

การพัฒนาไมโครอิมัลชันเอกโทอินสำหรับนำส่งทางผิวหนัง

นางสาวนงราม จันทเวช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF ECTOIN MICROEMULSIONS FOR SKIN DELIVERY

Miss Nongrahm Janthawej



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Cosmetic Science

Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาไมโครอิมัลชันเอคโทอินสำหรับนำส่งทางผิวหนัง
โดย	นางสาวนงราม จันทเวช
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.ดุขฎิ์ ชาญวานิช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.วราภรณ์ สุวกุล

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สุกุลบำรุงศิลป์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒน์กานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.ดุขฎิ์ ชาญวานิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.วราภรณ์ สุวกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนวยการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.สุชาดา ชุตินาวรรพันธ์)

นงราม จันทเวช : การพัฒนาไมโครอิมัลชันเอกโทอินสำหรับนำส่งทางผิวหนัง (DEVELOPMENT OF ECTOIN MICROEMULSIONS FOR SKIN DELIVERY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ภญ. ดร.ดุขฎิ ชาญวานิช, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ภญ. ดร.วราภรณ์ สุวกุล, 65 หน้า.

เอกโทอินเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสารสำคัญทางเครื่องสำอางที่ให้ผลการปกป้องผิว ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น และให้ผลชะลอการแก่ที่เนื่องมาจากแสงแดด อย่างไรก็ตาม เอกโทอินมีคุณสมบัติในการละลายน้ำที่ดีมาก มีค่า $\log P$ เท่ากับ -0.8 และมีจุดหลอมเหลวสูง ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ อาจทำให้เอกโทอินมีข้อจำกัดในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนัง จึงได้นำระบบไมโครอิมัลชันมาศึกษาเพื่อแก้ปัญหานี้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาและประเมินตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุเอกโทอิน โดยศึกษาผลของชนิดไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำมันกระจายในน้ำและชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน และชนิดน้ำมัน (ไอโซโพรพิลไมริสเทท (IPM) และกรดโอเลอิก) ต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่บรรจุเอกโทอิน การประเมินคุณสมบัติของเอกโทอินไมโครอิมัลชัน ได้แก่ คุณสมบัติทางกายภาพ การปลดปล่อยและการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังแบบนอกร่างกายของเอกโทอินจากระบบไมโครอิมัลชัน โดยมีสารละลายของเอกโทอินในน้ำเป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ ยังศึกษาความคงตัวของกายภาพและทางเคมีของเอกโทอินไมโครอิมัลชันที่สภาวะเร่ง ผลการศึกษาพบว่า ตำรับเอกโทอินไมโครอิมัลชันชนิด ชนิดน้ำมันกระจายในน้ำและชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน สามารถเตรียมได้โดยใช้ส่วนประกอบชนิดและอัตราส่วนที่เลือกมา ทุกตำรับมีความคงตัวดีหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน ยกเว้นตำรับ “IPM o/w” ซึ่งเหลือเอกโทอิน 88 เปอร์เซ็นต์ ตำรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ สามารถละลาย ectoin ได้มากกว่าชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน ที่มีน้ำมันชนิดเดียวกัน ความหนืดของตำรับชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ จะมีค่ามากกว่าชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน ผลการศึกษาการปลดปล่อยเอกโทอินพบว่า ตำรับ “oleic o/w” จะแสดงการปลดปล่อยที่สูงที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับสารละลายเอกโทอิน และพบว่าการปลดปล่อยของทุกสูตรตำรับแสดงผลการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและการปลดปล่อยเป็นไปตามจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยแบบจลนศาสตร์อันดับหนึ่งของไมโครอิมัลชันทุกสูตรตำรับ ($p > 0.05$) ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวพบว่า ระบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านชั้นผิวหนัง ($\%Q_{24}$) ของเอกโทอินได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารละลายเอกโทอิน ($p < 0.05$) ยกเว้น ตำรับ “IPM w/o” ที่ให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ตำรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน ช่วยเพิ่มการสะสมของเอกโทอินในชั้นผิวหนัง ($\%Q_s$) ได้ดีกว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยไม่คำนึงถึงชนิดของน้ำมัน ดังนั้น ไมโครอิมัลชันจึงเป็นระบบที่น่าสนใจสำหรับการนำส่งเอกโทอินเข้าสู่ผิวหนังซึ่งจะพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป

ภาควิชา	วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัช	ลายมือชื่อนิสิต
	อุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ปีการศึกษา 2559

5676237033 : MAJOR COSMETIC SCIENCE

KEYWORDS: ECTOIN / MICROEMULSION / TYPE OF MICROEMULSION / TYPE OF OIL / RELEASE / SKIN PERMEATION

NONGRAHM JANTHAWAJ: DEVELOPMENT OF ECTOIN MICROEMULSIONS FOR SKIN DELIVERY. ADVISOR: DUSADEE CHARNVANICH, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. WARAPORN SUWAKUL, Ph.D., 65 pp.

Ectoin is renowned as an active cosmetic ingredient with skin protection, moisturizing and anti-photoaging effects. However, ectoin is a compound with high water solubility, a log P value of -0.8 and high melting point. These properties of ectoin are limitations of skin permeability. Microemulsion has been studied to conquer these problems. The purpose of the present study was to develop and characterize microemulsions containing ectoin. Furthermore, effects of microemulsion type (o/w and w/o) and oil type (isopropyl myristate (IPM) and oleic acid) on properties of ectoin microemulsions were also investigated. Evaluation of properties of ectoin microemulsions included physical properties, *in vitro* release and skin permeability of ectoin from the microemulsion system. Aqueous solution of ectoin was prepared as a control group. In addition, physical and chemical stability tests of ectoin microemulsions were also performed at the accelerated condition. Results showed that o/w and w/o microemulsions containing ectoin could be prepared from type and ratio of the components chosen. All formulations were stable after storage at 45°C for two months, except formulation “IPM o/w” that remained ectoin of 88%. The o/w type of microemulsions could dissolve ectoin more than the w/o type of microemulsions with the same oil. Viscosity of the o/w type was more than the w/o type. Release study of ectoin was found that the formulation “oleic o/w” showed the maximum release which was close to the ectoin solution. Release of all formulations presented burst effect and followed the first-order kinetics. However, no significant difference among first-order release rate constants of all formulations was observed ($p > 0.05$). For skin permeation study, it was found that the microemulsion system could significantly improve skin permeability of ectoin ($\%Q_{24}$) compared to the ectoin solution ($p < 0.05$), except for the formulation “IPM w/o” showing no significant difference. The w/o microemulsions gave significantly greater skin deposition ($\%Q_5$) of ectoin than the o/w microemulsions regardless of oil type ($p < 0.05$). In conclusion, microemulsion is a promising system for dermal delivery of ectoin developed for further application in cosmetic industry.

Department: Pharmaceutics and Industrial Student's Signature

 Pharmacy Advisor's Signature

Field of Study: Cosmetic Science Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษางานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อ. ภญ. ดร.ดุขฎิ ชาญวานิช อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ. ภญ. ดร.วราภรณ์ สุวกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่ดี และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องตลอดการทำวิจัย ตลอดจนให้ความรู้และ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบริษัท โครด้า (ประเทศไทย) จำกัด ที่อนุเคราะห์สารเคมีในการเตรียมตัวรับ ไมโครอิมัลชัน

ขอขอบคุณฟาร์มชโลธร สำหรับความอนุเคราะห์หนังสือในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง แบบนอกร่าง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่คอยอนุเคราะห์ความช่วยเหลืออุปกรณ์หรือความสะดวกต่างๆในการทำงานวิจัย ให้ราบรื่น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ	1
บทที่ 1	1
บทที่ 2	4
2.1 Photoaging	4
2.2 Ectoin	5
2.2.1 ฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของ ectoin.....	5
2.2.1.1 ฤทธิ์การชะลอริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด (anti-photoaging).....	5
2.2.1.2 ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะต่าง ๆ	6
2.2.1.3 ฤทธิ์เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง	6
2.2.2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ ectoin	7
2.2.3 การศึกษาระบบนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง	8
2.2.3.1 ระบบ submicron emulsions	8
2.2.3.2 ระบบ microemulsion.....	9
2.3 ระบบไมโครอิมัลชัน	9
2.3.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน	10
2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชัน	11

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ	13
3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin โดยใช้วิธี HPLC	14
3.3 การตั้งสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน	15
3.4 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน	16
3.4.1 ลักษณะภายนอก	16
3.4.2 ชนิดของไมโครอิมัลชัน	16
3.4.3 ความหนืด	16
3.4.4 ขนาดและการกระจายขนาด	17
3.5 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	17
3.5.1 การหาค่าการละลายของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชัน	17
3.5.2 การเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	17
3.6 การประเมินตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	17
3.6.1 คุณลักษณะทางกายภาพ	17
3.6.2 ปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชัน	17
3.7 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	18
3.8 การศึกษาการปลดปล่อย ectoin แบบนอกกาย (Olejnik, Goscianska และ Nowak, 2012)	18
3.9 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ ectoin แบบนอกกาย (OECD, 2010)	19
3.9.1 การเตรียมหนังหมูสำหรับศึกษาการซึมผ่าน	19
3.9.2 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง	19
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ	20
ผลและการอภิปรายผลการทดลอง	21
4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin โดยใช้วิธี HPLC	21

4.1.1 ความจำเพาะ (specificity).....	21
4.1.2 ความเป็นเชิงเส้น (linearity).....	24
4.1.3 ความถูกต้อง (accuracy)	25
4.1.4 ความแม่นยำ (precision).....	26
4.2 การตั้งสูตรตำรับไมโครอิมัลชันและการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน.....	27
4.2.1 ลักษณะภายนอก.....	27
4.2.2 ชนิดของไมโครอิมัลชัน.....	27
4.2.3 ความหนืด.....	29
4.2.4 ขนาดและการกระจายขนาด.....	29
4.3 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	29
4.3.1 ค่าการละลายของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชัน	30
4.3.2 การเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin.....	31
4.4 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin	32
4.5 การศึกษาการปลดปล่อย ectoin แบบนอกกาย	33
4.6 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ ectoin แบบนอกกาย	36
บทที่ 5	41
รายการอ้างอิง	43
ภาคผนวก.....	50
ภาคผนวก ก	51
ภาคผนวก ข	55
ภาคผนวก ค	61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญตาราง

ตาราง 1 ปริมาณ ectoin ในผิวของตำรับ submicron emulsion ที่เตรียมด้วยวิธีการต่างๆ.....	8
ตาราง 2 ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันที่ศึกษา.....	16
ตาราง 3 ค่า peak area สำหรับกราฟมาตรฐานของสารละลาย ectoin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....	24
ตาราง 4 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ของการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ IPM w/o ด้วยวิธี HPLC.....	25
ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ของการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ oleic w/o ด้วยวิธี HPLC.....	25
ตาราง 6 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในชุดการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ IPM w/o ด้วยวิธี HPLC.....	26
ตาราง 7 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในชุดการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ oleic w/o ด้วยวิธี HPLC.....	26
ตาราง 8 ค่าความหนืดของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3).....	29
ตาราง 9 ค่าการละลายและความเข้มข้น 90% ของ ectoin ในสารละลายและไมโครอิมัลชันตำรับต่างๆ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3).....	30
ตาราง 10 ปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆที่วิเคราะห์ได้ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3).....	32
ตาราง 11 ความคงตัวของเคมีของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin หลังจากเก็บที่ 45°C ที่เวลาต่างๆ.....	33
ตาราง 12 ค่า coefficient of determination (r^2) ของการปลดปล่อยสาร ectoin จากตำรับตามจลนศาสตร์รูปแบบต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4).....	35
ตาราง 13 ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆตามจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order) (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4).....	36
ตาราง 14 เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในส่วนต่างๆหลังการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4).....	37

ตาราง 15 ค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังของ ectoin จากไมโครอิมัลชันและสารละลายที่ได้
จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4)..... 38



สารบัญภาพ

รูปภาพ 1 กลไกของ UVA ที่กระตุ้นการเกิด Photoaging ต่อเซลล์เคอราติโน (Krutmann และคณะ, 1996).....	4
รูปภาพ 2 ผลการยับยั้งสารสื่อประสาทลำดับที่สองและการกระตุ้น AP-2 ของสารละลาย ectoin จากการกระตุ้นด้วยรังสี UVA โดย A คือ ไม่ได้รับรังสีและสารละลาย ectoin, B คือ ได้รับรังสีแต่ไม่ได้รับสารละลาย ectoin และ C คือ ได้รับรังสีและสารละลาย ectoin	5
รูปภาพ 3 ผลการเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนังในอาสาสมัครเมื่อใช้ครีม ectoin (Graf และคณะ, 2008).....	6
รูปภาพ 4 ค่าการสูญเสียน้ำทางผิวหลังจากกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวและเมื่อใช้ครีมที่มี ectoin	6
รูปภาพ 5 ผลการเพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นของผิวหนังเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ A (ครีมเปล่า), B (ครีม ectoin 2%) และ control (ไม่มีการให้ผลิตภัณฑ์ใดๆ) (Heinrich, Garbe และ Tronnier, 2007).....	7
รูปภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ ectoin (Bitop, 2006 : online).....	8
รูปภาพ 7 ผลของวิธีการเตรียมต่อขนาดอนุภาคของ submicron emulsion ที่มี ectoin.....	9
รูปภาพ 8 โครมาโตแกรม HPLC ของสารละลายในน้ำของ ectoin 12 µg/ml.....	21
รูปภาพ 9 โครมาโตแกรม HPLC ของไมโครอิมัลชันเปล่า (ก-ง), ไมโครอิมัลชันที่มี ectoin (จ-ช), ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านที่ 24 ชม. ที่ไม่มีและมี ectoin (ฉ-ญ),.....	22
รูปภาพ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ectoin ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	Error!
Bookmark not defined.	
รูปภาพ 11 ลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้	27
รูปภาพ 12 ผลการประเมินการทดสอบชนิดของไมโครอิมัลชันด้วยวิธี dilution test (หลอดซ้ายเป็นตำรับเริ่มต้น หลอดกลางเจือจางด้วยน้ำ และหลอดขวาเจือจางด้วยน้ำมัน).....	28
รูปภาพ 13 ค่าความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าและไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin.....	31
รูปภาพ 14 กราฟการปลดปล่อย ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆ.....	34

รูปภาพ 15 เปอร์เซนต์ของ ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในของเหลวตัวกลางและในชั้นผิวหนังหลัง
การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4)..... 38



บทที่ 1

บทนำ

ริ้วรอยของผิวหนังเกิดได้จากหลายสาเหตุ ทั้งสาเหตุภายใน เช่น พันธุกรรม เชื้อชาติ และสาเหตุภายนอก เช่น รังสีอินฟราเรด คิววีบี และการสัมผัสแสงแดด การสัมผัสแสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดริ้วรอยบนใบหน้า (Krutmann, 2011) การเกิดริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด (photoaging) สาเหตุ ร้อยละ 95 เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิด UVA ที่มีความยาวคลื่น 320-400 nm (Bosch และคณะ, 2015) ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาสารสำคัญหลายชนิดที่ส่งผลในการชะลอการเกิดริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด สารสำคัญชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ คือ สาร ectoin ซึ่งมีผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในท้องตลาดหลายชนิดที่มี ectoin เป็นส่วนประกอบ และโฆษณาว่ามีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความชุ่มชื้น และชะลอริ้วรอยที่เกิดจากแสงแดด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ของ Shiseido, Paula's choice, Bioderma และ DADOSENS derma cosmetics เป็นต้น

ectoin เป็นสารสกัดที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (extremophilic microorganisms) เช่น ในสภาวะแห้งแล้งหรือมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างมาก (Bitop, 2006: online) โดย ectoin เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์และช่วยให้สิ่งมีชีวิตนี้ทนอยู่ในสภาวะเช่นนั้นได้ นักวิจัยจึงได้สกัดสาร ectoin จากแบคทีเรียและมีการศึกษาฤทธิ์ทางเครื่องสำอางมากมาย ได้แก่ Buenger และ Driller (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์การชะลอริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด (anti-photoaging) ในเซลล์ fibroblast ของมนุษย์ พบว่า ectoin 1 mM สามารถป้องกันการกระตุ้นของรังสี UVA ทำให้ลดการกระตุ้น AP-2 และลดการแสดงออกของยีนส์ ICAM-1 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการอักเสบของเซลล์ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดริ้วรอย นอกจากนี้ ยังพบว่า ectoin มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากสภาวะต่างๆ ได้แก่ การศึกษาโดยใช้วิธี red blood cell assay พบว่า สารละลาย ectoin 0.1, 0.5, 1 และ 5% สามารถปกป้องความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Graf และคณะ, 2008) ในการศึกษาโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า ครีมที่มี ectoin 1% สามารถป้องกันผลของรังสี UV ที่จะลดจำนวนเซลล์ Langerhans ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า ectoin สามารถลดการกระตุ้นการทำลายเซลล์ keratinocyte จากรังสี UV โดยสามารถลด sunburn cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Lentzen และ Schwarz, 2006) ectoin ยังมีความสามารถปกป้องเซลล์ keratinocyte โดยลดการทำลาย DNA จากรังสี UVA และ visible light ได้ (Botta และคณะ, 2008) และจากภาวะเครียดจากความร้อนได้ (Buommino และคณะ, 2005) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในอาสาสมัคร พบว่า ครีมที่มี ectoin 2% และ 5% สามารถลดค่า transepidermal water loss (TEWL) จากการทำลายของสารลดแรงตึงผิวได้ (Graf และคณะ, 2008) และ ectoin ยังมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนังได้ดี เช่น การศึกษาของ Graf และคณะ (2008) พบว่า เมื่อใช้ครีมที่มี ectoin 1% ในอาสาสมัคร สามารถเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังได้นาน 7 วัน และ Heinrich, Garbe และ Tronnier (2007) พบว่า การใช้ครีมที่มี

ectoin 2% ให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้น ลดความหยابกร้านริ้วรอย และลดความลึกของผิวได้ดีกว่ายาพื้นครีม แต่ไม่พบความแตกต่างในความยืดหยุ่นของผิวหนัง

สาร ectoin มีคุณสมบัติเป็นผงแห้งสีขาว มวลโมเลกุล 142.16 g/mol มีค่าการละลายในน้ำเท่ากับ 550 g/L มีค่าจุดหลอมเหลวเท่ากับ 280°C (Bitop, 2006 : online) ค่า log P เท่ากับ -0.8 มีความคงตัวดีในช่วง pH 1-9 และคงตัวที่ 190°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Pubchem, 2015 : online) จากค่า log P จุดหลอมเหลว และคุณสมบัติความชอบน้ำของ ectoin ทำให้สารนี้อาจมีปัญหาในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังเพื่อไปยังตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ เนื่องจากสารที่จะสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดี ควรมีค่า log P เท่ากับ 1-3 จุดหลอมเหลวควรน้อยกว่า 200°C และควรมีค่าการละลายน้ำที่เหมาะสม (Finnin และ Morgan, 1999) ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มี ectoin เป็นสารสำคัญเพื่อให้ผลชะลอริ้วรอยที่เกิดจากแสงแดดโดยใช้ระบบที่เหมาะสมในการนำส่งสารเข้าสู่ชั้นหนังแท้ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายของฤทธิ์นี้จึงเป็นที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้

