่อน เทคนิคนี้เหมาะสมสำหรับแยกสารที่มีมวลโมเลกุลสูง

Partition HPLC เทคนิคนี้อาศัยหลักการที่โมเลกุลของสารประกอบกระจายตัวระหว่างวัฏภาคทั้งสองที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เฟสทั้งสองจะต้องเลือกจากของเหลวที่มีสภาพขั้วต่างกันมากมาย ถ้าวัฏภาคคงที่มีขั้ว (polar) จะต้องเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ไม่มีขั้ว สำหรับสารประกอบที่มีขั้วจะถูกยึดอยู่กับวัฏภาคคงที่อย่างแน่น เทคนิคนี้คือ normal-phase liquid chromatography แต่ถ้าวัฏภาคคงที่ไม่มีขั้วเฟสเคลื่อนที่ต้องมีขั้ว สารประกอบที่มีขั้วจะชอบเฟสเคลื่อนที่จึงถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วเทคนิคนี้คือ reversed-phase liquid chromatography

### การหาประสิทธิภาพของคอลัมน์

พิจารณาได้จากความกว้างของพีคที่ถูกชะออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีคแต่ละพื้นที่ถูกชะออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลตของคอลัมน์ สามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรมดังนี้

$$N = \left[ t_r / W \right]^2$$

เมื่อ N = number of theoretical plates

T = retention time ของสาร

w = ความกว้างของพีคที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด

a = ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีค (tangent = 16)

และความสูงของเพลตแต่ละเพลตในคอลัมน์ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่มีความยาวไม่เท่ากันได้ โดยที่

$$H = L / N$$

เมื่อ L = เป็นความยาวของคอลัมน์ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

### ภาชนะบรรจุของเหลวที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

อาจทำมาจากแก้ว ซึ่งมีข้อเสียคือ แตกง่าย หรือวัสดุอื่นๆ เช่น tenon, stainless steel ขนาดบรรจุควรประมาณ 1 ลิตร หรือมากกว่า ในกรณีใช้เพื่อเตรียมสารละลาย ตัวทำละลาย เป็นตัวแปรที่มีความสำคัญมากในการแยกสารตัวอย่างออกเป็นองค์ประกอบย่อย ตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาค

เคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้ง สารละลายอื่นๆ ของเกลือชนิดต่าง คุณสมบัติที่สำคัญบางประการของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่ ไม่ทำปฏิกิริยากับคอลัมน์ (ทำให้เกิดการอุดตัน ในคอลัมน์ เป็นการเพิ่มความดันในระบบ และสารละลายตัวอย่างทุกชนิดก่อนการวิเคราะห์โดยใช้ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ควรกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45-0.5 ไมครอน และกำจัดก๊าซซึ่งละลายในสารละลายทั้งหมด สำหรับน้ำกลั่นจะต้องปราศจากสารอินทรีย์ และแบคทีเรียต่างๆ เหมาะสมกับชนิดของเครื่องตรวจวัดที่ใช้การดูดกลืนแสงของวัฏภาคเคลื่อนที่ ความบริสุทธิ์ของตัวทำละลายมีความสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ของเครื่องตรวจวัดของเครื่องโคร มาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีความไวสูง ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ทำให้เพิ่ม background ในช่วงยูวีต่ำ การไล่อากาศสามารถช่วยแก้ปัญหาได้ เกลือที่เป็นสาร ion-pairing เช่น tetramethylammonium salts มักมีสารปนเปื้อนที่ดูดกลืนแสงยูวี จึงควรเลือกชนิดที่มีความบริสุทธิ์ สูงเท่าที่จะหาได้

#### ระบบให้ความดัน

เป็นส่วนสำคัญในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อดันของเหลวให้ไหลผ่าน คอลัมน์ ด้วยความเร็วที่เหมาะสมและคงที่ ระบบให้ความดันมี 2 แบบคือ

ระบบที่ให้ปริมาตรคงที่ คือ ระบบที่อัตราเร็วของการไหลจะคงที่ จะทำงานโดยการผลักดัน ด้วยแรงกล ข้อดีของระบบนี้ คือ ให้ base line ที่คงที่มากกว่า retention time จะมี reproducibility มากกว่า ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องและแม่นยำกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้ gradient elution

ระบบที่ให้ความดันคงที่ คือ ระบบจะถูกพลังกดดันและควบคุมด้วยความดันจากก๊าซ มีข้อดี กว่าในด้านราคาและความไม่ซับซ้อนในการทำงาน แต่ความถูกต้องจะน้อยกว่า ใช้ในกรณีที่ไม่ ต้องการความถูกต้อง และ reproducibility มากนัก

ปั๊มทำหน้าที่สูบวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อส่งเข้าสู่คอลัมน์ในอัตราเร็วที่เราเลือก ความดันของ ระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (ถ้าความเร็วสูงจะทำให้เกิดความดันสูง) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความหนืดของวัฏภาคเคลื่อนที่ ขนาดของอนุภาค และความยาวของคอลัมน์ อีกด้วย โดยปกติ ความดันที่ใช้มักไม่เกิน 4,000 psi ปั๊มสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ isocratic pump ใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้คงที่ตลอดเวลา และ gradient pump เป็นปั๊มที่สามารถ ควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ตามเวลาที่กำหนด

### เครื่องฉีดสารตัวอย่าง

Syringe injection เป็นการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง เพื่อลดความกว้างของแถบ ก่อนที่สารจะไปถึงของแข็งรองรับที่บรรจุในคอลัมน์ให้น้อยที่สุด มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะกับคอลัมน์ที่ ความดันสูงๆ Loop injection สามารถใช้กับคอลัมน์ที่ความดันสูงได้มีปริมาตรคงที่ให้ปริมาตรฉีด เท่ากันทุกครั้ง จึงให้ reproducibility ดี สามารถใช้กับระบบอัตโนมัติได้ง่าย

### คอลัมน์

คอลัมน์สำหรับวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มักทำด้วยเหล็กไม่เป็นสนิม ภายใน บรรจุด้วยวัสดุบรรจุคอลัมน์ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวอย่างที่ต้องการแยก หรือ วิเคราะห์ ตัวคอลัมน์ทำด้วย stainless steel แก้ว หรือ Teflon มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 1-25 มิลลิเมตร ในงานวิเคราะห์ใช้ขนาด 1-5 มิลลิเมตร และใช้ขนาดใหญ่กว่านี้กับงาน preparative separation และ size exclusion chromatography สำหรับคอลัมน์วิเคราะห์ซึ่งเป็น คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพจะประกอบด้วย guard column จะ อยู่ก่อนคอลัมน์วิเคราะห์ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายซึ่งจะเกิดแก่คอลัมน์ ช่วยให้คอลัมน์มีอายุการใช้งานนานขึ้น precolumn material ทำหน้าที่กรอง particle packing material ที่ใช้ในงานวิเคราะห์มี 2 ชนิด คือ particular type และ microparticulate

### เครื่องตรวจวัด

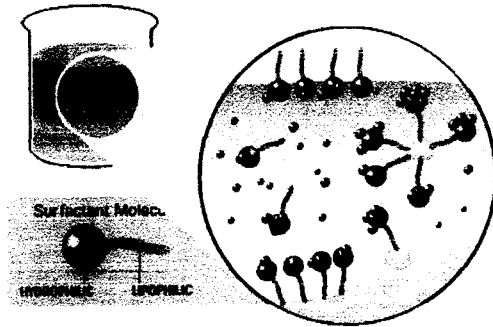
เครื่องตรวจวัดที่ใช้ใน HPLC มี 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ bulk property detector และ solute property detector โดยประเภทแรก จะวัดความเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพทั้งหมด ของทั้ง สารตัวอย่างและวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ refractometer, conductivity และ dielectric constant detector ประเภทที่สองจะวัดคุณสมบัติของตัวถูกละลายโดยเฉพาะ แต่จะแบ่งเป็นประเภทที่ไม่ จำเป็นต้องเอาวัฏภาคเคลื่อนที่ออก เครื่องตรวจวัดกลุ่มนี้ได้แก่ ultraviolet absorption, polarographic และ radioactivity detector และประเภทที่ต้องเอาวัฏภาคเคลื่อนที่ออกก่อน ได้แก่ Flame ionization detector และ electron capture detector เครื่องตรวจวัดมีหลายชนิดให้เลือก แต่มี สิ่งที่ควรพิจารณาในการเลือกใช้ตรวจวัด เช่น มีความไวสูง ใช้ได้กับสารหลายๆ ชนิด และมีความ เฉพาะเจาะจง ไม่ทำลายตัวอย่าง มีความน่าเชื่อถือ และสะดวกในการใช้งาน

### ระบบข้อมูล

ระบบข้อมูลของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีตั้งแต่ระบบง่ายๆ ซึ่งใช้ใน สมัยเริ่มแรก เป็นเครื่องบันทึก และได้พัฒนาขึ้นจนเป็น integrator ในปัจจุบันผู้ผลิตหลายแหล่งได้ นำเอาระบบ microprocessor ที่สามารถควบคุมการทำงานของระบบโครมาโทกราฟีทั้งหมด ทำให้ การวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น และสะดวกในการใช้งานมากขึ้น

### เทคนิคไมเซลล์าร์โรคราโทกราฟี

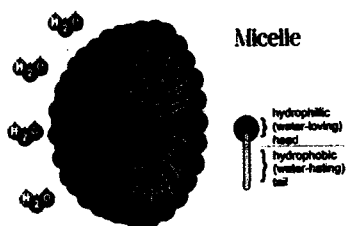
เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มการละลายโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิว หรือที่นิยมเรียกว่า surfactants หรือ surface active agent ซึ่งคือโมเลกุลหรือไอออนซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ และ ที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงในสารละลายบัฟเฟอร์จะทำให้สารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นถึงระดับความเข้มข้นวิกฤตไมเซลล์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตมีความเข้มข้นวิกฤตไมเซลล์ที่ 8.0 มิลลิโมลต่อลิตร โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะรวมกลุ่มกันเป็นวงกลมโดยหันด้านที่ชอบน้ำอยู่ด้านนอกและด้านชอบไขมันอยู่ด้านในหรือศูนย์กลางเกิดเป็นไมเซลล์



รูปภาพ 2.1 ลักษณะการเกิดไมเซลล์าร์ของสารลดแรงตึงผิว

เทคนิคไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Weinberger และคณะ (1993) ได้มีการทดลองใช้ไมเซลล์ ในกระบวนการแคปิลารีเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อใช้แยกสารที่ไม่มีประจุโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ การเติมสารลดแรงตึงผิวในสารละลายบัฟเฟอร์จะเติมให้สารลดแรงตึงผิว มีความเข้มข้นถึงระดับวิกฤตไมเซลล์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตมีความเข้มข้นวิกฤตไมเซลล์ที่ 8.0 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นวิกฤตไมเซลล์โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะรวมกลุ่มกันเป็นวงกลม โดยหันด้านที่ชอบน้ำออกสู่ผิวด้านนอกและหันปลายด้านชอบไขมันเข้าสู่ศูนย์กลางเกิดเป็นไมเซลล์ ระบบของไมเซลล์าร์โครมาโทกราฟีประกอบด้วย 2 เฟส คือเฟสน้ำและเฟสไมเซลล์าร์ โมเลกุลที่ไม่มีประจุกระจายตัว ระหว่างเฟสน้ำและเฟสไมเซลล์าร์ โดยโมเลกุลที่ชอบไขมันสามารถเกิดแรงกระทำกับเฟสไมเซลล์าร์ได้ดีกว่า ทำให้สามารถแยกโมเลกุลที่ไม่มีประจุออกจากกันได้ เฟสไมเซลล์าร์จึงทำหน้าที่คล้ายเฟสคงที่ในโครมาโทกราฟีเฟสไมเซลล์าร์จึงถูกเรียกว่า เฟสคงที่เสมือน โมเลกุลที่เกิดแรงกระทำกับเฟสไมเซลล์าร์ได้

ดี จะใช้เวลาในการแยกนานกว่าโมเลกุลที่ชอบน้ำ หลักการพื้นฐานของเทคนิคไมเซลล์าร์แสดงดัง  
รูปภาพ 2.2



รูปภาพ 2.2 หลักการพื้นฐานของเทคนิคไมเซลล์าร์

เฟสไมเซลล์าร์เป็นชนิดประจุลบ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมกลุ่มเป็นไมเซลล์ และโมเลกุลตัวถูกละลายจะกระจายตัวระหว่างเฟสไมเซลล์าร์และเฟสน้ำ ความสามารถในการแยกของแต่ละโมเลกุล ขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวระหว่างเฟสไมเซลล์าร์และเฟสน้ำ โมเลกุลที่กระจายตัวในเฟสไมเซลล์าร์ได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาก่อนในขณะที่โมเลกุลที่กระจายตัวในเฟสไมเซลล์าร์ได้ดีจะออกมาช้ากว่าโมเลกุลที่กระจายตัว ในเฟสคงที่เสมือนได้ไม่ดี

### ประเภทของครีม

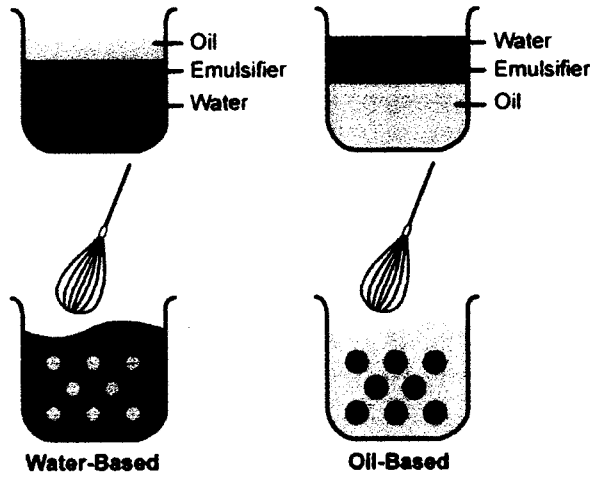
ครีม คือ ยาจำพวกอิมัลชันที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวใช้ทาภายนอก นิยมใช้ในเครื่องสำอาง และ ยารักษาโรคผิวหนัง คุณสมบัติของครีมที่ดี คือ คงตัวในอุณหภูมิธรรมดา เมื่อครีมนุ่ม มองดูน่าใช้ เมื่อครีมแผ่กระจายได้ง่ายเมื่อทา ทำให้เกิดความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง และล้างน้ำออกง่าย

อิมัลชัน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด เช่น น้ำและน้ำมัน ซึ่งนำมารวมกัน ในลักษณะที่ผสมผสานเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ ตัวทำอิมัลชัน เป็นตัวผสมของเหลวทั้งสองเข้าด้วยกัน อิมัลชันที่เกิดขึ้น ถ้ามองด้วยตาเปล่า จะเห็นลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามองด้วยกล้องจุลทรรศน์ ก็จะเป็น 2 วัฏภาค คือ เห็นเป็น หยดเล็กๆ ของของเหลวชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า วัฏภาคภายใน กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า วัฏภาคภายนอก โดยทั่วไปหยดของวัฏภาคภายใน อาจมีขนาดต่างๆ กัน ตั้งแต่ขนาดที่เล็กกว่า 0.05 ไมครอน จนถึง 25 ไมครอน ซึ่งขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในมีผลต่อการกระจายแสงได้ต่างกัน จึงทำให้อิมัลชันมีลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้แตกต่างกัน ขนาดหยดอนุภาควัฏภาคภายใน และลักษณะอิมัลชันที่มองเห็น

เล็กกว่า 0.05 ไมครอน	โปร่งใส
0.05-0.10 ไมครอน	ขุ่นหรือโปร่งแสง

0.10-1.00 ไมครอน  
ใหญ่กว่า 1.00 ไมครอน

สีขาวอมฟ้า  
ขุ่นขาวทึบ



รูปภาพ 2.3 การเกิดอิมัลชัน

การแบ่งชนิดของอิมัลชัน อาจมีได้หลายลักษณะดังนี้

ก. แบ่งตามลักษณะภายนอกที่มองเห็น ได้เป็น 2 ชนิด คือ

แมคโครอิมัลชัน คือ อิมัลชันลักษณะขุ่นขาวที่พบโดยทั่วไปนั่นเอง อนุภาคของวัฏภาคภายในของอิมัลชันชนิดนี้ มักมีขนาดตั้งแต่ 0.25-10 ไมครอน (โดยทั่วไปจะใหญ่กว่า 1 ไมครอน) จึงทำให้เกิดความแตกต่างในค่าดัชนีการหักเหของแสงของวัฏภาคทั้งสอง และเกิดการกระจายแสง ทำให้ดูมอมขุ่นขาว อิมัลชันนี้ อาจแบ่งย่อยได้เป็น อิมัลชันเนื้อหยาบ ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่และอิมัลชันเนื้อละเอียด ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างเล็กหรือเล็กกว่า 5 ไมครอนลงไป แมคโครอิมัลชัน เป็นอิมัลชันชนิดที่พบมากที่สุด ทั้งใน อาหาร ยา และ เครื่องสำอาง ไมโครอิมัลชันมีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กมาก ประมาณ 10-75 นาโนเมตร (0.01-0.75 ไมครอน) ซึ่งมิต้านน้อยกว่า หนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง แสงจึงสามารถทะลุผ่านได้ ทำให้ดูโปร่งใส หยตของวัฏภาคภายใน มีลักษณะกลม ถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มของตัวทำอิมัลชัน มีทั้ง ชนิด O/W และ W/O

ข. แบ่งตามชนิดของของเหลว ที่เป็นวัฏภาคภายใน และ วัฏภาคภายนอก ได้เป็น 3 ชนิด คือ

อิมัลชัน ชนิด น้ำในน้ำมัน อิมัลชันชนิดนี้ มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำ วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน พบอิมัลชันชนิดนี้ ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมล้างหน้า ครีมทากลางคืน ครีมนวดหน้า และ

ครีมซอร์โม่ เป็นต้น เนื่องจากอิมัลชันชนิดนี้ ค่อนข้างเหนอะหนะและล้างน้ำออกยาก จึงเป็นที่นิยมใช้น้อย

อิมัลชัน ชนิด น้ำมันในน้ำ อิมัลชันชนิดนี้ กลับกักกลับชนิดแรก คือ มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ จึงมีความเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายดี ล้างน้ำออกง่าย เป็นที่นิยมมาก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีม และโลชั่นทาผิว ครีมทาหน้า ครีมกันแดด ครีมรองพื้น เป็นต้น

อิมัลชันเชิงซ้อน เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น W/O/W หรือ O/W/O อิมัลชันเชิงซ้อนเหล่านี้ สามารถกลับกลายเป็นอิมัลชันชนิดธรรมดาได้ เช่น W/O/W ซึ่งมีน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก แต่วัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน จะมีหยดเล็กๆ ของหยดน้ำซ้อนอยู่อีกที เมื่อกลับกลายเป็นอิมัลชันธรรมดาจะกลายเป็นชนิด O/W พบ อิมัลชันชนิดนี้บ้างในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น cold cream ซึ่งเป็นชนิด O/W/O เป็นต้น

ค. แบ่งตามความหนืดของอิมัลชัน ได้เป็น 2 ชนิด คือ

โลชั่น เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ (เหลว) เพราะมีวัฏภาคภายในปริมาณที่สูง วัฏภาคภายในมักมีไม่เกิน 35% โลชั่นอาจเป็นทั้งชนิด O/W และ W/O หรือมีชื่อเรียกต่างออกไป ว่าน้ำมันเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทาผิว โดยเฉพาะผิวหนังที่มีบริเวณกว้าง เพราะทาแล้วชุ่มชื้น ไม่เหนอะหนะ ดูดี สดชื่น ให้ความรู้สึกสบาย และล้างออกได้ง่าย เช่น โลชั่นทาผิว โลชั่นป้องกันแสงแดด เป็นต้น โลชั่นชนิด W/O มีการใช้บ้างแต่ไม่เป็นที่นิยม เพราะเมื่อทาแล้ว จะรู้สึกเหนอะหนะผิว เช่น โลชั่นป้องกันแดดชนิดที่มีคุณสมบัติกันน้ำที่ใช้ทา ก่อนลงเล่นน้ำ เป็นต้น คุณสมบัติเช่นนี้ อิมัลชันชนิด O/W ไม่สามารถทำได้ เพราะจะถูกน้ำชะล้างออกหมด เป็นต้น โลชั่นนี้อาจใช้สารเพิ่มความหนืด ในวัฏภาคน้ำเพื่อให้หนืดขึ้นได้ แต่ยังคงเป็นของเหลวที่ไหลได้

