การตั้งตำรับครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์

นางสาวกัญญาพัชร บรรจงประเสริฐ 5136507433

นางสาวพัชร์ระพี เผดิมปราชญ์ 5136617833

นางสาวพิชญ์วิภา ทรัพย์ศิริสวัสดิ์ 5136624133

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Formulation of nourishing cream with anti free radical activity from beer

Miss Kanyaphat	**Bunchongprasert**	**5136507433**
Miss Patrapee	**Padermprach**	**5136617833**
Miss Pitwipa	**Subsirisawat**	**5136624133**

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Bachelor of Science in Pharmaceutical Science Program

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การตั้งตำรับครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวกัญญาพัชร บรรจงประเสริฐ 5136507433
	นางสาวพัชร์ระพี เผดิมปราชญ์ 5136617833
	นางสาวพิชญ์วิภา ทรัพย์ศิริสวัสดิ์ 5136624133
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์แขนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม(เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภญ. ร.ต.ท.หญิง ดร.วลัยศิริ ม่วงศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภญ. ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒกานนท์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

……..……..คณบดี
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

……..ประธานแขนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม
(รองศาสตรจารย์ เภสัชกร ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนวย)

……อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.ท.หญิง ดร. วลัยศิริ ม่วงศิริ)

……อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒกานนท์)

โครงการลำดับที่ 2.7

วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การตั้งตำรับครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Formulation of nourishing cream with anti free radical activity from beer

หัวหน้าโครงการ : นางสาวกัญญาพัชร บรรจงประเสริฐ 5136507433

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวพัชร์ระพี เผดิมปราชญ์ 5136617833

นางสาวพิชญ์วิภา ทรัพย์ศิริสวัสดิ์ 5136624133

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ภญ.ร.ต.ท.หญิง ดร.วลัยศิริ ม่วงศิริ, ผศ.ภญ.ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒกานนท์

ภาควิชา : วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

เบียร์มีส่วนประกอบของฮอปและมอลต์ซึ่งอุดมไปด้วยสารจำพวก Polyphenols ที่สามารถออกฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ในการศึกษานี้จึงได้นำเบียร์มาเป็นสารสำคัญของครีมบำรุงผิวเพื่อต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการคัดเลือกเบียร์ที่ผลิตในประเทศไทย หาสารสำคัญและปริมาณของสารสำคัญ โดยใช้ D P P H Method และ Folin-Ciocalteu Method เปรียบเทียบกับตำรับครีมที่มีสารมาตรฐานในการ ต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาช่วงของปริมาณที่จะใช้ เมื่อพัฒนาสูตรตำรับจนได้คุณสมบัติตามต้องการแล้วจึงนำ ไปทดสอบ ความคงตัวทางกายภาพในสภาวะเร่งและการปั่นเหวี่ยงและทดสอบความคงตัวทางเคมีโดยใช้ Folin-Ciocalteu Method จากนั้นทำการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังที่อาจเกิดขึ้นได้ในกลุ่มตัวอย่าง รวมทั้งทดสอบหาประสิทธิภาพในการให้ความชุ่มชื้นของตำรับ จากการศึกษาพบว่าเบียร์สิงห์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมี % Scavenging เท่ากับ 29.662 และมีปริมาณ Total polyphenols เท่ากับ 293.9 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับ Gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำมาพัฒนา สูตรตำรับครีมบำรุงผิวโดยใช้เบียร์ในความเข้มข้น 2% w/w พบว่าตำรับมีความคงตัวดีในทางกายภาพแต่ไม่มีความคงตัวทางเคมีเนื่องจากพบว่าสารสำคัญ (Total polyphenols) ลดลง 31.27% ในสภาวะเร่งที่ 30°C±2°C /75±5%RH และลดลง 43.82% ในสภาวะเร่งที่ 40°C±2°C /75±5%RH ซึ่งเกินกำหนดของ ASEAN Guideline on stability study of drug product ในการทดสอบการระคายเคืองของตำรับและประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว พบการระคายเคืองเล็กน้อยจำนวน 3 คนในอาสาสมัครทั้งหมด 2 0 คน และสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหลังใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.032 และ 0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวที่ลดลงจากผิวปกติหลังใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่เวลา 3 ชั่วโมพบค่า p-value เท่ากับ 0.494 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ .ภญ.ร.ต.ท.หญิง ดร . วลัยศิริ ม่วงศิริ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผศ.ภญ.ดร. พรเพ็ญ วีระวัฒกานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำ ติดตามความก้าวหน้าของโครงการ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอกราบขอบพระคุณโครงการปริญญานิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.รุทธ์ สุทธิศรี และคุณชุติโชติ มั่งมี ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือในการเตรียมสารสำคัญ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสันติ ห่านศรีวิจิตร และคุณวรรณภา มหาพสุธานนท์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม ที่ช่วยจั ดการเรื่องสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ นิสิตปริญญาโท นายวิรุจน์ จิตต์ผ่องใสกุล และนายศิตาพัชพ์ เบ็ญจรงค์กิจ ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรมที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือทั้งในด้านความรู้ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มโครงการ

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของวิชา Senior Project (3346502) ประจำปีการศึกษา 2555 ซึ่งการวิจัยโครงการนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตั้งตำรับครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์ โดยอาศัยความรู้พื้นฐาน ทางด้านเภสัชกรรมและเภสัชวิเคราะห์เพื่อให้ได้ตำรับที่มีความคงตัวที่ดีและสามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆในระดับอุตสาหกรรมได้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจด้านการตั้งตำรับครีมที่มีเบียร์เป็นสารสำคัญในตำรับ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
กิตติกรรมประกาศ..... ข
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ฉ
สารบัญภาพ..... ซ

บทที่

1 บทนำ.....1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
วัตถุประสงค์..... 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2
2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4
ประวัติและความเป็นมาของเบียร์..... 4
ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์..... 5
สารต้านอนุมูลอิสระ..... 6
การตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ.....7
Gallic acid..... 7
Quercetin..... 8
อิมัลชัน..... 9
เทคนิคการประเมินการระคายเคืองและความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์..... 11
3 วัสดุและวิธีการวิจัย..... 16
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 16
เครื่องที่ใช้ในการทดสอบ..... 16
วิธีการดำเนินการวิจัย..... 17
1. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเบียร์..... 17
2. การคัดเลือกยี่ห้อและชนิดของเบียร์ที่เหมาะสม..... 17
3. การตรวจสอบสารสำคัญในเบียร์สิงห์..... 19
4. การตั้งสูตรตำรับครีมเบส..... 20

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

5. การตั้งสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ 22
6. การทดสอบความระคายเคืองและประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว 24
4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 27
1. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเบียร์ 27
2. การคัดเลือกยี่ห้อและปริมาณของเบียร์ที่เหมาะสม 28
3. การตรวจสอบสารสำคัญในเบียร์สิงห์ 32
4. การตั้งสูตรตำรับครีมเบส 34
5. การตั้งสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ 38
6. การทดสอบความระคายเคืองและประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว 41
5 สรุปผลการทดลอง 44
เอกสารอ้างอิง 47
ภาคผนวก 50
ภาคผนวก ก 51
ภาคผนวก ข 52
ภาคผนวก ค 57
ภาคผนวก ง 62
ภาคผนวก จ 63
ภาคผนวก ฉ 64
ภาคผนวก ช 65
ภาคผนวก ซ 66

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสูตรตำรับที่มีส่วนผสมของ Quercetin เป็นส่วนประกอบ..... 8

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายเบียร์ 7 ตัวอย่างเพื่อทำการคัดเลือกเบียร์..... 17

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายเบียร์สิงห์ 9 ตัวอย่างเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเบียร์.... 18

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในสูตรตำรับครีมเบส.....21

ตารางที่ 5 คะแนนสำหรับการประเมินลักษณะการแยกชั้นหลังทดสอบด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง.... 22

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์..... 23

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบ %Scavenging ของเบียร์ชนิดต่างๆ..... 30

ตารางที่ 8 แสดง %Scavenging ของเบียร์สิงห์ และสารละลายมาตรฐาน Quercetin..... 31

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Quercetin หรือสารละลายเบียร์ : น้ำ ที่อัตราส่วน 1:5 และค่าที่คำนวณได้จากสมการถดถอยเทียบเป็น gallic acid equivalent..... 34

ตารางที่ 10 แสดงการประเมินคุณสมบัติต่างๆ ของครีมเบส..... 35

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบสหลังผ่าน Heat-cool cycles 7 รอบ.....37

ตารางที่ 12 แสดงค่า pH ของครีมเบสในสภาวะเร่งที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์..... 37

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบสหลังผ่านสภาวะ30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH นาน 1 เดือน..... 38

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบสหลังผ่านสภาวะ40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH นาน 1 เดือน.....38

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์หลังเตรียมเสร็จทันทีกับหลังผ่าน Heat-cool cycles 7 รอบ..... 39

ตารางที่ 16 แสดงค่า pH ของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในสภาวะเร่งที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์...39

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบสหลังผ่านสภาวะ 30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH และ 40±2 องศาเซลเซียส75%RH นาน 1 เดือน..... 40

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 18 แสดงความคงตัวทางเคมีของครีมเบียร์ 2% โดยการวัดปริมาณ Total Polyohenols เปรียบเทียบเป็น Gallic acid equivalent ด้วย Folin-Ciocalteu Method.....64
ตารางที่ 19 แสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบส โดยวิธี Transepidermal water loss.....65
ตารางที่ 20 แสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบียร์ 2% โดยวิธี Transepidermal water loss.....66

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย Folin-Ciocalteu กับ phenolic hydroxyl groups..... 6

ภาพที่ 2 แสดงกลไกการจับโลหะของ Flavonoids……..... 7

ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Gallic acid..... 8

ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ Quercetin..... 8

ภาพที่ 5 แสดงการทดสอบการแพ้ของผลิตภัณฑ์โดยวิธี patch test..... 12

ภาพที่ 6 แสดงการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า (Transepidermal water loss).....14

ภาพที่ 7 แสดงสิ่งกั้น (Barrier function) ของผิวหนังที่ส่งผลต่อค่า TEWL.....14

ภาพที่ 8 แสดง Tewameter® เครื่องมือที่ใช้ในการวัด Transepidermal water loss.....15

ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์ช้างสูตร Malt 100%..... 27

ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์ช้างสูตร Classic..... 27

ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์สิงห์..... 28

ภาพที่ 12 แสดงสีของ DPPH ที่จางลงจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ..... 29

ภาพที่ 13 แสดงสีของ DPPH จากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อยืนยันฤทธิ์..... 31

ภาพที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Quercetin..... 32

ภาพที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของเบียร์สิงห์..... 32

ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid และสมการถดถอยเชิงเส้น..... 34

ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Gallic acid equivalent (GAE) กับระยะเวลาที่เก็บครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในสภาวะเร่ง..... 41

ภาพที่ 18 แสดงความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวปกติกับความชุ่มชื้นของผิวหลังใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์.....43

ภาพที่ 19 แสดงครีมเบสหลังผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที รอบที่ 5.....51

ภาพที่ 20 แสดงแสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที รอบที่ 5.....51

ภาพที่ 21 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 1 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 52

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 22 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....52
ภาพที่ 23 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 2 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....52
ภาพที่ 24 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 2 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....53
ภาพที่ 25 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 3 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....53
ภาพที่ 26 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....53
ภาพที่ 27 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....54
ภาพที่ 28 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 4 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....54
ภาพที่ 29 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....54
ภาพที่ 30 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....55
ภาพที่ 31 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....55
ภาพที่ 32 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 6 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....55
ภาพที่ 33 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 7 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส....56
ภาพที่ 34 แสดงความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....56

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 35 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 1 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....57
ภาพที่ 36 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....57
ภาพที่ 37 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 2 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....57
ภาพที่ 38 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 2 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....58
ภาพที่ 39 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 3 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียฃส.....58
ภาพที่ 40 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....58
ภาพที่ 41 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....59
ภาพที่ 42 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 4 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....59
ภาพที่ 43 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....59
ภาพที่ 44 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....60
ภาพที่ 45 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....60
ภาพที่ 46 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 6 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....60
ภาพที่ 47 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 7 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....61

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 48 แสดงความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles รอบที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....61
ภาพที่ 49 แสดงครีมเบสหลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์.....62
ภาพที่ 50 แสดงครีมเบสหลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์.....62
ภาพที่ 51 แสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์.....63
ภาพที่ 52 แสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์.....63

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันได้มีการนำเบียร์มาเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องสำอางหลายชนิดโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์บำรุงผมเช่น แชมพูสระผม ครีมนวดผม เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า เบียร์อุดมไปด้วยสารต่างๆ ที่มีประโยชน์ในการบำรุง ให้ความชุ่มชื้นแก่ผมได้เช่น วิตามิน B_1, B_2, B_5, B_6, B_9 และ B_{12} ซึ่งวิตามินเหล่านี้มักได้จากยีสต์ที่ใช้หมักเบียร์ [1] อีกทั้งในอดีตในประเทศอียิปต์พบว่ามีการใช้เบียร์เป็นเครื่องสำอางเพื่อบำรุงผิวในผู้หญิงชนชั้นสูงและเชื่อว่ายีสต์ในเบียร์สามารถลดปัญหาสิวโดยลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้[2] อีกทั้งยังช่วยปรับสมดุลกรด-ด่างให้เหมาะสมได้ทั้งนี้เชื่อยังให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้

ทั้งนี้เมื่อศึกษาดูส่วนประกอบเบียร์ [3] พบว่านอกจากยีสต์แล้ว เบียร์ยังมีส่วนประกอบของดอกฮอปและมอลต์ซึ่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ [4,5] โดยเฉพาะสารจำพวก Polyphenol หลายชนิด เช่น catechin, epicatechin และ quercetin[10] สารประกอบเหล่านี้เป็นสารที่มาจากการเมแทบอลิ ซึมในพืช จึงมักพบในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่สกัดจากพืชและจะมีผลต่อ คุณลักษณะเชิงประสาทสัมผัสคือ สี กลิ่น รส ของผลิตภัณฑ์ด้วย โดยสาร Polyphenol จะมีบทบาทสำคัญในการดักจับ อนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุ มูล H• แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น [6] ซึ่งมีการศึกษาวิจัยมากมายที่ยืนยันว่าเบียร์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้[7]

จากฤทธิ์ดังกล่าวจึงคาดว่าสามารถนำเบียร์มาเป็นสารสำคัญของเครื่องสำอางเพื่อออกฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระได้ และจากการศึกษาพบว่าในท้องตลาดเบียร์มักนิยมใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์บำรุงผมเท่านั้น ยังไม่ค่อยมีการนำมาใช้ในรูปแบบครีมบำรุงผิวในด้านการต้านอนุมูลอิสระนัก โดยเฉพาะประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนาครีมที่มีส่วนผสมจากเบียร์ จึงเป็นที่มาของแนวคิดที่จะนำเบียร์มาเป็นส่วนประกอบของครีมบำรุงผิวเพื่อต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของเครื่องสำอางในท้องตลาด

งานวิจัยนี้จึงได้เลือกเบียร์ที่ผลิตในประเทศไทยมาทำการศึกษาเพื่อทดสอบหาฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากหาได้ง่ายและเหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบ และนำมาทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH เพื่อเลือกชนิดและยี่ห้อของเบียร์และเมื่อได้เบียร์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระที่ดีแล้วจะนำมาศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ในสูตรตำรับโดยทำการเปรียบเทียบกับตำรับครีมที่มีสารในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาช่วงของปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้

เมื่อพัฒนาครีมเบสจนได้ตำรับที่มีความเหมาะสมแล้วจึงทดลองใส่เบียร์ที่ปริมาณต่างๆกันในช่วงที่เหมาะสมและนำไปทดสอบความคงตัว แล้วจึงพัฒนาจนได้ตำรับครีมแล้วจึงนำมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทำการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังที่อาจเกิดขึ้นได้ในกลุ่ม ตัวอย่างเนื่องจากแพ้สารประกอบในเบียร์ รวมทั้งทดสอบหาประสิทธิภาพในการให้ความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์

วัตถุประสงค์การวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไป เพื่อศึกษา

1. แหล่งที่มาและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเบียร์
2. การพัฒนาสูตรตำรับครีมบำรุงผิวที่มีคุณลักษณะที่ดี มีความคงตัว มีประสิทธิผลที่ดีและปราศจากการระคายเคืองต่อผิว

วัตถุประสงค์เฉพาะ เพื่อศึกษา

1. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์แหล่งต่างๆ
2. การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ได้แก่ สี กลิ่น การแยกชั้นของครีม และ pH ในสภาวะที่แตกต่างกัน
3. การทดสอบความระคายเคืองต่อผิวที่ปรากฏเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์
4. การทดสอบความคงตัวทางเคมีของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
5. การทดสอบประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ การให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวของผลิตภัณฑ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ฝึกกระบวนการคิดและทำวิจัยอย่างเป็นระบบ
2. มีความรู้ความเข้าใจในกระบวนการทดลองศึกษาวิจัยผลิตภัณฑ์
3. เรียนรู้วิธีการทดลองและการใช้เครื่องมือต่างๆเช่น การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณสาร Polyphenol การทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนัง การทดสอบความชุ่มชื้นของผิว เป็นต้น

4. เรียนรู้หลักการพัฒนาสูตรตำรับครีมพื้นให้มีลักษณะของครีมที่ดี มีความคงตัว น่าใช้
5. พัฒนาสูตรตำรับครีมที่มีความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์
6. ได้ผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวจากเบียร์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ให้กับท้องตลาดปัจจุบัน
7. เพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ครีมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

ประวัติและความเป็นมาของเบียร์[9]

