



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์จากคอกอัญชัน

Development of potential products from *Clitoria ternatea* Linn

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การสร้างมูลค่าเพิ่มจากคอกอัญชัน

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2562

จำนวน 950,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวจิตติพรรณ จิมสุข

ผู้ร่วมโครงการ -

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

15/พฤษภาคม/2563

คำนิยม

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์จากดอกอัญชัน (Development of potential products from *Clitoria ternatea* Linn) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัย และส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2562 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี และสาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่อง สถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ฐิติพรรณ นิมสุข



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	จ
บทคัดย่อ	ณ
Abstract	ณ
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	14
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์ผลการวิจัย	50
สรุปผลการวิจัย	51
เอกสารอ้างอิง	52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคการแช่หมักที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย	20
ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย	21
ตารางที่ 3 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย	22
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาพหุคูณเคมีของสารสกัดจากดอกอัญชันจากเทคนิคการสกัด 3 เทคนิค ในทุกอัตราส่วนของการสกัด	23
ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	24
ตารางที่ 6 ความแปรปรวนของน้ำหนักเมื่อดผลิตภัณฑ์	25
ตารางที่ 7 ค่าความหนาและเส้นผ่านศูนย์กลางของเมื่อดผลิตภัณฑ์	26
ตารางที่ 8 ความแข็งของเมื่อดผลิตภัณฑ์	27
ตารางที่ 9 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดควบคุมในขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม	29
ตารางที่ 10 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดควบคุมสมุนไพรขนาด 5 g/kg BW	31

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 11 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับสารสกัด สมุนไพรขนาด 2 g/kg BW	33
ตารางที่ 12 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับสารสกัด สมุนไพรขนาด 5 g/kg BW	35
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก	38
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้น ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก	39
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	40
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้น ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	40
ตารางที่ 17 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก	41
ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้น ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก	41
ตารางที่ 19 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก	42

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 20	ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชันเข้มข้น ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก	43
ตารางที่ 21	ผลการทดสอบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	43
ตารางที่ 22	ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชันเข้มข้น ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	44
ตารางที่ 23	ผลการทดสอบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก	45
ตารางที่ 24	ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชันเข้มข้น ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก	45

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพลักษณะดอกอัญชัน	3
ภาพที่ 2	โครงสร้างเคมีของ ternatin (a) และ anthocyanin (b)	5
ภาพที่ 3	โครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิน	6
ภาพที่ 4	สารสกัดดอกอัญชันในตัวทำละลาย	19
ภาพที่ 5	ผงแห้งของสารสกัดอัญชันที่ได้จากการสกัดด้วยการแช่หมัก ที่อัตราส่วนดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	19
ภาพที่ 6	ลักษณะเม็ดผลึกแห้งของสารสกัดดอกอัญชัน ที่สกัดด้วยเทคนิค การทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัด คือ ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	24
ภาพที่ 7	ลักษณะเนื้อครีมบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจาก ดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ที่สกัดด้วยเทคนิค การทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส	37
ภาพที่ 8	ลักษณะเซรัมบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจาก ดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ที่สกัดด้วยเทคนิค การทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส	37
ภาพที่ 9	แสดงลักษณะของเครื่อง Multi-probe Adapter (รุ่น MPA 580, Courage+ Khazaka electronic, Germany) และหัววัด ชนิดต่างๆ เช่น Mexameter, Corneometer และ Frictiometer	47
ภาพที่ 10	รูปแบบของบรรจุภัณฑ์ 2 รูปแบบ สำหรับครีมบำรุงผิวหน้าและ เซรัมบำรุงผิวหน้า	49
ภาพที่ 11	กล่องบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุครีมบำรุงผิวหน้า	49
ภาพที่ 12	กล่องบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุเซรัมบำรุงผิวหน้า	50
ภาพที่ 13	ซองบรรจุภัณฑ์สารสกัดจากดอกอัญชันในรูปแบบของเม็ดผลึกแห้ง	50

การพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์จากดอกอัญชัน

Development of potential products from *Clitoria ternatea* Linn

ฐิติพรรณ ชิมสุข

Thitiphan Chimsook

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

สารสกัดจากดอกอัญชันเตรียมได้จากเทคนิคการแช่หมัก เทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย และเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส นำสารสกัดศึกษาวิจัยการสกัดฤทธิ์ทางชีวภาพที่ประกอบด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม สารสกัดดอกอัญชันที่เตรียมได้จากสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับตั้งตำรับเซรั่มบำรุงผิวหน้า ครีมบำรุงผิวหน้า การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

คำสำคัญ: ดอกอัญชัน เทคนิคการสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์

Abstract

The butterfly pea extracts were performed using maceration, microwave assisted extraction with solvent and osmotic dehydration. The extracts were determined the percentage yield and biological activities including antioxidant activity, total phenolic contents. The butterfly pea extract obtained from optimized condition for preparing the butterfly pea extract which had the highest biological activities was used as the ingredient for formulating the face serum, face cream and packaging development, supplementary product development and evaluated the acute oral toxicity of supplementary product.

Keywords: *Clitoria ternatea* Linn, Extraction method, Biological activity, Product formulation

คำนำ

ปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจมากขึ้นในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อการดูแลสุขภาพ ตลอดจนถึงการเลือกซื้อและเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากสารสกัดจากพืชในธรรมชาติมากขึ้น และมีแนวโน้มการเติบโตด้านการตลาดในทิศทางบวกอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้โดยทั่วไปการสกัดสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น จากพืชสด พืชแห้ง นั้นส่วนใหญ่เป็นกระบวนการที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งถ้าไม่สามารถแยกตัวทำละลายอินทรีย์จากสารสกัดได้หมด ก่อนนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ทำให้เกิดสารตกค้างที่อาจเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค หรือบริโภค ในระยะยาวได้ โดยเหตุนี้จึงควรให้ความสำคัญต่อกระบวนการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้มากขึ้น โดยให้ความสำคัญต่อการผลิตผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติตั้งแต่ต้นน้ำถึงปลายน้ำ สำหรับกระบวนการต้นน้ำจะสัมพันธ์กับวัตถุดิบในที่นี้คือพืชที่จะนำมาสกัด โดยให้ความสำคัญตั้งแต่ขั้นตอนการปลูกพืช หรือเพาะพันธุ์เพื่อให้พืชชนิดนั้นสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ในปริมาณสูง โดยสารเหล่านี้จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่มีผลต่อการบำรุง รักษา กระตุ้นหรือเสริมสุขภาพ เพื่อให้เกิดผลดีต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ทั้งแบบอุปโภคและบริโภค นอกจากนี้ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือ การสกัดแยกสารออกฤทธิ์หรือสารประกอบที่มีความสำคัญในพืชชนิดนั้นเพื่อนำมาสารเหล่านั้นไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย ทั้งนี้ถ้าสามารถสกัดโดยวิธีการที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ สกัดจากพืชสด ด้วยกระบวนการสกัดที่สามารถสกัดสารทุติยภูมิและน้ำมันหอมระเหยในพืชให้ได้มากที่สุดจะทำให้ได้สารสกัดที่เข้มข้น และลดปัญหาเรื่องเชื้อราที่อาจปะปนในการอบแห้งพืช เหล่านี้จะทำให้สารสกัดที่ได้มีความปลอดภัยสูง ที่สำคัญคือลดปัญหาการกำจัดของเสียหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องแยกออกจากกระบวนการสกัดสาร ทำให้กระบวนการสกัดนี้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและได้สารสกัดที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัย สารสกัดชนิดนั้น ๆ จะสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบคุณภาพดีในการนำไปแปรรูปในภาพแบบต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพมากที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำหลักการการสกัดที่ได้กล่าวมาข้างต้นคือ การสกัดโดยไม่ใช้ตัวทำละลาย จากพืชสด เพื่อรักษาคุณภาพของสารสกัดทุติยภูมิให้ได้มากที่สุด โดยพืชที่สนใจคือ ดอกอัญชันซึ่งเป็นดอกไม้ที่มีสารสกัดสำคัญที่มีประโยชน์หลากหลายด้านคือ สารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) นำสารสกัดที่ได้เข้าสู่วิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพในภาพแบบอัดเม็ด และการนำไปเป็นวัตถุดิบในภาพเม็ดสีเพื่อพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง เพื่อส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์จากดอกอัญชันให้สามารถต่อยอดเชิงพาณิชย์ได้อย่างเป็นภาพธรรม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดจากดอกอัญชันแบบอัดเม็ด
2. ตั้งตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากดอกอัญชัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์
2. องค์ความรู้ ด้านวิชาการ
3. เป็นข้อมูลสนับสนุนด้านการตลาด

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน

ด้านวิชาการ

ผู้ที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
ผู้สนใจ นักศึกษา	ถ่ายทอดในการเรียนการสอน และบทความวิจัยหรือ เอกสารเผยแพร่

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน

ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์/อุตสาหกรรม

ผู้ที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
เกษตรกร	เกษตรกรพัฒนาการปลูกดอกอัญชันอินทรีย์ อย่างมีคุณภาพ
ผู้ประกอบการ	ผู้ประกอบการนำไปประยุกต์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรอื่น ๆ

การตรวจเอกสาร

วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรไทยมีความสำคัญ โดยเฉพาะถ้าสามารถพัฒนานวัตกรรมการสกัดสารจากสมุนไพรไทยด้วยกระบวนการที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย จะยิ่งเพิ่มความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรชนิดนั้น รวมถึงการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณในระดับอุตสาหกรรมได้ เพื่อให้ได้สารสกัดที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาและวิจัย เหล่านี้ถ้าสมุนไพรที่สกัดได้เหล่านั้นประสบความสำเร็จและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ที่ยืนยันจากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านเภสัชวิทยา และการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีด้วยนั้น จะเป็นประโยชน์อย่างสูงในการนำเทคโนโลยีการสกัดสมุนไพรมาใช้เพื่อแยกองค์ประกอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพร เพื่อนำมาใช้เป็นยาหรือสมุนไพรทางเลือกในกิจกรรมทางการแพทย์และการสาธารณสุข

ของคนไทยในการดูแลบำบัด ส่งเสริมสุขภาพและรักษาโรคในผู้ป่วยภายใต้การแนะนำจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ เป็นต้น

ดังนั้นกรอบแนวคิดของงานวิจัยนี้คือ การใช้นวัตกรรมเทคนิคการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรมาใช้ในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน ที่ปลูกในแปลงเกษตรอินทรีย์อายุไม่เกิน 4 เดือน และนำดอกอัญชันสดมาสกัดสารสีม่วงคือสารแอนโทไซยานิน ด้วยระบบปิดสุญญากาศ ซึ่งเป็นระบบการสกัดที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และขึ้นภาพเม็ดโดยไม่ใช้แมกนีเซียมสเตียเรท และนำเม็ดผลิตภัณฑ์ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี และศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ได้นำสารสกัดดอกอัญชันนำมาเป็นองค์ประกอบในการตำรับเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งหมดเป็นภาพแบบของการพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์จากดอกอัญชันอย่างเป็นภาพธรรมได้อย่างแท้จริง

อัญชัน (*Clitoria ternatea* Linn.) มีชื่อสามัญ คือ butterfly pea และมีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น blue pea และ Mussel-shell Creeper ชื่อวงศ์ Leguminosae แสดงลักษณะในภาพที่ 1 อัญชันมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย และขยายพันธุ์ได้ด้วยการเพาะเมล็ด เป็นพืชสมุนไพรล้มลุก มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เป็นไม้ดอกที่ดอกสามารถรับประทานได้ พบได้ทั่วไปในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดอกอัญชันมีสีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ แต่ไม่มีกลิ่นและรสชาติ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอัญชันเป็นไม้เถาเลื้อยที่นิยมปลูกไว้รั้ว ขึ้นได้ดีในเขตร้อน และเป็นไม้ที่มีอายุสั้น ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมและอากาศ ดอกมีสีน้ำเงินเข้ม หรือน้ำเงินอมม่วง กลีบดอกมีสีเขี้ยว กลีบดอกชั้นในแบ่งเป็น 5 กลีบ มีผลเป็นฝักขนาดยาวประมาณ 5-10 เซนติเมตร ซึ่งมีเมล็ดภายใน 2-3 เมล็ด การปลูกและดูแลรักษาอัญชันสามารถปลูกได้ดีในดินทุกชนิด



ภาพที่ 1 ภาพลักษณะดอกอัญชัน

ที่มา : <http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=pookhakae&month> เข้าถึงเมื่อ 14 สิงหาคม

2562

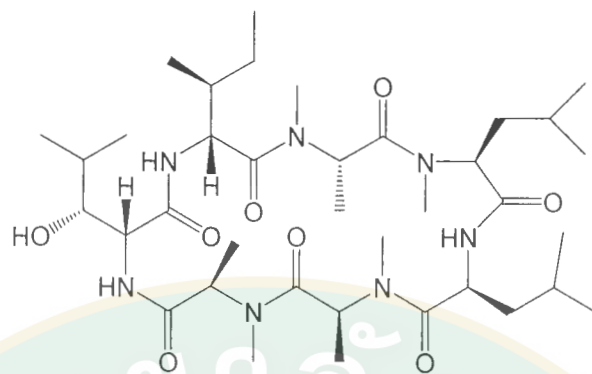
ดอกอัญชันส่วนใหญ่พบเป็นดอกสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินม่วงนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ผสมในเครื่องสำอาง ใช้เป็นสีผสมอาหารและเครื่องดื่ม ส่วนต่าง ๆ ของต้นอัญชันสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรในลักษณะเป็นยาพื้นบ้านได้ เช่น ราก ใบ เมล็ด ในตำรายาบูรเวทศาสตร์ของอินเดีย อัญชัน

นำส่วนรากและเมล็ดมาใช้เป็นยา บำรุงร่างกายและสมอง บำรุงความจำ รวมทั้งเป็นยาระบายและยาขับปัสสาวะ ประเทศแถบอเมริกาพบรายงานการใช้ น้ำคั้นจากราก หรือทั้งรากและดอกร่วมกันเป็นยาบำรุงโลหิต ส่วนเมล็ดใช้เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะและขับพยาธิ

ดอกอัญชันสีน้ำเงินมีองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น polyphenolic flavonoids, anthocyanin glycosides, pentacyclic triterpenoids, phytosterols (Mukherjee *et al.*, 2008) เป็นต้น มีข้อมูลงานวิจัยสนับสนุนว่าสารสกัดดอกอัญชันมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น glucoside, malonylated flavonal glycosides (Kazuma *et al.*, 2004) เป็นต้น นอกจากนี้พบว่ามีข้อมูลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากส่วนต่าง ๆ ของอัญชันเป็นจำนวนมาก มีการทดสอบในสัตว์ทดลอง สารสกัดชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากส่วนลำต้นเหนือดิน ใบ ดอก และราก

