การพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

DEVELOPMENT OF DIHYDROOXYRESVERATROL IN NANOEMULSION FORM

โดย

วราภรณ์ ชัยนฤมล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2560

DEVELOPMENT OF DIHYDROOXYRESVERATROL IN NANOEMULSION FORM

BY

WARAPORN CHAINARUMON

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 2017

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

โดย

วราภรณ์ ชัยนฤมล

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2560

---	---
รศ.ดร.พิมล เรียนวัฒนา	ผศ.ดร.สุรีย์ ศุภลักษณ์นารี
ประธานกรรมการสอบ	กรรมการ

	ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
	กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ร.ต.หญิง ดร.วรรณี ศุขสาตร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

31 พฤษภาคม 2561

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Thesis entitled

DEVELOPMENT OF DIHYDROOXYRESVERATROL IN NANOEMULSION FORM

by

WARAPORN CHAINARUMON

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

Rangsit University
Academic Year 2017

Asso.Prof. Pimol Rienvatana, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Asst.Prof. Suree Supalakneree, Ph.D.
Member

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

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vannee Sooksatra, D.Eng.)
Dean of Graduate School
May 31, 2018

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ.ดร. ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา คณะการแพทย์แผนตะวันออกมหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆในการดำเนินงานวิจัยตลอดจนการชี้แนะแนวทางแก้ไขจุดบกพร่องเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของงานวิจัย

ขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำงานวิจัยและคำแนะนำต่างๆในการใช้เครื่องมือการทดสอบต่างๆ

ผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่างานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจทั่วไปที่จะนำองค์ความรู้ในงานวิจัยนี้ไปต่อยอดพัฒนาต่อเพื่อให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น

วราภรณ์ ชัยนฤมล

ผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5607791 : สาขาวิชาเอก : การแพทย์แผนตะวันออก; วท.ม.

คำสำคัญ : ไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล, นาโนอิมัลชัน, สารลดแรงตึงผิว

วราภรณ์ ชัยนฤมล : การพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน (DEVELOPMENT OF DIHYDROOXYRESVERATROL IN NANOEMULSION FORM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ประสาน ตั้งตีนยงวัฒนา, 66 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชันซึ่งสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลได้ถูกเตรียมจากปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) การเตรียมตำรับพื้นนาโนอิมัลชันมี 12 สูตร ตามอัตราส่วนของเฟสไดอะแกรม ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำ โดยทำการลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Sonicator จากนั้นบันทึกผลทางลักษณะกายภาพเพื่อนำไปศึกษาขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีตาด้วยเครื่อง Nanoplus (Micromeritics, USA) และเลือกสูตรที่ดีที่สุดคือ Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) และ Peppermint oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 28.88±0.88 และ 154.32±0.59 นาโนเมตร ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตามีค่าเท่ากับ -13.82±0.60 และ -4.93±1.31 มิลลิโวลต์ ค่าการกระจายตัวของอนุภาคมีค่าเท่ากับ 0.203±0.0217 และ 0.233±0.0052 และเมื่อเก็บไว้ 1 เดือน Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) เกิดการแยกชั้นและ Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 48.58±6.72 นาโนเมตร มีความคงตัวไม่เกิดการแยกชั้น และเมื่อทำการทดสอบการซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยวิธี Franz diffusion cell พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การปลดปล่อย (Flux) มีค่าเท่ากับ 312.9 จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในนาโนอิมัลชันด้วยวิธี HPLC พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นสารมีค่าสัมประสิทธิ์ $(r)^2$ เท่ากับ 0.9996ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) เท่ากับ 101±4.18 ค่าความแม่นยำภายในวันเดียว (Intraday Precision) มีค่าเฉลี่ย %RSDเท่ากับ 0.15 ความแม่นยำระหว่างวัน (Interday Precision) ค่าเฉลี่ย %RSD เท่ากับ 0.51 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบสาร (LOD) เท่ากับ 0.33 และความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ปริมาณสารได้ (LOQ) เท่ากับ 0.99

ลายมือนักศึกษา…………………………………….. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา………………………………..

5607791 : MAJOR : ORIENTAL MEDICINE ; M.Sc

KEYWORDS : DIHYDROOXYRESVERATROL, NANOEMULSION, SURFACTAN

WARAPORN CHAINARUMON : DEVELOPMENT OF DIHYDROOXYRES VERATROL IN NANOEMULSION FORM. THESIS ADVISOR: ASST.PROF.PRASAN TANGYUENYONGWATANA,PH.D. 66 p.

The objective of this study is to develop the Dihydrooxyresveratrol in the form of Nano-emulsion. The Dihydrooxyresveratrol is prepared from the reaction of Hydrogenation. There are 12 formula of Nano-emulsion preparation following the ratio of phase diagram consisting of the essential oil, surfactant, co-surfactant, and water. The particle size is reduced by using the Sonicator. After that, the physical results are recorded for studying the particle size and zeta electric potentialby using Nanoplus (Micromeritics, USA) and selecting the best formula which is Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)and Peppermint oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) having the particle size equaling to 28.88±0.88 and 154.32±0.59 Nano meters. The zeta electric potential values are -13.82±0.60 and -4.93±1.31 millivolt. The particle distribution values are 0.203±0.0217 and 0.233±0.0052. When having been storage for 1 month, Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) is separated into layers and Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) has the particle size equaling to 48.58±6.72 Nano meters. It is still in form without being separated into layers. When being tested for the penetration of synthesized tissue using the Franz diffusion cell method, Flux is found to be 312.9. Then, it is analyzed to find the amount of Dihydrooxyresveratrol in Nano-emulsion by using the HPLC method. It is found that the Linear relations between the area underneath the peak and the substance concentration has the correlation coefficient equaling to 0.9996. The Accuracy is 101±4.18. The Intraday Precision has %RSD mean equaling to 0.15. The Interday Precision has %RSD mean equaling to 0.51. The minimum concentration value in finding the substance (LOD) is 0.33 and the minimum concentration value with the analysis of substance measuring (LOQ) is 0.99.

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

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 คำถามการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	**5**
2.1 ข้อมูลสมุนไพรมะหาด	5
2.2 ข้อมูลวิจัยที่สำคัญ	7
2.3 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล	10
2.4 โครงสร้างผิวหนัง	13
2.5 นาโนอิมัลชัน	15
2.6 Ternary Phase Diagram	21
2.7 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วย เทคนิค Dynamic Light Scattering	22
2.8 การทดสอบการซึมผ่าน	24
2.9 เอช พี แอล ซี	25
2.10 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analytical Procedures)	28
2.11 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)	28

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่3 ระเบียบวิธีการวิจัย	**29**
3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ	29
3.2 วัตถุดิบสารเคมี	30
3.3 เครื่องมือทดสอบ	31
3.4 วิธีการศึกษาวิจัย	31
3.5 การทดสอบการซึมผ่านวิธี Franz Diffusion Cells	32
3.6 การวิเคราะห์เอช พี แอล ซี (HPLC : High Performance Liquid Chromatography)	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**36**
4.1 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล	36
4.2 การพัฒนาสูตรตำรับพื้นในรูปแบบนาโนอิมัลชัน	36
4.3 การวัดขนาดอนุภาค การหาค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา และการตรวจสอบสัณฐานวิทยา	41
4.4 การทดสอบการซึมผ่านของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล	43
4.5 การวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลโดยวิธี HPLC	45
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	**51**
5.1 สรุป	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	**54**
ภาคผนวก	**58**
ประวัติผู้วิจัย	**66**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

4.1 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพตำรับพื้นนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil กับ Tween 80 — 37

4.2 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของบริเวณระบบที่เกิดนาโนอิมัลชัน — 38

4.3 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพตำรับพื้นนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil กับ Tween 20 — 39

4.4 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของบริเวณที่เกิดระบบนาโนอิมัลชัน — 39

4.5 แสดงขนาดอนุภาคค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคของสูตรตำรับพื้นในรูปแบบนาโนอิมัลชัน — 41

4.6 แสดงขนาดอนุภาคค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคของสูตรตำรับพื้นในรูปแบบนาโนอิมัลชัน — 41

4.7 แสดงลักษณะทางกายภาพขนาดอนุภาคค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายของตำรับนาโนอิมัลชันเมื่อเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม — 42

4.8 แสดงลักษณะทางกายภาพขนาดอนุภาคค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายของตำรับนาโนอิมัลชันเมื่อเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม เมื่อทิ้งไว้ 1 เดือน — 42

4.9 แสดงค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลตั้งแต่ 6.6-132 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม — 46

4.10 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ ไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล แบบIntraday Precision จำนวน 6 ครั้ง — 47

4.11 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ไดออกซีเรสเวอราทรอลแบบ Interday Precision จำนวน 12 ครั้ง — 48

4.12 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ Accuracy — 49

4.13 แสดงผลการศึกษา LOD และ LOQ — 50

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 โครงสร้างไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 10

2.2 ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน 10

2.3 อัลคีนและอัลไคน์ 11

2.4 ปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันของอัลคีน 12

2.5 พลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาไฮโดจิเนชันเมื่อใช้และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี 12

2.6 โครงสร้างของผิวหนัง 14

2.7 แสดงถึงลักษณะของนาโนอิมัลชัน 100-200 นาโนเมตรและลักษณะนาโนอิมัลชัน ที่โปร่งแสงหรือค่อนข้างใสจนมีสีฟ้า 16

2.8 การเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยการใช้พลังงานสูง 17

2.9 Ternary Phase Diagram 22

2.10 ส่วนประกอบทั่วไปของดีแอลเอส 23

2.11 Franz Diffusion Cell 24

2.12 องค์ประกอบ HPLC 27

4.1 แสดง Ternary Phase Diagram แสดงพื้นที่อัตราส่วนที่เกิดนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45), Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35), Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4) 38

4.2 Ternary Phase Diagram แสดงพื้นที่อัตราส่วนที่เกิดนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O 40

4.3 แสดงถึงลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมของ Peppermint : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) 43

4.4 กราฟแสดงปริมาณการสะสมของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลที่สามารถซึมผ่านทางผิวหนังของสูตรตำรับ Peppermint : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) 44

4.5 HPLC Chromatogram ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 45

4.6 Calibration Curve ของสารไดออกซีเรสเวอราทรอลที่เข้มข้นตั้งแต่ 6.6 ถึง 132 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.7 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลแบบ Intraday Precision 47

4.8 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลแบบ Interday Precision 49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเครื่องสำอางดูแลผิวพรรณได้รับความนิยมอย่างมากทั้งในผู้บริโภคชายและหญิงโดยมีการผลิตมากมายหลายชนิดเพราะความก้าวหน้าและเทคโนโลยีที่ทันสมัยโดยจากข้อมูลสถิติความต้องการประกอบธุรกิจเครื่องสำอางที่สูงขึ้นถึงจำนวน 8,045 ราย และมีแนวโน้มว่าจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรมพัฒนาธุรกิจการค้า, 2559) ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ธุรกิจเครื่องสำอางมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องทุกปีเพราะผู้คนในยุคปัจจุบันทุกเพศทุกวัยโดยเฉพาะวัยหนุ่มสาวต่างให้ความใส่ใจเกี่ยวกับเรื่องสุขภาพ ความงาม และผิวพรรณ รวมทั้งการดูแลตัวเองมากขึ้นส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ความงามในท้องตลาดไม่ว่าจะผลิตภายในประเทศหรือนำเข้าจากต่างประเทศสามารถที่จะสร้างรายได้จำนวนมาก (พรเพรช แก้วอ่อน, 2550) รวมไปถึงกระแสของสมุนไพรที่เข้ามามีบทบาทในปัจจุบันโดยนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางด้วยคุณสมบัติที่มีประโยชน์สามารถใช้ทดแทนสารเคมีได้เป็นอย่างดี (รพีพร จันทุมา, 2556)

เครื่องสำอางจากธรรมชาติและสมุนไพรไทยยังขาดการพัฒนาอย่างจริงจังทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับเพราะผลิตภัณฑ์บางชนิดไม่ปลอดภัยหรือใช้สารเคมีต้องห้ามทำให้เกิดอันตรายต่อผิวและยังอวดอ้างสรรพคุณเกินจริงซึ่งมะหาดเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับความนิยมทั้งในอดีตจนถึงปัจจุบันมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่มีรสร้อน แก้ลม แก้เส้นเอ็นพิการ แก้กษัย ละลายเลือด ส่วนของ เนื้อไม้ สามารถนำมาเคี่ยวต้มเอากากออกเอาผ้ากรองเอาน้ำออกทำให้น้ำแห้งจะได้ผงสีนวลๆ จับกันเป็นก้อนย่างไฟให้เหลืองเรียกว่า ปวกหาด ซึ่งในตำราไทยนั้นบวกหาดมีรสร้อนเมาเบื่อใช้ผงบวกหาด 3 กรัม ละลายน้ำเย็นดื่มขณะท้องว่างหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ดื่มน้ำดีเกลือตามไปขับพยาธิในท้องใช้ในเด็กได้ดีไม่พบพิษหรือฤทธิ์ข้างเคียงละลายน้ำทาแก้ผื่นคัน (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) มะหาดมีโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่และด้วยโครงสร้างทางเคมีของมะหาดทำให้มะหาดมีคุณสมบัติหลายอย่างที่สำคัญเช่น สารจำพวกฟลาโวนอยด์จากสารสกัดของแก่นมะหาดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(Shailendra, Bharath, Rakshitha, & Nandini, 2010) มะหาดยังมีสารออกซีเรสเวอราทรอลซึ่งมีฤทธิ์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและมีประสิทธิภาพที่สามารถลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (จุฑามาศ เจียรนัยกุลวานิช, 2559) ด้วยฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น รูปแบบโลชันซึ่ง พบว่า ประสิทธิภาพในการช่วยให้ผิวกระจ่างใสและเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังอีกทั้งมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง (ปิ่นมณี พูนสุข, 2559) ซึ่งสารออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารที่สามารถแยกจากแก่นมะหาดในปริมาณมากและสามารถการดัดแปลงโครงสร้างให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงขึ้นซึ่ง พบว่า สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นประมาณ 8 เท่า ของออกซีเรสเวอราทรอล (คมกริช หาสิตะพันธุ์, 2560) และในปัจจุบันมีการพัฒนาสมุนไพรในรูปแบบต่างๆเพื่อให้มีการนำส่งสารหรือเกิดการซึมผ่านไปยังเซลล์เป้าหมายเพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่ดีที่สุดซึ่งการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและความงามโดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารสำคัญความคงตัวและการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนัง เช่น การประยุกต์ใช้นาโนอิมัลชันเพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์น่าใช้และให้ความรู้สึกที่ดีบนผิวจากคุณสมบัติของนาโนอิมัลชันที่ไม่เป็นอันตรายไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองไม่อุดตันรูขุมขนยอมให้อากาศและน้ำไหลผ่านได้ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของนาโนอิมัลชันน่าใช้และให้ความรู้สึกที่ดีหลังการใช้ โดยจากการทดสอบกับกลุ่มอาสาสมัครที่ใช้ Body Lotion เป็นประจำ จำนวน 192 คน โดยให้ใช้ Body Lotion ชนิดนาโนอิมัลชัน วันละครั้งนาน 2 สัปดาห์ พบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของอาสาสมัครชอบความเหลวและใสของ Body Lotion ชนิดนาโนอิมัลชัน 80 เปอร์เซ็นของอาสาสมัครดังกล่าวชอบความสดชื่นที่ได้รับ 72 เปอร์เซ็นต์ชอบความชุ่มชื้นและ 84 เปอร์เซ็นต์ชอบผลทางความงามที่ได้รับ (Sonneville, Simonnet, and Alloret, 2004) และการศึกษาโดยนำนาโนเทคโนโลยีมาพัฒนาแผ่นแปะรักษาสิว Q-Acnes โดยใช้เทคนิคการปั่นเส้นใยนาโนแบบไฟฟ้าสถิตทำให้ได้เส้นใยที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรแล้วนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นแปะ 3 ชั้นที่มีความบางเนียนไปกับผิวหน้าด้วยการขึ้นรูปแบบเส้นใยขนาดนาโนทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้นจึงสามารถในการปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ออกฤทธิ์ลดอาการอักเสบของสิวได้ดีขึ้นที่สำคัญมีการทดสอบทางคลินิกว่ามีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหน้า (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556) จึงทำให้นาโนเทคโนโลยีเป็นอีกหนึ่งรูปแบบที่น่าสนใจและพัฒนาต่อไป

จากข้อมูลที่ได้ศึกษามานั้นทำให้ผู้ศึกษามีความสนใจนำสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมาพัฒนาในรูปแบบนาโนอิมัลชันเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์วิธี Franz Diffusion Cell และวิเคราะห์สารด้วยวิธี HPLC

1.2 วัตถุประสงค์การงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

1.2.2 เพื่อที่จะศึกษาประสิทธิภาพการซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยวิธีการ Franz Diffusion Cell ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

1.2.3 เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในตำรับนาโนอิมัลชันโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography ; HPLC

1.2.4 เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้สนใจนำผลการศึกษาสามารถนำไปพัฒนาต่อไป

1.3 คำถามการวิจัย

1.3.1 สามารถพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชันได้หรือไม่

1.3.2 สามารถที่จะทำการเตรียมสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลให้อยู่ในรูปแบบของนาโนอิมัลชันที่มีประสิทธิภาพในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์ได้หรือไม่

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1 จัดหาสมุนไพร

1.4.2 เตรียมสกัดสารสำคัญ

1.4.3 การประเมินประสิทธิภาพและประสิทธิผลสารสำคัญ

1.4.4 การเตรียมนาโนอิมัลชัน

1.4.4.1 ประเมินลักษณะทางกายภาพ

1.4.4.2 ประเมินความคงตัวของนาโนอิมัลชัน

1.4.4.3 วัดขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า

1.4.5 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันโดยเพิ่มสารสำคัญ

1.4.5.1 การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วยวิธี Franz Diffusion Cell

1.4.5.2 วิเคราะห์สารสำคัญด้วยวิธี HPLC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.5 ประโยชน์ได้รับจากงานวิจัย

1.5.1 ได้พัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

1.5.2 ได้ทำการพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบของนาโนอิมัลชันที่มีประสิทธิภาพในการซึมผ่านผิวหนัง

1.5.3 ได้ทราบวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลด้วยวิธี HPLC

1.5.4 ได้พัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชันที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

1.6 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.6.1 สังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

1.6.2 การพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

1.6.3 ศึกษาอัตราส่วนของสารลดแรงตึงและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมของตำรับนาโนอิมัลชัน

1.6.4 วัดขนาดอนุภาค วัดค่าการกระจายและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของตำรับนาโนอิมัลชัน

1.6.5 ทดสอบการซึมผ่านเนื้อเยื่อสังเคราะห์ด้วยวิธี Franz Diffusion Cell

1.6.6 วิเคราะห์หาปริมาณสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลด้วยวิธี HPLC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลสมุนไพรมะหาด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artocarpus lakoocha* Roxb.
ชื่อวงศ์ MORACEAE
ชื่ออื่นๆ กาแย ตาแป (นราธิวาส-มาเลเซีย) มะหาดใหญ่ (ตรัง) (สถาบันวิจัยสมุนไพรกระทรวงสาธารณสุข, 2559)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ตั้งตรงเรือนเป็นพุ่มกลมทึบกิ่งและยอดอ่อนมีขนอ่อนหรือสีเทาหรือน้ำน้ำตาลปกคลุมแน่น

เปลือกต้น เปลือกนอกสีน้ำตาลเทาหรือดำขรุขระแตกเป็นสะเก็ดเปลือกในสีน้ำตาลแกมแดงมักมียางสีขาวหรือขาวเหลืองซึมตามรอยแตกแห้งติด