งานวิจัยที่มีการพัฒนาระบบนำส่ง ectoin เข้าสู่ผิวหนัง ได้แก่ ระบบ submicron emulsions โดยศึกษาผลของวิธีการเตรียมและเครื่องมือที่ใช้ต่อขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค และการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายของ ectoin ซึ่งพบว่าการเตรียมโดยวิธี high pressure homogenizer และ membrane emulsification จะให้ขนาดอนุภาค 300-320 nm ซึ่งเล็กกว่าวิธี homogenizer และขนาดเล็กส่งผลให้ ectoin สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้สูงกว่า (Ebrahimi และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามระบบนำส่งชนิดนี้เป็นระบบที่ไม่มี ความคงตัวด้านเทอร์โมไดนามิก (McClements, 2012) และระบบยังต้องใช้วิธีการเตรียมที่ยุ่งยากเพราะต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการเตรียมและราคาแพง (Lovelyn, 2011) นอกจากระบบนำส่งนี้ ยังมีสิทธิบัตรของ Gattfreund (2006) ซึ่งพัฒนาระบบไมโครอิมัลชันของ ectoin เพื่อใช้ทางเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของชนิดของไมโครอิมัลชันและชนิดของน้ำมันต่อการนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง

ระบบไมโครอิมัลชันประกอบด้วยเฟสน้ำ เฟสน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีลักษณะเป็นของเหลวใส ความหนืดต่ำ มีข้อดี คือ เป็นระบบที่มีความคงตัวดีทางเทอร์โมไดนามิก เตรียมได้ง่ายโดยใช้พลังงานต่ำ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการเตรียม ราคาถูก สามารถละลายสารได้ดีทั้งสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังได้ดี และมีคุณสมบัติในการปกคลุมผิวหนัง (occlusive) ทำให้ผิวเกิดความชุ่มชื้น (Prince, 1997) โดยงานวิจัยที่พบว่า การใช้ระบบไมโครอิมัลชันสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังได้มีมากมายทั้งสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เช่น prilocaine hydrochloride (Kreilgaard, Pedersen และ Jaroszewski, 2000), penciclovir (Zhu และคณะ, 2008), nicotinamide (Boonme และคณะ, 2014) และ caffeine (Sintov และ Greenberg, 2014) และสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำมัน เช่น quercetin (Kitagawa และคณะ, 2009), 8-methoxsalen (Baroli และคณะ, 2000) และ lidocaine (Kreilgaard และคณะ, 2000)

งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของชนิดของไมโครอิมัลชันต่อการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังพบว่า ส่วนใหญ่ตำรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ (o/w) มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารทั้งชนิดชอบน้ำและไม่ชอบน้ำได้ดีกว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน (w/o) เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของ glucose (Delgado-Charro และคณะ, 1997), lidocaine, estradiol,

lidocaine hydrochloride และ ditiazem hydrochloride (Lee, Langer และ Shastri, 2003), tetracaine hydrochloride (Changez และคณะ, 2006), dibucaine และ tetracaine (Buraphacheep และคณะ, 2007), sodium nonivamide acetate (Huang และคณะ, 2008), ketoprofen และ caffeine (Zhang และ Michniak-Kohn, 2011) แต่ในบางงานวิจัยที่พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด w/o มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารได้ดีกว่าชนิด o/w เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของสาร quercetin (Kitagawa และคณะ, 2009) และ 8-methoxsalen (Baroli และคณะ, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีบางงานวิจัยที่พบว่า ชนิดของไมโครอิมัลชันไม่มีผลต่อการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของสาร caffeine (Naoui และคณะ, 2011; Sintov และ Greenberg, 2014)

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาพัฒนาและประเมินระบบไมโครอิมัลชันเพื่อนำส่ง ectoin เข้าสู่ชั้นหนังแท้ โดยทำการศึกษาผลของชนิดของไมโครอิมัลชัน (o/w และ w/o) และชนิดของน้ำมันต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชัน ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ ความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี การปลดปล่อยสารแบบนอกกาย และความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายของไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง

วัตถุประสงค์เฉพาะ เพื่อศึกษา

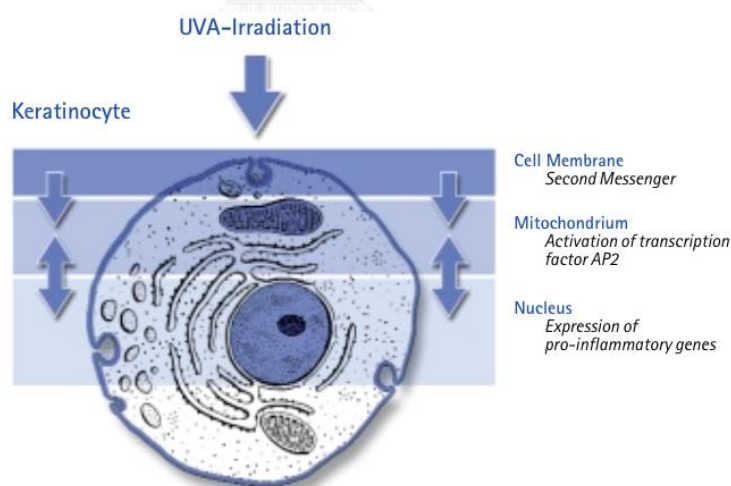
1. ผลของชนิดของไมโครอิมัลชันและชนิดของน้ำมันต่อคุณสมบัติของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin
2. ประเมินคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin ได้แก่ คุณลักษณะทางกายภาพ การปลดปล่อยและการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังของสาร ectoin จากระบบไมโครอิมัลชัน
3. ความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 Photoaging

ริ้วรอยของผิวหนังเกิดได้จากหลายสาเหตุ ทั้งสาเหตุภายใน เช่น พันธุกรรม เชื้อชาติ และสาเหตุภายนอก เช่น รังสีอินฟราเรด คิววีบี และการสัมผัสแสงแดด การสัมผัสแสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดริ้วรอยที่ใบหน้า (Krutmann, 2011) การเกิดริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด (photoaging) สาเหตุ ร้อยละ 95 เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิด UVA ที่มีความยาวคลื่น 320-400 nm (Bosch และคณะ, 2015) โดยทำให้เกิดการก่อตัวของริ้วรอย นอกจากนี้ ยังมีผลลดการสังเคราะห์และการเชื่อมโยงเส้นใยคอลลาเจนในระยะยาว ทำให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่นได้ โดยกลไกที่ทำให้เกิดริ้วรอยก่อนวัยมี 2 กลไก คือ กลไกที่ 1 การเริ่มต้นในระดับการแสดงออกของยีนส์ในเซลล์ เคอราติโนไซต์ รังสี UVA ได้กระตุ้นสารสื่อประสาทลำดับที่สองในเซลล์ ส่งผลต่อการทำงานของ AP-2 และส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับ pro-inflammatory เช่น ICAM-1 ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ผิวหนังก่อนวัย (รูปที่ 1) และกลไกที่ 2 คือ รังสี UVA ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของ DNA ในไมโทคอนเดรีย เป็นสาเหตุสำคัญซึ่งส่งผลให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกิดความชรา ส่งผลให้ผิวเกิดริ้วรอยก่อนวัย



รูปภาพ 1 กลไกของ UVA ที่กระตุ้นการเกิด Photoaging ต่อเซลล์เคอราติโน (Krutmann และคณะ, 1996)

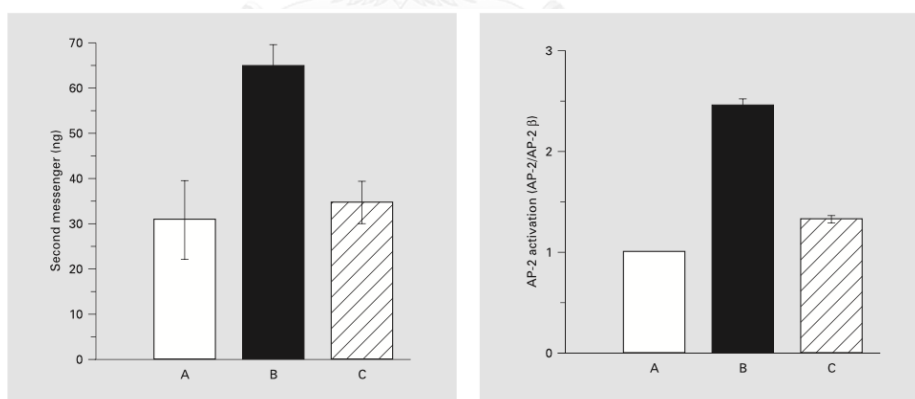
2.2 Ectoin

Ectoin เป็นนวัตกรรมใหม่ของสารออกฤทธิ์ตามธรรมชาติ ถูกค้นพบในแบคทีเรียกลุ่ม halophilic เช่น *Ectothiorhodospira halochloris* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะที่รุนแรงในทะเลสาบเกลือ น้ำทะเล และทะเลทราย (Galinski และคณะ, 1995) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนต่อสภาพอากาศที่รุนแรงได้ เช่น การได้รับรังสี UV การอยู่ในที่แห้ง ในที่อุณหภูมิสูง หรือมีความเค็มสูง โดยกลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถรักษาเสถียรภาพของเซลล์ได้โดยการสังเคราะห์สาร ectoin ซึ่งที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์และช่วยให้สิ่งมีชีวิตนี้ทนอยู่ในสภาวะเช่นนั้นได้ (Bitop, 2006: online)

2.2.1 ฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของ ectoin

2.2.1.1 ฤทธิ์การชะลอริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด (anti-photoaging)

Buenger และ Driller (2004) ได้ทำการศึกษาผลของ ectoin ในเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยทำการฉายรังสี UVA ขนาด 30 J/cm² และให้สารละลาย ectoin 1 mM พบว่า ectoin สามารถป้องกันการกระตุ้นของรังสี UVA ต่อการกระตุ้น AP-2 และลดการแสดงออกของยีนส์ ICAM-1 ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการอักเสบของเซลล์ที่เป็นต้นเหตุของการเกิดริ้วรอยได้ และผลใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (A) (รูปที่ 2) นอกจากนี้ ยังพบว่า สารละลาย ectoin สามารถป้องกันการกลายพันธุ์ของ DNA ในไมโทคอนเดรียจากการกระตุ้นจากรังสี UVA ได้

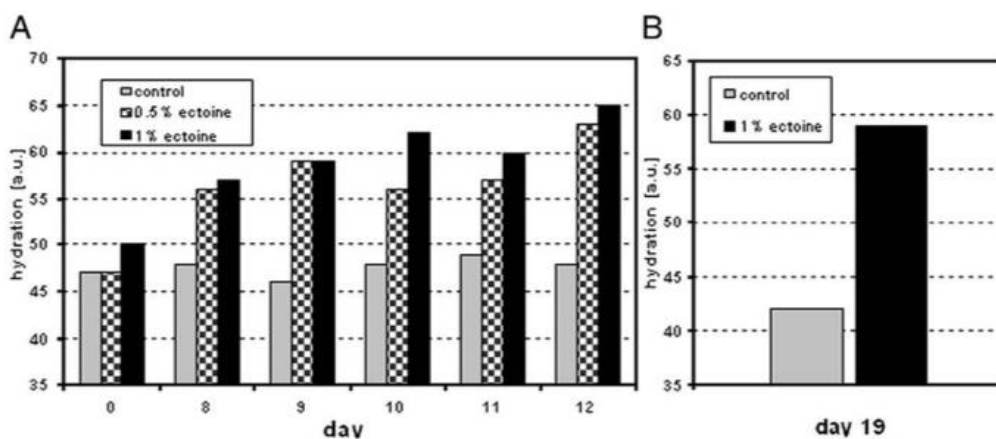


รูปภาพ 2 ผลการยับยั้งสารสื่อประสาทลำดับที่สองและการกระตุ้น AP-2 ของสารละลาย ectoin จากการกระตุ้นด้วยรังสี UVA โดย A คือ ไม่ได้รับรังสีและสารละลาย ectoin, B คือ ได้รับรังสีแต่ไม่ได้รับสารละลาย ectoin และ C คือ ได้รับรังสีและสารละลาย ectoin

2.2.1.2 ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะต่าง ๆ

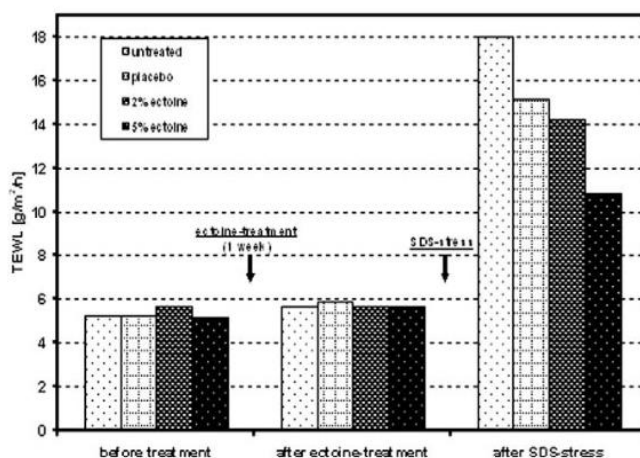
Graf และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธี red blood cell assay พบว่า สารละลาย ectoin 0.1, 0.5, 1 และ 5% สามารถปกป้องความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และในการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า ครีมที่มี ectoin 1% สามารถป้องกันผลของรังสี UV ที่จะลดจำนวนเซลล์ Langerhans ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Lentzen และ Schwarz (2006) ยังพบว่า ectoin สามารถลดการ กระตุ้นการทำลายเซลล์เคอราติโนไซต์จากรังสี UV โดยสามารถลด sunburn cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ และ ectoin ยังมีความสามารถปกป้องเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยลดการทำลาย DNA จากรังสี UVA และจากแสงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Botta และคณะ, 2008) และจากภาวะเครียดจากความร้อนได้ (Buommino และคณะ, 2005)

2.2.1.3 ฤทธิ์เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง



รูปภาพ 3 ผลการเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนังในอาสาสมัครเมื่อใช้ครีม ectoin

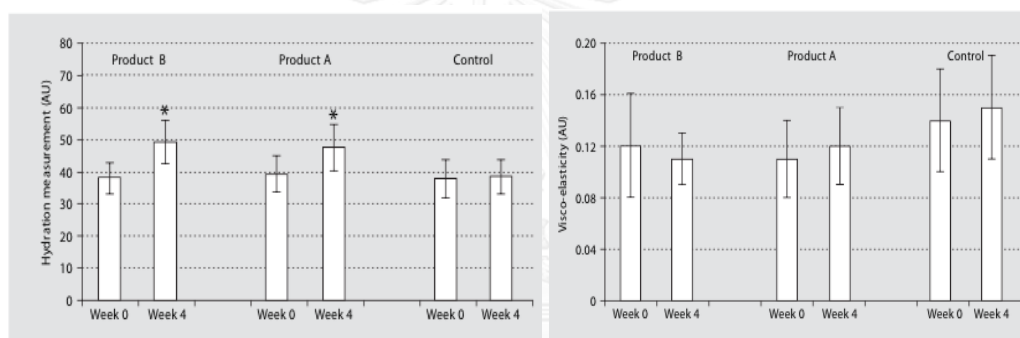
(Graf และคณะ, 2008)



รูปภาพ 4 ค่าการสูญเสียน้ำทางผิวหลังจากกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวและเมื่อใช้ครีมที่มี ectoin

Graf และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัคร โดยการทาครีมที่มี ectoin ความเข้มข้น 0% (กลุ่มควบคุม), 0.5% และ 1% วันละ 2 เวลา วัดความชุ่มชื้นผิวด้วยเครื่อง corneometer ที่วันที่ 8 จนถึงวันที่ 12 หลังจากนั้นหยุดการใช้ครีม 7 วัน แล้ววัดผลอีกครั้ง พบว่า เมื่อใช้ครีมที่มี ectoin 1% ในอาสาสมัคร สามารถเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังได้นาน 7 วัน (รูปที่ 3) นอกจากนี้ ยังได้ประเมินผลต่อการสูญเสียน้ำทางผิว (transepidermal water loss, TEWL) เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิว โดยทำการทดสอบในอาสาสมัครจำนวน 5 คน และทาครีม ectoin วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 อาทิตย์ พบว่า ครีมที่มี ectoin 2% และ 5% สามารถลดค่า TEWL จากการทำลายของสารลดแรงตึงผิวได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ครีมที่ไม่มี ectoin) (รูปที่ 4)

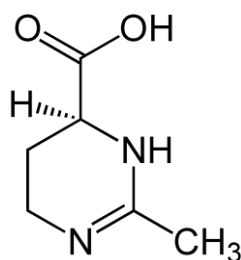
อย่างไรก็ตาม Heinrich, Garbe และ Tronnier (2007) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างครีมที่มี ectoin 2% ต่ำรับครีมเปล่า และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้ผลิตภัณฑ์ใด ๆ ก่อนและหลังใช้ 4 สัปดาห์ พบว่า การใช้ครีมเปล่าและครีม ectoin 2% ให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มความชุ่มชื้นได้ดีกว่าก่อนใช้ ส่วนผลของการลดความหยابกร้านริ้วรอย ทั้ง 3 กลุ่ม ก่อนใช้และหลังใช้ไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 5) จากผลการศึกษานี้ ไม่พบประสิทธิภาพของ ectoin อย่างชัดเจน



รูปภาพ 5 ผลการเพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นของผิวหนังเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ A (ครีมเปล่า), B (ครีม ectoin 2%) และ control (ไม่มีการให้ผลิตภัณฑ์ใดๆ) (Heinrich, Garbe และ Tronnier,

2.2.2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ ectoin

สาร ectoin มีคุณสมบัติเป็นผงแห้งสีขาว โครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 6 มีมวลโมเลกุล 142.16 g/mol มีค่าการละลายในน้ำเท่ากับ 550 g/L ค่าการละลายใน methanol เท่ากับ 36g/l มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 280°C (Bitop, 2006: online) ค่า log P เท่ากับ -0.8 มีความคงตัวดีในช่วง pH 1-9 และคงตัวที่ 190°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Pubchem, 2015 : online)



รูปภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ ectoin (Bitop, 2006 : online)

