

การเตรียมโศลกติปีดนาโนพาร์ทิเคิลที่มีส่วนประกอบของ
สารสกัดจากทับทิมสำหรับทำให้ผิวขาว

นางสาวญาตาวิ ทิพย์เที่ยงแท้	5136536633
นางสาวจิณห์นิภา ประจวบพงศ์	5136516033
นางสาววิภูษิตา ภูธรภักดี	5136657933

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Preparation of solid lipid nanoparticles
containing pomegranate extract for skin whitening

Yatawee Thipthiangthae	5136536633
Jinnipha Pajoubpong	5136516033
Waritta Pootornpakdee	5136657933

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

โครงการลำดับที่

วันที่

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การเตรียมโซลิดลิปิดนาโนพาร์ทิเคิลที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากทับทิมสำหรับทำให้ผิวขาว

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Preparation of solid lipid nanoparticles containing pomegranate extract for skin whitening

หัวหน้าโครงการ : นางสาวญาตาวี ทิพย์เที่ยงแท้ 5136536633

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวจิณห์นิภา ประจวบพงศ์ 5136516033

: นางสาววิภูษา ภูธรภักดี 5136657933

อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภญ.ดร.ประภาศรี สีนสวัสดิ์, รศ.ภค.ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนาจ

ภาควิชา : วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

สารสกัดทับทิมประกอบด้วยอิลลาจิกแอซิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน อย่างไรก็ตามอิลลาจิกแอซิดมีค่าการละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดต่ำและสามารถซึมผ่านผิวหนังได้น้อย ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการใช้โซลิดลิปิดนาโนพาร์ทิเคิล (SLNs) ในการกักเก็บอิลลาจิกแอซิด เนื่องจากเป็นระบบที่มีขนาดอนุภาคเล็ก ช่วยเพิ่มการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังได้ และสามารถนำเอา SLNs มาใช้ทางเครื่องสำอางได้หลายรูปแบบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดและปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียม SLNs ด้วยเทคนิคไมโครอิมัลชัน พบว่าสูตรตำรับที่เหมาะสมประกอบด้วย GMS, Myrij[®] 52, ethanol และน้ำ ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 10: 25: 25: 40 ตามลำดับ SLNs ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาว โปร่งแสง มีขนาดอนุภาคในช่วง 122.23 ± 1.59 นาโนเมตร ค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค 0.59 ± 0.01 เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน เมื่อทำการเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมความเข้มข้น 0.05% SLNs มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาว โปร่งแสง มีขนาดอนุภาคในช่วง 126.67 ± 2.20 นาโนเมตร ค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค 0.49 ± 0.03 และมีประสิทธิภาพการกักเก็บอิลลาจิกแอซิด 65.53% ผลการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งโดยการปั่นเหวี่ยง พบว่าไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน อย่างไรก็ตามเมื่อวัดขนาดอนุภาคหลังผ่านสภาวะเร่งพบว่าขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ เกษักรหญิง ดร.ประภาศรี สินสวัสดิ์ รองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนวย และรองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.รุทธ์ สุทธิศรี ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องและให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้ รวมถึง เจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม ภาควิชาเกษตรเขตและเกษตรพฤษศาสตร์ที่ได้อำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย ทำให้ปริญญาานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม	5
2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับผิวหนัง	5
2.1.1 โครงสร้างของผิวหนัง	5
2.1.2 กระบวนการสร้างเมลานิน	8
2.2 สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวขาว	10
2.3 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับทัปทิมและสาระสำคัญ	14
2.4 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ solid lipid nanoparticles (SLNs)	16
2.4.1 คำจำกัดความของ SLNs	16
2.4.2 วิธีการเตรียม SLNs	18
2.4.3 การแสดงคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs	23
2.4.4 ข้อดีของ SLNs ต่อการนำไปใช้นำส่งทางผิวหนัง	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. วัสดุและวิธีการวิจัย	28
3.1 รายชื่อสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	28
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	29
3.3 วิธีการวิจัย	30
3.3.1 การเตรียมสารสกัดเปลือกทับทิม	30
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	31
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดเปลือกทับทิม	32
3.3.4 การศึกษาหาชนิดไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและ สารลดแรงตึงผิวรวมที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมไมโครอิมัลชัน	33
3.3.5 การศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLN โดยวิธีสร้างแผนภาพระบบไตรภาคของวัฏภาคน้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวผสม ด้วยวิธี Titration Method	36
3.3.6 การศึกษาหาสูตรตำรับ SLN ที่เหมาะสมและการประเมิน	39
3.3.7 การเตรียม SLN ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและการประเมิน	42
3.3.8 การประเมินประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs	43
3.3.9 การประเมินความคงตัวของ SLNs	44
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	46
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดเปลือกทับทิม	46
4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	47
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ สารสกัดเปลือกทับทิม	47
4.4 การศึกษาหาชนิดไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและ สารลดแรงตึงผิวรวมที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมไมโครอิมัลชัน	48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลการศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLN โดยวิธีสร้างแผนภาพระบบไตรภาคของวัฏภาคน้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวผสม ด้วยวิธี Titration Method	56
4.6 ผลการศึกษาหาสูตรตำรับ SLN ที่เหมาะสมและการประเมิน	63
4.7 ผลการเตรียม SLN ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและการประเมิน	68
4.8 ผลการประเมินประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs	71
4.9 ผลการประเมินความคงตัวของ SLNs	72
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	73
5.1 สรุปผลการวิจัย	73
5.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางการพัฒนาการวิจัย	74
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	81
ภาคผนวก ง	82
ภาคผนวก จ	88

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไขมันและสารทำอิมัลชันที่มีการใช้เตรียม SLNs	17
ตารางที่ 2	ข้อดีและข้อเสียของเทคนิคการเตรียม SLNs	19
ตารางที่ 3	ข้อดีและข้อเสียของเทคนิคการเตรียม SLNs โดยใช้วิธี Cold and Hot Homogenization	20
ตารางที่ 4	วิธีที่ใช้วัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆของ SLNs	23
ตารางที่ 5	ปริมาณของน้ำหนักรสชาติเปลือกทับทิมและ ไขมันแข็งที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้	34
ตารางที่ 6	ปริมาณสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษาความเข้ากันได้	35
ตารางที่ 7	ชนิดของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่ใช้ในการศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสม สำหรับเตรียม SLNs	38
ตารางที่ 8	ปริมาณของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่ใช้ในการศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสม สำหรับเตรียม SLNs ในการทดลองแต่ละชุด	39
ตารางที่ 9	ส่วนประกอบและปริมาณ โดยน้ำหนักในสูตร SLNs ที่ใช้ศึกษา	41
ตารางที่ 10	ส่วนประกอบและปริมาณ โดยน้ำหนักในสูตร SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม	43
ตารางที่ 11	ผลการหาปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม (n=3)	47
ตารางที่ 12	% tyrosinase inhibition ของสารสกัดเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 13	% tyrosinase inhibition ของสารละลาย kojic acid (positive control) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
ตารางที่ 14	ลักษณะภายนอกของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิม และไขมันแข็ง	49
ตารางที่ 15	ผลการทดลองความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม	52
ตารางที่ 16	ความเข้ากันและความไม่เข้ากันของสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม	53
ตารางที่ 17	อัตราส่วนเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำของไมโครอิมัลชันเพื่อใช้เตรียม SLNs	62
ตารางที่ 28	ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ลักษณะภายนอก หลังเตรียมเตรียมได้ และลักษณะภายนอกเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	64
ตารางที่ 39	ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ของ SLNs เปรียบเทียบระหว่างบรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมกับ ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม และเปรียบเทียบ ก่อนผ่านสภาวะเร่งและหลังผ่านสภาวะเร่ง	70
ตารางที่ 20	% entrapment efficiency ของ SLNs ที่ประกอบด้วย สารสกัดเปลือกทับทิม 0.05%, 0.10% และ 0.20%	71

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพจำลองโครงสร้างผิวหนังและเซลล์ชนิดต่างๆที่อยู่ชั้นผิวหนัง	6
รูปที่ 2 ภาพจำลองแสดงความแตกต่างของขนาดและการกระจายของเมลานิน ในเมลาโนโซมของผิวสีเข้มและผิวสีอ่อน	7
รูปที่ 3 แผนผังแสดงกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis)	9
รูปที่ 4 การส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เมลานิน	9
รูปที่ 5 โครงสร้างของ SLNs	17
รูปที่ 6 ลักษณะโครงสร้างของ SLNs ในทางทฤษฎี	17
รูปที่ 7 กระบวนการผลิต SLNs โดยเทคนิคไมโครอิมัลชัน	21
รูปที่ 8 ภาพสามมิติของ SLNs ขนาด 400 nm ที่ได้จาก SEM	24
รูปที่ 9 ความแตกต่างของคุณสมบัติปกคลุมผิว (occlusive effect) ของอนุภาคนาโนและอนุภาคขนาดไมครอน	26
รูปที่ 10 ลักษณะของผงสารสกัดเปลือกทับทิมที่สกัดได้	46
รูปที่ 11 ลักษณะของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิมและ ไขมันแข็งในสถานะของเหลว (อุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส)	50
รูปที่ 12 ลักษณะของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิมและ ไขมันแข็งในสถานะของแข็ง (อุณหภูมิห้อง)	50

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 13 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Mytj [®] 52) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol)	53
รูปที่ 14 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (dioctyl sodium sulfosuccinate) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol)	54
รูปที่ 15 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Tween [®] 80) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Tween [®] 80) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (benzyl alcohol)	54
รูปที่ 16 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor [®] RH 40) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor [®] RH40) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (benzyl alcohol)	55
รูปที่ 17 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Arlacel [®] 165) ในสารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor [®] RH40) และสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ benzyl alcohol)	55

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 18 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Myrj [®] 52), สารลดแรงตึงผิวร่วม (ethanol) และน้ำ	56
รูปที่ 29 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Myrj [®] 52), สารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆกัน (butanol, isopropyl alcohol, benzyl alcohol) และน้ำ	57
รูปที่ 20 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (DSS), สารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆ (ethanol, butanol, benzyl alcohol) และน้ำ	58
รูปที่ 21 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (DSS), สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และน้ำ	59
รูปที่ 22 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Tween [®] 80), สารลดแรงตึงผิวร่วม (ethanol) และน้ำ	59
รูปที่ 23 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Tween [®] 80), สารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, butyl alcohol, isopropyl alcohol) และน้ำ	60
รูปที่ 24 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Cremophor [®] RH 40), สารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, butanol, isopropyl alcohol) และน้ำ	61

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 24 แผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย GMS, สารลดแรงตึงผิว (Arlacel® 165), สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และน้ำ	62
รูปที่ 26 ลักษณะของ SLN สูตรที่ 1-9 หลังเตรียมได้ทันที	67
รูปที่ 27 ลักษณะของ SLN สูตรที่ 10-18 หลังเตรียมได้ทันที	68
รูปที่ 28 ลักษณะของ SLN สูตรที่ 19-28 หลังเตรียมได้ทันที	68
รูปที่ 29 ลักษณะของ SLN ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและที่บรรจุ สารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.05%, 0.1% และ 0.2% ก่อนผ่านสภาวะเร่ง	70
รูปที่ 30 ลักษณะของ SLN ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและที่บรรจุ สารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.05%, 0.1% และ 0.2% หลังผ่านสภาวะเร่ง	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ทับทิมเป็นสมุนไพรที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีการเพาะปลูกในหลายพื้นที่ ให้ผลได้ตลอดปี เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และมีการศึกษาพบว่าในทับทิมนั้นมีสารสำคัญในกลุ่ม polyphenol หลายชนิดที่มีฤทธิ์เป็น antioxidant หนึ่งในนั้นคือ ellagic acid ที่นอกจากจะมีฤทธิ์เป็น antioxidant แล้วยังมีฤทธิ์เป็นสารทำให้ผิวขาว นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสรรพคุณของสารสกัดทับทิมว่าสามารถช่วยกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนโดยไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เคราติโนไซต์และมีส่วนช่วยให้เกิดการสร้างเซลล์ผิวใหม่อีกด้วย⁽¹⁾ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ได้จากส่วนเปลือก, เนื้อและเมล็ดของทับทิม พบว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกมีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด⁽²⁾ ดังนั้นการนำเปลือกผลทับทิมที่เป็นสิ่งเหลือใช้จากการบริโภคหรืออุตสาหกรรมมาสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายในราคาถูก และยังเป็น การเพิ่มมูลค่าของเปลือกผลทับทิมให้เกิดประโยชน์ทางเครื่องสำอางได้ ellagic acid อาจอยู่ในรูปกรดอิสระหรือในรูป ellagitannin glycoside สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น สตอร์ว์เบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ แบล็กเบอร์รี่ วอลนัท เป็นต้น⁽³⁾ โดยมีรายงานว่าเมื่อทา ellagic acid ลงบนผิวของหนูตะเภาแล้ว สามารถเกิดการยับยั้งการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีได้⁽⁴⁾ เมื่อเปรียบเทียบ ellagic acid กับไฮโดรควิโนนซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์เมลานোসัยต์ ทำให้ไม่เกิดการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง ส่งผลให้มีปัญหาในด้านความปลอดภัย มีการจำกัดการใช้ในหลายประเทศ ellagic acid สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีเทียบเท่ากับไฮโดรควิโนนและไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมลานোসัยต์ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าในการนำมาใช้เป็นเครื่องสำอาง และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ ellagic acid, kojic acid และ arbutin พบว่า ellagic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้ดีกว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นที่เท่ากัน (1%) ในตัวทำละลายเดียวกัน⁽⁵⁾ แต่เนื่องด้วย ellagic acid ละลายน้ำได้น้อย⁽⁶⁾ ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด และมีความสามารถในการแพร่ผ่านน้อย จึงต้องมีการพัฒนาระบบนำส่งสารเพื่อที่จะนำส่ง ellagic acid ให้สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้มากขึ้น

solid lipid nanoparticles (SLNs) เป็นระบบนำส่งสารที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 50 ถึง 1,000 นาโนเมตร⁽⁷⁾ เตรียมโดยใช้หลักการเดียวกันกับการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยวัฏภาคน้ำมันจะเตรียมจาก

ไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 37 °C เช่น ไตรกลีเซอไรด์, กรดไขมัน, สเตียรอยด์, แร็กซ์ เป็นต้น ทำให้ได้อนุภาคเมทริกซ์ไขมันแข็งที่มีชั้นของสารลดแรงตึงผิวเรียงตัวชั้นเดียวห่อหุ้มแกนไขมันไว้ด้านในทำให้ได้อนุภาคที่มีความคงตัว สามารถกักเก็บสารที่ชอบไขมันไว้ได้ โดยสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ นิยมสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มไม่มีประจุที่สามารถเข้าได้กับร่างกาย เช่น ethylene oxide หรือ propylene oxide copolymers, sorbitan esters เป็นต้น การใช้ระบบนำส่งสารแบบ SLNs มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังได้ดี ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการนำส่งสารเนื่องจากมีขนาดอนุภาคเล็ก สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้ ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว (occlusive effect) สามารถนำมาใช้ในทางเครื่องสำอางได้หลายรูปแบบโดยนำมาเตรียมให้อยู่ในรูปโลชัน ครีม หรือเจล นอกจากนี้ยังสามารถขยายขนาดการผลิตไปในระดับอุตสาหกรรมได้ไม่ยาก^(7,8) อีกทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอางของไทยและทั่วโลกมีแนวโน้มในการใช้วัตถุดิบที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติเป็นส่วนผสมมากยิ่งขึ้น เพราะมีความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมี และผู้บริโภคยังให้ความสนใจเกี่ยวกับนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก ดังนั้นการเตรียม SLNs ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมเป็นสารสำคัญ จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับทำให้ผิวขาว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไป :

เพื่อศึกษาการเตรียมและจำแนกคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมที่เตรียมโดยวิธีไมโครอิมัลชัน

วัตถุประสงค์เฉพาะ :

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด ellagic acid จากเปลือกทับทิมและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดทับทิมที่สกัดได้
2. เพื่อหาชนิดและสัดส่วนที่เหมาะสมในวัฏภาคต่างๆในการเตรียม SLNs ด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมในสภาวะเร่ง

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง
2. จัดหาเปลือกทับทิม สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ
3. นำเอาเปลือกทับทิมหั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °c เป็นเวลา 24 ชม. ในตู้อบ (hot air oven) จากนั้นบดให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบดและแรงเบอร์ 60

4. เตรียมสารสกัดเปลือกทับทิมโดยนำผงแห้งของเปลือกทับทิมสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอล และนำจากนั้นนำมาสกัดแยกส่วนด้วย ethyl acetate และ 2% acetic acid แล้วนำมาระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศด้วย rotary evaporator
5. วิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดทับทิมโดยเครื่อง HPLC แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ellagic acid
6. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี modified dopachrome ใน 96-well microplates จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
7. ศึกษาความเข้ากันได้ของไขมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมกับสารสกัดทับทิมสำหรับใช้เตรียมไมโครอิมัลชัน
8. ศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLNs โดยวิธีสร้างแผนภาพระบบไตรภาค (pseudo-ternary phase diagram) ของวัฏภาคน้ำ น้ำมันและสารลดแรงตึงผิวผสม ด้วยวิธี titration Method
9. ศึกษาหาสูตรตำรับ SLNs ที่เหมาะสมโดยวิธีไมโครอิมัลชันแบบอุ่นและประเมินคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs ที่เตรียมได้ ดังนี้
 - ขนาดของอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค โดยใช้เครื่อง zetasizer nano
 - zeta potential ด้วยเครื่อง zetasizer nano
 - ความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง
10. เตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมโดยเลือกสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 9 และประเมินคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs ที่เตรียมได้ ดังนี้
 - ขนาดของอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค โดยใช้เครื่อง zetasizer nano
 - zeta potential ด้วยเครื่อง zetasizer nano
 - ความคงตัวในสภาวะเร่ง
 - ประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ของ SLNs

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สารสกัดทับทิมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้เปลือกทับทิมที่เหลือใช้
2. ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดทับทิมที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้
3. ได้ระบบนำส่งสารแบบ SLNs ที่เตรียมโดยใช้ไขมัน, สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสม มีคุณลักษณะที่ดีและมีความคงตัว
4. เป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรตำรับที่มีระบบนำส่งสารแบบ SLNs เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

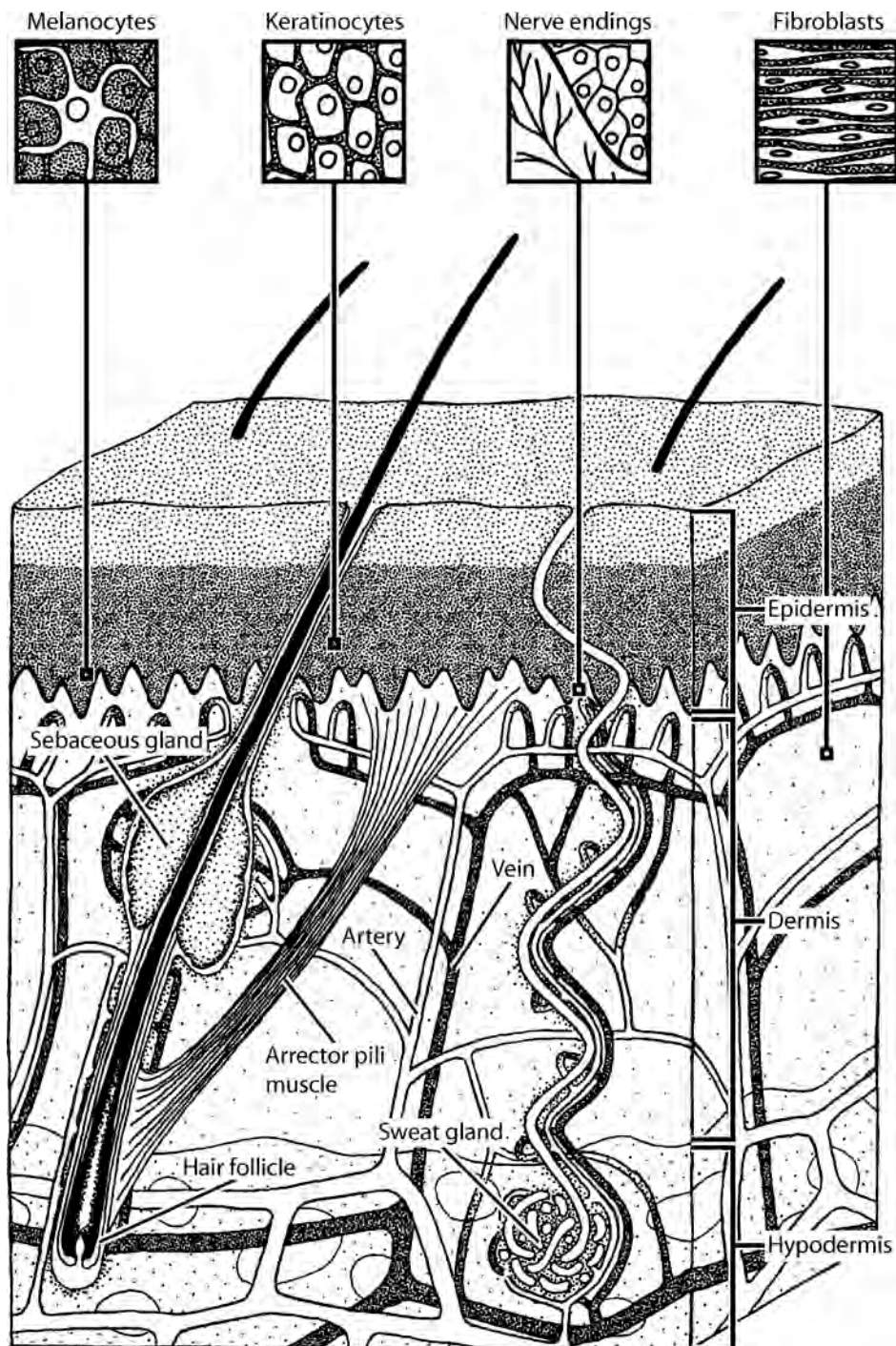
2.1 ผิวหนัง

2.1.1 โครงสร้างของผิวหนัง⁽⁹⁾

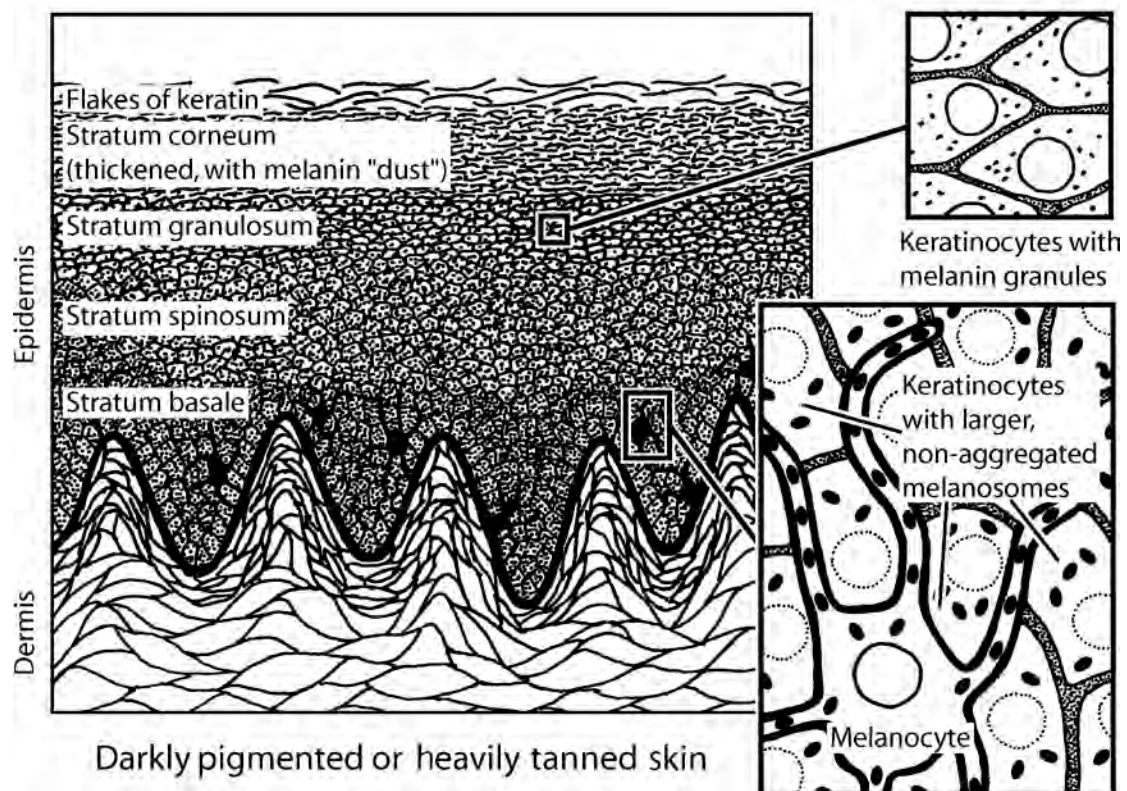
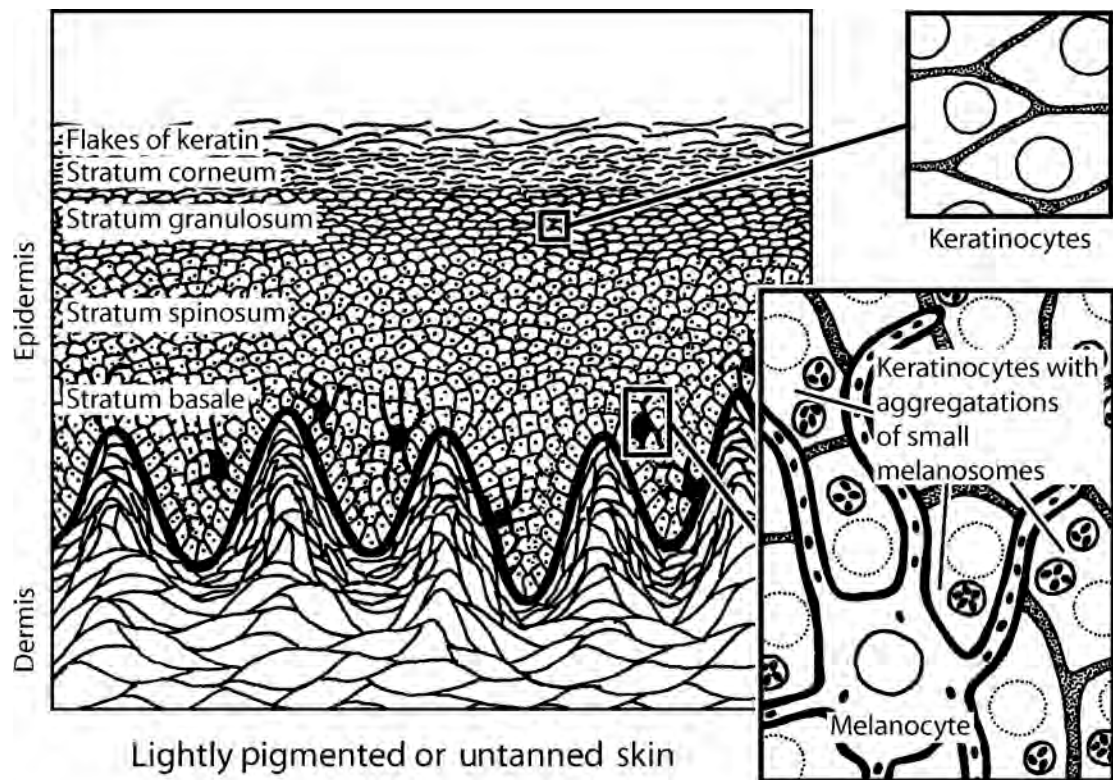
โครงสร้างผิวหนังของมนุษย์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) ชั้นหนังกำพร้าเป็นชั้นเยื่อผิวที่ปกคลุมร่างกายอยู่นอกสุด ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีการเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ มีพื้นผิวเรียบ อาจมีเส้นขนและรูเปิดของต่อมเหงื่อแทรกกระหว่างเซลล์ เซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) เป็นเซลล์ที่พบมากในชั้นหนังกำพร้า ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่ที่เรียกว่าเคราติน (keratin) นอกจากนี้ชั้นหนังกำพร้ายังประกอบไปด้วย dendritic cell ที่ไม่มีการเคลื่อนตัวอีก 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เมลานินไซต์ (melanocyte) ทำหน้าที่สร้างเมลานิน (melanin) , langerhans cells เป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อแอนติเจนที่เข้ามาสัมผัสกับผิวหนัง และ Merkel cells เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับปลายประสาทในการรับรู้สัมผัส ซึ่งพบมากบริเวณปลายนิ้ว ชั้นหนังกำพร้าสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชั้น คือ stratum basale (ชั้นที่เซลล์เคราติโนไซต์ถูกสร้างขึ้น), stratum spinosum, stratum granulosum และ stratum corneum จากชั้นลึกสุดจนถึงบนสุดตามลำดับ ในชั้นของ stratum corneum ประกอบไปด้วยเซลล์เคราติโนไซต์ที่คงรูปร่างและมีลักษณะแบน โดยชั้น stratum corneum ทำหน้าที่กีดขวางการซึมผ่านผิวหนังของน้ำและตัวทำละลายต่างๆ ป้องกันจุลชีพและสารพิษเข้าสู่ร่างกาย และปกป้องร่างกายจากการบาดเจ็บต่างๆ ได้ ซึ่งเซลล์เคราติโนไซต์ที่อยู่บนชั้น stratum corneum จะมีการหลุดลอกออกแล้วถูกทดแทนด้วยเซลล์เคราติโนไซต์ที่เกิดใหม่และเคลื่อนตัวขึ้นไปจากชั้น stratum basale