ใบ โดยมีใบเดี่ยว (Simple) ติดเรียงสลับ (Alternate) ทรงใบรูปขนาน (Oblong) รูปรี (Elliptical) หรือรูปไข่ (Ovate) กว้าง 5-20 เซนติเมตร ยาว 10-30 เซนติเมตร โคนใบมนหรือหยักเว้าเข้าเล็กน้อยปลายใบสอบแหลมเนื้อใบค่อนข้างหนามีขนสากทั้งสองด้านเส้นแขนงใบมี 6-12 คู่ปลายเส้นโค้งจรดเส้นถัดไปใกล้ขอบใบเส้นใบย่อยแบบเส้นขั้นบันไดเห็นได้ชัดทางด้านท้องใบขอบใบอ่อนจักถี่ส่วนขอบใบแก่เรียบหรือเป็นคลื่นก้านใบยาวที่มีขนาด 2-4 เซนติเมตรมีขนหนาแน่น

ดอก ซึ่งจะมีดอกช่อ (Inflorescence) แบบหัว (Head) ดอกเล็ก สีเขียวเหลืองออกเป็นช่อกลมตามง่ามใบตอนปลายกิ่งช่อดอกแยกเพศโดยเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างช่อแต่อยู่ในต้นเดียวกันช่อดอกเพศผู้รูปรียาว 5-10 ม.ม กลีบดอก 2-4 แฉก เกสรผู้ 1 อัน ก้านเกสรแบนช่อดอกเพศเมียรูปเกือบกลมเกิดจากดอกแต่ละดอกเรียงอัดตัวบนแกนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดรังไข่มีช่องเดียวภายในมีไข่อ่อน 1 ใบ ดอกมักออกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผล รูปทรงกลมเบี้ยวขรุขระค่อนข้างนุ่มสีเหลืองเมื่อแก่จัดกินได้โตวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 เซนติเมตรประกอบด้วยผลย่อยจะมีลักษณะเป็นปุ่มหนามผนังของผลย่อยจะเชื่อมติดกันแต่ละผลย่อยที่มี 1 เมล็ด มักจะพบผลในช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม

เมล็ด มีรูปยาวรีหรือรูปไข่เบี้ยวยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร กว้าง 0.5-0.7เซนติเมตร สีน้ำตาลอ่อน

นิเวศวิทยา ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปตามป่าดงดิบการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2556)

2.1.2 ประโยชน์ทางยาพื้นบ้าน

ในตำรายาไทยนั้นใช้หลายส่วนของมะหาดในการรักษาโรคหรือบรรเทาอาการต่างๆ ซึ่งรวบรวมไว้ดังนี้

ราก (Root) ใช้แก้ไข้ ขับพยาธิ บรรเทาพิษต่างๆรักษานิ่วในทางเดินปัสสาวะ

เนื้อ (Wood)ใช้แก้ท้องอืดขับลมระบายท้องรักษาผื่นผิวหนังรักษาอาการไม่ปกติของระบบทางเดินอาหารเรื้อรังของเด็กซึ่งมีอาการขาดอาหารน้ำหนักลดเนื่องจากมีพยาธิใช้ถ่ายพยาธิตัวกลม พยาธิตัวแบน โดยใช้ในรูปของ “ปวกหาด” ซึ่งเป็นสารสกัดด้วยน้ำซึ่งทำแห้งแล้วนอกจากนี้ยังใช้รักษาอาการประจำเดือนมาไม่ปกติอาการเอ็นและกล้ามเนื้ออ่อน

เปลือกต้น (Bark) ใช้แก้ไข้นอกจากนี้ในเนปาลและอินเดียใช้น้ำต้มเปลือกต้นรักษาสิว (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2556)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.1.3 สารสำคัญในมะหาด

แก่นต้น	Artocarpin, Norartocapin, Resveratrol, Oxyresveratrol
เปลือกต้น	β-Amyrin Acetate, Lupeol Acetate, Artostenone
ราก	Lakoochin A, Lakoochin B
เปลือกราก	Gelangin-3-0-A-L-Rhamnoside,Kaempferol-3-0-β-L-Xyloside, Lupeol, β-Sitosterol
เมล็ด	ALA

ซึ่งในแต่ละส่วนของมะหาดล้วนแล้วแต่มีสารสำคัญที่มีประโยชน์ (กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2551)

2.2 ข้อมูลวิจัยที่สำคัญ

ต้นมะหาดมีสารที่พบหลายชนิดในส่วนต่างๆและมีโครงสร้างที่หลากหลายเราอาจแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1) กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
2) กลุ่มสารสติลบินอยด์ (Stilbenoids)
3) กลุ่มสารไทรเทอร์พินอยด์และเสตียรอยด์ (Triterpenoids and Steroids)
4) กลุ่มสารเลคติน (Lactins)
5) สารกลุ่มอื่นๆ (Miscellaneous Compounds)

ในแก่นมะหาดนั้นมีสารออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารหลักและถึงแม้ว่าสารออกซีเรสเวอราทรอลจะพบในพืชสกุลนี้หลายชนิด ได้แก่ *Artocarpus chaplasha*, *Artocarpus dadah*, *Artocarpus gomezianus*, *Artocarpus lakoocha* และ *Artocarpus rigida* แต่มีเพียงมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) เท่านั้นที่พบในปริมาณสูงซึ่ง สารออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารหลักในแก่นต้นมะหาดซึ่งประโยชน์ที่สามารถนำไปใช้ของสารนี้ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของออกซีเรสเวอราทรอล อาจนำมาใช้เป็นสารทำให้ขาว (Skin whitening) ฤทธิ์ต้านไวรัส (Antiviral activity) อาจนำมาใช้ต้านไวรัสเริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidative) และต้านอักเสบ (Anti-Inflammatory Activities) (Gautam & Patel, 2014)

ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสข้อมูลการศึกษาโดยสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ Soxhlet Extraction Apparatus ซึ่งใช้ 95% Ethanol เป็นตัวทำละลายและทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารออกซิเรสเวอราทรอลในสารสกัดแก่นมะหาดโดยวิธี Thin Layer Chromatography Densitometry (TLC densitometry) และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดแก่นมะหาดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ได้มีปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอลเท่ากับ 0.31±0.05 % ของสารสกัดหยาบและความเข้มข้นของสารสกัดแก่นมะหาดที่ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC50) มีค่าเท่ากับ 4.63±1.02 mg/ml (พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ, 2558) รวมไปถึงข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลและสารออกซีเรสเวอราทรอล พบว่า สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล มีค่า IC_{50} 1.6 μM ส่วนออกซีเรสเวอราทรอล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

มีค่า IC_{50} 12.7 μM และ กรดโคจิก มีค่า IC_{50} 133.4 μM ซึ่งกล่าวได้ว่า สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นประมาณ 8 เท่า ของออกซีเรสเวอราทรอล หรือ 80 เท่า ของกรดโคจิกโดยเมื่อนำสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-Competitive Inhibition) ในทำนองเดียวกับออกซีเรสเวอราทรอล คือไม่มีผลต่อค่า Michaelis Constant (K_m) แต่ทำให้ความเร็วสูงสุด (Maximal Velocity , V_{max}) มีค่าลดลงและเมื่อพิจารณาค่า K_i พบว่า ค่า K_i ของไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมีค่าน้อยกว่าของออกซีเรสเวอราทรอลซึ่งหมายความว่า ไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลมี Affinity ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับประมาณ 4-5 เท่า ของออกซีเรสเวอราทรอลซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารยับยั้งไทโรซิเนสชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์แรงกว่าสารตั้งต้นออกซีเรสเวอราทรอลซึ่งอาจนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในตำรับยาหรือเครื่องสำอางได้ดีกว่า (Likhitwitayawuida, Sornsute, Sritularak, & Ploypradith, 2006)

ฤทธิ์ช่วยให้ผิวขาว ได้มีรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูตะเภาผิวดำจำนวน 18 ตัว ซึ่งเริ่มจากการโกนขนบริเวณหลังที่กำหนด แล้วจึงนำไปฉายแสงยูวีบีที่บริเวณที่โกนไว้วันละ 1ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกันเมื่อผ่านไป 18 วัน ผิวหนังบริเวณดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีคล้ำแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 ได้รับสารทดสอบซึ่งเป็นสารละลายของสารสกัดแก่นมะหาดใน Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 กลุ่มที่ 2 ได้รับสารทดสอบสารละลายกรดโคจิกใน Propylene Glycol ที่ความเข้มข้นร้อยละกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่ม Control ได้รับสารทดสอบซึ่งเป็น Propylene Glycol จะเห็นได้ว่า ในสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม รวมทั้งกลุ่ม Control มีผิวขาวขึ้นเมื่อเทียบข้อมูลในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า ทั้งมะหาดและกรดโคจิกทำให้ผิวขาวขึ้นคิดเป็นร้อยละที่ใกล้เคียงกัน และสูงกว่ากลุ่ม Control ซึ่งได้รับแต่ Propylene Glycol ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าสารสกัดแก่นมะหาดทำให้ผิวของสัตว์ทดลองขาวขึ้นคิดเป็นร้อยละสูงกว่ากรดโคจิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดแก่นมะหาดโดยมีออกซีเรสเวอราทรอลที่มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งเมลานินในผิวหนังสัตว์ทดลอง (Tengamnuay, Pengrungruangwong, Pheansri, & Likhitwitayawuid, 2006) เช่นเดียวกันกับข้อมูลการศึกษาในอาสาสมัครจำนวน 4 คน โดยทาสารสกัดจากแก่นมะหาดที่แขนวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการวัดค่าความเข้มของสีผิวด้วยเครื่องแมกซามิเตอร์ (Mexameter) พบว่าแขนที่ทาด้วยสารสกัดจากแก่นมะหาดมีแนวโน้มให้ค่าความเข้มของสีผิวลดลงนอกจากนี้ยังไม่มีอาการแพ้หรือระคายเคืองซึ่งศึกษาในอาสาสมัครจำนวนมากขึ้น คือ 60 คน ในระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 คน เป็นเพศหญิง อายุ 20-48

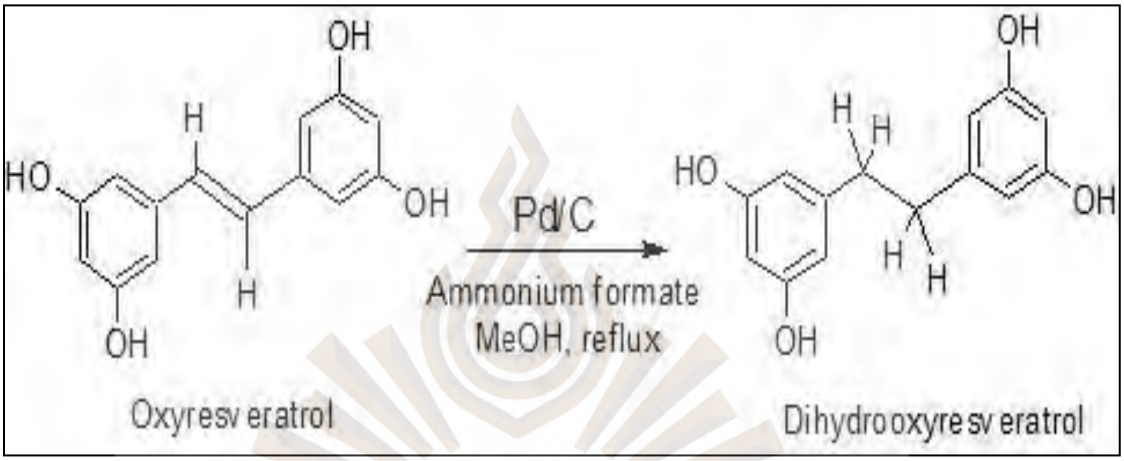
ปีมีโดยมีสภาพผิวหนังปกติจากการทาสารสกัดที่ต้นแขนของอาสาสมัครวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เปรียบเทียบกับอาสาสมัครที่ทาด้วยสารสกัดจากชะเอมและกรดโคจิก ผลการทดลองพบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่ทาด้วยสารสกัดจากมะหาดจะมีผิวขาวขึ้นเรื่อยๆ ความขาวของสีผิวจะเห็นผลในระยะเวลาเพียง 4 สัปดาห์ และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังไม่พบอาการแพ้หรือระคายเคืองผิวแต่อย่างใดในขณะที่กรดโคจิกให้ผลในการทาให้ผิวขาวในระยะเวลาที่นานกว่า 8 สัปดาห์ (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2557)

ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระข้อมูลศึกษาสารออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีโมเลกุลหรืออิออนชนิด Superoxide Anion Radical, Hydroxyl Radical และ Ringlet Oxygen ที่เป็นปัจจัยสำคัญของการตายในเซลล์ประสาทแบบ Apoptosis โดยการตายของเซลล์ (Cell Death) เซลล์จะเริ่มมีการหดตัวเล็กลง (Cell Shrinkage) เกิดการแตกของนิวเคลียสเยื่อหุ้มเซลล์พองเซลล์แตกและตายในที่สุด (Wachiranuntasin, 2005) เช่นเดียวกันกับการศึกษาวิจัยของ (Singhatong , Leelarungrayub, and Chaiyasut, 2010) สารสกัดแก่นมะหาด 1 กรัม สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ 2, 2’–Azino-Bis (3-Ethylbenzo thiazoline-6-Sulphonic Acid) (ABTS) (n=3) 128.30±0.13 ไมโครโมลาร์ 2,-2 Diphenyl-L-Picryl-Hydrazy (DPPH) (n=3) 463.49±0.01 ไมโครโมลาร์ สอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยของ (Povichit, Phrutivorapongkul, Suttajit, & Leelapornpisid, 2010) โดยจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร Oxyresveratrol ด้วยวิธี Radical Scavenging Activity (DPPH) พบว่า สารออกซีเรสเวอราทรอลต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50} 0.01±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนูลอิสระด้วยวิธี Lipid Peroxidation Inhibitory Activity (TBARS) พบว่า สารออกซีเรสเวอราทรอลต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50} 0.43±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติไกลเคชัน (Antiglycation) ที่ IC_{50} 2.0±0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (นฤมล บุญชม, 2556)

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยการศึกษาสารสกัดแก่นมะหาดด้วยวิธี Agar Diffusion – Disc Method พบว่าสารสกัดแก่นมะหาดขนาด 10,000 ไมโครกรัม/ดิสก์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Mycobacterium smegmatic* โดยแสดงผล Inhibition Zone ซึ่งกว้างกว่า 19 มิลลิลิตร (Pongpan, Chumsri, and Taworasate, 1982) รวมถึงฤทธิ์ต่อพยาธิใบไม้ *Haplorchis taichui* ในสภาพทดลองเมื่อเลี้ยงใน Tyrod’s Solution ที่มีสารสกัดน้ำของ มะหาด ราชพฤกษ์ และแก้ว ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการมีชีวิตของพยาธิที่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดด้วยน้ำมะหาดที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml สามารถฆ่าพยาธิ

ได้ตายหมดที่ 12 ชั่วโมง นำพยาธิตัวที่ตายมาทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นผิวของลำตัวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภัสสร์พัณณ์ หลวงไผ่, 2549)

2.3 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล



รูปที่ 2.1 โครงสร้างไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

ที่มา : กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2551

2.3.1 ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation Reaction)

ปฏิกิริยาการรวมตัวของแอลคีนหรืออัลไคน์กับแก๊สไฮโดรเจนโดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalytic Hydrogenation) นั้นเป็นการรีดิวซ์พันธะ π ในสารประกอบปฏิกิริยานี้จึงเป็นปฏิกิริยาทั่วไปที่เกิดขึ้นได้กับอัลคีน อัลไคน์ และสารประกอบอื่นๆ ที่มีพันธะ π

สมการทั่วไปของปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน คือ

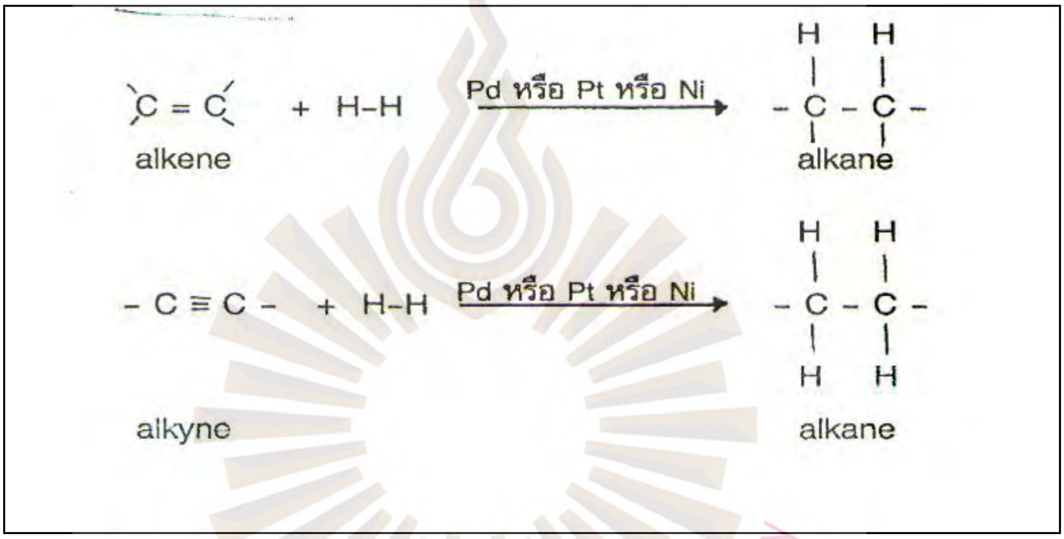
$$\underset{\text{Alkene}}{C_nH_{2n}} \xrightarrow{\text{H2 / Pt,Pd or Ni}} \underset{\text{alkane}}{C_nH_{2n+2}}$$

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

ที่มา : โสภณ เริงสราญ, 2551

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อัลคีนและอัลไคน์หรือไซโคลอัลคีนและไซโคลอัลไคน์ ทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันจบลงด้วยสารผลิตภัณฑ์คืออัลเคนและไซโคลอัลเคน การเพิ่มไฮโดรเจน 2 อะตอมเข้าที่พันธะไพ (π-bond) จะเข้าทางเดียวกัน เพราะปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่ผิวของตัวเร่ง (Catalyst) เรียกการเข้าแบบนี้ว่า การเข้า "แบบซิน" (Syn Addition) เขียนสมการทั่วไปแสดงทิศทางการเข้าของไฮโดรเจนทั้ง 2 อะตอมได้เป็น (โสภณ เริงสราญ, 2551)



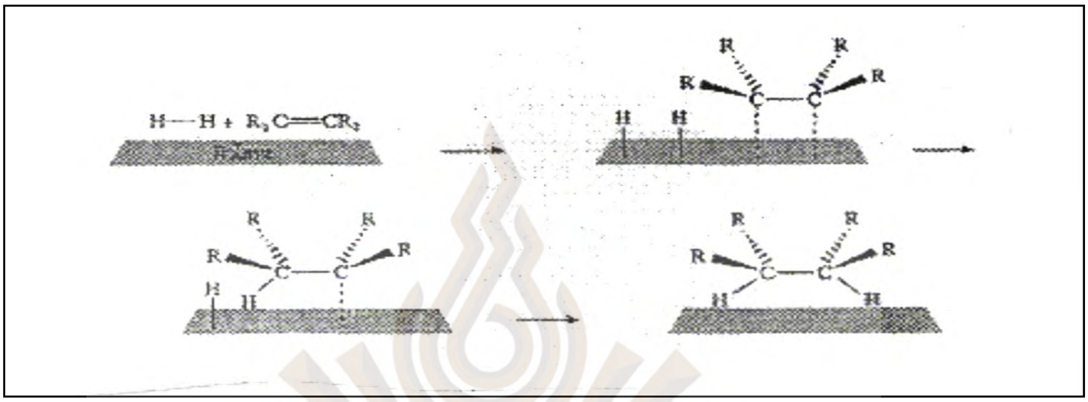
รูปที่ 2.3 อัลคีนและอัลไคน์
ที่มา : โสภณ เริงสราญ, 2551