ครีม เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง (ลักษณะกึ่งแข็ง) เพราะมีส่วนประกอบของสารพวกไขแข็ง และไขมัน ซึ่งช่วยเพิ่มความหนืดและเนื้อครีมที่ผสมอยู่กับน้ำมัน ในวัฏภาคน้ำมัน ครีมมีทั้งชนิด O/W และ W/O ครีมมีความหนืดกว่าโลชั่น เพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในสูงกว่า คือประมาณ 35-75% แล้วแต่ความหนืดที่ต้องการโดยมีการใช้สารเพิ่มเนื้อ ครีม เช่น ไขมันและไขแข็งดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ กรณีของครีมชนิด O/W อาจมีการใส่สารเพิ่มความหนืดร่วมด้วยในตำรับ เช่น acacia และ methyl cellulose เป็นต้น ซึ่งช่วยความหนืดให้แก่วัฏภาคน้ำ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่เป็นครีมชนิด O/W ได้แก่ ครีมทาผิว ครีมแต่งผม ครีมโกนหนวด ครีมทากันแดด ครีมระงับเหงื่อและกลิ่นตัว ครีมทาแก้ผิว ครีมทาแก้ผ้า เป็นต้น ครีมชนิด W/O ได้แก่ ครีมซอร์โม่ ครีมล้างหน้า ครีมนวดหน้า ครีมแต่งผม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี อิมัลชันชนิดพิเศษ คือ anhydrous emulsion ซึ่งไม่มีน้ำอยู่เลย ประกอบด้วย น้ำมันและสาร polyols เช่น glycerin, propylene glycol, PEG 400 เป็นต้น อิมัลชันที่ได้ อาจมีลักษณะใสหรือขุ่นขาว

### ส่วนประกอบของอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์รูปแบบอิมัลชัน มีส่วนประกอบหลักสำคัญ 3 ส่วนคือ

วัฏภาคน้ำ ได้แก่ น้ำและสารต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ อาจเป็นสารเพิ่มความหนืด เช่น acacia, veegum, methylcellulose, carbopol สารอิมเมกแตนต์ เช่น glycerin, propylene glycol หรือ glycol สารกันเสีย เช่น methylparaben, sodium benzoate สารลดแรงตึงผิว เช่น tween, sodium lauryl sulfate สีที่ละลายน้ำ สารต้านออกซิเดชัน เช่น sodium metabisulfite นอกจากนี้ อาจเป็นสารออกฤทธิ์อื่นที่ละลายน้ำได้ เช่น cetyl pyridinium chloride, benzalkonium chloride เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้ อาจเติมลงในวัฏภาคน้ำได้ทั้งสิ้น แล้วแต่ส่วนประกอบของสูตรในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

วัฏภาคน้ำมัน ได้แก่ น้ำมันต่างๆ เช่น olive oil, mineral oil, castor oil ไขมัน เช่น stearyl alcohol, stearic acid, cetyl alcohol, lanolin ไขแข็ง เช่น bee wax, paraffin wax, carnauba wax สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารกันหืน เช่น BHT, BHA สารลดแรงตึงผิว เช่น span, emulgin C 1000 หรือ สารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น ฮอริโมน วิตามิน เป็นต้น แล้วแต่ส่วนประกอบในสูตรของผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทเช่นกัน

ตัวทำอิมัลชัน ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เช่น tween, span, sodium lauryl sulfate คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น acacia, gelatin ของแข็งอนุภาคละเอียด เช่น bentonite, colloidal magnesium aluminium silicate เป็นต้น ตัวทำอิมัลชัน เป็นตัวสำคัญในการผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

### วัสดุที่ใช้เตรียมเม็ดปิด

#### โซเดียมอัลจิเนต

อัลจิเนตหรืออัลจินเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ในการผลิตอัลจิเนตเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ ได้แก่ *macrocyctis pyrifera* มีอัลจินประมาณ 14-19%, *laminaria cloustoni* และ *laminaria digitata* มีอัลจินประมาณ 15-40% ปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิดของสาหร่ายฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วยุโรป ในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนตมากคือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนาดา และญี่ปุ่น อัลจิเนตไม่ทุกชนิดมีคุณสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ  $Ca^{2+}$  โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ โดยมี  $Ca^{2+}$  เกาะอยู่กับสายโพลีเมอร์ คุณสมบัติที่ดีของอัลจิเนตคือ ทำให้เกิด irreversible gel ในน้ำเย็นเมื่อมี  $Ca^{2+}$  รวมอยู่ด้วย ซึ่งคุณสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิตำ่ทำให้อัลจิเนต แตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง

อัลจินตถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1920 โดยเติมในอาหารบางชนิดใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มความคงตัว ทำให้มีล้นข้นคงตัว สารทำให้เกิดเจล และสารยับยั้งการเกิดกลไกการสังเคราะห์ ตัวอย่างเช่น propylene glycol alginate ใช้ในน้ำสลัด และเปียร์ เพราะมีความสามารถละลายได้สูงที่พีเอชต่ำ

#### กัมอะคาเซีย

อะคาเซียเป็นกัมที่ได้จากต้นของ *Acacia Senegal* และ *Acacia Seyal* ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์เชิงซ้อนและมีไนโตรเจนจำนวนเล็กน้อย องค์ประกอบทางเคมีจะแตกต่างกันเล็กน้อยตามแหล่งที่มา ภูมิอากาศ ฤดูกาลและอายุของต้น ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล คือ galactose (44%), arabinose (24%), glucuronic acid (14.5%), rhamnose (13%) และ 4-O-methylglucuronic acid (1.5%) กัมจากอะคาเซียจะมีปริมาณของ rhamnose และ glucuronic acid ต่ำกว่า *Acacia Senegal* แต่มีปริมาณของ arabinose และ 4-O-methyl glucuronic acid สูงกว่ากัม Arabic ซึ่งเป็น heteropolysaccharide ที่มีโครงสร้างซับซ้อนมีกิ่งแขนง นอกจากนี้โมเลกุลยังประกอบด้วย amino acid ได้แก่ hydroxyproline และ serine

#### กัมเมล็ดแมงลัก

แมงลัก (*Ocimum canum* Sims.) อยู่ในวงศ์ *Lamiaceae* เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันแพร่หลายในประเทศไทย เปลือกเมล็ดมีสารเมือก เมื่อนำไปแช่น้ำจะพองตัวได้ถึง 45 เท่า ลักษณะเป็นวุ้นใสหุ้มเมล็ดสีดำเล็กๆ ไว้ข้างในคล้ายไซกบโดยสารเมือกเมล็ดแมงลักจัดเป็นเส้นใยอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเมือกของเมล็ดแมงลักประกอบด้วยสายของเม็ดแป้งจำนวนมากมายเรียงตัวกันแน่นอยู่ในแนวตั้งกับเปลือกของเมล็ดจำนวนของเม็ดแป้งในแต่ละสายมีประมาณ 50-70 เม็ดจึงนำเมือกของเมล็ดแมงลักมาสกัดเป็นกัม โดยกัมที่สกัดจากเม็ดแมงลักมีคุณสมบัติในการเป็นสารที่ให้ความหนืด แม้ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย มีการพองตัวและความสามารถในการขุ่นน้ำได้เป็นอย่างดีซึ่งสามารถนำมาเป็นสารก่อเจลได้ในเครื่องสำอาง

### บทที่ 3

#### การทดลอง

##### เครื่องมือสำหรับการทดลอง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Shimadzu SCL-10 A ประเทศญี่ปุ่น

ประกอบด้วย Pump : LC-10 AD

Detector : SPD-10 A

Analytical column : Nova-Pak C<sub>18</sub>, 150 x 3.9 mm

เครื่อง UV-visible spectrophotometer, Model 1240v Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่อง pH-meter รุ่น MP-220

เครื่อง Zetameter, Zetasizer® Nano Series, model ZEN3600, ประเทศอังกฤษ

##### สารเคมีที่ใช้

สารมาตรฐานอาร์บูติน (Arbutin standard)

สารมาตรฐานของเรซอร์ซินอล (Resorcinol standard)

สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid standard)

Methanol (HPLC grade)

Acetonitrile (HPLC grade)

Sodium hydrogen phosphate

Disodium hydrogen phosphate

Lead (II) acetate

Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)

Polyethylene dodecyl ether (Brij 35)

Tyrosinase from mushroom, บริษัท Fluka [EC 1.14.18.1]

L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine), บริษัท Sigma

ตัวอย่างเครื่องสำอางตามท้องตลาด

## วิธีการทดลอง

### การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานอาร์บูตินน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเรเซอร์ซินอลความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานเรเซอร์ซินอลน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร ใช้เพื่อเปรียบเทียบในการวิเคราะห์ของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อทดสอบหาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

#### เตรียม SDS

ชั่ง SDS น้ำหนัก 1.4419 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบปริมาตรจะได้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง SDS จะมีจุดวิกฤตไมเซลอยู่ที่ 8.0 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจะต้องเตรียม SDS ให้มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับจุดวิกฤตไมเซล

#### การเตรียมสารละลาย CTAB

ชั่ง CTAB น้ำหนัก 0.1823 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรจนครบปริมาตรจะได้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง CTAB จะมีจุดวิกฤตไมเซลอยู่ที่ 0.92 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจะต้องเตรียม CTAB ให้มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับจุดวิกฤตไมเซล

#### การเตรียมสารละลาย Brij 35

ชั่ง Brij 35 น้ำหนัก 0.2995 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรจนครบปริมาตรจะได้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง Brij 35 จะมีจุดวิกฤตไมเซลอยู่ที่ 0.09 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจะต้องเตรียม Brij 35 ให้มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับจุดวิกฤตไมเซล

## การเตรียมตัวอย่าง

### การเตรียมตัวอย่างพืช

สาธิตสายพันธุ์ต่างๆ นำผลมาล้างทำความสะอาด แยกเป็น เปลือกนอก กับเนื้อสาธิต ปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน 40-50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด

การสกัดตัวอย่างพืชด้วยน้ำ: นำตัวอย่างมาทำการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้งแล้วนำไปปั่นให้เป็นผงพืชด้วยเครื่องปั่น เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันไม่ให้ถูกแสง การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างละเอียดประมาณ 1 กรัม แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น เติมน้ำคลอโรฟอร์มบอเนตลงไป 0.02 กรัม แล้วนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 จากนั้นเติม 4% lead (II) acetate จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 0.05 กรัมของโซเดียมฟอสเฟต แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่จนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การสกัดตัวอย่างพืชด้วยเมทานอล: การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้น้ำหนักตัวอย่างละเอียดประมาณ 1 กรัม แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล เติมน้ำคลอโรฟอร์มบอเนตลงไป 0.02 กรัม แล้วนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 จากนั้นเติม 4% lead (II) acetate จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 0.05 กรัมของโซเดียมฟอสเฟต แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่จนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร

### การเตรียมตัวอย่างครีม

การสกัดตัวอย่างครีมด้วยน้ำ ; ซังตัวอย่างครีมประมาณ 0.5 กรัม จดบันทึกน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร แล้วนำไป centrifuged ที่ 3500 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41

การสกัดตัวอย่างครีมด้วยเมทานอล ; ซังตัวอย่างครีมประมาณ 0.5 กรัม จดบันทึกน้ำหนักโดยละเอียด ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร แล้วนำไป centrifuged ที่ 3500 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41

## การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ MLC

### ศึกษาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของอาร์บูติน

เจือจางสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินจากความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำสารมาตรฐานอาร์บูตินไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วย

เครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูติน

### **ศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่**

ในการทำการทดสอบวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำเพื่อหาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ทำได้โดยการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วทำการทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายมาตรฐานอาร์บูติน สารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนและสารละลายเรเซอร์ซินอล ฉีดเข้าไปเพื่อคำนวณค่า retention factor และสังเกตลักษณะของพีคที่ได้ในแต่ละวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ทดสอบทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมไว้ จากนั้นก็เลือกตัวที่เหมาะสมที่สุดนำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

### **ศึกษาความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่**

เมื่อทำการทดสอบวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วเลือกตัวที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นก็เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวที่เลือกใช้โดยการเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ความเข้มข้นแต่ความเข้มข้นต้องเตรียมมากกว่าจุดวิกฤตไมเซล) ดังนั้นต้องเตรียมที่ความเข้มข้นให้มากกว่าจุดวิกฤตไมเซล จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานทั้งสามตัวเช่นเดิม แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้แล้วเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

### **ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์**

เมื่อทำการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วที่ได้จากการทดลอง จากนั้นก็ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่พีเอชต่างๆ กัน โดยการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ และใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายในการเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ สารละลายบัฟเฟอร์เตรียมได้จากสารผสมระหว่างโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อเตรียมละลายเสร็จแล้วนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter แล้วปรับพีเอชตามความต้องการที่พีเอชต่างๆ กัน แล้วนำไปทดสอบในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานทั้งสามตัวเช่นเดิม แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ แล้วเลือกความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์และพีเอชที่เหมาะสมที่สุดโดยดูจากค่า retention factor ที่คำนวณได้และลักษณะของพีคที่ได้

### **ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงไป**

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายอินทรีย์ที่เติมลงไปโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ผสมลงไปในวัฏภาคเคลื่อนที่ ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ อะซิโตน ไทรเมทิลอะมิโน และ โพรพานอล ที่มีความเข้มข้นที่เติมลงไปในวัฏภาคเคลื่อนที่ เท่ากับ 1%, 2%, 3 %, 4% และ 5% ตามลำดับ แล้วทำการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน ทั้ง

สามตัวเช่นเดิม แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ที่เหมาะสมที่สุดโดยคำนวณจากค่า retention factor ที่วิเคราะห์ได้และลักษณะของพีคที่ได้

### ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม

เมื่อทำการเลือกชนิดและความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้วจากนั้นก็ทำการทดสอบอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยปรับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีอัตราการไหลต่างๆ กัน แล้วทำการทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน ทั้งสามตัวเช่นเดิม แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้โดยดูจากค่าการแยกของพีค และเวลาที่ใช้วิเคราะห์และเลือกอัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุด

### การสร้างกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐานทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานทั้งอาร์บูตินและไฮโรควิโนนให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และปิเปตสารละลายมาตรฐานเรเซอร์ซินอลให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายมาตรฐานผสมทุกความเข้มข้นแล้วปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 2-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 3 ซ้ำในระบบ MLC อ่านบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค และนำไปคำนวณสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ใช้วิเคราะห์กับค่าพื้นที่ใต้พีค และนำค่าที่ได้ไปใช้คำนวณเพื่อหาค่า ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบ และ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดปริมาณได้

### ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้นที่สูงและต่ำกว่ากราฟมาตรฐาน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ และคำนวณค่า R-square โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานทั้งอาร์บูติน และไฮโรควิโนนให้สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จนถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และปิเปตสารละลายเรเซอร์ซินอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เดิมลงไปในทุกๆ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมแล้วปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ อ่านพื้นที่ใต้พีค และทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยการ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้

## การตรวจสอบความถูกต้อง

### ความแม่นยำ

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยแยกการศึกษาเป็น 2 ประเด็น คือ ประเด็นแรก ศึกษา repeatability คือ ศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียว โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูติน และไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพืชและครีมที่เตรียมไว้ ทำการวัดซ้ำทั้งหมดตัวอย่างละ 7 ซ้ำ ประเด็นที่สองศึกษา reproducibility คือ การศึกษาความแม่นยำระหว่างวัน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษา repeatability เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างวันของการทำการวิเคราะห์ การหาความแม่นยำ ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเปิดสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนให้มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และทุกๆ ความเข้มข้นเติมสารละลายเรเซอร์ซินอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการฉีดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในวันเดียวกันและระหว่างวัน เพื่อเปรียบเทียบผลและคำนวณหาค่า S.D. และ %R.S.D.

### ความถูกต้อง

การศึกษาความถูกต้องทำโดยใช้ standard addition method ในการหาความถูกต้องของวิธี โดยการคำนวณได้จากค่า %recovery เมื่อเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงไปในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น โดยขวดที่ 1 ไม่ต้องใส่สารละลายมาตรฐานลงไปแต่เติมสารละลายมาตรฐานเรเซอร์ซินอล ที่มีความเข้มข้นที่เท่ากัน และเปิดสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนโดยเพิ่มความเข้มข้นตั้งแต่ 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ขวดละ 3 ซ้ำ ในระบบ MLC อ่านค่าพีคที่ได้ และคำนวณหาค่า %recovery ของแต่ละความเข้มข้นที่เติมลงไป

### ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบ และ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดปริมาณ

ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบ โดยทำการลดความเข้มข้นของตัวตัวอย่างลงไปเรื่อยๆ จนเมื่อวัดความสูงพื้นของตัวอย่าง เทียบกับ noise (signal to noise ratio) แล้วได้ค่าประมาณ 2-3 เท่า นั่นคือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์จะสามารถตรวจพบได้ และการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดปริมาณ เมื่อวัดความสูงของพีคของตัวอย่าง เทียบกับ noise แล้วได้ค่าประมาณ 10 เท่า นั่นคือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้

### การศึกษา Robusness

การศึกษา robustness เป็นการทดสอบความคงตัวของวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนเครื่องที่ใช้วิเคราะห์โดยใช้สภาวะเดิมที่ทำการวิเคราะห์ของวิธีที่คิดค้นขึ้น แล้วทำการฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่น้อยไปมากแล้วสร้างกราฟมาตรฐานออกมาแล้วทำการเทียบผลที่ได้กับผลที่ได้

จากอีกเครื่อง ถ้าผลอีกเครื่องที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างแสดงว่าวิธีที่คิดค้นขึ้นมาใหม่สามารถใช้ได้กับสถานะเครื่องอื่นๆ ได้

### การเทียบวิธีมาตรฐาน

การเทียบวิธีมาตรฐานเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้วิธีมาตรฐานในงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ไว้แล้ว โดยใช้สถานะและขั้นตอนของวิธีมาตรฐานทั้งหมด แต่ใช้ตัวอย่างที่เราต้องการวิเคราะห์ในการหาปริมาณแล้วทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีที่คิดค้นขึ้นมาใหม่ว่าวิธีที่คิดค้นขึ้นมาใหม่มีความเหมาะสมกว่าวิธีมาตรฐานที่มีอยู่แล้วเพื่อทำการพัฒนาต่อไป

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด

#### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายสารสกัดหยาบเอทานอลจากสาหล้าสายพันธุ์ต่างๆ น้ำหนักจำนวน 1 กรัม ด้วยคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย จากนั้นสกัดแยกชั้นด้วย 20%เอทานอล 8 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง สารสกัดที่ต้องการจะอยู่ในชั้น 20% เอทานอล รวมชั้น 20%เอทานอล มาปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร นำน้ำหนักสารสกัดที่ละลายอยู่ในชั้น 20%เอทานอล โดยนำน้ำหนักของสารในชั้นคลอโรฟอร์ม (ระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ) ไปลบออกจากน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายในชั้น 20%เอทานอล แล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ คือ 4, 2, 0.4, 0.2 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20%เอทานอล เมื่อนำสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร มาเติมลงในจานหลุมทำให้แต่ละหลุมมี ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร จะคำนวณความเข้มข้น สุดท้ายของสารละลายตัวอย่างในแต่ละหลุมได้โดยใช้สูตร  $N_1V_1 = N_2V_2$  โดยที่  $N_1$  = ความเข้มข้นเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร),  $V_1$  = ปริมาตรเริ่มต้น (50 ไมโครลิตร),  $N_2$  = ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ  $V_2$  = ปริมาตรสุดท้าย (200 ไมโครลิตร)

