Original Article

การเปรียบเทียบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังคนกับหมูในหลอดทดลองของสารพอลิฟีนอลจากพืช

อรุณศรี ปรีเปรม[1*], วีรยาศักดิ์ คำดวง[2], วีรวัฒน์ ธีระณชัยดีกุล[3], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1], ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง[4], มาลิน จุลศิริ[3]

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบการซึมผ่านแผ่นกั้นผิวหนังคนกับหมูในหลอดทดลองของสารพอลิฟีนอลจากพืช

อรุณศรี ปรีเปรม[1*], วีรยาศักดิ์ คำดวง[2], วีรวัฒน์ ธีระณชัยดีกุล[3], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1], ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง[4], มาลิน จุลศิริ[3]

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2554;7(3) : 39-46

Received : 16 August 2011 **Accepted :** 31 August 2011

บทนำ: การศึกษาเปรียบเทียบผิวหนังหมูกับคนที่ใช้เป็นแผ่นกั้นการทดสอบการซึมผ่านของพอลิฟีนอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของพืชซึ่งใช้เพิ่มมูลค่าของเครื่องสำอางวัสดุและวิธีการทดลอง:ผิวหนังจากหูหมูกับผิวหนังคนสารสกัดพืช 7 ชนิด คือ ดาหลา (EE) กุหลาบมอญ (RD) บัวผุด (RK) สมอไทย (TC) สมอพิเภก (TB) อัญชัน (CT) กุหลาบแดง (RH) ทำการซึมผ่านเยื่อกั้นด้วยหลอดทดสอบการซึมผ่านที่อุณหภูมิ 32°C นำตัวอย่างมาวัดสีด้วยวิธีการโฟลินซิโอ-คาลโชที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรเทียบกับสารมาตรฐานคือกรดแกลลิก **ผลการศึกษา:** ความเข้มข้นตั้งต้นในส่วนให้ของ EE, RD, RK, TC, TB, CT และRH 5, 13.5, 56, 42, 37, 3.6 and 8.9 mg GAE·ml-1 ตามลำดับ ความเข้มข้นตั้งต้นของพอลิฟีนอลในส่วนให้กับอัตราการซึมผ่านเข้าสู่ส่วนรับของพอลิฟีนอลจากสารสกัดทั้ง 7 ชนิดนี้เมื่อใช้ผิวหนังหมูเป็นแผ่นกั้นมีแนวโน้มความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (r = 0.8255) แต่เมื่อใช้ผิวหนังคนพบว่าไม่เป็นเส้นตรง (r = 0.3207) เวลาเริ่มต้นในการซึมผ่านผิวหนังคนประมาณ 12 - 22 ชั่วโมง แต่ผิวหนังหมูเริ่มซึมผ่านตั้งแต่เริ่มการทดสอบแสดงถึงความแตกต่างของการซึมผ่านทั้งอัตราและเวลาเริ่มต้น **สรุปผล:** การใช้ผิวหนังหมูไม่อาจทดแทนการใช้ผิวหนังคนในการทดสอบการซึมผ่านของพอลิฟีนอลจากสารสกัดพืชที่มีปริมาณต่ำมาก

คำสำคัญ: การซึมผ่านในหลอดทดลอง, พอลิฟีนอล, สารสกัดจากพืช, ผิวหนังหมูและผิวหนังคน

---

[1] Ph.D, รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] นักศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[3] ฝ่ายวิจัยและพัฒนา บริษัท เอสแอนด์เจเอ็นเตอร์ไพรส์ (มหาชน) จำกัด กรุงเทพ 10120

[4] คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* ติดต่อผู้นิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ปรีเปรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 โทร/โทรสาร: 043-362092 E-mail: aroonsri@kku.ac.th

[1] Ph.D, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen, Thailand 40002

[2] Graduate student in Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen, Thailand 40002

[3] Research and Development Division, S&J International Enterprises Public Co. Ltd., Bangkok, Thailand 10120

[4] Faculty of Dentistry, KhonKaen University, KhonKaen, Thailand 40002

* Corresponding author: Tel/Fax: 043-362092 E-mail: aroonsri@kku.ac.th

Abstract

Comparison of human and porcine skins as the barrier membraneinan *in vitro* permeation of plant polyphenols

Aroonsri Priprem[1*],Weeraya Sukkhamduang[2], Weerawat Teeranachaideekul[3], Supatra Porasuphatana[1], Teerasak Damrongrungruang[4] and Malyn Chulasiri[3]