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.3.2 การทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันจะเป็นปฏิกิริยาคลายความร้อน แต่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเองไม่ได้ ทั้งนี้เพราะพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาสูงมากการให้พลังงานความร้อนเพียงอย่างเดียวไม่อาจทำให้โมเลกุลมีพลังงานสูงพอที่จะผ่านทรานซิชันได้แต่ถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างง่ายดาย ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันคือผงโลหะหรือผงโลหะที่ถูกดูดซับบนสารเฉื่อย เช่น ธาตุคาร์บอนหรือแบเรียมคาร์บอนเนตตัวอย่างของโลหะที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น แพลตินัม แพลเลเดียม และนิกเกิล ตัวเร่งปฏิกิริยาจะช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเกิดง่ายขึ้นได้อย่างไร นักเคมีเชื่อว่าผิวของโลหะจะดูดซับโมเลกุลของไฮโดรเจนไว้ แล้วพันธะ σ ระหว่างโมเลกุลของ H_2 จะแตกออกเกิดพันธะระหว่างโลหะกับ H (M-H) เมื่อโมเลกุลของแอลคีนสัมผัสกับ

ผิวของโลหะ พันธะ π ของแอลคีนจะเกิดอัตรากิริยา (Interaction) กับออร์บิทอลของโลหะโมเลกุลของแอลคีนและเคลื่อนที่ไปโดยรอบผิวหน้าของโลหะจนเกิดการชนกับอะตอมไฮโดรเจนในพันธะโลหะกับ H อะตอมของไฮโดรเจนก็จะเข้ารวมตัวกับคาร์บอนที่สร้างพันธะ π ได้เป็นผลิตผลเกิดขึ้นแล้วจึงหลุดออกจากผิวโลหะ

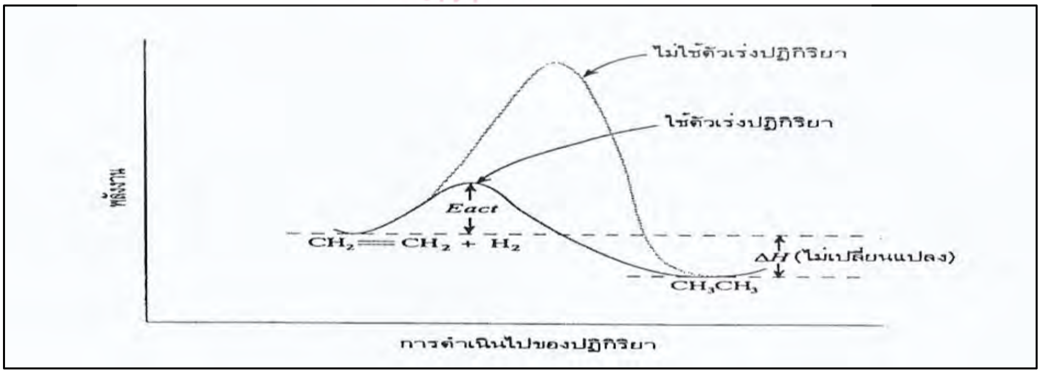


รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันของอัลคีน

ที่มา : เกสร พะลัง และ สุนัน ชัยกุล, 2549

หน้าที่ของตัวเร่งปฏิกิริยา คือ จะทำให้พันธะของ H_2 และอัลคีนอ่อนลงผลก็คือจะทำให้พลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาลดลงแสดงถึงพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเมื่อใช้และไม่ใช้ตัวเร่ง (ΔH) โดยที่ยังคงเดิมเฉพาะพลังงานก่อกัมมันต์ (Eact) ของปฏิกิริยาที่เปลี่ยนแปลง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 2.5 พลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเมื่อใช้และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี

ที่มา : เกสร พะลัง และ สุนัน ชัยกุล, 2549

2.4 โครงสร้างผิวหนัง

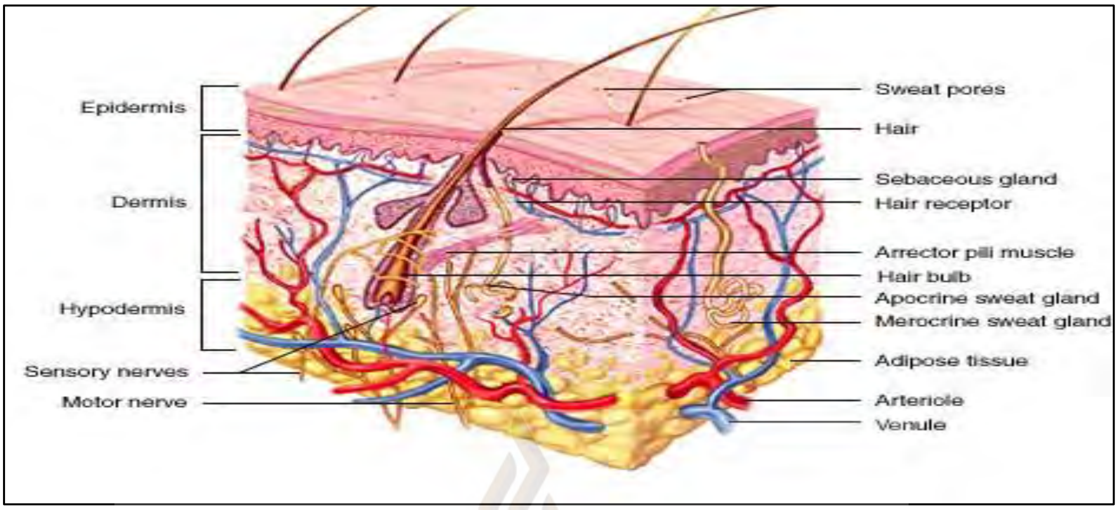
ผิวหนังประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) ชั้นหนังแท้ (Dermis) และชั้นไขมัน (Subcutis) ในแต่ละชั้นจะแบ่งเป็นชั้นย่อยๆอีกหลายชั้นและมีต่อมต่างๆอีกมากมาย เช่น ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน เป็นต้น ซึ่งจะมีหน้าที่แตกต่างกันออกไป

ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) เป็นชั้นผิวหนังที่อยู่นอกสุดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงผิวชั้นหนังกำพร้าเกิดจากเซลล์ชั้นเดียวซึ่งแบ่งตัวหนาขึ้นเกิดเป็นเซลล์ผิวหนัง (Keratonocyte) และ Epidermal Appendages (Adnexal Structures) เช่นขุมขน, ต่อมเหงื่อ, ต่อมไขมัน เป็นต้น อีพิเดอร์มิสเป็นชั้นที่มีความสำคัญมากในเรื่องของความงาม เพราะผิวหนังชั้นนี้จะบ่งบอกถึงความยืดหยุ่นหรือความชุ่มชื้นของผิวรวมทั้งเป็นชั้นที่ผลิตเม็ดสีผิวอีกด้วยจึงเกี่ยวข้องกับการเกิดฝ้า กระ จุดด่างดำ โดยตรง

ชั้นหนังแท้ (Dermis) ชั้นหนังแท้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นใยคือCollagen Fibers, Elastic Fibers และ Reticulumfibers ซึ่งเส้นใยจะมีลักษณะละเอียดและอยู่กันแบบหลวมๆในชั้นบนที่อยู่ชิดกับชั้นหนังกำพร้าเรียกว่าชั้น Papillary Dermis ส่วนในชั้นลึกเส้นใยมีลักษณะหยาบกว่าและอยู่กันอย่างหนาแน่นเรียกว่าชั้น Reticular Dermis เส้นใยดังกล่าวจะวางตัวอยู่ในสารพื้นฐาน (Ground Substance) ซึ่งประกอบด้วย Acid mucopolysaccharide พวก Hyaluronic Acid, Chondroitin Sulfate, Dermatansulfate, Neutral Mucopolysaccharides และ Electrolytes นอกจากนั้นในชั้นหนังแท้ยังมีเส้นเลือด, กล้ามเนื้อ, เส้นประสาทและปุ่มประสาทพิเศษที่รับความรู้สึกต่างๆ เช่น รับความรู้สึกสัมผัสความกดดัน ความร้อน ความเย็น เป็นต้น และในชั้นหนังแท้ยังมี Mast Cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี Granules ที่บรรจุด้วยสารหลายชนิดเช่น Heparin, Histamine, Neutrophil Chemotactic Factor, Eosinophil Chemotactic Factor of Fnaphylaxis และ Kinin เป็นต้น

ชั้นของไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutis) ชั้นลึกลงมาจากชั้นหนังแท้จะเป็นชั้นไขมันใต้ผิวหนังซึ่งจะแบ่งโดยผนังกั้นบางๆซึ่งประกอบด้วยเส้นใย Collagen และเส้นเลือด ทำให้ไขมันมีลักษณะเป็นกลุ่มๆ (Lobules) ชั้นนี้เป็นส่วนรองรับผิวหนังให้คงรูปร่างรับแรงกระแทกและสะสมพลังงานแก่ร่างกาย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของผิวหนัง

ที่มา : Hoffman, 2016

2.4.1 เส้นทางในการซึมผ่านผิวหนัง

ส่วนบนของผิวหนังซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของเศษเซลล์ที่ยึดติดอยู่จุลินทรีย์ซีบัมและสารอื่นมีผลไม่มากนักต่อการซึมผ่านของสาร สารต่างๆซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ 3 เส้นทาง ได้แก่

1) ผ่านทางต่อมเหงื่อ
2) ข้ามผ่านสตราตัมคอร์เนียมที่อยู่ระหว่างท่อบนผิวหนัง
3) ผ่านทางรูขุมขนที่ติดอยู่กับต่อมไขมัน

ชั้นสตราตัมคอร์เนียมเป็นตัวกั้นการซึมผ่านที่สำคัญ เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นอิฐและปูนคล้ายผนัง คอร์นีโอไซต์ของเคอราทินที่ชุ่มชื้นประกอบเป็น “ก้อนอิฐ” ที่ฝังตัวอยู่ในส่วนที่เป็น “ปูน” ที่ประกอบด้วยไขมันชั้นคู่ (Bilayer) จำนวนหลายชั้นที่มีส่วนประกอบเป็นเซราไมด์กรดไขมันอิสระ คอเลสเตอรอล และคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ ชั้นสองชั้นนี้ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นกึ่งผลึกเจลและผลึกเหลว (Liquid Crystal) โมเลกุลสารส่วนใหญ่แทรกผ่านผิวหนังทางเส้นทางขนาดเล็กระหว่างเซลล์ (Intercellular Microroute) ดังนั้นเทคนิคส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเพิ่มการส่งผ่านเมมเบรนมีเป้าหมายที่จะเปลี่ยนแปลงหรือสร้างเส้นทางลัดผ่านโครงสร้างอิฐและปูนของผิวหนัง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.4.2 หน้าที่ของผิวหนัง

1) ปกคลุมร่างกายและปกป้องเซลล์ต่างๆที่อยู่ภายสิ่งแวดล้อม

2) ช่วยรักษาอุณหภูมิร่างกายให้คงที่

3) มีส่วนในกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหรือสารก่อภูมิแพ้ต่างๆ

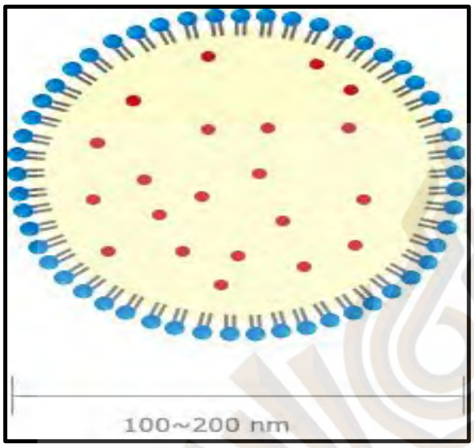
4) ช่วยควบคุมระดับน้ำในร่างกายโดยการละเหยน้ำหรือขับเหงื่ออีกทั้งช่วยป้องกันศูนย์ความชื้นจากร่างกายมากเกินไป (วิกิพีเดีย, 2559)

2.4 นาโนอิมัลชัน

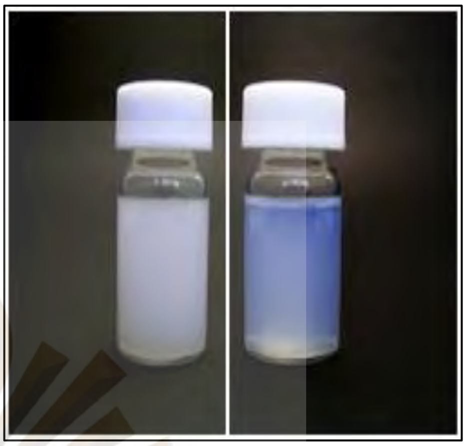
นาโนอิมัลชันเป็นกระจายตัวของน้ำมันในน้ำที่มีขนาดเล็กมากโดยมีขนาดของหยดวัฏภาคกระจายโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งแสงหรือค่อนข้างใสจนมีสีออกฟ้า (Solans, Izquierdo, Nolla, & Azemar, 2005) ซึ่งระบบนี้เป็นระบบที่เรียกกันโดยทั่วไปในชื่อต่างๆกัน เช่น มินิอิมัลชัน (Mini Emulsion) อัลต้าไฟน์อิมัลชัน (Ultrafine Emulsion) ซับไมครอนอิมัลชัน (Submicron Emulsion) อิมัลชันเนื้อเดียว (Homogeneous Emulsion) ไมโครอิมัลชันไม่คงตัว (Unstable Microe mulsion) หรืออิมัลชันโปร่งแสง (Translucent Emulsion) เป็นต้น คำว่า “มินิอิมัลชัน” ถูกนำมาใช้ในช่วงทศวรรษที่ 1970 เพื่ออธิบายระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีความคงตัวทางจลนศาสตร์ Kinetically Stable และมีขนาดหยดน้ำมันเฉลี่ยในช่วง 100-400 นาโนเมตร โดยมีความเข้มข้นของส่วนผสมของสารทำอิมัลชันที่ต่ำร้อยละ 1-3 โดยน้ำหนักของวัฏภาคน้ำมันและมีการเตรียมภายใต้แรงเฉือนเชิงกล (Mechanical Shear) สำหรับคำว่า “ซับไมครอนอิมัลชัน” เป็นคำที่นิยมใช้เรียกอิมัลชันทางเภสัชกรรมที่ใช้ฉีดหรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ ที่แสดงถึง สมบัติเฉพาะของนาโนอิมัลชัน เช่น ในทางเครื่องสำอางหมายถึงระบบอิมัลชันกระจายขนาดเล็กละเอียดหรือเล็กละเอียดมากๆ คำว่า “นาโนอิมัลชัน” เป็นคำได้รับคำนิยมในการใช้เพิ่มขึ้นมากกว่าเนื่องจากสะท้อนให้เห็นถึงขนาดหยดของเหลวที่เล็กในระดับนาโนได้อย่างชัดเจน อีกทั้งยังช่วยหลีกเลี่ยงความเข้าใจที่สับสนกับระบบการกระจายตัวของประเภทอื่นๆ เช่น ไมโครอิมัลชันซึ่งเป็นระบบที่มีความคงตัวอุณหพลวัด (Themodynamically Stable) อนุภาคของนาโนอิมัลชันอาจปรากฏอยู่ในรูปน้ำในน้ำมัน (W/O) และ น้ำมันในน้ำ (O/W) โดยที่แกนกลางของอนุภาคอาจเป็นได้ทั้งน้ำหรือน้ำมัน ตามลำดับ นาโนอิมัลชันมีความคงตัวทางจลนศาสตร์ เนื่องจากมีตัวกั้นซึ่งเป็นชั้นดูดซับของสารทำอิมัลชันหรือสารลดแรงตึงผิวที่บริเวณผิวระหว่างน้ำและน้ำมันตัวกั้นชนิดนี้อาจมีสมบัติไฟฟ้าสถิต Electrostatic หรือกีดขวาง Steric โดยธรรมชาติ ที่ช่วยป้องกันหยดอิมัลชันจากการเข้าใกล้กัน และ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทำหน้าที่เสริมความคงตัวจากฟิล์มของเหลวบางๆ ระหว่างหยดของเหลวที่อยู่ใกล้ชิดติดกัน นาโนอิมัลชันจึงมีความคงตัวทางกายภาพระยะยาวโดยไม่จับกลุ่มหรือรวมหยด และทำให้ระบบนี้มีลักษณะเฉพาะตัวในบางครั้งอาจหมายถึงระบบที่เข้าใกล้คงตัวทางอุณหพลวัต นอกจากนั้นนาโนอิมัลชันยังเป็นระบบที่มีลักษณะบอบบางโดยธรรมชาติ



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.7 (ก) แสดงถึงลักษณะของนาโนอิมัลชัน 100-200 นาโนเมตร
(ข) ลักษณะนาโนอิมัลชันที่โปร่งแสงหรือค่อนข้างใสจนมีสีฟ้า
ที่มา : Chinchole, 2016

2.5.1 การเตรียมนาโนอิมัลชัน

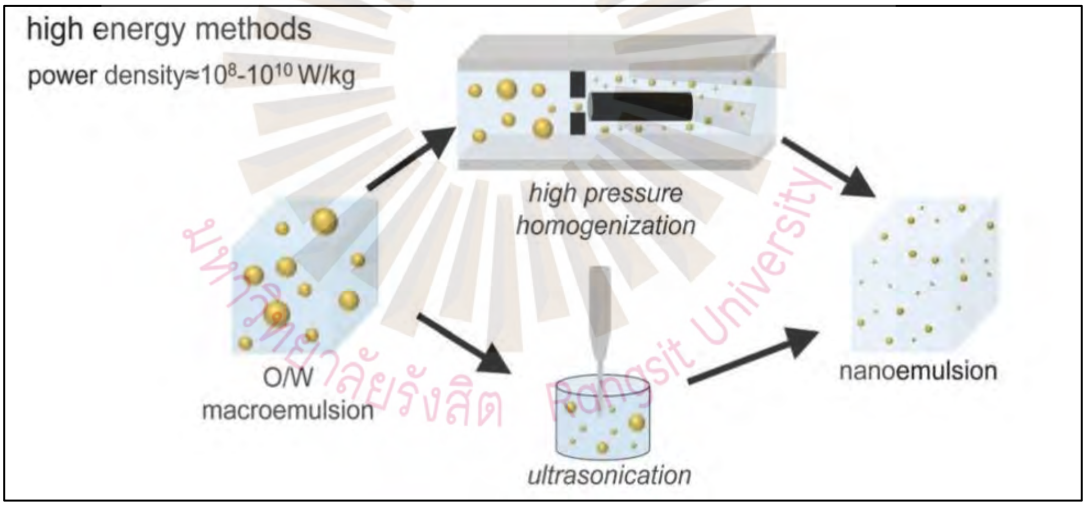
นาโนอิมัลชันเป็นระบบที่ไม่สมดุลซึ่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองจากการผสมสารเข้าด้วยกัน ดังนั้นกระบวนการเตรียมหรือผลิตจึงต้องใช้พลังงานเข้าไปในระบบซึ่งอาจเป็นพลังงานจากเครื่องมือกลหรือพลังงานศักย์ทางไฟฟ้าของสารประกอบ วิธีการเตรียมโดยใช้พลังงานเชิงกลจากเครื่องมือใช้หลักการของการกระจายหรือการสร้างอิมัลชันด้วยการใช้พลังงานระดับสูงสำหรับวิธีการใช้พลังงานทางเคมีสะสมของสารประกอบในระบบอาจเรียกได้ว่าเป็นวิธีการควบแน่นหรือวิธีการใช้พลังงานต่ำหรือวิธีการสร้างอิมัลชันให้เกิดขึ้นด้วยตัวเอง

2.5.2 วิธีการเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยการใช้พลังงานสูง