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

ละลายกรดโคจิก น้ำหนัก 0.0142 กรัม ด้วยสารละลาย 20%เอทานอล ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลายมาตรฐานกรดโคจิก 10 มิลลิโมลาร์ (1.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 20%เอทานอลให้ได้ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เหมาะสม คือ  $2.84 \times 10^{-1}$ ,  $5.68 \times 10^{-2}$ ,  $5.68 \times 10^{-3}$ ,  $2.84 \times 10^{-3}$  และ  $1.42 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน เมื่อนำสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 ไมโครลิตร มาเติมลงในจานหลุม ทำให้แต่ละหลุมมี ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร จะคำนวณความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐาน

กรดโคจิกในแต่ละหลุมได้เป็น  $7.1 \times 10^{-2}$ ,  $1.42 \times 10^{-2}$ ,  $1.42 \times 10^{-3}$ ,  $7.1 \times 10^{-4}$  และ  $0.36 \times 10^{-5}$  มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับการเตรียมบัฟเฟอร์, เอนไซม์ และสารตั้งต้นทำปฏิกิริยา การเตรียม สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 0.44 กรัม และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 0.39 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร การเตรียมสารละลาย เอนไซม์ไทโรซิเนส (314.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from mushroom, บริษัท Fluka) [EC 1.14.18.1] 0.2 มิลลิกรัม ด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 0.02 โมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) การเตรียมสารละลาย L-DOPA จำนวน 0.34 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine, บริษัท Sigma) 0.32 มิลลิกรัม ละลายด้วย 5 มิลลิลิตร ของ 0.02 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8)

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ กัน มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้ Dopachrome method ซึ่งได้ดัดแปลงมาจากวิธีของบุญชู ศรีตุลารักษ์ (2541); Masamoto และคณะ (1980); Morita และคณะ (1994); Lida และคณะ (1995) เทียบกับสารละลาย มาตรฐานกรดโคจิก ดังนี้: เขย่าให้ สารละลายผสมกันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าวัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในจานหลุม (microplate reader) จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น เดิม เติมสาร ละลาย A, B, C และ D แยกกัน ลงในจานหลุม (microlitre plate) (ทำ 3 ซ้ำ) ได้แก่

- A (control): สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (314.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร  
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) 100 ไมโครลิตร  
20% เอทานอล 50 ไมโครลิตร
- B (blank of A): โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) 150 ไมโครลิตร  
20% เอทานอล 50 ไมโครลิตร
- C (test sample): สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (314.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร  
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) 100 ไมโครลิตร  
สารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน 50 ไมโครลิตรใน 20% เอทานอล
- D (blank of C): โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) 100 ไมโครลิตร

สารละลายตัวอย่างใน 20% เอทานอล 50 ไมโครลิตร

การคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สูตร

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

โดย A, B, C และ D คือ ผลต่างของค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ระหว่างค่าที่วัดได้ก่อนการบ่ม และหลังบ่มแล้ว 2 นาที ( $A_2 \text{ min} - A_0 \text{ min}$ )

การคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  จากกราฟ

การหาค่า  $IC_{50}$  (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50%) ให้ใช้โปรแกรม excel สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่า  $\log_{10}$  ของความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน x) กับ %Lethality (แกน y) คำนวณค่า  $IC_{50}$  โดยแทนค่า  $y = 50$  ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะหาค่า x และ antilog x จะเป็นค่า  $IC_{50}$

การเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากสารสกัด

การเตรียมตำรับครีมนาโนอิมัลชันครีม

วัตถุดิบประกอบด้วยน้ำ tween 80 และพาราเบน และวัตถุดิบไขมันประกอบด้วยน้ำมัน และ span 80 เทวัตถุดิบลงในวัตถุดิบไขมันแล้ว ผสมด้วยเครื่อง Polytron ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 3 นาที จนได้อิมัลชันปฐมภูมิ จากนั้นนำไปผ่านเครื่องบั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง ที่ความดัน 1,000 บาร์ (14,500 psi) ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 2, 4, 6 และ 8 รอบ แล้วจึงนำอิมัลชันที่ได้ไปศึกษาขนาดหยดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta potential) โดยใช้เครื่อง PCS และ Zetameter การคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความเหมาะสมเบื้องต้น โดยพิจารณาจาก ลักษณะภายนอก เช่น การเกิด coalescence หรือ phase separation, สี และกลิ่น ขนาดหยดอนุภาคและการกระจายตัวของขนาดหยดอนุภาค โดยใช้ TEM และเครื่อง PCS ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่อง Zetameter (Zetasizer®) การเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดขนาดหยดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาด้วยเครื่อง Zetameter ทำโดยเจือจางผลิตภัณฑ์ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1,000 และใช้คิวเวตแบบ DTS 1060C-Clear disposable zeta cell สูตรตำรับที่เหมาะสมจะต้องมีองค์ประกอบของน้ำมันในความเข้มข้นสูง มีลักษณะภายนอกที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร และมีศักย์ไฟฟ้าไม่ต่ำกว่า  $\pm 30 \text{ mV}$  เก็บตำรับที่ได้รับการคัดเลือกหนึ่งตำรับจากขั้นตอนการพัฒนาตำรับครีมนาโนรูปแบบนาโนอิมัลชันไว้ในขวดแก้วกันแสงสีขาที่สภาวะต่างๆ คือ อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส (เก็บในตู้เย็น) 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) และ 45 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้อบ) เก็บตัวอย่างไว้นาน 4 เดือน รวมถึงทดสอบในสภาวะร้อน-เย็นสลับกัน (Heating & Cooling) จำนวน 8 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษา ลักษณะภายนอก สีและกลิ่น การกระจายตัวของขนาดหยดอนุภาคโดยใช้เครื่อง Photon Correlation Spectrophotometer ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาด้วยเครื่อง Zetameter เตรียมครีมทาผิวจากสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดได้ เตรียมตำรับยาพื้นครีมแล้วศึกษาความคงตัวของสารสำคัญจากตำรับยาพื้นครีม เพื่อคัดเลือกตำรับยาพื้นครีม และทดสอบความพึงพอใจ วัดค่า pH ของครีมหรือโลชัน โดยชั่งครีมน้ำหนัก 0.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 9 มิลลิลิตร คนจนละลายให้เข้ากัน แล้ววัดค่า pH โดยใช้ pH meter ลักษณะทางกายภาพของครีมหรือโลชัน สังเกตดูลักษณะทางกายภาพของครีม ซึ่งได้แก่ สี กลิ่น เนื้อครีม การแยกชั้น และความหนืด

ตาราง 3.1 สัดส่วนของปริมาณสารสกัด (5, 10, 15 และ 20 %) และปริมาณโซเดียมอัลจิเนต (0.25%, w/w)

Part	INIC Name	% w/w			
		สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
A	Water	64.04	59.04	54.04	49.04
	Carbopol ultrez 10	0.15	0.15	0.15	0.15
	Titanium dioxide	0.10	0.10	0.10	0.10
	Glycerine	2.00	2.00	2.00	2.00
	Methyl paraben	0.10	0.10	0.10	0.10
B	Cetyl alcohol	1.20	1.20	1.20	1.20
	Tween 80	0.25	0.25	0.25	0.25
	Span 80	0.75	0.75	0.75	0.75
	Propyl paraben	0.05	0.05	0.05	0.05
	Crude extract	5.00	10.00	15.00	20.00
C	Water	1.00	1.00	1.00	1.00
	Sodium hydroxide	0.06	0.06	0.06	0.06
D	Water	25.00	25.00	25.00	25.00
	Sodium alginate	0.25	0.25	0.25	0.25
E	Water	100.00	100.00	100.00	100.00
	Calcium chloride	4.00	4.00	4.00	4.00

### การเตรียมเครื่องสำอางเม็ดปิดด้วยเทคนิคไอออนิกเจลเลขัน

เตรียมเม็ดปิดที่มีส่วนผสมของสารอาร์บูติน โดยกำหนดปริมาณสารสกัดที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% กำหนดปริมาณโซเดียมอัลจินेटเท่ากับ 0.25% (w/w) แสดงดังตาราง 3.1 ผสม Part A และกวนให้เข้ากัน นำส่วนผสมใน Part B มาหลอมโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ทำการเตรียมเนื้อครีมอิมัลชันโดยการนำ Part A มาผสมกับ Part B โดยเติม Part B ลงใน Part A กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นค่อยๆ เติม Part C และ Part D ที่ละลายเข้ากันดีแล้ว ทำการผสมกันด้วยความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จนได้ลักษณะเนื้อครีมอิมัลชันสีขาวอมเหลืองมีความข้นหนืดเล็กน้อยจากนั้นทำการเตรียมเม็ดปิดโดยการละลายแคลเซียมคาร์บอเนต (20 กรัม) ลงในน้ำกลั่น (480 กรัม) ทำการปั่นกวนสารละลายบน magnetic stirrer โดยใช้อัตราในการกวนระดับ 2 หลังจากควบคุมอิมัลชันให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่อยๆ หยดอิมัลชันผ่านรูเข็มฉีดยาที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางกึ่งกลางของรูเข็ม 0.10 มิลลิเมตร ทำการปั่นกวนประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นจะได้เม็ดปิด แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปใส่ในจานเพลตนำเม็ดปิดที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

### การศึกษาการปลดปล่อยแบบอินวิโทร (*in vitro* release)

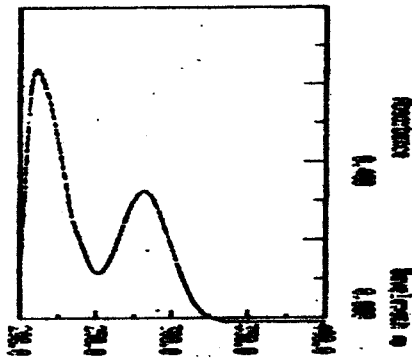
การศึกษาการปลดปล่อยอาร์บูตินจากเม็ดปิด โดยการชั่งเม็ดปิดน้ำหนัก 200 มิลลิกรัม นำมาบดด้วย mortar ละลายในเอทานอลต่อน้ำ (20:80, v/v) จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยจะนำไปวัดทุกๆ ชั่วโมง

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ MLC

#### ผลของความยาวคลื่นสูงสุดในการตรวจวัดปริมาณอาร์บูตินด้วยวิธี MLC

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารมาตรฐานอาร์บูตินมีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปสแกนวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-400 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินมีค่าเท่ากับ 280 นาโนเมตร แสดงดังรูปภาพ 4.1 และจากการศึกษาข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานไฮโดรควิโนนพบว่าไฮโดรควิโนนให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 289 นาโนเมตร (ไม่ได้แสดงยูวีสเปกตรัม) แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้กำหนดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพราะเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้งสองชนิดมาซ้อนทับกันแล้ว ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สารทั้งสองชนิดที่สนใจวิเคราะห์ให้ค่าความไวที่ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นนี้



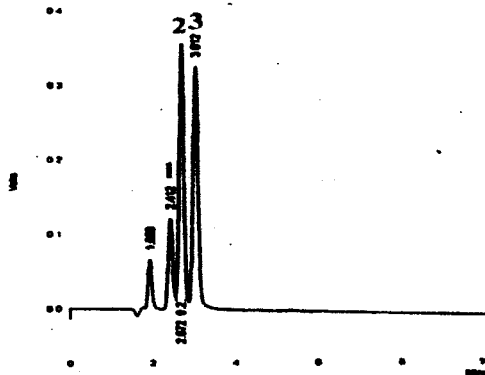
รูปภาพ 4.1 ยูวีสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยตัวทำละลายน้ำ

#### ผลของชนิดสารละลายลดแรงตึงผิวการเกิดไมเซลล์และหาสภาวะที่เหมาะสม

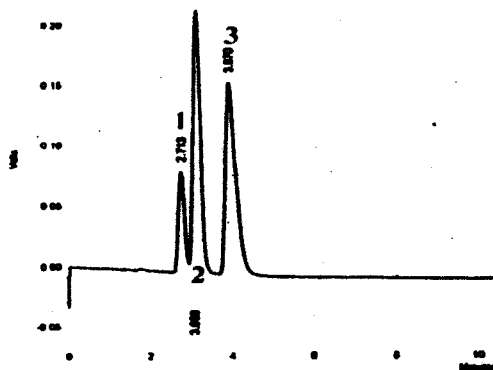
ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายลดแรงตึงผิวที่นำมาศึกษามี 3 ชนิด คือ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) และ Polyethylene dodecyl ether (Brij 35) เมื่อนำสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดย

ใช้คอลัมน์ Nova-Pak C<sub>18</sub> ขนาด 150x3.9 mm i.d. 5 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมอาร์บูติน ไฮโดรควิโนนและเรเซอร์ซินอลที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.2

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปภาพ 4.3 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน ไฮโดรควิโนน และ เรเซอร์ซินอลซึ่งพิกของสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้ มีค่า retention factor ต่ำ (ผลจากตาราง 4.1) และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟอง ทำให้ไม่สามารถนำสารละลาย SDS มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้ เมื่อนำสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.2 และสรุปพารามิเตอร์ทางการแยกดังตาราง 4.1



รูปภาพ 4.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล(3) เมื่อใช้ SDS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่



รูปภาพ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอน (3) เมื่อใช้ CTAB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปภาพ 4.4 พบว่าการสกัดสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน ไฮโดรควิโนน และ เรเซอร์ซินอลซึ่งฟีกของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน แยกออกจากกันได้ไม่ดี มีค่า retention factor ต่ำ ส่วนฟีกของเรเซอร์ซินอลนั้นแยกออกจากสารที่สนใจวิเคราะห์ได้ดี แต่ฟีกมีหางเล็กน้อย ทำให้ไม่สามารถนำสารละลาย CTAB มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้ เมื่อนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6, 1.0, 1.5 และ 2 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6 ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.3 และสรุปพารามิเตอร์ทางการแยกดังตาราง 4.1



รูปภาพ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

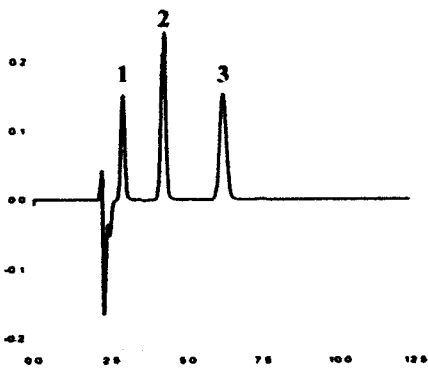
ตาราง 4.1 ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์

สารมาตรฐาน / วัฏภาคเคลื่อนที่	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์		
	SDS	CTAB	Brij 35
อาร์บูติน	0.25 ; 1106.82	0.48 ; 1959.02	0.50 ; 153.25
ไฮโดรควิโนน	0.38 ; 1358.30	0.66 ; 484.67	0.96 ; 177.93
เรเซอร์ซินอล	0.56 ; 536.81	0.98 ; 49.34	1.78 ; 194.04

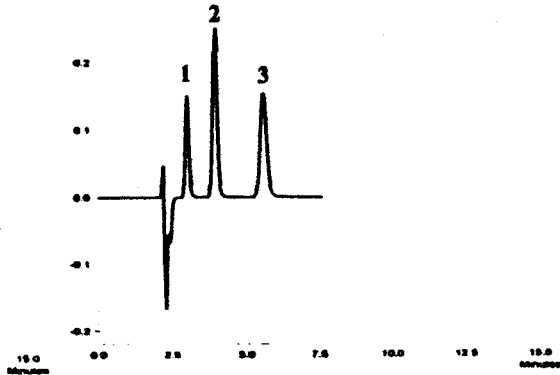
**ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์และหา  
สภาวะที่เหมาะสม**

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำ  
สารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.6, 1.0, 1.5  
และ 2 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.5

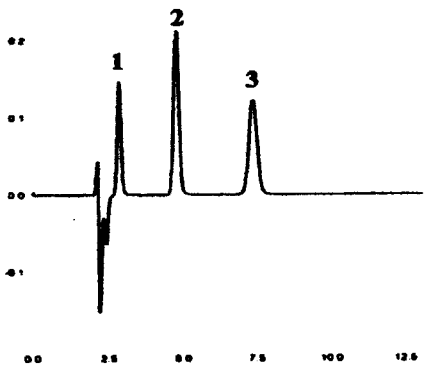
(ก)



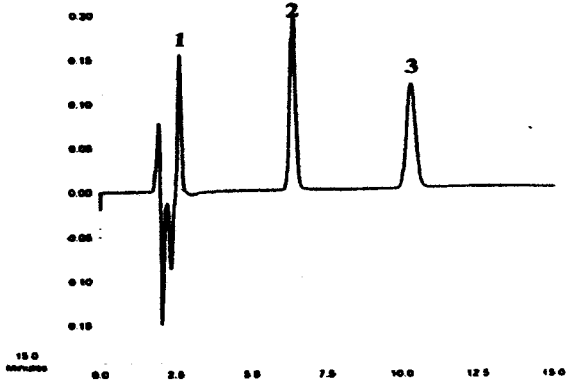
(ข)

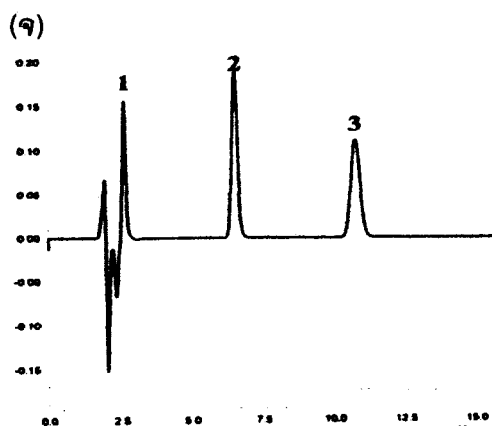


(ค)



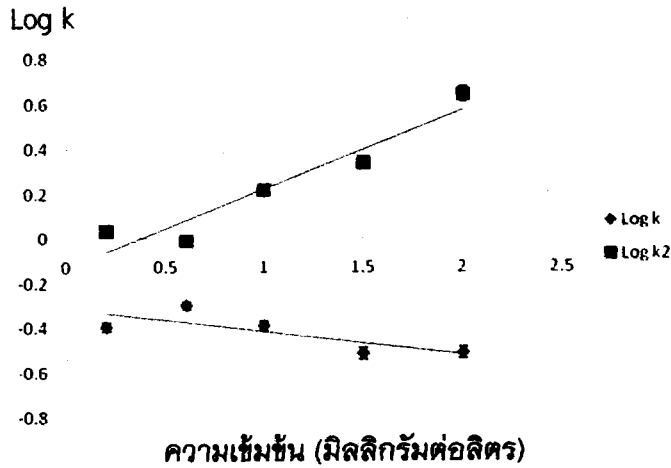
(ง)





รูปภาพ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรโซซินอน (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่พีเอช 7 (ก) 0.2 mM (ข) 0.6 mM (ค) 1.0 mM (ง) 1.5 mM และ (จ) 2.0 mM เป็นเฟสเคลื่อนที่