เซลล์เมลานินไซต์เป็น dendritic cell ที่อยู่ในชั้น stratum basale ของชั้นหนังกำพร้าและอยู่ในส่วนเมทริกซ์ของ hair bulb เซลล์เมลานินไซต์สร้างเมลานินแล้วบรรจุไว้ใน cytoplasmic organelles ที่เรียกว่า เมลาโนโซม (melanosome) ที่มีขนาดและระดับการเกาะกลุ่มกันแตกต่างกันไปตามแต่ประเภทของผิวหนังและสีผิว ความหนาแน่นของเซลล์เมลานินไซต์มีความแตกต่างกันขึ้นตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย จำนวนของเซลล์เมลานินไซต์ที่ยังทำหน้าที่ผลิตเมลานินได้จะแปรไปตามอายุ และมีจำนวนมากขึ้นเมื่อสัมผัสกับรังสียูวี เซลล์เมลานินไซต์จะขนส่งเมลานินโซมที่เจริญเต็มที่แล้วไปตามสาขาที่ยื่นเข้าไปแทรกตามเซลล์เคราติโนไซต์ จากนั้นเมลานินโซมจะเกาะกลุ่มกันและถูกล้อมรอบด้วยเมมเบรนในเมลานินโซมคอมเพล็กซ์ ความเข้มของสีผิวขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ จำนวนเมลานินโซมในเซลล์เคราติโนไซต์และเซลล์เมลานินไซต์, ระดับการกระจายของเมลานินโซม, อัตราการสร้างเมลานิน (melanogenesis), ระดับการเกิด melanization ของเซลล์เมลานินไซต์, อัตราการขนส่งและรูปแบบการรวมเมลานินโซมเข้าสู่เซลล์เคราติโนไซต์, การสลายตัว

ของเมลานินในเซลล์เคราติโนไซต์ และอายุของแต่ละบุคคล รูปภาพโครงสร้างของผิวหนังดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2



รูปที่ 1 แสดงภาพจำลองโครงสร้างผิวหนังและเซลล์ชนิดต่างๆที่อยู่ชั้นผิวหนัง



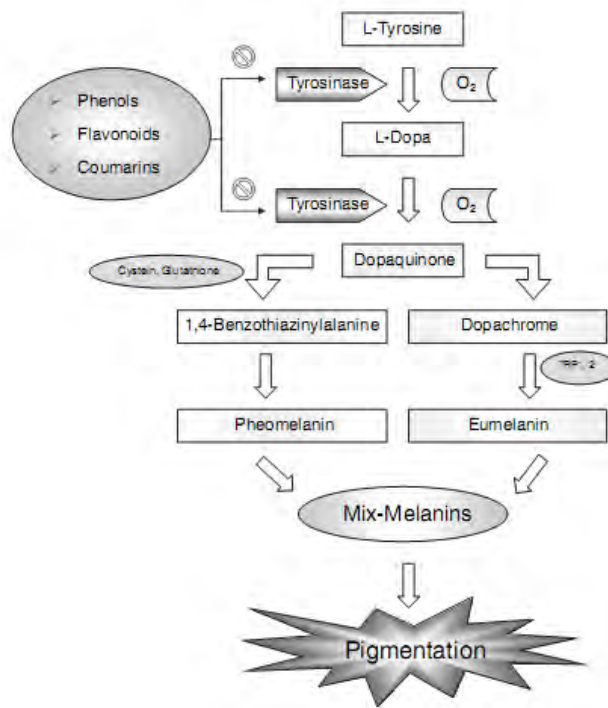
รูปที่ 2 แสดงภาพจำลองแสดงความแตกต่างของขนาดและการกระจายของเมลานินในเมลานโซมของผิวสีเข้มและผิวสีอ่อน

2.1.2 กระบวนการสร้างเมลานิน (melanogenesis)

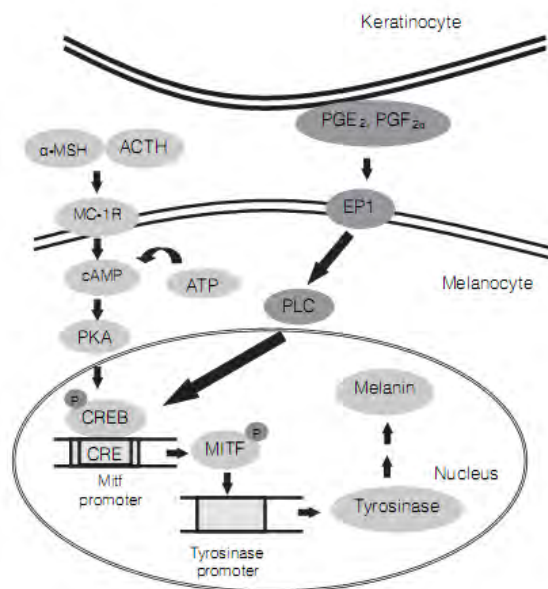
การสร้างสีผิวแบ่งออกเป็นสีผิวโดยกำเนิดและสีผิวที่เปลี่ยนแปลงไป สีผิวโดยกำเนิดคือปริมาณของการสร้างเมลานินโดยไม่ขึ้นกับอิทธิพลจากแสงแดด ส่วนสีผิวที่เปลี่ยนแปลงไปหรือผิวแทนชั่วคราวนั้นเกิดจากการสัมผัสกับแสงยูวี สีผิวโดยกำเนิดที่อ่อนกว่าจะมีการตอบสนองต่อการไหม้แดดที่มากกว่า ผิวคล้ำได้น้อยกว่า และไวต่อการเกิดมะเร็งผิวหนังมากกว่า ในผิวหนังประกอบด้วยเมลานิน 2 ชนิด คือ eumelanin สีน้ำตาลดำ และ pheomelanin สีแดงเหลือง ความเข้มข้นของ eumelanin ที่มากกว่าทำให้ผิวแสดงสีที่เข้มกว่า ส่วนความเข้มข้นของ pheomelanin จะมีความแตกต่างกันไปตามบุคคล เมลานินมีหน้าที่ป้องกันอันตรายที่ได้รับจากแสงแดดโดยธรรมชาติ (photoprotection) โดยอาศัยการดูดกลืนและการกระจายแสงยูวีของเมลานิน ความหนาแน่นและการกระจายของเมลานินในเซลล์เคราติโนไซต์จะมีผลต่อคุณสมบัติการดูดกลืนและการกระจายแสงของเมลานิน โดยเมลานินที่มีขนาดที่ใหญ่กว่า กระจายตัวเดี่ยวๆ ที่พบในผิวสีเข้มสามารถดูดกลืนพลังงานได้มากกว่าเมลานินที่มีขนาดเล็กกว่าและอยู่เกาะกลุ่มกัน ในผิวสีอ่อนการผลิตเมลานินถูกควบคุมโดยยีนควบคุมการสร้างสี, ฮอร์โมน และรังสียูวี การผลิตเมลานินในเซลล์เมลานินไซต์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และหากปัจจัยเหล่านี้ไม่สมดุลก็อาจจะก่อให้เกิดความผิดปกติของการสร้างสีผิวได้ เช่น ภาวะผิวเผือก, ดำขาว, หรือการสร้างสีที่มากเกินไป (hyperpigmentation)

เมื่อผิวหนังสัมผัสกับรังสียูวี รังสียูวีจะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง prostaglandin E₂ (PGE₂), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), adrenocorticotropin melanocyte stimulating hormone (ACTH), endothelin-1, β -fibroblast growth factor (β -FGF), NO, nerve growth factor (NGF), hepatocyte growth factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factors, leukemia inhibitory factor, *p*-locus และ stem-cell factor จากเซลล์เคราติโนไซต์ เพื่อส่งสัญญาณให้เริ่มการสร้างเมลานิน โดยอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ glycosylated copper-containing oxidase เอนไซม์ไทโรซิเนสทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสองปฏิกิริยา ปฏิกิริยาแรกคือการออกซิเดชัน monophenol (L-tyrosine) ให้เปลี่ยนเป็น *o*-diphenol (3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) ปฏิกิริยาที่สองคือ L-dopa ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น *o*-quinone (dopaquinone) จากนั้นกระบวนการสร้างเมลานินจะแยกออกเป็นสองทาง โดยทางแรก tyrosinase-related protein 1 (TRP1) และ DOPAchrome tautomerase (DCT หรือ TRP2) จะเปลี่ยนแปลง dopaquinone ให้เป็น eumelanin ในขณะที่อีกทาง dopaquinone ถูก conjugate ด้วย thiol-containing cysteine หรือ glutathione เพื่อสร้าง pheomelanin ดังแสดงในรูปที่ 3 นอกจากนี้ α -MSH และ ACTH ยังช่วยกระตุ้นการสร้างเมลานินของเซลล์เมลานินไซต์ โดยสร้างพันธะกับ melanocortin receptor-1 (MC-1R) บนเซลล์เมลานินไซต์ กระตุ้น intracellular adenylate cyclase ผ่านทาง G proteins ทำให้ cyclic AMP (cAMP) ที่เปลี่ยนแปลงจาก adenosine triphosphate มีปริมาณสูงขึ้น จึงส่งผลให้ protein kinase A (PKA) ถูก phosphorylated และกระตุ้น cAMP-response element binding protein (CREB) ที่จับกับ cAMP response element (CRE) ซึ่งแสดงใน M promoter ของ microphthalmia-associated transcription factor (MITF) gene การเพิ่มขึ้นของ

MITF อย่างชั่วคราวนี้จะทำให้เกิดการ up-regulation ของเอนไซม์ไทโรซิเนส และ TRP-1 และ TRP-2 ได้¹⁰⁾ ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 3 แผนผังแสดงกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis)



รูปที่ 4 แสดงการส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เมลานิน

2.2 สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวขาว⁽¹⁰⁾

สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารที่ขัดขวางกระบวนการสร้างเมลานิน โดยไม่ได้ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แบ่งย่อยตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

a. สารในกลุ่มโครงสร้าง Phenols

1) arbutin และอนุพันธ์

arbutin (hydroquinone-O-beta-D-glucopyranoside) ที่แยกได้จากผลสดของต้น californian buckeye (*Aesculus californica*) สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของ L-DOPA ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะการสร้างเม็ดสีที่มากเกินไปของผิวหนังที่เกิดจากการทำงานที่มากเกินไปของเซลล์เมลานोไซต์ arbutin ออกฤทธิ์โดยการให้ hydroquinone จากกระบวนการ hydrolysis ที่ glycosidic bond จากนั้น hydroquinone จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยเข้าทำปฏิกิริยากับ copper ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ ต่อมาเกิดการสังเคราะห์อนุพันธ์ α -glucosides ของ arbutin ขึ้น ทำให้สามารถ hydrolyze ได้ง่ายขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ และให้ hydroquinone โดยอาศัยเอนไซม์ α -glycosidases ในเซลล์ นอกจากนี้ยังได้มีการสังเคราะห์ deoxyarbutin โดยเอาหมู่ hydroxyl ของ arbutin ออก พบว่าได้สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีเยี่ยม เนื่องจากสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้นและมีความชอบจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้นด้วย

2) kojic acid และอนุพันธ์

kojic acid (5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเชื้อราหลายสปีชีส์อย่างเช่น *Aspergillus* และ *Penicillium* ออกฤทธิ์ได้โดย chelate กับ copper ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสและกำจัดอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามมีการพบว่า kojic acid ทำให้เกิดอาการแพ้ได้และยังแสดงประสิทธิภาพในระดับปานกลางเมื่อทำการทดลองทางคลินิก

3) gentisic acid และอนุพันธ์

gentisic acid (2,5-dihydrobenzoic acid) พบในราก gentian เป็นสารยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินที่ดี ได้มีการพิสูจน์แล้วว่าหมู่ alkyl ester สำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งในทาง *in vitro* และในการเพาะเลี้ยงเซลล์ methyl gentisate มีประสิทธิภาพดีกว่าในรูปกรดอิสระและมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับสารลดการสร้างสีผิวที่เป็นที่รู้จักคือ hydroquinone, kojic acid, arbutin และ magnesium ascorbyl phosphate นอกจากนี้ methyl gentisate ยังมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่าและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้น้อยกว่า hydroquinone อีกด้วย

4) อนุพันธ์ของ hydroxycinnamic Acid

อนุพันธ์ของ hydroxylated cinnamic หลายตัวสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินได้ สืบเนื่องจาก *p*-coumaric acid ที่ได้จากไบโสมซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ferulic acid แสดงการยับยั้งการออกซิเดชันของ L-DOPA ซึ่งอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบไม่แข่งขัน *N*-feruloyserotonin และ *N*-(*p*-coumaryl) serotonin จากเมล็ดดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.) ยับยั้งการสร้างเมลานินได้อย่างดีเช่นเดียวกัน และมีการศึกษาพบว่าการเติมหมู่ methyl และ hydroxyl ให้กับอนุพันธ์ของ cinnamic acid น่าจะมีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

b. สารในกลุ่มโครงสร้าง Polyphenols

1) flavonoids

โครงสร้าง flavonoids ประกอบด้วย phenolic ring และ pyran ring ถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones และ anthocyanidins กลุ่มเหล่านี้แตกต่างกันที่ conjugation ของ ring และตำแหน่งที่ติดกับหมู่ hydroxyl, methoxy และ glycosidic มีรายงานว่า flavonoids ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เนื่องจากสามารถในการ chelate กับ copper ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ได้ การศึกษา fluorescence quenching แสดงให้เห็นว่า หมู่แทนที่ dihydroxy ทั้งใน ring A และ B ของ flavonoids เป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารในกลุ่ม flavonols บางตัวเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน quercetin (3,3',4',5,7-pent ahydroxyflavone) เป็นอนุพันธ์ที่เติมหมู่ glycosilic พบในหัวหอมและดอกไม้ของพืชบางชนิด เช่น mexican heteroteca inuloides เป็นต้น quercetin มีประสิทธิภาพดีกว่า kaempferol และ morin ซึ่งเป็น analogues ของ quercetin นอกจากนี้ mulberroside F (moracine M-6) ที่พบในใบของต้น *Morus alba* สามารถลดการสร้างเมลานินได้อย่างดีในเซลล์เมลานोไซตส์ปกติ สารสกัดเอทานอลของใบ *Myrica rubra* พบว่าประกอบไปด้วย quercetin, myricetin และอนุพันธ์ของ 3-*O*-ramnosides ซึ่งแสดงผลการลดสีผิวได้อย่างดีในทาง *in vitro* นอกจากนี้ galangin, luteolin, chrysin และ baicalein ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย galangin แสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน kurarinone, kuraridin, kushnol F, kurariol และ sophoraflavanone G ซึ่งเป็น prenylated flavonoids จากต้น *Sophora flavescens* ต่างก็มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

flavanones หรือ chalcones ซึ่งมีลักษณะคือมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ของ pyrone ring มีการกล่าวว่าสาร isoliquiritigenin (2', 4', 4-trihydroxychalcone) ในสารสกัดชะเอมสามารถยับยั้งทั้ง monophenolase และ diphenolase activities ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ การศึกษาผลของจำนวนและตำแหน่งของหมู่ hydroxyl บน ring หลักของ chalcones แสดงให้

เห็นว่าตำแหน่งที่ 4 บน ring B มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ และมีการศึกษารายงานว่า 2,4-resorcinol subunit บน ring B มีความสำคัญมากต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2) aloesin

aloesin (2-acetyl-8-D-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-methylchromone) ก็คือ glycosylated chromone ที่แยกได้จากว่านหางจระเข้ โครงสร้างของ aloesin ใกล้เคียงกับ flavonols ทำให้สามารถลดการสร้างเมลานินโดยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการรักษาโดยใช้ aloesin และ arbutin ร่วมกันแสดงการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งแบบแข่งขันและไม่แข่งขัน

3) gallic acid และอนุพันธ์

อนุพันธ์ gallic acid ของ hydroxyflavonols หลายตัวซึ่งแยกได้จากชาเขียวและต้น *Galla rhois* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส gallic acid และ alkyl (<10) chain ester สายสั้นของ gallic acid ถูกออกซิไดซ์โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น substrate ได้ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันเป็นสารสีเหลือง แต่ alkyl (>10) chain ester สายยาวของ gallic acid ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทำให้ไม่เกิดการสร้างเม็ดสี การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าความยาวของสายคาร์บอนมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารจำพวก hydroxyflavonols ในชาเขียว ซึ่งประกอบด้วย ECG [(-)epicatechin-3-O-gallate], GCG [(-)gallo catechin-3-O-gallate], EGCG [(-) epigallocatechin-3-O-gallate] และ EGC [(-)epigallocatechin] มีเพียง EGCG และ hinokitiol (ไม่ใช่โครงสร้าง hydroxyflavonols) เท่านั้นที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่สามารถลดการสร้าง MITF ในเซลล์ได้

4) procyanidins

procyanidins เป็นพอลิเมอร์ของ catechin ที่พบในชาและผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล และองุ่น ที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน สารสกัดที่อุดมไปด้วย procyanidin สามารถลด DOPA-positive melanocyte และ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine positive melanin ที่อยู่ในเซลล์ และยังมีผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เมลานินไซต์ที่เหนี่ยวนำโดย ROS

5) อนุพันธ์ของ hydroxystilbene

อนุพันธ์ของ hydroxystilbene อย่าง resveratrol และ oxyresveratrol เป็นสารทำให้ผิวขาวที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะเกิดจากมีความชอบจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง oxyresveratrol แสดงฤทธิ์ที่แรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า resveratrol และได้มีการพิสูจน์แล้วว่ากระบวนการสร้างเมลานินถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัดจาก *Ramulus mori* ที่ประกอบด้วย 2-oxyresveratrol

6) ellagic acid

ellagic acid (EA) เป็นสารจำพวก polyphenol ที่พบในผลไม้ตระกูลเบอร์รี่, ชาเขียว และทับทิม ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลที่ทำให้ผิวขาวขึ้นเกิดจากการ chelating กับ copper ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อลดการทำงานของ เอนไซม์การเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานोไซต์และการสังเคราะห์เมลานินได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของ ellagic acid ยังมีส่วนช่วยให้ผิวขาวขึ้นอีกด้วย

c. สารกลุ่มอื่น

สารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น isoimperatorin และ imperatorin ที่ได้จากต้น *Angelica dahurica* แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อย่างดี

สารที่ขัดขวางกระบวนการผลิตเมลานินโดยไม่ได้ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

a. α -MSH blockers

1) sophoraflavanone G

sophoraflavanone G ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินที่ถูกกระตุ้นด้วย α -MSH โดยไม่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2) piperlonguminine

piperlonguminine ซึ่งแยกได้จาก *Piper longum* ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินโดยยับยั้งการส่งสัญญาณที่เหนี่ยวนำโดย α -MSH ผ่าน cAMP ไปยัง CREB ซึ่งทำหน้าที่ควบคุม MITF และการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส

b. melanosome transferase inhibitor

1) สารสกัดถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองประกอบด้วย serine proteases ขนาดเล็ก อย่างเช่น Bowman Birk inhibitor (BBI) และ soybean trypsin inhibitor (STI) ซึ่งยับยั้ง protease-activated receptor-2 (PAR-2) pathway ที่แสดงบนเซลล์เคราติโนไซต์ การรบกวน PAR-2 pathway เหนี่ยวนำให้ลดการสร้างสีผิวโดยการลด phagocytosis เมลาโนโซมโดยเซลล์เคราติโนไซต์ ทำให้ไม่มีการขนส่งเมลานิน

2) Centaureidin

Centaureidin (5, 7, 3'- trihydroxy-3, 6, 4'- trimethoxyflavone) เป็น flavonoid glucoside ที่ได้จากต้น yarrow แสดงการลดการขนส่งเมลานิน และการเจริญของ dendrites ของเซลล์เมลานินไซต์ โดยไปกระตุ้น Rho ทั้งในทางตรงและทางอ้อม ส่งผลให้ dendrite หดเข้ามาจึงขัดขวางการส่งเมลานินของเซลล์เมลานินไซต์ไปยังเซลล์เคราติโนไซต์ แต่ไม่ได้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินหรือการแสดงออกของโปรตีน

3) niacinamide

niacinamide (nicotinamide; 3-pyridinecarboxamide) คือวิตามิน B₃ ในรูป amide ทำให้เกิดการ down regulation ของการกระบวนการสังเคราะห์เมลานินและยับยั้งการขนส่งเมลานินจากเซลล์เมลานโนไซต์ไปเซลล์เคราติโนไซต์ นอกจากนี้ niacinamide ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอีกด้วย

c. cytokines inhibitors

สารสกัดจาก *Lepidium apetalum* สามารถลดการสร้างสิวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีในหนูตะเภาน้ำตาล และในการเพาะเลี้ยง melanoma cells ของคน ถึงแม้ว่ายังไม่ได้มีการค้นพบสารที่ออกฤทธิ์ แต่ก็มีความเป็นไปได้ว่าผลนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากการ down regulation ของ MITF ที่อาศัย IL-6 เป็นสื่อกลาง

2.3 ทับทิม

ทับทิมเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Lythraceae (เดิมอยู่ในวงศ์ Punicaceae) สกุล Punica ซึ่งมีลักษณะเป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามหรือเกือบตรงข้าม หรือออกเป็นกระจุกรอบข้อ ไม่มีหูใบ ดอกออกเดี่ยวหรือเป็นกระจุกหลายดอก ดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้จำนวนมาก ติดกับหลอดกลีบเลี้ยง ก้านเกสรแยกอิสระต่อกัน รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มีอวุลจำนวนมาก ติดตามแนวตะเข็บและรอบแกน ผลคล้ายผลมีเนื้อหลายเมล็ด ผนังหนาค่อนข้างหนา เมล็ดจำนวนมาก ในสกุลของทับทิมมีเพียง 2 ชนิด คือ *Punica granatum* L. ซึ่งนิยมปลูกทั่วไปในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและทวีปเอเชีย เพื่อรับประทานผล และ *Punica protopunica* Balf. f. เป็นพืชถิ่นเดียวของเกาะ socorta ของโซมาลีในมหาสมุทรอินเดีย

จากการนำส่วนต่างๆ เช่น เปลือกผล (peel), ผนังผลชั้นกลาง (mesocarp) และปุยหุ้มเมล็ด (arils) ของทับทิมมาทำการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม phenolic พบว่าประกอบด้วยสารหลากหลายชนิด เช่น anthocyanin, gallotannin, ellagitannin, gallagyl ester, hydroxybenzoic acid, hydroxycinnamic acid และ dihydroflavonol⁽¹¹⁻¹³⁾ โดยพบว่า ellagitannin นั้นเป็นกลุ่มที่พบได้ในปริมาณที่มากที่สุด ซึ่งสารในกลุ่ม phenolic นั้นอาจมีประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ในการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดทับทิมที่สกัดจากเฉพาะปุยหุ้มเมล็ด (arils) พบว่ามีความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ที่สูงกว่าไวน์แดงและสารสกัดจากชาเขียวถึง 3 เท่า⁽¹⁴⁾ และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ระหว่างสารสกัดจากต่างส่วนของทับทิม พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมนั้นมีฤทธิ์ในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์สูงกว่าสารสกัดจากเนื้อทับทิม ซึ่งเกิดจากส่วนของเปลือกทับทิมนั้นมีสารในกลุ่ม phenolic, flavonoid และ proanthocyanidin สูงกว่า⁽²⁾

ปัจจุบันได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของทับทิมเพิ่มเติม เช่น สารสกัดจากเปลือกทับทิมพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารหลายชนิด ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, *Escherichia coli* และ *Yersinia enterocolitica* ทั้งในการทดลองโดยการเพาะเชื้อและการทดลองในอาหาร ซึ่งเชื่อว่าสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์คือสารในกลุ่ม phenolic และ flavonoid^(15, 16) อีกทั้งยังมีการนำเอาสารสกัดจากใบของทับทิมมาทดสอบหาความสามารถในการลดความอ้วนในหนูที่มีภาวะอ้วนและไขมันสูงจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง โดยการให้หนูกินสารสกัดจากใบทับทิม พบว่าสารสกัดจากใบทับทิมนั้นช่วยหยุดยั้งการพัฒนาของภาวะอ้วนและไขมันสูง ซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน และมีผลช่วยกุดความอยากอาหาร ซึ่งมีผลเฉพาะในหนูที่มีภาวะอ้วนจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงเท่านั้น⁽¹⁷⁾

และยังมีการศึกษาผลของสารสกัดทับทิมที่ประกอบด้วยปริมาณ ellagic acid ที่สูงต่อการเกิดเม็ดสีที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีในผิวหนังของมนุษย์ พบว่าเมื่อให้อาสาสมัครได้รับรังสียูวีปริมาณ 1.5 เท่าของปริมาณต่ำสุดที่ทำให้เกิดอาการแดงของผิว (MED; minimum erythema dose) แล้วให้รับประทาน ellagic acid ทั้งในขนาดต่ำและขนาดที่สูง (100 และ 200 mg/d ตามลำดับ) พบว่ามีผลยับยั้งการเกิดเม็ดสีในผิวหนังของมนุษย์ที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับรังสียูวี⁽¹⁸⁾ เมื่อทำการศึกษาโดยใช้ผิวของ guinea pig ซึ่งได้รับรังสียูวีในบริเวณเดียวกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการทา ellagic acid ลงบนบริเวณนั้นติดต่อกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ การสร้างเม็ดสีของผิวหนังนั้นลดลงอย่างเห็นได้ชัดและแสดงให้เห็นว่าบริเวณที่ทำการทา ellagic acid นั้นไม่เกิดการระคายเคือง อีกทั้งเมื่อทา ellagic acid จนครบเวลาแล้วฉายรังสียูวีอีกครั้ง พบว่าเกิดการเกิดเม็ดสีขึ้นใหม่ ซึ่งแตกต่างจาก 1% hydroquinone ที่ไม่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่า ellagic acid นั้นมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีผ่านทางเซลล์เมลานोไซต์ โดยที่ไม่เกิดการทำลายเซลล์⁽⁴⁾

2.4 solid lipid nanoparticles (SLNs)

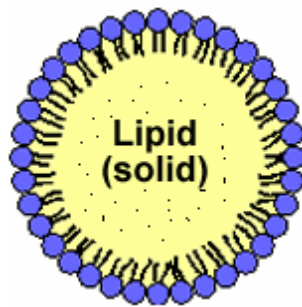
2.4.1 คำจำกัดความของ SLNs

SLNs เป็นระบบนำส่งสารในขนาดคอลลอยด์ มีลักษณะทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 1,000 นาโนเมตร (โดยมากอยู่ในช่วง 50 – 500 นาโนเมตร) ทั่วไปโครงสร้างของ SLNs เป็นลักษณะเมทริกซ์ไขมันแข็งที่ถูกเคลือบด้วยชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่เรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งช่วยทำให้แกนไขมันมีความคงตัว ดังรูปที่ 5 โมเลกุลสารหรือยาจะกระจายหรือละลายในเมทริกซ์ไขมัน ดังนั้น SLNs จึงสามารถห่อหุ้มตัวยาที่มีความชอบไขมันหรือชอบน้ำได้^(19, 20)

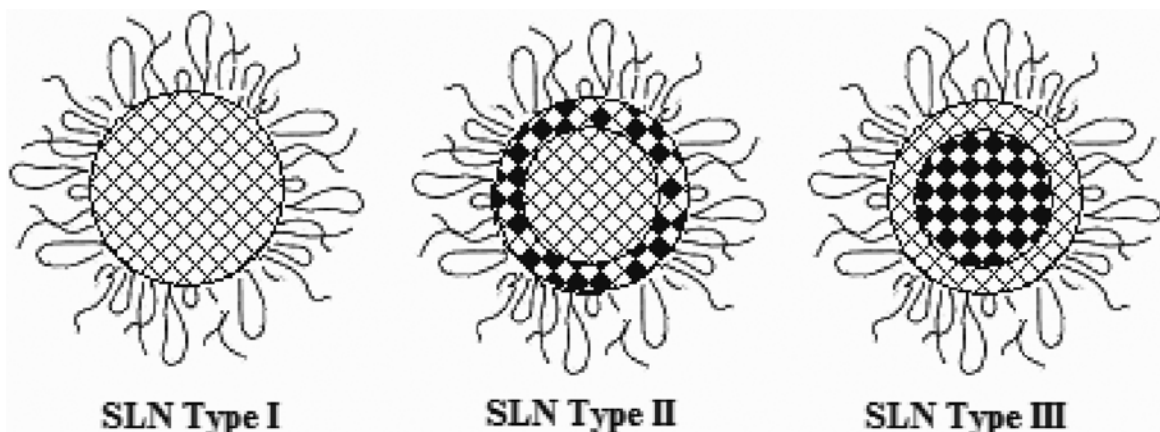
ลักษณะโครงสร้างของ SLNs ในการบรรจุด้วยยาสามารถจำแนกตามลักษณะของตัวยาที่ถูกกระจายในเมทริกซ์ไขมันแข็งได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ SLNs type I, type II และ type III ซึ่งเป็นผลจากส่วนประกอบในสูตรตำรับและวิธีการผลิต SLNs ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 6 SLNs type I เป็นรูปแบบ