วิธีการเตรียมอิมัลชันด้วยการใช้พลังงานระดับสูง โดยอาศัยหลักการปั่นด้วยแรงเฉือนขนาดสูง หรือการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง (High Pressure Homogenizer) และการ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเหนือเสียง Ultrasound Generator เครื่องมือที่ใช้เหล่านี้สามารถใช้พลังงานในช่วงเวลาอันสั้นและมีการไหลที่สม่ำเสมออย่างมากจนทำให้เกิดอนุภาคขนาดที่เล็กในวิธีทั้งหลายที่กล่าวมาแล้ววิธีการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูงเป็นเครื่องมือเตรียมนาโนอิมัลชันที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากวิธีนี้สามารถใช้พลังงานสูงตามที่ต้องการภายในระยะเวลาสั้นๆ และยังให้การไหลของอิมัลชันสม่ำเสมอทำให้สามารถสร้างเป็นหยดอนุภาคขนาดเล็กที่สุดได้พารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการใช้เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง คือ อุณหภูมิความดันและจำนวนรอบในการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งจำนวนรอบของการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากต่อการลดค่าการกระจายขนาดอนุภาคและเป็นการทำให้ได้อนุภาคขนาดเล็ก นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้อุณหภูมิที่สูงเพิ่มขึ้นเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการผลิตขนาดอนุภาคในขนาดที่เล็กลง แสดงให้เห็นว่าจำนวนรอบของการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากต่อการลดค่าการกระจายขนาดอนุภาคและเป็นการทำให้ได้อนุภาคขนาดเล็ก นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้อุณหภูมิที่สูงเพิ่มขึ้นเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการผลิตขนาดอนุภาคในขนาดที่เล็กลง



รูปที่ 2.8 การเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยการใช้พลังงานสูง

ที่มา : Gupta, 2016

2.5.3 การแสดงลักษณะเฉพาะของนาโนอิมัลชัน

การพิสูจน์เอกลักษณ์ประเภทของนาโนอิมัลชันสามารถทำได้หลายวิธีการทดสอบด้วยการเจือจาง (Dilution Test) มีพื้นฐานจากการที่อิมัลชันจะเข้ากันได้กับของประเภทเดียวกับวัฏภาค

ต่อเนื่อง การวัดค่าการนำไฟฟ้าขึ้นกับหลักการที่ว่าการนำไฟฟ้าของน้ำมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำมัน ดังนั้นนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะมีค่าการนำไฟฟ้าที่สูงเนื่องจากมีน้ำเป็นวัฏภาคต่อเนื่อง สำหรับการทดสอบด้วยการย้อมสีโดยการโปรยสีที่ละลายน้ำลงบนผิวของนาโนอิมัลชันซึ่งเป็นวิธีซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ธรรมชาติของวัฏภาคต่อเนื่องหากเป็นนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำสีละลายในน้ำจะเข้ากันได้อย่างรวดเร็วกับระบบในขณะที่นาโนอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันสีละลายน้ำจะรวมกันเป็นกลุ่มก้อนที่มองเห็นได้อย่างชัดเจนและสิ่งเหล่านี้เกิดขึ้นตรงกันข้ามเมื่อเติมสีที่ละลายน้ำมัน สำหรับการแสดงลักษณะเฉพาะทางเคมีกายภาพของนาโนอิมัลชัน ได้แก่ การวัดขนาดหยดของเหลวศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta Potential) พีเอชและความหนืด นอกจากนั้นการประเมินการสร้างนาโนอิมัลชันสามารถทำได้ด้วยการวัดการกระจายขนาดของหยดอนุภาคด้วยการใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต (Dynamic Light Scattering) ในบางกรณีอาจใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่านด้วยเทคนิคการย้อมสีเนกาทีฟ (Negative-Staining) เพื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยา (Morphology) และโครงสร้างของนาโนอิมัลชัน

2.5.4 การประเมินคุณลักษณะของนาโนอิมัลชัน

คุณลักษณะเฉพาะของนาโนอิมัลชันที่นิยมศึกษา ได้แก่ การศึกษาลักษณะเบื้องต้น (Preliminary Characterization) เช่น การสังเกตด้วยตาเปล่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิสูงและต่ำสลับกัน (Freeze-Thaw Cycling Test) ทำอย่างน้อย 5 รอบต่อเนื่องกันและการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High Speed Centrifugation) ด้วยความเร็วเริ่มต้นจาก 2,000 ไปจนถึง 25,000 pm เป็นเวลา 10 นาที โดยนาโนอิมัลชันต้องมีความคงตัวดีไม่เกิดปัญหาความไม่คงตัวระหว่างการทดสอบการวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคเป็นการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่มีความสำคัญต่อตำรับโดยใช้เครื่องมือหลายชนิด เช่น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) เครื่อง Photon Correlation Spectrosoopy หรือ เทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต (Dynamic Light Scattering) โดยทั่วไปขนาดอนุภาคเฉลี่ยของนาโนอิมัลชันจะอยู่ระหว่าง 20-200 นาโนเมตร เนื่องจากขนาดหยดอนุภาคที่เล็กทำให้มีความคงตัวดีและมีประสิทธิภาพในการนำส่งยาผ่านผิวหนังได้ด้วยส่วนค่าดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity Index, PDI) ของหยดนาโนอิมัลชันจากเครื่อง Photon Correlation Spectroscopy ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งนาโนอิมัลชันควรจะให้ขนาดหยดที่ใกล้เคียงกันคือมาการกระจายของขนาดแคบ (Narrow Size Distribution) ให้ค่า PDI ไม่เกิน 0.2

1) การตรวจสอบสัณฐานวิทยา Morphology และโครงสร้างของนาโนอิมัลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microsoopy, TEM) พบรูปร่างนาโนอิมัลชันเป็นทรงกลมและมีขนาดที่เล็กในระดับนาโนเมตร

2) การวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta Potential) ใช้วัดคุณสมบัติของประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคและบอกถึงความคงสภาพในระยะยาวของนาโนอิมัลชัน

3) การวัดความหนืด Viscosity Determination เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและใช้ควบคุมให้นาโนอิมัลชันมีความคงตัวโดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer ซึ่งนาโนอิมัลชันที่เหมาะสมควรมีความหนืดต่ำ

4) การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง (*In Vitro* Skin Permeation Studies) ทำการศึกษาโดยใช้ Franz Diffusion Cell หรือ Keshary Chien Diffusion Cell โดยเมมเบรนที่ใช้ศึกษาการซึมผ่านอาจใช้จากผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมของสัตว์ทดลอง เช่น หนังงู หนังหมู หนังหนู หรือผิวหนังมนุษย์เป็นเมมเบรนที่อยู่ระหว่าง Donor และ Receiver ของ Franz Diffusion Cell และใช้ Receiver ของ Franz Diffusion Cell และใช้ Receiver Fluid เป็น Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 ที่มีการรบกวนจลอดเวลาด้วย Magnetic Rotor (100 rpm) และการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37±1 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำมาวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (Rangsimawong & Gawhirunpat, 2014)

2.5.5 การประยุกต์ใช้นาโนอิมัลชันเพื่อการนำส่งทางผิวหนัง

นาโนอิมัลชันมีข้อดีหลายประการต่อการประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกายเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ ประการแรก คือ ขนาดหยดของเหลวที่เล็กนี้ช่วยลดผลกระทบต่างๆ ที่เกิดจากแรงโน้มถ่วงโลก เช่น การเกิดการเคลื่อนไหวแบบบราวน์ของหยดของเหลวขนาดเล็กของนาโนอิมัลชัน ช่วยป้องกันการเกิดครีมหรือการตกตะกอนระหว่างเก็บ ประการที่สอง คือ พื้นที่ผิวมหาศาลของนาโนอิมัลชันทำให้เกิดการแพร่แผ่นของสารสำคัญลงสู่ผิวหนังอย่างรวดเร็ว ประการที่สามหยดของเหลวที่มีขนาดเล็กนี้สามารถช่วยทำให้เกิดการสะสมบนผิวหนังได้อย่างสม่ำเสมอ นอกจากนั้นกระบวนการเปียกบนผิว การกระจายบนผิว และการแทรกซึมเข้าสู่ผิวเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เป็นผลจากการที่ทั้งระบบมีแรงตึงผิวที่ลดลงและการที่มีแรงตึงผิวที่ลดลงและการมีแรงตึงระหว่างผิวที่ต่ำของหยดน้ำมันในน้ำ ประการที่สี่นาโนอิมัลชันอำนวยความสะดวกต่อการให้ยาซึมหรือแทรกเข้าสู่ผิวหนังจากผลของปกคลุม (Occlusive Effect) ของฟิล์มที่สร้างขึ้นบนพื้นผิวหนังซึ่งจะลดอัตราการละเหยหรือสูญเสียน้ำจากผิวหนังชั้นนอกการ

ปกคลุมสามารถช่วยเพิ่มการแทรกผ่านของตัวยาเข้าสู่ผิวหนังจากการเพิ่มไฮเดรชัน นอกจากนั้นนาโนอิมัลชันยังมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้กับผิวเพราะมีสมบัติที่ไม่เป็นอันตรายและไม่ละคายเคืองระบบนี้ยังมีสมบัติที่ดึงดูดต่อการใช้และให้ความรู้สึกที่ดีบนผิว เนื่องจากเป็นระบบมีลักษณะโปร่งแสงโดยธรรมชาติ และนาโนอิมัลชันที่มีความเข้มข้นของน้ำมันในปริมาณที่เหมาะสมจะมีการไหลที่ดีและมีความหนืดไม่มากนอกจากนั้นอนุภาคอิมัลชันมีขนาดเล็กมากจึงไม่อุดตันรูขุมขนและยอมให้อากาศและน้ำไหลผ่านได้ ประการสุดท้ายนาโนอิมัลชันช่วยให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันที่ยาวนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันปกติเนื่องจากการมีขนาดหยดที่เล็กในระดับนาโนซึ่งช่วยการปลดปล่อยยาออกจากหยดของวัฏภาคกระจาย ข้อดีที่สำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์คือนาโนอิมัลชันเป็นระบบที่ใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่ต่ำ (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2555)

นาโนอิมัลชันสามารถใช้เป็นระบบนำส่งยาผ่านผิวหนังเนื่องจากการให้ยาทางผิวหนังเพื่อการรักษาเฉพาะที่หรือเพื่อให้เกิดผลทั่วร่างกายสามารถเอาชนะข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการที่เกิดขึ้นกับระบบนำส่งรูปแบบอื่นทั่วๆไป เช่น การให้ยาทางปากหรือทางฉีดซึ่งอาจเกิดปัญหาจากการเกิดการเมแทบอไลต์ของตัวยาก่อนเข้ากระแสเลือดที่เกิดในตับและการดูดซึมของตัวยาเข้าสู่กระแสเลือดโดยไม่ตั้งใจ นอกจากนั้นการให้ยาทางผิวหนังนี้ทำได้ง่ายกว่าและสะดวกกว่าต่อคนไข้และเมื่อมีความต้องการหยุดให้ยาก็สามารถหยุดได้ทันที ดังเช่นมีการศึกษาเปรียบเทียบนาโนอิมัลชันที่มีประจุหรือลบของตัวยาต้านเชื้อราเช่น อีโคนาโซลไนเตรท (Econazole Nitrate) และไมโครนาโวลไนเตรท (Miconazole Nitrate) แสดงให้เห็นว่า นาโนอิมัลชันชนิดประจุบวกมีประสิทธิภาพในการการแทรกซึมผ่านผิวหนังที่ดีกว่านาโนอิมัลชันชนิดประจุลบเพราะมีการยึดรวมตัวของหยดของเหลวบนผิวหนังที่ดีกว่าและการศึกษาต่อมาแสดงให้เห็นว่านาโนอิมัลชันเพิ่มการนำส่งทางผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญ คือ ระบบนำส่งทางผิวหนังของตัวยาสเตียรอยด์และยาต้านการอักเสบ ชนิดไม่ใช่ สเตียรอยด์ เช่น เบตาเมทาโซลวาลีเรท และไดโพรพิโอเนต (Betamethasone Velerate and Dipropionate) อินโดเมทาซิน (Indomethacin) ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ไพรอกซิแคม (Piroxicam) และนาพรอกเซน (Naproxen) เมื่อเติมตัวยาที่ไม่ชอบน้ำเหล่านี้ลงในวัฏภาคน้ำมันของนาโนอิมัลชันชนิดครีมจะช่วยเพิ่มการแทรกผ่านและเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยาที่กักเก็บเมื่อเทียบกับการกระสายยาหรือครีมเบสทั่วไป นอกจากนั้นยังแสดงให้เห็นว่า ผลทางเภสัชวิทยาของตัวยาต้านการอักเสบมีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับขนาดของหยดน้ำมันของอิมัลชัน มีข้อมูลการศึกษาซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าการทำนาโนอิมัลชันของไดอาซีแพมก่อให้เกิดผลของตัวยาอย่างทั่วร่างกายอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับครีมทั่วไป นอกจากนั้นยังพบว่าการให้นาโนอิมัลชันของไดอาซีแพมบน

ผิวหนังหนู ทำให้ระดับความเข้มข้นของตัวยาในเลือดอยู่ในระดับเดียวกับการฉีด การศึกษาอีกเรื่องหนึ่งระบุว่าฤทธิ์ของตัวยา เช่น อะโทรปีน (Atropine) และลิโดเคน (Lidocaine) เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า เมื่อเตรียมในรูปแบบนาโนอิมัลชัน (Schwaz, Weisspapir, and Friedman, 1995) เช่นเดียวกับศึกษาผลของการใช้นาโนอิมัลชันชนิดประจุบวกต่อการใช้เป็นกระสายยาที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านผิวหนังโดยที่นาโนอิมัลชันที่มีประจุบวกนี้ประกอบด้วยเซราไมด์ (Ceramides) จากการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่านาโนอิมัลชันชนิดประจุบวกนี้เป็นตัวพาที่เหมาะสมสำหรับสารที่มีการละลายต่ำ (Yilmaz & Borchert, 2006)

2.5.6 ข้อดีของนาโนอิมัลชัน

1) นาโนอิมัลชันมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่าแมคโครอิมัลชัน ดังนั้นจึงทำให้นาโนอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการส่งผ่านสารสำคัญได้ดีกว่า

2) นาโนอิมัลชันมีโอกาสที่จะเกิด Creaming, Flocculation, Coalescence ได้น้อยกว่าแมคโครอิมัลชัน

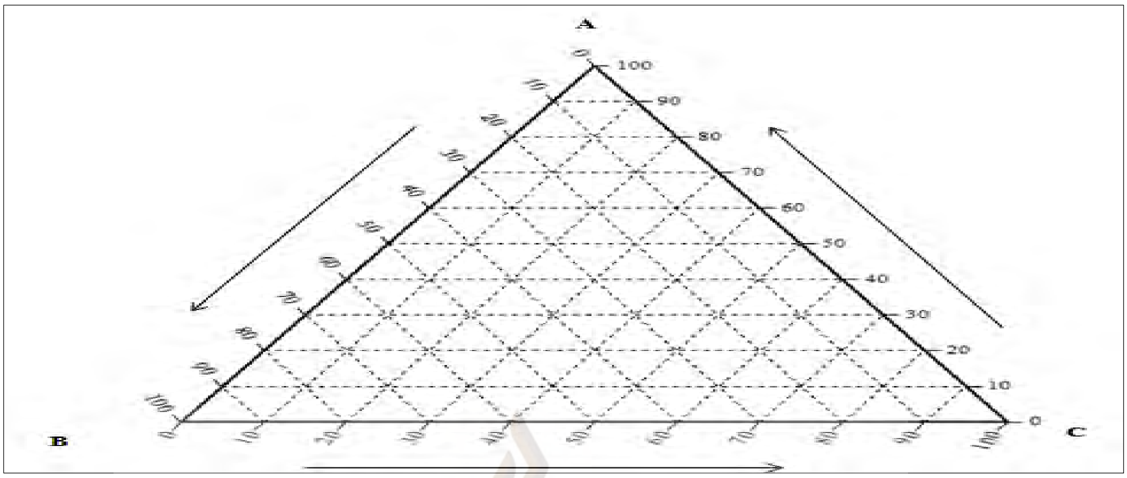
3) สามารถเตรียมนาโนอิมัลชันได้หลายรูปแบบ เช่น ครีม โลชั่น สเปรย์ และโฟม

4) นาโนอิมัลชันไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังหรือเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายรวมทั้งในเซลล์ของสัตว์ ดังนั้นจึงสามารถนำนาโนอิมัลชันมาใช้ได้กับมนุษย์และสัตว์

2.6 Ternary Phase Diagram

แผนภาพเฟสของระบบที่มีองค์ประกอบ 3 ชนิด ลักษณะของแผนภาพเฟสมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่าและมีองค์ประกอบทั้ง 3 ชนิด แสดงสภาพการละลายได้ของเฟสหนึ่งในอีกเฟสหนึ่งจนมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ณ สภาวะสมดุลหนึ่งๆการสร้างแผนภาพสามเหลี่ยมด้านเท่าจะช่วยทำให้เห็นสภาวะของระบบและอัตราส่วนของสามตัวแปรการอ่านแผนภาพ Ternary Phase Diagram เมื่อให้สารบริสุทธิ์แต่ละตัวอยู่ที่มุมของสามเหลี่ยมด้านเท่า A B และ C ที่จุดยอด A B และ C มีค่าเท่ากับ 100% โดยน้ำหนักของ A B และ C เมื่อลากเส้นตั้งฉากจากจุดยอด A B และ C ลงมาที่ฐาน ค่าที่ฐาน A B และ C จะมีค่าเท่ากับ 0%

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 2.9 Ternary Phase Diagram
ที่มา : Fichter, 2016

2.7 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วย เทคนิค Dynamic light scattering

อนุภาคนาโนที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวมีการเคลื่อนที่แบบสุ่มอย่างสม่ำเสมอ หรือเรียกว่า การเคลื่อนที่แบบบราวน์ (Brownian Motion) อันเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคกับโมเลกุลของของเหลวตัวกลางการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่เข้มข้นต่ำสามารถคำนวณได้จากความหนืดของของเหลวตัวกลางอุณหภูมิและขนาดของอนุภาคตามสมการสโตกส์และไอน์สไตน์ (Stokes and Eienstein) ดังนั้นหากทำการวัดการเคลื่อนที่ของอนุภาคในของเหลวที่รู้อุณหภูมิและความหนืดก็สามารถคำนวณขนาดของอนุภาคได้ขนาดของอนุภาคที่เข้มข้นต่ำจะเป็นขนาดอนุภาคแบบไฮโดรไดนามิค (Hydrodynamic Particle Size) เมื่อความเข้มข้นของอนุภาคในของเหลวมากขึ้นทำให้การกระเจิงเป็นแบบทวีคูณและเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างอนุภาค การปรับระบบการวัดสามารถช่วยลดผลกระทบจากการกระเจิงแบบทวีคูณทั้งนี้ขนาดอนุภาคที่วัดได้จะเป็นภายนอกอนุภาค (Apparent Particle Size) เทคนิค DLS อาศัยการเคลื่อนที่ของอนุภาคเชิงแสง โดยใช้แสงจากแหล่งกำเนิดแสงอาพันธ์ (Coherent Light Source) ฉายลงบนอนุภาคที่แขวนลอยในของเหลว แสงกระเจิงอันเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอนุภาคนั้นมีเฟสที่ขึ้นกับเวลาของแสงกระเจิงนี้สามารถพิจารณาเป็นการเลื่อนของเฟสหรือการเลื่อนของความถี่จากความถี่กลางของแสงจากแหล่งกำเนิดแสง เมื่อทำการวัดไปในช่วงเวลาหนึ่งการเคลื่อนที่แบบสุ่มของอนุภาคทำให้เกิดการกระจายตัวของการเลื่อนเฟสและการเลื่อนของความถี่แสง