จากรูปภาพ 4.5 พบว่าเมื่อใช้สารละลาย Brij 35 พีเอช 6 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ก) พบว่า ค่า retention time ของอาร์บูตินใกล้เคียงกับพีคของตัวทำละลายมาก ส่วนพีคของไฮโดรควิโนนและเรโซซินอนนั้นแยกออกจากกันได้ดี ใช้เวลาในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมทั้งหมดไม่เกิน 7.5 นาที แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Brij 35 เป็น 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าค่า retention time ของอาร์บูตินใกล้เคียงกับพีคของตัวทำละลายมาก ส่วนพีคของไฮโดรควิโนนและเรโซซินอนนั้นแยกออกจากกันได้ดี แต่ใช้เวลาในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมทั้งหมดมากกว่า 7.5, 10 และ 12.5 นาที ตามลำดับ เมื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย Brij 35 เป็น 0.6 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่า retention time ของอาร์บูตินแยกห่างออกจากพีคของตัวทำละลายมากกว่าความเข้มข้นที่ทำการศึกษานี้ ส่วนพีคของไฮโดรควิโนนและเรโซซินอนนั้นแยกออกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมทั้งหมดน้อยกว่า 7.0 นาที เพราะฉะนั้นจึงเลือกสารละลาย 0.6 มิลลิโมลาร์ Brij 35 ที่พีเอช 7 เป็นความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมเมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ กับค่าความเข้มข้นของ Brij 35 พีเอช 7 แสดงผลดังรูปภาพ 4.6 และตาราง 4.2



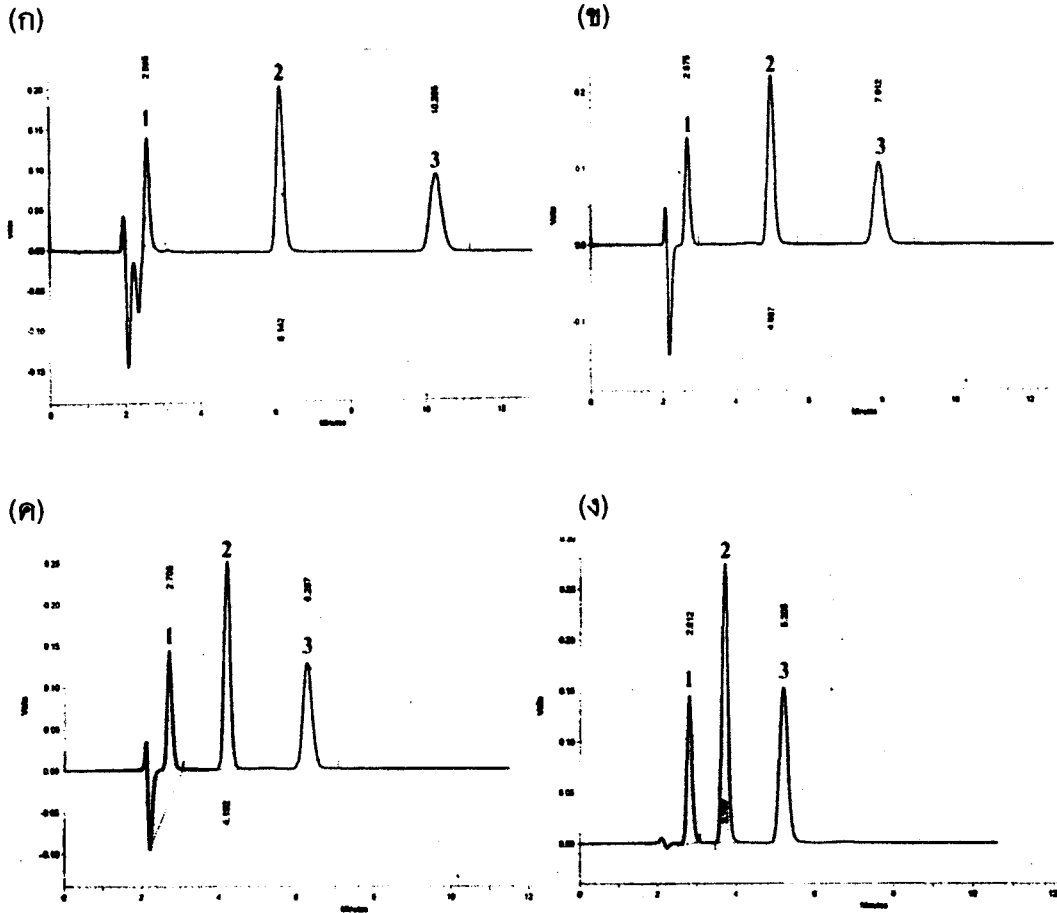
รูปภาพ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน (Log k) และค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน (Log k2) ตามลำดับ

ตาราง 4.2 ค่าแฟกเตอร์ความจุและค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

สารมาตรฐาน / ความเข้มข้นของ Brij 35	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์				
	0.2 mM	0.6 mM	1.0 mM	1.5 mM	2.0 mM
อาร์บูติน	0.40 ; 527.31	0.50 ; 153.25	0.40 ; 290.44	0.30 ; 562.12	0.30 ; 54.99
ไฮโดรควิโนน	1.07 ; 612.97	0.96 ; 177.93	1.63 ; 279.98	2.17 ; 446.90	2.25 ; 69.44
เรเซอร์ซินอล	2.04 ; 823.49	1.78 ; 194.05	2.66 ; 372.29	4.14 ; 988.74	4.37 ; 39.29

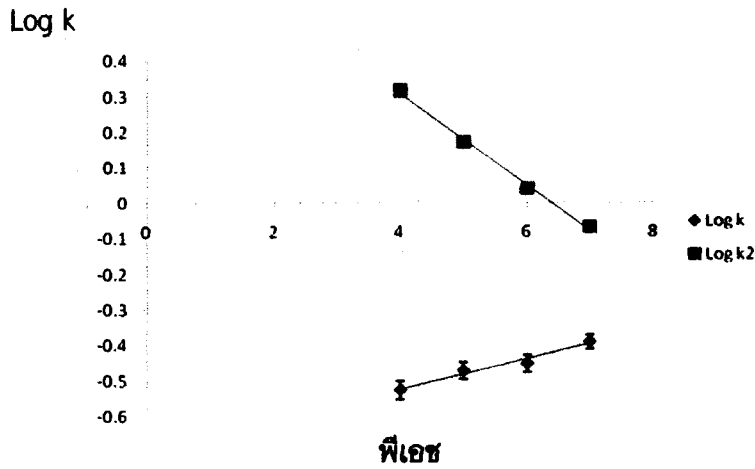
**ผลจากการศึกษา พีเอช ของเฟสเคลื่อนที่**

จากการศึกษา พีเอช ของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำสารละลาย Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่พีเอช 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.7



รูปภาพ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไส้ไตรครีนิน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช (ก) 4 (ข) 5 (ค) 6 และ (ง) 7

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ กับค่าความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 แสดงผลดังรูปภาพ 4.8 และตาราง 4.3



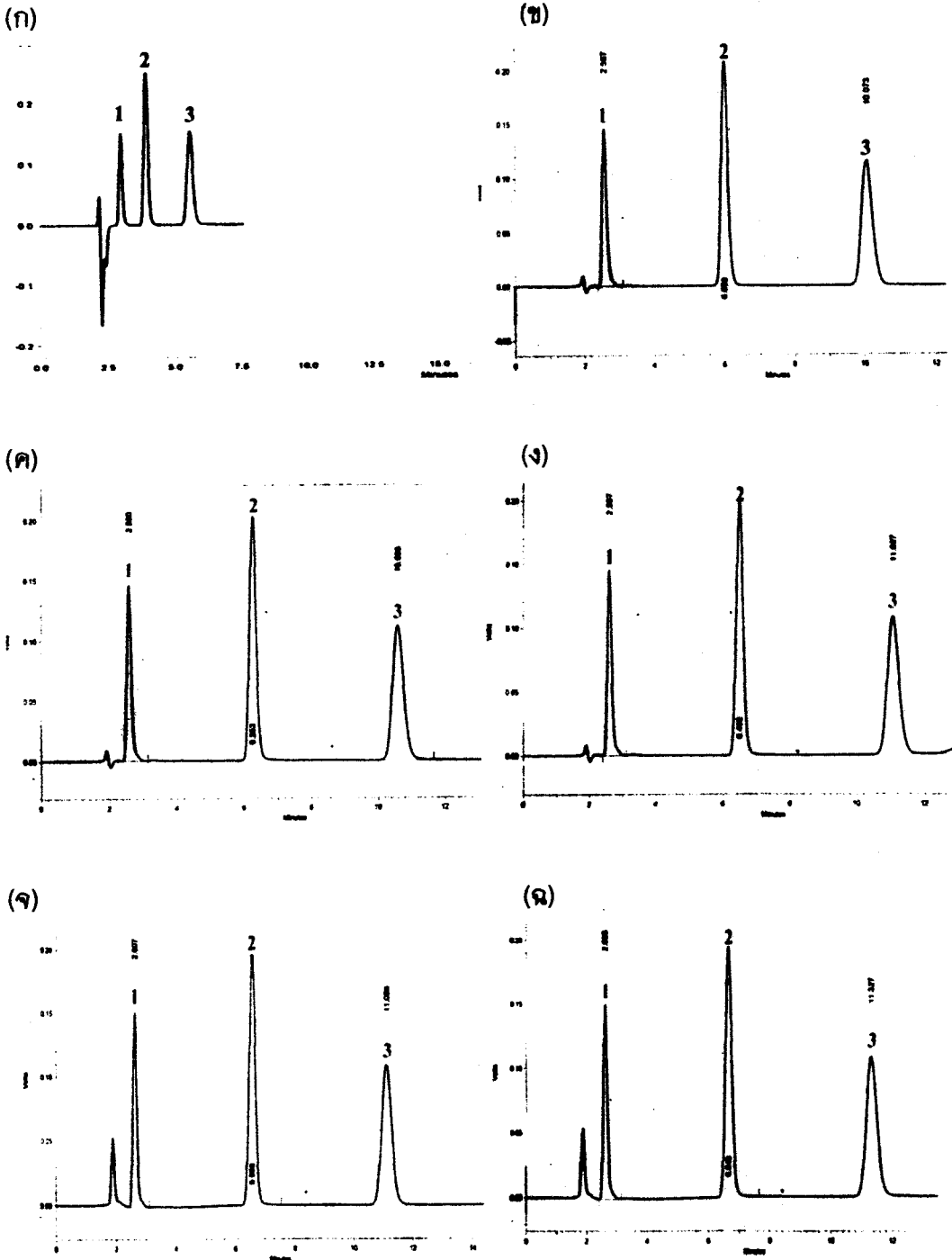
รูปภาพ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 0.6 มิลลิโมลาร์ Brij 35 ที่พีเอช ต่างๆ กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน และ ค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน ตามลำดับ

ตาราง 4.3 ค่าแฟกเตอร์ความจุและค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ เมื่อใช้ Brij 35 ที่พีเอชต่างๆ กัน

สารมาตรฐาน	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์			
	พีเอช 4	พีเอช 5	พีเอช 6	พีเอช 7
อาร์บูติน	0.29 ; 448.75	0.33 ; 407.58	0.35 ; 432.94	0.40 ; 324.57
ไฮโดรควิโนน	2.07 ; 204.02	1.48 ; 386.96	1.09 ; 275.63	0.85 ; 304.32
เรเซอร์ซินอล	4.14 ; 732.56	2.95 ; 451.14	2.13 ; 377.62	1.60 ; 248.78

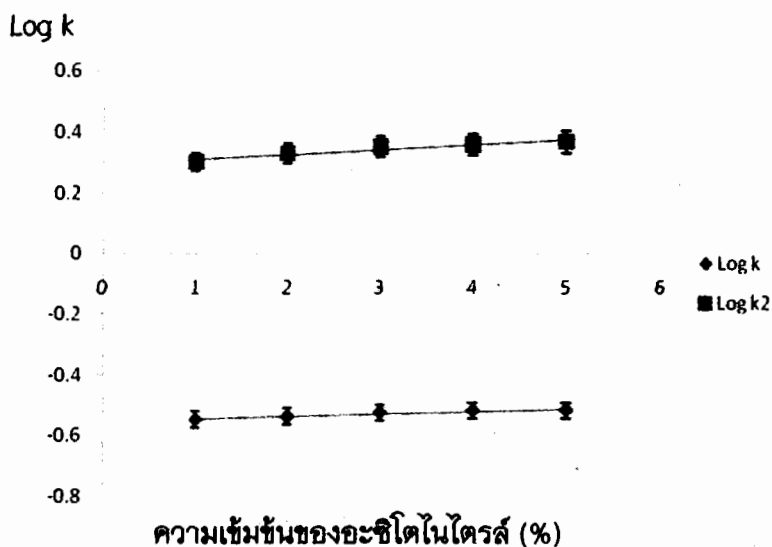
### ผลจากการเติมอะซิโตนไตรรต์

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเติมอะซิโตนไทรนปริมาตร เท่ากับ 1, 2, 3, 4, และ 5% ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.9



รูปภาพ 4.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เดิมอะซีโตไนไตรล์(ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% เป็นเฟสเคลื่อนที่

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ กับค่าความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 เติมอะซิโตไนโตรัส (ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% แสดงผลดังรูปภาพ 4.10 และตาราง 4.4



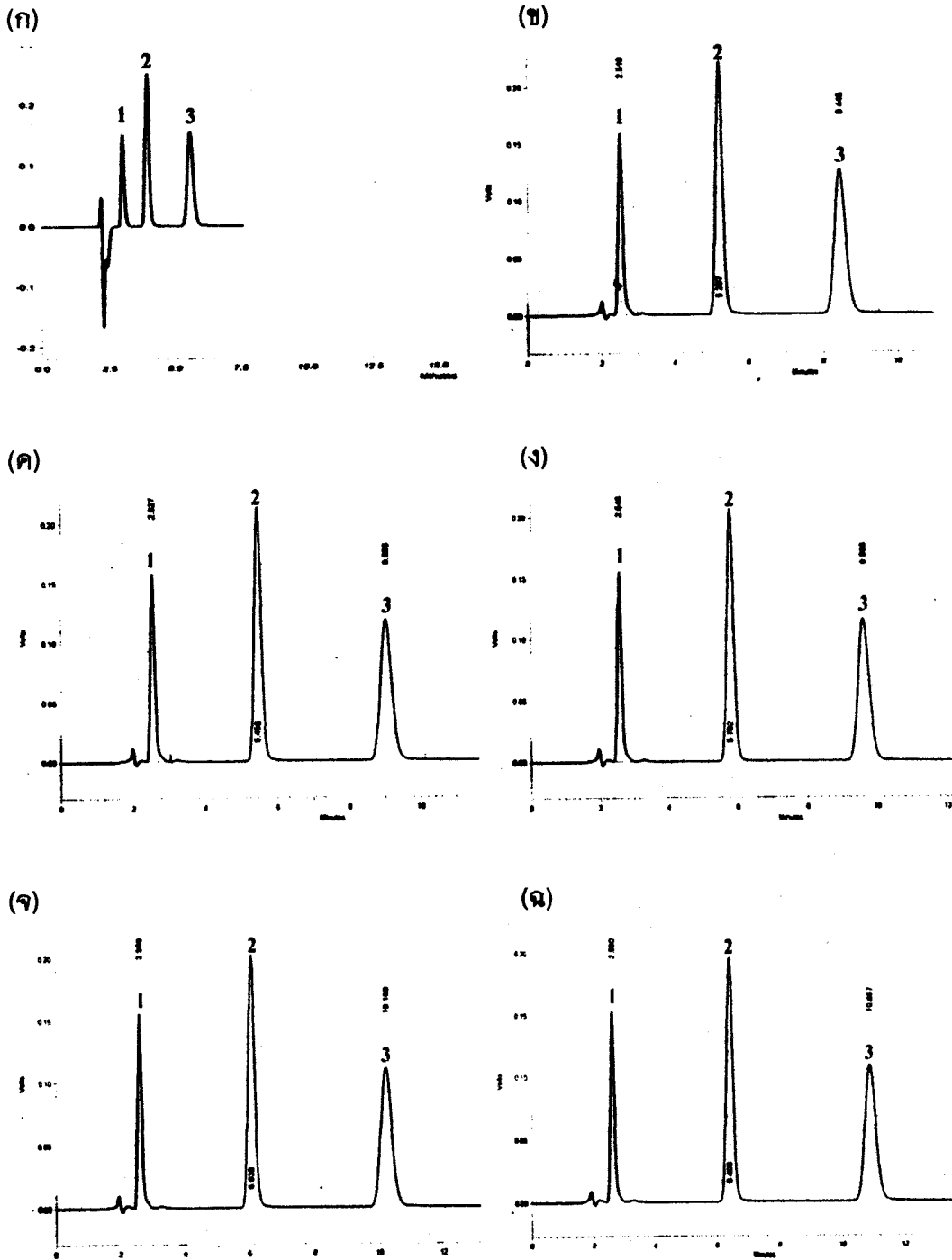
รูปภาพ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะซิโตไนโตรัสกับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน และ ค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน ตามลำดับ

ตาราง 4.4 ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์ เมื่อเติมอะซิโตไนโตรัสความเข้มข้นต่างๆ กัน ลงใน Brij 35 ที่พีเอช 7

สารมาตรฐาน	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์				
	เติม 1%	เติม 2%	เติม 3%	เติม 4%	เติม 5%
อาร์บูติน	0.28; 207.15	0.29; 194.49	0.29; 214.07	0.30; 242.24	0.30; 209.93
ไฮโดรควิโนน	2.00 ; 340.43	2.12 ; 289.51	2.24 ; 60.95	2.27; 236.50	2.32 ; 94.33
เรเซอร์ซินอล	4.03 ; 650.31	4.29 ; 643.15	4.53 ; 848.18	4.54; 621.97	4.66; 580.81

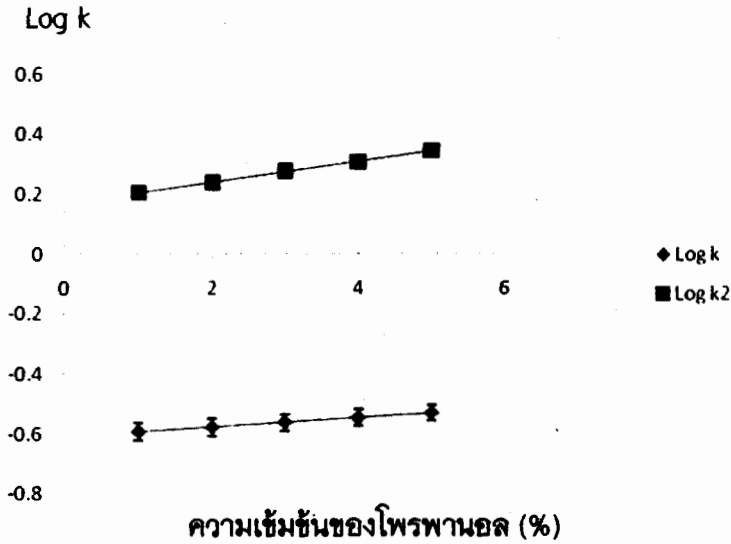
### ผลจากการเติมโพรพานอล

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเติมโพรพานอลปริมาตรเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5% ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.11



รูปภาพ 4.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรควิโนน (2) และเรเซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 เดิมโพรพานอล (ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% เป็นเฟสเคลื่อนที่

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ กับค่าความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 เติมโพรพานอล (ก) ไม่เติม (ข) 1% (ค) 2% (ง) 3% และ (จ) 4% (ฉ) 5% แสดงผลดังรูปภาพ 4.12 และตาราง 4.5