เมทริกซ์ไขมันแข็งที่เข้ากันเป็นเนื้อเดียว (homogeneous matrix model) โดยมีตัวยาถูกกระจายในระดับโมเลกุลหรือรูปแบบของกลุ่มผลึกอสัณฐานในไขมันได้เป็นของผสมที่เป็นเนื้อเดียวกัน SLNs type II เป็นรูปแบบ SLNs ที่มีตัวยาเข้มข้นที่เปลือกของเมทริกซ์ไขมันแข็ง (drug-enriched shell model) และ SLNs type III เป็นรูปแบบ SLNs ที่มีตัวยาเข้มข้นที่แกนกลางของเมทริกซ์ไขมันแข็ง (drug-enriched core model)⁽²¹⁾

ส่วนประกอบของ SLNs ทั่วไปประกอบด้วย ไขมันแข็ง (solid lipid), สารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือสารทำอิมัลชัน (emulsifier) และน้ำ ไขมันที่ใช้ใน SLNs เป็นไขมันชนิดที่มีจุดหลอมเหลวไม่สูงมากแต่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายเพื่อคงให้อยู่ในรูปอนุภาคไขมันแข็งขณะบริหารการใช้ยา สำหรับระบบนำส่งทางผิวหนังและปาก สารปรุงแต่งยา (excipient) ที่อยู่ใน SLNs ทั้งไขมันและสารลดแรงตึงผิวต้องเป็นสารชนิดที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้จากหน่วยงานที่มีอำนาจควบคุม เช่น องค์การอาหารและยา โดยทั่วไปสารที่ใช้เป็นสารชนิดเดียวกับสารที่ใช้ในตำรับยาแบบต่างๆ ไป เช่น ครีม ยาเม็ด ยาเม็ดกลมเล็ก (pellet) หรือแคปซูล ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นสารประกอบต่างๆ ไปที่ใช้เตรียม SLNs⁽²²⁾



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ SLNs



รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างของ SLNs ในทางทฤษฎี (สี่เหลี่ยมจัตุรัสสีดำแทน โมเลกุลของยา)

ตารางที่ 1 แสดงไขมันและสารทำอิมัลชันที่มีการใช้เตรียม SLNs

Lipids	Emulsifiers/Coemulsifiers
Triglycerides	Soybean lecithin (Lipoid [®] S 75, Lipoid [®] S 100)
Tricaprin	Egg lecithin (Lipoid [®] E 80)
Trilaurin	Phosphatidylcholine(Epikuron [®] 170, Epikuron 200)
Trimyristin	
Tripalmitin	Poloxamer 188
Tristearin	Poloxamer 182
Hydrogenated coco-glycerides (Softisan [®] 142)	Poloxamer 407
Hard fat types	Poloxamine 908
Witepsol [®] W 35	Tyloxapol
Witepsol [®] H 35	Polysorbate 20
Witepsol [®] H 42	Polysorbate 60
Witepsol [®] E 85	Polysorbate 80
Glyceryl monostearate (Imwitor [®] 900)	
Glyceryl behenate (Compritol [®] 888 ATO)	Sodium cholate
Glyceryl palmitostearate (Precirol [®] ATO 5)	Sodium glycocholate
Cetyl palmitate	
Stearic acid	Taurocholic acid sodium salt
Palmitic acid	Taurodeoxycholic acid sodium salt
Decanoic acid	Butanol
Behenic acid	Butyric acid
Acidan N12	Dioctyl sodium sulfosuccinate
	Monooctylphosphoric acid sodium

โดยทั่วไปตัวยาที่บรรจุในเมทริกซ์จะคงอยู่ได้ด้วยการแทรกตัวอยู่ระหว่างสายของกรดไขมัน ระหว่างชั้นไขมัน หรืออยู่ในส่วนของผลึกไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการเรียงตัวอย่างมีระเบียบเพิ่มขึ้นของผลึกแลตทิซ (crystal lattice) จะไม่สามารถรองรับการอาศัยอยู่ของตัวยาปริมาณมากได้ เป็นผลให้ตัวยาถูกขับออกจากเมทริกซ์ไขมัน ดังนั้นการเลือกไขมันที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น mono-triglyceride, di-triglyceride หรือ triglyceride ที่มีความยาวสายโซ่แตกต่างกัน จะช่วยให้สามารถบรรจุยาในเมทริกซ์ไขมันได้ในปริมาณมากขึ้น⁽²³⁾

2.4.2 วิธีเตรียม SLNs⁽²³⁾

การเตรียม SLNs ในวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอนคือ

1. การเตรียมนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ
2. การทำให้นาโนอิมัลชันแข็งตัว (solidification)

ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีที่ใช้ผลิตมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ดังได้แสดงใน

ตารางที่ 2 แสดงข้อดีและข้อเสียของเทคนิคการเตรียม SLNs

วิธีการผลิต	ข้อดี	ข้อเสีย
1. การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ความดันสูง (high pressure homogenization, HPH)	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก - สามารถผลิตซ้ำได้ (reproducibility) - เหมาะสมที่จะใช้ผลิตด้วยที่เชื่อมสลายง่ายโดยการผลิตที่อุณหภูมิต่ำ - หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 	<ul style="list-style-type: none"> - มีประสิทธิภาพต่ำต่อการกักเก็บตัวยาที่ชอบน้ำ - เกิดอุณหภูมิสูงขึ้นในระหว่างการผลิต หรือปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว
2. การปั่นด้วยความเร็วสูงหรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (high speed stirring or ultrasound)	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทั่วไป - เป็นวิธีผลิตที่ทำได้ง่าย 	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เวลานานในการให้คลื่นเสียงความถี่สูง และอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะจากโพรบ (probe) - ไขมันต่างชนิดกันต้องการกระบวนการการผลิตที่แตกต่างกัน - ทำให้ได้ไมโครพาร์ทิเคิลปะปนมาด้วย
3. เทคนิคไมโครอิมัลชัน (microemulsion based SLNs preparation)	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตได้ปริมาณมาก - ห่อหุ้มได้ทั้งตัวยาที่ชอบน้ำและยาชอบไขมัน - ใช้เครื่องมือธรรมดาทั่วไปในการผลิตและไม่ต้องใช้พลังงานสูงในการผลิต 	<ul style="list-style-type: none"> - ต้องใช้สารทำอิมัลชันในปริมาณสูง - อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากต้องเจือจางในระหว่างผลิต

4. การทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหย (SLNs prepared by solvent emulsification/evaporation)	<ul style="list-style-type: none"> - ได้อนุภาคขนาดเล็ก - หลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูง 	<ul style="list-style-type: none"> - การตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ - มีข้อจำกัดเรื่องขนาดการผลิต
--	--	---

● **High Pressure Homogenization (HPH)**

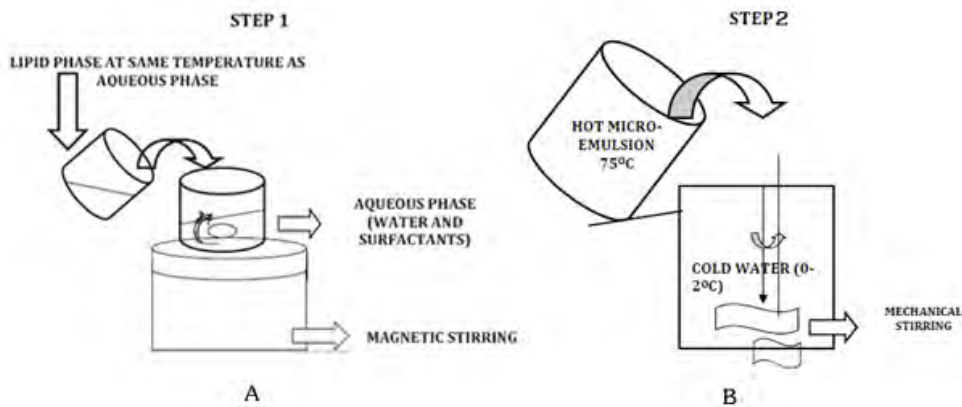
สามารถเตรียมได้โดยใช้การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันความดันสูงที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูง (Cold and Hot Homogenization) ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวยาที่ต้องการกักเก็บ วิธี HPH ที่ใช้อุณหภูมิต่ำเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวยาที่สลายตัวได้ง่ายรวมถึงยาที่ชอบน้ำ HPH เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับเตรียม SLNs โดยหลักการของวิธีนี้คือ ทำการลดขนาดอนุภาคด้วยการอัดด้วยความดันสูง (100-2,000 บาร์) เพื่อผลึกของเหลวผ่านช่องว่างแคบขนาดเล็ก และทำภายใต้การไหลปั่นป่วน (turbulence) อย่างรุนแรง และแรงเฉือนจะทำให้อนุภาคในของเหลวแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน โดยแต่ละวิธีก็มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงข้อดีและข้อเสียของเทคนิคการเตรียม SLNs โดยใช้วิธี Cold and Hot Homogenization

วิธีการผลิต	ข้อดี	ข้อเสีย
1. Hot Homogenization technique	<ul style="list-style-type: none"> - ได้อนุภาคขนาดเล็กและมีค่าการกระจายขนาดที่แคบ - สามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูงและผลิตรซ้ำได้ (reproducibility) - ง่ายต่อการขยายขนาดการผลิต - สามารถผลิตอนุภาคที่มีการปลดปล่อยจับปล้นและตามด้วยการปลดปล่อยแบบทยอย 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ควรใช้กับตัวยาที่ไม่ทนต่อความร้อน - กักเก็บตัวยาที่ชอบน้ำได้ต่ำ
2. Cold Homogenization technique	<ul style="list-style-type: none"> - เหมาะสมกับตัวยาที่ไม่ทนต่อความร้อน - สามารถห่อหุ้มตัวยาที่ชอบน้ำได้ - หลีกเลี่ยงความซับซ้อนในขั้นตอนการเกิดผลึกนาโนอิมัลชันที่นำไปสู่การเกิดสารหลากหลายรูปแบบ - สามารถทำให้เกิดการปลดปล่อยตัวยาที่ห่อหุ้มแบบยาวนาน 	<ul style="list-style-type: none"> - มีขั้นตอนการผลิตหลายขั้นตอน - ทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่ และมีการกระจายขนาดที่กว้าง - อาจทำให้ได้ไมโครพาร์ทิเคิลติมาด้วย

- **Microemulsion based SLNS preparations**

วิธีนี้พัฒนาโดยกลุ่มวิจัยของ Gasco และใช้วิธีการพัฒนาเพิ่มเติมจากกลุ่มวิจัยอื่นๆร่วมด้วย เริ่มต้นโดยการเตรียมไมโครอิมัลชันที่ร้อนด้วยการคนผสมไขมันหลอมร่วมกับสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมัน ประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส ไมโครอิมัลชันที่ได้จะมีลักษณะโปร่งใส ดังรูปที่ 7(A) จากนั้นนำไมโครอิมัลชันที่ร้อนไปกระจายตัวในน้ำเย็น (อุณหภูมิประมาณ 2-3 องศาเซลเซียส) โดยให้แรงคนตลอดเวลา ดังรูปที่ 7(B) ทำให้เกิดการแข็งตัวของหยดไขมันที่มีขนาดนาโนอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปอัตราส่วนระหว่างไมโครอิมัลชันที่ร้อนต่อน้ำเย็นประมาณ 1:25 ถึง 1:50 จากนั้นกำจัดปริมาณน้ำจำนวนมากโดยใช้วิธีการกรองละเอียดยิ่งยวด (Ultrafiltration) หรือโดยการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของอนุภาคเพิ่มขึ้น อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ผลิตโดยวิธีนี้จะมีความเสถียรผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 50-800 นาโนเมตร (ส่วนมากอยู่ในช่วง 100-400 นาโนเมตร) และมี polydispersity index 0.06-0.90 (ส่วนมากอยู่ในช่วง 0.10-0.70)



รูปที่ 7 แสดงกระบวนการผลิต SLNs โดยเทคนิคไมโครอิมัลชัน A: การเตรียมไมโครอิมัลชัน B: การเตรียม SLNs โดยใช้ไมโครอิมัลชันที่เตรียมจาก A

- **High shear homogenization and ultrasound**

วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้เตรียมสารกระจายขนาดนาโนชนิดไขมันแข็ง (solid lipid nanodispersion) เป็นวิธีที่เตรียมได้ง่าย แต่อาจได้อนุภาคขนาดไมครอนปนร่วมอยู่ในสารกระจายนี้ด้วยการผลิต SLNs จากไมโครพาร์ทิเคิลโดยวิธีนี้ทำได้โดยวิธีทำให้แข็งตัวโดยการพ่น (spray congealing) และตามด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูงหรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ข้อดีที่สำคัญของวิธีนี้คือเครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และเป็นวิธีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยาก แต่ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ ได้อนุภาค

ที่มีการกระจายของขนาดที่กว้างมากไปจนถึงช่วงไมโครเมตร ทำให้เกิดความไม่คงตัวทางกายภาพ เช่น อนุภาคมีขนาดใหญ่มากขึ้นในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งอาจป้องกันด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นสูง แต่อาจทำให้เกิดปัญหาเรื่องความเป็นพิษตามมา หากนำไปใช้กับการบริหารยาโดยการฉีด ข้อเสียอื่นๆ ได้แก่ การเกิดการปนเปื้อนของโลหะจากการใช้หัวโพรบของเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง

การเพิ่มความคงตัวของระบบ อาจใช้วิธีการปั่นความเร็วสูงรวมไปกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีความคงตัวทางกายภาพดีและมีการกระจายขนาดแคบ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังต้องใช้ความเข้มข้นของไขมันค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 1) และใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวค่อนข้างสูงมาก

- **SLNS prepared by solvent emulsification/evaporation**

วิธีการนี้ใช้หลักการตกตะกอนในสารละลายที่เหมาะสม โดยการละลายไขมันในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่เข้ากับน้ำ เช่น toluene chloroform จากนั้นเติมสารละลายไขมันแข็งนี้ลงในสารละลายน้ำจนเกิดเป็นอิมัลชัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะการลดความดัน ในระหว่างที่ทำการระเหยตัวทำละลาย ไขมันจะตกตะกอนออกมาจนได้เป็น SLNs ข้อดีที่สำคัญของวิธีนี้ คือ การไม่ใช้ความร้อนระหว่างการผลิต จึงมีความเหมาะสมที่ใช้กับเก็บตัวยาที่สลายตัวง่าย ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น คือ การตกค้างของตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ นอกจากนี้ระบบการกระจายตัวที่ได้ค่อนข้างเจือจางเนื่องจากขีดการละลายของไขมันในตัวทำละลายอินทรีย์มีค่าต่ำ โดยทั่วไปความเข้มข้นของไขมันในสารละลาย SLNs ที่ได้มีค่าประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นอาจต้องทำให้ความเข้มข้นของอนุภาคไขมันเพิ่มขึ้นเพื่อให้มีความเข้มข้นมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ โดยวิธีการต่างๆ เช่น การกรองละเอียดอย่างยี่งวดหรือการระเหย

สำหรับวิธีการทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหยนี้ อาจใช้ตัวทำละลายที่เข้ากับน้ำได้บ้าง เช่น benzyl alcohol และ ethyl formate โดยเริ่มด้วยการทำให้ตัวทำละลายเหล่านี้อิ่มตัวในน้ำเพื่อให้เกิดสภาวะสมดุลทางเทอร์โมไดนามิกระหว่างของเหลวทั้งสอง จากนั้นละลายไขมันลงในตัวละลายที่อิ่มตัวด้วยน้ำ แล้วนำสารละลายไขมันนี้ไปทำอิมัลชันกับสารละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิสูง จะเกิดการตกตะกอนของ SLNs เมื่อมีการเติมลงในน้ำปริมาณมากพอ (โดยทั่วไปใช้อัตราส่วนสารละลายไขมันต่อสารละลายน้ำ 1:5 ถึง 1:10) เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์แพร่ออกจากหยดอิมัลชันไปสู่วัฏภาคภายนอก สารกระจายที่ได้จากวิธีนี้ค่อนข้างเจือจาง ซึ่งจำเป็นต้องทำให้เข้มข้นด้วยการกรองละเอียดอย่างยี่งวด หรือการทำแห้งเยือกแข็ง คล้ายๆกับการผลิตด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน ขนาดอนุภาคไขมันแห้งเฉลี่ยที่ได้จากการเตรียมวิธีนี้มีค่าประมาณ 100 นาโนเมตร โดยมีการกระจายขนาดอนุภาคค่อนข้างแคบ

2.4.3 การแสดงคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs

วิธีที่ใช้วัดค่าพารามิเตอร์เพื่อใช้แสดงคุณลักษณะเฉพาะของ SLNs แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงวิธีที่ใช้วัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆของ SLNs

ลำดับ	ค่าพารามิเตอร์	วิธีที่ใช้วัดค่าพารามิเตอร์
1	ขนาดอนุภาคและการกระจายของอนุภาค	Photon correlation spectroscopy, Scanning electron microscopy (SEM), Transmission electron microscopy (TEM), Atomic force microscopy (AFM), Mercury porosimeter, Laser defractometer
2	ประจุของอนุภาค	Laser droplet anemometry, Zeta potentiometer
3	ความไม่ชอบน้ำ	Water contact angle measurements, rose bangle (dye) binding, hydrophobic interaction chromatography, X-ray photoelectron spectroscopy
4	การวิเคราะห์ทางเคมีของพื้นผิวอนุภาค	Static secondary ion mass spectrometry
5	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างยาที่กักเก็บ	Differential scanning calorimetry
6	การปลดปล่อยตัวยา	In-vitro release characteristic under physiologic & sink condition
7	ความคงตัวของตัวยา	Bioassay of drug extracted from nanoparticles, chemical analysis of drug

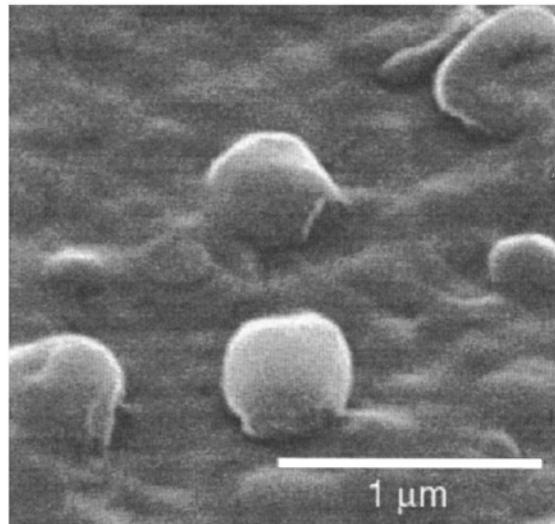
- การวัดขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีตา

การวัดขนาดอนุภาคเป็นหนึ่งใน การตรวจสอบลักษณะเฉพาะขั้นพื้นฐาน วิธีวัดขนาดที่นิยมใช้ได้แก่ Photon correlation spectroscopy (PCS) และการเลี้ยวเบนของแสงเลเซอร์ (laser diffraction, LD) ซึ่งช่วยในการทำนายความคงตัวของระบบคอลลอยด์ สามารถทำได้โดยเจือจางสารทดสอบด้วยน้ำกลั่นและนำไปใส่ในสนามไฟฟ้าอ่อนๆ แล้ววัดการเคลื่อนที่ด้วยวิธี Laser Doppler Anemometry โดยทั่วไปค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่มากกว่า |30 มิลลิโวลต์| แสดงว่าระบบมีความคงตัวทางกายภาพดี และค่าที่สูงถึง |60 มิลลิโวลต์| แสดงถึงความคงตัวทางกายภาพดีมากตลอดอายุการใช้ (shelf life)

- ลักษณะวิทยาของอนุภาค

การประเมินรูปร่างอนุภาคของ SLNs ทำได้ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบ

แรงอะตอม (atomic force microscope, AFM) ภาพถ่ายที่ได้จากวิธีดังกล่าวนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลโดยตรงในการตรวจสอบรูปร่างและวัดขนาดอนุภาคของ SLNs ตัวอย่างรูปร่างอนุภาคของ SLNs ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงภาพสามมิติของ SLNs ขนาด 400 nm ที่ได้จาก SEM (SLNs ประกอบด้วย Compritol, Poloxamer188)⁽⁷⁾

- **สภาพเป็นผลึกและภาวะพหุสัณฐาน (polymorph)**

สภาวะความเป็นของแข็งของตัวพาคเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ได้สมบัติการปลดปล่อยแบบควบคุมตามความต้องการ หลังจากเตรียมเสร็จ SLNs ที่เตรียมจากไขมันแข็งหรือส่วนผสมของไขมันแข็งสามารถเกิดผลึกอยู่ในรูปพหุสัณฐานที่มีพลังงานสูงแล้วเกิดเป็น โครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ (imperfect structure) แต่ภายหลังอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความไม่คงตัวของเทอร์โมไดนามิก และมีแนวโน้มที่นำไปสู่พหุสัณฐานที่มีพลังงานต่ำกว่าในระหว่างการเก็บรักษา ทำให้ได้โครงสร้างที่มีการเรียงตัวเป็นระเบียบมากขึ้นหรือเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ (perfect structure) และนำไปสู่การขับไล่ออกมาเนื่องจากโครงสร้างนี้มีช่องว่างที่รองรับยาน้อยลง ดังนั้น การตรวจสอบโครงสร้างไขมันด้วยวิธีการวัดแยกปริมาณความร้อนแบบส่องกราด (differential scanning calorimetry, DSC) และการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (x-ray diffraction) เป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไขมันหลังผลิตและในระหว่างการเก็บรักษา

- **การปลดปล่อยและการซึมผ่านตัวยาจากนาโนพาร์ทิเคิลนอกกาย (in vitro)**

วิธีการทดลองที่ใช้ในการศึกษาการปลดปล่อยยาจาก SLNs ทำได้หลายวิธี เช่น การทดสอบโดยใช้หลอดทดลอง (test tube assay) แบบไม่ใช้เมมเบรน (membrane-free model) การใช้เซลล์แพร่ผ่านชนิดฟรานซ์ (franz diffusion cell) โดยใช้เมมเบรนเซลลูโลส การใช้เมมเบรนแยกสาร (dialysis

membrane) การใช้ผิวหนังสัตว์ เช่น ผิวหนังหมูและผิวหนังหมูหรือผิวหนังคน และการจุ่มถุงไดอะไลซิสที่บรรจุสารแขวนลอยของ SLNs ในตัวกลางปริมาณมาก (Dialysis bag diffusion) ซึ่งการปลดปล่อยยาหรือสารสำคัญที่บรรจุใน SLNs มีอิทธิพลจากปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ธรรมชาติทางเคมีของสารสำคัญและไขมัน ค่าการละลายของสารสำคัญในไขมันหลอม ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว วิธีการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียม ชนิดของตัวกลางที่ปลดปล่อย เช่น ตัวกลางที่เป็นน้ำแตกต่างจากตัวกลางที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ และความเป็นกรดต่างในตัวกลางที่รับ

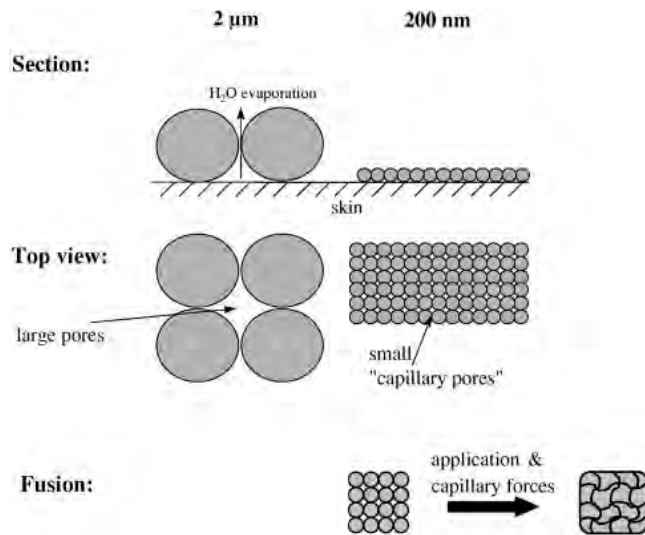
2.4.4 ข้อดีของ SLNs ต่อการนำไปใช้นำส่งทางผิวหนัง⁽²³⁾

1. การเพิ่มความคงตัวของตัวยาที่กักเก็บ

SLNs สามารถลดการแบ่งส่วนของตัวยาที่ชอบไขมันออกจากวัฏภาคน้ำมันเข้าไปอยู่ในน้ำได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ตัวยาจึงสามารถเสื่อมสลายด้วยน้ำได้ง่าย ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและลิโปโซม เนื่องจากหยคน้ำมันของระบบอิมัลชันอยู่ในลักษณะของเหลว แต่ตัวพยานี้ของ SLNs อยู่ในสภาวะของแข็ง จึงทำให้กระบวนการแบ่งส่วนระหว่างอนุภาคของแข็งกับน้ำวัฏภาคภายนอกเกิดได้ช้าลง

2. การเกิดฟิล์มและผลของการปกคลุมผิว

SLNs มีความสามารถในการยึดติด (adhesiveness) ผิวหนังที่ดี เพราะมีขนาดอนุภาคที่เล็กนำไปสู่การสร้างฟิล์มบางบนผิวที่มีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่เล็กมาก ทำให้เกิดผลการปกคลุมผิว (occlusive effect) รูปที่ 9 แสดงการปกคลุมผิวของอนุภาคขนาดนาโนเปรียบเทียบกับอนุภาคขนาดใหญ่ระดับไมครอน การปกคลุมของอนุภาคขนาดใหญ่ระดับไมครอนค่อนข้างน้อยเนื่องจากมีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่ใหญ่ทำให้เกิดการระเหยของน้ำได้ง่าย อนุภาคขนาดนาโนมีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่แคบขนาดแคปิลลารี (Capillary) ทำให้ลดการระเหยของน้ำ จึงทำให้เกิดผลการปกคลุมผิวที่ดีและนำไปสู่การเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง (hydration effect)



รูปที่ 9 แสดงความแตกต่างของคุณสมบัติปกคลุมผิว (occlusive effect) ของอนุภาคนาโนและอนุภาคขนาดไมครอน

3. การป้องกันแสงยูวีของ SLNs

ปัจจุบันมีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบไปด้วยสารกันแดดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าสารกันแดด เช่น benzophenone, titanium dioxide สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองผิวและแพ้สารกันแดดได้ เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถแทรกซึมเข้าสู่ผิวหนัง ดังนั้นการที่เลือกใช้สารกันแดดที่ออกฤทธิ์นาน ควรป้องกันการซึมผ่านของสารลงสู่ผิวหนัง ทำได้โดยการใส่สารลงใน SLNs ซึ่งมีโครงสร้างเป็นผลึกไขมันทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันแสงด้วยตัวเองและยังสามารถเสริมผลการป้องกันแสงได้อีกด้วย นอกจากนี้การสร้างฟิล์มของ SLNs หลังการทาเนื่องจากน้ำระเหยออกไป ทำให้เกิดการหลอมตัวกันของอนุภาคและเกิดเป็นฟิล์มขึ้นมา และ oxybenzone ยังคงยึดอยู่ในฟิล์มที่เกิดขึ้นนี้ทำให้การแทรกซึมผิวลดลง ดังนั้นจึงสามารถลดความเข้มข้นของการใช้สารป้องกันยูวี โดยที่ยังคงได้ค่า SPF ที่เท่าเดิม

4. การแทรกซึมผิวหนังและการนำส่งสู่เป้าหมายของ SLNs

การใช้ SLNs เพื่อเป็นตัวพาสำหรับตัวยาหรือสารทางเครื่องสำอางที่ใช้ทางผิวหนัง มีรายงานการให้ผลการซึมผ่านผิวหนังที่แตกต่างกันและขัดแย้งกัน บางการศึกษา รายงานผลการเพิ่มการแทรกซึมผิว เมื่อต้องการใช้ SLNs เพื่อเพิ่มการนำส่งยาสู่ผิวหนัง บางการศึกษา รายงานผลในการลดหรือชะลอการซึมผ่านผิวหนังของ SLNs เมื่อต้องการให้เกิดผลที่ตรงข้ามกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการซึมผ่านผิวหนังที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากการปลดปล่อยตัวยาที่แตกต่างกันจาก SLNs ที่ผลิตขึ้นด้วยสูตรหรือปัจจัยการผลิตที่แตกต่างกัน แต่กล่าวโดยสรุปได้ว่าการทา SLNs บนผิวหนังสามารถเพิ่มการแทรกซึมของตัวยาที่บรรจุอยู่รวมทั้งส่งเสริมการส่งยาสู่ชั้นหนังกำพร้า และลดผลข้างเคียงทั่วร่างกาย ดังนั้น SLNs จึงเป็นระบบที่มีศักยภาพสูง