2.7.1 องค์ประกอบของเครื่อง

1) เลเซอร์แสงเดียว (Monochromatic Laser) ทำหน้าที่ให้แสงที่โพลาไรซ์กับสนามไฟฟ้าซึ่งตั้งฉากกับระนาบที่เกิดจากรังสีจากแหล่งกำเนิดแสงและรังสีที่ตรวจวัดได้โพลาไรซ์แนวตั้งเลเซอร์ที่ใช้ได้แก่ ฮีเลี่ยมนีออนเลเซอร์ อาร์กอนเลเซอร์ โซลิดเสตทเลเซอร์ ไดโอดปั๊มโซลิดเสตทเลเซอร์ และไดโอดเลเซอร์

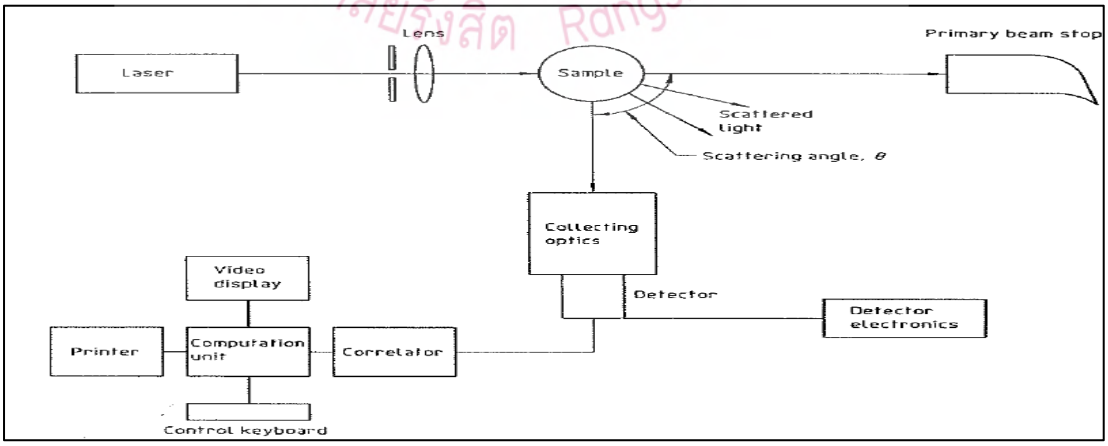
2) องค์ประกอบเชิงแสง Optics เลนซ์ และอุปกรณ์รวมแสงจากแหล่งกำเนิดเพื่อส่งไปยังปริมาตรการกระเจิงของแสงและตัวตรวจวัดแสงกระเจิงนิยมใช้เส้นใยนำแสงในระบบตรวจวัดและนำส่งแสง

3) ช่องใส่ตัวอย่าง Test Sample Holder ต้องสามารถวัดและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ภายใน ±0.3 องศาเซลเซียส

4) ตัวจับโฟตอน Photon Detector นิยมใช้ตัวตรวจวัดแสงทวีคูณและแอวัลแลนซ์โฟโตไดโอดหรือโฟโตไดโอดในการตรวจจับโฟตอนซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มของแสงกระเจิง

5) หน่วยประมวลประมวลผลสัญญาณความเข้มที่สัมพันธ์กับเวลาแล้วแสดงผลสหสัมพันธ์อัตโนมัติ Autocorrelation สหสัมพันธ์ข้าม Cross-Correlation หรือสเปกตรัมของกำลังสัญญาณ

6) คอมพิวเตอร์ ประมูลผลสัญญาณเพื่อคำนวณขนาดอนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาคบางครั้งทำหน้าที่เป็นหน่วยประมวลผลกด้วย (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)



รูปที่ 2.10 ส่วนประกอบทั่วไปของดีแอลเอส
ที่มา : ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

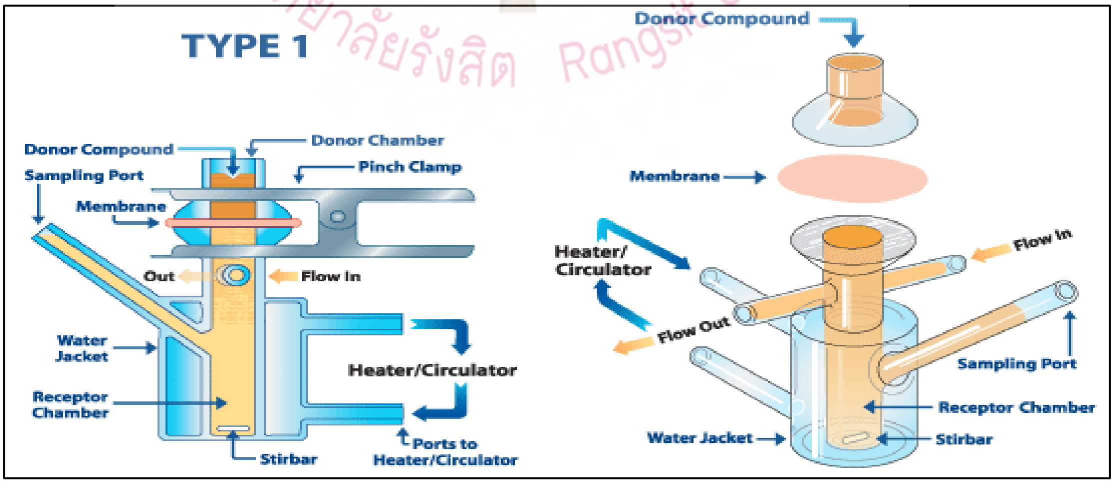
2.8 การทดสอบการซึมผ่าน

2.8.1 Franz diffusion cell

เซลล์ทดสอบการแพร่ (Franz Diffusion Cell) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการดูดซึมผ่านผิวหนังของตัวยา โดยเป็นการจำลองระบบการทำงานของผิวหนังเนื้อเยื่อและของเหลวภายในร่างกายที่กระทำการทดลองภายนอกร่างกาย *In vitro*

2.8.2 หลักการทำงานของอุปกรณ์ Franz Diffusion Cell

หลักในการบรรจุยาหรือสารเคมีลงบนส่วนบรรจุตัวยา Donor Chamber ตัวยาจะถูกปลดปล่อยและซึมผ่าน Membrane ไปยังส่วนที่บรรจุตัวทำละลาย Receptor Chamber ที่มีตัวทำละลาย Phosphate Buffer pH 7.4 ซึ่งเลียนแบบของเหลวในร่างกายที่มาหล่อเลี้ยงผิวหนังภายใต้อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ควบคุมการหมุนเวียนด้วยปั๊มน้ำหมุนเวียนและใส่แท่งกวนแม่เหล็ก Magnetic bar ภายในส่วนบรรจุตัวทำละลาย Receptor Chamber เพื่อไม่ให้ตัวทำละลายตกตะกอนโดยที่ชุดอุปกรณ์ Franz Diffusion Cell ตั้งอยู่บนเครื่องกวนสารละลายชนิดแม่เหล็ก Magnetic Stirrer แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างจาก Receptor Chamber ในช่วงเวลาต่างๆเพื่อตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณยาหรือสารที่ได้ผ่านผิวหนังลงมา



รูปที่ 2.11 Franz Diffusion Cell

ที่มา : สุปรีดี สังฆรักษ์, 2559

2.8.3 อุปกรณ์ Franz Diffusion Cell

1) ส่วนบรรจุตัวยาที่ต้องการทดสอบ (Donor Chamber)

2) ส่วนบรรจุตัวทำละลาย (Receptor Chamber)

3) เยื่อแผ่นกั้น (Semipermeable Membrane) หรือผิวหนัง

3.1) ผิวหนังเทียม Simulated Skin Membrane

3.2) ผิวหนังธรรมชาติ

4) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Temperature Control Water Jacket)

5) ส่วนที่เปิดเพื่อเก็บตัวอย่าง (Sampling Port)

6) เครื่องกวนสารละลายชนิดแม่เหล็กและแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer and Magnetic bar)

7) ปั๊มน้ำหมุนเวียน (Water Reciculating Pump)

8) ตัวทำละลายใน Receptor Chamber (พิชยา อุโฆษอารามิก, 2557)

2.9 เอช พี แอล ซี (HPLC)

เอช พี แอล ซี (HPLC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีการแยกของผสมออกจากกันเพื่อหาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบของสารแต่ละตัวในระหว่าง 2 Phase คือ Stationary Phase กับ Mobile Phase สามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ Qualitative Analysis และในเชิงปริมาณ Quantitative Analysis เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เป็นเครื่องที่มีความไว Sensitivity สูงสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยสารที่น้ำหนักโมเลกุลสูงและสารที่ไม่คงตัวต่อความร้อน

HPLC เป็น Column Liquid Chromatography แบบใหม่มีการพัฒนามาตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1969 โดยพัฒนาเกี่ยวกับคอลัมน์คือลดขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ Packing Material ลงเหลือประมาณ 3-10 ไมโครเมตร HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์งานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ในด้านต่างๆ ได้แก่ ตรวจสอบและควบคุมคุณภาพตัวยาและเภสัชตามข้อกำหนด Quality Control and Testing ศึกษาความคงตัวของตัวยาและเภสัช Stability Studies ควบคุมการสังเคราะห์ตัวยาทั้งทางเคมีและทางจุลชีววิทยาการตรวจสอบความบริสุทธิ์ตรวจสอบระดับยาในร่างกาย Therapeutic

Monitoring ศึกษากระบวนการสร้างและกระบวนการสลายตัวของยา Drug Metabolism Studies ศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์และวิเคราะห์ยาที่ได้มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

2.9.1 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase Reservoir) โดยทั่วไปมักทำด้วยแก้วหรือ Stainless เนื่องจากตัวทำละลาย Solvent ที่ใช้ในงาน HPLC ต้องปราศจากฟองอากาศซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่ Pump หรือ Detector เฟสเคลื่อนที่ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์จะต้องทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เพราะออกซิเจนที่ละลายอยู่อาจทำให้ปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้หรือแม่กับเฟสคงที่ที่บรรจุในคอลัมน์เพื่อลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในระบบเทคนิคที่นิยมใช้ในการไล่อากาศ ได้แก่ การผ่านเครื่อง Degasser ก่อนผ่านเฟสเคลื่อนที่เข้าปั๊มและการ Purge ด้วยแก๊สเฉื่อย เช่น ฮีเลียมในภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่

ระบบของการแยกในเทคนิค HPLC มี 2 Mode ตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ Isocratic elution คือ การแยกใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่แบบเดียวตลอดการแยกและ Gradient Elution คือ การแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้นวิธีนี้จะใช้ในกรณีที่สารมีความซับซ้อนและมีสารตัวอย่างอยู่ใน Sample หลายตัว

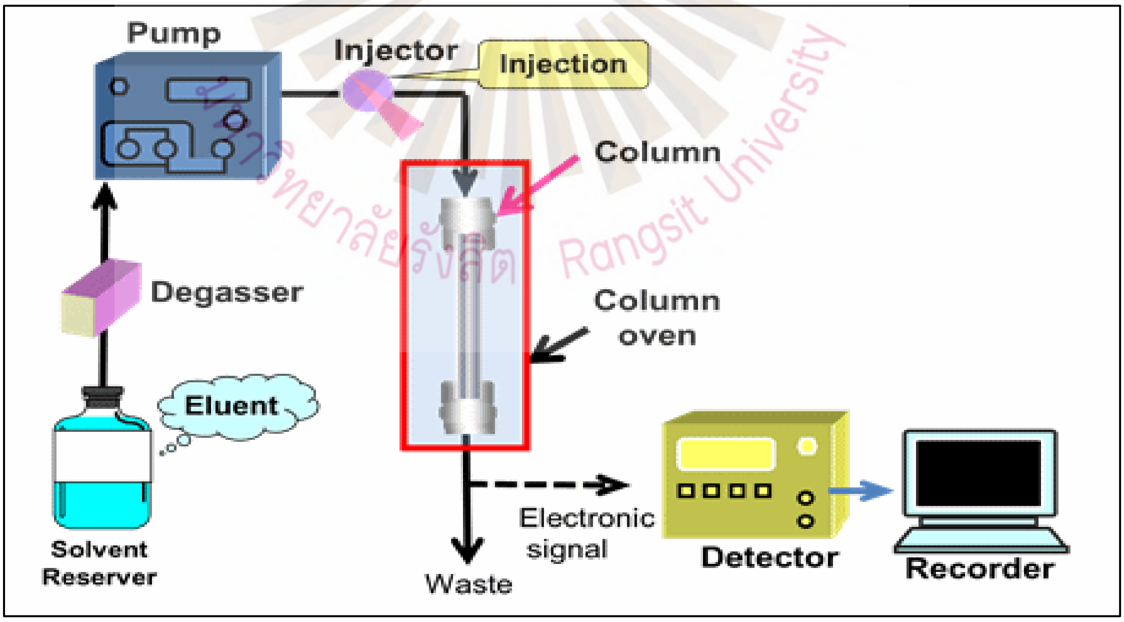
ระบบปั๊มสาร (Pumping System) การแยกสารต้องอาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ mobile phase ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ Stationary phase ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมากทำให้เกิดความต้านทานการไหล และระบบปั๊ม Pump System จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ Mobile Phase ให้ไหลไประบบปั๊ม Pump System แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ Piston Reciprocating Pump และ Diaphragm หรือ Membrane Reciprocating Pump

ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (Injector) วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Vale-Type Injection System โดยสารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปเก็บไว้ Loop โดยมี Vale ควบคุมให้สารตัวอย่างเข้าสู่ Column โดย Loop มีหลายขนาดสามารถเปลี่ยนถอดได้ตามปริมาณสารตัวอย่าง โดยทั่วไปมีขนาดยาว 5 ถึง 500 ไมโครลิตร และ Automatic Sample Injection นิยมใช้งานประจำที่มีสารตัวอย่างจำนวนมาก

คอลัมน์ (Column) เป็นหลักสำคัญของ HPLC มักเป็นท่อเรียบทำด้วย Stanless Steel ที่ทนความร้อนสูงได้ ส่วนปลายมีลักษณะเป็นตาข่ายเล็กๆเพื่อป้องกันการรั่วของวัสดุที่เป็น Stationary Phase ประกอบด้วย Guard Column ทำหน้าที่กรองสิ่งสกปรกที่ปนมากับ Solvent นิยมต่อเข้าก่อน และ Analytical Column ทำหน้าที่แยกสาร

การตรวจวัด (Detector) หลังจากสารตัวอย่างถูกแยกผ่าน Column ออกมาแล้วจะต้องผ่านเครื่องตรวจวัด Detector และคุณสมบัติที่ดีของ Detector ต้องมีความ Sensitivity ที่เพียงพอมี Reproducibility ที่ดีไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตรากาลไหลของ Mobile Phase และอุณหภูมิ เชื่อถือได้ง่ายต่อการใช้งานและไม่ทำลายสารตัวอย่าง เครื่องตรวจวัด Detector ที่นิยม คือ UV-Vis Detector หลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนของสารตัวอย่างจะมี Flow-Through Cell รูปร่างตัว Z Cell ดังกล่าวออกแบบมาให้มีปริมาณน้อยที่สุดเพื่อป้องการเกิด Band Broadening ข้อดีคือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลของ Mobile Phase และอุณหภูมิ

การประมวลผล (Recorder and Data Processing) เป็นส่วนที่ใช้แปลผลแล้วบันทึกผลออกมาในรูป Chromatogram (สุรพจน์ วงศ์ใหญ่, 2541)



รูปที่ 2.12 องค์ประกอบ HPLC

ที่มา : Choudhary, 2016

2.10 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analytical Procedures)

เป็นวิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อแสดงว่าวิธีดังกล่าวมีเหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์นั้นๆการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วย

1) ความจำเพาะ (Specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์ เฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยสารนั้นเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งๆในสารละลายนั้นๆ หรือวิธี วิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการวัด

2) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะทำให้ วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความ เข้มข้นที่กำหนดการหาความเป็นเส้นตรงควรหาอย่างน้อยที่สุด 5 ความเข้มข้น ค่าที่ได้จากการ วิเคราะห์จะแสดงผลเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient : r^2)

3) ความเที่ยงตรง (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่วัดค่าใกล้เคียง กับค่าที่แท้จริงมากที่สุดแสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีค่าความถูกต้องสูง (High Accuracy) ได้แก่ การ หาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% Recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (Spike Sample) ทำ 3 ระดับความเข้มข้น

4) ความแม่น (Precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำกันหลายๆครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์จะแสดงเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน Standard (Deviation: SD) หรือค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation: CV) (กองควบคุม ยาและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2549)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.11 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

1) Limit of Detection (LOD) หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ใน ตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

2) Limit of Quantitation (LOQ) หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ใน ตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ หรือรายงานโดยมี Accuracy และ Precision ที่ยอมรับได้

บทที่3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย มีดังนี้

1) Beaker	(Pyrex, Japan)
2) Erlenmeyer Flask With Joint	(Pyrex, Japan)
3) Erlenmeyer Flask	(Pyrex, Japan)
4) Burette	(Pyrex, Japan)
5) Vial	(Pyrex, Japan)
6) Cylinder	(Pyrex, Japan)
7) Filtering Funnel	(Pyrex, Japan)
8) Desiccator	(Pyrex, Japan)
9) Round Bottom Flask Joint	(Pyrex, Japan)
10) Dropper	(Pyrex, Japan)
11) Watch Glass	(Pyrex, Japan)
12) Stirring Rod	(Pyrex, Japan)
13) Volumetric Flask	(Pyrex, Japan)
14) Test Tube	(Pyrex, Japan)
15) Hotplat Stirrer	(Daihan Labtech, Korea)
16) Stand and Burette Clamp	(Art Products, USA)
17) ลูกโป่ง	
18) ช้อนตักสารพลาสติก	
19) น้ำมันพืช	
20) ไม้ขีดไฟ	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2 วัตถุดิบสารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย มีดังนี้

1) Cinnamon Oil	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
2) Grape Oil	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
3) Peppermint Oil	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
4) Tween 20	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
5) Tween 80	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
6) Span 20	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
7) Span 80	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
8) Propylene Glycol	(บริษัท ฮงฮวด,ประเทศไทย)
9) Dichloromethane	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
10) Acetic Acid	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
11) HPLC Water	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
12) Absolute Methanol	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
13) Ethanol 95%	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
14) Acetonitrile	(RCI Labscan,ประเทศไทย)
15) KH_2PO_4	(Ajax Finechem, Austria)
16) K_2HPO_4	(Ajax Finechem, Austria)
17) Ammonium Formate	(Sigma Aldrich, USA)
18) Palladium Carbon	(Sigma Aldrich, USA)
19) Parafilm M	(Sigma Aldrich, USA)
20) Filter Papers	(Whatman, USA)
21) Membrane Filter	(Whatman, USA)
22) Silica Gel	(Merck, USA)
23) แผ่น TCL	(Merck, USA)
24) Dihydrooxyresveratrol	(มหาวิทยาลัยรังสิต)
25) ผงสารสกัดมะหาด	(มหาวิทยาลัยรังสิต)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.3 เครื่องมือทดสอบ

1) เครื่อง NMR/ IR	(Bruker, USA)
2) Scanning Electron Microscope (SEM)	(Hitachi,Japan)
3) เครื่อง HPLC	(Shimadzu, Japan)
4) เครื่อง Sonicator	(Vibra Cell, USA)
5) เครื่อง Nanoparticlesize	(Micromeritics, USA)
6) ชุดทดสอบ Franz Diffusion Cells	(Perm Gear, Inc.USA)

3.4 วิธีการศึกษาวิจัย

3.4.1 วิธีการเตรียมไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

ชั่งมะหาด 0.2049 กรัม ละลายใน MeOH 10 มิลลิลิตร เติม Ammonium Formate 0.1800 กรัม และ Pd/C 0.0109 กรัม นำมา Reflux จนกว่าสารจะมีลักษณะใสและตกตะกอนสีดำ และนำมาแยกด้วย Column Chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Dichloromethane : Methanol 9:1 นำมา Spot TLC ตรวจสอบด้วยเครื่อง UV และนำมาละเหยด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และทำการส่งตรวจ NMR และ IR