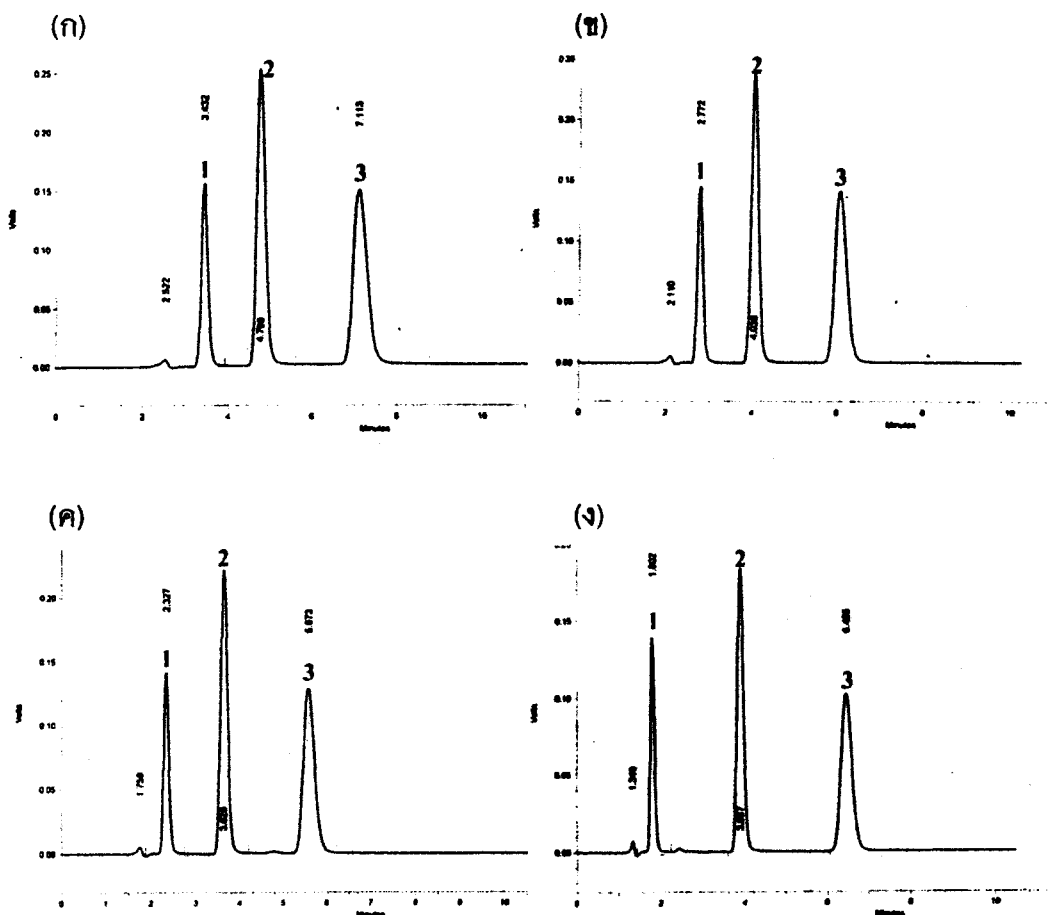
รูปภาพ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโพรพานอล กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน และ ค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน ตามลำดับ

ตาราง 4.5 ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ที่เติมโพรพานอลความเข้มข้นต่างๆ กัน ลงใน Brij 35 ที่พีเอช 7

สารมาตรฐาน	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์				
	เติม 1%	เติม 2%	เติม 3%	เติม 4%	เติม 5%
อาร์บูติน	0.25 ; 253.97	0.26 ; 227.60	0.27 ; 211.95	0.28 ; 235.05	0.29 ; 382.09
ไฮโดรควิโนน	1.60 ; 200.75	1.72 ; 273.25	1.89 ; 257.59	2.01 ; 266.31	2.20 ; 295.47
เรเซอร์ซินอล	3.22 ; 414.69	3.50 ; 454.57	3.79 ; 773.96	4.09 ; 450.68	4.44 ; 633.64

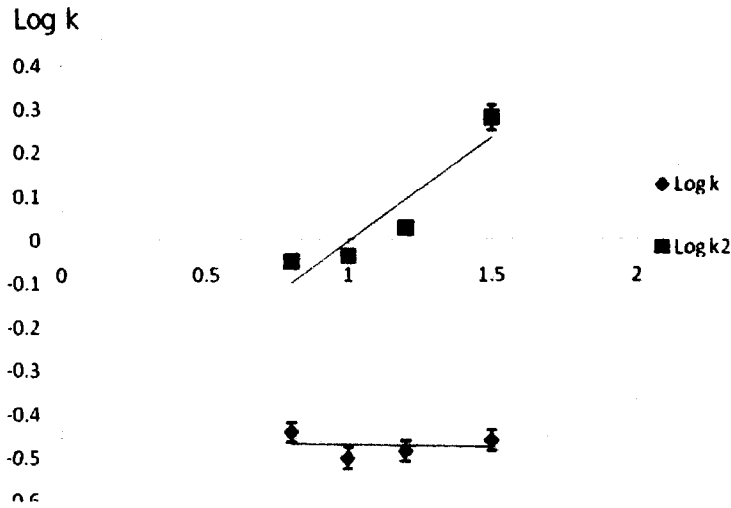
### ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของการเกิดไมเซลล์ เมื่อนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และโดยปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเป็น 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปภาพ 4.13



รูปภาพ 4.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน (1) ไฮโดรคอร์ติโซน (2) และ เรซอร์ซินอล (3) เมื่อใช้ Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเท่ากับ 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.5 มิลลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่าפקเตอร์ความจุ กับค่าความเข้มข้นของ Brij 35 ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเป็น 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.5 มิลลิตรต่อนาที แสดงผลดังรูปภาพ 4.14 และตาราง 4.6



อัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่ (มิลลิเมตรต่อนาฬิกา)

รูปภาพ 4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่ กับค่า Log k โดยที่ค่าแฟกเตอร์ความจุของอาร์บูติน และ ค่าแฟกเตอร์ความจุของไฮโดรควิโนน ตามลำดับ

ตาราง 4.6 ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ที่อัตราการใช้ต่างๆ กัน

อัตราการใช้ (มิลลิเมตรต่อ นาฬิกา)	ค่าแฟกเตอร์ความจุ และประสิทธิภาพของคอลัมน์			
	0.8	1.0	1.2	1.5
อาร์บูติน	0.36 ; 280.28	0.31 ; 512.05	0.32 ; 240.66	0.34 ; 81.18
ไฮโดรควิโนน	0.89 ; 202.57	0.91 ; 175.28	1.06 ; 259.56	1.90 ; 170.70
เรเซอร์ซินอล	1.82 ; 163.81	1.84 ; 191.95	2.17 ; 289.57	3.81 ; 433.58

ผลจากการศึกษาสภาวะการทดลองโดยวิธี MLC

- วัสดุเคลือบที่ : Brij 35 ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7
- อัตราการใช้ : 1.0 มิลลิเมตรต่อนาฬิกา
- ปริมาตรในการฉีด : 20 ไมโครลิตร
- ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น : 280 นาโนเมตร
- คอลัมน์ : Nova - Pak C<sub>18</sub>, 150x3.9 mm
- เวลาที่ใช้วิเคราะห์ : 15 นาที

### ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

#### ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบ

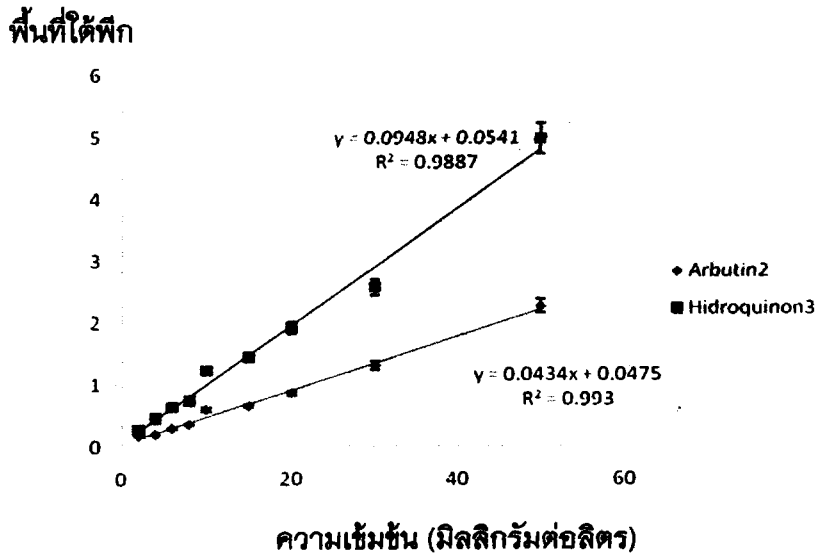
จากการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจพบเพื่อหาค่าความไวของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ที่ทำการฉีดภายในวันเดียวและระหว่างวันของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ 3 S.D./S เมื่อ S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของอาร์บูติน และไฮโดรควิโนน และ S คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 0.51 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาร์บูติน และ 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตรของไฮโดรควิโนน

#### ผลการศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้

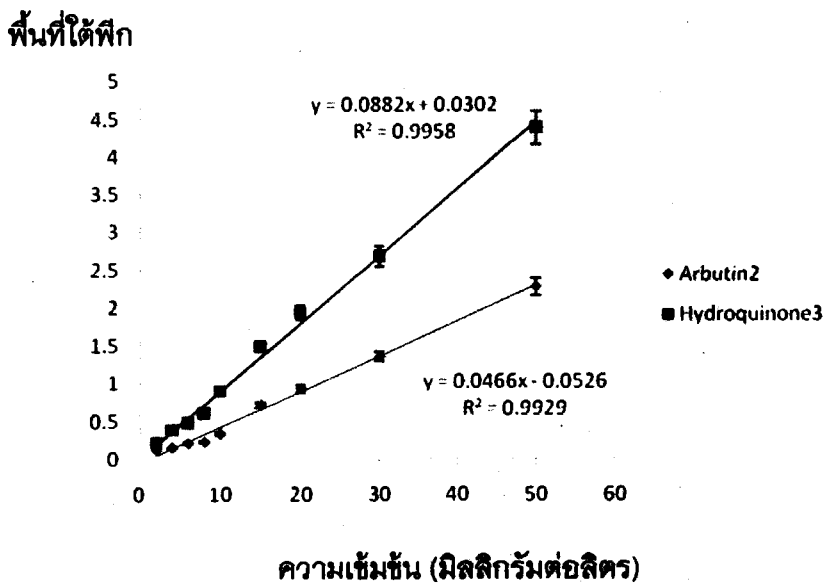
จากการศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้เพื่อหาค่าขีดต่ำสุดที่ของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ที่ทำการฉีดภายในวันเดียวและระหว่างวันของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ 10 S.D./S เมื่อ S.D. คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของอาร์บูติน และไฮโดรควิโนนและ S คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาร์บูตินและ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตรของไฮโดรควิโนน

#### ผลจากการศึกษาความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วัน พบว่าค่า R-square ของทั้ง 2 วันมีค่า 0.99 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูงโดยดูจากค่าความชัน และค่า R-square ที่ได้ และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 วันดังรูปภาพ 4.15 และรูปภาพ 4.16 เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน จะได้กราฟดังรูป 4.15 และ 4.16



รูปภาพ 4.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ได้พิกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน วันที่ 1



รูปภาพ 4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ได้พิกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน วันที่ 3

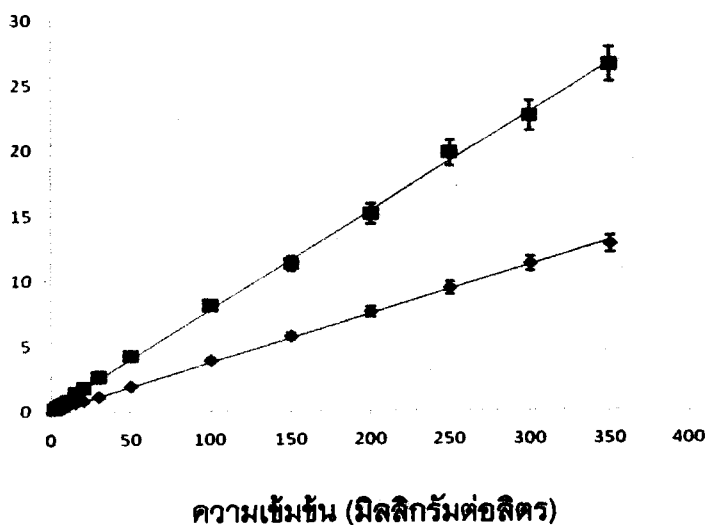
ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง

วันที่	สารละลายมาตรฐาน	ค่าความเค็ม	จุดตัดแกน y	R-square
วันที่ 1	อาร์บูติน	0.0434	0.0475	0.9930
	ไฮโดรควิโนน	0.0948	0.0541	0.9887
วันที่ 3	อาร์บูติน	0.0466	- 0.0526	0.9929
	ไฮโดรควิโนน	0.0882	0.0302	0.9958

### ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมอาร์บูติน ไฮโดรควิโนนและเรซอร์ซินอลที่มีความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่สูงกว่า กราฟมาตรฐาน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตั้งแต่ 2-500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูความเป็นเส้นตรง เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกกับความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนจะได้กราฟดังรูปภาพ 4.17

พื้นที่ที่ได้พิก



รูปภาพ 4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกกับความเข้มข้นของอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน

นั่นคือพื้นที่ได้ฟังก์ชันความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน  
อาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในช่วง 2-350 มิลลิกรัมต่อลิตร

### ความแม่นยำ

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร  
ตามลำดับ โดยเปิดสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนให้มีความเข้มข้น 5, 10  
และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และทุกๆ ความเข้มข้นเดิมสารละลายเรเซอร์ซินอลความเข้มข้น 10  
มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการฉีดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในวัน  
เดียวกันและระหว่างวัน เพื่อเปรียบเทียบผลและคำนวณหาค่า S.D. และ %R.S.D. ของผลการ  
ทดลอง ได้ %RSD ไม่เกิน 5% จะอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังรายละเอียดผลการทดลองในตาราง  
4.8

ตาราง 4.8 ค่า %R.S.D. ในการศึกษาความแม่นยำ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	วันที่ 1		วันที่ 3	
	อาร์บูติน	ไฮโดรควิโนน	อาร์บูติน	ไฮโดรควิโนน
5	0.58	1.97	0.97	0.58
10	0.36	0.77	0.33	0.86
15	0.44	0.67	1.03	1.02
20	2.90	0.33	1.37	1.25

ดังนั้นผลการศึกษาความแม่นยำ โดยการนำข้อมูลเบื้องต้นมาแปลผลทางสถิติ แล้ว  
ได้ค่า %R.S.D. ตามตาราง 4.8 ซึ่งมีค่า %R.S.D. ไม่เกิน 5% ซึ่งยอมรับได้

### ความถูกต้อง

จากการศึกษาความถูกต้องทำโดยใช้ Standard addition method ในการหาความ  
ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการคำนวณได้จากค่าร้อยละของการกลับคืน เมื่อเติมสาร  
มาตรฐานลงไปในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น โดยขวดที่ 1 ไม่ต้องใส่สารละลายมาตรฐานลง  
ไปยกเว้นสารละลายเรเซอร์ซินอลต้องใส่ทุกความเข้มข้นที่เท่าๆ กัน โดยการเปิดสารละลาย  
มาตรฐานให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนโดย  
เพิ่มความเข้มข้นตั้งแต่ 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยวัฏ  
ภาคเคลื่อนที่ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้ขวดละ 3 ซ้ำ ในระบบ MLC อ่านค่าฟังก์ชันได้ และ

คำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืนของแต่ละความเข้มข้น แล้วหาร้อยละของการกลับคืน  
ได้ผลดังตาราง 4.9 และตาราง 4.10

ตาราง 4.9 ค่าร้อยละของการกลับคืนของการศึกษาความถูกต้องของตัวอย่างพืช

สมการเส้นตรงของ อาร์บูติน คือ  $y = 0.0466x - 0.0526$

สมการเส้นตรงของ ไฮโดรควิโนน คือ  $y = 0.0882x + 0.0302$

ตัวอย่าง	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	ร้อยละของการ กลับคืนเฉลี่ย
สาส์พันธุสีทอง	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	103.77
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	104.37
สาส์พันธุน้ำผึ้ง	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	99.67
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	102.87
สาส์พันธุหอมแดง	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	96.30
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	104.82

ตาราง 4.10 ค่าร้อยละของการกลับคืนของการศึกษาความถูกต้องของตัวอย่างครีมบำรุงผิว

ตัวอย่าง	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	ร้อยละของการ กลับคืนเฉลี่ย
ครีมยี่ห้อ Cute press	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	102.16
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	102.54
ครีมยี่ห้อ Ctrl	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	99.44
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	96.12
ครีมยี่ห้อ Moniga	อาร์บูติน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	96.64
	ไฮโดรควิโนน (5, 10, 15 มิลลิกรัมต่อลิตร)	97.28

จากผลการทดลองทั้งตัวอย่างพืชและครีมโดยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่  
ในความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วนำค่าได้พิก มาทำการแปลผลทางสถิติโดยการ  
หาค่าร้อยละของการกลับคืนได้ไม่เกิน  $\pm 5\%$  จึงจะยอมรับได้ จากตารางร้อยละของการ  
กลับคืนของแต่ละตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้มีร้อยละของการกลับคืน ไม่เกิน  $\pm 5\%$  ดังนั้นวิธีนี้จึง  
ยอมรับได้

**ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน ในตัวอย่างพืชและครีมบำรุงผิว**

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน เมื่อนำสารละลาย Brij 35 มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค MLC ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ Nova-Pak C<sub>18</sub> ขนาด 150x3.9 mm i.d. 5 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมอาร์บูติน ไฮโดรควิโนนและเรเซอร์ซินอลทั้งในตัวอย่างพืชและครีมบำรุงผิวโดยวิธี ไมเซลลาร์ โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของ อาร์บูติน คือ  $y = 0.0466x - 0.0526$  และสมการเส้นตรงของ ไฮโดรควิโนน คือ  $y = 0.0882x + 0.0302$  ได้ผลการทดลองดังนี้

**ตาราง 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพืช**

ตัวอย่าง	สารสำคัญ	ครั้งที่	ปริมาณที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกรัม)	ปริมาณเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกรัม)
สาส์พันธุสีทอง	อาร์บูติน	1	0.36	0.34
		2	0.34	
		3	0.33	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
สาส์พันธุน้ำผึ้ง	อาร์บูติน	1	0.58	0.59
		2	0.59	
		3	0.60	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
สาส์พันธุหอมแดง	อาร์บูติน	1	0.54	0.54
		2	0.54	
		3	0.53	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	

ตาราง 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างครีมบำรุงผิว

ตัวอย่าง	สารที่วิเคราะห์	ครั้งที่	ปริมาณที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกรัม)	เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ครีมยี่ห้อ Cute press	อาร์บูติน	1	0.92	0.92
		2	0.93	
		3	0.91	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
ครีมยี่ห้อ Moniga	อาร์บูติน	1	1.88	1.72
		2	1.77	
		3	1.50	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
ครีมยี่ห้อ Ctrl.	อาร์บูติน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	

**ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างพืชและครีมบำรุงผิวโดยวิธีมาตรฐาน**

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน ทั้งในตัวอย่างพืชและครีมบำรุงผิวโดยวิธี มาตรฐานโดยใช้กฎภาคเคลื่อนที่เป็น น้ำ : เมทานอล : 0.1 โมลของกรดอะซิติกในอัตราส่วน 89:10:1 โดยปริมาตร มีอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของอาร์บูติน คือ  $y = 0.0325x + 0.0235$  สมการเส้นตรงของไฮโดรควิโนน คือ  $y = 0.072x + 0.0367$  ได้ผลการทดลองดังนี้

ตาราง 4.13 ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่งพืชโดยวิธีเทียบ