ต่อการนำไปใช้และยังช่วยลดความเสี่ยงของการใช้ยา นอกจากนี้การใช้ SLNs เพื่อเป็นระบบนำส่งยา
เฉพาะที่เข้าทางรูจมูกก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

3.1 รายชื่อสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. methanol for analysis
บริษัท Merck-KGaA, Lot; I621109 203 ประเทศเยอรมัน
2. methanol HPLC
บริษัท RCI Labscan จำกัด Lot; 12 08 0316 ประเทศไทย
3. acetic acid
บริษัท Merck-KGaA, Lot; K33266463 422 ประเทศเยอรมัน
4. ethyl acetate
บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd, Lot; 1104141 ประเทศออสเตรเลีย
5. phosphoric acid, 85%
บริษัท Mallinckrodt Baker, Inc. Lot; 805A16 ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. propyl paraben
7. ellagic acid, from Chestnut bark: approx. 95%
บริษัท Sigma-aldrich, Co., Lot; 038K1415 ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. mushroom tyrosinase
บริษัท SIGMA-ALDRICH, lot#SLBB9478V
9. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
บริษัท SIGMA-ALDRICH, EC 200-445-2
10. phosphate buffer pH 6.8 : sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
11. dimethyl sulfoxide (DMSO)
12. glyceryl monostearate (GMS)
13. stearic acid
14. glyceryl behenate
15. cetyl palmitate
16. ethanol
17. n-butyl alcohol

บริษัท Carlo Erba Reagenti, Lot; 05910100 ประเทศฝรั่งเศส

18. benzyl alcohol

19. Myrj[®] 52

20. dioctyl sodium sulfosuccinate (DSS)

บริษัท Sigma-Aldrich Co. Ltd., Lot; 21721MB ประเทศเยอรมัน

21. Tween[®] 80

บริษัท ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด จังหวัดกรุงเทพฯ ประเทศไทย

22. Cremophor[®] RH 40

บริษัท เอกตรงเคมีภัณฑ์ (1985) จำกัด จังหวัดกรุงเทพฯ ประเทศไทย

23. Arlacel[®] 165

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. มีดสำหรับหั่น

2. เครื่องปั่น บริษัท Panasonic รุ่น MX 898N

3. ขวดสีชา

4. Parafilm[®] บริษัท [Pechiney Plastic Packaging](#)

5. อะลูมิเนียมฟอยล์

6. desiccator

7. ตู้อบ บริษัท Memmert GmbH & Co. KG

8. กระบอกตวงขนาด 10, 50, 1000 มิลลิลิตร

9. soxhlet apparatus (Electrothermal[®]) บริษัท Bibby scientific จำกัด

10. separatory funnel ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

11. rotary evaporator (Rotavapor[®] R-210/R-215) บริษัท BUCHI Labortechnik AG

12. ถ้วยกระเบื้อง

13. water bath บริษัท Memmert GmbH & Co. KG

14. กระดาษกรอง Whatman[®] เบอร์ 1

15. buchner Funnel

16. filtering Flask (suction flask)

17. high performance liquid chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LD20

18. microvolume pipette ยี่ห้อ Pipetteman ขนาดปริมาตร 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

19. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น AX/MX/UMX
20. pipette tips ยี่ห้อ Diamond®
21. filter membrane 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Millipore
22. centrifugal filter, regenerated cellulose 100,000 MWCO ยี่ห้อ Amicon® Ultra
23. syringe filter nylon 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Lubitech
24. กระบอกฉีดยา ยี่ห้อ Nipro
25. HPLC vial ขนาดปริมาตร 2 มิลลิลิตร
26. volumetric flask ขนาด 2, 5, 10, 50, 100, 2000 มิลลิลิตร
27. ขวดแก้วสำหรับใส่ mobile phase
28. 96-well microtiter plate
29. เครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ Beckman coulter รุ่น AD200
30. เครื่อง analogue hotplate stirrer รุ่น M6 ยี่ห้อ CAT
31. เตาไฟฟ้า (hot plate)
32. เครื่อง vortex mixer ยี่ห้อ Vortex-Genie® 2
33. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น PG403-5
34. เครื่อง High speed refrigerated microcentrifuge รุ่น Tomy MX-305
35. เครื่อง Zetasizer nano series รุ่น ZS
36. หลอดทดลองพร้อมฝาปิด ขนาด 10 มิลลิลิตร
37. หลอดหยด

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดเปลือกทับทิม

1. นำเปลือกทับทิมสดมาล้างและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำเปลือกทับทิมอบแห้งมาบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านร่อนเบอร์ 60
3. ชั่งน้ำหนักผงเปลือกทับทิมที่ได้ในข้อ 2. บันทึกผล และเก็บผงเปลือกทับทิมลงภาชนะป้องกันแสงใน desiccator
4. นำผงเปลือกทับทิม 322.1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และน้ำ ในอัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 2.5 ลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้ soxhlet apparatus

5. นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ โดยใช้ rotary evaporator จนได้สารสกัดเข้มข้น

6. นำสารสกัดเข้มข้นจากข้อ 5. มาแขวนลอยในสารละลาย acetic acid (2% v/v) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และนำมาสกัดแยกส่วนกับ ethyl acetate ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยใช้ separatory funnel ไขเก็บส่วน ethyl acetate นำสารละลาย acetic acid ที่ไขออกมาใส่กลับไปใน separatory funnel แล้วเติม ethyl acetate 400 มิลลิลิตร เพื่อสกัดแยกส่วนซ้ำ ทำเช่นเดิมอีก 3 ครั้ง

7. นำส่วน ethyl acetate ที่ผ่านการสกัดแยกส่วนในแต่ละครั้งมารวมกัน แล้วนำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ โดยใช้ rotary evaporator จนได้สารสกัดเข้มข้นและนำไประเหยตัวทำละลายที่เหลือบน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ถ้วยกระเบื้อง จนกระทั่งได้สารสกัดแห้ง

8. ชั่งน้ำหนักสารสกัดทับทิมที่ได้ บันทึกผล และคำนวณหา % extraction yield จากสูตร

$$\% \text{ extraction yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดเปลือกทับทิม}}{\text{น้ำหนักผงเปลือกทับทิมอบแห้ง}} \times 100$$

9. เก็บผงสารสกัดเปลือกทับทิมลงภาชนะป้องกันแสงใน desiccator

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิมโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1. กรองสารละลาย phosphoric acid 0.2% (v/v) ในน้ำและ methanol for HPLC ผ่าน membrane filter 0.45 ไมโครเมตร เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายและ mobile phase

2. เตรียม stock solution ของ internal standard โดยชั่ง propyl paraben 1 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร

3. เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐาน ellagic acid โดยชั่ง ellagic acid 1 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ellagic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางจาก stock solution แล้วเติมสารละลาย internal standard ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้น 1.762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol

5. เตรียมสารละลายสารสกัดเปลือกทับทิม โดยชั่งสารสกัดเปลือกทับทิม 1 มิลลิกรัม เติมสารละลาย internal standard ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้น 1.762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ทำเช่นเดียวกันซ้ำอีก 2 ครั้ง (n=3)

6. ถ่ายสารละลายมาตรฐาน ellagic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายสารสกัดเปลือกทับทิมที่ได้จากข้อ 4. และ 5. ลงใน HPLC vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

7. เตรียม mobile phase โดยผสมสารละลาย phosphoric acid 0.2% และ methanol ในอัตราส่วน 45:55 (v/v) นำสารละลายผสมไปไล่อากาศโดยใช้ sonicator

8. กำหนดสภาวะในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยตั้งค่าให้มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของ detector ที่ใช้ 254 นาโนเมตร และฉีดสารละลายตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร

9. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน ellagic acid โดยพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ellagic acid (แกน X) กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ ellagic acid ต่อพื้นที่ใต้กราฟของ internal standard จาก HPLC chromatogram (แกน Y)

10. คำนวณหาความเข้มข้นของ ellagic acid ในสารละลายสารสกัดทับทิมได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

11. คำนวณหาร้อยละปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม จากสูตร

$$\text{ร้อยละของ ellagic acid} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ ellagic acid } (\mu\text{g/ml})}{\text{น้ำหนักสารสกัดเปลือกทับทิม } (\mu\text{g}) / 50 \text{ ml}} \times 100$$

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกทับทิม

1. เตรียมสารละลายสารสกัดเปลือกทับทิมใน DMSO ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย kojic acid ใน DMSO ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้เป็น positive control

2. หยอดสารละลายสารสกัดเปลือกทับทิมในข้อ 1. ลงในหลุม A1, A2 และ A3 หลุมละ 5 ไมโครลิตร ตามด้วย DMSO ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต จะได้สารละลายสารสกัดเปลือกทับทิมที่มีความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n=3)

3. หยอดสารละลาย kojic acid ในข้อ 1. ลงในหลุม A4, A5 และ A6 หลุมละ 5 ไมโครลิตร ตามด้วย DMSO ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต จะได้สารละลาย kojic acid ที่มีความเข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (n=3)

4. ดูดสารละลายในหลุมแถว A ขึ้นมาปริมาตร 5 ไมโครลิตร และหยอดลงในหลุม B แล้วตามด้วย DMSO ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ทำเช่นเดียวกันในทุกคอลัมน์ ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต

5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4. ในแถวถัดไปอีก 5 ครั้ง (แถว C-G) จนกระทั่งได้สารละลาย 7 ความเข้มข้นในแต่ละคอลัมน์

6. หยอด DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม H1, H2 และ H3 เพื่อใช้สำหรับการเปรียบเทียบ (negative control)

7. หยอด phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 140 ไมโครลิตรและ สารละลายเอนไซม์ไทโรซีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม แล้วบ่มเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
8. หยอดสารละลาย L-DOPA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 1 นาทีแรกและที่เวลา 10 นาทีตามลำดับ นำค่าที่ได้มาคำนวณการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่มีสารตัวอย่าง คำนวณออกมาเป็นร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีน (% inhibition) ด้วยสมการต่อไปนี้

$$\frac{\Delta A - \Delta B}{\Delta A} \times 100 = \% \text{Inhibition}$$

จากสมการ

$$\Delta A = A_2 - A_1 = \text{ความแตกต่างค่าการดูดกลืนแสงของ control}$$

$$\Delta B = B_2 - B_1 = \text{ความแตกต่างค่าการดูดกลืนแสงของ sample}$$

3.3.4 การศึกษาหาชนิดไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมไมโครอิมัลชัน

1. การศึกษาหาชนิดของไขมันแข็งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบไขมันของระบบไมโครอิมัลชันจากความเข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม

เลือกสารไขมันแข็งมาใช้ในการศึกษา พิจารณาจากการศึกษาอื่นๆที่เคยมีการใช้สารเหล่านี้ นำมาเตรียมเป็น SLNs แล้วได้เป็น SLNs ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมโดยไขมันแข็งที่ใช้ในการศึกษา คือ glyceryl monostearate, glyceryl behenate, stearic acid และ cetyl palmitate

วิธีการทดลอง

1. ชั่งผงสารสกัดเปลือกทับทิม 0.01 กรัม ใส่หลอดทดลอง
2. ชั่งไขมันแข็ง 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองในข้อที่ 1 ตามตารางที่ 5
3. หลอมสารผสมในหลอดทดลองบน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง vortex mixer
4. ประเมินลักษณะของสารผสมที่ได้

เกณฑ์การประเมิน ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของสารผสมขณะร้อนและที่อุณหภูมิห้อง ไขมันแข็งที่เข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิมต้องเป็นสารละลายใสขณะร้อน และเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเย็นตัวลงถึงอุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของน้ำหนักสารสกัดเปลือกทับทิมและไขมันแข็งที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้

หลอดที่	น้ำหนักสารสกัดเปลือกทับทิม (g)	น้ำหนักไขมันแข็ง (g)			
		glyceryl monostearate	glyceryl behenate	stearic acid	cetyl palmitate
1	0.01	2.00	-	-	-
2	0.01	-	2.00	-	-
3	0.01	-	-	2.00	-
4	0.01	-	-	-	2.00

2. การศึกษาหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมสำหรับใช้เป็นสารทำอิมัลชันของระบบไมโครอิมัลชัน จากความเข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม

เลือกสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมมาใช้ในการศึกษาพิจารณาจากการศึกษาอื่นๆที่เคยมีการใช้สารเหล่านี้นำมาเตรียมเป็น SLNs แล้วได้เป็น SLNs ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสม โดยสารลดแรงตึงผิวที่นำมาศึกษาได้แก่ Myrj[®] 52, dioctyl sodium sulfosuccinate, Arlacel[®] 165, Tween[®] 80 และ Cremophor[®] RH 40 และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่นำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol จากนั้นจับคู่สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมแต่ละชนิด จะได้สารลดแรงตึงผิวผสมทั้งหมด 20 คู่ แล้วนำไปทดสอบความเข้ากันได้ดังแสดงในตารางที่ 6

วิธีการทดลอง

1. ชั่งผงสารสกัดเปลือกทับทิม 0.01 กรัม ใส่หลอดทดลอง
2. ชั่งสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมแต่ละชนิด อัตราส่วน 1:1 ใส่ในหลอดทดลองในข้อที่ 1

3. ในกรณีที่ใช้ Myrj[®] 52, dioctyl sodium sulfosuccinate หรือ Arlacel[®] 165 ต้อง หลอมสารผสมในหลอดทดลองบน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียสและ บั่นผสมสารผสมในหลอดทดลองให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง vortex mixer

4. ประเมินลักษณะของสารผสมที่ได้

เกณฑ์การประเมิน ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของสารผสมขณะร้อนและที่ อุณหภูมิห้อง สารลดแรงตึงผิวผสมที่เข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิมต้องเป็นสารละลายใสขณะร้อน และเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเย็นตัวลงถึงอุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษา ความเข้ากันได้

หลอด ที่	น้ำหนัก สารสกัด เปลือก ทับทิม (g)	น้ำหนักสารลดแรงตึงผิว (g)					น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวร่วม (g)			
		Myrj [®] 52	DSS	Arlacel [®] 165	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH 40	ethanol	n-butyl alcohol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol
1	0.01	0.5	-	-	-	-	0.5	-	-	-
2	0.01	0.5	-	-	-	-	-	0.5	-	-
3	0.01	0.5	-	-	-	-	-	-	0.5	-
4	0.01	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.5
5	0.01	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-	-
6	0.01	-	0.5	-	-	-	-	0.5	-	-
7	0.01	-	0.5	-	-	-	-	-	0.5	-
8	0.01	-	0.5	-	-	-	-	-	-	0.5
9	0.01	-	-	0.5	-	-	0.5	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงปริมาณสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษาความเข้ากันได้

หลอดที่	น้ำหนักสารสกัดเปลือกทับทิม (g)	น้ำหนักสารลดแรงตึงผิว (g)					น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวร่วม (g)			
		Myrj [®] 52	DSS	Arlacel [®] 165	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH 40	ethanol	n-butyl alcohol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol
10	0.01	-	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-
11	0.01	-	-	0.5	-	-	-	-	0.5	-
12	0.01	-	-	0.5	-	-	-	-	-	0.5
13	0.01	-	-	-	0.5	-	0.5	-	-	-
14	0.01	-	-	-	0.5	-	-	0.5	-	-
15	0.01	-	-	-	0.5	-	-	-	0.5	-
16	0.01	-	-	-	0.5	-	-	-	-	0.5
17	0.01	-	-	-	-	0.5	0.5	-	-	-
18	0.01	-	-	-	-	0.5	-	0.5	-	-
19	0.01	-	-	-	-	0.5	-	-	0.5	-
20	0.01	-	-	-	-	0.5	-	-	-	0.5

3.3.5 การศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLNs โดยวิธีสร้างแผนภาพระบบไตรภาค (Pseudo-ternary phase diagram) ของวัฏภาคน้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวผสม ด้วยวิธี

Titration Method

ไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่นำมาใช้ศึกษา ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.3.4 โดยไขมันแข็งที่นำมาใช้ในศึกษาได้แก่ glyceryl monostearate สารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Myrj[®] 52, dioctyl sodium sulfosuccinate, Arlacel[®] 165, Tween[®] 80 และ Cremophor[®] RH 40 และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol จากนั้นสร้างชุดการทดลองที่ประกอบด้วยไขมันแข็ง, สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยมีอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น 1:1 และในแต่ละชุดการทดลองจะประกอบด้วยอัตราส่วนของ

ไขมันแข็งและสารลดแรงตึงผิวผสมจำนวน 9 อัตราส่วน (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 และ 1:9) ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8

วิธีการทดลอง

1. ชั่งไขมันแข็งและส่วนผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (1:1) ในอัตราส่วน 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 และ 1:9 ตามตารางที่ 5 ในปริมาณรวม 2 กรัม ใส่หลอดทดลอง โดยใช้เครื่องชั่งที่ปรับสมดุลแล้ว ปิดปากหลอดทดลองด้วย parafilm
2. หลอมสารผสมในหลอดทดลองบน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง vortex mixer
3. ค่อยๆหยดน้ำที่ละลายลงในหลอดทดลองโดยใช้หลอดหยด นำไปปั่นผสมด้วย vortex mixer ทุกครั้งที่หยดน้ำลงไป ถ้าพบว่าส่วนประกอบในหลอดทดลองเริ่มแข็งตัวให้นำไปหลอมใน water bath ใหม่ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ทำเช่นนี้จนกระทั่งส่วนผสมเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น เกิดการแยกชั้น หรือเกิดเป็นเจล
4. บันทึกปริมาณน้ำที่ใช้หยดลงไปในระบบไมโครอิมัลชันแต่ละอัตราส่วน
5. สร้างแผนภาพระบบไตรภาค โดยพล็อตระหว่างน้ำหนักของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวผสม และน้ำที่ใช้ไปทุกอัตราส่วน

เกณฑ์การประเมิน คือ เลือกระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีปริมาณน้ำอย่างน้อย 30% และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสมน้อยกว่า 65%

ตารางที่ 7 แสดงชนิดของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLNs

รหัสชุดการทดลอง	ชนิดของไขมันแข็ง	ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วม
L-S1-C1	glyceryl monostearate	Myrj [®] 52	Ethanol
L-S1-C2	glyceryl monostearate	Myrj [®] 52	n-butyl alcohol
L-S1-C3	glyceryl monostearate	Myrj [®] 52	benzyl alcohol
L-S1-C4	glyceryl monostearate	Myrj [®] 52	isopropyl alcohol
L-S1-C5	glyceryl monostearate	dioctyl sodium sulfosuccinate	ethanol
L-S2-C1	glyceryl monostearate	dioctyl sodium sulfosuccinate	n-butyl alcohol
L-S2-C2	glyceryl monostearate	dioctyl sodium sulfosuccinate	benzyl alcohol
L-S2-C3	glyceryl monostearate	dioctyl sodium sulfosuccinate	isopropyl alcohol
L-S2-C4	glyceryl monostearate	Arlacel [®] 165	ethanol
L-S2-C5	glyceryl monostearate	Arlacel [®] 165	n-butyl alcohol
L-S3-C1	glyceryl monostearate	Arlacel [®] 165	benzyl alcohol
L-S3-C2	glyceryl monostearate	Arlacel [®] 165	isopropyl alcohol
L-S3-C3	glyceryl monostearate	Tween [®] 80	ethanol
L-S3-C4	glyceryl monostearate	Tween [®] 80	n-butyl alcohol
L-S3-C5	glyceryl monostearate	Tween [®] 80	benzyl alcohol
L-S4-C1	glyceryl monostearate	Tween [®] 80	isopropyl alcohol
L-S4-C2	glyceryl monostearate	Cremophor [®] RH 40	ethanol
L-S4-C3	glyceryl monostearate	Cremophor [®] RH 40	n-butyl alcohol
L-S4-C4	glyceryl monostearate	Cremophor [®] RH 40	benzyl alcohol
L-S4-C5	glyceryl monostearate	Cremophor [®] RH 40	isopropyl alcohol

กำหนดให้ L แทน glyceryl monostearate, S แทน สารลดแรงตึงผิว โดย Myrj[®] 52: S1; dioctyl sodium sulfosuccinate: S2; Tween[®] 80: S3; Cremophor[®] RH 40: S4; Arlacel[®] 165: S5 และ C แทนสารลดแรงตึงผิวร่วม โดย ethanol: C1; n-butyl alcohol: C2; benzyl alcohol: C3; isopropyl alcohol: C4

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในการศึกษาหา ระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLNs ในการทดลองแต่ละชุด

หลอดที่	อัตราส่วนระหว่าง ไขมันแข็งต่อสารลดแรงตึงผิวผสม	ไขมันแข็ง (g)	สารลดแรงตึงผิว (g)	สารลดแรงตึงผิวร่วม (g)
1	9:1	1.8	0.1	0.1
2	8:2	1.6	0.2	0.2
3	7:3	1.4	0.3	0.3
4	6:4	1.2	0.4	0.4
5	5:5	1.0	0.5	0.5
6	4:6	0.8	0.6	0.6
7	3:7	0.6	0.7	0.7
8	2:8	0.4	0.8	0.8
9	1:9	0.2	0.9	0.9

3.3.6 การศึกษาหาสูตรตำรับ SLNs ที่เหมาะสมและการประเมิน

ระบบไมโครอิมัลชันที่นำมาเตรียม SLNs ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.3.5

วิธีการทดลอง

1. ชั่งไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำ ตามตารางที่ 9 โดยมีปริมาณรวม 1 กรัม ใส่หลอดทดลอง โดยใช้เครื่องชั่งที่ปรับสมดุลแล้ว ปิดปากหลอดทดลองด้วย parafilm
2. หลอมสารผสมในหลอดทดลองบน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง vortex mixer จะได้ไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใส
3. นำไมโครอิมัลชันร้อนไปกระจายตัวในน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (กำหนดอัตราส่วนไมโครอิมัลชันร้อนต่อน้ำเย็นเท่ากับ 1 ต่อ 25) ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ตลอดเวลา โดยใช้อัตราเร็ว 1,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
4. ประเมินลักษณะภายนอกของ SLNs ที่เตรียมได้ทันทีด้วยสายตา ได้แก่ ความเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ความขุ่นของสารละลาย มีหรือไม่มีเศษชิ้นไขมันแข็งที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า

5. วิเคราะห์ขนาดอนุภาค และการกระจายขนาดอนุภาคที่เตรียมได้โดยใช้เครื่อง zetasizer nano series โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

5.1 ปิเปต SLNs ที่เตรียมได้ 20 ไมโครลิตร เจือจางด้วย ultrapure water ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

5.2 ปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 30 วินาที

5.3 บรรจุสารใส่เซลล์ที่ใช้ในการวัด ทำการวัดค่าต่างๆด้วยเครื่อง zetasizer nano series (ตั้งค่าวัดขนาดอนุภาค 10 รอบต่อครั้ง จำนวน 3 ครั้ง)

6. ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับ SLNs โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

เกณฑ์การประเมิน คือ

1. ประเมินลักษณะทางกายภาพของ SLNs หลังเตรียมทันที โดย SLNs ที่ผ่านเกณฑ์จะต้องมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีเศษไขมันแข็งที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและไม่ขุ่นทึบ

2. วิเคราะห์ขนาดอนุภาค และการกระจายขนาดอนุภาคที่เตรียมได้โดยใช้เครื่อง zetasizer nano series โดย SLNs ที่ผ่านเกณฑ์จะต้องมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-400 นาโนเมตร การกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.7

3. ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับ SLNs โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดย SLNs ที่ผ่านเกณฑ์จะต้องไม่มีการแยกชั้น หรือการนอนก้นของอนุภาค

ตารางที่ 9 แสดงส่วนประกอบและปริมาณโดยน้ำหนักในสูตร SLNs ที่ใช้ศึกษา

หลอดที่	GMS	Myrj [®] 52	DSS	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH40	ethanol	butanol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol	water
1	0.10	0.3	-	-	-	0.30	-	-	-	0.30
2	0.10	0.25	-	-	-	0.25	-	-	-	0.40
3	0.20	0.25	-	-	-	0.25	-	-	-	0.30
4	0.10	0.30	-	-	-	-	0.30	-	-	0.30
5	0.10	0.15	-	-	-	-	-	-	0.15	0.60
6	0.10	0.20	-	-	-	-	-	-	0.20	0.50
7	0.10	0.25	-	-	-	-	-	-	0.25	0.40
8	0.10	0.30	-	-	-	-	-	-	0.30	0.30
9	0.20	0.20	-	-	-	-	-	-	0.20	0.40
10	0.20	0.25	-	-	-	-	-	-	0.25	0.30
11	0.20	-	0.15	-	-	-	-	0.15	-	0.50

หลอดที่	GMS	Myrj [®] 52	DSS	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH40	ethanol	butanol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol	water
12	0.20	-	0.20	-	-	-	-	0.20	-	0.40
13	0.20	-	0.25	-	-	-	-	0.25	-	0.30
14	0.30	-	0.15	-	-	-	-	0.15	-	0.40
15	0.20	-	0.15	-	-	-	-	-	0.15	0.50
16	0.20	-	0.20	-	-	-	-	-	0.20	0.40
17	0.20	-	0.25	-	-	-	-	-	0.25	0.30
18	0.30	-	0.15	-	-	-	-	-	0.15	0.40
19	0.20	-	-	0.20	-	-	-	-	0.20	0.40
20	0.20	-	-	0.25	-	-	-	-	0.25	0.30
21	0.10	-	-	-	0.20	0.20	-	-	-	0.50
22	0.10	-	-	-	0.25	0.25	-	-	-	0.40
23	0.10	-	-	-	0.30	0.30	-	-	-	0.30
24	0.20	-	-	-	0.25	0.25	-	-	-	0.30
25	0.10	-	-	-	0.20	-	-	-	0.20	0.50
26	0.10	-	-	-	0.25	-	-	-	0.25	0.40
27	0.10	-	-	-	0.30	-	-	-	0.30	0.30
28	0.20	-	-	-	0.25	-	-	-	0.25	0.30

3.3.7 การเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและการประเมิน

นำสูตร SLNs ที่ผ่านเกณฑ์ประเมินมาเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมโดยเทคนิคไมโครอิมัลชัน กำหนดความเข้มข้นสารสกัดเปลือกทับทิม 0.05%, 0.1%, 0.2% หลังการกระจายในน้ำเย็น

วิธีการทดลอง

1. ชั่งผงสารสกัดเปลือกทับทิมและ ethanol ตามตารางที่ 10 โดยใช้เครื่องชั่งที่ปรับสมดุลแล้วปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer จนสารสกัดละลายหมด (หากละลายไม่หมดให้นำไปทำให้ละลายด้วยเครื่อง sonicator)
2. ชั่ง Myrj[®] 52 และน้ำ ตามตารางที่ 10 ลงในหลอดทดลองจากข้อที่ 1 โดยใช้เครื่องชั่งที่ปรับสมดุลแล้ว ปิดหลอดทดลองด้วย parafilm (วิญญานน้ำ)
3. ชั่ง glyceryl monostearate ตามตารางที่ 10 ในหลอดทดลองอีกหลอด (วิญญานน้ำมัน)

4. แยกหลอมวัฏภาคน้ำและ glyceryl monostearate (วัฏภาคน้ำมัน) ในหลอดทดลองบน water bath โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส
5. เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง vortex mixer จะได้ไมโครอิมัลชันที่ได้จะมีลักษณะใส (ควบคุมอุณหภูมิของไมโครอิมัลชันให้อยู่ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส)
6. นำไมโครอิมัลชันร้อนไปกระจายตัวในน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร คนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา โดยใช้อัตราเร็ว 1,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
7. ตั้ง SLNs ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ประเมินลักษณะทางกายภาพ แล้วนำไปวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีตา โดยใช้เครื่อง zetasizer nano series โดยเตรียม SLNs ในการวิเคราะห์ดังนี้
 - 7.1 ปิเปิด SLNs ที่เตรียมได้ 20 ไมโครลิตร เจือจางด้วย ultrapure water ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
 - 7.2 ปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 30 วินาที
 - 7.3 บรรจุสารใส่เซลล์ที่ใช้ในการวัด ทำการวัดค่าต่างๆด้วยเครื่อง zetasizer nanoseries (ตั้งค่าวัดขนาดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา 10 รอบต่อครั้ง จำนวน 3 ครั้ง)
8. สังเกตความคงตัวในสภาวะแรง โดยสภาวะแรงที่ใช้คือการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High speed refrigerated microcentrifuge ที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลาย SLNs ที่ผ่านสภาวะแรงไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ตามขั้นตอนในข้อ 7

ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบและปริมาณโดยน้ำหนักในสูตร SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม

ส่วนประกอบในสูตร SLN	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3
ผงสารสกัดเปลือกทับทิม	0.001 g	0.002 g	0.004 g
glyceryl monostearate	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Myrj [®] 52	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Ethanol	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Water	0.8 g	0.8 g	0.8 g