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.4.2 การเตรียมสูตรตำรับพื้น

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสูตรตำรับพื้นประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) Tween 20, Tween 80, Span 20, Span 80 และสารลดแรงตึงผิวร่วม (Co-Surfactant) Propylene Glycol, Ethanol ผสมกับน้ำมันหอมระเหย Cinnamon Oil, Grape Oil, Peppermint Oil และ น้ำในอัตราส่วนตามเฟสไดอะแกรม โดยจะเตรียมทั้งหมด 36 อัตราส่วนในแต่ละชนิดของสารลดแรงตึงผิวและน้ำมันหอมระเหย โดยการนำส่วนประกอบทั้งหมด (สารลดแรงตึงผิว น้ำมันหอมระเหยและน้ำ) มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer เพื่อดูลักษณะทางกายภาพเบื้องต้น หลังจากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องโซนิคเคท เพื่อลดขนาดให้เล็กลงมากยิ่งขึ้น จากนั้นทำการแยกประเภทของอิมัลชันโดยการสังเกตจากลักษณะทางกายภาพของแต่ละอัตราส่วนแล้วนำมา Plot ลงใน Ternary

Phase Diagram และเลือกอัตราส่วนที่มีลักษณะเป็นนาโนอิมัลชันซึ่งจะมีลักษณะที่โปร่งแสง และมีเสถียรภาพทางกายภาพเมื่อตั้งทิ้งไว้สักครู่หนึ่งนำไปวัดขนาดอนุภาค และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีตาด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนและความต่างศักย์ไฟฟ้าซีตา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งตัวอย่างจะถูกเจือจางด้วย Water HPLC 25 เท่า และนำมาใส่ใน Cuvette เพื่อทำการประมวลผลขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซึ่งค่าของตัวอย่างที่เลือกมีขนาดเล็กที่สุดในเฟสนี้

3.4.3 การเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลลงในสูตรตำรับ

หลังจากเลือกอัตราส่วนที่เป็นนาโนอิมัลชันได้แล้ว นำอัตราส่วนนั้นมาเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล (2%) ลงไป และนำไปปั่นด้วยเครื่องโซนิคเคทหลังจากนั้นนำไปวัดขนาดอนุภาค (Particle) และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนและแตกต่างศักย์ไฟฟ้าซีตา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งตัวอย่างจะถูกเจือจางด้วย Water HPLC 25 เท่า และนำมาใส่ใน Cuvette เพื่อทำการประมวลผลขนาดอนุภาคและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าอีกครั้ง จากนั้นส่งตัวอย่างไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope ; SEM) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (Nanotec) เพื่อดูลักษณะของนาโนอิมัลชันควรลักษณะการฟอร์มตัวที่เป็นทรงกลม

3.5 การทดสอบการซึมผ่านวิธี Franz Diffusion Cells

3.5.1 การเตรียม Phosphate Buffer (PBS) pH7.4

ทำการชั่งสาร KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogenphosphate)ปริมาณ 8.709 กรัม และ K_2HPO_4 (Dipotassium Phosphate) ปริมาณ 6.804 กรัม ลงในบีกเกอร์เทน้ำ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ทั้งสองบีกเกอร์ คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวจากนั้นเทสารละลาย KH_2PO_4 ให้เหลือ 40.1 มิลลิลิตร และ K_2HPO_4 ให้เหลือ 9.9 มิลลิลิตร ตวงน้ำ 500 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์แล้วเทสารละลายทั้งสองบีกเกอร์ลงไปผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเทสารละลายทั้งหมดลงในบีกเกอร์แล้วใส่แผ่น Membrane (Cellulose Membrane) ลงไปในบีกเกอร์ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟลอยด์ จากนั้นทำการเก็บทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นให้เติม Tween20 ลงไปในบีกเกอร์ 2% คนให้ทั่วเพื่อดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.5.2 การเตรียมเครื่อง Franz Diffusion Cell

เตรียมเครื่อง Franz Diffusion Cell ด้วยการเติมน้ำน้ำลงระบบหมุนเวียนน้ำเปิดเครื่องปั๊มน้ำหมุนเวียน (Water Reciculating Pump) ประมาณ 30 นาที เพื่อทำให้น้ำมีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ±1 องศาเซลเซียส และขจัดฟองอากาศออกจาก Jacket และ Saving Media จากนั้นใส่ Magnetic Bar ใน Jacket แล้วเปิดเครื่อง Magnetic Stirrer ให้ Magnetic Bar หมุนของเหลวภายใน Receptor Chamber ด้วยความเร็ว 770 รอบต่อนาที นำ Membrane ที่เตรียมไว้มาประกบกันระหว่าง Donor Chamber และ Receptor Chamber ผนึกด้วย Paraffin Tape และรัดด้วย Pinch Clamp จากนั้นเติม PBS pH7.4 ลงใน Receiving Chamber โดยใช้ Syringe แบบเข็มยาวจนได้รับระดับเดียวกับ Membrane และเติมตัวอย่างสูตรตำรับนาโนอิมัลชันของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลลงไปในส่วนของ Donor Chamber เพื่อที่จะทำให้ส่วนของ Membrane นั้นได้สัมผัสกับ pH7.4 และตัวอย่างสูตรตำรับนาโนอิมัลชันของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลได้อย่างต่อเนื่องและด้วยการไหลเวียนของ PBS pH 7.4 ใน Receptor Chamber ที่ถูกรักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ± 1 องศาเซลเซียส นั้นจะถูกหมุนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่อง Magnetic Stirrer หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในปริมาณ 5 มิลลิลิตร ซึ่งในการเก็บตัวอย่างจะมีการเติม PBS pH 7.4 เข้าไปเพื่อแทนที่ตัวอย่างที่ถูกเก็บออกมาในปริมาณที่เท่ากันโดยจะทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป

3.6 การวิเคราะห์เอช พี แอล ซี (HPLC:High Performance Liquid Chromatography)

Column : Luna C18 (5µm,4.6mm ID x15cm)

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

Flow-Rate : 0.80 mL/min

Detector : 254 nm

Injection Volume : 20 µm

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.6.1 การเตรียม Standard Stock Solution

โดยชั่งสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 3.0 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Volumetric Flask 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จึงจะได้สารมาตรฐานเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.6.2 การวิเคราะห์ Linearity

Linearity of Method เตรียมสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล จำนวน 7 ความเข้มข้นโดยนำ Standard Stock Solution 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Pipette ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol นำมากรองผ่าน Membrane Filter 0.20 ไมโครเมตร และทำการฉีด 20 ไมโครลิตรความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นทำการ Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับ Peak Area ที่ได้ หลังจากนั้นคำนวณหาค่า Correlation Coefficient , r^2 โดยที่ค่า r^2 จะต้องอยู่ในช่วง 0.9995-0.999

3.6.3 การวิเคราะห์ Injection Precision

Intraday Precision คือ ทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้งในช่วงเวลาเดียวกัน โดยผู้ทำการทดลองและสภาวะการทดลองรวมทั้งห้องปฏิบัติการเดียวกันทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล จำนวน 1 ความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้น 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง) %RSD ของ Peak Area ที่ได้นั้นจะต้องไม่เกินร้อยละ 2

Interday Precision คือ ทำการทดลองซ้ำแต่ต่างกันวัน 2 วัน โดยการเตรียม Mobile Phase ใหม่และเครื่องมือในการทดลองใหม่ ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลจำนวน 1 ความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้น 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง) %RSD ของ Peak Area ของทั้ง 2 วันที่ได้นั้นจะต้องไม่เกินร้อยละ 2

3.6.4 การวิเคราะห์ Accuracy

การเตรียมตัวอย่างนาโนอิมัลชันชั่งนาโนอิมัลชัน 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในVolumetric Flask 10 มิลลิลิตร และ Pipette Stock Standard ปริมาตร 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร ตามลงไปในทุก Volumetric Flask ปรับปริมาตรด้วย Methanol จากนั้นกรองผ่าน Membrane Filter ขนาด 0.2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ไมโครกรัม และทำการฉีด 20 ไมโครกรัม ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณค่า % Recovery จะต้องอยู่ในช่วง ร้อยละ 98 ถึง 102

3.6.5 วิเคราะห์ Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantiation (LOQ)

1) Limit of Detection (LOD) คือ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ที่ S/N= 3:1

2) Limit of Quantiation (LOQ) คือ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ที่ S/N= 10:1

การเตรียมทำได้โดยนำ Standard Stock Solution 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Pipette ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol แล้ว Pipette ออกมาในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร อันใหม่ จากนั้นปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้ Dilute Standard Stock Solution นำมากรองผ่าน Membrane Filter 0.20 ไมโครเมตร ทำการฉีดและดูผลของ LOD หากยังไม่ได้ ให้เจือจางต่อไปจนได้ค่าความเข้มข้นของ LOD และ LOQ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

ชั่งออกซีเรสเวอราทรอล 0.2000 กรัม ใส่ลงในภาชนะก้นกลม และเติมเมทานอล 10 มล. ละลายสารให้หมด จากนั้นเติม Pd/C จำนวน 0.0109 กรัม และ Ammonium Formate จำนวน 0.1800 กรัม นำสารทั้งหมดไปให้ความร้อนโดยทำการ Reflux เป็นเวลา 30 นาที และติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นนำไประเหยเมทานอลออกโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วนำสารที่เหลือมาแยกโดยใช้วิธี Column Chromatography ได้สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0936 กรัม คิดเป็น 46.80 % yield. ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 2.52 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 5.98 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.10 (dd, *J* = 2.4, 8.1 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* 2.3 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 31.15, 36.21, 100.20, 102.60, 106.07, 106.55, 106.55, 118.64, 130.08, 144.486, 155.81, 156.36, 158.24, 158.24. LC-MS [M^+] = 246.0977

4.2 การพัฒนาสูตรตำรับพื้นที่เหมาะสมในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

โดยการเตรียมสูตรตำรับพื้นจะประกอบด้วยอัตราส่วนของ (Oil : Surfactant : H_2O) ซึ่งมี 12 สูตร สูตรละ 36 อัตราส่วนตามเฟสไดอะแกรมซึ่งมีน้ำหอมระเหย 3 ชนิด คือ Peppermint Oil, Grape Oil, Cinnamon Oil ที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Tween 20, Tween 80, Span 20, Span 80 และน้ำ และมีในบางอัตราส่วนที่เพิ่มสารลดแรงตึงผิวร่วม Propylene Glycal, Ethanol, โดยผู้วิจัยจะพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพต่างๆ เช่น การกระเจิงแสง การไหล การตกตะกอนดังตารางต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพตำรับพื้นนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil กับ Tween 80

อัตราส่วนผสมนาโนอิมัลชัน			ลักษณะทางกายภาพ			
Oil (Pm)	Surfactant (Tween80)	H_2O	การกระเจิงแสง	การไหล	การตกตะกอน	การแยกชั้น
0.6	0.1	0.3	ขุ่น	หนืด	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.6	0.3	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.5	0.4	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.3	0.4	0.3	ขุ่น	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.3	0.5	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.3	0.6	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.2	0.3	0.5	ขุ่น	หนืด	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.2	0.5	0.3	ขุ่นเล็กน้อย	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.2	0.6	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.2	0.7	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.1	0.5	0.4	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.1	0.6	0.3	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.1	0.7	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.1	0.8	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่แยกชั้น

** Pm หมายถึง Peppermint

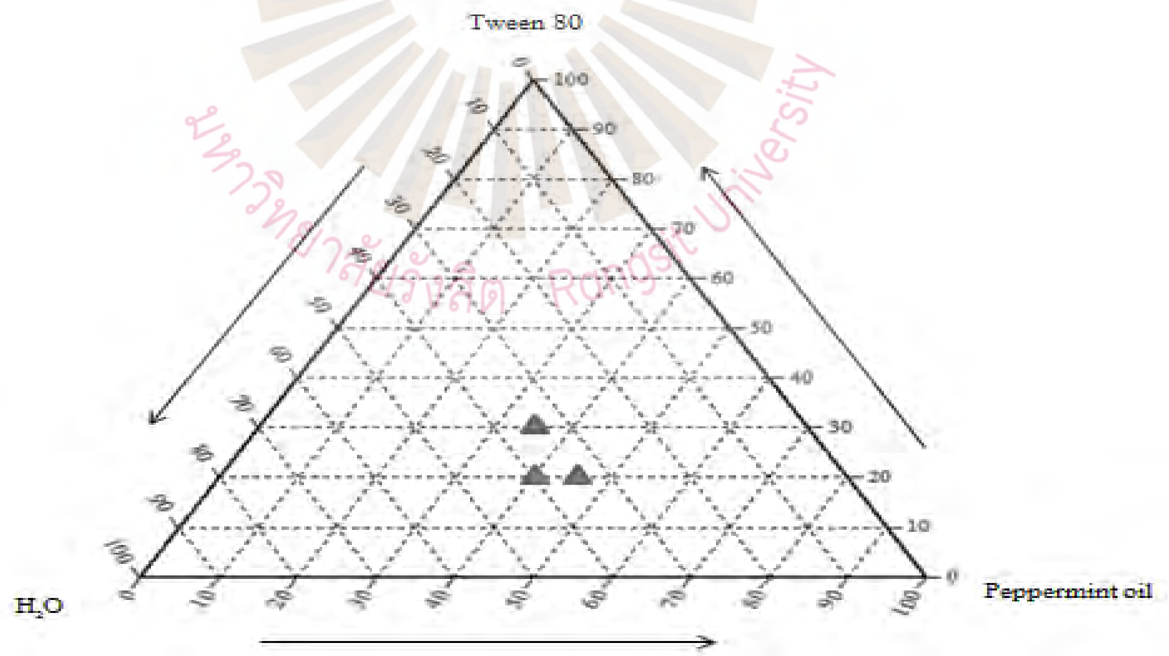
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากตารางที่ 4.1 แสดงถึง อัตราส่วนของ Peppermint : Tween80 : H_2O ที่ได้ทำการตามผสมตามอัตราส่วนของเฟสไดอะแกรม ปั่นผสมอัตราส่วนทุกอย่างเข้ากันด้วย Vortex Mixer ซึ่งอัตราส่วนที่แสดงในตารางคืออัตราส่วนที่ไม่เกิดการแยกชั้น โดยการกระเจิงแสงที่มีลักษณะขุ่นเป็นอิมัลชัน และการกระเจิงแสงที่มีลักษณะใสเป็นไมโครอิมัลชัน ในอัตราส่วนที่แยกชั้นจะไม่ถูกกล่าวถึงในตารางดังกล่าว

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของบริเวณระบบที่เกิดนาโนอิมัลชัน

สูตรตำรับนาโนอิมัลชัน	การกระเจิงแสง	การไหล	การแยกชั้น
Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	โปร่งแสง	ดี	ไม่แยกชั้น
Peppermint oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	โปร่งแสง	ดี	ไม่แยกชั้น
Peppermint oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)	โปร่งแสง	ดี	ไม่แยกชั้น
Peppermint oil : Tween80 : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)	โปร่งแสง	ดี	ไม่แยกชั้น
Peppermint oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)	โปร่งแสง	ดี	ไม่แยกชั้น

** Tw80P หมายถึง Tween80 ผสมกับ Propylene Glycol 0.05 กรัม



รูปที่ 4.1 Ternary Phase Diagram แสดงพื้นที่อัตราส่วนที่เกิดนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45), Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35), Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)

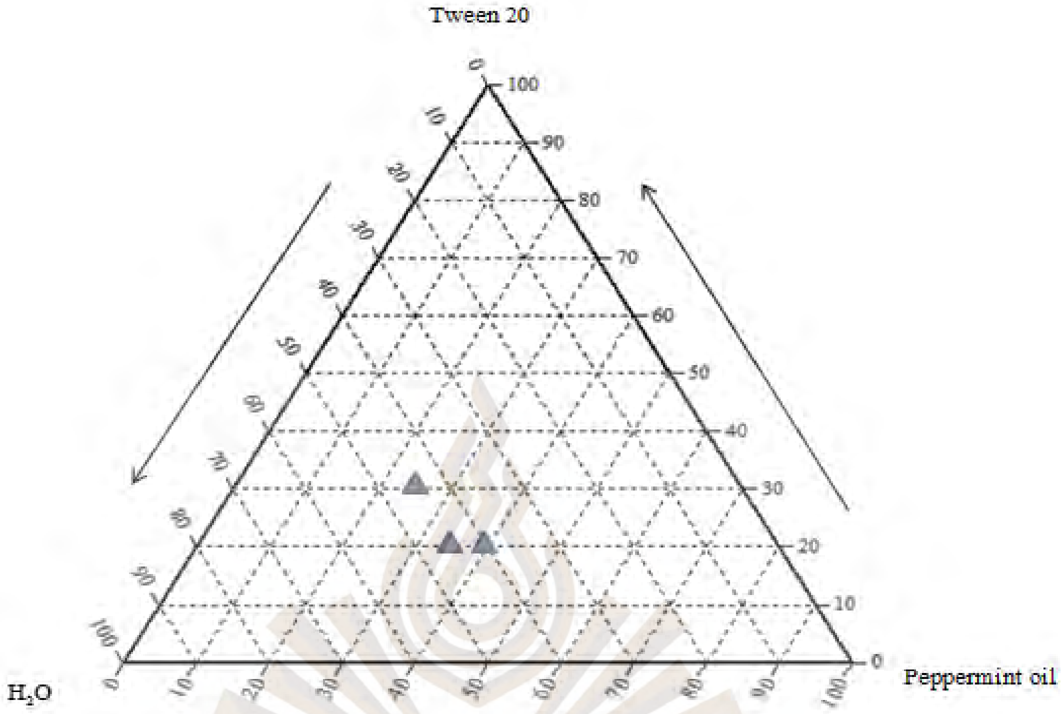
ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพตำรับพื้นนาโนอิมัลชันของ Peppermint oil กับ Tween 20

Oil (Pm)	Surfactant (Tween20)	H_2O	การกระเจิงแสง	การไหล	การตกตะกอน	การแยกชั้น
0.5	0.4	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.4	0.5	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.3	0.5	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.3	0.6	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.2	0.5	0.3	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.2	0.6	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.2	0.7	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.3	0.6	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.4	0.5	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.5	0.4	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.6	0.3	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.7	0.2	ใส	ดี	ไม่	ไม่
0.1	0.8	0.1	ใส	ดี	ไม่	ไม่

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราส่วนและลักษณะทางกายภาพของบริเวณที่เกิดระบบนาโนอิมัลชัน

อัตราส่วนผสมนาโนอิมัลชัน			ลักษณะทางกายภาพ		
Oil (Pm)	Surfactant (Tween20)	H_2O	การกระเจิงแสง	การไหล	การแยกชั้น
0.2	0.4	0.4	โปร่งแสง	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.2	0.45	0.35	โปร่งแสง	ไม่	ไม่แยกชั้น
0.3	0.45	0.25	โปร่งแสง	ไม่	ไม่แยกชั้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.2 Ternary Phase Diagram แสดงพื้นที่อัตราส่วนที่เกิดนาโนอิมัลชันของ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4), (0.2 : 0.45 : 0.35), (0.3 : 0.45 : 0.25)

จากการศึกษาสูตรตำรับพื้นนาโนอิมัลชัน โดยอัตราส่วนที่มีความเหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยกับสารลดแรงตึงผิวรวมถึงสารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำ มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชันได้และสามารถทำให้มีขนาดอนุภาคที่เล็กลงโดยอาศัยหลักการปั่นด้วยแรงเฉือนขนาดสูงหรือการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูงซึ่งจะทำให้การไหลของอิมัลชันสม่ำเสมอจึงทำให้สามารถสร้างเป็นหยดอนุภาคขนาดเล็กที่สุดได้ พบว่า ตำรับสูตรมีอัตราส่วนที่เหมาะสมและมีลักษณะทางกายภาพที่คงตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ คือ

Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)

Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.3 : 0.45 : 0.25)