ตัวอย่าง	สารที่วัด	ครั้งที่	ปริมาณที่ตรวจพบ (µg/g)	ค่า ขีดจำกัด (µg/g)
สาส์พันธุ์สีทอง	อาร์บูติน	1	0.0021	
		2	0.0018	0.0017
		3	0.0012	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	
		2	ไม่พบปริมาณ	ND
		3	ไม่พบปริมาณ	
สาส์พันธุ์น้ำผึ้ง	อาร์บูติน	1	0.0083	
		2	0.0003	0.0039
		3	0.0031	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	
		2	ไม่พบปริมาณ	ND
		3	ไม่พบปริมาณ	
สาส์พันธุ์หอมแดง	อาร์บูติน	1	1.5316	
		2	1.8622	1.6323
		3	1.5032	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	
		2	ไม่พบปริมาณ	ND
		3	ไม่พบปริมาณ	



รูปภาพ 4.18 ลักษณะไลชันอาร์บูตินรูปแบบนาโนอิมัลชัน

ตาราง 4.14 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนในตัวอย่างครีมบำรุงผิวโดยวิธีเทียบ

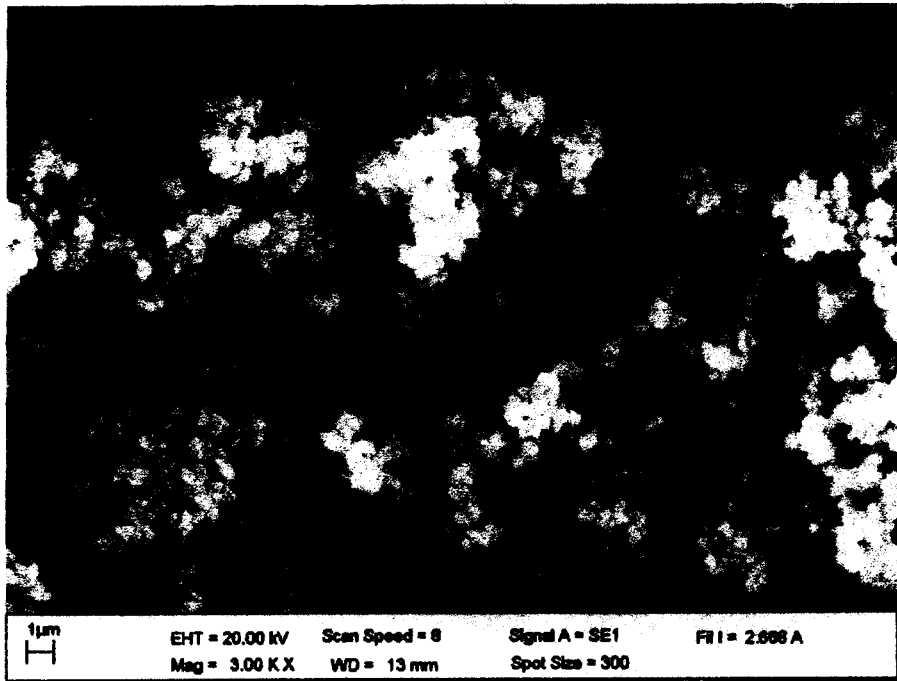
ตัวอย่าง	สารสำคัญ	ครั้งที่	ปริมาณที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกรัม)	เทียบ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ครีมยี่ห้อ Cute press	อาร์บูติน	1	0.0019	0.0019
		2	0.0019	
		3	0.0018	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
ครีมยี่ห้อ Ctrl.	อาร์บูติน	1	0.00084	0.0008
		2	0.00085	
		3	0.00089	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	
ครีมยี่ห้อ Moniga	อาร์บูติน	1	0.00007	0.00006
		2	0.00005	
		3	0.00005	
	ไฮโดรควิโนน	1	ไม่พบปริมาณ	ND
		2	ไม่พบปริมาณ	
		3	ไม่พบปริมาณ	

**ผลการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากสารสกัด**

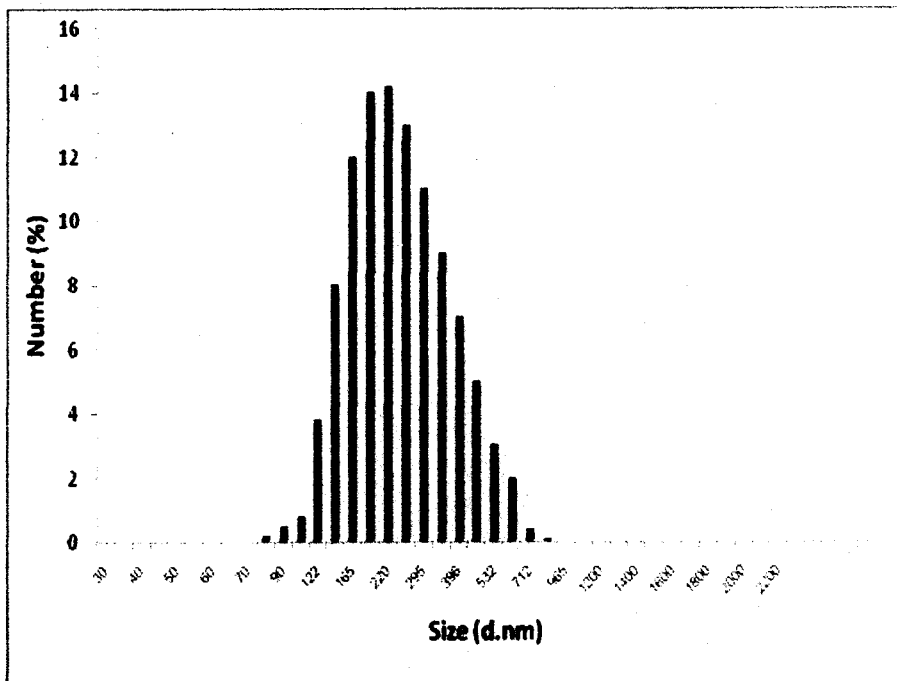
วัตถุดิบประกอบด้วยน้ำ Tween80 และ พาราเบน และวัตถุดิบน้ำมันประกอบด้วย น้ำมัน และ Span 80 เทวัตถุดิบลงในวัตถุดิบน้ำมันแล้ว ผสมด้วยเครื่อง Polytron ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 3 นาที จนได้อิมัลชันปฐมภูมิ จากนั้นนำไปผ่านเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง ที่ความดัน 1,000 บาร์ (14,500 psi) ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 2, 4, 6 และ 8 รอบ แล้วจึงนำอิมัลชันที่ได้ไปศึกษาขนาดหดยคอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา โดยใช้เครื่อง PCS และ Zetameter การคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความเหมาะสมเบื้องต้น โดยพิจารณาจาก ลักษณะภายนอก เช่น การเกิด coalescence หรือ การแยกชั้น สี และกลิ่น ขนาดหดยคอนุภาคและการกระจายตัวของขนาดหดยคอนุภาค โดยใช้ TEM และเครื่อง

PCS ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่อง Zetameter การเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดขนาดหยดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาด้วยเครื่อง Zetameter ทำโดยเจือจางผลิตภัณฑ์ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1,000 และใช้คิวเวทแบบ DTS 1060C-Clear disposable zeta cell สูตรตำรับที่เหมาะสมจะต้องมีองค์ประกอบของน้ำมันในความเข้มข้นสูง มีลักษณะภายนอกที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร และมีศักย์ไฟฟ้าไม่ต่ำกว่า  $\pm 30$  มิลลิโวลต์ เก็บตำรับที่ได้รับการคัดเลือกหนึ่งตำรับจากขั้นตอนการพัฒนาตำรับครีมนาโนรูปแบบนาโนอิมัลชันไว้ในขวดแก้วกันแสงสีขาที่สภาวะต่างๆ คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้เย็น) 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) และ 45 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้อบ) เก็บตัวอย่างไว้นาน 4 เดือน รวมถึงทดสอบในสภาวะร้อน-เย็นสลับกัน (heating & cooling) จำนวน 8 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำตำรับที่ได้ไปศึกษา ลักษณะภายนอก เช่น การเกิด coalescence หรือ การแยกชั้น สี และกลิ่น การกระจายตัวของขนาดหยดอนุภาคโดยใช้เครื่อง PCS ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่อง Zetameter เตรียมครีมทาผิวจากสารสกัดจากสาส์ที่สกัดได้ เตรียมตำรับยาพื้นครีม แล้วศึกษาความคงตัวของสารสำคัญจากตำรับยาพื้นครีม เพื่อคัดเลือกตำรับยาพื้นครีม และทดสอบความพึงพอใจ วัตถุประสงค์ของครีมหรือโลชันขี้ผึ้ง หนัก 0.1 กรัม ใส่ในปิอกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 9 มิลลิลิตร คนจนละลายให้เข้ากัน แล้ววัดพีเอช โดยใช้พีเอชมิเตอร์ ลักษณะทางกายภาพของครีมหรือโลชัน สังเกตดูลักษณะทางกายภาพของครีม ซึ่งได้แก่ สี กลิ่น เนื้อครีม การแยกชั้น และความหนืด ได้ผลการทดลองดังนี้

การพัฒนาตำรับโลชันอาร์บูตินจากสารสกัดสาส์รูปแบบนาโนอิมัลชันไว้ในขวดแก้วกันแสงสีขาที่สภาวะต่างๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้เย็น), 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) และ 45 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้อบ) เก็บตัวอย่างไว้นาน 4 เดือน รวมถึงทดสอบในสภาวะร้อน-เย็นสลับกัน (Heating & Cooling) จำนวน 8 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว เมื่อได้ตำรับดังแสดงดังรูปที่ 4.18 แล้วนำตำรับที่ได้ไปศึกษาความคงตัวต่อไป เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ตำรับที่มีปริมาณอาร์บูติน 1% ผสมกับสารลดแรงตึงผิว ที่ผ่านเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง 1000 บาร์ จำนวน 8 รอบแล้ว นำไปส่องและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งทำให้เห็นลักษณะของหยดอนุภาคเป็นทรงกลมมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร โดยหยดอนุภาคส่วนมากจะเล็กกว่า 500 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปภาพ 4.20



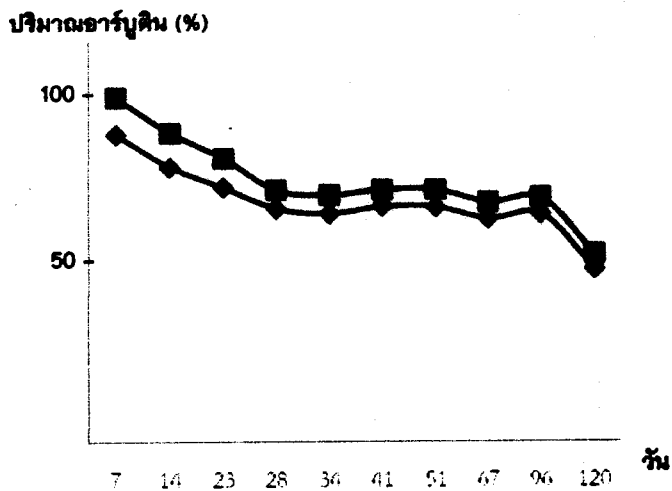
รูปภาพ 4.19 ลักษณะหยดอนุภาคจากกล้อง SEM ของตัวรับไอออนอาร์บูตินนาโนอิมัลชัน 1% ผสมกับสารลดแรงตึงผิว



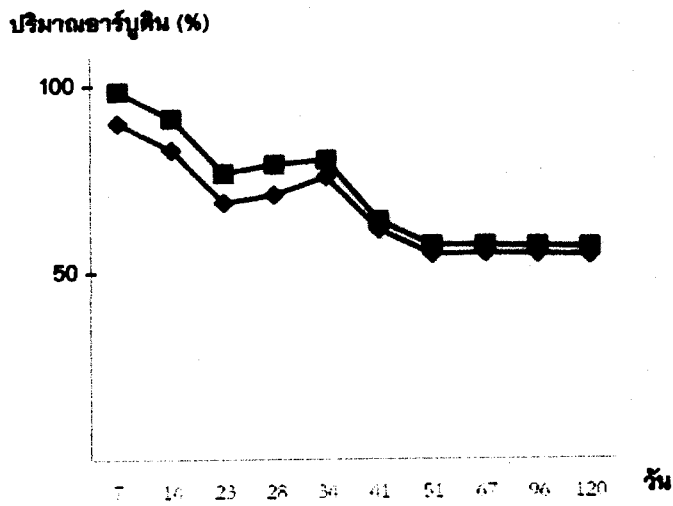
รูปภาพ 4.20 ขนาดอนุภาคแบบสะสมของตัวรับไอออนอาร์บูตินนาโนอิมัลชันจากเครื่อง PCS

### ผลศึกษาความคงของอาร์บูตินครีมและโลชันรูปแบบนาโนอิมัลชัน

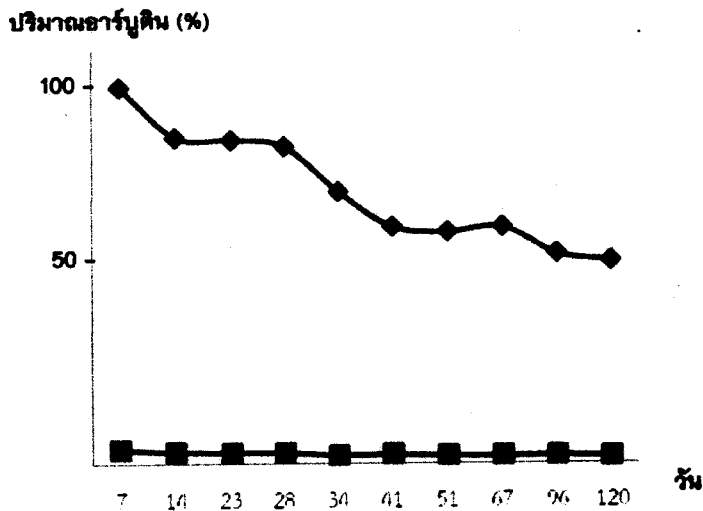
จากผลการศึกษาความคงสภาพของอาร์บูติน หลังจากเก็บไว้ที่สภาวะเร่งต่างๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน และวิเคราะห์โดยวิธี MLC ได้ผล ความคงสภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มของความคงตัวของอาร์บูตินค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ และเริ่มคงที่ดังรูปภาพ 4.21 ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีแนวโน้ม ของความคงตัวของอาร์บูตินเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ ดังรูปภาพ 4.22 และที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มของความคงตัวของครีมอาร์บูตินลดลงอย่างรวดเร็วจน แทบไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงดังรูปภาพ 4.23 ดังนั้นโลชันอาร์บูตินจะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ ต่างๆ ได้ดีกว่าครีมอาร์บูติน



รูปภาพ 4.21 ค่าความคงตัวของอาร์บูตินครีมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปภาพ 4.22 ค่าความคงตัวของอาร์บูตินครีมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปภาพ 4.23 ค่าความคงตัวของอาร์บูตินครีมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ เส้นสีแดง คือ ครีมอาร์บูติน  
เส้นสีน้ำเงิน คือ โลชันอาร์บูติน

### การประเมินลักษณะทางกายภาพและความพึงพอใจของตำรับครีมและโลชั่น

ผลของลักษณะทางกายภาพของครีมและโลชั่น จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเนื้อครีมและโลชั่น จากการศึกษาครีมที่มีส่วนผสมของอาร์บูตินและไม่มีส่วนผสมของอาร์บูตินและจากการเตรียมโลชั่นทั้ง 6 สูตรพบว่าโลชั่นสูตรที่ 1 และ 3 ดีที่สุด

ตาราง 4.15 ลักษณะทางกายภาพของครีมและโลชั่นที่เตรียมขึ้น

ประเภท	สูตร	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	การแยกชั้น	ความหนืด
ครีม	ไม่มีส่วนผสมของสารสกัด	ขาว	หอมอ่อนๆ	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	ข้น
	มีส่วนผสมของสารสกัด	ขาวอมเหลืองเล็กน้อย	หอมอ่อนๆ	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	ข้น
โลชั่น	1	เหลืองอ่อนๆ	หอม	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	เหลวเล็กน้อย
	2	เหลืองอ่อนๆ	หอม	หยาบ	ไม่แยกชั้น	ข้น
	3	เหลืองอ่อนๆ	หอม	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	เหลวเล็กน้อย
	4	เหลืองอ่อนๆ	หอม	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	เหลว
	5	เหลืองอ่อนๆ	หอม	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	เหลว
	6	เหลืองอ่อนๆ	หอม	ละเอียด	ไม่แยกชั้น	เหลว

### ประเมินความพึงพอใจในการใช้ครีมทาผิวและโลชั่น

ประเมินโดยใช้แบบสอบถาม ถ้ามองจากอาสาสมัครที่ทดลองใช้ครีม โดยสอบถามด้านลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ กลิ่น สี ประสิทธิภาพของครีมในการให้ความชุ่มชื้นผิว ความชุ่มชื้นที่ให้กับผิว และความเหนอะหนะเวลาทาได้เปอร์เซ็นต์ความพึงพอใจ ดังแสดงในตาราง 4.16

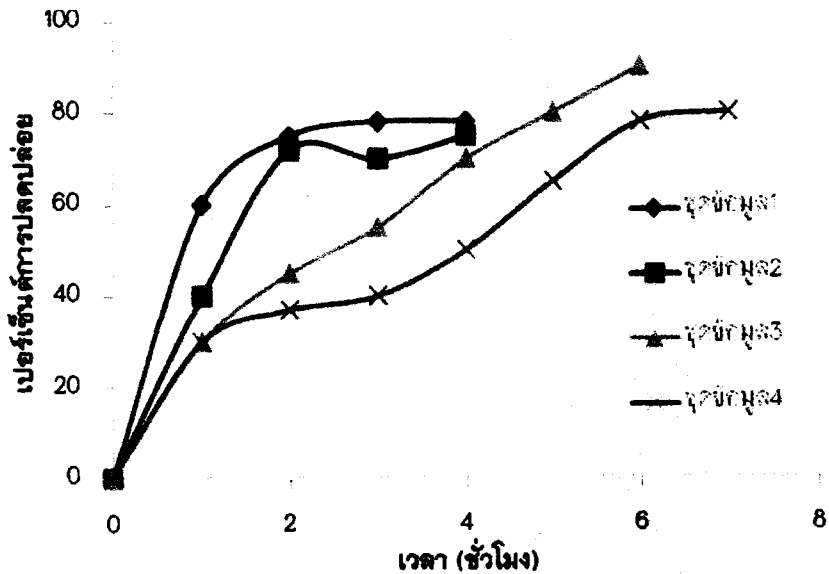
จากการประเมินความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์ โดยสอบถามจากอาสาสมัครที่ทดลองใช้ครีมจำนวน 30 คน พบว่ามีระดับความพึงพอใจในช่วง 60-70% ซึ่งความพึงพอใจอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

ตาราง 4.16 ระดับการประเมินความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์ครีม

ลักษณะความพึงพอใจ	ระดับความพึงพอใจ
ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์	
ความเนียน	75 %
ความชื้น	67.5 %
ความมันเงา	72.5 %
สี	70 %
ความหอมของกลิ่น	65 %
ความพึงพอใจขณะที่ใช้ผลิตภัณฑ์	
ความง่ายในการเก็ย	72.5 %
ความสิ้น	67.5 %
ความหอมของกลิ่น	62 %
ความพึงพอใจหลังใช้ผลิตภัณฑ์	
ความเหมียวเหนอะหนะ	70 %
	70 %
ความชุ่มชื้น	60 %

