การพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซม

DEVELOPMENT OF GLYCYRRHIZA GLABRA EXTRACT IN LIPOSOME FORM

โดย

ขจีธัญชินี หนานิรันดร์กุล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2562

DEVELOPMENT OF GLYCYRRHIZA GLABRA EXTRACT IN LIPOSOME FORM

BY

KAGEETUNCHINEE NANIRANKUL

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE

COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2019

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซม

โดย

ขจีธัญชินี หนานิรันดร์กุล

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2562

รศ.ดร.รัฐพล อายาสุจริต
ประธานกรรมการสอบ

รศ.ดร.สิริมา กิจวัฒนชัย
กรรมการ

ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ร.ต.หญิง ดร.วรรณี ศุขสาตร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
23 สิงหาคม 2562

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Thesis entitled

DEVELOPMENT OF GLYCYRRHIZA GLABRA EXTRACT IN LIPOSOME FORM

by

KAGEETUNCHINEE NANIRANKUL

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University
Academic Year 2019

Assoc. Prof. Rathapon Asasutjarit, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Assoc. Prof. Sirima Kitwatanachai, Ph.D.
Member

Asst. Prof. Prasan Tangyuenyongwatana, Ph.D.
Member and Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vannee Sooksatra, D.Eng.)
Dean of Graduate School
August 23, 2019

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุลวงได้ด้วยคำแนะนำแนวคิดและคำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนสมบูรณ์จาก ผศ.ดร. ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี (RSU-STREC) และมหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดการวิจัยการวิจัยจนประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนร่วมงาน ที่คอยให้การสนับสนุน และให้คำแนะนำ ติชม

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเกิดประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ

ขจีธัญชินี หนานิรันดร์กุล

ผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

6006369 : MAJOR: ORIENTAL MEDICINE; M.Sc. (ORIENTAL MEDICINE)

KEY WORDS : GLYCYRRHIZA GLABRA EXTRACT, FILM HYDRATION, LIPO SOME, GAMMA ORYZANOL, CHOLESTEROL

KAGEETUNCHINEE NANIRANKUL: DEVELOPMENT OF GLYCY-RRHIZA GLABRA EXTRACT IN LIPOSOME FORM. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. PRASAN TANGYUENYOUNGWATANA, Ph.D., 63 p.

Licorice or *Glycyrrhiza glabra* is widely used herbal medicinal plants. The root of this plant has glycyrrhizin which has anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. The purpose of this research was to develop licorice extract into liposome form. Liposome was prepared by film hydration method using L-α Phosphatidyl choline, licorice extract, and stabilizing agents which were cholesterol and gamma-oryzanol dissolved with organic solvent mixture (Methanol: Dichloromethane) in 2:1 ratio. The organic solvent was evaporated and phosphate buffer pH 7.0 was added into the mixture and the liposome was formed. The size of liposome was reduced by Ultrasonic probe. Next, the particle size and Zeta potential of liposome were measured and two good compositions were obtained. The compositions were L-α Phosphatidyl choline: cholesterol: licorice extract with the ratio of 85: 2.5: 1.5 and L-α Phosphatidyl choline: gamma-oryzanol: licorice extract with the ratio of 85: 2.0: 1.5. The particle size were 183.23±23.98 and 270.07±15.49 nm while the Zeta potential were -7.85±0.45 and -7.09±1.06 mV, respectively. Flux were equal to 202.15 and 297.80 microgram per cm^2. square centimeter from Franz Diffusion Cell's method. Liposomal reservations encapsulation efficiency was 25.45% and 50% respectively.

Quantitative analysis of *Glycyrrhiza glabra* extract by HPLC showed correlation coefficient value (r^2) equal to 0.9999 with the concentrations range from 0.5-4.0 microgram per milliliter. The %RSD of intraday and interday precision were 0.09 and 0.18%, respectively.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Student's Signature ..... Thesis Advisor's Signature .....

6006369 : สาขาวิชาเอก: การแพทย์แผนตะวันออก; วท.ม (การแพทย์แผนตะวันออก)

คำสำคัญ : สารสกัดชะเอมเทศ, ฟิล์มไฮเดรชั่น, ลิโพโซม, แกมมาโอไรซานอล, คลอเรสเตอรอล

ขจีธัญชินี หนานิรันดร์กุล: การพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซม (DEVELOPMENT OF GLYCYRRHIZA GLABRA EXTRACT IN LIPOSOME FORM) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา, 63 หน้า.

ชะเอมเทศเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ส่วนของรากมีสารกลีเซอไรซินซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทำให้ผิวขาว และลดการอักเสบ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซม (Liposome) ลิโพโซมจะถูกเตรียมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชั่น โดยใช้ L-α Phosphatidyl choline, สารสกัดชะเอมเทศ และสารเพิ่มความคงตัว 2 ชนิด คือ คลอเรสเตอรอล และแกมมาโอไรซานอล ละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Methanol : Dichloromethane) อัตราส่วน 2:1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกและจะทำให้เกิดลิโพโซมโดยการเติม Phosphate buffer pH 7.0 ลงไป ทำการลดขนาดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค จากนั้นทำการวัดขนาดอนุภาค และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้า พบอัตราส่วนที่ดีที่สุดเมื่อเก็บตัวอย่างทิ้งไว้ 1 เดือน คือ L-α Phosphatidyl choline : คลอเรสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5) และ L-α Phosphatidyl choline : แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5) เมื่อนำไปวัดขนาดอนุภาคได้เท่ากับ 183.23±23.98 และ 270.07±15.49 นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าได้ค่า -7.85±0.45 และ -7.09±1.06 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ผลการทดสอบการปลดปล่อยผ่านด้วยวิธี Franz Diffusion Cells พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การปลดปล่อย (Flux) มีค่าเท่ากับ 202.15 ไมโครกรัม/นาที.ซม^2. และ297.80 ไมโครกรัม/นาที.ซม^2. เมื่อนำมาทดสอบการกักเก็บสารมีค่า เท่ากับร้อยละ 25.45 และ 50 ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณหาสารสกัดชะเอมเทศ ด้วยวิธี HPLC พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมีค่าสัมประสิทธิ์ r^2 เท่ากับ 0.9999 โดยมีความเข้มข้น 0.5- 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (Intraday Precision) มีค่าเฉลี่ย % RSD เท่ากับร้อยละ 0.09 และความแม่นยำระหว่างวัน (Interday Precision) มีค่าเฉลี่ย % RSD เท่ากับร้อยละ 0.18 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย		**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ค**
สารบัญ		**ง**
สารบัญตาราง		**ฉ**
สารบัญรูป		**ช**
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
	1.3 คำถามงานวิจัย	2
	1.4 ขอบเขตการดำเนินการ	2
	1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	3
บทที่ 2	**ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**4**
	2.1 ชะเอมเทศ	4
	2.2 แกมมาโอไรซานอล (Gamma-Oryzanol)	11
	2.3 ลิโพโซม	13
	2.4 การทดสอบการปลดปล่อยของสารสำคัญทางยา (Franz Diffusion Cell)	22
	2.5 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	24
บทที่ 3	**วิธีการดำเนินงานวิจัย**	**27**
	3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	27
	3.2 วิธีและขั้นตอนในการวิจัย	29

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	**35**
	4.1 การเตรียมตำรับพื้นของลิโพโซม	35
	4.2 การวัดขนาดอนุภาค ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้า ของตำรับลิโพโซม	36
	4.3 การเพิ่มสารสกัดชะเอมเทศในตำรับพื้นลิโพโซม	38
	4.4 การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	40
	4.5 การศึกษาการกักเก็บสารสกัดลิโพโซมของสูตรตำรับลิโพโซม	43
	4.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารสกัดชะเอมเทศของตำรับลิโพโซม ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	44
	4.7 การศึกษาการปลดปล่อยของสารสกัดชะเอมเทศในตำรับลิโพโซม	45
	4.8 Linearity of Method	46
	4.9 Precision of Method	48
บทที่ 5	**สรุปผลและข้อเสนอแนะ**	**51**
	5.1 สรุปผลการวิจัย	51
	5.2 ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม		**54**
ภาคผนวก	ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	**58**
ประวัติผู้วิจัย		**63**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	อัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของตำรับพื้นลิโพโซมทใช้สารเพิ่มความคงตัว (คอลเลสเตอรอล)	36
4.2	อัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของตำรับพื้นลิโพโซมที่ใช้สารเพิ่มความคงตัว (แกมม่าโอไรซานอล)	36
4.3	สูตรที่ 1 (PC และคลอเรสเตอรอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน	37
4.4	สูตรที่ 1 (PC และคลอเรสเตอรอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน	37
4.5	สูตรที่ 2 (PC และแกมม่า โอไรซานอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 1 วัน	37
4.6	สูตรที่ 2 (PC และแกมม่าโอไรซานอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน	38
4.7	สูตรที่ 1 PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน	38
4.8	สูตรที่ 1 PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน	39
4.9	สูตรที่ 2 PC :แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน	39
4.10	สูตรที่ 2 PC :แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน	40
4.11	แสดงผลการศึกษาค่าการกักเก็บสารสกัดชะเอมเทศของสูตรตำรับลิโพโซม PC :แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5)	43
4.12	แสดงผลการศึกษาค่าการกักเก็บสารสกัดชะเอมเทศของสูตรตำรับลิโพโซม PC:คลอเลสเตอรอล : สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5)	43
4.13	ระบบ Gradient System ของ Mobile Phase	44
4.14	แสดงผลและค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic acid 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	47

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.15	ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของ Glycyrrhizic acid แบบ Intraday Precision	48
4.16	ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของ Glycyrrhizic acid แบบ Interday Precision	49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1	ลักษณะของต้นชะเอมเทศ	4
2.2	ลำต้นของชะเอมเทศ	5
2.3	ใบของชะเอมเทศ	6
2.4	ลำต้นของชะเอมเทศ	6
2.5	ฝักและผลของชะเอมเทศ	7
2.6	การสร้างเม็ดสีผิว	8
2.7	ขั้นตอนสังเคราะห์และโครงสร้างทางเคมี Glycyrrhizic acid จากชะเอมเทศ	9
2.8	โครงสร้างทางเคมีโอไรซานอล	12
2.9	โครงสร้างทางเคมีวิตามินอี	12
2.10	ลักษณะและชนิดต่างๆ ของลิโปโซม	14
2.11	โมเลกุลของฟอสโฟลิพิด	17
2.12	โครงสร้างของกลีเซอเรอฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ	18
2.13	ขั้นตอนการเตรียมลิโพโซมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน	20
2.14	ส่วนประกอบของเครื่อง Franz Diffusion Cell	23
2.15	ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	25
4.1	แสดงรูปร่างของลิโปโซมสูตร PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5 mg) (บน) เป็นกำลังขยาย 500 เท่า (ล่าง) เป็นกำลังขยาย 2000 เท่า	41
4.2	แสดงรูปร่างของลิโปโซมสูตร PC:แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5 mg) (บน) เป็นกำลังขยาย 3000 เท่า (ล่าง) เป็นกำลังขยาย 5000 เท่า	42
4.3	HPLC Chromatogram ของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic acid	44
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสะสมของสารสกัดชะเอมเทศกับเวลา (นาที) ของสูตร PC: แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5)	45
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสะสมของสารสกัดชะเอมเทศกับเวลา (นาที) ของสูตร PC: คลอเรสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5)	46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.6 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak Area และสารมาตรฐาน Glycyrrhizic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 47

4.7 กราฟเส้นตรงของการศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic acid แบบ Intraday Precision ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 49

4.8 ความแม่นยำในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic acid แบบ Interday Precision ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกราฟเส้นตรง 50

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

ในยุคของการเติบโตอย่างรวดเร็วของผลิตภัณฑ์ความงาม กระแสในการดูแลสุขภาพก็มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น มีการนำสมุนไพร พืชออแกนิก หรือสารจากธรรมชาติมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวกายและผิวหน้า เป็นต้น เพื่อความปลอดภัยในระยะยาวและทดแทนการใช้สารเคมีหรือสารสังเคราะห์ นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าและเพิ่มทางเลือกแก่ผู้บริโภคในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยและหลากหลายมากขึ้น

ชะเอมเทศ (Glycyrrhiza glabra L.) หรือ Licorice เป็นสมุนไพรที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีสารสำคัญคือ สาร Glycyrrhizin (หรือ Glycyrrhizic Acid หรือ Glycyrrhizinic Acid), Flavonoids, Glabridin, 24-Hydroxyglyrrhizin เป็นต้น เป็นสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น ช่วยทำให้ชุ่มคอ แก้อาการไอ แก้อาการคัน แก้ผื่นเอ็กซีมา มีฤทธิ์ช่วยแก้อาการปวดและช่วยลดอาการอักเสบต่างๆ (Tangri, Seth, Parmar & Bhargava, 1965) นอกจากนี้มีการศึกษาสารสกัด Licorice จากรากชะเอมเทศ ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยสารสกัดเอทานอลจากรากชะเอมเทศและใบและผลฟิกส์ โดยใช้สารมาตรฐานเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด Agaricus bisporusพบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทั้ง 2 ชนิด (Nerya et al., 2006)

ในปัจจุบันในด้านความงามมีการนำสารสกัดจากชะเอมเทศมาใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เครื่องสำอาง ช่วยลดความหมองคล้ำ ลดการระคายเคืองและต้านออกซิเดชั่น นอกจากนี้สารสกัดชะเอมเทศยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการผลิต Superoxide Anion, ยับยั้ง Cyclooxygenase ซึ่งนอกจากจะได้ผิวขาวใสแล้ว ยังช่วยลดริ้วรอยอีกด้วย (Phunrassame, 2016)

ปัญหาสำคัญที่สุดในการนำส่งยาผ่านทางผิวหนังคือการที่ยาไม่สามารถซึมผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมได้ ลิโพโซมทำให้มีการปล่อยสารที่กักเก็บออกมา ช่วยเพิ่ม Bioavailability ของสารผ่านผิวหนังและออกฤทธิ์ได้นานมากขึ้น (Manosroi, A. & Manosroi, J., 2007)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาสารสกัดรากชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซม โดยมีการเปรียบเทียบสารเพิ่มความคงตัว 2 ชนิด คือ คลอเรสเตอรอล และแกมมาโอไรซานอล โดยสารเพิ่มความคงตัวชนิดหลัง เป็นการใช้ครั้งแรกในการเตรียมลิโพโซม ซึ่งแกมมาโอไรซานอลมีองค์ประกอบของสเตอรอลที่คล้ายกับคลอเรสเตอรอล และส่วนของกรดเฟอรูลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของลิโพโซมที่เตรียมขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อนำสารสกัดจากชะเอมเทศมาพัฒนาในรูปแบบลิโพโซม

1.2.2 เพื่อหาปริมาณสารสำคัญของลิโพโซม โดยการซึมผ่านด้วยวิธี Franz Diffusion Cell

1.2.3 เพื่อวิเคราะห์หาสารสำคัญ ด้วยวิธี Hight Performace Liquid Chromatography (HPLC)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.3 คำถามงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถเตรียมสารสกัดชะเอมเทศในรูปแบบลิโพโซมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชั่นได้หรือไหม

1.4 ขอบเขตการดำเนินการ

1.4.1 จัดหาชะเอมเทศ

1.4.2 การเตรียมสารสกัดสาระสำคัญจากชะเอมเทศ

1.4.3 การประเมินประสิทธิผลและประสิทธิภาพของสาระสำคัญ

1.4.4 การเตรียมตำรับลิโพโซม

1.4.5 การประเมินตำรับพื้นลิโพโซม

1.4.6 การเตรียมสาระสำคัญในตำรับพื้นลิโพโซม

1.4.7 การประเมินประสิทธิผลและประสิทธิภาพของตำรับลิโพโซม

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.5.1 ได้ลิโพโซมที่มีสารสกัดชะเอมเทศที่มีประสิทธิภาพการซึมผ่านและมีความคงตัวที่ดี

1.5.2 เพิ่มมูลค่าให้กับชะเอมเทศ และกระจายรายได้สู่ชุมชน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชะเอมเทศ

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นชะเอมเทศ
ที่มา: Phunrassame, 2016

ชื่อสมุนไพร	ชะเอมเทศ
ชื่ออื่นๆ	กำเช่า กำเช้า (จีน-แต้จิ๋ว), กันเฉ่า (จีนกลาง), ชะเอมจีน
ชื่อสามัญ	Licorice, Chinese Licorice, Russian Licorice, Spanish Licorice
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Glycyrrhiza glabra L.*
ชื่อวงศ์	จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (FABACEAE หรือ LEGUMINOSAE) และอยู่

ในวงศ์ย่อยถั่ว FABOIDEAE (PAPILIONOIDEAE หรือ PAPILIONACEAE)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ต้นชะเอมเทศ จัดเป็นไม้พุ่มที่มีอายุนาน มีลำต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร

ใบ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 9-17 ใบ มีสีเขียวอมเหลือง ส่วนก้านใบย่อยจะสั้นมาก

ดอก ออกดอกเป็นช่อ กลีบดอกเป็นสีม่วงอ่อน ๆ ส่วนก้านดอกสั้นมาก

ผล หรือฝักชะเอมเทศ ผลมีลักษณะเป็นฝักแบน ผิวภายนอกมีลักษณะเรียบ

ราก เรียวยาวรูปกระสวย ยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร อาจยาวได้ถึง 1 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-20 เซนติเมตร เปลือกหุ้มรากด้านนอกสีน้ำตาลอมแดง หรือสีน้ำตาลแก่ เนื้อเปลือกหยาบ มีเส้นใยมาก เนื้อในรากมีสีเหลืองอ่อน ผิวเรียบเป็นเส้นใย