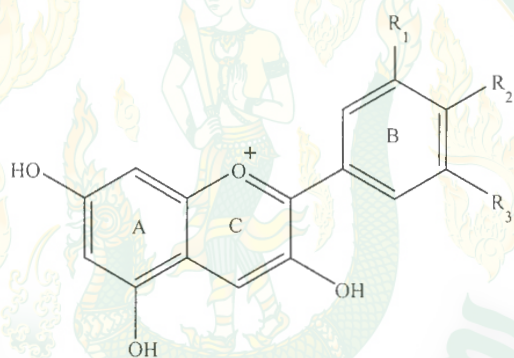
มีฤทธิ์กระตุ้นการเรียนรู้และความจำ ช่วยคลายความเครียดและวิตกกังวล มีฤทธิ์ช่วยในการนอนหลับ ลดน้ำตาลในเลือด แก้ไข้ แก้ปวด และต้านการอักเสบ (Mukherjee *et al.*, 2008 และ Patil Amol, and Patil Vijay, 2011) รวมถึงการใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอางก็มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า สารสกัดเอทานอลจากดอกอัญชันมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5 α -reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นขน และมีฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเส้นขนของหนูแรท (Zingare *et al.*, 2013) นอกจากนี้สารสกัดเมทานอลจากดอกอัญชันยังมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดสีเมลานิน และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ melanocyte เมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลอง (Kumar *et al.*, 2012) และในการทดสอบฤทธิ์ของอัญชันในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับบำรุงผิวพบว่า มีการนำสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลจากดอกอัญชันไปเป็นส่วนประกอบในเจลสำหรับทาอบดวงตา ซึ่งจะได้ประโยชน์จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ (กฤตติญารัตน์และชุตินันท์, 2012)

โดยทั่วไปกลีบดอกอัญชันพบการสะสมแอนโทไซยานินหลายชนิด เฉพาะที่มีการรายงานว่าพบมากในกลีบดอกอัญชันสีน้ำเงินคือเทอนาทิน (ternatins) ซึ่งเป็น (poly) acylated delphinidin glucoside เป็นสารหนึ่งในกลุ่ม แอนโทไซยานิน (anthocyanins) (Kazuma *et al.*, 2003) ดังตัวอย่างโครงสร้างของเทอนาทิน เอ และโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานินแสดงในภาพที่ 2 ดอกอัญชันสีม่วง สีฟ้าและสีขาวมีสารแอนโทไซยานินต่างปริมาณและ/หรือชนิด แต่ดอกอัญชันสีน้ำเงินที่มีกลีบดอกเดี่ยวหรือดอกซ้อนมีชนิดของสารสำคัญไม่แตกต่างกัน (Kazuma *et al.*, 2003) สำหรับการศึกษาเลือกใช้อัญชันที่มีสีน้ำเงิน



Ternatin

(a)

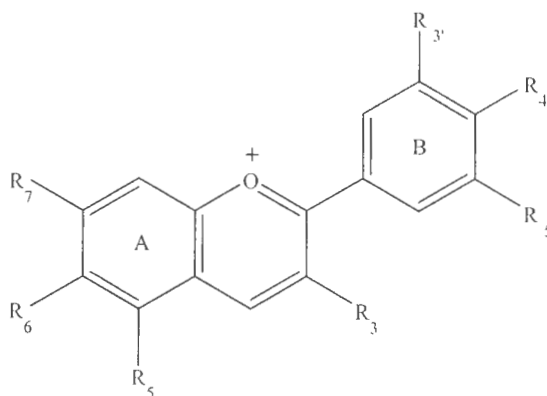


Anthocyanin

(b)

ภาพที่ 2 โครงสร้างเคมีของ ternatin (a) และ anthocyanin (b)

สีที่แตกต่างกันของแอนโทไซยานิน เกิดจากโครงสร้างเรโซแนนซ์ (resonant structure) ของอออนฟลาโวลีียม (flavylium ion) ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) เป็นอะไกลโคน (aglycone) ของแอนโทไซยานิน แอนโทไซยานิดินประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก เอ (aromatic ring A) ซึ่งติดกับวงแหวน ซี (heterocyclic ring C) ซึ่งมีออกซิเจน 1 อะตอม วงแหวนซียังเชื่อมกับวงแหวนบีด้วยพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนของแต่ละวงแหวน



โดยที่ $R_3 = -OH$

$R_{3'} = -H, -OH, -OCH_3$

$R_5 = -H, -OH, -OCH_3$

$R_{5'} = -H, -OH, -OCH_3$

$R_4 = -OH$

$R_6 = -H, -OH$

$R_7 = -OH, -OCH_3$

ภาพที่ 3 โครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิดิน [Andersen and Jordheim, 2006]

การสกัด (extraction) หมายถึง กระบวนการแยก (separation) สารที่ต้องการออกมาจากสารที่ผสมกันอยู่ สำหรับการสกัดสารในพืชสมุนไพรนั้นปัจจุบันมีหลากหลายวิธีมาก เช่น

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย ซึ่งอาจจะเป็นภาพแบบการรีฟลักซ์ (reflux: เทคนิคการสกัดโดยที่ไอของสารละลายจะควบแน่นแล้วย้อนกลับตกลงมาในสารละลายที่กำลังเดือด) หรือภาพแบบซอกซ์เลต (soxhlet: เทคนิคการสกัดที่ทำให้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเวียนผ่านสารที่ต้องการสกัดหลาย ๆ ครั้งในลักษณะหมุนเวียนจนกระทั่งสารที่ต้องการสกัดออกมามีปริมาณเข้มข้นมากพอ)

2. การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้คลื่น sonic ไปรบกวนและเขย่าตัวทำละลายทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลตัวทำละลายเพื่อช่วยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายออกมา

3. การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) เป็นเทคนิคการสกัดสารออกจากของผสมโดยใช้ไอน้ำเป็นตัวทำละลายเหมาะสำหรับแยกสารที่ระเหยง่าย ไม่ละลายน้ำ และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่ในที่นี้คือน้ำมันหอมระเหย

4. การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นเทคนิคการละลายส่วนประกอบที่ต้องการออกจากของผสมของแข็งด้วยตัวทำละลายของเหลว

โดยทั่วไปการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันจะทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ได้แอนโทไซยานินใกล้เคียงกับธรรมชาติ จึงมีนักวิจัยใช้ตัวทำละลายที่เป็นกลางในการสกัด เริ่มต้น เช่น 60% methanol, ethylene glycol, *n*-butanol และ acetone (Nollet, 1996) โดยเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดมากที่สุด ทั้งนี้ได้มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้สกัดแอนโทไซยานิน 3 ชนิด (เมทานอล เอทานอล และน้ำ) พบว่า เมทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าเอทานอลและน้ำเท่ากับร้อยละ 20 และร้อยละ 73 ตามลำดับ การสกัดโดยใช้เอทานอล และน้ำเหมาะสมสำหรับนำมาใช้กับอาหารได้ดีกว่า เนื่องจากต้องการหลีกเลี่ยงความเป็นพิษที่อาจเกิดจากเมทานอล แต่

recovery ของแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพน้อยกว่าเมทานอล (Socaciu, 2008) การสกัดด้วยสารละลายกรด มีความสำคัญในการทำให้แอนโทไซยานิน ส่วนฟลาวิลเลียม แคทไอออน (flavylium cation) มีความเสถียรและช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการสกัด อย่างไรก็ตาม กรดสามารถเปลี่ยนฟอร์มของแอนโทไซยานิน ในเนื้อเยื่อได้โดยไม่เชื่อมต่อกับโลหะและ/หรือรงควัตถุอื่น ซึ่งการทำให้การสลายตัวของแอนโทไซยานิน เกิดน้อยที่สุดคือ การสกัดในสารละลายกรดอ่อนและกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (volatile organic acids) เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) หรือกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) หรือปริมาณเล็กน้อยของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid) เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.01-3.0 ที่สามารถสกัดออกได้ระหว่างการทำให้รงควัตถุมีความเข้มข้นขึ้น (pigment concentration) ในปัจจุบันมีเทคนิคอื่น ๆ ที่นำมาประยุกต์ใช้สกัดสารจะพืช สัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น accelerated solvent extraction (ASE) และ pressurized liquid extraction (PLE), supercritical fluid extraction (SFE) เป็นต้น โดยเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีต้นทุนเครื่องมือสูง สามารถสกัดได้ในปริมาณมาก สำหรับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดแอนโทไซยานิน ทำได้หลายวิธีคือ ใช้ lead acetate, paper chromatography และ solvent-solvent extraction แต่ทั้ง 3 วิธีนี้ใช้เวลานานและทำให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ปัจจุบันจึงมีการคิดค้นวิธีการสกัด solid-phase extraction ด้วย insoluble poly(vinylpyrrolidone; PVP) Sephadex G-25, Sephadex LH-20, polyamide, ion-exchange resins, acid alumina, Amberlite XAD-7 และ octadecylsilane ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและเร็วกว่าโดยใช้ตัวดูดซับ (absorbents) ขณะที่สารที่ไม่ต้องการ (น้ำตาลและกรดต่าง ๆ) จะถูกล้างออกจากคอลัมน์ สารแอนโทไซยานินจะถูกดูดซับและต้องแยกออกโดยการชะล้าง (elute) ด้วยเมทานอลในสารละลายกรด และวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography; TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC)

โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่มีต้นทุนไม่สูงคือการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ วิธีเหล่านี้ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานรวมถึงต้องใช้พืชสมุนไพรและตัวทำละลายในปริมาณมากด้วย ซึ่งส่วนใหญ่มักเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นชนิดที่มีขั้วต่ำอย่างเฮกเซน หรือชนิดที่มีขั้วสูงอย่างแอลกอฮอล์ หรือตัวละลายอื่น ๆ เช่น คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เมทานอล เบนซีน อีเทอร์ โทลูอิน เป็นต้น เนื่องจาก

สารละลายอินทรีย์เหล่านั้นโดยส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติความมีขี้ที่เหมาสมกับการสกัดสารสำคัญบางชนิดมากกว่าน้ำ หรือสามารถระเหยและแยกออกจากสารสกัดได้ง่ายกว่าน้ำเพราะมีจุดเดือดต่ำกว่า แต่ทั้งนี้ถึงแม้จะทำการระเหยหรือแยกออกด้วยวิธีอื่นแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่าตัวทำละลายเหล่านั้นถูกแยกออกจนหมดอย่างแน่นอน ดังนั้นจึงอาจยังมีสารละลายอินทรีย์หลงเหลืออยู่ในสารที่สกัดออกมาได้ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านั้นล้วนเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ในระยะยาว นอกจากนี้สารที่ต้องการสกัดยังอาจได้ปริมาณน้อย หรือมีการสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการสกัดอีกด้วย ทั้งนี้ สารอาหารและสารสำคัญในพืชสมุนไพรนั้น มีสารหลายชนิดมากที่มีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นหากสกัดสารเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งออกมาก็จะสูญเสียสารชนิดอื่นไปอย่างน่าเสียดายจากแนวคิดดังกล่าว จึงเลือกแนวทางการสกัดและการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมดังนี้

1. จะต้องไม่มีการใช้สารเคมีในทุกขั้นตอนการผลิต เพื่อความมั่นใจว่าจะไม่มีสารเคมีปนเปื้อนอย่างแน่นอน

2. จะไม่เลือกวิธีการที่สามารถสกัดสารสำคัญได้เพียงตัวใดตัวหนึ่ง แต่จะเลือกวิธีการที่สามารถดึงสารสำคัญอื่น ๆ จากพืชออกมาให้ได้มากชนิดและในปริมาณที่มากที่สุด

3. วิธีการดังกล่าวจะต้องสามารถเก็บรักษาคุณประโยชน์ของพืชไว้ได้เป็นเวลานาน

4. วิธีการดังกล่าวต้องทำให้ได้สารสำคัญที่มีความสามารถในการดูดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของร่างกายได้ดี ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคสามารถได้รับประโยชน์จากพืชสมุนไพรได้อย่างเต็มที่ เพื่อที่เมื่อสามารถเหนี่ยวนำสารสำคัญออกมาได้ดีมากแล้ว สารสำคัญเหล่านั้นจะไม่สูญเสียไป

จากแนวทางทั้ง 4 ข้อข้างต้น ทำให้สามารถสร้างกระบวนการสกัดและนำมาใช้ในการสกัดสารสกัดจากดอกอัญชันได้ดังนี้

1. ล้างวัตถุดิบพืชสดให้สะอาด และทำการบดผสมกับน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1:1 (W/V) โดยพืชที่บดจะถูกบดให้ละเอียดเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด

2. นำเข้าสู่กระบวนการระเหยความชื้นในภาพแบบการ evaporation (โดยระเหยนํ้าออกภายใต้ความดัน) นํ้าผึ้งและพืชที่บดแล้วจะค่อย ๆ ถูกระเหยนํ้าออกไป โดยทั่วไปกระบวนการนี้จะทำให้นํ้ามันหอมระเหยบางส่วนระเหยไปพร้อมกับไอนํ้าด้วย แต่เนื่องจากนํ้ามันหอมระเหยเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งที่ต้องการให้คงอยู่ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงทำการควบแน่นแล้วแยกเฉพาะนํ้ามันหอมระเหยกลับลงมา วิธีการนี้จะทำให้นํ้ามันหอมระเหยไม่สูญเสียหรือสูญเสียเป็นปริมาณน้อย ส่วนสารสำคัญอื่น ๆ ในพืชจะถูกกักเก็บไว้ในชั้นของนํ้าผึ้ง

3. เมื่อความชื้นลดลงถึงระดับหนึ่งแล้ว ทำการย้ายส่วนที่ได้ไประเหยความชื้นออกด้วยเครื่องมืออีกภาพแบบหนึ่ง โดยการวางพืชเหล่านั้นบนภาชนะที่มีท่อนํ้าร้อนอยู่ด้านใต้ ความร้อนจะกระจายผ่านขึ้นมาทำให้ภายในเครื่องมือมีภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เมื่อนํ้าผึ้งสัมผัสกับบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ นํ้าผึ้งจะสูญเสียความชื้นออกไปอย่างรวดเร็วในช่วงแรก แล้วจึงลดการสูญเสียความชื้นในตัวเองน้อยลงเนื่องจากนํ้าตาลที่อยู่ในนํ้าผึ้ง (ส่วนใหญ่เป็นนํ้าตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่พบมากคือฟรุกโตส) จะทำการจับตัว