#### ผลการศึกษาการปลดปล่อยของเม็คปิดโลชั่นอาร์บูติน (*In vitro* release)

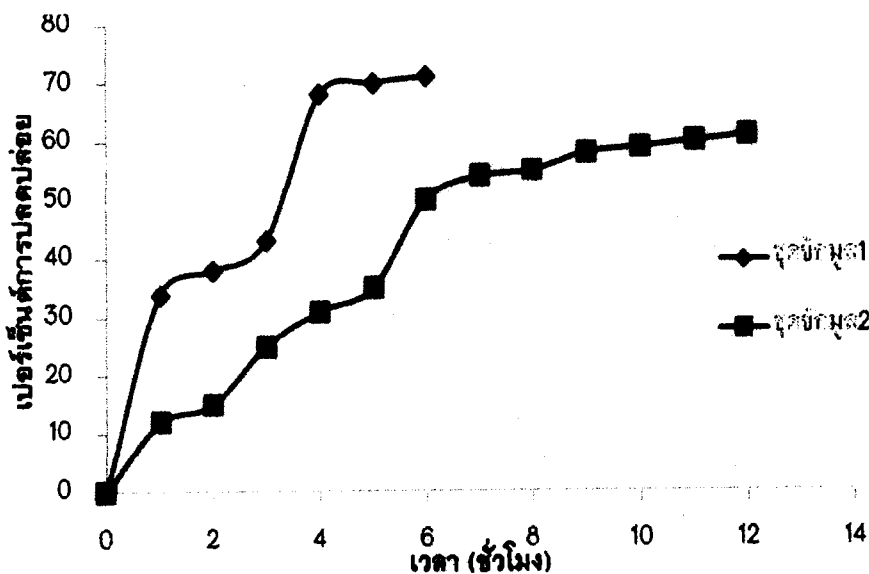
จากการศึกษา *In vitro* release เป็นการศึกษาการปลดปล่อยปริมาณสารอาร์บูตินจากเม็คปิดโดยการซังเม็คปิดปริมาณ 100 มิลลิกรัม นำมาบดด้วยโกร่งบดยา ละลายใน 95% เอทานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 280 นาโนเมตร โดยจะนำไปวัดทุกชั่วโมง โดยจะเปรียบเทียบจากเม็คปิดที่มีการพัฒนาสูตรจาก กัมอะคาเซียต่ออัลจินต และ กัมเม็คแมงลักต่ออัลจินตโดยกำหนดปริมาณอัลจินต เท่ากับ 0.20% โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วนเดียวกันคือ 0:1, 0.25:1, 0.5:1 และ 1:1



หมายเหตุ ชุดข้อมูล 1 คือ สูตรครีมที่ 1      ชุดข้อมูล 2 คือ สูตรครีมที่ 2  
ชุดข้อมูล 3 คือ สูตรครีมที่ 4      ชุดข้อมูล 4 คือ สูตรครีมที่ 3

รูปภาพ 4.24 กราฟเส้นการปลดปล่อยของเมคปิดอาร์บูตินสูตรต่างๆ

จากรูปภาพ 4.24 กราฟเส้นแสดงการปลดปล่อยของเมคปิดโลชันอาร์บูตินจากผลการศึกษา *In vitro* release โดยใช้เครื่องมือวีวีวีลิสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สูตรครีมที่ 3 มีการปลดปล่อยมากถึง 6 ชั่วโมง จึงนำสูตรครีมที่ 3 มาพัฒนาสูตร จึงได้การปลดปล่อยสารอาร์บูตินจากเมคปิดที่มีส่วนผสมของกัมที่สกัดจากเมคแมงลักจะใช้เวลาในการปลดปล่อยที่ 9 ชั่วโมงโดยจะให้การปลดปล่อยที่ยาวนานกว่าเมคปิดที่มีส่วนผสมของกัมอะคาเซียที่ใช้เวลาในการปลดปล่อยเพียง 4 ชั่วโมงเท่านั้น ในรูปภาพ 4.25



หมายเหตุ

ข้อมูลชุดที่ 1 คือ การปลดปล่อยอาร์บูตินจากเม็คปิดที่ผสมกับอะคาเซีย ที่อัตราส่วน 0.25:1

ข้อมูลชุดที่ 2 คือ การปลดปล่อยอาร์บูตินจากเม็คปิดที่ผสมกับเม็คแมงลักต่ออัลจินเนต ที่อัตราส่วน 0.25:1

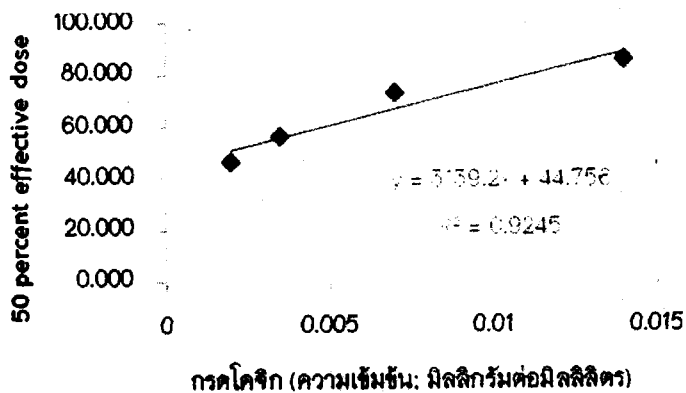
รูปภาพ 4.25 กราฟเส้นแสดงการปลดปล่อยของเม็คปิดอาร์บูติน

### ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด

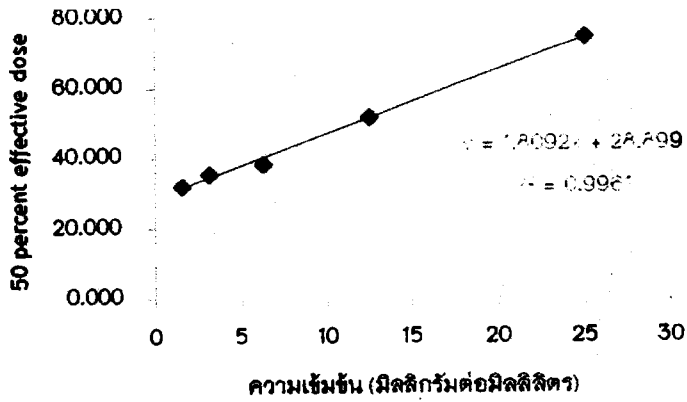
การทดสอบฤทธิ์ด้านเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการนำสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของสาส์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันไปทดสอบฤทธิ์ด้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี dopachrome method ซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะเปลี่ยนสารตั้งต้นคือ L-DOPA ไปเป็นรงควัตถุเม็ดสี พิเอซเมเมลานิน และ eumelanin โดยมีกรดโคจิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดสาส์ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดจากสาส์ที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ด้านเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยให้ค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 11.31-11.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ให้ฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 0.0167 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสาส์ที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดสาส์จากที่สกัดด้วย 20%เอทานอล ซึ่งรายละเอียดของสารสกัดต่างๆ และค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงดังตาราง 4.17

ตาราง 4.17 ค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

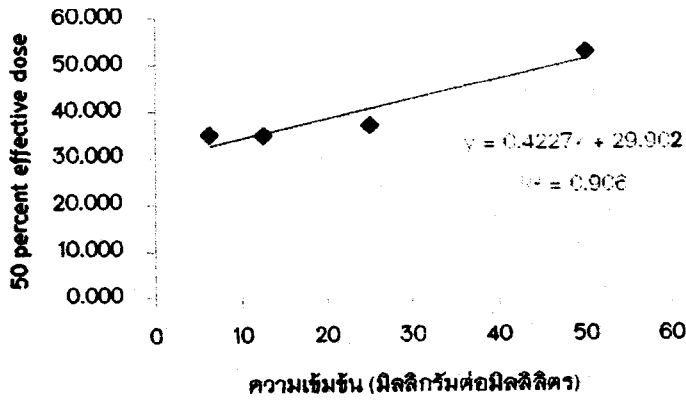
ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด	ED <sub>50</sub> (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
เอทานอล	
ครั้งที่ 1	11.66 ± 1.83
ครั้งที่ 2	11.37 ± 2.53
ครั้งที่ 3	11.31 ± 1.46
20% เอทานอล	
ครั้งที่ 1	47.55 ± 2.33
ครั้งที่ 2	47.97 ± 2.53
ครั้งที่ 3	48.61 ± 0.74
น้ำ	
ครั้งที่ 1	81.13 ± 2.13
ครั้งที่ 2	81.16 ± 2.16
ครั้งที่ 3	83.35 ± 1.85
กรดโคจิก	0.0167



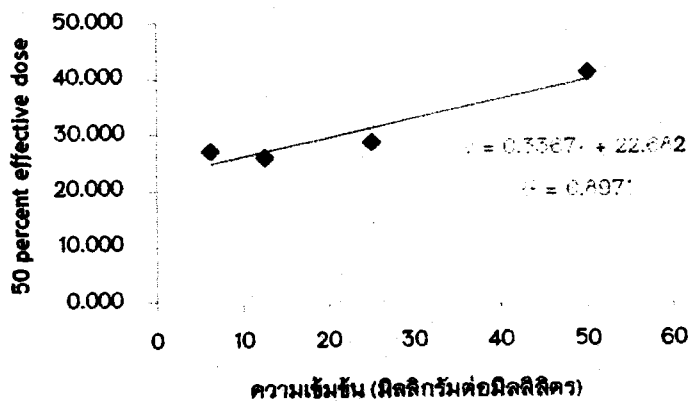
รูปภาพ 4.26 กราฟเส้นตรงแสดงค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายกรดโคจิก



สารสกัดในตัวอย่างละลายเอทานอล



สารสกัดในตัวอย่างละลาย 20%เอทานอล



สารสกัดในตัวอย่างละลายน้ำ

รูปภาพ 4.27 กราฟเส้นตรงแสดงค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารสกัดในตัวอย่างละลายเอทานอล, 20%เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ

### ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ จากการนำสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของสาส์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันไปทดสอบฤทธิ์โดยวิธี DPพีเอช scavenging assay โดยมีอาร์บูตินเป็นสารมาตรฐาน รายงานออกมาเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาส์ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดจากสาส์ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 6.53-8.61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ให้ฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานอาร์บูติน ซึ่งให้ค่าเท่ากับ  $0.198 \pm 0.05$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสาส์ที่มีฤทธิ์รองลงมา คือ สารสกัดสาส์จากที่สกัดด้วยน้ำ และ 20% เอทานอล ตามลำดับ แสดงดังตาราง 4.18

ตาราง 4.18 ค่าเฉลี่ยร้อยละ 50 ของความเข้มข้นการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาส์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด	$IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
20% เอทานอล	
- 1	$8.95 \pm 1.15$
- 2	$8.37 \pm 2.53$
- 3	$9.31 \pm 1.46$
น้ำ	
- 1	$6.53 \pm 0.40$
- 2	$7.97 \pm 2.53$
- 3	$8.61 \pm 0.74$
เอทานอล	
- 1	$5.76 \pm 0.04$
- 2	$6.16 \pm 0.16$
- 3	$6.35 \pm 0.85$
อาร์บูติน	$0.198 \pm 0.05$

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น Brij 35 ที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีไมเซลล์ลาร์ พบร้อยละของการกลับคืนของตัวอย่างจาก สารสกัดจากพืชคือ สารสีพันธุสีทอง สารสีพันธุน้ำผึ้ง และสารสีพันธุหอมแดง เป็น 104.37, 102.87 และ 104.82 ตามลำดับ และพบร้อยละของการกลับคืนจากตัวอย่างครีมบำรุงผิวคือ ยี่ห้อ Moniga ยี่ห้อ Cute press และยี่ห้อ Ctrl เป็น 97.27, 102.54 และ 96.12 ตามลำดับ เมื่อศึกษาความแม่นยำพบว่าความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือมีค่า %R.S.D. น้อยกว่า 5% เมื่อทำการทดลองมากกว่า 5 ครั้งขึ้นไป ผลจากการศึกษาความเป็นเส้นตรงและช่วงความเป็นเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์ ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วงที่กว้าง และครอบคลุม ช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี ที่มีค่า R-square เท่ากับ 0.998 และกราฟมาตรฐานมีความคงตัวดี โดยมีค่าความชันของกราฟที่มีความเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ และจากการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์โดยการหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด สำหรับวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวัดอาร์บูตินและไฮโดรควิโนน ได้รับความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.5125 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้เท่ากับ 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า พารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนของตัวอย่างสารสีพันธุสีทอง สารสีพันธุน้ำผึ้ง และสารสีพันธุหอมแดง ไม่พบปริมาณไฮโดรควิโนนแต่พบปริมาณอาร์บูติน เท่ากับ 0.347, 0.593 และ 0.515 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (ไม่พบปริมาณไฮโดรควิโนน) และการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนของตัวอย่างครีมบำรุงผิว คือ ยี่ห้อ Moniga และยี่ห้อ Cute press เท่ากับ 0.926 และ 1.720 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (ไม่พบใน บำรุงผิวยี่ห้อ Ctrl) และไม่พบปริมาณไฮโดรควิโนน และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนของตัวอย่าง สารสีพันธุสีทอง สารสีพันธุ น้ำผึ้ง และสารสีพันธุหอมแดง ไม่พบปริมาณไฮโดรควิโนนแต่พบปริมาณอาร์บูติน เท่ากับ 0.0016, 0.0036 และ 1.6320 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เทคนิคไมเซลล์ลาร์มีใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ อาร์บูตินในสารสกัดจากพืชได้ดี ให้ความแม่นยำ และความถูกต้องดี วิธีวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ใช้สารเคมีน้อย และใช้ง่ายในการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

การพัฒนาตำรับโลชันอาร์บูตินจากสารสกัดสาส์รูแบบนาโนอิมัลชันไว้ในขวดแก้วกันแสงสี  
ชาที่สภาวะต่างๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างไว้นาน 4 เดือน จาก  
ผลการศึกษาความคงสภาพของอาร์บูติน หลังจากเก็บไว้ในสภาวะแรงต่างๆ ความคงสภาพที่อุณหภูมิ  
4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มของความคงตัวของอาร์บูตินค่อยๆ ดีที่สุด รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 30  
องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มของความคงตัว ส่วนของครีมอาร์บูติน  
จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ตำรับที่มีปริมาณอาร์บูติน 1%  
ผสมกับสารลดแรงตึงผิวและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ลักษณะของ  
หยดอนุภาคเป็นทรงกลมมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร โดยหยดอนุภาคส่วนมากจะเล็กกว่า  
500 นาโนเมตร

การปลดปล่อยของเม็ดปิดโลชันอาร์บูตินจากผลการศึกษา *In vitro* release สูตรครีมที่ 3 มี  
การปลดปล่อยสารอาร์บูตินจากเม็ดปิดที่มีส่วนผสมของกัมที่สกัดจากเม็ดแมงลักจะใช้เวลาในการ  
ปลดปล่อยที่ 9 ชั่วโมง ซึ่งการปลดปล่อยที่ยาวนานกว่าเม็ดปิดที่มีส่วนผสมของกัมอะคาเซียที่ใช้  
เวลาในการปลดปล่อยเพียง 4 ชั่วโมงเท่านั้น

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไมโรซิเนสของสารสกัดจากสาส์ที่สกัดด้วย  
น้ำมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยให้ค่า  $ED_{50}$  อยู่ในช่วง 11.31-11.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
แต่ให้ฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 0.0167 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด  
สาส์ที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดสาส์จากที่สกัดกักด้วย 20%เอทานอล

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดสาส์ที่สกัดด้วยเอทานอลมี  
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยให้ค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 6.53-8.61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ให้ฤทธิ์  
น้อยกว่าสารมาตรฐานอาร์บูติน ซึ่งให้ค่าเท่ากับ  $0.198 \pm 0.05$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสาส์ที่  
มีฤทธิ์รองลงมาคือ สารสกัดสาส์จากที่สกัดกักด้วยน้ำ และ 20%เอทานอล ตามลำดับ

## เอกสารอ้างอิง

- บุญชู ศรีตุลารักษ์. 2541. องค์ประกอบทางเคมีของมะหาดและหาดหนูน. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมพ์ร สีลาพรพิสิฐ. เครื่องสำอางธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ (2544) 131- 132.
- Balsam, S. and Edward S. 1972. *Cosmetic : science and technology* 2<sup>nd</sup> ed. volumn 1, wiley Interscience, pp. 223-239.
- Ballantyne, B., Marrs, T. and Turner, P. 1995. *General & applied toxicology*. Abridged ed. London: Macmillan Press. pp. 1361.
- Bentley-Phillips B, Bayles MAH. Cutaneous reaction to topical application of hydroquinone. *S Afr Med J* 1975; 49: 1391-5.
- Bleehen SS, Pathak MA, Hori Y, et al. Depigmentation of skin with 4-isopropylcatechol mercaptoamines and other compounds. *J Invest Dermatol* 1968; 50: 103-9.
- Boyle J, Kennedy CTC. Hydroquinone concentrations in skin lightening cream. *Br J Dermatol* 1986; 114: 501-4.
- Brailovskaya, V. A.; Luk, yanchikova, G. I. 1976. pyatigorsk. Farm, inst. pyatigorsk' USSR. *Rastitel'nye Resursy* 12(3), 466-8.
- Brauer EW. Safety of over-the-counter hydroquinone bleaching creams. *Arch Dermatol* 1985; 121: 1239.
- Buhl, F. and Hachula, U. 1991. Spectrophotometric determination of folic acid and other reducing agents using coupled redox-complexation reaction with cerium (IV) and Arsenazo III. *Chemia Analityczna*. 36, 27-34.
- Celine, C. and Laurence J.M. 2000. *Laboratry of Industrial pharmacy, School of pharmacy, University of Nantes, IL Furnaco* 55 (2000) 410-413.
- Clarys P, Barel A. Efficacy of topical treatment of pigmentation skin disorders with plant hydroquinone glucosides as assessed by quantitative color analysis. *J Dermatol* 1998; 25: 412-4.
- Connor T, Braunstein B. Off-center fold: hyperpigmentation following the use of bleaching creams: localized exogenous ochronosis. *Arch Dermatol* 1987; 123: 105-6.
- Cullison D, Abele DC, James L, Quinn O. Localized exogenous ochronosis. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6: 389-391.

- Deisinger PJ, Hill TS, English JC. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 31-46.
- Diven DG, Smith EB, Pupo RA, Lee M. Hydroquinone-induced localized exogenous ochronosis treated with dermabrasion and CO<sub>2</sub> laser. *J Dermatol* 1990; 22: 529-31.
- Dorsey OS. Dermatitis and pigmentary reactions to monobenzylether of hydroquinone. *Arch Dermatol* 1960; 81: 245-8.
- Findlay GH, Morrison JGL, Simson IW: Exogenous ochronosis and pigmented collid milium from hydroquinone bleaching creams. *Br J Dermatol* 1975; 93: 613-22.
- Findlay GH. Ochronosis following skin bleaching with hydroquinone. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6: 1092-3.
- Fisher AA. Treatment of chloasma with monobenzylther of hydroquinone. *Arch Dermatol* 1951 : 64, 645.
- Fisher AA. Can bleaching creams 2 percent hydroquinone produce leukoderma. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 134.
- Fisher AA. Hydroquinone uses and abnormal reactions. *Cutis* 1983; 31: 240-4.
- Fromard, F. 1983. *Lab. Bot. Biogeogr. Univ. paul sabatier, Toulouse, Fr. Comptes Rendus du Congres National des societes savantes, section des sciences, 251-67.*
- Gellen GA. Pigment responses: occupational. In Maibach HI, ed. *Occupational and industrial dermatology*. Chicaco London: Year Book Publ 1987; 134-141.
- Goldsmith LA. Cutaneous changes in errors of amino acid metabolism: alkaptonuria. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. *Dermatology in general medicine* 6<sup>th</sup> ed. Chapter 147 New York: McGraw-Hill 2003; 1423-8.
- Hardwick N, Van Gelder LW, Van Der Merwe CA, Van Der Merwe MD. Exogenous ochronosis : An epidemiological study. *Br J Dermatol* 1989; 120: 229-238.
- Hoshaw RA, Zimmerman KG, Menter A. Ochronosis like pigmentation from hydroquinone bleaching creams in American blacks. *Arch Dermatol* 1985; 21: 105-80.
- Hull PR, Proctor PR. The melanocyte: an essential link in hydroquinone-induced ochronosis. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 529-31.
- Hung, S. H., Baifen, C. Q., Huang, Y., Tie, X. 1960. Zhejiang Intitute of Light Industry Hmgzhou, peop. Rep. china. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin*. (1), 3-16.