รูปที่ 2.2 ลำต้นของชะเอมเทศ

ที่มา: เมดไทย, 2555

รูปที่ 2.3 ใบของชะเอมเทศ

ที่มา: เมดไทย, 2555

รูปที่ 2.4 ลำต้นของชะเอมเทศ

ที่มา: เมดไทย, 2555

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 2.5 ฝักและผลของชะเอมเทศ
ที่มา: เมดไทย, 2555

2.1.2 ลักษณะทางกายภาพและเคมี

ลักษณะทางกายภาพและเคมีที่ดีควรมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 12% w/w ปริมาณเถ้ารวมไม่เกิน 7% w/w ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดไม่เกิน 2% w/w ปริมาณสาร Glycyrrhizic Acid ไม่น้อยกว่า 2% w/w ปริมาณสาร Glycyramarin ไม่น้อยกว่า 1% w/w (ข้อกำหนดเภสัชตำรับจีน)

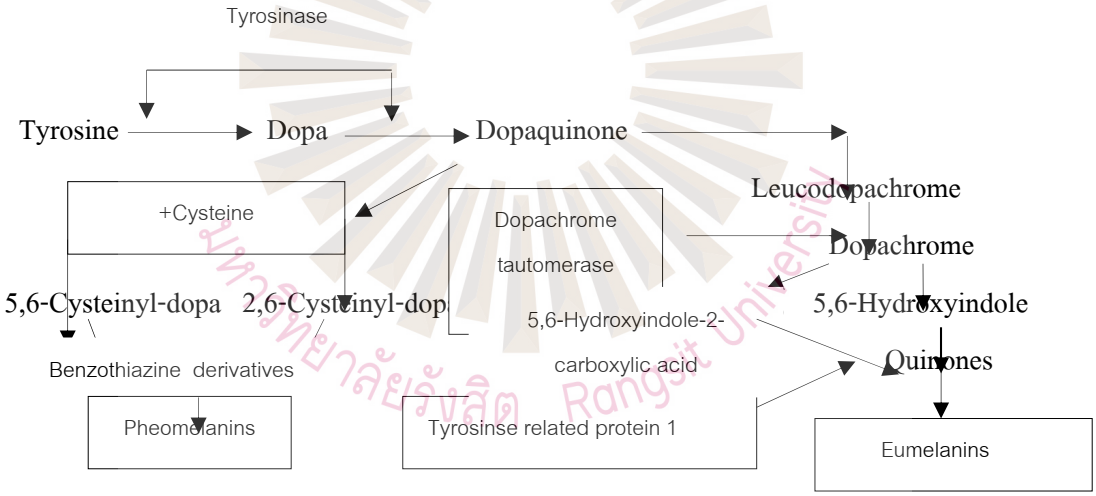
องค์ประกอบทางเคมีเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ซาโปนิน ได้แก่ Glycyrrhizin, 24-Hydroxyglycyrrhizin 2-12% นอกจากนี้ยังพบสารฟลาโวนอยด์สีเหลือง ได้แก่ Iso-quiritin, Liquiritin เป็นต้น (Yakugaku,, 2000)

2.1.3 สรรพคุณของชะเอมเทศ

ประเทศจีนนิยมนำชะเอมเทศมาช่วยขจัดสารพิษที่สะสมในร่างกาย โดยรับประทานเป็นประจำในปริมาณน้อยๆ นอกจากนั้นนำมาทำเป็นชาบรรเทาอาการเจ็บคอ แก้ไอ และลดการอักเสบ นอกจากนี้สรรพคุณพื้นบ้านไทย ใช้รากเป็นยาขับเสมหะทำให้ชุ่มคอ แก้ไอ แก้น้ำลายเหนียว แก้คอแห้ง ขับลม แก้คัน บำรุงร่างกาย ขับเลือดเน่า และเจริญซึ่งหทัยวาตให้สดชื่น เนื่องจากรากของชะเอมเทศพบสารสำคัญคือ กลีเซอไรซิน Glycyrrhizin (Glycyrrhizic Acid หรือ

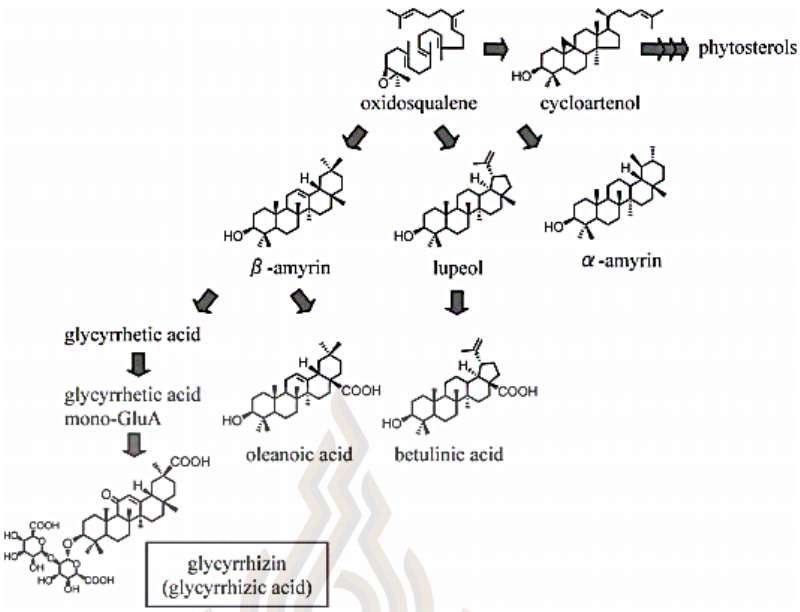
Glycyrrhizinic Acid) Glabridin และ 24-Hydroxyglyrrhizin ซึ่งสารเหล่านี้ให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 50 - 100 เท่า รากชะเอมจึงถูกนำไปแต่งรสอาหาร ปรุงยาสมุนไพร หรือใช้แต่งรสหวานในขนมและลูกอม (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2554) ขั้นตอนสังเคราะห์และโครงสร้างทางเคมี Glycyrrhizic Acid จากชะเอมเทศ ดังแสดงในรูปที่ 2.7

นอกจากนี้ชะเอมเทศยังสามารถนำมาใช้เป็นไวต์เทนนิงจากธรรมชาติ ช่วยลดการเกิดของเม็ดสี ซึ่งเป็นสาเหตุของความหมองคล้ำเกิดจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ลดฝ้ากระบนใบหน้า ช่วยทำให้ผิวหน้าสว่างกระจ่างใสขึ้นอย่างเป็นธรรมชาติ (รูปที่ 2.6) ช่วยลดและต้านการอักเสบของผิว โดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผิวหน้า มีการศึกษาสารสกัด Licorice จากรากชะเอมเทศ ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดเอทานอลจากรากชะเอมเทศและใบและผลฟิกส์ โดยใช้สารมาตรฐานเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด Agaricus Bisporus พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทั้ง 2 ชนิด (Nerya et al., 2006)



รูปที่ 2.6 การสร้างเม็ดสีผิว

ที่มา : ผู้วิจัย



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนสังเคราะห์และโครงสร้างทางเคมี Glycyrrhizic Acid จากชะเอมเทศ
ที่มา: Kojoma et al., 2010

2.1.4 เภสัชวิทยาของชะเอมเทศ

รายงานและผลการทดลองควรระมัดระวังการรับประทานชะเอมเทศในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูง หรือภาวะโพแทสเซียมต่ำ ไม่ควรใช้ชะเอมเทศในขนาดที่มากกว่า 50 กรัมต่อวัน เกิน 6 สัปดาห์ ทำให้เกิดน้ำในร่างกาย เกิดอาการบวมที่มือและเท้า สารโซเดียมถูกขับออกน้อย ขณะที่สารโพแทสเซียมถูกขับมากขึ้น ส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น และไม่ควรใช้ชะเอมเทศร่วมกับยาขับปัสสาวะ (กลุ่ม Thiazide) หรือยากลุ่ม Cardiac glycoside เพราะชะเอมเทศจะมีผลทำให้สารโพแทสเซียมถูกขับออกมาขึ้น และหลีกเลี่ยงการใช้ร่วมกับยาขับปัสสาวะ Spironolactone หรือ Amiloride เพราะจะให้ประสิทธิผลการรักษาโรคความดันโลหิตลดลง (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2554)

สามารถลดการอักเสบในคน และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย Carrageenan หรือ A-Chymotrypsin ส่วนสารสกัดบิวทานอล อีเทอร์ และน้ำต้มจากรากขนาด 20 กรัม/กิโลกรัมและไม่ระบุขนาด ทดสอบโดยให้ทางสายยางเข้าสู่กระเพาะอาหารหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยฟอร์มาลีน และทดสอบด้วยวิธี Albumin Stabilizing พบว่า สามารถลดการอักเสบได้ เมื่อนำยาชงจากตำรับที่มีชะเอมเทศเป็นส่วนประกอบ ไม่ระบุขนาดรับประทาน

พบว่าสามารถลดการอักเสบในคน สารสกัดตำรับที่มีชะเอมเทศเป็นส่วนประกอบ ไม่ระบุขนาด ทดสอบในหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยฮีสตามีน พบว่าสามารถต้านการอักเสบ นอกจากนี้สารสกัดน้ำร้อนและเอทานอล 95 % ขนาด 18 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, 180 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, 1.1 มิกรัม/กิโลกรัม , 350 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และไม่ระบุขนาด โดยป้อนทางปาก ให้ทางสายยางเข้าสู่กระเพาะอาหาร และฉีดเข้าช่องท้อง ทดสอบในหนูขาว หนูถีบจักร และหนูเผือก ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย Carrageenan, Dextran, Paw Immersion ในน้ำร้อน, ก้อนสำลี และ Adjuvant พบว่า สามารถลดการอักเสบได้ เมื่อให้ยาชงกับสารสกัดน้ำร้อนจากตำรับที่มีชะเอมเทศเป็นส่วนประกอบ ขนาด 100 มก./กก. ทางสายยางเข้ากระเพาะอาหารของหนูขาวหรือหนูถีบจักร ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย Carrageenan, Dextran, Paw Immersion ในน้ำร้อน, Adjuvant ก้อนสำลี และ Mustard พบว่า ไม่สามารถลดการอักเสบได้

สารสกัดชะเอมเทศด้วยเอทธานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Streptococcus Mutant ด้วยวิธี Agar Disk Diffusion Method ค่า Inhibition Zones เท่ากับ 10-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) น้อยกว่า 12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (A.Chaiya. 2013) สารสำคัญประกอบด้วย Glycyrrhizin (GL), 18β-Glycyrrhetinic Acid (GA), Liquiritigenin (LTG), Licochalcone A (LCA), Licochalcone E (LCE) And Glabridin (GLD) มีฤทธิ์ต้านไวรัสและเชื้อแบคทีเรีย (Liqiang, Rui, Bochuan & Ying., 2015)

ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีผลการศึกษาสารสกัดชะเอมเทศสามารถลดความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เดอร์มัลแพพิลลาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติร่วมกับการลดระดับโปรตีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดคือ CD133, ALDH1A1 และ Integrinβ 1โดยกลไกการลดความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดผ่านการยับยั้ง β-Catein Signaling ซึ่งสารสกัดชะเอมเทศลด ATP-Dependent Tyrosine Kinase ในรูป Active Form ทำให้ Glycogen Synthase Kinase3β (GSK3β) เพิ่มขึ้นและ GSK3β ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ β-Catenin ถูกทำลาย การลดลงของ β-Catenin จึงทำให้ Transcription Factor ซึ่งมีหน้าที่คงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือ Oct4, Nanog และ Sox2 ลดลง ในส่วนของกรดกลีเซอไรซิกพบว่าสารดังกล่าวลดความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เดอร์มัลแพพิลลาโดยผ่านกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารสกัดชะเอมเทศ (งานวิจัยด้านอุตสาหกรรม, 2561)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประเทศญี่ปุ่นมีการศึกษาใช้สารสกัดจากรากชะเอมเทศเพื่อรักษาโรคตับอับเสบ และสามารถช่วยลดระดับเอนไซม์ตับ (Amino-Transferase) ซึ่งทำให้เซลล์ตับดีขึ้น สถาบันโรคมะเร็งแห่งชาติในสหรัฐ พบว่า สารสกัดจากชะเอมเทศช่วยป้องกันการทำลายของรังสียูวี (UV) สามารถลดผลกระทบจากแดดเผาได้เนื่องจากทำปฏิกิริยาเสมือนสารต้านอักเสบ สารไฟโตเอสโตรเจนและฟลาโวนอยด์ในชะเอมเทศ มีคุณสมบัติช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบของผิว

2.2 แกมมาโอไรซานอล (Gamma-Oryzanol)

สูตรโมเลกุล $C_40H_{58}O_4$

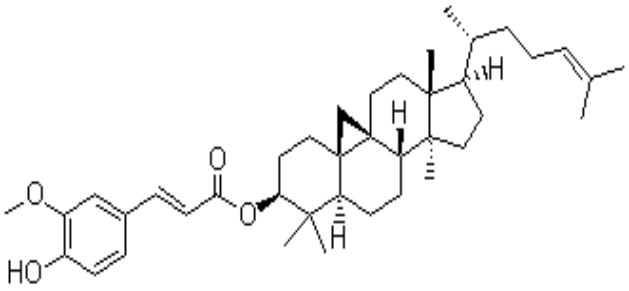
มวลโมเลกุล 602.9

สี ขาวหรือขาวเหลือง

ลักษณะ โปร่งใส คล้ายผงแป้ง

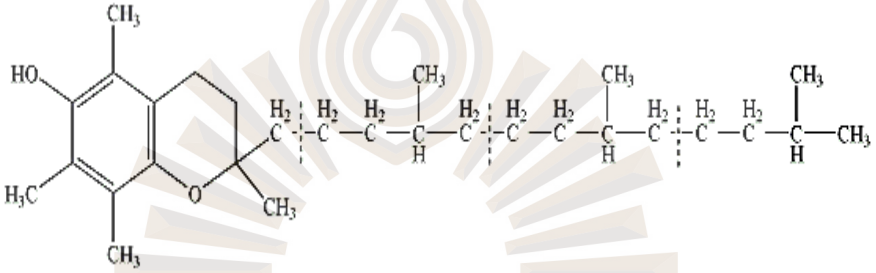
การละลาย ละลายได้ในน้ำมัน ละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ละลายน้ำ เป็นสารประกอบที่พบในน้ำมันรำข้าว มาจากส่วนผสมของเอสเทอร์ ประเภท Ferulic Acid Sterols และไตรเทอร์ปีน (Triterpene) เป็นสารธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สารโอไรซานอลที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับวิตามินอี มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และยังเป็นสายโซ่ธรรมชาติที่ดีในการป้องกัน การเกิดออกซิเดชั่น (Antioxidant) ของน้ำมัน ที่สำคัญ สามารถป้องกันการออกซิเดชั่นของกรดไขมันอิ่มตัวได้ดีกว่าวิตามินอีกลุ่มโทโคฟีรอล (Tocopherol) และกลุ่มโทโคไตรอีนอล (Tocotrienols) ในร่างกายคนเราการเกิดออกซิเดชั่นนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะที่ผิดปรกติต่างๆ หรือโรค เช่น โรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือด เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติช่วยลดโคเลสเตอรอล (Cholesterol) ตัวเลว (LDL-C) ให้กับร่างกายอีกด้วย ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง มีคุณสมบัติในการดูดแสงจึงสามารถปกป้องผิวหนังจากแสงแดด ยังช่วยป้องกันการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง (Graf, 1992) และช่วยลดอาการผิดปกติในสตรีที่กำลังหมดประจำเดือน (Nakayama et al., 1987) มีผลการวิจัยของสถาบัน วิจัยบรานสวิคส์ (Brunswick Laboratories) พบว่า โอไรซานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า โครงสร้างทางเคมีของโอไรซานอล ดังแสดงในรูปที่ 2.8 และ 2.9

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีโอไรซานอล

ที่มา: Gamma-Oryzanol, 2016



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีวิตามินอี

ที่มา: สยามเคมี, 2561

รำข้าวถูกนำมาสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวโดยนิยมใช้เฮกเซน แต่เฮกเซนเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ระเหยง่ายและไวไฟ จึงสนใจศึกษาชนิดของตัวทำละลายชนิดอื่นคือ ไอโซโพรพานอล เอทานอล เปรียบเทียบกับการใช้เฮกเซนที่สภาวะการสกัดเดียวกันพบว่า รำข้าวที่ผ่านการคงสภาพด้วยวิธีการนึ่งและสกัดด้วยไอโซโพรพานอลจะให้ปริมาณน้ำมัน วิตามินอีและแกมมา-โอไรซานอลได้สูงที่สุด จากการศึกษาผลของอัตราส่วนรำข้าวต่อไอโซโพรพานอล (1 ต่อ 30, 1 ต่อ 45 และ 1 ต่อ 60 กรัม/มิลลิลิตร) อุณหภูมิ (50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) และเวลา (1, 10 และ 20 ชั่วโมง) ในการสกัดต่อคุณภาพน้ำมัน พบว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อค่าปริมาณน้ำมัน วิตามินอีและแกมมา-โอไรซานอล โดยพบว่า สภาวะที่มีสารดังกล่าวมากที่สุดคือ สภาวะการสกัดที่ใช้รำข้าวต่อไอโซโพรพานอล 1 ต่อ 30 กรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเวลา 20 ชั่วโมง (ปรีดาวรรณ ขอช่วยกลาง และวรนุช ศรีเจษฎารักษ์, 2553)

