NUEJ
NARESUAN UNIVERSITY
ENGINEERING JOURNAL

การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ผิวหนังของแผ่นมาส์กหน้าจากไฟโบรอิน ไคโตซาน และไนอะซิน

Analysis of Factors Influencing the Cytotoxicity of Fibroin-Chitosan-Niacin Facial Mask

ณัฏฐ์ปภาณ ยาวุฒิ[1], อนิรุท ไชยจารุวณิช[2*] และ สุรักษ์ อุดมสม[3]
Natpaphan Yawut [1],Anirut Chaijaruwanich[2*] and Suruk Udomsom[3]

[1,2*]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]ศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์ สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[*]Corresponding author: anirut@eng.cmu.ac.th
E-mail: natpaphan_yawut@cmu.ac.th[1] , suruk_u@cmu.ac.th[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของแผ่นมาส์กหน้าที่ขึ้นรูปจากไฟโบรอิน ไคโตซาน และไนอะซินด้วยวิธีการขึ้นรูปด้วยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งโดยประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองแฟคทอเรียลแบบเพิ่มจุดกึ่งกลางโดยปัจจัยที่ศึกษาคือระดับขององค์ประกอบที่ใช้ในการขึ้นรูป ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหมไทย ไนอะซินจากข้าวหอมนิล และเตรียมไคโตซานจากกระดองหมึก ผลจากการวิเคราะห์ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าในช่วงปริมาณขององค์ประกอบที่ศึกษาระดับของไนอะซินและอันตรกิริยาร่วมระหว่างไคโตซานและไนอะซินมีผลต่อความเป็นพิษ ของเซลล์ระดับขององค์ประกอบที่เหมาะสมคือ ไคโตซาน 2 wt% และไนอะซิน 5 wt% ซึ่งให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนัง ที่ดี เนื่องจากค่าอัตราการอยู่รอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 100 % ใน 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ไฟโบรอิน ไคโตซาน ไนอะซิน แผ่นมาส์กหน้า การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การออกแบบการทดลองแฟคทอเรียล

Abstract

This research aims to analyze factors affecting cytotoxicity of facial masks fabricated from fibroin, chitosan and niacin by a lyophilized or freeze dry method applying a factorial experiment with center point. The factors include levels of components used in the fabrication. In this study, fibroin was synthesized from Thai silkworm cocoons whereas niacin was synthesized from Hom-nin rice and chitosan from cuttlefish bone. From the results of the cytotoxicity tests, it was found that within the range studied the levels of niacin and interaction between chitosan and niacin significantly affected the cytotoxicity. The suitable levels of the components were 2 wt% chitosan and 5wt% niacin, resulting in good cell viability with the cell viability more than 100% within 24 hours.

Keywords: Fibroin, Chitosan, Niacin, Facial Mask, Cytotoxicity test, Factorial Design

1. บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์มาส์กหน้าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ได้รับความนิยมสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการดูแลผิวหน้าและเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มสารอาหารให้แก่ผิวหน้าโดยตรง เนื่องจากการพกพาที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งานและยังหาซื้อได้ง่าย การมาส์กเป็นการนำสารบำรุงผิวที่มีความเข้มข้นมาทำการเคลือบผิว เพื่อดูดซับทำความสะอาด และยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต เพิ่มการบำรุงผิวอย่างล้ำลึก ผิวพรรณดูเปล่งปลั่ง ซึ่งการมาส์กมีหลายรูปแบบทั้งการมาส์กด้วยครีม มาส์กแบบพอกหน้าแล้วล้างออก มาส์กแบบพอกบนหน้าแล้วลอกออก และมาส์กแบบแผ่น