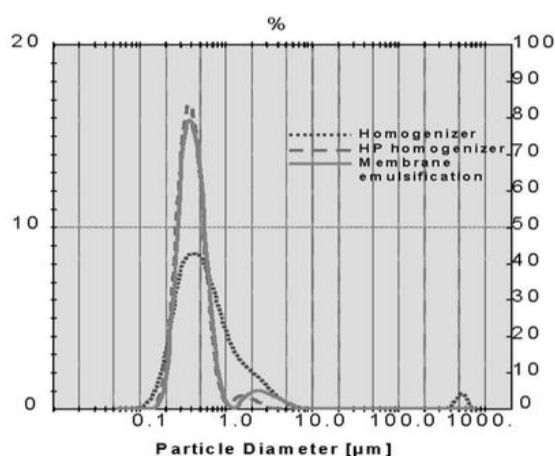
2.2.3 การศึกษาระบบนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง

2.2.3.1 ระบบ submicron emulsions

งานวิจัยของ Ebrahimi และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของวิธีการเตรียม submicron emulsion ต่อขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคและการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายของ ectoin โดยเทียบระหว่างวิธีการเตรียม 3 วิธี คือ homogenizer, high pressure homogenizer และ membrane emulsification โดยพบว่า การเตรียมด้วยวิธี high pressure homogenizer และ membrane emulsification จะให้ขนาดอนุภาค 300-320 nm ซึ่งเล็กกว่าวิธี homogenizer และขนาดอนุภาคที่เล็กส่งผลให้ ectoin สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้สูงกว่าขนาดอนุภาคใหญ่ (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 7)

ตาราง 1 ปริมาณ ectoin ในผิวของตำรับ submicron emulsion ที่เตรียมด้วยวิธีการต่างๆ

วิธีการเตรียม	ปริมาณ ectoin ในผิว (mg/cm ²)
Homogenizer	0.0699
High pressure homogenizer	0.121
Membrane emulsification	0.1187



รูปภาพ 7 ผลของวิธีการเตรียมต่อขนาดอนุภาคของ submicron emulsion ที่มี ectoin

2.2.3.2 ระบบ microemulsion

Gattfreund (2006) ได้จดสิทธิบัตรระบบไมโครอิมัลชันของ ectoin เพื่อใช้ทางเครื่องสำอาง โดยมีการระบุส่วนประกอบที่ใช้ในระบบไมโครอิมัลชันหลายส่วนประกอบ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของชนิดของไมโครอิมัลชันและชนิดของน้ำมันต่อการนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง

2.3 ระบบไมโครอิมัลชัน

ระบบไมโครอิมัลชัน มีลักษณะเป็นของเหลวใส ความหนืดต่ำ ประกอบด้วยเฟสน้ำ เฟสน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีขนาดอนุภาคภายในประมาณ 10-100 nm (Kogan และ Garti, 2006) โดยระบบไมโครอิมัลชันมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ มีความสามารถในการละลายที่ดี มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ สามารถเตรียมได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ราคาไม่แพง ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญได้ และช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังได้ โดยกลไกการเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังมีหลายกลไก ได้แก่

1. คุณสมบัติของไมโครอิมัลชันในการละลายสารได้สูง โดยสามารถละลายสารได้ดีทั้งสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ทำให้ในตำรับสามารถบรรจุสารสำคัญได้มาก เพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านสู่ผิว (Yaun และคณะ, 2006, Changez และคณะ, 2006) โดยสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เช่น prilocaine hydrochloride (Kreilgaard, Pedersen และ Jaroszewski, 2000), penciclovir (Zhu และคณะ, 2008), nicotinamide (Boonme และคณะ, 2014) และ caffeine (Sintov และ Greenberg, 2014) และสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำมัน เช่น quercetin (Kitagawa และ

คณะ, 2009), 8-methoxsalen (Baroli และคณะ, 2000) และ lidocaine (Kreilgaard และคณะ, 2000)

2. ช่วยเพิ่มการนำส่งสารผ่านผิวหนังได้โดยส่วนประกอบของระบบไมโครอิมัลชัน คือ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีผลรบกวนโครงสร้างของหนังกำพร้า (Delgado-Charo และคณะ, 1997; Dreher และคณะ, 1997)

3. มีคุณสมบัติในการปกคลุมผิวหนัง (occlusive) ทำให้ผิวเกิดความชุ่มชื้นขึ้น (Prince, 1997)

4. ขนาดของอนุภาคที่เล็กทำให้มีพื้นที่ผิวมาก การสัมผัสผิวมีมากขึ้น และสามารถแทรกผ่านผิวหนังชั้นหนังกำพร้าได้ดี (Heuschkel และคณะ, 2008)

2.3.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

- เฟสน้ำมัน

ชนิดของน้ำมันที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชันมีผลต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ โดยควรเลือกใช้น้ำมันที่มีโครงสร้างสายสั้นถึงปานกลาง มีความสามารถในการละลายสารสำคัญได้ดี ปลอดภัยไม่เป็นพิษ ไม่ระคายเคือง สามารถทำให้เกิดไมโครอิมัลชันได้ในบริเวณกว้าง และควรเลือกน้ำมันที่มีผลช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในกรณีเตรียมผลิตภัณฑ์สำหรับนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง โดยน้ำมันที่มีผลช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง ได้แก่ isopropyl myristate และ oleic acid

Isopropyl myristate เป็นน้ำมันในกลุ่มไตรกลีเซอไรด์สายปานกลางที่นิยมใช้ในสูตรตำรับเครื่องสำอาง และนิยมใช้ในระบบไมโครอิมัลชันเช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นน้ำมันที่ไม่พบการระคายเคือง (Gupta, 2005) และยังพบว่า IPM มีความสามารถในการเพิ่มการนำส่งสารสู่ผิวโดยรบกวนชั้นไขมันที่ผิวและทำลายหนังกำพร้า (Engelbrecht และคณะ, 2012)

Oleic acid เป็นน้ำมันในกลุ่มกรดไขมันที่มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านได้ดี โดยสามารถทำลายชั้นไขมันในชั้นผิว (Kogan และ Garti, 2006; Kreilgaard และคณะ, 2000; Li และคณะ, 2004; Paolino และคณะ, 2002; Zhao และคณะ, 2006) ดังนั้น oleic acid จึงเหมาะแก่การเลือกนำมาเป็นเฟสน้ำมันในระบบไมโครอิมัลชันสำหรับช่วยเพิ่มการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง

- สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

ระบบไมโครอิมัลชันส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในปริมาณที่สูง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระคายเคืองผิวได้ (Lawrence และ Rees, 2000) จึงควรเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่ปลอดภัยต่อผิวหนัง ได้แก่ L.A.S.® (PEG-8 caprylic/capric glycerides) ซึ่งมีการศึกษาว่ามีความระคายเคืองต่ำ (Djordjevic และคณะ, 2004; Kreilgaard, 2001) และการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมทำให้ลดปริมาณของสารลดแรงตึงผิวในสูตรตำรับซึ่งลดโอกาสการเกิดการระคายเคืองผิวหนังได้

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชัน

-ผลของชนิดไมโครอิมัลชัน

ชนิดของไมโครอิมัลชันที่แตกต่างกันส่งผลต่อการปลดปล่อยของสาร เช่น sodium ascorbyl phosphate โดยพบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด o/w มีอัตราการปลดปล่อยสารที่เร็วกว่าชนิด w/o (Polona และคณะ, 2003) นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับผลของชนิดไมโครอิมัลชันต่อการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนัง พบว่า ส่วนใหญ่ตำรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารทั้งชนิดชอบน้ำและชอบน้ำมันได้ดีกว่าไมโครอิมัลชันชนิด w/o เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของ glucose (Delgado-Charro และคณะ, 1997), lidocaine, estradiol, lidocaine hydrochloride และ ditiagem hydrochloride (Lee, Langer และ Shastri, 2003), tetracaine hydrochloride (Changez และคณะ, 2006), dibucaine และ tetracaine (Buraphacheep และคณะ, 2007), sodium nonivamide acetate (Huang และคณะ, 2008), ketoprofen และ caffeine (Zhang และ Michniak-Kohn, 2011) แต่ในบางงานวิจัยที่พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด w/o มีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของสารได้ดีกว่าชนิด o/w เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของสาร quercetin (Kitagawa และคณะ, 2009) และ 8-methoxsalen (Baroli และคณะ, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีบางงานวิจัยที่พบว่า ชนิดของไมโครอิมัลชันไม่มีผลต่อการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ตำรับไมโครอิมัลชันของสาร caffeine (Naoui และคณะ, 2011; Sintov และ Greenberg, 2014) นอกเหนือจากนี้ ชนิดของไมโครอิมัลชันยังส่งผลต่อความคงตัวของสารสำคัญที่บรรจุในระบอบไมโครอิมัลชันด้วย (Gallarate และคณะ, 1999)

-ผลของชนิดน้ำมัน

น้ำมันบางชนิดมีความสามารถในการช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิว (penetration enhancer) ได้ เช่น isopropyl myristate และ oleic acid ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของน้ำมันด้วย งานวิจัยของ Peltola และคณะ (2003) พบว่า สูตรตำรับที่ใช้ oleic acid จะนำส่งสาร estradiol ได้ดีกว่าสูตรตำรับที่ใช้ IPM เป็นเฟสน้ำมัน เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Rhee และคณะ (2001) ที่พบว่าตำรับที่ใช้ oleic acid สามารถเพิ่มการซึมผ่านสาร ketoprofen ได้ดีกว่าตำรับที่ใช้ IPM นอกจากนี้ ชนิดของน้ำมันยังมีผลต่อการปลดปล่อยของสารสำคัญจากตำรับไมโครอิมัลชันด้วย งานวิจัยของ Panapisal และคณะ (2012) พบว่า สูตรตำรับที่ใช้ glyceryl monooleate จะให้อัตราการปลดปล่อยสาร silymarin ที่เร็วกว่าสูตรตำรับที่ใช้ ethyl oleate, IPM และ oleic acid

-ผลของชนิดสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน จะส่งผลต่อการซึมผ่านของสารสำคัญ เช่น งานวิจัยของ Hosmer และคณะ (2009) พบว่า หากใช้สารลดแรงตึงผิว Capmul® (Medium-chain mono and diglycerides) จะเพิ่มการซึมผ่านสาร adenosine และ progesterone ได้ดีกว่า Tween® 80 ตามลำดับ และงานวิจัยของ Huang และคณะ (2008) พบว่า หากใช้ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมจะเพิ่มการซึมผ่านของสาร sodium nonivamide acetate ได้ดีกว่า isopropanol, 1-propanol และ 1,2-propandiol ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Peltola และคณะ (2009) ที่พบว่า การใช้ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมจะให้การซึมผ่านของสาร estradiol ได้ดีกว่าการใช้ isopropanol นอกจากนี้

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ยังส่งผลต่อความคงตัวของสารสำคัญด้วย ดังปรากฏในงานวิจัยของ Panapisal และคณะ (2012) ที่พบว่า สารลดแรงตึงผิว Labrasol® จะให้ความคงตัวของสาร silymarin ดีกว่า Tween® 20 และ Span® 20 ตามลำดับ

-ผลของสัดส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม

มีหลายงานวิจัยพบว่าสัดส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วมได้ส่งผลต่อการซึมผ่านสารทางผิวหนัง เช่น งานวิจัยของ Kreilgaard และคณะ (2000) พบว่า หากใช้อัตราส่วนระหว่าง Labrasol®:plurol isostearique เท่ากับ 3:1 จะสามารถนำส่งสาร lidocaine และ prilocaine ได้ดีดีกว่าอัตราส่วน 2:1 และ 1:1 และงานวิจัยของ Changez และคณะ (2006) พบว่า หากใช้อัตราส่วนระหว่าง lecithin:n-propanol พบว่า อัตราส่วน 1:2 จะสามารถนำส่งสาร tetracaine hydrochloride ได้มากที่สุด



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

- Acetonitrile, HPLC grade (Lot no. 100197, Honeywell Burdock & Jackson, Korea)
- Disodium hydrogen phosphate (Lot no. F1021786b 125, Merck KGaA, Germany)
- Ectoin (Lot no. 96702-03-3 , Merck KGaA, Germany)
- HCO-40[®] (PEG-40 hydrogenated castor oil) (Lot no. 10001290 , Nikko Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- Isopropyl myristate (Lot no. 90184B , BRENNTAG, Singapore)
- L.A.S.[®] (PEG-8 caprylic/capric glycerides) (Lot no. 149291 , Gattefossé, Baden-Württemberg, Germany)
- Methanol, HPLC grade (Lot no. 100233, Honeywell Burdock & Jackson, Korea)
- Oleic acid (Lot no. 000034096, Panreac, Spain)
- Potassium chloride (Lot no. K37429936, Merck KGaA, Germany)
- Potassium dihydrogen phosphate (Lot no. A262673 045, Merck KGaA, Germany)
- Sodium chloride (Lot no. F102603 115, Merck KGaA, Germany)
- Transcutol[®] (ethoxydiglycol) (Lot no. 145176 , Gattefossé, Baden-Württemberg, Germany)
- Ultrapure[®] water (Maxima UF, Elga)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- Analytical balance (UMTZ, Mettler Toledo, Switzerland)
- Brookfield viscometer (Brookfield engineering laboratories, Inc., Middleboro MA, USA)
- High performance liquid chromatography system (Aligent Technologies, United States)
- Column (C18 column, Capcell Pak NH₂ UG80 S5, Shiseido, Japan)
- Hot air oven (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

- _ Membrane dialysis, molecular weight cutoff (MWCO) 12-14 kDa (Lot No. 9587, Cellu-Sep® T4, Membrane filtration products, Inc., USA)
- _ Micropipette (Gilson, France)
- _ Modified Franz diffusion cells (Science service, Thailand)
- _ pH meter (Beckman, USA)
- _ Shaker (Stuart Scientific, UK)
- _ Sonicator (Model TP680DH, Elma, Germany)
- _ Syringe filter (CNW Technologies, China)
- _ Vortex mixer (Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)
- _ Zetasizer (Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK)

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin โดยใช้วิธี HPLC

วิธี HPLC นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชัน ศึกษาความคงตัวของ ectoin ในสูตรตำรับ หาปริมาณ ectoin ที่ถูกปลดปล่อยออกจากตำรับ และที่ซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกาย โดยวิธี HPLC ใช้สภาวะดังนี้

คอลัมน์: C18 column, Capcell Pak NH₂ UG80 S5 (Shiseido, Japan)
 เฟสเคลื่อนที่: 10 mM phosphate buffer pH 7.5/acetonitrile (20/80 v/v)
 ปริมาณที่ฉีด: 10 ไมโครลิตร
 อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
 เครื่องตรวจวัด: UV detector @ 220 nm
 อุณหภูมิ: 25 °C
 เวลาที่ใช้: 14 นาที

โดยมีการตรวจสอบความถูกต้องบางส่วน (validation) ของวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้เกณฑ์จาก ICH Q2(R1) มีค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ

_ ความจำเพาะ (specificity)

Specificity หมายถึง วิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด เพื่อให้แน่ใจว่าเมื่อวิเคราะห์แล้ว ไม่มีสารใดรบกวนหรือมีผลกระทบต่อสารสำคัญ โดยในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการวิเคราะห์สารละลายของ ectoin ในน้ำความเข้มข้น 12 µg/ml ตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าทุกสูตรที่เจือจาง 1,700-16,000 เท่า (ขึ้นกับสูตรตำรับ) ตำรับไมโครอิมัลชันเจือจางที่มีการเติมสาร ectoin ความเข้มข้น 12 µg/ml ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายที่เวลา 24 ชม. และตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดผิวหนังวิธีเดียวกับการศึกษาปริมาณสารที่สะสมในชั้นผิวหนัง โดยวิธี HPLC ในสภาวะที่ใช้ จะต้องมีความจำเพาะต่อสาร ectoin โดยไม่มีการรบกวนจากส่วนประกอบในสูตรตำรับและสารอื่นๆ

- ความเป็นเชิงเส้น (linearity)

Linearity หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ผลวิเคราะห์ที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด ทำโดยการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำ ความเข้มข้น 6 ระดับ ในช่วง 1-50 µg/ml พล็อตกราฟระหว่างค่า peak area และความเข้มข้น คำนวณหาสมการถดถอยและค่า coefficient of determination (r^2) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

- ความถูกต้อง (accuracy)

Accuracy หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่สามารถวัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด แสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง การหาค่าความถูกต้องทำโดยการวิเคราะห์สารละลาย ectoin 3 ความเข้มข้นในช่วงที่ใช้ศึกษาความเป็นเชิงเส้น คือ 1, 15, 30 µg/ml และในแต่ละความเข้มข้นมีการเติมตัวรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ทั้งสูตรตำรับที่มี IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมันด้วย ทำการทดสอบ 3 ครั้ง คำนวณหาระดับความถูกต้องเป็นเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ดังสมการที่ (1)

$$\% \text{ Recovery} = (\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้} / \text{ค่าที่แท้จริง}) \times 100 \% \quad (1)$$

เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของการวิเคราะห์ควรอยู่ในช่วง 80-115% สำหรับความเข้มข้นที่น้อยกว่า 10 µg/g และในช่วง 85-110% สำหรับความเข้มข้นที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10 µg/g (AOAC Guideline, 2013)

- ความแม่นยำ (precision)

Precision หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กัน ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ นี้จะแสดงเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ในการทดสอบสำหรับงานวิจัยนี้ จะทดสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์แบบ Repeatability (within-run precision) โดยทำการวิเคราะห์สารละลาย ectoin 3 ความเข้มข้น คือ 1, 15, 30 µg/ml และในแต่ละความเข้มข้นมีการเติมตัวรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ทั้งสูตรตำรับที่มี IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมันด้วย ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณหาค่า %CV ของแต่ละความเข้มข้น %CV ของการวิเคราะห์ควรน้อยกว่า 6% สำหรับความเข้มข้นที่น้อยกว่า 10 µg/g และน้อยกว่า 4% สำหรับความเข้มข้นที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10 µg/g (AOAC Guideline, 2013)

3.3 การตั้งสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้ในการศึกษานี้ได้เลือกมาจากชุดเทอนารีเฟสไดอะแกรมจากงานวิทยานิพนธ์ของ Panapisal และคณะ (2012) โดยเลือกสัดส่วนของส่วนประกอบที่น่าจะสามารถทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ (o/w) และชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน (w/o) ได้ โดยเลือกส่วนประกอบที่มีสารลดแรงตึงและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดเดียวกัน และมีน้ำมันชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้ โดยส่วนประกอบที่เลือกมีดังนี้

- เฟสน้ำมัน คือ isopropyl myristate (IPM) หรือ oleic acid
- สารลดแรงตึงผิว คือ L.A.S.[®]
- สารลดแรงตึงผิวร่วม คือ Transcutol[®] และ HCO-40[®]