IJPS, 2011; 7(3) : 39-46

Introduction: Porcine and human skin were compared as barrier membranes in *in vitro* permeation of polyphenols from plant extracts as sources of antioxidants to be used as value-added ingredients in novel cosmetic products. In vitro permeation was intended to assess expected release of ingredients from the applied products. **Materials and Method:** Excised skins from porcine ears and human abdomen were used as the barrier membrane in diffusion cells for comparison of polyphenols from 7 plant extracts; dahla (EE), damask rose(RD), buaput (RK), samohtai (TC), samohpipek (TB), blue butterfly pea (CT) and red rose (RH) at 32 °C. Total polyphenols were analyzed by Folin-Ciocalteaucolorimetry at 765 nm using gallic acid as the standard and permeation rates were statistically compared. **Results:** Donor concentrations of EE, RD, RK, TC, TB, CT and RH were 5, 13.5, 56, 42, 37, 3.6 and 8.9 mg GAE·ml-1. Relationships between donor polyphenol concentrations and permeation rates using porcine skin showed a linear correlation (r = 0.826) but not when using the human skin as the barrier (r = 0.321). There were lag time of about 12 – 22 h when using the human skin but not porcine. Thus, porcine and the human skin did not provide the same permeation profiles which included rate, cumulative amount and lag time. **Conclusion:** Porcine skin cannot be used as a substitute of the human skin in in vitro permeation of plant extracts with substantially low quantities of polyphenols.

Key words: *In vitro* permeation, phenolic compounds, plant extracts, porcine skin and human skin

บทนำ (Introduction)

การประเมินการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการแพร่และใช้อุปกรณ์ทดสอบที่มี 3 ส่วน คือ ส่วนให้ (donor) ส่วนรับ (receptor) โดยมีแผ่นกั้น (barrier) ซึ่งมักจะเป็นผิวหนังหรือแผ่นจำลองเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นแนวทางเบื้องต้นก่อนการคัดสรรสูตรตำรับที่ให้การปลดปล่อยสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังซึ่งนอกจากจะใช้หาปริมาณและอัตราเร็วการซึมผ่านแล้วยังช่วยให้ได้ข้อมูลรับรองความปลอดภัย (safety) ก่อนการทดสอบในคนได้ระดับหนึ่ง ดังนั้นจึงบรรจุเป็นหนึ่งในข้อปฏิบัติการทดสอบขององค์กรระหว่างประเทศเช่น สมาคมผู้ผลิตอุตสาหกรรมและผู้ค้าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในยุโรป (COLIPA, 1997) เน้นความสำคัญของการเลือกแผ่นกั้นที่ใช้ในการทดสอบให้เลียนแบบความสามารถของเซลล์ผิวหนังชั้นบนสุดของคนคือชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งต้องประกอบด้วยชั้นไขมันเรียงตัวเป็นสองชั้นที่บรรจุแน่นหนา (densely-packed lipid bilayers) ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังมีลักษณะเป็นช่องแคบและคดเคี้ยว (narrow and tortuous tunnels) ทำให้จำกัดอัตราการซึมผ่านผิวหนัง (rate limiting) ได้แต่ขณะเดียวกันก็สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยตัวทำละลายจำพวกไกลคอล(glycol) หรือ (alcohols) (Barry, 2001, Williams and Barry, 2004) หากสารสามารถซึมผ่านส่วนกั้นนี้ไปจะมีโอกาสผ่านเข้าไปสู่ระบบภายในร่างกายได้ การใช้ผิวหนังของคนมีข้อจำกัดหลายประการ (Gabbanini *et al.,* 2009) อาทิเช่น ผิวหนังที่ใช้ต้องได้จากคนซึ่งขณะตัดออกต้องยังมีชีวิตอยู่ อายุการใช้งานไม่นานและต้องเก็บรักษาด้วยการควบคุมอย่างดี ความแตกต่างระหว่างผิวหนังบริเวณต่าง ๆ ทำให้มีความนิยมใช้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องของอาสาสมัครที่เข้ารับการผ่าตัดและมีการตัดผิวหนังบริเวณหน้าท้องออกด้วยข้อจำกัดต่างๆ ดังกล่าวจึงมีความพยายามในการสรรหาแผ่นกั้นสังเคราะห์หรือผิวหนังอื่นๆ เช่นคราบงู (Priprem

et al., 2008) ผิวหนังหนูหรือหนังหมู (Diembeck *et al.,* 1999; Meyer *et al.,* 1987) ผิวหนังหมูมีโครงสร้างและส่วนประกอบใกล้เคียงกับผิวหนังคนจึงมีงานวิจัยแสดงคุณลักษณะของการซึมผ่านผิวหนังเทียบได้ใกล้เคียงกับผิวหนังคน (Dick and Scott, 1992; Kanikkannan *et al.,* 2000) แม้จะมีข้อตกลงระงับการจำหน่ายผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง (6th Amendment to the Cosmetics Directive 93/35/EEC) ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ.2531เป็นต้นมาแต่ก็มีข้อแนะนำให้ใช้ได้ในกรณีการประเมินการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองโดยมิได้เป็นผลกระทบต่อสัตว์โดยตรง (COLIPA, 1997)