Kiribuchi, Miura, Tokuda and Kaneda (1983) มีรายงาน g-oryzanol พบว่าช่วยยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ดี g-oryzanol (0.5% ~ 1%) สามารถยับยั้งการทำปฏิกิริยาของ

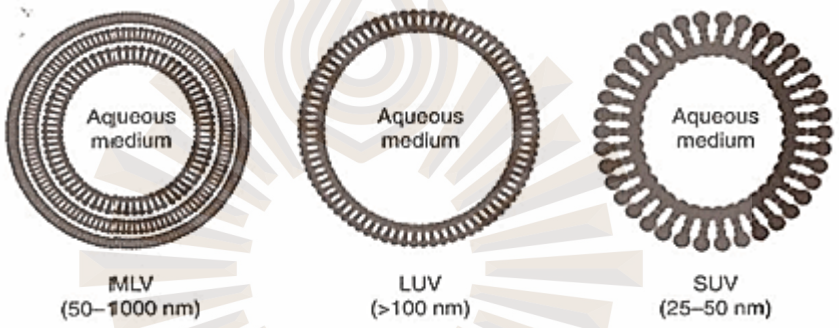
ออกซิเดชันเชิงความร้อนของน้ำมันถั่วเหลือง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ G-Oryzanol ในรูปของกรดเฟอรูริก (Ferulic Acid) ขณะเดียวกัน BHT และ D-Tocopherol ก็มีความทนต่อความร้อนได้ นอกจากนี้ Oryza Oil & Fat Chemical Co. Ltd. พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ G-Oryzanol ด้วยกรดอะมิโน ตามวิธีของ Rodins Iron การวัดระยะเวลาการเหนี่ยวนำของเปอร์ออกไซด์บางชนิด พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนซานอลและกรดอะมิโน

น้ำมันรำข้าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้ แต่ Gamma-Oryzanol ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยใช้ความเข้มข้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว 10 เท่า และให้เวลาเซลล์มะเร็งตับสัมผัสกับสาร Gamma-Oryzanol เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งไม่สามารถระบุค่า IC_{50} อาจเนื่องจากการที่ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวมีลักษณะและคุณสมบัติเป็นสารสกัดหยาบ (Crude Extract) จึงมีสารหลายชนิดที่สามารถทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (Co-Factor) ช่วยการทำงานของ Gamma-Oryzanol ได้ ขณะที่สาร Gamma-Oryzanol บริสุทธิ์ไม่มีสารช่วยมาเร่งการทำงานได้ (ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, รุ้งตะวัน สุภาพผล, วรอนงค์ พฤกษากิจ และพรรณนารี ชัยวิชิต, 2558)

2.3 ลิโพโซม

อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (Submicron) มีลักษณะเป็นถุงกลมๆ ของสารไขมัน โดยสารไขมันเหล่านี้เป็นสารชนิดแอมฟิพาติก (Amphipathic) คือมีทั้งกลุ่มมีขั้ว (Polar) ชอบน้ำและกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุล (Hydrophobic) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไขมันประเภท Phospholipids ทั้งจากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น เช่น ฟอสฟาติดิล โคลีนหรือเลซิติน (Phosphatidyl Choline), ฟอสฟาติดิล กลีเซอรอล (Phosphatidyl Glycerol) และฟอสฟาติดิล เอททาโนลามีน (Phosphatidyl Ethano Lamine) เป็นต้น ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนมีขั้วชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar) ไม่ชอบน้ำ จึงจัดเรียงตัวสลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำในสารละลายน้ำได้ เมื่ออยู่ในน้ำจะจัดเรียงตัวโดยนำส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุหันออกหาโมเลกุลน้ำ ในขณะเดียวกันจะเอาส่วนที่ไม่มีขั้วหันเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลพวกเดียวกัน โดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นหรือ Lipid Bilayer หากลิโพโซมมี Lipid Bilayer เพียงชั้นเดียว จะจัดเป็นลิโพโซมประเภท Unilamellar Bilayer Vesicles (ULVs) หากลิโพโซมมีชั้นไขมันมากกว่าหนึ่งชั้น จะจัดเป็นลิโพโซมประเภท Multilamellar Bilayer Vesicles (MLVs) ตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีขั้ว ส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ใน Lipid Bilayer

ลิโพโซมส่วนใหญ่จะมีขนาดอยู่ในช่วง 50 นาโนเมตรจนถึงหลายร้อยนาโนเมตร สามารถแบ่งประเภทออกได้ตามขนาดของอนุภาคหรือตามจำนวนชั้นของ Lipid Bilayer ถ้าแบ่งตามขนาดของอนุภาคจะแบ่งได้เป็น Small Unilamellar Vesicles (SUVs) โดยอนุภาคจะมีขนาดประมาณ 25-50 นาโนเมตร และ Large Unilamellar Vesicles (LUVs) โดยอนุภาคจะมีขนาดใหญ่กว่า 100 นาโนเมตร หรือถ้าแบ่งตามจำนวนชั้นของ Lipid Bilayer จะแบ่งได้เป็น Multilamella Vesicles (MLVs) คือลิโพโซมที่มี Lipid Bilayer มากกว่าหนึ่งชั้น และ Unilamellar vesicles (ULVs) คือลิโพโซมที่มี Lipid Bilayer เพียงหนึ่งชั้น ดังแสดงในภาพที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ลักษณะและชนิดต่างๆ ของลิโปโซม

ที่มา: Vanugaranti & Perumal, 2009

บริษัทลอรีอัลศึกษาและทดลองโดยใช้เทคนิคการวาวแสง พบว่า ลิโพโซมที่เก็บกักสาร Sodium (14C) Pyrrolidone Carboseylate สามารถซึมผ่านผิวและช่วยให้ผิวมีความชุ่มชื้น เนื่องจากสารประกอบดังกล่าวเป็นสารให้ความชุ่มชื้นและสามารถดึงน้ำเข้าผิวได้เมื่อเก็บกักในรูปแบบลิโพโซม แล้วยังพบว่า เปปไทด์ในลิโพโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไฟโบบลาส (Fibroblast) ของผิวหนังได้เป็น 2 เท่ามากกว่าเปปไทด์ที่ไม่ได้เก็บกักในรูปแบบไลโปโซม และทำให้รอยแผลหายเร็วขึ้นเป็น 4 เท่า (ลิโพโซม, 2558)

2.3.1 ช่องทางการซึมผ่านผิวหนัง

ช่องทางการซึมผ่านยาหรือสารเคมีเข้าสู่ผิวหนัง มี 3 ช่องทาง คือ

1) ช่องทางผ่านเข้าเซลล์ (Transcellular Route) คือ การที่ยาผ่านเข้าผิวหนังโดยทางเซลล์คอร์นิโอไซต์ในชั้นสตราตรัมคอร์เนียมแล้วถูกดูดซึมผ่านเซลล์ชั้นต่างๆ จึงต้องผ่านทั้งส่วนที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันสลับกันไป โดยยาที่ละลายในขัมนจะซึมผ่านโปรตีนประเภทเคราติน

2) ช่องทางผ่านท่อและต่อม (Appendageal Route) คือ การซึมผ่านของสารผ่านท่อและต่อม ประกอบ ด้วย ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน และทางท่อเปิดของรูขุมขน ยาสามารถซึมผ่านได้สูง แต่พื้นที่ซึมผ่านคิดเป็น 0.1 % ของผิวหนังทั้งหมดเท่านั้น ช่องทางนี้เหมาะสำหรับไอออนและสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

3) ช่องทางผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intracellular Route) คือ การซึมผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมซึ่งมีไขมันที่มีขั้วหลายชนิดเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ และมีน้ำกักเก็บอยู่ภายในไขมันเหล่านี้ สารที่ซึมผ่านจะต้องไม่ละลายดีจนเกินไป ยาที่ผ่านช่องทางนี้ควรมีความสมดุลระหว่างการละลายในน้ำและน้ำมัน ซึ่งค่าที่ซึมผ่านดีควรมีค่าสัมประสิทธิ์ การแบ่งภาคระหว่างน้ำและน้ำมันประมาณ 1

2.3.2 กลไกการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาหรือสารเคมีของลิโปโซม

1) การแพร่ของตัวยาอิสระออกจากลิโพโซมแล้วซึมผ่านผิวหนัง เป็นการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังโดยตัวยาที่อยู่ในลิโพโซมจะแพร่ออกจากผนังของลิโพโซมก่อน แล้วตัวยาจึงค่อยถูกดูดซึมเข้าสู่ผิวหนัง

2) การซึมผ่านผิวหนังโดยอาศัยกลไกลของสารช่วยเพิ่มการดูดซึม เป็นการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของลิโพโซมโดยอาศัยสารช่วยเพิ่มการดูดซึมชนิดต่างๆ เช่น สารกลุ่มสารลดแรงตึงผิว เอทธานอล กลีเซอรีน เป็นต้น

3) การหลอมรวมของถุงลิโพโซมกับชั้นสตราตัมคอร์เนียม เป็นการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังโดยถึงลิโปโซมจะสามารถหลอมรวมตัวกับชั้นสตราตัมคอร์เนียม ทำให้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ ซึ่งจะพบลิโพโซม ชนิดที่มีสภาพการไหล (Fludity) ในโครงสร้าง เช่น เอทโธโซม ทรานสเฟอร์โซม เป็นต้น

4) การซึมผ่านผิวหนังของลิโพโซมทั้งอนุภาค เป็นการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังโดยถุงลิโพโซมจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้สามารถแทรกตัวผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังที่ขนาดเล็กกว่าถุงลิโพโซมได้ ซึ่งในลิโพโซมที่มีสภาพการไหล เช่น ทรานสเฟอร์โซม เป็นต้น

5) การซึมผ่านทางรูขุมขน เป็นการซึมผ่านผิวหนังโดยถุงลิโพโซมแทรกตัวผ่านทางรูขุมขนเข้าสู่ผิวหนังในชั้นหนังแท้

2.3.3 การใช้ลิโพโซมในเครื่องสำอาง

เพื่อเป็นตัวให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว เนื่องจากมีส่วนประกอบเป็นลิพิด และยังกักเก็บและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อให้ออกฤทธิ์ได้นานด้วยการปลดปล่อยทีละน้อย สารที่ถูกกักเก็บในลิโพโซม เป็นสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในน้ำมันก็ได้ นอกจากนี้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังหรืออาการแพ้ และยังมีการศึกษาการใช้ลิโพโซมเพื่อนำพาเมลานิน (Melanin), Protein ไปยัง Hair Follicles ซึ่งลิโพโซมมีความสามารถในการเป็นตัวนำสารไปยัง Hair Follicles จึงถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนสีผม ป้องกันหรือลดการขาดร่วงหรือควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นผม

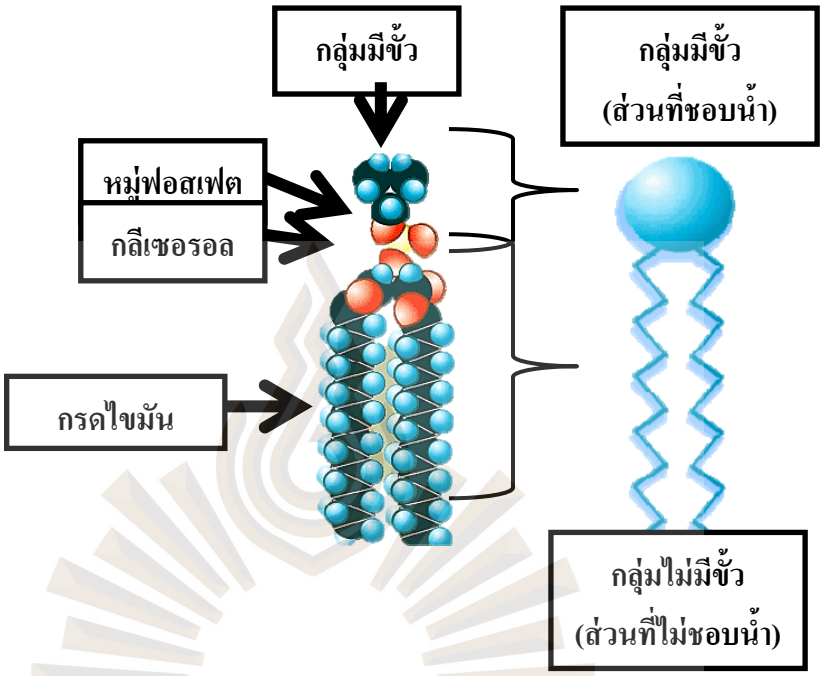
2.3.4 ส่วนประกอบของลิโพโซม

ฟอสโฟลิพิด

พบในส่วนประกอบของเยื่อหุ้ม ทำหน้าที่เยื่อเลือกผ่านให้สารบางชนิดผ่านเข้าไปภายในเซลล์ อีกทั้งยังเป็นตัวรับ (Receptor) ในการรับส่งสัญญาณทางประสาท การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน และยึดโครงสร้างของเซลล์กับแมทริกซ์ (Matrix) ภายนอกเซลล์ มีคุณสมบัติทางเคมีและมีบทบาทสำคัญในโครงสร้างและกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ ฟอสโฟลิพิดชนิดแรกที่ถูกค้นพบคือ ฟอสฟาติดิลโคลีน หรือเลซิทิน (PC) มีมากที่สุดในสัตว์และพืชชั้นสูง เลซิทินทำพันธะกับหมู่ฟอสเฟต โดยพบเลซิทินบริสุทธิ์จะเป็นขี้ผึ้งแข็ง สีขาว เมื่อโดนอากาศสีจะเข้มขึ้น เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายคอลลอยด์ เลซิทินทำหน้าที่เป็นสารต้านแรงตึงผิวในเซลล์ปอด เป็นส่วนประกอบในน้ำดีทำหน้าที่เป็น Emulsifying Agent ช่วยให้ไขมันแตกตัว เป็นตัวทำละลายคอเลสเทอรอล เลซิทินพบมากในถั่วเหลือง ในปัจจุบันกระบวนการเมตาบอลิซึมและสรีรวิทยาของฟอสโฟลิพิดได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างมาก

ฟอสโฟลิพิดเป็นลิพิดที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตเอสเทอร์ ฟอสโฟลิพิด โมเลกุลหนึ่งจะ ประกอบด้วย กลีเซอรอล 1 โมเลกุล กรดไขมัน 2 โมเลกุล และหมู่ฟอสเฟตอีก 1 หมู่ ฟอสโฟลิพิด เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย อาจเกิดเป็นโครงสร้าง 2 ชั้น โดยมีส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนหันเข้าหากัน และส่วนที่มีขั้วหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 11 นอกจากนี้สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ช่วยทำให้อิมัลชัน (Emulsion) คงตัว และ

เป็นสารเคลือบผิว ซึ่งเคลือบบนผิวของผลึกเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของยาที่ไม่ชอบน้ำ



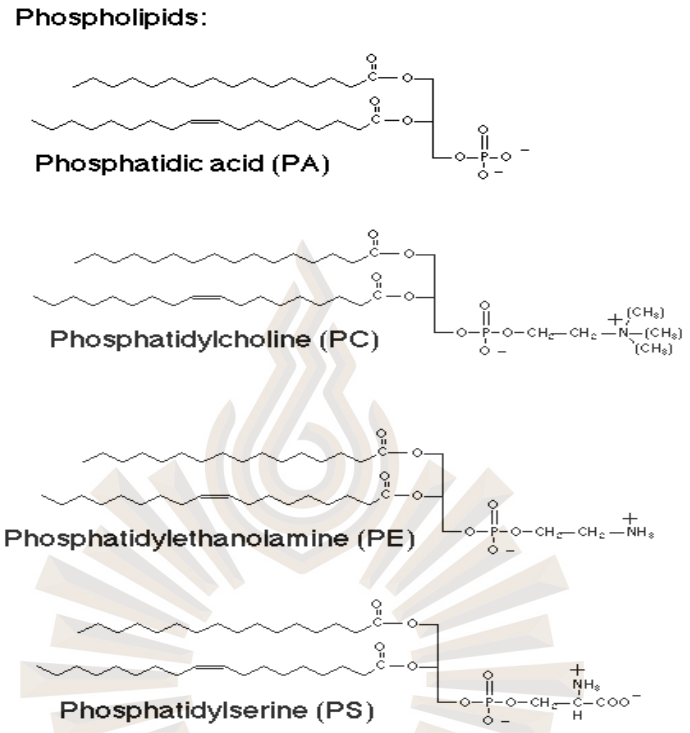
รูปที่ 2.11 โมเลกุลของฟอสโฟลิพิด
ที่มา: ดัดแปลงมาจากอรษา พรริท, 2559

โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด แบ่งตามหมู่แอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในฟอสโฟลิพิด สามารถแบ่งออกเป็น กลีเซอเรอฟอสโฟลิพิด (Glycerophospholipids) และสปิงโกมายอิลีน (Sphingo Myelins)

กลีเซอเรอฟอสโฟลิพิด

มักพบในยูคาริโอติกเซลล์ มีกลีเซอรอลเป็นแกนกลาง กลีเซอเรอฟอสโฟลิพิดที่เกิดขึ้นตาม ธรรมชาติทั้งหมดมี A-Structure และ L-Configuration ส่วนโครงสร้างทางเคมีสามารถจำแนกตามพันธะส่วนหัว (Head Group) ความยาวและความอิ่มตัวของสายโซ่ที่ชอบไขมัน ชนิดของพันธะระหว่างโมเลกุลแอลิแฟติก (Aliphatic Moieties) กับแกนกลีเซอรอลและจำนวนของสายแอลิแฟติก การเปลี่ยนพันธะส่วนหัวทำให้เกิดกลีเซอเรอฟอสโฟลิพิดที่แตกต่างกัน เช่น ฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine, PC) ฟอสฟาติดิลเอธานอลามีน