ทั้งนี้แผ่นมาส์กหน้าที่วางจำหน่ายในปัจจุบันก็ยังมีหลากหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของแผ่นมาส์กหน้านั้น โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ แบบแรกชนิดกระดาษ และแบบที่สองชนิดไบโอเซลลูโลสคล้ายแผ่นเจล ซึ่งทั้งสองแบบต่างมีข้อเสีย [1] ทั้งที่เป็นกระดาษไม่แนบสนิทกับผิวหน้าทำให้สารบำรุงระเหยออก แบบเจลมีอายุการใช้งานระยะสั้นเป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาแผ่นมาส์กจากข้อเสียต่างๆนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคการขึ้นรูปด้วยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อให้วัสดุแผ่นมาส์กหน้ามีระยะการเก็บรักษาได้นานขึ้น และวัสดุแผ่นมาส์กหน้ายังมีลักษณะคล้ายฟองน้ำเมื่อสัมผัสกับของเหลวจะคล้ายเจลซึ่งกักเก็บสารบำรุงไว้ ซึ่งวัสดุที่ใช้ในงานวิจัยนี้ล้วนมีคุณสมบัติทางเวชสำอางที่โดดเด่น จึงนำสารสังเคราะห์แต่ละอย่างมารวมกันเพื่อผลิตและพัฒนาแผ่นมาส์กหน้าด้วย 3 ส่วนผสม โดยไฟโบรอินเป็นเลิศแห่งมอยเจอร์ไรเซอร์ เป็นโปรตีนสกัดจากรังไหมด้วยกระบวนการทางชีวเคมี เป็นสรรพคุณของไฟโบรอินที่เหมาะแก่การผลิตเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิวจากโปรตีนไฟโบรอิน นอกจากนี้ไฟโบรอินยังเป็นวัสดุโปรตีนที่มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่พบในร่างกายมนุษย์ [2] ส่วนไคโตซานก็มีคุณสมบัติที่ดีทางเวชสำอางมีความโดดเด่นในการดูดซับสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผิวให้หลุดออกได้ เนื่องจากไคโตซานมีประจุบวกอย่างล้นเหลือจึงทำให้มันสามารถเกาะกับประจุลบของผิวหน้าได้เป็นอย่างดี จึงมักถูกนำมาใช้ในเครื่องสำอาง [3] ทั้งนี้ไฟโบรอินและไคโตซานยังมีคุณสมบัติเป็นสารก่อฟิล์ม ซึ่งมีส่วนช่วย ในด้านโครงสร้าง และสาระสำคัญในการผลิตแผ่นมาส์กหน้าที่ช่วยด้านผิวพรรณมีผลต่อความสวยงามของผิวหน้าในงานวิจัยนี้คือ ไนอะซินจากข้าวหอมนิล ซึ่งผลการวิจัย ส่วนใหญ่มักชี้ว่าไนอะซินมีประโยชน์ต่อผิวพรรณมากมายไม่ว่าจะเป็นการช่วยทำให้ผิวนุ่มชุ่มชื้น สามารถช่วยเพิ่มปริมาณเซราไมด์ (Ceramide) และกรดไขมัน (Fatty Acid) ได้ดี และยังช่วยลดการสูญเสียน้ำ ทำให้ผิวมีความยืดหยุ่นดี พร้อมช่วยลดการติดเชื้อได้ดี ช่วยให้ผิวขาวกระจ่างใส ลดรอยด่างดำที่เกิดจากแสงแดด และแผลเป็นจากสิวได้ [4]

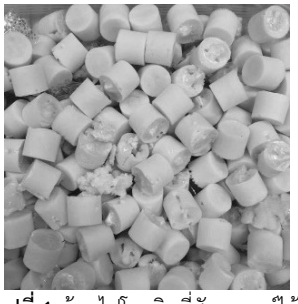
ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและพัฒนามาส์กหน้าแบบแผ่นซึ่งเป็นการใช้สารสกัดวิตามินจากธรรมชาติและมีส่วนผสมของสารสกัดจากพืชมาบำรุงผิวพรรณ โดยคุณสมบัติที่โดดเด่นของวัสดุทั้ง 3 นี้ ซึ่งเป็นวัสดุท้องถิ่นและมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการมาทำการผลิตแผ่นมาส์กหน้า โดยใช้หลักการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลร่วมกับจุดกึ่งกลางมาเป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ของแผ่นมาส์กหน้าที่ขึ้นรูปจาก ไฟโบรอิน ไคโตซาน และไนอะซิน ด้วยเทคนิคการขึ้นรูปด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilized method)

2. วิธีดำเนินการทำวิจัย

2.1 การสังเคราะห์สาร

2.1.1 การสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหม

เริ่มจากการทำความสะอาดและตัดรังไหมให้เป็นชิ้นขนาดเล็กปริมาณ 10 กรัมและทำการกำจัดโปรตีนเซริซินหรือกาวที่เคลือบอยู่ชั้นนอกสุดของรังไหมออก (Degum) โดยการต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้น 0.02 โมล เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 98-100 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างเส้นไหมแล้วนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดเอาสารละลายไฟโบรอินด้วยตัวทำละลาย (Ternary Solvent) 3 ตัว คือ แคลเซียมคลอไรด์ต่อเอทานอลต่อน้ำ ($CaCl_2$: CH_3CH_2OH : DI water) ในอัตราส่วน 1:2:8 โมล ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียล เพื่อให้ได้ไฟโบรอินในสารละลายเกลือ และจะถูกแยกโปรตีนกับเกลือออกจากกันโดยการไดอะไลซิส (Dialysis) ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วัน สารละลายไฟโบรอินสุดท้ายจะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนออกแล้วจึงนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน จานหลุม 24 หลุม (24 well plate) จะได้ ไฟโบรอินที่มีลักษณะเป็นก้อน ดังรูปที่ 1 จากนั้นจัดเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท อ้างอิงจาก [5] ไฟโบรอินที่สังเคราะห์ได้ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปคโตรสโครปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy :FT-IR)