การใช้สมุนไพรในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นด้วยความต้องการใช้ประโยชน์จากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging or anti-oxidant activity) ซึ่งคาดหวังผลในการต้านอักเสบ ชะลอวัย (Malhotra *et al.,* 2008, Santos-Buelga and Scalbert, 2000, Javanmardi *et al.,* 2003) การลดริ้วรอยที่ผิวหนังทำให้เครื่องสำอางที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชได้รับความนิยมของผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด สารสำคัญในสมุนไพรที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) (Zhengand Wang, 2001) การเพิ่มปริมาณสารพอลิฟีนอลก็มีส่วนให้เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและน่าจะมีผลต่อผิวหนังเพิ่มขึ้นด้วย หน่วยงานสากล กำหนดวิธีตรวจวัดเพื่อหาปริมาณสารพอลิฟีนอลรวมในเหล้าไวน์ด้วยหลักการวัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันระหว่างสารพอลิฟีนอลกับน้ำยาที่เป็นส่วนผสมระหว่างฟอสโฟทังสเตน (phosphotungsten) กับมอลิบดีนัมออกไซด์ (molybdenum oxides) เรียกว่าการทดสอบสีโฟลินซิโอคาลโซ (Folin-Ciocalteau colorimetric assay) วัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรวิธีนี้ได้พิสูจน์ตรวจวัดเชิงปริมาณในตัวอย่างสารสกัดพืชสดรวมถึงเห็ด (Singleton and Rossi, 1965; Waterhouse, 2002; Yim *et al.,* 2009) และเทียบกับสารมาตรฐานดังเช่นกรดแกลลิก (gallic acid) ได้ข้อมูลเป็น Gallic acid equivalence ย่อว่า GAE

สารสกัดที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบในการวิจัยนี้ประกอบด้วยสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีโอกาสในการนำมาใช้ในเครื่องสำอางและมีสารต้านอนุมูลอิสระดาหลา (*Etlingeraelatior* (Jack) R.M. Smith) กุหลาบมอญ (Damask rose, *Rosa damascena* Mill, family Rosaceae) กุหลาบแดง (*Rosa hybrid* L, family *Rosaceae*) บัวผุด (*Rafflesia Kerrii* Meijer) สมอไทย (*Terminalia chebula* Retzius) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica* Roxb.) อัญชัน (*Clitoria-ternatea* Linn.)

การศึกษานี้มุ่งเปรียบเทียบผิวหนัง 2 ชนิดคือ ผิวหนังหมูกับผิวหนังคนที่ใช้เป็นแผ่นกั้นในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองโดยใช้สารสกัดจากพืชทั้ง 7 ชนิดโดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ตามวิธีการในข้อกำหนดการผ่านผิวหนังของ COLIPA

วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

1. การเตรียมผิวหนังเป็นแผ่นกั้น

ผิวหนังหมูส่วนหู (Full-thickness of porcine ear skin, PS) จากโรงชำแหละสุกรเพื่อจำหน่ายเก็บภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากฆ่าผิวหนังคน (HS) ผ่าตัดบริเวณหน้าท้องของผู้บริจาค 3คนซึ่งเก็บภายใน 15นาทีหลังจากการผ่าตัดการลอกผิวหนังทำหลังจากการแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 45 วินาที (Akomeah *et al*., 2004) ความหนาของผิวหนังหมูและผิวหนังคนหลังจากลอกแล้วคือ 1.0 ± 0.15 mm แล ะ0.15± 0.2 mm

2. การเตรียมสารสกัด

พืชที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ดอกดาหลา ดอกกุหลาบมอญ ดอกกุหลาบแดงและดอกอัญชันสีน้ำเงิน เก็บสดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C ตัวอย่างผลได้แก่ ผลสมอไทยและผลสมอพิเภกได้มาจาก CR Pure Light ประเทศไทย หมักตัวอย่างที่อบแห้งในตัวทำละลายเป็นเวลา 3 วันแล้วแยกกากออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองได้สารสกัดที่เป็นของเหลวการสกัดดอกดาหลาดอกกุหลาบมอญผลสมอไทยและผลสมอพิเภกรวมทั้งการเก็บรักษาตัวอย่างพืช (herbarium) ดำเนินการที่หน่วยวิจัยและพัฒนาโรงงานเอสเจอินเตอร์เนชันแนลกรุงเทพมหานครส่วนดอกกุหลาบแดงและดอกอัญชันสีน้ำเงินดำเนินการที่คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัย ขอนแก่นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพืชแสดงในตารางที่ 1

3. การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง

อุปกรณ์เซลล์ทดสอบการแพร่ชนิดแนวนอนสีชา (amber glass horizontal diffusion cells, Crown Glass Co., Inc., USA)ที่ประกอบด้วยการประกบให้แผ่นกั้น (ผิวหนังหมูหรือผิวหนังคนที่เตรียมและแช่น้ำก่อน) อยู่ระหว่างส่วนให้กับ