เบียร์เป็นเครื่องดื่มที่มีความเก่าแก่มากชนิดหนึ่ง เชื่อว่ามีมาตั้งแต่ 9500 ปีก่อนคริสตศักราช ในยุคหินใหม่ โดยพบบันทึกในสมัยอียิปต์โบราณและเมโสโปเตเมีย โดยเชื่อว่าการพัฒนาเครื่องดื่มเหล่านี้ได้เกิดขึ้นหลังจากที่มีการปลูกธัญพืชต่างๆในการทำการเกษตรซึ่งนับเป็นการใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพแรกๆ ทางด้านชีวภาพในการหมัก

เบียร์ได้รับการนิยมอย่างแพร่หลายในยุโรปซึ่งเดิมมักเป็นการผลิตในครัวเรือนและในสมัยนั้นวัตถุดิบจะไม่มีดอกฮอปเป็นส่วนประกอบเหมือนปัจจุบัน แต่จะใช้พืชสมุนไพรหรือเครื่องเทศอื่นๆ ที่มีฤทธิ์สงบระงับต่างๆ

การใช้ดอกฮอปในการผลิตเบียร์มีการเขียนบันทึกไว้ในปี ค.ศ. 822 เพื่อใช้ในการแต่งกลิ่นรสของเบียร์ โดยก่อนที่จะใช้ดอกฮอปมีการใช้สมุนไพรหลายชนิดแต่ยังไม่มีสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการคงสภาพได้เช่นดอกฮอป หากหมักเบียร์โดยไม่ใช้ดอกฮอป มักมีการเน่าเสียและเก็บได้ไม่นานจึงใช้ในการส่งออกไม่ได้ นอกจากนี้การใช้ดอกฮอปยังช่วยให้สา มารถเพิ่มการใช้แอลกอฮอล์ได้ ในประเทศเยอรมนี ได้มีการผลิตเบียร์โดยใช้ดอกฮอปในระดับอุตสาหกรรมตั้งแต่ในช่วงศตวรรษที่ 13

ในปี 1516 วิลเลียมที่ 5 แห่งบาวาเรียน ได้กำหนดให้ใช้ Reinheitsgebot กฎหมายอาหารด้านการกำหนดความบริสุทธิ์กำหนดให้ส่วนผสมของเบียร์ต้องประกอบด้วย น้ำ ดอกฮอป และมอลต์ ต่อมาหลุยส์ ปาสเตอร์ แนะนำวิธีให้หมักเบียร์ โดยใช้ยีสต์เพื่อกันรสเปรี้ยวในเบียร์จากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการจึงมีการใช้ยีสต์ในการหมักเบียร์มาตั้งแต่ปี 1857

กล่าวได้ว่าวัตถุดิบในการหมักเบียร์[10] จะประกอบไปด้วย ข้าวมอลต์ ซึ่งได้มาจากข้าวบาร์เลย์ โดยข้าวบาร์เลย์ที่เก็บเกี่ยวแล้วนำไปแช่น้ำ ผึ่ง และนำไปอบให้แห้งอย่างช้าๆ ดอกฮอป เป็นวัตถุดิบส่วนสำคัญที่ทำให้ได้เบียร์รสขมและมีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์ ทั้งนี้ยังส่งผลช่วยให้โปรตีนตกตะกอนเร็วขึ้น ยีสต์ ซึ่งใช้น้ำตาลเป็นอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนน้ำเป็นส่วนสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของเบียร์ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่มีมากกว่า 90% ในเบียร์

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์

เมื่อนำเบียร์มาศึกษาวิเคราะห์โดยใช้ HPLC พบว่าในเบียร์มีสารประกอบที่หลากหลายชนิดมาก โดยเฉพาะสารจำพวก Polyphenols ซึ่งได้แก่ catechin, epicatechin และ quercetin[6] ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อกลิ่นรสของเบียร์และส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ในการควบคุมคุณภาพจึงต้องมีการวิเคราะห์ประเมินสารประกอบ Polyphenols ด้วยวิธีวิเคราะห์ต่างๆ[11]

สารประกอบ Polyphenols นี้มักมาจากดอกฮอปและมอลต์ในเบียร์ สาร Polyphenol ในฮอป[4] ได้แก่ anthocyanogen และ flavonoids ส่วนในมอลต์พบสารกลุ่ม Polyphenols ได้แก่ flavonoids[5] และ hydroxybenzoic เช่น gallic acid และ hydroxycinnamic acid ทั้งนี้พบ tannin ได้ทั้งในมอลต์และฮอป ซึ่งปริมาณและชนิดของสารประกอบ Polyphenols ที่พบได้ในเบียร์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นกับวัตถุดิบและกระบวนการหมัก โดยมีการศึกษาพบว่าปริมาณ Polyphenols อาจมีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างระหว่างการหมักซึ่งสามารถวัดปริมาณ Polyphenols ในเบียร์โดยใช้ปฏิกิริยาเคมี oxidation-reduction กับ สาร Folin-Ciocalteu และ catechin โดยวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจาก

1) ความสามารถในการยับยั้งการ oxidation ของ lipoprotein ที่มีความหนาแน่นต่ำ (LDL)

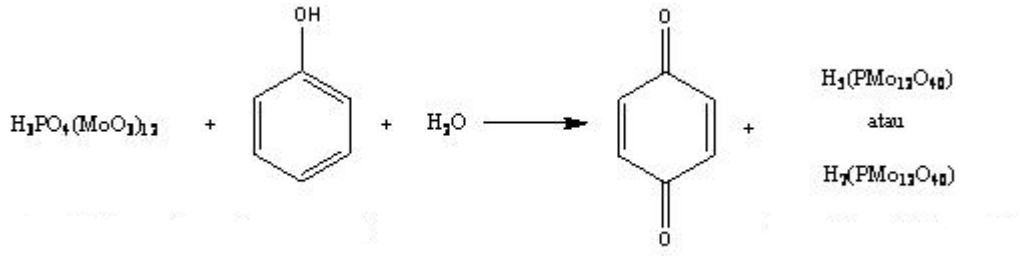
2) ความเข้มข้นของ phenol ในเบียร์เมื่อ peroxide 50% ถูกทำลายในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างชัดเจนจาก วิตามิน และ Polyphenols ต่างๆในเบียร์[12]

ต่อมามีการศึกษา[13] ที่ยืนยันความสามารถของสารประกอบ Polyphenols นี้ในเบียร์ในการป้องกัน LDL จากกระบวนการ oxidation โดยใช้ ethyl acetate และน้ำในการสกัด ออกจากสารประกอบอื่นๆ โดยใช้ Centrifugal partition chromatography (CPC) และทดสอบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) ผลการศึกษาพบว่า มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้มีการศึกษาโดย Joe Vinson[14] ทำการศึกษาวิเคราะห์เบียร์ พบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมากโดยคาดว่าในฮอปมี Polyphenols ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงอยู่ คือสาร Xanthohumol[15] ซึ่งเป็น Polyphenols ที่มีเฉพาะในฮอปและเบียร์ โดยพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผลไม้ตระกูลส้มกว่า 6 เท่า และมากกว่าถั่วเหลืองกว่า 4 เท่า และนอกจากนี้ยังสูงกว่าชาเขียว ไวน์แดง น้ำองุ่น และวิตามินอีด้วย โดยจากการศึกษา

โครงสร้างของ Xanthohumol พบว่าจะมี หมู่ prenyl group เกาะอยู่บนโครงสร้างด้วยซึ่งช่วยบดบังการเข้ามาทำปฏิกิริยากับโครงสร้างทำให้ สาร xanthohumol จะถูกทำลายได้ช้ากว่า Polyphenols ชนิดอื่นๆ

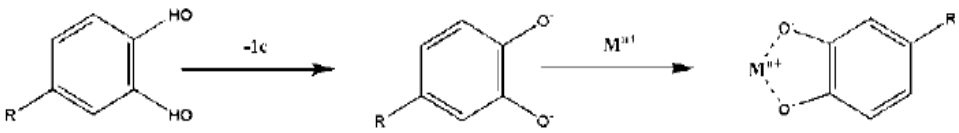
ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenol จะใช้ Folin-Ciocalteu[16,17] เป็นสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีส่วนประกอบของ phenol อยู่ และจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของ total polyphenols ตั้งทิ้งไว้ 40 - 60 นาที จะเกิดสีน้ำเงินเข้มซึ่งเกิดจากการส่งผ่านของอิเล็กตรอนในสารละลายที่มีค่าเป็นด่าง และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 760 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบ phenolic ทั้งหมดหาโดยเทียบกับปริมาณของ gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenol ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย Folin-Ciocalteu กับ phenolic hydroxyl groups

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)[7]

สารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ แต่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมักได้รับความสนใจและมีการศึกษามากกว่า เนื่องมากจากมีความเชื่อมั่นในความปลอดภัยสูงกว่า สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืชหลากหลายชนิด สารเหล่านี้ได้แก่ วิตามินต่างๆ เช่น วิตามิน C, วิตามิน E และสารประกอบกลุ่ม Polyphenols เช่น xanthone และ flavonoids ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ ชันนี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล H• แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนสโดยจับกับไอออนของเหล็กที่เป็นโคแฟกเตอร์ไว้ นอกจากนี้ flavonoids ยังสามารถจับกับโลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการจับโลหะของ Flavonoids

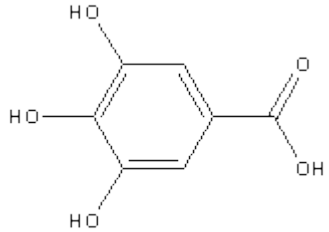
การตรวจสอบฤทธิ์ของสารในอนุมูลอิสระ[18]

วิธีการในการตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การทดสอบ Scavenging activity of ABTS radical, การทดสอบ Hydroxyl (OH) radical scavenging activity, การทดสอบ Lipid peroxidation in liver homogenates, การทดสอบ Metal chelating activity, การทดสอบ Superoxide radical scavenging และ การทดสอบโดยใช้ DPPH (2, 2–diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical ซึ่งเป็นวิธีนี้เป็นที่นิยมเนื่องจากทำได้ง่าย มักใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบสาร ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH· มีความคงตัวต่างจากอนุมูลอิสระในเซลล์ของร่างกายจึงไม่สามารถเปรียบเทียบอนุมูลที่มีความไวสูงได้

การทดสอบทำโดยใช้อนุมูล DPPH· ซึ่งมีสีม่วงการวิเคราะห์จะวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีการให้อะตอมไฮโดรเจนเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชัน การวัดทำโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดการลดลงของสีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยสารละลาย DPPH· ซึ่งมีสีม่วง เมื่อได้รับ H^+ จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีม่วงจางลงถึงเหลือง

Gallic Acid[19]

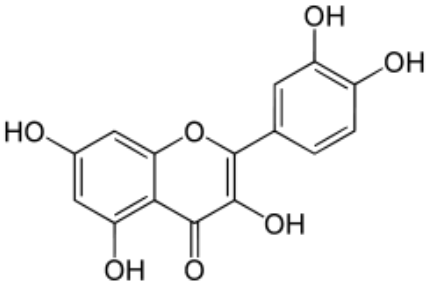
Gallic Acid หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ tannin พบมากใน องุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ ทั่วไปมักใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือสามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดี โดยจากการศึกษาโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte ของมนุษย์ พบว่า Gallic acid ช่วยยับยั้งกระบวนการ Lipid peroxidation และการตายของเซลล์จากการออกซิไดซ์ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Gallic acid

Quercetin[20]

Quercetin มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 4 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถป้องกันเซลล์โดยกลไกที่สามารถให้ อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ลิโพออกซีจีเนส ได้ทำให้ลดความสามารถในการทำลายเซลล์และ DNA ได้ ทั้งนี้ ยังสามารถดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุลได้ แต่หากใช้ในปริมาณที่สูงเกินไป คือมากกว่า 40 ไมโครโมลาร์ มักอาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เองได้ โดยกลายเป็น ROS เอง และทำให้เกิดการทำลายเซลล์ได้



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ Quercetin

ทั้งนี้ได้มีการศึกษาเพื่อใช้ Quercetin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตำรับ[21] โดยใช้ Quercetin ปริมาณ 0.05% ของตำรับ และในการเตรียมจะนำ Quercetin มาละลายใน Propylene glycol และจึงเติมไปในสูตรตำรับที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างสูตรตำรับที่มีส่วนผสมของ Quercetin เป็นส่วนประกอบในตำรับ

ส่วนประกอบในตำรับ	ปริมาณ
Self-emulsifying wax (Polawax)	2%
Anionic hydrophilic colloid (Carboxypolymethylene, Carbopol 940)	0.18%
Triethanolamine	0.2%

Macadamia oil	2.5%
Squalene	1%
Phenova	0.4%
Quercetin	0.05%
Propylene glycol	6%
Deionized water qs	100%

อิมัลชัน (Emulsion)[22,23,24]

หมายถึง dispersed system ที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด แบ่งเป็น 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายใน และวัฏภาคภายนอก จะไม่กระจายตัวเข้าหากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน น้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ น้ำมันกับตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตัวทำลายอินทรีย์ทั้ง 2 วัฏภาค โดยการที่จะนำของเหลวทั้งสองวัฏภาคกระจายตัวเข้าหากันจนเป็นเนื้อเดียวกันโดยอาศัยสารตัวที่สามซึ่งก็คือ สารก่ออิมัลชัน (Emulsifier or Emulsifying agent) โดยทั่วไป ขนาดของหยดของวัฏภาคภายในจะอยู่ในช่วง 0.1(0.5) – 10 ไมโครเมตร ซึ่งบางครั้งอาจพบอิมัลชันขนาดเล็กมากถึง 0.01 ไมโครเมตร หรือใหญ่มากถึง 100 ไมโครเมตร แต่จะทำให้ระบบไม่คงตัวมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษาเลือกใช้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำเนื่องจากมีความเหนียวเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายตัวดี ล้างออกได้ง่าย นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีม และโลชันทาผิว เป็นต้น

<u>องค์ประกอบพื้นฐานในสูตรตำรับอิมัลชัน</u>

สามารถแยกองค์ประกอบพื้นฐาน ในสูตรตำรับอิมัลชั นที่ซึ่งมักใช้กับผิวหนังเป็นส่วนใหญ่ตามหน้าที่ของสารในสูตรได้ดังนี้

1. Moisturizer หมายถึง สารที่ใช้ป้องกันหรือบรรเทาความแห้งของผิวหนัง ทำให้ผิวเนียน และอ่อนนุ่ม สามารถเพิ่มปริมาณน้ำแก่ผิวหนัง ทำให้ผิวชุ่มชื้น และช่วยเพิ่มความแข็งให้กับผลิตภัณฑ์ได้

2. Humectants เป็นสารที่ควบคุมความชื้นของครีมหรือโลชัน และความชื้นของผิวหนัง โดยลดการระเหยของน้ำ และจะดูดความชื้นในอากาศเข้ามาไว้ในเนื้อครีม จะทำให้ครีมไม่แห้ง ไม่ควรใช้ humectants ในความเข้มข้นสูงเพราะจะดูดความชื้นจากผิวหนังออกมา ทำให้เกิดผลตรงข้ามกับความประสงค์ สารที่นิยมใช้เป็น humectants ได้แก่ glycerol, propylene glycol, sorbitol ทั้งสามชนิดเป็น

polyhydric alcohol ต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุลและการระเหย โดย propylene glycol มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ การระเหยสูง, glycerol อยู่ในระดับปานกลาง และ sorbitol มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ความหนืดสูง และไม่ระเหย

3. Thickeners and Film formers โดยใช้ Polymer ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มปกคลุมผิวทำให้ชุ่มชื้น และเกิดความเย็น นอกจากนี้ทำให้ครีมมีเนื้อข้น มักเตรียมอยู่ในรูปสารละลาย หรือนำไปกระจายในน้ำก่อนนำไปผสมกับยาอื่นๆ เช่น gum, tragacanth, algin, cellulose derivative, veegum, carbopol, polyvinyl pyrollidone (P.V.P)

4. Emulsifiers (สารก่ออิมัลชัน) จะทำให้น้ำมันและน้ำเข้ากันได้ดีและทำให้มีความคงตัวที่ดี แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

4.1 สารก่ออิมัลชันชนิดประจุลบ ได้แก่ sodium, potassium, triethanolamine stearate

ข้อดีคือ ราคาถูก แต่มีข้อเสียคือ ไวต่อ pH และอิเล็กโทรไลต์ ไม่สามารถเข้ากันได้กับสารประจุบวกและกรด

4.2 สารก่ออิมัลชันชนิดประจุบวก เหมาะกับอิมัลชันที่มีฤทธิ์เป็นกรด ตัวที่ใช้มาก คือ cetyl pyridinium chloride ใช้ในน้ำยาปรับผ้านุ่มและครีมนวดผม ให้ผลดีที่ pH ต่ำกว่า 7 ใช้ในครีมสำหรับฆ่าเชื้อเท่านั้น

4.3 สารก่ออิมัลชันชนิดไม่มีประจุ อาจใช้ร่วมกับ anionics และ cationics ตัวอย่างของ nonionics ได้แก่ sorbitan monostearate, glyceryl monostearate

ข้อดีคือ ทนต่อ pH กว้าง ทนกรด ใช้ได้ทั้งยารับประทาน ยาฉีด และยาทาภายนอก

ในการศึกษานี้เลือกใช้สารก่ออิมัลชันชนิดไม่มีประจุ เนื่องจากสามารถทน pH ได้กว้าง ทนต่อกรด และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวดี

5. Preservatives อาจใช้ benzoic acid 0.1 % หรือ sodium benzoate 0.1 % combination ของ methyl paraben (0.15%) และ propyl paraben (0.3%)