เฟสน้ำ คือ ultrapure[®] water

สูตรตำรับที่เลือกนำมาศึกษามีส่วนประกอบและสัดส่วนโดยน้ำหนักแสดงดังตารางที่ 2 วิธีการเตรียม โดยชั่งสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวรวม น้ำมัน และน้ำ ตามลำดับในปริมาณตามสัดส่วนที่ระบุไว้อย่างถูกต้อง ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องผสม vortex จากนั้น นำส่วนผสมที่เตรียมได้ไปประเมินคุณลักษณะของไมโครอิมัลชันตามข้อ 3.4

ตาราง 2 ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันที่ศึกษา

ตำรับที่	เฟสน้ำมัน	ชนิด	ปริมาณที่ใช้ (%w/w)				
			น้ำมัน	L.A.S. [®]	HCO-40 [®]	Transcutol [®]	น้ำ
IPM o/w	IPM	o/w	4	17	17	34	28
IPM w/o		w/o	24	17	17	34	8
Oleic o/w	oleic acid	o/w	4	15.5	15.5	31	34
Oleic w/o		w/o	30	15.5	15.5	31	8

3.4 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน

3.4.1 ลักษณะภายนอก

การประเมินลักษณะภายนอกของตำรับโดยการประเมินด้วยตาเปล่าและบันทึกลักษณะที่ได้ สูตรตำรับที่เกิดไมโครอิมัลชัน คือ สูตรที่ให้ลักษณะเป็นของเหลวใส สามารถไหลได้ เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้น จากนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และประเมินลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

3.4.2 ชนิดของไมโครอิมัลชัน

การทดสอบชนิดของไมโครอิมัลชันด้วยวิธี dilution test ทำโดยการผสมไมโครอิมัลชันที่ได้กับน้ำหรือน้ำมันในอัตราส่วน 1:1 ด้วยเครื่องผสม vortex ประเมินโดยพิจารณาจากการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน หากผสมไมโครอิมัลชันกับน้ำแล้วสามารถเข้ากันได้ดี แสดงว่าเป็นชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ แต่หากผสมกับน้ำแล้วเกิดการแยกชั้น แสดงว่าเป็นชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน และเมื่อผสมกับน้ำมันที่ใช้ในสูตรตำรับ ผลที่ได้จะตรงข้ามกัน

3.4.3 ความหนืด

การประเมินความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชัน โดยใช้เครื่อง Brookfileld viscometer โดยทำการทดลองซ้ำตำรับละ 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 25°C

3.4.4 ขนาดและการกระจายขนาด

การประเมินขนาดและการกระจายขนาดของเฟสภายในของไมโครอิมัลชัน ทำโดยใช้เครื่อง Zetasizer โดยทำการทดลองซ้ำดำรับละ 3 ครั้ง

3.5 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

3.5.1 การหาค่าการละลายของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชัน

การทดลองเบื้องต้นในการหาค่าการละลายของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชันแต่ละสูตรตำรับ ทำที่อุณหภูมิห้อง โดยชั่ง ectoin ปริมาณ 50 mg สำหรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w และปริมาณ 20 mg สำหรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด จากนั้น ค่อย ๆ เติมไมโครอิมัลชันทีละ 100 μ l ด้วยไมโครปิเปต แล้ว vortex ปั่นผสม หากสาร ectoin ยังไม่ละลาย ให้เติมไมโครอิมัลชันลงไปอีก จนกว่าจะละลายหมดและไม่มีการตกตะกอนภายในเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อสังเกตการตกตะกอน ความขุ่น หรือการแยกชั้น บันทึกปริมาณไมโครอิมัลชันที่ใช้ในการละลาย ectoin คำนวณหาค่าการละลายอิมตัวของ ectoin เป็น %w/w ของแต่ละสูตรตำรับ

3.5.2 การเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

ปริมาณ ectoin ที่บรรจุในแต่ละสูตรตำรับเลือกใช้ที่ 90% ของค่าการละลายอิมตัวที่หาได้จากการทดลองในข้อ 3.5.1 เพื่อป้องกันการตกตะกอน วิธีการเติม ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชัน ทำโดยละลาย ectoin ในน้ำก่อน แล้วจึงเติมส่วนผสมอื่นลงไป ผสมด้วยเครื่อง vortex ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น ประเมินตำรับตามข้อ 3.6

3.6 การประเมินตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

3.6.1 คุณลักษณะทางกายภาพ

การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ได้แก่ ลักษณะภายนอก ชนิดของไมโครอิมัลชัน ความหนืด และขนาดของเฟสภายใน โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1-3.4.4

3.6.2 ปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชัน

การหาปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันหลังจากเตรียมเสร็จ ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยชั่ง ไมโครอิมัลชันปริมาณ 0.1 g ละลายด้วยเมทานอลจนได้สารละลายใส และเจือจางด้วย mobile phase ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC คำนวณปริมาณ ectoin โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ectoin และคำนวณปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันเป็น %w/w ดังสมการที่ 2 และ % labeled amount ดังสมการที่ 3 เกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 85-115 % สำหรับยาทาภายนอก (USP27, 2004)

$$\text{ปริมาณ ectoin ในตำรับ (\%w/w)} = \frac{\text{ปริมาณ ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในไมโครอิมัลชัน}}{\text{ปริมาณไมโครอิมัลชัน}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Labeled amount} = \frac{\text{ปริมาณ ectoin (\%w/w) ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณ ectoin ที่ใส่จริง (\%w/w)}} \times 100 \quad (3)$$

3.7 การศึกษาความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

การศึกษาความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ทำโดยการเก็บในขวดแก้วปิดสนิทและเก็บในสภาวะเร่ง (CTFA, 2004) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 เดือน สุ่มตัวอย่างหลังจากเก็บเป็นเวลา 1 และ 2 เดือน จากนั้น ประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับตามที่ระบุไว้ในข้อ 3.4.1 และประเมินความคงตัวของเคมีโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ในตำรับด้วยวิธี HPLC ตามข้อ 3.2

3.8 การศึกษาการปลดปล่อย ectoin แบบนอกกาย (Olejnik, Goscianska และ Nowak, 2012)

การศึกษาการปลดปล่อย ectoin จากไมโครอิมัลชันแบบนอกกาย โดยใช้เครื่อง modified-Franz diffusion cell ใช้แผ่นเซลลูโลสเป็นตัวกั้นระหว่างตัวอย่างทดสอบและช่องหลอดตัวกลาง ทดสอบภายใต้สภาวะปิด (occlusive) และใช้น้ำ (ultrapure® water) เป็นช่องหลอดตัวกลางสำหรับการทดสอบการปลดปล่อย (receptor medium) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37±1°C ปั่นด้วยความเร็ว 800±1 รอบต่อนาที สุ่มเก็บตัวอย่าง 1.5 ml จากส่วนของหลอดตัวกลางที่เวลา 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยทุกครั้งที่สุ่มจะเติมน้ำใหม่ที่อุณหภูมิ 37°C เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่ากับที่สุ่มออกมา นำของเหลวที่สุ่มได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร ectoin ด้วยวิธี HPLC ทำการทดลองซ้ำตำรับละ 4 ครั้ง จากนั้น สร้างกราฟแสดงรูปแบบการปลดปล่อย (release profile) ระหว่างเปอร์เซ็นต์ปริมาณสะสมของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมา (%) กับเวลา (ชั่วโมง) และนำข้อมูลการปลดปล่อยที่ได้ไปเข้าสมการจลนศาสตร์การปลดปล่อยรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ zero-order, first order และ Higuchi kinetics ตามสมการที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

$$\text{สมการ zero-order: } M_t = M_0 + k_0 t \quad (4)$$

$$\text{สมการ first-order: } \ln(M_{\text{inf}} - M_t) = -k_1 t \quad (5)$$

$$\text{สมการ Higuchi: } M_t = M_0 + k_H \quad (6)$$

โดย M_t คือ เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลา t ; M_0 คือ เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ในตำรับตอนเริ่มต้น; M_{inf} คือ เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลา infinite time; k_0 , k_1 และ k_H คือ ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย (release rate constant) ของสมการ zero order, first order และ Higuchi ตามลำดับ

ข้อมูลต่าง ๆ จะถูกนำไปวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) และคำนวณหาค่า correlation of determination (r^2) จากนั้น รูปแบบการปลดปล่อยที่มีค่า r^2 เข้าใกล้ 1 มากที่สุด จะเป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการใช้อธิบายและเปรียบเทียบการปลดปล่อยสารจากตำรับ

ต่าง ๆ โดยการคำนวณหาค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยต่อไป โดยมีกลุ่มควบคุมคือ สารละลาย ectoin ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายอิ่มตัวในน้ำ เปรอร์เซนต์ปริมาณสะสมของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมาคำนวณได้จากสมการที่ 7

$$\% \text{ Ectoin สะสมที่ถูกปลดปล่อย} = (A_t/A_0) \times 100 \quad (7)$$

โดย A_t คือ ปริมาณ ectoin สะสมที่ปลดปล่อยออกมา ณ เวลา t (mg)
 A_0 คือ ปริมาณ ectoin ทั้งหมดที่มีอยู่ในตำรับที่ทดสอบ (mg)

3.9 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ ectoin แบบนอกร่าง (OECD, 2010)

การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างของ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชัน โดยใช้ modified-Franz diffusion cell และใช้ผิวหนังลูกหมูแรกเกิดที่เสียชีวิตตามธรรมชาติในการศึกษา โดยมีกลุ่มควบคุม คือ สารละลาย ectoin ในน้ำที่ความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายอิ่มตัว ทำการทดลองซ้ำตำรับละ 4 ครั้ง วิธีการทดสอบมีดังนี้

3.9.1 การเตรียมหนังหมูสำหรับศึกษาการซึมผ่าน

หนังหมูที่ใช้ในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสาร จะใช้ผิวหนังของลูกหมูแรกเกิดในส่วน ของบริเวณหน้าท้องแบบ full-thickness โดยตัดส่วนของชั้นไขมันและเนื้อทิ้งให้เหลือแต่ส่วนหนัง หลังจากนั้นทำความสะอาดด้วยน้ำ ห่อเก็บโดยใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน ก่อนการใช้งานให้แช่ด้วยของเหลวตัวกลาง คือ phosphate buffered saline (pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัดหนังให้ได้พื้นที่เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 3 cm

3.9.2 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง

วิธีการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างคล้ายกับการศึกษาการปลดปล่อย ectoin ใน ข้อ 3.8 แต่เปลี่ยนตัวกันจากแผ่นเซลลูโลสเป็นหนังหมู และใช้ phosphate buffered saline (pH 7.4) เป็นของเหลวตัวกลาง ควบคุมอุณหภูมิที่ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เตรียมอุปกรณ์โดยวางแผ่นหนังให้ส่วนหนึ่ง กำพรัายอยู่ติดกับส่วน donor และให้ด้านหนังแท้ติดกับส่วน receptor อุ่นเครื่องประมาณ 30 นาที หรือจนได้อุณหภูมิคงที่ จากนั้น ใส่ตัวอย่างตำรับละ 400 μl ลงบนส่วนของผิวหนังในแต่ละเซลล์ ทำ การทดลองภายใต้สภาวะเปิด (non-occlusive) เก็บตัวอย่างจากส่วนของเหลวตัวกลาง 1.5 ml ที่ เวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ด้วยวิธี HPLC คำนวณปริมาณ ectoin ที่ซึมผ่านผิวหนัง ต่อพื้นที่การแพร่เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง (Q_{24} , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การซึมผ่าน ผิวหนังของ ectoin เมื่อเทียบกับปริมาณ ectoin ที่ใส่เริ่มต้น ($\%Q_{24}$)

หลังจากสิ้นสุดการทดลองการซึมผ่านผิวหนัง ให้ล้างตัวอย่างที่เหลือนอยู่บนผิวหนังและในส่วน donor โดยชะด้วยเมทานอลสำหรับสุตรตำรับ ส่วนสารละลาย ectoin ในน้ำจะใช้น้ำในการชะ โดย จะชะล้างจนกว่าจะใส หรือมั่นใจว่าไม่มีสารสำคัญหลงเหลืออยู่บนส่วนของ donor ปรับปริมาตร

เจือจาง และกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ที่เหลืออยู่บนผิวหนัง ด้วยวิธี HPLC ในส่วนของผิวหนัง จะนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และสกัดด้วยเมทานอล 3 ml ปั่นผสมโดยใช้เครื่อง vortex นำไปผ่านเครื่องความถี่สูง 30 นาที จากนั้นนำไปเขย่าอีก 1.5 ชั่วโมง ดูดส่วนใสใส่พลาสติกวัดปริมาตรขนาด 5 ml จากนั้นเติมเมทานอลไปสกัดหนังที่เหลืออีก 2 ml นำไปผ่านเครื่องความถี่สูงอีก 30 นาที จากนั้นดูดส่วนใสลงในพลาสติกวัดปริมาตรอันเดิม ปรับปริมาตรให้ได้ 5 ml กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ด้วยวิธี HPLC คำนวณปริมาณ ectoin ที่อยู่ในผิวหนังต่อพื้นที่การแพร่เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง (Q_s , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่อยู่ในผิวหนังเมื่อเทียบกับปริมาณ ectoin ที่ใส่เริ่มต้น ($\%Q_s$)

การเปรียบเทียบการซึมผ่านของ ectoin จากตำรับไมโครอิมัลชันกับสารละลายในน้ำ ทำโดยคำนวณค่า enhancement factor (EF) ของเปอร์เซ็นต์ ectoin ที่อยู่ในผิวหนัง และของเปอร์เซ็นต์ ectoin ที่อยู่ในของเหลวตัวกลาง ดังสมการที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

$$\text{EF ของ } \%Q_s = (\%Q_s \text{ ของตำรับ}) / (\%Q_s \text{ ของสารละลาย}) \quad (8)$$

$$\text{EF ของ } \%Q_{24} = (\%Q_{24} \text{ ของตำรับ}) / (\%Q_{24} \text{ ของสารละลาย}) \quad (9)$$

เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ $\%Q_{24}$, $\%Q_s$, EF ของ $\%Q_s$ และ EF ของ $\%Q_{24}$ ระหว่างสูตรตำรับไมโครอิมัลชันและสารละลายของ ectoin, ระหว่างไมโครอิมัลชันชนิด o/w และ w/o และระหว่างไมโครอิมัลชันชนิดเดียวกันที่มีน้ำมันต่างชนิดกัน

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มโดยใช้ Student's *t*-test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และ Tukey HSD's test สำหรับเทียบความแตกต่างในกลุ่มย่อยของการศึกษา โดยจะให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p < 0.05$

บทที่ 4

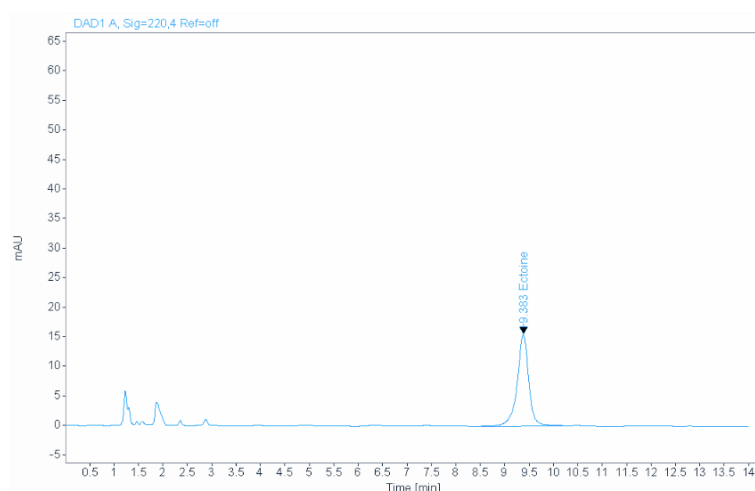
ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin โดยใช้วิธี HPLC

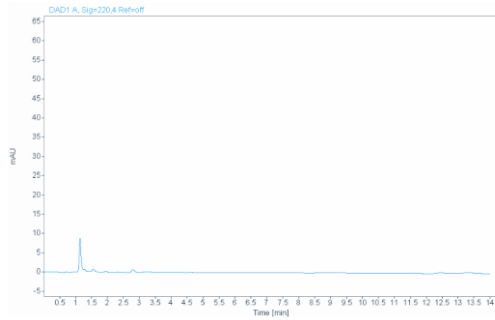
ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบวิธี HPLC สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันและการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายของสาร ectoin โดยทำการศึกษาในหัวข้อความจำเพาะและความเป็นเชิงเส้น ผลการศึกษาเป็นดังนี้

4.1.1 ความจำเพาะ (specificity)

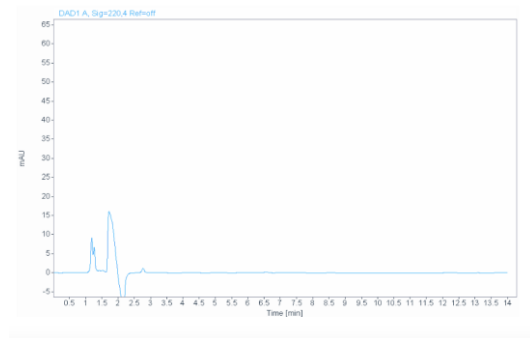
จากโครมาโตแกรม HPLC ผลการศึกษาในรูปที่ 8 และ 9 แสดงให้เห็นว่า สาร ectoin มี retention time ประมาณ 9.3 นาที และไม่มีส่วนประกอบใดในสูตรตำรับไมโครอิมัลชันรบกวนการวิเคราะห์สาร ectoin รวมทั้งของเหลวตัวกลาง (PBS, pH 7.4) ที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่รบกวนการวิเคราะห์นี้ด้วย ดังนั้น วิธี HPLC นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันที่ศึกษาและสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ที่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้



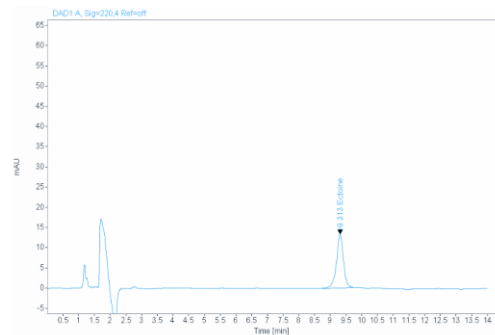
รูปภาพ 8 โครมาโตแกรม HPLC ของสารละลายในน้ำของ ectoin 12 µg/ml