4.3 การวัดขนาดอนุภาค การหาค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา และการตรวจสอบสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 4.5 แสดงขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคของสูตรตำรับพื้นในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

อัตราส่วนผสมนาโนอิมัลชัน	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีตา (mV)	ดัชนีการกระจาย (PDI)
Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	66.94±26.33	-16.90±1.25	0.147 ±0.031
Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	453.64±13.96	-0.73±1.67	0.3006±0.004
Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)	119.30±4.80	-13.15±1.14	0.2626±0.032
Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)	159.94±2.85	-19.29±0.42	0.218±0.071
Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)	171.26±11.23	-2.14±0.61	0.0223±0.003

ตารางที่ 4.6 แสดงขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคของสูตรตำรับพื้นในรูปแบบนาโนอิมัลชัน

อัตราส่วนผสมนาโนอิมัลชัน			ลักษณะทางกายภาพ		
Oil (Pm)	Surfactant (Tween20)	H_2O	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีตา (mV)	ดัชนีการกระจาย (PDI)
0.2	0.4	0.4	163.96±3.87	-12.68±1.29	0.222±0.003
0.2	0.45	0.35	156.02± 0.78	-4.61±0.25	0.186±0.007
0.3	0.45	0.25	156.34±1.35	-5.21±1.32	0.172±0.046

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากตารางที่ 4.5 และตารางที่ 4.6 พบว่าในตำรับสูตรทั้ง 8 ตำรับ มีขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถเลือกบางสูตรตำรับเพื่อนำไปเพิ่มสารไดออกซีเรสเวอราทรอลลงในตำรับ คือ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45), Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) และ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.3 : 0.45 : 0.25) ขนาดอนุภาค 66.94±26.33, 156.02± 0.78 และ 156.34±1.35 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา -16.90±1.25, 4.61±0.25 และ 0.172±0.046 ดัชนีการกระจายตัว 0.147±0.031, 0.186±0.007 และ 0.172±0.046 ตามลำดับ

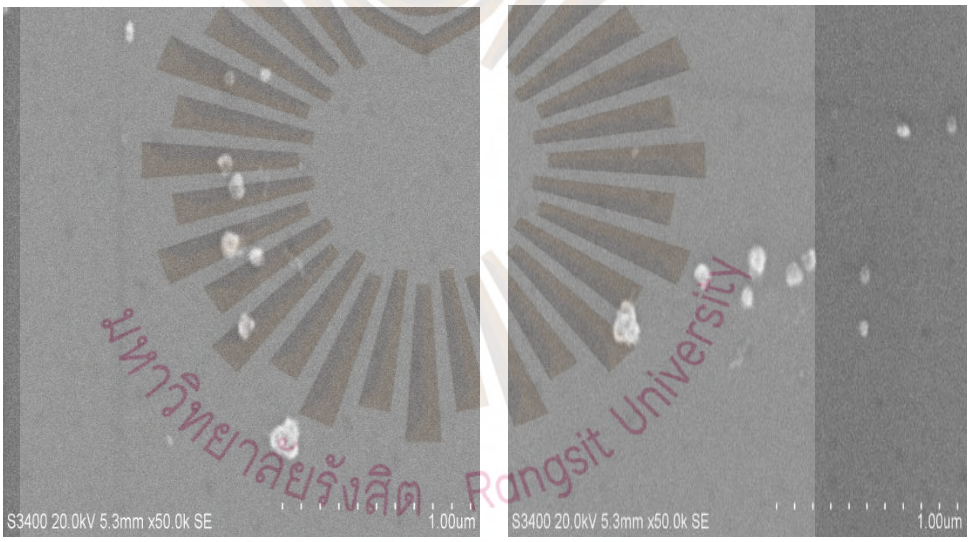
ตารางที่ 4.7 แสดงลักษณะทางกายภาพขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายของตำรับนาโนอิมัลชันเมื่อเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม

สูตรตำรับนาโนอิมัลชัน	การกระเจิงแสง	ขนาดอนุภาค(nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีตา(mV)	ดัชนีการกระจาย (PDI)
Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	โปร่งแสง	28.88±0.88	-13.82±0.60	0.203±0.0217
Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35)	โปร่งแสง	154.32±0.59	-4.93±1.31	0.233±0.0052

ตารางที่ 4.8 แสดงลักษณะทางกายภาพขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาและดัชนีการกระจายของตำรับนาโนอิมัลชันเมื่อเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม เมื่อทิ้งไว้ 1 เดือน

สูตรตำรับนาโนอิมัลชัน	การกระเจิงแสง	ขนาดอนุภาค(nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีตา(mV)	ดัชนีการกระจาย (PDI)
Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)	โปร่งแสง	48.58±6.72	-0.73±1.16	0.181±0.0523

จากตารางที่ 4.7 สูตรตำรับพื้นที่เติมสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม อัตราส่วนของ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.3 : 0.45 : 0.25) เกิดการแยกชั้นและ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่น้อยและดัชนีการกระจายตัวสูง ซึ่งจากทั้ง 2 ตำรับสูตรจึงเลือกสูตรตำรับที่ดีที่สุดคือ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) มีขนาดอนุภาค 28.88±0.88 นาโนเมตร ศักย์ไฟฟ้าซีตา -13.82±0.60 มิลลิโวลต์ และดัชนีการกระจายตัว 0.203±0.0217 และตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 เดือน อัตราส่วนของ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) วัดขนาดอนุภาคเท่ากับ 48.58±6.72 นาโนเมตร ซึ่งขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อยและยังอยู่ในเกณฑ์ 20-200 นาโนเมตร ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า -0.73±1.16 มิลลิโวลต์ เมื่อส่งตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้อง SEM (Scanning Eletron Microscopy) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ พบว่า มีลักษณะเป็นถุงทรงกลม ดังรูปที่ 4.3 ในขณะที่อัตราส่วนของ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) มีขนาดอนุภาคที่เล็กลงจากเดิมและเกิดการแยกชั้น



รูปที่ 4.3 แสดงถึงลักษณะโครงสร้างอัตราส่วน Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (Scanning Electron Microscope; SEM)

4.4 การทดสอบการซึมผ่านของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลที่อยู่ในนาโนอิมัลชัน

การคำนวณการซึมผ่านของสูตรตำรับ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) โดยการคำนวณหาค่าปริมาณสารซึมผ่านผิวหนังต่อเวลา และค่าพื้นที่ตัดขวางของผิวหนังที่

สารซึมผ่านคือ 1.767 ซึ่งผลการคำนวณ พบว่า สูตรตำรับ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) มีค่าการซึมผ่านผิวหนัง (Flux) เท่ากับ 312.9

โดย สูตรคำนวณ

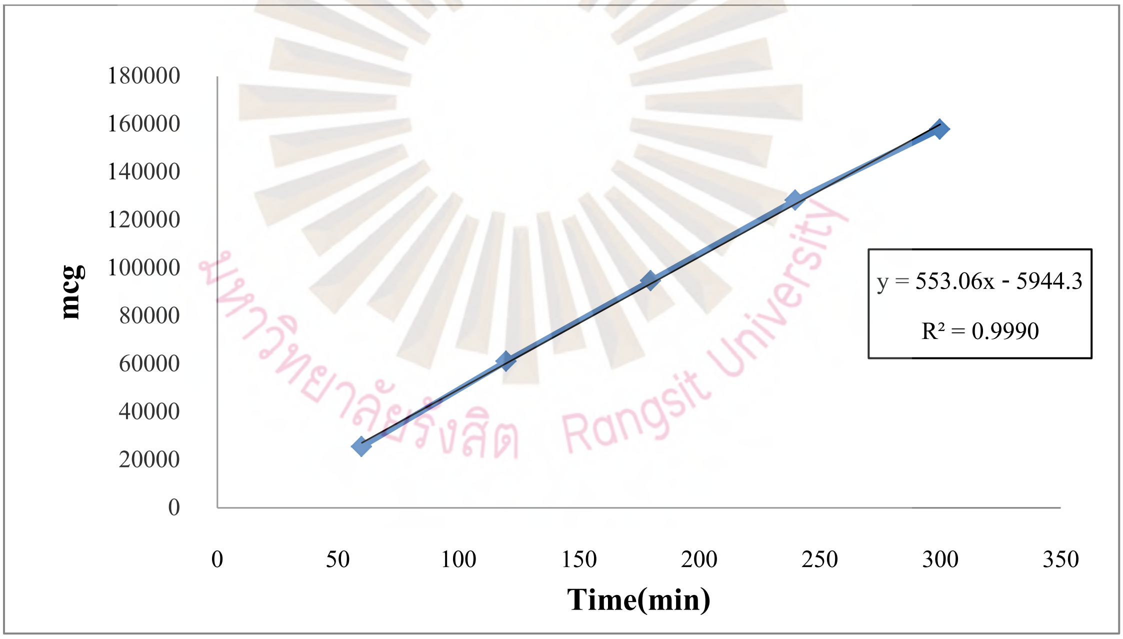
Flux (J) = Q/A * t

เมื่อ Q/t = Slope

A = Area

ดังนั้น Flux (J) ของ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) = 553.06/1.767

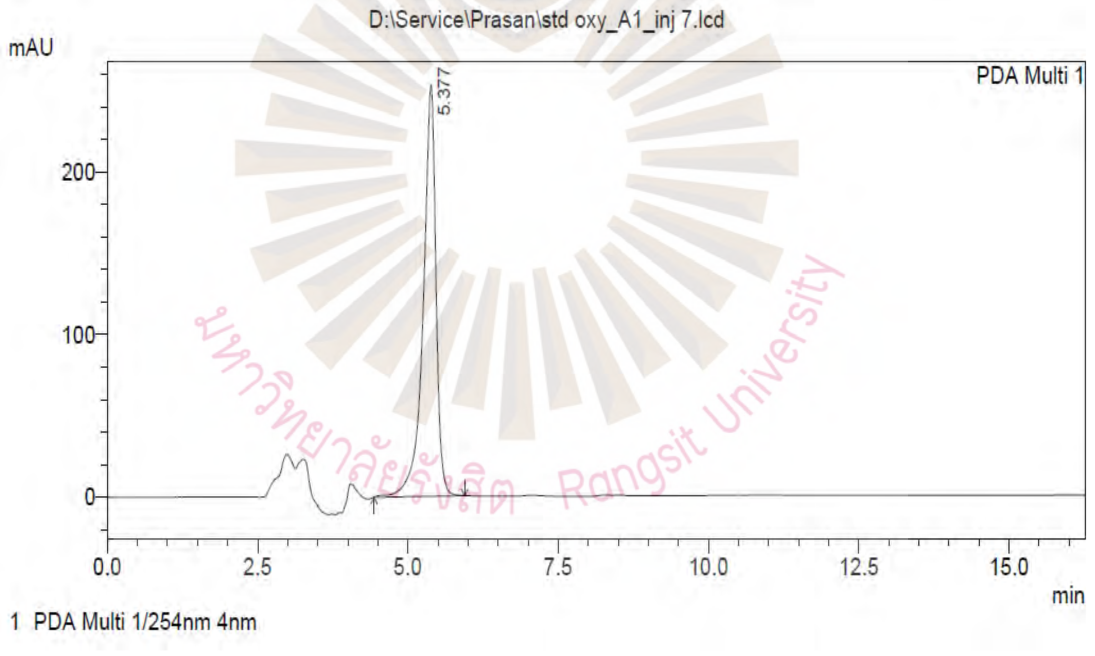
= 312.9 ไมโครกรัม/นาที.ซม^2



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณการสะสมของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล ที่สามารถซึมผ่านทางผิวหนังของสูตรตำรับ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)

4.5 การวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลโดยวิธี HPLC

ผลการวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนาโนอิมัลชันด้วยเครื่อง HPLC พบว่า การวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในสภาวะที่เหมาะสมโดยมี Mobile Phase คือ ร้อยละ 1 % v/v ของ Acetic Acid ในน้ำและAcetonenitrile ซึ่งใช้ระบบ Gradient System โดยมีอัตราส่วน 80:20, 40:60, 100:0 ที่เวลา 0, 15, 20 โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารละลายเท่ากับ 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ที่ใช้ คือ ACE 5 C18 (159×4.6mm id) และตรวจวัด UV-VIS Detector ที่ความยาวเคลื่อนแสง 254 นาโนเมตร ใช้ปริมาตรในการฉีดเท่ากับ 20 ไมโครเมตร สามารถวิเคราะห์สารมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล โดยมีค่า Retention Time เท่ากับ 5.377 นาที



รูปที่ 4.5 แสดง HPLC Chromatogram ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

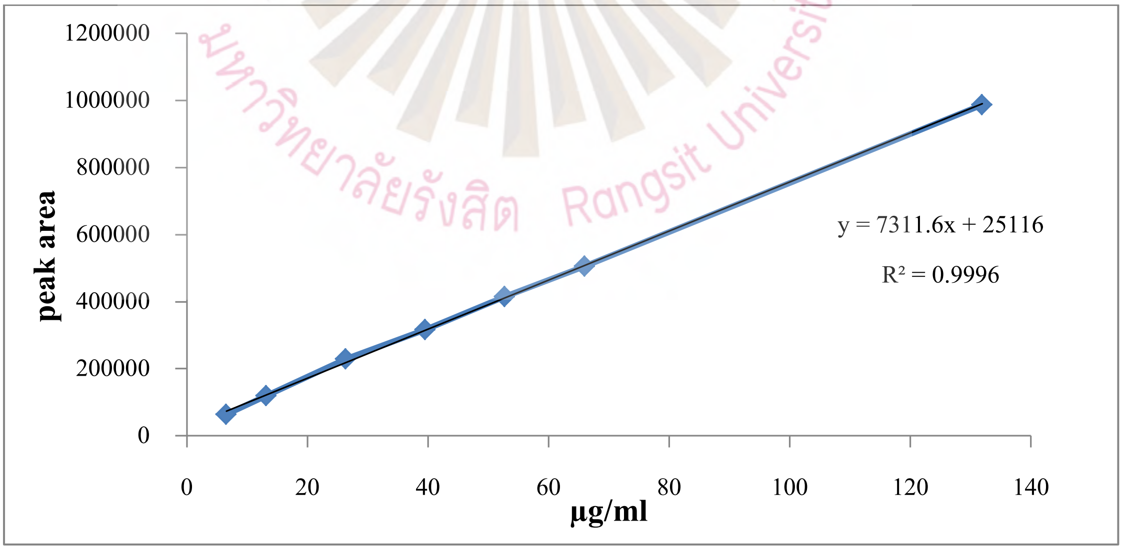
4.5.1 Linearity of Method

เป็นการฉีดสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 7 ความเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นได้แก่ 6.6, 13.2, 26.4, 39.6, 52.8, 66, 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เครื่องมือ

สภาพแวดล้อมในวันเดียวกันโดยนำ Standard Stock Solution Dihydrooxyresveratrol ปิเปตลงใน Volunmetric Flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol ทำการฉีดครั้งละ 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล ตั้งแต่ 6.6-132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Peak Area ครั้งที่ 1	Peak Area ครั้งที่ 2	Peak Area ครั้งที่ 3	Average
6.6	64094	63578	64982	64218
13.2	120398	119287	117282	118989
26.4	223230	232450	230774	228818
39.6	309180	319141	321035	316452
52.8	417740	419515	417340	414865
66	504663	502376	510358	505799
132	972341	996535	994410	987762



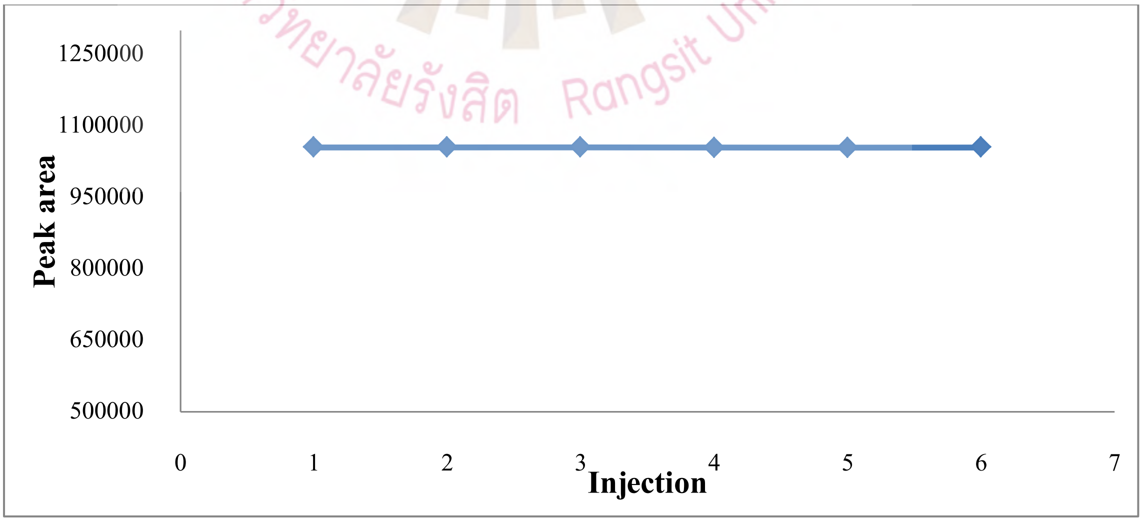
รูปที่ 4.6 แสดง Calibration Curve ของสารไดออกซีเรสเวอราทรอลที่เข้มข้นตั้งแต่ 6.6 ถึง 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.2 การศึกษาความแม่นยำของวิเคราะห์ (Precision)

Intraday Precision เป็นการวิเคราะห์สารมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำในช่วงเวลาเดียวกันโดยฉีดซ้ำจำนวน 6 ครั้ง

ตารางที่ 4.10 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ ไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลแบบ Intraday Precision จำนวน 6ครั้ง

Injection	**Peak Area**
1	1054453
2	1054586
3	1054643
4	1054345
5	1054124
6	1054378
Average	1055288
SD	1578.195
%RSD	0.15



รูป 4.7 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลแบบ Intraday Precision

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

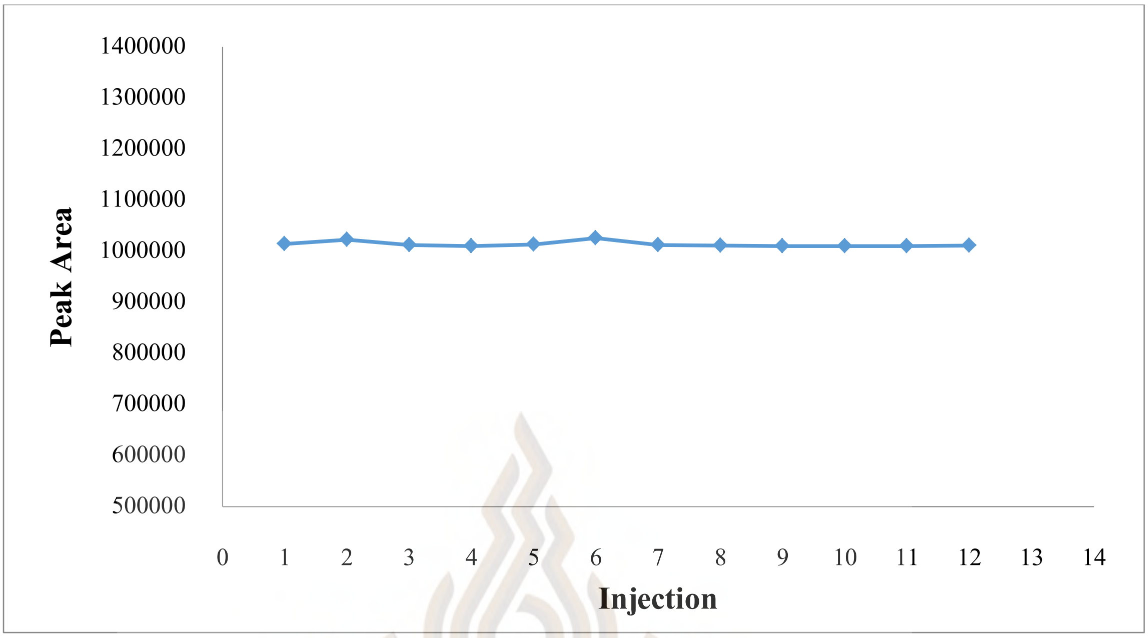
Interday Precision

เป็นการทดลองซ้ำแต่ต่างกัน 2 วัน โดยการเตรียม Mobile Phase ใหม่และเครื่องมือในการทดลองใหม่ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล คือ ที่ความเข้มข้น 132 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง) %RSD ของ Peak Area ของทั้ง 2 วันที่ได้นั้นจะต้องไม่เกินร้อยละ 2