6. Antioxidants

องค์ประกอบในผลิตภัณฑ์หรือ เครื่องสำอางบางชนิด อาจมีสารซึ่งไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สลายตัวและ /หรือ ประสิทธิภาพของสารนั้นลดลง เป็นผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีรูปลักษณ์เปลี่ยนไป เช่น สีเข้มขึ้ น กลิ่นเปลี่ยนไปจากเดิม หรือ เกิดการแยกชั้นได้ ถ้าสารนั้นเป็นสารสำคัญจะทำให้ประสิทธิภาพลดลงด้วย จำเป็นต้องใช้สารต้านออกซิเดชัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่อาจจะเกิดขึ้น

7. Perfume อาจได้จากธรรมชาติ หรือการสังเคราะห์

การทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน

การทดสอบความคงตัวของทางกายภาพของอิมัลชัน ทำเพื่อให้แน่ใจว่าอิมัลชันที่ทำขึ้นมีความคงตัวตลอดอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปไม่ควรต่ำกว่า 2 ปี แต่เนื่องจากการทดสอบความคงตัวใช้เวลานานอย่างน้อย 2 ปีขึ้นไป จึงมีการคิดค้นวิธีการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง (Accelerated storage test) ขึ้น เพื่อทำให้สามารถทราบถึงความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในเบื้องต้นได้ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อขั้นตอนการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรตำรับการทดสอบเพื่อคาดคะเนวันสิ้นอายุของผลิตภัณฑ์ หรือการทดสอบเพื่อขึ้นทะเบียนตำรับ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อจำหน่ายได้ เป็นต้น

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (มอก.152/2539)[25] กำหนดให้ทดสอบผลิตภัณฑ์ครีมและโลชัน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำออกมาตรวจลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเช่น กลิ่น สี ความข้นเหลว การแยกชั้น การจับตัวเป็นก้อน ให้คะแนน 1-5 ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ โดย 1 คือไม่ปรากฏร่องรอยการแยกชั้น และกำหนด ให้ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยให้เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเก็บที่อุณหภูมิ 45 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำเช่นนี้จนครบ 7 ครั้ง แล้วนำออกมาตรวจลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น กลิ่น สี ความข้นเหลว การแยกชั้น และการจับตัวเป็นก้อน

ตาม Asean Guideline on Stability study of drug product[26] กำหนดให้ทำการทดสอบทางกายภาพโดยทดสอบสภาวะการเก็บในสภาวะจริงอย่างน้อย 3 ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75±5% RH เป็นเวลา 1 เดือน ส่วนสภาวะเร่งเก็บอย่างน้อย 3 ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40±2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75±5% RH เป็นเวลา 6 เดือน ส่วนการทดสอบความคงตัวทางเคมีให้ทำการทดสอบสารสำคัญหลังจากการเก็บผลิตภัณฑ์ตามที่กล่าวข้างต้น สารสำคัญจะต้องลดลงไม่มากกว่า 5%

เทคนิคการประเมินการระคายเคืองและความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์

1. การประเมินการระคายเคืองของผลิตภัณฑ์

   วัตถุประสงค์ในการทดสอบผื่นแพ้เพื่อตรวจสอบว่าผิวหนังจะเกิดอาการแพ้มากหรือน้อยแค่ไหนเมื่อสัมผัสกับสารที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ การประเมินการระคายเคืองของผลิตภัณฑ์มีวิธีในการทดสอบได้หลายวิธี เช่น

1.1 การทดสอบแบบ In vitro skin model[27] เป็นการทำให้สารซึมผ่านเข้าสู่หนังกำพร้าชั้นนอกสุดและทำการประเมินการระคายเคืองที่เกิดขึ้น ในการทดสอบจะใช้ผิวหนังของมนุษย์โดยที่ผิวหนังที่นำมาใช้จะต้องมีชั้น epidermis หลายๆ ชั้นและมีหนังกำพร้าชั้นนอกสุดที่ทำหน้าที่เป็นสิ่งกั้นให้กับผิว ในการทดสอบนี้สามารถทดสอบได้ทั้งผลิตภัณฑ์ประเภทของแข็ง ของเหลว กึ่งแข็ง และไขมันแข็ง

1.2 Close patch test[28]

ในการทดสอบจะใช้แผ่นแปะปกคลุมผิวในส่วนที่ได้มีการทาผลิตภัณฑ์ไว้ และทำการตรวจสอบผิวหนังที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งในการใช้แผ่นปะปกคลุมผิวหนังทำให้ผลิตภัณฑ์สามารถ ซึมผ่านผิวหนังกำพร้าชั้นนอกสุ ดได้ดีมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 5 ถ้าผลิตภัณฑ์ก่อให้เกิดอาการแพ้ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายจะมีการตอบสนองต่อผิวบริเวณนั้นเกิดขึ้น ข้อดีของการทดสอบ คือ เป็นการวิเคราะห์ในเบื้องต้น สามารถทำได้ง่าย ใช้ผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิดภายในการทำ 1 ครั้ง ส่วนข้อเสียของการทดสอบผลิตภัณฑ์จะสัมผัสกับผิวหนังโดยตรงและสัมผัสอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นความรุนแรงของการแพ้จะเกิดได้มากกว่าความเป็นจริง

ภาพที่ 5 แสดงการทดสอบการแพ้ของผลิตภัณฑ์โดยวิธี Patch test

ในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี Close patch test ในการทดสอบเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และสะดวกในการทดสอบ

2. การวัดความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์[29,30,31]

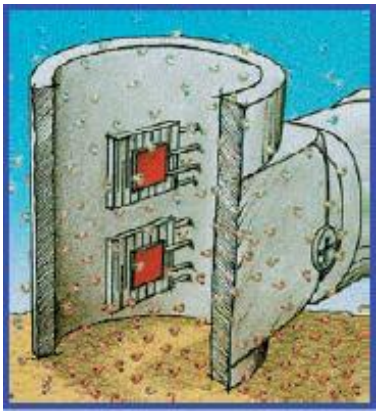
วัตถุประสงค์หลักของการใช้ผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้น คือ การฟื้นคืนสภาพการเป็นสิ่งกั้นที่ดีที่สุดของผิวหนัง โดยทำการวัดสภาวะที่ดีขึ้นของผิวภายหลังการใช้ผลิตภัณ ฑ์ให้ความชุ่มชื้นใน 4 ด้าน ต่อไปนี้

1.การวัดปริมาณน้ำของผิวหนังโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) การวัดปริมาณน้ำในชั้นหนังกำพร้าชั้นนอกสุดเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากผิวหนังที่มีความชุ่มชื้นสูงให้ทั้งลักษณะของสิ่งกั้นของผิวหนัง (Skin barrier) ที่ดีกว่าและมีพื้นผิวที่เรียบกว่า การวัดคุณสมบัติการนำไฟฟ้าที่พื้นผิวของผิวหนังทำได้โดยเครื่องมือ Corneometer® โดยอาศัยหลักการของความแตกต่างของค่าคงตัวไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ของสารต่างประเภทกัน ในที่นี้คือ น้ำและผิวหนัง

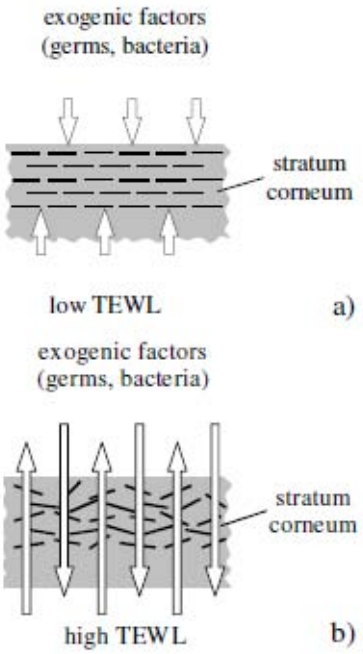
2.ไฮเดรชันของหนังกำพร้าชั้นนอกสุดโดยการ วัดความยืดหยุ่นของผิวหนัง (Surface extensibility) เมื่อหนังกำพร้าชั้นนอกสุดแห้งทำให้ขาดความยืดหยุ่น (Extensibility) และในทางกลับกันผิวหนังที่ชุ่มชื้นจะมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น สามารถใช้ Gas bearing electrodynamometer (GBE) ในการวัดการเพิ่มขึ้นของความยืดหยุ่นของผิวหนังภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้นเพื่อวัดประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

3.ปริมาณและลักษณะการหลุดลอกของหนังกำพร้าชั้นนอกสุดเป็นการลอกชั้นหนังกำพร้าชั้นนอกสุดโดยใช้เทปกาวซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาลักษณะผิวหนัง D-squame® เป็นอุปกรณ์ประเภทหนึ่งที่อาศัยหลักการการลอกผิวหนังกำพร้าชั้นนอกสุดโดยใช้เทปกาวซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาทั้งโครงสร้างและชีวเคมีของหนังกำพร้าชั้นนอกสุดสามารถนำมาประมวลผลได้ทั้งปริมาณและลักษณะของชั้นหนังกำพร้าชั้นนอกสุดจากการลอกออกของแผ่นแปะ

4.การสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า (Transepidermal water loss หรือ TEWL) เป็นการประเมินปริมาณน้ำที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเหนือผิวหนังสองตำแหน่ง ณ เวลาเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 6 โดยการวัด TEWL เป็นการบอกสิ่งกั้น (Barrier function) ของผิวในชั้น Stratum corneum ถ้าผิวหนังมีการกั้นที่ดีแสดงว่าสามารถกักเก็บน้ำไว้ในผิวได้มากก็จะมีค่า TEWL ที่ต่ำ แต่ถ้าการกั้นไม่ดีก็จะกักเก็บน้ำไว้ในผิวหนังได้น้อยจะมีค่า TEWL สูง ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 แสดงการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า (Transepidermal water loss หรือ TEWL)



ภาพที่ 7 แสดงสิ่งกั้น (Barrier function) ของผิวหนังที่ส่งผลต่อค่า TEWL

การวัดการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้าสามารถทำได้ใน 2 ลักษณะ คือ

1.1 ทำการวัดในสภาวะปกติ (Static measurement)

1.2 ทำการวัดภายหลังการกระตุ้นสิ่งกั้นของผิวหนัง (Challenging the barrier) คือการลอกหนังกำพร้าชั้นนอกสุดโดยใช้เทปกาวก่อนทำการวัดการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า

เครื่องมือที่ใช้ในการวัด Transepidermal water loss หรือ TEWL คือ Tewameter® ดังแสดงในภาพที่ 8 ซึ่งเครื่องจะวัดอัตราการระเหยของน้ำจากผิวหนังโดยจะขึ้นอยู่กับการแพร่กระจายของน้ำใน

open chamber ดังแสดงในรูปที่ 2 ตัววัด (Probe) ของเครื่อง Tewameter® ภายในจะมีตัวจับอยู่ 2 จุดใช้ในการวัดการระเหยของน้ำ โดยในการใช้วิธีนี้จะต้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของบริเวณที่วัดให้เหมาะสม

ภาพที่ 8 แสดง Tewameter® เครื่องมือที่ใช้ในการวัด Transepidermal water loss หรือ TEWL

ข้อดีของการวัดการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า คือ สามารถวัดได้อย่างรวดเร็ว สามารถปรับเวลาที่ใช้ในการวัดได้ หัววัดมีน้ำหนักสามารถถือได้ง่าย และหัววัดมีลักษณะแบบ cylindrical ทำให้สามารถป้องกันสิ่งรบกวนจากภายนอกได้

ข้อเสียของการวัดการสูญเสียน้ำผ่านทางชั้นหนังกำพร้า คือ ในการวัดจะต้องไม่กดหัววัดมากเกินไป ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ผิวหนังที่วัดจะต้องแห้งไม่เปียกชื้นเนื่องจากจะทำให้การวัดค่าผิดพลาดได้

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เบียร์ช้างสูตรMalt 100 %, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์ จากร้านสะดวกซื้อ , DMSO (Dimethylsulfoxide) (Batch No. 12 02 0080) ซึ่งมาจาก RCI LABSCAN LIMITED, Absolute Ethanol (Lot NO.4w240 12) ซึ่งมาจากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต, Quercetin dehydrate, Gallic acid (Batch# 046K0131) และ Folin-Ciocalteau reagent (Batch# 049K0069) ซึ่งมาจาก SIGMA-ALDRICH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (LOT. STBB0510A0) ซึ่งมาจาก ALDRICH chemistry, Acetronitrole (Batch No.11 09 0336) ซึ่งมาจาก RCI LABSCAN LIMITED, Trifluoro acetic acid (LOT. SZB93500) ซึ่งมาจาก Fluka® analytical, Methanol (Batch No. 12 05 0023) ซึ่งมาจาก RCI LABSCAN LIMITED, Sodium carbonate, Ascorbic acid, Beeswax, Cetyl alcohol, Glycerylmonostearate, Brij72 (Steareth-2), Brij721 (Steareth-21), Caprylic/Capric, triglyceride, Dimethicone, Carbopol940, Triethanolamine, Glycerin, Propylene Glycol, Propylparaben และ Methylparaben ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ

ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (WTB binder, Axyos technologies และ 75310 HOTPACK Corp.), Refrigerated Incubator (Model FOC225I, SN 4031459, VELP® SCIENTIFICA), Analytical Balances (MT-034 METTLER TOLEDO, SWITZERLAND), Analytical Balances (MY-035 METTLER TOLEDO, SWITZERLAND), Microplate reader (Wallac 1420, PerkinElmer), Micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร (GILSON, FRANCE), ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (9070912, BIOHIT PROLINE), UV-Vis Spectrophotometer (204-04550-01 UV-160A, SHIMADZU), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (UFLC SHIMADZU), Tewameter® TM 300 (Courage cologne + Khazaka germany), Centrifuge (ALC® CENTRIFUGETTE 4206, บริษัท ไบโอเมด กรุ๊ป จำกัด), เครื่องผสมสารละลาย (VORTEX-GENIE 2™, บริษัท พีอินเตอร์เทรด อิควิปเม้นท์ จำกัด), pH Meter (ORION ID.NO.

OR-025/49, บริษัทซายน์เทค จำกัด), เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (BUCHI ROTAVAPOR R-220), อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์)

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเบียร์

การศึกษาโดยใช้ UV-Vis Spectrophotometer และ pH meter

เพื่อศึกษาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของเบียร์ช้างสูตร Malt 100 %, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์ ด้วยเครื่อง UV-Vis Reading Spectrophotometer และประเมินค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) ด้วยเครื่อง pH meter

2.การคัดเลือกยี่ห้อและชนิดของเบียร์ที่เหมาะสม

2.1 การประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

เพื่อคัดเลือกชนิดของเบียร์ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และเลือกสัดส่วนที่เหมาะสมในการทดสอบโดยทำตามขั้นตอนดังนี้

เตรียมสารละลายเบียร์ 7 ตัวอย่าง ตามแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมสารละลายเบียร์ 7 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง	เบียร์ช้างสูตรคลาสสิก	เบียร์ช้างสูตร Malt 100%	เบียร์ช้างสูตรคลาสสิก
ไม่มีการเตรียมตัวอย่างเพิ่มเติม	●	●	●
ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง	●	●	-
ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นาน 2 ชั่วโมง	●	●	-

● แสดงชนิดของเบียร์ที่ต้องเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ได้จากตารางที่ 1 แต่ละตัวอย่างถูกนำมาเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน ตัวอย่าง : DMSO เท่ากับ 1:10, 1:15 และ 1:100

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ใน DMSO

เตรียมสารละลาย DPPH ในเอทานอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์

ปิเปตสารละลายเบียร์ที่เจือจางแล้ว, สารละลายมาตรฐาน Quercetin, DMSO, น้ำ หรือ สารละลาย DPPH จำนวน 5 ไมโครลิตรลงใน 96-well-plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ในเอทานอล บริสุทธิ์ 195 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยป้องกันแสงด้วยฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาทีวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร โดยใช้ Microplate reader ซึ่งสารละลายมาตรฐาน Quercetin เป็น Positive control, DMSO และ Purified water เป็น Vehicle control และสารละลาย DPPH เป็น Negative control ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ยกเว้นสารละลายที่มีสี ให้ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยในหลุมที่ 4 ให้ใช้เอทานอลบริสุทธิ์ 195 ไมโครลิตรแทนสารละลาย DPPH

วิเคราะห์หาฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชัน โดยนำค่าที่ได้ มาคำนวณหาค่า Q (% Scavenging) จาก สูตรดังนี้

$$Q = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$; A_c = Absorbance ของ ตัวทำละลายควบคุม

A_s = Absorbance ของ สารละลายตัวอย่าง

2.2 <u>การตรวจสอบยืนยันคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์สิงห์ ด้วยวิธี DPPH</u>

เตรียมสารละลายตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการเตรียมสารละลายเบียร์สิงห์ 9 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง	การเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน ตัวอย่าง: DMSO		
	ไม่เจือจาง	1:10	1:15
ไม่มีการเตรียมตัวอย่างเพิ่มเติม	●	●	●
ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นาน 1 ชั่วโมง	●	●	●
ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นาน 2 ชั่วโมง	●	●	●

● แสดงชนิดของเบียร์ที่ต้องเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ใน DMSO ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 และ 0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายอื่นๆตามระบุในข้อ 2.1

ปิเปตสารละลายเบียร์ที่เจือจางแล้ว, สารละลายมาตรฐาน Quercetin 40 ไมโครโมลาร์, สารละลายมาตรฐาน Quercetin 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 และ 0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, DMSO, น้ำ หรือ สารละลาย DPPH ลง 96-well-plate อย่างละ 5 ไมโครลิตร และทำต่อเช่นเดียวกับในข้อ 2.1

นำค่า Q (% Scavenging) ของสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆมาสร้าง กราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบค่า Q ของ 80 ไมโครโมลาร์ DPPH ใน เอทานอลบริสุทธิ์ 195 ไมโครลิตร กับสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด เพื่อยืนยันยี่ห้อและชนิดของเบียร์ที่จะเลือกใช้