(Phosphatidylethanolamine, PE) ฟอสฟาติดิลเซอรีน (Phosphatidylserine, PS) ฟอสฟาทิดิค แอซิด (Phosphatidic Acid, PA) ฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.12



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของกลีเซอเรอฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ

ที่มา: Phospholipid Structures, 2012

จากรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการนำพาสารของลิโพโซมและฟอสฟาติดิล โคลีน พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บของ Egg Phophatidylcholine (EPC) สูงกว่า Soybean Phosphatedylcholine (SPC) และอัตราการรั่วไหลต่ำกว่า SPC ดังนั้น EPC จึงมีความ สามารถในการนำพาสารได้ดีกว่า (Wang & Sun, 2008)

สฟิงโกมายอิลีน

มีอะตอมคาร์บอน เท่ากับ 18 อะตอม เมื่อหมู่แอมิโนและหมู่ไฮดรอกซิล หรือไดไฮโดรสฟิงโกซีน อนุพันธ์เกิดพันธะฟอสเฟตเอสเทอร์อีก จะเรียกว่า สฟิงโกฟอสโฟลิพิดสปิง ในปี ค.ศ. 1884 Thudicum ได้อธิบายถึง สฟิงโกมายอิลีน (Sphingomyelins, SMs) เป็นครั้งแรก จนถึงปี ค.ศ.1927 Pick และBielschowsky ได้พิสูจน์โครงสร้างว่าเป็น N-Acylsphingosine-1-

Phospha Tidylcholine สฟิงโกมายอิลีนเป็นส่วนประกอบสำคัญในเซลล์สมอง แม้ว่า PC และ SM จะมีโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่ยังมีข้อแตกต่างกันคือ

1) แกนโครงสร้างของ SM คือ Sphingosine ส่วนแกนของ PC คือ กลีเซอรอล

2) ในแต่ละโมเลกุลโดยเฉลี่ยของ SM ประกอบด้วยพันธะคู่ 0.1-0.35 cis เอไมด์เชื่อมกับสายเอซิล ส่วน PC โมเลกุลโดยเฉลี่ยของ SM ประกอบด้วยพันธะคู่ 1.1-1.5 cis และจุดอิ่มตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ SM สูงกว่า PC

ฟอสโฟลิพิดมีคุณสมบัติเป็น อิมัลซิไฟเออร์, สเตบิไลเซอร์ หรือ สารช่วยการกระจายตัว ในตัวนำพายาในขนาดนาโนและไมโครถูกนำมาทดสอบโดยนำเอาฟอสโฟลิพิดจากไข่แดงบริสุทธิ์ (Lecithins ,PELs) ทั้งสามชนิดที่มีค่าไอโอดีนต่างกัน (ค่า IV) คือ PEL (IV = 76), R-20 (IV = 20) และ R-5 (IV = 2) นำมาทดสอบหาขนาดของลิโพโซม และหาประสิทธิภาพการกักเก็บสารของ Calcein ค่าที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของเลซิทินในตัวทำละลายประเภทไขมัน และเติมไฮโดรเจนในเลซิทิน ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างขนาดของลิโพโซม และประสิทธิภาพการกักเก็บสารของเลซิทินที่ไม่ใช้ไฮโดรเจน แต่ไม่อยู่ใน R-20 และ R-5 ที่เติมไฮโดรเจน เมื่อใช้ PELs ที่เติมไฮโดรเจนในผนังของลิโพโซม ควรเลือกตัวทำละลายไขมันเพื่อให้เลซิตินละลายในสภาพการเตรียมการเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารที่ดีขึ้น (Fumiyoshi & Tomoko, 2014)

สารเติม

สารเติมมี 2 ประเภท นอกเหนือจากฟอสโฟลิพิด

ประเภทแรกได้แก่ คอเลสเตอรอล (Cholesterol) ไดไฮโดรคอเลสเตอรอล (Dihydrocholesterol) สเตอรอล (Sterol) เป็นต้น สารเหล่านี้ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟอสโฟลิพิดในการสร้างถุงที่มีความแข็งแรงมากขึ้น โดยทั่วไปนิยมใช้คอสเลสเตอรอลเป็นสารเพิ่มความคงตัวร่วมกับฟอสโฟลิพิดให้กับตำรับลิโพโซม

ประเภทที่สอง ได้แก่ สารปรับพีเอช บัพเฟอร์ (Buffer) สารกันเสีย และสารที่มีประจุสำหรับเติมที่เป็นประจุบวกที่นิยมใช้ เช่น สเตียริลเอมีน (Starylamine) และสารเติมประจุลบ เช่น ไดซิทิลฟอสเฟต (Dicetyphophate) กรดฟอสฟาติดิก (Phosphatidic Acid) สารเหล่านี้ใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวด้วยการป้องกันหรือลดการรวมหรือรวมตัว

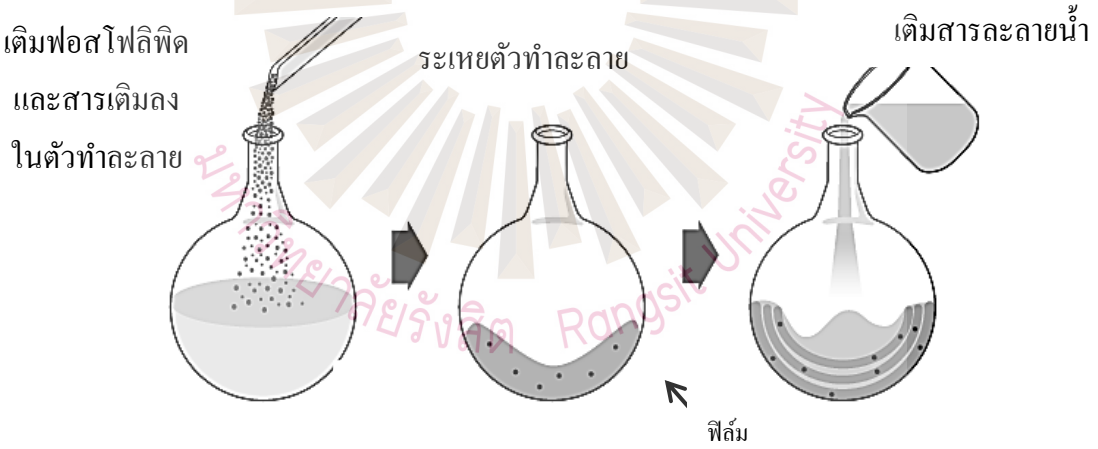
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กัน และอาจทำให้เกิดช่องว่างระหว่างชั้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บสารบางชนิดได้

2.3.5 การเตรียมลิโพโซม

การเตรียมลิโพโซมมีหลายวิธี การเลือกใช้ขึ้นอยู่แนวคิดของนักวิจัย โดยคำนึงถึงการเตรียมที่เหมาะสมกับสมบัติของตัวยา การกักเก็บและประสิทธิภาพที่ดีของลิโพโซม ตัวอย่างวิธีการเตรียมลิโพโซมมีดังนี้

วิธีฟิล์มไฮเดรชัน (Film Hydration Method) เป็นวิธีการเตรียมที่นิยมใช้มากที่สุด โดยใช้ฟอสโฟลิพิด ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการทำลิโพโซม มาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิดฟิล์มของฟอสโฟลิพิดด้วยการระเหยตัวทำ ละลายออก และทำการรีไฮเดรต (Rehydrate) ฟิล์มที่เกิดขึ้นด้วยการเติมน้ำหรือละลายบัพเฟอร์ หรือน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า T_c ของฟอสโฟลิพิด หลังจากเขย่า ฟิล์มจะกลายเป็นฟองห่อหุ้มสารออกฤทธิ์แขวนลอยอยู่ในสารละลาย จะสร้างเป็นลิโพโซม MLV ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ขั้นตอนการเตรียมลิโพโซมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน

ที่มา: Lasic, 1996

วิธีฉีดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Injection Method) เป็นการฉีดสารละลายไขมันหรือลิพิดในตัวทำละลายที่มีความดันไอสูง เช่น ฟลูโอโรคาร์บอน (Fluorocarbon) อีเทอร์ (Ether) หรือเอทานอล (Ethanol) ลงในวัฏภาคน้ำที่มีปริมาตรมากภายใต้สภาวะความดันอุณหภูมิวัฏภาคน้ำที่ใช้ต้องอยู่เหนือค่า T_c เมื่อความดันลดลงจะทำให้เกิดการระเหยของตัวละลายระหว่างทำการฉีด เกิดการสร้างเป็นลิโพโซมชนิด LUV

2.3.6 การศึกษาสภาพแวดล้อมของผนังไลโปโซม ด้วยเทคนิคทางสเปคโทรสโกปี (Spectro -Scopic Technique)

หลักการศึกษาทางสเปคโทรสโกปีเป็นการใช้พลังงานรังสีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV–Vis) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การดูดกลืน และการเรืองแสง ในส่วนของสเปคโทรสโกปีของการใชสเปคโทรสโกปในชวงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV–Vis) จะใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความยาวคลื่นในช่วงประมาณ 200 ถึง 700 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางที่แส่งส่องผ่าน (Path Length, b) และความเข้มข้น (Concentration, c) ของสารที่ดูดกลืนแสงซึ่งสัมพันธกันตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) เนื่องจากโมเลกุลที่แตกต่างกัน จะดูดกลืนรังสีที่ความยาวคลื่นที่แตกตางกัน ดังนั้นสเปคตรัมของการดูดกลืนแสงจะแสดงจำนวนของแถบการดูดกลืนแสง (Absorption Bands) ที่สอดคลองกับหมู่โครงสร้างภายในโมเลกุล การเรืองแสง (Fluorescence Spectroscopy) จะเป็นการเปลี่ยนระดับพลังงานจากสภาวะกระตุ้น (Excited State) เป็นสภาวะพื้น (Ground State) ในขณะที่สเปคโทรสโกปีของการดูดกลืนแสง (Absorption Spectroscopy) เป็นการเปลี่ยนระดับพลังงานจากสภาวะพื้น เป็นสภาวะกระตุ้น

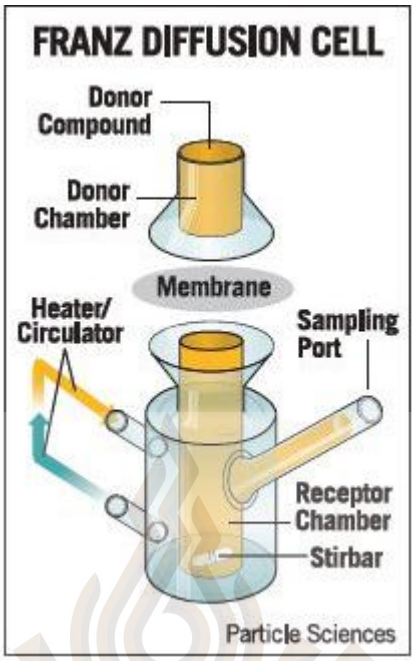
ส่วนการใช้เทคนิคสเปคโทรสโกปีของการเรืองแสง (Fluorescence Spectroscopy) เป็นวิธีการที่มีความไวสูงกว่าสเปคโทรสโกปของการดูดกลืนแสง (Absorption Spectroscopy) โดยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจะถูกปล่อยออกมาจากสารที่ถูกวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดการปล่อยพลังงานจากระดับสภาวะกระตุ้นกลับสู่สภาวะพื้น ซึ่งสารที่ถูกวิแคราะห์จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงโดยการดูดกลืนรังสี ในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล และกระบวนการกระตุ้นและคลายการกระตุ้น ซึ่งจะพบในระหว่างการวัดการเรืองแสง ดังนั้นเครื่องมือวัดจะประกอบด้วยตัวรับความยาวคลื่น 2 ชนิด คือ Excitation Beam และ Emission Beam12

ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของไลโปโซม เทคนิคทางสเปคโทรสโกปี สามารถใช้ศึกษาสภาพแวดลอมของผนังสองชั้นไลโปโซมได้ จากรายงานการวิจัยของ Rao และคณะ (2012) ซึ่งทำการศึกษาทางสเปคโทรสโกปีของอันตรกิริยาระหวางคอเลสเตอรอลที่ต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอล (Chol-PEG-Chol) และไลโปโซม โดย ทำการเตรียมตำรับไลโปโซมจาก Dimyristoyl Phosphatidylcholine (DMPC) และ Dimethyl Dioctadecylammonium Bromide (DOD AB) แล้ว

ศึกษาผลของการแทรกตัวของคอเลสเตอรอลเข้าไปในผนังสองชั้นไลโปโซมทั้ง 4 สูตรตำรับที่มีสัดส่วนของ DMPC: DODAB: Cholesterol แตกต่างกัน คือ Liposome 1 (DMPC:DODAB Molar Ratio = 9.9: 11), Liposome 2 (DMPC:DODAB molar ratio = 1:1), Liposome 3 (DMPC: DODAB: Cholesterol Molar Ratio = 8:1:1) และ Liposome 4 (DMPC: DODAB: Cholesterol Molar Ratio = 6:1:3) จากนั้นทำการติดสีโมเลกุลด้วยสี 2 ชนิด คือ Nile Red ซึ่งจะแทรกเข้าไปในผนังสองชั้นของไลโปโซม และ Pinacyananol Chloride (PIN) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่อยู่ในชั้นน้ำข้างนอก (วรนันท์ รังสิมาวงศ์ และ ธนะเศรษฐ์ ง้าวหิรัญพัฒน์, 2559)

2.4 การทดสอบการปลดปล่อยของสารสำคัญทางยา (Franz Diffusion Cell)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบการซึมผ่าน หรือการปลดปล่อยของสารสำคัญทางยา เครื่องสำอาง ผ่านเมมเบรน ผิวหนังสิ่งมีชีวิต หรือผิวหนังสังเคราะห์ เป็นการทดสอบเบื้องต้นก่อนการคัดสรรสูตรตำรับที่ให้การปลดปล่อยสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังซึ่ง นอกจากจะใช้หาปริมาณและอัตราเร็วการซึมผ่านแล้วยังช่วยให้ได้ข้อมูลรับรองความปลอดภัย (Safety) ก่อนการทดสอบในคนได้ระดับหนึ่ง แผ่นกั้นที่ใช้ในการทดสอบให้เลียนแบบความสามารถของเซลล์ผิวหนังชั้นบนสุดของคนคือชั้นสตราตัมคอร์เนียม (Stratum Corneum) เป็นชั้นที่ประกอบด้วยชั้นไขมันเรียงตัวเป็นสองชั้นรวมตัวอย่างแน่นหนา (Densely-Packed Lipid Bilayers) ใน ช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังมีลักษณะเป็นช่องแคบ ทำให้จำกัดอัตราการซึมผ่านผิวหนัง (Rate Limiting) ได้แต่ขณะเดียวกัน ก็สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยตัวทำละลายจำพวกไกลคอล(Glycol) หรือแอลกอฮอล์ (Alcohols) โดยอาศัยหลักการแพร่และใช้อุปกรณ์ทดสอบที่มี 3 ส่วน คือ ส่วนให้ (Donor) ส่วนรับ (Receptor) โดยมีแผ่นกั้น (Barrier) ดังแสดงในรูปที่ 2.14 หลักการทดสอบดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.14 ส่วนประกอบของเครื่อง Franz Diffusion Cell

ที่มา: สุปรีดี สังฆรักษ์, 2559

การเตรียมสารตัวอย่าง

ในกรณีสารตัวอย่างเป็นของเหลว ใช้ Pipette หรือ Micropipette ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงใน Donor cell

1) ปิดด้านบนของ Donor chamber ด้วย Acrylic top plate เพื่อป้องกันการระเหยของสารตัวอย่าง และปิดส่วน Sampling port ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการระเหยของ Medium เริ่มจับเวลาในการทดลอง (Start 0 ชั่วโมง)

2) ทำการทดสอบการซึมผ่าน หรือการปลดปล่อยของสารสำคัญตามเวลาที่กำหนด เช่น 30 นาที, 1, 2, 4, 5 และ 24 ชั่วโมง โดยที่แต่ละจุดเวลาจะทำการสุ่มสารละลายใน Receptor chamber 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ และแทนที่สารละลายที่สุ่มออกมาด้วย Medium เพื่อรักษาสภาวะ Sink condition

3) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการศึกษาที่ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ค้างอยู่บน Donor chamber ไปวิเคราะห์จะได้ข้อมูลของปริมาณสารสำคัญ ที่ค้างอยู่บน Membrane หรือผิวหนังสัตว์ทดลองที่ 24 ชั่วโมง (สุปรีดี สังฆรักษ์, 2559)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.5 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุลตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลวต้องละลายได้ 100 % (ผ่านการกรอง) การแยกสารได้สารนั้นต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป โดยกระบวนการแยกสารประกอบจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (Stationary Phase) หรือ คอลัมน์ (Column) กับเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่าง สามารถถูกแยกออกจากกันได้ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่กับเฟสที่เคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (Peak) ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม (Chromatogram)

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

1) Mobile Phase / Solvent : ตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ Stationary Phase (หรือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2) Degaser : ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน Mobile Phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ Column และ Detector

3) Pump : ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (Mobile Phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

4) Injector / Autosampler : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5) Column : หรือจะเรียกว่า Stationary Phase มีลักษณะเป็นของแข็ง หรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง Mobile Phase กับ Stationary Phase

6) Detector : คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี

รูปที่ 2.15 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา : ผู้วิจัย

ข้อควรปฏิบัติในการใช้

สิ่งที่ควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการใช้เครื่องโครมาโทกราฟเหลวความดันสูง คือ การดูแลรักษาคอลัมน์ให้มีอายุการใช้งานนานที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร การใช้งานที่ผิด หรือขาดการดูแลจะทำให้คอลัมน์ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงเสียหายแบบถาวร

1) กรองสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์เพื่อป้องกันคอลัมน์อุดตัน

2) ระวังการเกิดฟองอากาศในเข็มที่ใช้ดูดสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3) ล้างเข็มฉีดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานทุกครั้งทั้งก่อนและหลังการใช้งาน

4) ใช้เฉพาะสารเคมีเกรด HPLC เท่านั้น สำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5) น้ำกลั่นควรมีความบริสุทธิ์สูง โดยการกลั่น 2-3 ครั้ง รวมทั้งภาชนะต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องล้างให้สะอาดจริง ๆ

6) สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรมีการกรองสิ่งสกปรกออกก่อนใช้งาน

7) สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรทำการกำจัดแก๊สหรือฟองอากาศออกก่อนใช้งาน โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก หรือเครื่องดูดสุญญากาศ

8) ตรวจสอบพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ให้อยู่ในช่วงพีเอช 2-7 เพื่อป้องกันซิลิกาในคอลัมน์ถูกทำลาย

9) ล้างทำความสะอาดคอลัมน์ทุก ๆ ครั้ง หลังจากใช้งานเสร็จ

10) ก่อนเก็บคอลัมน์ในระยะยาว ควรล้างทำความสะอาด บรรจุคอลัมน์ด้วยสารละลายที่ผู้ผลิตกำหนด (Hickers, Schenmken, Steinrauf & Mc Whorler, 1980)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

1) เครื่อง Evaporator (มหาวิทยาลัยรังสิต)

2) เครื่อง Sonocator (มหาวิทยาลัยรังสิต)

3) เครื่อง Nanoparicle Size (มหาวิทยาลัยรังสิต)

4) เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ)

5) เครื่อง HPLC (มหาวิทยาลัยรังสิต)

6) ชุดทดสอบ Franz Diffusion Cells (มหาวิทยาลัยรังสิต)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.1.2 สารเคมี

1) Absolute Methanol (RCI Labscan, ไทย)

2) Ethanol 95% (RCI Labscan, ไทย)

3) Acetic Acid (RCI Labscan, ไทย)

4) KH_2PO_4 (Ajax Finechem, ออสเตเรีย)

5) K_2HPO_4 (Ajax Finechem, ออสเตเรีย)

6) HPLC Water (RCI Labscan, ไทย)

7) L--α Phosphatidyl Choline (Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

8) Membrane Filter (Whatman, สหรัฐอเมริกา)

9) Parafilm M (Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

10) Silica Gel (Merck, สหรัฐอเมริกา)

11) Acetonitrile (RCI Labscan, ไทย)

11) Dichloromethane (RCI Labscan, ไทย)

12) Glycyrrhizic Acid ammonium salt (Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

13) รากชะเอมเทศ (เวชพงศ์โอสถ, ไทย)

14) Gamma Oryzanol (Wako, ญี่ปุ่น)

3.1.3 อุปกรณ์เครื่องแก้วและอื่นๆ

1) Beaker

2) Cylinder

3) Stirring Rod

4) Round Bottom Flask

5) Round Bottom Flask Joint

6) Micropopette

7) Metal Stand and Clamp

8) Column Chromatography

9) Desiccator

10) Erlenmeyer Flask

11) Test Tube

12) Volumetric Flask

13) Vial

14) อลูมิเนียมฟรอยด์

15) สายยาง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2 วิธีและขั้นตอนในการวิจัย

3.2.1 การสกัดสารสกัดจากชะเอมเทศ

ชั่งรากชะเอมเทศ 100 กรัม นำมาบดหยาบ ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเตรียมตัวทำละลาย เอทานอล 500 มิลลิลิตร และน้ำ 100 มิลลิลิตร เทใส่บีกเกอร์ที่มีรากชะเอมเทศบดหยาบ ตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ คนส่วนผสมทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เมื่อครบกำหนดแล้วกรอง และนำสารละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator เทสารสกัดที่ระเหยได้ลงใน Evaporating Dish แล้วนำไปตั้งไฟให้ความร้อนเพื่อระเหยตัวทำละลายที่เหลือออก

3.2.2 การวิเคราะห์สารสกัดชะเอมเทศด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chroma- Tography, TLC)

เป็นการเปรียบเทียบสารสกัดชะเอมเทศกับสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid โดยสารที่มีค่า R_f ภายใต้สภาวะเดียวกัน จะเป็นสารเดียวกันเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ใช้โครมาโทเพลต แต่ละแผ่นหยดสาร 3 จุด โดยจุดหนึ่งเป็นสารมาตรฐาน จุดตรงกลางคือผสมสารมาตรฐานและสารสกัด และอีกจุดเป็นสารสกัด จากนั้นนำโครมาโทเพลตใส่ลงในโถตัวทำละลายเคลื่อนที่ ภายในโถบรรจุซึ่งมีตัวทำละลาย C_2H_5OH :H_2O: $C_4H_8O_2$ 1:1:3 โดยปริมาตร ปิดฝาโถ และตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายสูงขึ้นประมาณสามในสี่ของโครมาโทเพลต นำออกมาทำเครื่องหมายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึง (Solvent Front) ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำมาอ่านโครมาโทเพลต ภายใต้แสงยูวี ซึ่งต้องใช้ตัวดูดซับที่ผสมอินดิเคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Indicator) เมื่อแผ่นโครมาโทเพลตกระทบแสงยูวี ที่ช่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะสะท้อนแสงออกมาเป็นสีเขียว (ดังรูปภาคผนวกที่ 1) ดังนั้นเมื่อสารตัวอย่างที่สามารถดูดซับแสงยูวีได้ตรงจุดใด ก็จะเกิดเป็นจุดสีม่วงขึ้นที่จุดนั้นๆ ขั้นตอนต่อไปนำมาวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยการวัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง และวัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ด้วยเช่นกัน หน่วยเซนติเมตร หาค่า R_f ดังสมการที่ 1

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ถ้า R_f เท่ากันและสีเหมือนกัน แสดงว่าอาจเป็นสารเดียวกัน

3.2.3 วิธีการเตรียม Phosphate Buffer pH 7.0

ชั่ง K_2HPO_4 (Dipotassium Hydrogen Orthophosphate) 1.04 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 1 และชั่ง KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogen Orthophosphate) 0.9470 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 2 แล้วเทน้ำ 100มิลลิลิตร ลงไปทั้งสองบีกเกอร์ คนให้ละลาย เตรียมบีกเกอร์ที่ 3 จากนั้นเทสารละลาย K_2HPO_4 มา 80 มิลลิลิตร และสารละลาย KH_2PO_4 มา 20 มิลลิลิตร นำมาผสมกันในบีกเกอร์ที่สาม

3.2.4 การเตรียมตำรับพื้นของลิโพโซม

เตรียมฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidyl Choline, PC) 85 มิลลิกรัม ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างลิโพโซม กับคลอเรสเตอรอล หรือแกมมาโอไรซานอล ซึ่งเป็นสารเพิ่มความคงตัว โดยปรับอัตราส่วนของสารทั้ง 2 ชนิดเป็น 5 ระดับ คือ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัม แต่ละอัตราส่วนจะใช้บัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ Phosphate Buffer และ HPLC Water โดยชั่ง PC และสารเติมลงในขวดก้นกลมแบบมีข้อต่อ (Round Bottom Flask) จากนั้นละลายด้วย Organic Solvent Mixture (Methanol : Dichloromethane, 2:1) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปทำให้เกิดเป็นฟิล์มบาง(ดังรูปภาคผนวกที่ 3) โดยระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (ดังรูปภาคผนวกที่ 2) จากนั้นนำสารที่ระเหยแห้งมาทิ้งค้างคืนไว้ในโถดูดความชื้น (ดังรูปภาคผนวกที่ 4) และเติมบัฟเฟอร์ละลายให้หมด แล้วนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องโซนิคเคท จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูลักษณะทางกายภาพ และนำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้า(ดังรูปภาคผนวกที่ 5) ด้วยเครื่องวัดขนาดนาโน (NanoPlus, USA)

3.2.5 การเติมสารสกัดชะเอมเทศลงในลิโพโซม

เตรียมสูตรตำรับพื้นที่คงตัวโดยเพิ่มสารสกัดชะเอมเทศ จำนวน 5 ความเข้มข้น คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ละลายด้วย Organic Solvent Mixture (Methanol : Dichloromethane, 2:1) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator จากนั้นนำสารที่ระเหยแห้งมาทิ้งค้างคืนไว้ในโถดูดความชื้น และเติมบัฟเฟอร์ละลายให้หมด แล้วนำไปลดขนาดอนุภาคในเครื่องโซนิคเคท จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูลักษณะทางกายภาพ และนำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.6 การวัดขนาดอนุภาค (Particle)

นำตำรับลิโพโซมที่ต้องการมาวัดขนาด โดยดูดสารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย HPLC Water 25 เท่า เทลงใน Cuvette นำเข้าเครื่องและทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C วัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Average, $\overline{x}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

3.2.7 การวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta Potential)

นำลิโพโซมที่เจือจางตำรับแล้ว ใช้กระบอกฉีดสารดูดมาประมาณ 1 มิลลิลิตร สวมเข้ากับเซลล์ที่ใช้วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีตา ทำการฉีดสารในกระบอกฉีดให้สารผ่านเข้าเซลล์ หากมีฟองอากาศให้ไล่ฟองออกโดยการผลักกระบอกฉีดสารเข้า-ออกจนฟองหายไป นำเซลล์ใส่ลงในเครื่อง และทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C ทำการวัด 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.8 การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างที่ต้องการไปถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope, SEM) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec)

3.2.9 การทดสอบการเก็บกักสารสกัดชะเอมเทศ

การหาปริมาณการเก็บกักสารในลิโพโซมจะถูกแยกออกจากสารที่ไม่ถูกเก็บกัก โดยวิธี Sephadex G-50 MiniColumn Centrifugation โดยใช้ Sephadex G-50 500 ไมโครลิตร (µl) แช่ใน Water (For HPLC) 100 มิลลิลิตร ทิ้งให้พองตัวหนึ่งคืนแล้วเทน้ำออกและบรรจุเจลลงในหลอดเข็มฉีดยา ใส่ในหลอด Micro Tube แล้วหมุนเวี่ยง (ดังรูปภาคผนวกที่ 6) จนน้ำหมดจากคอลัมน์เปลี่ยนหลอด Micro Tube นำมาหมุนเวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเอาเตรียมลิโพโซม 200 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และเติม Water (For HPLC) 200 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จะได้ลิโพโซมที่ปราศจากสารสกัดที่ไม่ถูกเก็บกัก อยู่ในหลอด Micro Tube จากนั้นนำไปหาปริมาณการเก็บกัดสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.10 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสกัดชะเอมเทศในตำรับลิโพโซม

โดยวิธี Reversed Phase HPLC Chromatography Conditions

Column : Luna C-18 (4.6x15 cm)

Mobile Phase : 1% (v/v) Acetic Acid in Water/ Acetonitrile (Gradient System)

Flow-Rate : 0.8 ml/ min

Detector : 254 nm

Injection Volume : 10 µl

3.2.11 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดชะเอมเทศ ด้วยวิธี HPLC

นำลิโพโซม ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร เติม Triton x-100 ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงให้สารไขมันตกตะกอน นำสารละลายชั้นบน มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดชะเอมเทศด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Luna C-18 (4.6x15 เซนติเมตร) ระบบตัวทำละลาย Isocratic (Acetronitrile: 1% Acetic Acid, 80:20) โดยมีอัตราการไหลของตัวทำละลาย (Mobile Phase) 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV Detector ที่ 254 นาโนเมตร และปริมาณการฉีดที่ 10 ไมโครลิตร

3.2.12 การทดสอบการปลดปล่อยของตำรับลิโพโซม

เตรียม Phosphate Buffer pH 7.4

ชั่งสาร K_2HPO_4 6.804 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 1 และชั่ง KH_2PO_4 8.709 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 2 แล้วเทน้ำ 50 มิลลิลิตร ลงไปทั้งสองบีกเกอร์ คนให้ละลาย เตรียมบีกเกอร์ที่ 3 จากนั้นเทสาร ละลาย K_2HPO_4 มา 9.9 มิลลิลิตร และสารละลาย KH_2PO_4 มา 40.1 มิลลิลิตร ตวงน้ำ 500 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ที่สามและเทบีกเกอร์ที่ 1 กับ 2 ลงไปผสมกัน จากนั้นใส่แผ่น Cellulose Membrane ลงในบีกเกอร์ที่ 3 ใช้กระดาษฟลอยด์ปิดปากบีกเกอร์ ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นให้เติม Tween 20 2% ลงในบีกเกอร์ คนให้เข้ากัน

นำมาทดสอบด้วยเครื่อง Franz Diffusion Cell เติมสูตรตำรับนาโนอิมัลชันของสารสกัดชะเอมเทศ ลงใน Donor Chamber เพื่อให้ส่วนของเมมเบรนได้สัมผัสกับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Phosphate Buffer pH 7.4 ได้อย่างต่อเนื่อง และด้วยการไหลของ Phosphate Buffer ใน Receptor Chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ±1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งในการเก็บตัวอย่างจะมีการเติม Phosphate Buffer เข้าไปเพื่อแทนที่ตัวอย่างที่ถูกเก็บออกมาในปริมาณที่เท่ากันโดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5 และ 24 ชั่วโมง (ดังรูปภาคผนวกที่ 7) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดชะเอมเทศ ด้วยวิธี HPLC

3.2.13 การเตรียม Standard Stock Solution

ชั่งสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid 0.5 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3.2.14 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ด้วย Linearity of Method

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid จำนวน 5 ความเข้มข้น โดย Pipette Standard Stock Solution ปริมาณ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล นำมากรองผ่าน Membrane Filter 0.20 ไมโครเมตร และนำสารตัวอย่างที่ผ่านการกรองไปวัดค่าด้วยเครื่อง HPLC ทำการฉีด 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 3 ครั้ง จากนั้นทำการ Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับ Peak Area ที่ได้ หลังจากนั้นคำนวณหาค่า Correlation Coefficient (R-square, r^2) โดยค่า r^2 ควรอยู่ในช่วง 0.9995-0.9999

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.15 การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

Intraday Precision (Repeatability) คือ การทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้งในช่วงเวลาเดียวกัน โดยผู้ทำการทดลองและสภาวะการทดลองรวมทั้งห้องปฏิบัติการเดียวกัน ทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid จำนวน 1 ความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง) %RSD ของ Peak Area ที่ได้นั้นจะต้องน้อยกว่า 2%

Interday Precision (Reproducbility) คือ การศึกษาความแม่นยำระหว่างวัน โดยทำการทดลองซ้ำแต่ต่างกันวันสองวัน เตรียม Mobile Phase ใหม่ ทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน

Glycyrrhizic Acidจำนวน 1 ความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง) %RSD ของ Peak Area ที่ได้นั้นจะต้องน้อยกว่า 2%

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมตำรับพื้นของลิโพโซม

สูตรตำรับลิโพโซมทำการเตรียมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชั่น โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมละลายฟอสโฟลิพิด นำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจนเกิดเป็นฟิล์ม จากนั้นทำให้ฟิล์มนี้กลับมาเปียกซ้ำอีกครั้ง

ขั้นตอนการเตรียมประกอบด้วย Phosphatidyl Choline (PC) เป็นส่วนประกอบหลักและสารเพิ่มความคงตัว คือ คลอเลสเตอรอล และ แกมม่าโอไรซานอล โดยเตรียมปรับอัตราส่วน 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ ใช้ buffer 2 ตัว คือ Phosphate Buffer pH 7.0 และ HPLC Water โดยชั่งฟอสฟาติดิลโคลีน และสารเพิ่มความคงตัว ในขวดก้นกลมแบบมีข้อต่อ (Round Bottom Flask) จากนั้นนำมาละลายด้วย Organic Solvent Mixture (Methanol: Dichloromethane 2:1) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator จากนั้นนำสารที่ระเหยแห้งมาทิ้งค้างคืนไว้ในโถดูดความชื้น และเติมบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ละลายให้หมด แล้วนำไปลดขนาดอนุภาคในเครื่องโซนิคเคท จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูลักษณะทางกายภาพ ตามตารางที่ 4.1-4.2

เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะทางกายภาพที่ดี ควรโปร่งแสงหรือโปร่งใส ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 4.1 อัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของตำรับพื้นลิโพโซมที่ใช้สารเพิ่มความคงตัว (คอลเลสเตอรอล)

อัตราส่วน PC:คลอเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
85:1.0	โปร่งแสง ตกตะกอน
85:1.5	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:2.0	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:2.5	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:3.0	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของตำรับพื้นลิโพโซมที่ใช้สารเพิ่มความคงตัว (แกมม่าโอไรซานอล)

อัตราส่วน PC:แกมม่าโอไรซานอล (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
85:1.0	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:1.5	โปร่งใส ไม่ตกตะกอน
85:2.0	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:2.5	โปร่งแสง ไม่ตกตะกอน
85:3.0	ทึบแสง ไม่ตกตะกอน

4.2 การวัดขนาดอนุภาค ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้า ของตำรับลิโพโซม

นำตำรับลิโพโซมมาวัดขนาดอนุภาค โดยปิเปต (Pipette) มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย HPLC Water 25 เท่า เทลงใน Cuvette นำเข้าเครื่องและทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ºC วัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Average) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อหาขนาดอนุภาค ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเซต้า และดัชนีการกระจายตัว ตังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.3 สูตรที่ 1 (PC และคลอเรสเตอรอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