3.3.8 การประเมินประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs

วิธีการทดลอง

1. กรองสารละลาย phosphoric acid 0.2% (v/v) ในน้ำ และ methanol for HPLC ผ่าน membrane filter เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายและ mobile phase
2. เตรียม stock solution ของ internal standard โดยชั่ง propyl paraben 1 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol
3. เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐาน ellagic acid โดยชั่ง ellagic acid 1 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol
4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ellagic acid ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางจาก stock solution และผสมกับสารละลาย internal standard ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้น 1.762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วถ่ายสารละลายมาตรฐาน ellagic acid แต่ละความเข้มข้นลงใน HPLC vial
5. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่ง SLNs 0.3 กรัม ผสมกับสารละลาย internal standard ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้น 1.762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol นำมากรองผ่าน syringe filter แล้วถ่ายใส่ HPLC vial
6. ชั่ง SLNs 0.3 กรัม ใน centrifugal filter แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที
7. ละลายอนุภาคที่ค้างอยู่บน centrifugal filter ด้วย methanol แล้วเทลง volumetric flask ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย internal standard ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้น 1.762 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol นำมากรองผ่าน syringe filter แล้วถ่ายใส่ HPLC vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
8. เตรียม mobile phase โดยผสมสารละลาย phosphoric acid 0.2% และ methanol ในอัตราส่วน 45:55 (v/v) นำสารละลายผสมไปไล่อากาศโดยใช้ sonicator
9. กำหนดสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยตั้งอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของ detector ที่ใช้ 254 นาโนเมตร และฉีดสารละลายตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร
10. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน ellagic acid โดยพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ellagic acid (แกน X) กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ ellagic acid ต่อพื้นที่ใต้กราฟของ internal standard จาก HPLC chromatogram (แกน Y)
11. คำนวณหาความเข้มข้น ellagic acid ในสารละลายตัวอย่าง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

12. คำนวณเปอร์เซ็นต์ entrapment efficiency จากสูตร

$$\% \text{ entrapment efficiency} = \frac{\text{ปริมาณ } ellagic \text{ acid ที่กักเก็บได้ใน } SLN}{\text{ปริมาณ } ellagic \text{ acid ทั้งหมดในตำรับ}} \times 100$$

3.3.9 การศึกษาความคงตัวของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม

นำสูตร SLNs ที่ทำการบรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05%, 0.1% และ 0.2% จากข้อ 3.3.7 ไปผ่านสภาวะเร่ง โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง high speed refrigerated microcentrifuge อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การประเมินความคงตัวสูตร SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม

การประเมินลักษณะทางกายภาพ คือ ความใส/ขุ่น โปร่งแสง ตะกอนด้วยการสังเกต และวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer nano โดยสูตร SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมมีความคงตัวดีเมื่อลักษณะทางกายภาพต่างๆ ขนาดอนุภาค ไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิมหรือเปลี่ยนแปลงไปในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดเปลือกทับทิม

จากการชั่งผงเปลือกทับทิมอบแห้งจำนวน 322.1 กรัม เมื่อนำไปผ่านการสกัด พบว่าได้สารสกัดจากเปลือกทับทิมที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอมเหลือง (รูปที่ 1) ทั้งสิ้นจำนวน 4.71 กรัม ดังนั้น สามารถหา % extraction yield ได้จากสูตร

$$\begin{aligned}\% \text{ extraction yield} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดเปลือกทับทิม}}{\text{น้ำหนักผงเปลือกทับทิมอบแห้ง}} \times 100 \\ &= \frac{4.71}{322.1} \times 100 \\ &= 1.46 \%\end{aligned}$$



รูปที่ 10 แสดงลักษณะของผงสารสกัดเปลือกทับทิมที่สกัดได้

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลาย ellagic acid คือ $y = 1.1041x - 0.0494$ เมื่อคำนวณหาปริมาณ ellagic acid พบว่าในสารสกัดเปลือกทับทิมประกอบไปด้วย ellagic acid เฉลี่ยร้อยละ 6.23 ± 0.14 ดังแสดงค่าในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการหาปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม (n=3)

ตัวอย่างที่	น้ำหนักของสารสกัดเปลือกทับทิม (mg)	ความเข้มข้นของ ellagic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิม
1	0.99	1.25	6.31
2	1.07	1.30	6.07
3	1.00	1.26	6.32
ค่าเฉลี่ย			6.23
S.D.			0.14

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกทับทิม

ผลการทดสอบ % tyrosinase inhibition ของสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเมื่อใช้สารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงความเข้มข้นน้อยจะแสดงฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และจะเริ่มคงที่ในช่วงความเข้มข้นสูง เช่นเดียวกับผลการทดสอบฤทธิ์ของ kojic acid ซึ่งเป็น positive control ดังแสดงในตารางที่ 13 และเมื่อนำผลจากตารางที่ 12 มาพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิม (แกน x) กับ % tyrosinase inhibition (แกน y) และลากเส้นแนวโน้มลอการิทึมจะได้ สมการ $y = 11.49 \ln(x) + 135.35$ จากสมการเส้นแนวโน้มลอการิทึมของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมและ % tyrosinase inhibition จะสามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50}) 0.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ kojic acid สามารถหาค่า IC_{50} ได้ 0.0038 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 12 แสดง % tyrosinase inhibition ของสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิม ($\mu\text{g/ml}$)	% tyrosinase inhibition
1.25	61.91
0.62	48.71
0.31	41.44
0.16	32.50
0.078	26.76
0.039	18.87
0.020	12.37

ตารางที่ 13 แสดง % tyrosinase inhibition ของสารละลาย kojic acid (positive control) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย kojic acid ($\mu\text{g/ml}$)	% tyrosinase inhibition
0.075	96.95
0.038	93.22
0.019	80.34
0.0094	66.10
0.0047	57.63
0.0023	43.39
0.0012	28.81

4.4 ผลการศึกษาหาชนิดไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมไมโครอิมัลชัน

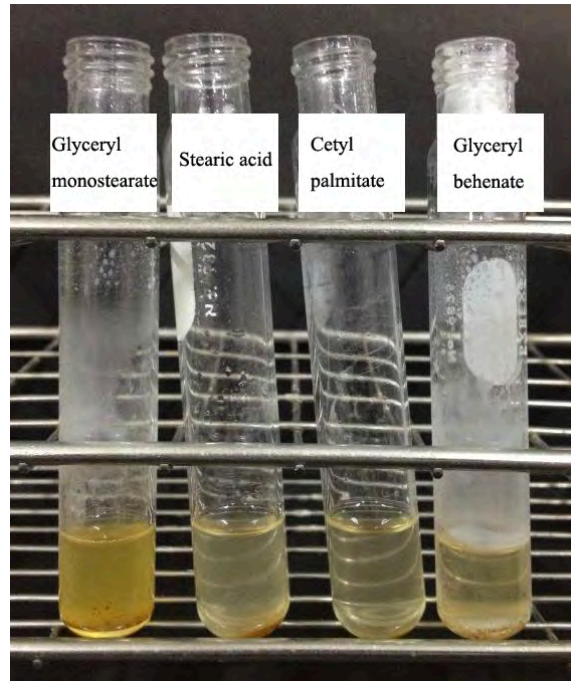
4.4.1 ผลการศึกษาหาชนิดของไขมันแข็งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบไขมันของระบบไมโครอิมัลชันจากความเข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม

จากการทดลองศึกษาหาความเข้ากันได้ของสารสกัดเปลือกทับทิมและไขมันแข็ง พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมสามารถเข้ากันได้ดีกับ glyceryl monostearate, stearic acid, cetyl palmitate, glyceryl behenate ดังแสดงในรูปที่ 4 แต่เมื่อสังเกตความสามารถในการละลายสารสกัดเปลือกทับทิมของไขมันในสภาวะหลอม จากสีของไขมันหลอมและปริมาณผงสารสกัดเปลือกทับทิมที่เหลืออยู่พบว่า glyceryl monostearate สามารถละลายสารสกัดเปลือกทับทิมได้มากที่สุด สังเกตได้จากไขมันหลอมมีสีเข้มและปริมาณผงสารสกัดเปลือกทับทิมเหลือน้อยที่สุด ในขณะที่ glyceryl behenate สามารถละลายสารสกัดเปลือกทับทิมได้รองลงมา

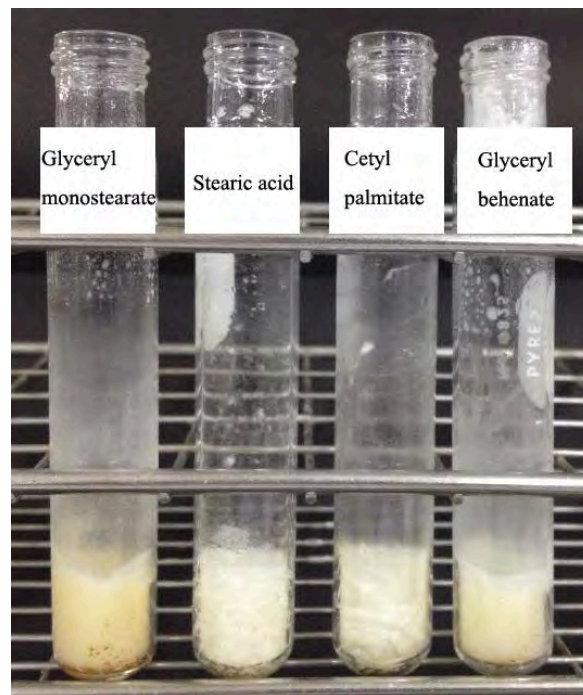
และ stearic acid และ cetyl palmitate สามารถละลายสารสกัดเปลือกทับทิมได้น้อยที่สุด เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้ไขมันแข็งตัวพบว่า glyceryl monostearate และ glyceryl behenate มีลักษณะเป็นของแข็งเนื้อเนียน ในขณะที่ stearic acid และ cetyl palmitate มีลักษณะเป็นของแข็งเนื้อไม่เนียน (รูปที่ 5) ซึ่งผลการทดลองลักษณะความเข้ากันได้และความสามารถในการละลายสารสกัดเปลือกทับทิมของไขมันได้แสดงในตารางที่ 14 ดังนั้นจากผลการทดลอง จะเลือก glyceryl monostearate เป็นวัฏภาคน้ำมันของระบบไมโครอิมัลชัน นอกจากนี้แล้วความเข้ากันได้ของไขมันแข็งและสารสกัดเปลือกทับทิมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการละลายสารสกัดเปลือกทับทิมและธรรมชาติของไขมันแต่ละชนิด เป็นต้น

ตารางที่ 44 แสดงลักษณะภายนอกของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิมและไขมันแข็ง

ไขมันแข็ง	ความเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน		ความสามารถในการละลายสารสกัดสังเกตุด้วยตา (+: น้อย, ++: ปานกลาง, +++: มาก)
	ในสถานะของเหลว (อุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส)	ในสถานะของแข็ง (อุณหภูมิต่ำ)	
glyceryl monostearate	เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองน้ำตาล	ของแข็งเนื้อเนียน	+++
stearic acid	เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อนๆ	ของแข็งเนื้อไม่เนียน	+
cetyl palmitate	เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อนๆ	ของแข็งเนื้อไม่เนียน	+
glyceryl behenate	เข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อน	ของแข็งเนื้อเนียน	++



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิมและไขมันแข็งในสถานะของเหลว (อุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 12 ลักษณะของสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกทับทิมและไขมันแข็งในสถานะของแข็ง (อุณหภูมิห้อง)

4.4.2 ผลการศึกษาหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมสำหรับใช้เป็นสารทำอิมัลชันของระบบไมโครอิมัลชัน จากความเข้ากันได้กับสารสกัดทับทิม

จากการทดลองหาความเข้ากันได้ของสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยใช้ผงสารสกัดเปลือกทับทิม 0.01 กรัม และสารลดแรงตึงผิวผสม 1 กรัม โดยมีอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1 ต่อ 1 พบว่าหลอดทดลองที่ 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13 ผงสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถละลายในสารลดแรงตึงผิวผสมได้สารละลายใส เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน หลอดทดลองที่ 3, 6, 7, 10, 12, 14, 16 ผงสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถละลายในสารลดแรงตึงผิวผสมได้สารละลายขุ่น เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน หลอดทดลองที่ 11, 15 ผงสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถละลายได้ในสารลดแรงตึงผิวผสม แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้สักครู่เกิดการแยกชั้นระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมได้ชั้นล่างใส ชั้นบนขุ่น หลอดทดลองที่ 17, 18, 19 ผงสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถละลายได้บ้างในสารลดแรงตึงผิวผสม เมื่อตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้สารผสมเย็นลง สารผสมจะแข็งขึ้นได้เป็นสารกึ่งแข็งไหลได้ ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเป็นเม็ดๆ และหลอดทดลองที่ 20 ผงสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถละลายได้ในสารลดแรงตึงผิวผสม เมื่อตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้สารผสมเย็นลง สารผสมจะแข็งขึ้นได้ของแข็ง เนื้อเนียน ดังแสดงในตารางที่ 15 และในรูปที่ 6-10

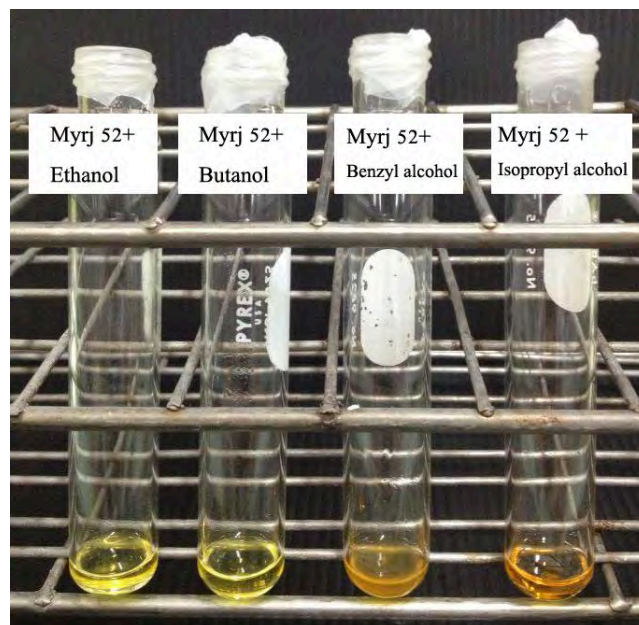
ดังนั้นจากการทดลองหาความเข้ากันได้ของสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม และการประเมินเพื่อเลือกสารที่จะนำไปใช้ในเป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับ สามารถเลือกคู่ของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ได้แก่ คู่ของ Myrij[®] 52 ร่วมกับ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol, isopropyl alcohol คู่ของ dioctyl sodium sulfosuccinate ร่วมกับ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol, isopropyl alcohol คู่ของ Tween[®] 80 ร่วมกับ ethanol, n-butyl alcohol, isopropyl alcohol คู่ของ Cremophor[®] RH 40 ร่วมกับ ethanol, n-butyl alcohol, isopropyl alcohol และคู่ของ Arlacel[®] 165 ร่วมกับ isopropyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดลองความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม

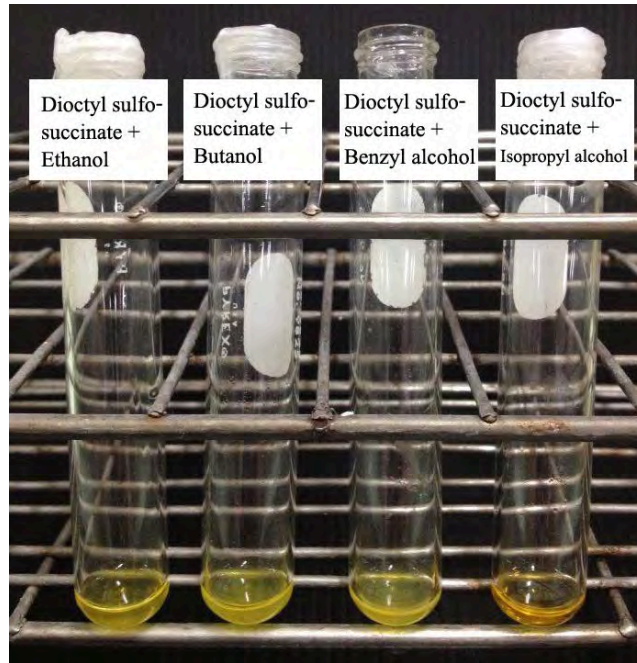
หลอดที่	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม	ลักษณะของสารผสมที่ได้
1	Myrj [®] 52 + ethanol	สารละลายใส สีเหลืองอ่อน
2	Myrj [®] 52 + n-butyl alcohol	สารละลายใส สีเหลือง
3	Myrj [®] 52 + benzyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลืองน้ำตาล
4	Myrj [®] 52 + isopropyl alcohol	สารละลายใส สีเหลืองน้ำตาล
5	dioctyl sodium sulfosuccinate + ethanol	สารละลายใส สีเหลือง
6	dioctyl sodium sulfosuccinate + n-butyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลือง
7	dioctyl sodium sulfosuccinate + benzyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลือง
8	dioctyl sodium sulfosuccinate + isopropyl alcohol	สารละลายใส สีเหลืองน้ำตาล
9	Tween [®] 80 + ethanol	สารละลายใส สีเหลือง
10	Tween [®] 80 + n-butyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลือง
11	Tween [®] 80 + benzyl alcohol	แยกชั้น ชั้นล่างสีใส ชั้นบนสีเหลืองแก่และขุ่น
12	Tween [®] 80 + isopropyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลืองน้ำตาล
13	Cremophor [®] RH 40 + ethanol	สารละลายใส สีเหลือง
14	Cremophor [®] RH 40 + n-butyl alcohol	สารละลายขุ่น สีเหลือง
15	Cremophor [®] RH 40 + benzyl alcohol	แยกชั้น ชั้นล่างสีใส ชั้นบนสีเหลืองแก่และขุ่น
16	Cremophor [®] RH 40 + isopropyl alcohol	สารละลายขุ่น สีน้ำตาล
17	Arlacel [®] 165 + ethanol	สารกึ่งแข็งไหลได้ ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเป็นเม็ดๆ
18	Arlacel [®] 165 + n-butyl alcohol	สารกึ่งแข็งไหลได้ ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเป็นเม็ดๆ
19	Arlacel [®] 165 + benzyl alcohol	สารกึ่งแข็งไหลได้ ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเป็นเม็ดๆ
20	Arlacel [®] 165 + isopropyl alcohol	ของแข็งสีเหลือง เนื้อเนียน

ตารางที่ 16 แสดงความเข้ากันและความไม่เข้ากันของสารสกัดเปลือกทับทิม สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

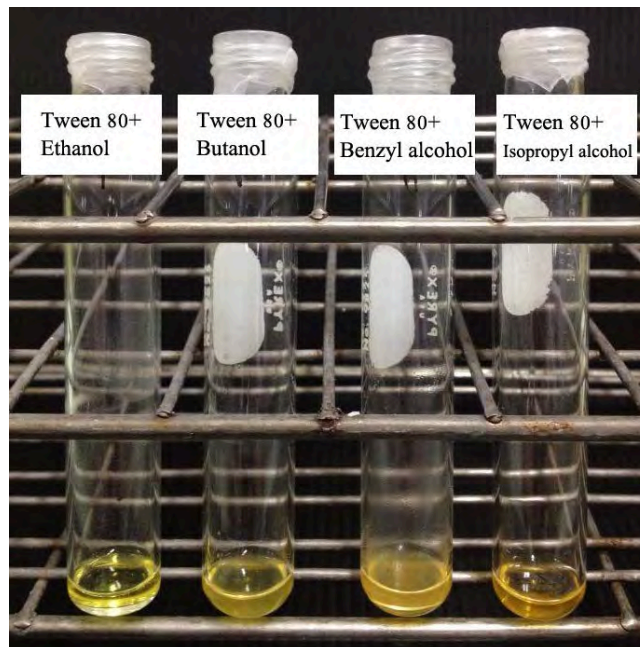
สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม	Myrj [®] 52	dioctyl sodium sulfosuccinate	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH40	Arlacel [®] 165
Ethanol	√	√	√	√	X
n-butyl alcohol	√	√	√	√	X
benzyl alcohol	√	√	X	X	X
isopropyl alcohol	√	√	√	√	√



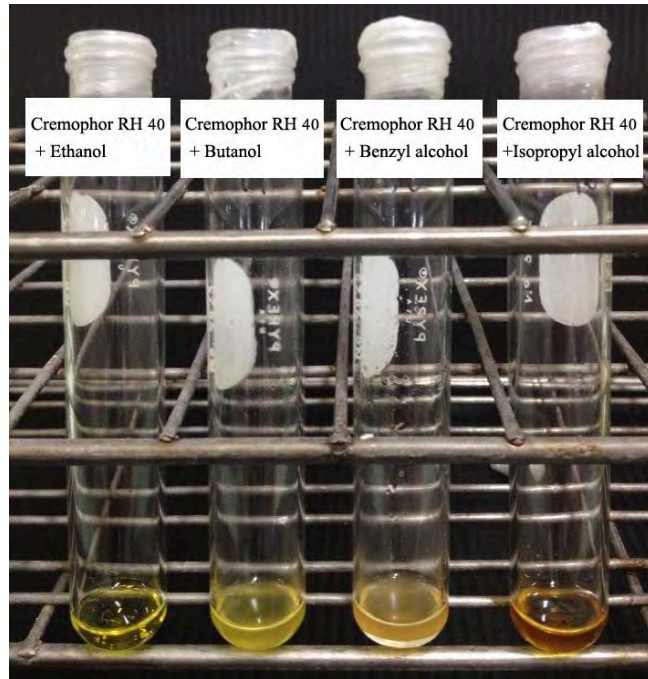
รูปที่ 13 ความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Myrj[®] 52) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol)



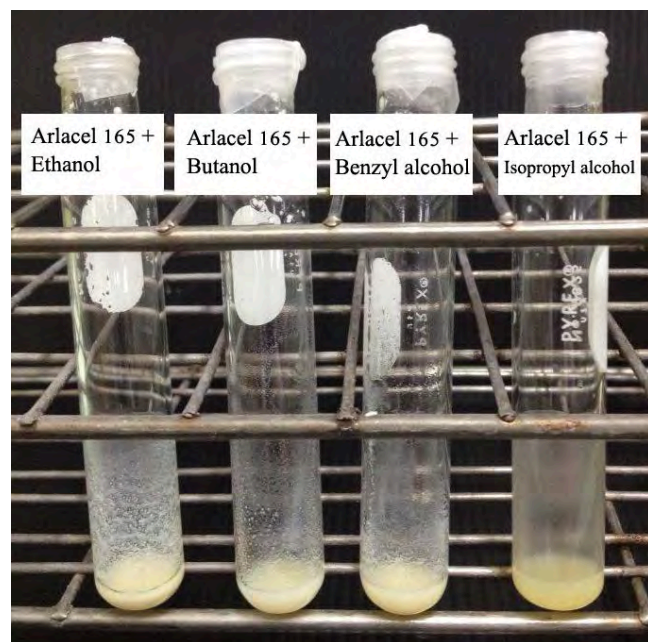
รูปที่ 14 แสดงความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (diocetyl sodium sulfosuccinate) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol)



รูปที่ 15 แสดงความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Tween[®] 80) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Tween[®] 80) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (benzyl alcohol)



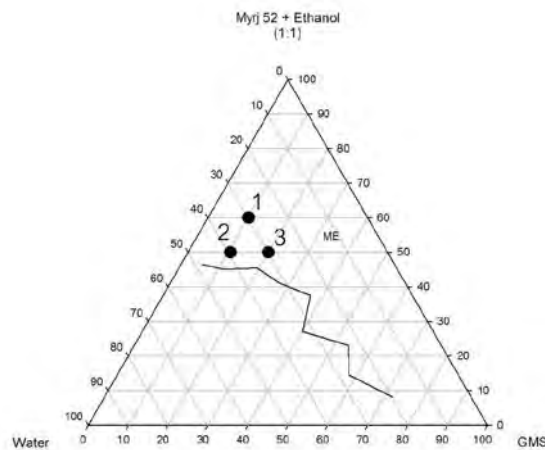
รูปที่ 16 แสดงความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor[®] RH 40) ในสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor[®] RH40) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (benzyl alcohol)



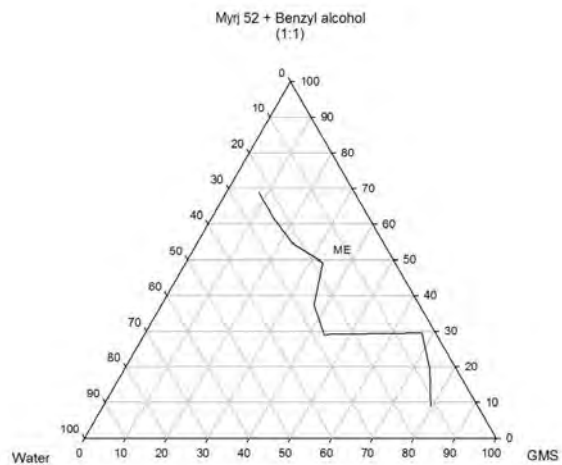
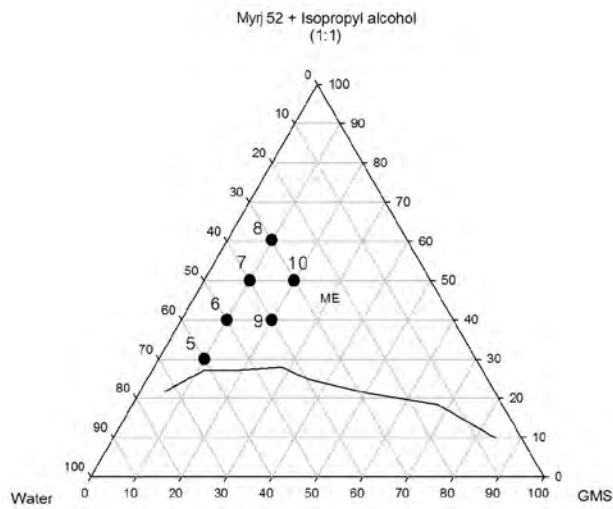
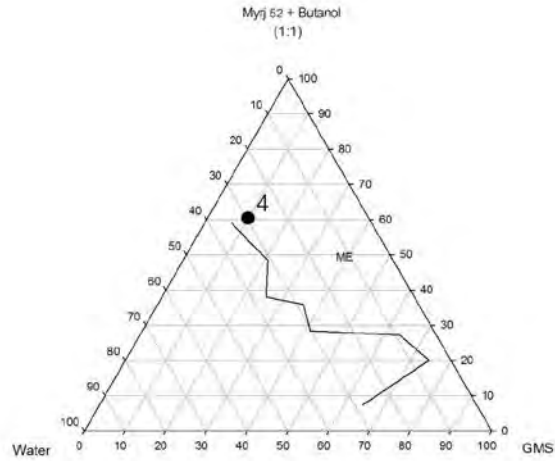
รูปที่ 17 แสดงความเข้ากันได้ของผงสารสกัดเปลือกทับทิมในสารลดแรงตึงผิว (Arlachel[®] 165) ในสารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และความไม่เข้ากัน (แยกชั้น) ในสารลดแรงตึงผิว (Cremophor[®] RH40) และสารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, n-butyl alcohol และ benzyl alcohol)

4.5 ผลการศึกษาหาระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับเตรียม SLNs โดยวิธีสร้างแผนภาพระบบไตรภาค (Pseudo-ternary phase diagram) ของวัฏภาคน้ำ น้ำมันและสารลดแรงตึงผิวผสม ด้วยวิธี Titration Method