3.การตรวจสอบสารสำคัญในเบียร์สิงห์

3.1<u>การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ให้ได้ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอลนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แบบกลับเฟสด้วยคอลัมน์ชนิด C_{18} ยี่ห้อ Agilent และเครื่องตรวจวัดชนิด Spectrophotometer ที่ 371 นาโนเมตร โดยกำหนดให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารละลายมาตรฐาน Quercetin 20 ไมโครลิตร Retention times นานประมาณ 8 นาทีและใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย Acetonitrile : 0.06% Trifluoro acetic acid ในน้ำอัตราส่วน 35:65 %v/v

วิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ในเบียร์ โดยนำสารละลายเบียร์มากรองด้วยกระบอกฉีดยา ที่ประกอบกับแผ่นกรองหมายเลข N14745 หนา 0.45 ไมโครเมตร Lot No. N06011106100 ก่อนนำไปวิเคราะห์ก่อนนำไปวิเคราะห์

3.2<u>การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Total Polyphenols โดย Folin-Ciocalteau method</u>

โดยคำนวณปริมาณ polyphenols ในสารสกัดในรูป gallic acid equivalent

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น Gallic acid โดยชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid (%purity = 99.6%) 50 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นเจือสารละลายมาตรฐานเข้มข้น Gallic acid ด้วยน้ำจนได้สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Quercetin โดยชั่ง Quercetin 10 มิลลิกรัม ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร ผสมจนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenols ทำโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Gallic acid หรือสารละลาย Quercetin หรือสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย เจือจางของ Folin-Ciocalteau reagent ในน้ำอัตราส่วน 1:10 จำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จึงเติม 4 มิลลิลิตร Sodium carbonate (7.5%) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่ไม่มีแสงจ้าเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ อัตราส่วน 1:5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 747 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของน้ำที่ความยาวคลื่นเดียวกัน โดยใช้น้ำเป็น Blank ถ้าส่วนผสมเจือจางทั้งหมดของสารละลายเบียร์ เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินเมื่อสังเกตด้วยตาที่เวลา 30 นาที และสามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 747 นาโนเมตรเมื่อเทียบกับน้ำที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ แสดงว่าเบียร์มี Polyphenols เป็นสารสำคัญ และสามารถนำ ไปเปรียบเทียบปริมาณ Total polyphenols กับสารมาตรฐาน Gallic acid ต่อไปได้

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 747 นาโนเมตร ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาสมการเชิงเส้นที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Gallic acid โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นและคำนวณค่า Coefficient of determination (R^2) การวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenols ในเบียร์สิงห์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ Total polyphenols ที่เทียบเท่ากับ Quercetin 0.05%w/w ที่มีการใช้ในสูตรตำรับครีมจากการศึกษาในปริทัศน์วรรณกรรม

4. การตั้งสูตรตำรับครีมเบส

4.1 <u>การเตรียมตำรับครีมเบส</u>

ใช้ Beaker method โดยชั่งสารต่างๆ ในตำรับตามแสดงในตารางที่ 4 ด้วยเครื่องชั่งที่ปรับสมดุลแล้ว จากนั้นกระจาย Carbomer ลงใน Purified water และค่อยๆเติม Triethanolamine จนได้เจลที่ข้นใส เติม Propylene glycol และ Glycerin เป็นวัฏภาคน้ำ หลอมสารในวัฏภาคน้ำมัน ได้แก่ Beeswax, Cetyl alcohol, Brij72 และ Brij721, Glyceryl monostearate SE, Caprylic/Capric triglyceride และ Dimethicone บนอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนมีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อุ่นวัฏภาคน้ำจนมีอุณหภูมิ 75

องศาเซลเซียส และเทวัฏภาคน้ำลงวัฏภาคน้ำมันอย่างช้าๆ และคนเร็วๆ อย่างต่อเนื่องจนอุณหภูมิค่อยๆ ลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติม Paraben concentrate และแต่งกลิ่นด้วย Rose oil คนให้เข้ากันจน Congeal

ทำการประเมินคุณสมบัติของครีมเบสที่เตรียมได้จนเนื้อครีมมีสีขาว มีความละเอียด มีความหนืดพอที่จะบรรจุในกระปุกได้ มีความรู้สึกสัมผัสที่ดี ได้แก่ มีความเหนอะหนะปานกลางเพียงพอที่จะให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้ มีการกระจายตัวที่ดีในขณะทา ไม่เกิดปื้นขาว มีการยึดติดผิวที่ ดีและสามารถนำครีมออกจากกระปุกมาใช้ได้ง่าย

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในสูตรตำรับ

Ingredients	**% ในตำรับ**			
	1	2	3	4
Beeswax	-	**1.00**	1.00	1.00
Cetyl alcohol	1.00	**2.00**	2.00	2.00
Glycerin	3.00	3.00	3.00	3.00
Propylene glycol	3.50	3.50	3.50	3.50
Carbomer 940	0.50	0.50	**0.35**	0.35
Glyceryl monostearate SE	3.00	3.00	3.00	3.00
Caprylic/Capric triglyceride	5.00	5.00	5.00	5.00
Dimethicone	1.00	1.00	1.00	**0.70**
Brij 72	0.83	0.83	0.83	0.83
Brij 721	0.83	0.83	0.83	0.83
Triethanolamine	0.20	0.20	**0.14**	0.14
Rose oil	0.01	0.01	0.01	0.01
Paraben concentrate	0.10	**0.30**	0.30	0.30
Purified water q.s. to	100.00	100.00	100.00	100.00

4.2 <u>การประเมินความคงตัวของครีมเบส</u>

4.2.1เก็บครีมเบสไว้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ที่เปลี่ยนแปลงและการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์

4.2.2 การทดสอบความคงตัวตาม มอก.152/2539

ทดสอบโดยใส่ครีมเบสในหลอดทดลองแล้วทดสอบโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง

อัตราหมุน 6000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ทั้งหมด 5 รอบเพื่อพิจารณาการแยกชั้นของครีม ซึ่งเกณฑ์การให้คะแนนลักษณะของผลิตภัณฑ์ต้องได้คะแนนเท่ากับ 1 ตามตารางที่ 5 จึงจะถือว่าผลิตภัณฑ์ผ่านเกณฑ์ตามกำหนด

ตารางที่ 5 แสดงคะแนนสำหรับการประเมินลักษณะการแยกชั้น

ลักษณะ	คะแนน
ไม่ปรากฏร่องรอยการแยกชั้น	1
เริ่มไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	2
เริ่มแยกชั้น	3
แยกชั้นพอสังเกตได้	4
แยกชั้นชัดเจน	5

การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งด้วยกระบวนการ Heat-cool cycles

เก็บครีมในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาตั้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาตั้งไว้จนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเท่าอุณหภูมิห้อง จึงนับเป็น 1 รอบ ทำทั้งหมด 7 รอบ ใช้เวลานาน 14 วัน ทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) โดยใช้เครื่อง pH meter พิจารณาการแยกชั้นของครีมและประเมินความรู้สึกสัมผัสของเนื้อครีม ได้แก่ สี กลิ่น และความรู้สึกเมื่อทาผิว ได้แก่ ความหนืด ความเหนอะหนะ การกระจายตัว และการเกิดปื้นขาว การยึดติดผิว

4.2.3 การทดสอบความคงตัวตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product

ทดสอบความคงตัวของครีมเบส เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ 30±2 องศาเซลเซียส /75%RH ±5%RH และในสภาวะเร่งที่ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH เป็นเวลา 1 เดือน โดยทดสอบความคงตัวของตำรับที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์เพื่อทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) โดยใช้เครื่อง pH meter และลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ที่เปลี่ยนแปลง

5.การตั้งสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

5.1 การเตรียมตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

เตรียมครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์จากสูตรตำรับที่ 4 ที่ได้ทำการพัฒนาจนมีคุณสมบัติตามต้องการแล้ว โดยใช้ Beaker method ตามรายละเอียดและขั้นตอนที่ระบุไว้ในข้อ 4.1 โดยชั่งสารต่างๆในตำรับตามแสดงในตารางที่ 6 โดยเติมเบียร์ตามปริมาณที่คำนวณได้จากข้อ 3.2 คือ 2%w/w ในลำดับสุดท้าย คนจนครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์เข้ากันดี และ Congeal โดยปริมาณของเบียร์ที่ใส่ในตำรับ ให้หักลบออกจากปริมาณ Purified water ที่ใช้เพื่อปรับปริมาณจนครบ 100 กรัม

ตารางที่ 6 แสดงชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

Ingredients	**%ในตำรับ**
Beer	2.00
Beeswax	1.00
Cetyl alcohol	2.00
Glycerin	3.00
Propylene glycol	3.50
Carbomer 940	0.35
Glyceryl monostearate SE	3.00
Caprylic/Capric triglyceride	5.00
Dimethicone	0.70
Brij 72	0.83
Brij 721	0.83
Triethanolamine	0.14
Rose oil	0.01
Paraben concentrate	0.30
Purified water q.s. to	100.00

5.2 <u>การประเมินความคงตัวของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์</u>

5.2.1 เก็บครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ไว้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1

5.2.2 การทดสอบความคงตัวตาม มอก.152/2539

การทดสอบโดยใส่ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในหลอดทดลองแล้วทดสอบโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง โดยใช้ค่ากำหนดเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งด้วยกระบวนการ Heat-cool cycles โดยใช้วิธีการเก็บและเกณฑ์การประเมินเช่นเดียวกับในข้อ 4.2.2

5.2.3 การทดสอบความคงตัวตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับในข้อ 4.2.3 โดยทำการทดสอบเพิ่มเติมด้านความคงตัวทางเคมีของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ ด้วยการทดสอบปริมาณของ Total polyphenols ของผลิตภัณฑ์โดยใช้ Folin-Ciocalteau method ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ 10 มิลลิกรัม นำไปละลายด้วยสารละลาย Methanol : Chloroform อัตราส่วน 1:3 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex) จนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenols ในสารละลายตัวอย่าง ด้วยสารละลายและขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 จากนั้นแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างลงในสมการถดถอยเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานในข้อที่ 3.2 และคำนวณเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในสารละลายตัวอย่าง

เปรียบเทียบปริมาณของ Total phenol content ของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเบียร์หลังเตรียมเสร็จทันทีและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่ผ่านการเก็บในสภาวะเร่งนาน 1 เดือน โดยแสดงค่าเป็นกราฟ

6.การทดสอบความระคายเคืองและประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว

เพื่อหาโอกาสในการเกิดความระคายเคืองและความสามารถในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวของผลิตภัณฑ์ครีมเบส และครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

6.1 การทดสอบความระคายเคืองของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

โดยใช้รูปแบบในการวิจัยคือ single-blind, parallel design, pilot study ซึ่งจะเลือกอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 20 คน จากนิสิตคณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี

Inclusion criteria : อาสาสมัครสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-25 ปี, ไม่มีประวัติการแพ้ยาหรือเครื่องสำอาง, ไม่มีประวัติแพ้แอลกอฮอล์, ไม่มีประวัติแพ้ยีสต์ และไม่มีประวัติแพ้ Parabens ในสูตรตำรับครีม, ไม่มีโรคผิวหนังและแผลบริเวณท้องแขน โดยผู้วิจัยเป็นผู้สอบถามประวัติข องผู้ป่วยและประเมินเบื้องต้นว่าไม่มีรอยโรคที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน

Exclusion criteria : มีการใช้ยาที่มีจะรบกวนต่อการตอบสนองทางผิวหนัง เช่น Steroids ในช่วงเวลา 7 วันก่อนทำการทดสอบ, ใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวมาก่อนอย่างน้อย 1 วันที่จะทำการทดสอบ

ทดสอบการระคายเคืองของครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.1.1ชี้แจงและให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการปฏิบัติตัวระหว่างเข้าร่วมการทดลอง คัดเลือกอาสาสมัครตามเกณฑ์ในการคัดเลือกในข้อ 6.1 เมื่ออาสาสมัครเข้าใจและยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะขอให้อาสาสมัครลงลายมือชื่อในหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย โดยอาสาสมัครมีสิทธิ์ขอถอนตัวออกจากการศึกษาได้ทุกเมื่อ

6.1.2ผู้วิจัยจะทำความสะอาดผิวบริเวณใต้ท้องแขนด้วย *Cetaphil*® จากนั้นใช้ครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์ที่พัฒนาขึ้น ขนาด 0.2 g ทาที่บริเวณใต้ท้องแขนขวาขนาดกว้าง 1 ตารางเซนติเมตร และใช้ครีมบำรุงผิวที่ไม่มีส่วนผสมของเบียร์ที่พัฒนาขึ้น ขนาด 0.2 g ทาที่บริเวณใต้ท้องแขนซ้าย ขนาดกว้าง 1 ตารางเซนติเมตร แล้วปิดผิวบริเวณที่ทาผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ข้าง ด้วยแผ่นแปะกันน้ำทิ้งไว้เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยลอกแผ่นแปะออก [9] เพื่อเปรียบเทียบลักษณะผิวที่ปรากฏและประเมินความแดงและความบวมของผิวตาม International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) Scale โดยแพทย์ผู้ดูแลโครงการ ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติตัวโดยสังเขปของอาสาสมัครคือให้อาสาสมัครสามารถชำระล้างร่างกายได้ตามปกติ แต่ให้หลีกเลี่ยงการใช้สบู่ ครีมบำรุงผิว หรือผลิตภัณฑ์อื่นบนผิวบริเวณใต้ท้องแขน

International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) Scale

การประเมินการตอบสนอง	ลักษณะผิว
0	ไม่มีปฏิกิริยาใดๆเกิดขึ้น
+	ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเล็กน้อย (มีการแดงบริเวณที่ทาผลิตภัณฑ์เล็กน้อย)
++	ปฏิกิริยาเกิดขึ้นปานกลาง (มีการแดงทั่วบริเวณที่ทาผลิตภัณฑ์)
+++	ปฏิกิริยาเกิดขึ้นรุนแรง (มีการบวมและแดงทั่วบริเวณที่ทาผลิตภัณฑ์)

6.1.3วิเคราะห์ผลการทดสอบการระคายเคืองจะใช้ Non parametric Test

6.2 <u>การทดสอบประสิทธิผลของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว</u> โดยจะใช้รูปแบบการวิจัยคือ single-blind, parallel design, pilot study ซึ่งจะเลือกอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 20 คน จากนิสิตคณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี

<u>Inclusion criteria</u> : อาสาสมัครสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-25 ปี, ไม่มีประวัติการแพ้ยาหรือเครื่องสำอาง, ไม่มีประวัติแพ้แอลกอฮอล์, ไม่มีประวัติแพ้ยีสต์ และไม่มีประวั ติแพ้ Parabens ในสูตรตำรับครีม, ไม่มีโรคผิวหนัง และแผลบริเวณท้องแขน โดยผู้วิจัยเป็นผู้สอบถามประวัติของผู้ป่วยและประเมินเบื้องต้นว่าไม่มีรอยโรคที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน

<u>Exclusion criteria</u> : มีการใช้ยาที่มีจะรบกวนต่อการตอบสนองทางผิวหนัง เช่น Steroids ในช่วงเวลา 7 วันก่อนทำการทดสอบ, ใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวมาก่อนอย่างน้อย 1 วันที่จะทำการทดสอบ ทดสอบประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นของครีมบำรุงผิวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเบียร์ต่อผิว โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

6.2.1ชี้แจงและให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการปฏิบัติตัวระหว่างเข้าร่วมการทดลอง เมื่ออาสาสมัครเข้าใจและยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะขอให้อาสาสมัครลงลายมือชื่อในหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย โดยอาสาสมัครมีสิทธิ์ขอถอนตัวออกจากการศึกษาได้ทุกเมื่อ

6.2.2ผู้วิจัยจะทำความสะอาดผิวบริเวณใต้ท้องแขนด้วย *Cetaphil*® ให้อาสาสมัครอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง จากนั้นจึงรับการทดสอบแบบไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ครีม การทดสอบแบบใช้ผลิตภัณฑ์ครีมเบสและการทดสอบแบบใช้ผลิตภัณฑ์ครีมที่ผสมเบียร์ ทดสอบโดยวิธี Transepidermal water loss (TEWL) โดยใช้เครื่อง Transepidermal water loss (TEWAMETER, TM 300) ภายในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์อากาศ 50%R.H.±5% ทาผลิตภัณฑ์ครีมเบสและผลิตภัณฑ์ครีมผสมเบียร์ ในแต่ละกลุ่มอาสาสมัครลงบนผิวหนังแขนด้านในปริมาณ 0.2 กรัม ขนาดกว้าง 1 ตารางเซนติเมตร ทำการวัดค่า การระเหยของน้ำออกจากผิวหนัง (TEWL) ที่เวลาเริ่มต้น 1, 2 และ 3 ชั่วโมง โดยที่อาสาสมัครจะต้องอยู่ในห้องที่ควบคุมสภาวะตลอดเวลาที่ทำการศึกษา และบันทึกผลการทดลอง

6.2.3วิเคราะห์ผลโดยใช้ T-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวปกติกับผิวหลังใช้ผลิตภัณฑ์ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ และความแตกต่าง ระหว่างความชุ่มชื้นของผิวหลังใช้ผลิตภัณฑ์ครีมเบสกับผลิตภัณฑ์ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