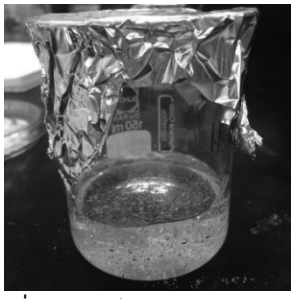


รูปที่ 1 ก้อนไฟโบรอินที่สังเคราะห์ได้

2.1.2 การเตรียมไคโตซานที่ได้จากกระดองหมึก

ในการศึกษานี้ใช้ไคโตซานสำเร็จรูปที่สกัดจากกระดองหมึกปริมาณ 0.5, 1.25 และ 2 กรัม โดยจะทำการละลายไคโตซานในสารละลายกรดอะซิติก 1% ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ซึ่งไคโต

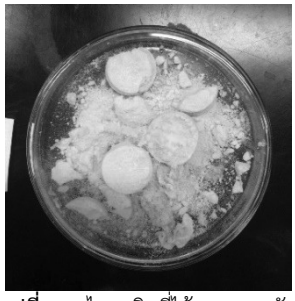
ซานจะถูกทำให้ละลายอย่างสมบูรณ์จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน จากนั้นจะทำการกรองไคโตซานที่ได้ให้เนื้อละเอียด ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ลักษณะไคโตซานในสารละลาย

2.1.3 การสังเคราะห์ไนอะซินจากข้าวหอม

โดยเริ่มจากการบดข้าวให้ละเอียดปริมาณ 20 กรัม เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่ความเข้มข้น 0.25 โมล ลงไป 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการปรับพีเอช (pH) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ pH ที่ 5.5 จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะทำการเพิ่มปาเปน (papain) ปริมาณ 0.1 กรัม ลงไปแล้วทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมกรดไทรคลอโรอะซีติค (Trichloroacetic acid) 45% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อกำจัดโปรตีนออก ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการกรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง No.42 จากนั้นทำการกรองด้วยเยื่อเซลลูโลส (Cellulose filter) ขนาด 0.45 µm ดัดแปลงจาก [6] หลังจากสังเคราะห์ไนอะซินจากข้าวหอมนิลแล้วจะทำการตรวจสอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) เพื่อวิเคราะห์และยืนยันสารไนอะซินที่สังเคราะห์ได้ แล้วจึงนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 3 วัน จะได้ไนอะซินในลักษณะเป็นผง ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผงไนอะซินที่ได้จากการสกัด

2.2 การออกแบบการทดลอง

ในการศึกษานี้ ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป แบบ 2^3 โดยได้ทำการทดลองซ้ำ อย่างละ 2 ครั้ง ร่วมกับการทดลองจุดกึ่งกลาง 4 จุด เป็น 4 การทดลอง รวมเป็นจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 20 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยกำหนดให้ A คือ ไฟโบรอิน B คือ ไคโตซาน และ C คือ ไนอะซิน เพื่อหาวิเคราะห์องค์ประกอบที่ใช้ขึ้นรูปแผ่นมาส์กหน้าที่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ช่วงของปริมาณของไฟโปรอินที่ใช้ในการศึกษานี้อ้างอิงจาก [7] และปริมาณสูงสุดของไคโตซาน (2 %) อ้างอิงจาก [8] ส่วนค่าต่ำสุดเป็นปริมาณไคโตซานที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นที่สามารถทำการขึ้นรูปได้ และปริมาณของไนอะซินอ้างอิงจาก [4] ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการใช้บนใบหน้า

ตารางที่ 1 อัตราส่วนขององค์ประกอบที่ใช้ในแต่ละระดับปัจจัย

ปัจจัย	หน่วย	สูง (+1)	กลาง (0)	ต่ำ (-1)
Fibroin (A)	wt %	1.4	0.75	0.1
Chitosan (B)	wt %	2	1.25	0.5
Niacin (C)	wt %	5	3.5	2

ตารางที่ 2 อัตราส่วนที่ใช้ในการทดลอง 10 อัตราส่วน

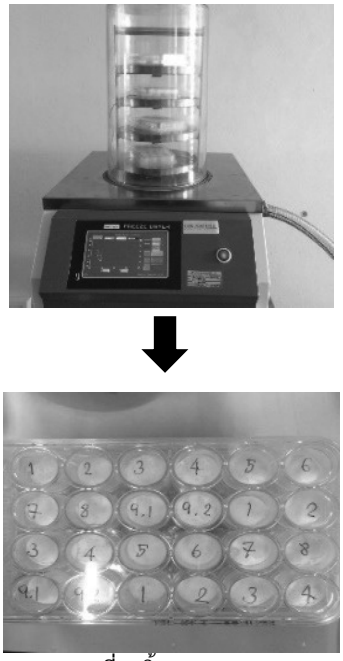
ลำดับการทดลอง	ปัจจัย		
	ไฟโบรอิน	ไคโตซาน	ไนอะซิน
1	0.1	0.5	2.0
2	1.4	0.5	2.0
3	0.1	2.0	2.0
4	1.4	2.0	2.0
5	0.1	0.5	5.0
6	1.4	0.5	5.0
7	0.1	2.0	5.0
8	1.4	2.0	5.0
9.1	0.75	1.25	3.5
9.2	0.75	1.25	3.5

จากตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนที่ใช้ในการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2.3 การเตรียมและขึ้นรูปแผ่นมาส์กหน้า

ก่อนการขึ้นรูปต้องเตรียมไฟโบรอิน ไคโตซาน และไนอะซินในรูปของสารละลาย หลังจากนั้นผสมเข้าด้วยกันเป็นเวลา 15

นาที กวนที่อุณหภูมิห้องตามอัตราส่วนที่ได้จากการออกแบบการทดลองดังตารางที่ 1 และเพิ่มกลูตารอลดีไฮด์ 2.5 % ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ลงไปซึ่งเป็นตัวช่วยยึดจับสารละลายทั้ง 3 จากนั้นนำสารละลายเทลงบน 24 well plate แล้วนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง จะได้ ชิ้นงานทดสอบ ดังรูปที่ 4 เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 4 ชิ้นงานทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติของแผ่นมาส์กหน้า

หลังจากทำการขึ้นรูปแผ่นมาส์กหน้าในแต่ละอัตราส่วนแล้ว ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติที่เป็นผลตอบสนองของงานวิจัย คือ ความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Minitab เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของแผ่นมาส์กหน้าที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์

2.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีววิทยา

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Test) ใช้เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ของแผ่นมาส์กหน้า โดยการทดสอบนี้ใช้เซลล์ผิวหนัง ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ วิเคราะห์ได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (Cell viability) จากนั้นทำการนับเซลล์แล้วนำไปเลี้ยงใน 24 well plate ซึ่งปริมาณเซลล์ของแต่ละหลุม คือ 50,000 เซลล์ต่อหลุม ดังรูปที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นงานใส่ลงไปแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำชิ้นงานออก แล้วเติมสาร 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไป บ่มต่อ 4 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลายทั้งหมดออก จากนั้นเติมสารละลาย Dimethyl sulphoxide (DMSO) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 20 นาที จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารละลายที่เป็นสีม่วง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และ 630 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาทำการคำนวณเพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจากสมการที่ 1

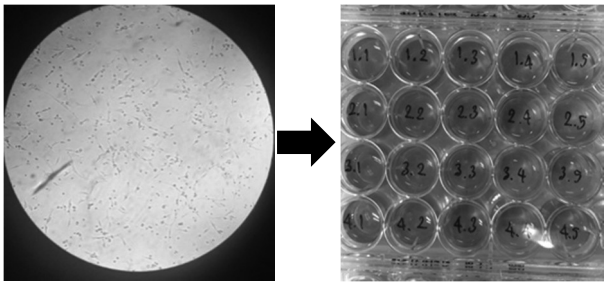
$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{OD of treated cell}) \times 100}{(\text{OD of control cell})} \qquad (1)$$

จากสมการที่ 1 กำหนดให้

Cell viability (%) = % การรอดชีวิตของเซลล์

OD of treated cell = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ทดลอง

OD of control cell = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม



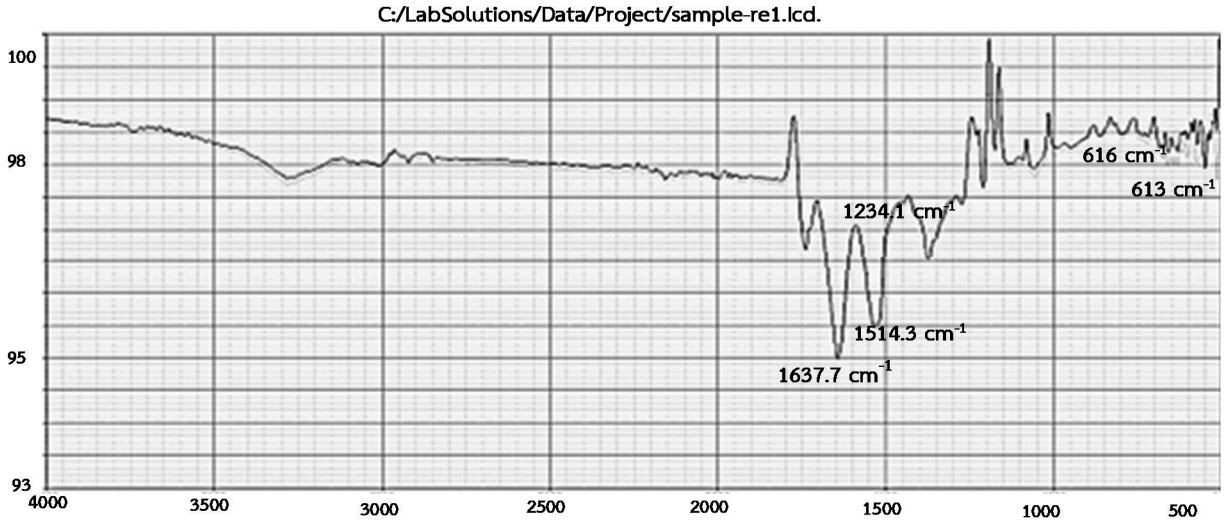
รูปที่ 5 เซลล์ผิวหนัง

3. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.1 ผลการตรวจสอบไฟโบรอิน ไนอะซิน และการเตรียมไคโตซาน