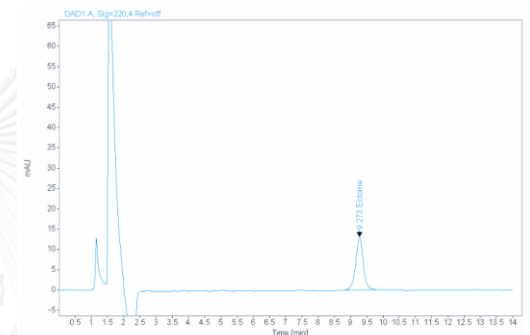
(ก) ไมโครอิมัลชันตำรับ IPM o/w



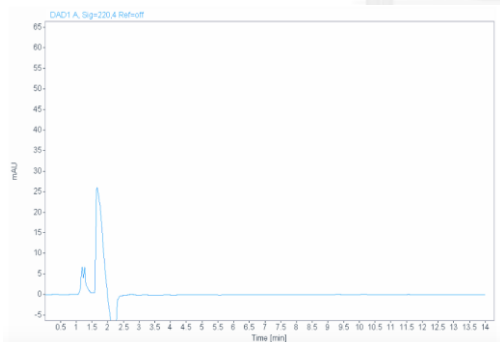
(ข) ไมโครอิมัลชันตำรับ IPM w/o



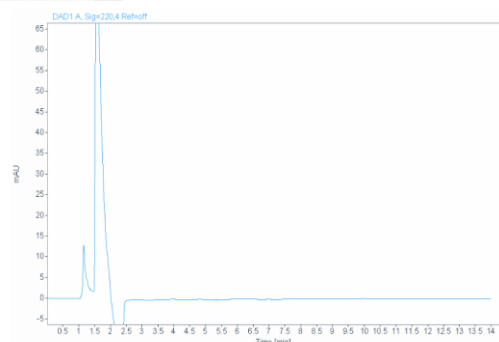
(ค) ไมโครอิมัลชันตำรับ oleic o/w



(ง) ไมโครอิมัลชันตำรับ oleic w/o

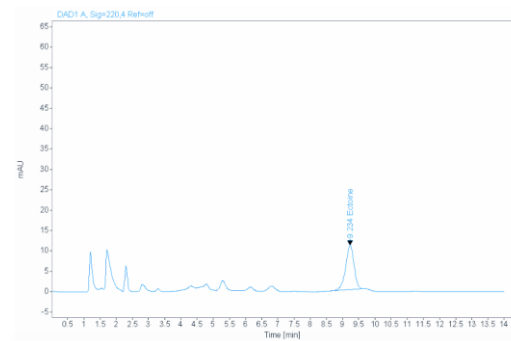
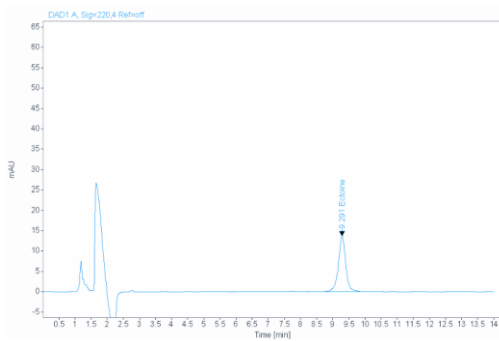


(จ) ไมโครอิมัลชันตำรับ IPM o/w ที่มี ectoin



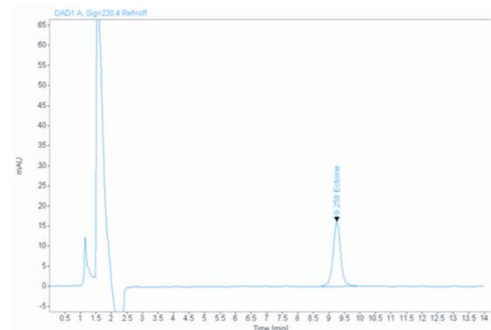
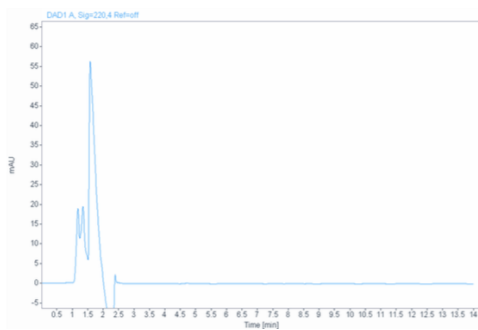
(ฉ) ไมโครอิมัลชันตำรับ IPM w/o ที่มี ectoin

รูปภาพ 9 โครมาโตแกรม HPLC ของไมโครอิมัลชันเปล่า (ก-ง), ไมโครอิมัลชันที่มี ectoin (จ-ฉ), ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านที่ 24 ชม. ที่ไม่มีและมี ectoin (ฉ-ญ), ตัวอย่างหนึ่งหมูที่ได้จากการสกัดที่ไม่มีและมี ectoin (ฎ-ฏ)



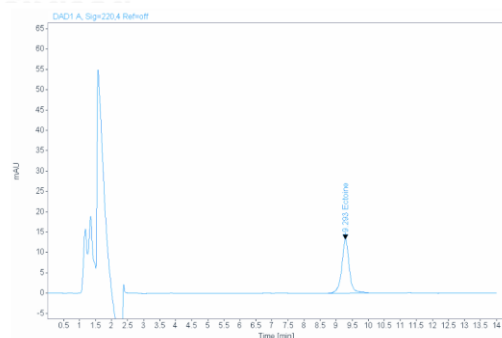
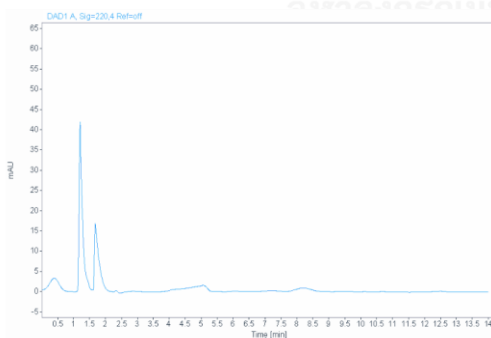
(ซ) ไมโครอิมัลชันตำรับ oleic o/w ที่มี ectoin

(ซ) ไมโครอิมัลชันตำรับ oleic w/o ที่มี ectoin



(ณ) ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการ
ซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายที่เวลา 24 ชม.

(ณ) ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่าน
ซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายที่เวลา 24 ชม. ที่มี ectoin



(ฎ) ตัวอย่างหนึ่งหมูที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกาย

(ฎ) ตัวอย่างหนึ่งหมูที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง ที่มี ectoin

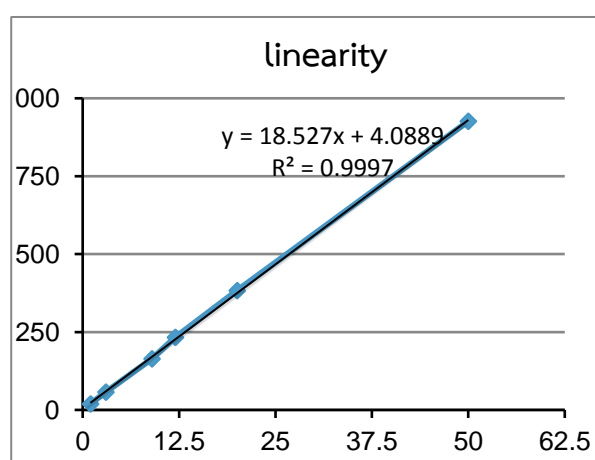
รูปที่ 9 โครมาโตแกรม HPLC ของไมโครอิมัลชันเปล่า (ก-ง), ไมโครอิมัลชันที่มี ectoin (จ-ซ), ของเหลวตัวกลางที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านที่ 24 ชม. ที่ไม่มีและมี ectoin (ณ-ญ), ตัวอย่างหนึ่งหมูที่ได้จากการสกัดที่ไม่มีและมี ectoin (ฎ-ฏ) (ต่อ)

4.1.2 ความเป็นเชิงเส้น (linearity)

ความเป็นเชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์ แสดงถึงผลวิเคราะห์ที่แปรผันกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด และสามารถแปลผลเป็นสมการเส้นตรงเพื่อนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายได้ จากผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3 และกราฟระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารละลาย ectoin แสดงดังรูปที่ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1-50 µg/ml โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในการหาค่าความเข้มข้นของสาร ectoin ในตัวอย่างได้

ตาราง 3 ค่า peak area สำหรับกราฟมาตรฐานของสารละลาย ectoin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ ectoin (µg/ml)	ค่า peak area			average	S.D.
	N1	N2	N3		
1	23.07885	18.18501	18.60555	19.96	2.71
3	58.81509	59.00045	53.27962	57.03	3.25
9	163.61864	167.87753	162.41792	164.63	2.87
12	231.762	231.45265	235.895	233.04	2.48
20	380.522	386.51544	382.515	383.184	3.05
50	928.05542	928.011	924.20563	926.76	2.21



รูปภาพ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ectoin ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

4.1.3 ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ แสดงถึงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับ ค่าที่แท้จริงหรือค่า

ของสารมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ ประเมินโดยการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ที่ความเข้มข้น 3 ระดับในช่วงที่ศึกษาความเป็นเชิงเส้น และประเมินในสภาวะที่มีระบบไมโครอิมัลชันชนิด w/o ทั้ง สูตรตำรับที่มี IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมันด้วย ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4 และ 5 พบว่า เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของค่าการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 80-115% สำหรับความเข้มข้น 3 µg/ml และในช่วง 85-110% สำหรับความเข้มข้น 15 และ 30 µg/ml ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC Guideline (2013) ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ HPLC นี้มีความถูกต้อง สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชันได้

ตาราง 4 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ของการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตร ตำรับ IPM w/o ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ ectoin (µg/ml)	% Recovery			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3			
3	112.67	111.33	115.00	113.00	1.86	1.64
15	97.07	93.53	97.40	96.00	2.14	2.23
30	100.11	95.87	96.13	97.37	2.38	2.44

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ของการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตร ตำรับ oleic w/o ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ ectoin (µg/ml)	% Recovery			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3			
3	115.00	107.16	109.67	110.61	4.00	3.62
15	95.12	89.45	90.92	91.83	2.94	3.21
30	99.54	96.64	95.81	97.33	1.96	2.01

4.1.4 ความแม่นยำ (precision)

การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันของสารละลาย ectoin 3 ความเข้มข้นในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน (repeatability หรือ within-run precision) ผลแสดงดังตารางที่ 6 และ 7 พบว่า ค่า %CV ของความเข้มข้นต่ำ (3 µg/ml) น้อยกว่า 6% และค่า %CV ของความเข้มข้น 15 และ 30 µg/ml น้อยกว่า 4% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC Guideline (2013) ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า วิธี HPLC นี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชันภายในการวิเคราะห์คราวเดียวกัน

ตาราง 6 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในชุดการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ IPM w/o ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ ectoin (µg/ml)	ความเข้มข้นของ ectoin ที่คำนวณได้ (µg/ml)			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3			
3	3.38	3.34	3.45	3.39	0.06	1.66
15	14.56	14.03	14.61	14.40	0.32	2.24
30	30.03	28.76	28.84	29.21	0.71	2.44

ตาราง 7 ผลการทดสอบความแม่นยำภายในชุดการวิเคราะห์สารละลาย ectoin ในน้ำที่มีสูตรตำรับ oleic w/o ด้วยวิธี HPLC

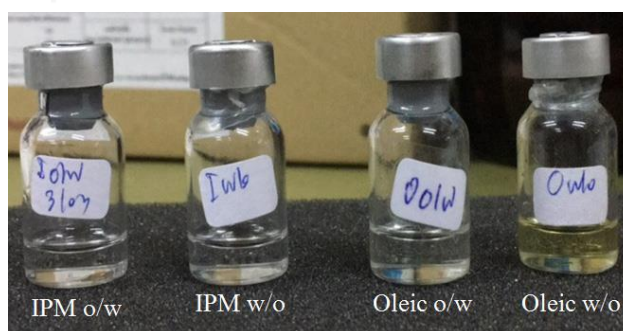
ความเข้มข้นของ ectoin (µg/ml)	ความเข้มข้นของ ectoin ที่คำนวณได้ (µg/ml)			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	ชุด 1	ชุด 2	ชุด 3			
3	3.48	3.21	3.51	3.40	0.16	4.79
15	14.27	13.42	13.64	13.77	0.44	3.21
30	29.86	28.99	28.74	29.20	0.59	2.01

4.2 การตั้งสูตรตำรับไมโครอิมัลชันและการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชันหลายสูตรจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องก่อนหน้านี้ที่ให้ประสิทธิผลในการช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญได้ดี จากนั้น ได้พิจารณาเลือกสูตรตำรับที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดเดียวกัน ที่สามารถเตรียมไมโครอิมัลชันได้ทั้งชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ (o/w) และชนิดน้ำกระจายในน้ำมัน (w/o) ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ได้จากซูโดเทอนารีเฟส ไดอะแกรมจากการศึกษาของ Panapisal และคณะ (2012) สามารถเตรียมไมโครอิมัลชันได้ทั้งชนิด o/w และ w/o โดยใช้สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดเดียวกัน เพื่อใช้สำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin และใช้สำหรับการศึกษาผลของชนิดไมโครอิมัลชันต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ต่อไป นอกจากนี้ ยังเลือกส่วนผสมที่มีน้ำมันต่างชนิดกันแต่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดเดียวกัน เพื่อศึกษาผลของชนิดของน้ำมันต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin ด้วย โดยน้ำมันที่เลือกมาในการศึกษานี้จะเลือกชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้ คือ isopropyl myristate (IPM) หรือ oleic acid ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่เลือกใช้ คือ L.A.S.[®] และสารลดแรงตึงผิวร่วม คือ Transcutol[®] และ HCO-40[®] ส่วนเฟสน้ำใช้ ultrapure[®] water การเตรียมสามารถเตรียมได้ง่ายโดยชั่งสารแต่ละตัวอย่างถูกต้องตามสัดส่วนที่กำหนดและผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)

4.2.1 ลักษณะภายนอก

จากการประเมินลักษณะภายนอกของตำรับโดยการประเมินด้วยตาเปล่าและบันทึกลักษณะที่ได้ พบว่า สูตรตำรับที่เกิดไมโครอิมัลชันได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส ใสได้ เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้น (รูปที่ 11) และหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทุกสูตรตำรับยังคงเป็นของเหลวใสเนื้อเดียวกัน

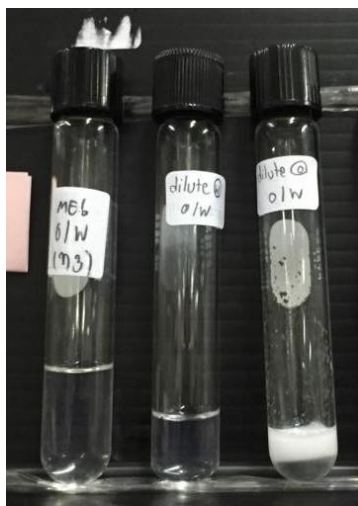


รูปภาพ 11 ลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้

4.2.2 ชนิดของไมโครอิมัลชัน

เมื่อนำไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มาทดสอบชนิดของไมโครอิมัลชันด้วยวิธี dilution test พบว่า ส่วนประกอบและสัดส่วนของน้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่เลือกมาสามารถให้ชนิดของไมโครอิมัลชันตามที่ต้องการได้ โดยไมโครอิมัลชันชนิด o/w สามารถผสม

เข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำได้ แต่เมื่อผสมกับน้ำมัน จะเกิดการแยกชั้นหรือขุ่นทึบ (รูปที่ 12) ส่วนไมโครอิมัลชันชนิด w/o จะเกิดการแยกชั้นเมื่อผสมกับน้ำ



ก) IPM o/w



ข) IPM w/o



ค) Oleic o/w



ง) Oleic w/o

รูปภาพ 12 ผลการประเมินการทดสอบชนิดของไมโครอิมัลชันด้วยวิธี dilution test (หลอดซ้ายเป็นตำรับเริ่มต้น หลอดกลางเจือจางด้วยน้ำ และหลอดขวาเจือจางด้วยน้ำมัน)

4.2.3 ความหนืด

ความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันซึ่งประเมินโดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer แสดงดังตารางที่ 8 พบว่าไมโครอิมัลชันชนิด o/w มีความหนืดที่มากกว่าตำรับ w/o ในน้ำมันทั้งสองชนิด ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Panapisal และคณะ (2012) ซึ่งศึกษาผลของปริมาณของเฟสน้ำที่เป็นเฟสภายในต่อความหนืดของระบบไมโครอิมัลชัน ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของเฟสภายในจะทำให้ความหนืดของระบบเพิ่มขึ้น จนถึงจุดกลับเฟส ความหนืดจะค่อยๆลดลง สำหรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w ที่เตรียมในการศึกษานี้ จะมีปริมาณน้ำที่เหนือจุดกลับเฟสเพียงเล็กน้อย ซึ่งทำให้ความหนืดของตำรับมีมากกว่าตำรับชนิด w/o ซึ่งมีปริมาณน้ำเพียง 8 %w/w ทั้งตำรับที่มี IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน

ตาราง 8 ค่าความหนืดของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3)

ตำรับไมโครอิมัลชัน	ความหนืด (cps)
IPM o/w	58.49 + 0.44
IPM w/o	49.73 + 0.31
Oleic o/w	52.51 + 0.92
Oleic w/o	39.94 + 0.61

4.2.4 ขนาดและการกระจายขนาด

จากการประเมินขนาดและการกระจายขนาดของเฟสภายในของไมโครอิมัลชันทุกสูตรตำรับ โดยใช้เครื่อง Zetasizer พบว่า เครื่องไม่สามารถวัดค่าได้ อาจเนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนอนุภาคของเฟสภายในมากเกินไปซึ่งในการศึกษานี้ไม่สามารถเจือจางตัวอย่างได้ เพราะจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบไมโครอิมัลชันได้ หรืออาจเป็นเพราะตัวอย่างมีการกระจายขนาดที่มากเกินไป

4.3 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

ตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 ทั้งสี่ตำรับ นำมาเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุสาร ectoin อย่างไรก็ดีตาม เพื่อที่จะทราบความเข้มข้นของ ectoin ที่ต้องการเตรียมในระบบไมโครอิมัลชันสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป จึงต้องมีการหาค่าการละลายของ ectoin ในไมโครอิมัลชันแต่ละตำรับก่อน