อัตราส่วน (mg) (PC:คลอเรสเตอรอล)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
85 :1.0	136.07±0.84	0.24±0.009	-5.06±0.63	ตกตะกอน
85 :1.5	138.13±1.09	0.29±0.01	-22.60±1.82	โปร่งใสไม่ตกตะกอน
85 :2.0	183.57±7.89	0.28±0.03	-30.41±1.48	ตกตะกอน
85 :2.5	214.27±15.29	0.26±0.03	-10.76±1.01	โปร่งแสงไม่ตกตะกอน
85 :3.0	299.93±55.38	0.29±0.05	-2.85±1.08	โปร่งแสงไม่ตกตะกอน

อัตราส่วนที่ไม่แยกชั้น นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน มาวัดขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าอีกครั้ง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สูตรที่ 1 (PC และคลอเรสเตอรอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

อัตราส่วน (mg) (PC:คลอเรสเตอรอล)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)
85 :1.5	211.20±2.33	0.42±0.02	-8.14±1.56
85 :2.5	154.97±3.64	0.31±0.01	-1.33±3.60
85 :3.0	355.37±19.18	0.26±0.02	-2.15±0.10

ตารางที่ 4.5 สูตรที่ 2 (PC และแกมม่า โอไรซานอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 1 วัน

อัตราส่วน (mg) (PC:แกมม่าโอไรซานอล)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
85 :1.0	145.30±5.53	0.28±0.02	+4.32±0.21	ตกตะกอน
85 :1.5	199.03±0.56	0.31±0.03	-1.41±0.67	โปร่งใสไม่ตกตะกอน
85 :2.0	136.53±1.22	0.28±0.01	-8.20±0.09	โปร่งแสงไม่ตกตะกอน

ตารางที่ 4.5 สูตรที่ 2 (PC และแกมม่า โอไรซานอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 1 วัน (ต่อ)

อัตราส่วน (mg) (PC:แกมม่าโอไรซานอล)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
85 :2.5	137.63±1.04	0.30±0.01	-6.88±0.26	โปร่งแสงไม่ตกตะกอน
85 :3.0	133.90±2.13	0.33±0.00	-2.71±0.80	ทึบแสงตกตะกอน

อัตราส่วนที่ไม่แยกชั้น นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน มาวัดขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าอีกครั้ง ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สูตรที่ 2 (PC และแกมม่าโอไรซานอล) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

อัตราส่วน (mg) (PC:แกมม่าโอไรซานอล)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)
85 :1.5	220.20±16.07	0.49±0.04	-3.79±1.10
85 :2.0	129.87±1.49	0.26±0.01	-9.16±0.38
85 :2.5	291.00±36.84	0.29±0.04	-6.88±2.80

4.3 การเพิ่มสารสกัดชะเอมเทศในตำรับพื้นลิโพโซม

อัตราส่วนที่เลือกจากสูตรที่ 1: PC และคลอเรสเตอรอล คือ 85 : 2.5 นำมาเพิ่มสารสกัดชะเอมเทศลงไปในตำรับลิโพโซม ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สูตรที่ 1 PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

อัตราส่วน (mg) (PC:คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)
85 : 2.5 :0.5	794.83±5.76	0.44±0.01	-8.5±0.44
85 : 2.5 :1.0	2003.57±165.96	1.04±0.08	-16.45±0.54

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.7 สูตรที่ 1 PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน (ต่อ)

อัตราส่วน (mg) (PC:คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)
85 : 2.5 :1.5	821.50±47.67	0.49±0.02	-13.97±0.84
85 : 2.5 :2.0	2632.97±580.58	0.76±0.44	-15.92±1.05
85 : 2.5 :2.5	1718.97±1137.58	0.91±0.60	-9.08±0.61

เมื่อตั้งทิ้งที่ไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน นำมาวัดค่าขนาดอนุภาคและค่าต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าอีกครั้ง (ตารางที่4.8)

ตารางที่ 4.8 สูตรที่ 1 PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

อัตราส่วน (mg) (PC:คลอเรสเตอ รอล : สารสกัดชะเอมเทศ)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
85 : 2.5 :0.5	211.63±1.04	0.33±0.01	-5.8±0.37	โปร่งใส มีตกตะกอน
85 : 2.5 :1.0	336.37±9.71	0.23±0.01	-6.26±1.04	โปร่งใส ไม่ตกตะกอน
85 : 2.5 :1.5	183.23±23.98	0.26±0.05	-7.85±0.45	โปร่งใส ไม่ตกตะกอน
85 : 2.5 :2.0	311.13±25.38	0.28±0.04	-8.93±1.06	โปร่งใส ไม่ตกตะกอน
85 : 2.5 :2.5	207.57±4.78	0.33±0.02	-9.96±0.19	โปร่งใส ไม่ตกตะกอน

อัตราส่วนที่เลือกจากสูตรที่ 2 : PC และแกมม่าโอไรซานอล คือ 85 : 2.0 นำมาเพิ่มสารสกัดชะเอมเทศลงไปในตำรับลิโพโซม ดังตารางที่ 4.9

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.9 สูตรที่ 2 PC :แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

อัตราส่วน (mg) (PC:แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)
85 : 2.0 :0.5	556.00±132.87	0.42±0.03	-18.9±0.80
85 : 2.0 :1.0	654.47±98.04	0.42±0.02	-31.4±0.22
85 : 2.0 :1.5	404.60±31.60	0.42±0.02	-17.29±1.40
85 : 2.0 :2.0	2414.03±187.69	1.11±0.04	-4.3±0.32
85 : 2.0 :2.5	443.53±50.24	0.39±0.05	-19.1±0.75

เมื่อตั้งทิ้งที่ไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน นำมาวัดค่าขนาดอนุภาคและค่าต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าอีกครั้ง ดังตารางที่ 4.10

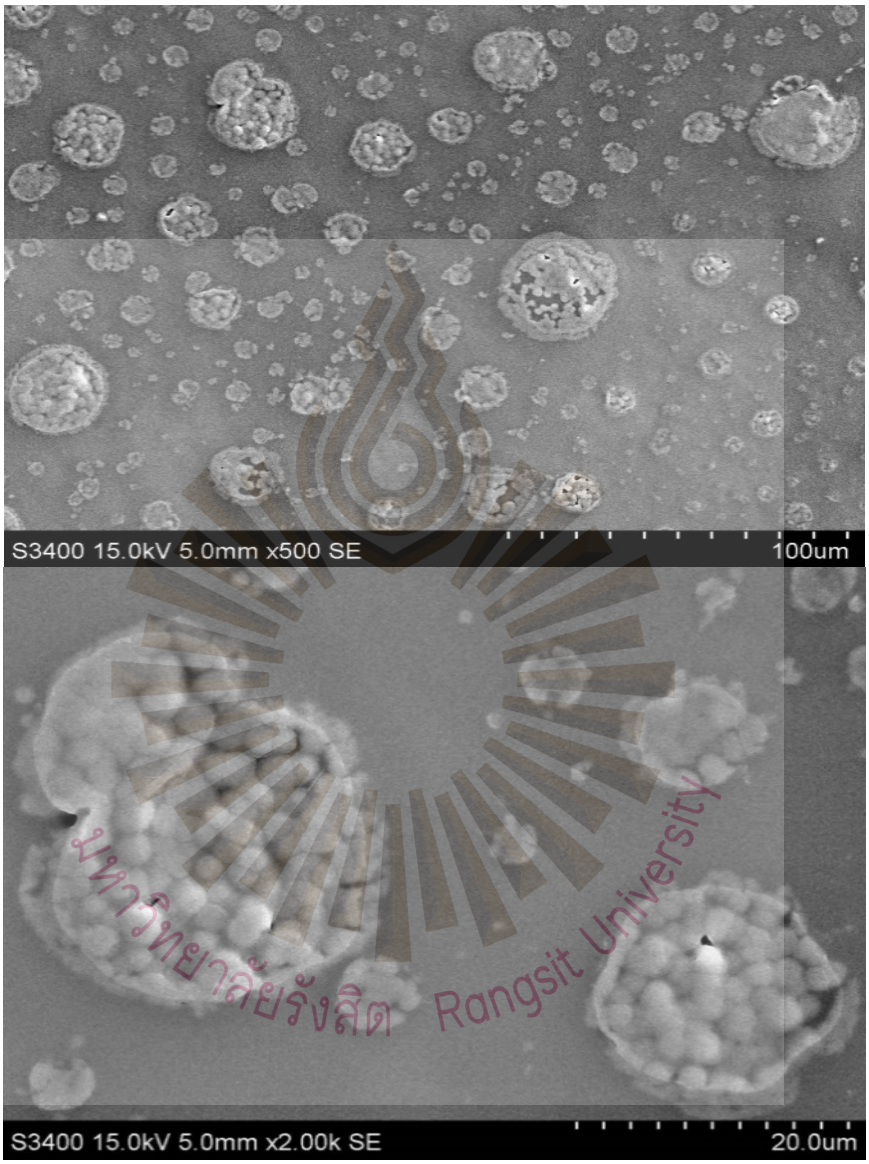
ตารางที่ 4.10 สูตรที่ 2 PC :แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

อัตราส่วน (mg) (PC:แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ)	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
85 : 2.0 :0.5	238.20±5.00	0.34±0.02	2.38±0.97	โปร่งใสไม่ตกตะกอน
85 : 2.0 :1.0	405.70±6.53	0.27±0.004	-19.50±0.65	ตกตะกอน
85 : 2.0 :1.5	270.07±15.49	0.38±0.03	-7.09±1.06	โปร่งใสไม่ตกตะกอน
85 : 2.0 :2.0	223.8±27.69	0.40±0.04	-6.30±0.70	ตกตะกอนทึบแสง
85 : 2.0 :2.5	160.67±6.09	0.33±0.01	-6.6±1.13	โปร่งใสไม่ตกตะกอน

4.4 การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

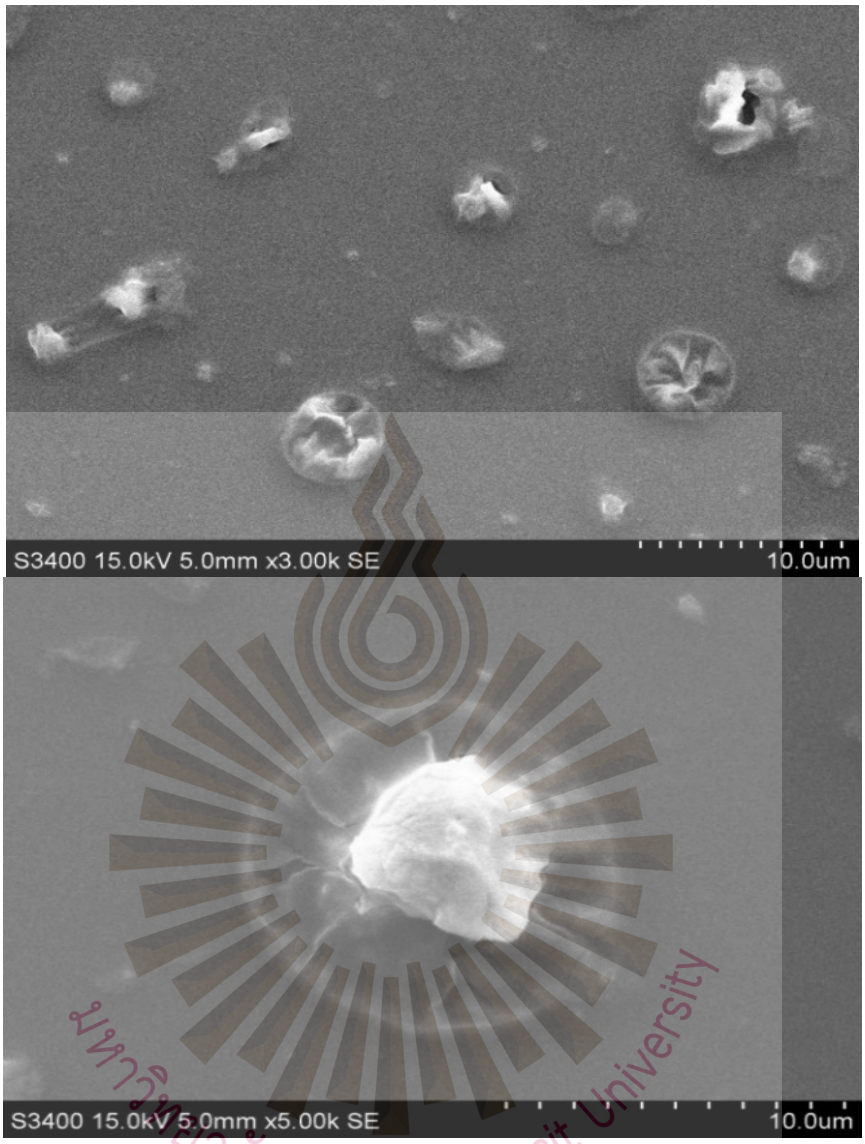
นำสูตรตำรับลิโพโซมไปส่งตรวจด้วยกล้อง SEM (Scanning Electron Microscope) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างของลิโพโซม พบว่า ลิโปโซม

สูตร PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ พบว่ามีผนังลิโปโซมชัดเจน ลิโปโซมขนาดใหญ่มีขนาดประมาณ 10 - 30 ไมครอน และภายในบรรจุลิโปโซมขนาดเล็ก (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 แสดงรูปร่างของลิโปโซมสูตร PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5 mg) (บน) เป็นกำลังขยาย 500 เท่า (ล่าง) เป็นกำลังขยาย 2000 เท่า

ลิโปโซมสูตร PC: แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ พบว่าลิโปโซมมีขนาดเล็กกว่าสูตรที่มีคอลเลสเตอรอล และมีขนาด 2 - 5 ไมครอน ซึ่งจะเป็นแบบ SUV (Small Unilamella Vesicle) ภาพจาก SEM จะเห็นอนุภาคขนาดใหญ่เป็นส่วนใหญ่ อนุภาคขนาดเล็กมองไม่ชัดเจน และบางส่วนแตกออกเนื่องจากการเตรียมตัวอย่างในการวัด SEM (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างของลิโปโซมสูตร PC:แกมม่าโอไรซานอล :สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5 mg) (บน) เป็นกำลังขยาย 3000 เท่า (ล่าง) เป็นกำลังขยาย 5000 เท่า

4.5 การศึกษาการกักเก็บสารสกัดลิโพโซมของสูตรตำรับลิโพโซม

การศึกษาหาปริมาณการกักเก็บสาร ใช้วิธี Sephadex G-50 MiniColumn Centrifugation โดยสามารถแยกสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากตำรับลิโพโซม และนำไปหาปริมาณการกักเก็บด้วยเครื่อง HPLC ดังตารางที่ 4.11 – 4.12

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการศึกษาค่าการกักเก็บสารสกัดชะเอมเทศของสูตรตำรับลิโพโซม PC : แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5)

ตัวอย่าง	Peak Area (ครั้งที่1)	Peak Area (ครั้งที่2)	Peak Area (ครั้งที่3)
Free Drug	31320	32314	32585
Total	63654	62303	66608
%EE	50.8	48.13	51.08
Average %EE	50.00		
Average %RE	50.00		

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการศึกษาค่าการกักเก็บสารสกัดชะเอมเทศของสูตรตำรับลิโพโซม PC:คลอเลสเตอรอล : สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5)

ตัวอย่าง	Peak Area (ครั้งที่1)	Peak Area (ครั้งที่2)
Free Drug	36648	37665
Total	50777	48958
%EE	27.83	23.06
Average %EE	25.45	
Average %RE	74.55	

สูตรคำนวณหาปริมาณการกักเก็บสาร (%EE, Encapsulation Efficiency)

$$\%EE = \{(Total - Free\ Drug)/Total\} \times 100$$

สูตรคำนวณ %RSD

$$\%RSD = (SD/\bar{X}) \times 100$$

สูตรคำนวณ

$$\%RE = (Peak\ Area\ Free\ Drug/\ Peak\ Area\ Total) \times 100$$

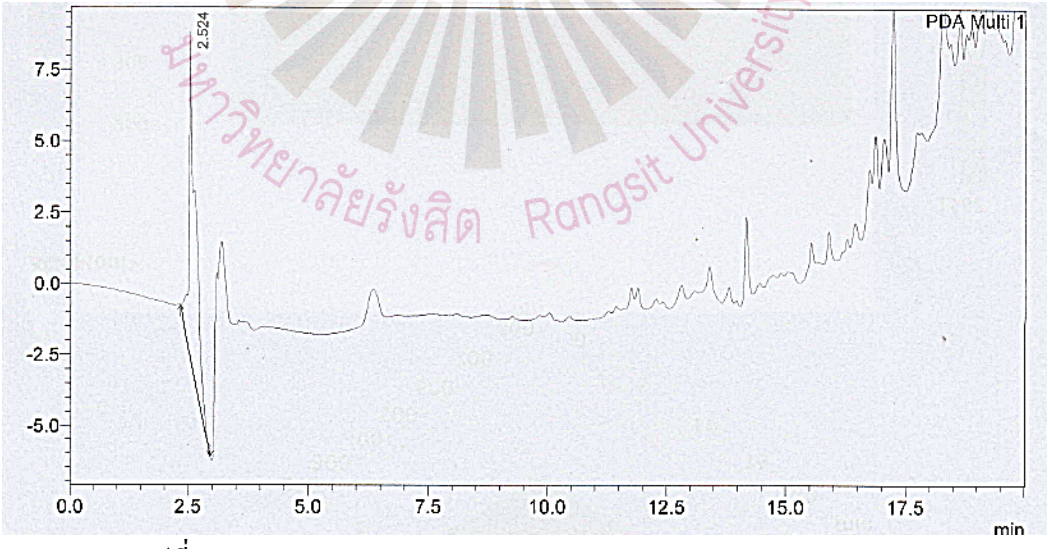
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารสกัดชะเอมเทศของตำรับลิโพโซม ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์สารสกัดชะเอมเทศ ในสภาวะที่เหมาะสมโดยที Mobile Phase คือ Acetonitrile และ ร้อยละ 1 ของ Acetic Acid ใน HPLC Water ใช้ระบบ Gradient System โดยมีอัตราส่วน 90:10, 20:80, 90:10 ที่เวลา 0, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.13 โดยมีอัตราส่วนการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ที่ใช้คือ Luna C18 (5 µm, 4.6 mm ID x 15 cm) วัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโมเมตร ใช้ปริมาณการฉีดที่ 10 ไมโครลิตร สามารถวิเคราะห์สารมาตรฐาน มีค่า Relation Time เท่ากับ 2.524 ตามรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ระบบ Gradient System ของ Mobile Phase