3.1.1 ผลการสังเคราะห์ไฟโบรอิน

จากผลการทดลองในการสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหม โดยทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุไฟโบรอินด้วยการดูดกลืนคลื่นความร้อนแบบการแปลงฟูริเยร์ (FT-IR)

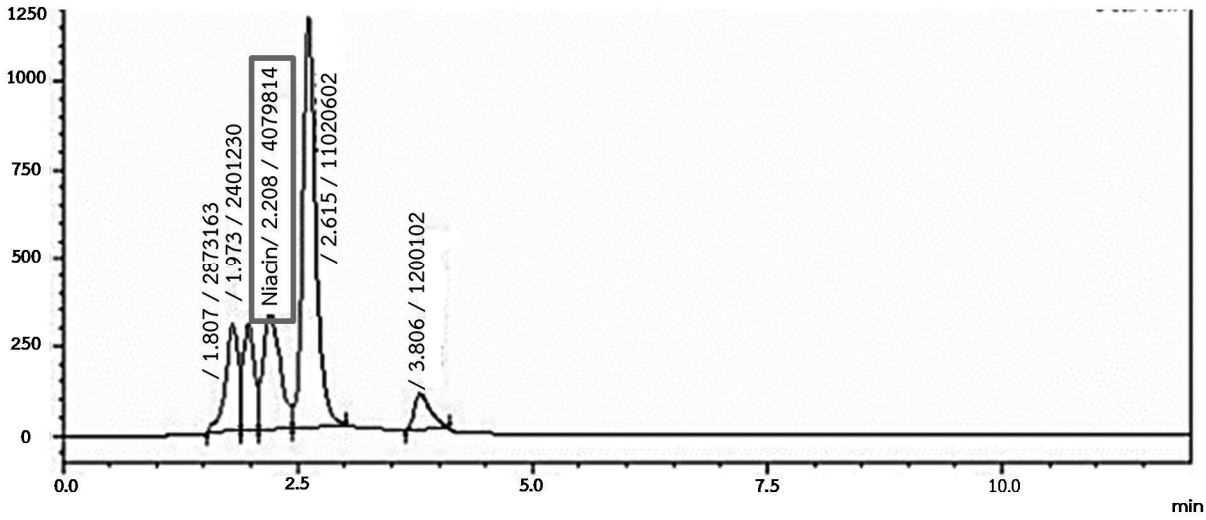


รูปที่ 6 กราฟ FT-IR ของไฟโบรอิน

จากการวิเคราะห์เฟสโครงสร้างและองค์ประกอบของไฟโบรอินด้วยการดูดกลืนคลื่นความร้อนแบบการแปลงฟูริเยร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy : FT- IR) อ้างอิงจาก[5] ดังรูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของหมู่หรือโครงสร้างโมเลกุลที่สำคัญของไฟโบรอินพบว่าเฟสองค์ประกอบของไฟโบรอินที่ได้ทำการสังเคราะห์จากรังไหมมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงอยู่ในช่วงเดียวกันกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของกรดอะมิโน ในไฟโบรอิน แสดงผลค่าไฟโบรอินมาตรฐาน กับ ไฟโบรอินที่สังเคราะห์ได้ คือ 616 cm^{-1} , 613 cm^{-1},1637.7 cm^{-1}, 1514.3 cm^{-1} และ 1234.1 cm^{-1} จึงสามารถยืนยันได้ว่าไฟโบรอินที่สังเคราะห์ขึ้นจากรังไหมนั้นเป็นไฟโบรอินจริง

3.1.2 ผลการสังเคราะห์ไนอะซิน

จากผลการทดลองในการสังเคราะห์ไนอะซินจากข้าวหอมนิลโดยทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการสังเคราะห์วัสดุด้วยการโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (HPLC)