4.3.1 ค่าการละลายของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชัน

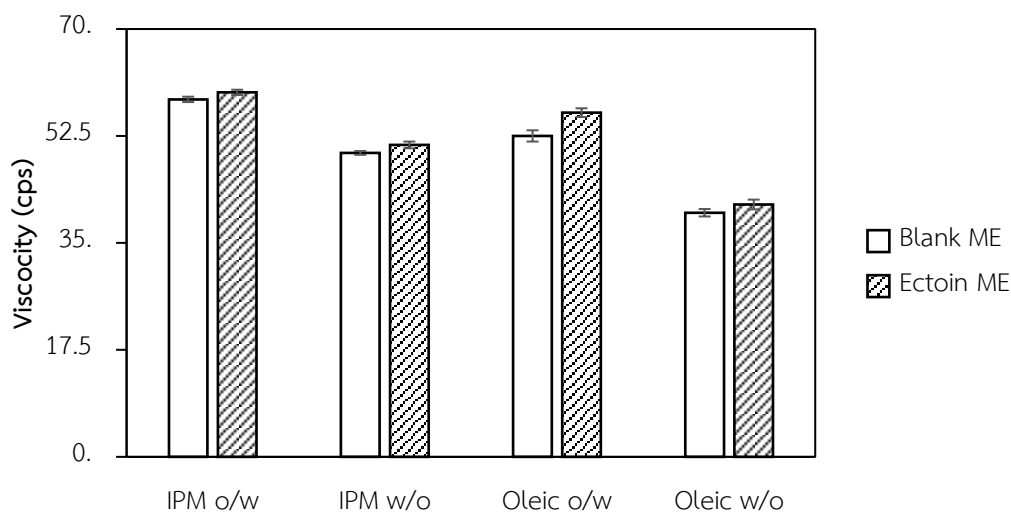
จากการทดลองหาค่าการละลายอิมิตัวของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชันแต่ละสูตรตำรับ ที่อุณหภูมิห้อง ผลแสดงดังตารางที่ 9 ซึ่งพบว่า สารละลายในน้ำของ ectoin มีค่าการละลายที่สูงที่สุด แต่น้อยกว่าค่าการละลายที่มีรายงานในข้อมูลสารเคมี (550 g/L) (Bitop, 2006 : online) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างกันของแหล่งที่มาของสาร ectoin และวิธีในการประเมินค่าการละลายที่แตกต่างกัน และตำรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w มีค่าการละลายของสาร ectoin ได้มากกว่าชนิด w/o ทั้งสูตรตำรับที่ใช้ IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน เนื่องจากสาร ectoin มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าในน้ำมัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างไมโครอิมัลชันชนิดเดียวกัน พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ตำรับที่มี IPM เป็นเฟสน้ำมัน จะมีค่าการละลายที่มากกว่าตำรับที่มี oleic acid แม้ว่าตำรับที่มี oleic acid จะมีปริมาณน้ำมากกว่าตำรับที่มี IPM (น้ำ 34% และ 28% ตามลำดับ) แต่มีปริมาณน้ำมันเท่ากัน ดังนั้น จึงน่าจะเป็นผลจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสมในตำรับที่มี IPM ซึ่งมีมากกว่าตำรับที่มี oleic acid ส่วนไมโครอิมัลชันชนิด w/o พบว่า ตำรับที่มี oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน จะมีค่าการละลายที่มากกว่าตำรับที่มี IPM แม้ว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสมของตำรับที่มี IPM จะมากกว่าตำรับที่มี oleic acid โดยทั้งสองตำรับมีปริมาณน้ำเท่ากัน (8%) แต่มีปริมาณน้ำมันไม่เท่ากัน ตำรับที่มี oleic acid มีน้ำมันมากกว่าตำรับที่มี IPM (30% และ 24% ตามลำดับ) ดังนั้น ผลนี้น่าจะเป็นผลจากตำรับที่มี oleic acid มีปริมาณน้ำมันที่มากกว่าและสามารถละลาย ectoin ได้มากกว่า

ตาราง 9 ค่าการละลายและความเข้มข้น 90% ของ ectoin ในสารละลายและไมโครอิมัลชันตำรับต่างๆ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3)

ตำรับ	ค่าการละลายของ ectoin (%w/w)	ความเข้มข้น 90% ของ ectoin (%w/w)
Solution	17.64 + 0.19	15.87
IPM o/w	6.69 + 0.08	6.02
IPM w/o	0.99 + 0.01	0.89
Oleic o/w	3.47 + 0.13	3.12
Oleic w/o	1.55 + 0.01	1.40

4.3.2 การเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

การเตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin จะใช้ความเข้มข้นของสารสำคัญเท่ากับ 90% ของค่าการละลายอิมัลต์ในสูตรตำรับต่าง ๆ ที่หาได้จากข้อ 4.2.1 (ตารางที่ 10) เนื่องจากความเข้มข้นมีผลต่อการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin จึงต้องมีการควบคุมให้ตำรับมีค่า thermodynamic activity ที่เท่ากัน และมีค่าที่มากที่สุดเพื่อให้ตำรับมีค่า flux ที่สูงที่สุดในการซึมผ่านชั้นผิวหนัง (Higuchi, 1960) เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆ โดยการเตรียมจะละลาย ectoin ในน้ำก่อน เนื่องจาก ectoin เป็นสารที่สามารถละลายในน้ำได้ดีมาก แล้วจึงค่อยผสมกับส่วนประกอบอื่นๆต่อไป หลังจากปั่นผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่า ส่วนผสมทั้งหมดมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไหลได้ เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น เมื่อนำมาทดสอบชนิดของไมโครอิมัลชันด้วยวิธี dilution test ยังคงให้ผลชนิดของไมโครอิมัลชันเช่นเดียวกับตำรับที่ไม่ใส่สารสำคัญ ส่วนความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin พบว่า ทุกตำรับมีความหนืดเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันเปล่า (รูปที่ 10) ซึ่งเป็นผลมาจากสาร ectoin ที่ละลายในระบบไมโครอิมัลชันทำให้ตำรับมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น และผลการวิเคราะห์หาปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้โดยใช้วิธี HPLC แสดงดังตารางที่ 10 พบว่า % labeled amount อยู่ระหว่าง 95.41-102.14% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดของ USP



รูปภาพ 13 ค่าความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าและไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

ตาราง 10 ปริมาณ ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆที่วิเคราะห์ได้ (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 3)

ตำรับ	ปริมาณ ectoin ที่เตรียมจริง (%w/w)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (%w/w)			% Labeled amount
		N1	N2	N3	
IPM o/w	6.02	5.76	5.59	6.13	96.79 + 4.59
IPM w/o	0.89	0.93	0.91	0.85	100.75 + 4.68
Oleic o/w	3.12	3.08	2.89	2.96	95.41 + 3.08
Oleic w/o	1.40	1.47	1.34	1.48	102.14 + 5.58

4.4 การศึกษาความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin

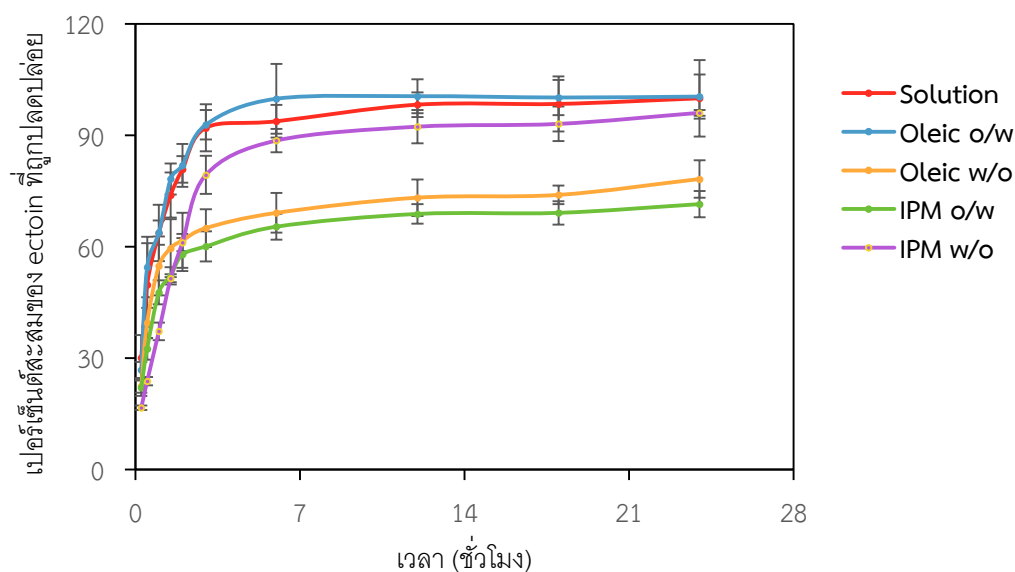
ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ตามสภาวะเร่ง (CTFA, 2004) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ไมโครอิมัลชันทุกตำรับมีความคงตัวทางกายภาพ โดยไม่พบการตกตะกอนหรือแยกชั้นแต่อย่างใด และพบว่าทุกตำรับมีความคงตัวทางเคมี ยกเว้น ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ที่มี IPM เป็นเฟสน้ำมัน มีปริมาณ ectoin เหลือ 88% เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 2 เดือน อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่ศึกษาอาจไม่เหมาะสมในการทดสอบความคงตัวของระบบ ไมโครอิมัลชัน เนื่องจากอุณหภูมิมิผลคุณสมบัติของระบบด้วย ดังนั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงความคงตัวของตำรับที่สภาวะอุณหภูมิห้องด้วยเพื่อประเมินความคงตัวในสภาวะที่เก็บตัวอย่างจริงสำหรับบรอกการประเมินผลการศึกษาคูณสมบัติอื่นๆของตำรับต่อไป

ตาราง 11 ความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin หลังจากเก็บที่ 45°C ที่เวลาต่างๆ

ไมโครอิมัลชัน	% ectoin ที่เหลืออยู่	
	1 เดือน	2 เดือน
IPM o/w	93.99 + 6.77	88.21 + 6.99
IPM w/o	102.91 + 2.77	103.31 + 1.67
Oleic o/w	100.74 + 3.10	101.73 + 1.81
Oleic w/o	102.05 + 4.88	101.97 + 2.60

4.5 การศึกษาการปลดปล่อย ectoin แบบนอกร่างกาย

ระบบไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ในความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายอิมัลชันในแต่ละสูตรตำรับ นำมาศึกษาการปลดปล่อยสาร ectoin จากตำรับแบบนอกร่างกาย โดยมีกลุ่มควบคุม คือ สารละลายของ ectoin ในน้ำที่ความเข้มข้น 90% เช่นเดียวกัน ได้ทำการศึกษาโดยใช้ modified Franz diffusion cell และใช้แผ่นเซลลูโลสที่มี MWCO 12-14 kDa เป็นตัวกั้นเพื่อให้เฉพาะสาร ectoin ที่ถูกปลดปล่อยผ่านไปได้ที่เวลาต่างๆ โดยใช้สภาวะปิด ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 13 ซึ่งเป็นกราฟที่สร้างขึ้นระหว่างเปอร์เซ็นต์สะสมของ ectoin ที่ถูกปลดปล่อยกับเวลา ผลแสดงให้เห็นว่า การปลดปล่อยสาร ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันทุกสูตรแสดงการปลดปล่อยแบบ burst effect โดยมีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรก และพบว่าการปลดปล่อย ectoin จากตำรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w ที่มี oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน (oleic o/w) มีความใกล้เคียงกับสารละลาย ectoin และปลดปล่อยได้มากกว่าตำรับ oleic w/o ซึ่งอาจเนื่องจากสาร ectoin มีความสามารถในการละลายน้ำสูง จึงทำให้สารอยู่ในเฟสน้ำซึ่งเป็นเฟสภายนอกและสามารถถูกปลดปล่อยออกมาได้อย่างรวดเร็ว ส่วนตำรับไมโครอิมัลชัน oleic w/o พบว่า มีการปลดปล่อยสาร ectoin ที่นาน ซึ่งอาจเป็นเนื่องจาก ectoin ละลายอยู่ในเฟสน้ำมันซึ่งเป็นเฟสภายในและจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเฟสภายในอย่างช้าๆโดยกลไกการแพร่ผ่านเฟสน้ำมันออกมาอีกที การปลดปล่อยของสารอยู่ระหว่าง 73% ถึง 85% ใน 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำรับไมโครอิมัลชันชนิด oleic w/o สามารถควบคุมการปลดปล่อยของสาร ectoin ได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Spiclin และคณะ (2003) ที่พบว่าไมโครอิมัลชันชนิด o/w สามารถปลดปล่อยสาร sodium ascorbyl phosphate ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำได้เร็วกว่าไมโครอิมัลชันชนิด w/o



รูปภาพ 14 กราฟการปลดปล่อย ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆ

ในทางตรงกันข้าม ตำรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ที่มี IPM เป็นเฟสน้ำมัน (IPM w/o) กลับปลดปล่อย ectoin ได้มากกว่าตำรับ IPM o/w ซึ่งอาจเนื่องมาจากในระหว่างการดำเนินการทดลองสังเกตพบว่า หลังจากครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง ตำรับที่มี IPM ทั้งชนิด o/w และ w/o มีการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างที่เหลืออยู่บนส่วน donor โดยมองเห็นด้วยตาเปล่าพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของไมโครอิมัลชันจากของเหลวใสเป็นของเหลวขาวขุ่น ซึ่งอาจเกิดจากน้ำซึ่งเป็นของเหลวตัวกลางที่รองรับการปลดปล่อย ectoin จากตำรับสามารถแพร่ขึ้นมายังตำรับไมโครอิมัลชันด้านบนได้ จึงทำให้ระบบมีการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบในตำรับ ซึ่งอาจส่งผลเปลี่ยนแปลงการปลดปล่อยของสารจากตำรับได้

เมื่อนำข้อมูลการปลดปล่อยสาร ectoin จากตำรับที่ได้ไปเข้าสมการจลนศาสตร์การปลดปล่อยรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ zero-order, first order และ Higuchi kinetics ผลการคำนวณหาค่า coefficient of determination (r^2) แสดงดังตารางที่ 12 ซึ่งค่า r^2 ที่มาก แสดงถึงความเหมาะสมของสมการถดถอยเชิงเส้นต่อข้อมูลผลการศึกษา การเลือกรูปแบบจลนศาสตร์การปลดปล่อยที่เหมาะสมสำคัญในการประเมินคุณสมบัติการปลดปล่อยของสารจากตำรับ ผลแสดงให้เห็นว่าการปลดปล่อยสาร ectoin จากสูตรตำรับไมโครอิมัลชันเป็นไปตามจลนศาสตร์แบบ first-order kinetics เนื่องจากมีค่า r^2 มากที่สุด ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng และคณะ (2008) ที่ศึกษา

การปลดปล่อยของ sodium salicylate จากระบบไมโครอิมัลชันเจลซึ่งมีจลนศาสตร์การปลดปล่อยรูปแบบเดียวกัน

เมื่อคำนวณค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยตามจลนศาสตร์แบบ first-order kinetics ซึ่งได้จากค่าความชันของกราฟที่สร้างระหว่างค่า $\ln (M_{inf} - M_t)$ และเวลาในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ผลแสดงดังตารางที่ 13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายของ ectoin ในน้ำมีการปลดปล่อยสารที่เร็วกว่าไมโครอิมัลชันทุกสูตรตำรับ เมื่อเปรียบเทียบชนิดของไมโครอิมัลชันที่มีน้ำมันชนิดเดียวกัน พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด o/w จะมีค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยที่สูงกว่าตำรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบผลของชนิดน้ำมันในไมโครอิมัลชันชนิดเดียวกัน พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ตำรับที่มี oleic acid จะมีค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยสูงกว่าตำรับที่มี IPM ส่วนไมโครอิมัลชันชนิด w/o น้ำมันทั้งสองชนิดให้ค่านี้ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความแตกต่างของค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เนื่องจากข้อมูลการปลดปล่อยที่วิเคราะห์ได้มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้ไม่เห็นผลความแตกต่างของข้อมูลเหล่านี้

ตาราง 12 ค่า coefficient of determination (r^2) ของการปลดปล่อยสาร ectoin จากตำรับตามจลนศาสตร์รูปแบบต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ย + SD, $n = 4$)

ตำรับ	Zero-order ^a	First-order ^b	Higuchi ^c
Solution	0.670 ± 0.092	0.942 ± 0.026	0.834 ± 0.066
IPM o/w	0.688 ± 0.045	0.909 ± 0.077	0.858 ± 0.037
IPM w/o	0.851 ± 0.027	0.969 ± 0.042	0.957 ± 0.018
Oleic o/w	0.660 ± 0.066	0.957 ± 0.021	0.866 ± 0.032
Oleic w/o	0.621 ± 0.129	0.871 ± 0.077	0.791 ± 0.103

^a ได้จากการสร้างกราฟระหว่าง M_t และ t

^b ได้จากการสร้างกราฟระหว่าง $\ln (M_{inf} - M_t)$ และ t

^c ได้จากการสร้างกราฟระหว่าง M_t และ $t^{1/2}$; โดย M_{inf} คือ เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลา infinite time และ M_t คือ เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลา t

ตาราง 13 ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆตาม จลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (first-order) (ค่าเฉลี่ย \pm SD, $n = 4$)

ตำรับ	Release rate constant (hr^{-1})
Solution	0.853 ± 0.377
IPM o/w	0.678 ± 0.047
IPM w/o	0.643 ± 0.124
Oleic o/w	0.756 ± 0.142
Oleic w/o	0.648 ± 0.139

4.6 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ ectoin แบบนอกกาย

การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกกายของสาร ectoin ในตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อเปรียบเทียบผลของชนิดไมโครอิมัลชันและผลของชนิดน้ำมัน โดยใช้ modified Franz diffusion cell และใช้ผิวหนังหน้าท้องของลูกหมูแรกเกิดในการศึกษาโดยใช้สภาวะเปิด ไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายอิ่มตัวในแต่ละระบบจะนำไปใช้ในการศึกษานี้เพื่อควบคุมให้ทุกระบบมีค่า thermodynamic activity ที่เท่ากัน และมีกลุ่มควบคุมคือสารละลายของ ectoin ในน้ำที่ความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายในน้ำ โดยทำการวิเคราะห์ผลที่เวลา 24 ชั่วโมงเพียงจุดเดียวเนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปริมาณของ ectoin ที่ซึมผ่านค่อนข้างน้อยไม่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 14 ซึ่งพบว่าวิธีการศึกษานี้ให้ผลการวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) 3 ส่วน คือ ส่วน receptor ส่วนผิวหนัง และส่วนที่เหลืออยู่บนผิวหนังส่วน donor รวมกันอยู่ในช่วงประมาณ 85-93% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สาร ectoin ส่วนใหญ่ยังคงค้างอยู่บนผิวในส่วน donor บางส่วนสะสมอยู่ในชั้นผิวหนัง และบางส่วนสามารถซึมผ่านผิวหนังไปยังส่วน receptor chamber ได้

ตาราง 14 เปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในส่วนต่างๆหลังการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4)

ตำรับ	% ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในส่วนต่างๆ			%Mass balance
	Receptor	Skin	Donor part	
Solution	0.00 ± 0.00	0.72 ± 0.38	92.29 ± 6.74	93.01 ± 6.76
IPM o/w	1.02 ± 0.23	0.63 ± 0.10	90.30 ± 6.14	91.94 ± 5.82
IPM w/o	0.24 ± 0.16	2.54 ± 0.32	87.25 ± 5.17	90.03 ± 5.03
Oleic o/w	0.94 ± 0.17	1.40 ± 0.51	91.12 ± 8.95	93.46 ± 8.34
Oleic w/o	0.97 ± 0.40	2.42 ± 0.45	81.84 ± 1.94	85.23 ± 2.03