เป็นแผ่นผลึกบาง ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้ความชื้นรั่วไหลออกไปมากกว่านั้น จากขั้นตอนนี้จะทำให้ได้พืช บดผสมน้ำผึ้งที่มีความชื้นต่ำที่สุดเท่าที่เป็นไปได้

4. นำไปทำเป็นแกรนูลเพื่อขึ้นภาพอัดเม็ดต่อไปได้

ความพิเศษของกระบวนการผลิตนี้อยู่ที่น้ำผึ้ง ในตำรับแพทย์แผนไทยระบุว่าน้ำผึ้งจัดเป็นน้ำ กระสายยาชนิดหนึ่ง ซึ่งคุณสมบัติของน้ำกระสายยาคือมีความสามารถในการดึงหรือเหนี่ยวนำตัวยา ออกมาจากพืชสมุนไพร ได้ดี ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผึ้ง ทำให้น้ำผึ้งสามารถดูดซึมน้ำออกมาจากพืช และสารสำคัญต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำที่อยู่ในพืชนั้น ๆ ถูกดูดซึมออกมาด้วย ยิ่งพืชมีความละเอียดสูงก็จะยิ่งมีโอกาสให้สารสำคัญออกมาได้ง่ายขึ้นเนื่องจากมีพื้นที่ผิวมาก ในที่นี้ น้ำผึ้งจึงทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญออกจากพืช เมื่อสารสำคัญต่าง ๆ ถูกปลดปล่อยหรือถูกดึงออกมาจากพืชแล้ว ความเข้มข้นของน้ำผึ้งก็จะทำให้สารเหล่านั้นถูกกักเก็บไว้ในชั้นของน้ำผึ้ง เสมือนเป็นการเคลือบไม่ให้สารสำคัญสูญหายไปกับกระบวนการผลิต นอกจากนี้ การที่น้ำตาลในน้ำผึ้งมีคุณสมบัติสร้างผลึกป้องกันการสูญเสีย น้ำ ทำให้พืชบดผงที่ได้จะไม่แห้งแข็งโดยสิ้นเชิง เป็นการรักษาสภาพผลึกน้ำในพืช ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้คุณประโยชน์ของพืชยังคงอยู่ครบถ้วนอีกด้วยคุณสมบัติพิเศษอีกอย่างหนึ่งของน้ำผึ้งคือคุณสมบัติออสโมติก ซึ่งเกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผึ้ง ทำให้เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำผึ้ง จะเกิดการแพร่ของน้ำในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปสู่ น้ำผึ้ง และส่งผลให้เซลล์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการต้านการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ และเก็บรักษาไว้ได้นาน ทั้งนี้ ส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้น้ำผึ้งสามารถดึงคุณประโยชน์ของพืชออกมาได้อย่างเต็มที่คือการออกแบบเครื่องจักรและอุปกรณ์ในการผลิต เพื่อให้การผลิตอยู่ในภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้น้ำผึ้งสามารถเหนี่ยวนำสารสำคัญออกมาให้ได้มากที่สุด และป้องกันการสูญเสียสารสำคัญในระหว่างการผลิตให้มากที่สุด ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรที่ปลอดสารเคมี มีคุณประโยชน์ครบถ้วนสูงสุด และเก็บรักษาไว้ได้นานตามที่ต้องการ

ความพิเศษอีกอย่างหนึ่งของกระบวนการสกัดและผลิตนี้ที่น้ำมันหอมระเหย ในขั้นตอนที่มีการระเหยความชื้นออกจากพืชและน้ำผึ้งนั้น เมื่อได้ทำการควบแน่นน้ำมันหอมระเหยกลับลงมา น้ำมันหอมระเหยจะสัมผัสกับพื้นผิวของน้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นสูง จนกลายเป็นการเคลือบพื้นผิวของน้ำผึ้งไว้ อีกชั้น ดังนั้น สิ่งที่ได้คืออนุภาคของพืชที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ถูกเคลือบไว้ด้วยน้ำผึ้งชั้นหนึ่ง ซึ่งเป็นชั้นที่กักเก็บสารสำคัญที่ถูกเหนี่ยวนำออกมา และถูกเคลือบด้วยชั้นของน้ำมันหอมระเหยอีกชั้นหนึ่ง ทำให้อ่อนนุ่มภายนอกมีลักษณะเป็นไขมัน จากคุณสมบัตินี้ทำให้อนุภาคของผลิตภัณฑ์มีความใกล้เคียงกับเซลล์สิ่งมีชีวิตมากที่สุด จึงสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ร่างกายด้วยวิธีเอนโดไซโทซิส (endocytosis) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์ร่างกายสามารถรับสารสำคัญจากพืชได้อย่างรวดเร็วและเต็มประสิทธิภาพตามที่ต้องการ

การนำสารสกัดแอนโทไซยานินไปใช้ประโยชน์มีหลายด้าน (Pascual-Teresa Maria and Sanchez-Ballesta, 2008) เช่น

1. ใช้เป็นสีย้อมอาหาร (food dye) เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษของผลิตภัณฑ์สีผสมอาหารแอนโทไซยานินสามารถอยู่ในภาพแบบผงและของเหลว จึงสามารถเลือกใช้ได้ตามความต้องการของอาหารและผสมกับส่วนของไข่ขาวเพื่อใช้เป็นสารช่วยให้ความคงตัว (stabilizer) แทนการใช้แป้ง รวมทั้งเพิ่มความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์ที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ต่ำ แต่ทั้งนี้สีผสมอาหารแอนโทไซยานินไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดสูง เช่น น้ามะนาว และครีมเปรี้ยว

2. ใช้เป็นส่วนผสมในแชมพู ซึ่งสารแอนโทไซยานินจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์รากผม (keratinocytes) สร้างผมได้มากขึ้นถึง 3 เท่า รวมทั้งเป็นส่วนผสมในครีมนวดผม

3. ใช้เป็นส่วนผสมในสารกันแดด (sunscreen) ช่วยให้ผิวหนังดูอ่อนกว่าวัย ชะลอความเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากสารแอนโทไซยานินช่วยยับยั้งความเสียหายของผิวหนังจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เมื่อใช้ร่วมกับวิตามินอีจะทำให้การทำงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ทำสบู่ได้ด้วย

4. ช่วยในการผสมเกสร โดยแมลงจะชอบสีส้มของดอกไม้ต่างกัน

5. ช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีความยาวคลื่นสั้น จึงมีพลังงานสูงและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยไปขัดขวางการจำลองแบบของดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

6. ช่วยดูดซับอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) เช่น ในการสังเคราะห์แสงจะมีการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ขึ้น แอนโทไซยานินจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารนี้ ทำให้พิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หมดไป ในแง่ของโภชนาการแอนโทไซยานินช่วยลดความเสี่ยงจากโรคเมเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โดยยับยั้งการรวมตัวระหว่างออกซิเจนกับคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL-cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันที่ไม่พึงประสงค์ ในขณะที่เดียวกันจะเพิ่มปริมาณของคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง (HDL-cholesterol) ที่เป็นไขมันดี ดังนั้นการดื่มน้ำองุ่นแดง วันละ 2-3 แก้วจะช่วยลดอัตราเสี่ยงการแข็งตัวของเลือดได้

ในการสืบค้นสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการสารสกัดแอนโทไซยานิน ได้แก่ กระบวนการดัดแปลงสารจำเพาะเพื่อการลดและชะลอริ้วรอยจากปัญหาหมักหมมและจากแสงแดด [US patent 2005/0191267 A1] โดยใช้สารสกัดแอนโทไซยานินจากผลมัลเบอร์รี่ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินในการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในการดัดแปลงผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้เป็นอย่างดี เพื่อช่วยให้ผิวขาวกระจ่างใส ลดจุดด่างดำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและลดการอักเสบของผิวได้ดี นอกจากนี้ในสิทธิบัตร [US patent 2011/0151029 A1] ได้กล่าวถึงข้อดีของการนำสารกลุ่ม paxillin stimulator ผสมในตำรับร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติ และนำไปตั้งตำรับเครื่องสำอางและเสนอสูตรตำรับที่ช่วยลดริ้วรอยและบำรุงผิว ในปี 2016 ได้มีรายงานอ้างอิงสิทธิบัตร [US patent 2016/0032105 A] ได้กล่าวถึงสารสกัดสีน้ำเงินแอนโทไซยานินและวิธีการสกัดที่เหมาะสม วิธีทำให้สารสีน้ำเงินแอนโทไซยานินเสถียรที่

pH ต่ำและเสถียรต่อแสง นอกจากนี้รายงานจากสิทธิบัตร WO2013/179309 A1 พบว่าสารสกัดและองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากดอกอัญชัน และรากอัญชันมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและมีส่วนช่วยเพิ่มความจำได้

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของอัญชันในด้านเครื่องสำอาง พบว่ามีงานวิจัยที่สนับสนุนถึงสรรพคุณและการนำสารสกัดจากดอกอัญชันมาใช้ประโยชน์โดยอ้างถึงกรณีการสกัดดอกอัญชันด้วยเอทานอล และนำสารสกัดศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดสีเมลานิน และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ melanocyte ในการทดสอบฤทธิ์ของอัญชันในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว พบว่ามีการนำสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลจากดอกอัญชันไปเป็นส่วนประกอบสบู่อาบน้ำ ซึ่งจะได้ประโยชน์จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ทั้งนี้ สารสกัดธรรมชาติที่ได้จากดอกอัญชันนั้น อุดมไปด้วยสารอะดีโนซีน (adenosine) สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) สารแอสตรากาลิน (astragaloside) สารเคอร์เซติน (quercetin) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคหลอดเลือดและโรคหัวใจ สารเคอซิทินเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดมีมากในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว ให้ฤทธิ์ในการป้องกันการอักเสบ ป้องกันแบคทีเรียและไวรัส ป้องกันการแพ้ สารแอฟเซลิน (afzelin) กรดซินนามิกไฮดรอกซี (cinnamic acid, 4-hydroxy) สารอะปาราจิติน (apigenin) กรดอะราชิติก (arachidic acid) สารซิโตสเตอรอล และมีสารสำคัญคือ Genistein ที่มีบทบาทเป็น Antiinflammatory, Antispasmodic และ Antioxidant และมีสารสำคัญอื่นเช่น Germatins pretermatins เป็นต้น

ดังได้กล่าวแล้วนั้นว่าสารสกัดธรรมชาติที่ได้จากดอกอัญชันอุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน ซึ่งสารชนิดนี้เป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารให้สีตามธรรมชาติ โดยสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง สารแอนโทไซยานินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) แต่คุณสมบัติเด่นที่สุดของสารแอนโทไซยานิน คือ ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามิน C วิตามิน E ถึง 2 เท่า จึงอาจเรียกว่า superantioxidant โดยพบว่ามีประสิทธิภาพแรงกว่าวิตามิน C ถึง 20 เท่า และแรงกว่าวิตามิน E 50 เท่า ซึ่งช่วยในการสร้างคอลลาเจนในชั้นผิวหนัง ทำให้ผิวหนังมีความแข็งแรงมากขึ้น ช่วยชะลอความแก่ และแห่งกร้านของผิว โดยการลดการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้ผิวแก่ก่อนวัยให้ลดน้อยลง ช่วยลดกระบวนการสร้างเม็ดสีที่ผิดปกติบนผิว ซึ่งมีสาเหตุมาจากฝ้า กระ หรือจุดด่างดำ อีกทั้งช่วยปรับสภาพและลดปัญหาผิวที่ไม่เท่าเทียมกัน ทำให้ผิวขาวใสได้อีกด้วย

สารแอนโทไซยานินทั่วไปนั้น จะพบในผลไม้และดอกไม้ที่มีสีน้ำเงิน สีแดง หรือสีม่วง มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยที่พืชจะสร้างสารนี้ขึ้นมาเพื่อป้องกันดอกหรือผลตัวเองจากอันตรายของแสงแดดหรือโรคภัย สีฟ้าที่พบในดอกอัญชันนี้เป็นสีเดียวที่พบในบลูเบอร์รี่ (blueberries) เชอร์รี่ (cherries) ราสเบอร์รี่ (raspberries) ลูกเกด (black currants) องุ่นม่วง (purple grape)

และไวน์แดง (red wine) เป็นต้น และช่วยในการปรับปรุงสุขภาพของเซลล์โดยการหยุดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระที่สามารถเข้าผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ ซึ่งจะมีผลให้เกิดความเสี่ยงของโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ และสารแอนโทไซยานิน ยังมีคุณสมบัติช่วยชะลอความชรา ลดเลือนริ้วรอยและช่วยให้ผิวของเรามีสุขภาพดี เพราะสารแอนโทไซยานิน สามารถที่จะเพิ่มคอลลาเจนและอีลาสติน เพิ่มความยืดหยุ่นของเซลล์ผิวได้

สารแอนโทไซยานินยังมีสรรพคุณในการเป็นส่วนผสมของสารกันแดด (sunscreen) และช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ต ช่วยให้ผิวคุณอ่อนกว่าวัย ชะลอความเสื่อมสภาพของผิวหนัง ทำให้แลดูผิวอ่อนกว่าวัย เนื่องจาก สาร แอนโทไซยานิน ช่วยยับยั้งความเสียหายของผิวหนังจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เมื่อใช้ร่วมกับวิตามิน E จะทำให้การทำงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในขณะที่วิตามิน E เป็นวิตามินที่ช่วยในการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายหลายระบบ และเป็น antioxidant ที่ช่วยให้เซลล์ต่างๆ ช่วยชะลอความแก่ได้ ช่วยให้ผิวขาวสดใส และช่วยให้ปอดทำงานดีขึ้นและไม่อ่อนเพลียง่าย

การศึกษาทางด้านพิษวิทยาในสัตว์ทดลอง หมายถึงการทดสอบความเป็นพิษของอาหารหรือสารเคมีใด ๆ ต่อระบบทั่วไปในร่างกายของสัตว์ทดลอง ที่มีความสัมพันธ์ในลักษณะเดียวกันกับการได้รับสัมผัสในมนุษย์ทั้งนี้การประเมินความปลอดภัยของอาหารหรือสารใดๆ ที่จะนำมาใช้เป็น ส่วนประกอบของอาหาร การศึกษาจะต้องให้สัตว์ทดลองได้รับทางปากโดยการกิน เพื่อนำผลการทดลองมาอธิบายและคาดการณ์ความเป็นพิษจากการบริโภคอาหารหรือสารนั้นๆ ในมนุษย์