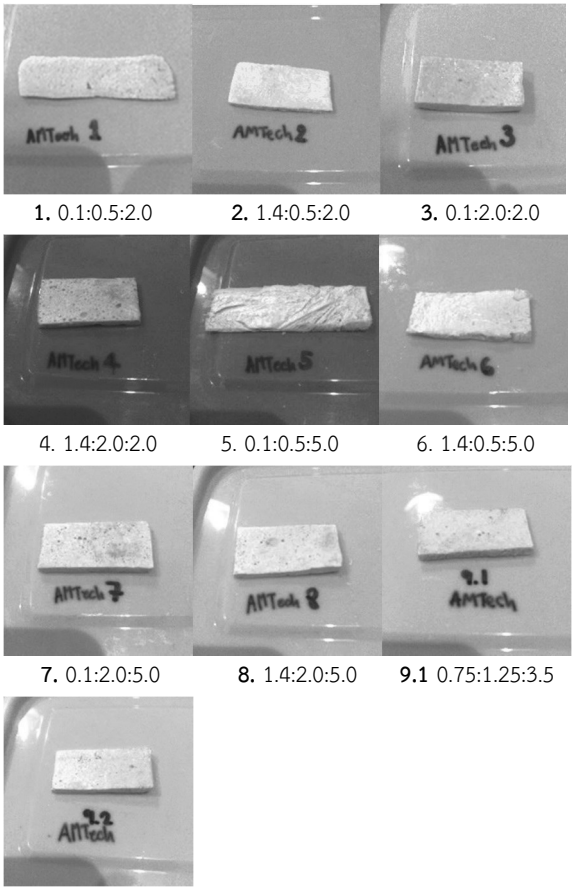


รูปที่ 7 HPLC ของไนอะซิน

จากการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการสังเคราะห์ไนอะซินจากข้าวหอมนิลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงดังรูปที่ 7 พบว่าปริมาณไนอะซินที่ได้จากการสังเคราะห์คือ 18.751 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารไนอะซินจริง

3.2 ผลการขึ้นรูปแผ่นมาส์กหน้า

การศึกษาลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นได้สังเกตจากการนำวัสดุออกจากแม่พิมพ์



1. 0.1:0.5:2.0 **2.** 1.4:0.5:2.0 **3.** 0.1:2.0:2.0

4. 1.4:2.0:2.0 5. 0.1:0.5:5.0 6. 1.4:0.5:5.0

7. 0.1:2.0:5.0 **8.** 1.4:2.0:5.0 **9.1** 0.75:1.25:3.5

9.2 0.75:1.25:3.5

รูปที่ 8 ลักษณะทางกายภาพจากการขึ้นรูป
(อัตราส่วนแสดงเป็น ไฟโบรอิน : ไคโตซาน : ไนอะซิน)

จากการทดลองขึ้นรูปแผ่นมาส์กหน้าตามอัตราส่วนดังตารางที่ 2 พบว่าแผ่นมาส์กหน้า ที่มีไคโตซานปริมาณสูงมีลักษณะทางกายภาพที่ดี ไม่ขาดง่าย ผิวหน้ามีความเรียบมีการเปลี่ยนแปลงหดตัวเล็กน้อยทำให้ควบคุมความหนาของแผ่นมาส์กหน้าได้ง่าย โดยอัตราส่วนที่ 3, 4, 7, 8, 9.1 และ 9.2 เป็นอัตราส่วนผสมที่มีไคโตซานระดับกลาง ถึง ระดับสูง ซึ่งเมื่อนำออกจากแม่พิมพ์แล้วจะมีลักษณะทางกายภาพที่ดี ไม่ขาดง่าย ผิวหน้ามีความเรียบ ความหนาของแผ่นมาส์กหน้าเป็นไปตามที่ต้องการ ส่วนอัตราส่วนที่ 1, 2, 5 และ 6 เป็นอัตราส่วนผสมที่มีไคโตซานระดับต่ำ เมื่อนำออจากแม่พิมพ์ลักษณะทางกายภาพจากการนำชิ้นงานออกมานั้นมีความเปราะบาง ขาดง่าย ผิวหน้าไม่เรียบเนียน ยากต่อการนำออกจากแม่พิมพ์ ความหนาไม่เป็นไปตามที่ต้องการ

3.3 ผลขององค์ประกอบต่อความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมมินิเทป (Minitab) เพื่อศึกษาว่าปัจจัยส่วนผสม (ไฟโบรอิน,ไคโตซาน, ไนอะซิน) ใดส่งผลต่อค่าการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังตารางที่ 3 แสดงผลจากการทดลอง

ตารางที่ 3 ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

ลำดับการทดลอง	% Cell viability 1	% Cell viability 2
1	104.390%	119.780%
2	104.191%	114.935%
3	79.949%	70.779%
4	56.924%	56.277%
5	272.444%	161.827%
6	277.202%	232.375%
7	297.083%	282.684%
8	261.569%	178.819%
9.1	129.482%	
9.2	156.188%	
9.3	183.828%	
9.4	157.703%	

โดยกำหนดสมมติฐาน คือ ถ้าหากค่า P-Value มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่ายอมรับสมมติฐานหลัก (H_0) กล่าวคือปัจจัยส่วนผสมนั้นไม่ส่งผลต่อค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่ถ้าหากค่า P-Value มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0) กล่าวคือปัจจัยส่วนผสมนั้นส่งผลต่อค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การคัดกรองปัจจัย