ส่วนรับในส่วนให้ของเซลล์ทดสอบทำการบรรจุตัวอย่างสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ที่เจือจาง 1 ต่อ 10 เท่าด้วยน้ำปราศจากอิออนปริมาตร 3 ml ในส่วนรับของเซลล์ทดสอบการแพร่บรรจุน้ำปราศจากอิออนปริมาตร 3 ml ของเหลวทั้งในส่วนให้และส่วนรับปั่นด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาทีและควบคุมอุณหภูมิ 32 ± 1ºC เก็บตัวอย่างสารละลายในส่วนรับที่เวลาต่าง ๆเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอลรวมเติมน้ำปราศจากอิออน (อุณหภูมิ32ºC) ปริมาณเท่ากับที่เก็บไปวิเคราะห์ไปแทนที่เพื่อให้เกิดการซึมผ่านต่อเนื่องในส่วนรับ

การวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอลด้วยการทดสอบสีโฟลิน ซิโอคาลโซ (Singelton 1999)

ตัวอย่างสารละลายส่วนรับที่เก็บที่เวลาต่าง ๆ นำไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิฟีนอลด้วยการทำปฏิกิริยากับโฟลิน ซิโอคาลโซรีเอเจนต์และยุติปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนต เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV1700, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบหาความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่ทำเป็นสารละลายมาตรฐานในช่วง 2.5-50 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเตรียมใหม่ทุกวันวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้นี้ได้ทำการประเมินผลความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกโดยวัดความเที่ยงตรงและความแม่นยำระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน และ 3 ช่วงเวลาภายในวันเดียวกันและพบว่า valid สำหรับการทดสอบเชิงปริมาณในช่วงความเข้มข้นที่พบในสารละลายส่วนรับตลอดการศึกษาดังนั้นจึงคำนวณปริมาณพอลิฟีนอลที่ซึมผ่านจากค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างโดยเทียบกับกรดแกลลิกและค่าที่ได้ระบุเทียบกับกรดแกลลิกหรือ gallic acid equivalence (GAE) คำนวณปริมาณการซึมผ่านสะสมต่อหน่วยพื้นที่ที่เวลาต่าง ๆแล้วหาอัตราเร็วของการซึมผ่านตามกฎของฟิกส์

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงใช้สมการสหสัมพันธ์และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ซึ่งสมการดังกล่าวใช้ในการคำนวณเวลาเริ่มต้นของการซึมผ่านผิวหนัง การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 2 กลุ่มใช้สถิติ t-test ถ้ามากกว่า 2 กลุ่มใช้ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 1 สารสกัดพืช คุณลักษณะและการสังเกตด้วยกล้องจุลทัศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

vehicle	Plant extract	Abbreviation	Characteristics	Observation (400 x)
50% hydroglycol	Torch ginger *(Etlingera elatior (Jack) R.M.Smith)*	EE	Clear brown yellow liquid, non viscous, slight odor	Clear, no particles
	Damask rose *(Rosa damascena)*	RD	Clear reddish brown liquid, non viscous, slight odor, light white precipitates	Clear, no particles
	Bua-Phut *(Rafflesiakerrii Meijer)*	RK	Clear dark brown, white precipitates, light ador	Clear, no particles
70% hydroglycol	Myrobalan wood *(Terminalia chebula)*	TC	Clear dark brown liquid, brown precipitates, slight odor	Clear, no particles Clear, no particles
	Belericmyrobalan *(Terminalia bellirica)*	TB	Clear dark brow, light brown green precipitates, sligh odor	
50% glycerin	Butterfly pea *(Clitoriaternatea)*	CT	Deep blue, no precipitate, no odor	Clear, no particles Clear, no particles
	Rose *(Rosa hybrida)*	RH	Reddish brown, white precipitate, slight odor	

ผลการวิจัย (Results)

ลักษณะของสารสกัดพืช 7 ชนิดที่เป็นตัวอย่างของการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1 จัดแบ่งกลุ่มตามตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็น 3 กลุ่มประกอบด้วยดาหลา (EE) กุหลาบมอญ (RD) บัวผุด (RK) ในกลุ่มที่ใช้ 50% ไฮโดรไกลคอลเป็นตัวทำละลายสมอไทย (TC) และสมอพิเภก (TB) ใช้ 70%ไฮโดรไกลคอลเป็นตัวทำละลาย ส่วนอัญชันสีน้ำเงิน (CT) และกุหลาบแดง (RH) ใช้ 50% กลีเซอรีนเป็นตัวทำละลายในการสกัด ผลการสกัดและกรองแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีกลิ่นเฉพาะ มีสีส่วนใหญ่สีเหลืองน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลเข้มเฉพาะสารสกัดอัญชันและกุหลาบแดงที่มีสีน้ำเงินเข้มและสีน้ำตาลแดงตามลำดับ การส่องกล้องจุลทัศน์ด้วยกำลังขยาย 400 เท่าไม่พบตะกอนซึ่งอาจเป็นผลให้การศึกษาการซึมผ่านมีอิทธิพลจากตะกอนที่จะเปลี่ยนแปลงปริมาณตั้งต้นของสารซึมผ่านได้ สารสกัดบางตัวมีการรายงานปริมาณพอลิฟีนอลมาก่อนอาทิเช่น ปริมาณพอลิฟีนอลรวมของดอกกุหลาบแดง 8 mg GAE g^{-1} dry weight (Kovatcheva-Apostolova *et al,* 2008) และผลสมอไทย 32.6 mg GAE g^{-1} dry weight (Chulasiri *et al.,* 2011) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้

ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งใช้ 50% ไฮโดรไกลคอลเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดดังรูปที่1มีปริมาณพอลิฟีนอลตั้งต้นจากสารสกัด 3 ตัวคือ EE, RD และ RK เป็น 5, 13.5 และ 56 mg GAE ·ml^{-1}แสดงว่าส่วนให้ของสารสกัดของดาหลากุหลาบมอญและบัวผุดมีปริมาณพอลิฟีนอลต่างกัน เมื่อทดสอบการซึมผ่านพบว่าอัตราการซึมผ่านผิวหนังหมูเป็น 1.8 ± 0.6, 7.2 ± 1.4 และ 8.7 ± 0.4 μg GAE·cm^{-2}·h^{-1} ตามลำดับโดยมีการเริ่มต้นการซึมผ่านเกิดตั้งแต่สารสกัดสัมผัสกับผิวหนังหมู (ไม่พบlag time) เมื่อเทียบกับการใช้ผิวหนังคนพบว่าอัตราการซึมผ่านโดยลำดับเป็นดังนี้ 1.3±0.6, 0.3±0.1 and 0.6±0.4 μg GAE·cm^{-2}·h^{-1} โดยพบการซึมผ่านเริ่มต้นที่เวลา 20.3±1.7, 22.1±4.0 และ 21.2±3.6 h ตามลำดับ แม้ว่าอัตราเร็วของการซึมผ่านผิวหนังคนลดลงเมื่อปริมาณพอลิฟีนอลเริ่มต้นสูงขึ้นแต่เมื่อพิจารณาปริมาณการซึมผ่านที่เวลาต่างๆ ก็พบว่าเป็นไปตามการแพร่กล่าวคือความเข้มข้นของพอลิฟีนอลสูงกว่ามีปริมาณการซึมผ่านสะสมสูงกว่าสารสกัดในกลุ่มแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างการซึมผ่านผิวหนังหมูกับผิวหนังคนทั้งอัตราเร็วปริมาณและเวลาที่เริ่มซึมผ่านในกลุ่มที่ 2 ซึ่งใช้ 70% ไฮโดรไกลคอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดมีปริมาณพอลิฟีนอลในส่วนให้ของสารสกัดTC และTB เท่ากับ 42 และ 37 mgGAE/ml ตามลำดับและให้อัตราการเร็วของซึมผ่านผิวหนังหมู 8.4 ± 1.1 และ 5.1 ± 0.5 μgGAE·cm^{-2}·h^{-1} เทียบกับอัตราเร็วของการซึมผ่านผิวหนังคนเท่ากับ 1.4± 1.0 และ 0.8±0.4 μg GAE·cmm^{-2}·h^{-1} โดยมีปริมาณการซึมผ่านผิวหนังหมูสูงกว่าผิวหนังคนประมาณ 13-15 เท่าในทำนองเดียวกันไม่พบเวลาเริ่มต้นของการซึมผ่านในผิวหนังหมูแต่ผิวหนังคนต้องใช้เวลาเริ่มต้น 17.1±7.6 และ 20.4±3.0 ชั่วโมงตามลำดับ แม้ว่าไกลคอลเพิ่มขึ้นก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการซึมผ่านอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับสารสกัดจากกลุ่ม ที่1ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันเพียงแต่มีสัดส่วนของไกลคอลต่ำกว่ากลุ่มที่ 3 ใช้ 50% กลีเซอรีนเป็นตัวทำละลายของสารสกัดอัญชัน (CT) และกุหลาบแดง (RH) มีปริมาณพอลิฟีนอล ในส่วนให้ 3.6 and 8.9 mgGAE/ml ตามลำดับมีอัตราเร็วของการซึมผ่านผิวหนังหมู 2.6±0.4 และ 2.9±0.3 μgGAE·cm^{-2}·h^{-1} หรือผิวหนังคน 0.2 ±0.09 และ 0.3±0.09 μgGAE·cm^{-2}·h^{-1} ตามลำดับ ปริมาณสะสมซึมผ่านผิวหนังหมูสูงกว่าผิวหนังคนประมาณ 18 เท่า เวลาเริ่มต้นที่พบการซึมผ่านผิวหนังคนของ CT และ RH 11.2±4.6 และ 13.5±4.8 ชั่วโมงตามลำดับ สารสกัดอัญชันและกุหลาบแดงมีการซึมผ่านผิวหนังแต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน (p>0.05)