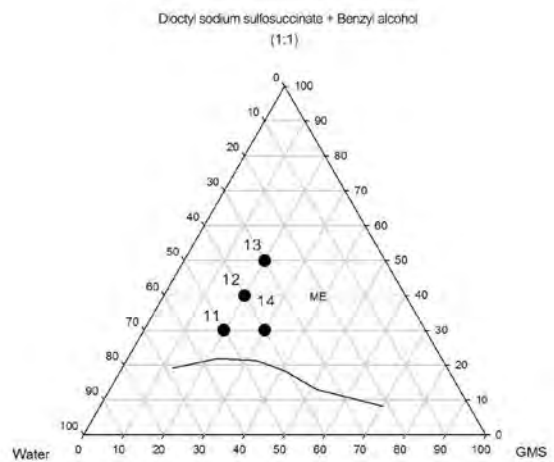
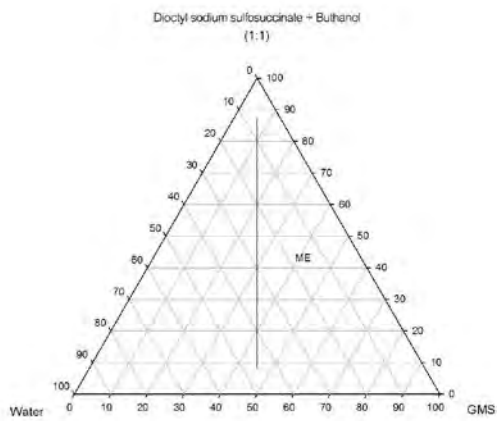
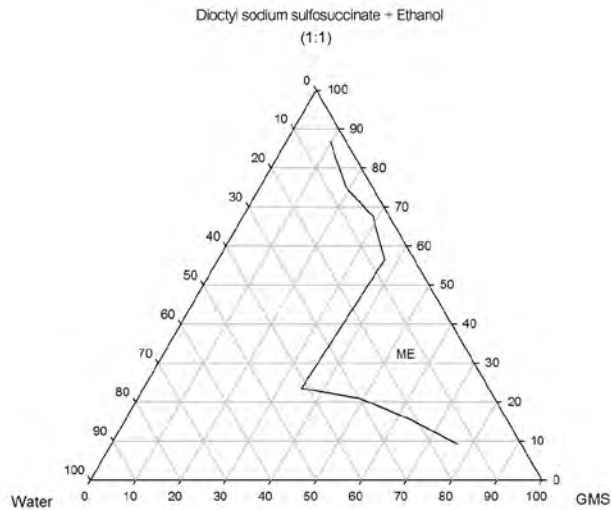
จากการทดลองศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำเพื่อใช้สร้างแผนภาพระบบไตรภาค ด้วยวิธีการเติมน้ำลงในส่วนผสมของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม เพื่อหาปริมาณน้ำที่มากที่สุดที่ใส่ไปในส่วนผสมแล้วยังทำให้ได้ไมโครอิมัลชันใส ซึ่งไขมันแข็งที่นำมาศึกษาได้แก่ glyceryl monostearate สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ Myrj[®] 52, dioctyl sodium sulfosuccinate, Tween[®] 80, Cremophor[®] RH 40 และ Arlacel[®] 165 และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่นำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol บางอัตราส่วนของไขมันต่อสารลดแรงตึงผิวผสมในไมโครอิมัลชันบางระบบ ไม่สามารถบันทึกปริมาณน้ำที่เติมลงไปได้ เนื่องจากที่อัตราส่วนนั้นสามารถเติมน้ำปริมาณมากลงไปในระบบโดยไม่ทำให้สารละลายขุ่น จึงไม่นำจุดดังกล่าวมาสร้างแผนภาพระบบไตรภาค ได้ผลดังแสดงในรูป 11-15 แต่เนื่องจากไม่สามารถใช้ค่าทุกค่าสร้างแผนภาพ จึงอาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการเลือกสูตรไมโครอิมัลชันได้ จากรูปแผนภาพระบบไตรภาค จะเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำ โดยเลือกอัตราส่วนที่ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยที่มีปริมาณน้ำมากกว่า 30% และปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสมน้อยกว่า 65% ซึ่งทุกอัตราส่วนที่เลือกต้องให้ไมโครอิมัลชันที่ใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากเกณฑ์การเลือกดังกล่าวทำให้สามารถเลือกสูตรไมโครอิมัลชันได้ทั้งหมด 28 สูตรดังแสดงในตารางที่ 17



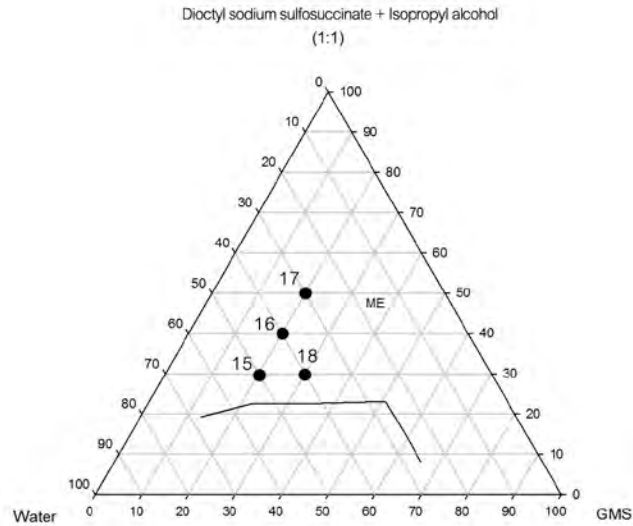
รูปที่ 58 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Myrj[®] 52), สารลดแรงตึงผิวร่วม (ethanol) และน้ำ; จุดที่ 1-3 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 1-3)



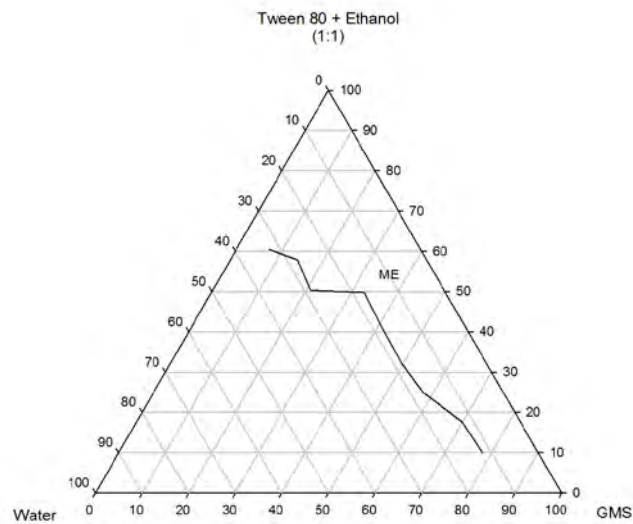
รูปที่ 69 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Myrij[®] 52), สารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆกัน (butanol, isopropyl alcohol, benzyl alcohol) และน้ำ; จุดที่ 4-10 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 4-10)



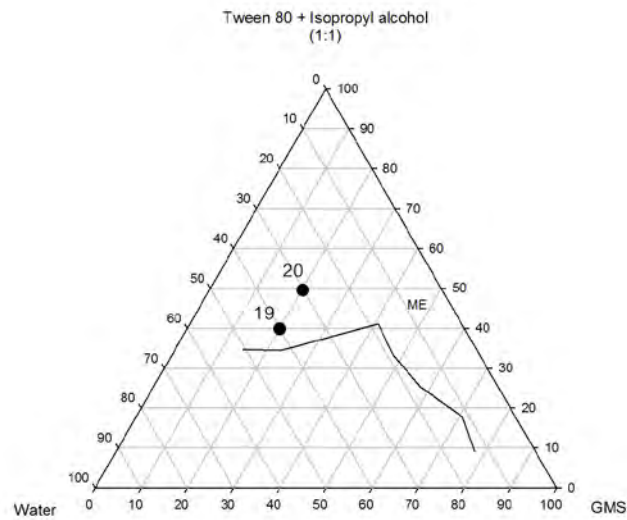
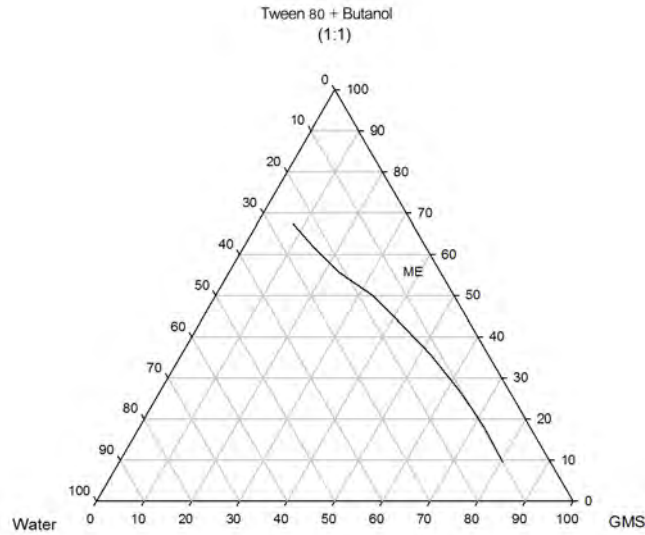
รูปที่ 20 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (diocetyl sodium sulfosuccinate), สารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆ (ethanol, butanol, benzyl alcohol) และน้ำ จุดที่ 11-14 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 11-14)



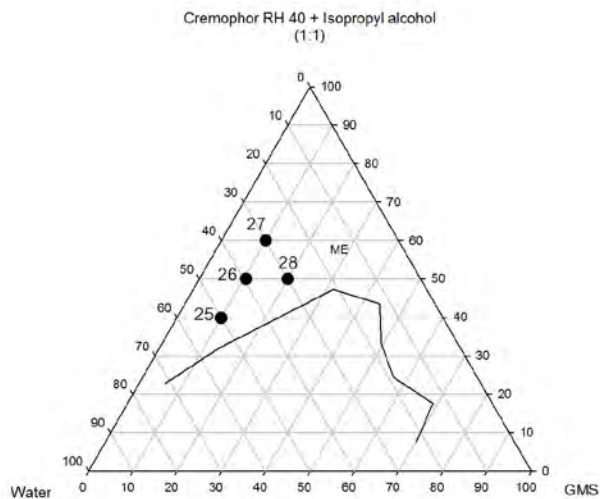
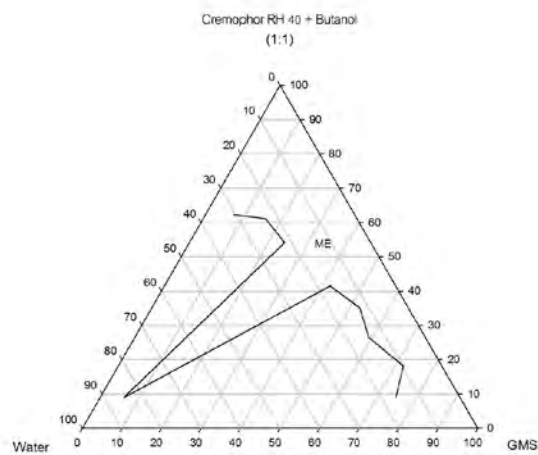
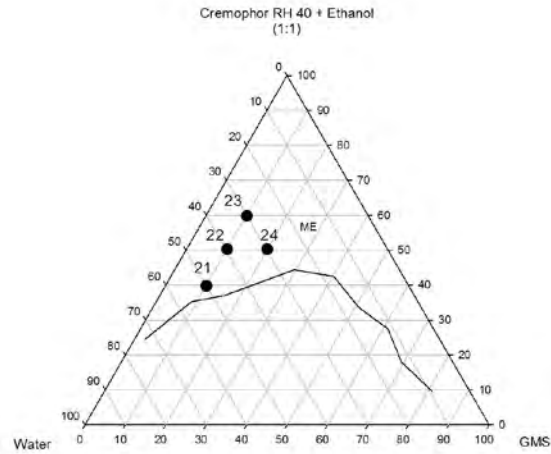
รูปที่ 21 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (diocetyl sodium sulfosuccinate), สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และน้ำ; จุดที่ 15-18 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 15-18)



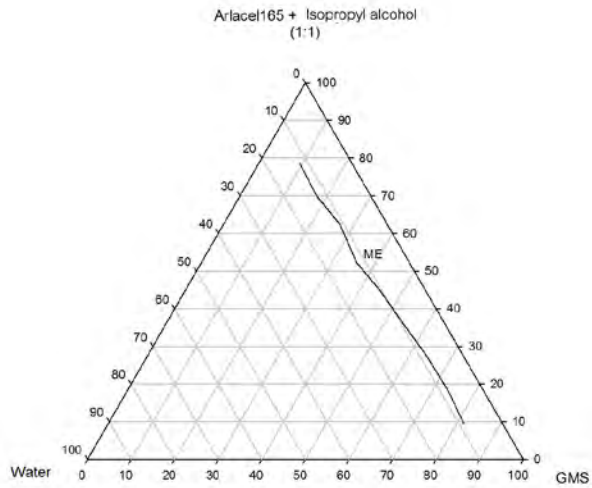
รูปที่ 22 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Tween[®] 80), สารลดแรงตึงผิวร่วม (ethanol) และน้ำ



รูปที่ 27 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Tween[®] 80), สารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, butyl alcohol, isopropyl alcohol) และน้ำ; จุดที่ 19-20 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 19-20)



รูปที่ 24 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Cremophor® RH 40), สารลดแรงตึงผิวร่วมต่างชนิดกัน (ethanol, butanol, isopropyl alcohol) และน้ำ; จุดที่ 21-28 แสดงอัตราส่วนของไมโครอิมัลชันที่เลือกมาเตรียมเป็น SLNs (สูตรที่ 21-28)



รูปที่ 28 แสดงแผนภาพระบบไตรภาคของไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย glyceryl monostearate (GMS), สารลดแรงตึงผิว (Arlacel[®] 165), สารลดแรงตึงผิวร่วม (isopropyl alcohol) และน้ำ

ตารางที่ 17 แสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของไขมันแข็ง สารลดแรงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำของไมโครอิมัลชันเพื่อใช้เตรียม SLNs

หลอด ที่	GMS	Myrj [®] 52	DSS	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH 40	ethanol	butanol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol	Water
1	10	30	-	-	-	30	-	-	-	30
2	10	25	-	-	-	25	-	-	-	40
3	20	25	-	-	-	25	-	-	-	30
4	10	30	-	-	-	-	30	-	-	30
5	10	15	-	-	-	-	-	-	15	60
6	10	20	-	-	-	-	-	-	20	50
7	10	25	-	-	-	-	-	-	25	40
8	10	30	-	-	-	-	-	-	30	30
9	20	20	-	-	-	-	-	-	20	40
10	20	25	-	-	-	-	-	-	25	30
11	20	-	15	-	-	-	-	15	-	50
12	20	-	20	-	-	-	-	20	-	40
13	20	-	25	-	-	-	-	25	-	30

ตารางที่ 17 (ต่อ) แสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของไขมันแข็ง สารลดแรงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำของไมโครอิมัลชันเพื่อใช้เตรียม SLNs

หลอด ที่	GMS	Myrj [®] 52	DSS	Tween [®] 80	Cremophor [®] RH 40	ethanol	butanol	benzyl alcohol	isopropyl alcohol	Water
14	30	-	15	-	-	-	-	15	-	40
15	20	-	15	-	-	-	-	-	15	50
16	20	-	20	-	-	-	-	-	20	40
17	20	-	25	-	-	-	-	-	25	30
18	30	-	15	-	-	-	-	-	15	40
19	20	-	-	20	-	-	-	-	20	40
20	20	-	-	25	-	-	-	-	25	30
21	10	-	-	-	20	20	-	-	-	50
22	10	-	-	-	25	25	-	-	-	40
23	10	-	-	-	30	30	-	-	-	30
24	20	-	-	-	25	25	-	-	-	30
25	10	-	-	-	20	-	-	-	20	50
26	10	-	-	-	25	-	-	-	25	40
27	10	-	-	-	30	-	-	-	30	30
28	20	-	-	-	25	-	-	-	25	30

4.6 ผลการศึกษาหาสูตรตำรับ SLNs ที่เหมาะสม และการประเมิน

จากการทดลองเตรียม SLNs จากสูตรไมโครอิมัลชันที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.5 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่า SLNs ที่เตรียมได้ มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาว โปร่งแสง ไม่มีเศษไขมันแข็งหรือตะกอน ในหลอดทดลองที่ 1, 2, 6, 7, 8, 21, 22, 23, 25, 26 และ 27 ในหลอดทดลองที่ 19 มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวทึบ ไม่มีเศษไขมันแข็งหรือตะกอน ในหลอดทดลองที่ 3, 4, 5, 9, 10, 20, 24 และ 28 มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาว โปร่งแสง ไม่มีเศษไขมันแข็งหรือตะกอน และในหลอดทดลองที่ 11-18 มีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวทึบ เหลือบมุก มีเศษไขมันแข็ง ลักษณะของ SLNs ในสูตรต่างๆแสดงไว้ในรูปที่ 16-18 ซึ่งเกณฑ์การเลือกสูตร SLNs ที่เหมาะสมพิจารณาจากลักษณะภายนอกของ SLNs หลังเตรียมทันทีร่วมกับสูตรตำรับมีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 400 นาโนเมตร และการกระจายขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.7 ซึ่งหลอดที่ผ่านเกณฑ์คือหลอดที่ 1, 2, 6, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27 และ 28 เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันเพื่อศึกษาความคงตัวพบว่าหลอดทดลองที่ 1 และ 2 มีความคงตัวดี แต่ในหลอดทดลองอื่นๆ เกิด

การนอนก้นของ SLNs แยกเป็น 2 ชั้นคือสารละลายชั้นบนใส และชั้นล่างเป็นตะกอนสีขาว เมื่อนำ SLNs ในหลอดที่ 1 และ 2 ไปวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีตามีค่าเท่ากับ -22.7 ± 1.89 , -23.9 ± 0.971 ตามลำดับ เมื่อทดลองเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมของสูตรในหลอดทดลองที่ 1 และ 2 ที่ความเข้มข้นสารสกัดเปลือกทับทิม 0.05%, 0.1% และ 0.2% พบว่า SLNs สูตรที่ 1 และ 2 ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมทุกความเข้มข้นมีลักษณะเป็นสารละลายสีขาว โปร่งแสง ไม่มีเศษไขมันแข็งหรือตะกอน แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้สักครู่พบว่า SLNs สูตรที่ 1 ที่บรรจุสารสกัดทับทิมทุกความเข้มข้นมีเศษผงของสารสกัดทับทิมตกตะกอนออกมา แต่ SLNs สูตรที่ 2 ที่บรรจุสารสกัดทับทิมทุกความเข้มข้นไม่มีเศษผงของสารสกัดทับทิมตกตะกอนออกมา ดังนั้นจึงเลือก SLNs ในสูตรที่ 2 นำมาบรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม เนื่องจากสามารถบรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวได้และ SLNs ที่ได้มีลักษณะคงตัวมากกว่า

ตารางที่ 58 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ลักษณะภายนอกหลังเตรียมเตรียมได้ และลักษณะภายนอกเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

SLN	หลังเตรียมได้ทันที			ลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายขนาดอนุภาค (PDI ⁺)	ลักษณะทางกายภาพ	
1	258.50 ± 21.90	0.52 ± 0.14	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง
2	129.70 ± 27.13	0.40 ± 0.06	สารละลายสีขาว โปร่งแสง	สารละลายสีขาว โปร่งแสง
3	747.80 ± 87.80	0.18 ± 0.18	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
4	581.70 ± 10.54	0.36 ± 0.27	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
5	728.00 ± 92.68	0.51 ± 0.09	สารละลายสีขาว โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
6	338.00 ± 45.10	0.55 ± 0.09	สารละลายสีขาว โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้

ตารางที่ 68 (ต่อ) แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ลักษณะภายนอกหลังเตรียมเตรียมได้ และ ลักษณะภายนอกเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

SLN	หลังเตรียมได้ทันที			ลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายขนาดอนุภาค (PDI ⁺)	ลักษณะทางกายภาพ	
7	498.10 ± 23.81	0.43 ± 0.02	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
8	511.10 ± 37.08	0.62 ± 0.14	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
9	940.50 ± 167.20	0.56 ± 0.06	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
10	1,027.00 ± 190.20	0.52 ± 0.10	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
11	745.10 ± 602.50	0.81 ± 0.32	สารละลายสีขาวขุ่น ที่บเหลืองมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
12	686.00 ± 481.70	0.77 ± 0.25	สารละลายสีขาวขุ่น ที่บเหลืองมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
13	1313.00 ± 818.90	0.96 ± 0.07	สารละลายสีขาวขุ่น ที่บเหลืองมุก มีเศษไขมันสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
14	443.20 ± 151.10	0.68 ± 0.20	สารละลายสีขาวขุ่น ที่บเหลืองมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
15	511.00 ± 231.90	0.71 ± 0.25	สารละลายสีขาวขุ่น ที่บเหลืองมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้

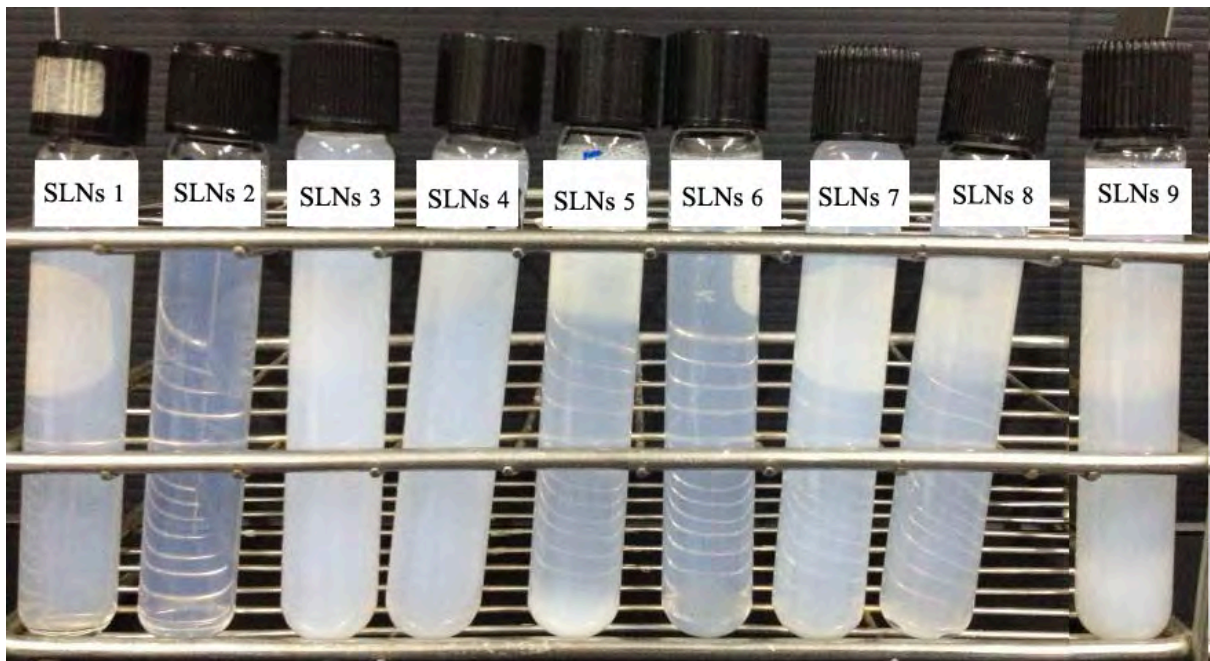
ตารางที่ 78 (ต่อ) แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ลักษณะภายนอกหลังเตรียมเตรียมได้ และ ลักษณะภายนอกเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

SLN	หลังเตรียมได้ทันที			ลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายขนาดอนุภาค (PDI ⁺)	ลักษณะทางกายภาพ	
16	416.70 ± 310.90	0.66 ± 0.23	สารละลายสีขาวขุ่น ทึบ เหลือบมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
17	1,016.00 ± 802.40	0.89 ± 0.11	สารละลายสีขาวขุ่น ทึบ เหลือบมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
18	1,021.00 ± 995.20	0.77 ± 0.20	สารละลายสีขาวขุ่น ทึบ เหลือบมุก มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
19	203.90 ± 13.04	0.40 ± 0.11	สารละลายสีขาวขุ่นทึบ	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
20	517.10 ± 96.41	0.64 ± 0.17	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
21	157.80 ± 11.23	0.54 ± 0.09	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
22	234.50 ± 6.12	0.54 ± 0.04	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
23	248.00 ± 21.64	0.51 ± 0.06	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
24	467.40 ± 100.20	0.54 ± 0.25	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
25	263.20 ± 10.97	0.58 ± 0.09	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้

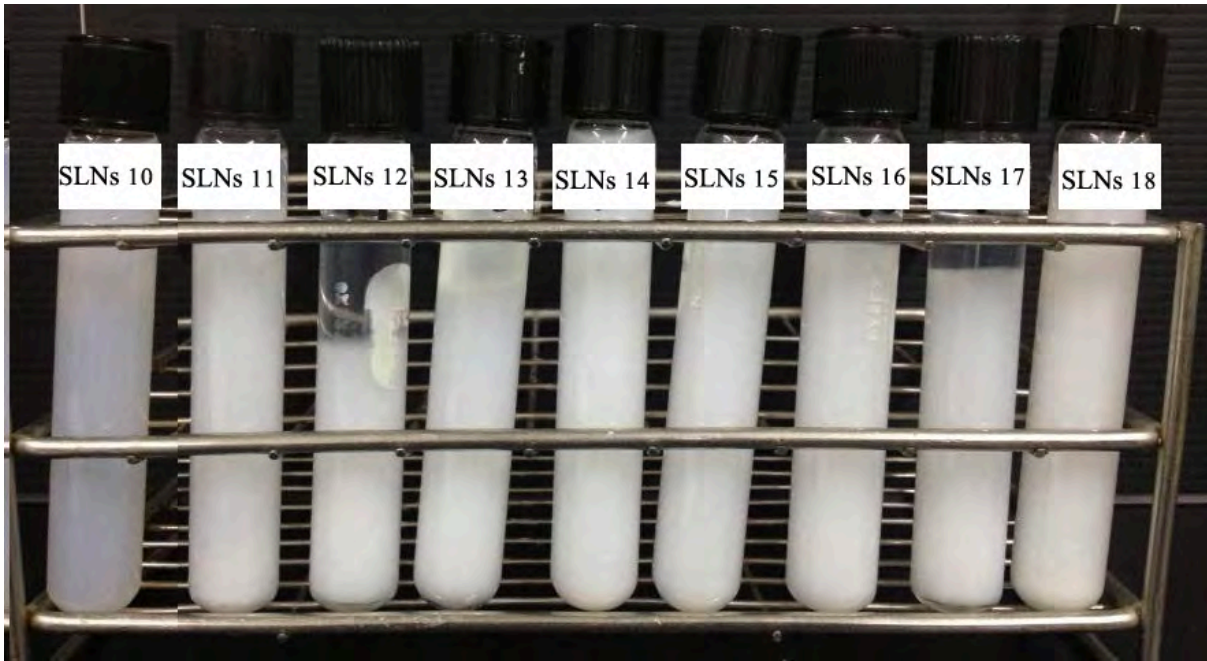
ตารางที่ 88 (ต่อ) แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ลักษณะภายนอกหลังเตรียมเตรียมได้ และ ลักษณะภายนอกเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

SLN	หลังเตรียมได้ทันที			ลักษณะทางกายภาพ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายขนาดอนุภาค (PDI ⁺)	ลักษณะทางกายภาพ	
26	285.40 ± 8.47	0.49 ± 0.10	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
27	368.10 ± 4.88	0.34 ± 0.05	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้
28	291.20 ± 28.45	0.64 ± 0.23	สารละลายสีขาวขุ่น โปร่งแสง มีเศษไขมันแข็งสีขาว	เกิดการนอนก้นของ SLNs เขย่ากลับคืนได้

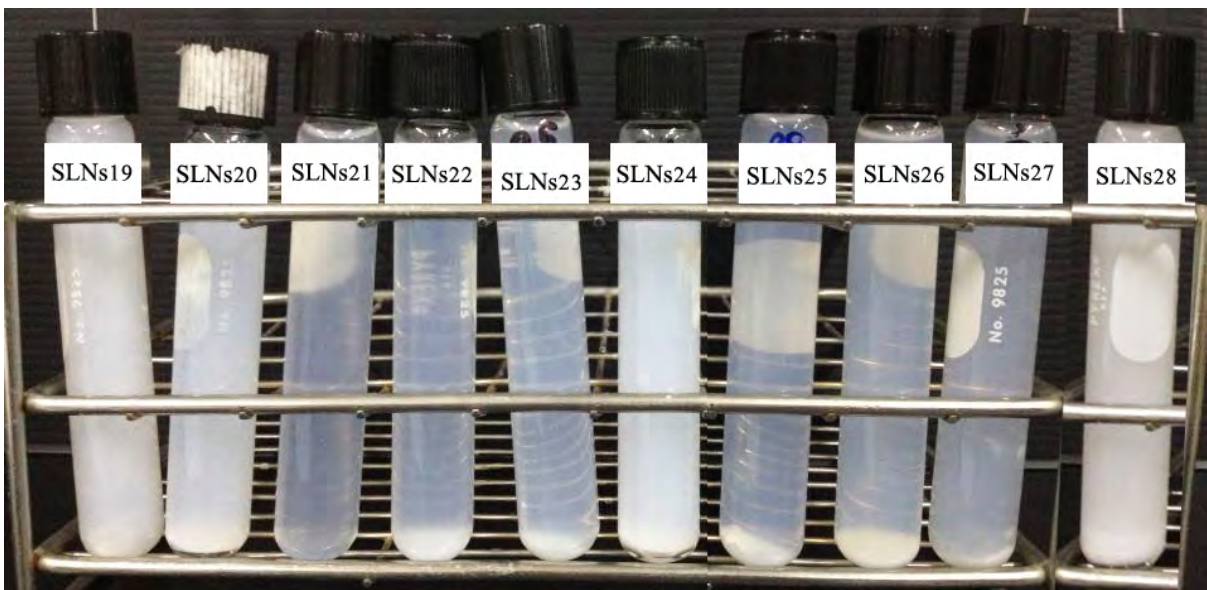
⁺ PDI = polydispersity index



รูปที่ 26 แสดงลักษณะของ SLNs สูตรที่ 1-9 หลังเตรียมได้ทันที



รูปที่ 27 แสดงลักษณะของ SLNs สูตรที่ 10-18 หลังเตรียมได้ทันที



รูปที่ 28 แสดงลักษณะของ SLNs สูตรที่ 19-28 หลังเตรียมได้ทันที

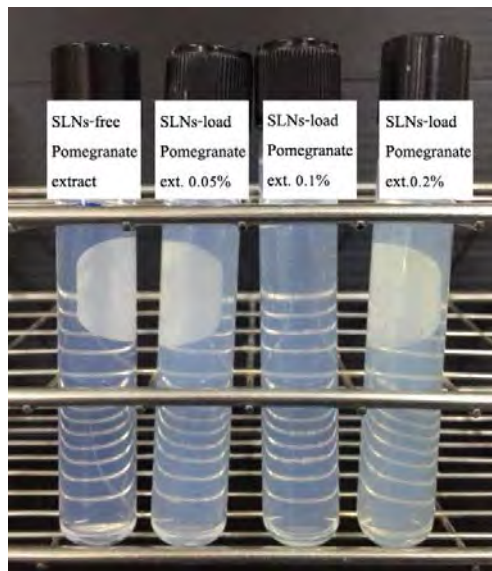
4.7 ผลการเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมและการประเมิน

จากการทดลองเตรียม SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.05%, 0.1% และ 0.2% โดยคิดเป็นความเข้มข้นของสารสกัดในปริมาณน้ำที่ใช้กระจาย พบว่าลักษณะทางกายภาพของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดทุกความเข้มข้นมีลักษณะสีขาว โปร่งแสง ไม่มีเศษผงสารสกัดทับทิมตกออกมา เช่นเดียวกับ SLNs ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม ดังแสดงในรูปที่ 19 เมื่อนำไปวัดขนาดอนุภาค พบว่า SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า SLNs ที่ไม่บรรจุสารสกัด ดังแสดงในตารางที่

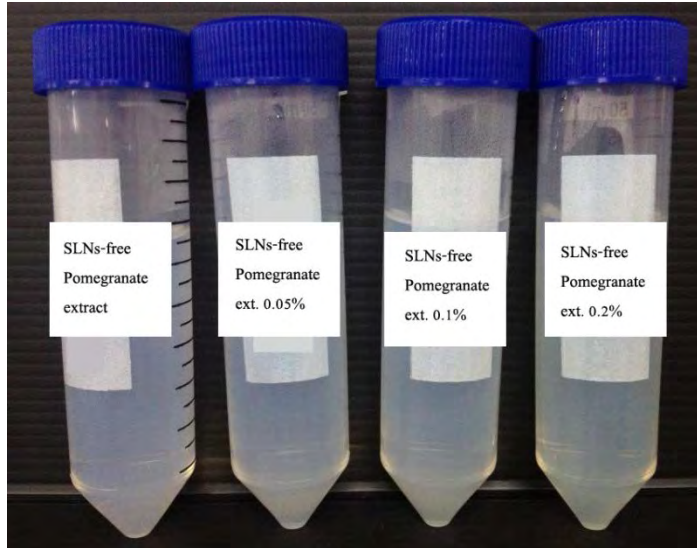
19 อาจเนื่องจากเกิดการกักเก็บสารสกัดทับทิมในอนุภาคของ SLNs จึงทำให้มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน ขนาดอนุภาคของ SLNs ไม่ได้มีแนวโน้มใหญ่ขึ้น อาจเป็น SLNs มีความสามารถในการกักเก็บสารสกัดเปลือกทับทิมได้ในปริมาณจำกัดค่าหนึ่ง เมื่อใส่สารสกัดปริมาณเพิ่มขึ้นจึงไม่สามารถกักเก็บได้เพิ่มขึ้น สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ SLNs ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม อาจแสดงถึงความไม่คงตัวได้ แต่เนื่องจากในสูตรตำรับประกอบไปด้วยสารที่ไม่มีประจุ ได้แก่ glyceryl monostearate, Myrj[®] 52, ethanol รวมถึง ellagic acid ซึ่งเป็นสารสำคัญ ทำให้ไม่สามารถใช้เกณฑ์ประเมินความคงตัวจากค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาได้เหมือนกับสารที่มีประจุ (ค่าค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่มากกว่า |30 มิลลิโวลต์| แสดงว่าระบบมีความคงตัวทางกายภาพดี และค่าที่สูงถึง |60 มิลลิโวลต์| แสดงถึงความคงตัวทางกายภาพดีมากตลอดอายุการใช้) แต่ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่ลดลงนั้น อาจเนื่องมาจากสารอื่นๆ ในสารสกัดเปลือกทับทิมไปมีผลต่อประจุของอนุภาค SLNs เมื่อนำ SLNs ไปผ่านสภาวะเร่งโดยปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะทางกายภาพของ SLNs ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่เกิดการนอนก้นของตะกอนหรือการแยกชั้น ดังแสดงในรูปที่ 20 เมื่อนำไปวัดขนาด การกระจายขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา โดยค่าที่ได้แสดงในตารางที่ 19 พบว่าขนาดอนุภาคก่อนผ่านสภาวะเร่งและหลังสภาวะเร่งที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value 0.033, 0.011 ตามลำดับ ที่ระดับความมั่นใจ 95% ในขณะที่ความเข้มข้น 0.2% ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value 0.975 ที่ระดับความมั่นใจ 95% ส่วนค่าการกระจายขนาดอนุภาคไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนผ่านสภาวะเร่งและหลังผ่านสภาวะเร่ง ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของ SLNs ที่ไม่บรรจุสารสกัดทับทิมมีค่าเพิ่มขึ้นโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหลังผ่านสภาวะเร่ง โดยมีค่า p-value 0.005 ที่ระดับความมั่นใจ 95% แต่ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดทับทิมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนผ่านสภาวะเร่งและหลังผ่านสภาวะเร่ง

ตารางที่ 99 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ของ SLNs เปรียบเทียบระหว่างบรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมกับไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม และเปรียบเทียบก่อนผ่านสภาวะเร่งและหลังผ่านสภาวะเร่ง

SLN	ก่อนผ่านสภาวะเร่ง			หลังผ่านสภาวะเร่ง		
	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (nm)	การกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ย	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาเฉลี่ย (mV)	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (nm)	การกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ย	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาเฉลี่ย (mV)
SLN-extract free	122.23 ± 1.59	0.59 ± 0.01	-22.90 ± 1.57	148.17 ± 4.10	0.44 ± 0.03	-12.37 ± 0.40
SLN-extract loaded 0.05%	126.67 ± 2.20	0.49 ± 0.03	-10.90 ± 0.78	135.23 ± 2.19	0.45 ± 0.08	-11.47 ± 0.70
SLN- extract loaded 0.1%	130.33 ± 1.45	0.46 ± 0.04	-11.30 ± 0.26	122.50 ± 0.82	0.52 ± 0.07	-11.80 ± 0.66
SLN- extract loaded 0.2%	128.97 ± 1.94	0.47 ± 0.05	-12.77 ± 0.25	129.17 ± 8.26	0.49 ± 0.0038	-12.20 ± 0.21



รูปที่ 29 แสดงลักษณะของ SLNs ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม (ซ้ายสุด) และที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.05%, 0.1% และ 0.2% ก่อนผ่านสภาวะเร่ง



รูปที่ 30 แสดงลักษณะของ SLNs ที่ไม่ได้บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม (ซ้ายสุด) และที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.05%, 0.1% และ 0.2% หลังผ่านสภาวะเร่ง

4.8 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs

จากการทดลองหาประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดทับทิม 0.05%, 0.1% และ 0.2% ที่แสดงดังตารางที่ 20 แสดงให้เห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดทับทิมสูงขึ้น มีแนวโน้มค่าประสิทธิภาพการกักเก็บที่ลดลง อาจเนื่องมาจาก ellagic acid สามารถละลายได้ในปริมาณที่จำกัดในไขมัน สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และไม่สามารถละลายได้ในน้ำ การเติมสารสกัดทับทิมเพิ่มขึ้นลงในอัตราส่วนของสูตร SLNs ที่คงที่ จึงไม่สามารถเพิ่มค่าประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ใน SLNs ได้ เมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บสาร ellagic acid ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบอัตราส่วนร้อยละระหว่าง ellagic acid ที่กักเก็บใน SLNs กับปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดเปลือกทับทิมที่ใส่ลงไป จึงทำให้ได้ค่าลดลง

ตารางที่ 20 แสดง % entrapment efficiency ของ SLNs ที่ประกอบด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม 0.05%, 0.10% และ 0.20%

ปริมาณสารสกัดเปลือกทับทิมที่ใส่ใน SLNs	% entrapment efficiency
0.05%	65.53
0.10%	40.93
0.20%	27.80

4.9 ผลการศึกษาความคงตัวของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม

จากการศึกษาความคงตัวของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05%, 0.1% และ 0.2% ในสภาวะเร่ง พบว่า SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมทุกความเข้มข้นมีลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 20 และเมื่อนำ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05%, 0.1% และ 0.2% วัดขนาดอนุภาคพบว่า SLNs มีขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงไปดังแสดงในตารางที่ 18 เมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคก่อนและหลังผ่านสภาวะเร่งของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% มีขนาดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความมั่นใจ 95% ในขณะที่ความเข้มข้น 0.2% ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความมั่นใจ 95% จากผลการศึกษาความคงตัวดังกล่าวไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าสูตร SLNs ที่เลือกมีความคงตัวหรือไม่ ดังนั้นควรศึกษาความคงตัวของ SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมในสภาวะปกติเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลซึ่งการเก็บรักษาสูตร SLNs ที่ประกอบไปด้วย ellagic acid เป็นสารสำคัญ ควรเก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสงและความชื้น เพื่อป้องกันการสลายตัวของ ellagic acid เมื่อสัมผัสกับความชื้นหรือแสง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยการเตรียม SLNs ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากทับทิมสำหรับทำให้ผิวขาว โดยมีสารสำคัญคือ ellagic acid ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปลี่ยน L-tyrosine ให้เป็น L-DOPA และเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopaquinone ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างเมลานินทั้ง 2 ชนิด คือ eumelanin และ pheomelanin ดังนั้น ellagic acid จึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์สำหรับทำให้ผิวขาว

สารสกัดเปลือกทับทิมที่สกัดได้น้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 1.46 ของเปลือกทับทิมอบแห้ง และเมื่อทำการวัดปริมาณของ ellagic acid พบว่าในสารสกัดเปลือกทับทิมประกอบด้วย ellagic acid ร้อยละ 6.23 ซึ่งเมื่อนำสารสกัดเปลือกทับทิมไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% หรือ ค่า IC_{50} นั้นมีค่าเท่ากับ 0.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับทำให้ผิวขาวได้

การศึกษาการเตรียม SLNs เริ่มต้นจากการศึกษาหาความเข้ากันได้ของส่วนประกอบที่ใช้เตรียม SLNs นั่นคือ ไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิว ร่วมกับ สารสกัดเปลือกทับทิม ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ไขมันแข็งที่เข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม ได้แก่ glyceryl monostearate สารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม ได้แก่ Myrj[®] 52, dioctyl sodium sulfosuccinate, Tween[®] 80, Cremophor[®] RH 40 และ Arlacel[®] 165 และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เข้ากันได้กับสารสกัดเปลือกทับทิม ได้แก่ ethanol, n-butyl alcohol, benzyl alcohol และ isopropyl alcohol เมื่อศึกษาการเตรียม SLNs ด้วยเทคนิคไมโครอิมัลชัน และคัดเลือกลูกระจุยโดยพิจารณาจาก ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-400 นาโนเมตร การกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.7 และมีความคงตัวเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าสูตรในการเตรียม SLNs ที่เหมาะสมประกอบด้วย

glyceryl monostearate	10%
Myrj [®] 52	25%
ethanol	25%

จากนั้นจึงทำการศึกษาการเตรียม SLNs สูตรที่เหมาะสมร่วมกับสารสกัดเปลือกทับทิม โดยใช้ปริมาณสารสกัดเปลือกทับทิมที่แตกต่างกัน คือ 0.05%, 0.1% และ 0.2% ของน้ำหนัก SLNs หลังจากกระจายในน้ำเย็น เมื่อนำไปวัดขนาดอนุภาค พบว่า SLNs ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า SLNs ที่ไม่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิม (p-value เท่ากับ 0.178, 0.03 และ 0.034 ที่ระดับความมั่นใจ 95% ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิม 0.05%, 0.1% และ 0.2% ตามลำดับ) เมื่อทำการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง โดยสภาวะเร่งที่ใช้คือการปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะทางกายภาพของ SLNs ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่เกิดการนอนกันหรือการแยกชั้น แต่เมื่อวัดขนาดอนุภาค พบว่าขนาดอนุภาคก่อนและหลังผ่านสภาวะเร่งของ SLNs ที่มีสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value เท่ากับ 0.033 และ 0.011 ตามลำดับ ที่ระดับความมั่นใจ 95%) ในขณะที่ SLNs ที่มีสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.2% ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value เท่ากับ 0.975 ที่ระดับความมั่นใจ 95%) เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บ ellagic acid ของ SLNs พบว่า SLNs ที่มีสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05% , 0.1% และ 0.2% มีประสิทธิภาพการกักเก็บ 65.53%, 40.93% และ 27.81% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะและแนวทางการพัฒนาโครงการวิจัย

1. วิธีการสกัดสารสำคัญจากเปลือกทับทิมที่นำมาใช้เป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดเวลา แต่สารสกัดที่ได้ยังมีปริมาณ ellagic acid น้อย ส่งผลให้ต้องใส่สารสกัดเปลือกทับทิมปริมาณมากในสูตรตำรับเพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งปริมาณของสารสกัดเปลือกทับทิมที่มากนี้อาจส่งผลต่อคุณลักษณะและความคงตัวของ SLNs ได้ นอกจากนี้ปริมาณ ellagic acid ที่น้อยอาจทำให้ยากต่อการตรวจจับทำให้ต้องใช้เครื่องมือที่มีความไวสูงในการวัดปริมาณ ดังนั้นควรศึกษาหาวิธีสกัดอื่นที่สามารถสกัด ellagic acid ออกมาจากเปลือกทับทิมได้มากกว่านี้

2. ควรมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อระบบของ SLNs เพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่างไมโครอิมัลชันที่ร้อนและน้ำเย็น ความเร็วรอบในการปั่น เวลาที่ใช้ปั่น อัตราส่วนไมโรอิมัลชันที่ร้อนต่อปริมาณน้ำเย็นที่กระจาย เป็นต้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีความเหมาะสมต่างกันไปในแต่ละระบบ ซึ่งจากการศึกษาจากแหล่งข้อมูลอื่นอาจได้ผลที่ไม่ได้เหมาะสมกับระบบอย่างแท้จริง อาจส่งผลต่อคุณลักษณะและความคงตัวของ SLNs ได้

3. ศึกษาส่วนประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม SLNs เพิ่มเติม ทั้งชนิดของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม เนื่องจากอาจจะทำให้สามารถกักเก็บ ellagic acid ได้มากขึ้นและ/หรือทำให้ SLNs ที่เตรียมได้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น

3. การศึกษาความคงตัวของ SLNs ส่วนใหญ่มักจะนำ SLNs ไปผ่านกระบวนการ lyophilization หรือ spray drying เพื่อให้แห้งก่อนจะเก็บไว้ จึงอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความคงตัวของ SLNs หลังผ่านกระบวนการเหล่านี้ ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเร่งที่เหมาะสม

4. พัฒนาสูตรตำรับที่ประกอบด้วย ellagic acid ในรูปแบบอื่นๆ โดยนำความรู้ทางเภสัชกรรมและเทคโนโลยีใหม่ๆ มาประยุกต์ใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Aslam MN, Lansky EP, Varani J. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;103(3):311-8.
2. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*. 2006;96(2):254-60.
3. Daniel EM, Krupnick AS, Heur Y-H, Blinzler JA, Nims RW, Stoner GD. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1989;2(4):338-49.
4. Shimogaki, Tanaka, Tamai, Masuda. In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *International Journal of Cosmetic Science*. 2000;22(4):291-303.
5. Junyaprasert VB, Singhsa P, Suksiriworapong J, Chantasart D. Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;423(2):303-11.
6. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;40(1):206-10.
7. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2000;50(1):161-77. Epub 2000/06/07.
8. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2009;71(4):349-58. Epub 2010/05/27.
9. Jablonski NG. THE EVOLUTION OF HUMAN SKIN AND SKIN COLOR. *Annual Review of Anthropology*. 2004;33(1):585-623.
10. Jen-Wen Lin H-MC, Yi-Chun Lin, Kuo-Ching Wen. Natural Products with Skin – Whitening Effects. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008;16(2):1-10.
11. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*. 2011;127(2):807-21.
12. Jain V, Murugananthan G, Deepak M, Viswanatha GL, Manohar D. Isolation and Standardization of Various Phytochemical Constituents from Methanolic Extracts of Fruit Rinds of *Punica granatum*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011;9(6):414-20.

13. Qu W, Breksa Iii AP, Pan Z, Ma H. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*. 2012;132(3):1585-91.
14. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(10):4581-9. Epub 2000/10/29.
15. Leonardo Sepúlveda AA, Raúl Rodríguez-Herrera, Antonio Aguilera-Carbó, Cristóbal N. Aguilar1*. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(22):4518-23.
16. Al-Zoreky NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;134(3):244-8.
17. Lei F ZX, Wang DM, Xie WD, Su H, Du LJ. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity* 2007;31(6):1023-9.
18. Kasai K, Yoshimura M, Koga T, Arai M, Kawasaki S. Effects of Oral Administration of Ellagic Acid-Rich Pomegranate Extract on Ultraviolet-Induced Pigmentation in the Human Skin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2006;52(5):383-8.
19. Vijay Kumar Sharma AD, Satish Sardana, Vipin Dhall. Solid Lipid Nanoparticles System: An overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2011;2(3):450-61.
20. Vivek Ranjan Sinha SS, Honey Goel, Vinay Jindal. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. *International Journal of Advance in Pharmaceutical Sciences*. 2010;1(3).
21. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54 Suppl 1:S131-55. Epub 2002/12/04.
22. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;47(2-3):165-96.
23. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยีการนำส่งทางผิวหนัง (NANOTECHNOLOGY SKIN DELIVERY)2555.

ภาคผนวก ก

Glyceryl monostearate

synonym: glycerin monostearate; glycerol monostearate; monostearin; octadecanoate acid, monoester with 1,2,3-propanetriol

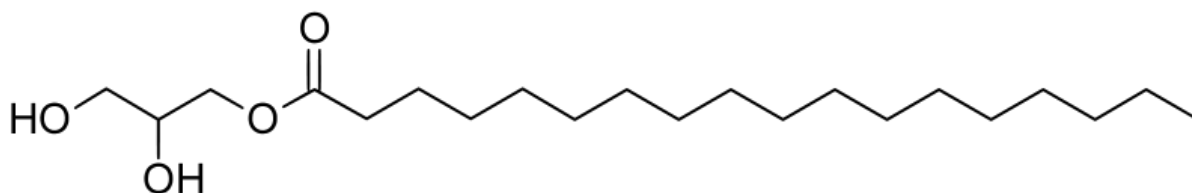
ชื่อทางเคมี: glyceryl monostearate

สูตรเคมี: $C_{21}H_{42}O_4$

CAS Register number: 31566-31-1

น้ำหนักโมเลกุล: 358.63

สูตร โครงสร้าง:



ลักษณะสาร: ของแข็ง สีขาวขุ่น

จุดหลอมเหลว: 58-59 °c

การละลาย: ละลายใน ethanol ที่ร้อน, diethyl ether, benzene, acetone, mineral หรือ fixed oils, ไม่ละลายน้ำ

Myrj[®] 52

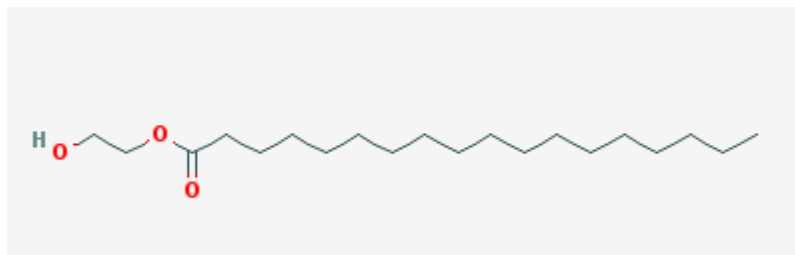
synonym: Polyoxyethylene 40 stearate; Polyethylene glycol monostearate

ชื่อทางเคมี: Polyoxyethylene (40) Stearate

สูตรเคมี: $C_{20}H_{40}O_3$

CAS Register number: 9004-99-3

น้ำหนักโมเลกุล: 328.54



สูตร โครงสร้าง:

ลักษณะสาร: ของแข็งสีขาว ลักษณะเป็นแว็กซ์ ไม่มีกลิ่น หรือมีกลิ่นคล้ายไขมันเล็กน้อย

จุดหลอมเหลว: 37.2°C

การละลาย: ละลายในน้ำ, แอลกอฮอล์, ether และ acetone ไม่ละลายใน mineral oil และ vegetable oils.

Ethanol

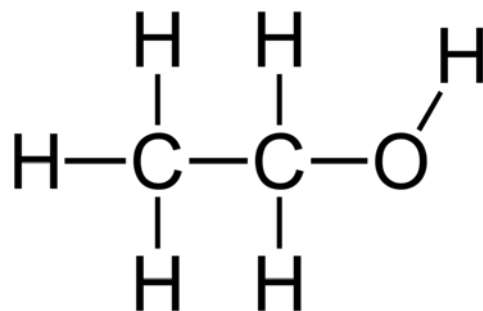
Synonym: ethyl alcohol, ethyl hydroxide, Grain alcohol

ชื่อทางเคมี: ethyl alcohol

CAS Register number: 64-17-5

สูตรเคมี: C_2H_6O

น้ำหนักโมเลกุล: 46.07



สูตร โครงสร้าง:

ลักษณะสาร: ของเหลวใสไม่มีสี สามารถระเหยได้ มีกลิ่นเล็กน้อย

จุดเดือด: $78.5^{\circ}C$

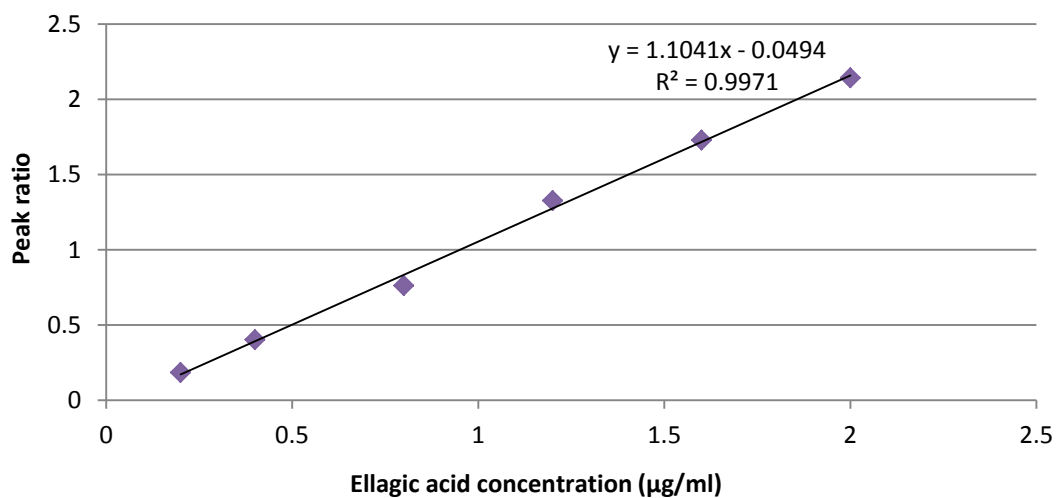
การละลาย: เข้ากันได้กับน้ำ

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณ ellagic acid ในสารสกัดทับทิมด้วยวิธี HPLC

1. กราฟมาตรฐานของ ellagic acid

กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ellagic acid (แกน x) กับอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้กราฟของ ellagic acid ต่อพื้นที่ที่ได้กราฟของ internal standard จาก HPLC chromatogram (แกน y) ได้สมการเส้นตรง $y = 1.1041x - 0.0494$ และ $R^2 = 0.9971$



2. พื้นที่ที่ได้กราฟของโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดเปลือกทับทิม

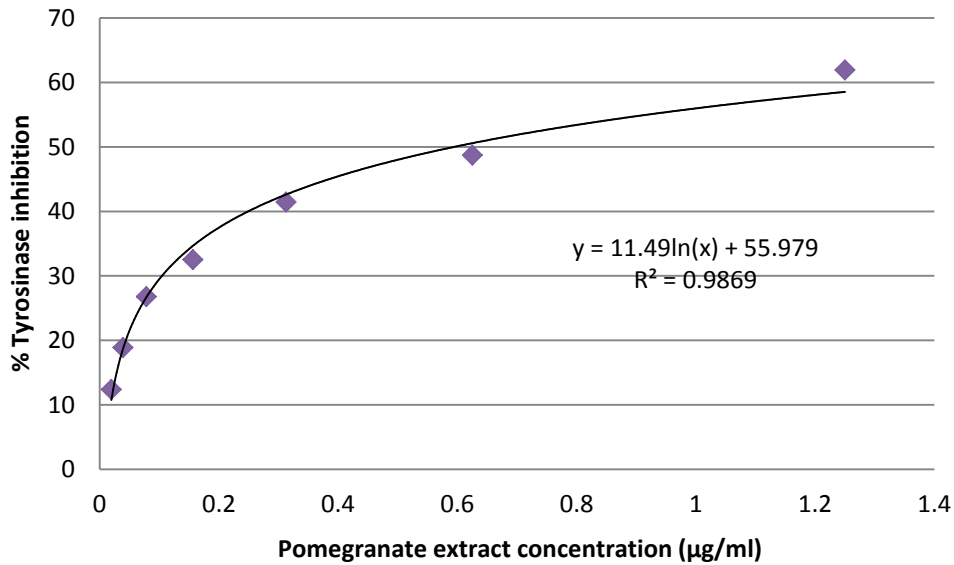
ตัวอย่างที่	พื้นที่ที่ได้กราฟของ ellagic acid	พื้นที่ที่ได้กราฟของ propyl paraben	อัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้กราฟ
1	264563	199008	1.33
2	250188	180680	1.38
3	225985	167743	1.35

ภาคผนวก ค

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกทับทิม

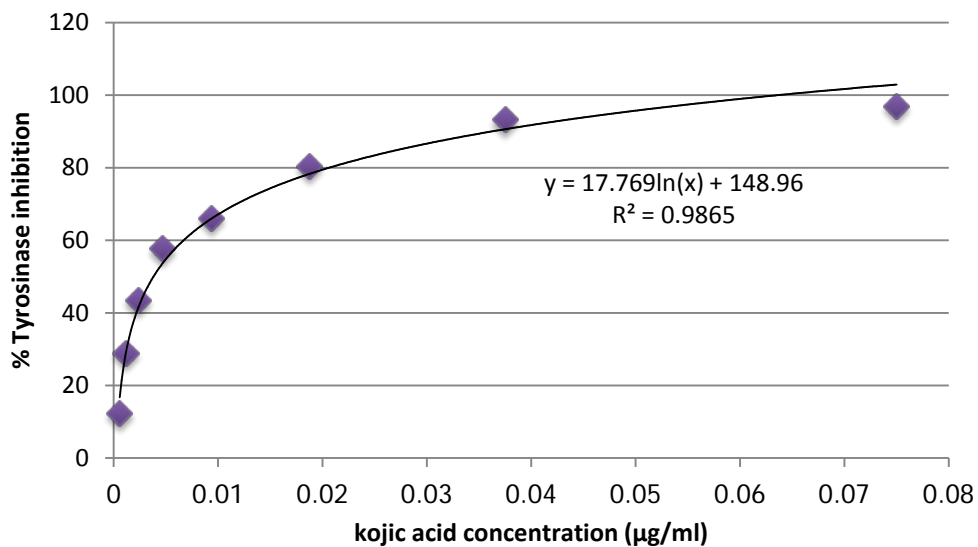
1. กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมกับ % tyrosinase inhibition

เมื่อพล็อตกราฟและลากเส้นแนวโน้มลอการิทึมจะได้ สมการเส้นแนวโน้ม คือ $y = 11.49 \ln(x) + 135.35$ และ $R^2 = 0.9869$



2. กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย kojic acid กับ % tyrosinase inhibition

เมื่อพล็อตกราฟและลากเส้นแนวโน้มลอการิทึมจะได้ สมการเส้นแนวโน้ม คือ $y = 17.769 \ln(x) + 148.96$ และ $R^2 = 0.9865$



ภาคผนวก ง

อัตราส่วนของไขมันแข็ง, สารลดแรงตึงผิว, สารลดแรงตึงผิวร่วม

และน้ำในระบบไมโครอิมัลชัน

ตารางแสดงน้ำหนักของไขมันแข็ง สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำสำหรับการสร้างแผนภาพระบบไตรภาค