Factorial Fit: Cytotoxicity versus Fibroin, Chitosan, Niacin

Estimated Effects and Coefficients for Cytotoxicity (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		170.08	8.614	19.74	0.000
Fibroin	-7.08	-3.54	8.614	-0.41	0.689
Chitosan	-19.13	-9.57	8.614	-1.11	0.290
Niacin	150.85	75.42	8.614	8.76	0.000
Fibroin*Chitosan	-37.15	-18.57	8.614	-2.16	0.054
Fibroin*Niacin	-8.94	-4.47	8.614	-0.52	0.614
Chitosan*Niacin	38.21	19.10	8.614	2.22	0.049
Fibroin*Chitosan*Niacin	-16.53	-8.26	8.614	-0.96	0.358
Ct Pt		-13.27	19.262	-0.69	0.505

S = 34.4561 PRESS = 48953.3
R-Sq = 89.03% R-Sq(pred) = 58.89% R-Sq(adj) = 81.06%

จากผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 2 ซึ่งประกอบไปด้วยไฟโบรอิน ไคโตซาน และไนอะซิน โดยเมื่อพิจารณาค่า P-Value พบว่า ไนอะซินเป็นปัจจัยหลักปัจจัยเดียวที่มีนัยสำคัญและพบปัจจัยร่วมระหว่างไคโตซานกับไนอะซินที่มีนัยสำคัญต่อค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square) ของค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจากการทดลองได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 81.06% ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ดีและมีความพอเพียงในการนำข้อมูลเพื่อไปสร้างแบบจำลองและสมการทำนายผล

ตารางที่ 5 แสดงผลทดสอบทางสถิติของส่วนโค้ง (Curvature)

Analysis of Variance for Cytotoxicity (coded units)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	92484	92483.7	46241.8	34.35	0.000
Chitosan	1	1464	1464.2	1464.2	1.09	0.313
Niacin	1	91019	91019.5	91019.5	67.62	0.000
2-Way Interactions	1	5840	5839.8	5839.8	4.34	0.055
Chitosan*Niacin	1	5840	5839.8	5839.8	4.34	0.055
Curvature	1	563	563.5	563.5	0.42	0.527
Residual Error	15	20191	20191.1	1346.1		
Pure Error	15	20191	20191.1	1346.1		
Total	19	119078				

เมื่อพิจารณาค่าทดสอบทางสถิติของส่วนโค้งจากตารางที่ 5 พบว่า มีค่า F (Curvature) เท่ากับ 0.42 และมีค่า P-Value เท่ากับ 0.527 จะเห็นได้ว่า P-Value มีค่ามากกว่า 0.05 ซึ่งแสดงว่ายอมรับสมมติฐานหลัก มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Linear Model) ดังนั้นการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2^3 ที่จุดกึ่งกลาง อย่างเดียวก็เพียงพอที่จะให้สมการพื้นผิวผลตอบสนองที่เป็นตัวแทนที่แท้จริงได้ ดังนั้น จึงไม่ต้องเพิ่มจุดทดลองนอกเหนือจากแบบทดลองข้างต้น และสามารถสร้างแบบจำลองลดจำนวน (Reduced Model) โดยรวมเฉพาะเทอมที่มีนัยสำคัญเท่านั้น ดังสมการที่ 2 เมื่อแสดงค่าแทนสมการเป็น code (+1, -1)

$$Y = 170.08 - 9.57B + 75.42C + 19.10BC \quad (2)$$

เมื่อ Y: อัตราการรอดชีวิตของเซลล์

B: ไคโตซาน

C: ไนอะซิน

จากสมการสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อใช้ไคโตซาน (B) ที่ระดับปัจจัยค่าน้อย (-) คือ 0.5 wt% จะทำให้ผลตอบ (Y) เพิ่มขึ้น แต่อันตรกิริยาร่วมระหว่างไคโตซานและไนอะซิน (BC) เมื่อสังเกตจากเลขสัมประสิทธิ์ 75.42C และ 19.10BC มีค่ามากกว่า 9.57B จึงส่งผลทำให้ไคโตซาน (B) อยู่ในระดับปัจจัยค่าสูง (+) คือ 2 wt% ไปด้วย กล่าวคือ เมื่อใช้ระดับปัจจัยของไคโตซาน และไนอะซินที่ค่าสูง คือ 2 และ 5 wt% ตามลำดับจะทำให้ได้ผลตอบ (Y) คือ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าผลตอบที่งานวิจัยต้องการ

ตารางที่ 6 การหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัย

Response Optimization

Parameters

	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Import
Cytotoxicity	Maximum	100	289	289	1	1