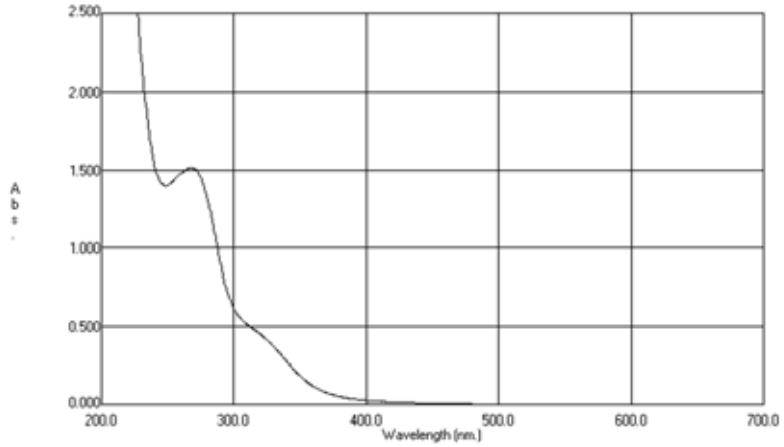
บทที่4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

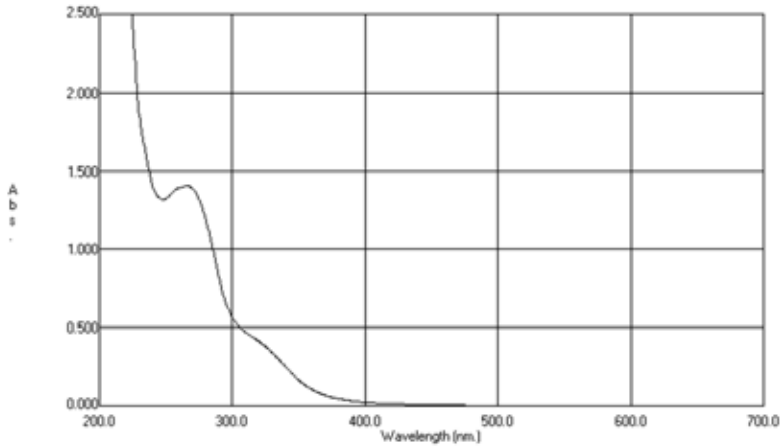
1.การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเบียร์

<u>การศึกษาโดยใช้ UV-Vis Spectrophotometer และ pH meter</u>

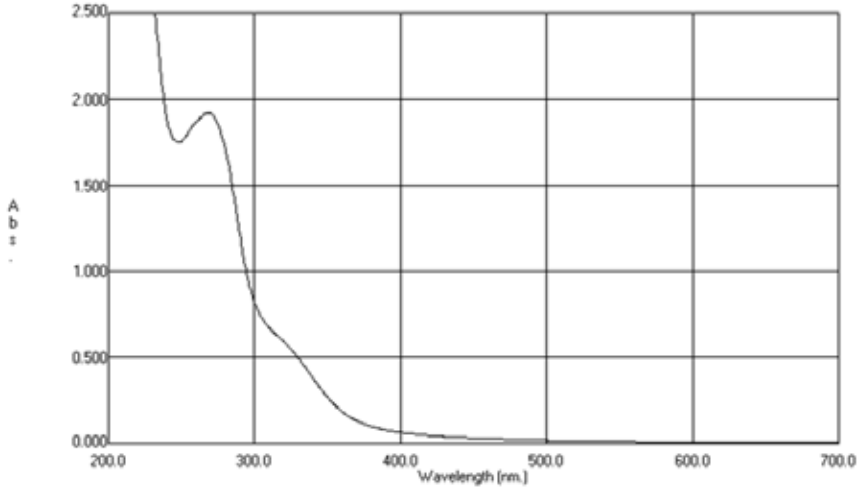
การตรวจหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ เบียร์ช้างสูตร Malt 100%, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์ ด้วยเครื่อง UV-Vis Reading Spectrophotometer พบว่าเบียร์ช้างสูตร Malt 100%, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 270 นาโนเมตร ภาพที่ 9, 10 และ 11 ดังนั้นจึงไม่รบกวนการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และการทดสอบหาปริมาณ Total Polyphenols ด้วย Folin-Ciocalteau method ที่ ความยาวคลื่น 747 นาโนเมตร



ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์ช้างสูตร Malt 100%



ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์ช้างสูตร Classic



ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสดงของเบียร์สิงห์

การประเมินค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) ด้วยเครื่อง pH meter พบว่าเบียร์ช้างสูตร Malt 100%, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์มีค่า pH เท่ากับ 4.52, 4.56 และ 4.61 ตามลำดับ

2. การคัดเลือกยี่ห้อและชนิดของเบียร์ที่เหมาะสม

2.1 <u>การประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH</u>

เพื่อคัดเลือกชนิดของเบียร์ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด วิธี DPPH เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้สารทำปฏิกิริยา คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร สามารถละลายได้เอทานอล สารละลายที่ได้จะมีสีม่วง และดูดกลืนแสงได้ในช่วงประมาณ 510 นาโนเมตร เมื่อสารละลาย DPPH ทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม Polyphenols ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน จะทำให้สีม่วงของสารละลายเจือจางลง ดังนั้นสีม่วงของสารละลายยิ่งจางลงมากจนถึงเหลือง แสดงว่าสารในกลุ่ม Polyphenols นั้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมาก

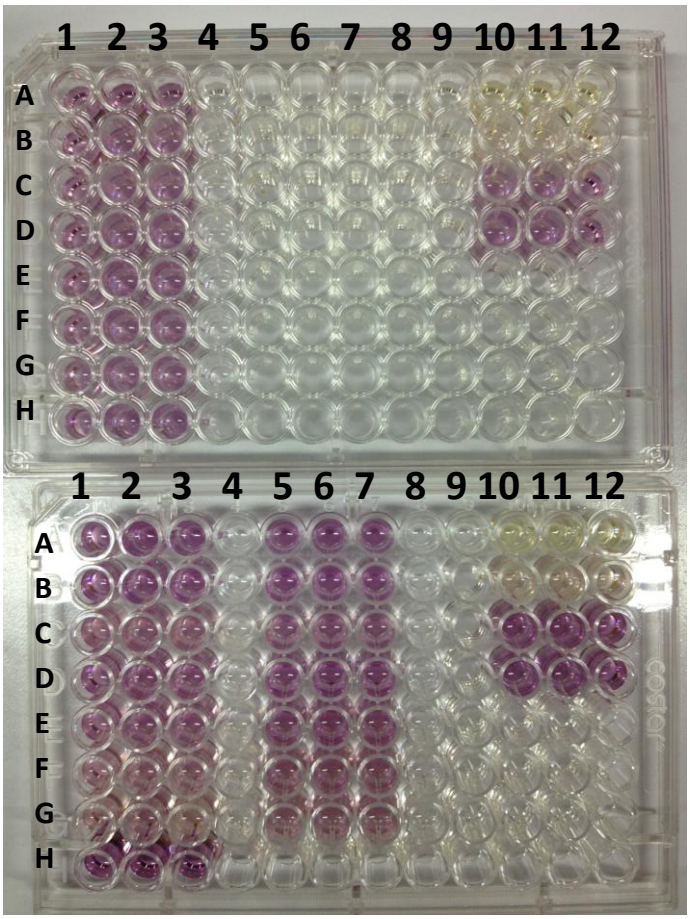
สังเกตลักษณะของสีที่เปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีม่วงเข้มของ DPPH เป็นสารละลาย สีม่วงอ่อน พบว่าสารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:10 (ภาพที่ 12 ข, 1A-3G) และสารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15 (ภาพที่ 12 ข, 5A-7G) เท่านั้นที่เกิดสีม่วงที่จางลง ส่วนสารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:100 (ภาพที่ 12 ก, 1A-3G) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในตัวอย่าง เนื่องจากมีความเจือจางมากเกินไป ทั้งนี้เอทานอลในสารละลาย DPPH เป็นสารที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ ในขณะที่น้ำเป็นส่วนประกอบหลักของเบียร์ ดังนั้นหากสารละลายเบียร์ที่มีความเข้มข้นสูงผสมกับเอทานอล จะทำให้ความเป็นขั้วของสารละลายลดลง สารประกอบต่างๆ ที่ละลายอยู่ในเบียร์จะเกิดการตกตะกอนกลับออกมาได้ สังเกตได้จากตะกอนในหลุมของสารละลาย

ตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:10 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเจือจางสารละลายเบียร์ให้มี ความเหมาะสมที่จะไม่เกิดการตกตะกอนและยังคงแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยเลือกใช้สารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15

ทำการคำนวณเปรียบเทียบค่า %Scavenging ระหว่างสารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15 ที่ระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นาน 2 ชั่วโมง ได้แก่ เบียร์ช้างสูตรคลาสสิก (ภาพที่ 12 ข, 5E-7E), เบียร์ช้างสูตร Malt (ภาพที่ 12 ข, 5F-7F), เบียร์สิงห์ (ภาพที่ 12 ข, 5G-7G) จะได้ค่าตามตารางที่ 7 ซึ่งพบว่าเบียร์สิงห์จะให้ % Scavenging ที่สูงที่สุด จึงเลือกใช้เบียร์สิงห์ในการทดสอบยืนยันฤทธิ์ต่อไป

ก

ข



ภาพที่ 12 แสดงสีของ DPPH ที่จางลงจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ สารละลายมาตรฐาน Quercetin (10A-12A), สารละลาย Ascorbic acid (10B-12B), สารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:10 (ภาพ ข, 1A-3C) และสารละลายตัวอย่างเจือจาง เบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15 (ภาพ ข, 5D-7G)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบ %Scavenging ของเบียร์ชนิดต่างๆ

สารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15

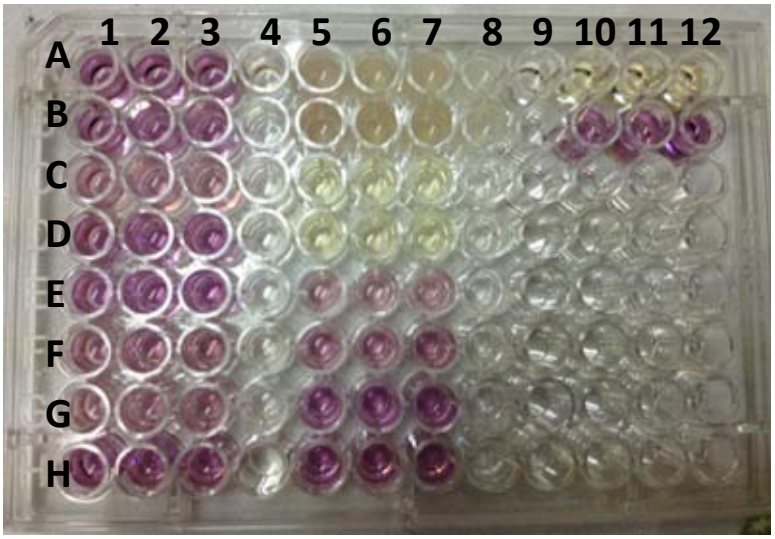
ชนิดของเบียร์	%Scavenging			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3		
เบียร์ช้างสูตรคลาสสิก (แถวE)	7.93	8.59	10.79	9.104	1.499
เบียร์ช้างสูตร Malt (แถวF)	23.35	20.93	24.45	22.907	1.803
เบียร์สิงห์ (แถวG)	30.84	28.19	29.96	29.662	1.346

2.2 การตรวจสอบยืนยันคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์สิงห์ ด้วยวิธี DPPH

จากค่าเฉลี่ยของ % Scavenging ในตารางที่ 8 พบว่า ที่สารละลายเจือจางเบียร์สิงห์ อัตราส่วน 1:15 ใน DMSO เบียร์สิงห์ที่กลั่นระเหยนาน 2 ชั่วโมง จะมีค่าเฉลี่ยของ %Scavenging มากกว่า เบี ยร์สิงห์ที่กลั่นระเหยนาน 1 ชั่วโมงและเบียร์สิงห์ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายเบียร์ที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการกลั่นระเหย

ส่วนสารละลายเบียร์ที่กลั่นระเหยนาน 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมงจะมีความเข้มข้นของสารประกอบต่างๆในเบียร์ที่สูงขึ้น เนื่องจา กน้ำและแอลกอฮอล์ที่ระเหยออกไป เมื่อผสมกับสารละลาย DPPH แล้วจึงเกิดตะกอนสีขาวขึ้น ดังกล่าวในข้อ 2.1 ทำให้ค่าที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร มีค่าสูงมากไม่สามารถนำมาสรุปผลการตรวจสอบได้

ส่วนสารละลายเบียร์สิงห์ กับสารละลายเบียร์สิงห์เจือจางที่อัตร าส่วน 1:15 ใน DMSO มีค่าเฉลี่ยของ % Scavenging ไม่เป็นสัดส่วน 15 เท่าตามที่เจือจาง คือมีค่าเฉลี่ย %Scavenging เท่ากับ 17.073 เมื่อเทียบกับเบียร์สิงห์ที่ไม่ผ่านการระเหย ที่ให้ค่าเฉลี่ย % Scavenging เท่ากับ 82.816 พบว่ามีค่าห่างกันเพียง 5 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่ องมาจากเทคนิคในการใช้ Micropipette ของผู้วิจัยเอง และเมื่อเปรียบเทียบเบียร์สิงห์ที่ไม่ผ่านการระเหย กับสารมาตรฐาน Quercetin ซึ่งให้ค่าเฉลี่ย %Scavenging เท่ากับ 91.020 พบว่าค่าเฉลี่ย % Scavenging ของสารละลายเบียร์สิงห์ยังคงมีค่าที่สูงและสามารถนำไปใช้ในตำรับเพื่อให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้โดยไม่เกิดการตกตะกอน



ภาพที่ 13 แสดงสีม่วงของ DPPH ที่จางลงจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 4 ส่วน คือสารละลายมาตรฐาน Quercetin (10A-12A และ 5C-7H), สารละลายตัวอย่างเจือจางเบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:10 (1A-3C), สารละลายตัวอย่างเจือจาง เบียร์ : DMSO อัตราส่วน 1:15 (1D-3F), สารละลายเบียร์ (1G-3G และ 5A-7B)

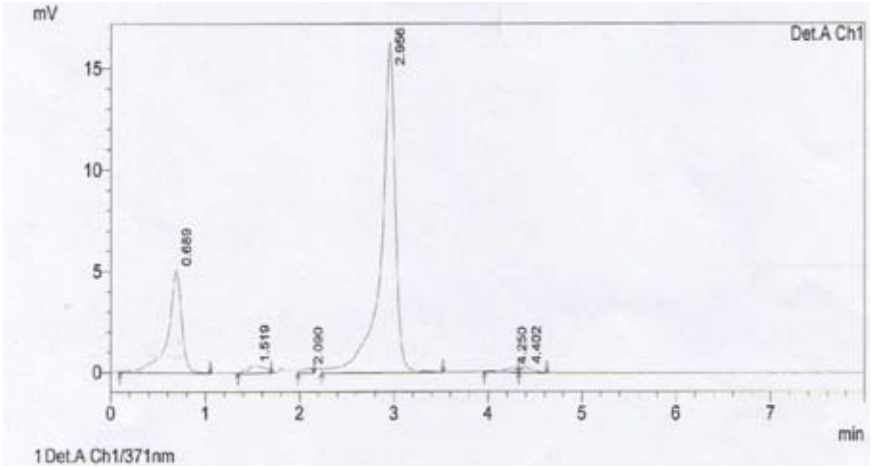
ตารางที่ 8 แสดง %Scavenging ของเบียร์สิงห์ และสารละลายมาตรฐาน Quercetin (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สารละลายตัวอย่างเบียร์		**%Scavenging**			**ค่าเฉลี่ย**
		ตัวอย่างที่ 1	**ตัวอย่างที่ 2**	**ตัวอย่างที่ 3**	
อัตราส่วน 1:15 ใน DMSO	เบียร์สิงห์	23.50	13.53	14.19	17.073
	กลั่นระเหยนาน 1 ชั่วโมง	21.51	18.85	22.51	20.953
	กลั่นระเหยนาน 2 ชั่วโมง	51.11	32.15	47.45	43.570
สารละลายเบียร์	เบียร์สิงห์	76.72	87.69	84.04	82.816
	กลั่นระเหยนาน 1 ชั่วโมง	213.41	199.45	288.93	231.596
	กลั่นระเหยนาน 2 ชั่วโมง	54.77	7.54	-30.04	10.754
สารละลายมาตรฐาน Quercetin		90.69	91.35	91.02	91.02

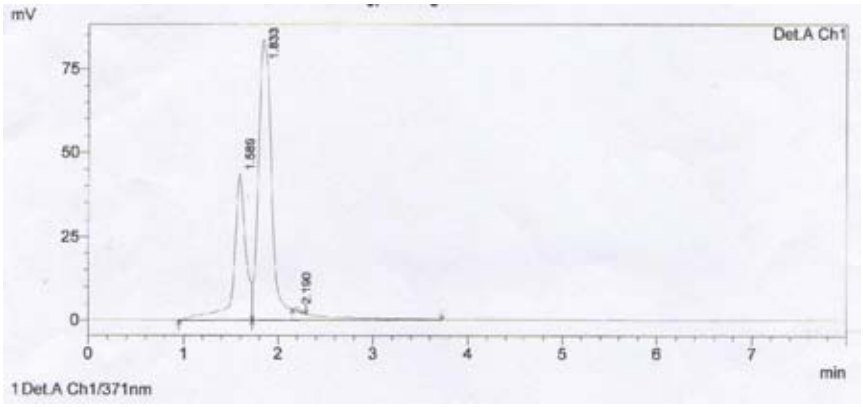
3.การตรวจสอบสารสำคัญในเบียร์สิงห์

3.1การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Quercetin ซึ่งมีพีคหลัก 1 พีคที่ Retention time 2.956 นาที (ภาพที่ 14) กับโครมาโตแกรม ของเบียร์สิงห์ซึ่งมีพีคหลัก 2 พีคที่ Retention time 1.589 และ 1.833 นาที (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่าเบียร์สิงห์นั้นไม่มี Quercetin เป็นสารสำคัญ ตามที่ศึกษาในปริทัศน์วรรณกรรมดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 อาจเนื่องมาจากเบียร์ในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกันได้แก่ สายพันธุ์และปริมาณของ ข้าวมอลต์ หรือฮอปที่เป็นส่วนประกอบหลักของเบียร์ รวมถึงกระบวนการและระยะเวลาในการหมักทำให้สารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างทั้งชนิดและปริมาณของสาร