เวลา (นาที)	1% (v/v) Acetic Acid in Water	Acetonitrile
0	90	10
15	20	80
20	90	10

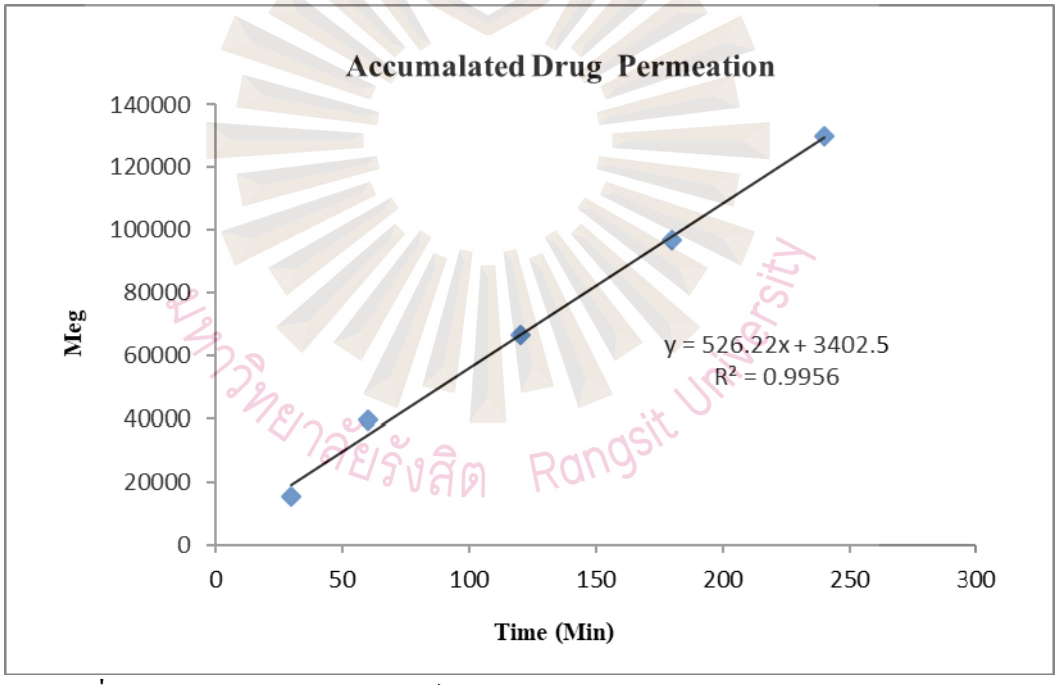


รูปที่ 4.3 HPLC Chromatogram ของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid

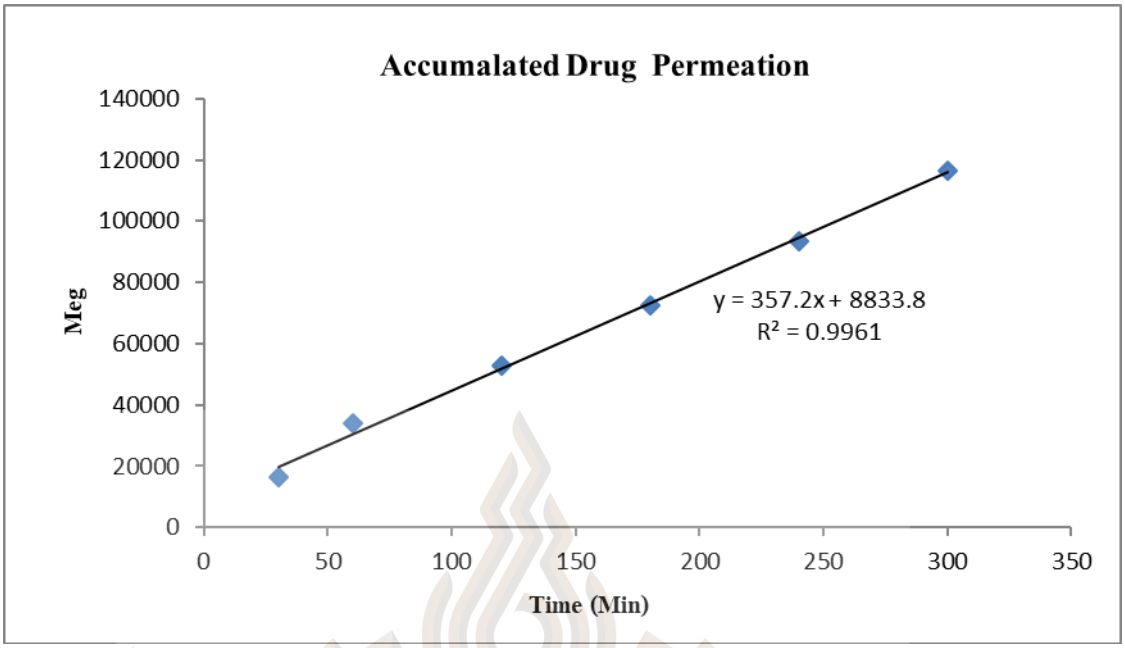
4.7 การศึกษาการปลดปล่อยของสารสกัดชะเอมเทศในตำรับลิโพโซม

ผลการศึกษาของการทดลองการซึมผ่าน แสดงการปลดปล่อยสารสกัดชะเอมเทศของตำรับลิโพโซมสูตร PC: แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5) ให้ค่าลดลงตามระยะเวลาที่นานขึ้นด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งมีค่าความชันของกราฟ (Slope) จากสมการเชิงเส้นเท่ากับ 76.434 และสูตรตำรับลิโพโซม PC :คลอเรสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5) ให้ค่าลดลงตามระยะเวลาที่นานขึ้นด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งมีค่าความชันของกราฟ (Slope) จากสมการเชิงเส้นเท่ากับ 19.42

การคำนวณหาค่า Flux (J) คือ ปริมาณสารที่ซึมผ่านผิวหนังต่อหน่วยเวลา พื้นที่ (ไมโคร กรัม/นาที.ซม.^{2}) โดยมีค่าพื้นที่หน้าตัดของ Franz Diffusion Cells เท่ากับ 1.767 ซม.^{2}



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสะสมของสารสกัดชะเอมเทศกับเวลา (นาที) ของสูตร PC: แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5)



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสะสมของสารสกัดชะเอมเทศ กับเวลา (นาที) ของสูตร PC: คลอเรสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.5: 1.5)

สูตรการคำนวณ

Flux (J) = (Q/A) x t.

เมื่อ Q/t = Slope

A = Area

คำนวณค่า Flux (J)

PC: แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ = 526.22/1.767

= 297.80 ไมโครกรัม/นาที .ซม.^{2}

PC: คลอเลสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ = 357.2/1.767

= 202.15 ไมโครกรัม/นาที.ซม.^{2}

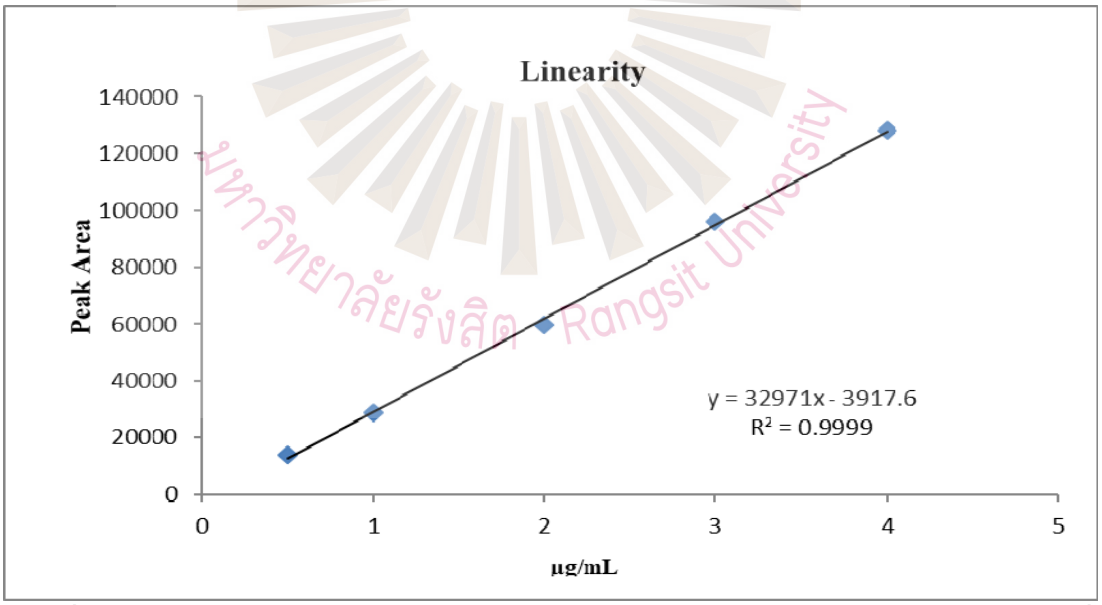
4.8 Linearity of Method

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น ได้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารนำเสนอในรูปแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำสุดจนถึงสูงสุด ใช้ตัวแปรสองตัวคือ การดูดกลื่นแสงและความเข้มข้น ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 2, 3 และ 4

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผู้ทำการทดลองคนเดียวในสภาวะแวดล้อมและเครื่องมือเดียวกัน ทำการฉีดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ (Correlation Coefficient: R^2) ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงผลและค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	Peak Area (ครั้งที่ 1)	Peak Area (ครั้งที่ 2)	Peak Area (ครั้งที่ 3)	Average
0.5	13870	14740	13060	13890
1	28908	29000	28491	28800
2	55000	53958	69733	59564
3	100297	87799	100071	96056
4	116372	136092	132446	128303



รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak Area และสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid ที่ความเข้มข้น 0.5 – 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นแล้ว จะได้สมการเส้นตรง คือ y = 32971x - 3917.6 เมื่อ X คือ สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid และมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (R^2) คือ 0.9999 ดังแสดงในรูปที่ 4.7

4.9 Precision of Method

ความแม่นยำของการทดลองและวิเคราะห์ซ้ำๆกันหลายๆครั้ง ความต่างของผลการทดลองและวิเคราะห์ ที่ได้จากการการทดลองและวิเคราะห์ซ้ำๆ จะแสดงค่าเป็น ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน หรือ SD ค่าที่ได้จะต้องมีค่าน้อยกว่า 2 %RSD

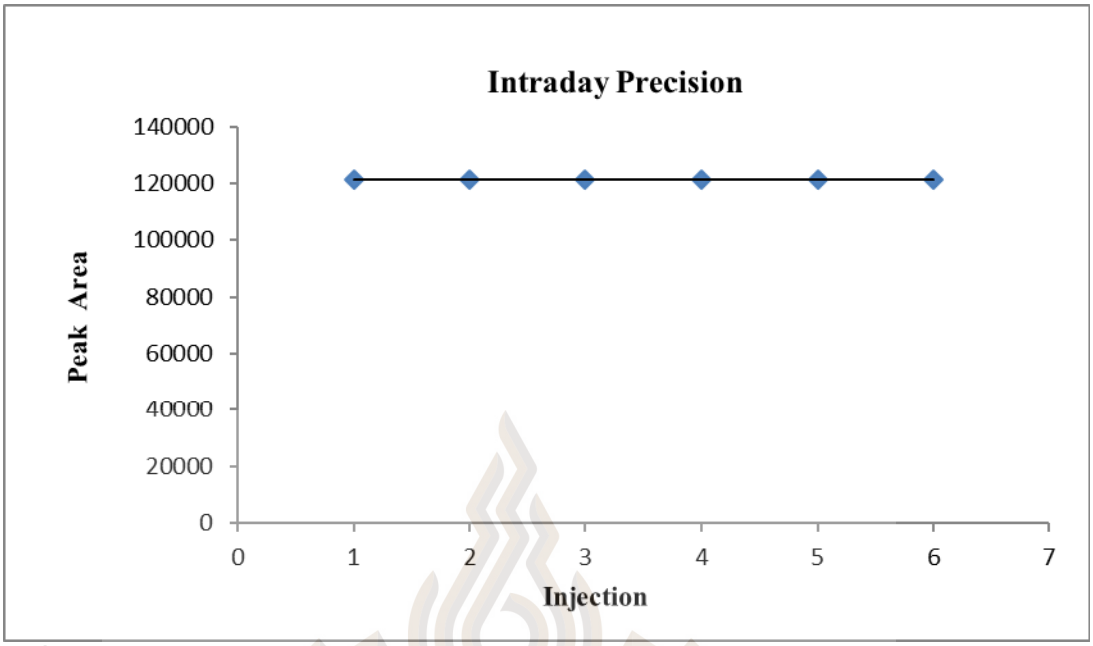
วิธีการวิเคราะห์มี 2 วิธี 1) Repeatability คือ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน คือ วิธีการทดลอง, ห้องปฏิบัติการ, เครื่องมือและผู้วิเคราะห์เดียวกัน 2) Reproducibility คือ ความแม่นยำที่เกิดจากการทดลองและวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาพแวดล้อมเดียวกันโดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ผู้วิเคราะห์ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการแตกต่างกัน ระดับความแม่นยำขึ้นกับความเข้มข้นของตัวอย่าง

Intraday Precision เป็นการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง โดยผู้ทำการทดลองตนเดียวในสภาวะแวดล้อมและเครื่องมือเดียวกัน ดังตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.15 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของ Glycyrrhizic Acid แบบ Intraday Precision

Injection	Peak Area
1	125442
2	125024
3	125325
4	125412
5	125259
6	125458
Average	125320
SD	119
%RSD	0.09

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



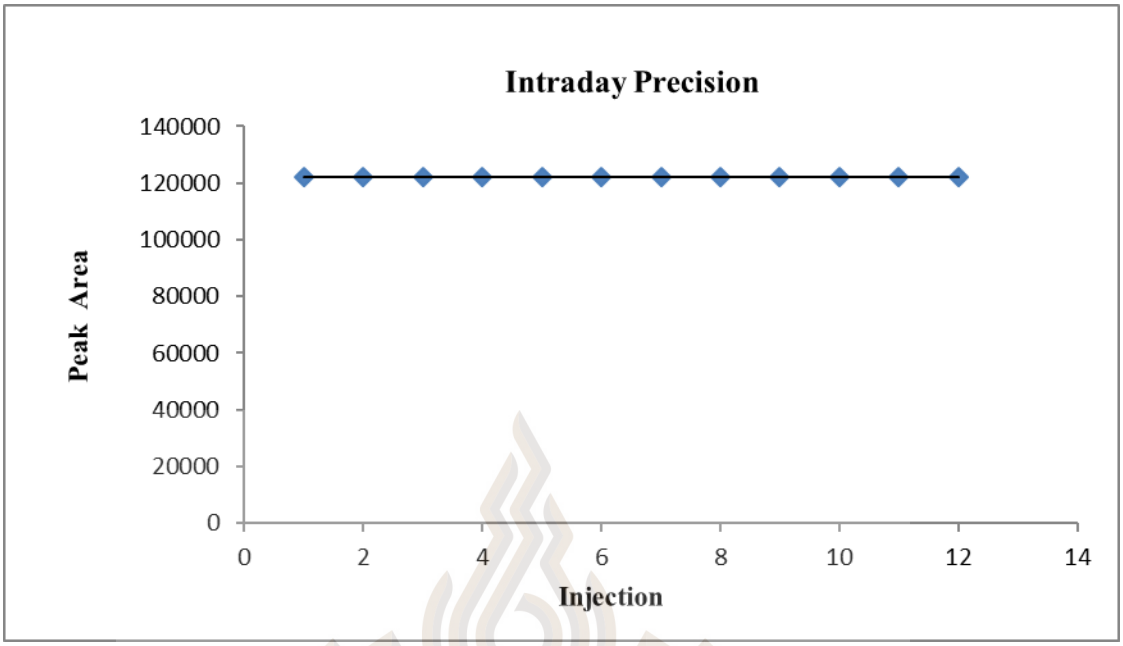
รูปที่ 4.7 กราฟเส้นตรงของการศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid แบบ Intraday Precision ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Interday Precision เป็นการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ทำการทดลองซ้ำแต่ต่างกัน 2 วัน โดยการเตรียม Mobile Phase ใหม่ และเครื่องมือในการทดลองใหม่ ดังตารางที่ 4.16 และ รูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.16 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ของ Glycyrrhizic Acid แบบ Interday Precision

Injection	Peak Area
7	122954
8	122219
9	122048
10	122116
11	122354
12	122285
Average	122329
SD	216
%RSD	0.18

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.8 ความแม่นยำในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid แบบ Interday Precision ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกราฟเส้นตรง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

รากชะเอมเทศนำมาสกัดสารเอง จะได้ปริมาณสารสำคัญที่ต้องการ มากกว่ารากชะเอมเทศแบบสกัดสำเร็จรูป เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง การสกัดสารจากชะเอมเทศ หมั่นคนสารทุกวันจนครบระยะเวลา เพื่อให้สาระสำคัญออกมามากขึ้น