การศึกษาทางพิษวิทยาดังกล่าวต้องปฏิบัติตามระเบียบวิธีการวิจัยที่ดีตามมาตรฐานสากล เช่น ตามแนวทาง (guidelines) ของ Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) หรือ The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) หรือ World Health Organization (WHO) หรือ แนวทางอื่นที่เทียบเท่า โดยการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในสัตว์ทดลองประเภทสัตว์ฟันแทะ (toxicity test in rodent) สามารถแบ่งประเภทการศึกษาตามระยะเวลาของการทดสอบความเป็นพิษ (David and Steven, 2008) (OECD, 2001) (OECD, 2009) ได้ดังตาราง

ประเภทการศึกษา	พิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity Study)	พิษกึ่งเรื้อรัง (Subchronic Toxicity Study)	พิษเรื้อรัง (Chronic Toxicity Study)
ระยะเวลา	- ระยะเวลาสัมผัสสาร: 24 ชั่วโมง - ระยะเวลาสังเกต อาการ: ประมาณ 14 วัน (1-2	90 วัน (3 เดือน)	≥12 เดือน (OECD) หรือ ≥ 6 เดือน (ICH)

ประเภทการศึกษา	พิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity Study)	พิษกึ่งเรื้อรัง (Subchronic Toxicity Study)	พิษเรื้อรัง (Chronic Toxicity Study)
	สัตว์) (สัตว์)		
เพศ	ทั้งเพศผู้และเพศเมีย	ทั้งเพศผู้และเพศเมีย	ทั้งเพศผู้และเพศเมีย
จำนวน	5 ตัว/เพศ/ขนาดสาร	10-20 ตัว/เพศ/ขนาดสาร	10-20 ตัว/เพศ/ขนาดสาร (OECD)
ระดับของสารที่ใช้ในการทดสอบ	ขนาดสาร (dose) สูงสุดที่ใช้คือ ขนาด 2,000 หรือ 5,000 มก./กก. (พิจารณาจากแนวโน้มความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบตาม limit test ของ OECD)	- อย่างน้อยต้องมีขนาดสาร (dose) ที่ใช้ในการทดสอบ 3 ระดับ และมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม - ให้สารวันละครั้งเป็นเวลา 90 วัน	- อย่างน้อยต้องมีขนาดสาร (dose) ที่ใช้ในการทดสอบ 3 ระดับ ได้แก่ MTD (Maximum Tolerable Dose), 1/2 ของ MTD หรือ 1/4 ของ MTD และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม - ให้สารวันละครั้งเป็นเวลา ≥ 12 เดือน
ผลการศึกษา	1) LD ₅₀ 2) อาการไม่พึงประสงค์อื่นๆหรือความเป็นพิษเฉียบพลันที่เกิดขึ้นกับระบบต่างๆ ของร่างกาย	1) NOEL/NOAEL 2) ลักษณะความเป็นพิษต่ออวัยวะเฉพาะ (specific organs) หรืออวัยวะที่ได้รับผลจากขนาดที่ทำให้เกิดพิษ (LOAEL)	1) ความเป็นพิษเรื้อรังของสารเคมี 2) ความเป็นพิษต่ออวัยวะเป้าหมาย (target organs) 3) ลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างขนาดสาร (dose) ที่ใช้ทดสอบกับความเป็นพิษที่เกิดขึ้น 4) คาดคะเนความเป็นพิษระยะยาวต่อมนุษย์ (ในขนาดที่ได้รับ) 5) ข้อมูลในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับกลไก (วิธี) การเกิดพิษ

ประเภทการศึกษา	พิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity Study)	พิษกึ่งเรื้อรัง (Subchronic Toxicity Study)	พิษเรื้อรัง (Chronic Toxicity Study)
			ของสาร

ที่มา: OECD guidelines และ Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (2008)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1.1 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชัน

1.1.1 การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบลักษณะของพืชโดยผู้เชี่ยวชาญ
2. ระบุส่วนที่ใช้ประโยชน์ เช่น ดอก ใบ เกล็ด เป็นต้น
3. ตรวจสอบลักษณะของตัวอย่างพืช

3.1 โดยการตรวจสอบลักษณะภายนอกของตัวอย่างพืช เพื่อช่วยในการพิจารณาว่าไม่มีสมุนไพรชนิดอื่นปนปลอมมา ด้วยการตรวจสอบเบื้องต้นในลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าหรือแว่นขยาย การดูสี การดมกลิ่น การสัมผัส เป็นต้น

3.2 โดยการตรวจสอบลักษณะเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค chromatography ได้แก่ High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหากกลุ่มสารสำคัญในพืช เนื่องจากโดยอาศัยหลักการที่ว่าไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ผลการตรวจสอบจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวเปรียบเสมือนลายพิมพ์นิ้วมือ (Fingerprint) ของพืชสมุนไพรนั้น ๆ

4. การตรวจหาปริมาณเถ้า เป็นการหาสิ่งสกปรกเหลืออยู่หลังจากการเผาสมุนไพรที่อุณหภูมิที่กำหนด ด้วยการหาปริมาณเถ้าชนิดต่าง ๆ ในพืชสมุนไพร จะเป็นเครื่องบ่งชี้คุณภาพและความสะอาดของสมุนไพร โดยสมุนไพรแต่ละชนิดก็จะมีปริมาณเถ้าชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันไป โดยการตรวจหาปริมาณเถ้าทั้งหมด การตรวจหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

5. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น การกำหนดปริมาณน้ำที่อนุญาตให้มีได้ในสมุนไพร โดยทั่วไปกำหนดให้มีปริมาณน้ำหรือความชื้นไม่เกินร้อยละ 8 หากมีปริมาณมากกว่าที่กำหนดสมุนไพรอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี หรือเกิดการสลายตัวได้ ซึ่งสามารถตรวจหาปริมาณความชื้นในสมุนไพรโดยใช้เครื่องวัดความชื้นอัตโนมัติที่เรียกว่า เครื่อง Moisture and ash analyzer

6. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา เช่น การตรวจวิเคราะห์ Total aerobic microbial count, Total combined yeasts/molds count, Bile-tolerant gram negative bacteria, *E. coli* และ *Salmonella* spp. (ต้องไม่พบ) เป็นต้น

7. การตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น แคดเมียม ทั่วไปโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อม หรือเกิดจากสารเคมีที่ใช้กำจัดศัตรูพืชในระหว่างการเพาะปลูกจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค จึงมีการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนสารพิษโดยใช้วิธี atomic absorption spectrophotometry (AAS)

8. การปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช การตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษตกค้าง ซึ่งสารพิษตกค้างที่สำคัญมี 4 ประเภท คือ สารประกอบคลอรีน สารประกอบฟอสเฟต สารคาร์บาเมต และสารไพรีทรอยด์ โดยการทำด้วยการใช้ชุดทดสอบหาการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเป็นการตรวจหาเบื้องต้น เช่น ชุดทดสอบเอ็ม เจ พี เค (M J P K Test Kit) ตรวจหาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (กลุ่มยาฆ่าแมลงออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต) หรือชุดตรวจชนิดเคมีกำจัดแมลง 4 กลุ่ม (TLC MedSci Pest Kit) หรือชุดตรวจคัดกรองสารเคมีกำจัดแมลง (2 กลุ่ม) (GPO-M Kit) หรือการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชโดยห้องปฏิบัติการวิจัย เป็นต้น

1.1.2 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคการแช่หมัก (maceration)

ในการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยวิธีการแช่หมัก ทำโดยใช้ภาชนะโหลแก้วมีฝาปิดมิดชิด ดอกอัญชันที่นำมาสกัด เป็นดอกอัญชันสดน้ำหนัก 100 กรัม ล้างและผึ่งแห้งโดยไม่นำไปอบเมื่อระเหย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 3 อัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำส่วนผสมเข้าเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยรอบการเขย่าเท่ากับ นำตัวอย่างบรรจุในขวดโหลสะอาดที่เตรียมไว้ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยจะทำการคนส่วนผสมทุกวัน เช้า และเย็น ครั้งละ 30 นาที (Saejung *et al.*, 2018) จากนั้นนำสารสกัดกรองแยกตัวทำละลายออก นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer สารสกัดแห้งที่ได้นำไปวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH (Net-anong *et al.*, 2015) ทดสอบพิษเฉียบพลันในตัวอย่างสารสกัดจากดอกอัญชัน

1.1.3 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย

ในการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย อาศัยหลักการของเทคนิค microwave assisted extraction (MAE) โดยดัดแปลงใช้ไมโครเวฟร่วมกับอุปกรณ์ reflux ดอกอัญชันที่นำมาสกัด เป็นดอกอัญชันสดน้ำหนัก 2 กรัม ล้างและผึ่งแห้งโดยไม่นำไปอบเมื่อระเหย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 โดย

ปริมาตร ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 3 อัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในส่วนของเครื่องไมโครเวฟจะทำการสกัดที่เวลาครั้งที่ 1 นาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กำลังไฟฟ้าที่ 450 วัตต์ (Saejung *et al.*, 2018) จากนั้นนำสารสกัดกรองแยกตัวทำละลายออก นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer สารสกัดแห้งที่ได้นำไปวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม (Net-anong *et al.*, 2015) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH [15] ทดสอบพิษเฉียบพลันเบื้องต้นในตัวอย่างสารสกัดจากดอกอัญชัน

1.1.4 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส (osmotic dehydration)

วัตถุดิบพืชคือ ดอกอัญชัน ซึ่งปลูกและมีอายุ 4 เดือน ควบคุมด้วยเกษตรอินทรีย์โดยมีพื้นที่ปลูกในแปลงควบคุมในจังหวัดลพบุรี

1. เมื่อตรวจสอบคุณภาพของดอกอัญชันแล้ว จากนั้นนำดอกเข้าสู่กระบวนการสกัดสารแอนโทไซยานิน
2. นำดอกอัญชันสดล้างให้สะอาด และทำให้แห้ง นำดอกเข้าบดผสมกับน้ำผึ้งในอัตราส่วนที่กำหนด และนำส่วนผสมเข้าสู่เครื่องสกัดในระบบปิดสุญญากาศ
3. เพิ่มสารยัดเกาะทำให้เป็นผงแกรนูลที่มีลักษณะเป็นส่วนผสมก้อนเล็ก ๆ
4. อบผงแกรนูลให้แห้งด้วยความร้อนหรือลมร้อนเพื่อให้สามารถเตรียมขึ้นภาพเป็นเม็ดผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ
5. ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์
6. การตรวจสอบมาตรฐานเม็ดผลิตภัณฑ์ และทดสอบพิษเฉียบพลันเบื้องต้นในตัวอย่างสารสกัดจากดอกอัญชัน

ในการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันดังกล่าว ทำโดยใช้เทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ซึ่งเป็นการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส (osmotic dehydration) เป็นวิธีการทำแห้ง (dehydration) โดยการแช่อาหารในสารละลาย เช่น น้ำตาล เกลือ เพื่อให้เกิดการออสโมซิส (osmosis) โดยน้ำภายในเซลล์อาหารจะแพร่ออกสู่สารละลายภายนอก ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ที่มีสมบัติเป็นเยื่อกึ่งซึมผ่านได้ (semi permeable membrane) หลักการนี้ใช้ในการดึงน้ำออกจากวัตถุดิบ เช่น ผัก ผลไม้ ก่อนนำไปทำแห้งด้วยวิธีปกติ นำหลักการวิธีการนี้มาดัดแปลงร่วมกับอนุสิทธิบัตรที่ได้จดแจ้ง เรื่อง กรรมวิธีการผลิตแกรนูลที่มีส่วนประกอบจากพืชและน้ำผึ้ง เลขที่คำขอ 1703002556 วันที่ 25 ธันวาคม 2560 (จุติพรรณ, 2560)

นำดอกอัญชันสดล้างให้สะอาด และทำให้แห้ง โดยใช้ดอกอัญชันสด 100 กรัม และผสมกับน้ำผึ้งที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วนพืชต่อน้ำผึ้ง 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำส่วนผสมเข้าสู่เครื่องสกัดในระบบปิดสุญญากาศ เพิ่มสารยัดเกาะทำให้เป็นผงแกรนูลที่มีลักษณะเป็น

ส่วนผสมก้อนเล็กๆ อบผงเกรนูลให้แห้งด้วยความร้อนหรือลมร้อน ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้คือ ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีองค์ประกอบสารสกัดดอกอัญชัน ในที่นี้เรียกชื่อว่า เม็ดผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำเม็ดผลิตภัณฑ์ของสารสกัดจากดอกอัญชันที่ได้มาวิเคราะห์ร้อยละในการสกัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Net-anong *et al.*, 2015)

วิเคราะห์แอนโทไซยานิน และองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด

การตรวจสอบมาตรฐานเม็ดผลิตภัณฑ์เบื้องต้น เช่น

- 1) การตรวจสอบความผันแปรของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่องชั่ง
- 2) ทดสอบการละลาย
- 3) ทดสอบความแข็งและความกรอบของเม็ดผลิตภัณฑ์ และวัดความหนาของเม็ดผลิตภัณฑ์เป็นต้น
- 4) การทดสอบความคงสภาพของเม็ดผลิตภัณฑ์ โดยการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิและความชื้นสูง

1.2 การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับพิจารณาเกี่ยวกับความปลอดภัยของสารทดสอบ

- 1) การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูขาว (OECD/OECD 420, 2001)
การป้อนสารทดสอบขนาด 5,000 มก/กก แก่ หนูขาวเพศเมีย จากนั้นสังเกตอาการภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าหนูไม่ตาย จะสังเกตอาการต่อทุกวัน ติดต่อกันนาน 14 วัน ตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ เมื่อสิ้นสุดการศึกษา

- 2) การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาว (OECD/OECD 407, 1995)
ศึกษาในหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย ป้อนสารทดสอบในขนาดต่างๆกัน 3 ขนาด (ต่ำ กลาง สูง) ทุกวันติดต่อกันนาน 90 วัน เพิ่มกลุ่มป้อนสารทดสอบในสูงนาน 90 วันแต่หลังจากนั้นจะสังเกตอาการต่ออีก 14 วันโดยไม่ให้สารทดสอบ (เพื่อประเมินว่า ถ้ามีความเป็นพิษเกิดขึ้น จะกลับเป็นปกติได้หรือไม่ เมื่อหยุดการให้สารทดสอบ)

การประเมินความเป็นพิษ พิจารณาจากหัวข้อต่อไปนี้

- น้ำหนักตัว พฤติกรรมทั่วไป การเคลื่อนไหว อาการความผิดปกติต่างๆ โดยบันทึกทุกวัน
- น้ำหนัก และ พยาธิสภาพของ อวัยวะต่างๆ รวมทั้งสมอง
- ค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก

จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 50 ตัว

1.3 การตั้งตำรับเครื่องสำอางจากสารสกัดแอนโทไซยานิน

1. เตรียมและพัฒนาตำรับ โดยมีส่วนประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชัน

สารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดได้จากสภาวะและวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อเตรียมตำรับเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยมี ส่วนประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชัน ทั้งนี้ตำรับทั้งสองชนิดประกอบด้วย เซรั่มบำรุงผิวหน้า และ ครีมบำรุงผิวหน้า สำหรับการพัฒนาแต่ละตำรับเครื่องสำอางบำรุงผิวแต่ละชนิดนั้น จะผสมสารสกัดที่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ต่อหนึ่งผลิตภัณฑ์ (ไม่ได้แสดง องค์ประกอบของแต่ละสูตร) จากนั้นศึกษาอายุการเก็บของตำรับผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาการ เปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี กลิ่น และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ 3 สภาวะคือ ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน และทดสอบคุณสมบัติ ตำรับผลิตภัณฑ์ในด้านอื่นๆ เช่น ความชุ่มชื้น ความพึงพอใจ และการแพ้ เป็นต้น

ผลการวิจัย

1.1 การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ

ในการตรวจสอบลักษณะของพืชโดยผู้เชี่ยวชาญ พืชที่ใช้คือ ดอกอัญชัน ใช้เฉพาะส่วน ดอกไม่มีใบ ลักษณะภายนอกเป็นดอกสีม่วง ในการตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography พบว่าปรากฏสารฟลาโวนอยด์และฟีนอลิก ปริมาณเท่าทั้งหมดเท่ากับ NMT ร้อยละ 8.0 w/w และปริมาณเท่าที่ไม่ละลายในกรดเท่ากับ NMT ร้อยละ 1.0 w/w ความชื้นของดอก อัญชันไม่เกินร้อยละ 10 ดอกอัญชันที่นำมาสกัดไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยพบว่า Aerobic Bacteria < 105 CFU / g Yeast and Mold < 103 CFU / g Enterobacteria อื่นๆ < 103 / g Escherichia coli < 50 / g ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ไม่พบเชื้อ แบคทีเรีย *Salmonella spp.* ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium spp.* ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

ดอกอัญชันไม่พบโลหะหนักและสารหนูปนเปื้อน ในการตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษ ตกค้างที่สำคัญมี 4 ประเภท คือ สารประกอบคลอรีน สารประกอบฟอสเฟต สารคาร์บาเมต และสาร ไพรีทรอยด์ ผลการตรวจไม่พบการปนเปื้อน

1.2 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชัน

1.2.1 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคการแช่หมัก

ในการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยวิธีการแช่หมัก ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างดอก อัญชันต่อตัวทำละลาย 3 อัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 กรัมต่อมิลลิลิตร และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน [14] จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 4 กรองแยกตัวทำละลายออก นำไประเหย

ตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer สารสกัดแห้งที่ได้แสดงในภาพที่ 5 จะนำไปวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม (Net-anong *et al.*, 2015) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH แสดงผลของร้อยละของการสกัด ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคการแช่หมัก ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย ในตารางที่ 1 ลักษณะของสารสกัดจากดอกอัญชัน ที่เตรียมได้ในทุกตัวอย่างจะเป็นผงละเอียด สีม่วงเข้ม



ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคการแช่หมัก ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย

อัตราส่วน ดอกอัญชัน ต่อตัวทำ ละลาย (w/v)	ร้อยละ ผลผลิต	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม สมมูล Trolox ต่อ กรัมแห้ง แห้ง, mg Trolox equivalents/g of dry weight)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูล แกลลิก ต่อ กรัมแห้งแห้ง, mg gallic acid equivalents/g of dry weight)
1:1	5.92±0.13	22.78±0.13	22.16±1.15
1:2	6.04±0.11	26.78±0.09	28.36±1.12
1:3	7.51±0.32	32.78±0.76	40.06±1.01

ผลการศึกษาพบว่า ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ร้อยละการสกัดสูงสุด และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดทุกชนิด พบว่าที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย ที่ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดที่เตรียมได้ที่อัตราส่วนอื่นๆ

1.2.2 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย

ในการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร โดยดัดแปลงใช้ไมโครเวฟครัวเรือน ร่วมกับอุปกรณ์ reflux ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 3 อัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 กรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของเครื่องไมโครเวฟจะทำการสกัดที่เวลาคงที่ 1 นาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กำลังไฟฟ้าที่ 450 วัตต์ (Saejung *et al.*, 2018) สารสกัดที่ได้ในแต่ละอัตราส่วนการทดลอง เมื่อกรองแยกตัวทำละลาย ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer แล้วนำมาวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH (Net-anong *et al.*, 2015) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย

อัตราส่วน ดอกอัญชัน ต่อตัวทำ ละลาย (w/v)	ร้อยละ ผลผลิต	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม สมมูล Trolox ต่อ กรัม น้ำหนัก แห้ง, mg Trolox equivalents/g of dry weight)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูล แกลลิก ต่อ กรัม น้ำหนักแห้ง, mg gallic acid equivalents/g of dry weight)
1:1	6.02±0.19	24.78±0.04	23.16±0.02
1:2	6.93±0.04	28.91±0.01	29.36±0.26
1:3	7.57±0.09	34.03±0.03	41.06±0.01

ผลการศึกษาพบว่า ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ร้อยละการสกัดสูงสุด และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดทุกชนิด พบว่าที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย ที่ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดที่เตรียมได้ที่อัตราส่วนอื่นๆ ซึ่งพบว่า ผลการทดลองสอดคล้องกับการสกัดด้วยเทคนิคการแช่หมัก โดยที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย ที่ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ร้อยละผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด ทั้งนี้พบว่า การสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลายจะใช้เวลาการสกัดสั้นกว่า และให้ร้อยละผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าที่อัตราส่วนสกัดเดียวกัน

1.2.3 การเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส

การเตรียมสารสกัดด้วยหลักการออสโมซิสนี้ ได้ทำการทดลองโดยใช้น้ำผึ้งเป็นน้ำกระสายยา ทำหน้าที่เสมือนตัวทำละลายในการสกัด ทำการสกัดโดยใช้อัตราส่วนพืชต่อน้ำผึ้ง 1:1, 1:2 และ 1:3 w/v นำส่วนผสมเข้าตู้เครื่องสกัดในระบบปิดสุญญากาศ เพิ่มสารยัดเกาะทำให้เป็นผงแกรนูลที่มีลักษณะเป็นส่วนผสมก้อนเล็กๆ อบผงแกรนูลให้แห้งด้วยความร้อนหรือลมร้อน ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้คือผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีองค์ประกอบสารสกัดดอกอัญชัน จากนั้นนำสารสกัดจากดอกอัญชันที่ได้มาวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Net-anong *et al.*, 2015) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ที่ 3 อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย

อัตราส่วน พืช ต่อตัวทำ ละลาย (w/v)	ร้อยละของ การสกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม สมมูล Trolox ต่อ กรัม น้ำหนักรักษา, mg Trolox equivalents/g of dry weight)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูล แกลลิก ต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง, mg gallic acid equivalents/g of dry weight)
1:1	7.54±0.08	38.78±0.12	44.90±1.12
1:2	7.52±0.03	32.78±0.12	35.90±1.12
1:3	7.51±0.09	30.78±0.12	34.90±1.12

ผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ร้อยละผลผลิตสูงสุดเช่นเดียวกัน เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรนี้ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนสกัดอื่นๆ นอกจากนี้พบว่าการสกัดที่อัตราส่วน 1:1 จะให้ร้อยละผลผลิตปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมากกว่าสารสกัดที่เตรียมได้จากเทคนิคการสกัดแบบแช่หมักและเทคนิคการใช้ไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลายในทุกอัตราส่วน ทั้งนี้อาจเนื่องด้วย การใช้ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด หลักการของแต่ละเทคนิค ทำให้ผลการสกัดแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ถ้าสกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ถือว่าเป็นการสกัดที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆ ทำให้มีความปลอดภัยสูงกว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเช่น สารละลายเอทานอล

การวิเคราะห์พฤษเคมีของสารสกัดจากดอกอัญชัน

ในการวิเคราะห์พฤษเคมีของสารสกัดจากดอกอัญชันนั้น จะนำตัวอย่างของสารสกัดแห้งของดอกอัญชันมาทดสอบพฤษเคมีเบื้องต้น โดยนำตัวอย่างสารสกัดผสมกับสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 2 มิลลิลิตร และทดสอบกับสารเคมีจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบสารทุติยภูมิในพืช เช่น สารทดสอบแอลคาลอยด์ สารทดสอบฟีนอลิก สารทดสอบไกลโคไซด์ สารทดสอบซาโปนิน สังเกตผลและวิเคราะห์ผลด้วยการสังเกตสี และการตกตะกอนของสารที่ทดสอบ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาพฤษเคมีของสารสกัดจากดอกอัญชันจากเทคนิคการสกัด 3 เทคนิค ในทุกอัตราส่วนของการสกัด

อัตราส่วน พืชต่อตัว ทำละลาย (w/v)	ฟีนอลิก	แอลคาลอยด์	ไกลโคไซด์	ซาโปนิน	ฟลาโวนอยด์	แทนนิน	เทอร์ พินอย	ควิโนน
1:1	+	-	+	-	+	+	+	+
1:2	+	-	+	-	+	+	+	+
1:3	+	-	+	-	+	+	+	+
1:1	+	-	+	-	+	+	+	+
1:2	+	-	+	-	+	+	+	+
1:3	+	-	+	-	+	+	+	+
1:1	+	-	+	-	+	+	+	+
1:2	+	-	+	-	+	+	+	+
1:3	+	-	+	-	+	+	+	+

สัญลักษณ์ + คือ พบกลุ่มสารทุติยภูมิ - คือ ไม่พบกลุ่มสารทุติยภูมิ

ผลการศึกษาชนิดของกลุ่มสารประกอบทุติยภูมิในสารสกัดจากดอกอัญชันทั้ง 3 เทคนิคการสกัดและทุกอัตราส่วนสกัด ให้ผลสอดคล้องกันคือ ทุกสารสกัดพบสารกลุ่มไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ที่ประกอบด้วย ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม และองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยมีตัวอย่างสารสกัดจากดอกอัญชัน ที่เตรียมด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดสอบพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินรวมมีค่าเท่ากับ 254.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในส่วนของปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดดอกอัญชัน แสดงในตารางที่ 5 โดยพบปริมาณสารประกอบ Quercetin สูงที่สุด รองลงมาคือ Isoquercetin และ Rutin ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากดอกอัญชัน ที่เตรียมด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
Gallic acid	265.03
Eriodictyol	20.40
Isoquercetin	1,306.00
Kaempferol	12.79
Quercetin	1,436.00
Rutin	1,106.00
Catechin	39.27
Tannic acid	246.90

1.3 การเตรียมสารสกัดดอกอัญชันในรูปแบบเม็ดผลิตภัณฑ์

นำสารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาเตรียมผลิตภัณฑ์รูปแบบเม็ดด้วยการขึ้นรูปเม็ดด้วยแป้งข้าวโพด ลักษณะเม็ดผลิตภัณฑ์แสดงในภาพที่ 6 จากนั้นนำเม็ดผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้วิเคราะห์และตรวจสอบลักษณะของเม็ดผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการทดสอบทางเภสัชวิทยา



ภาพที่ 6 ลักษณะเม็ดผลิตภัณฑ์ของสารสกัดดอกอัญชัน ที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัด คือ ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

การวิเคราะห์และตรวจสอบลักษณะของเม็ดผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการทดสอบทางเภสัชวิทยา

1. การหาความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ (วิเคราะห์โดยชั่งด้วยเครื่องชั่งแบบวิเคราะห์ 4 ตำแหน่ง) แสดงข้อมูลในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์

เม็ดที่	น้ำหนัก (mg)	เม็ดที่	น้ำหนัก (mg)
1	509.9	11	496.8
2	499.1	12	494.9
3	490.5	13	510.6
4	489.8	14	519.0
5	487.1	15	508.4
6	491.0	16	509.8
7	515.5	17	492.0
8	517.8	18	479.7
9	514.1	19	485.6
10	511.5	20	505.0

คำนวณน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดยาได้เท่ากับ 501.4 ± 12.1 mg

เนื่องจาก น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดผลิตภัณฑ์ มากกว่า 324 mg

ดังนั้น ใช้ค่าเบี่ยงเบนของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 5

นั่นคือ ช่วงกำหนด (1 เท่า) ของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน เท่ากับ 476.33 – 526.47 mg

ช่วงกำหนด (2 เท่า) ของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน เท่ากับ 451.26 – 551.54 mg

ผลการประเมิน

ผลิตภัณฑ์ทุกเม็ดที่สุ่มมา 20 เม็ด มีน้ำหนักเม็ดยาอยู่ในช่วงกำหนด (1 เท่า) ของน้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน

ดังนั้น เม็ดผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ ผ่านการทดสอบหาความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยา

หมายเหตุ

ใน หัวข้อ Dietary Supplements ของหนังสือ The United States Pharmacopeia 35 / The National Formulary 30 (USP 35 / NF 30) กำหนดมาตรฐานของความแปรปรวนน้ำหนักยาเม็ดว่า ให้สุ่ม

ตัวอย่างยาในแต่ละครั้งผลิต (batch) จำนวน 20 เม็ด ชั่งน้ำหนักทีละ 1 เม็ด และคำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ย โดยกำหนดเกณฑ์ว่า จะต้องมียาน้ำหนักเม็ดยาไม่เกิน 2 เม็ด ที่มีความเบี่ยงเบนมากกว่าจำนวนร้อยละที่กำหนดไว้ และต้องไม่มีเม็ดใดเลยที่มีความเบี่ยงเบนมากกว่า 2 เท่าของจำนวนร้อยละที่กำหนดไว้ในตาราง ดังนี้

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเม็ดยา (mg)	ค่าเบี่ยงเบนคิดเป็นร้อยละ
130 หรือ น้อยกว่า	10
130-324	7.5
มากกว่า 324	5.0

2. ความหนาและเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดผลิตภัณฑ์ (วิเคราะห์โดยวัดด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์) แสดงข้อมูลในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าความหนาและเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดผลิตภัณฑ์

เม็ดที่	ความหนา (cm)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (cm)
1	0.57	1.09
2	0.57	1.09
3	0.57	1.09
4	0.57	1.09
5	0.57	1.09

คำนวณความหนาเฉลี่ยของเม็ดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 0.57 ± 0.00 cm

คำนวณเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 1.09 ± 0.00 cm

หมายเหตุ

- ไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับความหนาของเม็ดยา แต่ความหนาของเม็ดยาขึ้นกับน้ำหนักของยาเม็ดแรงที่ใช้ในการตอกเม็ด และความหนาแน่นของผงยาก่อนตอกยาเม็ด การควบคุมให้ยาเม็ดมีน้ำหนักสม่ำเสมอจะขึ้นกับการไหลที่ดีของผงยาก่อนตอกเป็นยาเม็ด ซึ่งจะทำให้ได้ยาเม็ดที่มีความหนาสม่ำเสมอ โดยในแต่ละครั้งที่ผลิต อาจสุ่มตัวอย่างมาทดสอบ 10 เม็ด

- ไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดยา เนื่องจากขึ้นอยู่กับขนาดของปั๊มและสากที่ใช้ในการตอกเม็ดยา

3. ความแข็งแรงของเม็ดผลิตภัณฑ์ (วิเคราะห์โดยวัดด้วยเครื่องวัดความแข็งแรงของเม็ดยา) แสดงข้อมูลในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ความแข็งแรงของเม็ดผลิตภัณฑ์

เม็ดที่	ความแข็ง (kg)	เม็ดที่	ความแข็ง (kg)
1	5.1	6	5.7
2	4.0	7	5.6
3	5.5	8	4.3
4	5.3	9	4.5
5	4.1	10	4.7

คำนวณความแข็งแรงเฉลี่ยของเม็ดผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับ 4.9 ± 0.6 kg

หมายเหตุ

ไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับความแข็งแรงของยาเม็ดในเก็ฐตำรับ แต่ควรควบคุมมาตรฐานความแข็งแรงของเม็ดยาให้อยู่ในระดับหนึ่งที่ทำให้ยาเม็ดไม่หักบิ่นหรือกร่อนในระหว่างกระบวนการผลิตและการขนส่ง ซึ่งโดยทั่วไปจะกำหนดให้ยาเม็ดมีความแข็งแรงประมาณ 4-6 kg โดยในแต่ละครั้งที่ผลิต อาจสุ่มตัวอย่างมาทดสอบ 10 เม็ด

ดังนั้น เม็ดผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ มีความแข็งแรงของเม็ดผลิตภัณฑ์อยู่ในเกณฑ์ทั่วไป

4. การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความกร่อนของเม็ดผลิตภัณฑ์ (วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดความกร่อนของเม็ดยา โดยใช้ความเร็ว 100 รอบในเวลา 4 นาที)

น้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ (14 เม็ด) ก่อนทดสอบ เท่ากับ 6.9869 กรัม

น้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ (14 เม็ด) หลังทดสอบ เท่ากับ 6.9698 กรัม

ดังนั้น น้ำหนักเม็ดผลิตภัณฑ์ที่หายไป เท่ากับ 0.0171 กรัม

คิดเป็น ความกร่อนของเม็ดผลิตภัณฑ์ เท่ากับ $(0.0171 / 6.9869) \times 100 = 0.24 \%$

ผลการประเมิน

จากการทดสอบ ได้เปอร์เซ็นต์ความกร่อนของเม็ดผลิตภัณฑ์น้อยกว่า 1 % และไม่มีเม็ดใดแตกหักเสียหาย

ดังนั้น เม็ดผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ ผ่านการทดสอบเรื่องความกร่อนของเม็ดยา

หมายเหตุ

ในระหว่างการขนส่งยาเม็ด อาจเกิดการกระแทกกันเองหรือกระแทกกับผนังภาชนะบรรจุ ทำให้ยาเม็ดกร่อนและแตกหักเสียหายได้ ดังนั้น ตำรับยาเม็ดต้องเตรียมให้ได้ยาเม็ดที่มีความกร่อนต่ำ เพื่อต้านทานความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการขนส่ง โดยควรยึดตามเกณฑ์ของหนังสือ The United States Pharmacopeia 35 / The National Formulary 30 (USP 35 / NF 30) ที่กำหนดให้ยาเม็ดไม่เคลือบ ให้มีความกร่อนได้ไม่เกิน 1 % โดยไม่มีเม็ดใดแตกหักเสียหาย ซึ่งมีวิธีการ คือ หากน้ำหนักยาเม็ดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 650 mg ให้ชั่งเม็ดยามาให้ได้น้ำหนักรวมของเม็ดยาเท่ากับ 6.5 g หากน้ำหนักเม็ดยามากกว่า 650 mg ให้นำมาทดสอบจำนวน 10 เม็ด ปิดฝุ่นที่ติดเม็ดยาออกให้หมด แล้วนำไปใส่เครื่องวัดความกร่อน โดยเปิดเครื่องหมุนทั้งสิ้น 100 รอบ เป็นเวลา 4 นาที นำเม็ดยาออกจากเครื่อง ปิดฝุ่นออกให้หมด แล้วนำไปชั่งอีกครั้ง จากนั้นคำนวณหาร้อยละความกร่อนได้จาก

$$\% \text{ ความกร่อนยาเม็ด} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนทดสอบ} - \text{น้ำหนักหลังทดสอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนทดสอบ}}$$

5. การวิเคราะห์ระยะเวลาในการแตกตัวของเม็ดผลิตภัณฑ์

(วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดระยะเวลาในการแตกตัวของเม็ดผลิตภัณฑ์ โดยใช้เม็ดผลิตภัณฑ์ทดสอบ 6 เม็ด ทดสอบการแตกตัวในสารละลาย 0.05 M acetate buffer pH 4.5)

ผลการทดสอบ

เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เม็ดผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ แตกตัวได้หมดเพียง 1 เม็ด ส่วนเม็ดผลิตภัณฑ์อีก 5 เม็ด ยังมีบางส่วนแตกตัวไม่หมด เหลืออยู่บนตะแกรง เมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที เม็ดยาทั้ง 6 เม็ดที่ทดสอบ แตกตัวได้หมด

ผลการประเมิน

เนื่องจากเม็ดผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบเป็นเม็ดผลิตภัณฑ์ธรรมดา ไม่ได้เคลือบเม็ดยา ควรมีระยะเวลาในการแตกตัวของเม็ดผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 30 นาที โดยเม็ดผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 เม็ด ต้องแตกตัวหมด และไม่มีส่วนใดเหลือบนตะแกรงเลย จึงจะถือว่าผ่านการทดสอบการแตกตัวของเม็ดยา

หมายเหตุ

ตามเกณฑ์ของหนังสือ The United States Pharmacopeia 35 / The National Formulary 30 (USP 35 / NF 30) กำหนดระยะเวลาในการแตกตัวของเม็ดยา เมื่อครบระยะเวลาการทดสอบ ให้พิจารณาว่า เม็ดทั้ง 6 เม็ดแตกตัวหมดหรือไม่ ถ้าไม่มีเหลือบนตะแกรงเลยถือว่าผ่าน การทดสอบ โดยทั่วไปยาเม็ดไม่เคลือบใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที ยาเม็ดเคลือบฟิล์มใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง ยาเม็ดฟองฟูใช้เวลาไม่เกิน 5 นาที ส่วนยาเม็ดออกฤทธิ์นานที่อมได้ลิ้น อมภายในอุ้งปาก ไม่ต้องทดสอบการแตกตัวของยาเม็ด เพราะต้องการให้ยาออกฤทธิ์นาน ยาเม็ดเคี้ยวก็ไม่ต้องทดสอบการแตกตัว

1.4 การทดสอบความปลอดภัยของเม็ดผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ และเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม จากบริษัทโนบุระสยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด โดยนำหนูขาวมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมก่อนการทดลอง และได้ควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาที่ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ปรับสภาวะโดยทำการเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง ดำเนินการเปลี่ยนถาดรองปัสสาวะ และอุจจาระวันเว้นวัน สัตว์ทดลองได้มีการให้อาหารเม็ดมาตรฐาน และน้ำ ตามต้องการ ผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบคือ เม็ดผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไป

ผลการทดลองพบว่าไม่มีหนูขาวตัวใดมีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุมในระยะเวลา 7 วัน เมื่อป้อนสารทดสอบ ในขนาด 2 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ลักษณะการกินอาหารเม็ดมาตรฐานและน้ำ การขับถ่าย รวมทั้งน้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองของหนูขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นใน 7 วันของหนูขาวเพิ่มขึ้นเป็นปกติและไม่มีหนูขาวตัวใดเสียชีวิตในระหว่างการทดสอบ เมื่อผ่าซากดูอวัยวะภายในของหนูขาวด้วยตาเปล่าไม่พบความผิดปกติทั้งลักษณะ สี และขนาดของอวัยวะภายใน ผลแสดงในตารางที่ 9 - 12 ดังนี้

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดควบคุม ในขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
ความตื่นตัว (Alertness)	N	N	N	N
การเลียขน (Grooming)	A	A	A	A
การตอบสนองต่อการสัมผัส (Touch response)	P	P	P	P

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
การตอบสนองต่อความเจ็บปวด (Pain response)	A	A	A	A
การสั่น (Tremors)	A	A	A	A
อาการชักเกร็ง (Convulsion)	A	A	A	A
ปฏิกิริยาการพลิกลำตัว (Righting reflex)	A	A	A	A
แรงบีบมือ (Gripping strength)	P	P	P	P
การตอบสนองโดยการกระดิกใบหู (Pinna reflex)	P	P	P	P
ปฏิกิริยาตอบสนองของแก้วตา (Corneal reflex)	P	P	P	P
อาการบิดตัวเนื่องจากการปวด (Writhing response)	A	A	A	A
ปฏิกิริยาตอบสนองของรูม่านตา (Pupils)	N	N	N	N
การถ่ายปัสสาวะ (Urination)	N	N	N	N
Group/Response	Female	Male	Female	Male
	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)	Before

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
อาการน้ำลายไหล (Salivation)	N	N	N	N
สีผิว (Skin color)	N	N	N	N
อาการน้ำตาไหล (Lacrimation)	A	A	A	A
ลักษณะอยู่ไม่นิ่ง (Hyper activity)	A	A	A	A
ท้องร่วง (Diarrhea)	A	A	A	A
อาการซึม (Lethargy)	A	A	A	A

*N-Normal, *P-Present, *A-Absent

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดควบคุม ในขนาด 5 กรัม/กิโลกรัม

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
ความตื่นตัว (Alertness)	N	N	N	N
การเลียขน (Grooming)	A	A	A	A
การตอบสนองต่อ การสัมผัส (Touch response)	P	P	P	P
การตอบสนองต่อ ความเจ็บปวด (Pain response)	A	A	A	A
การสั่น (Tremors)	A	A	A	A

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
อาการชักเกร็ง (Convulsion)	A	A	A	A
ปฏิกิริยาการพลิก ลำตัว (Righting reflex)	A	A	A	A
แรงบีบมือ (Gripping strength)	P	P	P	P
การตอบสนอง โดยการกระดิกใบ หู (Pinna reflex)	P	P	P	P
ปฏิกิริยา ตอบสนองของ แก้วตา (Corneal reflex)	P	P	P	P
อาการบิดตัว เนื่องจากการปวด (Writhing response)	A	A	A	A
ปฏิกิริยา ตอบสนองของรู ม่านตา (Pupils)	N	N	N	N
การถ่ายปัสสาวะ (Urination)	N	N	N	N
อาการน้ำลายไหล (Salivation)	N	N	N	N
สีผิว (Skin color)	N	N	N	N

*N-Normal, *P-Present, *A-Absent

ตารางที่ 11 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดทดสอบ ในขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
ความตื่นตัว (Alertness)	N	N	N	N
การเลียขน (Grooming)	A	A	A	A
การตอบสนองต่อการ สัมผัส (Touch response)	P	P	P	P
การตอบสนองต่อ ความเจ็บปวด (Pain response)	A	A	A	A
การสั่น (Tremors)	A	A	A	A
อาการชักเกร็ง (Convulsion)	A	A	A	A
ปฏิกิริยาการพลิก ลำตัว (Righting reflex)	A	A	A	A
แรงบีบมือ (Gripping strength)	P	P	P	P
การตอบสนองโดย การกระดิกใบหู (Pinna reflex)	P	P	P	P
ปฏิกิริยาตอบสนอง ของแก้วตา (Corneal reflex)	P	P	P	P
อาการบิดตัวเนื่องจาก การปวด (Writhing)	A	A	A	A

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
response)				
ปฏิกิริยาตอบสนอง ของรูม่านตา (Pupils)	N	N	N	N
การถ่ายปัสสาวะ (Urination)	N	N	N	N
อาการน้ำลายไหล (Salivation)	N	N	N	N
สีผิว (Skin color)	N	N	N	N
อาการน้ำตาไหล (Lacrimation)	A	A	A	A
ลักษณะอยู่นิ่ง (Hyper activity)	A	A	A	A
ท้องร่วง (Diarrhea)	A	A	A	A
อาการซึม (Lethargy)	A	A	A	A

*N-Normal, *P-Present, *A-Absent

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับชุดทดสอบ ในขนาด 5 กรัม/กิโลกรัม

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
ความตื่นตัว (Alertness)	N	N	N	N
การเลียขน (Grooming)	A	A	A	A
การตอบสนองต่อ การสัมผัส (Touch response)	P	P	P	P
การตอบสนองต่อ ความเจ็บปวด (Pain response)	A	A	A	A
การสั่น (Tremors)	A	A	A	A
อาการชักเกร็ง (Convulsion)	A	A	A	A
ปฏิกิริยาการพลิก ลำตัว (Righting reflex)	A	A	A	A
แรงบีบมือ (Gripping strength)	P	P	P	P
การตอบสนอง โดยการกระดิกใบ หู (Pinna reflex)	P	P	P	P
ปฏิกิริยา ตอบสนองของ แก้วตา (Corneal reflex)	P	P	P	P
อาการบิดตัว เนื่องจากการปวด	A	A	A	A

Group Response	Female		Male	
	Before	After (24 hrs.)	Before	After (24 hrs.)
(Writhing response)				
ปฏิกิริยา ตอบสนองของรู ม่านตา (Pupils)	N	N	N	N
การถ่ายปัสสาวะ (Urination)	N	N	N	N
อาการน้ำลายไหล (Salivation)	N	N	N	N
สีผิว (Skin color)	N	N	N	N
อาการน้ำตาไหล (Lacrimation)	A	A	A	A
ลักษณะอยู่ไม่นิ่ง (Hyper activity)	A	A	A	A
ท้องร่วง (Diarrhea)	A	A	A	A
อาการซึม (Lethargy)	A	A	A	A

*N-Normal, *P-Present, *A-Absent

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลองของเม็ดผลิตภัณฑ์พบว่ามีความปลอดภัย