รูปที่ 2 แสดงการเขียนกราฟเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพอลิฟีนอลในส่วนให้กับอัตราการซึมผ่านผิวหนัง 2 ชนิดที่ใช้สารสกัดทั้ง 7 ชนิด เมื่อความเข้มข้นของพอลิฟีนอลเพิ่มขึ้นมีผลให้อัตราการซึมผ่านผิวหนังหมูเพิ่มขึ้นด้วยโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ค่อนข้างสูง (= 0.8255) ในขณะที่ผิวหนังคนมีค่าสัมประสิทธิ์นี้ต่ำ (= 0.3207) เป็นข้อยืนยันว่าผิวหนังคนมีการจำกัดการซึมผ่านของพอลิฟีนอลในขณะที่ผิวหนังหมูมีการจำกัดน้อยกว่า

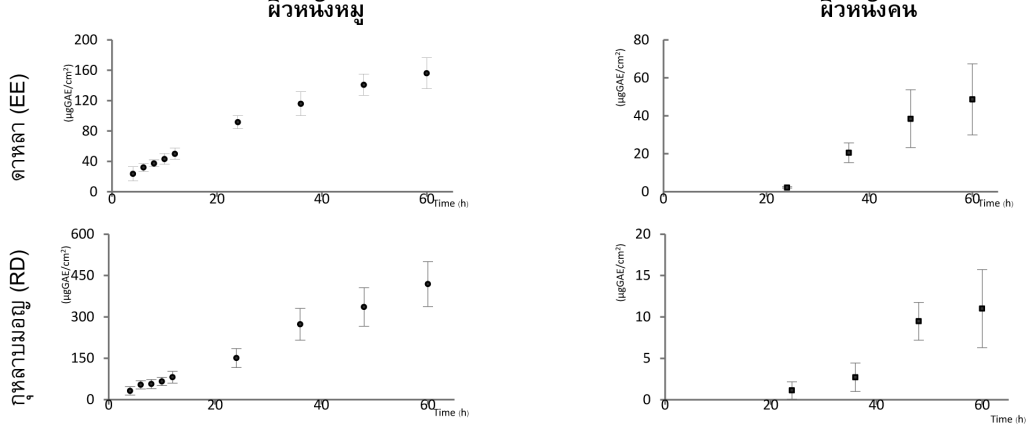
อภิปรายและสรุปผล (Results)

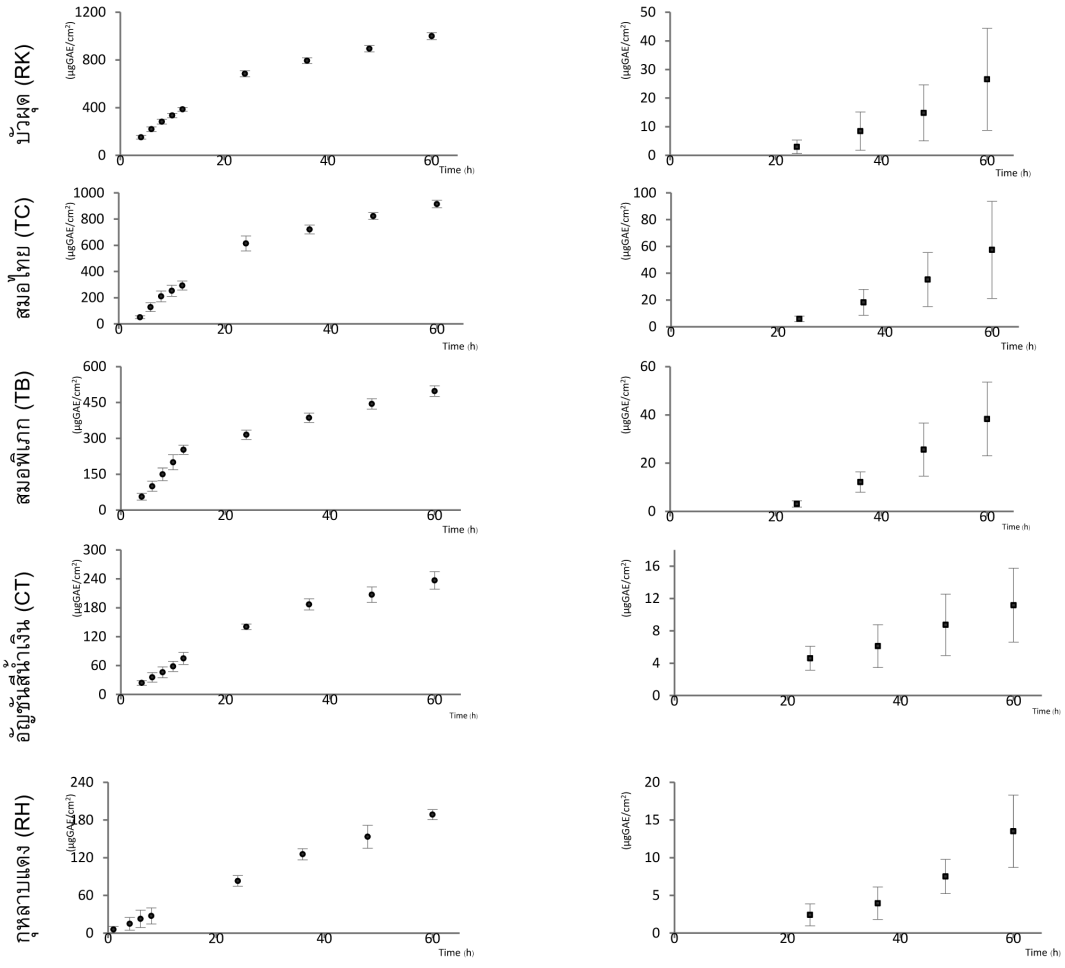
ผิวหนังหมูเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เป็นแผ่นกั้นของการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังทดแทนผิวหนังคนที่ตัดออกมาจากส่วนหน้าท้องและปรากฏในแนวปฏิบัติการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองขององค์กรหรือกลุ่มหรือสมาคมผู้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (COLIPA, 1997) ทำให้สะดวกและมีการใช้กันมากเนื่องจากไม่ต้องยุ่งยากเกี่ยวกับการขอผิวหนังที่ผ่าตัดจากคน การใช้ผิวหนัง