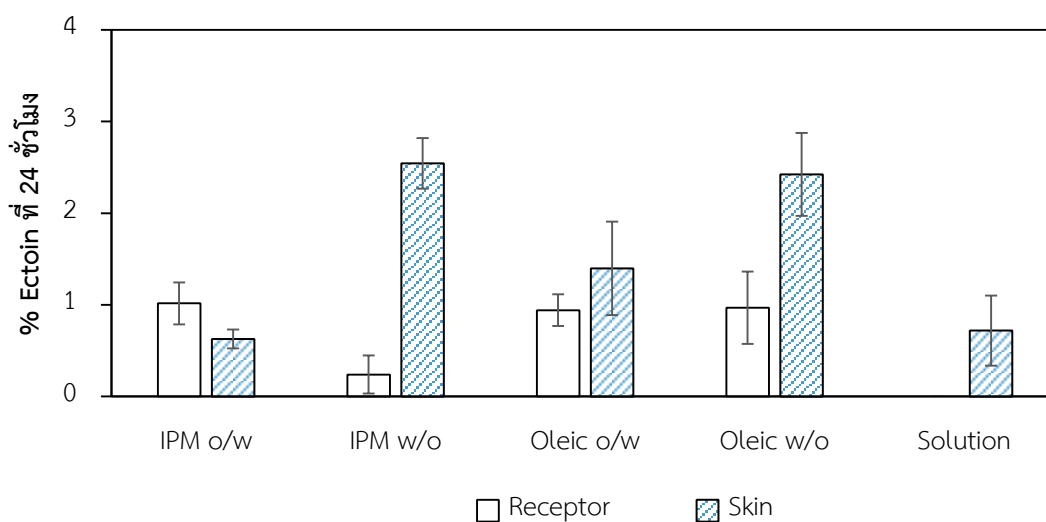
จากตารางที่ 15 และรูปที่ 14 ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารละลาย ectoin ในน้ำ ไม่พบปริมาณ ectoin ในส่วนของ receptor (%Q₂₄) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าสารละลาย ectoin ไม่สามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้เลยหรือซึมผ่านได้น้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี HPLC ส่วนตำรับไมโครอิมัลชันทุกตำรับสามารถพบปริมาณ ectoin ในส่วน receptor ได้ซึ่งชี้ให้เห็นว่าระบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารละลายของ ectoin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ยกเว้น ตำรับ IPM w/o ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้เนื่องจากส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันเองให้ผลเพิ่มการซึมผ่านได้ เช่น สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และเฟสน้ำมันที่ใช้ โดยสารเหล่านี้สามารถละลายหรือรบกวนการจัดเรียงตัวของไขมันในผิวหนังและทำให้สารสำคัญสามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ง่ายขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Naoui และคณะ (2011) ที่แสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านผิวหนังของสาร caffeine ในระบบไมโครอิมัลชันสูงกว่าสารละลายในน้ำ

ตาราง 15 ค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังของ ectoin จากไมโครอิมัลชันและสารละลายที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4)

ตำรับ	Q24 (%)	Qs (%)	EF of % Qs
Solution	0.00 ± 0.00 ^a	0.72 ± 0.38 ^a	1.00 ^a
IPM o/w	1.02 ± 0.23 ^b	0.63 ± 0.1 ^a	0.87 + 0.14 ^a
IPM w/o	0.24 ± 0.21 ^a	2.54 ± 0.27 ^b	3.53 + 0.38 ^b
Oleic o/w	0.94 ± 0.17 ^b	1.40 ± 0.51 ^a	1.94 + 0.71 ^a
Oleic w/o	0.97 ± 0.40 ^b	2.42 ± 0.45 ^b	3.36 + 0.63 ^b

a,b

อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปภาพ 15 เปรอ์เซ็นต์ของ ectoin ที่วิเคราะห์ได้ในของเหลวตัวกลางและในชั้นผิวหนังหลังการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างที่เวลา 24 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย + SD, n = 4)

ผลของชนิดไมโครอิมัลชันต่อเปอร์เซ็นต์ของ ectoin ที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง (%Q₂₄) พบว่าตำรับ IPM o/w สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ ectoin ที่ซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่าตำรับ IPM w/o อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นเนื่องจากตำรับ IPM o/w มีน้ำเป็นเฟสภายนอกและมี

ปริมาณน้ำที่มาก ซึ่งให้ผลเพิ่มคุณสมบัติความชุ่มน้ำ (hydration effect) แก่ผิวหนัง ทำให้การซึมผ่านผิวหนังของสารเพิ่มมากขึ้น ผลนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2003) ซึ่งพบว่า ตำรับชนิด o/w สามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารทั้งในกลุ่มที่ชอบน้ำ (lidocaine hydrochloride, diltiazem hydrochloride) และสารที่ไม่ชอบน้ำ (lidocaine free base, estradiol) อย่างไรก็ตาม ตำรับที่มี oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ ectoin ที่ซึมผ่านผิวหนังระหว่างไมโครอิมัลชันชนิด o/w และ w/o ซึ่งอาจเนื่องจาก oleic acid เป็นน้ำมันที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่ดีโดยรบกวนผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (Rhee และคณะ, 2001) ทำให้ตำรับ oleic w/o มีการซึมผ่านผิวหนังของสาร ectoin ใกล้เคียงกับตำรับ oleic o/w

ส่วนผลของชนิดน้ำมันต่อการซึมผ่านผิวหนังของสาร ectoin พบว่า ตำรับชนิด o/w ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างน้ำมันชนิด IPM และ oleic acid แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในตำรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ($p < 0.05$) โดยตำรับที่มี oleic acid จะให้ผลที่ดีกว่าตำรับที่มี IPM ซึ่งอาจเป็นเนื่องจากคุณสมบัติของ oleic acid ที่เป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่ดีกว่า ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ตามผลการศึกษาของ Rhee และคณะ (2001) ซึ่งได้ศึกษาการซึมผ่านของยา ketoprofen ในตำรับไมโครอิมัลชัน เมื่อใช้ oleic acid เป็นเฟสน้ำมันจะเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญในตำรับได้มากกว่าตำรับที่มี IPM

สำหรับผลของตำรับต่อปริมาณ ectoin (%Q_s) ที่สะสมอยู่ในชั้นผิวหนังที่ศึกษาซึ่งประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ที่มีน้ำมันทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลายในน้ำ แต่ไมโครอิมัลชันชนิด w/o ให้ผลช่วยเพิ่มปริมาณ ectoin ที่สะสมในชั้นผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูงกว่าสารละลาย ectoin ประมาณ 3.5 เท่า ซึ่งอาจเนื่องจากตำรับ w/o มีเฟสน้ำมันในปริมาณมาก น้ำมันทั้งสองชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้ดี (penetration enhancer) โดยไปมีผลรบกวนการจัดเรียงตัวของไขมันที่ชั้น stratum corneum ลดความหนาของชั้นหนังกำพร้า จึงทำให้การซึมผ่านของสารง่ายขึ้น นอกจากนี้ ตำรับชนิด w/o สาร ectoin จะอยู่ในเฟสภายใน จึงอาจทำให้เกิดการสะสมของสารอยู่ในชั้นผิวหนังได้มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของไมโครอิมัลชันต่อ %Q_s พบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o ให้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ ectoin ที่สะสมในชั้นผิวหนังสูงกว่าไมโครอิมัลชันชนิด o/w อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไม่ขึ้นกับชนิดของน้ำมัน ดังเหตุผลที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ผลนี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Naoui และคณะ (2011) ซึ่งพบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันชนิด bicontinuos และ w/o มีการสะสมของสาร caffeine ที่มากกว่าชนิด o/w แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนผลของชนิดน้ำมันต่อ %Q_s พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด w/o ตำรับที่มี IPM ให้ผลใกล้เคียงกับตำรับที่มี oleic acid แต่ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ตำรับที่มี oleic acid ให้ปริมาณ ectoin ที่สะสมในชั้นผิวหนังที่มากกว่าตำรับ IPM o/w อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากตำรับ oleic o/w มีปริมาณน้ำในสูตรตำรับที่มากกว่าและมีการปลดปล่อย ectoin ได้ดีกว่าตำรับ IPM o/w

จากผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกายของ ectoin แสดงให้เห็นว่า ระบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ ectoin ได้ดีกว่ารูปแบบสารละลาย ซึ่งสามารถพัฒนา

ต่อไปเป็นระบบนำส่งสารผ่านทางผิวหนัง (transdermal delivery) ได้ ส่วนระบบนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง (dermal delivery) ตำรับไมโครอิมัลชันชนิด w/o จะให้ประสิทธิภาพที่ดีโดยให้ปริมาณ ectoin ที่สะสมอยู่ในชั้นของผิวหนังซึ่งเป็นตำแหน่งการออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางที่สำคัญของสารนี้ได้ดีโดยไม่มีผลของชนิดของน้ำมัน ระบบไมโครอิมัลชันจึงเป็นระบบที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนังเพื่อให้ผลในการชะลอความแก่และผลปกป้องเซลล์ผิวหนังต่อไป



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ectoin เป็นสารสกัดจากแบคทีเรียซึ่งมีฤทธิ์ทางเครื่องสำอางมากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ชะลอริ้วรอยก่อนวัยที่เกิดจากแสงแดด ทำให้ผิวแห้งชุ่มชื้น และช่วยปกป้องเซลล์ผิวแห้ง แต่คุณสมบัติของ ectoin ที่สามารถละลายน้ำได้ดีมากและมีจุดหลอมเหลวสูง อาจทำให้การนำส่งสารนี้เข้าสู่ผิวแห้งมีปัญหาในการซึมผ่านได้ ผู้วิจัยจึงสนใจนำระบบไมโครอิมัลชันมาพัฒนาสำหรับช่วยเพิ่มการนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวแห้ง โดยทำการศึกษาผลของชนิดไมโครอิมัลชัน (o/w และ w/o) และชนิดของน้ำมันต่อคุณสมบัติของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin โดยผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

1. สูตรตำรับไมโครอิมัลชันชนิด o/w และ w/o ที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถเตรียมได้โดยมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใสเนื้อเดียวกัน ใสได้ และสามารถแยกชนิดของไมโครอิมัลชันได้อย่างชัดเจนโดยวิธี dilution test

2. ความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชัน พบว่า ตำรับชนิด o/w มีความหนืดมากกว่าชนิด w/o ทั้งตำรับที่ใช้ IPM และ oleic acid เป็นเฟสน้ำมัน และเมื่อเติม ectoin มีผลทำให้ความหนืดของตำรับเพิ่มขึ้น

3. ค่าการละลายอิมัลชันของ ectoin ในระบบไมโครอิมัลชัน พบว่า ตำรับชนิด o/w สามารถละลายสาร ectoin ได้มากกว่าตำรับชนิด w/o

4. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี พบว่า ทุกสูตรตำรับมีความคงตัวดีหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 เดือน ยกเว้นตำรับ IPM o/w ที่มีปริมาณ ectoin เหลือเพียง 88%

5. การศึกษาการปลดปล่อย ectoin จากระบบไมโครอิมัลชัน พบว่า ทุกตำรับให้ผล burst effect โดยตำรับ oleic o/w มีการปลดปล่อย ectoin ใกล้เคียงกับรูปแบบสารละลาย และไมโครอิมัลชันทุกตำรับมีการปลดปล่อยเป็นไปตามจลนศาสตร์แบบ first-order kinetics แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย

6. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่าง สำหรับผลการเพิ่มปริมาณ ectoin ผ่านทางผิวหนัง (%Q₂₄) พบว่า ระบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่ารูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ยกเว้น ตำรับ IPM w/o ส่วนผลของชนิดไมโครอิมัลชัน พบเฉพาะตำรับที่มี IPM เป็นเฟสน้ำมัน โดยตำรับ IPM o/w ให้ผลดีกว่าตำรับ IPM w/o และผลของชนิดน้ำมัน พบในตำรับชนิด w/o โดยตำรับ oleic w/o ให้ผลดีกว่าตำรับ IPM w/o

7. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่าง สำหรับผลการเพิ่มปริมาณ ectoin เข้าสู่ชั้นผิวหนัง (%Q_s) พบว่า ไมโครอิมัลชันชนิด w/o จะให้ผลดีกว่ารูปแบบสารละลาย โดยไม่ขึ้นกับชนิดของน้ำมันที่ใช้ในการศึกษานี้ ส่วนผลของชนิดไมโครอิมัลชัน พบว่า ชนิด w/o ให้ผลดีกว่าชนิด o/w และผลของชนิดน้ำมัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตำรับที่มี IPM และ oleic acid ทั้งตำรับชนิด o/w และ w/o

โดยสรุป ระบบไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีศักยภาพที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับนำส่งสาร ectoin เข้าสู่ผิวหนัง (dermal delivery) เพื่อให้ผลในการชะลอริ้วรอยและนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไปได้ และยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นระบบนำส่งผ่านทางผิวหนัง (transdermal delivery) ได้ ทั้งนี้ การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin ควรเลือกชนิดของไมโครอิมัลชันและชนิดของน้ำมันให้เหมาะสมด้วย ในงานวิจัยครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของน้ำมันชนิดอื่นๆและผลของสารลดแรงตึงผิวผสมชนิดอื่นๆร่วมด้วย เพื่อพัฒนาตำรับให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดต่อไป



รายการอ้างอิง



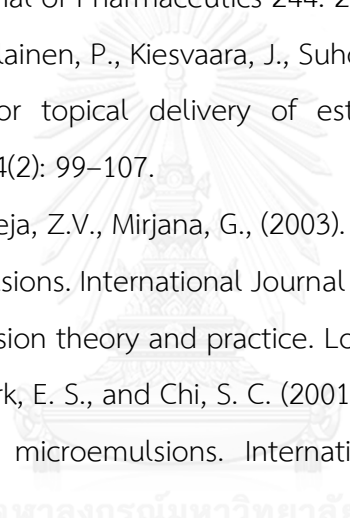
รายการอ้างอิง

- AOAC Official Methods of Analysis (2013). AOAC Guideline for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary supplements and Botanicals
- Baroli, B., Lopez-Quintela, M.A., Delgado-Charro, M.B., Fadda, A.M., and Blanco-Mendez, J. (2000). Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *Journal of Controlled Release* 69 :209-218
- Bitop. Science information. Ectoin-The natural stress-protective molecule. [online]. 2006. Available from : bitop_scientific_information_ectoin.pdf
- ChemicalBook. Oleic acid. [online]. 2016. Available from : http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7228241.htm
- Boonme, P., Boonthongchuay, C., Wongpoowarak, W., and Amnuait, T. (2014). Evaluation of nicotinamide microemulsion on the skin penetration enhancement. *Pharmaceutical Development and Technology* : 1-5.
- Bosch, R., Philips, N., Suárez-pérez, J. A., Juarranz, A., Devmurari, A., Chalensouk-khaosaat, J., and González, S. (2015). Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants* 2: 248-268.
- Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A.-S., and De Méo, M. (2008). Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 91(1): 24-34.
- Buenger, J., and Driller, H. (2004). Ectoin: An Effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacology and Physiology* 17(5): 232-237.
- Buommino, E., Schiraldi, C., Baroni, A., Paoletti, I., Lamberti, M., De Rosa, M., and Tufano, M. A. (2005). Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress and Chaperones* 10: 197-203.

- Buraphacheep, V., Boonme, P., Songkro, S., Krauel, K., and Rades, T. (2007). Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from oil-in-water and water-in-oil Brij 97-based microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 10(3): 288–298.
- Changez, M., Varshney, M., Chander, J., and Dinda, A. K. (2006). Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: in vitro. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 50(1): 18–25.
- Chang, X., Chen, H., Du, D., Li, J., Xu, H., and Yang, X. (2006). Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 315(1-2): 52–58.
- Dreher, F., Walde, P., Walther, P., Wehrli, E., (1997). Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. *J. Control Release*. 45(2): 131-140.
- Delgado-Charro, M. B., Iglesias-Vilas, G., Blanco-Méndez, J., López-Quintela, M. A., Marty, J. P., and Guy, R. H. (1997). Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43(1): 37–42.
- Ebrahimi, M., Lavi, G., Schmidts, T., Runkel, F., and Czermak, P. (2008). Development and production of oil-in-water vehicles sub-micron emulsion using tubular ceramic membranes. *Desalination* 224(1-3): 40–45.
- Engelbrecht TN, Demé B, Dobner B and Neubert RH. (2012). Study of the influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on the nanostructure of stratum corneum lipid model membranes using neutron diffraction and deuterium labelling. *Skin Pharmacol Physiol* 25(4):200-7.
- Finnin, B. C., and Morgan, T. M. (1999). Transdermal penetration enhancers: Applications, limitations, and potential. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(10): 955–958.
- Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., & Bovo, S. (1999). On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics* 188: 233–241

- Heuschkel, S.; Goebel, A.; Neubert, R.H. Microemulsions—Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 603–631.
- Krutmann, et al. 1996 Modified model of Grether-Beck, *Proc. Natl. Acad. Sci., Cell Biology* 93,14586-14591
- Galinski, E.A., H.P. Pfeiffer, H.G. Trüpper 1995: 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*, *Eur. J. Biochem.*, 149, 135 - 139.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., and Driller, H. (2008). The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology* 26(4): 326–333.
- Gupta, R.R., Jain, S.K., Varshney, M., 2005. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloids Surf. B: Biointerf.* 41, 25–32.
- Heinrich, U., Garbe, B., and Tronnier, H. (2007). In vivo assessment of ectoin: A randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacology and Physiology* 20(4): 211–218.
- Hosmer, J., Reed, R., Bentley, M. V. L. B., Nornoo, A., and Lopes, L. B. (2009). *American Association of Pharmaceutical Scientists* 10(2): 589–596.
- Huang, Y. Bin, Lin, Y. H., Lu, T. M., Wang, R. J., Tsai, Y. H., and Wu, P. C. (2008). Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 349(1-2): 206–211.
- ICH: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
[online].1994. Available form : <http://www.ich.org/> [2015, Aug23]
- Kitagawa, S., Tanaka, Y., Tanaka, M., Endo, K., and Yoshii, A. (2009). Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(7): 855–60.
- Kogan, A., Garti, N., (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science* 123(126): 369-385
- Kreilgaard, M., Pedersen, E. J., and Jaroszewski, J. W. (2000). NMR

- characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *Journal of Controlled Release* 69(3): 421–433.
- Krutmann, J. (2011). Nutrition for healthy skin. In Humbert, P. (ed.), *Skin aging.*, pp. 15–25. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lawrence, M.J., Rees, G.D., (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 45(1): 89-121.
- Lee, P. J., Langer, R., and Shastri, V. P. (2003). Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. *Pharmaceutical Research* 20(2): 264–269.
- Lentzen, G., and Schwarz, T. (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4): 623–634.
- Li, H., Pan, W.S., Li, J.Y., (2004). Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30: 657–666.
- Lovelyn, C. (2011). Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 02(05): 626–639.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8(6): 1719–1729.
- Naoui W., Bolzinger, M. A., Fenet, B., Pelletier, J., Valour, J. P., Kalfat, R., and Chevalier, Y. (2011). Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. *Pharmaceutical Research* 28(7): 1683–1695.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [online]. 2015. Available from : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126041> [2015, May 8]
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [online]. 2016. Available from : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8042#section=3D-Conformer> [2016, June 3]
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2010). OECD Guidance. *Dermal Absorption* (October): 1–53.