1.5 การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

สารสกัดจากดอกอัญชันที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของดอกอัญชัน ซึ่งเตรียมได้จากการสกัดดอกอัญชันสดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส โดยใช้อัตราส่วนสกัดที่ประกอบด้วย ดอกอัญชันต่อตัวทำละลาย 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยได้พัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ ครีมบำรุงผิวหน้า และเซรั่มบำรุงผิวหน้า (ตัวอย่างแสดงในภาพที่ 7) และครีมบำรุงผิวหน้า (ตัวอย่างแสดงในภาพที่ 8) ที่มีสารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส นำมาเป็นส่วนหนึ่งของวัตถุดิบที่เป็นส่วนผสมในเนื้อเบสที่ถูกพัฒนาขึ้นใหม่ ผสม

กับสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดอื่นๆ และตั้งตำรับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจำนวน 3 สูตรตำรับนำมาศึกษาสมบัติทางกายภาพ และสมบัติด้านอื่นๆ เช่น ความชุ่มชื้น ความพึงพอใจ และการแพ้ เป็นต้น โดยตำรับต้นแบบ 3 ตำรับ จะมีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ลักษณะของครีมบำรุงผิวหน้า มีลักษณะเป็นครีมเนื้อครีมสีม่วงอ่อน แสดงตัวอย่างครีมบำรุงผิวหน้าในภาพที่ 7 (อัตราส่วนผสมสารสกัดจากดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก) และตัวอย่างของเนื้อเซรัมบำรุงผิวหน้า แสดงในภาพที่ 8 (อัตราส่วนผสมสารสกัดจากดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก) มีลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ คือ เจลใสสีม่วงใส เนื้อบางเบา

ภาพที่ 7 ลักษณะเนื้อครีมบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส



ภาพที่ 8 ลักษณะเซรัมบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส

นำผลิตภัณฑ์ในทุกตำรับของครีมบำรุงผิวหน้าและเซรั่มบำรุงผิวหน้า นำมาศึกษาและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี ทำได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี กลิ่น และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stability test) ด้วยวิธีแบบเร่ง heating-cooling ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6 รอบ และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน

1. ครีมบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากดอกอัญชัน

1.1 ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งตำรับครีมบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นสารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ในแต่ละตำรับนำมาศึกษาและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี ทำได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี กลิ่น และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stability test) ด้วยวิธีแบบเร่ง heating-cooling ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6 รอบ และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน ผลการทดสอบในแต่ละตำรับของครีมบำรุงผิวหน้า แสดงข้อมูลของคุณสมบัติของครีมบำรุงผิวหน้า เช่น ค่า pH สี เนื้อสัมผัส การสัมผัส ความหนืด มีดังนี้

1.2 ครีมบำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 13 และ 14 โดยแสดงข้อมูลของสมบัติของครีมบำรุงผิวหน้า เช่น ค่า pH สี เนื้อสัมผัส การสัมผัส ความหนืด ลำดับความหนืดที่สัมผัสผิวหน้า (ความหนืดสูง ++, ความหนืดปานกลาง ++, ความหนืดต่ำ +)

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	6.20	Pale purple	light	soft	3023.7	++
2	6.21	Pale purple	light	soft	3025.5	++
3	6.22	Pale purple	light	soft	3032.6	++
4	6.21	Pale purple	light	soft	3035.1	+

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
5	6.22	Pale purple	light	soft	3032.3	+
6	6.22	Pale purple	light	soft	3026.5	+

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	6.21	Pale purple	light	soft	++
4°C	6.22	Pale purple	light	soft	++
45°C	6.22	Pale purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของครีมบำรุงผิวหน้า ตำรับที่ 1 พบว่า ลักษณะเนื้อครีมบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงอ่อน เนื้อละเอียด ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของตำรับครีมบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของครีมบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าครีมบำรุงผิวหน้า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้น เนื้อคงความเข้ากันดี ไม่มีของเหลวแยกชั้นด้านบนเนื้อครีมบำรุง และมีค่า pH ในช่วง 6.20 - 6.22 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง ความหนืดสัมผัสระดับปานกลาง

1.2 ครีมบำรุงผิวหน้า ที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 15 และ 16

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	6.23	Pale purple	light	soft	3027.0	++
2	6.24	Pale purple	light	soft	3028.1	++
3	6.22	Pale purple	light	soft	3035.2	++
4	6.23	Pale purple	light	soft	3036.4	++
5	6.22	Pale purple	light	soft	3037.5	++
6	6.24	Pale purple	light	soft	3026.2	++

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	6.23	Pale purple	light	soft	++
4°C	6.22	Pale purple	light	soft	++
45°C	6.23	Pale purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของครีมบำรุงผิวหน้า ตำรับที่ 2 พบว่า ลักษณะเนื้อครีมบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงอ่อน เนื้อละเอียด ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของตำรับครีมบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของครีมบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าครีมบำรุงผิวหน้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้น เนื่องจากความเข้ากันดี ไม่มีของเหลวแยกชั้นด้านบนเนื้อ

ครีมบำรุง และมีค่า pH ในช่วง 6.21 - 6.24 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง ความหนืดสัมผัสระดับปานกลาง

1.3 ครีมบำรุงผิวหน้า ที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 17 และ 18

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	6.23	Pale purple	light	soft	3028.2	++
2	6.23	Pale purple	light	soft	3029.1	++
3	6.22	Pale purple	light	soft	3035.2	++
4	6.23	Pale purple	light	soft	3038.4	++
5	6.22	Pale purple	light	soft	3035.1	++
6	6.23	Pale purple	light	soft	3030.3	++

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ stability test ของครีมบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	6.23	Pale purple	light	soft	++
4°C	6.22	Pale purple	light	soft	++
45°C	6.23	Pale purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของครีมบำรุงผิวหน้า คำรับที่ 3 พบว่า ลักษณะเนื้อครีมบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงอ่อน เนื้อละเอียด ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของ คำรับครีมบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของครีมบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าครีมบำรุงผิวหน้า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้น เนื้อคงความเข้ากันดี ไม่มีของเหลวแยกชั้นด้านบนเนื้อ ครีมบำรุง และมีค่า pH ในช่วง 6.21 - 6.23 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง ความหนืดสัมผัส ระดับปานกลาง

2. เซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีสารสกัดจากดอกอัญชัน

ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งคำรับเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นสารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ในแต่ละคำรับนำมาศึกษาและทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี ทำได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี กลิ่น และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stability test) ด้วยวิธีแบบเร่ง heating-cooling ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6 รอบ และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน ผลการทดสอบในแต่ละคำรับของเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงข้อมูลของคุณสมบัติของครีมบำรุงผิวหน้า เช่น ค่า pH สี เนื้อสัมผัส การสัมผัส ความหนืด มีดังนี้

2.1 เซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดย น้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 19 และ 20

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในคำรับที่ 1 ที่มีสารสกัด ดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	7.01	Clear purple	light	soft	3001.1	++
2	7.03	Clear purple	light	soft	3002.2	++
3	7.03	Clear purple	light	soft	3002.1	++
4	7.02	Clear purple	light	soft	3001.5	+

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
5	7.04	Clear purple	light	soft	3001.2	+
6	7.04	Clear purple	light	soft	3001.0	+

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 1 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	7.02	Clear purple	light	soft	++
4°C	7.03	Clear purple	light	soft	++
45°C	7.03	Clear purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเซรั่มบำรุงผิวหน้า ตำรับที่ 1 พบว่า ลักษณะเนื้อเซรั่มบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงใส ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของตำรับเซรั่มบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าเซรั่มบำรุงผิวหน้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้นของเนื้อเซรั่ม เนื้อเซรั่มคงความเข้ากันดี และมีค่า pH ในช่วง 7.01 - 7.04 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง ความหนืดสัมผัสระดับปานกลาง

2.2 เซรั่มบำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 21 และ 22

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	7.02	Clear purple	light	soft	3003.1	++

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
2	7.02	Clear purple	light	soft	3004.3	++
3	7.03	Clear purple	light	soft	3003.2	++
4	7.02	Clear purple	light	soft	3002.2	++
5	7.03	Clear purple	light	soft	3002.1	+
6	7.03	Clear purple	light	soft	3001.2	+

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในตำรับที่ 2 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	7.02	Clear purple	light	soft	++
4°C	7.02	Clear purple	light	soft	++
45°C	7.03	Clear purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเซรั่มบำรุงผิวหน้า ตำรับที่ 2 พบว่า ลักษณะเนื้อเซรั่มบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงใส ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของตำรับเซรั่มบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าเซรั่มบำรุงผิวหน้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้นของเนื้อเซรั่ม เนื้อเซรั่มคงความเข้ากันดี และมีค่า pH ในช่วง 7.01 - 7.05 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง สัมผัสความหนืดระดับปานกลาง

2.3 เซรั่มบำรุงผิวหน้า ที่มีส่วนผสมของสารสกัดของดอกอัญชันเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงในตารางที่ 23 และ 24

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ด้วยวิธี heating-cooling 6 รอบ ในคำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

Storage cycle	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity (cPs)	Viscosity score
1	7.03	Clear purple	light	soft	3004.0	++
2	7.03	Clear purple	light	soft	3004.1	++
3	7.03	Clear purple	light	soft	3003.1	++
4	7.02	Clear purple	light	soft	3003.2	++
5	7.03	Clear purple	light	soft	3002.2	+
6	7.03	Clear purple	light	soft	3002.1	+

ตารางที่ 24 ผลการทดสอบ stability test ของเซรั่มบำรุงผิวหน้า ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน ในคำรับที่ 3 ที่มีสารสกัดดอกอัญชัน เข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

Condition	pH	Color	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Room	7.02	Clear purple	light	soft	++
4°C	7.03	Clear purple	light	soft	++
45°C	7.03	Clear purple	light	soft	++

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเซรั่มบำรุงผิวหน้า คำรับที่ 3 พบว่า ลักษณะเนื้อเซรั่มบำรุงผิวหน้ามีสีม่วงใส ผลการทดสอบความคงตัวหรือ stability test ของคำรับเซรั่มบำรุงผิวหน้าด้วยวิธี heating-cooling ซึ่งเป็นการทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ 6 รอบ และทดสอบความคงตัวของเซรั่มบำรุงผิวหน้าที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 45 วัน พบว่าเซรั่มบำรุงผิวหน้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ไม่พบการแยกชั้นของเนื้อเซรั่ม เนื้อเซรั่มคงความเข้ากันดี และมีค่า pH ในช่วง 7.02 - 7.03 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ pH ของผิวหนัง สัมผัสความหนืดระดับปานกลาง

ตำรับสูตรเครื่องสำอางในทุกตำรับ นำมาทดสอบความชุ่มชื้น ความพึงพอใจในการใช้โดยอาสาสมัคร ทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนัง โดยมีวิธีการทดสอบโดยย่อ ดังนี้

- เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้า ต้องเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 18-45 ปี ไม่อยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยอื่น ยินดีเข้าร่วมการศึกษา ไม่มีอาการคันจากการติดเชื้อรุนแรง ไม่เป็นฝี ไม่เป็นหนอง หรือไม่มีอาการคันจากโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อหรือจากโรคระบบภูมิคุ้มกัน ไม่มีแผลหรือโรคผิวหนังที่บริเวณแขนด้านใน เกณฑ์การคัดเลือกรอกจากการศึกษา (exclusion criteria) ได้แก่ ผู้ที่ติดตามผลการทดสอบหรืออาสาสมัครไม่ได้ หรือขอยกจากการศึกษา มีอาการแพ้หรือระคายเคืองอย่างรุนแรง โดยมีคะแนนการแพ้ระคายเคืองตั้งแต่ 3 ขึ้นไป

- วิธีการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนัง บริเวณที่ทดสอบคือท้องแขนด้านในทั้งสองข้าง ข้างละ 2 จุด แต่ละจุดมีขนาด 3x3 ตารางเซนติเมตร ห่างกันจุดละ 3 เซนติเมตร เมื่อเริ่มการทดสอบเช็ดผิวหนังบริเวณท้องแขนด้านในทั้งสองข้างด้วยน้ำสะอาดรองแห้ง ใช้แผ่นสาลีที่ทำด้วยสารที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ เชรุ่มทั้ง 3 ตำรับ ชนิดละ 1.0 มิลลิตร ตามจุดที่กำหนดไว้ในข้างต้นจุดละ 1 ตัวอย่าง ประเมินอาการระคายเคืองโดยผู้วิจัย ได้แก่ อาการบวม แดง คัน แสบ ลอก และผื่นหลังใช้ทันที และหลังใช้ 24 ชั่วโมง อาสาสมัครที่ไม่พบอาการแพ้ระคายเคืองจะเข้าการศึกษาประสิทธิภาพต่อไป

- การศึกษาประสิทธิภาพของแต่ละตำรับ ทดสอบเปรียบเทียบตำรับทั้ง 3 สูตร เทียบกับเชรุ่มหรือครีมบำรุงผิวหน้าที่ไม่ผสมสารสกัดดอกอัญชัน ตำแหน่งที่ทดสอบคือ ตำรับเชรุ่มเบสหรือครีมเบส (ไม่มีสารสกัด) ทาบริเวณต้นแขนข้างขวาด้านบน ตำรับเชรุ่มเบสหรือครีมเบส ที่มีสารสกัดเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักทาบริเวณต้นแขนข้างขวาด้านล่าง ตำรับเชรุ่มเบสหรือครีมเบสที่มีสารสกัดเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักทาบริเวณต้นแขนซ้ายด้านบน และตำรับเชรุ่มเบสหรือครีมเบส ที่มีสารสกัดเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักโดยน้ำหนักทาบริเวณต้นแขนซ้ายด้านล่าง ทั้งนี้เริ่มการศึกษาโดยให้อาสาสมัครแต่ละคนทาเชรุ่มหรือครีมบำรุงวันละ 2 ครั้ง คือ เช้า-เย็น หลังอาบน้ำติดต่อกัน 30 วัน ทาครั้งละ 1 กดหัวบีบ และวัดพารามิเตอร์ทางผิวหนัง (skin parameters) ได้แก่ ปริมาณเม็ดสีเมลานิน ปริมาณผิวหนังร้อนแดง (erythema) ความชุ่มชื้น และความเรียบเนียนของผิวหนังทั้ง 4 ตำแหน่งก่อนใช้ กับหลังใช้ตำรับเชรุ่มหรือครีมบำรุงผิว ด้วยเครื่อง Multi-probe Adapter (รุ่น MPA 580, Courage+ Khazaka electronic, Germany) (ภาพที่ 9) โดยใช้หัววัด Mexameter, Comeometer และ Frictionmeter สำหรับวัดปริมาณเม็ดสีเมลานิน และปริมาณ erythema ความชุ่มชื้น และความเรียบเนียนของผิวหนัง ตามลำดับ และใช้เครื่อง Skin Visiometer® (Courage+Khazaka electronic, Germany) ประเมินสภาพรอยย่น ความหยาบ ความชุ่มชื้น และความเรียบเนียนของผิวหนัง