การทดลองเลือกวิธีการเตรียมลิโพโซมด้วยวิธีไฮเดรชั่น มีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด จากการทดลองสูตรที่ 1 (PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ) ค่าขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าเมื่อทิ้งไว้ 1 วัน จะมีค่าขนาดอนุภาคขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับสูตรที่ 2 (การที่ขนาดใหญ่ อาจเนื่องมาจากกระบวนการลดขนาดอนุภาคเกิดไม่สมบูรณ์) ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีค่าค่อนข้างต่ำทั้ง 2 สูตร หลังจากตั้งทิ้งไว้ 1 เดือน นำสูตรทั้ง 2 มาวัดอีกครั้ง พบว่าค่าขนาดอนุภาคของมีขนาดเล็กลง อยู่ในเกณฑ์ที่ดี อัตราส่วนที่ดีที่สุดของสูตรที่ 1 คือ 85 :2.5 :1.5 มีความคงตัวที่ดีและค่าขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กกว่าสูตรที่ 2 เล็กน้อย ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้าน้อยลงทั้ง 2 สูตร จากนั้นนำอัตราที่ดีที่สุดของแต่ละตำรับไปส่งตรวจที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติเพื่อถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ลิโปโซมสูตร PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ พบว่ามีผนังลิโปโซมชัดเจน ลิโปโซมขนาดใหญ่มีขนาดประมาณ 10 - 30 ไมครอน และภายในบรรจุลิโปโซมขนาดเล็ก ส่วนลิโปโซมสูตร PC: แกมม่าโอไรซานอล : สารสกัดชะเอมเทศ พบว่าลิโปโซมมีขนาดเล็กกว่าสูตรที่มีคอลเลสเตอรอล และมีขนาด 2 - 5 ไมครอน ซึ่งจะเป็นแบบ SUV (Small Unilamella Vesicle) ภาพจาก SEM จะเห็นอนุภาคขนาดใหญ่เป็นส่วนใหญ่ อนุภาคขนาดเล็กมองไม่ชัดเจน และบางส่วนแตกออกเนื่องจากการเตรียมตัวอย่างในการวัด SEM ขนาดที่ได้จาก SEM มีขนาดเล็กกว่าที่วัดจาก Dynamic Light Scattering (DLS) เนื่องจากวิธีหลังจะเป็นขนาดของ hydrodynamic particle diameter ซึ่งจะรวมชั้นของเหลวที่มีประจุหุ้มรอบอนุภาคอีก 2 ชั้น จึงทำให้ขนาดใหญ่กว่าความเป็นจริง (Hackley and Cloqston, 2011) การใช้

แกมม่าโอไรซานอลมีข้อดีที่เมื่อลิโพโซมแตกออก ปลดปล่อยสารสำคัญภายในเข้าสู่ผิวหนัง แกมม่าโอไรซานอลที่มีส่วนของกรดเฟอรูลิก จะสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผิวหนังได้ด้วย ซึ่งไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

การวิเคราะห์หาปริมาณการกักเก็บสารสกัดชะเอมเทศในลิโพโซมโดยวิธี Sephadex G-50 MiniColumn Centrifugation สามารถแยกสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากตำรับลิโพโซม จากนั้นนำไปหาปริมาณการกักเก็บสารสำคัญในลิโพโซมของแต่ละสูตร สูตรที่ 1 (PC: คลอเรสเตอรอล :สารสกัดชะเอมเทศ) มีค่าเท่ากับ 25.45 และสูตรที่ 2 PC :แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ (85 : 2.0: 1.5) มีค่าเท่ากับ 50 ซึ่งถือว่าปริมาณการกักเก็บสารสำคัญของสูตรที่ 2 มากกว่าสูตรแรก

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid ด้วยวิธี HPLC มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ คือ Luna C18 (5 µm, 4.6 mm ID x 15 cm) อัตราการเคลื่อนตัวของสารละลาย 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ระบบ Gradient 1% Acetic Acid ใน HPLC Water และ Acetonitrile เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งระบบ 20 นาที สามารถวิเคราะห์สารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid เป็นเวลาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณสารที่ปลดปล่อย พบว่า Calibration Curve ของสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak Area กับความเข้มข้นสาร r^2 เท่ากับ 0.9999 สมการ คือ y = 32971x - 3917.6

จากการวิเคราะห์หาค่า Flux ของ PC: แกมม่าโอไรซานอล: สารสกัดชะเอมเทศ เท่ากับ 297.80 ไมโครกรัม/นาที .ซม.^{2} และค่า Flux ของ PC: คลอเลสเตอรอล: สารสกัดชะเอมเทศ เท่ากับ 202.15 ไมโครกรัม/นาที.ซม.^{2}

การวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐาน Glycyrrhizic Acid โดยวิธี HPLC พบว่าค่าความแม่นยำภายในวัน (Intraday Precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 0.09 และค่าแม่นยำระหว่างวัน (Interday Precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 0.18

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาการวิจัย พบว่า ค่าความศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีค่าน้อยเกินไป ควรศึกษาพัฒนาค่าความศักย์ไฟฟ้าซีต้าให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมมากขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

งานวิจัยด้านอุตสาหกรรม. (2561). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชะลอการงอกของเส้นขนจากสารสกัดชะเอมเทศ*. ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สืบค้น 15 มีนาคม, 2561, จาก https://www.chula.ac.th/impact/3877/

ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, รุ้งตะวัน สุภาพผล, วรอนงค์ พฤกษากิจ และพรรณนารี ชัยวิชิต. (2558). ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของน้ำมันรำข้าวต่อเซลล์มะเร็งตับ. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยฮีสเทิร์นเอเชีย, 5(*1), 56-58.

ปรีดาวรรณ ขอช่วยกลาง และวรนุช ศรีเจษฎารักข์. (2553). การเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อการสกัดวิตามินอีและแกมมา-โอไรซานอลจากรำข้าวพันธุ์ กข 6. *วารสารวิจัย มข*, *12*(2), 45-7.

เมดไทย. (2555). *ชะเอมเทศ*. สืบค้น 8 สิงหาคม, 2561, จาก https://medthai.com/ชะเอมเทศ

ลิโพโซม. (2558). สืบค้น 15 มีนาคม, 2561, จาก http://www.dreamcosmetique.net/article /10572/liposome

วรนันท์ รังสิมาวงศ์ และ ธนะเศรษฐ์ ง้าวหิรัญพัฒน์. (2559). การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโซมสำหรับระบบนำสงยาผานทางผิวหนัง. *TBPS*, *10* (1), 61-74.

สยามเคมี. (2561). *วิตามินอี*. สืบค้น 8 สิงหาคม 2561, จาก http://www.siamchemi.com

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. (2554). *ชะเอมเทศกับความดันโลหิตสูง*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สืบค้น 15 มีนาคม 2561,จาก http://medplant.mahidol.ac.th

สุปรีดี สังฆมรักษ์. (2561). *คู่มือการใช้เครื่อง Franz Diffusion Cell.* ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สืบค้น 15 มีนาคม, 2561, จาก techno.pharmacy.psu. ac.th/diffusion-cell/Manual_Franz_Diffusion_Cell.pdf

อรษา พรริท. (2559). *ลิพิด (Lipid)*. สืบค้น 15 มีนาคม 2561, จาก http://chemyeasy.blogspot.com/p/blog-page_31.html

ChemicalBook. (2016). *Gamma-Oryzanol.* Retrieved March 21 2018, from https://www.chemblink.com/products/11042-64-1.html.

Fumiyoshi, I. and Tomoko, N. (2014). Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, 532, doi: 10.1016/C2012-0-00845-9

Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *J.Free Radic Biol Med*, *13*(4), 435-48.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Hackley, VA., & Cloqston, J.D. (2011). Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. *Methods Mol Biol, 697*, 35-52.

Hickers, M.R., Schenmken, J.R., Steinrauf, M.A., & Mc Whorler, C.A. (1980). *Laboratory instrumentation* (2 nd ed). Philadelphia: Harper&Row Publishers.

Ishii, F.,& Nii, T. (2014). Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, 469-501. doi: 10.1016/B978-0-444-62614-1.00022-3.

Kiribuchi, M., Miura, K., Tokuda, S., and Kaneda, T. (1983) Hypocholesterolemic Effect of Triterpene Alcohols with Soysterol on Plasma Cholesterol in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 29*, 35–43.

Kojoma, M., Ohyama, K., Seki, H., Hiraoka, Y., Asazu, S.N., Sawa, S., & Muranaka, T. (2010). In vitro proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (glycyrrhiza uralensis fischer, leguminosae) stolons. *Plant Biotechnology*, *27*, 59-66.

Lasic D. (1996). Liposomes. *Sci Med, 3,* 34 – 43.

Liqiang, W., Rui, Y., Bochuan, Y., & Ying, L. (2015). The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *5*, 310–15.

Manosroi, A. & Manosroi, J. (2007). *Liposomes for through-skin pharmaceuticals and cosmetics.* (1st edition). Bangkok: Odeon store publishing house.

Nakayama, S. et al. (1987), Comparative Effects of Two Forms of γ-Oryzanol in Different Sterol Compositions on Hyperlipidemia Induced by Cholesterol Diet in Rat, *Journal of Japan Pharmacology*, *44*(2), 135-143.

Nerya, O., Ben-Arie, R., Luzzatto, T., Mussa, R., Khativ, T., & J. Vaya. (2006). Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Posthavest Biology and Technology*, *39*, 272-277.

Panassayakorn Phunrassame. (2016). *Liquorice.* Retrieved March 15 2018, from http://herbal beauty9. blogspot.com/2016/10/blog-post_25.html.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Phospholipid structures. (2012). Retrieved March 15, 2018, from https://www.researchgate.net /figure/Phospholipid-structures-The-diagram-shows-the-structures-of-the-phospholipid-pa-and-the_fig1_221843059

Tangri, KK., Seth, PK., Parmar, SS., & Bhargava, KP. (1965) . Biochemical study of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of glycyrrhetic acid. *Biochem Pharmacol, 14*(8), 1277-81.

Vanugaranti, V.V., & Perumal, O.P. (2009) . Nanosystems for dermal and transdermal drug delivery in: Pathak Y, Thassu D. drug delivery nanoparticles formulation and characterization. *New York Informa Healthcare USA*, 126-55.

Wang, J., & Sun, Y. (2008). The relationship between drug carrying ability of liposomes and phos phatidykchilines. *Fine chemicals*, *25*, 256-9.

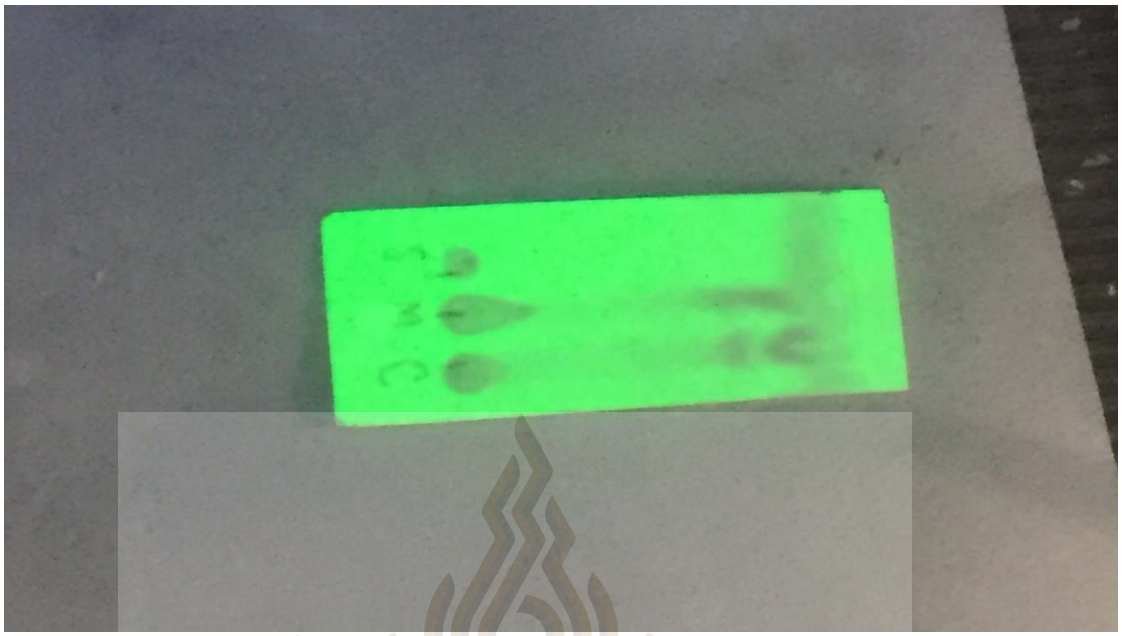
Yakugaku, Z., (2000). Drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *J. Pharm. Soc. Japan*, *120*, 849-62.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

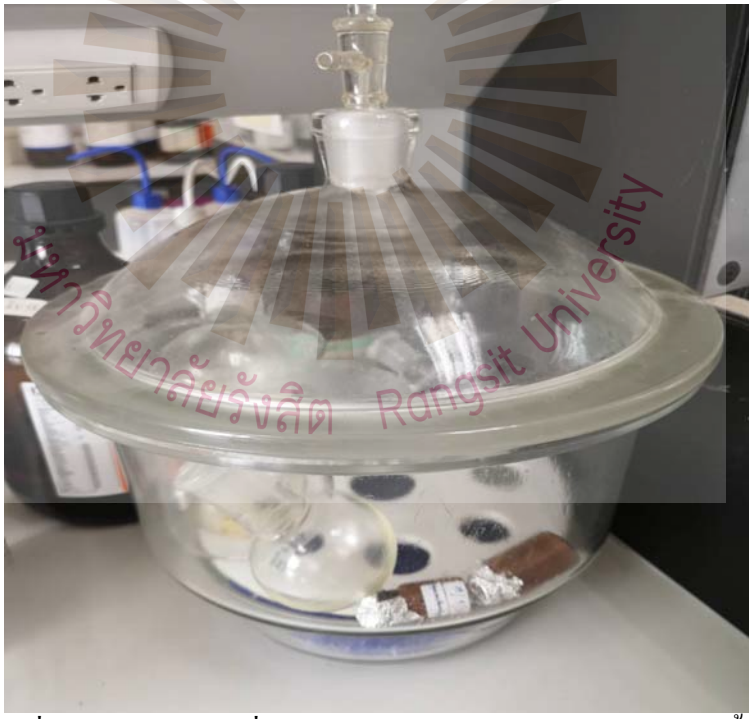


รูปที่ 1 การส่องแผ่น TLC ภายใต้แสงยูวี 254 นาโนเมตร

รูปที่ 2 เครื่องระเหยแห้ง (Evaporator)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

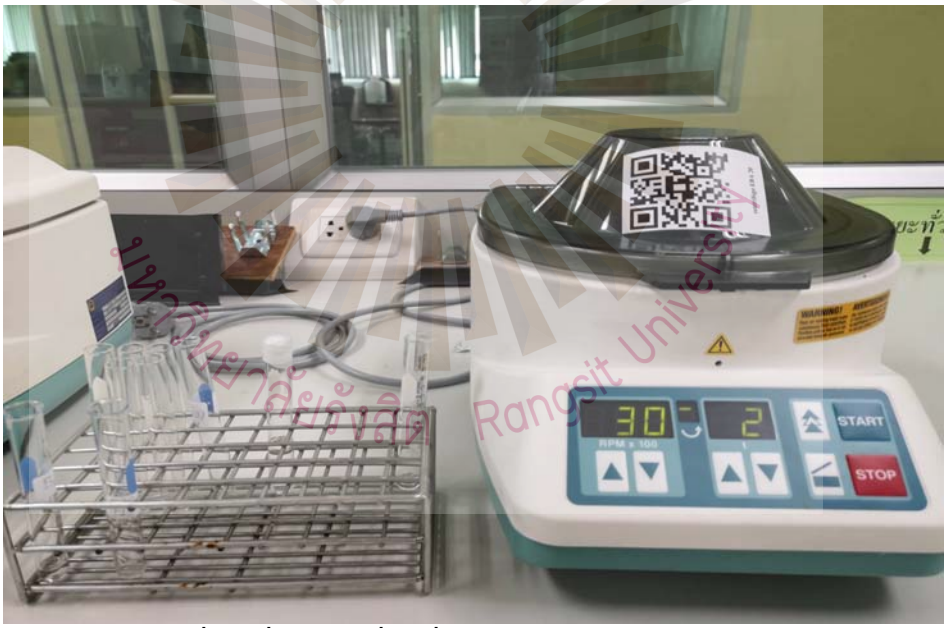
รูปที่ 3 หลังจากระเหยแห้ง เกิดเป็นฟิล์ม



รูปที่ 4 นำขวดก้นกลมที่มีตำรับลิโพโซม (ฟิล์ม) ใส่ในโถดูดความชื้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 5 เครื่องวัดขนาด และวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีต้า



รูปที่ 6 เครื่องหมุนเวี่ยงเพื่อศึกษาการกักเก็บสารลิโพโซม

รูปที่ 7 ชุดทดสอบการปลดปล่อยสาร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ขจีธัญชินี หนานิรันดร์กุล
วัน เดือน ปีเกิด	22 กรกฎาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาแพทย์แผนไทยบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย, 2560 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์ตะวันออก, 2562
ทุนการศึกษา	ทุน “ประสิทธิ์-คุณหญิงพัฒนา อุไรรัตน์”
ที่อยู่ปัจจุบัน	19/284 ซ.2 หมู่บ้านณัฐกลมรัษฎา2 จ.ภูเก็ต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University