- Jimbow K, Obata H, Pathak MA, Fitzpatrick TB. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J Invest Dermatol* 1974; 62: 436-49.
- Keller, E. 1960. *Arch. pharm.* 293, 1079-84.
- Kimura T, Doi K. Efficacy of hydroquinone in the treatment of cutaneous hyperpigmentation in hairless descendants of Mexican hairless dogs (*Xoloitzcuintli*). *Lab Anim Sci* 1998; 469-75.
- Kraus, L. and Stahl, E. 1968. Chromatography and Photometry of arbutin. *Inst. Conter Drug.* 17, 252-255.
- Larsen, K. and Larsen, S.S. 1997. *Bauhinia sirindhorniae* sp. Nov. (Leguminosae-Caesalpinioideae) a remarkable new species from Thailand. *Nordic J. Bot.* 17(2), 113-118.
- Lawrence N, Bligard CA, Reede R, Perret WJ. Exogenous ochronosis in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 1207-22
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. Treatment of melanin hyperpigmentation. *JAMA* 1953; 152: 585-8.
- Lida, K., Hase, K., Shimomura, K., Sudo, S., Katota, S. and Namba, T. 1995. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Med.* 61, 425-428.
- Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Yakeya, K. and Itokawa, H. 1994. Pseudostellalin A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron.* 50, 6797-6804.
- Masamoto, Y., Iida, S. and Kubo, M. 1980. Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Med.* 40, 361-365.
- Mosher DB, Parrish JA, Fitzpatrick TB. Monobenzylether of hydroquinone. A retrospective study of treatment of 18 vitiligo patients and a review of the literature. *Br J Dermatol* 1974; 97: 667-79.
- Oliver EA, Schwartz L, Warren LH. Occupational leukoderma *Arch Dermatol* 1940 : 142; 993-4.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. and Codina, C. 2001. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 12, 336-339.
- Penneys ND. Ochronosislike pigmentation from hydroquinone bleaching creams. *Arch Dermatol* 1985; 121: 1239.

- Qiu, Dong-fang; Guo, Ying-chen; Wang' Hong-wei. 2000. Nanyang Teachers college, Nanwng, peop. Rep. China. Haxuee Yanjiu. 1(4), 34-35.
- Rietschel RL, Fowler JF. Contact leukoderma (vitiligo), hyperpigmentation and discolorations from contactants. In : Fisher's contact dermatitis 4 ed. Williams and Wilkins. Maryland 1995 : 765-779.
- Riley PA. Acquired hypomelanosis. Br J Dermatol 1971; 83: 290-3.
- Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K, Yamamoto K. Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. Arch Pharm Res 1999; 22: 335-9.
- Sanchez JL, Vazques M. A hydroquinone solution in the treatment of melasma. J Am Acad Dermatol 1982; 21: 55-8.
- Snell RS. Monobenzylether of hydroquinone. Arch Dermatol 1964; 90 : 63-70.
- Snider RL, Thiers BH. Exogenous ochronosis. J Am Acad Dermatol 1993; 28: 662-4.
- Sticher, O .; Soldati, F. and Lehmann D. 1979. Pham. Inst. Eidg. Tech. Hochsch. Zurich, Zunrich,switz. Planta Medica35(2) 253-61.
- Sun, H. W., Huang, X. R., and Yuan, C.. 1997. Heilonliang University of Traditional chinese Medicine, Harbin, peop. Rep. china. Zhongguo zhongyao Zazhi. 22(9), 1-4.
- Sweetman SC. Hydroquinone : Martindale. The complete drug reference 33 rd edition. The Bath Press UK 2002 : 1115
- Teglia, A. 1989. Ist. Angelica, Bologna, Italy. cosmetics & Toiletries, Edizione Italiana 10(4) 6-26.
- Thomas AE, Gisburn MA : Exogenous ochronosis and myxedema from resorcinol. Br J Dermatol 1961; 73 : 378-381.
- Thongchai W., Liawruangrath B.and Liawruangrath S., High performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin whitening creams and medicinal plant extracts, Int. J. Cosmet. Sci. 2007; 29 (6), 488.
- Thongchai W., Liawruangrath B.and Liawruangrath S., Arbutin determination in medicinal plants and creams, Int. J. Cosmet. Sci. 2009; 31, 87-96.
- Tidman MJ, Horton JJ, MacDonald DM. Hydroquinone-induced ochonosis-light and electron-microscopic features. Clin Exp Dermatol 1986; 11: 224-8.

Tuffanelli D, Abraham RK, Dubois EI: Pigmentation from antimalarial therapy. Arch Dermatol 1963; 88: 419-26.

Zhang, D., Sha, Z. and Wenji, T. 1987. Med. Mater. Co, Shanxi, peop. Rep. China. Zhongyao Tongbuo, 2(5), 301-310.

## Determination of Arbutin in Medicinal Plants

Wisanu Thongchai<sup>a\*</sup>, Suwanna Thongchai<sup>b</sup>, Yuttasak Chammui<sup>a</sup>,

Pisit Poolprasert<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

<sup>b</sup> Sa Laung Phitthayakhom School, Phichit 66000, Thailand

<sup>c</sup> Program of Biology, Faculty of Science and Technology Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

wisanuthongchai@psru.ac.th

### Abstract

A simple micellar liquid chromatographic procedure for simultaneous determination of arbutin in medicinal plant extracts was proposed. This method was developed and validated. The chromatographic conditions were also optimized. All analyses were performed at room temperature in an isocratic mode, using a mixture of 1% (v/v) acetonitrile and 0.006 mol L<sup>-1</sup> Brij 35 (pH 6.0) as a mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The analytical column was a 150 × 3.9 mm Nova-Pak C-18 column. The effluent from the analytical column was monitored by UV detection at 280 nm. Under the optimum conditions, arbutin could be determined within a concentration range of 2-50 µg mL<sup>-1</sup> of arbutin was obtained with the regression equations;  $y = 0.045x + 0.042$  ( $r^2 = 0.9923$ ). The limits of detection were found to be 0.51 µg mL<sup>-1</sup> for arbutin. The proposed MLC method was applied to the determination of arbutin contents in medicinal plant extracts. This proposed MLC method is thus suitable for routine analysis of arbutin in the pharmaceutical formulations and raw medicinal plant extracts.

**Keywords:** micellar liquid chromatography, arbutin, medicinal plant

### 1. Introduction

Whitening agents are of major importance due to the negative effect of exposure to UV radiation on the skin. Skin whitening products have become increasingly demand in the past few years. The main purpose for skin lightening products is to lighten the skin as well as even out skin tone or to treat pigmentation disorders such as freckles melasma, pregnancy marks and age spots. In the skin, the enzyme tyrosinase biochemically converts the amino acid tyrosine into melanin. Arbutin is tyrosinase inhibitor, which inactivate tyrosinase by chelating with its vital copper ion and suppressing the tautomerization from dopachrome to 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) (Zhai et al., 2001). Arbutin (hydroquinone-β-D-glucopyranoside) is a naturally occurring glycoside of hydroquinone. It is a natural phenolic glycoside found in various plant species of diverse families such as Ericaceae (*Vaccinium* spp., *Arctostaphylos* spp.), Asteraceae (*Achillea millefolium*), Betulaceae (*Betula alba*) and Rosaceae (*Pyrus communis* L.). Arbutin is commonly used in

urinary therapeutics, and as a human skin-whitening agent (Tomita et al., 1990). Arbutin can prevent serious sunburn caused by an accumulation of melanin in subcutaneous tissue produced and a tyrosinase-catalyzed metabolic pathway (Jin et al., 1999; Maeda et al., 1991; Meada et al., 1996). Tyrosinase is the essential enzyme for melanin formation. The depigmenting effect of arbutin has been reported to reduce cellular tyrosinase activity without changing the cell viability (Maeda et al., 1991). Arbutin is highly water-soluble and has been used in many skin whitening, depigmenting cosmetics and antioxidants. In recent years, a technique known as micellar liquid chromatography (MLC) has been used as an alternative method to conventional liquid chromatography because of the large number of interactions of solutes with the mobile and stationary phases. Micellar liquid chromatography has several advantages over other chromatographic methods, including low cost, low toxicity, low volatility, the possibility of simultaneous separation of ionic and non-ionic compounds, direct injection of biological fluids, and high separation selectivity, because of the involvement of many adjustable conditions (Ruiz-Angel et al., 2002; Ruiz-Angel et al., 2009; Ruiz-Angel et al., 2009; Cheng et al., 2010; García Alvarez-Coque et al., 1999; Rosés et al., 2009; Koenigbauer et al., 1990; Tonova et al., 2008). The primary objective in the development of MLC separations is to optimize chromatographic performance by adjustment of such experimental conditions as temperature, type and concentration of organic modifier, pH, and concentration of surfactant. MLC separations are mainly modified by varying the composition of the mobile phase. Optimization is often effected by varying conditions one at a time, while keeping the others fixed, until an optimum is reached for each variable (Berthod et al., 2000).

In this research work, a rapid and simple micellar liquid chromatographic method for the determination of arbutin in medicinal plant extracts has been developed. The optimized method was applied to the analysis of arbutin in pear fruits.

## 2. Experimental

### *Apparatus*

A Shimadzu model SCL- 10A liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) was used for the analysis of arbutin. The following instruments were also used: spectrophotometer (UV-mini 1240; Shimadzu, Japan); pH-meter (Model pH 900, Precisa, Switzerland); water bath and shaker (Model SB-200-10, Thailand); Ultrasonicator (Model 889, Cole Parmer, USA); and a rotary evaporator (EYELA N-N series, EYELA, USA)

### *Chemicals*

The arbutin standards was obtained from Sigma (Saint Louis, USA). Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), Polyethylene dodecyl ether (Brij 35) and Sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetonitrile, potassium dihydrogen phosphate and 2-propanol were obtained from Carlo-Erba (Italy), disodium hydrogen phosphate from BDH (Poole, UK) and orthophosphoric acid 85% (w/v) from Fisher (UK). Deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA). Other chemicals were analytical reagent grade.

### *Materials and methods*

Stock standard solutions of arbutin was prepared in water to provide a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. These stock solutions were freshly prepared each time and stored below 4 °C and protected from light. The solutions were diluted with 0.006 mol L<sup>-1</sup> Brij 35 to the desired concentration levels just before performing the analysis. A 0.006 mol L<sup>-1</sup> Brij 35 stock solution was prepared in phosphate buffer solution. Organic solvents were added to the mobile phases where necessary. All mobile phases and standard solutions were filtered through 0.45 µm Nylon membranes (Millipore, Bedford, USA).

### Chromatographic conditions

The MLC analyses were carried out with a Shimadzu Model SCL-10A liquid chromatograph, thermostatic column compartment, online degasser with an UV-visible detector model SPD-10A (Shimadzu, Japan) chromatographic separations were performed on a Nova-Pak C<sub>18</sub> column (150 x 3.9 mm, 5.0 μm. Water Associates, Harrow, UK); at room temperature. A mixture of 1 % (v/v) acetonitrile and 0.006 mol L<sup>-1</sup> Brij 35 (pH 6.0) was used as a mobile phase with a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Each sample and/or standard aliquots of 20 μL was injected by auto sample injector onto the analytical column. The effluent from the analytical column was monitored by UV detection at 280 nm. The quantitation was achieved based on peak area of arbutin. Under the optimum conditions used, the time taken for complete separation and determination of arbutin was within 6.0 min.

### Sample preparation

Arbutin was presented in many plants, for example in flowers, leaves, peel and pulp of some oriental species of pear (*Pyrus bretschneideri*, *Pyrus pyrifolia*, *Pyrus ussuriensis*, *Pyrus sinkiangensis*) (Santos-Montes et al., 1999). In this study, attempt will be made to determine arbutin in pear which is present in Thailand (*Pyrus communis*). The medicinal plant samples used in this studied are Ya pear, Fragrant pear, Early-Matured pear and Chinese pear (commercially available from markets in Thailand). The kernel of each sample was peeled, dried at 60 °C for 12 h and then powdered. About 2.0 g of each plant powder was weighed accurately, sonicated for 30 min with 30 mL of deionized water and 0.10 g calcium carbonate and filtered through membrane filter paper (Whatman®, No. 42). The residue was washed thoroughly with deionized water. Then 5 mL of 4% lead(II) acetate solution was added to the filtrate, cooled and diluted to 50 mL with deionized water and filtered. Then 0.20 g of sodium phosphate was added to the filtrate, mixed and filtered through a millipore membrane again. This solution was kept for further MLC analysis.

## 3. Results and discussion

### Chromatographic Conditions

The mobile phase flow rate has an influence on the chromatographic efficiency in MLC. The effect of flow rate has been studied in the range of 0.8-1.5 mL min<sup>-1</sup> under the optimum conditions. As a compromise between resolution, sensitivity and analysis time, the optimum flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. All analyses were performed at room temperature. The chromatographic conditions were carried out in the isocratic mode using a mixture of 1% (v/v) acetonitrile and 0.006 mol L<sup>-1</sup> Brij 35 (pH 6.0) as a mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The analytical column was a 150 x 3.9 mm Nova-Pak C-18 column (Waters Associates, Harrow, UK). Each sample and/or standard aliquots of 20 μL was injected by auto sample injector onto the analytical column. The effluent from the analytical column was monitored by UV detection at 280 nm. The quantitation was achieved based on peak area of arbutin. Under the optimum conditions used, the time taken for complete separation and determination of arbutin was within 6.0 min.

### Method validation

Under the selected micellar chromatographic conditions, the linear range of the signal response for arbutin was studied over the concentration range of 2.0-500.0 mg L<sup>-1</sup>. The linearity of calibration graph was determined using the optimal experimental parameters. Nine standard solutions ranging from 2.0-50.0 mg L<sup>-1</sup> in concentration, in three replicates each, were injected into the MLC system. The calibration graph was obtained by plotting the absorbance of the solutions against the standard concentrations. Linear calibration graph over the concentration range 2.0-50.0 μg mL<sup>-1</sup> of arbutin was obtained with the regression equations;  $y = 0.045x + 0.042$  ( $r^2 = 0.9923$ ). Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of arbutin were estimated from

the calibration curves using the expression  $3.3SD/S$  where  $SD$  is standard deviation of the response and  $S$  is the slope of calibration curve and limit of quantitation (LOQ) =  $10SD/S$ . The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) values were found to be  $0.51 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1.25 \text{ mg L}^{-1}$  for arbutin. The precision of the method was determined by measuring the repeatability (intraday precision) and the intermediate precision (inter day precision), both expressed as relative standard deviation (R.S.D). The precision was evaluated by assaying six replicate injections of 5, 10, 15 and  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  of arbutin. The accuracy of the proposed MLC method was assessed with recovery using the addition of four known concentration levels (5, 10, 15 and  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of arbutin. All samples were injected in three replicates for each concentration. The concentration found was calculated against the concentration added. The recoveries of analyte were in the ranges of 96.04–98.58% for arbutin (Table 1). Additives and excipients did not interfere in the determination of those active ingredients since the samples used to in the samples evaluate recovery were prepared with those additives and excipients present.

**Table 1** Accuracy of the proposed MLC method (n=5)

Arbutin concentration; $\mu\text{g/mL}$		% Recovery (mean $\pm$ S.D)
Added	Found (mean $\pm$ S.D)	
5	$4.9 \pm 0.1$	$98.2 \pm 2.5$
10	$9.8 \pm 0.4$	$98.6 \pm 3.4$
15	$4.7 \pm 0.2$	$98.1 \pm 1.7$
20	$9.2 \pm 0.2$	$96.0 \pm 1.2$

#### Method application

The proposed MLC method was applied to the determination of arbutin in pear extracts. The samples were extracted and prepared according to sample preparation section. The content of arbutin in each sample solution was determined using the MLC optimum conditions. The samples gave well-defined peaks. There is no interference peak present in each sample. The average contents of arbutin in each sample were presented in Table 2. The results compared favorably with those obtained by the published HPLC method (Thongchai et al., 2007). Statistical analysis of the results by using a t-test showed that the calculated t- values were less than the table list t- value at 95% confidence limit (Miller et al., 1993). Therefore, there two methods are not significantly different in any of the samples.

**Table 2** Determination of studied arbutin in medicinal plant extracts (n=5)

Samples	Compounds	MLC method average ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Published method [35]* average ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Chinese pear	Arbutin	0.38	0.35
Fragrant pear	Arbutin	0.59	0.55
Early-matured pear	Arbutin	0.52	0.51

\* Chromatographic conditions: an Inertsil-ODS3 ( $C_{18}$ ) column ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ ;  $5\text{-}\mu\text{m}$  particles), (89:10:1, v/v/v) water-methanol-0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  acetic acid,  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ , 222 nm.

#### 4. Conclusion

The proposed MLC method can be used for the determination of arbutin in medicinal plant extracts. This proposed method has proven to be selective, fast, simple, relatively, inexpensive, precise and accurate. The speed of analysis and the precision make this method suitable for quality control of arbutin in medicinal plant extracts. In addition, the selected mobile phase is cheaper and less toxic than those used in conventional RP-HPLC method.

#### 5. Acknowledgment

The authors would like to express their sincere thanks to the Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok for partial support.

#### References

- Berthod A. and García-Alvarez-Coque C., *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2000.
- Cheng X.W., Jiang W.H., Chu J.X., *Micellar liquid chromatography and its application in toxicological analysis. Fa Yi Xue Za Zhi.* 26, 56-58 (2010).
- García Alvarez-Coque M.C., Carda Broch S., *Direct injection of physiological fluids in micellar liquid chromatography. J. Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 736, 1-18 (1999).
- Jin, Y.H., Lee, S.J., Chung, M.H., Park, J.H., Park, Y.I., Cho, T.H. and Lee, S.K. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* 22, 232-236 (1999).
- Koenigbauer M.J., *Application of micellar mobile phases for the assay of drugs in biological fluids. J. Chromatogr.* 531, 79-99 (1990).
- Maeda, K. and Fukuda, M. *In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J. Soc. Cosmet. Chem.* 42, 361-368 (1991).
- Meada, K. and Fukuda, M. *Arbutin: Mechanism of Its Depigmenting Action in Human Melanocyte Culture. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 765-769 (1996).
- Miller, J.C. and Miller, J.N. *Statistics for analytical chemistry (3<sup>rd</sup> ed.)*. New York: Ellis Horwood PRT Prentice Hall. 58 (1993).
- Ruiz-Angel M.J., Caballero R.D., Simó-Alfonso E.F. and García-Alvarez-Coque M.C., *Micellar liquid chromatography: suitable technique for screening analysis. J. Chromatogr. A.* 947, 31-45 (2002).
- Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Torres-Lapasió J.R., García-Alvarez-Coque M.C. *Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. J. Chromatogr A.* 1216 1798-1814 (2009).
- Rosés M., Subirats X., Bosch E., *Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: effect of variation of mobile phase composition and temperature. J. Chromatogr A.* 1216, 1756-1775 (2009).
- Ruiz-Angel M.J., Torres-Lapasió J.R., García-Alvarez-Coque M.C., Carda-Broch S., *Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of beta-blockers. J. Chromatogr A.* 1216, 3199-3209 (2009).
- Tonova K., Lazarova Z., *Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. Biotechnol Adv.* 26, 516-532 (2008).
- Santos-Montes A., Izquierdo-Hornillos R., *Optimization of separation of a complex mixture of natural and synthetic corticoids by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate. Application to urine samples. J. Chromatogr B. Biomed Sci Appl.* 724, 53-63 (1999).
- Thongchai W., Liawruangrath B. and Liawruangrath S., *High performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin whitening creams and medicinal plant extracts, J. Cosmet. Sci.*, 58, 35-44, 2007.
- Tomita, K., Fukuda, M. and Kawasaki, K. *Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use. Fragrance J.* 18, 72-77 (1990).
- Zhai, H. and Maibach, M.I. *Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14, 1-10 (2001).