- Olejnik, A., Goscianska, J., and Nowak, I. (2012). Active compounds release from semisolid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101(11): 4032–4045.
- Panapisal, V., Charoensri, S., and Tantituvanont, A. (2012). Formulation of microemulsion systems for dermal delivery of silymarin. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 13(2): 389–399.
- Paolino, D., Ventura, C.A., Nistico, S., Puglisi, G., Fresta, M., (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics* 244: 21–31.
- Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T. ., and Urtti, A. (2003). Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics* 254(2): 99–107.
- Polona, S., Miha, H., Andreja, Z.V., Mirjana, G., (2003). Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 256(1-2): 65-73.
- Prince, (1997). *Microemulsion theory and practice*. London: Academic press, Inc
- Rhee, Y. S., Choi, J. G., Park, E. S., and Chi, S. C. (2001). Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 228(1-2): 161–170. 
- Sintov, A. C., and Greenberg, I. (2014). Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. *International Journal of Pharmaceutics* 471(1-2): 516–24.
- The United States Pharmacopoeia and The National Formular (USP XXVII). MA: Rand McNally, 2004.
- Zhang, J., and Michniak-Kohn, B. (2011). Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *International Journal of Pharmaceutics* 421(1): 34–44.
- Zhao, X., Liu, J.P., Zhang, X., Li, Y., (2006) Enhancement of transdermal delivery of

theophylline using microemulsion vehicle. *International Journal of Pharmaceutics* 327: 58–64.

Zhu, W., Yu, A., Wang, W., Dong, R., Wu, J., and Zhai, G. (2008). Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *International Journal of Pharmaceutics* 360(1-2): 184–190.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

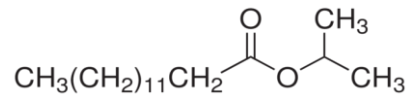
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ข้อมูลสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน

Isopropyl myristate (IPM) (Pubchem, 2016 : online)

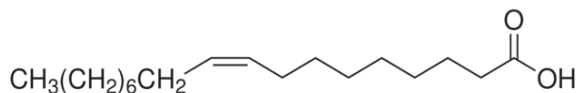
- โครงสร้าง:



- สูตรเคมี: C17H34O2
- มวลโมเลกุล: 270.457 g/mol
- log P: 7.2
- จุดหลอมเหลว: 3°C
- จุดเดือด: 193 °C ที่ 20 mm Hg
- ความหนาแน่น: 0.85 g/mL ที่ 25 °C
- Refractive index: 1.434 ที่ 25 °C
- การละลาย: ไม่ละลายน้ำ; ละลายได้ใน ether; ละลายได้ดีใน acetone, benzene; ละลายได้ใน castor oil, cottonseed oil, acetone, chloroform, ethyl acetate, ethanol, toluene และ mineral oil; ละลายได้บ้างใน glycerol, propylene glycol
- ความคงตัว: มีความคงตัวที่ดี

Oleic acid (Chemical book,2016 : online)

- โครงสร้าง:

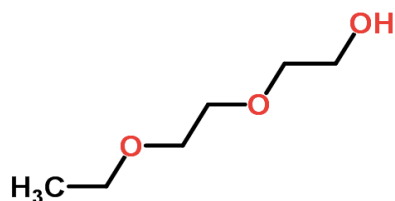


- ชื่อทางเคมี: Oleic acid, Cis-9-Octadecenoic acid, 112-80-1, Cis-Oleic acid, Elaidic acid
- สูตรเคมี: C₁₈H₃₄O₂
- มวลโมเลกุล: 282.468 g/mol
- log P: 6.5
- จุดหลอมเหลว: 13-14 °C
- จุดเดือด: 360 °C
- ความหนืด: 25.6 cP (30 °C)
- ความหนาแน่น: 0.89 g/mL at 25 °C
- Refractive index: 1.377
- การละลาย: ไม่ละลายในน้ำ, ละลายได้ใน chloroform, ether, alcohol
- ความเข้ากันได้: ผสมเข้ากันได้กับ ethanol, acetone, benzene, chloroform

L.A.S.[®] (ข้อมูลจากบริษัท Gattefossé)

- ชื่อทางเคมี: PEG-8 caprylic/capric glycerides เป็นสารผสมของ glycerides and polyethylene glycol esters
- ลักษณะทางกายภาพ: ของเหลวหนืดเล็กน้อย มีกลิ่นอ่อนๆ
- จุดเดือด: มากกว่า 150 °C
- ความหนาแน่น: 1.06-1.07 (20 °C)
- การละลาย: ละลายได้ในน้ำ, ethanol, chloroform, methylene chloride; ไม่ละลายใน mineral oil
- การนำไปใช้: เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ นิยมใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชัน ปลอดภัยไม่เป็นพิษ ใช้ทางเครื่องสำอางในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าและผลิตภัณฑ์กันแดด
- สภาวะการเก็บ: เก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง ความร้อนและความชื้น

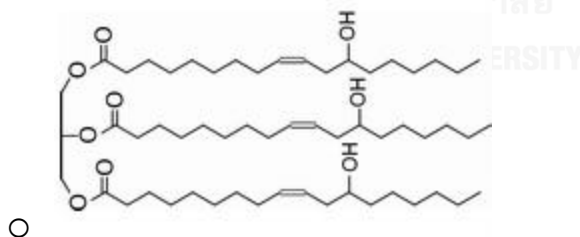
Transcutol® HP (ข้อมูลจากบริษัท Gattefossé)



- สูตรโมเลกุล: $C_6H_{14}O_3$
- ชื่อทางเคมี: Diethylene glycol monoethyl ether (highly purified)
- ลักษณะทางกายภาพ: ของเหลวใส
- ความหนืด: 4.8 cP (20 °C)
- การละลาย: ละลายได้ใน ethanol และน้ำ, ละลายได้บ้างในน้ำมันพืช และไม่ละลายใน mineral oils
- การนำไปใช้: เป็นตัวทำละลายและสารช่วยละลายที่ดี ใช้เป็นตัวทำละลายร่วมในตำรับยารับประทาน เป็นกระจายยาในตำรับยาฉีด ยาสำหรับจุ่ม และยาตา มีความปลอดภัยและมีความระคายเคืองต่ำ
- สถานะการเก็บ: เก็บในภาชนะปิดสนิท

HCO40® (ข้อมูลจากบริษัท Nikko Chemicals)

- สูตรโครงสร้าง:



- ชื่อทางเคมี: PEG-40 hydrogenated castor oil
- ลักษณะทางกายภาพ: สารกึ่งแข็งคล้าย petrolatum สีขาวหรือเหลืองอ่อน มีกลิ่นเล็กน้อย
- pH: 4.5-7.0 (สารละลายในน้ำ 5%)
- การนำไปใช้: เป็นสารก่อกัมมันต์และสารช่วยการละลาย ใช้ทางเครื่องสำอางและยา
- สถานะการเก็บ: เก็บในที่เย็นและมีการถ่ายเทอากาศดี
- ความคงตัว: มีความคงตัวทางเคมีที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข



ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการประเมินคุณสมบัติของไมโครอิมัลชัน

ตารางที่ 1x ค่าความหนืดของไมโครอิมัลชันตำรับต่าง ๆ ที่มีและไม่มี ectoin

ตำรับ	ความหนืด (cps)			ค่าเฉลี่ย	SD
	N1	N2	N3		
IPM o/w	58.86	58.61	58.00	58.49	0.44
IPM w/o	49.40	50.01	49.77	49.73	0.31
Oleic o/w	52.47	53.45	51.61	52.51	0.92
Oleic w/o	39.94	39.32	40.55	39.94	0.61
IPM o/w-ectoin	59.60	59.23	60.09	59.64	0.43
IPM w/o-ectoin	51.00	50.50	51.61	51.04	0.55
Oleic o/w-ectoin	55.91	57.14	55.91	56.32	0.71
Oleic w/o-ectoin	40.55	42.15	41.16	41.29	0.81

ตารางที่ 2x ค่าการละลายของ ectoin ในไมโครอิมัลชันตำรับต่าง ๆ

ตำรับ	ค่าการละลาย (%w/w)			ค่าเฉลี่ย	SD
	N1	N2	N3		
Solution	17.86	17.58	17.49	17.64	0.19
IPM o/w	6.67	6.77	6.62	6.69	0.08
IPM w/o	0.98	1.00	0.99	0.99	0.01
Oleic o/w	3.58	3.32	3.50	3.47	0.13
Oleic w/o	1.55	1.56	1.55	1.55	0.01

ตารางที่ 3 ปริมาณ ectoin ในสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่างๆที่วิเคราะห์ได้

ตำรับ	ปริมาณ ectoin ที่เตรียมจริง (%w/w)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (%w/w)			%Label amount (ค่าเฉลี่ย \pm SD)
		N1	N2	N3	
IPM o/w	6.02	5.76	5.59	6.13	96.79 \pm 4.59
IPM w/o	0.89	0.93	0.91	0.85	100.75 \pm 4.68
Oleic o/w	3.12	3.08	2.89	2.96	95.41 \pm 3.08
Oleic w/o	1.40	1.47	1.34	1.48	102.14 \pm 5.58

ตารางที่ 4 ความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่บรรจุ ectoin เดือนที่ 1 และ 2

ตำรับ	% ectoin ที่เหลืออยู่ เดือนที่ 1			ค่าเฉลี่ย	SD	% ectoin ที่เหลืออยู่เดือน ที่ 2			ค่าเฉลี่ย	SD
	N1	N2	N3			N1	N2	N3		
IPM o/w	96.36	86.36	99.26	93.99	6.77	83.30	96.21	85.10	88.21	6.99
IPM w/o	102.19	100.57	105.98	102.91	2.78	103.92	104.58	101.41	103.31	1.67
Oleic o/w	100.69	97.66	103.86	100.74	3.10	101.26	100.20	103.72	101.73	1.81
Oleic w/o	103.78	105.83	96.54	102.05	4.88	104.19	99.43	99.98	101.20	2.60

ตารางที่ 5x เปรูเซ็นต์การปลดปล่อยสะสมของ ectoin จากสารละลายและไมโครอิมัลชันตำรับ
ต่างๆ

ตำรับ	การทดลองที่	% การปลดปล่อยที่เวลา (ชั่วโมง)									
		0.25	0.75	1	1.5	2	3	6	12	18	24
Solution	N1	30.36	54.08	69.45	83.00	84.16	95.25	96.15	97.05	96.99	96.25
	N2	25.26	33.01	52.57	70.20	82.61	84.70	91.21	102.70	108.99	115.34
	N3	25.97	54.27	65.93	71.24	80.82	89.18	89.12	94.87	91.41	94.56
	N4	38.58	57.55	67.03	71.20	75.89	99.05	98.73	98.51	96.52	93.83
	ค่าเฉลี่ย	30.04	49.73	63.74	73.91	80.87	92.05	93.80	98.28	98.47	99.99
	SD	6.12	11.26	7.60	6.08	3.59	6.36	4.41	3.31	7.45	10.28
IPM o/w	N1	22.37	32.53	46.57	52.51	59.14	65.17	69.75	72.40	72.34	75.41
	N2	22.92	34.72	50.49	54.73	63.63	61.45	66.78	69.30	70.57	73.54
	N3	24.16	34.45	50.11	52.38	54.38	57.14	62.35	66.54	68.59	68.73
	N4	18.91	28.32	43.61	49.07	54.47	56.59	62.74	67.12	65.02	68.24
	ค่าเฉลี่ย	22.09	32.50	47.69	52.17	57.91	60.09	65.40	68.84	69.13	71.48
	SD	2.25	2.95	3.25	2.33	4.42	4.03	3.52	2.65	3.14	3.55
IPM w/o	N1	15.75	23.52	35.92	51.44	59.29	73.80	84.72	85.94	86.20	95.74
	N2	16.72	24.99	40.68	52.94	64.56	80.08	88.99	93.60	94.34	95.82
	N3	17.11	24.29	36.85	50.39	60.48	77.50	92.34	96.29	96.16	97.22
	N4	16.82	22.34	35.47	51.15	60.14	86.08	88.38	93.57	95.70	95.56
	ค่าเฉลี่ย	16.60	23.78	37.23	51.48	61.12	79.36	88.61	92.35	93.10	96.08
	SD	0.59	1.14	2.37	1.07	2.35	5.17	3.12	4.46	4.66	0.76
Oleic o/w	N1	25.14	54.03	66.40	78.11	78.83	93.72	103.99	101.94	104.08	105.56
	N2	29.91	62.47	59.39	83.20	89.34	95.13	109.63	106.04	104.42	105.62
	N3	26.05	58.17	66.22	78.63	83.44	95.64	87.61	98.91	96.99	95.19
	N4	26.11	43.43	63.21	73.07	76.16	87.05	98.29	95.34	95.34	95.47
	ค่าเฉลี่ย	26.80	54.53	63.80	78.25	81.94	92.88	99.88	100.56	100.21	100.46
	SD	2.12	8.16	3.29	4.15	5.78	3.97	9.40	4.54	4.72	5.92

ตำรับ	การทดลองที่	% การปลดปล่อยที่เวลา (ชั่วโมง)									
		0.25	0.75	1	1.5	2	3	6	12	18	24
Oleic w/o	N1	23.71	44.25	63.71	70.85	72.10	71.50	76.53	75.74	75.16	85.27
	N2	23.98	40.15	53.20	58.11	58.96	62.91	65.74	66.45	70.24	73.27
	N3	20.64	39.19	57.58	56.48	61.06	66.20	69.52	73.04	75.57	76.47
	N4	21.27	34.21	44.89	53.03	54.74	59.55	64.75	77.68	74.91	77.99
	ค่าเฉลี่ย	22.40	39.45	54.85	59.62	61.71	65.04	69.13	73.23	73.97	78.25
	SD	1.69	4.13	7.92	7.78	7.41	5.09	5.34	4.90	2.50	5.08

ตารางที่ 6x ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย ectoin จากสารละลายและตำรับไมโครอิมัลชันต่าง ๆ ตามจลนศาสตร์แบบ first-order

ตำรับ	ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย (h^{-1})				ค่าเฉลี่ย	SD
	N1	N2	N3	N4		
Solution	0.557	1.312	0.531	1.011	0.853	0.377
IPM o/w	0.695	0.684	0.721	0.611	0.678	0.047
IPM w/o	0.588	0.636	0.531	0.817	0.643	0.124
Oleic o/w	0.671	0.676	0.967	0.712	0.756	0.142
Oleic w/o	0.790	0.690	0.652	0.459	0.648	0.139

ตารางที่ 7x ค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังของ ectoin จากไมโครอิมัลชันและสารละลายที่ได้จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตำรับ	พารามิเตอร์	N1	N2	N3	N4	ค่าเฉลี่ย	SD
Solution	%Q ₂₄	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	%Q ₅	1.13	0.96	0.44	0.35	0.72	0.38
	EF of %Q ₅	1.56	1.34	0.60	0.49	1.00	0.53
IPM o/w	%Q ₂₄	0.96	1.32	1.01	0.77	1.02	0.23
	%Q ₅	0.61	0.78	0.57	0.55	0.63	0.10
	EF of %Q ₅	0.85	1.08	0.79	0.77	0.87	0.14
IPM w/o	%Q ₂₄	0.43	0.39	0.13	0.00	0.24	0.21
	%Q ₅	2.21	2.46	2.85	2.65	2.54	0.27
	EF of %Q ₅	3.07	3.42	3.96	3.68	3.53	0.38
Oleic o/w	%Q ₂₄	1.18	0.81	0.82	0.96	0.94	0.17
	%Q ₅	2.13	1.06	1.03	1.37	1.40	0.51
	EF of %Q ₅	2.95	1.48	1.44	1.90	1.94	0.71
Oleic w/o	%Q ₂₄	0.78	0.79	1.56	0.75	0.97	0.40
	%Q ₅	2.26	3.07	2.34	2.03	2.42	0.45
	EF of %Q ₅	3.14	4.26	3.24	2.81	3.36	0.63



ภาคผนวก ค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางแสดงการเปรียบเทียบระหว่างความหนืดระหว่าง Microemulsions-ectoin และ Microemulsions-blank (t-test independent)

ตารางที่ 1ค เปรียบเทียบความหนืดระหว่างสูตร IPM o/w-ectoin และ IPM o/w-blank

Group Statistics

	Sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	IPM o/w-ectoin	3	59.63776	.431540	.249150
	IPM o/w-blank	3	58.49088	.443050	.255795

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Viscosity	variances assumed	.026	.880	3.212	4	.033	1.146880	.357081	.15546	2.138296
	variances not assumed			3.212	3.997	.033	1.146880	.357081	.15519	2.138567

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความหนืดระหว่างสูตร IPM w/o-ectoin และ IPM w/o-blank

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Viscosity	variances assumed	.720	.444	3.578	4	.023	1.31072	.366357	.293549	2.327891
	variances not assumed			3.578	3.136	.035	1.31072	.366357	.172841	2.448599

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Viscosity	variances assumed	.720	.444	3.578	4	.023	1.31072	.366357	.293549	2.327891
	variances not assumed			3.578	3.136	.035	1.31072	.366357	.172841	2.448599

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความหนืดระหว่างสูตร oleic o/w-ectoin และ oleic o/w-blank

Group Statistics					
	Sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Oleic o/w-ectoin	3	56.32000	.709448	.409600
	Oleic o/w-blank	3	52.51072	.922282	.532480

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Viscosity	variances assumed	.064	.813	5.670	4	.005	3.809280	.671794	1.944081	5.674479
	variances not assumed			5.670	3.753	.006	3.809280	.671794	1.894671	5.723889

ตารางที่ 4ค เปรียบเทียบความหนืดระหว่างสูตร oleic w/o-ectoin และ oleic w/o-blank

Group Statistics					
	Sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viscosity	Oleic w/o-ectoin	3	41.28768	.805778	.465216
	Oleic w/o-blank	3	39.93600	.614400	.354724

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Viscosity	variances assumed	.286	.621	2.310	4	.082	1.351680	.585026	-.272612	2.975972
	variances not assumed			2.310	3.738	.087	1.351680	.585026	-.318497	3.021857

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนงราม จันทเวช
วันเดือนปีเกิด	เกิดวันที่ 8 พฤษภาคม 2532
วุฒิการศึกษา	เกสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2555
ประสบการณ์ทำงาน	ปี 2556 – 2557 เกสัชกรประจำโรงพยาบาลนวมินทร์ 9 ปี 2556 - 2558 เกสัชกรนอกเวลาร้านยาฟาแมกซ์
การศึกษาต่อ	เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ปีการศึกษา 2556