ผลการศึกษา พบว่า อาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษา 30 คน เป็นชาย 8 คน หญิง 22 คน มีอายุเฉลี่ย 22.42 ± 1.34 ปี ผลการศึกษาการระคายเคืองผิวหนังแบบเฉียบพลันหลังทาเชรุ่มหรือครีมบำรุงผิวหน้าทันที และหลังจากทาแล้ว 24 ชั่วโมง พบว่า ตำรับเชรุ่มหรือครีมเบส และตำรับเชรุ่มหรือครีมบำรุงผิวหน้าทั้ง 3 สูตรตำรับ ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ระคายเคืองต่อผิวหนัง ผิวหนังอาสาสมัครทุกคนโดยผิวหนังไม่แดง ไม่คัน ไม่ลอก และไม่บวม สำหรับการประเมินความชุ่มชื้น และความเรียบเนียนของ

ผิวหนังอาสาสมัคร ณ ตำแหน่งที่ทำตัวอย่างเซรัมหรือครีมบำรุงผิวหน้า ด้วยหัววัด Corneometer และ Frictiometer พบว่าเซรัมและครีมบำรุงผิวหน้าทั้ง 3 คำรับ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนังได้ แต่ไม่แตกต่างกันกับเซรัมหรือครีมเบส ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามคำรับเซรัมเบสหรือครีมเบส รวมถึง คำรับเซรัมหรือครีมบำรุงผิวหน้าทั้ง 3 คำรับ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความเรียบเนียนให้กับผิวหนัง ในส่วนของการประเมินการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังอาสาสมัครด้วยเครื่อง Skin Visiometer® โดยประเมินประสิทธิภาพในการลดรอยย่นของผิวหนัง (wrinkle) การลดความหยาบของผิวหนัง (roughness) การเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนัง (scaliness) และการเพิ่มความเรียบเนียนของผิวหนัง (smoothness) พบว่าคำรับเซรัมหรือครีมบำรุงผิวหน้าทั้ง 3 คำรับ ให้ผลไม่แตกต่างกับคำรับเซรัมหรือครีมเบสที่ $p>0.05$ (ไม่ได้แสดงข้อมูลผลการทดสอบ)



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของเครื่อง Multi-probe Adapter (รุ่น MPA 580, Courage+ Khazaka electronic, Germany) และหัววัด ชนิดต่างๆ เช่น Mexameter, Corneometer และ Frictiometer

ทั้งนี้อาสาสมัครได้ให้คะแนนความพึงพอใจในคำรับผลิตภัณฑ์ในแต่ละคำรับ โดยใช้แบบสอบถามพื้นฐานความพึงพอใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ให้อาสาสมัครประเมิน พบว่า สำหรับครีมบำรุงผิวหน้า คะแนนสูงสุดพบในคำรับที่มีสารสกัดจากดอกอัญชันมากที่สุด (ร้อยละ 1.0) ได้แก่ คำรับที่ 3 และได้คะแนนประเมินเท่ากับ 4.69 ± 0.31 ขณะที่เซรัมบำรุงผิวหน้า คะแนนสูงสุดพบในคำรับที่มีสารสกัดจากดอกอัญชันมากที่สุด (ร้อยละ 1.0) ได้แก่ คำรับที่ 3 และได้คะแนนประเมินเท่ากับ 4.79 ± 0.06 ตัวอย่างแบบสอบถามที่ใช้ในการสำรวจแสดงในข้อมูลต่อไปนี้

แบบทดสอบพื้นฐานความพึงพอใจในการใช้ผลิตภัณฑ์

คำชี้แจง ประเมินความชอบหรือพึงพอใจ โดยใช้เครื่องหมาย ✓ ในช่องว่างที่กำหนด

รหัส อาสาสมัครรหัสตัวอย่าง วัน เดือน ปี

ความพึงพอใจต่อ ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ในด้าน	ระดับความพึงพอใจ				
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
1. ความพึงพอใจ โดยรวม					
2. สีของ ผลิตภัณฑ์มี ความน่าใช้					
3. เนื้อผลิตภัณฑ์มี ความน่าใช้					
4. ความกลิ่นต่อผิว					
5. ความหนืดของ ผลิตภัณฑ์					
6. กลิ่นหอม					
7. ผลของการใช้ ผลิตภัณฑ์ต่อ สภาพผิว					

หมายเหตุ ระดับความพึงพอใจ น้อยที่สุดเท่ากับ 1 คะแนน มากที่สุด เท่ากับ 5 คะแนน

6.6 การออกแบบบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์

ในงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการออกแบบบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์ โดยเริ่มจากการเลือกภาชนะบรรจุและการออกแบบกล่องผลิตภัณฑ์ แสดงภาพประกอบดังต่อไปนี้

รูปแบบของบรรจุภัณฑ์ 2 รูปแบบ สำหรับครีมบำรุงผิวหน้าและเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงในภาพที่ 10

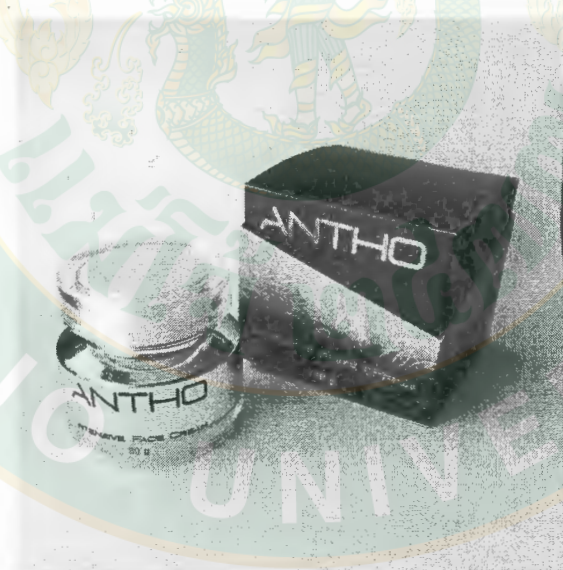


บรรจุภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวหน้า

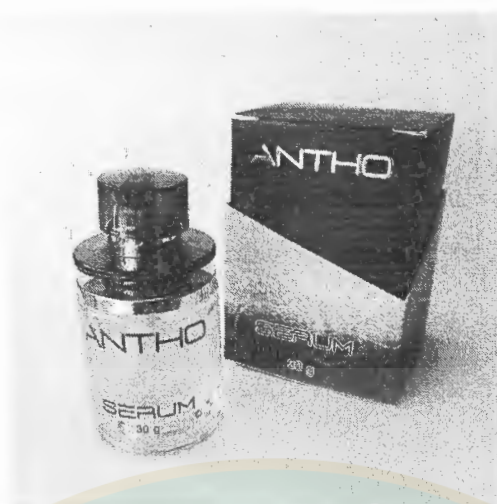
บรรจุภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้า

ภาพที่ 10 รูปแบบของบรรจุภัณฑ์ 2 รูปแบบ สำหรับครีมบำรุงผิวหน้าและเซรั่มบำรุงผิวหน้า

รูปลักษณะของบรรจุภัณฑ์ภายนอก สำหรับบรรจุครีมบำรุงผิวหน้าและเซรั่มบำรุงผิวหน้า แสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กล่องบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุครีมบำรุงผิวหน้า



ภาพที่ 12 กล้องบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุเซรามิกบำรุงผิวหน้า

นอกจากนี้ได้ออกแบบบรรจุภัณฑ์ในรูปแบบซอง เพื่อบรรจุสารสกัดจากดอกอัญชันที่สกัดและเตรียมในรูปแบบของเม็ดผลัดกันท์ แสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ของบรรจุภัณฑ์สารสกัดจากดอกอัญชันในรูปแบบของเม็ดผลิตภัณฑ์

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการตรวจสอบลักษณะของพืชที่ใช้คือ ดอกอัญชัน ในส่วนดอกไม่มีใบ ลักษณะภายนอกเป็นดอกสีม่วง ในการตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography พบว่าปรากฏสารฟลาโวนอยด์และฟีนอลิก ปริมาณเถ้าทั้งหมดเท่ากับ NMT ร้อยละ 8.0 โดยน้ำหนัก และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดเท่ากับ NMT ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ความชื้นของดอกอัญชันไม่เกิน ร้อยละ 10 ดอกอัญชันที่นำมาสกัดไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย เมื่อนำดอกอัญชันมาทดสอบสารเคมี 4 ประเภท คือ สารประกอบคลอรีน สารประกอบฟอสเฟต

สารคาร์บาเมท และสารไพรีทรอยด์และโลหะหนักพบว่า ดอกอัญชันไม่พบโลหะหนักและสารหนูปนเปื้อน ในการตรวจหาการปนเปื้อนสารพิษตกค้าง ผลการตรวจไม่พบการปนเปื้อน อัญชันนำมาสกัดด้วยสามเทคนิคการสกัด ได้แก่ เทคนิคการแช่หมัก ในตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แช่หมักด้วยอย่างเป็นเวลา 7 วัน และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิก นอกจากนี้ได้สกัดสารจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับการใช้ตัวทำละลายเอทานอล โดยทดลองใน 3 อัตราส่วน คือ อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ได้เตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคใหม่ที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกเทคนิคนี้ว่า เทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ในทุกเทคนิคการสกัดได้วิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เทคนิคที่ให้ร้อยละผลผลิต รวมถึงปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงสุดคือ การสกัดสารจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นพัฒนาสารสกัดในอัตราส่วนนี้ในรูปแบบเม็ดผลิตภัณฑ์และทดสอบลักษณะของเม็ดผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการทดสอบทางเภสัชวิทยา นอกจากนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในเม็ดผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลอง พบว่าเม็ดผลิตภัณฑ์สารสกัดจากดอกอัญชันมีความปลอดภัย

สารสกัดจากดอกอัญชันที่เตรียมด้วยที่ได้นำไปเตรียมเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำมาตั้งตำรับเครื่องสำอางเซรั่มบำรุงผิวหน้าและครีมบำรุงผิวหน้า โดยพัฒนาผลิตภัณฑ์อย่างละ 3 ตำรับที่มีอัตราส่วนสารสกัดจากดอกอัญชันแตกต่างกัน นำแต่ละตำรับผลิตภัณฑ์ทดสอบความคงตัว ทำได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี กลิ่น และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีแบบเร่ง heating-cooling ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6 รอบ และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีความคงตัวดี นอกจากนี้ได้ดำเนินการออกแบบบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั้งสองชนิด รวมถึงเม็ดผลิตภัณฑ์บรรจุของฟอยล์

สรุปผลการวิจัย

1. ดอกอัญชันสด นำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ และทดสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักและสารเคมีตกค้าง พบว่าไม่พบโลหะหนักปนเปื้อน และไม่พบสารตกค้าง
2. เตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันด้วยการแช่หมักและทำแห้งด้วย freeze dryer นอกจากนี้ได้เตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับตัวทำละลาย และเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส พบว่าวิธีการเตรียมสารสกัดจากดอกอัญชันที่ดีที่สุด ได้แก่ การสกัดสารจากดอกอัญชันด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส ที่อัตราส่วนของดอกอัญชันต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3. ตั้งตำรับเซรัมบำรุงผิวหน้าและครีมบำรุงผิวหน้า ที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากดอกอัญชัน
4. สกัดและขึ้นภาพเม็ดผลิตภัณฑ์อัญชัน ทดสอบสมบัติทางเภสัชวิทยาและความปลอดภัย

เอกสารอ้างอิง

- กฤตติญารัตน์ สมวงศ์ และ ชุตินันท์ ประสิทธิ์ ฐิริปรีชา. 2012. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านบางชนิด เพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย. **The 4th annual northeast pharmacy research conference of 2012, “pharmacy profession in harmony”**. ขอนแก่น, ประเทศไทย, 11-12 กุมภาพันธ์: 125-134.
- จิตติพรรณ นิมสุข อนุสิทธิบัตร เรื่อง กรรมวิธีการผลิตเกรนูลที่มีส่วนประกอบจากพืชและน้ำผึ้ง เลขที่คำขอ 1703002556 วันที่ 25 ธันวาคม 2560 มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- Kazuma, K., K. Kogawa, N. Noda, N. Kato and M. Suzuki. 2004. Identification of delphinidin 3-*O*-(6''-*O*-malonyl)-beta-glucoside-3'-*O*-beta-glucoside, a postulated intermediate in the biosynthesis of tematin C5 in the blue petals of *Clitoria ternatea* (butterfly pea). **Chem Biodivers.** 1(11): 1762-1770.
- Kazuma, K., N. Noda and M. Suzuki. 2003. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry.** 64(6): 1133-1139.
- Klaassen, C.D. 2008. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. McGraw-Hill Medical: New York. 13-48 p.
- Kumar, N., W. Rungseewijitprapa, N.-A. Narkkhong, M. Suttajit and C. Chaiyasut. 2012. 5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. **J. Ethnopharmacol.** 139(3): 765-771.
- Mukherjee, P.K., V. Kumar, N.S. Kumar and M. Heinrich. 2008. The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* from traditional use to scientific assessment. **J. Ethnopharmacol.** 120(3): 291-301.
- Net-anong, S., S. Kitipawong, S. Ruangnoo, A. Itharat. 2015. Free radical scavenging activity and total phenolic content of different times for extraction triphala powder and its stability study. **Thammasat Med J.** 15(3): 472-479.
- Nollet, Leo M.L. 1996. **Handbook of food Analysis**. Marcel Dekker: New York. 833-850 p.
- Organization for economic co-operation and development (OECD) guidelines for the testing of chemicals. Acute oral toxicity-Fixed dose procedure 420. (2001).
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines for the testing of chemicals. Test no. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents 407. (1995).

- Pascual-TeresaMaria, S., T. Sanchez-Ballesta. 2008. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochem. Rev.** 7(2): 281-299.
- Patil Amol, P. and R. Patil Vijay. 2011. *Clitoria ternatea* Linn.:An overview. **Int. J. Pharm. Res.** 3(1): 20-23.
- Saejung, T., J. Don-in and T. Chimsook. 2018. Bioactivity of *Clitoria Ternatea* extract from different extraction methods. **Proceedings of The 2nd Maejo-Engineo International Conference on Renewable Energy**. Chiang Mai, Thailand, Dec. 14-15, 2018: 107-115.
- Socaciu, C. 2008. **Food colorants chemical and functional properties**. CRC Press: Boca Raton. 479-497 p.
- Zingare, M.L., P.L. Zingare, A. Dubey and A. Ansari. 2013. *Clitoria ternatea* (aparajita): A review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.** 3(1): 203-213.