หมูอาจได้ผลในบางกรณีหรือสารบางชนิดที่มีการซึมผ่านได้ระดับหนึ่ง แต่จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบการซึมผ่านของสารพอลิฟีนอลระหว่างผิวหนังหมูกับผิวหนังคนในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารทดสอบชนิดเดียวกันใช้วิธีเดียวกันในการทำการทดสอบการซึมผ่านพบว่าเวลาเริ่มต้นของการซึมผ่านของสารพอลิฟีนอลจากสารสกัดพืชทุกตัวที่ทำการทดสอบแตกต่างในทิศทางเดียวกัน พอลิฟีนอลเริ่มต้นซึมผ่านผิวหนังคนเมื่อมีเวลาสัมผัสผ่านไปแล้ว 12 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากความแตกต่างระหว่างชนิดของไขมันในผิวหนังของคนกับหมู ผิวหนังหมูให้ผลใกล้เคียงกับผิวหนังคนเมื่อเป็นสารที่ชอบไขมัน (Dick and Scott, 1992) สารพอลิฟีนอลแสดงลักษณะกึ่งมีขั้ว (semi-polar) ในภาวะที่ทดสอบส่วนให้มีพอพิลีนไกลคอลหรือกลีเซอรอล (ต่ำกว่า10%) ซึ่งแม้จะเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังแต่มีผลต่อไขมันในช่องว่างระหว่างเซลล์ของชั้นสตราตัมคอร์เนียมในผิวหนังน้อย (Williams and Barry 2004) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองนี้ไม่มีผลต่อการซึมผ่านสารพอลิฟีนอลปัจจัยที่จำกัดการซึมผ่านที่สำคัญในที่นี้คือผิวหนังซึ่งพบว่าผิวหนังทั้งสองให้ข้อมูลการซึมผ่าน (ทั้งปริมาณอัตราเร็วและเวลาเริ่มต้น) ซึ่งวัดจากพอลิฟีนอลรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลได้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังของสารพอลิฟีนอลจากสารสกัดทุกชนิดอยู่ในเกณฑ์ต่ำมากโดยเมื่อคำนวณเทียบกับปริมาณตั้งต้นในสารละลายส่วนให้พบว่าร้อยละต่อพื้นที่ต่อเวลาอยู่ในช่วงระหว่าง 0.0004 $\%\cdot cm^{-2}\cdot h^{-1}$ (ค่าต่ำที่สุดจากสารสกัด RK ผ่านผิวหนังคน) ถึง 0.009$\%\cdot cm^{-2}\cdot h^{-1}$ (ค่าสูงสุดจากสารสกัด EE ผ่านผิวหนังคน) ซึ่งแสดงว่าการให้สารสกัดทาที่ผิวหนังจะมีพอลิฟีนอลซึมผ่านน้อยกว่า0.001 $\%\cdot cm^{-2}\cdot h^{-1}$ ในสภาวะที่ไม่มีปัจจัยขับเคลื่อน เช่น สูตรตำรับ หรือส่วนประกอบที่ช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังการใช้ผิวหนังหมูในการทดสอบการซึมผ่านของสารสกัดจากพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทดสอบการซึมผ่านพอลิฟีนอลจึงอาจไม่เหมาะที่จะแปลผลเพื่อเทียบกับการซึมผ่านผิวหนังคน หากเป็นการใช้เพื่อทดสอบเปรียบเทียบสูตรตำรับหรืออื่นใดก็ควรทำด้วยความระมัดระวังในการแปลผลเช่นกัน สารสกัดจากพืชที่ได้รับความนิยมและมีการใช้มากขึ้นในเครื่องสำอางจัดอยู่ในกลุ่มสารพอลิฟีนอลที่นำมาเป็นตัวอย่างการศึกษานี้เนื่องด้วยการเติมสารสกัดจากพืชในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีปริมาณน้อย ประกอบกับการที่สารพอลิฟีนอลก็ซึมผ่านได้น้อยมากทำให้โอกาสสรุปผลผิดพลาดมีสูงมาก อย่างไรก็ตามผิวหนังคนก็เป็นชีววัสดุที่มีโอกาสให้ข้อมูลเบี่ยงเบนสูงจำเป็นต้องเก็บเนื้อเยื่อและตัวอย่างในการทดสอบอย่างระมัดระวัง นอกจากนี้ควรทำการวัดปริมาณคงค้างในผิวหนังที่ใช้เป็นแผ่นกั้นเพื่อความชัดเจน