Global Solution

Chitosan = 1
Niacin = 1

Predicted Responses

Cytotoxicity = 255.039 , desirability = 0.820311

ทำการทดสอบยืนยันผล เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องว่าผลการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายจากการวิเคราะห์ด้วยการหาปัจจัยที่เหมาะสม (Response Optimization) ดังตารางที่ 4 โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้ววัดค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ คือ ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) เท่ากับ 255.039 % โดยทำการทดลองและแสดงผลการวิเคราะห์ค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ดังตารางที่ 6 ซึ่งจากการทดลองยืนยันผลได้ค่าเฉลี่ยของ%การรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 242.629 %

กำหนดให้ สมมติฐานหลัก $H_0 : \mu = 255.039$

สมมติฐานรอง $H_1 : \mu \neq 255.039$

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์การยืนยันผล

One-Sample T: Cytotoxicity

Test of mu = 255.039 vs not = 255.039

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% CI	T	P
Cytotoxicity	5	242.6	25.1	11.2	(211.5, 273.8)	-1.11	0.331

ผลจากการวิเคราะห์การยืนยันผลทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า P-Value มีค่าเท่ากับ 0.331 มีค่ามากกว่า 0.05 ที่ความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งแสดงว่ายอมรับสมมติฐานหลักของการทดลองที่ไคโตซานระดับสูง (+) เท่ากับ 2 wt% และไนอะซินระดับสูง (+) เท่ากับ 5 wt% ซึ่งค่าจากการทดลองยืนยันผลกับค่าการวิเคราะห์ด้วย Response Optimization ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

4. สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการขึ้นรูปและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของสารที่ได้ทำการสังเคราะห์และเตรียมจากวัสดุทางธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลอง

แฟคทอเรียลแบบเพิ่มจุดกึ่งกลางเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังจากผลการทดลองในการสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหมไนอะซินจากข้าวหอมนิล และเตรียมไคโตซานกระดองหมึก พบว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมดเป็นสารสกัดจริง ตามสารมาตรฐานทั้งเฟสโครงสร้างและองค์ประกอบเมื่อนำสารสังเคราะห์ ไปทำการศึกษาการขึ้นรูป พบว่าอัตราส่วนผสมที่มีไคโตซานระดับสูงส่งผลให้ลักษณะทางกายภาพของแผ่นมาส์กหน้าแข็งแรง ผิวหน้าเรียบ ความหนาได้ตามที่ต้องการ แสดงถึงปริมาณของไคโตซาน มีผลต่อโครงสร้างของแผ่นมาส์กหน้า และเมื่อทำการศึกษาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนังอย่างมีนัยสำคัญคือ ไนอะซินและอันตรกิริยาร่วมระหว่าง ไคโตซานและไนอะซิน ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติคือ ไคโตซาน 2 wt% และไนอะซิน 5 wt% ซึ่งจากการวิเคราะห์สามารถยืนยันได้จากการทดลองของชิ้นงานทดสอบต่อเซลล์ผิวหนังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่ง เซลล์ผิวหนังมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100 % ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์และสามารถนำข้อมูลดังกล่าวจากการทดลองข้างต้นนำข้อมูลไปใช้เป็นพื้นฐานด้านความปลอดภัยของสารที่สังเคราะห์และเตรียมจากวัสดุธรรมชาติ ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นแผ่นมาส์กหน้าที่ใช้สารสังเคราะห์นี้เป็นส่วนประกอบในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ให้ความรู้ในการทำวิจัย ผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์การทดลองและสถานที่ในการทำการทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์สารสังเคราะห์และทดสอบชิ้นงานทดสอบ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Murillo- Carretero, M., Ruano, M. J., (2002). Antiproliferative effect of nitric oxide on epidermal growth factor- responsive human neuroblastoma cells, Journal of Neurochemistry 83(1): 119-131.

[2] Kongchang, W., (2010). Haemagglutination Inhibition of Newcastle Disease Virus by Silk Fibroin, King Mongkut's Institute of Technology: pp.15.

[3] Sang-Urai, S., (2006). Isolation of a Biopolymer from Crustaceans, Its Derivatization and Uses in Adsorotion of some Chemicals, Department of ChemistryGraduate School, Silpakorn University :pp.10.

[4] Woranithathorn, V., (2012). Effectiveness of 5% niacinamide on facial sebum production, MFU RESEARCH CONFERENCE: pp.1-7.

[5] Oonjai, A., (2016). Development of Porous Bone Substitute by Freeze Dry Method, Department of Industrial Engineering, Chiang Mai University: pp.48.

[6] Padmanaban, G.K, Iftekher, M, Duane, P.M., (1999). Postcolumn Fluorimetric HPLC Procedure for Determination of Niacin Content of Cereals, CEREAL CHEMITRY: 512-513.

[7] Personal Care Products Council., (2015). Concentration of use by FDA product category: Silk. Unpublished data submitted by the Personal Care Products Council, on 1-6-2015. pp.1.

[8] Wetchakun, C., Puapermpoonsiri, U., and Sila-on, W., (2015). Effect of Alcohol and Co-Film Former on The Physical and Mechanical Properties of Facial Mask Formulations, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University: pp.1-8.