ภาพที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Quercetin



ภาพที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของเบียร์สิงห์

3.2การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Total Polyphenols โดย Folin-Ciocalteau method

นอกจาก Quercetin แล้วสารสำคัญอีกหนึ่งกลุ่มที่มีรายงานว่าเป็นส่วนประกอบของเบียร์และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคือสารในกลุ่ม Polyphenols ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถที่จะตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย Folin-Ciocalteau method โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐานและ Quercetin เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณ เนื่องจากในการศึกษาพบว่า Quercetin ถูกนำมาใช้เป็นสารสำคัญในสูตรตำรับครีมเพื่อให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อผิว แตกต่างจาก Gallic acid ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีการนำมาใช้ในทางเครื่องสำอาง

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenols โดย Folin-Ciocalteau method ใช้หลักการคำนวณปริมาณ Total polyphenols ของสารสารละลาย Quercetin หรือสารละลายเบียร์ในรูป gallic acid equivalent โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลาย Quercetin หรือสารละลายเบียร์ : น้ำ ที่อัตราส่วน 1:5 มาแทนค่าในสมการถดถอยที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid (ภาพที่ 16) และคำนวณเทียบเป็น gallic acid equivalent (GAE) ซึ่งเท่ากับปริมาณของ Total polyphenols ในสารละลาย Quercetin หรือสารละลายเบียร์ ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าสารละลายเบียร์ให้ค่า GAE เท่ากับ 293.9 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่าเบียร์มีส่วนประกอบเป็น Polyphenols ในการให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามที่ได้ศึกษา จากนั้นทำการหาปริมาณ Total polyphenols ในเบียร์สิงห์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ Total polyphenols ที่เทียบเท่ากับ Quercetin 0.05%w/w ดังนี้

ความเข้มข้นของ Quercetin ที่ใช้ในการทดสอบด้วย Folin-Ciocalteau method คือ 0.196 มิลลิกรัม/กรัม (ในสารละลาย 1 กรัม จะมี Quercetin 0.196 มิลลิกรัม เมื่อความหนาแน่นของ DMSO = 1.10 g/cm^3 และความหนาแน่นของน้ำ = 1.00 g/cm^3)

เมื่อสูตรตำรับที่มีการใช้ Quercetin เป็นสารสำคัญของตำรับจากปริทัศน์วรรณกรรมพบว่ามีการใช้ Quercetin 0.05%w/w = 0.500 มิลลิกรัม/กรัม

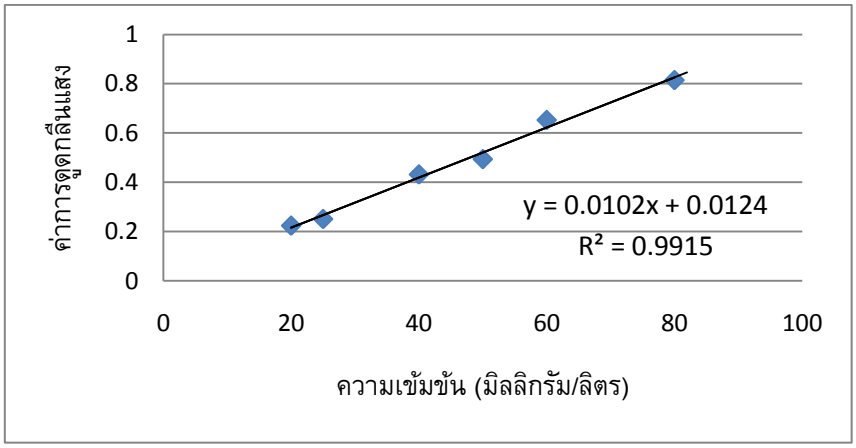
ที่ความเข้มข้นของ Quercetin 0.196 มิลลิกรัม/กรัม ได้ค่า GAE 212.10 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้น ที่ความเข้มข้นของ Quercetin 0.500 มิลลิกรัม/กรัม จะได้ค่า GAE 540.07 มิลลิกรัม/ลิตร

จากสารละลายเบียร์ 1 มิลลิลิตร มีค่า GAE = 293.9 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ว่า

ค่า GAE 293.90 มิลลิกรัม/ลิตร จากสารละลายเบียร์ 1.00 มิลลิลิตร

ถ้าต้องการ GAE 540.07 มิลลิกรัม/ลิตร จะต้องใช้สารละลายเบียร์ 1.84 มิลลิลิตร

ความหนาแน่นของสารละลายเบียร์จากการทดลอง = 1.023 g/cm^3 ดังนั้น สารละลายเบียร์ 1.84 มิลลิลิตร = 1.88 กรัม ดังนั้นจึง**เลือกใช้เบียร์ในตำรับที่ 2%w/w**



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid และสมการถดถอยเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Quercetin หรือสารละลายเบียร์ : น้ำ ที่อัตราส่วน 1:5 และค่าที่คำนวณได้จากสมการถดถอยเทียบเป็น gallic acid equivalent (GAE)

	ค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายเจือจาง	gallic acid equivalent (GAE) ในสารละลายเจือจาง (มิลลิกรัม/ลิตร)	gallic acid equivalent (GAE) (มิลลิกรัม/ลิตร)
สารละลาย Quercetin	0.373	35.35	212.1
สารละลายเบียร์	0.512	48.98	293.9

4.การตั้งสูตรตำรับครีมเบส

ในการพัฒนาสูตรตำรับได้นำสูตรตำรับที่ได้พัฒนาจากการฝึกปฏิบัติในรายวิชา Cosmetic Science I มาใช้เป็นสูตรตั้งต้น ซึ่งในรายวิชาดังกล่าว พบว่าการเลือกใช้สารก่ออิมัลชันในกลุ่มที่ไม่มีประจุ คือ Glyceryl monostearate SE และ Brij และการใช้ปริมาณสารประกอบต่างๆในช่วงที่กำหนดตาม Handbook of Pharmaceutical Excipients โดยเฉพาะสารในกลุ่ม Parabens และ Ethanol ที่เป็นส่วนผสมของเบียร์ที่ใช้เป็นสารสำคัญ จะช่วยลดโอกาสในการเกิดความระคายเคืองแก่ผู้ใช้และเพิ่ม

ความคงตัวของตำรับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกใช้ Brij72 และ Brij721 ในอัตราส่วน 1:1 จะได้เนื้อครีมที่มีคุณสมบัติที่ดีและเตรียมง่ายกว่าการใช้ Brij72 และ Brij721 ในอัตราส่วน 1:3 ด้วย

นอกจากนี้ในการพัฒนาจะนำเอาสารประกอบอื่นๆ ในตำรับที่เกิดออกซิเดชันได้ง่าย รวมถึงสารต้านออกซิเดชันต่างๆออกจากสูตรตำรับ เพื่อป้องกันการรบกวนประสิทธิภา พในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์ที่ใช้เป็นสารสำคัญ

4.1 <u>การเตรียมตำรับครีมเบส</u>

ครีมเบสที่ได้มีสีขาวทุกตำรับ แต่มีการปรับปรุงคุณลักษณะบางอย่างให้ดีขึ้นดังตารางที่ 10

จากการเตรียมครีมตำรับที่ 1 พบว่าครีมเบสมีลักษณะคล้ายโลชันมีความหนืดต่ำมาก ไม่ ยึดเกาะผิว และเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์พบว่ามีเชื้อขึ้น แสดงถึงปริมาณของสารถนอมมีไม่เพียงพอ จึงทำการแก้ไขโดยการเพิ่มสารจำพวกไขมัน เพื่อเพิ่มความข้นหนืดของตำรับได้แก่ การเพิ่ม Beeswax เข้าไปในตำรับ 1% และการเพิ่มปริมาณ Cetyl alcohol ให้สูงขึ้นอีก 1% รวมถึงเพิ่มปริมาณ Paraben concentrate จาก 0.1% เป็น 0.3% ด้วย

จากการเตรียมครีมตำรับที่ 2 ครีมเบสมีความหนืดที่เพิ่มขึ้นตามต้องการ ในขณะที่มีความเหนอะหนะเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการกระจายตัวที่ไม่ดีเท่าที่ต้องการและการยึดติดผิวต่ำมาก ทำให้การใช้มีความลำบาก จึงมีการปรับลด Carbomer 940 และTriethanolamine ลง

จากการเตรียมครีมตำรับที่ 3 พบว่ามีการกระจายตัวที่ดีขึ้นและมีการยึดติดผิวที่ดีขึ้นมาก แต่ตำรับที่ 3 ยังมีครีมเบสที่ได้ยังมีความเหนอะหนะอยู่มาก จึงทำการลดปริมาณของ Dimethicone ลงเพื่อลดการเคลือบผิวให้รู้สึกเหนอะหนะน้อยลง

จากการเตรียมครีมตำรับที่ 4 ได้ลักษณะของครีมเบสที่ต้องการคือ เนื้อครีมมีสีขาว มีความละเอียด มีความหนืดพอที่จะบรรจุในกระปุกได้ มีความเหนอะหนะปานกลางพอที่จะให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้ มีการกระจายตัวที่ดีในขณะทา ไม่เกิดปื้นขาว มีการยึดติดผิวที่ ดีสามารถนำครีมออกจากกระปุกมาใช้ได้ จึงเลือกใช้ครีมตำรับที่ 4 เป็นครีมเบสสำหรับการผสมกับเบียร์

ตารางที่ 10 แสดงการประเมินคุณสมบัติต่างๆ ของครีมเบส

ตำรับ	ลักษณะเนื้อครีม	ความหนืด	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การเกิดปื้นขาว	การยึดติดผิว	ลักษณะครีมหลัง1 สัปดาห์
1	เนื้อละเอียด	+1	+2	+4	0	0	เชื้อขึ้น

2	เนื้อละเอียด	+3	+3	+2	0	+1	ไม่เปลี่ยนแปลง
3	เนื้อละเอียด	+3	+3	+3	0	+3	ไม่เปลี่ยนแปลง
4	เนื้อละเอียด	+3	+2	+3	0	+3	ไม่เปลี่ยนแปลง

ความหนืด ได้คะแนนตั้งแต่ +1 ถึง +4 โดยที่ +1=หนืดน้อย, +2=หนืดปานกลาง, +3=หนืดมาก, +4=หนืดมากที่สุด

ความเหนอะหนะ ได้คะแนนตั้งแต่ +1 ถึง +4 โดยที่ +1=เหนอะหนะน้อย, +2=เหนอะหนะปานกลาง, +3=เหนอะหนะมาก, +4=เหนอะหนะมากที่สุด

การกระจายตัว ได้คะแนนตั้งแต่ +1 ถึง +4 โดยที่ +1=กระจายตัวน้อย, +2=กระจายตัวดีปานกลาง, +3=กระจายดี, +4=กระจายตัวดีมาก

การเกิดปื้นขาวได้คะแนนตั้งแต่ 0 ถึง +4 โดยที่ 0=ไม่เกิดปื้นขาว, +1=เกิดปื้นขาวเล็กน้อย, +2=เกิดปื้นขาวปานกลาง, +3=เกิดปื้นขาวมาก, +4=เกิดปื้นขาวมากที่สุด

การยึดติดผิวได้คะแนนตั้งแต่ 0 ถึง +4 โดยที่ 0=ไม่ยึดติดผิวเลย, +1=ยึดติดผิวน้อยที่สุด, +2=ยึดติดผิวดีปานกลาง, +3=ยึดติดผิวดีมาก, +4=ยึดติดผิวดีมากที่สุด

4.3 <u>การประเมินความคงตัวของครีมเบส</u>

4.2.1 เก็บครีมเบสไว้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง

ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ สี และกลิ่น

4.2.2 การทดสอบความคงตัวตาม มอก.152/2539

<u>ทดสอบโดยครีมเบสในหลอดทดลองแล้วทดสอบโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง</u>

อัตราหมุน 6000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ทั้งหมด 5 รอบ เพื่อพิจารณาการแยกชั้นของครีม ซึ่งจากการทดสอบพบว่า ครีมในทุกตำรับได้คะแนน = 1 แสดงว่าครีมมีความคงตัวทางกายภาพ เนื่องจากสามารถคงตัวในสภาวะดังกล่าว โดยไม่ปรากฏร่องรอยการแยกชั้น

<u>การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งด้วยกระบวนการ Heat-cool cycles</u>

คือเก็บครีมเบสในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 7 รอบนั้น จากการทดสอบพบว่าครีมเบสมีความคงตัวทางกายภาพใน Heat-cool cycles 7 รอบได้แก่ สี กลิ่น และค่า pH ลดลงเล็กน้อยจากค่า pH ของตำรับที่

เตรียมเสร็จใหม่ๆ แต่ยังคงอยู่ในช่วง pH ที่มีความเหมาะสมกับผิว โดยให้มีค่าอยู่ในช่วง pH 4-6 จึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผิวหนัง ส่วนลักษณะครีมและความรู้สึกสัมผัสอื่นๆ แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบสหลังผ่าน Heat-cool cycles 7 รอบ

ตำรับ		pH	ลักษณะเนื้อครีม	ความหนืด	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การเกิดปื้นขาว	การยึดติดผิว
Rx4	หลังเตรียมเสร็จทันที	4.77	เนื้อละเอียด	+3	+2	+3	0	+3
	ผ่านHeat-cool cycles	4.72	เนื้อละเอียด	+3	+2	+3	0	+3

ใช้เกณฑ์ในการประเมินเช่นเดียวกับตารางที่ 10

4.2.3 การทดสอบความคงตัวตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product

ทดสอบความคงตัวของครีมเบส เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ 30±2 องศาเซลเซียส /75%RH ±5%RH และในสภาวะเร่งที่ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าหลังจากที่ผ่านการเก็บเป็นระยะเวลานาน 1 เดือนตามกำหนด โดยทดสอบความคงตัวของตำรับที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ ตำรับมีความคงตัวที่ดี มีค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย กลิ่นจางลงบ้างแต่ไม่แตกต่างกันมาก ดังแสดงในตารางที่ 12, 13 และ 14

ตารางที่ 12 แสดงค่า pH ของครีมเบสในสภาวะเร่งที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์

ตำรับ	**สภาวะเร่ง**	**pH**		
		0 สัปดาห์	**2 สัปดาห์**	**4 สัปดาห์**
4	30 องศาเซลเซียส	4.77	4.74	4.74
	40 องศาเซลเซียส	4.77	4.74	4.73

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบส หลังผ่านสภาวะ30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH นาน 1 เดือน

ตำรับ		ลักษณะเนื้อครีม	สี	กลิ่น
4	**0 สัปดาห์**	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	2 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	4 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	จางลงเล็กน้อย

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบสหลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบส หลังผ่านสภาวะ40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH นาน 1 เดือน

ตำรับ		ลักษณะเนื้อครีม	สี	กลิ่น
4	**0 สัปดาห์**	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	2 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	4 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	จางลงเล็กน้อย

5. การตั้งสูตรตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

เนื่องจากเบียร์ที่ใช้เป็นสารสำคัญมีความเป็นกรดอ่อนมีค่า pH เท่ากับ 4.61 การผสมเบียร์ลงในตำรับครีมเบสจะต้องคำนึงถึงค่า pH ในผลิตภัณฑ์ครีมที่ได้ซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวของครีมและความเหมาะสมในการใช้กับผิว โดยให้มีค่าอยู่ในช่วง pH 4-6 จึงจะมีความปลอดภัยในการใช้กับผิว

5.1 <u>การเตรียมตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์</u>

เตรียมครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์จากตำรับที่ 4 โดยเติมเบียร์ตามปริมาณ 2%w/w จากข้อ 3.2 ลักษณะครีมที่ได้ไม่แตกต่างจากครีมเบส ยังคงลักษณะทางกายภาพและความรู้สึกสัมผัสที่ดี

5.2 <u>การประเมินความคงตัวทางของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์</u>

5.2.1 เก็บครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ไว้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ สี และกลิ่น

5.2.2 การทดสอบความคงตัวตาม มอก.152/2539

เมื่อผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยงและสภาวะเร่งด้วยกระบวนการ Heat-cool cycles ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์มีความคงตัวทางกายภาพที่ดี โดยไม่ปรากฏร่องรอยการแยกชั้น หลังผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยงทั้ง 5 รอบ มีลักษณะทางกายภาพ สี กลิ่น และความรู้สึกสัมผัสที่ดีไม่แตกต่างจากครีมหลังเตรียมเสร็จใหม่ๆ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์หลังเตรียมเสร็จทันทีกับหลังผ่าน Heat-cool cycles 7 รอบ

ตำรับ	pH	ลักษณะเนื้อครีม	ความหนืด	ความเหนอะหนะ	การกระจายตัว	การเกิดปื้นขาว	การยึดติดผิว
หลังเตรียมเสร็จใหม่ๆ	4.74	เนื้อละเอียด	+3	+2	+3	0	+3
ผ่าน Heat-cool cycles	4.76	เนื้อละเอียด	+3	+2	+3	0	+3

ใช้เกณฑ์ในการประเมินเช่นเดียวกับตารางที่ 10

5.2.3 การทดสอบความคงตัวตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product

ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ 30 ±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH และในสภาวะเร่งที่ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH เป็นเวลา 1 เดือน โดยทดสอบความคงตัวของตำรับที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ พบว่าครีมมีความคงตัวที่ดี มีค่า pH ลดลงแค่ 0.01 ในสภาวะ 30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH และ 0.02 ในสภาวะ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH และกลิ่นจางลงบ้างแต่ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังแสดงใน ตารางที่ 16 และ 17

ตารางที่ 16 แสดงค่า pH ของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในสภาวะเร่งที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์

สภาวะเร่ง	**pH**		
	0 สัปดาห์	**2 สัปดาห์**	**4 สัปดาห์**
30 องศาเซลเซียส	4.75	4.74	4.74
40 องศาเซลเซียส	4.75	4.74	5.73

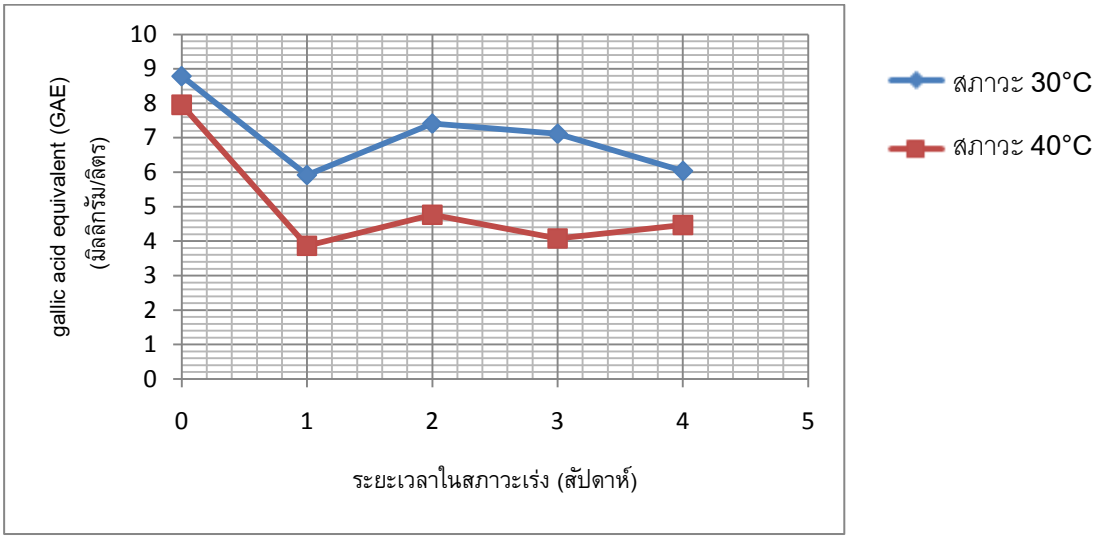
ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของตำรับครีมเบียร์หลังเตรียมเสร็จทันทีกับครีมเบียร์หลังผ่านสภาวะ 30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH และ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH นาน 1 เดือน

ตำรับ		ลักษณะเนื้อครีม	สี	กลิ่น
30 องศาเซลเซียส	**0 สัปดาห์**	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	2 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	4 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	จางลงเล็กน้อย
40 องศาเซลเซียส	**0 สัปดาห์**	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	2 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	กลิ่น Rose oil
	4 สัปดาห์	เนื้อละเอียด	ขาว	จางลงเล็กน้อย

ทดสอบความคงตัวทางเคมีของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบปริมาณของ Total phenol content ของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์หลังเตรียมเสร็จทันทีและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่ผ่านการเก็บในสภาวะเร่งนาน 1 เดือนโดยแสดงค่าในภาพที่ 17

เมื่อผลิตภัณฑ์ผ่านสภาวะเร่งนาน 1 เดือนจะมีการลดลงของปริมาณ gallic acid equivalent (GAE) ในสภาวะเร่งที่ 30±2 องศาเซลเซียส / 75%RH ±5%RH มีค่าลดลง 31.27% และในสภาวะเร่งที่ 40±2 องศาเซลเซียส / 75%RH±5%RH มีค่าลดลง 43.82% แสดงให้เห็นว่าครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ไม่มีความคงตัวทางเคมีตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product เนื่องจากมีค่า gallic acid equivalent (GAE) ของสารสำคัญที่ลดลงมากกว่า 5% ทั้งนี้สารในกลุ่ม Polyphenols ซึ่งให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่เกิดการสลายตัวได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่ออ ยู่ในตำรับครีมที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำมันไขมัน รวมถึง Carbomer ซึ่งสามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับแสง อาจทำให้เกิดความไม่คงตัวทางเคมีของสารในกลุ่ม Polyphenols ได้ แต่สารประกอบที่เป็นน้ำมันและไขมันนี้ ยังคงมีคุณสมบัติที่ดีในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวและคงความเป็นเนื้อครีมที่มีความข้นหนืด ในขณะที่ Carbomer ช่วยให้มีความรู้สึกสัมผัสที่ดีและเพิ่มความข้นหนืดให้กับตำรับได้

ส่วนค่าที่คำนวณได้ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีค่าที่ต่ำกว่าค่าอื่นมาก แต่มีแนวโน้มของค่าที่ลดลงทั้งในสภาวะเร่ง 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการทดลองในช่วงเวลานั้น



ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ gallic acid equivalent (GAE) กับระยะเวลาที่เก็บครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในสภาวะเร่ง 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส

6.การทดสอบความระคายเคืองและประสิทธิผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว

เพื่อหาโอกาสในการเกิดความระคายเคืองและความสามารถในการเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวของผลิตภัณฑ์ครีมเบส และครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์

6.1 <u>การทดสอบความระคายเคืองของครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์</u>

อาสาสมัครที่เข้ารับการทดสอบ คือ อาสาสมัครสุขภาพดีที่เป็นนิสิตคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีอายุระหว่าง 22-24 ปี เป็นเพศหญิงทั้งหมดจำนวน 20 คน จากการซักประวัติและการประเมินโดยผู้วิจัยพบว่าไม่มีการใช้ยาที่มีจะรบกวนต่อการตอบสนองทางผิวหนัง, ไม่มีประวัติการแพ้ยาหรือเครื่องสำอาง, ไม่มีประวัติแพ้ยีสต์, ไม่มีประวัติแพ้ Parabens ในสูตรตำรับครีม, ไม่มีโรคผิวหนังและแผลบริเวณท้องแขนที่เห็นชัดเจน และไม่มีประวัติแพ้แอลกอฮอล์

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะผิวที่ปรากฏและประเมินความแดงและความบวมของผิวตาม International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) Scale โดยแพทย์ผู้ดูแลโครงการ พบว่ามีอาสาสมัครได้**คะแนน** + จำนวน 3 คนใน 20 คน ซึ่งหมายถึงปฏิกิริยาการแพ้เกิดขึ้นเล็กน้อย (มีการแดงบริเวณที่ทาผลิตภัณฑ์เล็กน้อย) เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ครีมเบส ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากสารถนอมในกลุ่ม Parabens ที่ใช้ในสูตรตำรับ มากกว่าเอทานอลหรือสารอื่นๆ เนื่องจาก เอทาน อลที่มีอยู่ในเบียร์ที่ใช้มีปริมาณน้อยมากคือประมาณ 0.4% ของตำรับ อีกทั้งอาสาสมัครไม่มีประวัติแพ้แอลกอฮอล์ ส่วนสารประกอบอื่นๆมีรายงานโอกาสที่ทำให้เกิดการแพ้ที่น้อยมากหรือไม่มีเลย

นอกจากนี้อาสาสมัครอาจไม่เคยทราบว่าอาการระคายเคืองเล็กน้อยจากการใช้ผลิตภัณฑ์เครื่ องสำอางชนิดต่างๆ เป็นผลมาจากสารในกลุ่ม Parabens

6.2 <u>การทดสอบประสิทธิผลของครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว</u>

อาสาสมัครที่เข้ารับการทดสอบ คือ อาสาสมัครสุขภาพดีที่เป็นนิสิตคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีอายุระหว่าง 22-24 ปี เป็นเพศหญิงทั้งหมด จำนวน 20 คน จากการซักประวัติและการประเมินโดยผู้วิจัยพบว่าไม่มีการใช้ยาที่มีจะรบกวนต่อการตอบสนองทางผิวหนัง, ไม่มีประวัติการแพ้ยาหรือเครื่องสำอาง, ไม่มีประวัติแพ้ยีสต์, ไม่มีประวัติแพ้ Parabens ในสูตรตำรับครีม, ไม่มีโรคผิวหนังและแผลบริเวณท้องแขนที่เห็นชัดเจน และไม่มีประวัติแพ้แอลกอฮอล์ เมื่อทดสอบเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงไม่มีอาสาสมัครออกจากการทดสอบก่อนสิ้นสุดเวลา

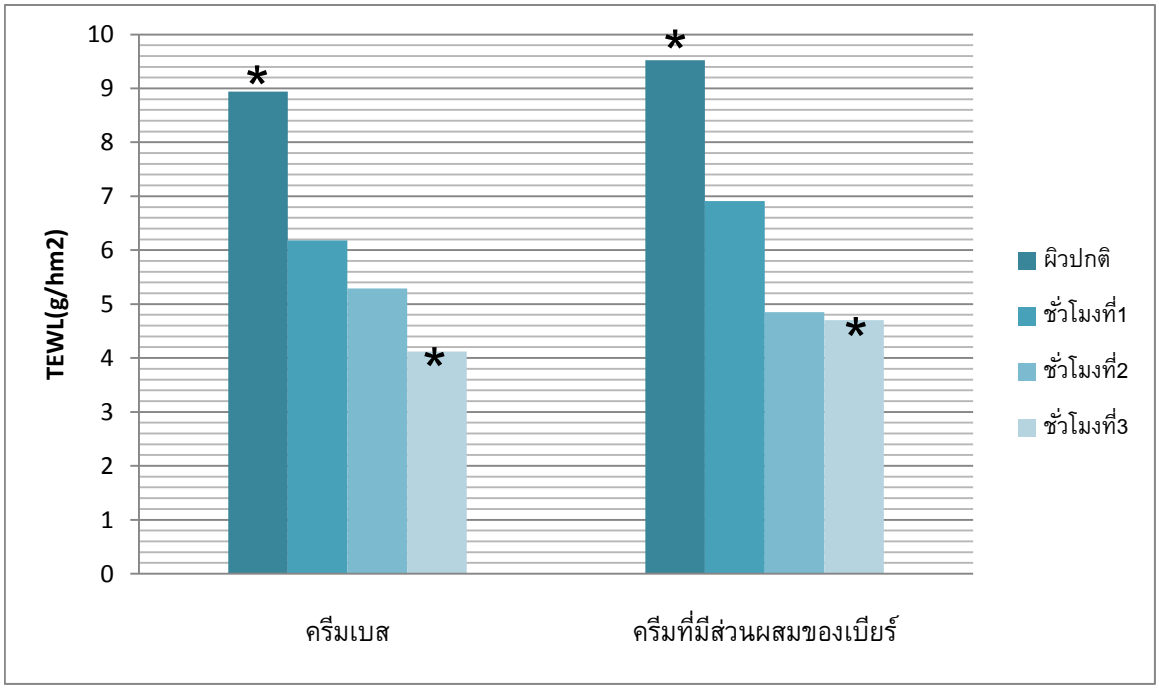
วิเคราะห์ผลโดยใช้ T-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ครีมกับใช้ ผลิตภัณฑ์ครีมเบส และ ความชุ่มชื้นของผิวที่ใช้ผลิตภัณฑ์ครีมเบสกับผลิตภัณฑ์ครีมที่ผสมเบียร์ โดยการคำนวณด้วยมือและ Microsoft Office Excel 2007

จากการทดสอบความชุ่มชื้นของผิวปกติด้วยเครื่อง TEWL ในอาสาสมัครคนเดียวกัน 2 จุดที่มีระยะห่างกัน 1 เซนติเมตรบนผิวปกติ พ บว่าค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.94±4.25 g/hm^2 และ 9.52±4.37 g/hm^2 ซึ่งมีค่า p-value เท่ากับ 0.032 แสดงว่าค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวในอาสาสมัครคนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เนื่องจากความแปรปรวน ของค่าที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง TEWL ในสภาวะแวดล้อมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นได้ยาก และความแตกต่างของความชุ่มชื้นของผิวในแต่ละจุดที่วัดแม้จะเป็นผิวบริเวณที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวปกติและความชุ่มชื้นของผิวห ลังใช้ครีมเบส พบว่าค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวหลังใช้ครีมเบสที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.18±1.42, 5.29±1.89, 4.12±1.60 g/hm^2 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผิวปกติซึ่งมีค่าเฉลี่ย 8.94±4.25 g/hm^2 ครีมเบสสามารถช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวตลอด 3 ชั่วโมงโดยมีค่า p-value ที่เวลา 3 ชั่วโมงเท่ากับ 0.001 แสดงว่าค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวลดลงหลังใช้ครีมเบสที่เวลา 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพที่ 18

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวปกติและความชุ่มชื้นของผิวหลังใช้ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ ทำการวัดค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวหลังใช้ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.91±1.93, 4.85±1.73, 4.70±2.30 g/hm^2 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผิวปกติซึ่งมีค่าเฉลี่ย 9.52±4.37 g/hm^2 ครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์สามารถช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวได้ตลอด 3 ชั่วโมงโดยมีค่า p-value ที่เวลา 3 ชั่วโมงเท่ากับ 0.001 แสดงว่าค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวลดลงหลังใช้ครีมที่มีส่วนผส มของเบียร์ที่เวลา 3 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพที่ 18

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวที่ใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ โดยทำการวัดค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวที่ลดลงจากผิวปกติหลังใช้ครีมเบ สและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82±4.20 และ 4.82±4.31 g/hm^2 ซึ่งมีค่า p-value เท่ากับ 0.494 ดังนั้นค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวระหว่างครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อ มั่น 95% แสดงว่าเบียร์อาจมีผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวได้ แต่เห็นผลไม่ชัดเจน



*แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาพที่ 18 แสดงความแตกต่างระหว่างความชุ่มชื้นของผิวปกติกับความชุ่มชื้นของผิวหลังใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่เวลา 1, 2 และ 3

บทที่5

สรุปผลการทดลอง

ในการพัฒนาตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ เริ่มต้นจากการคัดเลือกยี่ห้อและชนิดของเบียร์ที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ เพื่อให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยคัดเลือกระหว่างเบียร์ 3 ชนิดได้แก่ เบียร์ช้างสูตร Malt 100%, เบียร์ช้างสูตร Classic และเบียร์สิงห์ ด้วยวิธี DPPH พบว่าเบียร์สิงห์มีความเหมาะสมทั้งในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเบียร์อีก 2 ชนิด โดยเบียร์ที่ไม่ผ่านการระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนสามารถให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

จากนั้นทำการหาปริมาณของเบียร์สิงห์ที่จะต้องใช้ในการพัฒนาตำรับครีม ซึ่งพบว่าจากการศึกษาในปริทัศน์วรรณกรรม มีการกล่าวถึงสารมาตรฐาน Quercetin เป็นส่วนประกอบหนึ่งที่พบได้ในเบียร์ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าเบียร์สิงห์ไม่มี Quercetin เป็นส่วนประกอบ ซึ่งฤทธิ์ในการต้าน อนุมูลอิสระมาจากสารประกอบอื่นในเบียร์คือ Polyphenols เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenols โดย Folin-Ciocalteau method ในการเปรียบเทียบปริมาณ Total polyphenols ด้วยค่า Gallic acid equivalence (GAE) โดยมี Gallic acid เป็นสารมาตรฐานและ Quercetin เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณ เนื่องจากในการศึกษาพบว่า Quercetin ถูกนำมาใช้เป็นสารสำคัญในสูตรตำรับครีมเพื่อให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อผิว แตกต่างจาก Gallic acid ที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีการนำมาใช้ในทางเครื่องสำอาง พบว่าสารละลายเบียร์สิงห์ให้ GAE เท่ากับ 293.9 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่าเบียร์มีส่วนประกอบเป็น Polyphenols ในการให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามที่ได้ศึกษา จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของ Total polyphenols ที่เทียบเท่ากับ Quercetin 0.05%w/w ที่มีการใช้ในสูตรตำรับครีมจากการศึกษาในปริทัศน์วรรณกรรม ซึ่งค่าที่คำนวณได้จากวิธีดังกล่าว จะต้องใช้เบียร์ในตำรับคือ 2%w/w

เมื่อได้ปริมาณของเบียร์ที่ต้องใช้แล้ว จึงพัฒนาตำรับครีมเบสให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการคือ มีลักษณะทางกายภาพและความรู้สึกสัมผัสที่ดี มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี ดังนั้น การคัดเลือกสารที่จะใช้ในสูตรตำรับจึงต้องคำนึงถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเบียร์ซึ่งเป็นสารสำคัญ

ปริมาณของสารประกอบที่ใช้ต้องอยู่ในช่วงที่กำหนดตาม Handbook of Pharmaceutical Excipients โดยเฉพาะสารในกลุ่ม Paraben และ Ethanol ที่เป็นส่วนผสมของเบียร์ และการเลือกใช้สารก่ออิมัลชันในกลุ่มที่ไม่มีประจุได้แก่ Glyceryl monostearate SE และ Brij เพื่อลดโอกาสในการเกิดความระคายเคืองแก่ผู้ใช้ นอกจากนี้เนื่องจากเบียร์มีความเป็นกรดอ่อน ยังต้องคำนึงถึงค่า pH ของ สูตรตำรับที่จะมีผลต่อความคงตัวของครีมและความเหมาะสมในการใช้กับผิว โดยพบว่า pH ของครีมเบสอยู่ในช่วง pH 4-6 ซึ่งมีความปลอดภัยในการใช้กับผิว จากนั้นทดสอบความคงตัวของครีม โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง และ Heat-cool cycles ตามมอก.152/2539 และการเก็บในสภาวะเร่งนาน 1 เดือนตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product พบว่าตำรับที่เลือกใช้ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยงและมีความคงตัวในสภาวะเร่ง

จากนั้นทำการเตรียมตำรับครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์โดยใช้สูตรตำรับที่ได้พัฒนา นำมาทดสอบความคงตัวเช่นเดียวกับในครีมเบส และทดสอบความคงตัวทางเคมีด้วย Folin-Ciocalteau method เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Total Polyphenols หลังเก็บไว้ในสภาวะเร่งนาน 1 เดือน พบว่าครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์มีความคงตัวทางกายภาพที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยงและมีความคงตัวในสภาวะเร่งเช่นกัน แต่ไม่มีความคงตัวทางเคมีตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product เนื่องจากมีปริมาณ GAE ในสภาวะเร่งที่ 30°C ± 2°C /75%RH ±5%RH ลดลง 31.27% และในสภาวะเร่งที่ 40°C ± 2°C /75%RH±5%RH ลดลง 43.82% แสดงว่าปริมาณของสารสำคัญในตำรับลดลงมากกว่า 5% ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

เมื่อทำการทดสอบเพื่อหาโอกาสในการเกิดความระคายเคืองแก่ผิวด้วยวิธี Close Patch test และหาความสามารถในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวด้วย TEWL พบว่าครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์มีโอกาสเกิดความระคายเคืองแก่ผิวเล็กน้อยจำนวน 3 คนใน 20 คน เมื่อประเมินตาม International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) Scale ด้วยแพทย์ผู้ดูแลโครงการ และสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหลังใช้ครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.032 และ 0.001 ตามลำดับ แต่ค่าการระเหยของน้ำออกจากผิวที่ลดลงจากผิวปกติระหว่างครีมเบสและครีมที่มีส่วนผสมของเบียร์ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.494 แสดงว่าเบียร์อาจมีผลในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวได้ แต่เห็นผลไม่ชัดเจน

จากการทดสอบที่ผ่านมาพบว่าเบียร์ที่ใช้เป็นสารสำคัญมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจริง แต่เมื่อใส่ลงไปในตำรับแล้วเกิดความไม่คงตัวทางเคมี จึงควรมีการใส่ภาชนะป้องกันแสงและการพัฒนาตำรับให้มีความเหมาะสมมากขึ้น โดยนำ Carbomer ออกจากสูตรตำรับเพื่อเพิ่ มความคงตัวของสารในกลุ่ม Polyphenols แต่ยังคงใช้น้ำมันและไขมันเป็นส่วนประกอบ เพราะยังคงมีคุณสมบัติที่ดีในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวและคงความเป็นเนื้อครีมที่มีความข้นหนืดอยู่ได้ การเปลี่ยนชนิดของผลิตภัณฑ์จากอิมัลชันเป็นเจล อาจเป็นวิธีหนึ่ง ที่จะช่วยให้สารในกลุ่ม Polyphenols มีความคงตัวมากขึ้น แต่ประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวจะลดน้อยลง นอกจากนี้เพื่อลดอาการระคายเคืองต่อผิว อาจจำเป็นต้องเปลี่ยนสารถนอมในกลุ่ม Parabens ซึ่งทำให้เกิดอาการแพ้ได้สูงสุด และนำมาทดสอบทั้งความคงตัวทางเคมีและความระคายเคืองแก่ผิวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Hansen J, Kiellan MC. Inactivation of MET10 in Brewer's Yeast specifically increase SO_2 Formation during Beer Production. Nature Biotechnology 1996; 14: 1587-91
2. Beer sediments balance pH levels [Internet]. 2004 [cited 2012 Nov 20]. Available from: http://www.cosmeticsdesign.com/Formulation-Science/Beer-sediments-balance-pH-levels
3. The Ingredients of Beer [Internet]. [cited 2012 Jan 12]. Available from: http://www.alabev.com/ingredie.htm
4. Krofta K, Milkyska A, Haskova D. Antioxidant Characteristics of Hopsand Hop Products. Journal of the Institute of Brewing 2008; 114: 160-66
5. Liegeois C, Lermusieau G, Collin S. Measuring Antioxidant Efficiency of Wort, Malt, and Hops against the 2,2¢-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride-Induced Oxidation of an Aqueous Dispersion of Linoleic Acid Journal Agriculture Food Chemistry 2000; 48: 1129-34
6. Dvorakova M, Hulin P, Karabin M, Dostalek P. Determination of Polyphenols in Beers by an Effective Method based on Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. Czech Journal of Food Sciences 2006; 25(4): 182-88
7. เจนจิรา จิรัมย์, ประสงค์ สีหานาม. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 2554; 1: 59-67
8. Tafulo PAR, Queiros RB, Matos CMD, Ferreira MG. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. Food Research International 2010; 43(6): 1702-09
9. History of beer: Beer history and Future review [Internet]. [cited 2012 Nov 9]. Available from: http://www.beerh.com/history-of-beer
10. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 23. กรรมวิธีการผลิตเบียร์ [Internet]. [cited 2012 Nov 20]. Available from:

http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=23&chap=10& page=t23-10-infodetail05.html

11. Woffendin G, Klagkou K, Scigelova M. Analysis of Beer using a high speed U-HPLC Coupled to Linear Ion Trap Hybrid Mass Spectrometer [Internet]. 2007 [cited 2012 Nov 20]. Available from: http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=hplc%20beer&source=web&cd=4&cad=rja&ved=0CEMQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.antpedia.com%2Fdistdl.php%3Fid%3D1502&ei=D5LDUL_aF8rHrQe58YHIDg&usg=AFQjCNHdWDIcs52OyVXvHc7w_HUq3qTr1w
12. Vinson JA, Mandarano M, Hirst M, Trevithick JR, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis [Internet]. 2003 [cited 2012 Nov 20]. Available from: http://openagricola.nal.usda.gov/Record/IND43622708
13. Clarke VJ, Vauzour D, Gordon MH, Ames JM, Muller R, Spencer JPE. Polyphenol content and antioxidant activity of beer. Nutrition Society Summer Meeting 2007
14. Denke MA. Nutritional and health benefits of beer. American Journal of the Medical Sciences 2000; 320(5):320-6
15. Magalhaes PJ, Carvalho PO, Cruz JM, Guido LF, Barros AA. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. Natural product community 2009; 4(5): 591-610
16. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ความหมายของอนุมูลอิสระ [Internet]. [cited 2012 Nov 20]. Available from: http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/biol0451tp_ch2.pdf
17. Soshi KK, Mittal N, Hundal MK, Khanduja ML. Gallic acid, an antioxidant, exhibits antiapoptotic potential in normal human lymphocytes: A Bcl-2 independent mechanism. Journal of Nutritional Science and vitaminology 2003; 49(4): 221-7
18. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Emerging Science Nutrition Reviews 2010; 68(7): 418-28

19. Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jabor JR, Santos AC, Fonseca MJV. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. AAPS PharmSciTech 2006; 7(1): 1-8
20. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. วิธีการทดลองน้ำใบบัวบก [Internet]. [cited 2012 Dec 5]. Available from: http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2550/food0350pj_ch3.pdf
21. Fluka Analytical. Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Sigma-Aldrich Chemie: 1
22. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. อีมัลชันทางเครื่องสำอาง ฉบับ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์; 2534
23. เสาวนีย์ กระสานติสุข, หทัยชนก รุณรงค์. การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2549
24. ดร.ดุษฎี ชาญวาณิช. อิมัลชัน (Emulsions), คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; เอกสารประกอบคำสอน
25. ASEAN Guideline on stability study of drug product [Internet]. [updated 2005 Feb22; cited 2012 Dec 5]. Available from: http://portal.bpfk.gov.my/view_file.cfm?fileid=202
26. *สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม .มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (มอก.152-2539) 1996*
27. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE. *In Vitro* Skin Irritation: Human Skin Model Test [Internet]. [cited 2012 Dec 20]. Available from: www.oecd.org/dataoecd/21/56/40793105.doc
28. ICDRG guideline [Internet]. [cited 2012 Dec 8]. Available from: http://www.eliah-sahil.com/certificates/dermae.pdf
29. Tewameter® TM 300: Assessing the Skin Barrier Function Internet]. [cited 2012 Dec 8]. Available from: http://69.89.31.118/~cyberder/main/wp-content/themes/twentyten/doc/Tewameter_TM300.pdf
30. Mundlein M, Valentin B, Chabicovsky R, Nicolics J, Weremczuk J, Tarapata G, Jachowicz R. TRANSEPIDERMAL WATER LOSS (TEWL) MEASUREMENTS WITH TWO NOVEL SENSORS BASED ON DIFFERENT SENSING PRINCIPLES. Vienna University of Technology: 1-4
31. ภญ.ดร.วิภาพร พนาพิศาล. การตรวจสอบเพื่อยืนยันสรรพคุณ (Claim Substantiation Support), คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; เอกสารประกอบคำสอน

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รูปภาพประกอบการทดสอบความคงตัวของตำรับครีมเบสและ

ครีมเบียร์ 2% โดยวิธีปั่นเหวี่ยง

ภาพที่ 19 แสดงครีมเบสหลังผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที รอบที่ 5

ภาพที่ 20 แสดงแสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที รอบที่ 5

ภาคผนวก ข

รูปภาพประกอบการทดสอบความคงตัวของครีมเบสโดย Heat – Cool Cycles

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบส โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 21	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 1
ภาพที่ 22	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 1
ภาพที่ 23	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 2

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบส โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 24	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 2
ภาพที่ 25	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 3
ภาพที่ 26	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 3

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบส โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 27	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 4
ภาพที่ 28	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 4
ภาพที่ 29	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 5

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบส โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 30	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 5
ภาพที่ 31	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 6
ภาพที่ 32	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 6

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบส โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 33 	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 7
ภาพที่ 34 	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 7

ภาคผนวก ค

รูปภาพประกอบการทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดย Heat – Cool Cycles

รูปภาพประกอบ	**การทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดยการผ่าน Heat – cool cycles**
ภาพที่ 35	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 1
ภาพที่ 36	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 1
ภาพที่ 37	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 2

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 38	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 2
ภาพที่ 39	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 3
ภาพที่ 40	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 3

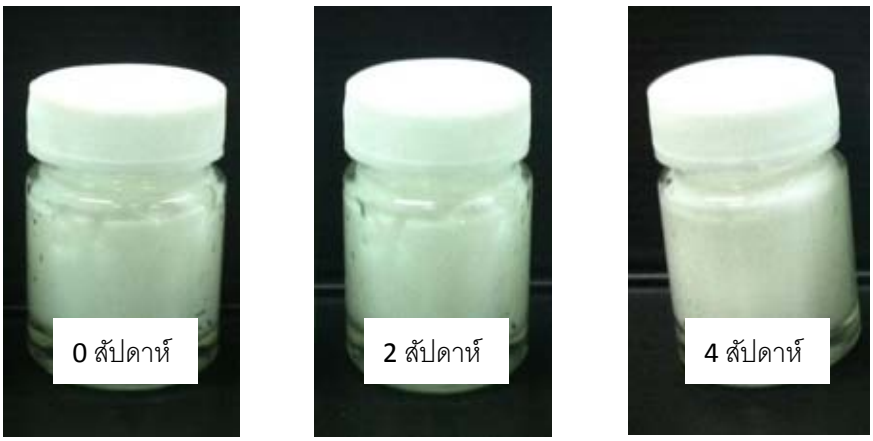
รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 41	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 4
ภาพที่ 42	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 4
ภาพที่ 43	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 5

รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 44	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 5
ภาพที่ 45	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 6
ภาพที่ 46	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 6

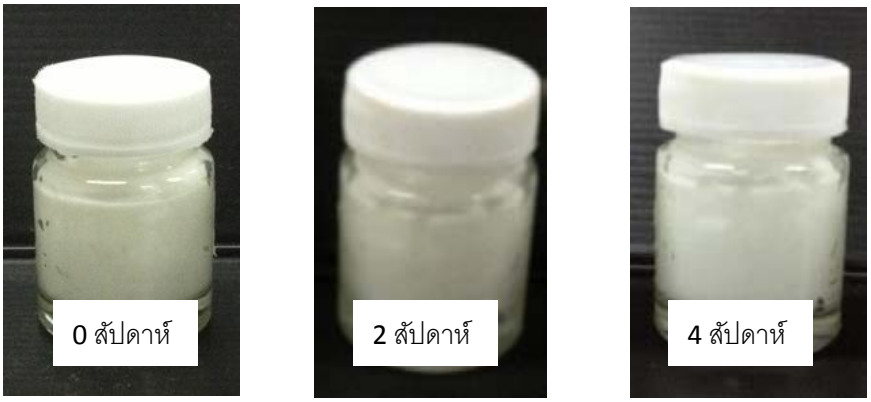
รูปภาพประกอบ	การทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2 % โดยการผ่าน Heat – cool cycles
ภาพที่ 47	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รอบที่ 7
ภาพที่ 48	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอบที่ 7

ภาคผนวก ง

รูปภาพประกอบการทดสอบความคงตัวของครีมเบสหลังผ่านสภาวะเร่งต่างๆ ที่เวลา 1 เดือน ตาม ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product



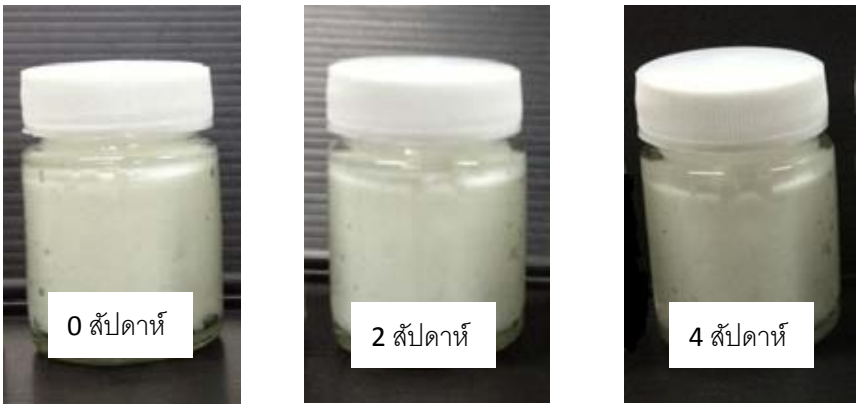
ภาพที่ 49 แสดงครีมเบสหลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 50 แสดงครีมเบสหลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์

ภาคผนวก จ

รูปภาพประกอบการทดสอบความคงตัวของครีมเบียร์ 2% หลังผ่านสภาวะเร่งต่างๆ ที่เวลา 1 เดือน ตาม ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product



ภาพที่ 51 แสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 52 แสดงครีมเบียร์ 2% หลังผ่านสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์

ภาคผนวก ฉ

ตารางแสดงความคงตัวทางเคมีของครีมเบียร์ 2% โดยการวัดปริมาณ Total Polyohenols เปรียบเทียบเป็น Gallic acid equivalent (GAE) ด้วย Folin-Ciocalteu Method

ตารางที่ 18 แสดงความคงตัวทางเคมีของครีมเบียร์ 2% โดยการวัดปริมาณ Total Polyohenols เปรียบเทียบเป็น Gallic acid equivalent (GAE) ด้วย Folin-Ciocalteu Method

สัปดาห์ / อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
0	8.787	7.956
1	5.921	3.862
2	7.412	4.765
3	7.118	4.078
4	6.039	4.470

ภาคผนวก ช

ตารางแสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบส

โดยวิธี Transepidermal water loss (TEWL)

ตารางที่ 19 แสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบส โดยวิธี Transepidermal water loss (TEWL)

อาสาสมัคร / ชั่วโมง	ก่อนทาครีมเบส	1	2	3
1	8.4	6.3	6.5	6.1
2	8.3	6.4	5.8	4.8
3	7.5	5.0	2.9	3.4
4	6.1	6.5	3.5	5.8
5	7.7	6.1	3.4	5.6
6	8.5	4.5	4.9	6.0
7	10.1	7.6	8.1	6.0
8	7.5	6.1	5.9	3.3
9	5.6	4.2	3.1	1.4
10	4.7	4.3	3.8	2.1
11	8.5	5.2	2.7	3.3
12	8.0	5.9	3.6	2.3
13	10.5	7.3	6.0	2.7
14	6.4	6.0	6.9	1.8
15	15.2	9.3	8.8	5.6
16	24.3	8.9	5.5	3.9
17	9.3	5.0	6.7	4.7
18	5.5	5.8	6.0	2.7
19	8.2	5.4	3.6	5.6
20	8.5	7.9	8.1	5.3

ภาคผนวก ซ

ตารางแสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบียร์ 2%

โดยวิธี Transepidermal water loss (TEWL)

ตารางที่ 20 แสดงอัตราการระเหยของน้ำของครีมเบียร์ 2% โดยวิธี Transepidermal water loss (TEWL)

อาสาสมัคร / ชั่วโมง	ก่อนทาครีมเบส	1	2	3
1	7.9	6.4	6.0	5.2
2	9.4	7.9	5.9	4.7
3	8.0	5.9	3.5	3.4
4	7.8	7.4	5.9	9.0
5	5.8	4.0	3.0	4.5
6	8.1	5.3	3.7	7.4
7	11.2	9.7	6.4	5.2
8	11.4	10.3	7.2	8.1
9	6.3	5.0	5.3	3.0
10	5.6	5.3	1.6	0.1
11	8.1	5.6	3.0	2.2
12	8.3	4.7	2.9	1.8
13	11.2	8.1	4.4	3.9
14	6.9	6.9	3.5	3.7
15	16.4	8.4	8.6	5.8
16	24.8	11.2	5.3	5.7
17	8.9	6.5	5.2	4.8
18	6.0	5.3	6.4	3.7
19	9.2	7.2	5.6	3.3
20	9.1	7.1	3.6	8.6