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
L-S1-C1	9:1	1.806	0.102	0.102	0.492
	8:2	1.607	0.202	0.201	0.760
	7:3	1.404	0.301	0.303	0.610
	6:4	1.201	0.411	0.397	0.976
	5:5	1.000	0.505	0.513	0.694
	4:6	0.809	0.601	0.610	0.927
	3:7	0.604	0.700	0.701	1.077
	2:8	0.409	0.802	0.804	1.547
	1:9	0.203	0.905	0.904	1.878
L-S1-C2	9:1	1.812	0.104	0.103	0.785
	8:2	1.603	0.201	0.230	0.116
	7:3	1.406	0.304	0.297	0.198
	6:4	1.202	0.417	0.408	0.883
	5:5	1.012	0.511	0.501	0.798
	4:6	0.815	0.603	0.606	1.155
	3:7	0.605	0.705	0.707	0.893
	2:8	0.402	0.789	0.810	0.971
	1:9	0.200	0.902	0.918	1.058
L-S1-C3	9:1	1.814	0.106	0.102	0.259

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
L-S1-C3	8:2	1.598	0.201	0.218	0.138
	7:3	1.399	0.299	0.314	0.069
	6:4	1.201	0.403	0.396	0.749
	5:5	1.002	0.499	0.512	0.691
	4:6	0.812	0.602	0.597	0.427
	3:7	0.601	0.716	0.709	0.576
	2:8	0.415	0.825	0.826	0.624
	1:9	0.207	0.921	0.901	0.612
L-S1-C4	9:1	1.794	0.109	0.102	0.121
	8:2	1.606	0.233	0.208	0.341
	7:3	1.413	0.293	0.303	0.792
	6:4	1.217	0.429	0.420	1.353
	5:5	1.049	0.529	0.508	1.629
	4:6	0.813	0.597	0.603	2.413
	3:7	0.592	0.699	0.701	3.160
	2:8	0.404	0.801	0.810	5.400
	1:9	0.209	0.906	0.899	-
L-S2-C1	9:1	1.804	0.102	0.113	0.328
	8:2	1.598	0.193	0.200	0.54
	7:3	1.409	0.293	0.306	0.854
	6:4	1.199	0.393	0.413	1.422
	5:5	1.004	0.504	0.499	-
	4:6	0.799	0.624	0.600	0.143
	3:7	0.599	0.705	0.701	0.075
	2:8	0.409	0.806	0.796	0.126
	1:9	0.206	0.921	0.904	0.073
L-S2-C2	9:1	1.786	0.107	0.107	0.564

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
	8:2	1.617	0.216	0.208	0.752
	7:3	1.407	0.298	0.303	0.737
	6:4	1.199	0.400	0.398	2.766
	5:5	0.999	0.498	0.502	2.456
	4:6	0.816	0.618	0.604	5.421
	3:7	0.599	0.706	0.698	8.058
	2:8	0.394	0.792	0.803	0.687
	1:9	0.191	0.904	0.899	0.13
L-S2-C3	9:1	1.811	0.092	0.121	0.555
	8:2	1.617	0.206	0.205	1.120
	7:3	1.393	0.321	0.301	1.383
	6:4	1.214	0.388	0.416	1.747
	5:5	1.019	0.505	0.497	2.556
	4:6	0.800	0.606	0.605	4.318
	3:7	0.608	0.717	0.705	-
	2:8	0.414	0.804	0.802	-
	1:9	0.199	0.911	0.917	-
L-S2-C4	9:1	1.805	0.113	0.110	0.715
	8:2	1.604	0.212	0.205	0.709
	7:3	1.396	0.328	0.309	0.721
	6:4	1.217	0.410	0.410	1.599
	5:5	1.025	0.523	0.506	2.493
	4:6	0.802	0.587	0.603	4.188
	3:7	0.614	0.707	0.710	-
	2:8	0.397	0.819	0.810	-
	1:9	0.217	0.912	0.899	0.215
L-S3-C1	9:1	1.808	0.119	0.110	0.277

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
	8:2	1.615	0.207	0.203	0.289
	7:3	1.392	0.300	0.298	0.413
	6:4	1.210	0.404	0.408	0.45
	5:5	1.029	0.516	0.495	0.448
	4:6	0.800	0.605	0.605	0.422
	3:7	0.591	0.705	0.711	0.808
	2:8	0.407	0.809	0.821	0.78
	1:9	0.207	0.913	0.898	0.975
L-S3-C2	9:1	1.796	0.104	0.110	0.223
	8:2	1.599	0.198	0.204	0.213
	7:3	1.418	0.312	0.306	0.238
	6:4	1.206	0.421	0.412	0.281
	5:5	1.005	0.496	0.505	0.337
	4:6	0.799	0.611	0.608	0.417
	3:7	0.597	0.719	0.715	0.548
	2:8	0.402	0.800	0.804	0.612
	1:9	0.208	0.918	0.901	0.676
L-S3-C4	9:1	1.799	0.113	0.099	0.305
	8:2	1.596	0.201	0.201	0.259
	7:3	1.410	0.308	0.308	0.409
	6:4	1.208	0.431	0.405	0.471
	5:5	1.013	0.524	0.496	0.449
	4:6	0.813	0.613	0.600	1.498
	3:7	0.615	0.728	0.727	2.120
	2:8	0.400	0.795	0.796	-
	1:9	0.202	0.918	0.897	-
L-S4-C1	9:1	1.801	0.113	0.099	0.206

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
	8:2	1.615	0.202	0.220	0.296
	7:3	1.395	0.319	0.307	0.257
	6:4	1.210	0.397	0.396	0.364
	5:5	1.001	0.523	0.534	0.428
	4:6	0.804	0.601	0.606	0.709
	3:7	0.607	0.695	0.705	1.772
	2:8	0.395	0.795	0.796	2.527
	1:9	0.198	0.904	0.918	5.405
L-S4-C2	9:1	1.794	0.120	0.101	0.385
	8:2	1.624	0.207	0.202	0.219
	7:3	1.395	0.330	0.295	0.337
	6:4	1.213	0.410	0.398	0.282
	5:5	1.008	0.501	0.496	0.398
	4:6	0.815	0.612	0.605	11.635
	3:7	0.621	0.697	0.697	0.560
	2:8	0.419	0.814	0.807	0.613
	1:9	0.206	0.915	0.895	0.889
L-S4-C4	9:1	1.798	0.098	0.097	0.566
	8:2	1.592	0.201	0.206	0.310
	7:3	1.395	0.304	0.297	0.465
	6:4	1.200	0.398	0.403	0.419
	5:5	1.020	0.505	0.503	0.288
	4:6	0.806	0.598	0.605	0.537
	3:7	0.598	0.724	0.696	2.412
	2:8	0.414	0.802	0.794	5.006
	1:9	0.200	0.891	0.901	-
L-S5-C4	9:1	1.807	0.100	0.110	0.197

formula code	อัตราส่วน solid lipid: mixed surfactant	ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (g)			
		solid lipid	surfactant	co-surfactant	water
L-S5-C4	8:2	1.607	0.195	0.200	0.177
	7:3	1.412	0.300	0.308	0.186
	6:4	1.200	0.397	0.404	0.211
	5:5	1.009	0.503	0.510	0.236
	4:6	0.818	0.597	0.609	0.279
	3:7	0.607	0.701	0.704	0.245
	2:8	0.408	0.825	0.812	0.290
	1:9	0.217	0.92	0.903	0.278

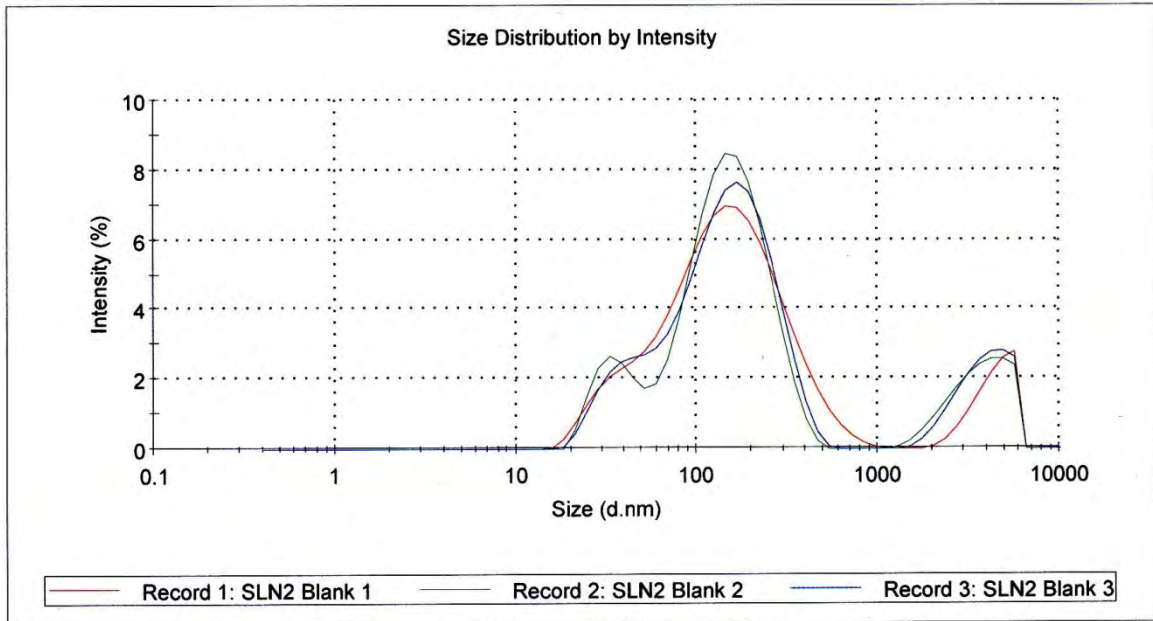
กำหนดให้ L แทน glyceryl monostearate, S แทน สารลดแรงตึงผิว โดย Myrij[®] 52: S1; dioctyl sodium sulfosuccinate: S2; Tween[®] 80: S3; Cremophor[®] RH 40: S4; Arlacel[®] 165: S5 และ C แทนสารลดแรงตึงผิวร่วม โดย ethanol: C1; n-butyl alcohol: C2; benzyl alcohol: C3; isopropyl alcohol: C4

ภาคผนวก จ

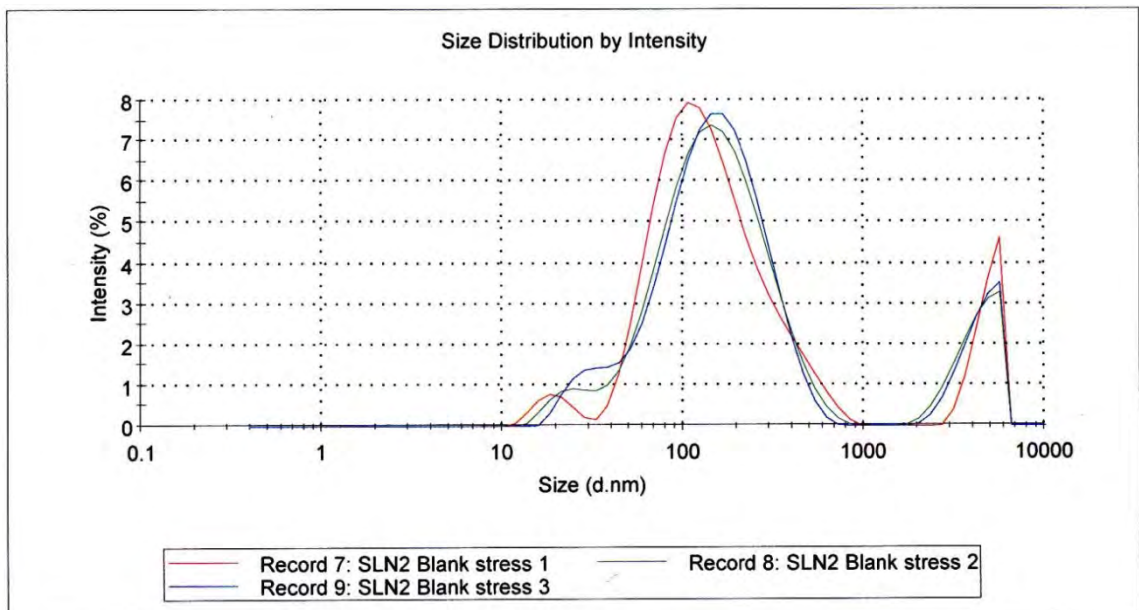
กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของ SLNs

1. กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาค SLNs ซึ่งประกอบด้วย Glycerol monostearate (GMS), Myrj[®] 52, Ethanol และน้ำ ที่เวลาแตกต่างกัน ดังนี้

1.1 หลังเตรียมได้ทันที

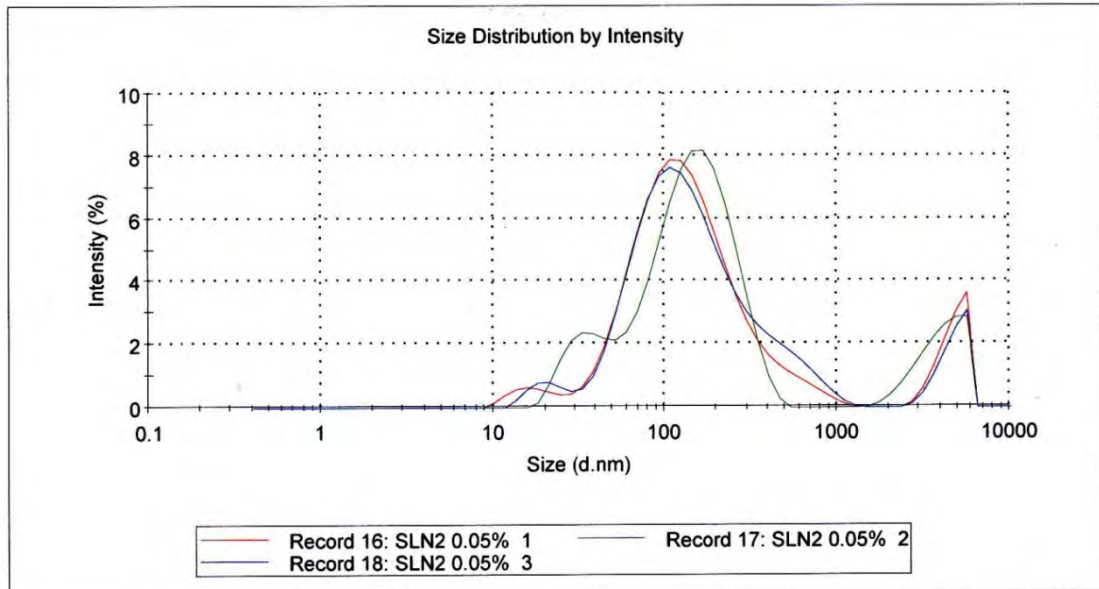


- 1.2 หลังผ่านสภาวะแรง โดยการปั่นเหวี่ยงด้วย อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

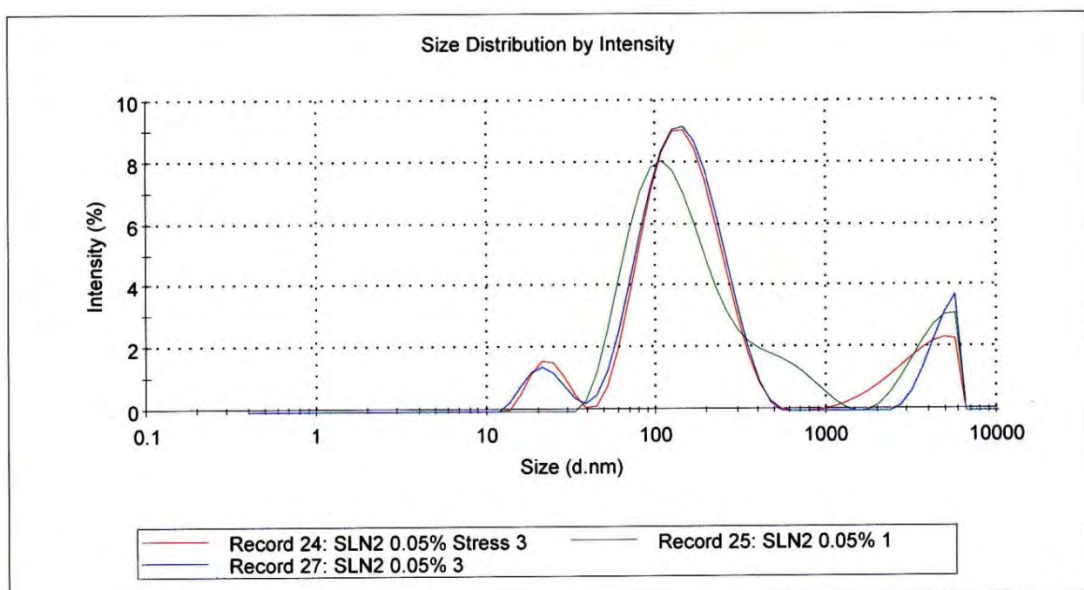


2. กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาค SLNs ซึ่งประกอบด้วย Glycerol monostearate (GMS), Myrj[®] 52, Ethanol และน้ำ ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.05%

2.1. หลังเตรียมได้ทันที

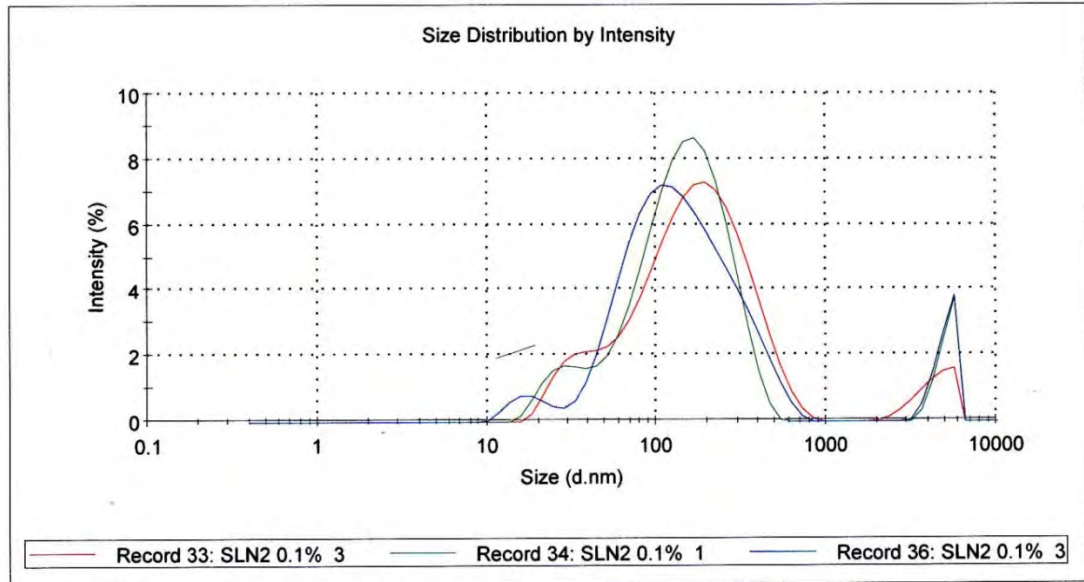


2.2. หลังผ่านสภาวะเร่งโดยการปั่นเหวี่ยงด้วย อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

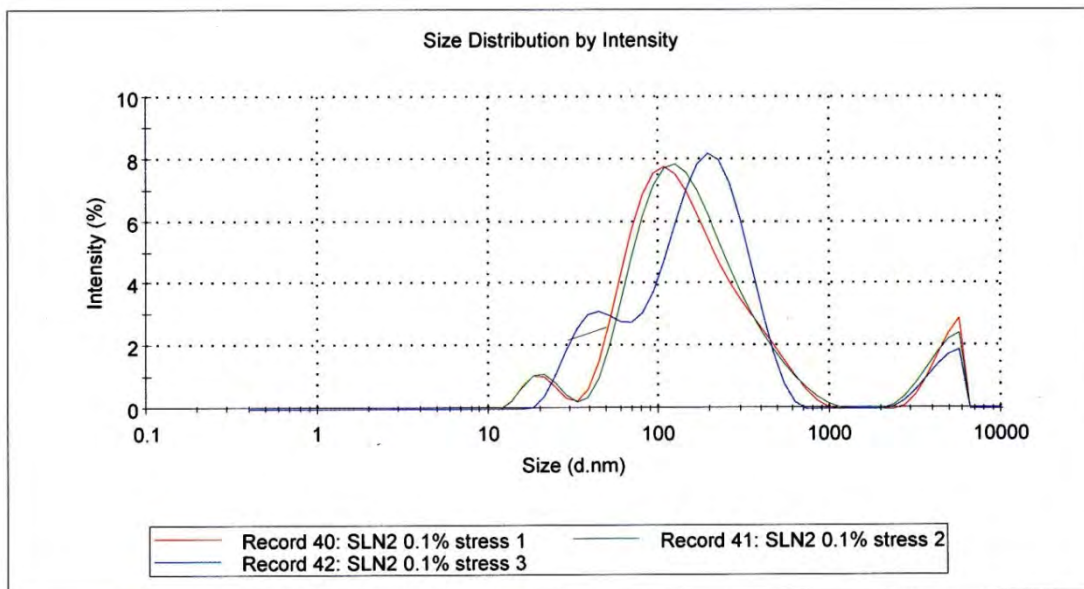


3. กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาค SLNs ซึ่งประกอบด้วย Glycerol monostearate (GMS), Myrj[®] 52, Ethanol และน้ำ ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.1%

3.1. หลังเตรียมได้ทันที

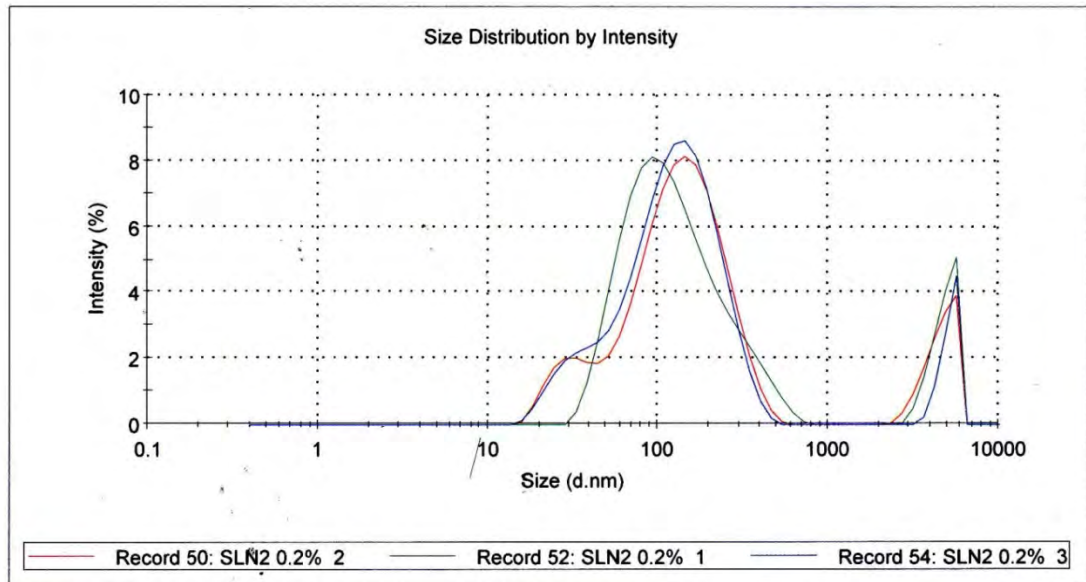


3.2. หลังผ่านสภาวะแรง โดยการปั่นเหวี่ยงด้วย อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

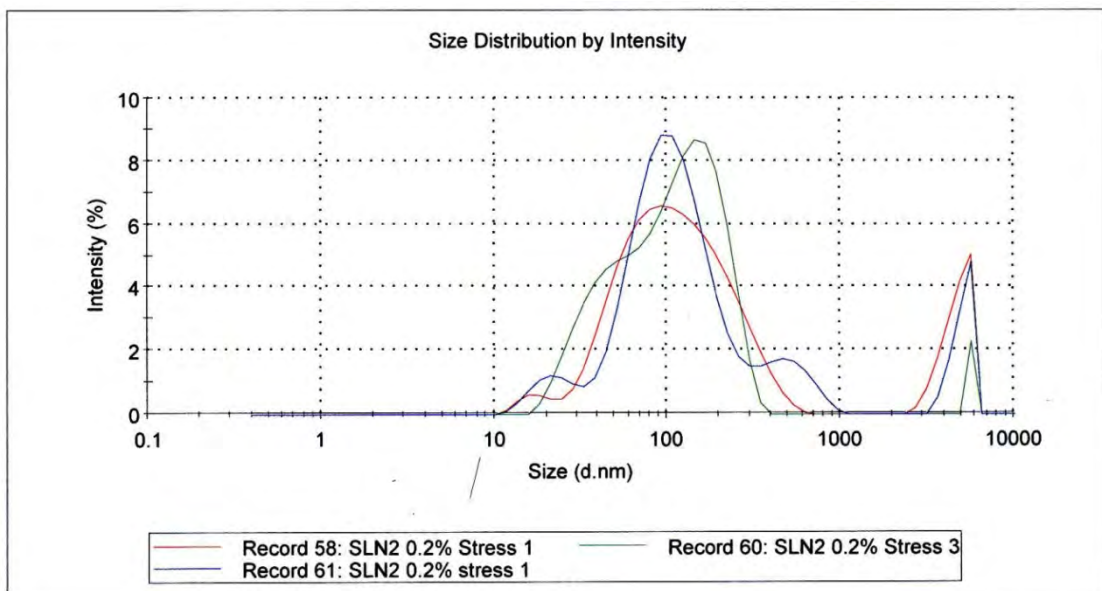


4. กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาค SLNs ซึ่งประกอบด้วย Glycerol monostearate (GMS), Myrj[®] 52, Ethanol และน้ำ ที่บรรจุสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้น 0.2%

4.1. หลังเตรียมได้ทันที



4.2. หลังผ่านสภาวะแรงโดยการปั่นเหวี่ยงด้วย อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

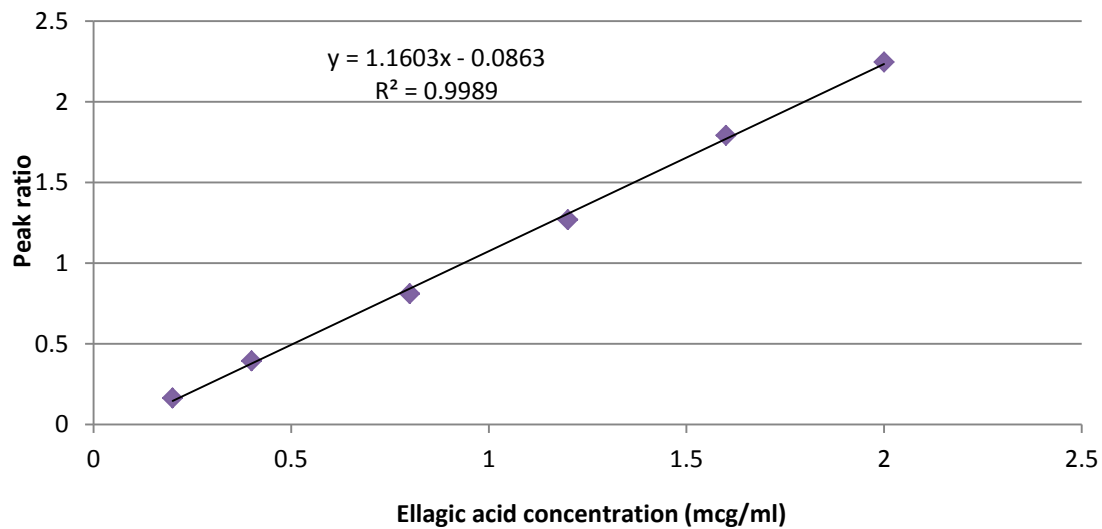


ภาคผนวก ฉ

การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บของ SLNs

1. กราฟมาตรฐานของ ellagic acid

กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ellagic acid (แกน X) กับอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้กราฟของ ellagic acid ต่อพื้นที่ที่ได้กราฟของ internal standard จาก HPLC chromatogram (แกน Y) ได้สมการเส้นตรง $y=1.1603x-0.0863$ และ $R^2=0.9989$



2. ความเข้มข้นของ ellagic acid ใน SLNs และในสูตรตำรับที่ประกอบด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม 0.05% ปริมาณ 3 กรัม

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของ ellagic acid ที่กักเก็บได้ใน SLNs ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นของ ellagic acid ทั้งหมดในสูตรตำรับ ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.088	0.14
2	0.096	0.14
3	0.094	0.15
ค่าเฉลี่ย	0.093	0.14
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.004	0.0061

3. ความเข้มข้นของ ellagic acid ใน SLNs และในสูตรตำรับที่ประกอบด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม 0.1% ปริมาณ 3 กรัม

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของ ellagic acid ที่กักเก็บได้ใน SLNs ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นของ ellagic acid ทั้งหมดในสูตรตำรับ ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.091	0.23
2	0.10	0.25
3	0.10	0.24
ค่าเฉลี่ย	0.098	0.24
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0066	0.011

4. ความเข้มข้นของ ellagic acid ใน SLNs และในสูตรตำรับที่ประกอบด้วยสารสกัดเปลือกทับทิม 0.2% ปริมาณ 3 กรัม

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของ ellagic acid ที่กักเก็บได้ใน SLNs ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นของ ellagic acid ทั้งหมดในสูตรตำรับ ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.11	0.39
2	0.10	0.37
3	0.11	0.38
ค่าเฉลี่ย	0.11	0.38
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0020	0.010