ตารางที่ 4.11 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ไดออกซีเรสเวอราทรอล แบบ Interday Precision จำนวน 12 ครั้ง

Injection	**Peak Area (Day1-Day2)**
1	1031482
2	1032554
3	1031570
4	1032531
5	1031946
6	1033435
7	1010890
8	1010721
9	1009938
10	1009824
11	1009986
12	1010975
Average	1013366
SD	5180.53
%RSD	0.51

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล แบบ Interday Precision

4.5.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ตารางที่ 4.12 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ Accuracy

ความเข้มข้น	เติม (Add)	วิเคราะห์พบ(Found, µg)	% Recovery
ความเข้มข้นต่ำ (Low)	13.2	12.83	97.19
ความเข้มข้นกลาง (Middle)	26.4	27.86	105.5
ความเข้มข้นสูง (High)	39.6	39.84	100.60
เฉลี่ย			101±4.18

การคำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืน(%Recovery) พบว่า มีค่า% Recover %Recovery อยู่ในช่วง 97.19 ถึง 105.5 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืน คือ 101±4.18

4.5.4 การศึกษา Low Limit of Detection (LOD) และ Low Limit of Quantitation (LOQ)

คือการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ เตรียมโดยการนำ Standard Stock Solution Dihydrooxyresveratrol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในVolumetric Flask 50 มิลลิลิตร อันใหม่แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้ Dilute Standard Stock Solution Dihydrooxyresvera trol และทำการฉีด 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการศึกษา LOD และ LOQ

LOD	0.33
LOQ	0.99

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปการวิจัย

จากการพัฒนาสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลในรูปแบบนนาโนอิมัลชัน โดยการสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล จากปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันเมื่อทำการวิเคราะห์ได้สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0936 กรัม คิดเป็น 46.80 % จากสารสกัดมะหาด 0.2000 กรัม ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปคโตรสโคปี (Spectroscopy)

ในการเตรียมตำรับพื้นนาโนอิมัลชันต้องมีอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำมันหอมละเหยกับสารลดแรงตึงผิวรวมถึงสารลดแรงตึงร่วมและน้ำ มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชันได้และสามารถทำให้ขนาดเล็กลงได้โดยอาศัยหลักการปั่นด้วยแรงเฉือนขนาดสูงหรือการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวด้วยความดันสูงจะทำให้การไหลของอิมัลชันสม่ำเสมอ จึงทำให้สามารถสร้างเป็นหยดอนุภาคเล็กที่สุดได้ โดยจากการศึกษา 12 สูตร ตามอัตราส่วนของเฟสไดอะแกรมซึ่งนาโนอิมัลชันควรมีขนาด 20-200 นาโนเมตร และมีความคงตัวของลักษณะทางกายภาพที่โปร่งแสงไม่แยกชั้นซึ่งมี 8 อัตราส่วน คือ

Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)

Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.3 : 0.35 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween80 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.4 : 0.4)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35)

Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.3 : 0.45 : 0.25)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดยทั้ง 8 อัตราส่วนมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 28.88 ถึง 156.34 นาโนเมตร ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) อยู่ในช่วง 0.02-0.26 และศักย์ไฟฟ้าซีตา -0.73 ถึง -19.29 มิลลิโวลต์

นำสูตรตำรับพื้นนาโนที่ได้มาเพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 0.0020 กรัม พบว่า มีเพียง 2 สูตรตำรับที่มีความคงตัวดีแม้เพิ่มสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลลงไป คือ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) และ Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) โดยมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 28.88±0.88 และ 154.32±0.59 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา -13.82±0.60 และ -4.93±1.31 มิลลิโวลต์ มีดัชนีการกระจายตัว (PI) 0.203±0.0217 และ 0.233±0.0052 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า Peppermint Oil : Tween20 : H_2O (0.2 : 0.45 : 0.35) เกิดการแยกชั้นไม่คงตัว ในขณะที่ Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) มีความคงตัวดีไม่เกิดการแยกชั้น วัดขนาดอนุภาคหลังครบ 1 เดือน พบว่า มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นเล็กน้อย 48.58±6.72 นาโนเมตร ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า 0.73±1.16 มิลลิโวลต์ ซึ่งภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope ; SEM) ของอัตราส่วนนี้มีลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นถุงทรงกลม จึงเลือก Peppermint Oil : Tw80P : H_2O (0.2 : 0.35 : 0.45) เพื่อนำมาทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วยวิธี Franz Duffusion Cells เพื่อวิเคราะห์การปลดปล่อยของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล ซึ่งพบว่า ค่า Flux ของการปลดปล่อยเท่ากับ 312.9 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร.นาที

จากการวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล ด้วยวิธี HPLC โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Luna C18 (5µm,4.6mm ID x15cm) อัตราการเคลื่อนตัวของสารละลาย 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ระบบ Isocratic 1% Acetic Acid ในน้ำ และ Acetonitrile เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งระบบ 10 นาที สามารถวิเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล เป็นการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยของ Peak Area ที่มีความเข้มข้นของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล 7 ความเข้มข้น คือ 6.6-132 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณสารที่ปลดปล่อย และนำมาวิเคราะห์การทดสอบความถูกต้องของวิธี และวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่า Calibration Curve ของสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak Area กับ ความเข้มข้นสาร (r^2) เท่ากับ 0.9996 สมการ คือ 7311.6x + 25116 โดยมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 6.6-132 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล โดยวิธี HPLC พบว่า ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) ค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืน

(%Recovery) คือ 101 ± 4.18 ความแม่นยำภายในวัน (Intraday Precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 0.15 ความแม่นยำระหว่างวัน (Interday Precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 0.51 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบสาร (LOD) เท่ากับ 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ปริมาณสารได้ (LOQ) 0.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้สามารถทำการตรวจวัดความหนืด, วัดค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น และยังสามารถนำสารสำคัญชนิดอื่นเพิ่มลงในตำรับนาโนอิมัลชันเพื่อให้ตรงกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งสามารถพัฒนาต่อทั้งในรูปแบบของเครื่องสำอางและยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาธุรกิจการค้า. (2559). *ผลิตเครื่องสำอางข้อมูลธุรกิจ*. สืบค้นจาก https:// www.dbd.go.th/download/document_file/Statisic/2559/T26/T26_201603.pdf

กองควบคุมยาและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.(2549). Validation and Verification of Analytical Procedure For Impurity.*วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม*, *22*(2), 19-22

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. (2551). *มะหาด* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกสร พะลัง และ สุนัน ชัยกุล. (2549).*อินทรีย์เคมี* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คมกริช หาสิตะพันธุ์. (2560).ปฏิกิริยาเคมีพื้นฐานที่สร้างมูลค่าให้สมุนไพร. *วารสารเพื่อการวิจัยและการพัฒนาองค์การเภสัชกรรม*, *24*(2), 5-7. สืบค้นจาก https://www.gpo.or.th/Portals/Newsletter/RDINewsYr24No2-2.pdf

จุฑามาศ เจียรนัยกุลวานิช. (2559). *จริงหรือไม่มะหาดทำให้ขาวขึ้นได้*. สืบค้นจากhttp://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0113

นฤมล บุญชม. (2556). *ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารออกซิเรสเวอราทรอล และเรสเวอราทรอลของมะหาด*. สืบค้นจาก http://newtdc.thailis.or.th/docview.aspx?tdcid=390280

ปิ่นมณี พูนสุข. (2559). การพัฒนาตำรับโลชันทาตัวที่เตรียมจากปวกหาด. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, *11*(1), 61-69. สืบค้นจากhttps://tcithaiijo.org/index.php/IJPS/article/download/48622/40403

พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ. (2558). ปริมาณออกซิเรสเวอราทรอลและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแก่นมะหาด. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *34*(6), 547-550.

พรเพรช แก้วอ่อน. (2550). *การศึกษาพฤติกรรมและปัจจัยในการเลือกซื้อเครื่องสำอางเพื่อบำรุงผิวสำหรับผู้ชายในเขตกรุงเทพมหานคร*(Master's Thesis). สืบค้นจาก http://newtdc.thailis.or.th

พิชยา อุโฆษอารามิก. (2557). *การพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดโกฐเชียง*(Master's Thesis). สืบค้นจาก http://grad2.rsu.ac.th

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

ภัสสร์พัณณ์ หลวงไผ่. (2549). *ผลในการสภาพทดลองของสารสกัดด้วยน้ำจากมะหาด (Artocarpus takoocha Roxb.) ราชพฤกษ์ (Cassia fistula Linn.) และแก้ว (Murraya paniculata Jack.) ที่มีต่อพื้นผิวพยาธิใบไม้ Haplorchis taichui* (Master's Thesis). สืบค้นจาก http://cmuir.cmu.ac.th

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีคณะเภสัชศาสตร์. (2556). *มะหาด*. สืบค้นจาก http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=187

มหาวิทยาลัยมหิดลสำนักงานข้อมูลสมุนไพร. (2557). *Artocarpus lacucha* Roxb.สืบค้นจาก http://www.medplant.mahidol.ac.th

รพีพร จันทุมา. (2556). การพัฒนาเพื่อการแข่งขันของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าจากสมุนไพร : กรณีศึกษาจังหวัดขอนแก่น. *Graduate Research Conference*, *1*(3), 1638-1664. สืบค้นจาก https://gsbooks.gs.kku.ac.th/56/grc14/files/hmp32.pdf

วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. (2555). *นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง* (พิมพ์ครั้งที่1).กรุงเทพมหานคร

วิกิพีเดีย. (2559). *โครงสร้างและเส้นทางในการซึมผ่านของผิวหนัง*.สืบค้นจาก https://en.wikipedia.org/wiki/Skin

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). *สารานุกรมสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2556). *แผ่นแปะสิวนาโน*. สืบค้นจาก http://www2.nanotec.or.th/thp=2900

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2559). *การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค Dynamic Light Scattering*. สืบค้นจาก https://www2.nanotec.or.th

สถาบันการแพทย์แผนไทย. (2556). บทความเกี่ยวกับการสมุนไพรและการปลูกสมุนไพร. สืบค้นจาก http://ittm.dtam.moph.go.th/index.php?option=com_content&view=category&id=8&Itemid=128

สถาบันวิจัยสมุนไพรกระทรวงสาธารณสุข. (2559). *สมุนไพรในชีวิตประจำวันมะหาด*. สืบค้นจาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_herbal/search_detail.php?herb_id=12

สุปรีดี สังฆรักษ์. (2559). *คู่มือการใช้ Franz diffusion cell*. สืบค้นจาก http://techno.pharmacy.psu.ac.th

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

สุรพจน์ วงศ์ใหญ่. (2541). *หลักการทั่วไปในการควบคุมคุณภาพตำรับยาและยาจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร:บุ๊คเน็ค

โสภณ เริงสำราญ. (2551). *อินทรีย์เคมี1* (พิมพ์ครั้งที่1).กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา อัครวงษ์และสมบุญ โพธิ์น้อย.(2556). *เคมีอินทรีย์เคมี1* (พิมพ์ครั้งที่1). กรุงเทพมหานคร : ศูนย์เทคโนโลยีทางการศึกษา มหาวิทยาลัยรังสิต

Chinchole, P. (2016). *Nanoemulsions formation, structure, and physical properties*. Retrieved from http://www.tlcbio.com

Choudhary, A. (2016). *HPLC Calibration Procedure.* Retrieved from https://www.pharmaguide line.com

Fichter, C. (2016). *Reading a Ternary Diagram*. Retrieved from http://csmres.jmu.edu

Gautam, P., & Patel, R.(2014). *Artocarpus lackoocha* Roxb. *European Journal of Complementary and Alternative Medicine*, *1*(1), 10-14.

Gupta, A. (2016). *Nanoemulsions formation, properties and application*. Retrieved from http://pub s.rsc.org

Hoffman, M. (2016). *Skin structure and function review*. Retrieved from https://www.webmd. com

Khandavilli, S., & Panchagnula, R. (2007). Nanoemulsions as Versatile Formulations for Paclitaxel Delivery: Peroral and Dermal Delivery Studies in Rats. *Journal of Investigative Dermatology*, *127* (1), 154-162.

Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B., & Ploypradith, P. (2006). Chemical transforma tion of oxyresveratrol (*trans-2,4,3',5'*-tetrahydroxystibene) into a potent tyrosinase inhibitor and strong cytotoxic agent. *Bioorg.Med.Chem.Lett*, *16*(21), 5650-5653.

Pongpan, A., Chumsri, P., & Taworasate, T. (1982). The antimicrobial activity of some Thai medicinal plants. *J. Pharm. Sci*. 9, 88-91.

Povichit, N., Phrutivorapongkul, A., Suttajit, M., & Leelapornpisid, P. (2010). Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Maejo Int. J. Sci. Technol*, *4*(03), 454-461.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม (ต่อ)

Rangsimawong, W., & Gawhirunpat, T. (2014). Nanoemulsions in transdermal drug delivery system. *TBPS, 9*(2), 46-61.

Schwarz, J. S., Weisspapir, M. R., & Friedman, D. I. (1995). Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. *Pharm Res*, *12*(5), 687-92.

Singhatong, S., Leelarungrayub, D., & Chaiyasut, C. (2010). Antioxidant and toxicity activities of Artocarpus lakoocha Roxb. *heartwood extract. Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(10), 947-953.

Shailendra, K., Bharath, A. C., Rakshitha, M. N., & Nandini, K. C. (2010). Screening of selected biological activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb (MORACEAE) fruit pericarp. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, *1*(4), 239-245.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., & Azemar, N. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *3*(10), 102 – 110.

Sonneville, A., Simonnet, J.T., & Alloret, F. (2004). Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci*, *108*(1), 145-9.

Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., & Likhitwitayawuid, K. (2006). Artocar pus lakoocha heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in *vitro* anti-tyrosinase and in *vivo* skin whitening activities. *Int J.Cosm. Sci*, *28*(4), 269-276.

Wachiranuntasin, K. (2005). Evaluation of stability, antioxidative and free radical scavenging activities of *Artocarpus lakoocha* heatwood extract (Unpublished Master's Thesis). Chulalongkorn University, Bangkok.

Yilmaz, E., & Borchert, H. H. (2006). Effect of lipid-containing, positively charged nanoemul sions on skin hydration, elasticity and erythema-an in vivo study. *Int J Pharm*, *7*(2), 8-232.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

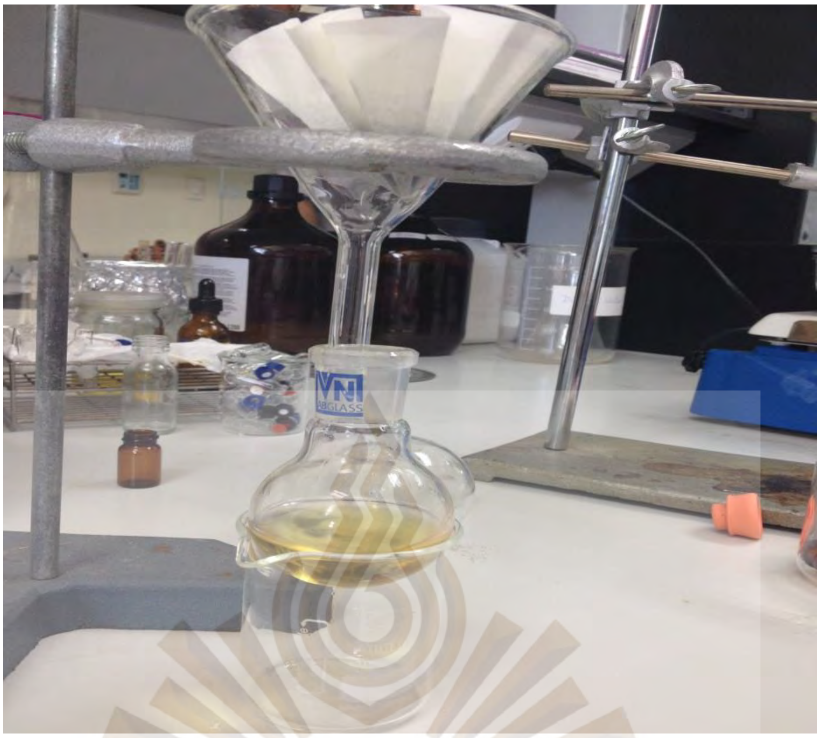
ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การสังเคราะห์สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล ด้วย Condenser

การสังเคราะห์สารวัดอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1

ระเหยสารละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การ Pack Column สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

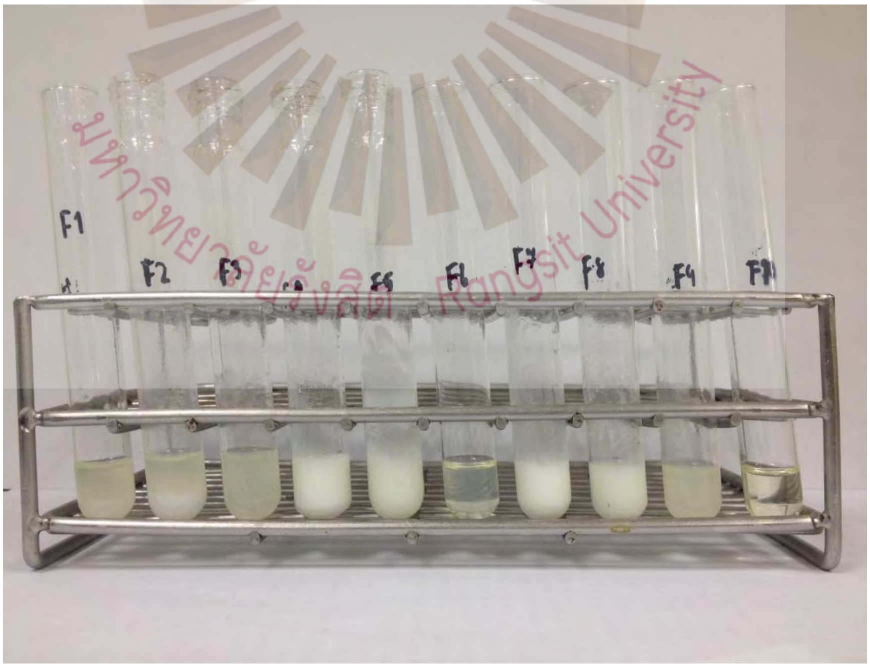
หลอดทดลองที่แยกสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

ระเหยสารละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

ได้สารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อุปกรณ์ในการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชัน



ทำการผสมอัตราส่วนของน้ำมันระเหย, สารลดแรงตึงและน้ำตามอัตราส่วน

ของเฟสไดอะแกรมโดยใช้เครื่อง Vortex Mixer

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทำการปั่นลดขนาดด้วยเครื่อง

บันทึกผลลักษณะทางกายภาพทันทีและหลังตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Nano Plus

ทดสอบการซึมผ่าน Franz Diffusion Cells

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ วราภรณ์ ชัยนฤมล

วันเดือนปีเกิด 29 มีนาคม 2534

สถานที่เกิด สระแก้ว ประเทศไทย

ประวัติการศึกษา มหาวิทยาลัยรังสิต

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนตะวันออก, 2556

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนตะวันออก, 2560

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 79/40 หมู่ที่ 4 ตำบลบางหลวง อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University