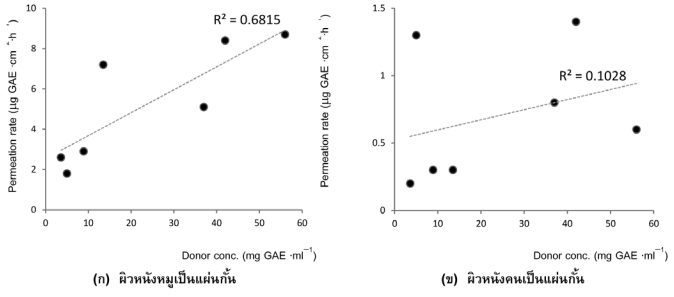
กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF-MAG) ร่วมกับบริษัทเอสแอนด์เจอินเตอร์เนชันแนล (มหาชน) จำกัดและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านจากหน่วยวิจัยและพัฒนาบริษัทเอสแอนด์เจอินเตอร์เนชันแนลฯ เจ้าหน้าที่สำนักงานประสานงานโครงการ TRF-MAG และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่าน





รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการซึมผ่านสะสมของพอลิฟีนอล (μgGAE·cm^{-2}) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อซึมผ่านผิวหนังหมู (●) และผิวหนังคน (■) ของ10%ของสารสกัดแต่ละชนิด ส่วนรับคือน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 32±1°C (n = 6)



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของปริมาณพอลิฟีนอลในส่วนให้ของสารสกัดแต่ละตัวกับอัตราการซึมผ่านของสารสกัดนั้นในการทดสอบการซึมผ่านในหลอดทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้ผิวหนังหมูเป็นแผ่นกั้น (ก) และผิวหนังคน (ข)

References

Akomeah F, Nazir T, Martin GP, Brown MB.Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21(2-3): 337-345.

Barry BW. Review Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug Delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 101 -114.

Chulasiri M, Wanaswas P, Sriaum D,et al., Utilizing hydroglycolic extract from myrobalan fruits to counteract reactive oxygen species. *Int J Cosmetic Science* 2011; 33:371-376.

COLIPA.Guidelines for percutaneous absorption/ penetration. In: Macmillan R. editor. 2nd Edition, The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association. *Brussel: Belgium;* 1997.

Dick IP, Scott RC. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* 1992; 44: 640-645.

Diembeck W, Bekc H, Benech-KieVer F, Courtellemonth P, Dupuis J, Lovell W, et al. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food ChemToxicol* 1999; 37: 191-205.

European Commission.Folin-Ciocalteu Index (OIV-AJ-2-10-INDFOL)-Category IV method. Official Journal of the European Union 2010; 43/01: 12-13.

Gabbanini S, Lucchi E, Carli M, Berlini E, Minghetti A, Valgimigli L. *In vitro* evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 370-376.

Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry* 2003; 83: 547-550.

Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba SS, Singh M. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr Med Chem* 2000; 7: 593-608.

Kovatcheva-Apostolova EG, Georgiev MI, Ilieva MP, Skibsted LH, Rødtjer A, Andersen ML. Extracts of plant cell cultures of Lavandulavera and Rosa damascena as sources of phenolic antioxidants for use in foods. *Eur Food Res Technol* 2008; 227: 1243-1249.

Malhotra S, Subban R, Singh A. Lichens-role in traditional medicine and drug discovery.*Internet J Alternative Med* 2008; 5(2).

Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with reference to the domestic pig. C*urr Prob Dermatol* 1987; 7: 39-52.

Priprem A, Khamlert C, Pongjanyakul T, Radapong S, Rittirod T, Chitropas P. Comparative permeation studies between scale region of shed snake skin and human skin *in vitro. Am J Agri Biol Sci* 2008; 3(1): 444-450.

Santos-Buelga C, Scalbert A. Proantocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2000; 80(7): 1094-1117.

Singleton VL, Rossi JA.Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16:144-158.

Waterhouse AL. Determination of total phenolics. In: Wrolstad ERE, editor. Current protocols in food analytical chemistry. *New York: Wiley;* 2002.

Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Delivery Rev* 2004; 56(5): 603-618.

Yim HS, Chye FY, Ho SK, Ho CW. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *As J Fd& Agro-Ind* 2009; 2(3): 371-380.

Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 2001; 49(11): 5165-70.